สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน

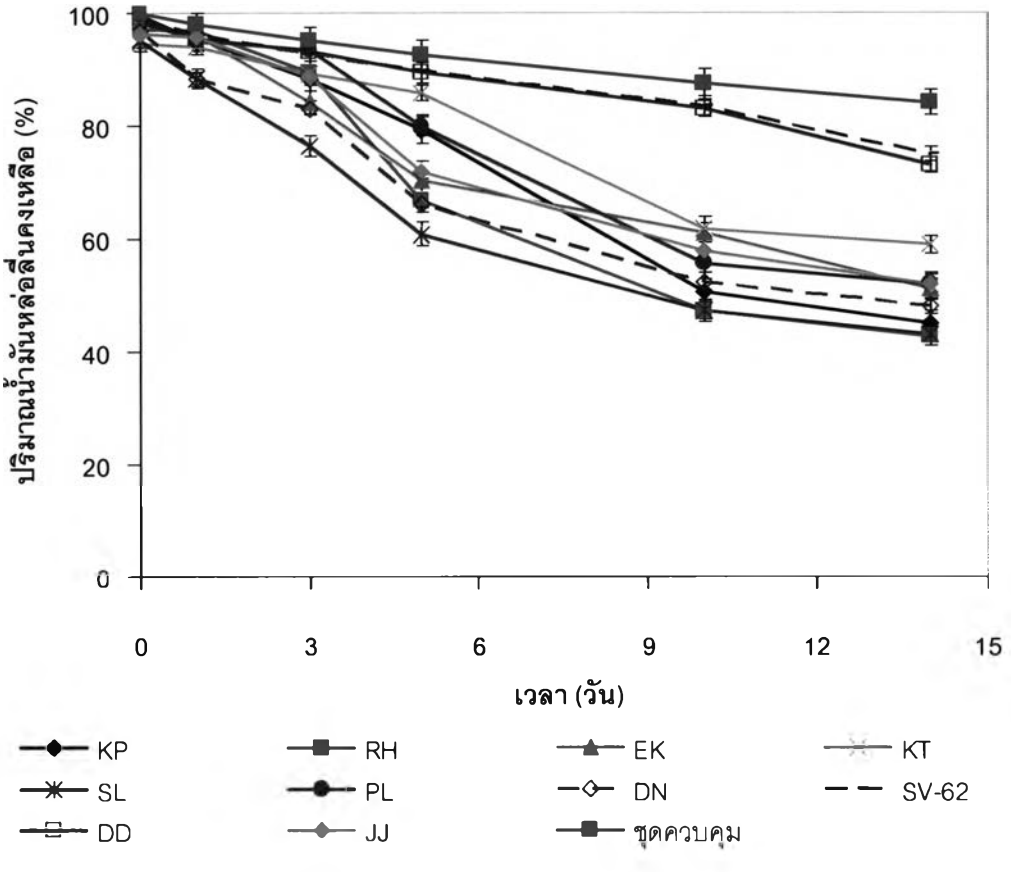
นำน้ำเสียจากสถานีบริการน้ำมันจำนวน 10 แห่งมาวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีอันได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน และปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน

ชื่อย่อตัวอย่าง	อุณหภูมิ (°ซ)	ค่า pH	ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน (มก.ต่อลิตร)	ปริมาณไฮโดรคาร์บอน (มก.ต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (มก.ต่อลิตร)	ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (มก.ต่อลิตร)
KP	30.1	7.78	15.9	11.74	13	23
RH	32	8.02	37.1	19.37	160	7
KT	32	7.48	10.8	20.98	8	0.3
SL	31.5	7.36	40.0	37.79	11	1
PL	34.5	7.92	30.9	9.23	5	0.5
DN	32	7.67	38.9	39.76	29	3
EK	32	7.57	159	39.60	120	6
JJ	-	7.35	817	19.40	4	0.6
SV-62	-	6.94	1416	28.92	21	2
DD	-	7.12	881	52.15	32	2

4.2 การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น

หลังจากเก็บตัวอย่างน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันแล้ว ได้เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมนิสเตตินเพื่อยับยั้งการเจริญของรา หลังจากถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง จึงเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของกลุ่มแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียต่างๆ ที่เก็บมา พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SL ซึ่งได้จากน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันสวนลุมพินี สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเหลือ 43.10% เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน (รูปที่ 4.1) ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มแบคทีเรีย RH ที่มาจากน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันรามคำแหง ซึ่งเหลือ 42.78% แต่ในระยะเวลาที่น้อยกว่า กลุ่มแบคทีเรีย SL สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรีย RH จึงเลือกกลุ่มแบคทีเรีย SL มาศึกษาต่อไป



รูปที่ 4.1 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยกลุ่มจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำเสียจากสถานีบริการน้ำมัน

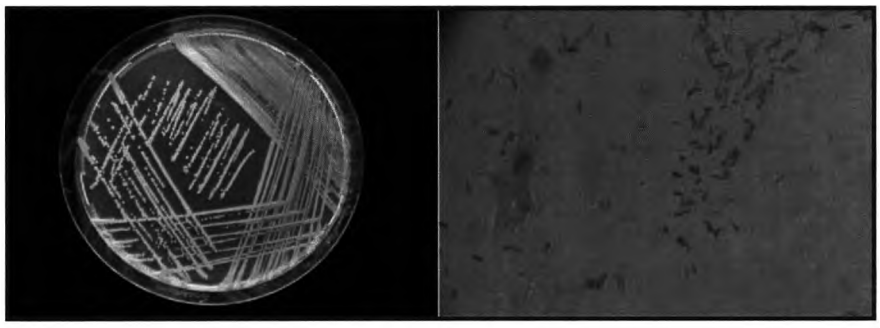
4.3 การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียบริสุทธิ์จากกลุ่มแบคทีเรีย SL

4.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมี

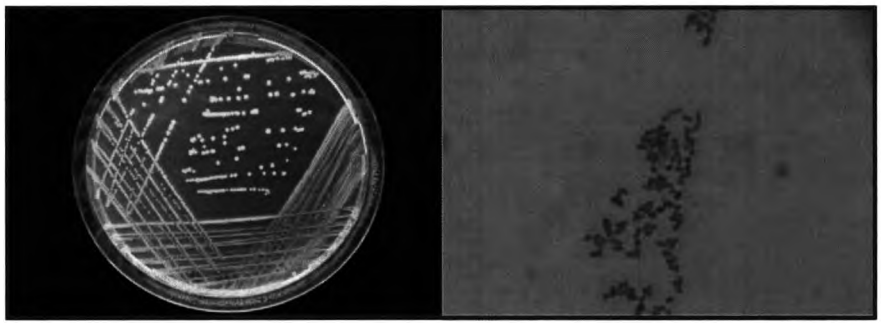
นำกลุ่มแบคทีเรีย SL มาแยกให้ได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ โดยเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % แล้วเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีน้ำมันหล่อลื่นปกคลุม หลังบ่ม 3 วัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SL ประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีลักษณะต่างกัน 4 สายพันธุ์ จากนั้นนำมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมี ดังแสดงในตาราง 4.2 4.3 และ รูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียบริสุทธิ์ของกลุ่มแบคทีเรีย SL

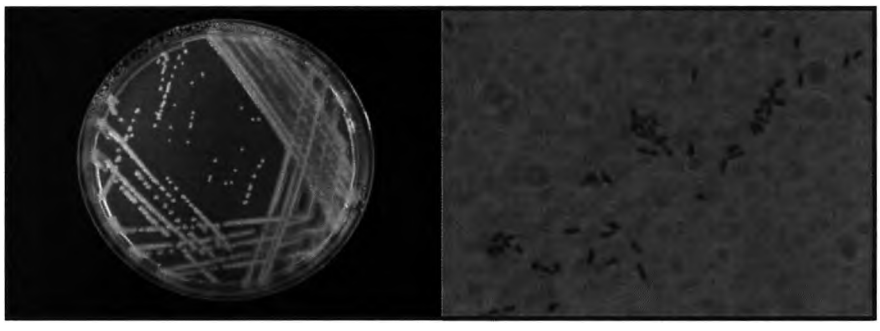
แบคทีเรียบริสุทธิ์	ลักษณะที่ศึกษา	
	ลักษณะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA	การติดสีแกรมและรูปร่างเซลล์
SLY	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีเหลือง ทึบแสง ผิวหน้ามันเงา	แกรมลบ แท่ง
SL15	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น ทึบแสง ผิวหน้ามันเงา	แกรมลบ แท่งกลม
SL17	โคโลนีกลม ขอบเรียบ ใส โปร่งแสง ผิวหน้ามันเงา	แกรมลบ แท่งสั้น
SL27	โคโลนีกลม ขอบเรียบ ใส โปร่งแสง ผิวหน้ามันเงา	แกรมลบ แท่ง



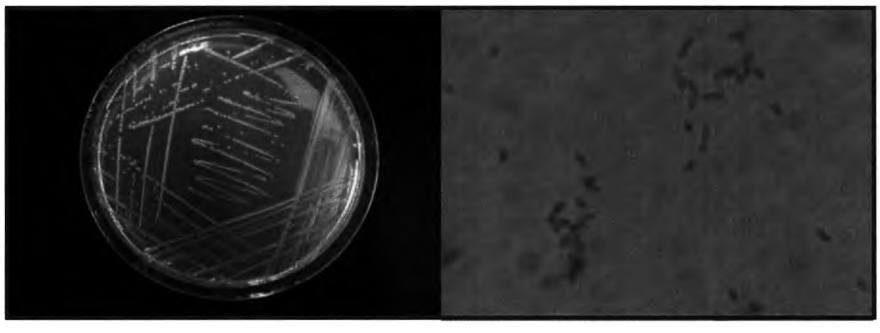
ก. แบคทีเรีย SLY



ข. แบคทีเรีย SL15



ค. แบคทีเรีย SL17



ง. แบคทีเรีย SL27

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA และเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียต่าง ๆ

ตารางที่ 4.3 สมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียบริสุทธิ์ของกลุ่มแบคทีเรีย SL

ลักษณะที่ศึกษา	แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ใช้ทดสอบ			
	SLY	SL15	SL17	SL27
การเคลื่อนที่	-	-	+	+
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	-	-	+	+
การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส	+	-	+	-
การสร้างอินโดล	-	-	-	-
การใช้ซิเตรท	-	+	-	-
การเจริญบนอาหารแข็ง TSI	K/K	K/K	K/K	K/K
การทดสอบเมทิลเรด	-	-	-	-
การทดสอบ Voges-Proskauer	-	-	-	-
ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ-เฟอร์เมนเตชัน	-/-	-/-	-/-	-/-
การย่อยสลายเอสคูลิน	-	-	-	-
การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์	-	-	-	-
การทดสอบการใช้น้ำตาล				
กลูโคส	-	-	-	-
ฟรุกโตส	-	-	-	-
ซูโครส	-	-	-	-
แลคโตส	-	-	-	-
แมนนิทอล	-	-	-	-
ซอร์บิทอล	-	-	-	-

หมายเหตุ + การทดสอบให้ผลบวกหรือเกิดปฏิกิริยา

\- การทดสอบให้ผลลบหรือไม่เกิดปฏิกิริยา

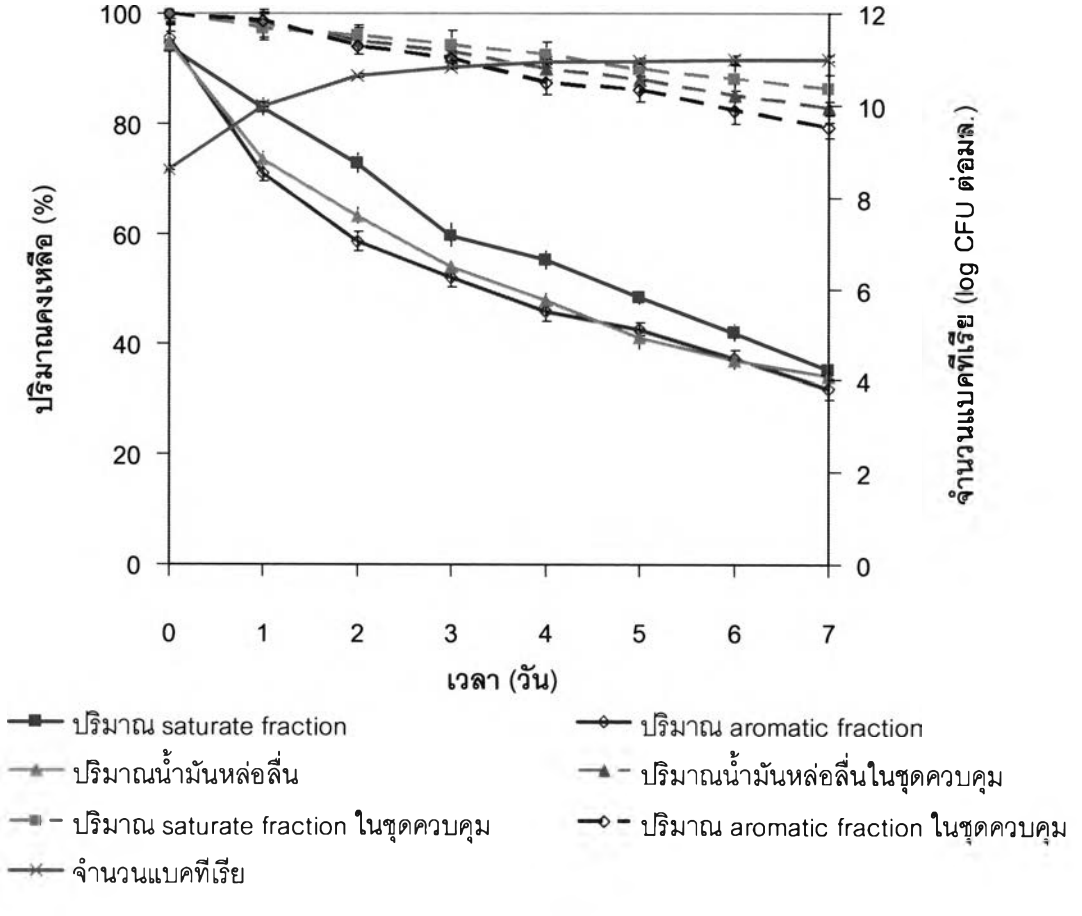
K/K ไม่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครส

4.3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA) ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้

หลังจากนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม BlastN ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย SLY SL15 SL17 และ SL27 คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในสกุล *Sphingobium* sp. *Acinetobacter* sp. *Ochrobactrum* sp. และ *Alcaligenes* sp. ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 99% ดังแสดงในภาคผนวก ง ดังนั้น จากผลทดสอบทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ จึงยืนยันได้ว่า แบคทีเรีย SLY SL15 SL17. และ SL27 เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Sphingobium* sp. *Acinetobacter* sp. *Ochrobactrum* sp. และ *Alcaligenes* sp. ตามลำดับ

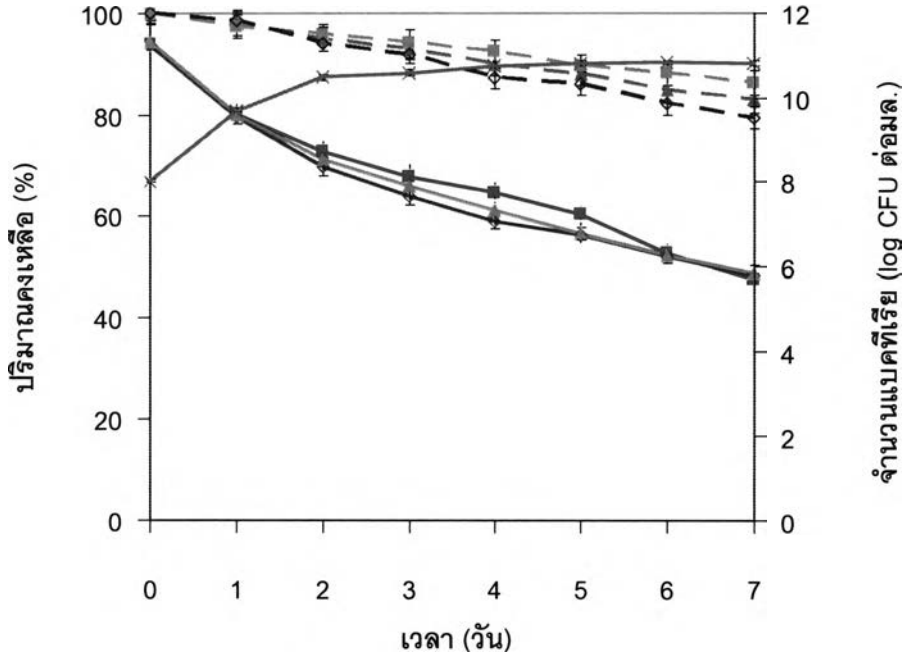
4.4 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์

การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นน้ำมันหล่อลื่น 100 มก.ต่อลิตร และมีอัตราส่วนปริมาณน้ำมัน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส เป็น 100 : 5 : 1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8.63 log CFU ต่อมล. พบว่า หลังจากผ่านไป 7 วัน กลุ่มแบคทีเรีย SL สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานได้ เนื่องจาก ปริมาณน้ำมันหล่อลื่น ส่วนแซททูเรท และส่วนอะโรมาติกคงเหลือในชุดควบคุมเท่ากับ 82.9 86.4 และ 79.4% ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณแตกต่างจากชุดทดลองอย่างมีนัยสำคัญ และสังเกตจากการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณน้ำมันหล่อลื่น ดังแสดงในรูปที่ 4.3 โดยจำนวนของแบคทีเรียเพิ่มเป็น 11.01 log CFU ต่อมล. ในวันที่ 7 และปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 34% ในขณะที่ส่วนแซททูเรท และส่วนอะโรมาติกเหลือ 35% และ 32% ตามลำดับ



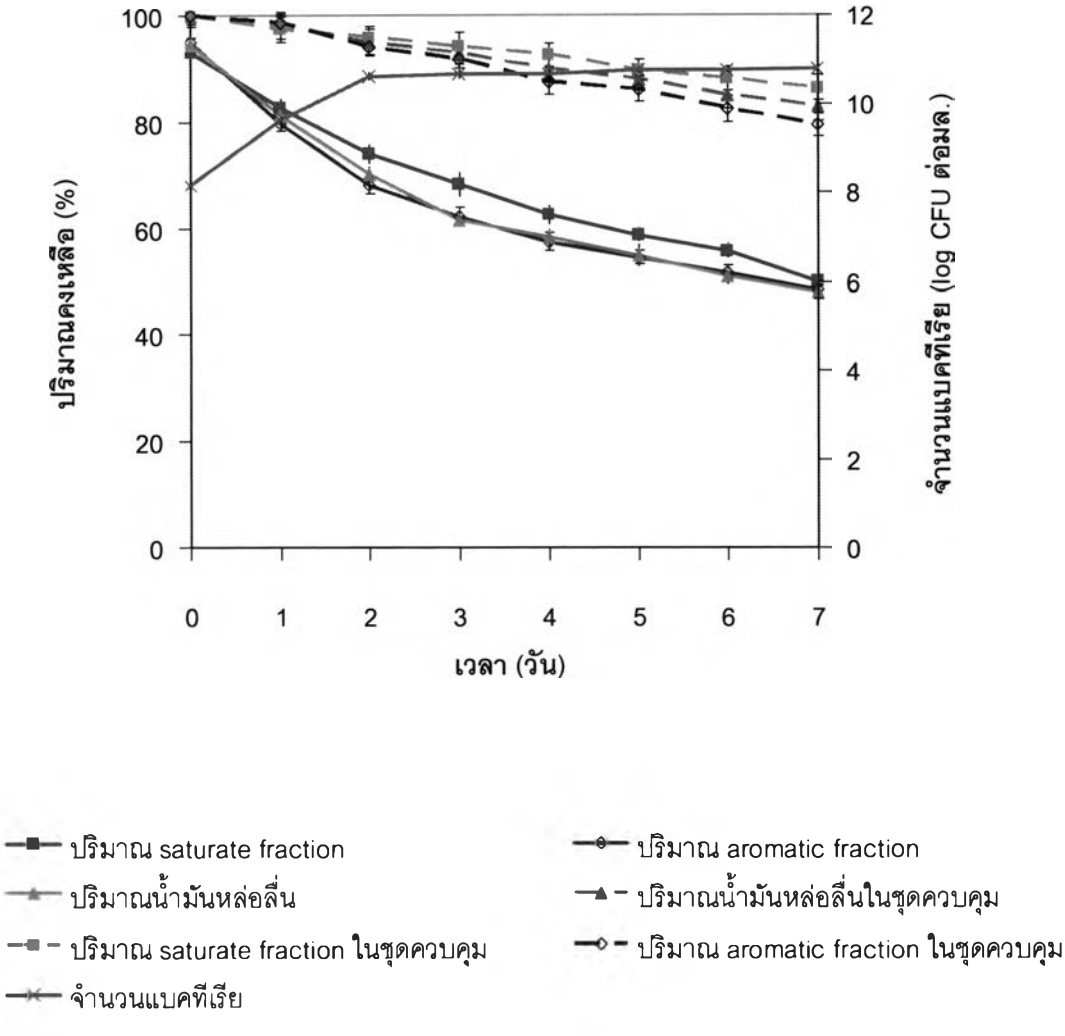
รูปที่ 4.3 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์

เมื่อพิจารณาการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของแบคทีเรีย SL15 ในภาวะเดียวกับกลุ่มแบคทีเรีย SL โดยมีเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8.04 log CFU ต่อมล. พบว่า แบคทีเรีย SL15 มีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณน้ำมันหล่อลื่นเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.4 โดยจำนวนของแบคทีเรียเพิ่มเป็น 10.83 log CFU ต่อมล. ในวันที่ 7 และปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 49% ในขณะที่ส่วนแซททูเรท และส่วนอะโรมาติกเหลือ 48% และ 48% ตามลำดับ



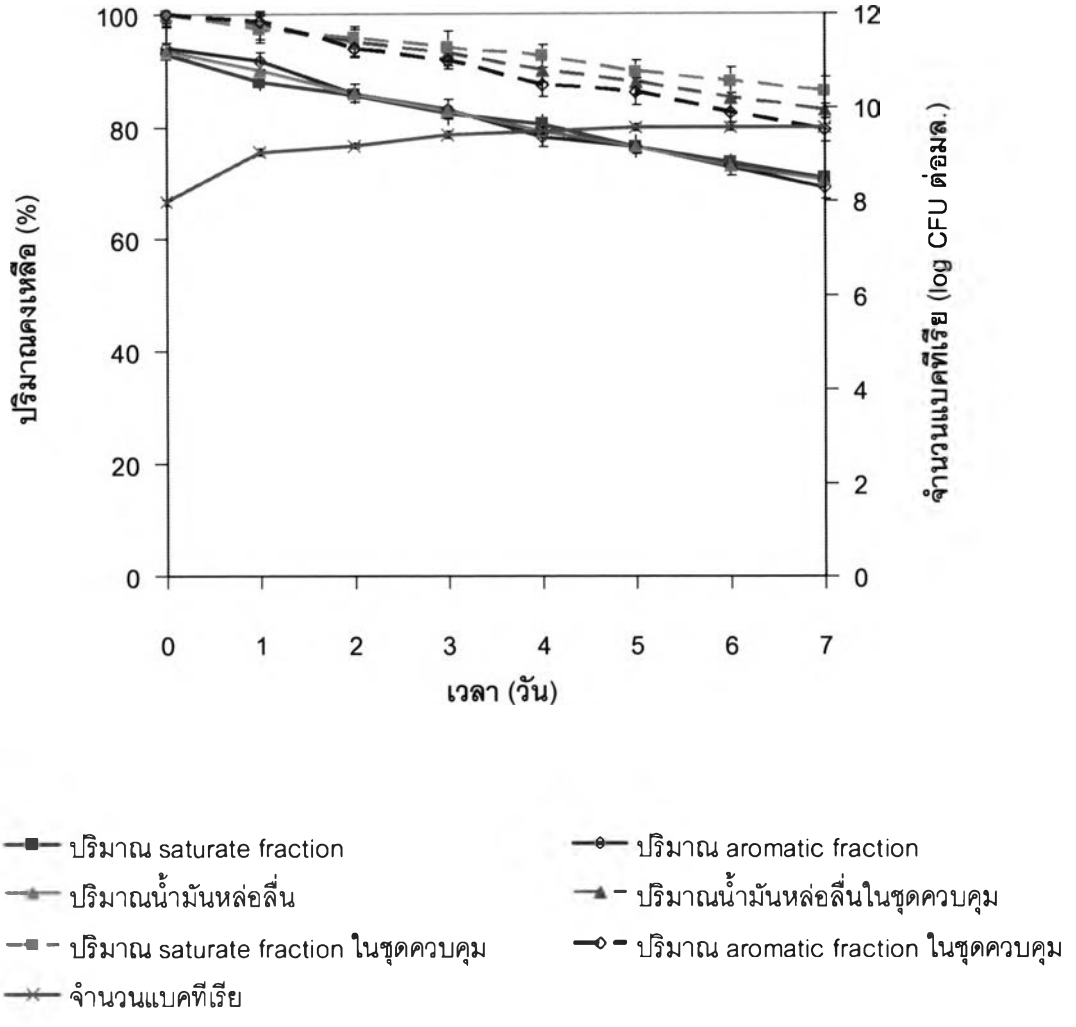
รูปที่ 4.4 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยแบคทีเรีย SL15 ในน้ำเสียสังเคราะห์

ในภาวะเดียวกัน สำหรับแบคทีเรีย SL17 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น ที่มีเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8.18 log CFU ต่อมล. พบว่า จำนวนของแบคทีเรีย SL17 เพิ่มเป็น 10.79 log CFU ต่อมล. ในวันที่ 7 ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และมีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 48% ในขณะที่ส่วนแซททูเรทและส่วนอะโรมาติกเหลือ 50% และ 48% ตามลำดับ



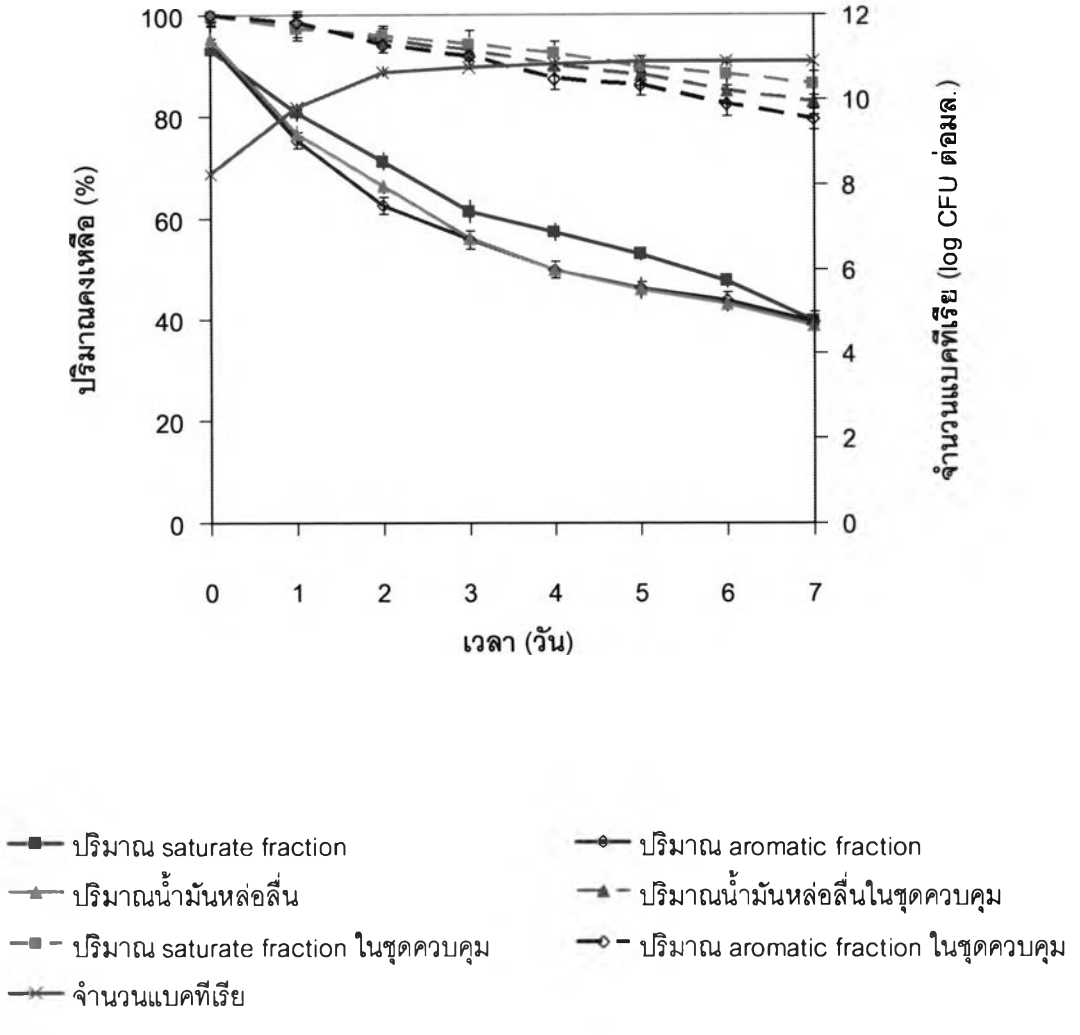
รูปที่ 4.5 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยแบคทีเรีย SL17 ในน้ำเสียสังเคราะห์

รูปที่ 4.6 แสดงการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของแบคทีเรีย SL27 ในภาวะเดียวกับข้างต้น พบว่า ในวันที่ 7 มีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 70% ในขณะที่ส่วนแซททูเรท และส่วนอะโรมาติกเหลือ 71% และ 69% ตามลำดับ โดยจำนวนของแบคทีเรียเพิ่มจาก 8.00 log CFU ต่อมล. เป็น 9.58 log CFU ต่อมล.



รูปที่ 4.6 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยแบคทีเรีย SL27 ในน้ำเสียสังเคราะห์

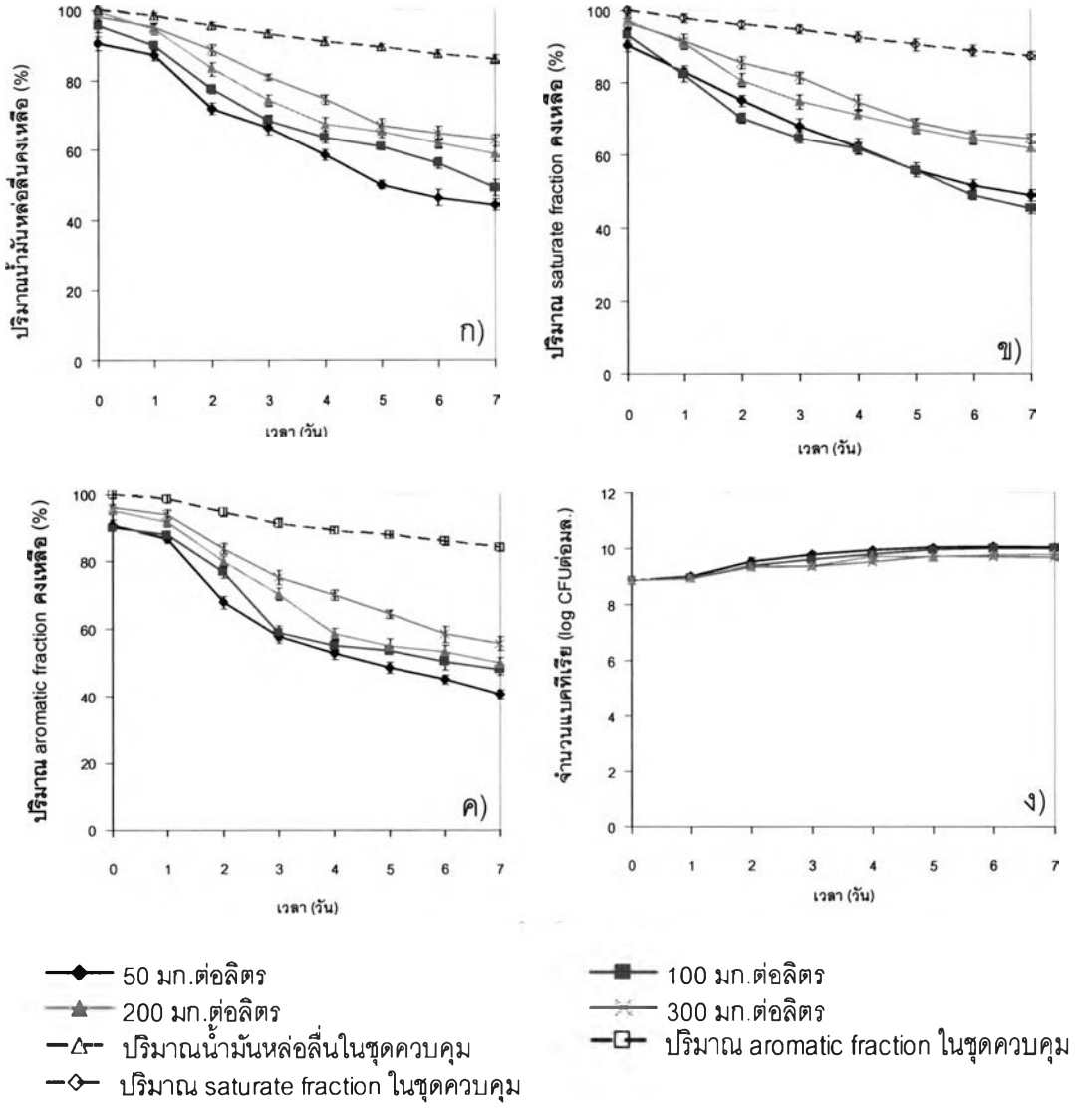
การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยแบคทีเรีย SLY แสดงในรูปที่ 4.7 ซึ่งจะเห็นว่า ในวันที่ 7 มีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 39% ในขณะที่ส่วนแซททูเรท และส่วนอะโรมาติกเหลือ 40% และ 40% ตามลำดับ โดยมีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียจาก 8.26 log CFU ต่อมล. เป็น 10.91 log CFU ต่อมล.



รูปที่ 4.7 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยแบคทีเรีย SLY ในน้ำเสียสังเคราะห์

4.5 การหาภาวะเหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

4.5.1 การหาปริมาณน้ำมันหล่อลื่นที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย

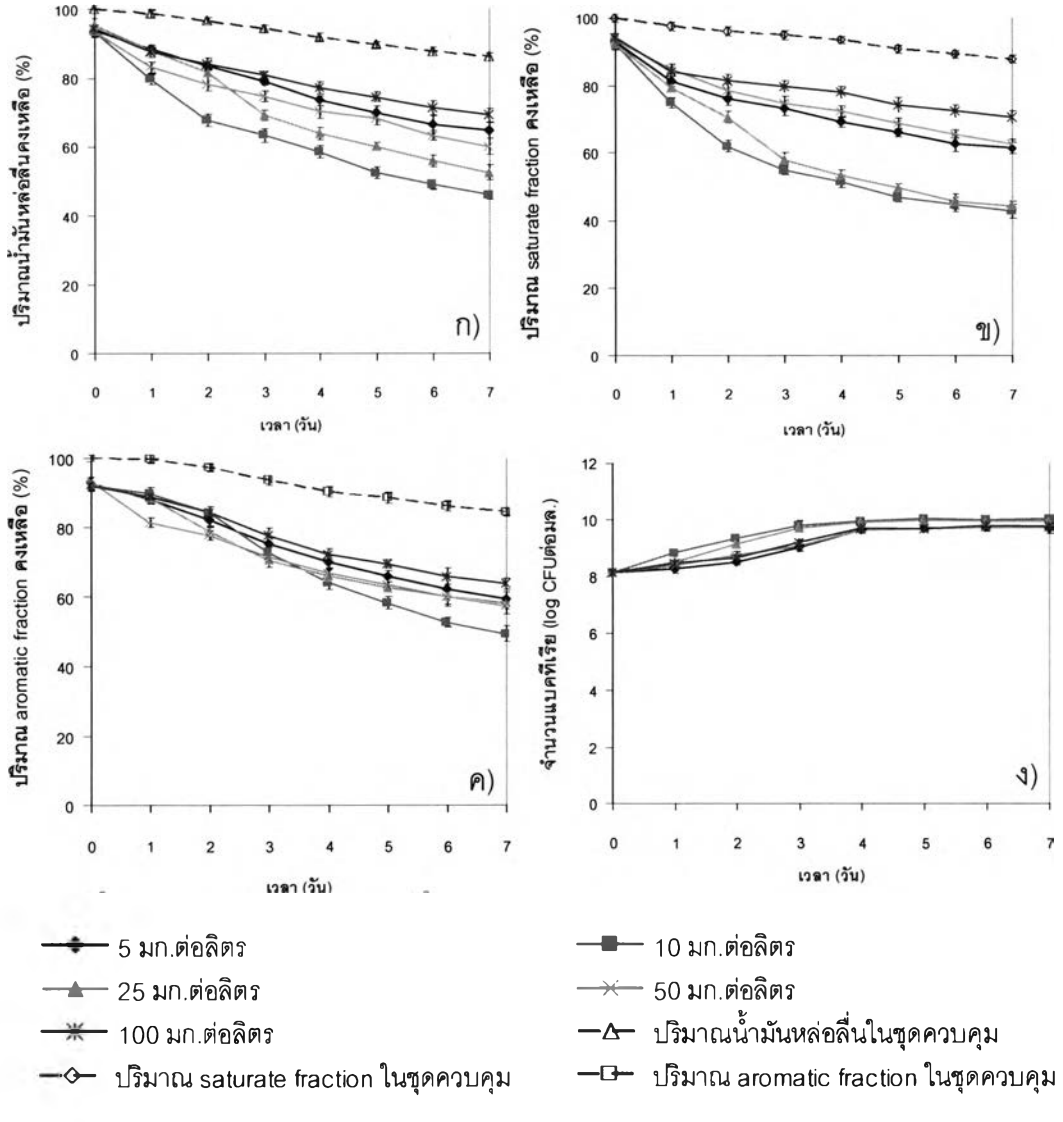


รูปที่ 4.8 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดย ก) แสดงปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ ข) แสดงปริมาณส่วนแซททูเรท ค) แสดงปริมาณส่วนอะโรมาติก ง) แสดงจำนวนแบคทีเรีย

การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่แปรผันปริมาณน้ำมันหล่อลื่นตั้งแต่ 50-300 มก.ต่อลิตร และมีอัตราส่วนปริมาณน้ำมัน : ไนโตรเจน :

ฟอสฟอรัส เป็น 100 : 5 : 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น คือ 8.85 log CFU ต่อมล. พบว่าปริมาณน้ำมัน 50 มก.ต่อลิตร กลุ่มแบคทีเรีย SL ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ดีที่สุด (รูป 4.8) เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ปริมาณน้ำมันหล่อลื่น ส่วนแซททูเรท และส่วนอะโรมาติกเหลือ 44 49 และ 41% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมของไฮโดรคาร์บอนทั้งสามส่วนเหลือประมาณ 86% จึงเลือกปริมาณน้ำมันเริ่มต้นที่ 50 มก.ต่อลิตร เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

4.5.2 การหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย

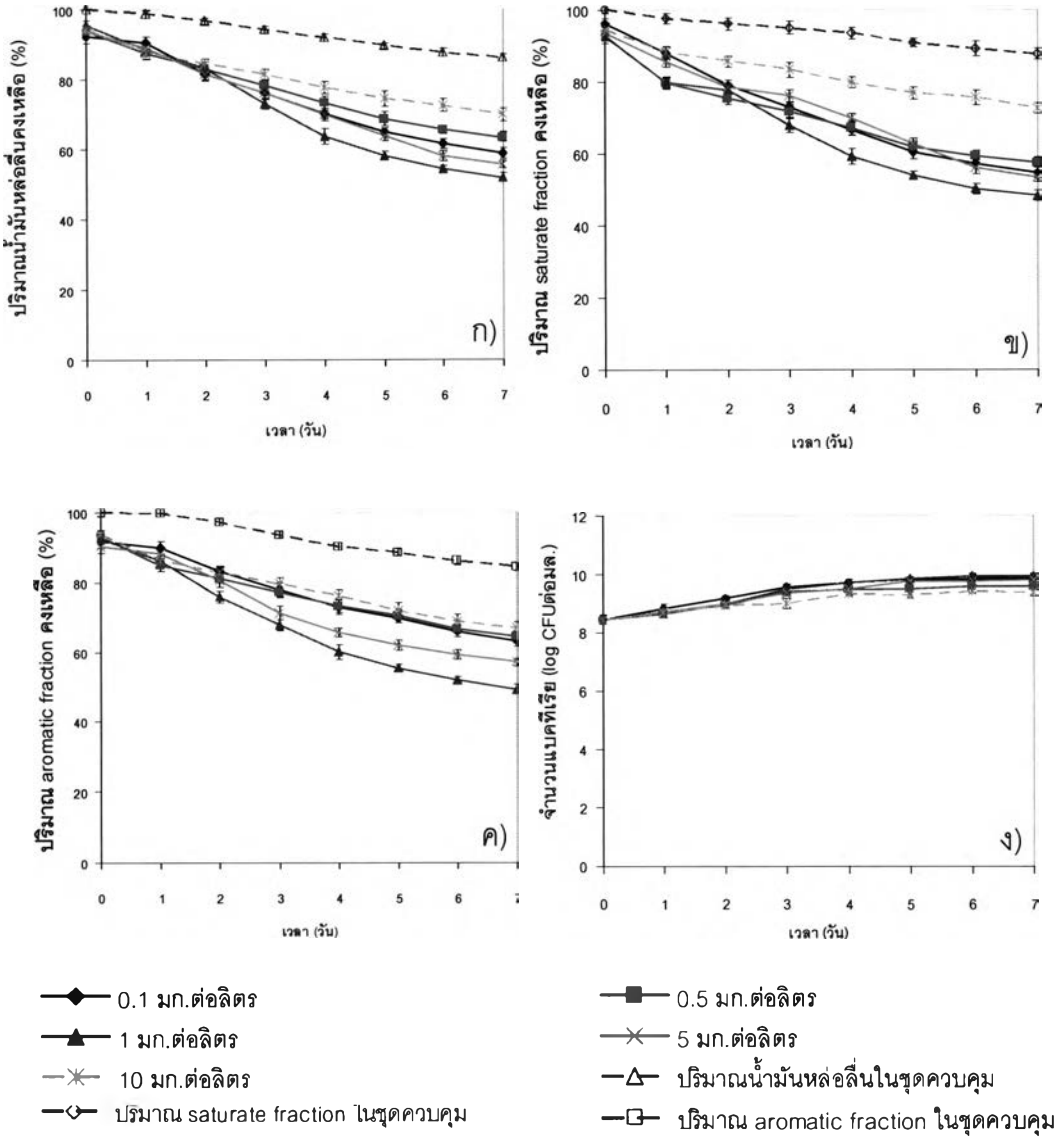


รูปที่ 4.9 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเมื่อใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่แตกต่างกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดย ก) แสดงปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ ข) แสดงปริมาณส่วนแซททูเรท ค) แสดงปริมาณส่วนอะโรมาติก ง) แสดงจำนวนแบคทีเรีย

รูปที่ 4.9 แสดงการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ที่แปรผันปริมาณไนโตรเจนตั้งแต่ 5-100 มก.ต่อลิตร มีอัตราส่วนไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส เป็น 5 : 1 โดยมีปริมาณน้ำมันคงที่ 50 มก.ต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8.15 log CFU ต่อมล.พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ชุดควบคุมมีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นส่วนแซททูเรท และอะโรมาติกเหลือประมาณ 86% และที่ปริมาณไนโตรเจน 10 มก.ต่อลิตร กลุ่มแบคทีเรีย SL ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ดีที่สุด โดยปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 46% ในขณะที่ส่วนแซททูเรท และส่วนอะโรมาติกเหลือ 43 และ 49% ตามลำดับ จึงเลือกปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นที่ 10 มก.ต่อลิตร เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

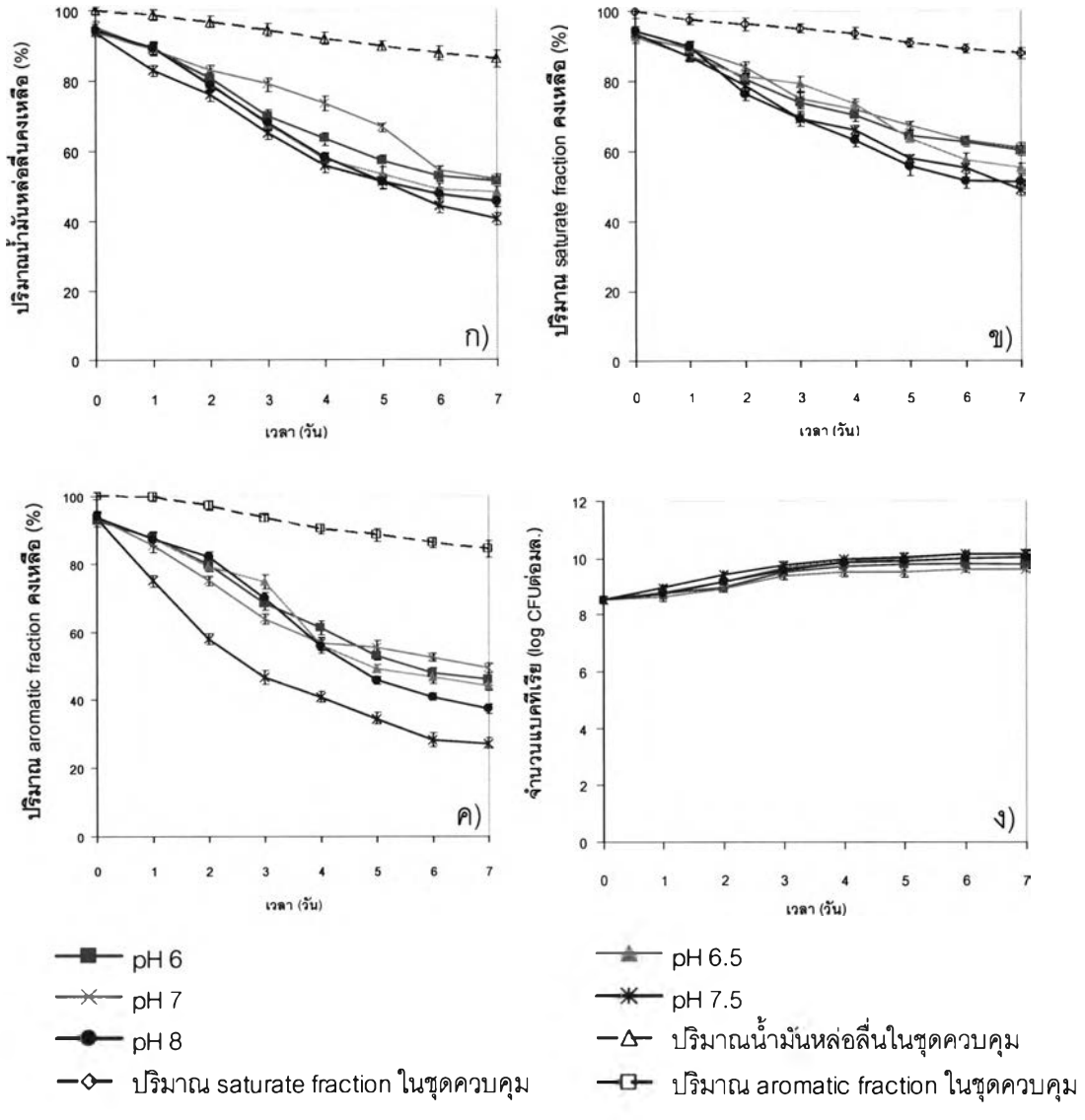
4.5.2 การหาปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย

จากการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่แปรผันปริมาณฟอสฟอรัสตั้งแต่ 0.1-10 มก.ต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8.46 log CFU ต่อมล. ในวันที่ 7 พบว่าชุดควบคุมมีปริมาณน้ำมันหล่อลื่น ส่วนแซททูเรท และอะโรมาติกเหลือประมาณ 87% ในขณะที่ปริมาณฟอสฟอรัส 1 มก.ต่อลิตร ส่งผลให้กลุ่มแบคทีเรีย SL ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ดีที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.10 โดยมีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 52% ในขณะที่ส่วนแซททูเรท และส่วนอะโรมาติกเหลือ 48 และ 49% ตามลำดับ จึงเลือกปริมาณปริมาณฟอสฟอรัสเริ่มต้นที่ 1 มก.ต่อลิตร เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.10 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเมื่อใช้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดย ก) แสดงปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ ข) แสดงปริมาณส่วนแซททูเรท ค) แสดงปริมาณส่วนอะโรมาติก ง) แสดงจำนวนแบคทีเรีย

4.5.4 การหาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย

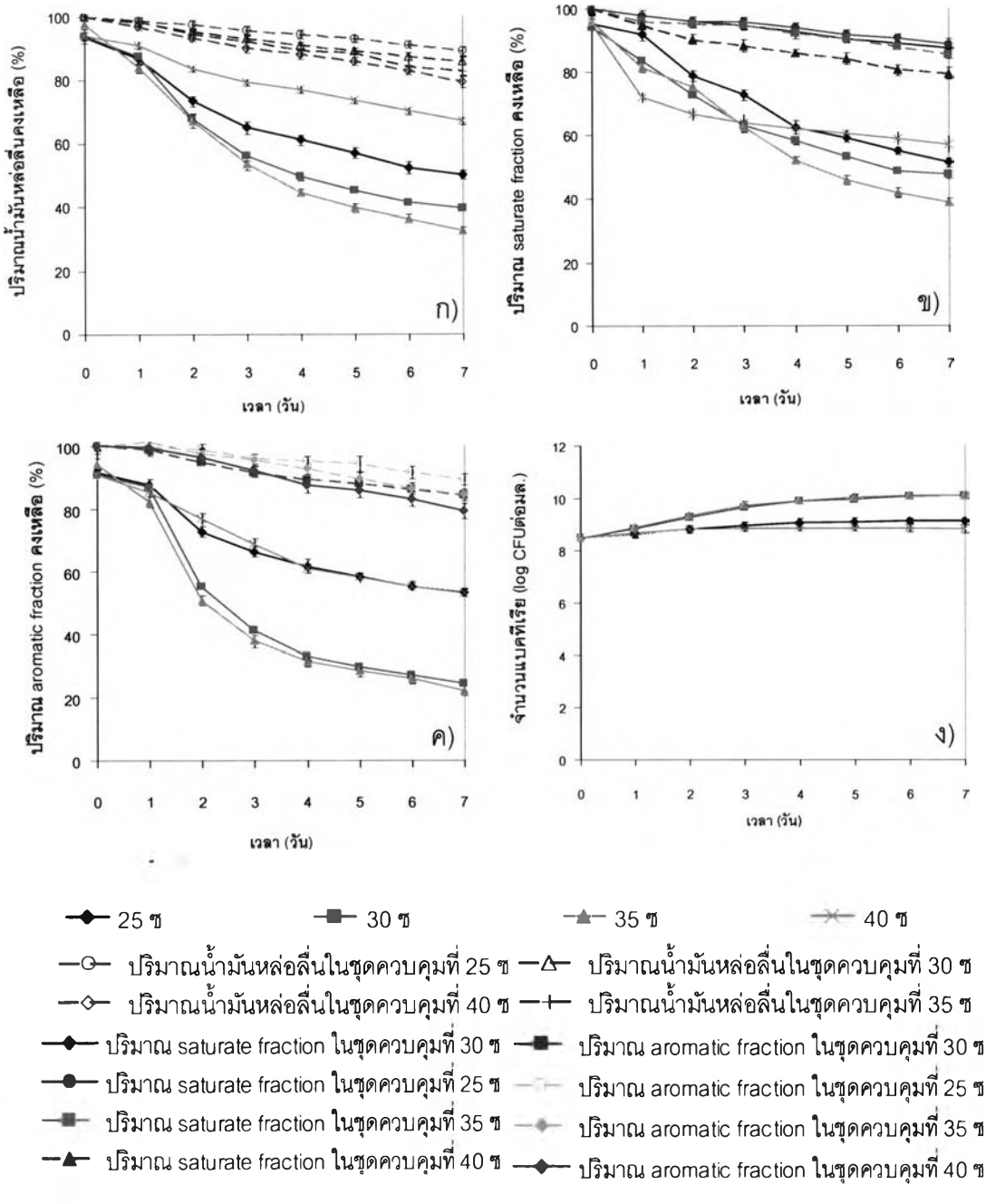


รูปที่ 4.11 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดย ก) แสดงปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ ข) แสดงปริมาณส่วนแซททูเรท ค) แสดงปริมาณส่วนอะโรมาติก ง) แสดงจำนวนแบคทีเรีย

รูปที่ 4.11 แสดงการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 6-8 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8.53 log CFU ต่อ มล.พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ชุดควบคุมมีปริมาณน้ำมันหล่อลื่น ส่วนแซททูเรท และอะโรมาติกเหลือประมาณ 86% และที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 กลุ่มแบคทีเรีย SL ย่อยสลาย

น้ำมันหล่อลื่นได้ดีที่สุด โดยปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 40% ในขณะที่ส่วนแซททูเรท และอะโรมาติกเหลือ 48 และ 27% ตามลำดับ จึงเลือกความเป็นกรด-ด่างที่ 7.5 เพื่อใช้ทดลองต่อไป

4.5.5 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย



รูปที่ 4.12 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่อุณหภูมิแตกต่างกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์ ก) แสดงปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ ข) แสดงปริมาณส่วนแซททูเรท ค) แสดงปริมาณส่วนอะโรมาติก ง) แสดงจำนวนแบคทีเรีย

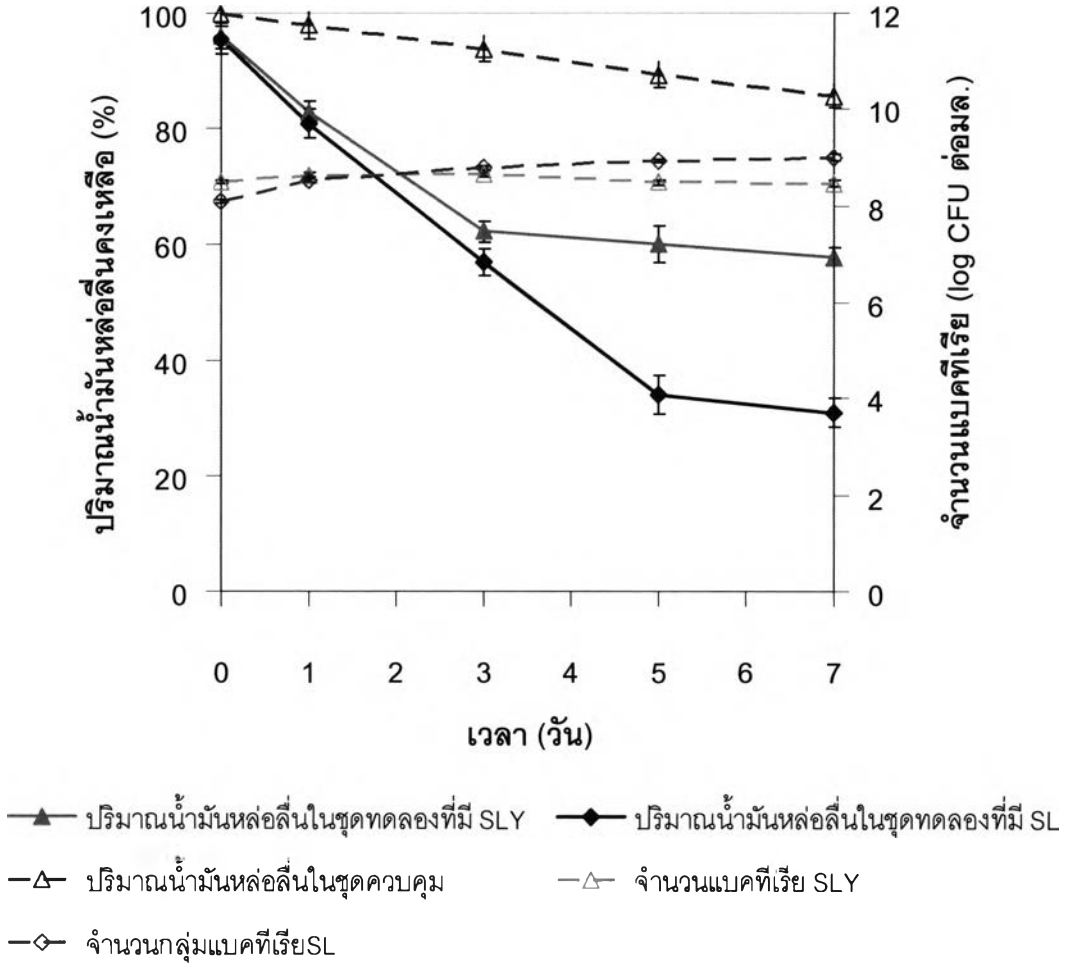
จากการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่แปรผันอุณหภูมิตั้งแต่ 25-40 °ซ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8.49 log CFU ต่อมล. ในวันที่ 7 พบว่าชุดควบคุมที่ 25 30 35 และ 40 °ซ มีปริมาณน้ำมันหล่อลื่น ส่วนแซททูเรท และอะโรมาติกเหลือประมาณ 89 87 84 และ 79% ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 35 °ซ กลุ่มแบคทีเรีย SL ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ดีที่สุด (รูป 4.12) มีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 33% ในขณะที่ส่วนแซททูเรทและส่วนอะโรมาติกเหลือ 39 และ 22% ตามลำดับ

4.6 การหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรียในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน

4.6.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรียกับแบคทีเรีย SLY ในน้ำเสียสังเคราะห์

จากการทดลองในข้อ 4.4 เห็นได้ว่ารูปแบบการเจริญเติบโต และการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL และแบคทีเรีย SLY ในน้ำเสียสังเคราะห์ มีความคล้ายคลึงกัน จึงตั้งข้อสังเกตว่า แท้จริงแล้วการย่อยสลายน้ำมันที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลมาจากความสามารถของแบคทีเรีย SLY เพียงชนิดเดียว จึงเปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นในน้ำเสียสังเคราะห์ระหว่างกลุ่มแบคทีเรีย SL กับ แบคทีเรีย SLY โดยปรับภาวะแวดล้อมตามค่าที่ได้จากการผลทดลองในข้อ 4.5 คือ ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นเริ่มต้น 50 มก.ต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น 10 มก.ต่อลิตร ปริมาณฟอสฟอรัสเริ่มต้น 1 มก.ต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 และอุณหภูมิ 35 °ซ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.13

พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SL สามารถลดปริมาณน้ำมันหล่อลื่นได้ดีกว่าการมีแบคทีเรีย SLY เพียงชนิดเดียวในระบบ เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือจากการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย SL และแบคทีเรีย SLY เป็น 31 และ 58% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 86%

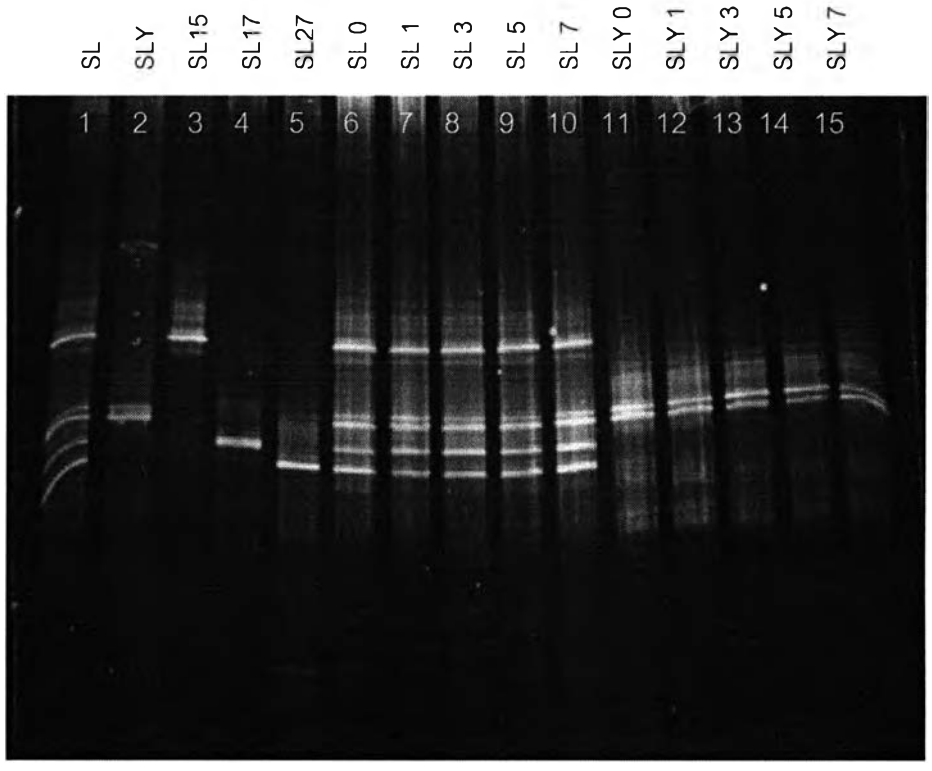


รูปที่ 4.13 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL กับแบคทีเรีย SLY ในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่มีการปรับภาวะแวดล้อมแล้ว

นอกจากนี้ ได้ติดตามพลวัตรประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย SL และแบคทีเรีย SLY ของทั้ง 2 ชุดการทดลอง ในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 ด้วยวิธี DGGE (รูป 4.14) ในพอลิอะคริลาไมด์เจล ที่มี 20-70% denaturant โดยมีการปรับความปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบให้เท่ากันก่อนนำไปเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แถบดีเอ็นเอในช่องวิ่งที่ 1 2 3 4 และ 5 เป็นชุดควบคุม ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย SL แบคทีเรีย SLY SL15 SL17 และ SL27 ตามลำดับ ส่วนช่องวิ่งที่ 6-10 เป็นแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 ตามลำดับ ช่องวิ่งที่ 11-15 เป็นแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย SLY ในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.14 เห็นได้ว่า แถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดในกลุ่ม และแบคทีเรีย SLY ปรากฏตลอดทั้ง 7 วันของการทดลอง เมื่อพิจารณาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย SL บนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่แบคทีเรีย SLY พบว่ามีจำนวน

ค่อนข้างคงที่ ซึ่งต่างจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ในข้อ 4.4 ที่ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่รูปแบบการเจริญของแบคทีเรีย SLY มีแนวโน้มตามกลุ่มแบคทีเรีย อาจเป็นไปได้ว่า ภาวะแวดล้อมที่ปรับให้เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย ช่วยให้ประชากรในกลุ่มเจริญได้ดี แต่ภาวะนี้อาจไม่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย SLY เมื่อมีอยู่เพียงชนิดเดียว



รูปที่ 4.14 DGGE analysis ของ 16S rDNA แสดงพลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์เปรียบเทียบกับ แบคทีเรีย SLY ในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20-70% denaturant

ช่องวิ่งที่ 1 เป็นแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย SL

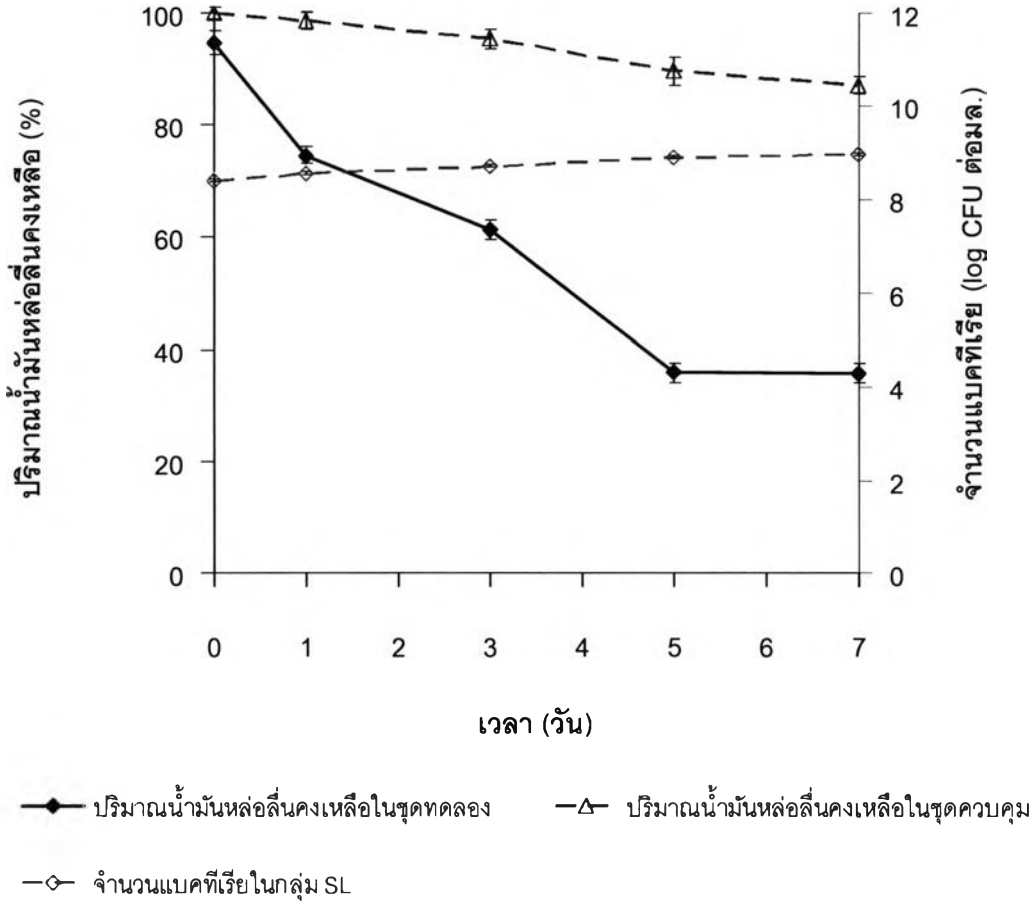
ช่องวิ่งที่ 2-5 เป็นแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย SLY SL15 SL17 และ SL27 ตามลำดับ

ช่องวิ่งที่ 6-10 เป็นแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 ตามลำดับ

ช่องวิ่งที่ 11-15 เป็นแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย SLY ในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 ตามลำดับ

4.6.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรียในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน

เมื่อจะทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน ได้ทดลองด้วยว่าสารในน้ำเสียจากสถานีบริการน้ำมันอาจมีผลต่อการเจริญ และการย่อยสลายน้ำมันของกลุ่มแบคทีเรีย SL โดยนำน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันไปฆ่าเชื้อ และเติมกลุ่มแบคทีเรีย SL ลงไป พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SL สามารถเจริญและย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ดี ดังแสดงในรูป 4.15 โดยกลุ่มแบคทีเรีย SL สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเหลือ 36% ในวันที่ 7 ของการทดลอง และมีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเล็กน้อย ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 85%



รูปที่ 4.15 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียจากสถานีบริการน้ำมันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

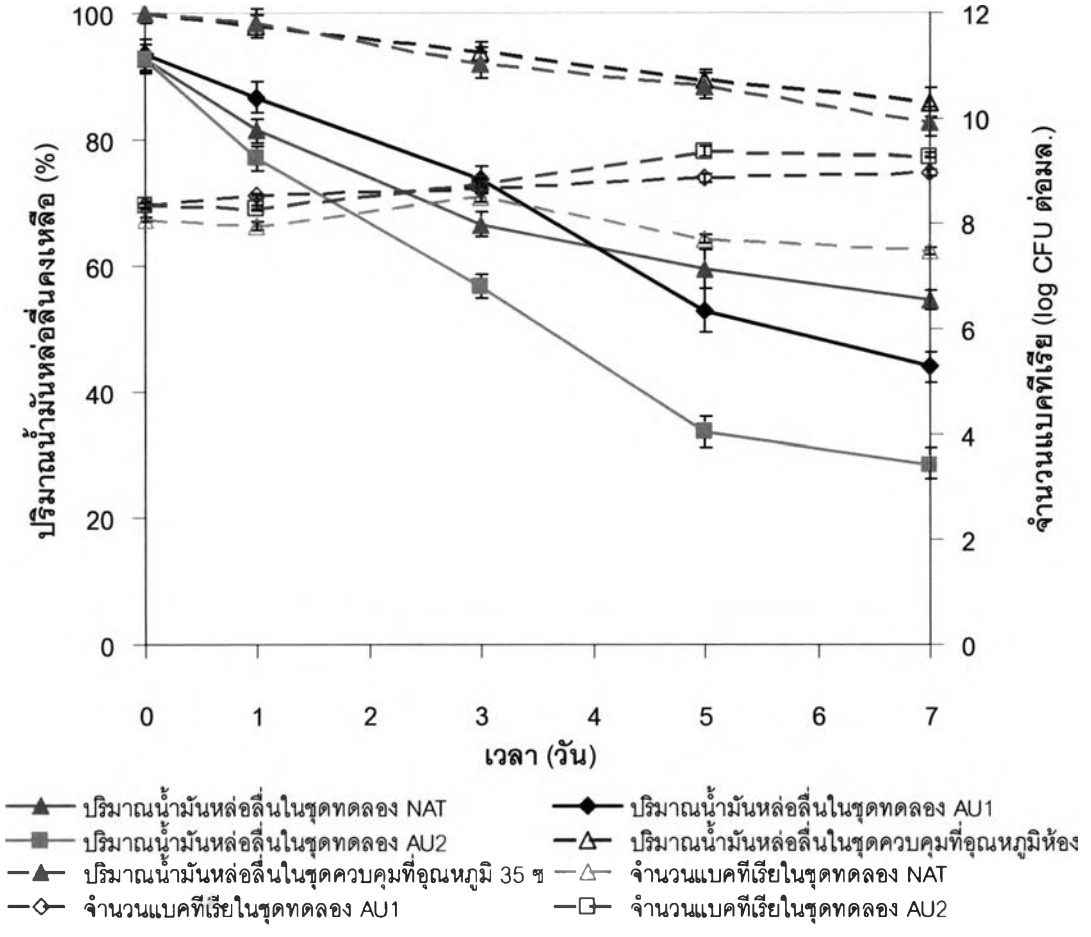
จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรียในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน ซึ่งน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้จากสถานีบริการน้ำมันปตท. สถานีสนามเป้า วิเคราะห์ค่าปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดได้เท่ากับ 6.5 3.4 และ 0.49 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.46 นำค่าที่วิเคราะห์ได้มาปรับให้เท่ากับค่าที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 4.5 คือ ให้ปริมาณน้ำมันเริ่มต้นเป็น 50 มก.ต่อลิตร สำหรับทุกชุดการทดลอง และปรับปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น 10 มก.ต่อลิตร ปริมาณฟอสฟอรัสเริ่มต้น 1 มก.ต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 และอุณหภูมิ 35 °ซ สำหรับชุดการทดลองที่ 4 โดยแบ่งชุดการทดลองเป็นดังนี้

1) ชุดควบคุม เพื่อดูการลดลงจากปัจจัยทางกายภาพ
2) Natural attenuation เพื่อดูการย่อยสลายที่เกิดจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำเสีย
3) Bioaugmentation 1 เติมกลุ่มแบคทีเรีย SL
4) Bioaugmentation 2 เติมกลุ่มแบคทีเรีย SL และปรับภาวะแวดล้อมให้เหมาะสม

และเพื่อความสะดวกจึงขอเรียกชื่อชุดการทดลองใหม่ ดังนี้

NAT แทนชุด Natural attenuation
AU1 แทนชุด Bioaugmentation 1
AU2 แทนชุด Bioaugmentation 2

ในวันที่ 7 พบว่า ชุดควบคุมที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 35 °ซ มีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือ 85 และ 83% ตามลำดับ การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเกิดได้ดีที่สุดที่ชุดการทดลอง AU2 โดยน้ำมันหล่อลื่นมีปริมาณคงเหลือ 29% ถัดมาเป็น AU1 และ NAT ซึ่งปริมาณน้ำมันคงเหลือเป็น 44 และ 55% ตามลำดับ สอดคล้องกับจำนวนของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่จำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลอง AU2 เพิ่มเป็น 9.29 log CFU ต่อมล. ในวันที่ 7 จากเริ่มต้น 8.36 log CFU ต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 4.16

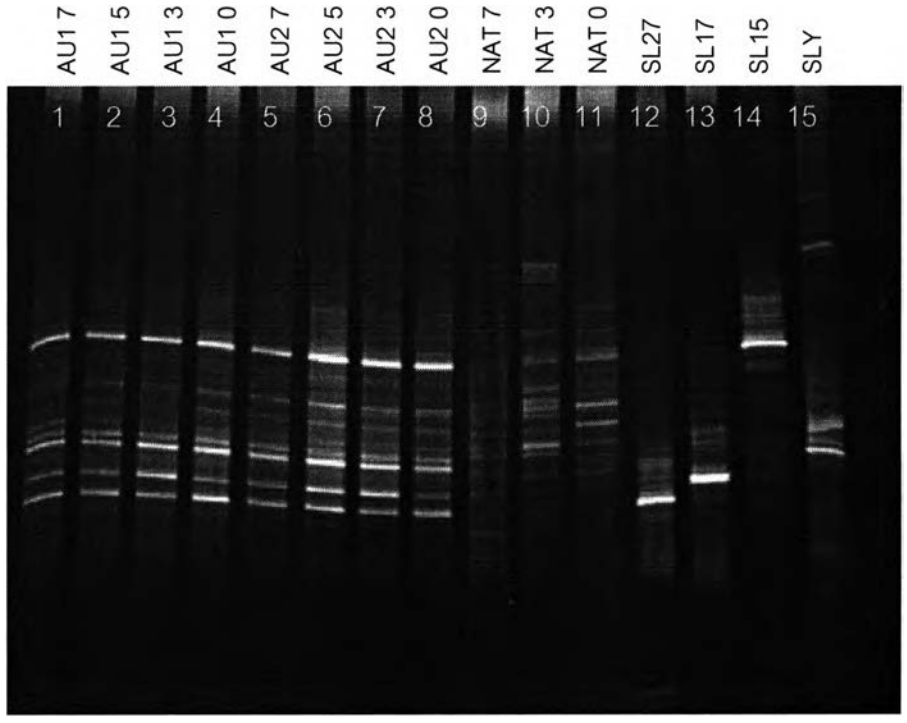


รูปที่ 4.16 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

เมื่อติดตามพลวัตรประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย SL ทั้ง 3 ชุดการทดลอง ในวันที่ 0 3 5 และ 7 ด้วยวิธี DGGE (รูป 4.17) ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20-70% denaturant โดยมีการปรับความปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบให้เท่ากันก่อนนำไปเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ผลการทดลองเป็นดังนี้ แถบดีเอ็นเอในช่องวิ่งที่ 1-4 เป็นแถบดีเอ็นเอของชุดทดลอง AU1 ในวันที่ 7 5 3 และ 0 ตามลำดับ ช่องวิ่งที่ 5-8 เป็นแถบดีเอ็นเอของชุดทดลอง AU2 ในวันที่ 7 5 3 และ 0 ตามลำดับ ส่วนช่องวิ่งที่ 9 10 และ 11 เป็นแถบดีเอ็นเอของชุดทดลอง NAT ในวันที่ 7 3 และ 0 ตามลำดับ ช่องวิ่งที่ 12 13 14 และ 15 เป็นชุดควบคุม ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย SL27 SL17 SL15 และ SLY ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.17 เห็นได้ว่า แบคทีเรียประจำถิ่นในน้ำเสียจากสถานีบริการน้ำมันมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาที่ทดลอง สังเกตได้จากแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียในชุดทดลอง NAT มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบพลวัตรประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในชุดทดลอง AU1 และ AU2 จะเห็นได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย SL สามารถเจริญได้ในน้ำเสียจริงตลอดช่วงเวลาของการทดลอง

ทั้ง 2 ชุด และมีความโดดเด่นมากกว่าแบคทีเรียประจำถิ่น ในชุดทดลอง AU2 การเปลี่ยนแปลงของแถบดีเอ็นเอมีมากกว่า AU1 สอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ชุดทดลอง AU2 มีจำนวนมากกว่า เมื่อพิจารณาร่วมกับปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือในชุดการทดลองทั้งสอง จึงอาจอนุมานได้ว่า การปรับภาวะแวดล้อมส่งผลดีต่อการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL



รูปที่ 4.17 DGGE analysis ของ 16S rDNA แสดงพลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน ที่เวลาต่างๆ ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20-70% denaturant

ช่องวิ่งที่ 1-4 เป็นแถบดีเอ็นเอของชุดทดลอง AU1 ในวันที่ 7 5 3 และ 0 ตามลำดับ

ช่องวิ่งที่ 5-8 เป็นแถบดีเอ็นเอของชุดทดลอง AU2 ในวันที่ 7 5 3 และ 0 ตามลำดับ

ช่องวิ่งที่ 9-11 เป็นแถบดีเอ็นเอของชุดทดลอง NAT ในวันที่ 7 3 และ 0 ตามลำดับ

ช่องวิ่งที่ 12-15 เป็นแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย SL27 SL17 SL15 และ SLY ตามลำดับ