การบำบัดทางชีวภาพของน้ำอับเฉาเรือที่ปนเปื้อนน้ำมัน
โดย *Candida* sp. JC4 ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน

นายธีรยุทธ วงษ์จิตรพิมล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOREMEDIATION OF OIL CONTAMINATED BALLAST WATER BY *Candida* sp. JC4

IMMOBILIZED ON POLYURETHANE FOAM

Mr Teerayut Wongchitphimon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การบำบัดทางชีวภาพของน้ำอับเฉาเรือที่ปนเปื้อนน้ำมัน *Candida* sp. JC4 ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน
โดย	นายธีรยุทธ วงษ์จิตรพิมล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. อรมาศ สุทธินุ่น)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธีรยุทธ วงษ์จิตรพิมล : การบำบัดทางชีวภาพของน้ำอับเฉาเรือที่ปนเปื้อนน้ำมันโดย *Candida* sp. JC4 ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน (BIOREMEDIATION OF OIL CONTAMINATED BALLAST WATER BY *Candida* sp. JC4 IMMOBILIZED ON POLYURETHANE FOAM) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย, 113 หน้า.

การปล่อยน้ำอับเฉาเรือของเรือประมงซึ่งมีน้ำมันปิโตรเลียมปนเปื้อนก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางน้ำได้ งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีการบำบัดน้ำอับเฉาเรือ โดยใช้ยีสต์ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน ทั้งนี้การตรึงเซลล์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและการอยู่รอดของยีสต์ โดยการทดลองขั้นแรกได้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Seawater (NSW) ผลการทดลองพบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดีกว่าเซลล์อิสระ โดยมีปริมาณน้ำมันคงเหลือ 63 % และ 79 % ตามลำดับ หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน และพบว่าเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานได้ดีกว่าน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว การปรับปริมาณสารอาหารให้เหมาะสม คือที่อัตราส่วน C/N/P เท่ากับ 100/7.5/1 ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงได้ นอกจากนี้สามารถนำเซลล์ตรึงไปใช้ซ้ำได้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 17 วัน การศึกษาในขั้นต่อมาได้ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำอับเฉาเรือที่เก็บมาจากท่าเรือประมง จังหวัดจันทบุรี ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าเซลล์ตรึงย่อยสลายน้ำมันได้ดีในชุดทดลองที่ปรับอัตราส่วน C/N/P ในน้ำอับเฉาเรือเป็น 100/7.5/1 โดยมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่เพียง 43 % จากความเข้มข้นน้ำมันเริ่มต้นประมาณ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำเซลล์ตรึงไปบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็ก ที่จังหวัดจันทบุรี โดยทำการศึกษาเบื้องต้นเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าปริมาณน้ำมันมีแนวโน้มลดลง และจำนวนจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันทั้งที่อยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนและในน้ำอับเฉาเรือ มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนมีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายน้ำมันเครื่อง และสามารถนำไปใช้เพื่อลดปริมาณน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือได้

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ธีรยุทธ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....

ปีการศึกษา 2553

5172321823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : Petroleum degradation / *Candida* / Immobilization / Polyurethane foam

TEERAYUT WONGCHITPHIMON : BIOREMEDIATION OF OIL CONTAMINATED BALLAST WATER BY *Candida* sp. JC4 IMMOBILIZED ON POLYURETHANE FOAM. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., 113 pp.

The releasing of petroleum contaminated ballast water from fishing boats can cause water pollutions. This research aimed to develop a technique for ballast water treatment by using *Candida* sp. JC4 immobilized on polyurethane foam (PUF). The immobilization could improve oil-degrading activity and survival of the yeasts. At the beginning, the efficiency of lubricant oil degradation at the initial concentration of 200 mg/L was studied in Nutrient Seawater (NSW) medium. The PUF-immobilized cells had higher oil-degrading ability than free cells and the remaining amounts of oil were at 63 % and 79 %, respectively after 7-day incubation. In addition, the PUF-immobilized cells and free cells degraded fresh oil better than used oil. Nutrient adjustment to the C/N/P ratio of 100/7.5/1 also increased the oil-degrading efficiency of the immobilized cells. In addition, the PUF-immobilized cells could be used repeatedly and continuously for 17 days. In the following study, the efficiency of immobilized cells was investigated in laboratory with ballast water collected from a fishery port in Chantaburi Province.The immobilized cells effectively degraded oil in the experiment that adjusted the C/N/P ratio in ballast water to 100/7.5/1. The amount of remaining oil was only 43% of the initial oil concentration (~150 mg/L). The immobilized cells were later applied to treat oil-contaminated ballast water in a small fishing boat at Chantaburi Province for 3 days. The preliminary results showed that the amount of oil tended to decrease and the oil-degrading microorganisms, both on polyurethane foam and in ballast water, were increased significantly. In summary, *Candida* sp. JC4 immobilized on polyurethane foam had high efficiency in lubricant oil degradation and it could be applied for reduction of oil in contaminated ballast water.

Department : Microbiology	Student's Signature Teerayut
Field of Study : Industrial Microbiology	Advisor's Signature Ekawan
Academic Year : 2010	

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำแนะนำ ถ่ายทอดความรู้ต่างๆ ได้ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง และอาจารย์ ดร.อรมาศ สุทธินุ่น เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณจิรภัทร จันทมาลี ที่คอยให้คำปรึกษา และคำแนะนำที่ดีต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณจอน ผาหนองลิง ที่ให้การอนุเคราะห์เรือประมงในการทำวิจัย

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย ที่ให้การอนุเคราะห์ในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ ตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคน และพี่ๆ น้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาที่เป็นแรงบันดาลใจ และกำลังใจในการศึกษาตลอดมา รวมถึงคอยสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย..	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..	จ
กิตติกรรมประกาศ...	ฉ
สารบัญ..	ช
สารบัญตาราง...	ฎ
สารบัญภาพ..	ฐ
สัญลักษณ์และคำย่อ...	ด
บทที่	
1. บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา...	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..	5
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..	5
2. ปริทัศน์วรรณกรรม	
2.1 ปัญหาของน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเล..	6
2.1.1 น้ำอับเฉาเรือ	7
2.1.2 น้ำมันเครื่อง…………………...	12
2.1.3 ชนิดและองค์ประกอบของน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเล……………	14
2.2 การบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล…………………………………..	16
2.2.1 วิธีทางกายภาพ …………………………………………………..	17
2.2.2 วิธีทางเคมี..	17
2.2.3 วิธีทางชีวภาพ...	18
2.3 ยีสต์ย่อยสลายน้ำมัน………………………………...........................	19
2.3.1 วิถีการย่อยสลายน้ำมันของของยีสต์………………………..…..	20
2.4 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์………………………………...........................	21
	22

บทที่ หน้า

2.5 โฟมพอลิยูรีเทน.. 23

2.5.1 ประโยชน์ของโฟมพอลิยูรีเทน………………………………........…. 25

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันในทะเล……………….…………… 26

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง... 28

เคมีภัณฑ์…………………………………………………….………………..… 29

วิธีดำเนินงานวิจัย.. 30

3.1 ภาพรวมของการดำเนินงานวิจัย.. 30

3.2 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยง

เชื้อ NSW ด้วย *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน…………..… 32

3.2.1 การเตรียมเซลล์ตรึง…………………………………………..…….… 32

3.2.1.1 ยีสต์ที่ใช้ในการวิจัย………………………………….. 32

3.2.1.2 การเพาะเลี้ยง *Candida* sp. JC4 และการ

เตรียมหัวเชื้อ…………………………………….…… 32

3.2.1.3 การเตรียมโฟมพอลิยูรีเทนสำหรับตรึงเซลล์………… 33

3.2.1.4 การตรึงเซลล์บนโฟมพอลิยูรีเทน……………….…….. 33

3.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึง

บนโฟมพอลิยูรีเทน………………………………………….…………….. 34

3.3.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันระหว่างเซลล์ตรึง

และเซลล์อิสระ……………………………………………...……… 34

3.3.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้

ใช้งานและผ่านการใช้งานแล้วระหว่างเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ.. 35

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายน้ำมัน…………………………………………………………. 36

3.3.4 การหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสม………………………… 37

3.3.5 การวิเคราะห์เซลล์ตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน………... 39

3.4 พัฒนาวิธีบำบัดน้ำอับเฉาเรือด้วย *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน…………………………………………………… 39

3.4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำอับเฉาเรือ………………………... 39

3.4.2 การทดสอบปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมกับน้ำอับเฉาจากเรือต่างๆ……………………………………………………... 41

3.4.3 ศึกษาการนำ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนไปบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมง……………………………… 41

3.5 วิธีการวิเคราะห์……………………………………………………… 43

3.5.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน………………………………………... 43

3.5.2 วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั่วไป และจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมัน…………………………………………………………... 44

3.5.3 วิเคราะห์จำนวนยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน……………… 44

3.5.4 วิเคราะห์จำนวนยีสต์ที่หลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทน……..... 45

4. ผลการทดลอง

4.1 การตรึง *Candida* sp. JC4 บนโฟมพอลิยูรีเทน……………………….. 46

4.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วย *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน……………… 47

4.2.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ.... 47

4.2.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานและผ่านการใช้งานแล้วระหว่างเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ…………………………………………………….. 51

4.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายน้ำมัน…………………………………………………… 56

4.2.4 การหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสม……………………….. 58

บทที่	หน้า
4.3 พัฒนาวิธีบำบัดน้ำอับเฉาเรือด้วย *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน	63
4.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำอับเฉาเรือ	63
4.3.2 การทดสอบปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมกับน้ำอับเฉาจากเรือต่างๆ	65
4.3.3 ศึกษาการนำ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนไปบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมง	70
5. วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง	
5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง	76
5.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป	83
รายการอ้างอิง	84
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	91
ภาคผนวก ข	93
ภาคผนวก ค	94
ภาคผนวก ง	96
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	113

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	จำนวนท่าเทียบเรือประมง สะพานปลา และแพปลา แยกตามประเภทของผู้ดำเนินกิจการ..........	10
2.2	ลักษณะน้ำเสียจากกิจกรรมท่าเทียบเรือประมงฯ..........	11
2.3	ค่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง..........	11
2.4	สมบัติจำเพาะของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ดีเซล (Lubricant oil) รุ่น PTT SEATECH 5000..........	13
2.5	การตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนโฟมพอลิยูรีเทน..........	25
4.1	สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน..........	50
4.2	สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานและใช้งานแล้ว ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ หลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 วัน..........	56
4.3	สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่อง ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ ที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร หลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 วัน..........	63
4.4	องค์ประกอบของน้ำอับเฉาเรือ..........	64
4.5	องค์ประกอบของน้ำมันตามเดือนที่เก็บตัวอย่าง..........	65
4.6	สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่อง ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงในน้ำอับเฉาเรือที่ปรับปริมาณสารอาหาร หลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 วัน..........	70
4.7	แสดงกิจกรรมต่างๆ ที่เกิดขึ้นใน 1 วันของเรือประมงขนาดเล็กในวันที่ 22 ถึง 24 เดือนสิงหาคม 2553..........	73
5.1	สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงในสภาวะต่างๆ..........	80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง		หน้า
ง.1	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของการย่อยสลายน้ำมันที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW เป็นเวลา 7 วัน..........................	96
ง.2	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของการย่อยสลายน้ำมันที่ยังไม่ใช้งานและใช้งานแล้วที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW เป็นเวลา 5 วัน..	100
ง.3	ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เหลืออยู่ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้นเริ่มต้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW ในการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 17 วัน..	104
ง.4	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW ที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร C/N/P เป็นเวลา 5 วัน......	105
ง.5	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการบำบัดน้ำอับเฉาเรือที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร เป็นเวลา 5 วัน...	107
ง.6	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในส่วนของน้ำอับเฉาเรือของการบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็กด้วยเซลล์ตรึง ระหว่างการบำบัดเป็นเวลาประมาณ 3 วัน..	110
ง.7	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในส่วนของโฟมพอลิยูรีเทนของการบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็กด้วยเซลล์ตรึง ระหว่างการบำบัดเป็นเวลาประมาณ 3 วัน...	112

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างการแพร่กระจายของน้ำมันเป็นแผ่นฟิล์มบนผิวน้ำ...........................	6
2.2	กลไกการปล่อยน้ำอับเฉาเรือของเรือขนส่งสินค้าขนาดใหญ่................................	7
2.3	ลักษณะของเรือประมงขนาดเล็กที่ท่าเทียบเรือประมง จ. จันทบุรีและการปล่อยน้ำอับเฉาเรือของเรือประมงขนาดเล็ก..	8
2.4	ขั้นตอนการดำเนินงานของชาวประมงที่ท่าเทียบเรือประมง............................	9
2.5	น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ดีเซล (Lubricant oil) รุ่น PTT SEATECH 5000..........	12
2.6	องค์ประกอบของน้ำมันดิบจำแนกตามโครงสร้าง..	15
2.7	แสดงคุณสมบัติของน้ำมันและโครมาแกรมของน้ำมันซึ่งแยกโดยเครื่อง TLC – FID..	16
2.8	การกำจัดน้ำมันด้วยวิธีทางกายภาพ..	17
2.9	การกำจัดน้ำมันด้วยวิธีทางเคมี..	18
2.10	วิถีการย่อยสลายอัลเคนโดยยีสต์...	21
2.11	ลักษะการตรึงเซลล์แบบการเกาะติด (Attachment หรือ Adsorp) (a) และการกักขัง (Entrapment) (b)...	22
2.12	โฟมพอลิยูรีเทน (PUF)..	24
2.13	สูตรโครงสร้างทางเคมีของโฟมพอลิยูรีเทน..	24
3.1	แผนผังการดำเนินงานวิจัย...	30
3.2	โฟมพอลิยูรีเทนหลังจากตรึงเซลล์..	33
3.3	น้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งาน (a) น้ำมันที่ใช้งานแล้ว (b).................................	36
3.4	ส่วนที่ 1 สำหรับนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมด โดยประกอบด้วยเซลล์ตรึงและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ทีมีน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 ppm..	37
3.5	ส่วนที่ 2 สำหรับการกรองเซลล์ตรึงนำกลับไปใช้ซ้ำ โดยประกอบด้วยเซลล์ตรึงและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ทีมีน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 ppm ที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว จากนั้นกรองเซลล์ตรึงใส่ลงไปในฟลาสก์ใหม่ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับการทดลองเริ่มต้น..	37

รูปที่		หน้า
3.6	ตัวอย่างลักษณะของเรือประมงขนาดเล็กที่ใช้ในงานวิจัยนี้…………………..…….	39
3.7	ลักษณะห้องอับเฉาเรือใต้ท้องเรือ…………………………………………………...	40
3.8	การปล่อยน้ำอับเฉาเรือของเรือประมง……………………………………………	40
3.9	เซลล์ยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนที่บรรจุอยู่ในตาข่าย……………..………….	42
3.10	เซลล์ตรึงที่ปล่อยในน้ำอับเฉาเรือบริเวณใต้ท้องเรือในเรือประมงขนาดเล็ก……..….	43
4.1	จำนวนยีสต์ที่เกาะอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน (มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมโฟม) เป็นเวลา 5 วัน…………………………………………………………….	46
4.2	เซลล์ตรึงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนก่อนการนำไปใช้บำบัดน้ำมัน : โฟมพอลิยูรีเทนไม่มีเซลล์ตรึง (a) กำลังขยาย 200 เท่า และ โฟมพอลิยูรีเทนที่มีเซลล์ตรึงเกาะ (b-c) ที่กำลังขยาย 200 500 และ 1,000 เท่า ตามลำดับ……………..……	47
4.3	ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (a) และจำนวนยีสต์ในระบบ (Log CFUต่อชุดการทดลอง) (b) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน……………………………………………….....	48
4.4	ปริมาณ saturate ที่เหลืออยู่ (%) (a) ปริมาณ aromatic ที่เหลืออยู่ (%) (b) ปริมาณ Resin ที่เหลืออยู่ (%) (c) และปริมาณ asphaltene ที่เหลืออยู่ (%) (d) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน……………………………………………………………..…….	50
4.5	ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (a) จำนวนยีสต์ในระบบ Fresh oil (b) และจำนวนยีสต์ในระบบ Used oil (Log CFUต่อชุดการทดลอง)(c) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ใช้งานและใช้งานแล้วความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน………………………………………………….	53
4.6	ปริมาณ saturate ที่เหลืออยู่ (%) (a) ปริมาณ aromatic ที่เหลืออยู่ (%) (b) ปริมาณ Resin ที่เหลืออยู่ (%) (c) และปริมาณ asphaltene ที่เหลืออยู่ (%) (d) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ใช้งานและใช้งานแล้ว ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน……….……………….……..	55
4.7	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมดหลังจากเติมน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกๆ 2 วัน (ลูกศรแสดงเวลาที่เติมน้ำมัน) ในระบบที่มีการใช้เซลล์ตรึงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 17 วัน……………………………………………	57

รูปที่		หน้า
4.8	เซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 9 วัน (a - b) และ 17 วัน (c - d) ที่กำลังขยาย 500 และ 1,000 เท่า ตามลำดับ..	58
4.9	ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (a) จำนวนยีสต์บน PUF-Immobilized cells (b) และจำนวนยีสต์ที่หลุดจาก PUF-Immobilized cells (c) (Log CFUต่อชุดการทดลอง) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน..	60
4.10	ปริมาณ saturate ที่เหลืออยู่ (%) (a) ปริมาณ aromatic ที่เหลืออยู่ (%) (b) ปริมาณ Resin ที่เหลืออยู่ (%) (c) และปริมาณ asphaltene ที่เหลืออยู่ (%) (d) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ปรับปริมาณสารอาหาร เป็นเวลา 5 วัน..	62
4.11	ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (a) จำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยน้ำมัน (b) และจำนวนจุลินทรีย์ทั่วไป (c) (Log CFUต่อชุดการทดลอง) ในการบำบัดน้ำอับเฉาเรือที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร เป็นเวลา 5 วัน....................	67
4.12	ปริมาณ saturate ที่เหลืออยู่ (%) (a) ปริมาณ aromatic ที่เหลืออยู่ (%) (b) ปริมาณ Resin ที่เหลืออยู่ (%) (c) และปริมาณ asphaltene ที่เหลืออยู่ (%) (d) ในน้ำอับเฉาเรือที่ปรับปริมาณสารอาหาร เป็นเวลา 5 วัน............................	69
4.13	บริเวณใต้ท้องเรือในห้องอับเฉาเรือของเรือประมง หลังจากที่เติมเซลล์ตรึงที่บรรจุอยู่ในตาข่าย..	71
4.14	ลักษณะของโฟมพอลิยูรีเทนที่ผ่านการบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือซึ่งเก็บขึ้นมาจากห้องอับเฉาเรือบริเวณใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็กสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน..	72
4.15	ลักษณะของน้ำอับเฉาเรือที่นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน............................	72
4.16	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในส่วนของน้ำอับเฉาเรือ (a) (มิลลิกรัมต่อลิตร) และปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ที่เกาะอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน (b) (มิลลิกรัมต่อกรัมโฟม) ของการบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็กด้วยเซลล์ตรึง ระหว่างการบำบัดเป็นเวลาประมาณ 3 วัน..	74

รูปที่		หน้า
4.17	จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็ก (log CFUต่อมิลลิลิตร) และจำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน (log CFUต่อกรัมโฟม) ระหว่างการบำบัดเป็นเวลาประมาณ 3 วัน…………………………………………………...	75
ค.1	กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของน้ำมันเครื่อง……………………………………...	94
ค.2	โครมาโตแกรมของน้ำมัน…………………………………………………………	95

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

OD_{600}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
%	=	เปอร์เซ็นต์
:	=	อัตราส่วนต่อ
x	=	เท่าทวีคูณ
CFU	=	colony forming unit
ppm	=	part per million (หนึ่งส่วนในล้านส่วน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันการปนเปื้อนของน้ำมันในทะเลก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก เมื่อน้ำมันปนเปื้อนในน้ำทะเลจะเกิดการแพร่กระจายของคราบน้ำมันเป็นแผ่นฟิล์มบริเวณผิวหน้าน้ำส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลแล้วทำให้เสียสมดุลของระบบนิเวศ (Nagata และคณะ, 1978) ซึ่งการปนเปื้อนน้ำมันในน้ำทะเลมาจากการคมนาคมขนส่งทางทะเล รวมทั้งเกิดจากอุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมันจากเรือขนส่งสินค้าเอง และการเติมน้ำมันของเรือในบริเวณท่าเรือ (Saltzmann, 1982; Prince และคณะ, 2003) นอกจากนี้ปัญหาของการปนเปื้อนน้ำมันในทะเลที่เป็นปัญหาสำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ การปนเปื้อนจากน้ำอับเฉาเรือ ซึ่งน้ำอับเฉาเรือเป็นน้ำที่เก็บไว้ในห้องอับเฉาเรือและห้องบรรทุกสินค้าของเรือ น้ำจะถูกใช้เพื่อรักษาสมดุลของเรือในระหว่างการเดินทางเมื่อเรือไม่มีสินค้าบรรทุกหรือบรรทุกสินค้าที่มีน้ำหนักไม่เพียงพอ เมื่อเรือมีการบรรทุกสินค้าก็จะปล่อยน้ำอับเฉาลงในทะเล เพราะมีน้ำหนักของสินค้าเข้าแทนที่ ซึ่งพบว่าเรือขนส่งสินค้าอาจจะมีน้ำอับเฉาเรือถึง 15,000 ตันต่อลำ และในหนึ่งปีทั่วโลกจะมีน้ำอับเฉาเรือจากเรือขนส่งสินค้าสูงถึงหนึ่งหมื่นล้านตันต่อปี ในปัจจุบันหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้ร่วมมือกันทำข้อตกลงเพื่อควบคุมปัญหาดังกล่าวโดยจะออกเป็นกฎข้อบังคับในการปล่อยน้ำอับเฉาเรือลงสู่ทะเล (Hua และคณะ, 2008) ในประเทศไทยก็พบว่าแหล่งกำเนิดมลพิษทางทะเลสาเหตุหนึ่งเกิดจากการเดินเรือ การทำประมงและเรือประมงที่ท่าเทียบเรือบริเวณชายฝั่งทะเล ซึ่งมีการถ่ายน้ำมันเครื่องและการระบายน้ำอับเฉาเรือ (กรมควบคุมมลพิษ, 2550) นอกจากนี้บริเวณท่าเทียบเรือประมงและสะพานปลาจำนวน 735 แห่ง ในประเทศไทยมีการปล่อยน้ำเสียที่เกิดจากขนถ่ายสัตว์น้ำและการล้างทำความสะอาดเรือลงในทะเล ซึ่งจากการสำรวจคุณภาพน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมงฯ ทั่วประเทศในปี 2543 พบว่าน้ำเสียมีค่าบีโอดีอยู่ในช่วง 46-12,780 มก./ล. ค่าสารแขวนลอยทั้งหมดอยู่ในช่วง 60-5,875 มก./ล. TKN อยู่ในช่วง 0-1,059 มก./ล. รวมทั้งน้ำมันและไขมันอยู่ในช่วง 3-1,779 มก./ล. ซึ่งค่าต่างๆ เหล่านี้มีเกณฑ์สูงกว่า ค่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง (กรมควบคุมมลพิษ, 2551)

ชนิดของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นประเภท น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันหล่อลื่น และน้ำมันเครื่องยนต์ ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเหล่านี้เป็นสารประกอบ

ไฮโดรคาร์บอนที่มีลักษะคงตัว (Kevin และ Stallwood, 2006) เมื่อเกิดการปนเปื้อนของน้ำมันในทะเล วิธีการแรกในการกำจัดและบำบัดจะใช้วิธีทางกายภาพและทางเคมี เช่น ใช้แรงคนในการตักคราบน้ำมันออกจากพื้นที่ ใช้ความร้อน ใช้สารเคมีทำให้น้ำมันเกิดการแตกตัว เป็นต้น แต่วิธีการเหล่านี้ใช้ได้ในบริเวณที่จำกัดและไม่สามารถกำจัดน้ำมันได้หมด อีกทั้งยังส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้ที่ทำการบำบัด สิ่งมีชีวิตต่างๆ ในทะเล และค่าใช้จ่ายในการบำบัดค่อนข้างสูงอีกด้วย (Taki และคณะ, 2003; Prince และคณะ, 2003) จึงมีงานวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับการบำบัดพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนน้ำมันโดยใช้วิธีทางชีวภาพ เนื่องจากวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายในการบำบัดไม่สูงมาก และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิธีทางกายภาพและทางเคมี ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย รา และยีสต์ หลากหลายชนิด มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน โดยใช้น้ำมันเป็นแหล่งอาหารและพลังงาน (Taki และคณะ, 2003; Michaud และคณะ, 2004; Hii และคณะ, 2009)

งานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายน้ำมันด้วยแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามมีรายงานของ Ijah (1998) ซึ่งเปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำมันดิบระหว่าง *Serratia marcescens* OCS-21, *Acinetobacter calcoaceticus* COU-27 และ *Candida tropicalis* PFS-95 พบว่า *Candida tropicalis* PFS-95 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในดินที่ความเข้มข้น 1 % ได้ถึง 68.9 % ในขณะที่แบคทีเรียได้แก่ *Serratia marcescens* OCS-21 และ *Acinetobacter calcoaceticus* COU-27 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ความเข้มข้น 1 % ได้เพียง 51.5 % และ 45.5% ตามลำดับ หลังจากผ่านไป 16 วัน นอกจากนี้ Zinjarde และ Pant (2002) ได้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์บริเวณทะเลในเขตร้อนชื้นที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน พบยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. intermedia*. และ *Y. lipolytica* ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1% ได้สูงถึง 78 % หลังจากผ่านไป 5 วัน รวมทั้งการศึกษาของ Hua และคณะ (2003) พบว่า *Candida Antarctica* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ และสามารถย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมโดรคาร์บอนประเภทอัลเคนที่ความเข้มข้น 8 % ได้สูงถึง 82.3±5.6 % เมื่อเวลาผ่านไป 6 วัน

Craft และคณะ (2003) รายงานว่าการเมแทบอลิซึมของสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนประเภทอัลเคนของยีสต์ เกิดผ่านวิถีเบต้า-ออกซิเดชันและโอเมก้า-ออกซิเดชัน โดยการทำงานร่วมกันของไซโตโครม P450 โมโนออกซิจีเนส และไซโตโครม P450 รีดักเทส รวมทั้ง

แอลกอฮอล์ออกซิเดสและอัลดิไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น พลังงาน คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำ *Candida* sp. JC 4 ที่คัดแยกมาจากบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน จังหวัดจันทบุรี โดยจิรภัทร จันทมาลี (ข้อมูลไม่เผยแพร่) ซึ่งพบว่ามีความสามารถย่อยสลายน้ำมันได้หลายชนิด เช่น น้ำมันเครื่อง น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ นอกจากนี้มีค่า Hydrophobicity 83.6 % ซึ่งค่านี้หมายถึง ผิวของเซลล์ที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ซึ่งมีค่าสูงจะทำให้เซลล์ยึดติดกับน้ำมันและผิวของวัสดุตรึงได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ 93.2 % ซึ่งสารนี้เกี่ยวข้องกับการรวมตัวกันของเซลล์บนผิววัสดุตรึง รวมทั้งมีความสามารถในการก่ออิมัลชัน (ค่า E_{24} เท่ากับ 40 %) ซึ่งจะทำให้น้ำมันแตกตัวเป็นเม็ดที่มีขนาดเล็กลงทำให้เซลล์จับกับหยดน้ำมันได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามมีข้อจำกัดบางประการที่อาจส่งผลต่อการทำงานและการอยู่รอดของยีสต์ เช่น การปนเปื้อนของน้ำมันปริมาณสูงในน้ำทะเล ทำให้มีความเป็นพิษสูงและเป็นข้อจำกัดในการใช้ยีสต์ในการบำบัด ดังนั้นจึงอาจแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าวด้วยการตรึงเซลล์บนวัสดุ เนื่องจากการตรึงเซลล์จุลินทรีย์เป็นการคุ้มกันให้กับเซลล์ ทำให้เซลล์ทนต่อสารเคมี และสารพิษที่มีความเข้มข้นสูงในสภาพแวดล้อมได้ (Parameswarappa และคณะ, 2008; Chu และคณะ, 2009)

Cunningham และคณะ (2004) และ Dursun และ Tepe (2005) รายงานว่าการตรึงเซลล์จุลินทรีย์จะช่วยป้องกันเซลล์จุลินทรีย์จากน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง และจากสภาวะต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ ทำให้มีการทำงานที่ดีขึ้น รวมทั้งการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ยังสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ การตรึงเซลล์จุลินทรีย์มีอยู่สองลักษณะคือ (1) การเกาะติดของเซลล์บนผิววัสดุตรึง (attachment) (2) การทำให้เซลล์ติดอยู่ในช่องว่างของวัสดุตรึง (entrapment) (Scott, 1987) วัสดุที่จะนำมาใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์มีอยู่หลายชนิด เช่น อัลจิเนต คาราจีแนน รวมทั้งโฟมพอลิยูรีเทน ซึ่งโฟมพอลิยูรีเทนเป็นที่นิยมมากในการนำไปใช้สำหรับการตรึงเอนไซม์และการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีที่คงตัวแข็งแรง ทนต่อสารละลายที่เป็นกรด-ด่าง ไม่เกิดปฏิกิริยากับเซลล์ที่ตรึง นอกจากนี้โฟมพอลิยูรีเทนยังมีลักษณะที่เป็นรูพรุนจำนวนมาก จึงช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวและเพิ่มการแพร่เข้าออกของสารต่างๆ ได้ดี (Romaskevic และคณะ, 2006) ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกว่าการใช้อัลจิเนตและคาราจีแนนในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ จากรายงานของ Jaime และคณะ (2009) รายงานว่า การตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนโฟมพอลิยูรีเทน เป็นการตรึงเซลล์ในลักษณะการเกาะติดของเซลล์บนผิววัสดุตรึง โดยอาศัยคุณสมบัติของผิวเซลล์กับผิวของวัสดุตรึงหรือเกิดพันธะเคมี

ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายเรื่องที่นำการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนโฟมพอลิยูรีเทนไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย จากงานวิจัยของ Oh และคณะ (2000) ได้ทำการทดลองตรึง *Yarrowia lipolytica* 180 บนโฟมพอลิยูรีเทน เพื่อย่อยสลายน้ำมันที่กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบนผิวหน้าน้ำทะเล พบว่ามีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันได้ดี ทั้งนี้พบว่าโฟมพอลิยูรีเทนสามารถดูดซับน้ำมันที่ลอยอยู่บนผิวหน้าน้ำทะเลได้ถึง 7-9 เท่าของน้ำหนักโฟม และมีความคงทนสามารถลอยอยู่ในน้ำทะเลได้นานกว่า 6 เดือน อย่างไรก็ตาม Venosa และคณะ (2003) รายงานว่าน้ำทะเลในธรรมชาติจะมีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสค่อนข้างต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมีผลต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล ทั้งนี้เมื่อเกิดการปนเปื้อนของน้ำมันในน้ำทะเล จะทำให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและฟอสฟอรัสลดลง และมีปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน (Harayama และคณะ, 2004; Hii และคณะ, 2009) จากรายงานของ Bartha (1986) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่ออัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล หลังจากผ่านไปสามสัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่เติมแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต 20 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นแหล่งของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส มีอัตราการย่อยสลายน้ำมัน 63 % ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่เติมแอมโมเนียมฟอสเฟตมีอัตราการย่อยสลายน้ำมันเพียง 40 % เท่านั้น นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Atlas และคณะ (1981) รายงานว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) และ คาร์บอนต่อฟอสฟอรัส (C/P) คือ 10:1 และ 100:1 ตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ด้วย

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่ามีการศึกษาค่อนข้างน้อยเกี่ยวกับการใช้ยีสต์ในการบำบัดการปนเปื้อนของน้ำมันในน้ำทะเล ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันของยีสต์ และนำข้อดีของการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนโฟมพอลิยูรีเทนมาประยุกต์ใช้ในการผลิต *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน เพื่อบำบัดน้ำอับเฉาเรือที่ปนเปื้อนน้ำมันของเรือประมงขนาดเล็ก รวมทั้งศึกษาปริมาณของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายน้ำมันให้ดียิ่งขึ้น ทั้งนี้ผู้วิจัยได้นำผลจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการไปทดสอบเบื้องต้นกับน้ำทะเลในห้องอับเฉาเรือใต้ท้องเรือประมง ซึ่งข้อมูลที่ได้รับจะช่วยในการพัฒนาวิธีทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและมีราคาถูก สำหรับลดปริมาณน้ำมันปิโตรเลียมที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมบริเวณท่าเรือประมงได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน ในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW

2. หาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมที่ส่งเสริมประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมโดยใช้ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน

3. ศึกษาการนำ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน ไปบำบัดน้ำอับเฉาเรือที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในเรือประมงขนาดเล็ก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถใช้ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน เพื่อลดปริมาณน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือ

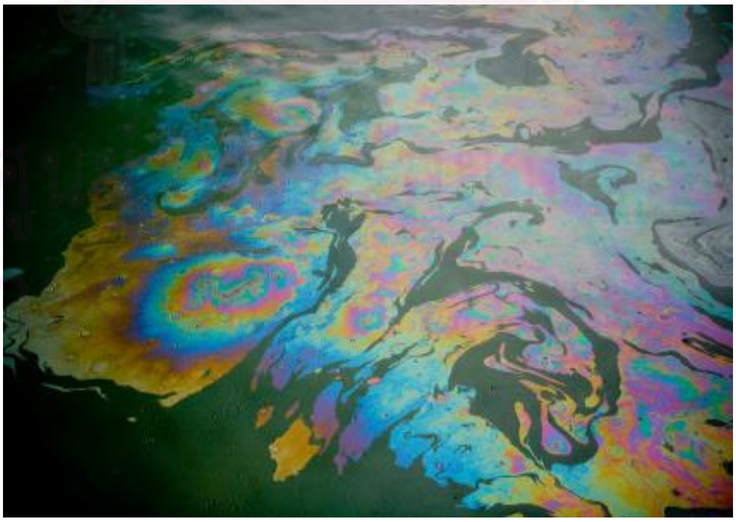
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ปัญหาของน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเล

ปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันในทะเลก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก โดยคราบน้ำมันจะกระจายเป็นแผ่นฟิล์มปกคลุมผิวหน้าน้ำ แล้วขัดขวางการถ่ายเทของก๊าซออกซิเจนจากอากาศสู่น้ำ (รูปที่ 2.1) ทำให้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลขาดออกซิเจน รวมทั้งปิดกั้นแสงแดดที่จะส่องลงไปใต้น้ำ ซึ่งพืชจำเป็นต้องใช้ในการสังเคราะห์แสง ส่งผลเสียต่อระบบนิเวศ นอกจากนี้ความเป็นพิษของน้ำมันยังทำให้สัตว์น้ำตายได้อย่างเฉียบพลัน หรือเกิดการสะสมในตัวของสัตว์น้ำ บางกรณีคราบน้ำมันในทะเลจะถูกพัดเข้ามายังชายฝั่งทะเล ทำให้บริเวณชายหาดเกิดคราบน้ำมันสะสมส่งผลกระทบต่อการท่องเที่ยว การปนเปื้อนของน้ำมันในทะเลเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การคมนาคมขนส่งสินค้าของเรือในทะเล การเกิดอุบัติเหตุการชนกันของเรือ การขุดเจาะก๊าซธรรมชาติ การทำปล่อยน้ำทิ้งจากชุมชน และปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันในทะเล สาเหตุที่สำคัญอีกอย่าง คือ การปล่อยน้ำอับเฉาเรือบริเวณท่าเรือของชาวประมง จะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนของน้ำมันในทะเลเป็นปัญหาที่สำคัญและควรได้รับการแก้ไข เพื่อรักษาสภาพแวดล้อมที่ดีให้คงอยู่ต่อไป

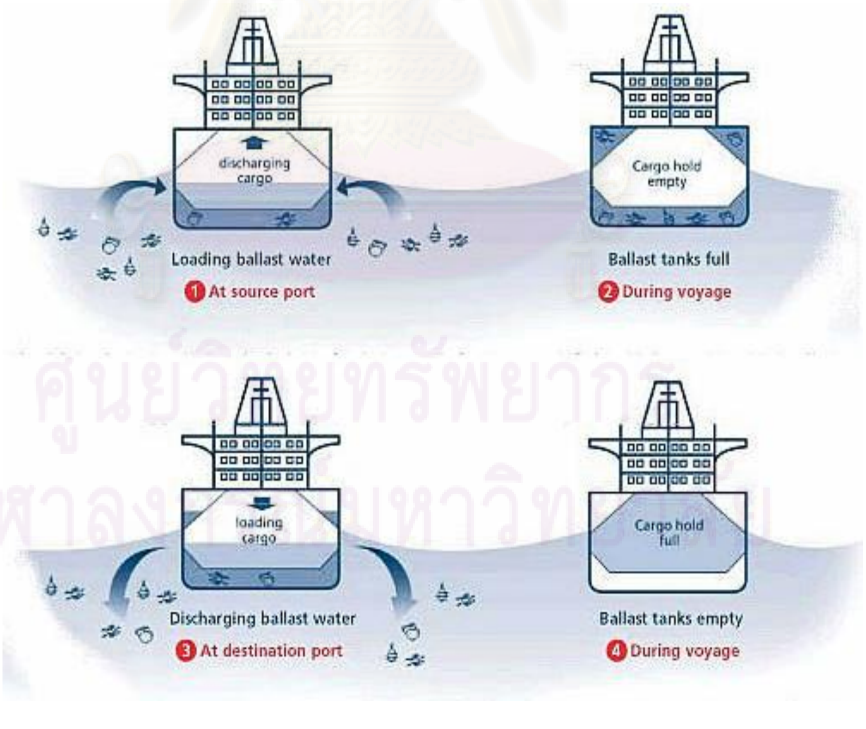


รูปที่ 2.1 ตัวอย่างการแพร่กระจายของน้ำมันเป็นแผ่นฟิล์มบนผิวน้ำ

(ที่มา: Jennifer lake's blog, 2010 : online)

2.1.1 น้ำอับเฉาเรือ

น้ำอับเฉาเรือ (Ships' Ballast Water) หมายถึง น้ำที่เก็บไว้ในห้องอับเฉาเรือ หรือห้องบรรทุกสินค้าของเรือ ซึ่งน้ำจะถูกใช้เพื่อรักษาสมดุลของเรือในระหว่างการเดินทาง เมื่อเรือไม่มีสินค้าบรรทุกหรือบรรทุกสินค้าที่มีน้ำหนักไม่เพียงพอ แต่เมื่อเรือมีการบรรทุกสินค้าก็จะปล่อยน้ำอับเฉาลงในทะเล เพราะมีน้ำหนักของสินค้าเข้าแทนที่ (รูปที่ 2.2) โดยเรือแต่ละประเภทจะมีการใช้ปริมาณน้ำอับเฉาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับขนาดของเรือ ซึ่งพบว่าในหนึ่งปีทั่วโลกจะมีน้ำอับเฉาเรือปล่อยลงสู่ทะเลสูงถึงหนึ่งหมื่นล้านตันต่อปี (Hua และคณะ, 2008) สำหรับน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็ก (รูปที่ 2.3) เกิดจากการซึมของน้ำตามรอยแตกของเรือเข้าสู่ห้องอับเฉาบริเวณใต้ท้องเรือขณะที่เรือออกหาปลาหรือจอดเทียบท่า ซึ่งกลไกการปล่อยน้ำอับเฉาเรือของเรือประมงขนาดเล็ก จะอาศัยการทำงานของลูกลอยในห้องอับเฉาเรือบริเวณใต้ท้องเรือ โดยปริมาณน้ำในห้องอับเฉาเรือในแต่ละลำอาจจะมีปริมาณของน้ำแตกต่างกันออกไป แต่ปริมาณน้ำทั้งหมดโดยเฉลี่ยแล้วในห้องอับเฉาเรือจะมีปริมาณไม่เกิน 250 ลิตร เมื่อปริมาณน้ำสูงถึงระดับที่ตั้งไว้เครื่องสูบน้ำจะสูบน้ำออก เพื่อไม่ให้ระดับน้ำสูงท่วมเครื่องยนต์ของเรือประมง



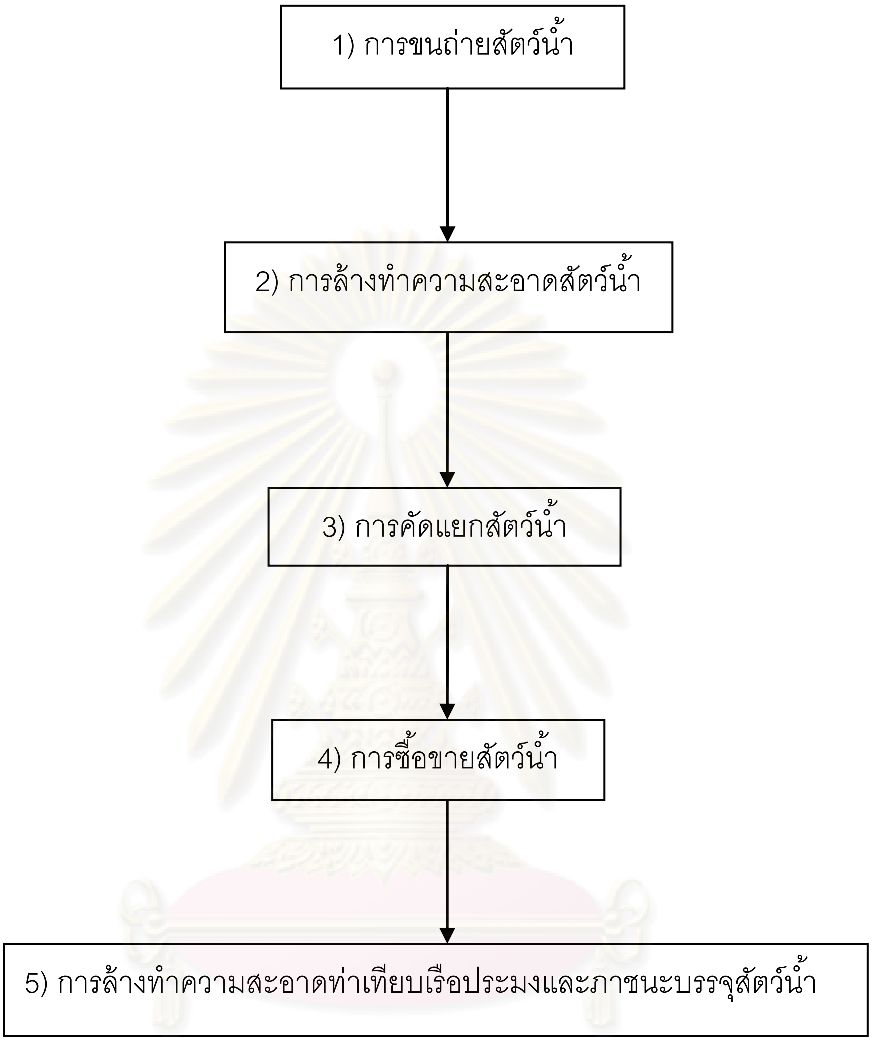
รูปที่ 2.2 กลไกการปล่อยน้ำอับเฉาเรือของเรือขนส่งสินค้าขนาดใหญ่

(ที่มา: Globallast partnerships, 2010 : online)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในประเทศไทยการปล่อยน้ำอับเฉาเรือร่วมกับกิจกรรมอื่นๆ บริเวณบริเวณท่าเรือประมง ทำให้น้ำทะเลมีคุณภาพต่ำลง เนื่องจากท่าเรือและท่าเทียบเรือสะพานปลาส่วนใหญ่จะตั้งอยู่บริเวณชายฝั่งทะเล จากการสำรวจของกรมควบคุมมลพิษ รายงานว่ามีท่าเทียบเรือและสะพานปลาจำนวน 753 แห่ง ในประเทศไทย (ตารางที่ 2.1) ซึ่งมีการปล่อยน้ำเสียที่เกิดกิจกรรมของชาวประมงบริเวณท่าเรือดังเช่นในรูปที่ 2.4 ลงในทะเล และจากการสำรวจคุณภาพน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมงฯ ทั่วประเทศในปี 2543 (ตารางที่ 2.2) พบว่าน้ำเสียมีค่าบีโอดี (BOD) อยู่ในช่วง 46-12,780 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าสารแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids) อยู่ในช่วง 60-5,875 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าทีเคเอ็น (TKN) อยู่ในช่วง 0-1,059 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งน้ำมันและไขมัน (Oil and grease) อยู่ในช่วง 3-1,779 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งค่าต่างๆ เหล่านี้มีเกณฑ์สูงกว่าค่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง (กรมควบคุมมลพิษ, 2551) (ตารางที่ 2.3)

รูปที่ 2.3 ลักษณะของเรือประมงขนาดเล็กที่ท่าเทียบเรือประมง จ. จันทบุรีและการปล่อยน้ำอับเฉาเรือของเรือประมงขนาดเล็ก



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการดำเนินงานของชาวประมงที่ท่าเทียบเรือประมง

(ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ, 2551)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 จำนวนท่าเทียบเรือประมง สะพานปลา และแพปลา แยกตามประเภทของผู้ดำเนินกิจการ

พื้นที่	จังหวัด	ประเภทผู้ดำเนินกิจการท่าเทียบเรือประมง		
		องค์กรสะพานปลา	เอกชน	หน่วยราชการอื่น
1. อ่าวไทยฝั่งตะวันออก	1. ตราด	1	27	15
	2. จันทบุรี	-	12	13
	3. ระยอง	-	60	6
	4. ชลบุรี	1	30	8
2. อ่าวไทยตอนบน	5. กรุงเทพฯ		-	-
	6. ฉะเชิงเทรา	-	5	2
	7. สมุทรสงคราม	-	6	10
	8. สมุทรสาคร	1	9	9
	9. สมุทรปราการ	1	-	-
3. อ่าวไทยฝั่งตะวันตก	10. เพชรบุรี	-	5	10
	11. ประจวบคีรีขันธ์	2	25	11
	12. ชุมพร	2	25	13
	13. สุราษฎร์ธานี	1	40	10
	14. นครศรีธรรมราช	1	70	7
	15. สงขลา	2	1	5
	16. ปัตตานี	1	35	3
	17. นราธิวาส	1	7	-
4. ฝั่งทะเลอันดามัน	18. ระนอง	1	50	14
	19. ภูเก็ต	1	13	3
	20. พังงา	-	20	12
	21. กระบี่	-	23	8
	22. ตรัง	-	20	16
	23. สตูล	1	40	18
รวมทั้งสิ้น			735	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 ลักษณะน้ำเสียจากกิจกรรมท่าเทียบเรือประมงฯ

พารามิเตอร์	**หน่วย**	**ค่าเฉลี่ย**	**ช่วง**
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	-	6.9	6.4-8.0
สารแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids)	มิลลิกรัม/ลิตร	3,875	46-12,780
น้ำมันและไขมัน (Oil and grease)	มิลลิกรัม/ลิตร	1,570	60-5,875
บีโอดี (BOD)	มิลลิกรัม/ลิตร	502	0-1,059
ทีเคเอ็น (TKN)	มิลลิกรัม/ลิตร	557	3-1,779

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ, 2551

ตารางที่ 2.3 ค่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง

พารามิเตอร์	**หน่วย**	**ค่ามาตรฐาน**
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	-	5-9
สารแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids)	มิลลิกรัม/ลิตร	น้อยกว่าหรือเท่ากับ 200
น้ำมันและไขมัน (Oil and grease)	มิลลิกรัม/ลิตร	น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20
บีโอดี (BOD)	มิลลิกรัม/ลิตร	น้อยกว่าหรือเท่ากับ 200
ทีเคเอ็น (TKN)	มิลลิกรัม/ลิตร	น้อยกว่าหรือเท่ากับ 250

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ, 2551

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 น้ำมันเครื่อง

น้ำมันเครื่องหรือน้ำมันหล่อลื่นเป็นน้ำมันที่ใช้ทั่วไปในเครื่องยนต์ต่างๆ เช่น เครื่องยนต์เรือ เครื่องยนต์รถ รวมทั้งใช้กับเครื่องจักรต่างๆในโรงงาน ซึ่งแบ่งออกเป็นสองชนิด คือ น้ำมันเครื่องชนิดทั่วไป (mineral-based lubricating) และน้ำมันเครื่องชนิดสังเคราะห์ (synthetic lubricants) โดยองค์ประกอบในน้ำมันเครื่องชนิดสังเคราะห์ ประกอบด้วยเอสเทอร์ (esters), อัลคิวเลท (alkylated), แนพธาลีน (naphthalenes) และได-ฟีนิวลาไมด์ (di-phenylamines) ซึ่งสารเหล่านี้มีความเป็นพิษสูง คงตัวสูง และย่อยสลายทางชีวภาพได้ยากกว่าน้ำมันเครื่องทั่วไป (Beyrem และคณะ, 2010) นอกจากนี้ Renato และคณะ (2009) รายงานว่าทวีปยุโรปมีการปนเปื้อนของน้ำมันเครื่องในสิ่งแวดล้อมสูงถึง 1.1 ล้านตันต่อปี

น้ำมันเครื่องที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ดีเซล (Lubricant oil) รุ่น PTT SEATECH 5000 (รูปที่ 2.5) ซึ่งเป็นน้ำมันเครื่องชนิดสังเคราะห์ ที่ใช้กับเครื่องยนต์เรือประมงขนาดเล็ก มีคุณสมบัติจำเพาะของน้ำมัน แสดงในตารางที่ 2.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.5 น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ดีเซล (Lubricant oil) **รุ่น** PTT SEATECH 5000
(ที่มา: บริษัท ปตท. จำกัด มหาชน, 2551 : ออนไลน์)

สมบัติพิเศษ

- ให้คุณสมบัติในการหล่อลื่นและป้องกันการกัดกร่อนเป็นเยี่ยม ป้องกันการสึกหรอ และการเกิดสนิมได้ดี

- ผสมสารเพิ่มคุณภาพพิเศษที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ ในการป้องกันและชะล้างคราบสกปรก และกระจายเขม่าอันเกิดจากการเผาไหม้ได้ดีเยี่ยม จึงช่วยให้เครื่องยนต์สะอาด ช่วยประหยัดน้ำมันเชื้อเพลิง และยืดอายุเครื่องยนต์
- รักษาความข้นใสได้ดี ขจัดปัญหาท่อทางเดินน้ำมัน และไส้กรองน้ำมันหล่อลื่นอุดตันได้ตลอดอายุการใช้งานลักษณะการใช้งาน
- ใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลเรือประมง ที่ใช้น้ำมันดีเซลหมุนเร็วเป็นเชื้อเพลิง สภาพงานทั่วไปจนถึงงานหนัก
- ใช้ได้ดีกับเครื่องยนต์ดีเซลที่ระบุให้ใช้น้ำมันหล่อลื่นเกรดรวม คุณภาพดี รวมถึงเครื่องยนต์ติดเทอร์โบชาร์จสภาพงานหนัก
- ใช้ได้ดีกับเครื่องยนต์เรือประมงขนาดเล็กทั่วไป

ตารางที่ 2.4 **สมบัติจำเพาะของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ดีเซล** (Lubricant oil) **รุ่น** PTT SEATECH 5000

สมบัติจำเพาะ	SAE 15W-40*	SAE 20W-50
Viscosity @ 100 °C cSt	14.8	18.9
Viscosity Index	137	125
Cold-cranking Simulator, cP	3,350 @ -15°C	4,370 @ -10 °C
Flash Point, (COC), °C	233	243
Pour Point , °C	-24	-21
Total Base Number, mg KOH/g	12	12
Sulfated Ash, %wt	1.5	1.5

(ที่มา : บริษัท ไทยออยล์ จำกัด มหาชน, 2551 : ออนไลน์)

*SAE 15W-40 หมายถึงค่าความหนืดของน้ำมันที่สามารถปรับหรือคงความหนืดให้เหมาะสมสำหรับการใช้งานทุกอุณหภูมิได้ โดยที่ 15W คือ อุณหภูมิต่ำในหน้าหนาว และ 40 คือ อุณหภูมิสูงในหน้าร้อน ซึ่งน้ำมันสามารถปรับสภาพความหนืดให้เหมาะสมกับการใช้งานในช่วงอุณหภูมิดังกล่าวได้

2.1.3 ชนิดและองค์ประกอบของน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเล

ชนิดของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นประเภท น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันเครื่องยนต์ รวมทั้งน้ำมันหล่อลื่น ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเหล่านี้เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีลักษะคงตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว (saturate hydrocarbon) อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) เรซิน (resin) และแอสฟาลทีน (asphaltene) (Harayama และคณะ, 1994; Kevin และ Stallwood, 2006) ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 2.6 และรูปที่ 2.7

2.1.3.1 ไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว (saturate hydrocarbon)

แบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1) อัลเคน (Alkanes) **หรือ พาราฟิน** (paraffins)

มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ C_nH_{2n+2} มีลักษณะเป็นโซ่ตรง (Straight chain) หรือ โซ่กิ่ง (Branched chain) ซึ่งสารในกลุ่มอัลเคนจัดเป็นสารที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนและย่อยสลายได้ง่ายที่สุด รวมทั้งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำมัน)

2) ไซโคลอัลเคน (Cycloalkanes) **หรือ แนฟทีน** (Naphthenes)

มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ C_nH_{2n} เป็นการจัดเรียงตัวของอะตอมคาร์บอนเป็นวงแหวน 1 วงหรือมากกว่า

2.1.3.2 อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon)

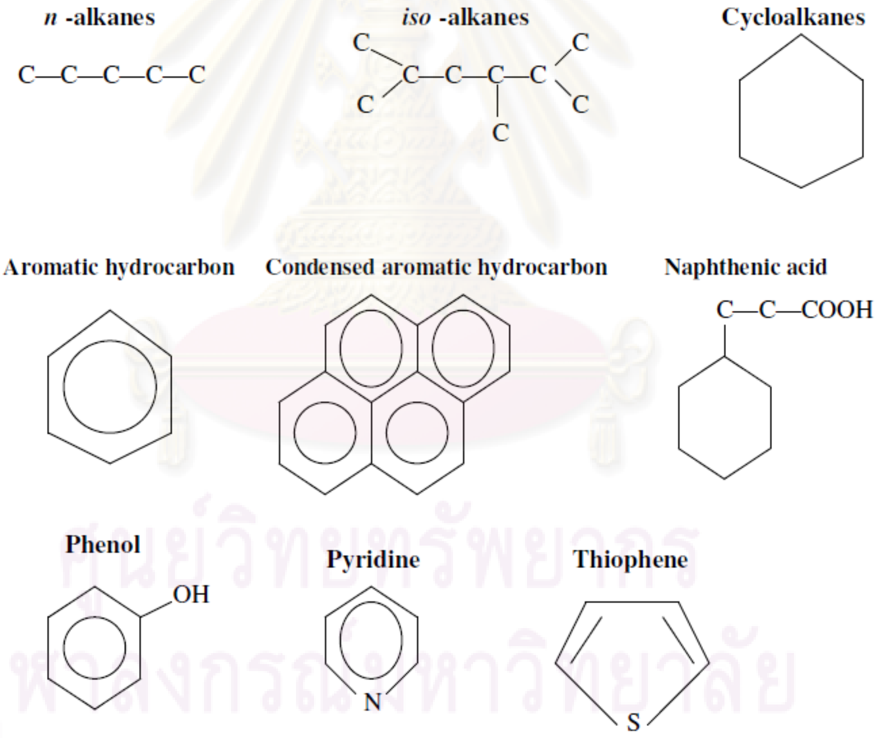
แบ่งได้ตามจำนวนวงเบนซีนที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีจำนวนวงเบนซีน 1 วง หรือมากกว่า มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ C_nH_{2n-6} อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 1 วง เช่น เบนซีน (benzene) โทลูอีน (toluene) เป็นต้น และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) จะมีจำนวนวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วง ขึ้นไปมีโครงสร้างที่ซับซ้อนย่อยสลายได้ยาก เช่น แนฟทาลีน (Napthalene) ฟีแนนทรีน (Phenanthrene) เป็นต้น ซึ่งสารประกอบ PAHs นี้มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต และถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของสารก่อมะเร็ง (Venosa และ Zhu, 2003)

2.1.3.3 **เรซิน** (resin)

เรซินประกอบด้วยโมเลกุลที่มีความเป็นขั้วสูง เช่น ออกซิเจน (O) ซัลเฟอร์ (S) ไนโตรเจน (N) ซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูงและมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมาก

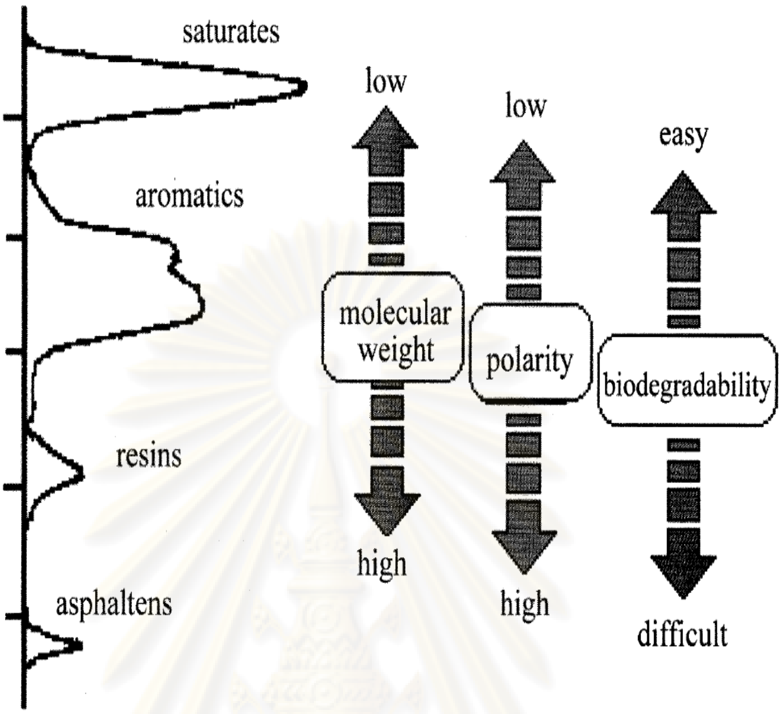
2.1.3.4 **แอสฟาลทีน** (asphaltene)

แอสฟาลทีนมีองค์ประกอบคล้ายกับเรซิน แต่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า มีโมเลกุลขนาด 500 - 2000 กรัมต่อโมล ซึ่งย่อยสลายได้ยากที่สุด รวมทั้งมีองค์ประกอบจำพวกโลหะหนัก (Fe) นิกเกิล (Ni) วานาเดียม (V) ด้วย ซึ่งสารประกอบ เรซินและแอสฟาลทีนนี้ ยังมีข้อมูลการศึกษาที่น้อยมากอาจเนื่องมาจากเป็นสารที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนจึงทำให้ยากที่เข้าใจ



รูปที่ 2.6 องค์ประกอบของน้ำมันดิบจำแนกตามโครงสร้าง

(ที่มา: Alloway และ Ayres, 1993)



รูปที่ 2.7 แสดงคุณสมบัติของน้ำมันและโครมาแกรมของน้ำมัน ซึ่งแยกโดยเครื่อง TLC – FID

(ที่มา: Taki และคณะ, 2003)

Van และคณะ (2003) รายงานว่าถึงการย่อยสลายองค์ประกอบในน้ำมันโดยเรียงลำดับจากการย่อยสลายได้ง่ายไปยากดังนี้ n-alkanes > branched-chain alkanes > branched alkenes > low molecular-weight n-alkyl aromatics> monoaromatics> cyclic alkanes > polycyclic aromatic hydrocarbons ≥ asphaltene

2.2 การบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล

ในปัจจุบันการกำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเลมีอยู่หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้วิธีบำบัดจะต้องเลือกให้เหมาะสม และคำนึงถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปกระบวนการบำบัดน้ำมันแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่ (Prince และคณะ, 2003)

2.2.1 วิธีทางกายภาพ (Physical)

เป็นวิธีที่ใช้แรงงานคนในการตักคราบน้ำมันออกจากพื้นที่ (รูปที่ 2.8) ใช้ทุ่นกักคราบน้ำมันเพื่อให้น้ำมันอยู่ในพื้นที่จำกัดไม่แพร่กระจายตัวออกไป จากนั้นทำการตักหรือใช้เครื่องมือดูดคราบน้ำมันออกจากพื้นที่

ข้อดี วิธีทางกายภาพจะเป็นการใช้แรงงานคนหรือเครื่องมือในการกำจัดน้ำมันออกจากพื้นที่จึงมีค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก

ข้อเสีย การกำจัดคราบน้ำมันโดยวิธีทางกายภาพนี้ เป็นวิธีที่ไม่สามารถจำกัดน้ำมันออกจากพื้นที่ได้อย่างสมบูรณ์ เป็นเพียงการย้ายน้ำจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง ซึ่งน้ำมันยังคงตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมซึ่งต้องหาวิธีกำจัดต่อไป (กรมควบคุมมลพิษ, 2551)

รูปที่ 2.8 การกำจัดน้ำมันด้วยวิธีทางกายภาพ

(ที่มา : Ladybroadoak visionary planetary healing tutorial, 2007 : online)

2.2.2 วิธีทางเคมี (Chemical)

เป็นวิธีที่ใช้สารเคมีฉีดพ่นลงไปในพื้นที่ที่ปนเปื้อนน้ำมัน (รูปที่ 2.9) ซึ่งสารเคมีขจัดน้ำมันในปัจจุบันจะมีส่วนผสมของสารต่างๆ ดังนี้ เช่น Sorbitan Esters ของกรด Oleic, Sodium Dioctyl Sulfosuccinate, Ethylene Glycol, และ Monobutyl Ether เมื่อสารเคมีสัมผัสกับน้ำมัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จะทำปฏิกิริยากับน้ำมันทำให้น้ำมันแตกตัวเป็นอนุภาคเล็กๆ แขวนลอยอยู่ในน้ำหรือรวมตัวกันเป็นก้อนแล้วจมลงใต้ทะเล

ข้อดี วิธีทางเคมีเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว แต่ยังกำจัดน้ำมันได้ไม่สมบูรณ์

ข้อเสีย 1) มีค่าใช้จ่ายที่สูง เนื่องจากสารเคมีมีราคาค่อนข้างสูง รวมทั้งน้ำมันที่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีกลายเป็นอนุภาคเล็กแล้วต้องมีการขนย้ายออกจากพื้นที่ และหาวิธีกำจัดต่อไป

2) สารเคมีที่นำมาใช้ไม่สามารถกำจัดน้ำมันได้ทุกประเภท

3) สารเคมีที่นำมาใช้กำจัดน้ำมันเป็นอันตรายต่อมนุษย์ สิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม และเมื่อจำกัดน้ำมันออกไปแล้ว สารเคมีเหล่านี้ยังคงตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นการเพิ่มปัญหาให้กับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (กรมควบคุมมลพิษ, 2551)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.9 การกำจัดน้ำมันด้วยวิธีทางเคมี
(ที่มา: Gulf oil spill truth, 2010 : online)

2.2.3 **วิธีทางชีวภาพ** (Bioremediation)

วิธีทางชีวภาพเป็นการอาศัยการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ ซึ่งมีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ ที่มีความสามารถใช้สารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันเป็นแหล่งอาหารได้ ซึ่งสารที่ได้หลังจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพนี้ คือ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงาน

วิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ยุ่งยาก เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และค่าใช้งานในการบำบัดไม่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางกายภาพและทางเคมี เนื่องจากไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการขนย้ายน้ำมันออกจากพื้นที่ สามารถทำการบำบัดในพื้นที่ได้โดยตรง รวมทั้งวิธีทางชีวภาพนี้หลังจากบำบัดด้วยจุลินทรีย์แล้ว น้ำมันจะเปลี่ยนรูปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ซึ่งไม่ต้องหาวิธีมากำจัดต่อเหมือนวิธีทางกายภาพและทางเคมี บางครั้งวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพอาจจะเกิดได้ช้า Venosa และ Zhu (2003) รายงานว่าวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันทางชีวภาพให้ดียิ่งขึ้นมี 2 วิธี ได้แก่ วิธีการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ในพื้นที่นั้นๆ ให้สามารถใช้นำมันเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดียิ่งขึ้น (Biostimulation) โดยการเติมสารตั้งต้น หรือสารอาหารที่สำคัญ เช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส อีกวิธีหนึ่งคือ วิธีการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันลงไปในน้ำทะเล (Bioaugmentation) โดยจุลินทรีย์ที่เติมลงไป จะเป็นจุลินทรีย์ที่มีคัดเลือกมาแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน นอกจากนี้ Quek และคณะ (2006) รายงานว่าการเติมกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเพื่อบำบัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล จะให้ผลดีกว่าการเติมสารอาหารลงไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อประจำถิ่น ในกรณีที่น้ำมันที่ปนเปื้อนมีองค์ประกอบที่ย่อยสลายได้ยาก หรือมีจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันอยู่ปริมาณน้อยในน้ำทะเล

2.3 ยีสต์ย่อยสลายน้ำมัน

งานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายน้ำมันด้วยแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามมีรายงานของ Ijah (1998) ซึ่งเปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำมันดิบระหว่าง *Serratia marcescens* OCS-21, *Acinetobacter calcoaceticus* COU-27 และ *Candida tropicalis* PFS-95 พบว่า *Candida tropicalis* PFS-95 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในดินที่ความเข้มข้น 1 % ได้ถึง 68.9 % ในขณะที่แบคทีเรียได้แก่ *Serratia marcescens* OCS-21 และ *Acinetobacter calcoaceticus* COU-27 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ความเข้มข้น 1 % ได้เพียง 51.5 % และ 45.5% ตามลำดับ หลังจากผ่านไป 16 วัน

Palittapongarnpim และคณะ (1998) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.5 % ที่ปนเปื้อนในดินของ *Candida tropicalis* 15Y พบว่า สามารถย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดและปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนประเภทอัลเคนได้ 87.3% และ 99.6% ตามลำดับ ในเวลา 7 วัน

Zinjarde และ Pant (2002) ได้คัดแยกจุลินทรีย์บริเวณทะเลในเขตร้อนชื้นที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน พบยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. intermedia*. และ *Y. lipolytica* ซึ่งมีสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1% ได้สูงถึง 78 % หลังจากผ่านไป 5 วัน

Hua และคณะ (2003) พบว่า *Candida Antarctica* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ และสามารถย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมโดรคาร์บอนประเภทอัลเคนที่ความเข้มข้น 8 % ได้สูงถึง 82.3±5.6 % เมื่อเวลาผ่านไป 6 วัน

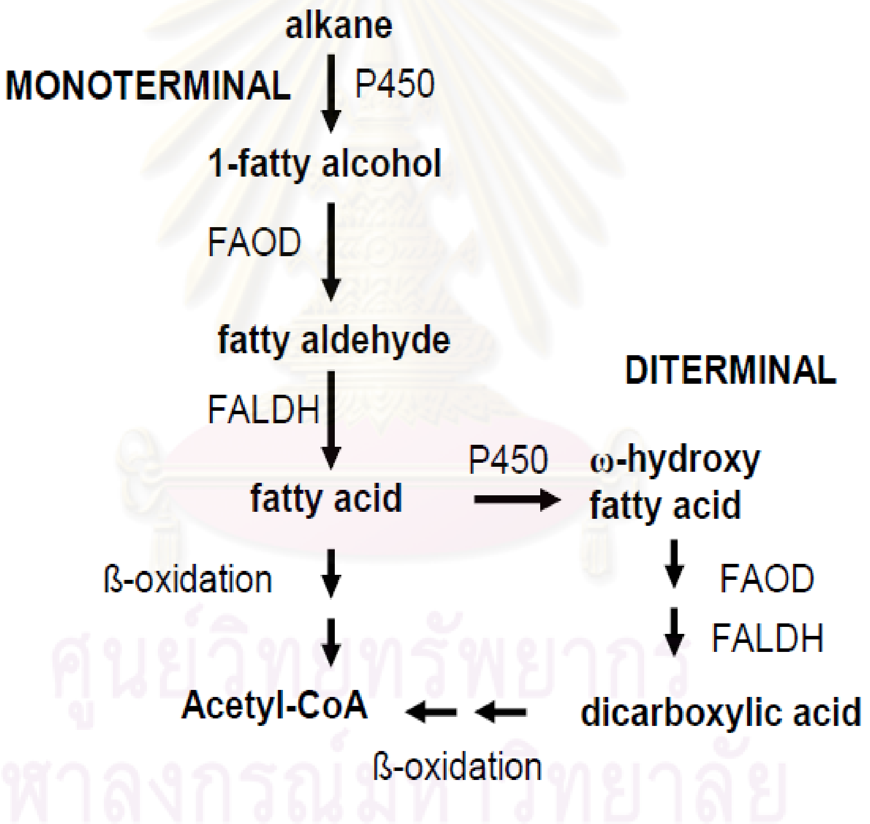
งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำยีสต์มาศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเนื่องจาก ยีสต์เลี้ยงง่าย โตเร็ว และมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมัน ยีสต์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ คือ *Candida* sp. JC 4 ที่คัดแยกมาจากบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน จังหวัดจันทบุรี โดยจิรภัทร จันทมาลี (ข้อมูลไม่เผยแพร่) ซึ่งพบว่ามีความสามารถย่อยสลายน้ำมันได้หลายชนิด เช่น น้ำมันเครื่อง น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ นอกจากนี้มีค่า Hydrophobicity 83.6 % ซึ่งค่านี้หมายถึง ผิวของเซลล์ที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ซึ่งมีค่าสูงจะทำให้เซลล์ยึดติดกับน้ำมันและผิวของวัสดุตรึงได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ 93.2 % ซึ่งสารนี้เกี่ยวข้องกับการรวมตัวกันของเซลล์บนผิววัสดุตรึง รวมทั้งมีความสามารถในการก่ออิมัลชัน (ค่า E_{24} เท่ากับ 40 %) ซึ่งจะทำให้น้ำมันแตกตัวเป็นเม็ดที่มีขนาดเล็กลงทำให้เซลล์จับกับหยดน้ำมันได้ดียิ่งขึ้น

2.3.1 วิถีการย่อยสลายน้ำมันของของยีสต์

Craft และคณะ (2003) รายงานว่าการเมแทบอลิซึมของสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนประเภทอัลเคนของ *Candida* spp. เกิดผ่านวิถีเบต้า-ออกซิเดชันและโอเมก้า-ออกซิเดชัน ในเพอรอกซิโซมของเซลล์ (peroxisomes) โดยการทำงานร่วมกันของไซโตโครม P450 โมโนออกซิจีเนส และ เอ็นเอดีเอชไซโตโครม P450 รีดักเทส รวมทั้งแอลกอฮอล์ออกซิเดสและอัลดิไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น พลังงาน คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ

ตัวอย่างการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนประเภทอัลเคนของยีสต์ แสดงใน รูปที่ 2.10 โดยการย่อยสลายอัลเคนจะเกิดขึ้นในวิถีของ P450 ไฮดรอกซิเลชัน (P450 hydroxylation) ในโมโนเทอมินอล ออกซิเดชัน (monoterminal oxidation) โดยอัลเคนจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ P450 โมโนออกซิจีเนส (P450 monooxygenase) ได้เป็น 1-แฟตตี้ แอลกอฮอล์ (1-fatty alcohol) จากนั้นจะถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์แฟตตี้แอลกอฮอล์ออกซิเดส (fatty alcohol

oxidase) (FAOD) ได้เป็นแฟตตี้อัลดิไฮด์ (fatty aldehyde) ต่อมากจะถูกเอนไซม์แฟตตี้อัลดิไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (fatty aldehyde dehydrogenase) (FALDH) เปลี่ยนเป็นกรดไขมัน (fatty acid) ซึ่งกรดไขมันนี้อาจจะเข้าสู่วิถีโอเมก้า-เบต้าออกซิเดชันแล้วถูกเปลี่ยนเป็น อะซิติล-โคเอ (acetyl-CoA) หรืออาจเข้าสู่วิถีวิถีของ P450 ไฮดรอกซิเลชันในไดเทอมินอล ออกซิเดชัน (diterminal oxidation) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไดคาร์บอกซิลิก (dicarboxylic acid) จากนั้นจะเข้าสู่วิถีของเบต้าออกซิเดชันแล้วถูกเปลี่ยนเป็น อะซิติว-โคเอ (acetyl-CoA) เช่นเดียวกัน สุดท้ายอะซิติล-โคเอจะถูกเมแทบอไลท์ได้ผลิตเป็น พลังงาน คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ (Mauersberger และคณะ, 1996)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.10 วิถีการย่อยสลายอัลเคนโดยยีสต์

(ที่มา: Mauersberger และคณะ, 1996)

2.4 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์

ในการนำยีสต์ไปย่อยสลายน้ำมันมีข้อจำกัดบางประการที่ส่งผลต่อการทำงานและการอยู่รอดของยีสต์ เช่น การปนเปื้อนของน้ำมันปริมาณสูงในน้ำทะเล ทำให้มีความเป็นพิษสูงและเป็น

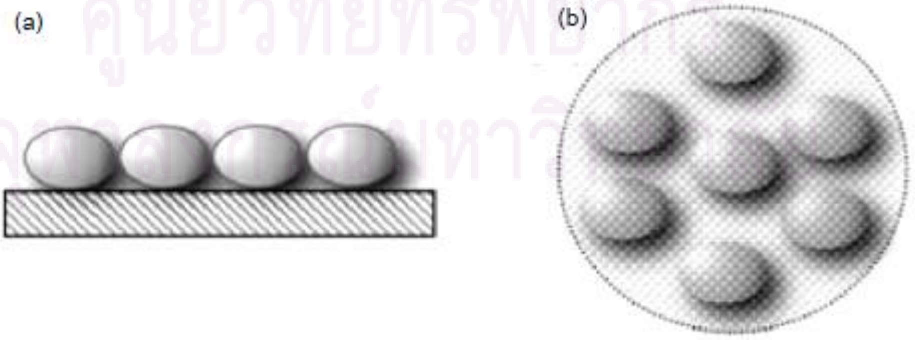
ข้อจำกัดในการใช้ยีสต์ในการบำบัด ดังนั้นจึงอาจแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าวด้วยการตรึงเซลล์บนวัสดุ เนื่องจากการตรึงเซลล์จุลินทรีย์เป็นการคุ้มกันให้กับเซลล์ ทำให้เซลล์ทนต่อสารเคมี และสารพิษที่มีความเข้มข้นสูงในสภาพแวดล้อมได้ นอกจากนี้การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ยังสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ (Parameswarappa และคณะ, 2008; Chu และคณะ, 2009)

2.4.1 การตรึงเซลล์

Scott (1987) ได้แบ่งการตรึงเซลล์ออกเป็น 2 ลักษณะ (รูปที่ 2.11) ได้แก่

1. การเกาะติด (Attachment หรือ Adsorp) เป็นการตรึงเซลล์ในลักษณะที่เซลล์ยึดติดอยู่บนผิววัสดุตรึง โดยอาศัยสมบัติของผิวเซลล์กับผิวของวัสดุตรึงหรือเกิดพันธะทางเคมี เช่นพันธะพันธะโควาเลนต์ ซึ่งพบว่าการเชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์นี้ เซลล์จะยึดติดอยู่ผิวของวัสดุตรึงอย่างสม่ำเสมอ มีการหลุดของเซลล์น้อย และการเกิดพันธะไอออนิก หรือพันธะไฮโดรเจน พบว่าแรงยึดติดของเซลล์กับผิวของวัสดุตรึงค่อนข้างน้อยและมีการหลุดของเซลล์ได้ง่าย วัสดุตรึงที่นิยมนำมาใช้ตรึงเซลล์วิธีนี้ ได้แก่ โฟมพอลิยูรีเทน (polyurethane foam) ฟองน้ำไนลอน (nylon spong) ซึ่งเป็นวัสดุสังเคราะห์ (Yan และ YU, 1996) รวมทั้งวัสดุธรรมชาติ ได้แก่ ฟางข้าง (straw) ใบปอ (hemp) (Shin และคณะ, 2002)

2. การกักขัง (Entrapments) เป็นการตรึงเซลล์ในลักษณะที่เซลล์จะถูกกักขังอยู่ในช่องว่างของวัสดุตรึงซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ทั่วไป วัสดุตรึงที่นิยมนำมาใช้ตรึงเซลล์วิธีนี้ ได้แก่ อัลจิเนต (alginate) และ คาราจีแนน (carrageenan) ไคโตซาน (chitosan) ซึ่งเป็นวัสดุตรึงธรรมชาติ รวมทั้ง พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ที่เป็นวัสดุตรึงสังเคราะห์ (Arica และคณะ, 1993)



รูปที่ 2.11 ลักษะการตรึงเซลล์แบบการเกาะติด (Attachment หรือ Adsorp) (a) และการกักขัง (Entrapment) (b)

(ที่มา: Verbelen และคณะ, 2006)

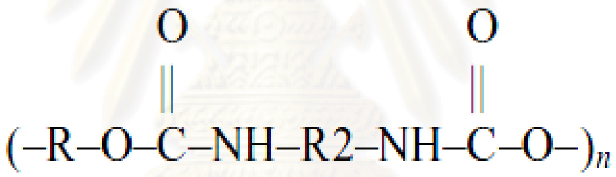
จะเห็นได้ว่าการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุตรึงมีอยู่หลายวิธี ดังนั้นควรเลือกวิธีที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ ลักษณะการนำเซลล์ตรึงไปใช้งาน สภาพแวดล้อมและวัสดุตรึงที่จะนำมาใช้สำหรับตรึงเซลล์ โดยในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเล ดังนั้นวัสดุตรึงที่จะนำไปใช้บำบัดน้ำมันในทะเล ควรมีลักษณะดังนี้ (1) ลอยตัวในน้ำทะเลได้ดี (2) ดูดซึมน้ำมันได้ดี (3) มีรูพรุนสูง (4) วัสดุตรึงสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง และ (5) ไม่สลายตัวเร็วในน้ำทะเล (Leenen และคณะ, 1996)

ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้โฟมพอลิยูรีเทนเป็นวัสดุสำหรับตรึงเซลล์ เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีที่คงตัวแข็งแรง ทนต่อสารละลายที่เป็นกรด-ด่าง มีรูพรุนจำนวนมากจึงช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวและการแพร่เข้าออกของสารต่างๆ ได้ดี รวมทั้งไม่เกิดปฏิกิริยากับเซลล์ที่ตรึง และมีราคาไม่สูง (Romaskevic และคณะ, 2006) นอกจากนี้การตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนโฟมพอลิยูรีเทนสามารถทำได้ง่ายและสะดวก รวมทั้งการเกาะติดของเซลล์บนโฟมพอลิยูรีเทนสามารถเกิดได้ทั้งแบบ การเกาะติด (Attachment) บนผิวของโฟม และการกักขัง (Entrapments) ในช่องว่างของโฟมซึ่งจะทำให้มีการเกาะติดของเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ (Haward, 2002)

2.5 โฟมพอลิยูรีเทน

โฟมพอลิยูรีเทน จัดเป็นพลาสติกชนิดแข็งชนิดหนึ่ง แต่พื้นที่ข้างในถูกแทรกด้วยฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมาก จึงทำให้เกิดรูพรุน มีลักษณะอ่อนนุ่มขึ้น รูปที่ 2.12 (Lemos และคณะ, 2007) โครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของโฟมพอลิยูรีเทนทั่วไปเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวดันระหว่าง ไอโซไซยาเนต (isocyanates) (ได-, ไตร-, และอื่นๆ) กับไกลคอล (glycols) (พอลิไกลคอล, พอลิเอสเทอร์, หรือ พอลิอีเทอร์) (รูปที่ 2.13) ทั้งนี้โครงสร้างของโฟมพอลิยูรีเทนยังมีความหลากหลายมากขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ คือ หมู่ฟังชั่นกรุ๊ป การเกิดพันธะเชื่อมขวางระหว่างพอลิเมอร์ต่างๆ เป็นต้น โฟมพอลิยูรีเทนแบ่งตามโครงสร้างของโฟมได้แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ (1) โครงสร้างแบบเปิด (opened shape) เป็นโฟมที่มีโพรงต่อถึงกันทำให้อากาศหมุนเวียนถึงกันได้ ตัวอย่างเช่นฟองน้ำสังเคราะห์ (2) โครงสร้างแบบปิด (closed shape) เป็นโฟมที่มีโพรงไม่ต่อถึงกัน นิยมนำไปใช้เป็นวัสดุกันความร้อนในตู้เย็น (3) โครงสร้างแบบผสม (mixed shape) มีโครงสร้างผสมระหว่างโครงสร้างที่เป็นทั้งแบบปิดและแบบเปิด นิยมใช้สำหรับการกันกระแทก โดยที่โครงสร้างแบบปิด มีคุณสมบัติทนต่อความร้อนและสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้ดี และ โครงสร้างแบบเปิดมีคุณสมบัติเป็นฉนวนกันเสียงได้ดี รวมทั้งน้ำกับอากาศสามารถแพร่เข้าออกได้ดีอีกด้วย (Romaskevic และคณะ, 2006)

รูปที่ 2.12 โฟมพอลิยูรีเทน (PUF)



รูปที่ 2.13 สูตรโครงสร้างทางเคมีของโฟมพอลิยูรีเทน

(ที่มา: Haward, 2002)

นอกจากนี้โฟมพอลิยูรีเทนยังสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ตามลักษณะของโฟมดังนี้

1. โฟมพอลิยูรีเทนชนิด flexible เป็นโฟมที่มีโครงสร้างแบบเปิดทำให้อากาศแพร่เข้าออกได้ดีและสามารถยืดขยายตัวได้สูงแต่เมื่อคืนสู่สภาพเดิมแล้วจะเสียรูปทรงแบบเดิม ไม่ทนต่อการไฮโดรไลซ์ และแสง UV

2. โฟมพอลิยูรีเทนชนิด Semiflexible เป็นโฟมที่มีโครงสร้างแบบเปิดน้ำและอากาศแพร่เข้าออกได้ดี มีลักษณะเด่น คือ เป็นโฟมที่อ่อนหนุ่ม ยืดหยุ่นดี รวมทั้งเป็นฉนวนกันเสียงที่ดีอีกด้วย ซึ่งนิยมนำมาใช้ทำเฟอร์นิเจอร์ เช่น โซฟา

3. โฟมพอลิยูรีเทนชนิด Rigid เป็นโฟมที่มีโครงสร้างแบบเปิดมีลักษณะที่แข็ง ยึดติดกับวัสดุที่เป็นเหล็ก ไม้ และเซรามิก ได้ดี (Romaskevic และคณะ, 2006)

2.5.1 ประโยชน์ของโฟมพอลิยูรีเทน

ในปัจจุบันโฟมพอลิยูรีเทนมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ในอุตสาหกรรมรองเท้า เฟอร์นิเจอร์ เครื่องใช้ไฟฟ้า และอุตสาหกรรมด้านอาหาร เป็นต้น รวมทั้งนำมาประยุกต์ใช้ในด้านชีวเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การนำไปตรึงเอนไซม์ ตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนโฟมพอลิยูรีเทน

จุลินทรีย์	วิธีการตรึง	กิจกรรม
Pseudomonas sp. strain NGK1	Adsorption บน PU foam	ย่อยสลายแนฟทาลีน
Rhizopus oryzae strain IM 057412	Entrapment ใน PU foam	กำจัดโลหะหนัก
Burkholderia cepacia	Entrapment ใน PU foam	ศึกษาการตรึงเซลล์
Aspergillus Niger	Adsorption บน PU foam	ผลิตกรดกลูโคนิคจากเวย์
Acetobacter aceti	Adsorption บน PU foam	ผลิตน้ำส้มสายชู

ที่มา : Romaskevic และคณะ (2006)

นอกจากนี้มีงานวิจัยหลายเรื่องที่นำการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนโฟมพอลิยูรีเทนไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เช่น งานวิจัยของ Oh และคณะ (2000) ที่ได้ทำการทดลองตรึง *Yarrowia lipolytica* 180 บนโฟมพอลิยูรีเทน เพื่อย่อยสลายน้ำมันที่กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบนผิวหน้าน้ำทะเล พบว่ามีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันได้ดี ทั้งนี้พบว่าโฟมพอลิยูรีเทนสามารถดูดซับน้ำมันที่ลอยอยู่บนผิวหน้าน้ำทะเลได้ถึง 7-9 เท่าของน้ำหนักโฟม และมีความคงทนสามารถลอยอยู่ในน้ำทะเลได้นานกว่า 6 เดือน

Monohar และคณะ (2001) ทดลองเปรียบเทียบการย่อยสลายแนพธาลีน 25 mW ของ *Pseudomonas* sp. NGK1 ที่เกาะติดอยู่บนวัสดุตรึง 4 ชนิด ได้แก่ อัลจิเนต วุ้น พอลิอะคริลาไมด์ และ โฟมพอลิยูรีเทน พบว่า เซลล์ที่ตรึงอยู่บน โฟมพอลิยูรีเทนย่อยสลายแนพธาลีนได้ดีที่สุด และนำกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 40 ครั้ง

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันในทะเล

ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเลขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น จำนวนจุลินทรีย์ อากาศ อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง และอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันให้ดียิ่งขึ้น คือ ปริมาณสารอาหารในทะเล ทั้งนี้เมื่อเกิดการปนเปื้อนของน้ำมันในน้ำทะเล จะทำให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและฟอสฟอรัสลดลง และมีปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน (Harayama และคณะ, 2004; Hii และคณะ, 2009)

Atlas และคณะ (1981) รายงานว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) และ คาร์บอนต่อฟอสฟอรัส (C/P) คือ 10:1 และ 100:1 ตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของน้ำมันที่ปนเปื้อน และสภาวะแวดล้อมในน้ำทะเลด้วย

Bartha (1986) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่ออัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล หลังจากผ่านไปสามสัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่เติมแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต 20 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นแหล่งของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส มีอัตราการย่อยสลายน้ำมัน 63 % ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่เติมแอมโมเนียมฟอสเฟต มีอัตราการย่อยสลายน้ำมันเพียง 40 % เท่านั้น

Venosa และคณะ (2003) รายงานว่าน้ำทะเลในธรรมชาติจะมีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสค่อนข้างต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมีผลต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล

Sarkar และคณะ (2005) ได้ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินโดยการเติมปุ๋ยซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส พบว่าประสิทธิภาพการย่อยเพิ่มขึ้นสูงถึง 96% เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมปุ๋ย เช่นเดียวกับการรายงานของ Delilleet และคณะ (2009) พบว่าการเติมปุ๋ยช่วยเพิ่มการประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในชายฝั่งทะเลมหาสมุทรแอนตาร์กติกได้

Beolchini และคณะ (2010) พบว่าการเติมไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.23 mM และไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.023 mM ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสตามลำดับในอัตราส่วน 100:10:1 พบว่าสามารถเพิ่มการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนประเภทอะลิฟาติกและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้มากกว่า

70 % และ 40% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไดแอมโมเนียมซัลเฟตและไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

แต่อย่างไรก็ดีการเติมไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในปริมาณที่มีความเข้มข้นสูงลงในน้ำทะเล อาจจะเป็นสาเหตุทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตรวดเร็วผิดปกติ รวมทั้งทำให้ออกซิเจนละลายในน้ำได้น้อยลง ซึ่งจะส่งผลเสียมากกว่าผลดี (Nikolopoulou และ Kalogerakis, 2009)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่ามีการศึกษาค่อนข้างน้อยเกี่ยวกับการใช้ยีสต์ในการบำบัดการปนเปื้อนของน้ำมันในน้ำทะเล ดังนั้นงานวิจัยนี้จะศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันของยีสต์ และนำข้อดีของการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนโฟมพอลิยูรีเทนมาประยุกต์ใช้ในการผลิต *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน รวมทั้งศึกษาปริมาณของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายน้ำมันให้ดียิ่งขึ้นและนำผลจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการไปทดสอบเบื้องต้นเพื่อบำบัดน้ำอับเฉาเรือที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในห้องอับเฉาเรือใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็ก ซึ่งข้อมูลที่ได้รับจะช่วยในการพัฒนาวิธีทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและมีราคาถูก สำหรับลดปริมาณน้ำมันปิโตรเลียมที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมบริเวณท่าเรือประมงได้ในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่อง TLC-FID รุ่น Iatroscan MK-6s ของบริษัท Mitsubishi, Japan.
2. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
5. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ “ISSCO” laminar flow รุ่น BVT – 124 ของบริษัท International Sciencetific Supply, USA.
6. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA.
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermospectonic, Japan.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall® Biofuge Stratos บริษัท Heraeus, Germany.
9. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
10. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
11. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 20 100 200 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific, USA
12. ขวดแก้วฝาเกลียว (vial) ขนาด 22 มิลลิลิตร (Screw Cap with Teflon Liner) ของบริษัท Lab System, Thailand.
13. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyele, Japan.
14. ตู้ดูดควัน (fume hood) รุ่น airone 12009s ของบริษัท Safelab systems, England.
15. เครื่องรีแฟรกโตมิเตอร์ (Refractometer) รุ่น S-10 (Salinity 0-10%) ของบริษัท Atago, Japan.

เคมีภัณฑ์

1. น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ดีเซล (Lubricant oil) รุ่น PTT SEATECH 5000 ออกแบบมาเพื่อเครื่องยนต์เรือประมงขนาดเล็ก มีคุณสมบัติรักษาความข้นใสได้ดี ขจัดปัญหาท่อทางเดินน้ำมัน และไส้กรองน้ำมันหล่อลื่นอุดตันได้ตลอดอายุการใช้งาน ของบริษัท ไทยออยล์ จำกัด (มหาชน) ประเทศไทย
2. โฟมพอลียูรีเทน (Polyurethane Foam) ของบริษัท ไทยโปรดักส์โฟม จำกัด ประเทศไทย
3. กลูโคส (Glucose) ของบริษัท Merck, Germany.
4. เปปโตน (Peptone) ของบริษัท Becton and Dickinson, USA.
5. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Bio springer, France.
6. สารสกัดจากมอลท์ (Malt extract) ของบริษัท ของบริษัท Lab-scan, Ireland.
7. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia.
8. ไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
9. เฟอริคซิเตรต (Ferric citrate) ของบริษัท BDH chemicals, England.
10. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
11. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท Lab-scan, Ireland.
12. เฮกเซน (Hexane) ของบริษัท Merck, Germany.
13. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ของบริษัท Merck, Germany.
14. เมทานอล (Methanol) ของบริษัท Fisher Scientific, Germany.

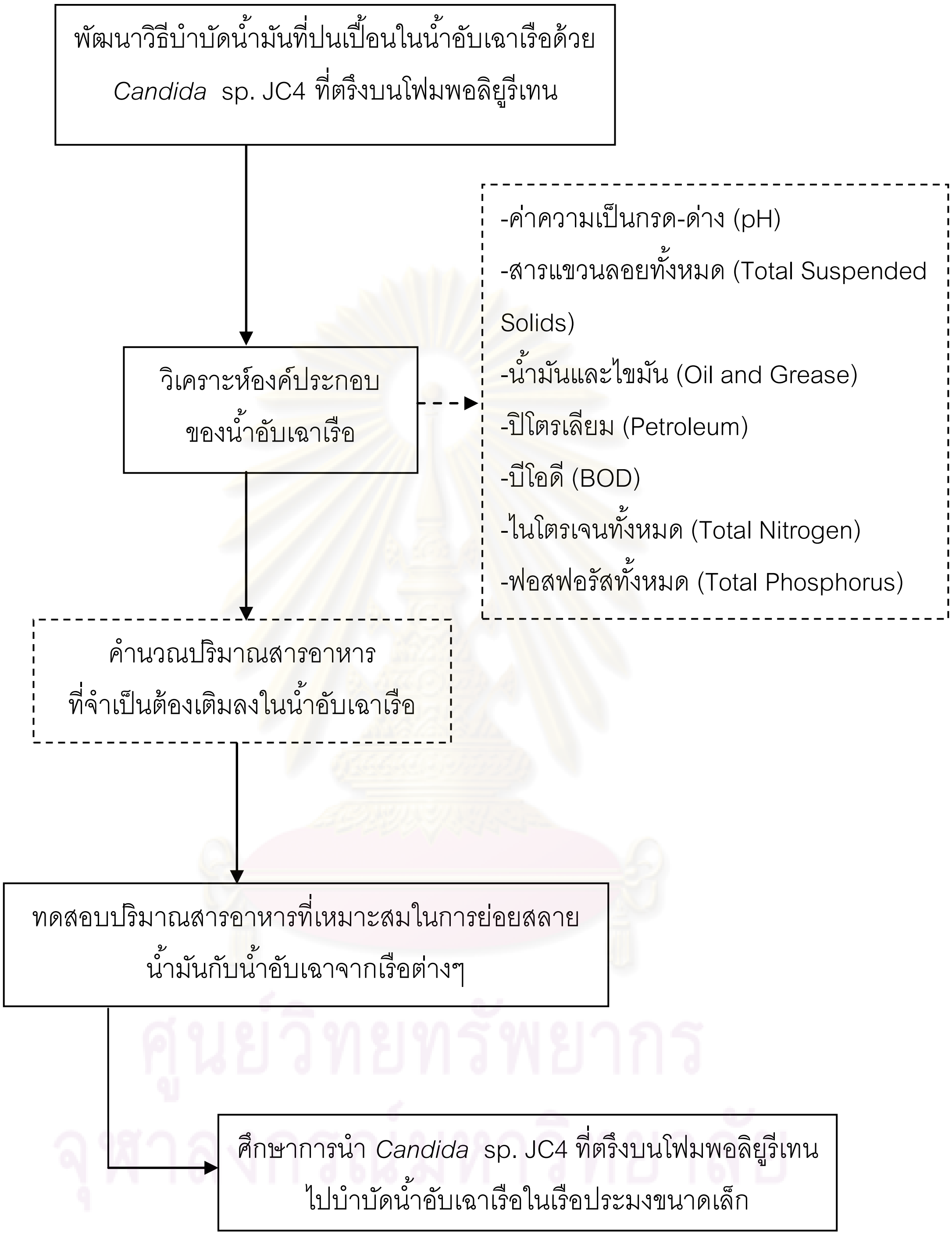
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ภาพรวมของการดำเนินงานวิจัย

รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย (ต่อ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วย *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน

3.2.1 การเตรียมเซลล์ตรึง

3.2.1.1 ยีสต์ที่ใช้ในการวิจัย

ยีสต์ที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็น *Candida* sp. JC4 ที่คัดแยกมาจากบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน จังหวัดจันทบุรี โดยจิรภัทร จันทมาลี (ข้อมูลไม่เผยแพร่) ศึกษาพบว่ามีความสามารถย่อยสลายน้ำมันได้หลายชนิด เช่น น้ำมันเครื่อง น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและน้ำมันดิบ นอกจากนี้มีค่า Hydrophobicity 83.6 % ซึ่งค่านี้หมายถึง ผิวของเซลล์ที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ซึ่งมีค่าสูงจะทำให้เซลล์ยึดติดกับน้ำมันและผิวของวัสดุตรึงได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ 93.2 % ซึ่งสารนี้เกี่ยวข้องกับการรวมตัวกันของเซลล์บนผิววัสดุตรึง รวมทั้งมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ 33 นิวตันต่อเมตร ซึ่งจะทำให้น้ำมันแตกตัวเป็นเม็ดที่มีขนาดเล็กลงทำให้เซลล์จับกับหยดน้ำมันได้ดียิ่งขึ้น

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์คือ Yeast Maltose (YM) (ภาคผนวก) 0.25 % ส่วนวิธีการเก็บรักษายีสต์ทำได้โดย ขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient Sea Water (NSW) (ภาคผนวก) และเกลี่ยทับผิวหน้าอาหารด้วยน้ำมันเครื่อง 100 ไมโครลิตร ทั้งนี้เพื่อรักษาแอคทิวิตีของยีสต์

3.2.1.2 การเพาะเลี้ยง *Candida* sp. JC4 และการเตรียมหัวเชื้อ

การเพาะเลี้ยง *Candida* sp. JC4 จะดัดแปลงมาจากวิธีของ Higashihara และคณะ (1978) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient Sea Water (NSW) (ภาคผนวก) ที่เกลี่ยทับผิวหน้าอาหารด้วยน้ำมันเครื่อง 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Maltose (YM) (ภาคผนวก) 0.25 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM 0.25 % ปริมาตร 400 มิลลิลิตร และบ่มเชื้อต่อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์สองครั้งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % นำเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^{11} CFU ต่อมิลลิลิตร หัวเชื้อที่ได้นี้จะใช้ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนต่อไป

3.2.1.3 การเตรียมโฟมพอลิยูรีเทนสำหรับตรึงเซลล์

โฟมพอลิยูรีเทนชนิด Semiflexible ที่ใช้ผลิตโดยบริษัท ไทยโปรดักส์โฟม จำกัด ประเทศไทย โดยนำมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 1 x 2 x 0.5 ซม. ก่อนนำไปใช้งาน เนื่องมาจากการรายงานของ Oh และคณะ (2000) พบว่าโฟมพอลิยูรีเทนที่มีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับน้ำมัน ซึ่งมีความสามารถในการดูดซับน้ำมันได้ถึง 8 เท่าของน้ำหนักโฟมและคงทนลอยตัวอยู่ในน้ำทะเลได้นานถึง 6 เดือน นำโฟมที่ตัดแล้วไปล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำโฟมพอลิยูรีเทนน้ำหนัก 1 กรัม (75 ชิ้น) ใส่ลงใน ฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2.1.4 การตรึงเซลล์บนโฟมพอลิยูรีเทน

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.2 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1 (จำนวนเซลล์ประมาณ 10^{11} CFU ต่อมิลลิลิตร) เติมลงไปในฟลาสก์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.3 จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามระยะเวลาที่เหมาะสมที่เซลล์ตรึงจะเกาะบนโฟมดีที่สุด เมื่อครบตามระยะเวลาแล้วเก็บเซลล์ตรึง โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ออกจากฟลาสก์ ล้างเซลล์ตรึงสองครั้งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ทำให้เซลล์ตรึงแห้งภายในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 คืน จะได้เซลล์ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนซึ่งมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^{10} CFU ต่อกรัมโฟม ทั้งนี้ในชุดการทดลองที่มีโฟม 15 ชิ้น มีน้ำหนักรวม 0.20 กรัม และอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^{12} CFU ต่อชุดการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.2 โฟมพอลิยูรีเทนหลังจากตรึงเซลล์

3.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน

3.3.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันระหว่างเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันระหว่างเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ เนื่องจากเซลล์อิสระอาจทนต่อความเป็นพิษของน้ำมันที่ความเข้มข้นสูงไม่ได้ การตรึงเซลล์น่าจะแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ โดยเตรียมฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานที่ความเข้มข้น 200 ppm ลงไปในฟลาสก์ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น

ชุดการทดลองที่ 1 เติมเซลล์ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนจำนวน 15 ชิ้น น้ำหนักรวม 0.20 กรัม โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นทั้งหมดประมาณ 10^{10} CFU ต่อชุดการทดลอง (เตรียมเซลล์ตรึงตามข้อ 3.2.1)

ชุดการทดลองที่ 2 เติมโฟมพอลิยูรีเทนที่ไม่มีเซลล์ตรึงจำนวน 15 ชิ้น น้ำหนักรวม 0.20 กรัม (ชุดการทดลองควบคุม) เพื่อศึกษาผลของโฟมพอลิยูรีเทนต่อการลดลงของน้ำมัน

ชุดการทดลองที่ 3 เติมเซลล์อิสระที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์อิสระประมาณ 10^{11} CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายถึงมีจำนวนเซลล์ทั้งหมดประมาณ 10^{12} CFU ต่อชุดการทดลอง (ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร)

ชุดการทดลองที่ 4 เป็นชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมเชื้อ (ชุดการทดลองควบคุม) เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของน้ำมัน

ทุกชุดการทดลองบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน ทุกชุดการทดลองจะทำสามซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมด ด้วยเครื่อง TLC – FID ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.1 วิเคราะห์การเจริญของยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.3 และวิเคราะห์จำนวนยีสต์ที่หลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทน ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.4 ผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานและผ่านการใช้งานแล้วระหว่างเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ

เนื่องจากในสิ่งแวดล้อมในน้ำอับเฉาเรือมีการปนเปื้อนของน้ำมันเครื่องทั้งชนิดที่เป็นน้ำมันที่ยังไม่ได้ใช้งานและผ่านการใช้งานมาแล้ว (รูปที่ 3.3) น้ำมันที่ใช้งานแล้วมีสีดำ โดยเก็บตัวอย่างมาจากเครื่องยนต์ของเรือประมงขนาดเล็ก บริเวณท่าเรือประมง จังหวัดตราด ดังนั้นการทดลองนี้จะศึกษาถึงประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องทั้งสองชนิดของเซลล์ตรึง ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.3.1 แต่เตรียมฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และแบ่งออกเป็นสองชุดการทดลองคือ ชุดที่เติมน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานกับชุดที่เติมน้ำมันเครื่องที่ผ่านการใช้งานแล้ว ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ลงไปในฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เติมเซลล์ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน จำนวน 15 ชิ้น น้ำหนักรวม 0.20 กรัม โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นทั้งหมดในโฟมประมาณ 10^{10} CFU ต่อชุดการทดลอง (เตรียมตามข้อ 3.2.1)

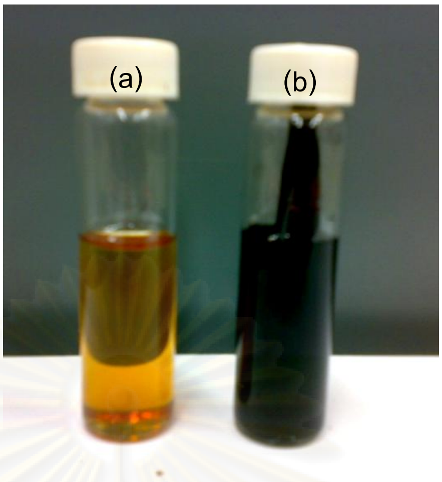
ชุดการทดลองที่ 2 เติมเซลล์ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน (เตรียมตามข้อ 3.2.1) แต่เป็นแบบคิลเซลล์ โดยเติมโซเดียมเอไซด์ (Sodium azide) ปริมาณ 0.1 % น้ำหนักต่อปริมาตร (Licestein และ Soule, 1994) เพื่อฆ่าเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน ซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุม เพื่อศึกษาผลของโฟมพอลิยูรีเทนและเซลล์ยีสต์ต่อการลดลงของน้ำมัน

ชุดการทดลองที่ 3 เติมเซลล์อิสระ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์อิสระประมาณ 10^{11} CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายถึงมีจำนวนเซลล์ทั้งหมด 10^{12} CFU ต่อชุดการทดลอง (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

ชุดการทดลองที่ 4 เป็นชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมเชื้อ (ชุดการทดลองควบคุม) เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของน้ำมัน

ทุกชุดการทดลองจะทำสามซ้ำ เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และวันที่ 5 แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมดด้วยเครื่อง TLC – FID ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.1 วิเคราะห์การเจริญของยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.3 และวิเคราะห์จำนวนยีสต์ที่หลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทน ตามวีธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.4

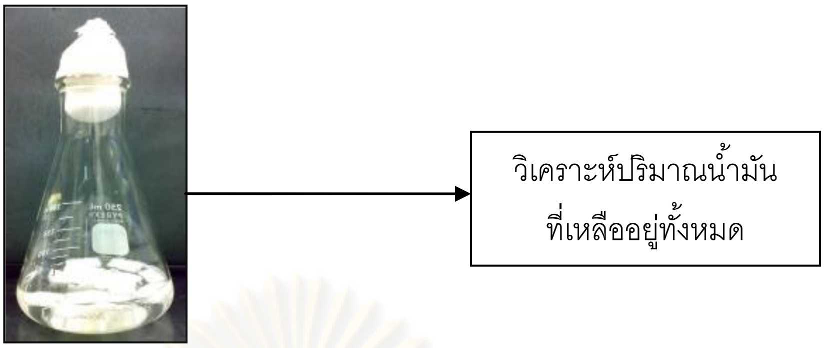
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.3 น้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งาน (a) น้ำมันที่ใช้งานแล้ว (b)

3.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายน้ำมัน

เนื่องจากการตรึงเซลล์สามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ (Reusability) การทดลองนี้จึงศึกษาจำนวนของการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึง เตรียมฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันเครื่องความที่ยังไม่ได้ใช้งานที่ความเข้มข้น 200 ppm นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเซลล์ตรึง 0.20 มิกรัมต่อฟลาสก์ (15 ชิ้น) (เตรียมเซลล์ตรึงตามข้อ 3.2.1) ลงไป แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน (รูปที่ 3.4 และรูปที่ 3.5) โดยชุดทดลองทั้งสองส่วนบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และ วันที่ 2 ของส่วนที่ 1 (รูปที่ 3.4) แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมด ด้วยเครื่อง TLC – FID ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.1 จากนั้นกรองเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว ของส่วนที่ 2 ซึ่งผ่านการใช้งานมาแล้วเป็นเวลา 2 วัน (รูปที่ 3.5) ใส่ลงไปในฟลาสก์ใหม่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 ppm ทั้งนี้เพื่อให้มีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับการทดลองเริ่มต้น บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และวันที่ 2 แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมดด้วยเครื่อง TLC – FID ทำการทดลองเช่นนี้ซ้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำว่าสามารถใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง



รูปที่ 3.4 ส่วนที่ 1 โดยประกอบด้วยเซลล์ตรึงและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ที่มีน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 ppm สำหรับนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมด

รูปที่ 3.5 ส่วนที่ 2 โดยประกอบด้วยเซลล์ตรึงและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ที่มีน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 ppm ที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว จากนั้นกรองเซลล์ตรึงใส่ลงไปในฟลาสก์ใหม่ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับการทดลองเริ่มต้นสำหรับการกรองเซลล์ตรึงนำกลับไปใช้ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.4 การหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสม

การทดลองนี้เป็นการศึกษาหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำมันของ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Atlas และคณะ (1981) รายงานว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) และ คาร์บอนต่อฟอสฟอรัส (C/P) คือ 10:1 และ 100:1 ตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ด้วย โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 10 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำมันเครื่องที่ความเข้มข้น 200 ppm ลงไปในฟลาสก์ ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW เพื่อให้ควบคุมปริมาณน้ำมันและสารอาหารได้สะดวกตามที่ต้องการ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเซลล์ตรึงลงไป (เตรียมเซลล์ตรึงตามข้อ 3.2.1) จากนั้นเติมไนโตรเจนและฟอสฟอรัสซึ่งใช้แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจนและไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เป็นแหล่งฟอสฟอรัส โดยในการทดลองจะปรับปริมาณสารอาหารให้อยู่ในอัตราส่วน C:N:P เท่ากับ 100:5:1 100:7.5:1 และ 100:10:1 ตามลำดับ ซึ่งในการปรับจะอ้างอิงเทียบกับอัตราส่วนของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW (200:10:1) เพื่อจะได้ทราบถึงปริมาณที่เหมาะสมของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่จะต้องทำการปรับ โดยการปรับ C:N:P ของอัตราส่วน 100:5:1 ให้เท่ากับ 200:10:2 โดยเติมไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 5.63 มิลลิกรัมต่อลิตร, ปรับอัตราส่วน 100:7.5:1 ให้เท่ากับ 200:15:2 โดยเติมแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และ ไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 14.3 และ 5.63 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ ปรับอัตราส่วน 100:10:1 ให้เท่ากับ 200:20:2 โดยเติมแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และ ไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 28.58 และ 5.63 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในส่วนของการทดลองที่ไม่เติมไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นชุดทดลองควบคุม (อัตราส่วน C:N:P คือ 100:0.5:1) เพื่อศึกษาผลของปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ต่อการลดลงของน้ำมัน โดยในการทดลองจะใช้อัตราส่วนของ C:N:P เท่ากับ 200:10:1 ซึ่งมี ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสอยู่ 10 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ทุกชุดการทดลองบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และวันที่ 5 แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมดด้วยเครื่อง TLC – FID ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.5.1 วิเคราะห์การเจริญของยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.3 และวิเคราะห์จำนวนยีสต์ที่หลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทน ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.4 ผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้ในการทดลอง

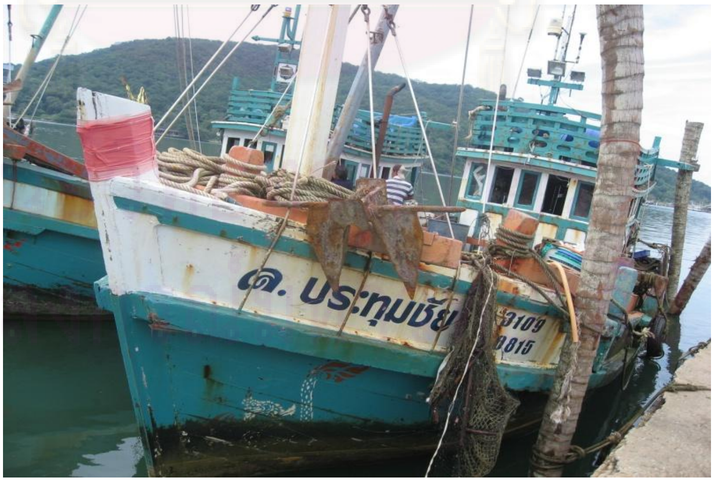
3.3.5 การวิเคราะห์เซลล์ตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

วิเคราะห์การเกาะติดของเซลล์ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน ก่อนและหลังจากการบำบัด ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) โดยเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ ดังนี้ โดยแช่ตัวอย่างใน 1% ออสเมียมเตตรอกไซด์ (Osmium Tetroxide) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ขจัดน้ำออกด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้น 30%, 50%, 70% และ 90% ตามลำดับ โดยทำขั้นตอนละ 10 นาที ขั้นตอนต่อมาตามด้วยเอทานอลความเข้มข้น 99.99% เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปทำให้แห้ง ณ จุกวิกฤต ด้วยเครื่อง Critical Point Dryer ยี่ห้อ Balzers model CPD 020 จากนั้นนำตัวอย่างมาติดที่แท่นทองด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วนำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่อง Ino sputter ยี่ห้อ Balzers model SCD 040 และนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JEOL, model JSM-5410LV ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

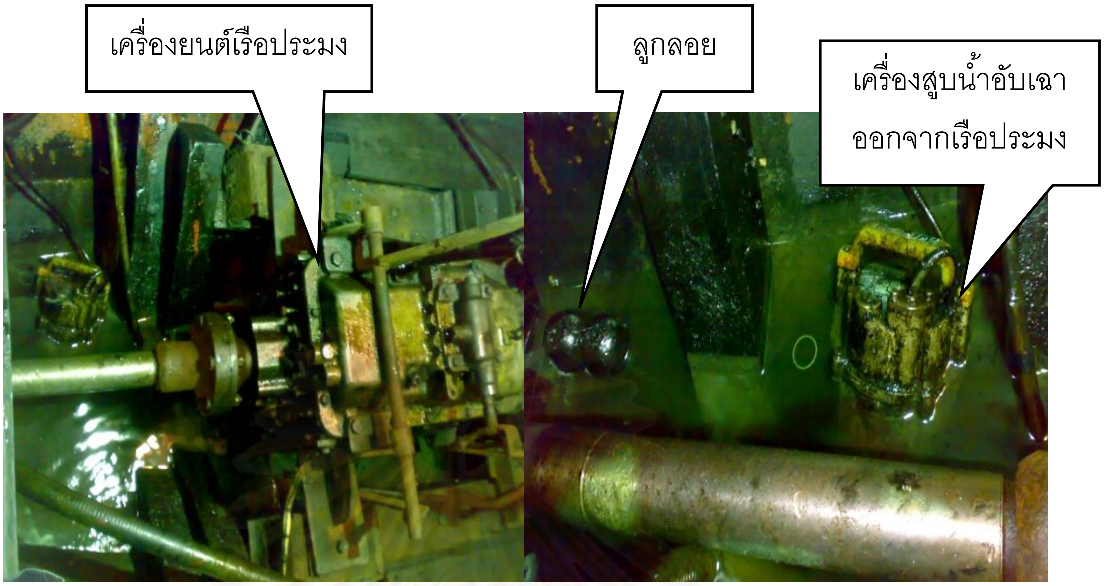
3.4 พัฒนาวิธีบำบัดน้ำอับเฉาเรือด้วย *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน

3.4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำอับเฉาเรือ

น้ำอับเฉาเรือที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นน้ำที่สูบเข้าสู่ห้องอับเฉาเรือ(รูปที่ 3.7) ใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็ก (รูปที่ 3.6) เพื่อช่วยปรับให้เรือมีความสมดุล การเปลี่ยนถ่ายน้ำอับเฉาเรือของชาวประมงเป็นแบบอัตโนมัติ (รูปที่ 3.8) โดยอาศัยหลักการทำงานของลูกลอย



รูปที่ 3.6 ตัวอย่างลักษณะของเรือประมงขนาดเล็กที่ใช้ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 3.7 ลักษณะห้องอับเฉาเรือใต้ท้องเรือ

รูปที่ 3.8 การปล่อยน้ำอับเฉาเรือของเรือประมง

ในการทดลองนี้เก็บตัวอย่างน้ำอับเฉาเรือครั้งละ 3 ตัวอย่าง จากบริเวณท่าเทียบเรือประมง จังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือนตุลาคมปี 2552 และในช่วงเดือนกรกฎาคมและสิงหาคมปี 2553 นำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สารแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids) น้ำมันและไขมัน (Oil and Grease) ปิโตรเลียม

(Petroleum) บีโอดี (BOD) ไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total Phosphorus) รวมทั้งสำรวจขนาดของเรือและปริมาณน้ำอับเฉาในเรือ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.2 การทดสอบปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมกับน้ำอับเฉาจากเรือต่าง ๆ

การทดลองนี้ศึกษาผลของปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้บำบัดกับน้ำอับเฉาเรือได้ทุกตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างน้ำอับเฉาเรือ 3 ตัวอย่าง จากเรือประมงที่มีลักษณะเดียวกันสามลำ นำมาผสมกัน ใส่ลงในฟลาสก์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 100 ppm ลงไปอีก จากนั้นเติมเซลล์ตรึง 0.20 กรัมต่อฟลาสก์ (15 ชิ้น) (เตรียมเซลล์ตรึงตามข้อ 3.2.1) แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เติมปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.4 โดยใช้แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจน และไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เป็นแหล่งฟอสฟอรัส

ชุดการทดลองที่ 2 ไม่เติมไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เป็นชุดการทดลองควบคุม เพื่อศึกษาผลของปริมาณสารอาหารที่มีอยู่แล้วในน้ำอับเฉาเรือต่อการลดลงของน้ำมัน

ทุกชุดการทดลองจะบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมดด้วยเครื่อง TLC – FID ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.5.1 วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั่วไปและจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.5.2

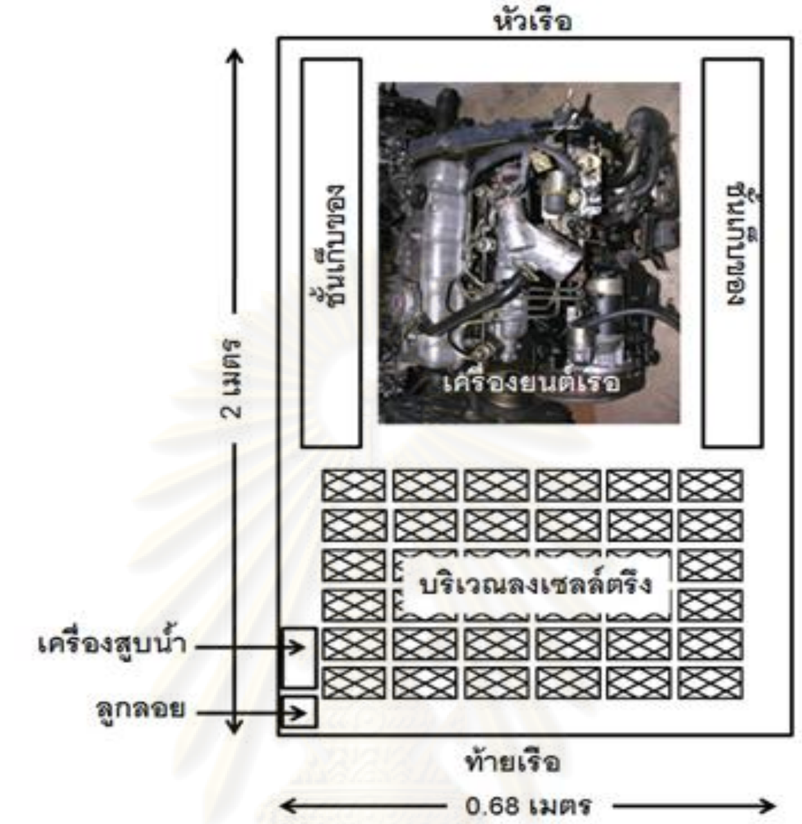
3.4.3 ศึกษาการนำ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนไปบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมง

การทดลองนี้ศึกษาการนำ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนไปบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็ก บริเวณท่าเทียบเรือประมง จังหวัดจันทบุรี โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ดังนี้ ชุดการทดลองควบคุมที่เติมโฟมพอลิยูรีเทนที่ไม่มีเซลล์ตรึง และชุดการทดลองที่เติมเซลล์ยีสต์ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนและปรับปริมาณสารอาหาร โดยนำเซลล์ยีสต์ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน (เตรียมเซลล์ตรึงตามข้อ 3.2.1) ใส่ในถุงตาข่าย ขนาด 10x6 ตารางเซนติเมตร (รูปที่ 3.9) เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้และการเก็บขึ้นมาจากท้องเรือ ทั้งนี้การนำเซลล์ตรึงจากห้องปฏิบัติการไปยังท่าเรือประมง จะเก็บเซลล์ตรึงไว้ในกระติกน้ำที่บรรจุน้ำแข็งเพื่อเป็นการรักษาอุณหภูมิในเย็นอยู่ตลอดเวลา จากนั้นนำเซลล์ตรึงไปปล่อยในน้ำอับเฉาเรือใต้ท้อง

เรือ (รูปที่ 3.10) โดยเก็บตัวอย่างเป็นเวลาประมาณ 3 วัน วันละสามครั้ง โดยเก็บตัวอย่างน้ำอับเฉาเรือครั้งละ 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างโฟมครั้งละ 3 ถุงตาข่าย และเติมโฟมกลับเข้าไปอีก 3 ถุงตาข่าย แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันสองส่วนคือ น้ำมันที่อยู่ในน้ำอับเฉาเรือ และน้ำมันที่ติดอยู่บนโฟม ด้วยเครื่อง TLC – FID ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.5.1 และวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั่วไปรวมทั้งจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.5.2

รูปที่ 3.9 เซลล์ยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนที่บรรจุอยู่ในตาข่าย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.10 เซลล์ตรึงที่ปล่อยในน้ำอับเฉาเรือบริเวณใต้ท้องเรือในเรือประมงขนาดเล็ก

3.5 วิธีการวิเคราะห์

3.5.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในตัวอย่างโดย ดัดแปลงจากวิธีของ Oh และคณะ (2000) โดยสกัดโฟมพอลิยูรีเทนด้วยคลอโรฟอร์มและเติมสารละลายมาตรฐาน stearyl alcohol 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ละลายในคลอโรฟอร์ม) จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้วนำมาสกัดต่อด้วยกรวยแยกโดยการเขย่ากรวยแยกเป็นเวลา 2 นาที แยกส่วนสารละลายออก แล้วสกัดโฟมพอลิยูรีเทนซ้ำอีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม แยกส่วนที่เป็นโฟมพอลิยูรีเทนทิ้งไป จากนั้นเทส่วนสารละลายทั้งหมดกลับเข้าไปในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้นระหว่างชั้นน้ำและชั้นคลอโรฟอร์ม ให้แยกชั้นคลอโรฟอร์มออกมาซึ่งมีน้ำมันละลายอยู่ จากนั้นนำไประเหยคลอโรฟอร์มด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศแบบหมุน จนมีปริมาณคลอโรฟอร์มเหลืออยู่ประมาณ 3 มิลลิลิตร นำไป

วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมดด้วยเครื่อง TLC – FID ตามวิธีของ Cavanagh และคณะ (1995) โดยคำนวณปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมด (Residual oil) ในตัวอย่างเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC – FID มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำมัน (ภาคผนวก) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยคำนวณจากสูตรนี้ [ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในแต่ละวัน/ปริมาณน้ำมันที่มีอยู่ในวันที่ 0] X 100

3.5.2 วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั่วไป และจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมัน

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั่วไปในตัวอย่างน้ำโดยใช้วิธี MPN (3 ซ้ำ ต่อ การวิเคราะห์แต่ละค่าการเจือจาง) ตามวิธีการทดลองของ Haines และคณะ (1996) โดยเติมอาหารเหลว Marine Broth (Difco 2261, USA) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม (well) ของ microtiter plate จำนวน 96 หลุม จากนั้นปิเปตตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ไปยังแต่ละหลุมที่อยู่ในแถวที่หนึ่ง ผสมตัวอย่าง และปิเปตตัวอย่างโดยวิธีเดิมไปยังแต่ละหลุมในแถวที่สอง เจือจางตัวอย่างจนกระทั่งถึงแถวที่เจ็ด ส่วนแถวที่แปดของ microtiter plate จะถูกใช้เป็นชุดควบคุม บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อโดยการเติมสารละลาย iodonitrotetrazolium violet (INT) ปลอดเชื้อ (3 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปใน microtiter plate แต่ละหลุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง สังเกตตะกอนสีส้มหรือสีชมพูของสาร formazan ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ INT ซึ่งให้เป็นผลบวก โดยเกิดจากสาร INT จะไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจนซึ่งเกิดจากการเจริญของเชื้อในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport chain) และนับจำนวนหลุมที่ให้ผลบวกในการทดสอบ นำไปเทียบค่ากับตาราง MPN (Haines และคณะ, 1996)

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในน้ำตัวอย่าง ทำเช่นเดียวกับการการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั่วไป แต่เปลี่ยนมาใช้อาหารเหลว NSW และเติมน้ำมันปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุมของ microtiter plate (ละลายน้ำมันในเฮกเซนแล้วระเหยเฮกเซนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมอาหารเหลว NSW) บ่มเป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อย่อยน้ำมันจากการแตกฟิล์มน้ำมันบนผิวหน้าอาหาร หรือจากการเปลี่ยนสีของน้ำมัน เป็นสีเหลืองส้ม นับจำนวนหลุมที่ให้ผลบวกในการทดสอบ นำไปเทียบค่ากับตาราง MPN

3.5.3 วิเคราะห์จำนวนยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน

วิเคราะห์จำนวนยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน โดยนำโฟมพอลิยูรีเทน จำนวน 1 ชิ้น (น้ำหนักโฟม 0.0125 กรัม) มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในขวดฝาเกลียว เติมสารละลายโซเดียมคลอ

ไรด์ 0.85 % 12.50 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางในเครื่องกำเนิดเสียงความแรงสูงสุดนาน 2 นาที และนำไปปั่นผสมนาน 2 นาที ดูดสารละลายแขวนลอยมา 0.1 มิลลิลิตร มาเจือจางเชื้อโดยวิธี 10-fold dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % 0.9 มิลลิลิตร นำค่าความเจือจางที่เหมาะสม มาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน คำนวณค่าในหน่วย CFU ต่อชุดการทดลอง

3.5.4 วิเคราะห์จำนวนยีสต์ที่หลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทน

โดยนำตัวอย่างน้ำจากชุดทดลองที่เติมยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % โดยวิธี 10-fold dilution และนำค่าความเจือจางที่เหมาะสม มาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน คำนวณค่าในหน่วย CFU ต่อชุดการทดลอง

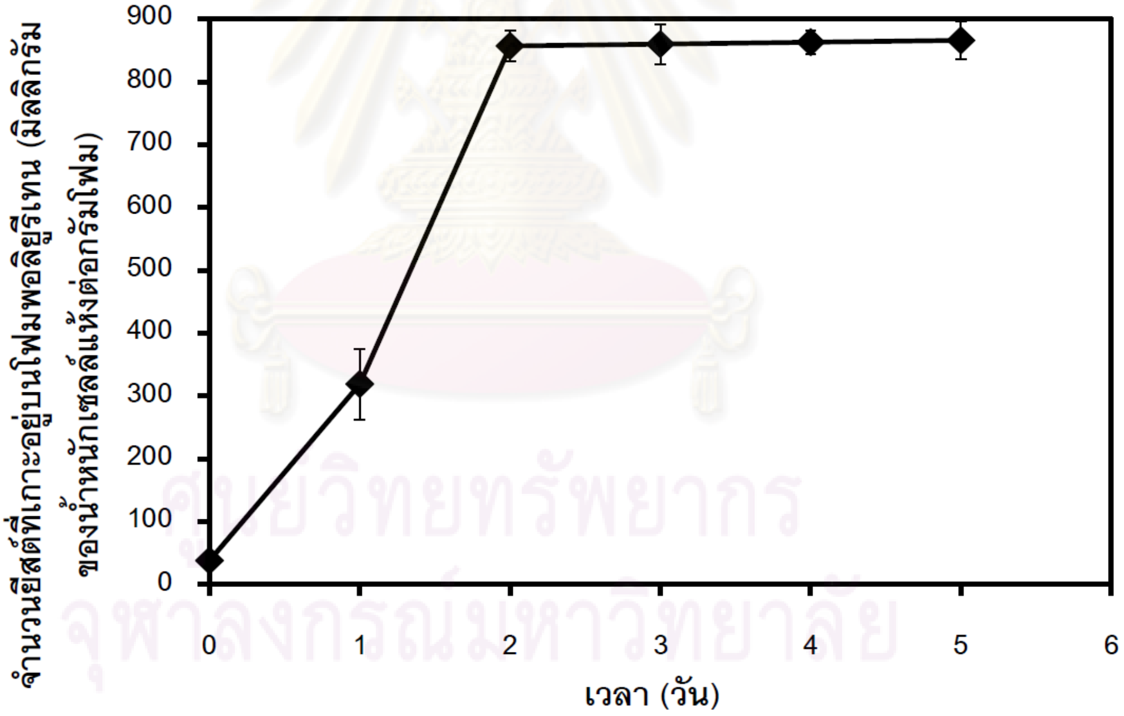
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

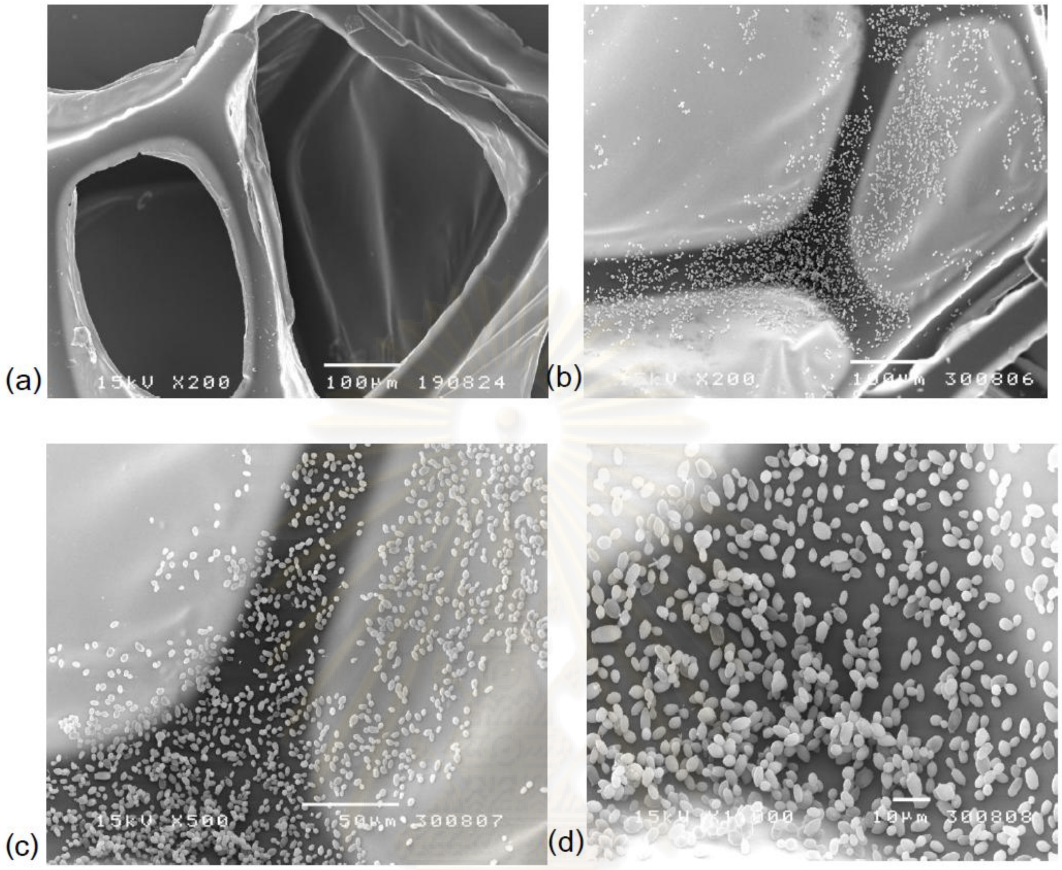
ผลการทดลอง

4.1 การตรึง *Candida* sp. JC4 บนโฟมพอลิยูรีเทน

การหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรึง *Candida* sp. JC4 บนโฟมพอลิยูรีเทน พบว่าการตรึงยีสต์ 2 วัน เป็นเวลาที่เหมาะสม (รูปที่ 4.1) โดยยีสต์จะมีจำนวนมากที่สุดบนโฟมพอลิยูรีเทนในวันที่ 2 ของการทดลองและมีค่าคงที่ไปจนถึงวันที่ 5 เมื่อนำเซลล์ตรึงไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนซึ่งเป็นเซลล์ตรึงก่อนการนำไปบำบัดน้ำมัน (รูปที่ 4.2) พบว่ามียีสต์จำนวนมากยึดติดกับพื้นผิวของโฟมพอลิยูรีเทน ในลักษณะรวมตัวกันเป็นกลุ่มเซลล์และกระจายตัวอยู่บนผิวของโฟมพอลิยูรีเทน



รูปที่ 4.1 จำนวนยีสต์ที่เกาะอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน (มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมโฟม) เป็นเวลา 5 วัน



รูปที่ 4.2 **เซลล์ตรึงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนก่อนการนำไปใช้บำบัดน้ำมัน : โฟมพอลิยูรีเทนไม่มีเซลล์ตรึง** (a) **กำลังขยาย 200 เท่า และ โฟมพอลิยูรีเทนที่มีเซลล์ตรึงเกาะ** (b-c) **ที่กำลังขาย 200 500 และ 1,000 เท่า ตามลำดับ**

4.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วย ***Candida*** **sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน**

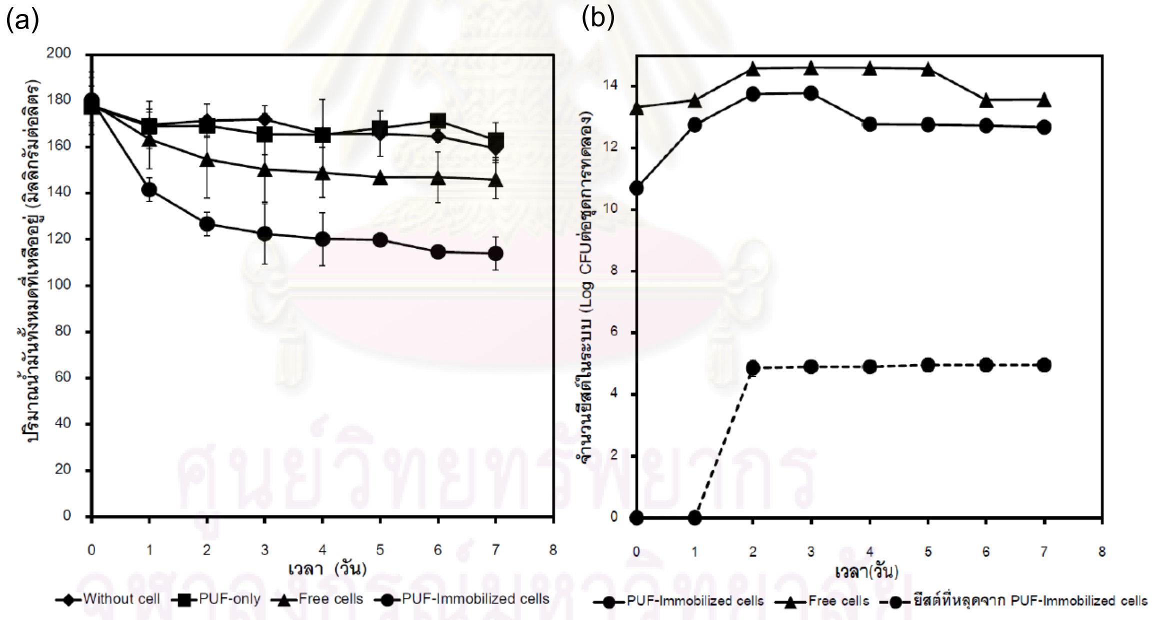
4.2.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันระหว่างเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ โดยใช้น้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเซลล์ตรึงมีความสามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (รูปที่ 4.3a) โดยในชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ประมาณ 114 มิลลิกรัมต่อลิตร (63 %) เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมเซลล์อิสระมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ประมาณ 146 มิลลิกรัมต่อลิตร (81 %) นอกจากนี้ในชุดการทดลองส่วนของ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารและโฟมพอลิยูรีเทนที่ไม่เติมหัวเชื้อลงไปซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุมพบว่า การสลายตัวของน้ำมันเกิดขึ้นได้น้อยมาก โดยมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ประมาณ 160 - 163 มิลลิกรัมต่อลิตร (90 - 92 %) เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

สำหรับการศึกษาการเจริญของยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน (รูปที่ 4.3b) พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนยีสต์ทั้งหมดมีค่าประมาณ 10.70 log CFU ต่อชุดการทดลอง และยีสต์เพิ่มจำนวนมากขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 ประมาณ 13.77 log CFU ต่อชุดการทดลอง และเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน พบว่ายีสต์มีจำนวนลดลงเหลืออยู่ 13.37 log CFU ต่อชุดการทดลอง นอกจากนี้พบว่ายีสต์จะเริ่มหลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทนในวันที่ 2 และเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน มียีสต์หลุดออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 4.96 log CFU ต่อชุดการทดลอง ในส่วนของยีสต์อิสระในวันที่ 0 และ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4.3b) พบว่ามีจำนวนยีสต์ทั้งหมด 13.32 และ13.57 Log CFU ต่อชุดการทดลอง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์อิสระเพิ่มจำนวนสูงสุดในวันที่ 2 ของการทดลองประมาณ 14.70 log CFU ต่อชุดการทดลอง

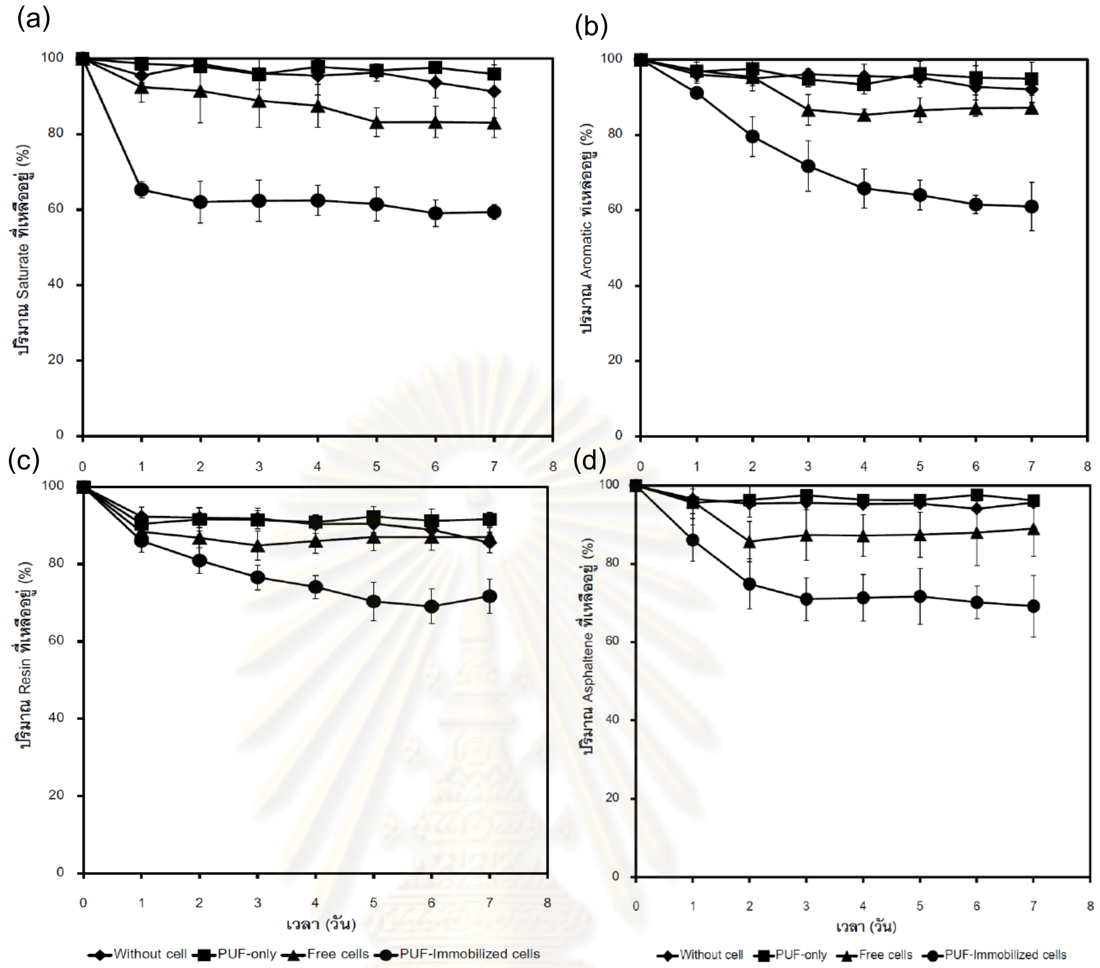


รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (a) และจำนวนยีสต์ในระบบ (log CFUต่อชุดการทดลอง) (b) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการลดลงขององค์ประกอบในน้ำมันซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ saturate 35 %, aromatic 19 %, resin 2 % และ asphaltene 44% พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7

วัน ชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ส่วน ได้ดีกว่าชุดการทดลองที่เติมเซลล์อิสระ โดยชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันในส่วนของ saturate (รูปที่ 4.4a) ได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณเหลืออยู่ 59 % รองลงมาคือ aromatic (รูปที่ 4.4b), asphaltene (รูปที่ 4.3d) และ resin (รูปที่ 4.4c) มีปริมาณเหลืออยู่ 61, 69 และ 71 % ตามลำดับ เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่เติมเซลล์อิสระพบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันในส่วนของ saturate ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน โดยมีปริมาณเหลืออยู่ 83 % รองลงมาคือ aromatic, asphaltene และ resin มีปริมาณเหลืออยู่ 86, 87 และ 89 % ตามลำดับ นอกจากนี้ชุดการทดลองควบคุมที่มีแต่อาหารและ/หรือโฟมพอลิยูรีเทนที่ไม่เติมหัวเชื้อลงไปมีปริมาณน้ำมันทั้ง 4 ส่วน เหลืออยู่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงหรือเซลล์อิสระ โดยมีปริมาณน้ำมันในส่วนของ saturate, aromatic, resin และ asphaltene เหลืออยู่ประมาณ 91-95 %, 92-94 %, 86-91 % และ 96-97 % ตามลำดับ ซึ่งผลการย่อยสลายน้ำมันทั้งหมดสรุปในตารางที่ 4.1 ดังนั้นจะเห็นว่าการลดลงของน้ำมันเกิดจากความสามารถในการใช้น้ำมันของยีสต์เป็นหลัก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 **ปริมาณ** saturate **ที่เหลืออยู่** (%) (a) **ปริมาณ** aromatic **ที่เหลืออยู่** (%) (b) **ปริมาณ** Resin **ที่เหลืออยู่** (%) (c) **และปริมาณ** asphaltene **ที่เหลืออยู่** (%) (d) **ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น** 200 **มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา** 7 **วัน**

ตารางที่ 4.1 **สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น** 200 **มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ หลังจากบ่มเป็นเวลา** 7 **วัน**

ชุดการทดลอง	**ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัม)**				
	Total	Saturate	Aromatic	Resin	Asphaltene
PUF-Immobilized cells	114 ± 7.2	35 ± 4.1	21 ± 3.3	2 ± 0.1	56 ± 5.2
Free cells	146 ± 8.2	49 ± 3.2	31 ± 4.1	3 ± 0.2	65 ± 7.0
PUF-only	163 ± 7.4	56 ± 5.1	32 ± 2.6	3 ± 0.1	73 ± 9.3
Without cell	160 ± 6.1	54 ± 3.	32 ± 1.1	3 ± 0.1	71 ± 2.5

4.2.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานและผ่านการใช้งานแล้วระหว่างเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ

เนื่องจากในน้ำอับเฉาเรือมีการปนเปื้อนของน้ำมันเครื่องทั้งชนิดที่เป็นน้ำมันที่ยังไม่ได้ใช้งาน (Fresh oil) และผ่านการใช้งานมาแล้ว (Used oil) ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาถึงประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องทั้งสองชนิดของเซลล์ตรึง โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำมัน 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเป็นเวลา 5 วัน พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องชนิดที่ยังไม่ได้ใช้งานได้ดีกว่าชนิดที่ใช้งานมาแล้ว (รูปที่ 4.5a) โดยมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ 667 มิลลิกรัมลิตร (75 %) และ 685 มิลลิกรัมต่อลิตร (84 %) ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับชุดการทดลองที่เติมเซลล์อิสระที่สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องชนิดที่ยังไม่ได้ใช้งานได้ดีกว่าชนิดที่ใช้งานมาแล้ว ซึ่งมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ 769 มิลลิกรัมต่อลิตร (87 %) และ 805 มิลลิกรัมต่อลิตร (92 %) ตามลำดับ นอกจากนี้ชุดการทดลองของอาหารที่ไม่เติมหัวเชื้อและเซลล์ตรึงที่เป็นแบบคิลเซลล์ (killed cells) พบว่ามีปริมาณน้ำมันทั้งหมดของน้ำมันที่ยังไม่ได้ใช้งานและใช้งานแล้วเหลืออยู่ในช่วง 834 - 838 และ 831 - 844 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (93 - 96 %)

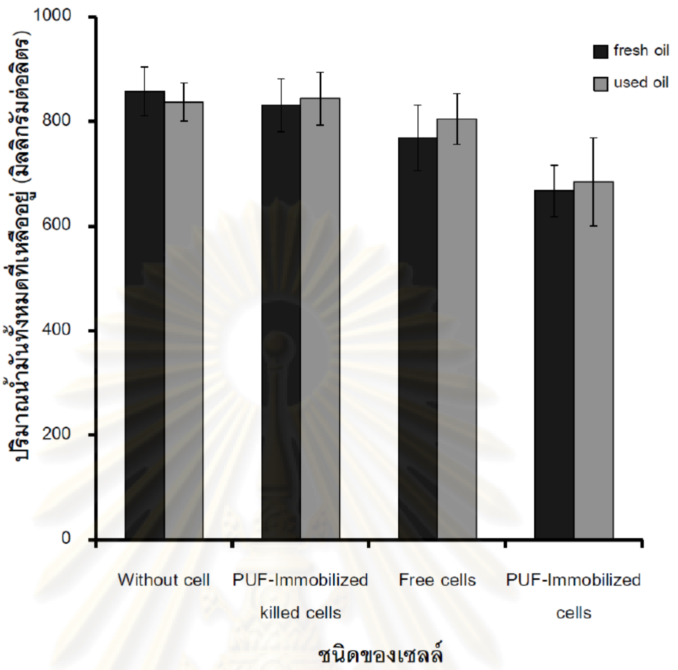
สำหรับผลการศึกษาการเจริญของยีสต์ของน้ำมันทั้งสองชนิด พบว่าชุดการทดลองที่ใช้น้ำมันที่ยังไม่ได้ใช้งานจะมีจำนวนยีสต์สูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้น้ำมันที่ใช้งานแล้ว โดยจำนวนยีสต์บนโฟมพอลิยูรีเทนในน้ำมันที่ยังไม่ได้ใช้งาน (รูปที่ 4.5b) พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลองมีจำนวนยีสต์ทั้งหมด 9.97 log CFU ต่อชุดการทดลอง และเพิ่มขึ้นเป็น 11.72 log CFU ต่อชุดการทดลอง เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน ในส่วนของจำนวนยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งหลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทน (รูปที่ 4.5b) พบว่า ในวันที่ 5 ของการทดลอง มียีสต์หลุดออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 3.11 log CFU ต่อชุดการทดลอง นอกจากนี้จำนวนยีสต์ทั้งหมดบนโฟมพอลิยูรีเทนที่เป็นแบบคิลเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน มีจำนวนลดลงจาก 10.02 log CFU ต่อชุดการทดลองในวันที่ 0 เป็น 3.61 log CFU ต่อชุดการทดลอง และในวันที่ 5 ของการทดลอง และไม่พบยีสต์ที่หลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทนในชุดการทดลองเซลล์ตรึงที่เป็นแบบคิลเซลล์ เนื่องจากได้มีการเติมโซเดียมเอไซด์ลงไปในอาหารจึงทำให้เซลล์ที่อยู่บนโฟมและเซลล์ที่หลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทนตายไป ในส่วนของเซลล์อิสระพบว่ามีการเจริญของยีสต์น้อยกว่าชุดการทดลองที่เป็นเซลล์ตรึงโดยในวันที่ 0 มีจำนวนยีสต์ทั้งหมด 12.98 log CFU ต่อชุดการทดลอง และเพิ่มจำนวนเป็น 13.90 log CFU ต่อชุดการทดลอง เมื่อผ่านไป 5 วัน

ในส่วนของการศึกษาการเจริญของยีสต์บนโฟมพอลิยูรีเทนในน้ำมันที่ใช้งานแล้ว (รูปที่ 4.5c) พบว่า ในวันที่ 0 มีจำนวนยีสต์ทั้งหมด 9.89 log CFU ต่อชุดการทดลอง และเพิ่มเป็น 11.35 log CFU ต่อชุดการทดลอง เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน ในส่วนของจำนวนยีสต์ในอาหารเลี้ยง

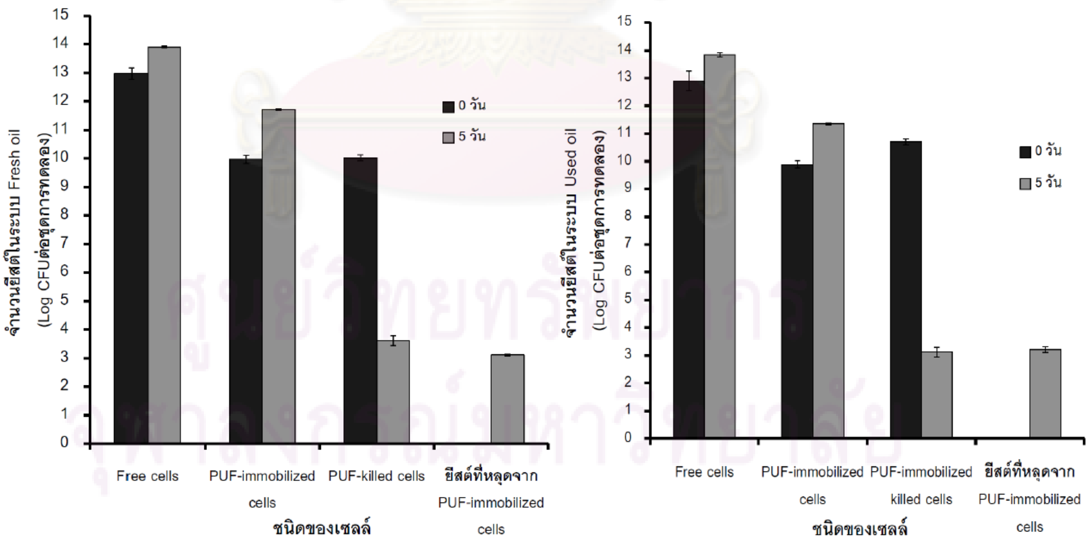
เชื้อซึ่งหลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทน (รูปที่ 4.5c) พบว่าในวันที่ 5 ของการทดลองมียีสต์หลุดออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 3.20 log CFU ต่อชุดการทดลอง ในส่วนของชุดการทดลองเซลล์ตรึงที่เป็นแบบคิลเซลล์ พบว่าจำนวนยีสต์บนโฟมพอลิยูรีเทนมีจำนวนลดลงจาก 10.70 log CFU ต่อชุดการทดลอง ในวันที่ 0 เหลือ 3.12 log CFU ต่อชุดการทดลอง ในวันที่ 5 นอกจากนี้ยังไม่พบการเจริญของยีสต์ที่หลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทน เนื่องจากได้มีการเติมโซเดียมเอไซด์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับการทดลองข้างต้น สำหรับการเจริญของเซลล์อิสระมีจำนวนยีสต์ทั้งหมดในวันที่ 0 เท่ากับ 12.90 log CFU ต่อชุดการทดลองเพิ่มเป็น 13.84 log CFU ต่อชุดการทดลอง เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(a)



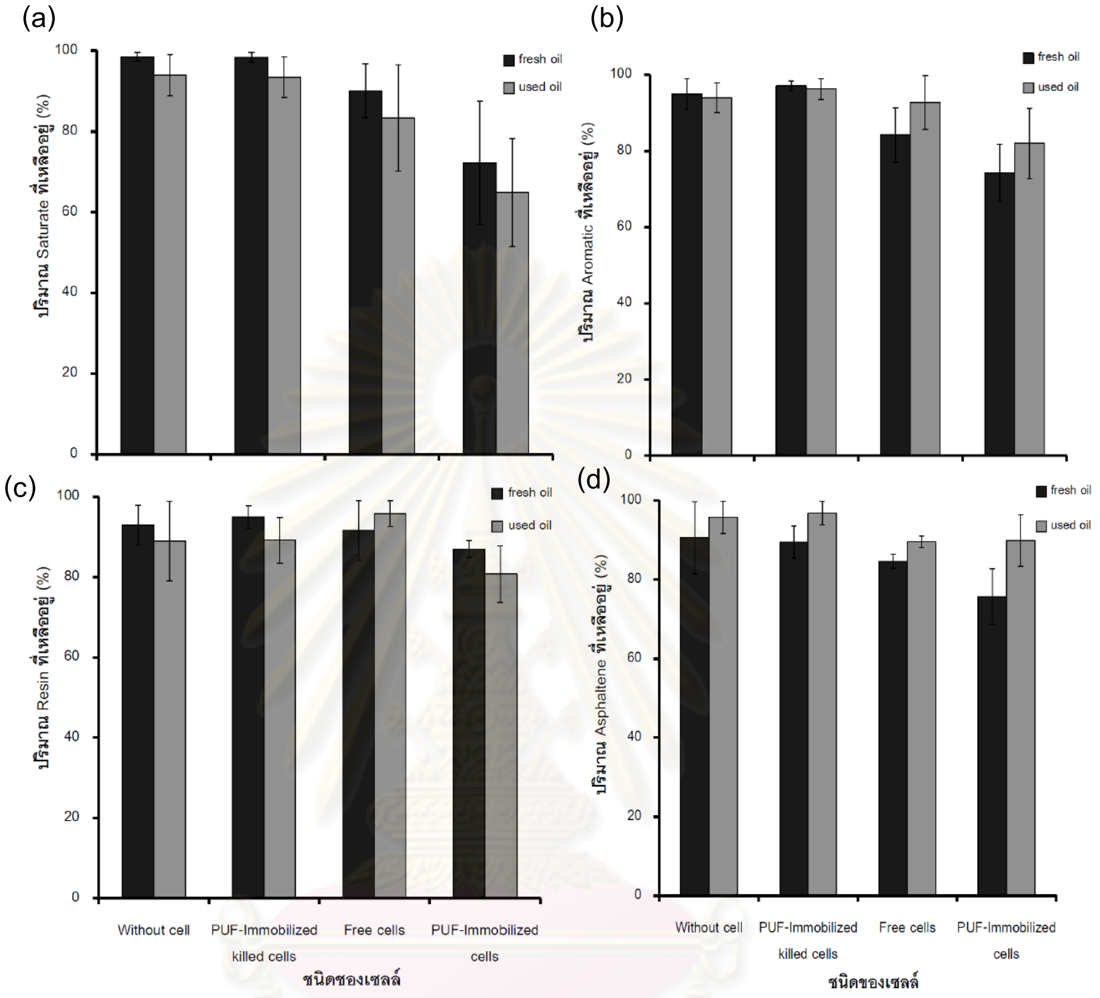
(b) (c)



รูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (a) จำนวนยีสต์ในระบบ Fresh oil (b) และจำนวนยีสต์ในระบบ Used oil (log CFUต่อชุดการทดลอง) (c) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ใช้งานและใช้งานแล้วความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน

ผลของการลดลงขององค์ประกอบทั้ง 4 ส่วนในน้ำมัน (รูปที่ 4.6) โดยน้ำมันที่ยังไม่ได้ใช้งานมี saturate 22 %, aromatic 15 %, resin 2 % และ asphaltene 61% ส่วนน้ำมันที่ใช้งานแล้วมี saturate 43 %, aromatic 22 %, resin 2 % และ asphaltene 33% พบว่าน้ำมันที่ยังไม่ได้ใช้งานจะถูกย่อยสลายได้ดีกว่าน้ำมันที่ใช้งานแล้ว ทั้งนี้เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ส่วน ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ โดยในน้ำมันที่ยังไม่ได้ใช้งานเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันในส่วนของ saturate ได้ดีที่สุด มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ 72 (รูปที่ 4.6a) รองลงมาคือ aromatic (รูปที่ 4.6b) asphaltene (รูปที่ 4.6d) และ resin (รูปที่ 4.6c) ซึ่งมีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ 74 %, 76 % และ 87 % ตามลำดับ และในน้ำมันที่ใช้งานแล้วเซลล์ตรึงย่อยสลายน้ำมันในส่วนของ saturate ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ 65 % รองลงมาคือ aromatic resin และ asphaltene มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ 82 %, 81 % และ 90 % ในส่วนของเซลล์อิสระพบว่ามีแนวโน้มในการย่อยสลายน้ำมันเช่นเดียวกับเซลล์ตรึงซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันในส่วนของ saturate ได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.6a) โดยมีปริมาณน้ำมันที่ยังไม่ได้ใช้งานและใช้งานแล้วเหลืออยู่ประมาณ 87 % รองลงมาคือ asphaltene (รูปที่ 4.6d), aromatic (รูปที่ 4.6b) และ resin (รูปที่ 4.6c) มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ประมาณ 90 %, 93 % และ 96 % ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองในส่วนของอาหารที่ไม่เติมหัวเชื้อและชุดการทดลองเซลล์ตรึงที่เป็นแบบคิลเซลล์ซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุมพบว่า องค์ประกอบในน้ำมันทั้ง 4 ส่วนของน้ำมันที่ยังไม่ได้ใช้งานและใช้งานแล้วส่วนมีการย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งผลการย่อยสลายน้ำมันทั้งหมดสรุปในตารางที่ 4.2 ดังนั้นจะเห็นว่าการลดลงของน้ำมันส่วนใหญ่มาจากความสามารถในการใช้น้ำมันของยีสต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.6 ปริมาณ saturate ที่เหลืออยู่ (%) (a) ปริมาณ aromatic ที่เหลืออยู่ (%) (b) ปริมาณ Resin ที่เหลืออยู่ (%) (c) และปริมาณ asphaltene ที่เหลืออยู่ (%) (d) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ใช้งานและใช้งานแล้วความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน

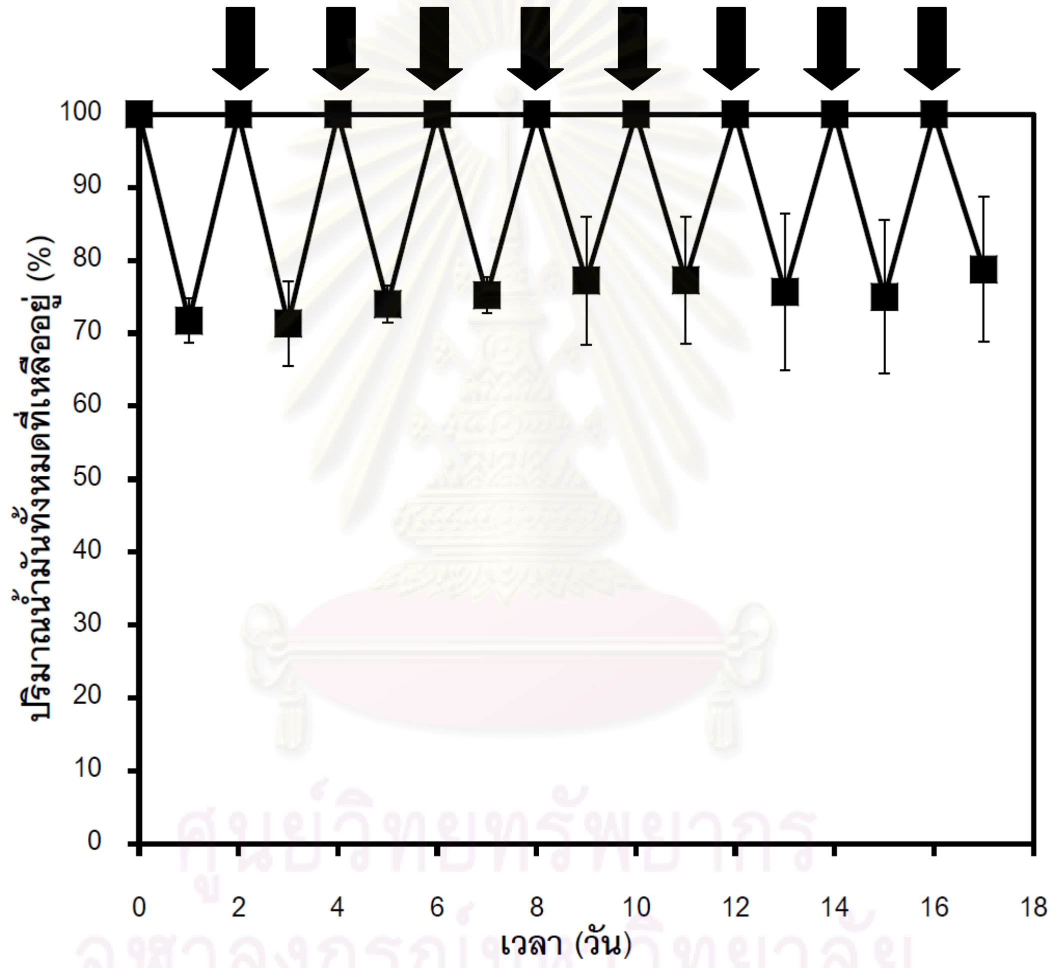
ตารางที่ 4.2 สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานและใช้งานแล้ว ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ หลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 วัน

ชุดการทดลอง	ชนิดน้ำมัน	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัม)				
		Total	Saturate	Aromatic	Resin	Asphaltene
PUF-Immobilized cells	ยังไม่ใช้	667 ± 49.8	133 ± 35.0	97 ± 14.5	13± 6.5	425 ± 35.8
	ใช้แล้ว	685 ± 84.2	250 ± 37.2	154 ± 21.8	17 ± 5.6	262 ± 35.4
Free cells	ยังไม่ใช้	769 ± 62.5	168 ± 25.6	113 ± 12.8	14 ± 2.6	474 ± 39.3
	ใช้แล้ว	805 ± 48.5	352 ± 53.7	177 ± 19.1	17 ± 6.2	259 ± 16.1
PUF-Immobilized killed cells	ยังไม่ใช้	831 ± 50.4	188 ± 1.2	133 ± 7.8	14 ± 5.3	496 ± 42.8
	ใช้แล้ว	844 ± 50.1	352 ± 5.0	181 ± 10.4	18 ± 3.6	293 ± 16.6
Without cell	ยังไม่ใช้	834 ± 46.8	185 ± 17.6	138 ± 19.9	15 ± 5.6	496 ± 13.2
	ใช้แล้ว	838 ± 36.7	361± 28.9	187 ± 13.0	16 ± 1.6	274 ± 12.0

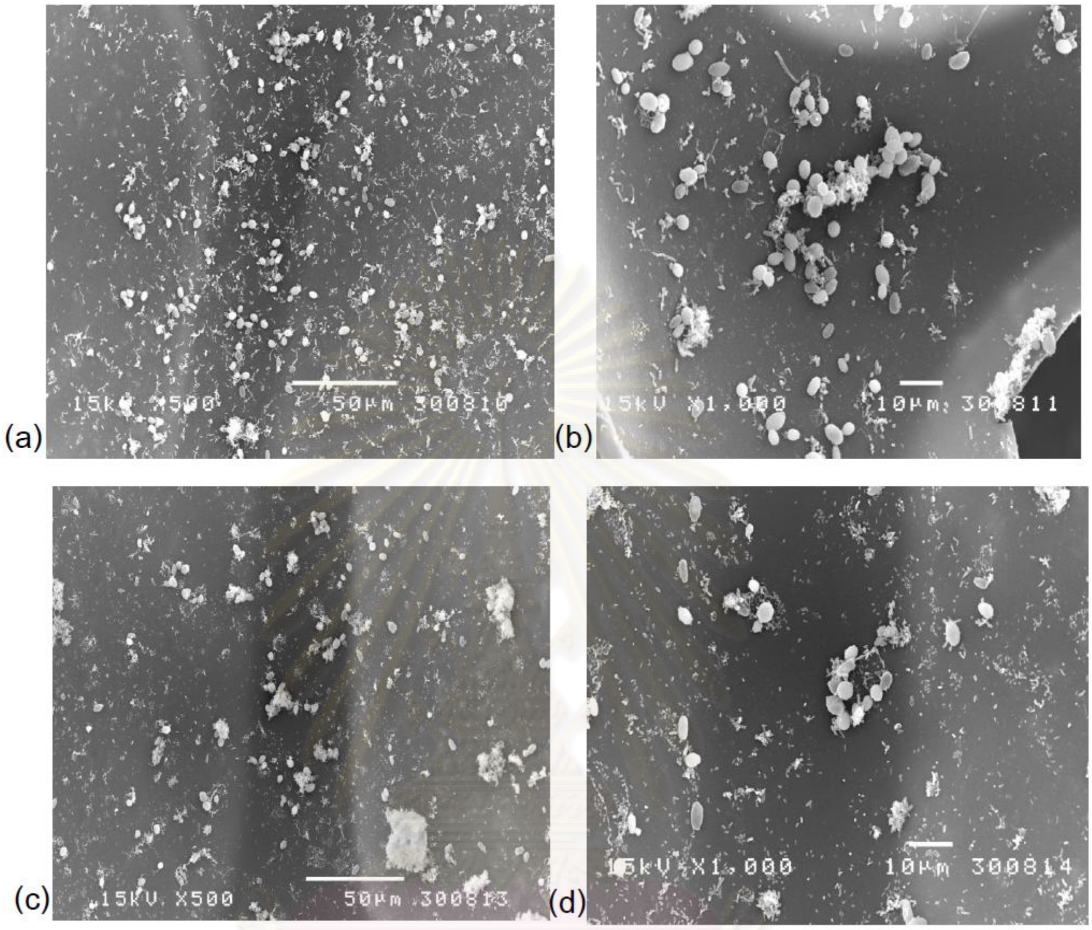
4.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายน้ำมัน

การทดลองนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพการในการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึง เพื่อดูว่าเซลล์ตรึงที่นำไปใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องยังคงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันได้เหมือนกับการใช้ครั้งเดียวหรือไม่ โดยในการทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันเครื่องความเข้มข้นเริ่มต้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และทุกๆ 2 วัน จะถ่ายเซลล์ตรึงลงไปในฟลาสก์ใหม่ที่มีน้ำมันเครื่องความเข้มข้นเริ่มต้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 ครั้ง เป็นเวลาทั้งสิ้น 17 วัน ผลการทดลองพบว่า (รูปที่ 4.7) เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพค่อนข้างดีในการนำไปใช้ซ้ำ โดยการใช้เซลล์ตรึงในครั้งแรกมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ 71 % ซึ่งการลดลงของน้ำมันนี้ใกล้เคียงกับผลการทดลองข้อ 4.2.1 ที่มีปริมาณน้ำมันเริ่มต้นที่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน มีปริมาณน้ำมันทั้งหมดคงเหลือ 70 % เมื่อใช้เซลล์ตรึงซ้ำไปเรื่อยๆ อย่างต่อเนื่อง พบว่าปริมาณ

น้ำมันที่เหลืออยู่มีแนวโน้มสูงขึ้นเล็กน้อย และการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงในครั้งสุดท้ายพบว่ามีปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมด 79 % ซึ่งเมื่อนำเซลล์ตรึงที่ใช้บำบัดน้ำมันแล้วอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 9 วัน และ 17 วัน ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (รูปที่ 4.8) พบว่าจำนวนยีสต์ที่เกาะอยู่บนผิวของโฟมพอลิยูรีเทนมีจำนวนลดลง ซึ่งคาดว่าทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงลดลง



รูปที่ 4.7 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ทั้งหมดหลังจากเติมน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกๆ 2 วัน (ลูกศรแสดงเวลาที่เติมน้ำมัน) ในระบบที่มีการใช้เซลล์ตรึงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 17 วัน



รูปที่ 4.8 เซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 9 วัน (a - b) และ 17 วัน (c - d) ที่กำลังขยาย 500 และ 1,000 เท่า ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

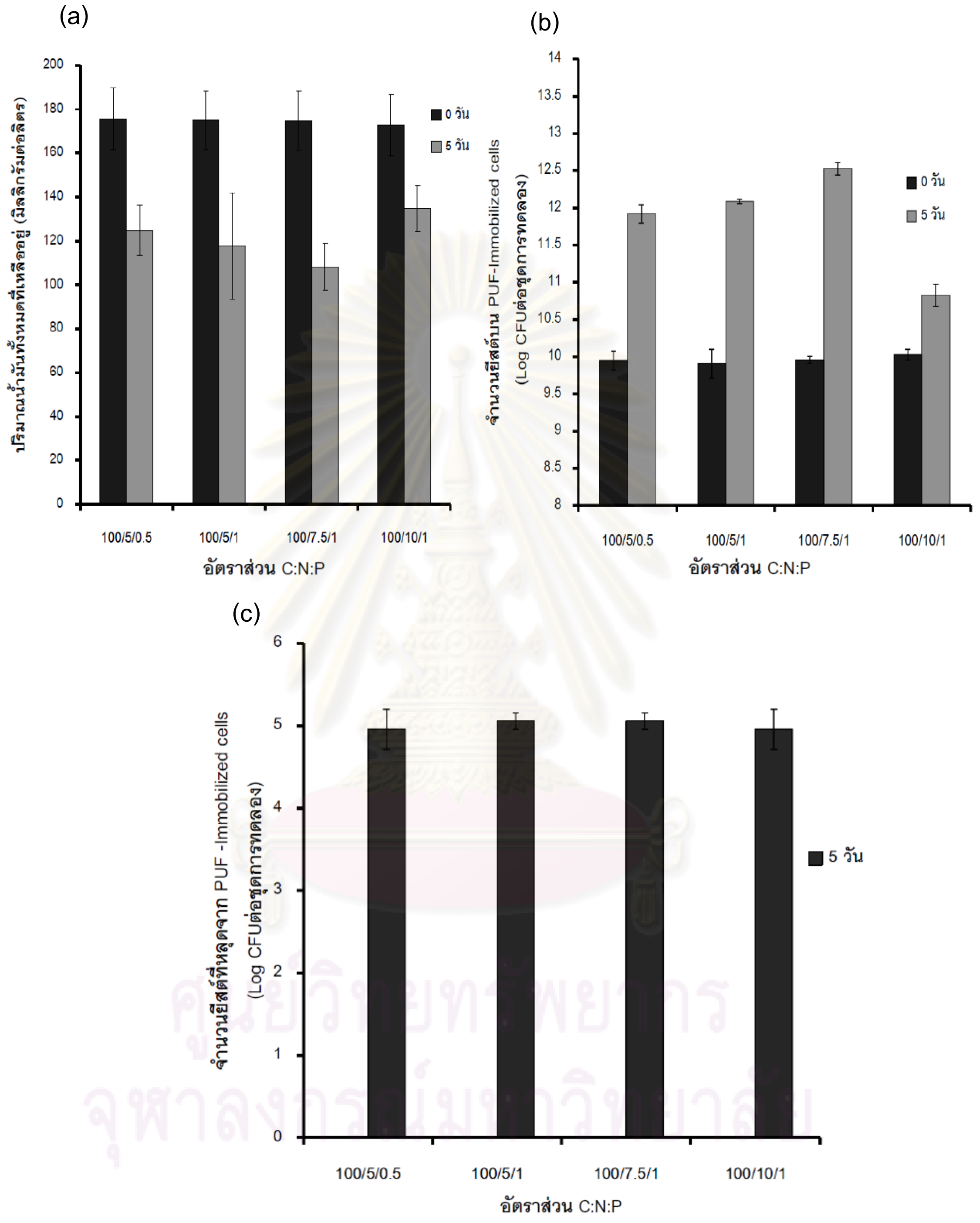
4.2.4 การหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสม

จากผลการทดลองที่ผ่านมาจะพบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันได้พอสมควร ดังนั้นในขั้นตอนนี้จะศึกษาปริมาณของสารอาหารที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงได้ โดยในการทดลองเติมน้ำมันเครื่องที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และปรับอัตราส่วนของ C/N/P ในระบบ ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่เติมน้ำมันเครื่องที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอัตราส่วน C/N/P เป็น 100/5/0.5 ผลการทดลองพบว่าอัตราส่วน C/N/P 100/7.5/1 มีการย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.9a) โดยมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ 108 มิลลิกรัมต่อลิตร (61 %) รองลงมาคือ อัตราส่วน C/N/P 100/5/1 มีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ 118 มิลลิกรัมต่อลิตร (67%) และ อัตราส่วน

C/N/P 100/5/0.5 ซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุมพบว่ามีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ 125 มิลลิกรัมต่อลิตร (71 %) ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าเมื่อปรับปริมาณสารอาหารในอัตราส่วน C/N/P 100/10/1 มีการย่อยสลายน้ำมันลดลงเมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุมโดยมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ 135 มิลลิกรัมต่อลิตร (78 %)

สำหรับผลการศึกษาการเจริญของยีสต์บนโฟมพอลิยูรีเทน (รูปที่ 4.9b) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน มีการเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับวันที่ 0 โดยการปรับปริมาณอาหารในอัตราส่วน C/N/P 100/7.5/1 มีการเจริญของยีสต์สูงสุดเท่ากับ 12.53 log CFU ต่อชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการของย่อยการสลายน้ำมันได้ดีที่สุด รองลงมาคือ อัตราส่วน C/N/P 100/5/1 และ 100/5/0.5 มีจำนวนยีสต์ 12.01 และ 11.92 log CFU ต่อชุดการทดลอง ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าการปรับปริมาณอาหารในอัตราส่วน C/N/P 100/10/1 มีการเจริญของยีสต์น้อยที่สุด คือ 10.82 log CFU ต่อชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการของย่อยสลายน้ำมันได้น้อยที่สุด นอกจากนี้เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน พบว่าทุกชุดการทดลองมีจำนวนยีสต์ซึ่งหลุดออกมาจากโฟมพอลิยูรีเทน (รูปที่ 4.9c) อยู่ในช่วง 4.96 - 5.01 log CFU ต่อชุดการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

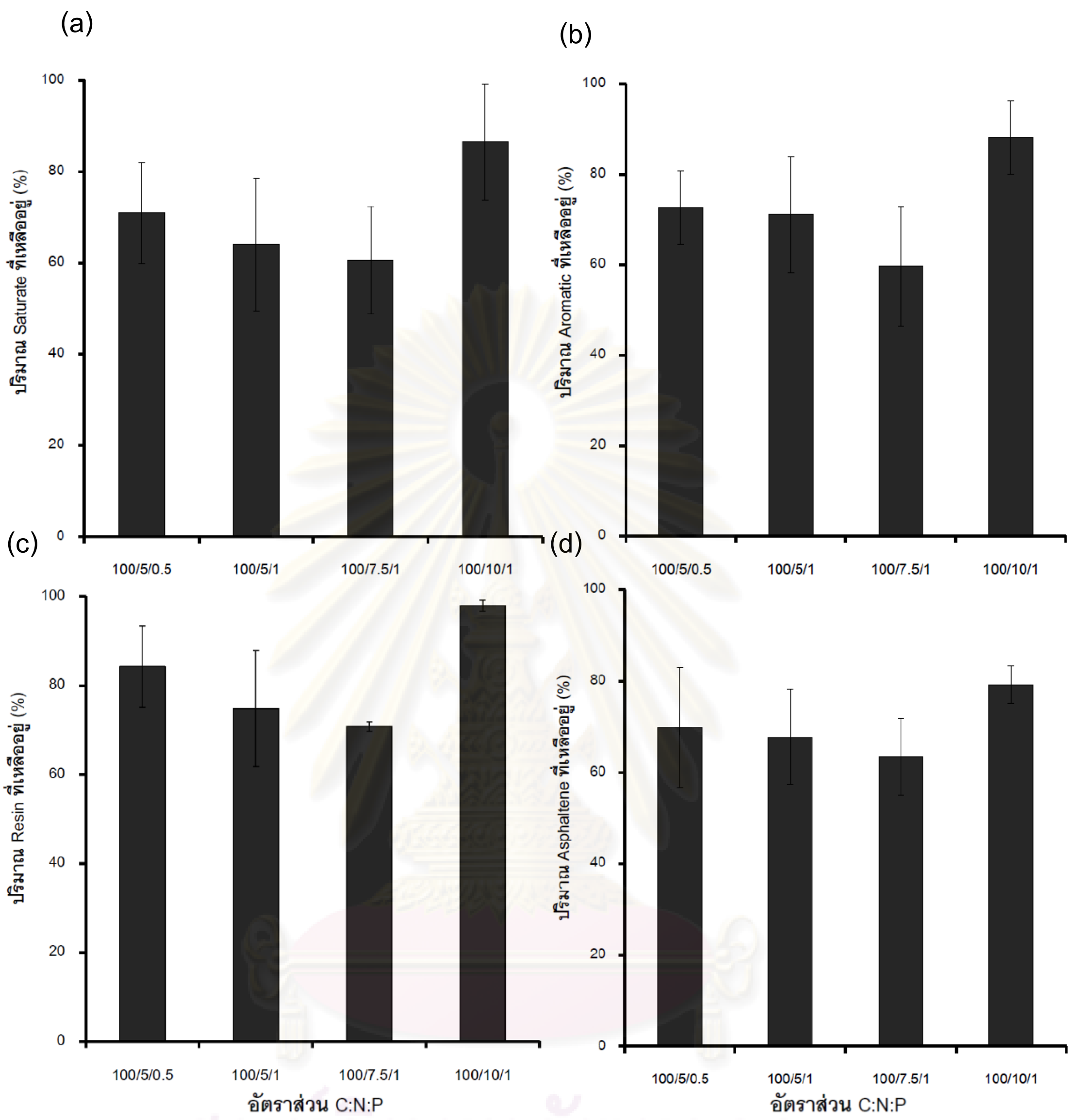


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.9 ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (a) จำนวนยีสต์บน PUF-Immobilized cells (b) และจำนวนยีสต์ที่หลุดจาก PUF-Immobilized cells (c) (log CFUต่อชุดการทดลอง) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน

ในชุดทดลองที่ปรับปริมาณสารอาหารในอัตราส่วน C/N/P 100/7.5/1 สามารถย่อยสลายองค์ประกอบทั้ง 4 ส่วน ในน้ำมันได้ดีกว่าอัตราส่วนอื่น ซึ่งน้ำมันในส่วนของ saturate (รูปที่ 4.10a) จะถูกย่อยสลายได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณเหลืออยู่ 60 % รองลงมาคือ aromatic (รูปที่ 4.10b), asphaltene (รูปที่ 4.10d) และ resin (รูปที่ 4.10c) มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ 61 % 63 % และ 70 % ตามลำดับ ขณะที่ในอัตราส่วน C/N/P 100/5/1, 100/10/1 และ 100/5/0.5 มีปริมาณน้ำมันในส่วนของ saturate เหลืออยู่ประมาณ 65 - 75 % ในส่วนของ aromatic มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ประมาณ 71 - 78 % และในส่วนของ asphaltene มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ประมาณ 70 - 80 % รวมทั้งในส่วนของ resin มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ประมาณ 75 - 98 % ซึ่งผลการย่อยสลายน้ำมันทั้งหมดสรุปในตารางที่ 4.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 ปริมาณ saturate ที่เหลืออยู่ (%) (a) ปริมาณ aromatic ที่เหลืออยู่ (%) (b) ปริมาณ Resin ที่เหลืออยู่ (%) (c) และปริมาณ asphaltene ที่เหลืออยู่ (%) (d) ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ปรับปริมาณสารอาหาร เป็นเวลา 5 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่อง ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ ที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร หลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 วัน

อัตราส่วน C/N/P	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัม)				
	Total	Saturate	Aromatic	Resin	Asphaltene
100/5/0.5	125 ± 11.4	42 ± 6.5	24 ± 2.3	3± 0.2	56 ± 5.7
100/5/1	118 ± 24.1	37 ± 4.7	24 ± 3.3	2 ± 0.5	55 ± 19.9
100/7.5/1	108 ± 10.8	35 ± 5.1	20 ± 3.4	2 ± 0.4	51 ± 9.1
100/10/1	135 ± 10.5	43 ± 5.2	26 ± 4.3	3 ± 0.3	63 ± 2.4

จากผลการทดลองในข้อ 4.2 ทั้งหมด (ข้อ 4.2.1 - 4.2.4) ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW จะเห็นว่าการลดลงของน้ำมันส่วนใหญ่เกิดจากความสามารถของยีสต์ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน ดังนั้นการศึกษาในขั้นต่อไปจะศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือ และพัฒนาวิธีบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็ก

4.3 พัฒนาวิธีบำบัดน้ำอับเฉาเรือด้วย *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน

4.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำอับเฉาเรือ

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำอับเฉาเรือในช่วงเดือนตุลาคม ปี 2552 และเดือนกรกฎาคมและสิงหาคม ปี 2553 แล้วนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่างๆ (ตารางที่ 4.4) พบว่าน้ำอับเฉาเรือมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 6.6 - 7.3 ค่าความเค็มอยู่ในช่วง 2.7 - 3.6 % ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดอยู่ในช่วง 118 - 275 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดีอยู่ในช่วง 12.5 - 380 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าปิโตรเลียมอยู่ในช่วง 70 - 161 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งจะแสดงองค์ประกอบของน้ำมันตามเดือนที่เก็บตัวอย่างในตารางที่ (ตารางที่ 4.5) และค่าน้ำมันและไขมันอยู่ในช่วง 9 - 38 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าค่าปิโตรเลียม ค่าบีโอดี และค่าน้ำมันและไขมัน อยู่ในช่วงที่มีเกณฑ์สูงกว่าค่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง (กรมควบคุมมลพิษ, 2551) จึงควรมีการบำบัด นอกจากนี้พบว่ามีค่าไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.82 - 13.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และฟอสฟอรัสทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.71 - 3.24 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบของน้ำอับเฉาเรือ

พารามิเตอร์	หน่วย	ตุลาคม ปี 2552			กรกฎาคม ปี 2553	สิงหาคม ปี 2553
		ลำที่ 1	ลำที่ 2	ลำที่ 3	ค่าเฉลี่ย[1]	ค่าเฉลี่ย[2]
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	-	6.82	6.62	7.28	6.91	7.30
ค่าความเค็ม	ร้อยละ	2.7	3.1	3.0	3.0	3.6
ค่าบีโอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	77.0	380	12.5	ND	ND
ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด ทั้งหมด (Total Suspended Solids)	มิลลิกรัมต่อลิตร	118	275	120	ND	ND
ไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen)	มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	1.5	13.6	1.0	0.82	0.65
ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total Phosphorus)	มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร	1.19	3.24	0.71	0.75	0.44
ปิโตรเลียม (Petroleum)	มิลลิกรัมต่อลิตร	161	127	84	100	70
น้ำมันและไขมัน (Oil and Grease)	มิลลิกรัมต่อลิตร	38.0	14.2	9.2	ND	ND

ค่าเฉลี่ย[1] จากตัวอย่างน้ำอับเฉาเรือประมง 3 ลำ ลำละ 1 ตัวอย่าง
ค่าเฉลี่ย[2] จากตัวอย่างน้ำอับเฉาเรือประมง 1 ลำ ลำละ 2 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบของน้ำมันตามเดือนที่เก็บตัวอย่าง

เดือนที่เก็บตัวอย่าง น้ำอับเฉาเรือ	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	Total	Saturate	Aromatic	Resin	Asphaltene
ตุลาคม 2552 ลำที่ 1	161±20.2	68±33.1	66±5.0	2±0.5	25±2.3
ตุลาคม 2552 ลำที่ 2	127±9.1	56±3.2	20±3.5	6±4.0	45±1.9
ตุลาคม 2552 ลำที่ 3	84±2.0	35±1.6	17±3.1	2±0.7	30±0.9
กรกฎาคม 2553	106 ± 17.3	34 ±11.3	16 ± 2.8	3 ± 0.7	53 ± 0.3
สิงหาคม 2553	70 ±12.01	15 ± 2.2	5 ± 2.4	3 ± 1.7	47 ± 9.2

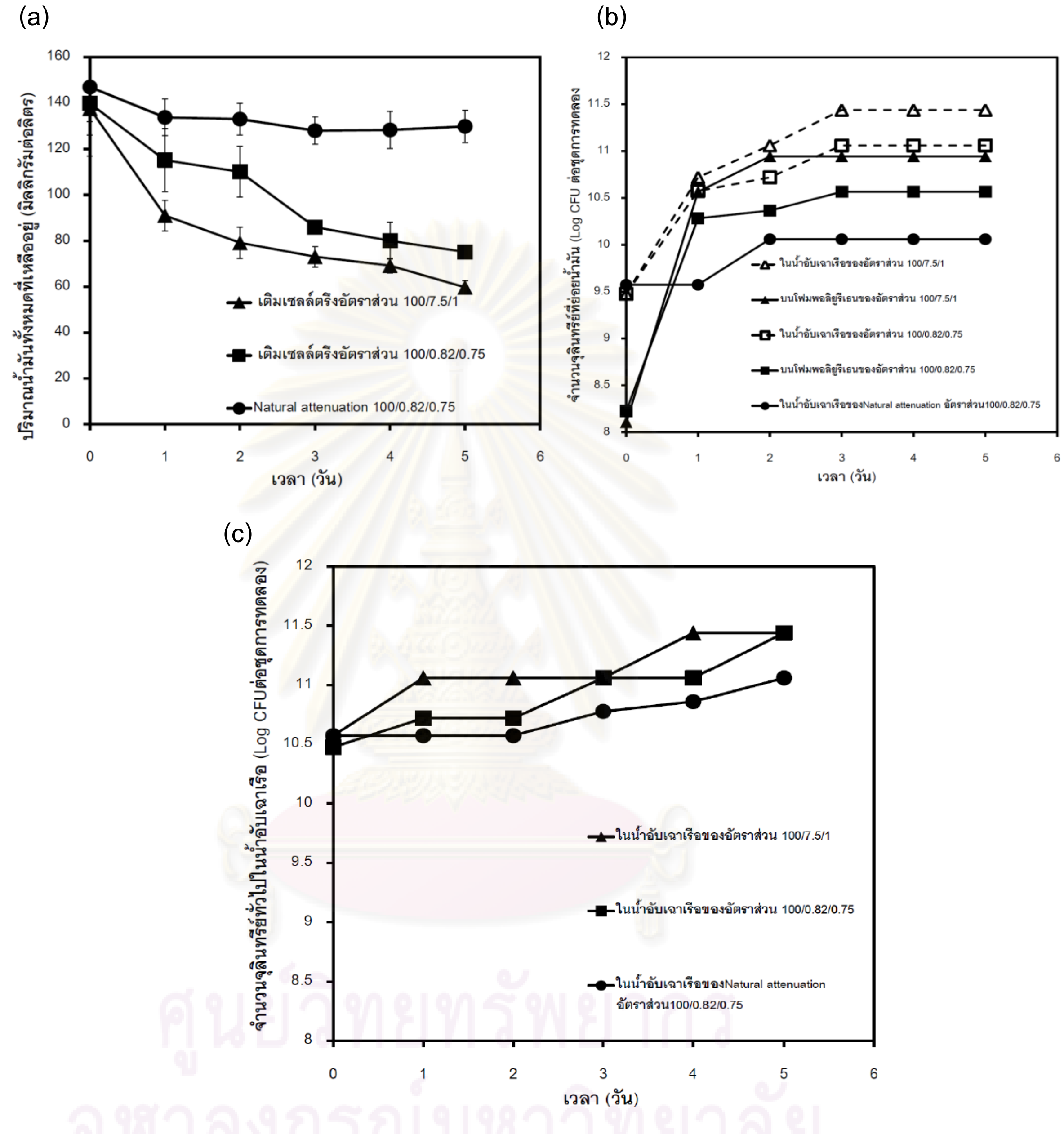
4.3.2 การทดสอบปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมกับน้ำอับเฉาจากเรือต่าง ๆ

เนื่องจากปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายน้ำมันโดยยีสต์ที่ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟม คือ 100/7.5/1 ในขั้นตอนนี้จึงศึกษาถึงปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอับเฉาเรือจริงของเซลล์ตรึง โดยเก็บตัวอย่างน้ำอับเฉาเรือมา 3 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคม แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำมันเริ่มต้นในน้ำอับเฉาเรือพบว่ามีความเข้มข้นของน้ำมันประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4) และได้เติมน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปอีก เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมแล้วที่ได้จากผลการทดลองข้อ 4.2.4 คือ อัตราส่วน 100/7.5/1 โดยจะปรับให้เท่ากับ 200/15/2 โดยเติมแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) 38.19 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนและเติมไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 2.81 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัส ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีอัตราส่วน คือ 100/0.82/0.75 จะปรับให้เท่ากับ 200/1.64/1 ทั้งนี้เพื่อให้ C เริ่มต้น ของชุดการทดลองเท่ากัน ดังนั้นจึงเติมแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) 2.34 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนและเติมไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 8.4 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัส ทุกชุดการทดลองบ่มเป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองพบว่าการปรับปริมาณสารอาหารในอัตราส่วน 100/7.5/1 (รูปที่ 4.11a) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันได้ดีกว่าชุดการทดลองที่มีอัตราส่วน 100/0.82/0.75 ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ไม่ปรับปริมาณสารอาหาร โดยมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ 59 มิลลิกรัมต่อลิตร (43 %) และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร (53 %) ตามลำดับ นอกจากนี้ชุดการทดลองการย่อยสลายน้ำมัน

ตามธรรมชาติ (Natural attenuation) พบว่ามีปริมาณน้ำมันลดลงเพียงเล็กน้อย โดยมีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ 130 มิลลิกรัมต่อลิตร (88 %)

สำหรับผลการศึกษาการเจริญของจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยน้ำมัน (รูปที่ 4.11b) และจำนวนจุลินทรีย์ทั่วไปในน้ำอับเฉาเรือ (รูปที่ 4.11c) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน ชุดการทดลองที่ปรับปริมาณสารอาหารในอัตราส่วน 100/7.5/1 มีการเจริญของจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยน้ำมันบนโฟมพอลิยูรีเทนและในน้ำอับเฉาเรือสูงกว่าชุดการทดลองที่มีสารอาหารในอัตราส่วน 100/0.82/0.75 ซึ่งเป็นชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ปรับปริมาณสารอาหารในอัตราส่วน 100/7.5/1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันได้ดีกว่าชุดการทดลองที่มีอัตราส่วน 100/0.82/0.75 โดยเมื่อผ่านไป 5 วัน จำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันที่อยู่บนโฟมเพิ่มจาก 8.10 ในวันที่ 0 เพิ่มเป็น 10.94 log CFU ต่อชุดการทดลอง รวมทั้งจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือเพิ่มจาก 9.47 เป็น 11.43 log CFU ต่อชุดการทดลอง ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีสารอาหารในอัตราส่วน 100/0.82/0.75 ซึ่งเป็นชุดควบคุม พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันที่อยู่บนโฟมเพิ่มจาก 8.22 ในวันที่ 0 เพิ่มเป็น 10.56 log CFU ต่อชุดการทดลอง รวมทั้งจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือเพิ่มจาก 9.47 เป็น 11.06 log CFU ต่อชุดการทดลอง นอกจากนี้ชุดการทดลองการย่อยสลายน้ำมันตามธรรมชาติมีการเพิ่มของจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือไม่สูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำมันที่ลดลงไม่มาก ส่วนจำนวนจุลินทรีย์ทั่วไปในน้ำอับเฉาเรือของการทดลองทั้งสามชุดการทดลอง พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ โดยชุดการทดลองในอัตราส่วน 100/7.5/1 และ 100/0.82/0.75 มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ทั่วไปในน้ำอับเรือสูงสุดเท่ากันคือ ประมาณ 1 log CFU ต่อชุดการทดลอง

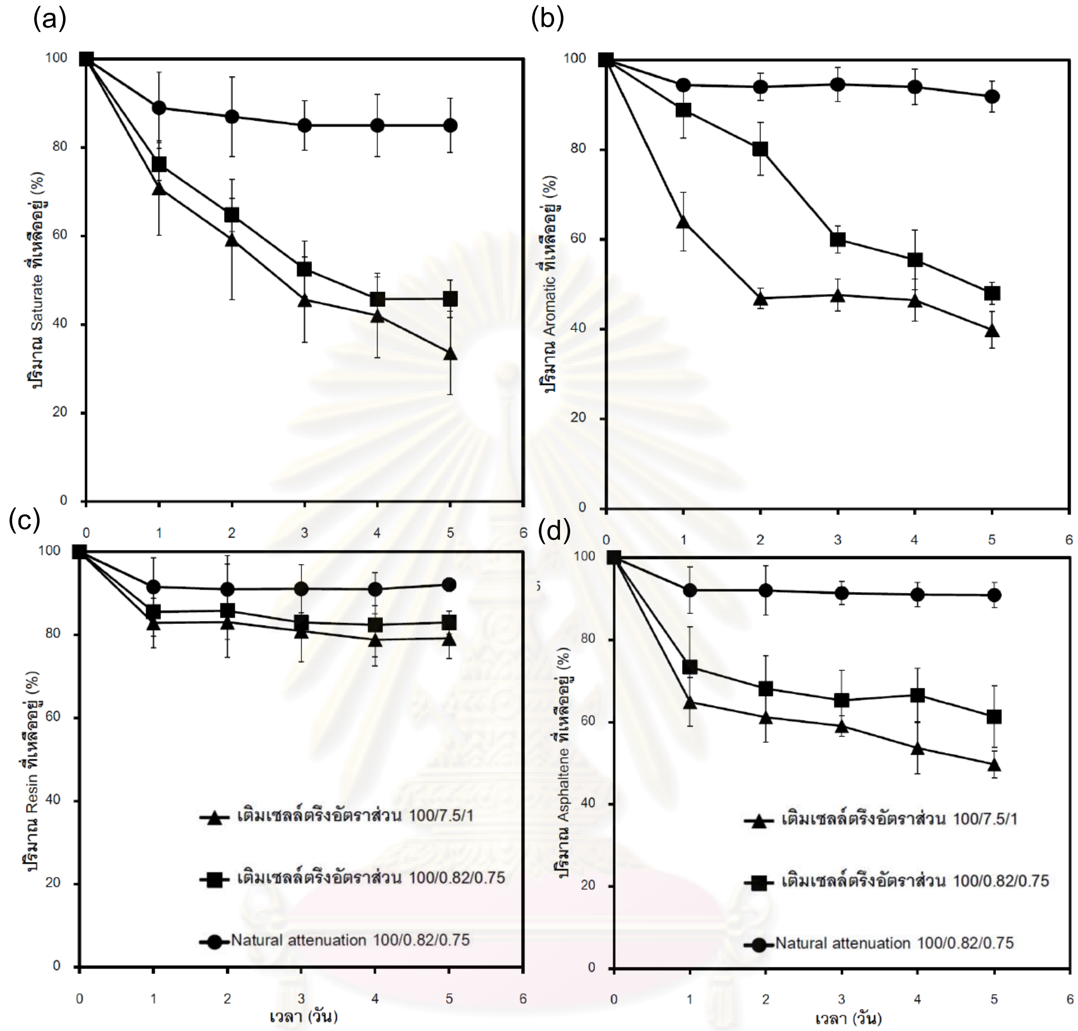
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.11 ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (a) จำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยน้ำมัน (b) และจำนวนจุลินทรีย์ทั่วไป (c) (log CFU ต่อชุดการทดลอง) ในการบำบัดน้ำอับเฉาเรือที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร เป็นเวลา 5 วัน

จากรูปที่ 4.12 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน ชุดการทดลองที่มีการปรับปริมาณสารอาหารในอัตราส่วน 100/7.5/1 มีการลดลงขององค์ประกอบทั้ง 4 ส่วน ในน้ำมัน มากกว่าชุดการทดลองอัตราส่วน 100/0.82/0.75 ซึ่งเป็นชุดควบคุม โดยน้ำมันในส่วนของ saturate จะถูกย่อยสลายได้ดีที่สุด ซึ่งพบว่ามีน้ำมันส่วน saturate เหลืออยู่ 33 % ในขณะที่ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ปรับปริมาณสารอาหารมีน้ำมันส่วน saturate เหลืออยู่ 45 % (รูปที่ 4.12a) รองลงมาคือ น้ำมันในส่วนของ aromatic (รูปที่ 4.12b) พบว่าชุดการทดทดลองที่ปรับปริมาณสารอาหาร จะมีการย่อยสลายน้ำมันได้ดีกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ปรับปริมาณสารอาหาร โดยมีน้ำมันส่วน aromatic เหลืออยู่ 39 % และ 48 % ตามลำดับ รวมทั้งน้ำมันในส่วนของ asphaltene (รูปที่ 4.12d) มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ 50 % และ 61% ตามลำดับ และน้ำมันในส่วนของ resin (รูปที่ 4.12c) มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่ 79% และ 82% ตามลำดับ เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ในชุดการทดลองการย่อยสลายน้ำมันตามธรรมชาติพบว่าน้ำมันในส่วนของ saturate มีปริมาณลดลงเหลืออยู่ 85 % ในขณะที่ปริมาณน้ำมันในส่วนของ aromatic, resin และ asphaltene ลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งผลการย่อยสลายน้ำมันทั้งหมดสรุปในตารางที่ 4.6 แสดงว่าการลดลงของน้ำมันมาจากความสามารถของยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน ปัจจัยทางกายภาพมีผลต่อการลดลงของน้ำมันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 ปริมาณ saturate ที่เหลืออยู่ (%) (a) ปริมาณ aromatic ที่เหลืออยู่ (%) (b) ปริมาณ Resin ที่เหลืออยู่ (%) (c) และปริมาณ asphaltene ที่เหลืออยู่ (%) (d) ในน้ำอับเฉาเรือที่ปรับปริมาณสารอาหาร เป็นเวลา 5 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่อง ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงในน้ำอับเฉาเรือที่ปรับปริมาณสารอาหาร หลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 วัน

อัตราส่วน C/N/P	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัม)				
	Total	Saturate	Aromatic	Resin	Asphaltene
เติมเซลล์ตรึง 100/7.5/1	59 ± 2.9	11 ± 0.9	11 ± 0.6	2 ± 0.2	35 ± 3.9
เติมเซลล์ตรึง 100/0.82/0.75	75 ± 2.1	15 ± 0.8	14 ± 0.4	2 ± 0.3	43 ± 3.2
Natural attenuation 100/0.82/0.75	130 ± 5.2	33 ± 2.1	29 ± 2.4	3 ± 3.4	65 ± 3.1

4.3.3 ศึกษาการนำ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนไปบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมง

การทดลองนี้ศึกษาการนำ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนไปบำบัดน้ำอับเฉาเรือบริเวณใต้ท้องเรือในเรือประมงขนาดเล็ก บริเวณท่าเทียบเรือประมง จังหวัดจันทบุรี (รูปที่ 4.13) ในเดือนสิงหาคม ปี 2553 โดยเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 3 วัน คือ ในวันที่ 22 23 และ 24 วันละสามครั้ง โดยเก็บตัวอย่างน้ำอับเฉาเรือครั้งละ 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างโฟมครั้งละ 3 ถุงตาข่าย แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันสองส่วนคือ น้ำมันที่อยู่ในน้ำอับเฉาเรือ (รูปที่ 4.15) และน้ำมันที่ติดอยู่บนโฟม หลังจากเก็บตัวอย่างเติมโฟมกลับเข้าไปอีก 3 ถุงตาข่าย ซึ่งโฟมที่เก็บขึ้นมานั้นจะมีลักษณะเป็นสีดำจากคราบน้ำมันที่ติดอยู่บนโฟม (รูปที่ 4.14) ทั้งนี้ในแต่ละวันเรือประมงจะมีกิจกรรมแตกต่างกันออกไป ซึ่งกิจกรรมของเรือประมงในแต่ละวันแสดงดังในตารางที่ 4.7 โดยในวันที่ 22 เรือประมงออกไปหาปลาประมาณ 9.00 น. และกลับเข้ามาที่ท่าเรือประมงประมาณ 16.00 น. พบว่าในส่วนของปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในน้ำอับเฉาเรือ เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือ จะมีปริมาณลดลง และเวลาประมาณ 18.00 น. พบว่าปริมาณน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งคาดว่าเกิดจากเรือประมงมีการเติมน้ำมัน และในส่วนของปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในโฟม พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณน้ำมันในโฟมจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.16) ต่อมาในวันที่ 23 เรือประมงออกไปหาปลาประมาณ 9.00 น. และกลับเข้ามาที่ท่าเรือประมงประมาณ 18.00 น. พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือ มีค่าลดลง และในส่วนของปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในโฟมพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูป

ที่ 4.16) และในวันที่ 24 เรือประมงจะออกไปหาปลาประมาณ 9.00 น. และกลับเข้ามาที่ท่าเรือประมงประมาณ 18.00 น. พบว่าในส่วนของปริมาณน้ำมันที่เหลือยู่ในน้ำอับเฉาเรือช่วงแรกจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เนื่องมาจากเรือประมงมีการเติมน้ำมันในเวลาประมาณ 9.00 น. (รูปที่ 4.16)

จากการศึกษาทั้งหมด 60 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือ มีแนวโน้มลดลง โดยพบว่าปริมาณน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือลดลงจาก 70 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 0 เหลือ 46 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 ทั้งนี้พบว่าองค์ประกอบทั้ง 4 ส่วนของน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน และในส่วนของปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในโฟม พบว่าในชั่วโมงที่ 36 ถึงชั่วโมงที่ 48 ปริมาณน้ำมันในโฟมลดลง และหลังจากนั้นปริมาณน้ำมันในโฟมจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไป 60 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณน้ำมันในโฟม 547 มิลลิกรัมต่อกรัมโฟม ทั้งนี้องค์ประกอบทั้ง 4 ส่วนของน้ำมันในโฟมมีแนวโน้มการลดและเพิ่มเช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.16)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.13 บริเวณใต้ท้องเรือในห้องอับเฉาเรือของเรือประมง หลังจากที่เติมเซลล์ตรึงที่บรรจุอยู่ในตาข่าย

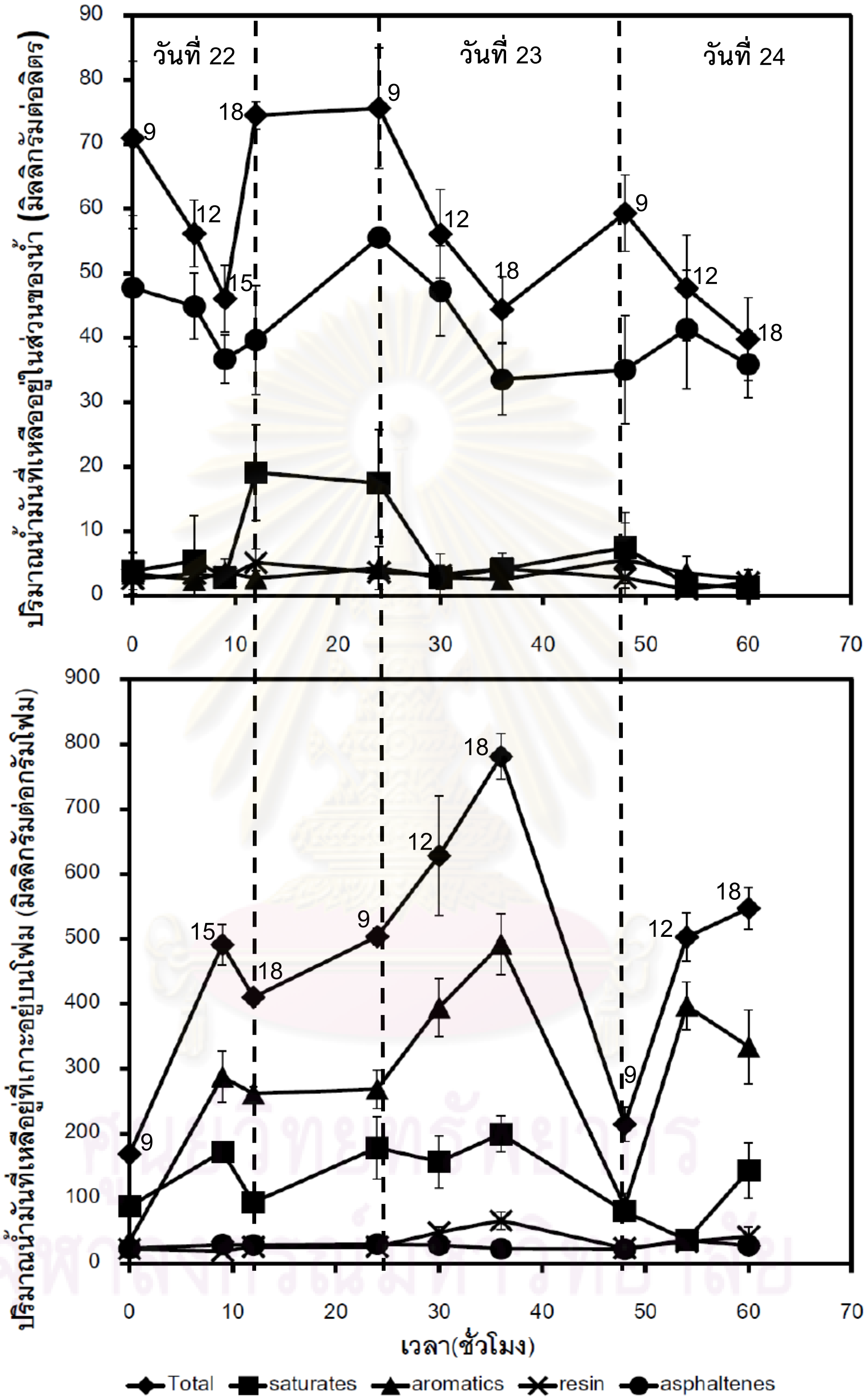
รูปที่ 4.14 ลักษณะของโฟมพอลิยูรีเทนที่ผ่านการบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือ ซึ่งเก็บขึ้นมาจากห้องอับเฉาเรือบริเวณใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็กสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

รูปที่ 4.15 ลักษณะของน้ำอับเฉาเรือที่นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

ตารางที่ 4.7 แสดงกิจกรรมต่างๆ ที่เกิดขึ้นใน 1 วันของเรือประมงขนาดเล็กในวันที่ 22 ถึง 24 เดือนสิงหาคม 2553

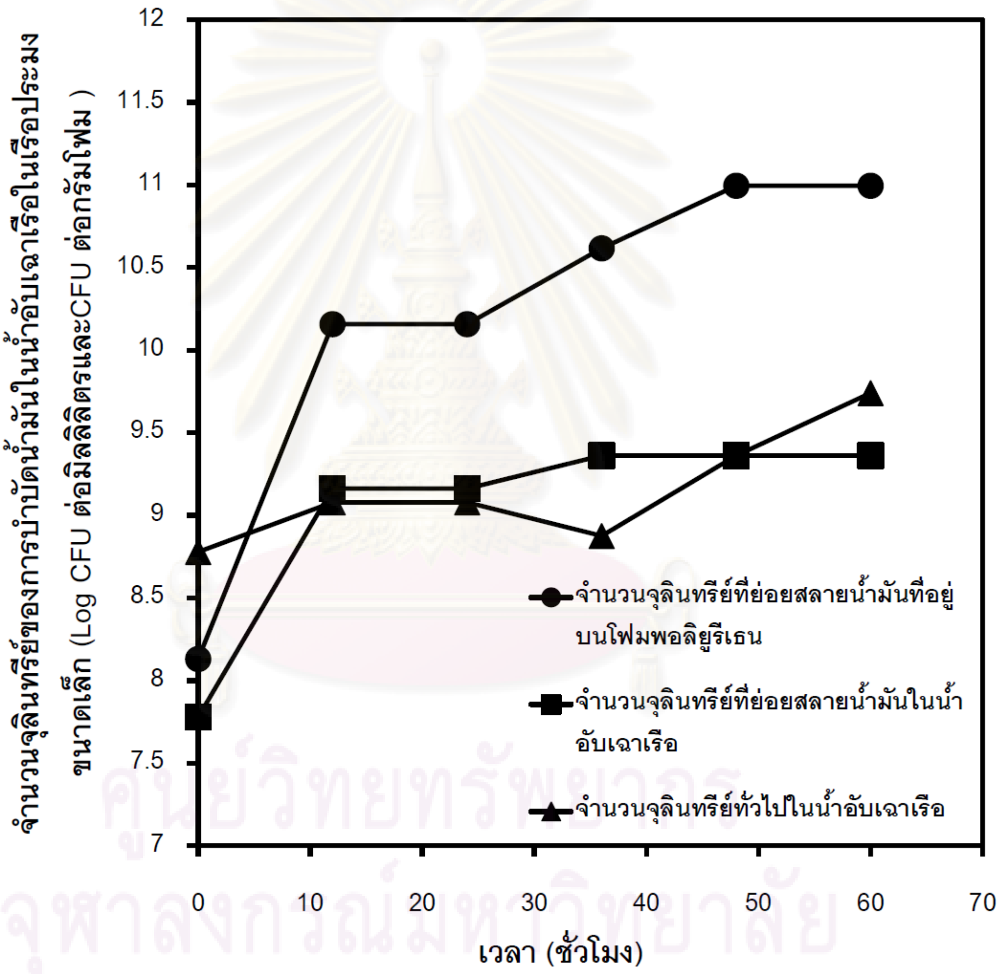
วัน เดือน ปี	กิจกรรมของเรือประมงขนาดเล็กใน 1 วัน
22 ส.ค. 2553	เวลา 9.00 น. - 15.00 น. : เรือออกหาปลา เวลา 16.00 น. : เรือกลับเข้ามาจอดเทียบท่า เวลา 18.00 น. : เรือมีการเติมน้ำมัน
23 ส.ค. 2553	เวลา 9.00 น. - 17.00 น. : เรือออกหาปลา เวลา 18.00 น. : เรือเข้ามาจอดเทียบท่า
24 ส.ค. 2553	เวลา 9.00 น. : เรือมีการเติมน้ำมัน เวลา 9.00 น. - 17.00 น. : เรือออกหาปลา เวลา 18.00 น. : เรือเข้ามาจอดเทียบท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.16 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในส่วนของน้ำอับเฉาเรือ (a) (มิลลิกรัมต่อลิตร) และปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ที่เกาะอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน (b) (มิลลิกรัมต่อกรัมโฟม) ของการบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็กด้วยเซลล์ตรึง ระหว่างการบำบัดเป็นเวลาประมาณ 3 วัน

สำหรับผลการศึกษาการเจริญของจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยน้ำมันและจำนวนจุลินทรีย์ทั่วไป (รูปที่ 4.17) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 60 ชั่วโมง จำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันที่อยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนมีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 8.13 log CFU ต่อกรัมโฟม ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 10.90 log CFU ต่อกรัมโฟม และจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือ เพิ่มจาก 7.78 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 9.36 log CFU ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั่วไปในน้ำอับเฉาเรือมีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 8.78 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 9.78 log CFU ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.17 จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็ก (log CFUต่อมิลลิลิตร) และจำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน (log CFUต่อกรัมโฟม) ระหว่างการบำบัดเป็นเวลาประมาณ 3 วัน

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ในขั้นตอนแรกได้ตรึง *Candida* sp. JC4 บนโฟมพอลิยูรีเทน โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่มีโฟมพอลิยูรีเทน เป็นเวลา 2 วัน พบว่ามียีสต์จำนวนมากยึดติดกับพื้นผิวของโฟมพอลิยูรีเทน ซึ่งเนื่องมาจาก *Candida* sp. JC4 มีค่า Hydrophobicity 83.6 % ทำให้เซลล์ยึดติดกับผิวของวัสดุตรึงได้ดี รวมทั้งช่วยให้เซลล์จับกับน้ำมันได้ดีอีกด้วย นอกจากยีสต์ยังมีลักษณะการรวมตัวกันเป็นกลุ่มเซลล์ ซึ่งคาดว่าเนื่องมาจากความสามารถในการสร้างสารเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Candida* sp. JC4 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 93.2 % ทั้งนี้ Obuekwe และ Al-Muttawa (2001) รายงานว่าสารเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ มีความเกี่ยวข้องกับการรวมตัวกันเป็นกลุ่มเซลล์บนผิววัสดุตรึง อย่างไรก็ดีจะเห็นว่าบนพื้นผิวของโฟมพอลิยูรีเทนยังมีพื้นที่ว่างอยู่ อาจเป็นไปได้ว่าการเกาะของยีสต์บนพื้นผิวของโฟมยังไม่เสถียรเท่าที่ควร ทำให้มียีสต์บางส่วนหลุดออกมาได้ระหว่างการเตรียมเซลล์เพื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ดังนั้นจึงอาจจะเพิ่มระยะเวลาการตรึงเซลล์ให้นานกว่า 2 วัน เพื่อให้ยีสต์เกาะบนพื้นผิวของโฟมแน่นมากยิ่งขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องระหว่างเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ โดยใช้น้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (รูปที่ 4.3a) โดยในชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ประมาณ 63 % ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมเซลล์อิสระมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ประมาณ 81 % การที่เซลล์ตรึงย่อยสลายน้ำมันได้ดีกว่าเซลล์อิสระ อาจเนื่องมาจากการเซลล์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนไม่ได้สัมผัสกับน้ำมันโดยตรง จึงได้รับพิษจากน้ำมันน้อย ในขณะที่เซลล์อิสระจะสัมผัสกับน้ำมันโดยตรง ทำให้เซลล์มีแอคทิวิตีน้อยลงเนื่องมาจากสภาวะความเป็นพิษของน้ำมัน สำหรับชุดการทดลองที่ไม่เติมหัวเชื้อลงไป พบว่าปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ประมาณ 90 - 92 % แสดงว่าการลดลงของน้ำมันเครื่องตามธรรมชาติเกิดขึ้นได้น้อยมาก ทั้งนี้แม้ว่าโฟมพอลิยูรีเทนจะมีการดูดซับน้ำมัน ซึ่ง Oh และคณะ (2000) รายงานว่าโฟมพอลิยูรีเทนมีสามารถในการดูดซับน้ำมันได้ถึง 7 - 9 เท่าของน้ำหนักโฟม แต่ในขั้นตอนการสกัดน้ำมันออกมาจากโฟมของงานวิจัยนี้ สามารถสกัดน้ำมันออกมาจากโฟมได้หมด ดังนั้นการดูดซับน้ำมันของ

โฟมจึงไม่มีผลต่อการลดลงของน้ำมัน จึงสรุปได้ว่าการลดลงของน้ำมันเกิดจากความสามารถของยีสต์ที่ใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ นอกจากนี้ยังพบการเจริญของยีสต์บนโฟมพอลิยูรีเทน โดยมีจำนวนยีสต์เพิ่มขึ้นประมาณ 3 log CFU ต่อชุดการทดลอง ในช่วง 3 วันแรก และเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน มีจำนวนยีสต์ลดลงเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากการหลุดของยีสต์ ซึ่งพบว่ามีจำนวนยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ทั้งหมด 4.96 log CFU ต่อชุดการทดลอง ในขณะที่ยีสต์อิสระมีการเจริญเช่นเดียวกัน โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 2 log CFU ต่อชุดการทดลอง อย่างไรก็ดีจำนวนยีสต์เริ่มต้นในชุดการทดลองยีสต์อิสระมีค่ามากกว่าชุดการทดลองยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน ดังนั้นอาจจะทำการเจือจางจำนวนยีสต์เริ่มต้นของชุดการทดลองยีสต์อิสระให้เท่ากับชุดการทดลองยีสต์ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยีสต์ทั้ง 2 แบบ ได้สะดวกยิ่งขึ้น

จากรายงานของ Ijah (1998) ซึ่งเปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำมันดิบระหว่าง *Serratia marcescens* OCS-21, *Acinetobacter calcoaceticus* COU-27 และ *Candida tropicalis* PFS-95 พบว่า *Candida tropicalis* PFS-95 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในดินที่ความเข้มข้น 1 % ได้ 68.9 % หลังจากผ่านไป 16 วัน ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าแบคทีเรีย และจะเห็นว่า *Candida tropicalis* PFS-95 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันได้ดีกว่า *Candida* sp. JC4 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ อาจเนื่องมาจากการใช้น้ำมันต่างชนิดกัน ซึ่งในงานวิจัยของ Ijah (1998) ใช้น้ำมันดิบซึ่งเป็นน้ำมันทั่วไป แต่ในงานวิจัยนี้ได้ใช้น้ำมันสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงขนาดเล็กชนิดที่สังเคราะห์ขึ้น (synthetic lubricants) ซึ่งอาจจะมีการเติมสารที่มีสมบัติจำเพาะเพิ่มเข้าไปเพื่อส่งเสริมให้เครื่องยนต์เรือทำงานได้ดีขึ้น ตัวอย่างสารที่เติมเข้าไป ได้แก่ เอสเทอร์ (esters), อัลคิวเลท (alkylated), แนพธาลีน (naphthalenes) และได-ฟีนิวลาไมด์ (di-phenylamines) ซึ่ง Beyrem และคณะ (2010) รายงานว่าสารเหล่านี้มีความเป็นพิษสูงคงตัวสูง และย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก ดังนั้นสารดังกล่าวอาจจะมีผลต่อยีสต์จึงทำให้มีประสิทธิในการย่อยสลายน้ำมันไม่ดีเท่าที่ควร หรืออาจจะเกิดจากสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายน้ำมันอาจเป็นพิษกับยีสต์ ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันลดลง สำหรับผลการศึกษาการลดลงขององค์ประกอบในน้ำมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ saturate, aromatic, resin และ asphaltene พบว่าทั้งเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระย่อยน้ำมันในส่วนของ saturate ได้ดีกว่าองค์ประกอบอื่นๆ เนื่องมาจากน้ำมันในส่วนของ saturate มีโครงสร้างทางเคมีไม่ซับซ้อน เป็นโซ่ตรงหรือโซ่กิ่ง ซึ่งยีสต์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ง่ายกว่าองค์ประกอบอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Van Hamme และคณะ (2003) ที่พบว่า

การย่อยสลายองค์ประกอบในน้ำมันเรียงลำดับจากการย่อยสลายได้ง่ายไปยากดังนี้ n-alkanes > branched-chain alkanes > branched alkenes > low molecular-weight n-alkyl aromatics > monoaromatics > cyclic alkanes > polycyclic aromatic hydrocarbons ≥ asphaltene นอกจากนี้ Palittapongarnpim และคณะ (1998) ได้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.5 % ที่ปนเปื้อนในดินของ *Candida tropicalis* 15Y พบว่าสามารถย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนประเภทอัลเคนได้ 99.6% ในเวลา 7 วัน ซึ่ง *Candida tropicalis* 15Y มีประสิทธิภาพดีกว่า *Candida* sp. JC4 อาจเนื่องมาจากการใช้น้ำมันต่างชนิดกันและความเข้มข้นเริ่มต้นต่างกัน

ต่อมาผู้วิจัยได้ศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานและผ่านการใช้งานแล้ว โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำมัน 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำอับเฉาเรือจะมีการปนเปื้อนของน้ำมันเครื่องทั้ง 2 ชนิด พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันได้ดีกว่าเซลล์อิสระ และทั้งเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระสามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องชนิดที่ยังไม่ได้ใช้งานได้ดีกว่าชนิดที่ใช้งานมาแล้วเล็กน้อย โดยเซลล์ตรึงมีปริมาณน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานและใช้งานมาแล้วคงเหลือ 75 % และ 84 % ตามลำดับ และในส่วนของเซลล์อิสระมีน้ำมันคงเหลือ 87 % และ 92 % ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tong และคณะ (1999) และ Thompson และคณะ (2007) ที่รายงานว่า น้ำมันเครื่องชนิดที่ยังไม่ได้ใช้งาน จะมีองค์ประกอบเป็นไฮโดรคาร์บอนที่ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และมีคาร์บอนอะตอมจำนวนน้อย (fresh and lighter hydrocarbons) แต่น้ำมันเครื่องที่ผ่านการใช้งานแล้วจะมีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อนมากขึ้น เช่น อัลเคนที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนมาก และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนวงเบนซีนหลายวง รวมทั้งอาจพบ เหล็ก ตะกั่ว สังกะสี แคดเมียม การทดลองนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานลดลงประมาณ 10 % เมื่อเทียบกับผลการทดลอง 4.2.1 ที่ใช้น้ำมันเครื่องที่ยังไม่ได้ใช้งานเช่นกัน แต่ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่าเมื่อน้ำมันมีความเข้มข้นสูงมากขึ้น ความเป็นพิษของน้ำมันต่อเซลล์จึงมากขึ้น ยีสต์จึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันจึงลดลง นอกจากนี้พบว่ายีสต์บนโฟมพอลิยูรีเทนมีการเพิ่มจำนวนประมาณมากกว่ายีสต์อิสระ โดยยีสต์บนโฟมพอลิยูรีเทนมีการเพิ่มจำนวนประมาณ 2 log CFU ต่อชุดการทดลอง และยีสต์อิสระมีการเพิ่มจำนวนประมาณ 1 log CFU ต่อชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองว่าเซลล์ตรึงทนต่อความเป็นพิษของน้ำมันได้ดีกว่าเซลล์อิสระ นอกจากนี้ชุดการทดลองในส่วนของเซลล์ตรึงที่เป็นแบบคิลเซลล์โดยได้เติมโซเดียมเอไซด์ เพื่อฆ่าเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต

ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน พบว่ามีปริมาณน้ำมันคงเหลือในระบบมากกว่า 90 % แสดงว่าการลดลงของน้ำมันเกิดจากความสามารถของยีสต์ไม่ได้เกิดจากการดูดซับน้ำมันของเซลล์ยีสต์หรือโฟม สำหรับผลการลดลงขององค์ประกอบในน้ำมันเครื่องทั้งสองชนิด พบว่าเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระสามารถย่อยน้ำมันในส่วนของ saturate ได้ดีกว่าองค์ประกอบอื่นๆ เช่นเดียวกันกับการทดลองก่อนหน้านี้

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ยังมีข้อดีอีกประการหนึ่ง คือ สามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ พบว่าการใช้เซลล์ตรึงในครั้งแรกทำให้มีปริมาณน้ำมันคงเหลือ 71 % แต่เมื่อใช้เซลล์ตรึงซ้ำไปเรื่อยๆ อย่างต่อเนื่อง ปริมาณน้ำมันที่เหลือมีแนวโน้มสูงขึ้นเล็กน้อย และเมื่อนำเซลล์ตรึงที่ใช้บำบัดน้ำมันแล้วไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (รูปที่ 4.8) พบว่าจำนวนยีสต์ที่เกาะอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนมีจำนวนลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากการเขย่าเป็นระยะเวลานาน และอาจเกิดการสะสมน้ำมันในโฟมของเซลล์ตรึงที่ถ่ายลงไปในอาหารใหม่ ทำให้มีน้ำมันเริ่มต้นในแต่ละครั้งเพิ่มสูงขึ้นได้เรื่อยๆ ซึ่งการใช้เซลล์ตรึงในครั้งสุดท้าย (วันที่ 17) พบว่ามีปริมาณน้ำมันคงเหลือ 79 % แสดงว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพลดลงบ้างเมื่อใช้ไปนานๆ อย่างไรก็ดีผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ซ้ำและมีความเสถียรพอสมควร ซึ่งมีรายงานของ Monohar และคณะ (2001) รายงานว่าการย่อยสลายแนพธาลีน 50 mW ของ *Pseudomonas* sp. NGK1 ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนสามารถใช้ซ้ำได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน ดังนั้นจึงอาจจะเพิ่มระยะเวลาในการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงให้นานขึ้นได้อีก ทั้งนี้ขึ้นอยู่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงว่าจะลดลงหรือไม่ นอกจากนี้อาจจะมีการเติมสารอาหารลงไป เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงให้ดียิ่งขึ้น

ปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมัน คือ ปริมาณของสารอาหาร ซึ่งพบว่าอัตราส่วน C/N/P ที่ 100/7.5/1 เป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุดในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน โดยมีปริมาณน้ำมันคงเหลือ 61 % โดย saturate จะถูกย่อยสลายได้ดีกว่า องค์ประกอบอื่นๆ เช่นเดียวกันกับการทดลองก่อนหน้านี้ และมีการเจริญของยีสต์สูงสุด แต่ชุดการทดลองที่ไม่ปรับปริมาณสารอาหารมีปริมาณน้ำมันคงเหลือ 71 % นอกจากนี้พบว่าการปรับปริมาณสารอาหารในอัตราส่วน 100/10/1 มีการเจริญของยีสต์และการลดลงของน้ำมันน้อยที่สุด ซึ่งแสดงว่าการปรับสารอาหารในอัตราส่วนนี้อาจมีปริมาณเกินความต้องการของยีสต์ เกิดสภาวะไม่เหมาะสมจึงทำให้ยีสต์มีการเจริญช้าลง แต่อย่างไรก็ดีอัตราส่วนในการปรับปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมนั้นยังขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และชนิด

ของน้ำมันที่ปนเปื้อนด้วย (Vrede และคณะ, 2002) เช่น Beolchini และคณะ (2010) พบว่าการเติมไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.23 mM และไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.023 mM ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสตามลำดับในอัตราส่วน 100:10:1 สามารถเพิ่มการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนประเภทอะลิฟาติกและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้มากกว่า 70 % และ 40% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไดแอมโมเนียมซัลเฟตและไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แต่อย่างไรก็ดีการเติมไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในปริมาณที่มีความเข้มข้นสูงลงในน้ำทะเล อาจจะเป็นสาเหตุทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตรวดเร็วผิดปกติ รวมทั้งทำให้ออกซิเจนละลายในน้ำได้น้อยลง ซึ่งจะส่งผลเสียมากกว่าผลดี (Nikolopoulou และ Kalogerakis, 2009)

จากผลการทดลองทั้งหมด ในส่วนของการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ของยีสต์อิสระและยีสต์ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องได้ดีกว่ายีสต์อิสระ โดยสรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงในสภาวะต่างๆ ดังในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงในสภาวะต่างๆ

ชนิดของน้ำมัน	ปริมาณสารอาหาร	ความเข้มข้นของ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่คงเหลืออยู่ในระบบ (%)
น้ำมันยังไม่ได้ใช้	100/5/0.5	200	7	63 ± 7.2 %
น้ำมันยังไม่ได้ใช้	100/5/0.5	200	5	71 ± 10.5 %
น้ำมันยังไม่ได้ใช้	100/7.5/1	200	5	61 ± 3.5 %
น้ำมันยังไม่ได้ใช้	100/5/0.5	1000	5	75 ± 10.9 %
น้ำมันใช้งานแล้ว	100/5/0.5	1000	5	87 ± 15 %

ดังนั้นการศึกษาในขั้นต่อไปจึงได้นำเซลล์ตรึงไปทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และในเรือประมงขนาดเล็ก ใน

เบื้องต้นได้ตรวจวิเคราะห์ว่าค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำอับเฉาเรือจากเรือประมงขนาดเล็ก ระหว่างเดือนตุลาคม ปี 2552 รวมทั้งเดือนกรกฎาคมและสิงหาคม ปี 2553 พบว่ามีค่าแตกต่างกันค่อนข้างมาก อาจเนื่องมาจากช่วงระยะเวลาในการเก็บน้ำตัวอย่างมีช่วงระยะเวลาเก็บที่ห่างกันมากไป ทั้งนี้ในสิ่งแวดล้อมน้ำจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพตลอดเวลา ดังนั้นเราจึงควรสุ่มเก็บตัวตัวอย่างน้ำให้ถี่ขึ้น เพื่อข้อมูลที่ได้จะมีค่าคงที่ยิ่งขึ้น นอกจากนี้พบว่า ค่าปิโตรเลียม ค่าบีโอดี และค่าน้ำมันและไขมัน อยู่ในช่วงที่มีเกณฑ์สูงกว่าค่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง (กรมควบคุมมลพิษ, 2551) จึงควรมีการบำบัด นอกจากนี้ยังพบว่าค่าไนโตรเจนและฟอสฟอรัสมีปริมาณที่ค่อนข้างน้อย ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำมัน

เมื่อนำน้ำอับเฉาเรือมาทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ โดยปรับอัตราส่วน C/N/P ให้เหมาะสมคือ 100/7.5/1 พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันได้ดีกว่าชุดควบคุมที่มีอัตราส่วน C/N/P 100/0.82/0.75 โดยมีปริมาณน้ำมันทั้งหมดเหลืออยู่ 43 % และ 53 % ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ค่อนข้างดีกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือกับที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้พบว่าในชุดการทดลองอัตราส่วน C/N/P 100/7.5/1 มีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือ และจำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในโฟม 2.5 และ 3.5 log CFU ต่อชุดการทดลอง ตามลำดับ ซึ่งมีรายงานของ Bartha (1986) ได้ทดลองปรับปริมาณสารอาหารโดยเติมแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต พบว่าช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายน้ำมันให้ดียิ่งขึ้นจาก 40 % เป็น 63 % ตามลำดับ สำหรับชุดการทดลองการย่อยสลายน้ำมันตามธรรมชาติ พบว่ามีการลดลงของน้ำมันเพียงเล็กน้อย เนื่องจากไม่มีการเติมเซลล์ตรึงและสารอาหารลงไป และพบว่าจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันมีการเพิ่มจำนวนเพียงเล็กน้อย Harayama และคณะ (2004) และ Hii และคณะ (2009) รายงานว่า เมื่อเกิดการปนเปื้อนน้ำมันในน้ำทะเล จะทำให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและฟอสฟอรัสลดลง และมีปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน จึงทำให้มีการย่อยสลายน้ำมันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

เมื่อทดลองนำ *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนไปบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็ก บริเวณท่าเทียบเรือประมง จังหวัดจันทบุรี พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือมีปริมาณลดลง ซึ่งการลดลงของน้ำมันส่วนใหญ่น่าจะเกิดจากหลายกลไก ได้แก่ การเจือจาง การย่อยสลายทางชีวภาพ และการดูดซับโดยโฟม ทั้งนี้เรือประมงจะมีการปล่อยน้ำอับเฉาเรือทุกๆ 15 นาทีโดยประมาณ ซึ่งปริมาณน้ำที่ปล่อยจะมีปริมาณ 50 ลิตรต่อครั้ง ดังนั้นในเวลา 1 ชั่วโมง จะมีการปล่อยน้ำอับเฉาออกจากเรือ 200 ลิตร หลังจากการปล่อยน้ำอับเฉาเรือไป

แล้ว จะมีน้ำซึมเข้ามาตามรอยแตกของเรือเข้ามาใหม่ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการลดลงของน้ำมันเกิดจากการเจือจางของน้ำที่มีการถ่ายเทเข้าออกอยู่ตลอดเวลา สำหรับการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึงดูจากผลการเจริญของยีสต์บนโฟม (รูปที่ 4.17) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 60 ชั่วโมง จำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันที่อยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนมีจำนวนเพิ่มขึ้นประมาณ 3 log CFU ต่อกรัมโฟม แสดงว่าเชื้อบนโฟมสามารถใช้น้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญได้ ซึ่งก็สอดคล้องกับการที่มีปริมาณน้ำมันบางส่วนลดลง รวมทั้งจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือและจุลินทรีย์ทั่วไปมีจำนวนเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันประมาณ 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้พบว่าในบางช่วงปริมาณน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือจะเพิ่มสูงขึ้นเนื่องมาจากเรือประมงมีการเติมน้ำมัน ทั้งนี้เมื่อสิ้นสุดการทดลองซึ่งใช้เวลาทั้งหมด 60 ชั่วโมง ปริมาณน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือ มีแนวโน้มลดลงจาก 70 มิลลิกรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 0 เหลือ 46 มิลลิกรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 60 (รูปที่ 4.16) ในกรณีนี้การลดลงของน้ำมันอาจจะไม่ได้เกิดจากการเจือจางของน้ำอย่างเดียว เพราะจากรูปที่ 4.16 จะเห็นว่าปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในเวลา 9.00 น. ของแต่ละวันจะมีปริมาณค่อนข้างคงที่กล่าวคือ ในวันที่ 22 และ 23 ก่อนที่เรือประมงออกไปหาปลามีปริมาณน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือ 70 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณไม่แตกต่างกันมาก แต่วันที่ 24 ในเวลาเดียวกัน พบว่ามีปริมาณน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่าทุกวัน แสดงว่าน้ำมันบางส่วนได้ถูกย่อยสลายไปโดยเซลล์ตรึง และเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือลดลงเหลือ 46 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์ ดังนั้นการลดลงของน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือส่วนหนึ่งน่าจะเกิดมาจากความสามารถในการใช้น้ำมันของยีสต์บนโฟมพอลิยูรีเทน พร้อมกันนี้พบว่าปริมาณของ saturate เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มีจำนวนลดลงใกล้เคียง 100 % ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ จะเห็นว่าปริมาณน้ำมันส่วน saturate ของชุดการทดลองการย่อยสลายของน้ำมันตามธรรมชาติของน้ำอับเฉาเรือ มีการลดลงเพียง 15 % เท่านั้น ดังนั้นการลดลงของ saturate ในการทดลองนี้ จึงมาจากแอคติวิตีของยีสต์มากกว่าการลดลงโดยปัจจัยทางกายภาพ

สำหรับปริมาณน้ำมันในส่วนของโฟม พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณน้ำมันในโฟมมีปริมาณเพิ่มขึ้นน่าจะเกิดจากการดูดซับน้ำมันของโฟมพอลิยูรีเทน ซึ่งมีรายงานของ Oh และคณะ (2000) ได้รายงานว่าโฟมพอลิยูรีเทนมีสามารถในการดูดซับน้ำมันที่ลอยอยู่บนผิวหน้าน้ำทะเลได้ถึง 7 - 9 เท่าของน้ำหนักโฟม อย่างไรก็ดีจากรูปที่ 4.16 พบว่าในชั่วโมงที่ 36 ถึงชั่วโมงที่ 48 ปริมาณน้ำมันในโฟมลดลง อาจเป็นไปได้ที่เกิดจากการย่อยสลายน้ำมันของยีสต์บนโฟมพอลิยูรี

เทน และหลังจากนั้นปริมาณน้ำมันในโฟมมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ตามช่วงเวลาที่มีการเติมน้ำมันในเครื่องยนต์เรือ โดยเมื่อเวลาผ่านไป 60 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณน้ำมันในโฟม 547 มิลลิกรัมต่อกรัมโฟม ซึ่งมีค่าสูงขึ้นเพื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 เนื่องมาจากการดูดซับน้ำมันของโฟมพอลิยูรีเทน

จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนมีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW และปริมาณสารอาหาร C/N/P ที่เหมาะสมคือ อัตราส่วน 100/7.5/1 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันให้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ดีการเติมสารอาหารอาจจะก่อให้เกิดสภาวะสารอาหารมากเกิน (Eutrophication) ในแหล่งน้ำ งานวิจัยนี้จึงนำเฉพาะเซลล์ตรึงไปทดสอบการบำบัดน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนในน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็กที่ท่าเรือประมง จ. จันทบุรี และพบว่าการเติมเซลล์ตรึงช่วยลดการสะสมของน้ำมันในน้ำอับเฉาเรือได้ในระดับหนึ่ง จึงควรมีการพัฒนาวิธีที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการนำไปใช้เพื่อบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป

1. การพัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น อาจทำได้โดยนำเชื้ออื่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันในส่วน aromatics มาตรึงร่วมกับเชื้อ *Candida* sp. JC4 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันให้ดียิ่งขึ้น

2. ในขั้นตอนการนำเซลล์ตรึงไปบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมง ควรทำการศึกษาโดยใช้โฟมพอลิยูรีเทนที่ไม่มีเซลล์ตรึงควบคู่ไปด้วย เพื่อเป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึง รวมทั้งเพิ่มระยะการนำเซลล์ตรึงไปบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงให้นานกว่านี้ เพื่อจะได้เห็นประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการลดปริมาณของน้ำมันให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ควบคุมมลพิษ, กรม. ท่าเทียบเรือประมง สะพานปลา และแพปลา กับแนวทางการจัดการ. [ออนไลน์]. 2551. แหล่งที่มา: http;//www.pcd.go.th [2553, สิงหาคม 6]

ควบคุมมลพิษ, กรม. ส่วนแหล่งน้ำทะเล สำนักจัดการคุณภาพน้ำ. [ออนไลน์]. 2550. แหล่งที่มา: http;//www.marinepcd.org [2553, สิงหาคม 13]

ภาษาอังกฤษ

Alloway, T.M. and Ayres, D.J. 1993. Organic pollutants. In: Chemical Principles of Environmental Pollutants. 1st edition. Chapman and Hall, India, Publishers, p.201.

Atlar, M.R.1986. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiological Reviews. 45: 180-209.

Bartha, R. 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. Microbiology Ecology. 12:155-172.

Beolchini, F., Rocchetti, L., Regoli, F. and Dell'Anno, A. 2010. Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: Experimental analysis and kinetic modeling. Journal of Hazardous Materials. 182: 403-407.

Beyrem H., Louati H., Essid N., Aossa P. and Mahmoudi, E. 2010. Effects of two lubricant oils on marine nematode assemblages in a laboratory microcosm experiment. Marine Environmental Research. 69: 248-253.

Cavanagh, J.-A.E., Juhasz, A.L., Nichols, P.D., Franzmann, P.D. and McMeekin, T.A. 1995. Analysis of microbial hydrocarbon degradation using TLC-FID. Journal of Microbiological Methods. 22: 119-130.

Chu, Y.-F., Hsu, C.-H., Soma, P. K. and Lo, Y. M. 2009. Immobilization of bioluminescent *Escherichia coli* cells using natural and artificial fibers treated with polyethyleneimine. Bioresource Technology.100: 3167-3174.

Craft D. L., Krishna, M.M., Eshoo, M. and Wilson, C. R. 2003. Identification and characterization of the *CYP52* family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, Important for the conversion of fatty acids and alkanes to β,ω-dicarboxylic acids. Applied and Environmental Microbiology. 69: 5983-5991.

Cunningham, C.J., Ivshina, I.B., Lozinsky, V.I., Kuyukina M.S. and Philp J.C. 2004. Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol. International Biodeterioration & Biodegradation. 54: 167-174.

Dursun, A. Y. and Tepe, O. 2005. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*. Journal of Hazardous Materials. 126: 105-111.

Haines, J.R., Wrenn, B.A., Holder, E.L., Strohmeier, K.L., Herrington, R.T. and Venosa, A.D. 1996. Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populations by a 96-well plate most probable number procedure. Journal of Industrial Microbiology.16: 36-41.

Harayama, S., Hara, A. and Kasai, Y. 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. Environmental Biotechnology. 15: 205-214.

Higashihara, T. and Sato, A. 1978. An MPN method for the enumerations of marine hydrocarbon degradation bacteria. Bulletin of the Japanese Society of Fisheries. 44: 1127-1134.

Hii, Y. S., Lawa, A. T., Shazili, N.A.M., Abdul-Rashid, M.K. and Lee, C. W. 2009. Biodegradation of tapis blended crude oil in marine sediment by a consortium of symbiotic bacteria. International Biodeterioration & Biodegradation. 63: 142-150.

Howard, G.T. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. International Biodeterioration & Biodegradation. 49: 245 – 252.

Hua, J. and Liu, S.-M. 2008. Ballasting outside port to prevent spread of butyltin from merchant ships. Ocean Engineering. 35: 1505-1511.

Hua, Z., Chen J., Lun, S. and Wang, X. 2003. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. Water Research. 37: 4143-4150.

Ijah, U. J. J. 1998. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. Waste Management. 18: 5293-299.

Jaime, Y.S.L., Abdullah, N. and Vikineswary, S. 2009. Evaluation of support materials for immobilization of *Pycnoporus sanguineus* mycelia for lacease production and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Research Journal of Environmental Sciences. 3: 357-366.

Kevin, A. H. and Stallwood, B. 2006. Oil pollution in the Antarctic terrestial environment. Polarforschung. 75: 141-144.

Leenen, E.J.T.M.,Dos Santos, IV.A.P., Grolie, K.C.F., Tramper, J. and Wljffels, R.H. 1996. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. Water Resource. 30: 2985-2996.

Lemos, V.A., Santos, E.S., Santos, M.J.S., Santos, W.N.L., Souzae, A.S., Virgens, D.S., Carvalho, M.S., Oleszczuk, N., Vale, M.G.R., Welz, B. and Ferreira, S.L.C. 2007. Application of polyurethane foam as sorbent for trace metal pre-concentration – A review. Spectrochimica Acta. Part B, Atomic Spectroscopy. 62: 4-12.

Licestein, H.C. and Soule, M.H. 1994. Studies of the effect of sodium azide on microbic growth and respiration. Journal of Bacteriology. 47: 221–230.

Mauersberger, S., Ohkuma, M., Schunck, W.-H. and Takagi, M.1996. *Candida maltosa*, p. 411-580. In K. Wolf (ed.), Non-conventional yeasts in biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Michaud, L., Giudice, A. L., Saitta, M., Domenico, M. D. and Bruni, V., 2004. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. Marine Pollution Bulletin. 49: 405-409.

Monohar, s., Kim, C.K. and Karegoudar, T.B. 2001. Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas* sp. strain NGK1 in polyurethane foam. Applied Microbiology Biotechnology. 55: 311-316.

Nagata, S., Kondo, G. and Asano, T.1978. Experiment degradation of crude oil by marine bacterial. Journal of the Oceanographical Society of japan. 34: 105-107.

Nikolopoulou, M. and Kalogerakis, N. 2009. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 84: 802-807.

Obuekwe, C.O. and Al-Muttawa, E.M. 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. Biotechnology Letters. 23: 1025-1032.

Oh, Y.-S., Maeng, J. and Kim, S.-J. 2000. Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. Applied Microbiology Biotechnology. 54: 418-423.

Palittapongarnpim M., Pokethitiyook P., Upatham E. S. and Tangbanluekal, L.1998. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. Biodegradation. 9: 83-90.

Parameswarappa, S., Karigar, C. and Nagenahalli, M. 2008. Degradation of ethylbenzene by free and immobilized *Pseudomonas fluorescens*-CS2. Biodegradation. 19: 137-144.

Prince, R.C., Lessard, R.R. and Clark , J.R. 2003. Bioremediation of marine oil spills. Oil & Gas Science and Technology. 58: 463-468.

Quek, E., Ting, Y.-P. and Tan, H.M. 2006. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. Bioresource Technology. 97: 32-38.

Renato, N.-M., Paulo R.M. and Ederio D.B. 2009. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. International Biodeterioration & Biodegradation. 63: 297-305.

Romaskevic,T., Budrien, S., Pielichowski, K. and Pielichowski, J. 2006. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: A review. Chemija. 17: 74-89.

Saltzmann, H. A. 1982. Biodegradation of aromatic hydrocarbon in marine sediments of three north sea oil fields. Marine Biology. 72: 17-26.

Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R. and Birnbaum, S. 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. Environmental Pollution. 136: 187-195.

Scott, C. D. 1987. Immobilized cells: a review of recent literature. Enzyme and Microbial Technology. 9: 66-72.

Shin, M., Nguyen, T. and Ramsay, J. 2002. Evalution of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by Trametes versicolor. Applied Microbiology and Biotechnology. 60: 218-233.

Taki, H., Takahata, Y. and Harayama, S. 2003. Bioremediation of spilled oil, p. 393-403. *In* Hayakawa, K. and Tazaki, K. (ed.), Heavy oil spilled from russian tanker "Nakhodka" in 1997. Towards eco-responsibility earth sense, 21st Century COE Kanazawa University.

Thompson, B.A.W., Goldsworthy, P.M., Riddle, M.J., Snape, I. and Stark, J.S. 2007. Contamination effects by a 'conventional' and a 'biodegradable' lubricant oil on infaunal recruitment to Antarctic. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 340: 213-226.

Tong, S.L., Goh, S.H. Rani Abdulah, A., Tahir, N.M. and Wang, C.W.1999. Asean marine water quality criteria for oil and grease. Marine Environment Division, Water Quality Management Bureau, Pollution Control Department.

Van Hamme, J.D., Singh, A. and Ward, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67: 503-549.

Venosa, A. D. and Zhu, X. 2003. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. Spill Science & Technology Bulletin. 8:163-178.

Venosa, A.D., Holder, E.L .2007. Biodegradability of dispersed crude oil at two different temperatures. Marine Pollution Bulletin . 54: 545-553.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Verbelen P. J., De D. P., Delvaux S. F., Verstrepen, K. J. and Delvaux, F. R. 2006. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. Biotechnology Letters. 28: 1515-1525.

Vrede, K., Heldal, M., Norland, S. and Bratbak, G. 2002. Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. Applied and Environmental Microbiology. 68: 2965-2971.

Yang, F.C. and Yu, J.T. 1996. Development of a bioreactor system using an immobilized white rot fungus for decolorization. Bioprocess and Biosystems Engineering. 15: 307-310.

Zinjarde, S. S. and Pant, A. A. 2002. Hydrocarbon degraders from tropical marine environment. Marine Pollution Bulletin. 44: 118-121.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Sea Water (NSW)

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.02	กรัม
เฟอริคซิเตรต (Ferric citrate)	0.02	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.5	กรัม
น้ำทะเล	200	มล.
น้ำกลั่น	800	มล.

ชั่งสารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร และเติมน้ำทะเล 200 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.8 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NSW (NSW agar)

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.02	กรัม
เฟอริคซิเตรต (Ferric citrate)	0.02	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.5	กรัม
วุ้น (Agar)	15	กรัม
น้ำทะเล	200	มล.
น้ำกลั่น	800	มล.

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว NSW แต่เติมผงวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไป ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.8 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Maltose (YM)

กลูโคส (Glucose)	1.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	0.02	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.02	กรัม
สารสกัดจากมอลท์ (Malt extract)	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ชั่งสารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM (YM agar)

กลูโคส (Glucose)	1.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	0.02	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.02	กรัม
สารสกัดจากมอลท์ (Malt extract)	0.5	กรัม
วุ้น (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว YM แต่เติมผงวุ้น 20 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

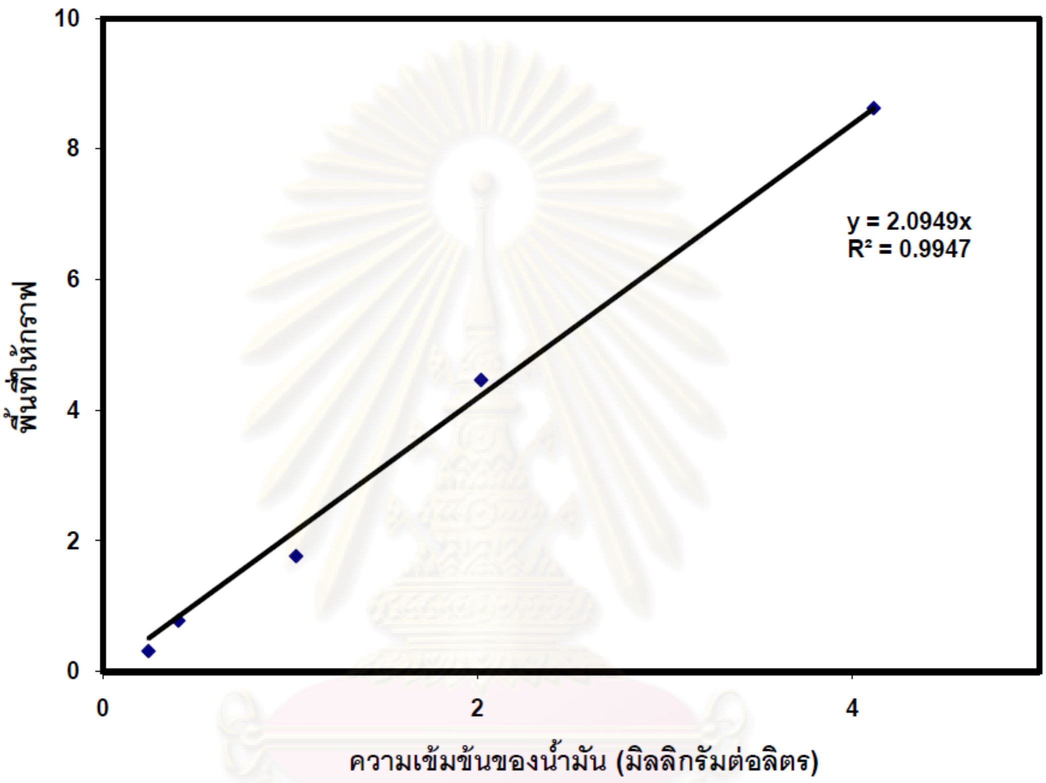
1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่านำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

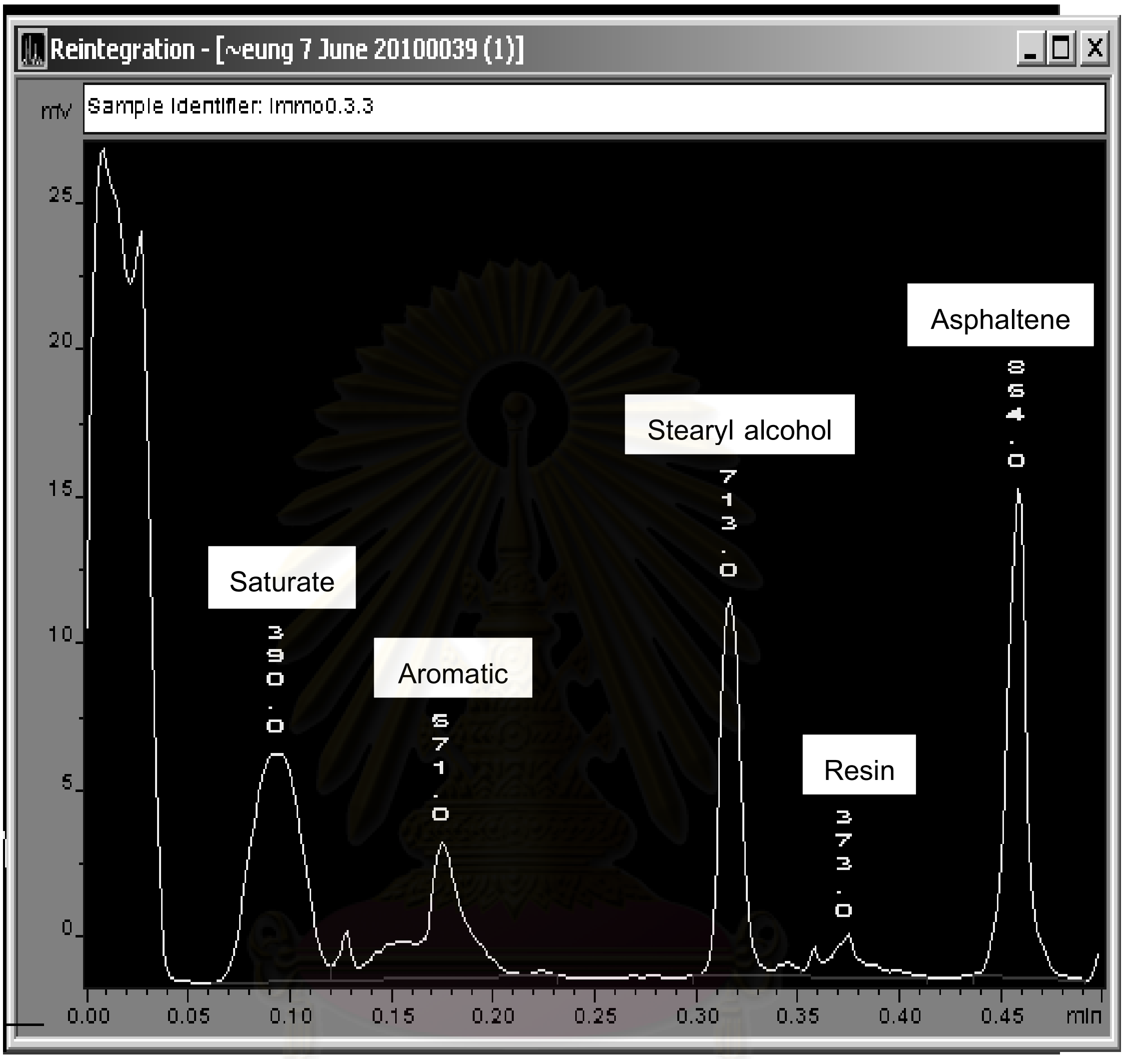
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของน้ำมันเครื่อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ค.2 โครมาโตแกรมของน้ำมัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่

ตารางที่ ง.1 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของการย่อยสลายน้ำมันที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW เป็นเวลา 7 วัน

เวลา (วัน)	PUF-Immobilized Cells														
	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	179.95	178.91	181.91	62.78	52.78	62.15	33.28	35.79	32.31	3.49	3.43	3.41	77.59	80.89	83.03
1	144.18	135.72	144.92	39.98	35.78	40.04	30.09	31.56	30.65	2.93	2.90	3.05	71.16	65.47	71.17
2	121.08	130.08	125.04	40.53	30.46	42.73	26.25	30.51	24.14	2.80	2.90	2.66	121.5	31.19	24.49
3	116.28	134.88	116.46	39.53	37.70	38.03	26.45	24.47	21.77	2.79	2.52	2.60	47.50	70.17	54.05
4	127.90	107.01	125.79	39.17	35.38	39.91	22.92	21.43	22.16	2.47	2.57	2.61	63.32	47.62	61.09
5	120.02	121.78	117.83	39.26	32.05	43.02	22.05	23.76	19.21	2.62	2.44	2.22	56.08	63.52	53.38
6	112.12	115.75	116.30	38.97	31.57	34.29	20.16	23.02	19.30	2.26	2.53	2.34	50.72	58.62	60.36
7	121.53	107.25	113.23	38.74	30.67	36.24	20.36	24.10	17.60	2.47	2.63	2.31	59.94	49.84	57.07

96

ตารางที่ ง.1 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของการย่อยสลายน้ำมันที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

เวลา (วัน)	Free Cells														
	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	185.12	178.25	173.59	60.26	56.55	60.21	36.73	29.42	36.13	3.29	3.62	3.63	84.83	68.65	73.61
1	177.85	152.83	159.79	54.65	54.88	54.03	36.24	28.86	34.16	2.83	3.18	3.31	84.11	65.90	68.28
2	162.57	135.56	166.06	49.21	54.33	58.23	33.82	27.88	35.86	3.03	3.06	3.04	76.49	50.28	68.91
3	152.44	149.70	149.02	52.79	54.54	49.67	33.50	25.22	30.06	2.93	2.98	3.01	63.21	66.96	66.26
4	153.00	147.66	154.91	49.88	51.37	53.50	33.96	32.90	29.47	3.56	2.94	2.96	68.29	62.43	69.96
5	147.36	152.13	148.96	52.41	44.83	50.15	25.88	37.94	30.75	3.55	3.14	2.93	67.41	67.21	66.11
6	152.37	145.72	150.64	47.35	49.01	50.78	34.84	26.63	34.87	3.54	3.02	2.94	68.61	67.04	63.14
7	155.37	146.72	142.64	52.63	46.51	47.86	35.57	31.25	26.18	3.05	2.99	2.96	65.79	66.10	66.00

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.1 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของการย่อยสลายน้ำมันที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

เวลา (วัน)	PUF-Only														
	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	174.83	177.72	177.30	62.45	55.60	59.22	37.51	35.10	30.13	3.88	3.71	3.95	70.98	83.31	83.99
1	162.85	175.30	169.03	61.82	54.91	58.21	34.98	34.27	30.05	3.52	3.37	3.53	62.51	82.73	77.23
2	166.74	174.16	166.83	59.99	54.91	58.68	35.58	34.62	29.88	3.68	3.35	3.53	67.47	81.27	74.74
3	156.77	174.47	165.52	61.59	54.34	54.00	36.02	34.68	26.93	3.65	3.33	3.57	85.49	82.11	81.00
4	152.80	171.19	172.18	59.76	55.20	58.37	34.05	32.89	28.83	3.61	3.34	3.53	85.36	79.75	81.43
5	168.15	170.37	166.30	61.04	53.24	57.51	34.71	33.93	29.94	3.70	3.37	3.58	68.70	79.81	75.25
6	169.73	171.80	172.61	61.46	54.87	56.72	36.57	31.58	29.57	3.67	3.31	3.54	68.01	82.02	82.76
7	165.56	169.13	154.55	60.57	50.88	58.79	33.71	34.10	29.44	3.55	3.33	3.68	87.71	80.80	62.62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

98

ตารางที่ ง.1 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของการย่อยสลายน้ำมันที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

เวลา (วัน)	Without cell														
	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	168.33	181.14	184.55	54.31	60.39	61.79	34.60	34.61	34.98	3.61	3.67	3.70	75.79	82.46	84.06
1	157.95	175.57	175.72	51.03	58.98	58.64	33.96	33.06	33.07	3.43	3.35	3.34	69.50	80.17	80.65
2	163.18	174.57	176.49	54.02	58.72	61.27	33.66	32.41	32.90	3.43	3.31	3.36	72.06	80.12	78.94
3	165.17	174.78	176.16	58.98	57.55	59.93	32.76	33.75	33.65	3.25	3.32	3.51	70.16	80.16	79.05
4	149.10	169.55	178.36	53.2	54.65	60.43	32.12	32.84	34.66	3.20	3.27	3.44	60.52	78.78	79.82
5	162.64	172.80	161.91	52.75	59.22	57.95	33.47	32.43	33.30	3.36	3.27	3.29	73.04	77.86	67.34
6	161.85	165.07	167.16	53.47	55.64	55.95	32.45	29.95	34.22	3.34	3.22	3.20	72.58	76.24	73.77
7	161.65	164.26	152.60	52.97	50.49	57.36	31.81	33.16	30.98	3.02	3.25	3.13	73.84	77.35	61.12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.2 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของการย่อยสลายน้ำมันที่ยังไม่ใช้งานและใช้งานแล้วที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW เป็นเวลา 5 วัน

เวลา (วัน)	PUF-Immobilized Cells														
	ปริมาณน้ำมันยังไม่ใช้งาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	851.24	919.2	922.84	169.64	201.52	192.82	119.09	143.75	128.09	13.58	19.37	18.92	548.91	554.60	583.00
5	736.86	596.5	669.27	167.32	97.31	134.59	99.69	92.49	95.98	12.32	19.9	7.12	457.51	386.69	431.56
เวลา (วัน)	PUF-Immobilized Cells														
	ปริมาณน้ำมันยังไม่ใช้งาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	842.12	928.03	889.12	364.87	414.26	387.78	187.58	199.59	178.92	17.03	24.21	13.93	272.63	289.95	308.48
5	660.83	669.92	896.35	278.88	208.26	263.81	134.19	177.58	152.98	23.12	18.35	11.93	224.62	265.71	295.18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.2 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของการย่อยสลายน้ำมันที่ยังไม่ใช้งานและใช้งานแล้วที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW เป็นเวลา 5 วัน (ต่อ)

เวลา (วัน)	Free Cells														
	ปริมาณน้ำมันยังไม่ใช้งาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	833.09	882.37	988.24	185.38	177.19	200.01	125.83	127.74	153.58	19.11	16.05	16.58	502.76	561.38	618.05
5	729.34	775.05	853.04	169.64	169.93	165.34	113.09	116.14	110.54	11.86	16.00	13.85	434.73	472.97	513.52

เวลา (วัน)	Free Cells														
	ปริมาณน้ำมันยังไม่ใช้งาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	892.31	858.12	885.89	402.37	383.23	375.73	176.29	168.71	211.88	24.30	11.64	16.18	289.32	294.5	282.08
5	757.03	805.06	854.01	297.71	355.00	404.96	180.98	168.13	181.81	23.28	17.78	10.85	255.03	264.14	256.37

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.2 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของการย่อยสลายน้ำมันที่ยังไม่ใช้งานและใช้งานแล้วที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW เป็นเวลา 5 วัน (ต่อ)

เวลา (วัน)	PUF-Immobilized killed Cells														
	ปริมาณน้ำมันยังไม่ใช้งาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	884.98	858.26	937.97	191.15	167.98	208.82	141.49	129.51	130.67	14.00	21.52	16.74	538.33	539.24	581.72
5	830.24	777.56	878.31	186.45	171.48	207.36	142.01	129.37	127.78	17.84	16.69	8.09	483.93	460.01	543.16
เวลา (วัน)	PUF-Immobilized killed Cells														
	ปริมาณน้ำมันยังไม่ใช้งาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	871.05	844.30	901.25	396.33	367.79	368.87	194.94	170.55	199.96	15.38	16.09	22.43	264.39	289.85	309.97
5	851.95	785.21	883.21	344.21	322.38	390.52	189.54	169.47	184.70	20.64	18.90	13.68	297.54	274.45	306.57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

102

ตารางที่ ง.2 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของการย่อยสลายน้ำมันที่ยังไม่ใช้งานและใช้งานแล้วที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW เป็นเวลา 5 วัน (ต่อ)

เวลา (วัน)	Without cell														
	ปริมาณน้ำมันยังไม่ใช้งาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	935.66	862.86	884.39	166.16	178.89	218.79	158.37	138.27	119.61	11.11	22.16	18.31	599.99	523.53	527.67
5	810.92	858.60	904.59	203.48	183.78	168.35	114.65	148.01	150.09	11.93	22.02	12.91	480.83	504.7	502.69

เวลา (วัน)	Without cell														
	ปริมาณน้ำมันยังไม่ใช้งาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	899.10	858.78	870.26	397.01	370.05	387.73	202.33	178.93	185.35	19.04	11.65	18.55	280.70	298.14	278.61
5	809.94	879.27	823.84	360.48	389.01	333.24	172.33	192.02	196.91	17.35	16.62	14.31	259.75	281.61	279.36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.3 ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เหลืออยู่ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้นเริ่มต้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW ในการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 17 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณน้ำมันทั้งหมด (Total) (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	190.56	170.66	174.13
1	142.25	116.93	124.77
2	306.63	257.79	282.78
3	232.78	166.66	204.82
4	390.40	402.58	383.51
5	316.54	314.12	318.30
6	514.00	480.87	492.63
7	372.14	370.76	375.96
8	536.46	529.94	462.77
9	412.78	402.91	424.28
10	668.767	665.02	632.00
11	507.08	506.05	502.29
12	725.59	698.75	788.41
13	588.78	440.09	491.16
14	710.97	666.25	616.25
15	507.99	436.35	528.95
16	645.05	646.03	673.82
17	582.27	476.58	488.24

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.4 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW ที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร C/N/P เป็นเวลา 5 วัน

เวลา (วัน)	อัตราส่วน C/N/P 100/5/0.5														
	ปริมาณน้ำมันยังไม่ใช้งาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	169.85	154.31	203.22	60.36	55.35	60.74	43.12	15.87	41.73	2.99	3.51	2.63	63.36	79.56	98.11
5	111.85	129.46	133.14	35.39	41.48	48.29	22.99	23.18	27.03	2.72	2.61	2.36	50.73	62.17	55.45

เวลา (วัน)	อัตราส่วน C/N/P 100/5/1														
	ปริมาณน้ำมันที่ใช้งานแล้ว (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	168.26	166.61	190.11	52.88	55.43	65.00	30.93	35.63	34.19	3.12	2.61	3.66	81.32	72.93	87.24
5	145.39	100.50	107.39	40.60	38.51	31.70	24.66	20.24	26.80	2.80	1.75	2.47	77.32	39.98	46.40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

105

ตารางที่ ง.4 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร NSW ที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร C/N/P เป็นเวลา 5 วัน (ต่อ)

เวลา (วัน)	อัตราส่วน C/N/P 100/7.5/1														
	ปริมาณน้ำมันยังไม่ใช้งาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	176.35	160.20	187.20	64.20	51.48	58.05	42.38	31.17	27.13	2.86	2.62	3.70	66.90	74.92	98.30
5	102.19	101.55	120.61	30.74	33.80	40.79	20.38	23.25	16.49	2.06	1.83	2.60	49.00	42.65	60.71

เวลา (วัน)	อัตราส่วน C/N/P 100/10/1														
	ปริมาณน้ำมันที่ใช้งานแล้ว (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	181.64	180.15	156.70	63.79	54.37	50.83	32.3	37.75	30.62	3.41	2.77	3.26	82.09	85.25	71.98
5	147.39	136.4	126.45	48.74	39.93	39.58	31.58	28.43	23.12	3.31	2.76	3.18	63.75	65.32	60.56

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

106

ตารางที่ ง.5 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการบำบัดน้ำอับเฉาเรือที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร เป็นเวลา 5 วัน

เวลา (วัน)	อัตราส่วน C/N/P 100/7.5/1														
	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	124.73	140.63	147.42	29.47	48.12	27.65	27.27	27.40	30.31	2.93	2.30	2.90	65.05	62.81	86.55
1	86.95	87.28	98.73	22.49	28.19	21.49	18.01	20.62	15.35	2.22	2.22	2.51	44.21	36.48	59.37
2	71.92	85.54	79.96	22.06	24.29	14.48	12.78	13.48	13.52	2.37	1.85	2.55	34.70	45.92	49.39
3	71.03	70.93	77.21	16.35	17.37	12.52	12.46	14.16	13.76	2.37	1.88	2.32	39.84	37.50	48.59
4	63.44	69.16	68.56	13.60	14.97	13.52	13.69	13.13	12.49	2.10	1.87	2.42	34.04	39.17	40.12
5	58.72	57.42	63.08	12.06	11.06	10.21	11.05	11.95	10.74	2.15	1.87	2.40	33.44	32.53	39.72

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

107

ตารางที่ ง.5 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการบำบัดน้ำอับเฉาเรือที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร เป็นเวลา 5 วัน (ต่อ)

เวลา (วัน)	อัตราส่วน C/N/P 100/0.82/0.75														
	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	114.36	146.14	159.04	30.24	37.67	35.85	28.88	31.43	28.98	2.73	3.01	2.19	70.12	82.00	62.03
1	121.23	105.29	119.92	29.32	28.27	35.02	27.65	25.02	27.54	2.39	2.71	2.73	60.37	59.281	53.19
2	120.20	112.76	100.33	27.56	22.85	23.53	24.48	26.10	23.86	2.43	3.21	2.08	62.78	38.05	58.43
3	87.87	90.98	79.54	17.38	17.82	21.32	16.38	19.72	17.54	2.46	2.28	1.59	55.13	50.72	40.42
4	77.97	82.67	79.39	15.58	16.25	15.97	19.80	13.98	15.48	2.01	2.54	1.94	51.01	34.52	48.79
5	76.81	72.79	75.80	15.29	16.71	15.25	13.79	14.35	14.66	2.24	2.43	1.88	43.98	39.29	45.48

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

108

ตารางที่ ง.5 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการบำบัดน้ำอับเฉาเรือที่มีการปรับปริมาณสารอาหาร เป็นเวลา 5 วัน (ต่อ)

เวลา (วัน)	Natural attenuation 100/0.82/0.75														
	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	140.33	151.50	149.12	49.54	60.41	56.17	37.62	48.49	40.29	5.47	6.23	5.07	47.67	36.35	47.45
1	150.45	143.72	143.75	43.35	53.93	41.19	46.88	47.81	43.98	6.39	6.12	5.41	53.81	35.85	53.16
2	151.45	141.78	143.50	42.34	54.23	41.99	48.12	45.98	43.05	7.34	5.24	5.99	54.39	36.23	53.38
3	135.64	132.69	145.11	44.15	45.01	49.35	39.01	47.64	41.76	5.60	5.94	4.90	46.87	34.09	49.08
4	134.56	128.45	140.97	43.89	46.82	49.19	37.89	45.77	41.76	6.23	4.98	4.23	48.34	32.48	49.23
5	140.23	139.80	137.23	41.34	54.04	45.63	43.02	45.35	38.78	6.15	5.63	5.19	49.70	34.76	47.38

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

109

ตารางที่ ง.6 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในส่วนของน้ำอับเฉาเรือของการบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็กด้วยเซลล์ตรึง ระหว่างการบำบัดเป็นเวลาประมาณ 3 วัน

เวลา (ชม.)	ส่วนของน้ำอับเฉาเรือ														
	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	81.01	70.34	60.36	7.17	5.08	1.96	7.17	3.21	1.80	1.97	2.85	4.53	64.68	59.18	52.05
6	61.59	51.37	55.54	13.54	1.71	0.87	5.42	1.08	0.87	2.27	4.62	3.42	40.35	43.94	50.37
9	36.53	49.53	52.21	3.66	2.95	2.01	3.09	5.94	1.98	2.90	1.66	3.94	26.87	38.97	44.27
12	76.03	73.02	38.48	29.08	9.19	6.84	2.73	1.51	3.85	6.29	6.35	2.73	37.92	55.96	25.04
24	95.06	69.48	62.34	31.73	3.13	1.54	2.24	8.16	2.56	4.66	3.42	2.78	56.41	54.76	55.44
30	48.25	61.07	58.94	1.62	1.79	4.97	1.70	1.89	4.73	0.77	2.04	6.87	44.14	55.33	42.36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

110

ตารางที่ ง.6 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในส่วนของน้ำอับเฉาเรือของการบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็กด้วยเซลล์ตรึง ระหว่างการบำบัดเป็นเวลาประมาณ 3 วัน (ต่อ)

เวลา (ชม.) (ต่อ)	ส่วนของน้ำอับเฉาเรือ (ต่อ)														
	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
36	39.06	49.37	44.76	3.11	7.01	2.36	3.70	1.65	2.14	4.97	3.05	4.61	27.26	37.65	35.63
48	33.87	63.52	55.16	5.26	13.71	3.38	2.30	12.21	2.21	0.91	3.64	3.77	25.37	33.94	45.78
54	37.84	59.39	45.86	1.03	1.68	2.78	6.45	2.50	1.55	0.72	0.71	1.53	29.63	54.48	39.98
60	32.56	44.94	41.84	1.33	1.07	1.36	1.14	3.97	2.76	4.25	0.70	1.16	30.09	39.90	37.71

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

111

ตารางที่ ง.7 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในส่วนของโฟมพอลิยูรีเทนของการบำบัดน้ำอับเฉาเรือในเรือประมงขนาดเล็กด้วยเซลล์ตรึง ระหว่างการบำบัดเป็นเวลาประมาณ 3 วัน

เวลา (ชม.)	ส่วนของโฟมพอลิยูรีเทน														
	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)														
	Total			Saturate			Aromatic			Resin			Asphaltene		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3
0	169.90	161.58	175.51	81.37	90.92	92.47	39.72	30.10	34.67	21.60	26.62	19.14	27.20	13.94	29.21
9	475.86	527.65	470.37	182.93	162.26	118.72	242.60	314.43	306.62	19.04	22.53	16.72	31.27	28.41	28.29
12	410.20	406.90	414.30	77.14	103.98	101.5	272.85	251.23	260.83	24.94	24.98	27.42	35.26	26.69	24.45
24	498.64	494.38	518.49	158.44	144.31	233.34	282.86	288.85	234.74	24.00	30.20	24.45	33.33	31.00	25.94
30	681.62	521.86	681.60	192.18	112.7	166.02	414.01	343.49	426.08	42.41	44.20	57.71	33.01	21.43	31.78
36	829.06	502.09	1012.46	217.44	167.35	214.47	506.52	259.00	710.79	81.02	54.97	63.09	24.07	20.76	24.10
48	241.30	187.70	215.25	86.90	65.58	89.12	110.71	79.33	74.64	22.00	26.74	22.66	21.67	16.03	28.80
54	483.24	545.95	480.03	34.99	30.41	42.59	400.21	432.02	358.26	23.28	47.67	30.72	24.75	35.83	48.45
60	427.83	661.03	553.12	97.71	181.54	151.66	286.32	396.33	319.80	24.78	49.92	50.69	19.01	33.23	30.96

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

112

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธีรยุทธ วงษ์จิตรพิมล เกิดเมื่อวันที่ 18 กันยายน พ.ศ.2528 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2550 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

ผลงานที่เผยแพร่

ธีรยุทธ วงษ์จิตรพิมล, เอกวัล ลือพร้อมชัย และจิรภัทร จันทมาลี. การบำบัดทางชีวภาพของน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องโดยใช้ยีสต์ตรึงบนโฟมพอลิยูลีเธน. ใน การประชุมทางวิชาการวิทยาศาสตร์ วิศวกรรมและการจัดการสิ่งแวดล้อม ครั้งที่ 2. หน้า 23-24. 18-19 มีนาคม 2553 ณ อาคารสถาบัน 2 ชั้น 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร, 2553.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย