

การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวาเพื่อการบำบัดทางชีวภาพของน้ำปนเปื้อนดีเซล

นางสาวสุธาสินี จิตติมณี



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMMOBILIZATION OF BACTERIAL CONSORTIUM ON WATER HYACINTH ROOTS FOR  
BIOREMEDIATION OF DIESEL CONTAMINATED WATER

Miss Suthasinee Jittimane



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวาเพื่อการบำบัดทางชีวภาพของน้ำปนเปื้อนดีเซล
โดย	นางสาวสุธาสินี จิตติมณี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. อัญชญา พัฒนสุพงษ์

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติลี สิริศรัทธา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. อัญชญา พัฒนสุพงษ์)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนีย์วัน)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร. วรณวิมล ภัทรสิริวงศ์)

สุธาสนี จิตติมณี : การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวาเพื่อการบำบัดทางชีวภาพของน้ำปนเปื้อนดีเซล (IMMOBILIZATION OF BACTERIAL CONSORTIUM ON WATER HYACINTH ROOTS FOR BIOREMEDIATION OF DIESEL CONTAMINATED WATER) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. อัญชญา พัฒนสุพงษ์, 170 หน้า.

กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่คัดแยกได้จากรากผักตบชวาไทย สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลวได้หมดภายในเวลา 7 วัน ประกอบด้วยแบคทีเรียเดี่ยวอย่างน้อย 3 ชนิด ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปฏิกริยาชีวเคมี และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA แสดงว่าแบคทีเรียดังกล่าว คือ *Pseudomonas aeruginosa* S4A, *Stenotrophomonas maltophilia* S4B และ *Ochrobactrum intermedium* S4C กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างไม่จำกัดไม่ปลอดภัยได้สูงสุด  $75.18 \pm 5.1\%$  *P. aeruginosa* S4A สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้  $63.30 \pm 1.97\%$  ใน 14 วัน แต่ *S. maltophilia* S4B และ *O. intermedium* S4C ไม่สามารถใช้ดีเซลเพื่อการเจริญได้ เมื่อตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บน PUF จะย่อยสลายดีเซลได้ถึง  $98.19 \pm 0.51\%$  ในเวลา 3 วัน ก่อนการตรึงเซลล์ ลดจำนวนแบคทีเรียที่รากผักตบชวาโดยการแช่รากผักตบชวาใน 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับการใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงนาน 20 นาทีจะลดแบคทีเรียได้ 53.81% ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวาโดยการแช่ไว้ในสารละลายแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง จะมีแบคทีเรีย  $10.32 \pm 0.15 \log \text{CFU/กรัม}$  ราก การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และการวิเคราะห์ 16S rDNA PCR-DGGE แสดงให้เห็นว่ามีกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่รากหลังการตรึง เมื่อใช้ผักตบชวาที่มีแบคทีเรียตรึงเพื่อลดปริมาณดีเซลในน้ำไม่ปลอดภัยจากแม่น้ำเจ้าพระยา พบว่าสามารถลดจำนวนดีเซลได้สูงสุด  $81.11 \pm 0.91\%$  ในเวลา 7 วัน ในขณะที่การใช้ผักตบชวาระบบธรรมชาติและกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อิสระ จะลดดีเซลได้เพียง  $33.99 \pm 4.41\%$  และ  $31.48 \pm 8.1\%$  ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ( $31.39 \pm 8.58\%$ ) จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสามารถตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวาได้ และการใช้พืชร่วมกับกลุ่มแบคทีเรียจะช่วยลดปริมาณดีเซลในน้ำจืดได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียอิสระหรือพืชเพียงอย่างเดียว

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5373936123 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEYWORDS: BACTERIAL CONSORTIUM/ BIOREMEDIATION / DIESEL / WATER HYACINTH/  
IMMOBILIZATION/ FRESH WATER

SUTHASINEE JITTIMANEE: IMMOBILIZATION OF BACTERIAL CONSORTIUM ON WATER  
HYACINTH ROOTS FOR BIOREMEDIATION OF DIESEL CONTAMINATED WATER.  
ADVISOR: ASST. PROF. DR.RER.NAT, KOBCHAI PATTARAGULWANIT, CO-ADVISOR:  
PH.D. ANCHANA PATTANASUPONG, 170 pp.

Bacterial consortium SJ42 isolated from morning glory root could completely degrade 1% diesel in liquid medium within 7 days. SJ42 composed of at least 3 pure bacterial isolates. Morphological characteristics, biochemical reaction and 16S rDNA nucleotide sequence analyses revealed that those strains are *Pseudomonas aeruginosa* S4A, *Stenotrophomonas maltophilia* S4B and *Ochrobactrum intermedium* S4C. *P. aeruginosa* S4A could degrade  $63.30 \pm 1.97\%$  of diesel within 14 days whereas *S. maltophilia* S4B and *O. intermedium* S4C could not utilize diesel as sole carbon source for growth. Before cell immobilization, indigenous microorganisms on water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) roots were decontaminated by immersion roots into 2% sodium hypochlorite solution together with sonication for 20 min which could reduce 53.81% of root bacteria. SJ42 was immobilized on water hyacinth roots by immersion in bacteria solution for 24 hours. After immobilization, the bacterial cells were as high as  $10.32 \pm 0.15$  log CFU/gram root. Scanning electron micrograph (SEM) as well as 16S rDNA PCR-DGGE analyzes showed that SJ42 attached on water hyacinth roots. Water hyacinth with immobilized SJ42 could reduce 1% diesel in Chao Phraya freshwater samples to the highest of  $81.11 \pm 0.91\%$  within 7 days whereas natural water hyacinth and planktonic SJ42 could remove only  $33.99 \pm 4.41\%$  and  $31.48 \pm 8.1\%$ , respectively which was not significantly different from control experiment ( $31.39 \pm 8.58\%$ ) This research proposed a successful method to immobilize a bacterial consortium SJ42 onto water hyacinth roots and plant root-bacterial association enhanced the diesel removal better than the utilization of planktonic bacteria or plant alone.

Department: Microbiology

Field of Study: Microbiology

Academic Year: 2016

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.อัญชญา พัฒนสุพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างสูง จนงานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี ทั้งตรวจทาน แก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ สนับสนุนทางด้านวิชาการ ด้านจิตใจ และการดำเนินชีวิต ให้ข้าพเจ้ามีประสบการณ์และมุมมองความคิดการวิเคราะห์และแก้ไขปัญหา ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวิมล ลือพร้อมชัย รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนนิวัฒน์ และ ดร. วรณวิมล ภัทรสิริวงศ์ ในความกรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ผู้ดูแลทุนการศึกษา รวมถึงอาจารย์ผู้ประสานงานทุนการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในความกรุณาอำนวยความสะดวก แนะนำ ช่วยเหลือด้านวิชาการ และด้านจิตใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณทุนการศึกษาและวิจัยจากสำนักงานการอุดมศึกษา ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย รุ่นเพิ่มเติม ปีการศึกษา 2551 และทุนอุดหนุนการทำวิจัย ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ครั้งที่ 25 3/2557 ที่สนับสนุนเงินเพื่อการศึกษาและวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาอื่นๆ ที่ให้การช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ นายสุรพล และนางสุพร จิตติมณี ผู้เป็นบิดามารดา นางสาวจุฑารัตน์ และนางสาวสุภัทตรา จิตติมณี พี่สาวของข้าพเจ้า ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ .....	ฐ
สารบัญตาราง.....	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ปรีทศน์วรรณกรรม.....	7
2.1 ดีเซล และอันตรายของดีเซล.....	7
2.2 สถานการณ์การปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อม .....	9
2.3 การบำบัดดีเซลปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม.....	10
2.3.1 การบำบัดดีเซลทางกายภาพ.....	10
2.3.2 การบำบัดดีเซลทางเคมี.....	11
2.3.3 การบำบัดดีเซลทางชีวภาพ .....	13
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ.....	18
2.5 การตรึงจุลินทรีย์.....	19
2.6 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียตรึงเพื่อการบำบัดน้ำมันทางชีวภาพรวมถึงดีเซล .....	21
2.7 การบำบัดสารมลพิษโดยพืช .....	23
2.7.1 การดูดซับและสะสมสารมลพิษโดยพืช.....	23
2.7.2 การย่อยสลายสารมลพิษโดยพืช.....	25
2.7.3 การบำบัดสารมลพิษโดยแบคทีเรียร่วมกับพืช .....	25
2.8 ผักตบชวา .....	29

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	30
อุปกรณ์.....	30
เคมีภัณฑ์.....	32
แผนผังงานวิจัย.....	36
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	37
3.1 คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลจากรากพืชขึ้นน้ำ.....	37
3.1.1 การเก็บตัวอย่างพืช.....	37
3.1.2 การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย.....	37
3.2 ความสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลของกลุ่มแบคทีเรีย.....	37
3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย.....	37
3.2.2 การคัดกรองกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM.....	38
3.2.3 ความสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว CFMM.....	38
3.2.4 ความสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในอาหารเหลว Hoagland's.....	38
3.3 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42.....	38
3.3.1 ตัวอย่างน้ำจืด.....	38
3.3.2 การย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดโดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือก.....	39
3.4 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียเดี่ยวจากกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	39
3.4.1 การคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยว.....	39
3.4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียเดี่ยวที่คัดแยกได้.....	39
3.5 ลักษณะสมบัติของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรียเดี่ยว.....	40
3.5.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	40



3.5.2	ความสามารถในการผลิตไบโอฟิล์ม (ดัดแปลงจาก Tribelli และคณะ, 2012) .....	40
3.5.3	ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ....	41
3.5.4	ความสามารถของแบคทีเรียเดี่ยวในการย่อยสลาย 1% ดีเซล .....	41
3.6	การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนพอลิยูรีเทนโฟม .....	41
3.6.1	การเตรียมวัสดุตรึง.....	41
3.6.2	การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพื่อใช้ตรึงบน PUF .....	42
3.6.3	การนับจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่ถูกตรึงบน PUF .....	42
3.6.4	ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียตรึงบน PUF ในการย่อยสลาย 1% ดีเซล.....	42
3.7	การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา .....	42
3.7.1	การเตรียมผักตบชวา .....	42
3.7.2	การลดจำนวนแบคทีเรียที่รากผักตบชวา.....	43
3.7.2.1	การลดจำนวนแบคทีเรียโดยวิธีการแช่ในสารเคมี (ดัดแปลงจาก Daud และคณะ, 2012) .....	43
3.7.2.2	การลดจำนวนแบคทีเรียโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Kirzhner และคณะ, 2009) .....	43
3.7.2.3	การลดจำนวนแบคทีเรียโดยวิธีการแช่ในสารเคมีร่วมกับการใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง.....	44
3.7.3	การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา.....	44
3.7.4	การนับจำนวนแบคทีเรียบนรากผักตบชวา.....	45
3.7.5	ตรวจสอบการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) .....	45
3.8	การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวา.....	46
3.8.1	การย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's.....	46
3.8.2	การย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืด.....	46

3.9 การแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวา .....	47
3.9.1 การเตรียมผักตบชวาตามวิธีในข้อ 3.7.3 .....	47
3.9.2 การแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จากต้นผักตบชวาต้นแม่สู่ต้นผักตบชวา อื่น.....	47
3.10 การนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count .....	48
3.11 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณดีเซล .....	48
3.11.1 การสกัดดีเซลในอาหารเหลวและตัวอย่างน้ำจืดปริมาตร 5 มล. ....	48
3.11.2 การสกัดดีเซลจากอาหารเหลวและตัวอย่างน้ำจืดจำนวนมาก .....	48
3.11.3 การสกัดดีเซลจากรากพืช .....	49
3.11.4 การวิเคราะห์ปริมาณดีเซลโดยเครื่องวิเคราะห์แก๊สโครมาโตกราฟี .....	49
3.12 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรในกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE ...	50
3.12.1 การสกัดดีเอ็นเอ .....	50
3.12.1.1 การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียจากอาหารเหลว.....	50
3.12.1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากรากผักตบชวา .....	50
3.12.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอ.....	51
3.12.3 การเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNAของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยวิธี ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Iwamoto และคณะ, 2000).....	51
3.12.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR.....	52
3.12.5 การตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	52
3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....	54
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	55
ตอนที่ 1 คัดแยก พิสูจน์เอกลักษณ์ และศึกษาลักษณะสมบัติต่างๆของกลุ่มแบคทีเรียย่อย สลายดีเซลจากรากพืชน้ำจืด .....	55

4.1 การคัดแยกและคัดเลือกรุ่นแบบคที่เรียที่สามารถย่อยสลายดีเซล .....	55
ก. การคัดแยกกลุ่มแบบคที่เรียจากรากพืชน้ำจืด .....	55
ข. การคัดกรองกลุ่มแบบคที่เรียที่สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM.....	56
4.2 ความสามารถในการย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบบคที่เรียที่คัดเลือก .....	56
ก. การย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว CFMM โดยกลุ่มแบบคที่เรีย SJ42 และ SJ51 ที่ คัดเลือก .....	56
ข. การคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์แบบคที่เรียเดี่ยวในกลุ่มแบบคที่เรีย SJ42 .....	57
ค. การศึกษาลักษณะสมบัติของกลุ่มแบบคที่เรีย SJ42 .....	63
ค.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ .....	63
ค.2. ความไม่ชอบน้ำของเซลล์แบบคที่เรีย.....	64
ค.3 การสร้างไบโอฟิล์ม.....	65
ค.4 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM ของ แบบคที่เรียเดี่ยว .....	66
ง. ความสามารถของกลุ่มแบบคที่เรีย SJ42 ในการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลว CFMM.....	69
ตอนที่ 2 ความสามารถของกลุ่มแบบคที่เรีย SJ42 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในน้ำจืด.....	72
4.3 ความสามารถของกลุ่มแบบคที่เรีย SJ42 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืด .....	72
ก. ตัวอย่างน้ำ .....	72
ข. ความสามารถของกลุ่มแบบคที่เรีย SJ42 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำ จืดไม่ปลอดเชื้อ .....	73
ค. ความสามารถในการย่อยสลาย1% ดีเซลของกลุ่มแบบคที่เรีย SJ42 ในตัวอย่างน้ำจืด ปลอดเชื้อ.....	83
4.4 การตรึงกลุ่มแบบคที่เรียบนพอลิยูรีเทนโฟม (PUF).....	91

ตอนที่ 3 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวาและการใช้กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึง เพื่อบำบัด 1% ดีเซลในอาหารเหลวและน้ำจืด.....	95
4.5 การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา.....	95
ก. ความสามารถในการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's โดยกลุ่ม แบคทีเรีย SJ42.....	95
ข. การลดจำนวนแบคทีเรียจากรากผักตบชวาโดยใช้สารเคมี.....	96
ค. การลดจำนวนแบคทีเรียจากรากผักตบชวาโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง.....	99
ง. การลดจำนวนแบคทีเรียจากรากผักตบชวาโดยใช้ 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับ เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง.....	100
จ. การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา.....	101
ฉ. การตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวา.....	102
ฉ.1 การตรวจสอบแบคทีเรียบนรากผักตบชวาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (SEM).....	102
ฉ.2 การตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ด้วยวิธี Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE).....	104
4.6 การย่อยสลาย 1% ดีเซล โดยกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนรากผักตบชวา.....	105
ก. การย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's.....	105
ก.1 การตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่ตรึงบนรากผักตบชวาก่อนและหลัง ใช้บำบัดดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's.....	110
ข. การย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวา.....	112
ข.1 การตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่ตรึงบนรากผักตบชวาก่อนและหลัง ใช้บำบัดดีเซลในตัวอย่างน้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดเชื้อ.....	119
4.7 การแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวาสู่ผักตบชวาอื่น.....	123
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	125

รายการอ้างอิง .....	130
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	152
ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี .....	154
ภาคผนวก ค ข้อมูลต่างๆในการทดลอง .....	157
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	170



## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1	โครงสร้างโมเลกุล PAHs ที่สำคัญ 16 ชนิด ในรายงานสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) (Labana และคณะ, 2007) ..... 8
รูปที่ 2.2	หลักการตรึงเซลล์ (Kisukuri และ Andrade, 2015)..... 20
รูปที่ 3.1	การทดลองการแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ระหว่างรากผักตบชวา..... 47
รูปที่ 4.1	ตัวอย่างผักบุ้ง (ก) ผักตบชวา (ข) และหญ้าน้ำ (ค) ที่เก็บเพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล ..... 55
รูปที่ 4.2	การย่อยสลาย 1% ดีเซล และจำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และ SJ51 ..... 57
รูปที่ 4.3	การวิเคราะห์ Phylogeneticของแบคทีเรียไอโซเลต S4A (ใช้โปรแกรม MEGA5 โดยวิธี Neighbor-Joining ตัวเลขที่กิ่งสาขาคือผลการนับซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap)..... 61
รูปที่ 4.4	การวิเคราะห์ Phylogeneticของแบคทีเรียไอโซเลต S4B (ใช้โปรแกรม MEGA5 โดยวิธี Neighbor-Joining ตัวเลขที่กิ่งสาขาคือผลการนับซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap)..... 62
รูปที่ 4.5	การวิเคราะห์ Phylogeneticของแบคทีเรียไอโซเลต S4C (ใช้โปรแกรม MEGA5 โดยวิธี Neighbor-Joining ตัวเลขที่กิ่งสาขาคือผลการนับซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap)..... 62
รูปที่ 4.6	ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรียเดี่ยวไอโซเลต S4A, S4B และ S4C..... 67
รูปที่ 4.7	GC โครมาโทแกรมของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรียเดี่ยวไอโซเลต S4A, S4B และ S4C ในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซล 14 วัน..... 68
รูปที่ 4.8	การย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในอาหารเหลว CFMM ..... 70

รูปที่ 4.9	ลักษณะคลองและตัวอย่างน้ำที่เก็บเพื่อใช้ทดสอบการย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 (ก. คลองแสนแสบ, ข. คลองสามเสน, ค. คลองลาดพร้าว, ง. คลองบางซื่อ, จ. คลองรังสิตประยูรศักดิ์ และ ฉ. แม่น้ำเจ้าพระยา).....	72
รูปที่ 4.10ก	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองแสนแสบไม่ปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	74
รูปที่ 4.10ข	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองสามเสนไม่ปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	75
รูปที่ 4.10ค	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองลาดพร้าวไม่ปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	76
รูปที่ 4.10ง	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองบางซื่อไม่ปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	77
รูปที่ 4.10จ	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ไม่ปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	78
รูปที่ 4.10ฉ	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากแม่น้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดเชื้อ หลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	79
รูปที่ 4.11ก	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองแสนแสบปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	83
รูปที่ 4.11ข	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองสามเสนปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	84

รูปที่ 4.12ค	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองลาดพร้าวปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	85
รูปที่ 4.11ง	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองบางซื่อปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	86
รูปที่ 4.11จ	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ปลอดเชื้อหลังการย่อยสลาย โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	87
รูปที่ 4.11ฉ	ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากแม่น้ำเจ้าพระยาปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน.....	88
รูปที่ 4.12	การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบน PUF เทียบกับกลุ่มแบคทีเรียอิสระในอาหารเหลว CFMM.....	93
รูปที่ 4.13	จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียตรึงบน PUF และกลุ่มแบคทีเรียอิสระในอาหารเหลว CFMM .....	94
รูปที่ 4.14	การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในอาหารเหลว Hoagland's..	96
รูปที่ 4.15	ลักษณะต้นผักตบชวาอายุ 3 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 50 % Hoagland's ในเรือนเพาะชำ .....	97
รูปที่ 4.16	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่รากผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียก่อนตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42.....	102
รูปที่ 4.17	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงแบคทีเรียที่รากผักตบชวา .....	103
รูปที่ 4.18	แถบดีเอ็นเอจาก PCR-DGGE (เกรเดียนต์ 30-70% ยูเรีย-ฟอร์มามาไมด์) ในการวิเคราะห์ 16S rDNAของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ไอโซเลต S4A ไอโซเลต S4B และไอโซเลต S4C (ก) และ แถบดีเอ็นเอจาก PCR-DGGE (เกรเดียนต์ 50-80% ยูเรีย-ฟอร์มามาไมด์) ในการวิเคราะห์ 16S rDNAของกลุ่มแบคทีเรียที่รากก่อนตรึง (N) รากหลังลดจำนวนด้วย NaClO ร่วมกับเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Na)	



	และรากหลังจากตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 1 วัน (D1) และ 3 วัน (D3) เทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 (ข).....	104
รูปที่ 4.19	ปริมาณดีเซลในตัวอย่างอาหารเหลว Hoagland's และที่รากผักตบชวา หลังการบำบัดด้วยวิธีต่างๆเป็นเวลา 7 วัน .....	106
รูปที่ 4.20	รูปแบบ DGGE ของ 16S rDNA ที่พบในรากผักตบชวาในระหว่างการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึง (30-70% ยูเรีย-ฟอร์มาไมด์ เกรเดียนท์).....	111
รูปที่ 4.21	การย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาไม่ปลดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวาที่เวลา 7 วัน .....	113
รูปที่ 4.22	รูปแบบ DGGE ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียบนรากผักตบชวาในระหว่างการย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำเจ้าพระยาโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึง (เกรเดียนต์ 50-80% ยูเรีย-ฟอร์มาไมด์).....	120
รูปที่ 4.23	การทดลองเพื่อทดสอบการแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42.....	123
รูปที่ 4.24	รูปแบบ 16S rDNA DGGE ของแบคทีเรียจากรากผักตบชวาในการทดลองแพร่กระจายกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในวันที่ 0 (ก.) และ วันที่ 7 (ข.).....	124
รูปที่ ค-1	กราฟมาตรฐานดีเซลที่ความเข้มข้น 0.16, 0.4, 1, 2.5 และ 6.25% เทียบเป็นหน่วย มก./ลิตร.....	167

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ปริมาณการใช้ดีเซลในประเทศไทย ปี 2550-2558 (สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน, 2559).....	8
ตารางที่ 2.2 รายชื่อสารเคมีจัดคราบน้ำมันบางส่วนที่อนุญาตให้ใช้ในประเทศไทยกรณีแก้ไขปัญหาน้ำมันรั่วไหล (กรมควบคุมมลพิษ, 2558).....	13
ตารางที่ 3.1 ไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย .....	35
ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี denaturant 30-80%.....	54
ตารางที่ 4.1 กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากพืชน้ำชนิดต่างๆจากต่างแหล่งที่มา .....	55
ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต S4A S4B และ S4C .	58
ตารางที่ 4.3 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต.....	59
ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียเดี่ยว.....	60
ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและความไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียเดี่ยว .....	66
ตารางที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในการทดลองตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนพอลิยูรีเทนโฟม (PUF) ในเวลาที่ต่างกัน .....	91
ตารางที่ 4.7 การใช้สารเคมีที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อลดจำนวนแบคทีเรียบนรากผักตบชวา.....	98
ตารางที่ 4.8 การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อลดจำนวนแบคทีเรียบนรากผักตบชวา.....	99
ตารางที่ 4.9 การใช้สารเคมีร่วมกับเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงเพื่อลดจำนวนแบคทีเรียบนรากผักตบชวา .....	100
ตารางที่ 4.10 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดการทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างอาหารเหลว Hoagland's.....	107
ตารางที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลวและรากผักตบชวา .....	108
ตารางที่ 4.12 ปริมาณดีเซลที่สะสมในรากผักตบชวา .....	109

ตารางที่ 4.13	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดและรากผักตบชวา .....	115
ตารางที่ 4.14	ปริมาณดีเซลที่สะสมในรากผักตบชวา .....	116
ตารางที่ 4.15	การเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ของตัวอย่างน้ำในการทดลองย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวา เป็นเวลา 7 วัน .....	118
ตารางที่ 5.1	ความสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุดโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในสภาวะต่างๆ.....	126
ตารางที่ ค-1	กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากพืชน้ำชนิดต่างๆจากต่างแหล่งที่มา .....	157
ตารางที่ ค-2	ความสามารถในการย่อยสลายดีเซลและจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 50 กลุ่มแบคทีเรีย.....	158
ตารางที่ ค-3	ค่าพารามิเตอร์ของน้ำจืดตัวอย่าง .....	161
ตารางที่ ค-4	สถานที่เก็บน้ำตัวอย่างทั้ง 6 แหล่ง .....	161
ตารางที่ ค-5	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และฟอสฟอรัสทั้งหมดของตัวอย่างน้ำไม่ปลอดเชื้อในการทดลองย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42.....	162
ตารางที่ ค-6	BOD และ COD ของตัวอย่างน้ำไม่ปลอดเชื้อและปลอดเชื้อในการทดลองย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42.....	162
ตารางที่ ค-7	ข้อมูลดิบการวัดค่าการสร้างสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย <i>P. aeruginosa</i> S4A, <i>S.maltophilia</i> S4B, <i>O. intermedium</i> S4C และกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 และ 600 นาโนเมตร .....	166
ตารางที่ ค-8	ปริมาณดีเซลที่สะสมในรากผักตบชวาในการทดลองย่อยสลาย 1% ดีเซล ในอาหารเหลว Hoagland's.....	168
ตารางที่ ค-9	ปริมาณดีเซลที่สะสมในรากผักตบชวาในการทดลองย่อยสลาย 1% ดีเซลในน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดเชื้อ .....	169

## บทที่ 1

### บทนำ

ดีเซล เป็นผลิตภัณฑ์จากการกลั่นน้ำมันดิบ มีองค์ประกอบหลักเป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ C<sub>9</sub>-C<sub>23</sub> และมีจุดเดือดอยู่ในช่วงประมาณ 163-357°C โดยแบ่งเป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างเป็นสาย (aliphatic hydrocarbons) และ ไฮโดรคาร์บอนที่เป็นวงแหวนหรือสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต (Chandran และ Das, 2011) การปนเปื้อนดีเซลในสิ่งแวดล้อมสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ นอกจากการรั่วไหลจากเครื่องยนต์ หรือการเกิดอุบัติเหตุ อาจมาจากปลดปล่อยน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะโรงกลั่นน้ำมันที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันค่อนข้างสูงออกสู่สิ่งแวดล้อม (Ajae และคณะ, 2013) ซึ่งจากข้อมูลของกรมควบคุมมลพิษ รายงานว่าในระหว่างปี พ.ศ. 2519-2553 เกิดเหตุน้ำมันรั่วไหลในทะเล โดยมีสาเหตุของการรั่วไหลที่พบมากที่สุดคือ 1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเดินเรือ เกือบกัก หรือสูบน้ำมันชำรุด 2. รั่วไหลระหว่างการสูบน้ำมัน 3. การลักลอบทิ้ง 4. เรืออัปปาง 5. สาเหตุอื่นๆ เช่น รั่วไหลจากแท่นขุดเจาะปิโตรเลียมในทะเล (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2554) ในเขตเมืองมักพบปัญหาการปนเปื้อนดีเซลในแม่น้ำหรือคลองที่มีการสัญจรทางเรือเป็นประจำก่อเกิดการสะสมน้ำมันหรือคราบน้ำมันในแหล่งน้ำ เกิดอุบัติเหตุทางน้ำบ่อยครั้งก่อให้เกิดการรั่วไหลของดีเซลในปริมาณมากและเกิดการแพร่กระจายซึ่งส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม เช่น เมื่อวันที่ 2 มกราคม 2559 มีรายงานการเกิดอุบัติเหตุเรือบรรทุกน้ำมันชนกับเรือโดยสารข้ามฟากกลางแม่น้ำเจ้าพระยา ที่ท่าวัดพันธุเชิงวรวิหาร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และเรือโดยสารข้ามฟากอัปปางลง ทำให้ดีเซลรั่วไหลลงสู่แม่น้ำ (ผู้จัดการออนไลน์, 2559) ในต่างประเทศมีรายงานการรั่วไหลของน้ำมันเชื้อเพลิงจำนวน 14,000 ลิตร จากบริษัท Hydro-Québec เมื่อเดือนสิงหาคม 2559 ในบริเวณชุมชน Nunavik ในอ่าวฮัดสัน ในจังหวัด Quebec ประเทศแคนาดา ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำ (Rogers, 2017) หรือบริษัท Plains All-American Pipeline พบว่าเกิดน้ำมันรั่วไหลจากท่อส่งน้ำมันในเขตชนบท ในรัฐโอคลาโฮมา ประเทศสหรัฐอเมริกา น้ำมันจำนวนกว่า 72,000 ลิตร และเกิดการไหลลงสู่ลำคลอง (Miston, 2017)

การปนเปื้อนของดีเซลจะทำให้คราบน้ำมันลอยบนผิวน้ำและอาจส่งผลให้ออกซิเจนละลายน้ำลดลงได้ ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งนั้น (Dede และ Kaglo, 2001) รวมถึงปัญหาด้านสุขภาพของมนุษย์ เช่น โรคเกี่ยวกับระบบเลือดของหัวใจหรือปอด เป็นต้น (Blomberg และคณะ, 2005) การได้รับดีเซลเข้าสู่ร่างกายมีทั้งการสัมผัสโดยตรง การสูดดม และการรับเข้าโดยการกิน ซึ่งอันตราย

ทั้งสิ้นเนื่องจากดีเซลถูกระบุว่าเป็นสารก่อมะเร็ง และความเสี่ยงที่มนุษย์จะได้รับดีเซลเข้าสู่ร่างกายมีมาก ทั้งบุคคลที่ทำงานในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมอาจได้รับในระหว่างการบรรจุ การเติมน้ำมันในสถานีบริการ ช่างซ่อมเครื่องยนต์ดีเซล เป็นต้น (Chilcott และ Chapd, 2011) โดยถ้ารับเข้าทางการหายใจ อาจทำให้เกิดอาการปวดหัว เวียนศีรษะ คลื่นไส้ แน่นบริเวณหน้าอก หายใจลำบาก เกิดการระคายเคืองที่ตา จมูกและบริเวณภายในลำคอ รวมถึงการรับรสชาติในปากได้ไม่ดี (Rudell และคณะ, 1996) จากการศึกษาความเป็นพิษของดีเซลแล้วพบว่าดีเซลปริมาณ 6 มล./กิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูที่ให้หนูกินนั้น ก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบเลือดทำให้เม็ดเลือดแดงลดลง ปริมาณฮีโมโกลบินในเลือดลดลง ในขณะที่เม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดโรคโลหิตจางได้ (Ita และ Udofia, 2011, Achuba และ Ogwumu, 2014)

ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องบำบัดดีเซลที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ในปัจจุบัน วิธีการบำบัดดีเซลปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมสามารถใช้วิธีทางกายภาพ เช่นการใช้แสง หรือการดูดซับไว้ด้วยวัสดุต่างๆ (Zhang, 2016) และการใช้คลื่นไมโครเวฟ (Falciiglia และคณะ, 2016) วิธีทางเคมี เช่น การเติมสารที่ช่วยให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมัน (Dispersants) การเติมสารจำพวกลดแรงตึงผิว (Surfactants) หรือสารทำให้เสถียร (Stabilizers) (Dave และ Ghaly, 2011) วิธีการดังกล่าวมักใช้กับการปนเปื้อนปริมาณมาก และไม่สามารถบำบัดดีเซลจนหมดได้ ปัจจุบันมีวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและยังสามารถใช้เพื่อบำบัดดีเซลและสารที่เป็นมลพิษได้หลากหลายและสมบูรณ์หนึ่งวิธี คือ การบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) ซึ่งเป็นวิธีการใช้จุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายดีเซลที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายดีเซลสามารถใช้ทั้งรา ยีสต์ แบคทีเรียเดี่ยว และกลุ่มแบคทีเรียแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลสามารถคัดแยกได้จากแหล่งที่มีการปนเปื้อน เช่น *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ WatG, *Serratia marcescens* สายพันธุ์ HokM (Wongsa และคณะ, 2004) *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* สามารถย่อยสลายดีเซล (Olu-Arotiowa และคณะ, 2007, Nwaogu และคณะ, 2008) นอกจากนี้สามารถใช้กลุ่มแบคทีเรียเพื่อบำบัดดีเซล เช่น กลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Ralstonia picketti* SRS (BP-20), *Alcaligenes piechaudii* SRS (CZOR L-1B), *Bacillus subtilis* (I'-1a), *Bacillus* sp. (T-1) และ *Bacillus* sp. (T'-1) สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมได้ (Plaza และคณะ, 2008) หรือกลุ่มแบคทีเรีย *Rhodococcus wratislaviensis* และ *Rhodococcus aetherivorans* สามารถย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยย่อยสลายสารผสม 16 ชนิดได้ (Auffret และคณะ, 2009) กลุ่มแบคทีเรียจีโนส *Pseudomonas* ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas koreensis* s4, *Pseudomonas chlororaphis* s5 *Pseudomonas* sp. s9 และ *Pseudomonas* sp. s12 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ (Taccari และคณะ, 2012) หรือแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. NM1 ที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมัน สามารถย่อยสลายองค์ประกอบดีเซลได้ (Di-Gregorio และคณะ,

2016) รายงานถึงแบคทีเรียในจินัส *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Chryseomicrobium*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Nesterenkonia*, *Pseudomonas*, และ *Serratia* ซึ่งคัดแยกจากน้ำทะเลปนเปื้อนดีเซลมีสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวในระหว่างการเจริญ และกลุ่มแบคทีเรีย ที่ประกอบด้วย *Exiguobacterium* sp. ASW-1, *Pseudomonas aeruginosa* ASW-2, *Alcaligenes* sp. ASW-3, *Alcaligenes* sp. ASS-1, และ *Bacillus* sp. ASS-2 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก ได้ 75.1% ในเวลาเพียง 7 วัน (Chen และคณะ, 2017)

การใช้แบคทีเรียเดี่ยวหรือกลุ่มแบคทีเรียอิสระในการย่อยสลายดีเซลได้ แต่การเติมแบคทีเรียเดี่ยวหรือกลุ่มแบคทีเรียต่างถิ่นลงในสิ่งแวดล้อมใหม่และอาจเกิดการแข่งขันกับจุลินทรีย์เจ้าถิ่นที่ปรับตัวได้ดีกว่า และอาจส่งผลต่อการย่อยสลายดีเซลได้ (Fodelianakis และคณะ, 2015) การตรึงแบคทีเรียหรือกลุ่มแบคทีเรียกับวัสดุจะช่วยให้แบคทีเรียมีผลทำให้การย่อยสลายดีเซลหรือน้ำมันปิโตรเลียมได้สูงขึ้นและเร็วกว่าการใช้จุลินทรีย์อิสระ (Hou และคณะ, 2013, Nopcharoenkul และคณะ, 2013) วัสดุตรึงช่วยเป็นแหล่งอาศัยยึดเกาะของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นได้ (Chen และคณะ, 2017) วัสดุตรึงเซลล์ที่เป็นทั้งวัสดุสังเคราะห์ เช่น พอลิยูรีเทนโฟม (Chanthamalee และคณะ, 2013) แอลจิเนต (Chen และคณะ, 2017) เป็นต้น หรือสามารถใช้วัสดุทางการเกษตร เช่น พีทมอส ไคโตซาน (Lee และคณะ, 2010) หรือเปลือกถั่ว (Deng และคณะ, 2016) เป็นต้น ข้อดีของแบคทีเรียตรึงทำให้การย่อยสลายเพิ่มขึ้น และเร็วขึ้น และยังสามารถใช้ซ้ำได้ในกรณีที่วัสดุตรึงไม่เกิดการย่อยสลายหรือเสื่อมสภาพ การใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงบนตัวกลางเพื่อย่อยสลายดีเซล เช่น กลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลประกอบด้วยแบคทีเรีย *Achromobacter denitrificans*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Rahnella aquatilis* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ที่ตรึงโดยการสร้างไบโอฟิล์มบนวัสดุที่เป็นเซลลูโลสจะสามารถย่อยดีเซลได้สูงถึง 80% ขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายได้ 35% (Ławniczak, 2011) *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ตรึงบนผิวเม็ดพลาสติก สามารถย่อยสลายดีเซลเข้มข้นเริ่มต้น 200 มก./ล และเติมดีเซลทุก 3 วัน จนระยะเวลา 15 วัน พบว่า แบคทีเรียตรึงยังคงสามารถย่อยสลายดีเซลได้ต่อเนื่องและดีกว่าแบคทีเรียอิสระ เมื่อความเข้มข้นของดีเซลเพิ่มขึ้นเป็น 500, 1,000, 5,000, 10,000, 15,000 และ 20,000 มก./ล การย่อยสลายดีเซลเท่ากับ 96, 87, 78, 57, 48 และ 26% ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียตรึงสามารถใช้บำบัดซ้ำได้อย่างน้อย 70 ครั้ง โดยที่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลมากกว่า 80 % ซึ่งเห็นได้ชัดว่าการตรึงนั้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพแบคทีเรียให้สามารถย่อยสลายได้ดีขึ้นและสามารถใช้ซ้ำได้ (Nopcharoenkul และคณะ, 2013) นอกจากนี้ ยังสามารถใช้วัสดุธรรมชาติเพื่อตรึงแบคทีเรีย เช่น *Acinetobacter* sp. F9 ที่ตรึงบนข้าวฟ่างหางหมาแบบเม็ดพอง กับ

เยื่อที่เป็นสารประกอบแคลเซียมแอลจินेट-โคโตซาน สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้เร็วกว่าแบคทีเรียอิสระ :ซึ่งสามารถย่อยดีเซลได้มากกว่า 80% ในเวลา 1 วัน .ในขณะที่เซลล์อิสระย่อยดีเซลได้ประมาณ 45% แต่ใช้ระยะเวลานานเป็น 2 วัน สุกท้ายที่ 7 วัน แบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลในอาหารได้มากกว่า 90% (Hou และคณะ, 2013) ตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนตัวกลางระหว่างแอลจินेटและเศษเปลือกหอยทะเลเพื่อย่อยสลาย คราบน้ำมันดิบที่ลอยอยู่บนน้ำทะเล เข้มข้น 10 กรัม/ล (weathered oil) พบว่าการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนเศษเปลือกหอยให้การย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่ขนาดใหญ่กว่า  $C_{32}$  ได้ 75% ซึ่งดีกว่าจากตรึงบนแอลจินेट ที่ย่อยได้เพียง 20% ในระยะเวลา 12 สัปดาห์ (Simons และคณะ, 2013) หรือตรึง *Mycobacterium gilvum* บนผงเปลือกแก้วเพื่อย่อยสลายดีเซล (Deng และคณะ, 2016) เป็นต้น

การปนเปื้อนดีเซลในแหล่งน้ำ มักจะเกิดขึ้นที่ผิวน้ำ ซึ่งในแหล่งน้ำจืดจะมีฟิซิลอยน้ำหลายชนิด เช่น ผักตบชวา ซึ่งเป็นพืชที่มีรายงานว่าสามารถใช้ผักตบชวาเพื่อเป็นปุ๋ย เป็นอาหารสัตว์ ใช้ผลิตพลังงานชีวภาพ ผลิตกระดาษ หรือผลิตแก๊สชีวภาพได้ (Rezania และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดสารพิษในน้ำได้ (Lu, 2004, Xia, 2008, Saleh, 2012, Ukiwe และคณะ, 2012, Jasrotia และคณะ, 2015, Rezania และคณะ, 2015) นอกจากผักตบชวาแล้ว ยังมีรายงานว่าพืชน้ำสามารถช่วยลดสารพิษได้เช่นกัน ตัวอย่างพืชที่มีรายงาน เช่น แหน (Priya และคณะ, 2012) ตีนตุ๊กแก (Cohen และคณะ, 2002) ต้นกก (Toyama และคณะ, 2011, Li และคณะ, 2012) ต้นยาสูบ (Talano และคณะ, 2010) จากที่พืชนั้นอาศัยที่ผิวน้ำ และการปนเปื้อนดีเซลก็เกิดที่ผิวน้ำเช่นกัน นอกจากนี้ รายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียที่รากพืชช่วยย่อยสลายสารพิษได้ เช่น การใช้แหนและแบคทีเรียที่อาศัยบริเวณรากแหนในการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกในน้ำ โดยแบคทีเรียที่รากแหนช่วยย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก ร่วมกับ การที่แหนสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและแลคเคสออกมาช่วยย่อยสลายร่วมกัน ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกได้มากกว่าน้ำที่ไม่มีแบคทีเรียที่รากแหน (Toyama และคณะ, 2006) แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลคือ *Acinetobacter calcoaceticus* P23 คัดแยกจากรากแหนจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของแหน ในระหว่างการบำบัดฟีนอล (Yamaga, 2010) การใช้แหน (*Spirodela polyrrhiza*) ร่วมกับแบคทีเรียรอบรากของแหนเพื่อย่อยสลาย 2-nitrophenol (2-NP) 4-nitrophenol (4-NP) และ 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่าการย่อยสลายสารไนโตรฟีนอลมากจากการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่รากแหนมากกว่าการดูดซับไว้โดยแหน (Kristanti และคณะ, 2012) การใช้หญ้าปศุสัตว์ (Italian rye-grass) ปลูกลงในดินไม่ปลอดเชื้อที่ปนเปื้อนดีเซล 7.5 กรัมต่อกิโลกรัมของดินแห้ง โดยเติมแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอลเคนได้ :ซึ่งพบว่าการเติมแบคทีเรียสามชนิดรวมกันสามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุด เท่ากับ 79 % ในเวลา 93 วัน นอกจากเพิ่มความสามารถในการบำบัดดีเซลแล้ว แบคทีเรียยังช่วยเพิ่มการเจริญของพืชได้ด้วย (Afzal และคณะ, 2012) ดังนั้น

ทางผู้วิจัยคาดหวังว่าจะสามารถนำผักตบชวามาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการย่อยสลายดีเซลที่ปนเปื้อน โดยจากรายงานความสามารถของผักตบชวาทางด้านการใช้เพื่อบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อมเช่น การดูดซับสารมลพิษของผักตบชวา *Eichhornia crassipes* สามารถดูดซับโลหะหนักและสะสมไว้ที่เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ โดยเฉพาะที่ราก (Lu, 2004) หรือสาร Dicofol ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชในกลุ่ม organochlorine (Xia, 2008) ใช้ดูดซับสารหนูที่ปนเปื้อนในน้ำ (Govindaswamy และคณะ, 2011, Jasrotia และคณะ, 2015) สารกัมมันตรังสี (Saleh, 2012) และยังสามารถใช้ผักตบชวาเพื่อการดูดซับ PAHs จากน้ำชะดินปนเปื้อน (Ukiwe และคณะ, 2012)

จากรายงานข้างต้น พืชที่สามารถใช้บำบัดน้ำได้ดีคือ ผักตบชวาซึ่งมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ *Eichhornia crassipes* Solms ชื่อสามัญว่า Water Hyacinth มีการเจริญเติบโตที่ใช้เวลาสั้น ขยายพันธุ์ได้เร็วโดยการแตกต้นอ่อนออกจากไหล สามารถพบได้ทั่วไปตามแม่น้ำ และเนื่องจากเป็นพืชลอยน้ำและการปนเปื้อนดีเซลนั้นมักลอยอยู่ที่ผิวน้ำ จึงเป็นพืชที่เหมาะสมแก่การใช้เพื่อการบำบัดดีเซลที่ปนเปื้อนในน้ำได้โดยตรง และด้วยความที่เป็นพืชที่อวบน้ำ และมีลักษณะรากที่เป็นร่างแห (Govindaswamy และคณะ, 2011, Rezania และคณะ, 2015) จะเป็นผลดีต่อการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซับสารต่างๆ รวมถึงสามารถเป็นแหล่งยึดเกาะอาศัยของจุลินทรีย์ได้ดี การใช้ผักตบชวาเพื่อการบำบัด เช่น ใช้ผักตบชวาในการบำบัดแคดเมียม และสังกะสี ทดลองในน้ำประปา พบว่าผักตบชวาสามารถดูดซับไว้ที่รากและลำต้นได้ แต่ที่รากจะมีการดูดซับไว้มากกว่าที่ลำต้น (Lu, 2004) ใช้ผักตบชวาในการดูดซับสาร Dicofol ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชในกลุ่ม organochlorine ในน้ำที่ความเข้มข้น dicofol 1 มล./ล. โดยเกิดการสะสมของสาร dicofol ในผักตบชวา 50 % และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์รอบรากพืช 7 % (Xia, 2008) ใช้ผักตบชวาเพื่อดูดซับโลหะหนัก (Mn, Cd, Fe, Zn, Cu, และ Pb) และสารอินทรีย์ที่เป็นอาหารพืช (N, P, K, Ca, Mg) ในบึงมักกะสัน (Chunkao และคณะ, 2012) ใช้ผักตบชวาบำบัดซีซีเอ็ม 137 และโคบอลต์ 60 (Saleh, 2012) ผักตบชวาสามารถใช้บำบัดสารหนูในน้ำได้ 20% และสามารถทนสารหนูได้ 2 มก./ล ทั้งนี้ยังสามารถกำจัดค่า COD ได้กว่า 50-65% (Jasrotia และคณะ, 2015)

ดังนั้นจุดมุ่งหมายในงานวิจัยนี้ คือคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้จากรากพืชน้ำจืด ที่เจริญในบริเวณแหล่งน้ำที่คาดว่ามีดีเซลปนเปื้อน จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลในตัวอย่งน้ำจืดจากแหล่งน้ำต่างๆ การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา ตรวจสอบการตรึงโดยใช้ SEM และ PCR-DGGE และใช้กลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงเพื่อย่อยสลายดีเซลในน้ำจืดสุดท้ายศึกษาการแพร่ของกลุ่มแบคทีเรียไปยังรากพืชอื่น



### วัตถุประสงค์

1. คัดแยก พิสูจน์เอกลักษณ์ และศึกษาลักษณะสมบัติของกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลจากรากพืชน้ำจืด
2. ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืด
3. การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา และใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงย่อยสลายดีเซลในน้ำจืด

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลและสามารถตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา รวมทั้งใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงนี้ในการย่อยสลายดีเซลในน้ำ

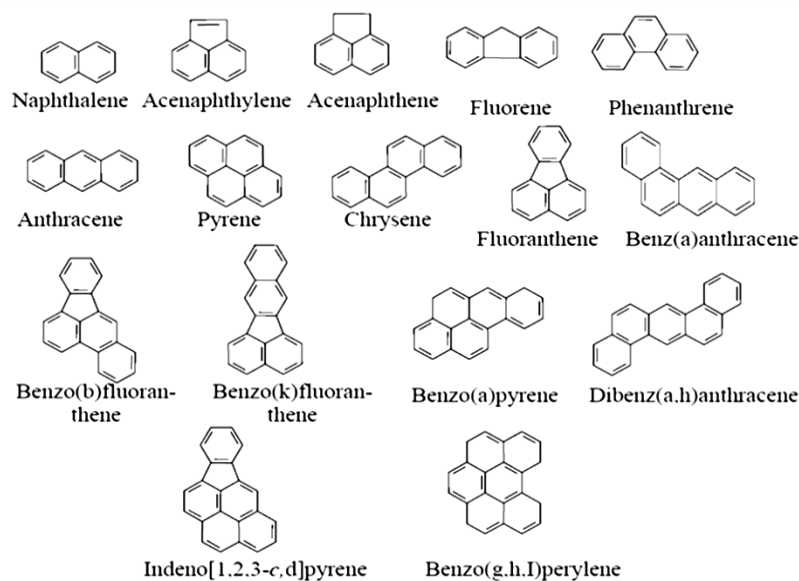


## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 ดีเซล และอันตรายของดีเซล

ดีเซลเป็นที่รู้จักดีในด้านการใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ ทั้งนี้ดีเซลคือผลิตภัณฑ์ได้จากการกลั่นน้ำมันดิบ โดยที่มีจุดเดือดอยู่ในช่วงประมาณ 163-357°C มีองค์ประกอบหลักประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub> ซึ่งสามารถแบ่งเป็น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างเป็นสาย (aliphatic hydrocarbons) และ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นวงแหวน (aromatic hydrocarbons) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ที่เป็นส่วนหนึ่งในดีเซลที่ถูกจัดให้เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต (Labana และคณะ, 2007) ซึ่ง PAHs นั้นมีหลายชนิดและตามสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, US-EPA) ได้ให้ความสำคัญในการบำบัดเมื่อพบในสิ่งแวดล้อมมีทั้งหมด 16 ชนิด ดังรูปที่ 2.3 อีกองค์ประกอบของดีเซลคือ ซัลเฟอร์ ซึ่งปริมาณของซัลเฟอร์นั้นจะเป็นตัวกำหนดคุณภาพของดีเซลว่าเหมาะกับการใช้งานประเภทใด ซัลเฟอร์ที่ปริมาณต่ำเหมาะสำหรับเครื่องยนต์ที่ต้องการการเผาไหม้ได้สมบูรณ์ไม่ก่อให้เกิดมลพิษ เช่นรถยนต์ทั่วไปหรือรถโดยสารขนส่งมวลชน หรือเรือขนาดเล็ก สำหรับดีเซลที่ใช้สำหรับเครื่องยนต์ใช้ในอุตสาหกรรม การขนส่งหนัก หรือเรือขนส่งขนาดใหญ่ เครื่องยนต์รอบกลางถึงต่ำกว่า ดีเซลจะมีองค์ประกอบของซัลเฟอร์ในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังมีสารที่ใส่เพิ่มเติมเข้าไป (additive compounds) แตกต่างไปตามสูตรของผู้ผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของดีเซล (IARC, 1989)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุล PAHs ที่สำคัญ 16 ชนิด ในรายงานสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) (Labana และคณะ, 2007)

ในประเทศไทยมีปริมาณการใช้ดีเซลในปัจจุบันค่อนข้างสูง สถิติการใช้น้ำมันโดยรวม ทั้ง ใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร การขนส่งมวลขนและขนส่งสินค้า อุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งใช้ดีเซลเพิ่มขึ้นทุกปีตั้งแต่ปี พ.ศ 2550 ถึง 2558 (ดังตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณการใช้ดีเซลในประเทศไทย ปี 2550-2558 (สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน, 2559)

ปี พ.ศ.	ปริมาณการใช้ดีเซล (ล้านลิตร)
2550	18,706
2551	17,642
2552	18,462
2553	18,483
2554	19,195
2555	20,559
2556	20,847
2557	21,063
2558	21,913

ดีเซลที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม สามารถก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม โดยเมื่อเกิดการปนเปื้อนของคราบน้ำมันลอยบนผิวน้ำ อาจส่งผลให้ออกซิเจนละลายน้ำลดลงได้ ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งนั้น (Dede และ Kaglo, 2001) การปนเปื้อนดีเซลนี้เพิ่มความเสี่ยงต่อการได้รับดีเซลเข้าสู่ร่างกาย โดยมีทั้งการสัมผัสโดยตรง การสูดดม และการรับเข้าโดยการกิน และความเสี่ยงที่มนุษย์จะได้รับดีเซลเข้าสู่ร่างกายมีสูง เช่น บุคคลที่ทำงานในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมอาจได้รับในระหว่างขั้นตอนการบรรจุผลิตภัณฑ์ บุคคลที่ทำงานในสถานบริการน้ำมัน รวมถึงงานช่างซ่อมเครื่องยนต์ดีเซล รวมถึงความเสี่ยงจากการเกิดการปนเปื้อนเนื่องจากอุบัติเหตุ ซึ่งล้วนก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพทั้งสิ้น เนื่องจากดีเซลถูกกระบุว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (Chilcott และ Chapd, 2011) การรับดีเซลเข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพของมนุษย์ เช่น โรคเกี่ยวกับระบบเลือดของหัวใจหรือปอด (Blomberg และคณะ, 2005) ถ้ารับเข้าทางการหายใจ อาจทำให้เกิดอาการปวดหัว เวียนศีรษะ คลื่นไส้ แน่นบริเวณหน้าอก หายใจลำบาก เกิดการระคายเคืองที่ตา จมูกและบริเวณภายในลำคอ รวมถึงการรบกวนรสชาติในปากได้ไม่ดี (Rudell และคณะ, 1996) นอกจากมนุษย์แล้ว จากการศึกษาความเป็นพิษของดีเซลในหนู พบว่าดีเซลปริมาณ 6 มล./กิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูที่ให้โดยการกิน ก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบเลือด ทำให้เม็ดเลือดแดงลดลง ปริมาณฮีโมโกลบินในเลือดลดลง ในขณะที่เม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้น ปัจจัยเหล่านี้อาจนำไปสู่การเกิดโรคโลหิตจางได้ (Ita และ Udofia, 2011, Achuba และ Ogwumu, 2014)

## 2.2 สถานการณ์การปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อม

ในต่างประเทศ ข่าวการปนเปื้อนน้ำมันดิบจากเหตุระเบิดแท่นขุดเจาะ Deepwater Horizon ซึ่งเป็นของบริษัท British Petroleum กลางทะเลในรัฐหลุยเซียนา เมื่อปี 2553 เป็นการปนเปื้อนขนาดใหญ่ ซึ่งมีน้ำมันดิบไหลทะลักสู่ทะเลกว่า 4.9 ล้านบาร์เรล ทำให้ต้องบำบัดอย่างเร่งด่วนพร้อมทั้งประเมินผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและบุคคลที่ถูกปนเปื้อนน้ำมันดิบ (Schmidt, 2011) มีรายงานการรั่วไหลของน้ำมันเชื้อเพลิงจำนวน 14,000 ลิตร จากบริษัท Hydro-Québec เมื่อเดือนสิงหาคม 2559 ในบริเวณชุมชนในอ่าวฮัดสัน แถบช่องแคบฮัดสัน ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำของชุมชนกว่า 450 ชุมชน และยังคงปนเปื้อนในแหล่งน้ำอยู่ถึงปัจจุบันจากรายงานของทางชุมชน Nunavik ในจังหวัด Quebec ประเทศแคนาดา (Rogers, 2017) หรือบริษัท Plains All-American Pipeline พบว่าเกิดน้ำมันรั่วไหลจากท่อส่งน้ำมันในเขตชนบท ในรัฐโอคลาโฮมา ประเทศสหรัฐอเมริกา น้ำมันจำนวนกว่า 72,000 ลิตร และเกิดการไหลลงสู่คลองที่ใช้ในการทำการเกษตร ส่งผลกระทบต่อพื้นที่เกษตรกรรม 177 ไร่ (Miston, 2017)

ในประเทศไทย กรมควบคุมมลพิษได้รายงานคุณภาพน้ำแม่น้ำสายหลักในภูมิภาคต่างๆในประเทศไทยประจำวันวันที่ 10-16 ตุลาคม 2559 จากรายงานของกรมควบคุมมลพิษพบว่า มีทั้งที่คุณภาพดีและไม่ดี ยกตัวอย่างแม่น้ำเจ้าพระยาตั้งแต่จังหวัดนครสวรรค์ถึงจังหวัดพระนครศรีอยุธยา อยู่ในเกณฑ์พอใช้ แต่ตั้งแต่จังหวัดปทุมธานีถึงจังหวัดสมุทรปราการ คุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์เสื่อมโทรม ความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำมักมีสาเหตุมาจากน้ำเสียจากการระบายน้ำทิ้งจากชุมชนและตลาดริมแม่น้ำเสียจากการระบายน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (กรมควบคุมมลพิษ, 2560) นอกจากรายงานคุณภาพน้ำผิวดินในประเทศไทยแล้ว ยังมีจากรายงานการรั่วไหลของน้ำมันในแหล่งน้ำจากกรมเจ้าท่า ซึ่งมีทั้งการกระทำที่ตั้งใจและอุบัติเหตุ ก่อให้เกิดการปนเปื้อนน้ำมันในแหล่งน้ำ เช่น รายงานการปนเปื้อนดีเซล และน้ำมันเครื่องในแหล่งน้ำ เมื่อวันที่ 4 ธันวาคม 2558 ปนเปื้อนบริเวณโป๊ะเทียบเรือในแม่น้ำเจ้าพระยาหลังวัดภคินีนาถวรวิหาร เขตบางพลัด กรุงเทพมหานครกว่า 1,500 ลิตร และ 140 ลิตร สาเหตุมาจากเรือ River Sun Cruise เกิดการอัปปางลง (กรมเจ้าท่า, 2559) ทั้งมีรายงานการเกิดอุบัติเหตุเรือบรรทุกน้ำมันชนกับเรือโดยสารข้ามฟากกลางแม่น้ำเจ้าพระยา ที่ท่าวัดพนัญเชิงวรวิหาร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เมื่อวันที่ 2 มกราคม 2559 จนเรือโดยสารข้ามฟากอัปปาง เกิดการปลดปล่อยดีเซลสู่มแม่น้ำ (ผู้จัดการออนไลน์, 2559)

### 2.3 การบำบัดดีเซลปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

เนื่องจากดีเซลมีความเป็นพิษตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงจำเป็นต้องบำบัดดีเซลจากสิ่งแวดล้อม การบำบัดดีเซลในน้ำ ทำได้ทั้งวิธีทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ (Farhadian และคณะ, 2008) โดยวิธีการแต่ละแบบเหมาะสมกับความต้องการบำบัดที่แตกต่างกันออกไป

#### 2.3.1 การบำบัดดีเซลทางกายภาพ

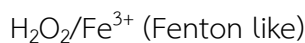
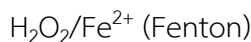
การบำบัดดีเซลด้วยวิธีทางกายภาพ สามารถทำได้โดย สลายตัวด้วยแสง Zhang และคณะ (2016) ได้ทดลองใช้วิธีกายภาพร่วมกับการดูดซับบนวัสดุสำหรับดูดซับ พบว่าสามารถย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 475 มล./ล. ได้ 53.8 และยังคงเหลือส่วนประกอบตั้งแต่ C<sub>15</sub> จนถึง C<sub>23</sub> อยู่ โดยการใช้วัสดุดูดซับสามารถใช้วัสดุทั้งที่เป็นสารอินทรีย์ วัสดุอนินทรีย์ หรือวัสดุสังเคราะห์ (Dave และ Ghaly, 2011) การใช้ฝักตบชวาแห้งในการดูดซับดีเซล น้ำมันหล่อลื่น และน้ำมันละหุ่ง โดยที่สามารถใช้ทั้งส่วนของราก ลำต้น และใบ ในการดูดซับน้ำมันได้ดีที่สุด คือ 9.3, 7.8 และ 11.08 กรัม/กรัม สำหรับดีเซล น้ำมันหล่อลื่นและ น้ำมันละหุ่ง ตามลำดับ ซึ่งดีพอๆกับการใช้แผ่นใยสังเคราะห์พอลิโพรพิลีน ซึ่งสามารถดูดซับได้ในช่วง 10-16 กรัม/กรัม (Jansi Rani และคณะ, 2014) พลังงานจากคลื่นไมโครเวฟสามารถใช้เพื่อการย่อยสลายดีเซลในน้ำ ดีเซลปนเปื้อนในน้ำแข็งความเข้มข้น 800 มล./กก.

เมื่อใช้พลังงาน 160, 350 และ 500 วัตต์) จากเครื่องไมโครเวฟกำลัง 2.45 จิกะเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 60 นาที ย่อยสลายได้ 56%, 67% และ 80% ตามลำดับ (Falciglia และคณะ, 2016) วิธีการเติมโอโซน ( $O_3$ ) สามารถย่อยสลายดีเซลในน้ำได้ โดยการทดลองการเติมโอโซน 1.5 ดีกรี ร่วมกับการปรับ pH เป็น 7.0 และระยะเวลาในการเติมโอโซนหลังผ่านไป 35 นาทีจะพบว่าสามารถสลายปริมาณดีเซลได้ 53-61% (Ziabari และคณะ, 2016) อย่างไรก็ตาม การบำบัดดีเซลทางกายภาพไม่สามารถบำบัดดีเซลได้ทั้งหมด และในกรณีเกิดการปนเปื้อนจากการรั่วไหลของน้ำมันในน้ำปริมาณมาก จำเป็นต้องจำกัดการแพร่กระจายก่อนการบำบัดด้วยวิธีอื่น โดยใช้วัสดุลอยน้ำ เช่น บลูม (bloom) สกิมเมอร์ (skimmer) และวัสดุสำหรับการดูดซับ ซึ่งจากวิธีทางกายภาพที่กล่าวมานั้น ค่อนข้างมีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งยังต้องการเครื่องมือที่ใช้พลังงานเพื่อการบำบัด (Dave และ Ghaly, 2011)

### 2.3.2 การบำบัดดีเซลทางเคมี

การย่อยสลายดีเซลที่ปนเปื้อนในน้ำ นั้นสามารถใช้วิธีการบำบัดด้วยสารเคมี ซึ่งสารเคมีที่มีรายงานการใช้เพื่อบำบัดดีเซล เช่น การเติมสารที่ช่วยให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมัน (Dave และ Ghaly, 2011) โดยอาจประกอบด้วยสารเติมสารจำพวกลดแรงตึงผิว สารตัวทำลาย และสารทำให้เสถียร เมื่อมีคราบน้ำมันปนเปื้อนที่ผิวน้ำ สารช่วยกระจายตัวจะทำงานโดยที่ สารลดแรงตึงผิวจะประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic group) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Lipophilic group) ซึ่งทั้งสองส่วนจะช่วยให้ไขมันเกิดการกระจายตัวออกเป็นหยดเล็กๆ และละลายลงสู่ชั้นน้ำ ทำให้เกิดการเจือจางและย่อยสลายได้ง่ายขึ้น การเติมสารที่ทำให้ไขมันเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็ง (solidifiers) จะทำให้สามารถกำจัดออกจากน้ำได้ง่ายขึ้น แต่จะพบปัญหาการจัดการของแข็งที่ถูกเปลี่ยนสภาพหลังการบำบัด ที่อาจต้องขนย้ายออกจากน้ำ อาจเกิดการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมอื่น ในขณะที่ขนย้าย แม้ว่าวิธีการบำบัดโดยใช้สารเคมีจะสามารถบำบัดได้ดีและอาจราคาถูกกว่าการใช้วิธีทางกายภาพ (Holakoo, 2001) แต่การเติมสารพวกนี้อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อมนุษย์ในระหว่างการบำบัด และส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำนั้นๆ (Dave และ Ghaly, 2011)

การใช้วิธี การเติมโอโซนเทียบกับวิธี Fenton และทั้งสองวิธีร่วมกันให้ผลการบำบัดดีเซลได้ดีสุด . ในระหว่างการบำบัดดีเซลที่ปนเปื้อนในทรายและถ่านหินเลน (ซากพืชที่ทับถมกันเป็นเวลานานในหนองน้ำ) พบปริมาณอัลเคนสายสั้น ( $C_{11}-C_{18}$ ) ถูกย่อยสลายได้มากกว่า อัลเคนสายยาว ( $C_{19}-C_{26}$ ) และอัลเคนโครงสร้างกิ่งแขนง (pristane + phytane) ดีเซลปริมาณ 12.5±0.4 กรัม/กก.ถ่านหินเลน และ 10.4±0.3 กรัม/กก.ทราย ถูกกำจัดได้ 43% และ 93% ตามลำดับ โดยวิธี Fenton ร่วมกับการเติมโอโซน ในถ่านหินเลน ดีเซลจะถูกดูดซับไว้ที่ถ่านหินเลน มากกว่าในทราย ทำให้การกำจัดออกได้น้อยลง (Goi และคณะ, 2006) วิธี Fenton อธิบายตามสูตรด้านล่าง (Cheng และคณะ, 2016)



จากรายงานการใช้สารเคมีเพื่อบำบัดสารพิษของ Zhao และคณะ (2013) ซึ่งบำบัดสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ปนเปื้อนในดิน (340 มก./กก.) โดยการใช้การเติมสาร ซิเตรตคีเลตไอออน และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผสมกับโซเดียมเปอร์ซัลเฟต ในสภาวะต่าง (pH 10-12) ที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 40-60 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิสูง 60 องศาเซลเซียสสามารถกำจัด PAHs ได้สูงที่สุดถึง 99.1% และเมื่อใช้ซิเตรตคีเลตไอออน จะสามารถลดปริมาณ PAHs ลงได้ 73.3–82.9% ซึ่งจากรายงานจะเห็นว่าการใช้เพียงแค่สารเคมีในการบำบัดนั้นไม่สามารถบำบัด PAHs ได้หมด

ในประเทศไทยมีการอนุญาตให้ใช้สารเคมีเพื่อกำจัดคราบน้ำมันในกรณีเกิดการรั่วไหลซึ่งจากรายงานของกรมควบคุมมลพิษ มีการอนุญาตให้สามารถใช้ได้หลากหลายชนิด โดยยกตัวอย่างดังตารางที่ 2.2 รายชื่อที่แสดงเป็นรายชื่อทางการค้าของสารเคมีชนิดต่างๆ พร้อมระบุวันที่อนุญาตให้สามารถใช้ได้และวันหมดอายุ ซึ่งการใช้สารเคมีในการบำบัดน้ำมันนี้ข้อดีคือรวดเร็วและสามารถบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนได้ในปริมาณมาก (Zhao และคณะ, 2013) แต่ข้อเสียคืออาจเกิดการตกค้างของสารเคมี ผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในพื้นที่บำบัด (Dave และ Ghaly, 2011) และไม่สามารถบำบัดน้ำมันปนเปื้อนได้ทั้งหมดจากพื้นที่ (Zhao และคณะ, 2013)

ตารางที่ 2.2 รายชื่อสารเคมีขจัดคราบน้ำมันบางส่วนที่อนุญาตให้ใช้ในประเทศไทยกรณีแก้ไข  
ปัญหาน้ำมันรั่วไหล (กรมควบคุมมลพิษ, 2558)

ชื่อสารเคมี	บริเวณที่ อนุญาตให้ ใช้ได้	วันหมดอายุ	วันที่จดทะเบียน/ วันที่ปรับปรุง	หน่วยงานที่ อนุญาต
COREXIT® EC9500A	ทะเล	12 ธันวาคม 2561	13 เมษายน 2537/ 18 ธันวาคม 2538	MMO* U.S. EPA**.
Finasol OSR 52	ทะเล ชายหาด หาดหิน	18 มีนาคม 2563	30 มกราคม 2546	MMO U.S. EPA.
OSD/LT Oil Spill Dispersant	ทะเล ชายหาด หาดหิน	20 มิถุนายน 2559	-	MMO
SEACARE ECOSPERSE 52 (see FINASOL OSR 52)	ทะเล ชายหาด หาดหิน	25 เมษายน 2561	30 มกราคม 2546	MMO U.S.EPA

\* Marine Management Organisation : MMO สหราชอาณาจักร

\*\* U.S. Environmental Protection Agency : U.S. EPA สหรัฐอเมริกา

### 2.3.3 การบำบัดดีเซลทางชีวภาพ

การบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) เป็นวิธีที่อาศัยกิจกรรมของพืชหรือจุลินทรีย์ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซล ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์จะย่อยสลายน้ำมันเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ (Dua และคณะ, 2002) จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายดีเซลให้กลายเป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (mineralization) จึงนับเป็นวิธีที่ย่อยสลายดีเซลได้สมบูรณ์ วิธีการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนดีเซลทางชีวภาพนั้นมีหลายวิธี ได้แก่วิธี Biostimulation เป็นวิธีการบำบัดโดยเติมสารอาหารที่จำเป็นหรือปรับสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายดีเซลให้มากขึ้นและลดระยะเวลาในการบำบัด ธาตุอาหารที่จำเป็นได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส Biostimulation เป็นวิธีที่เหมาะสมแก่การบำบัดดีเซลทั้งในดินและน้ำ ในพื้นที่ที่มีจุลินทรีย์ที่สามารถบำบัดสารพิษได้ (Kavamura และ Esposito, 2010) ซึ่งการเติมสารอาหารรวมกับการเติมจุลินทรีย์ พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดี โดย Zahed และคณะ



(2010) ใช้วิธี Response surface methodology (RSM) เพื่อการบำบัดน้ำมันดิบความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มล./ล. ในน้ำทะเลปริมาตร 250 มล. โดยให้การเติมสารอาหารร่วมกับการใช้แบคทีเรีย โดยให้ปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับการเติมแบคทีเรียที่ได้จากคัดแยกจากน้ำทะเลปริมาณ  $1.2 \times 10^7$  เซลล์/มล. ที่เวลา 28 วันพบว่าสามารถย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน ได้ 95% และย่อยสลาย *n*-alkanes 98% อีกวิธีหนึ่งคือ Bioaugmentation ซึ่งเป็นวิธีการเติมจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายดีเซล (Samanta และคณะ, 2002) ซึ่งอาจคัดแยกจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนนั่น หรืออาจเป็นจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากแหล่งปนเปื้อนอื่น เพิ่มจำนวนเฉพาะจุลินทรีย์ที่ต้องการ เพื่อเติมลงในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนโดยตรง ซึ่งเป็นการเพิ่มการย่อยสลายได้ (Safdari และคณะ, 2016) แต่การใช้วิธีนี้ต้องการระยะเวลา และต้องเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Onur และคณะ, 2015) ยิ่งไปกว่านั้น จุลินทรีย์ที่เติมลงไปอาจรอดชีวิตน้อยหรือไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่เติมลงไป เช่น อุณหภูมิ ความชื้น สภาพพื้นที่ หรือการแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Nzila และคณะ, 2016) ข้อดีของการใช้วิธีนี้คือสามารถบำบัดได้สมบูรณ์ และเหมาะสมกับพื้นที่ที่ไม่มีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารพิษได้ (Taccari และคณะ, 2012) (Kavamura และ Esposito, 2010)

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายดีเซลนั้นมีหลายชนิดได้แก่ แบคทีเรีย รา และยีสต์ ยกตัวอย่างเช่น

รา *Aspergillus fumigatus* ซึ่งคัดแยกจากบริเวณถังเก็บดีเซล สามารถย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนตั้งแต่  $C_{11}$   $C_{12}$  และ  $C_{13}$  ได้ 47.7, 37.5 และ 51 % ในเวลา 60 วัน ตามลำดับ และรา *Hormoconis resinae* สามารถย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน  $C_{11}$   $C_{12}$  และ  $C_{13}$  ได้ 65.9, 44.2 และ 32.8 % ในเวลา 60 วัน ตามลำดับ (Bento และคณะ, 2005) หรือ รา *Cladosporium* (filamentous fungi) สามารถย่อยสลายดีเซลได้ 34 % ในเวลา 5 วัน (Li และคณะ, 2008)

*Pleurotus pulmonarius* สามารถย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% ในดินได้ 84.41%, 64.87% และ 44.27% ตามลำดับ ในเวลา 2 เดือน เมื่อเติมลงในดินร่วมกับปอกระเจาฝักยาว (*Corchorus olitorius* (L)) (Adenipekun และคณะ, 2013)

*Cladosporium tenuissium*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium corylophilum*, *Trichoderma koningii* และ *Aspergillus niger* คัดแยกจากดินบริเวณที่มีการแยกชิ้นส่วนเรือ โดยราทุกชนิดสามารถย่อยสลายออกเทน ดีเซล และคีโรซีนได้ ซึ่ง *Fusarium moniliforme* สามารถย่อยสลาย ออกเทนและดีเซลได้สูงสุด 58% และ 56% ตามลำดับ และ *Penicillium corylophilum* ย่อยสลายคีโรซีนได้สูงสุด 40%. (Dhar และคณะ, 2014)

*Geomyces pannorum* และ *Geomyces* sp. ที่คัดแยกจากดินปนเปื้อนดีเซลในป่าอะเมซอน สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารโดยมีอัตราการย่อยสลาย *n*-alkanes ได้สูงสุดเท่ากับ 77.34 และ 62.62 .ในเวลา 30 วัน (Maddela และคณะ, 2015)

*Trichoderma longibrachiatum* Evx1 คัดแยกจากดินในป่า ซึ่งรายงานว่าจะสามารถทนและย่อยสลาย PAHs ที่ความเข้มข้นสูงได้ (พีแนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนทีน และไพรีน) และสามารถย่อยสลายดีเซล (5 กรัม/กก.ดิน) ในดินได้ โดยย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน C<sub>12-40</sub> ได้ 54.2±1.6 ในเวลา 30 วัน (Andreolli และคณะ, 2016)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถย่อยสลายดีเซลแล้ว ยีสต์ *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 และ *Candida ernobii* UFPEDA 862 การทดลองที่มีดีเซลความเข้มข้น 12% พบว่า *C. ernobii* สามารถย่อยสลายองค์ประกอบในดีเซล เช่น เทตระเดเคน 5-เมธิล-ออกเทน และ ออกทอะเดเคน ได้หมด และสามารถย่อยสลายเตเคน 60.8% โนเนน 21.4% ส่วนยีสต์ *R. aurantiaca* รายงานว่าจะสามารถย่อยสลายดีเคนได้สูงกว่า ซึ่งย่อยได้เท่ากับ 93% ย่อยสลายโนเนนได้ 38.4% และ โดดีเคนได้ 22.9% ภายในระยะเวลา 15 วัน (Miranda และคณะ, 2007)

*Candida viswanathii* KA-2011 (Khaled และคณะ, 2012) สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลและน้ำมันหล่อลื่นได้ 93.9% และ 58.6% ที่ความเข้มข้นเกลือ 6% ในเวลา 4 วัน

*Candida tropicalis* SK21 คัดแยกจากดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม สามารถย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 0.5% และ 5% โดยปริมาตร ในอาหารได้ 96% และ 42% ตามลำดับ และสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เมื่อเติมลงในดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน(16,300 มก./กก.) สามารถบำบัดได้ 83% ในเวลา 180 วัน ในขณะที่แบคทีเรียประจำถิ่นบำบัดได้ 61% (Fan และคณะ, 2014)

*Candida* sp. HC1 และ *Trichosporon* sp. HC4 คัดแยกจากน้ำเสียโรงงานปิโตรเลียม รายงานว่าจะสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ทั้งอัลเคนและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอัลเคนสายยาว ดีเซล และน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน โดย *Trichosporon* sp. HC4 สามารถย่อยสลายพีแนทรีน แอนทราซีน และฟลูออแรนทีนได้ 47%, 73% และ 31.4% ตามลำดับ ในเวลา 7 วัน ส่วน *Candida* sp. HC1 ย่อยสลาย แอนทราซีน และฟลูออแรนทีนได้ 51% และ 74% ตามลำดับ ในเวลา 7 วัน (Gargouri และคณะ, 2015)

มีรายงานความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของแบคทีเรียหลายชนิดทั้งที่เป็นแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มแบคทีเรีย ดังนี้

Wongsa และคณะ (2004) ใช้ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ WatG ที่ได้คัดแยกได้จากเกาะฮอกไกโด พบว่ามีสามารถย่อยสลายน้ำมัน เคโรซีน ดีเซล และน้ำมันหล่อลื่น ได้ โดยที่มีสามารถย่อยสลายดีเซล และ เคโรซีน ได้สูงถึง 90-95% ภายในเวลา 2 และ 3 สัปดาห์ ตามลำดับ และย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้สูงถึง 60% ใน 2 สัปดาห์ ส่วน *Serratia marcescens* สายพันธุ์ HokM สามารถย่อยสลาย เคโรซีน ดีเซล และน้ำมันหล่อลื่นได้สูงถึง 50-60% ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์

รายงานการย่อยสลายดีเซลปริมาณ 1.5 มล.ต่อ 7 มล.ของอาหารเหลว mineral salt medium โดย *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายดีเซล เหลือ 0.7 มล.ในเวลา 20 วัน (Olu-Arotiowa และคณะ, 2007) และจากงานวิจัยของ Nwaogu และคณะ (2008) ได้คัดเลือก *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Trichoderma harzanium* และ *Trichothercium roseum* โดยใช้ดีเซลเป็นแหล่งอาหารในการคัดเลือก พบว่า *B. subtilis* สามารถย่อยสลาย 5% ดีเซลในดิน ได้สูงกว่าแบคทีเรียอื่นที่คัดเลือกได้ และพบว่าอัตราการย่อยสลายวันที่ 1, 12 และ 24 เท่ากับ  $5.8 \times 10^{-4}$ ,  $1.83 \times 10^{-3}$  และ  $1.05 \times 10^{-3}$  กรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ

*B. subtilis* SPB1 เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้และสามารถย่อยสลายดีเซลและคีโรซีนความเข้มข้น 2% 62% และ 34% ในเวลา 28 วัน แต่เมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ 0.1% การย่อยสลายเพิ่มขึ้นเป็น 88% และ 72% ตามลำดับ (Mnif และคณะ, 2014)

*Acinetobacter haemolyticus* Zn01 เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ 92% ในเวลา 14 วัน ทั้งยังมีค่า emulsification index 60 % (Onur และคณะ, 2015)

*P. aeruginosa* และ *B. subtilis* คัดแยกจากดินโรงงานกลั่นน้ำมัน สามารถย่อยสลาย 2% โดยปริมาตร ดีเซลในน้ำได้ 87% และ 75% ตามลำดับ ในเวลา 20 วัน ที่ความเข้มข้นดีเซล 5% พบว่า *P. aeruginosa* ย่อยสลายดีเซลได้ลดลงเหลือ 35% ส่วน *B. subtilis* ย่อยสลายดีเซลได้ลดลงเหลือ 29% (Safdari และคณะ, 2016)

นอกจากการใช้แบคทีเรียเดี่ยวแล้ว การใช้กลุ่มแบคทีเรียเพื่อการบำบัดดีเซลหรือน้ำมันดิบให้ผลดีกว่า เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการย่อยสลายสารต่างชนิดกัน เมื่ออยู่ร่วมกันจะเกิดการย่อยสลายสารได้หลายชนิดและย่อยสลายได้มากกว่า (Tara และคณะ, 2014, Balseiro-Romero และคณะ, 2016, Chen และคณะ, 2017)

Márquez-Rocha และคณะ (2001) ใช้กลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ย่อยสลายดีเซลทั้งในห้องปฏิบัติการและระดับโรงงาน โดยกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 135 และ 118 กรัม/กก.น้ำหนักแห้งดิน ในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการและระดับโรงงาน ตามลำดับ เหลือ 19.32 และ 17.5 กรัม/กก.น้ำหนักแห้งของดิน คิดเป็นเหลือดีเซลน้อยกว่า 15% ภายในเวลา 5 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการลดลงของดีเซล 5% และ 15% ตามลำดับ

Ozaki และคณะ (2007) สามารถคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย *Pandoraea* sp., *Hyphomicrobium facile* Y3, *Burkholderia multivorans* Y4 และ *Brachymonas* sp. F จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน กลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวย่อยสลายน้ำมันดิบที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อ ล. ได้มากกว่า 65% ในระยะเวลา 14 วัน แบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันได้ นอกจากจะลดน้ำมันดิบหรือดีเซลแล้ว ยังส่งผลให้ค่า COD ลดลงด้วย เช่น Gargouri และคณะ (2011) ได้บำบัดน้ำเสียจากโรงงาน

ที่ปนเปื้อนไปด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ระบบ continuously stirred tank bioreactor (CSTR) เมื่อเติมกลุ่มจุลินทรีย์เข้าไปนั้นสามารถลดค่า COD ลดลงถึง 95% และปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนลดลงจาก 320 มล./ล. เหลือเพียง 8 มล./ล. ภายในเวลา 225 วัน Hamza และคณะ (2012) คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียได้ 4 สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* และ *Serratia mercrescens* และใช้เพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันที่ได้จากโรงกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม พบว่าการเติม *B. subtilis* สามารถลดค่า COD มากกว่า 56%

กลุ่มแบคทีเรีย ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียทั้งหมด 15 ชนิด *Bacillus* sp 7 สายพันธุ์ (MD-1, DW-3, SS-1, SNW-3, SNW3-2, SNW3-3 และ SNW4-4) *Micrococcus* sp สายพันธุ์ DW-1 และ DW-8, *Staphylococcus* sp. SNW3-1, *Pseudomonas* sp. DW-6, *Alcaligenes* sp. SNW3-4 และ *Psychrobacter* sp สายพันธุ์ SS1-8, SS-2 และ SOL-10 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 2% ในอาหารเหลวได้ โดยที่สามารถย่อยสลายอะลิฟาติกและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ 94.84% และ 93.75% ตามลำดับ ในเวลา 24 วัน ซึ่งอัลเคนที่มีคาร์บอนต่ำกว่า C8, C9 และ C10 จะถูกย่อยสลายจนหมดตั้งแต่วันที่ 12 (Malik และ Ahmed, 2012)

กลุ่มแบคทีเรีย Mix3 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากการผสมระหว่างน้ำเสียจากโรงงานบำบัดน้ำเสีย ดินปนเปื้อนปิโตรเลียม และดินจากป่า นำมาเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 222 วัน โดยเติมไฮโดรคาร์บอน น้ำมันเบนซิน และ ดีเซล ทั้งหมด 16 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียหลายชนิด แต่ที่พบโดดเด่นคือแบคทีเรียในจีนัส *Actinobacteria Rhodococcus* และ *Mycobacterium* หลังจาก 113 วัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสาร 13 ชนิด จาก 16 ชนิดที่เติมลงไปได้ทั้งหมด และย่อยสลาย สามารถย่อยสลายไอโซกเทน และ MTBE ได้ต่ำกว่า 40 % หนึ่งในกลุ่มแบคทีเรีย Mix3 คือ *Rhodococcus wratislaviensis* IFP พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายได้เช่นเดียวกับกลุ่มแบคทีเรีย Mix3 (Auffret และคณะ, 2015)

กลุ่มแบคทีเรียคัดที่ประกอบด้วย *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, *Pseudomonas* sp. B3, *Micrococcus* sp. B4 และ *Klebsiella* sp. B5 สามารถย่อยสลายดีเซลปริมาตร 10 และ 20 มล. ในอาหารเหลวได้เหลือ 3 และ 14 มล ตามลำดับ. ในเวลา 14 วัน. (Paul และคณะ, 2016)

การเติมกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย แบคทีเรียทั้งหมด 22 ชนิด ประกอบด้วย *Acinetobacter haemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis* type II และ *Brevibacillus brevis* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เพื่อบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำเสียระบบขนาด 750 ลิตร พบว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถลดปริมาณไฮโดรคาร์บอนรวมจาก 1086 มก./ล. เหลือ 56 มก./ล. และ 18 มก./ล. ในเวลา 21 และ 104 วันตามลำดับ (Poi และคณะ, 2016)

การใช้กลุ่มแบคทีเรียรอบรากพืชที่ประกอบด้วย *Bacillus aquimaris*, *Bacillus anthracis* และ *Bacillus cereus* เพื่อย่อยสลายดีเซลปนเปื้อนในพื้นที่ชุ่มน้ำจำลองร่วมกับการปลูกกกสามเหลี่ยม (*Scirpus grossus*) หลังจาก 63 วัน พบว่า ปริมาณดีเซลในน้ำในชุดที่ไม่เติมกับเติมกลุ่มแบคทีเรีย ลดลง 72% และ 84% ตามลำดับ ส่วนในดินสามารถลดดีเซลได้ 59% และ 77% ตามลำดับ จากการทดลองนี้ กลุ่มแบคทีเรียช่วยเพิ่มการเจริญของพืชโดยการลดสภาวะเครียดจากปริมาณดีเซล ช่วยปกป้องพืชจากดีเซล (Al-Baldawi และคณะ, 2017)

## 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ มีทั้งปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางชีวภาพ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น

- อุณหภูมิ ซึ่งเป็นปัจจัยหลักเนื่องจากมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารมลพิษ ซึ่งอุณหภูมิจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดแหล่งที่มา (Palanisamy และคณะ, 2014)
- pH ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องทั้งกับการเจริญของจุลินทรีย์ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย (Lin และคณะ, 2014, Palanisamy และคณะ, 2014)
- ความเข้มข้นของสารพิษ คุณสมบัติของสารมลพิษซึ่งหลักๆเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อจุลินทรีย์ที่ใช้เพื่อการบำบัดทางชีวภาพ (Palanisamy และคณะ, 2014)
- สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์นั้นส่งผลในการบำบัดเช่นกัน โดยที่เมื่อสารอาหารสมบูรณ์ เช่นปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส อัตราส่วน 100:10:1 (Mouginot และคณะ, 2014) ที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้ เมื่อมีจำนวนมากการย่อยสลายก็ดีขึ้นตามจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้ (Das และ Chandran, 2011)
- ออกซิเจน ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ตลอดจนการบำบัดโดยใช้ ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ออกซิเจนโดยตรงก็สามารถบำบัดดีเซลในน้ำได้ (Ziabari และคณะ, 2016)
- ความเค็ม ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนและย่อยสลายสารพิษได้ลดลง (Lin และคณะ, 2014, Palanisamy และคณะ, 2014)

ปัจจัยทางชีวภาพ เช่น

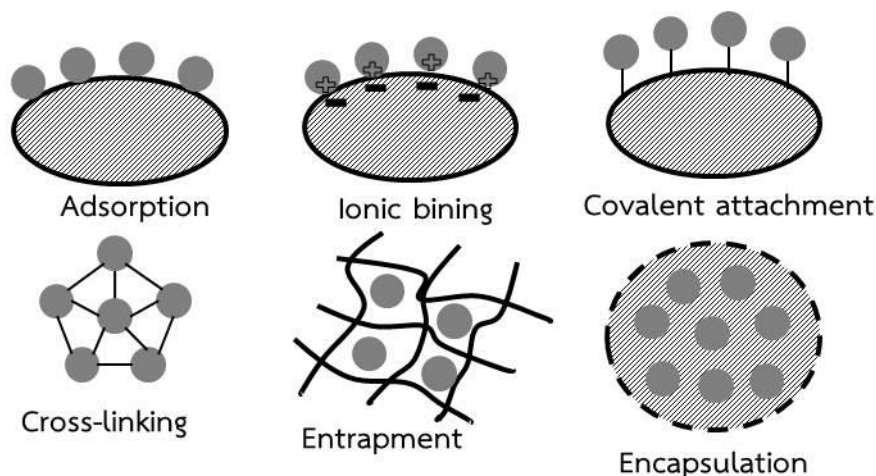
- จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย ซึ่งจะมีผลต่อระยะเวลาและปริมาณการบำบัดสารพิษ (Palanisamy และคณะ, 2014)

- การแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์เจ้าถิ่น ซึ่งจะมีผลกระทบโดยตรงกับวิธีการบำบัดที่ใช้จุลินทรีย์จากแหล่งอื่นเติมลงในพื้นที่เพื่อบำบัดสารพิษ (Nzila และคณะ, 2016)
- ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายในจุลินทรีย์ จะเป็นปัจจัยกำหนดว่าจุลินทรีย์นั้นจะสามารถย่อยสลายสารพิษได้หรือไม่ เช่น ยีน *AlkB* และ *Nah* (Das และ Chandran, 2011, Liu และคณะ, 2015)
- ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวของจุลินทรีย์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้จะช่วยทำให้ดีเซลเกิดการละลายได้ดีและสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้นโดยจุลินทรีย์ (Liu และคณะ, 2014, Yadav และคณะ, 2016)

## 2.5 การตรึงจุลินทรีย์

การใช้วิธีการทางกายภาพในการบำบัดดีเซล เช่น การใช้อุณหภูมิที่สูงในการกำจัดคราบน้ำมัน (Zhao และคณะ, 2013) การใช้การเผาคราบน้ำมันที่ผิวน้ำอาจทำให้เกิดการตกตะกอนของสารที่ได้จากการเผา (Davidson และคณะ, 2008) หรือเกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในพื้นที่บำบัด (Dave และ Ghaly, 2011) รวมถึงไม่สามารถบำบัดได้ทั้งหมด (Falciglia และคณะ, 2016, Zhang และคณะ, 2016) แม้ว่าจากรายงานก่อนหน้านี้นี้ มีรายงานการใช้แบคทีเรียทั้งบริสุทธิ์และกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ดี แต่ยังคงมีข้อจำกัดที่เกิดจากการเติมแบคทีเรียเดี่ยวหรือกลุ่มแบคทีเรียต่างถิ่นลงในสิ่งแวดล้อมใหม่ อาจเกิดการแข่งขันกับจุลินทรีย์เจ้าถิ่น และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ การตรึงแบคทีเรียหรือกลุ่มแบคทีเรียกับวัสดุจะช่วยให้แบคทีเรียมีแหล่งอาศัยยึดเกาะและสามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นได้ ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมคือการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในปัจจุบันใช้ประโยชน์มากในอุตสาหกรรมการผลิตสารหรือ อาหาร (Michelini และคณะ, 2010, De Vos และคณะ, 2010, Wu และคณะ, 2010) การตรึงจุลินทรีย์มีข้อดีหลายด้าน การตรึงเซลล์จะช่วยให้เซลล์จุลินทรีย์คงอยู่และไม่สูญเสียไปในระหว่างกระบวนการ (Wang และคณะ, 2015) จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้ สามารถใช้เซลล์ตรึงนั้นซ้ำได้ (Nopcharoenkul และคณะ, 2013) ส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายในการผลิต ข้อดีอีกอย่างคือการป้องกันเซลล์ให้ทนต่อสภาวะเครียดต่างๆ (Wang และคณะ, 2015) ในการประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์สำหรับการบำบัดสารพิษที่มีความเป็นพิษสูง การตรึงเซลล์จะช่วยป้องกันเซลล์จากสารพิษโดยตรงได้ (Chen และคณะ, 2016) ทำให้เซลล์มีความสามารถทนทานต่อสภาวะไม่เหมาะสมต่างๆ ได้สูงขึ้น (Kisukuri และ Andrade, 2015)



รูปที่ 2.2 หลักการตรึงเซลล์ (Kisukuri และ Andrade, 2015)

หลักการในการตรึงเซลล์นั้นหลักๆ สามารถแบ่งได้ตามลักษณะการยึดเกาะของเซลล์กับวัสดุตรึง (Kisukuri และ Andrade, 2015) ได้แก่

การดูดซับ (adsorption) เป็นเทคนิคการตรึงเซลล์ไว้ที่ผิวของวัสดุตรึง วัสดุตรึงจะมีลักษณะเป็นรูพรุนหรือพื้นผิวไม่เรียบ การตรึงเซลล์จะอาศัยการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับวัสดุ ที่อาศัยแรงวันเดอร์วาลส์อ่อนๆ หรือแรงจากไฮโดรโฟบิก ในการยึดเกาะของเซลล์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย แต่ข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ มักใช้ในงานที่ใช้ระยะเวลาสั้น เนื่องจากความไม่เสถียรของพันธะทำให้หลุดได้ง่าย เช่น การตรึงบนเส้นใยฝ้าย (Lin และคณะ, 2014, Wang และคณะ, 2015)

การสร้างพันธะไอออนิก (ionic binding) เป็นการตรึงเซลล์โดยอาศัยความแตกต่างของประจุไฟฟ้าที่ผิวเซลล์และวัสดุตรึงเพื่อการยึดเกาะ เช่นการตรึงเอนไซม์บน ionic exchange resin Duolite A568 ซึ่งจะใช้วิธีสร้างพันธะไอออนิก เพื่อตรึง (Guidini และคณะ, 2010)

การสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent attachment) คือการตรึงเซลล์โดยอาศัยหมู่ฟังก์ชันที่ผิวเซลล์ เช่น หมู่  $\text{NH}_2^-$ ,  $-\text{OH}$  หรือ  $-\text{SH}$  กับหมู่ฟังก์ชันของวัสดุตรึงเพื่อสร้างพันธะโควาเลนต์ วิธีนี้ไม่เหมาะกับการตรึงสิ่งมีชีวิต มักใช้กับการตรึงเอนไซม์

การกักเก็บ (entrapment) คือวิธีกักเก็บเซลล์อยู่ในช่องว่างรูพรุนของวัสดุตรึง ส่งผลให้เซลล์ไม่ได้ติดต่อกับสสารภายนอกโดยตรง ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อตรึงเซลล์ที่ต้องการความคงทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่นในการบำบัดสารมลพิษต่างๆ ที่เซลล์ที่มีความสามารถจะถูกปกป้องโดยวัสดุตรึง ทำให้เซลล์สามารถทนได้สูงขึ้น แต่เซลล์สามารถหลุดออกจากวัสดุตรึงได้ง่าย เช่น การตรึง *Candida tropicalis* บน โซเดียมอัลจิเนต คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส และไคโตซาน โดยวิธีการกักเก็บเซลล์ (Chandran และ Das, 2011)

การตรึงแบบห่อหุ้ม (encapsulation) เป็นเทคนิคที่ใกล้เคียงกับวิธีการกักเก็บ ซึ่งวัสดุที่ใช้ในวิธีการนี้มักสร้างเส้นใยเมมเบรนเสมือนที่ยอมให้บางสารผ่านได้ โดยเฉพาะเซลล์ เพื่อใช้กักเก็บเซลล์ไว้ในวัสดุ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมอย่างแพร่หลายเนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงค่อนข้างมีความเสถียร เซลล์หลุดออกได้ยาก และด้วยความคงทนของวัสดุตรึง (Kisukuri และ Andrade, 2015) เช่น Chen และคณะ (2017) ตรึงกลุ่มแบคทีเรียแล้วบนแคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับแอคติเวทคาร์บอนเพื่อย่อยสลายน้ำมันดิบ

จากข้อดีในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ที่กล่าวมา เป็นได้ว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารมลพิษได้มากกว่าการใช้จุลินทรีย์อิสระ ดังนั้นจึงเป็นอีกหนึ่งวิธีที่มีการใช้ในงานบำบัดสิ่งแวดล้อม

## 2.6 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียตรึงเพื่อการบำบัดน้ำมันทางชีวภาพรวมถึงดีเซล

รายงานการใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงบนตัวกลางเพื่อย่อยสลายดีเซลโดย Cuenca และคณะ (2006) เกี่ยวกับการบำบัดน้ำปนเปื้อนน้ำมันโดยใช้วิธี Anaerobic Fluidized Bed Reactor (AFBR) โดยใช้น้ำประปาเติมดีเซลความเข้มข้นตั้งแต่ 100, 200 และ 300 มล./ล. โดยมีการเติมอาหารเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์และสามารถสร้างไบโอฟิล์มบนเม็ดคาร์บอนที่ซึ่งใช้เป็นวัสดุภายใน reactor ดังกล่าว เป็นการบำบัดที่ต่อเนื่องนาน 177 วัน โดยแบ่งเป็นสองช่วงระยะเวลา ซึ่งการบำบัดจะใช้เวลาช่วงแรกคือ 65 วัน จากนั้นบำบัดต่อจนครบ 117 วัน สามารถลดค่า COD ให้อยู่ในช่วง 61.9 และ 84.1 % รวมถึงปริมาณดีเซลลดลงต่ำกว่า 50 มล./ล.

Lohi และคณะ (2008) ใช้ชิ้นส่วนหินลาวาเป็นวัสดุตรึงจุลินทรีย์เพื่อการบำบัดดีเซลปนเปื้อนในน้ำเสียสังเคราะห์ ก่อนใช้วัสดุดังกล่าวเพื่อเป็น biomass ใน Rotating Biological Contactor (RBC) ที่เคยใช้เพื่อการบำบัดน้ำเสียมาก่อน โดยทดลองในระบบ three-phase fluidized bed reactor ร่วมกับการเติมสารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงไว้และเติมดีเซลความเข้มข้น 50-700 มล./ล. พบว่าสามารถย่อยสลายดีเซลได้ 100% ในระยะเวลา 12 วัน

Ławniczak และคณะ (2011) ตรึงกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบไปด้วยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซล (*Achromobacter denitrificans*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Rahnella aquatilis* และ *Stenotrophomonas maltophilia*) โดยการสร้างไบโอฟิล์มบนตัวพาที่เป็นเซลลูโลส แบคทีเรียตรึงสามารถย่อยดีเซลได้สูงถึง 80 % ส่วนเซลล์อิสระย่อยสลายได้เพียง 35 %



Hou และคณะ (2013) ศึกษาการตรึงแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. F9 บนข้าวฟ่างทางหมาแบบเม็ดพอง กับ เยื่อที่เป็นสารประกอบแคลเซียมแอลจินेट-โคโคซาน แบคทีเรียที่ถูกตรึงสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้เร็วกว่าแบคทีเรียอิสระ สามารถย่อยดีเซลได้มากกว่า 80% ในเวลา 1 วัน ในขณะที่เซลล์อิสระย่อยดีเซลได้เพียง 45% และใช้ระยะเวลานาน 2 วัน สุกท้ายที่ 7 วัน แบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลในอาหารได้มากกว่า 90%

Simons และคณะ (2013) ตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนตัวกลางระหว่างแอลจินेटและเศษเปลือกหอยทะเลเพื่อย่อยสลาย weathered oil ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อ ล.ในน้ำทะเล พบว่าการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนเศษเปลือกหอยทะเล และร่วมกับการเติมยูเรีย  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}_2$  200 กรัม และ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  45 กรัม สามารถย่อยสลาย ไฮโดรคาร์บอน  $\text{C}_{32}$  ได้  $75 \pm 14\%$  ขณะที่ชุดควบคุมสลายตัวไปเพียง  $20 \pm 1.42\%$  หลังผ่านไป 12 สัปดาห์

Nopcharoenkul และคณะ (2013) รายงานว่า *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 เพื่อย่อยสลายดีเซลในอาหาร CFMM โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลายดีเซล น้ำมันดิบ *n*-tetradecane และ *n*-hexadecane ที่ความเข้มข้น 450 มล./ล.ได้ 89, 83, 92 และ 65 % ในเวลา 9 วัน และเมื่อใช้แบคทีเรียตรึงบนผิวเม็ดพลาสติก พบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 100 มล./ล. ได้หมดในเวลา 7 วัน และสามารถย่อยสลายดีเซล เข้มข้นเริ่มต้น 200 มก./ล และเติมดีเซลทุก 3 วัน จนระยะเวลา 15 วัน ได้ต่อเนื่องและดีกว่าแบคทีเรียอิสระ เมื่อความเข้มข้นของดีเซลเพิ่มขึ้นเป็น 500, 1,000, 5,000, 10,000, 15,000 และ 20,000 มก./ล การย่อยสลายดีเซลเท่ากับ 96, 87, 78, 57, 48 และ 26% ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียตรึงสามารถใช้บำบัดซ้ำได้อย่างน้อย 70 ครั้ง โดยที่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลมากกว่า 80 %

Lin และคณะ (2014) ตรึง *Acinetobacter* sp. HC8-3S บนเส้นใยฝ้ายซึ่งทำหน้าที่เป็นทั้งตัวดูดซับน้ำมันดิบและเป็นวัสดุตรึง สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 10 กรัม/ล. ได้มากกว่า 60% ในเวลา 5 วัน ซึ่งย่อยสลายได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

Wang และคณะ (2015) คัดแยก *Pseudomonas* sp ODB-1, *Brevundimonas* sp. ODB-2 และ *Brevundimonas* sp. ODB-3, จากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมันเพื่อย่อยสลายดีเซล และตรึงแบคทีเรียบนกราไฟท์ เพอร์ไลต์ และถ่านไม้ผุ ส่งผลให้แบคทีเรียตรึงนี้สามารถทนต่อความเค็มได้มากกว่าเซลล์อิสระ และสามารถย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 1,600 มก./ล. โดยที่แบคทีเรียทั้งสามชนิดที่ถูกตรึงบนกราไฟท์ เพอร์ไลต์ และ *Pseudomonas* sp ODB-1 ตรึงบนถ่านไม้ผุ สามารถบำบัดดีเซลได้เกือบ 100% ส่วน *Brevundimonas* sp. ODB-2 และ *Brevundimonas* sp. ODB-3 ตรึงบนถ่านไม้ผุลดดีเซลได้มากกว่า 85% ในเวลา 6 วัน จากงานวิจัยนี้ วัสดุที่ใช้ตรึงนั้นสามารถดูดซับดีเซลได้จึงทำให้การบำบัดดีเซลเห็นผลชัดเจน และในขณะเดียวกันดีเซลที่ถูกดูดซับไว้จะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุนั้น

Chen และคณะ (2016) ตรึง *Acinetobacter venetianus* บนถ่านไม้ไผ่ ซึ่งจะพบเซลล์เข้าไปแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของลำต้นไผ่ เพื่อใช้ย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 200 มก./ล. ได้ 94% ในขณะที่เซลล์อิสระย่อยสลายได้ 82% ในเวลา 3 วัน และยังสามารถใช้แบคทีเรียตรึงซ้ำได้ 8 ครั้งโดยที่ความสามารถในการย่อยสลายยังสูงกว่า 80%

Liu และคณะ (2016) ตรึง *Rhodococcus pyridinivorans* CCHCCH11 และ *Gordonia alkanivorans* CC-JG39 บนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ร่วมกับแอคติเวทคาร์บอน สามารถย่อยสลายดีเซลในน้ำทะเลได้ 92% และ 88% ตามลำดับ

Chen และคณะ (2017) คัดแยกแบคทีเรีย 5 ชนิดคือ *Exiguobacterium* sp. ASW-1, *Pseudomonas aeruginosa* ASW-2, *Alcaligenes* sp. ASW-3, *Alcaligenes* sp. ASS-1, และ *Bacillus* sp. ASS-2 ซึ่งเมื่อรวมเป็นกลุ่มแบคทีเรียแล้วตรึงบนแคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับแอคติเวทคาร์บอนสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก ได้ 75.1% ในเวลา 7 วัน ซึ่งดีกว่าเซลล์อิสระ

## 2.7 การบำบัดสารมลพิษโดยพืช

การบำบัดสารมลพิษโดยวิธีทางชีวภาพ นอกจากการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารมลพิษแล้ว พืชนั้นสามารถใช้ในการบำบัดสารมลพิษต่างๆ พืชมีกลไกที่ใช้บำบัดสารมลพิษได้หลากหลาย เช่น การดูดซับและสะสมไว้ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ โดยเฉพาะโลหะหนัก (Dhir, 2010) การดูดซับและย่อยสลายสารมลพิษให้เป็นสารที่ไม่เป็นพิษ การปลดปล่อยเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารและใช้เป็นอาหาร การดูดซับและเปลี่ยนรูปสารมลพิษเป็นแก๊สออกสู่ชั้นบรรยากาศ การย่อยสลายสารมลพิษโดยอาศัยการทำงานร่วมกับจุลินทรีย์ที่อาศัยรอบรากพืช หรือพืชสามารถหลั่งสารออกมาทำให้สารมลพิษเปลี่ยนเป็นสารไม่มีพิษหรือมีพิษน้อยลงหรืออยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำเพื่อลดการแพร่กระจาย (Phytostabilization) (Pilon-Smits, 2005) มีการใช้พืชหลายชนิดเพื่อบำบัดสารมลพิษได้ เช่น ผักตบชวา (Lu และคณะ, 2004, Xia, 2008, Saleh, 2012, Ukiwe และคณะ, 2012, Rezania และคณะ, 2015, Jasrotia และคณะ, 2015) แหน (Priya และคณะ, 2012) ตีนตุ๊กแก (Cohen และคณะ, 2002) ต้นกก (Toyama และคณะ, 2011, Liu และคณะ, 2012, Al-Baldawi และคณะ, 2015) ต้นยาสูบ (Talano และคณะ, 2010) เฟิร์น *Azolla* (Kösesakal และคณะ, 2016) เป็นต้น

### 2.7.1 การดูดซับและสะสมสารมลพิษโดยพืช

พืชมีความสามารถในการดูดซับสารมลพิษ และสะสมไว้ที่เนื้อเยื่อส่วนต่างๆของพืช เช่น การใช้ผักตบชวา *Eichhornia crassipes* ในการบำบัดแคดเมียมความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 4 มล./ล.

และสังกะสีความเข้มข้น 5, 10, 20, และ 40 มล./ล. ในน้ำประปา พบว่า ผักตบชวาสามารถดูดซับ แคดเมียมไว้ที่รากเท่ากับ 2044 มล./กก. และดูดซับไว้ที่ลำต้นเท่ากับ 113.2 มล./กก. หลังจากผ่านไป 8 วัน และผักตบชวาสามารถดูดซับสังกะสีไว้ที่รากเท่ากับ 9,652.1 มล./กก. และดูดซับไว้ที่ลำต้น เท่ากับ 1,926.7 มล./กก. หลังจากผ่านไป 4 วัน (Lu และคณะ, 2004)

Xia (2008) ใช้ผักตบชวาในการดูดซับสาร dicofol ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชในกลุ่ม organochlorine ในน้ำที่ความเข้มข้น dicofol 1 มล./ล. พบว่าในภาวะไม่ปลอดเชื้อ สาร dicofol เหลือเพียง 0.05 และ 0.26 มล./ล. และในภาวะปลอดเชื้อ สาร dicofol เหลือเพียง 0.07 และ 0.31 มล./ล. ในชุดทดลองมีพีชและชุดที่ไม่มีพีช ตามลำดับ ในเวลา 10 วัน และพบว่าค่าครึ่งชีวิตของสาร dicofol ลดลงจาก 118-137 ชั่วโมง เหลือ 59-68 ชั่วโมงในชุดที่มีพีช ซึ่งผู้วิจัยสรุปว่ามี 2 ปัจจัย สำคัญในการบำบัดด้วยพีชคือ การสะสมของสาร dicofol ในผักตบชวา 50 % และการย่อยสลายโดย จุลินทรีย์รบกวนรากพีช 7 %

ผักตบชวายังใช้ดูดซับสารกัมมันตรังสีได้ ดังรายงานของ Saleh (2012) ใช้ผักตบชวาบำบัด ซีเซียม 137 และโคบอลต์ 60 พบว่าที่ pH 4.9 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่เกิดการสะสมซีเซียม 137 และโคบอลต์ 60 และยังพบว่า การสะสมของซีเซียมจะสูงกว่าในสภาวะที่มีโคบอลต์ แต่การสะสมโค บอลต์เมื่อมีซีเซียมอยู่ในระบบจะส่งผลให้การสะสมต่ำกว่า

Ukiwe และคณะ (2012) ใช้ผักตบชวาในการดูดซับ PAHs ในดินซึ่งสามารถดูดซับแนพทา ลีน (8.350 ไมโครกรัม/กรัม) และไพรีน (0.057 ไมโครกรัม/กรัม) ได้สูงสุดเมื่อ pH เท่ากับ 4 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งจากรายงานนี้ พบการย่อยสลาย PAHs ได้ดีที่ค่า pH ในช่วง 2.0-4.0 เมื่อ pH สูงกว่า 4.0 อัตราการย่อยสลายจะเริ่มลดลง แสดงให้เห็นว่าสารมลพิษที่โครงสร้างซับซ้อนนั้นยากต่อการย่อย สลายและ pH เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารมลพิษโดยใช้พีชเช่นกัน

Al-Baldawi และคณะ (2015) บำบัดดีเซล (0, 8700, 17,400 และ 26,100 มก./ล.) โดยใช้ กกสามเหลี่ยม (*Scirpus grossus*) ทดลองในบึงประดิษฐ์ พบว่าหลังจาก 72 ชั่วโมง ดีเซลที่ความ เข้มข้น 17,400 มก./ล. ถูกกำจัดได้ 91.5% ในขณะที่ชุดควบคุมไม่มีพีช ลดลง 54.1%. และดีเซลใน ส่วนของดินตะกอนลดลง 67.2–69.9% ในทุกการทดลอง

Al-Sbani และคณะ (2016) ใช้ต้นกระจุก (*Lepironia articulata*) ทดลองเลี้ยงในบึง ประดิษฐ์ในเรือนกระจก ที่มีดีเซลความเข้มข้น 1%, 2%, 3% และ 5% โดยปริมาตร สามารถบำบัด PAHs ได้ 96.6, 90.3, 79.9 และ 79.6% ตามลำดับ

Kösesakal และคณะ (2016) ใช้เฟิร์น *Azolla filiculoides* บำบัดน้ำมันดิบในอาหารเหลว Hoagland ความเข้มข้น 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, and 0.5% ในเรือน กระจกเป็นเวลานาน 15 วัน พบว่าสามารถย่อยสลายอะลิฟาติก และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (พีแน

นทรีน) ที่ความเข้มข้น 0.05%-0.2% ได้ 94-73% และ 81-77% ตามลำดับ ความเข้มข้น 0.3-0.5% ย่อยสลายได้ 71-63% และ 75-71%

### 2.7.2 การย่อยสลายสารมลพิษโดยพืช

สามารถใช้พืชเพื่อย่อยสลายสารมลพิษ ได้เช่น Ebel และคณะ (2007) ใช้ผักตบชวา ทดสอบกับไซโตเดียมไฮยาไนต์ที่ความเข้มข้น 5-50 มล./ล. พบว่า ที่ไซยาไนด์ความเข้มข้น 5.8 และ 10 มล./ล. ในสารละลายถูกกำจัดได้หมดจากสารละลายหลังจากเวลา 23-32 ชั่วโมง และศึกษาเมแทบอลิซึมของ  $^{14}\text{CN}$  โดยวิเคราะห์จากใบและรากผักตบชวา ซึ่งจากการตัดใบวิเคราะห์ พบว่า 40 % ของ  $^{14}\text{CN}$  จะถูกกำจัดออกจากสารละลายและอีก 10% ถูกเปลี่ยนไปเป็น  $^{14}\text{CO}_2$  หลังจากผ่านไป 28 ชั่วโมง ส่วนการวิเคราะห์รากพบ 25 % จะถูกเปลี่ยนไปเป็น  $^{14}\text{CO}_2$  หลังผ่านไป 48 ชั่วโมง และพบการสะสม  $^{14}\text{CN}$  เพียง 12 % ในเนื้อเยื่อของผักตบชวา ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นว่าเกิดการขนถ่ายไซยาไนด์สู่ส่วนต่างๆของผักตบชวา แล้วเกิดการย่อยสลายโดยพืชและปลดปล่อยออกมาในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์

ต้นยาสูบสามารถใช้บำบัดสาร 2,4-dichlorophenol พบว่า ที่ความเข้มข้นสารเท่ากับ 250, 500 และ 1,000 มล./ล. ยาสูบสามารถกำจัดได้ 98, 88 และ 83 % ตามลำดับ ในเวลา 1 ชั่วโมง โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase เกิดขึ้นในระหว่างการบำบัด (Talano และคณะ, 2010)

การใช้แหน *Lemna minor* ในการบำบัดน้ำเสียชุมชน โดย Priya และคณะ (2012) พบว่าสามารถลดค่า BOD ได้ 94.45 % และออร์โธฟอสเฟตลดลง 79.39 % ในเวลา 22 วัน

### 2.7.3 การบำบัดสารมลพิษโดยแบคทีเรียร่วมกับพืช

Kuiper และคณะ (2003) รายงานว่าการใช้แบคทีเรียร่วมกับพืช สามารถช่วยให้เกิดการย่อยสลายได้เพิ่มขึ้น ทั้งนี้พืชจะมีการปลดปล่อยสารอาหารต่างๆ เช่น กรดอะมิโน น้ำตาลที่เป็นอาหารแก่จุลินทรีย์ได้ รวมถึงแหล่งยึดเกาะเพื่อเพิ่มจำนวน แบคทีเรียให้ประโยชน์แก่พืชในด้านการช่วยย่อยสลายสารอาหารในสิ่งแวดล้อมให้พืชสามารถดูดซึมไปใช้ได้ง่ายขึ้น

นอกจากการบำบัดดีเซลแล้วยังมีการใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียในการย่อยสลายสารมลพิษอื่น เช่น สารประกอบอะโรมาติก Toyama และคณะ (2006) โดยการใช้แหนและแบคทีเรียที่อาศัยบริเวณรากแห่นในการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกในน้ำ และพบว่าแบคทีเรียที่พบบริเวณรากแห่น เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เพิ่มจำนวนโดยแหนและยังช่วยย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกได้มากกว่าน้ำที่ไม่มีแบคทีเรียที่รากแห่น

Yamaga และคณะ (2010) คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลจากรากแห่น คือ *Acinetobacter calcoaceticus* P23 และทดลองตรึงแบคทีเรียดังกล่าวกับแห่น พบว่า แบคทีเรียสามารถยึดเกาะบนรากแห่นและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของแห่น เมื่อเทียบกับแห่นที่ไม่มีแบคทีเรีย จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากพืชสามารถนำไปยึดเกาะบนรากพืชใหม่ได้และเป็นภาวะที่มีการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันของพืชกับแบคทีเรียบริเวณรากพืช การใช้แห่น (*Spirodela polyrrhiza*) ร่วมกับการตรึงแบคทีเรียรอบรากของแห่นเพื่อย่อยสลาย 2-ไนโตรฟีนอล (2-NP) 4-ไนโตรฟีนอล (4-NP) และ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล (2,4-DNP) ความเข้มข้นชนิดละ 10 มล./ล. ในน้ำ พบว่าชุดทดลองที่มีแห่นสามารถย่อยสลาย 2-NP ได้ 8-36 % และ 23-100 % ย่อยสลาย 4-NP ได้ 40-89 % และ 25-87 % และย่อยสลาย 2,4-DNP ได้ 52-74 % และ 43-98 % ในเวลา 10 วันแรกและอีก 10 วันถัดมา ตามลำดับ การทดสอบการดูดซับสารไนโตรฟีนอลในแห่นในสภาพปลอดเชื้อพบว่า 2-NP ลดลงเพียง 18 % 4-NP ลดลงเพียง 10 % และ 2,4-DNP ลดลงเพียง 2 % การย่อยสลายสารไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่บริเวณรอบรากแห่นมากกว่าการดูดซับไว้โดยแห่น (Kristanti และคณะ, 2012)

Afzal และคณะ (2012) ใช้ Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* var. Taurus) ที่มีรายงานว่าสามารถทนต่อดีเซลได้ ปลูกลงในดินไม่ปลอดเชื้อที่ปนเปื้อนดีเซล 7.5 กรัม/กก.ของดินแห้ง โดยเติมแบคทีเรียที่ย่อยสลายอัลเคนได้ ซึ่งได้แก่ *Pantoea* sp. ITS110 *Pantoea* sp. BTRH79 และ *Pseudomonas* sp. MixRI75 ที่คัดแยกได้จากบริเวณรอบรากและผิวรากของ Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* var. Taurus) และ birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* var. Leo) ลงในดินโดยตรงแต่ละชนิด และรวมกันทั้งสามชนิด เปรียบเทียบกับการดูดซับไว้กับเมล็ดของ Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* var. Taurus) พบว่าการเติมแบคทีเรียสามชนิดรวมกันสามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุด เท่ากับ 79 % ในเวลา 93 วัน นอกจากเพิ่มความสามารถในการบำบัดดีเซลแล้ว แบคทีเรียยังช่วยเพิ่มการเจริญของพืช โดยพบว่าน้ำหนักแห้งของพืชเพิ่มขึ้น 12-44 % เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย

Liu และคณะ (2012) ใช้ต้นกก 4 ชนิดได้แก่ *Scirpus triqueter*, *Phragmites australis*, *Carex phacota* และ *Sagittaria sagittifolia* เพื่อบำบัดดินตะกอนปนเปื้อนดีเซลจากแม่น้ำ Huangpu-Yangtze ร่วมกับจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนปนเปื้อนนี้ พบว่าสามารถย่อยสลายดีเซลได้ 76-80% (15 000 มก./กก.) ในเวลา 60 วัน

Tara และคณะ (2014) ใช้หญ้ามาเลเซีย (*Axonopus affinis*) ปลูกลงในดินที่ปนเปื้อนดีเซล 1% (w/w) ร่วมกับ *Pseudomonas* sp. ITRH25, *Pantoea* sp. BTRH79 และ *Burkholderia* sp. PsJN, ทั้งการเติมแบบแยกและการเติมรวมกันเป็นกลุ่มแบคทีเรีย ใช้ระยะเวลา 90 วัน พบว่าดีเซลมีผลในการยับยั้งการเจริญของพืช แต่การเติมกลุ่มแบคทีเรียทั้งสามช่วยให้การเจริญของพืชเพิ่มขึ้น 5-

46% เมื่อเทียบการไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย อีกทั้งการเติมกลุ่มแบคทีเรียทั้งสามชนิดสามารถย่อยสลายดีเซลได้สูงสุด คือ 89% ในขณะที่พืชไม่เติมกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายได้ 46%

Zhang และคณะ (2014b) ศึกษาการย่อยสลายดีเซล (6,000 มก./กก.) ในดิน(1,500 กรัม/กระถาง) ที่ใช้การปลูกต้นกกสามเหลี่ยม (*Scirpus triqueter*) ร่วมกับ *Pseudomonas* sp. J4AJ ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ หลังจาก 60 วัน พบว่าย่อยสลายดีเซลได้  $54.51 \pm 0.15\%$  ทั้งนี้ยังพบว่าดีเซลเป็นพิษต่อพืชเนื่องจากเกิดการยับยั้งการเจริญของพืช แต่การเติมแบคทีเรียสามารถช่วยให้การเจริญของพืชเพิ่มขึ้นทั้งความสูงและมวลของลำต้น นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส และดีไฮโดรจีเนส และพบว่ามีเปลี่ยนแปลงรูปแบบประชากรในดินที่ปลูกพืชร่วมกับการเติมแบคทีเรียดังกล่าว

Balseiro-Romero และคณะ (2016) ใช้พืชลูพิน (*Lupinus luteus*) ร่วมกับแบคทีเรียรอบรากพืชที่เป็นแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช และเติมทั้งแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลและแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชลงในกระถาง โดยมีดีเซลความเข้มข้น 1.25%, w/w หลังจาก 1 เดือน พบว่าในดินที่เติมดีเซลจะส่งผลให้การเจริญของพืชลดลงเมื่อเทียบกับดินที่ไม่เติมดีเซล แต่ในขณะเดียวกันในดินที่เติมดีเซลจะพบว่าพืชที่มีการเติมแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญ พืชสามารถเจริญได้ดี แต่การย่อยสลายดีเซลได้สูงสุดมาจากการเติมทั้งแบคทีเรียย่อยดีเซลร่วมกับแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญ ซึ่งสูงกว่าชุดที่ไม่เติมแบคทีเรีย 15–20% และสูงกว่าชุดที่เติมเพียงแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล 10% อีกทั้งยังพบว่าการเติมทั้งแบคทีเรียย่อยดีเซลร่วมกับแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญลงในพืช จะพบดีเซลที่สกัดออกด้วยน้ำ หลังจาก 30 วันนั้นสูงขึ้น 15-25% เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ซึ่งเป็นผลมาจากสารที่พืชหลั่งออกมาจากรากและความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล

Al-Baldawi และคณะ (2017) ใช้กลุ่มแบคทีเรียรอบรากพืช ประกอบด้วย *Bacillus aquimaris*, *Bacillus anthracis* และ *Bacillus cereus* เพื่อย่อยสลายดีเซลปนเปื้อนในพื้นที่ชุ่มน้ำจำลองร่วมกับการปลูกกกสามเหลี่ยม (*Scirpus grossus*) พบว่าหลังจาก 63 วัน ปริมาณดีเซลลดลง 72% และ 84% ในน้ำในชุดที่ไม่เติมกับเติมกลุ่มแบคทีเรียตามลำดับ ส่วนในดินสามารถลดดีเซลได้ 59% และ 77% ตามลำดับ จากการทดลองนี้ กลุ่มแบคทีเรียช่วยเพิ่มการย่อยสลายดีเซลในทั้งในน้ำและในดิน ทำให้การย่อยสลายดีเซลดีกว่าการใช้พืชเพียงอย่างเดียว อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชโดยการลดสภาวะเครียดจากปริมาณดีเซลและช่วยป้องกันความเป็นพิษจากดีเซลต่อพืช

จากรายงานข้างต้น กระบวนการบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนดีเซลสามารถบำบัดโดยการเติมแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลโดยตรงลงในพื้นที่ที่ต้องการบำบัด ทั้งกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียเดี่ยว แต่อาจไม่สามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมที่ประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตดั้งเดิม

ได้ การเติมแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลโดยตรงบนวัสดุหรือเศษวัสดุทางชีวภาพ หรือแม้แต่การยัดเกาะบนรากพืช จะสามารถช่วยให้แบคทีเรียที่เติมลงไปอยู่รอดได้สูงขึ้น ส่งผลให้เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายได้สูงขึ้น (Hou และคณะ, 2013) โดยจากงานวิจัยที่ใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อาศัยรอบรากพืชในการย่อยสลายสารมลพิษนั้น สามารถช่วยเพิ่มการบำบัดสารมลพิษได้ และพบว่าพืชน้ำหลายชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษได้หลากหลาย

จากรายงานของ Afzal และคณะ (2013) ได้ศึกษาวิธีการใช้พืช Ryegrass เพื่อการย่อยสลายดีเซลในดิน ร่วมกับการใช้แบคทีเรีย *Burkholderia phytofirmans* PsJN ที่มีความสามารถนั้นไปเกาะที่พืชโดยการโดยการตรึงบนเมล็ดพืช การเติมลงในดินโดยตรง การพ่นแบคทีเรียในระหว่างการงอกของพืช หรือการใส่ที่ใบพืชหลังเจริญ 1 สัปดาห์ เพื่อเป็นการให้แบคทีเรียดังกล่าวสามารถยึดเกาะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซล ซึ่งพบว่าการเติมแบคทีเรียสามารถลดดีเซลได้ 24.4-49.7% โดยการเติมแบคทีเรียโดยตรงลงในดินสามารถลดได้ 8.35 กรัม/กก.ดิน และการตรึงแบคทีเรียบนเมล็ดพืชสามารถย่อยสลายได้ 7.60 กรัม/กก.ดิน

Kristanti และคณะ (2014) ใช้กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากแห่น ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรียย่อยสลายไนโตรฟินอล (*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ MFR-1, *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ PFR-1 และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ DFR-1) เติมลงในน้ำปนเปื้อน 2-ไนโตรฟินอล 3-ไนโตรฟินอล 4-ไนโตรฟินอล และ 2,4-ไดไนโตรฟินอล ร่วมกับการตรึงที่รากแห่น (*Spirodela polyrhiza*) โดยการแช่ 10 นาทีเพื่อตรึง ซึ่งจะพบแบคทีเรียบนรากเท่ากับ  $10^4$ - $10^6$  CFU/ต้นแห่น). หลังจากการตรึงพบแบคทีเรียเพียงแค่ 2 ชนิดอยู่บนราก คือ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ PFR-1 และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ DFR-1 และหลังจาก 1 วันของการทดลองย่อยสลายพบแบคทีเรียหลุดออกมาอยู่ในอาหารเหลว แต่จำนวนแบคทีเรียที่รากไม่มีการลดลง อีกทั้งสามารถพบแบคทีเรียที่รากยังคงสูงเท่าเดิมหลังการย่อยสลายซ้ำ 5 รอบ ซึ่งแห่นที่มี *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ PFR-1 จะสามารถย่อยสลาย 3-ไนโตรฟินอล และ 4-ไนโตรฟินอลได้หมดในเวลา 4 วัน ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลาย 70%, 93%, 94% และ 4% สำหรับ 2-ไนโตรฟินอล 3-ไนโตรฟินอล 4-ไนโตรฟินอล และ 2,4-ไดไนโตรฟินอล ตามลำดับ และแห่นที่มี *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ DFR-1 จะสามารถย่อยสลาย 2-ไนโตรฟินอล 4-ไนโตรฟินอล และ 2,4-ไดไนโตรฟินอลได้หมดในเวลา 4 วัน ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลาย 82%, 32%, 100% และ 100% สำหรับ 2-ไนโตรฟินอล 3-ไนโตรฟินอล 4-ไนโตรฟินอล และ 2,4-ไดไนโตรฟินอล ตามลำดับ ซึ่งสุดท้ายแล้วเมื่อใช้แห่นที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย จะสามารถย่อยสลายได้หมดทุกสารที่ทดลองในเวลา 4 วัน

งานวิจัยของ Agnello และคณะ (2016) ใช้การเติมแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC ร่วมกับพืช (alfalfa) เพื่อการบำบัดดินที่ปนเปื้อนโลหะหนักและปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอน เปรียบเทียบกับการใช้เพียงอย่างเดียวหนึ่ง พบว่าการเติมแบคทีเรียดังกล่าวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ 68% ในขณะที่การเติมพืชอย่างเดียว ลดลงเพียง 47% และเติมเฉพาะแบคทีเรียย่อยสลายได้ 59% การใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้พืชอย่างเดียว

## 2.8 ผักตบชวา

ผักตบชวามีชื่อทางพฤกษศาสตร์ *Eichhornia crassipes* Solms ชื่อสามัญว่า Water Hyacinth จัดอยู่ในวงศ์ Pontederiaceae เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบลุ่มน้ำอะเมซอนในประเทศบราซิล ทวีปอเมริกาใต้ มีการเจริญเติบโตที่ใช้เวลาสั้นทำให้สามารถขยายพันธุ์ได้เร็วโดยการแตกต้นอ่อนออกจากไหล สามารถพบได้ทั่วไปตามแม่น้ำ สามารถลอยน้ำได้ เป็นพืชที่อวบน้ำ มีรากลักษณะที่เป็นร่างแห เป็นผลดีต่อการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซับสารต่างๆ รวมถึงสามารถเป็นแหล่งยึดเกาะของจุลินทรีย์ได้ (Govindaswamy และคณะ, 2011, Rezanian และคณะ, 2015) เนื่องจากผักตบชวาเป็นพืชลอยน้ำจึงเป็นข้อดีในการเลือกใช้พืชชนิดนี้เพื่อการบำบัดดินที่ปนเปื้อนในน้ำ เนื่องจากดินจะลอยอยู่ที่ผิวน้ำเช่นเดียวกับผักตบชวา

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลจากรากพืชลอยน้ำจืด ศึกษาความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลทดสอบทั้งในอาหารเหลวและน้ำจืด เมื่อได้กลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแล้วจะใช้กลุ่มแบคทีเรียนี้เพื่อใช้ในการศึกษาการตรึงกลุ่มแบคทีเรียที่ได้บนรากผักตบชวา พร้อมทั้งตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรียหลังจากตรึงบนรากผักตบชวา จากนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนผักตบชวาในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงพืชก่อนนำไปทดลองในน้ำจืดที่ปนเปื้อน 1% ดีเซล ซึ่งวิธีการนี้เป็นการใช้วิธีการเติมแบคทีเรีย (Bioaugmentation) ร่วมกับการใช้พืชเพื่อการย่อยสลายดีเซลที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำจืด (Phytoremediation) โดยการเติมเป็นในลักษณะการตรึงแบคทีเรียบนรากผักตบชวา แทนการเติมลงไปใต้น้ำเพื่อบำบัดโดยตรงพร้อมพืช ซึ่งทำให้กลุ่มแบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับรากผักตบชวาได้ดีและจำนวนมาก



### บทที่ 3

## อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

### อุปกรณ์

1. กระจกบอกรีตยาพลาสติก ขนาด 1 และ 5 มล. บริษัท Nipro Corporation Limited, ประเทศไทย
2. ขวดแก้วฝาเกลียวเทฟลอน ขนาด 22 มล. บริษัท National Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250, 500 และ 1,000 มล. บริษัท Pyrex, ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ประกอบด้วย
  - เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, ประเทศสหรัฐอเมริกา
  - เครื่องตรวจวัด (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) บริษัท Agilent Technologies, ประเทศสหรัฐอเมริกา
  - คอลัมน์ (Column) ชนิด HP-5 บริษัท Agilent Technologies, ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Sonorex RK100 บริษัท Bandelin electronic, ประเทศเยอรมนี
6. เครื่องกวนผสมสาร รุ่น HS10-2 บริษัท Torrey Pines Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4000 บริษัท New Brunswick Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis) รุ่น Mupid-2plus บริษัท Mupid, ประเทศญี่ปุ่น
9. เครื่องชั่ง รุ่น ME 3002 และ ME 403 บริษัท Mettler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
10. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น ES-315 บริษัท TOMY digital biology, ประเทศญี่ปุ่น และรุ่น HV-25 บริษัท HIRAYAMA manufacturing, ประเทศญี่ปุ่น
11. เครื่องบันทึกภาพเจล รุ่น Gel DOC 2000TM บริษัท Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. เครื่องปั่นผสม รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, ประเทศสหรัฐอเมริกา

13. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 6500 บริษัท Kubota Corporation, ประเทศญี่ปุ่น
14. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะชนิดไม่ควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Force Micro 1418 บริษัท Lio Lab International, ประเทศไทย
15. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA รุ่น T100 Thermal Cycler บริษัท Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น Genesys 20 บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิด UV-VIS รุ่น NanoDrop 2000 บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น SevenEasy pH บริษัท Mettler-Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
19. เครื่องวัดแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น Force Tensiometer-K100 บริษัท Krüss, ประเทศเยอรมนี
20. เครื่องให้ความร้อนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. (Heating Thermostat) รุ่น SLTDB-120 บริษัท SeoulLin Bioscience, ประเทศเกาหลี
21. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด พอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (Polytetrafluoroethylene, PTFE) ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Filtrex, ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. ชุดหัวกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตท (Cellulose acetate, CA) ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Acrodisc<sup>®</sup>, Pall Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น LV1250 บริษัท Official Equipment Manufacturing, ประเทศไทย
24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ รุ่น SF-PC697 บริษัทพานาโซนิค แอ็ฟไลแอนซ์ โคลด์เซน, ประเทศไทย
25. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น BE600 บริษัท Memmert, ประเทศเยอรมนี
26. ตู้อบฆ่าเชื้อ รุ่น UE600 บริษัท Memmert, ประเทศเยอรมนี
27. ตู้อบแห้ง บริษัท Contherm Scientific, ประเทศนิวซีแลนด์
28. ตู้ดูดไอระเหยสารเคมี รุ่น FH150DC บริษัท Official Equipment Manufacturing, ประเทศไทย
29. ไมโครปิเปตต์ และ ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette Tip) ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, ประเทศฝรั่งเศส

### เคมีภัณฑ์

1. กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) บริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. กรดอะซิติก ( $CH_3COOH$ ) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
3. กรดโมลิบดิก ( $H_2MoO_4$ ) บริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
5. กลีเซอรอล ( $C_3H_8O_3$ ) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
6. คลอโรกซ์ (Clorox<sup>®</sup>) บริษัท The Clorox Company, ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ( $CHCl_3$ ) บริษัท V.S.CHEM HOUSE, ประเทศไทย
8. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals, ประเทศออสเตรเลีย
9. ดีเซล (Diesel oil) บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
10. เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) บริษัท TCL-EP, ประเทศญี่ปุ่น
11. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
12. โซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส ( $Na_2SO_4$ ) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
13. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $NaH_2PO_4$ ) Merck, ประเทศเยอรมนี
14. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) บริษัท Nacalai Tesque, ประเทศญี่ปุ่น
15. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
16. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
17. เดทтол (Dettol) บริษัท Reckitt Benckiser Group of Companies, ประเทศอังกฤษ
18. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเดคะไฮเดรต ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
19. ไดโพแทสเซียมซัลเฟต ( $K_2SO_4$ ) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
20. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
21. เตตระเมทิลีนไดอะมีน (*N,N,N',N'*-tetramethylenediamine, TEMED) บริษัท Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. ทริส[ไฮดรอกซีเมทิล]อะมิโนมีเทน (Tris) ( $C_4H_{11}NO_3$ ) บริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา
24. แบคโตเอการ์ (bacto agar) บริษัท Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
25. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Bio Springer, ประเทศฝรั่งเศส

26. พอลิยูรีเทนโฟม (Polyurethane foam) Thai Product Foam, ประเทศไทย
27. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
28. โพแทสเซียมไนเตรต ( $\text{KNO}_3$ ) Merck, ประเทศเยอรมนี
29. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
30. ฟีนอล (Phenol) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
31. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Poch, ประเทศโปแลนด์
32. ฟอร์มาไมด์ (Formamide) บริษัท Bio Basic Canada, ประเทศแคนาดา
33. เอทานอล (Ethanol) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
34. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
35. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
36. ยูเรีย ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) บริษัท Sigma-aldrich, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
37. DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder บริษัท New England Biolabs, ประเทศสหรัฐอเมริกา
38. DNA มาตรฐาน 1kb DNA ladder บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
39. DNA มาตรฐาน Lambda *HindIII* บริษัท New England Biolabs, ประเทศสหรัฐอเมริกา
40. สีคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
41. อะกาโรส (Agarose) บริษัท Cambrex Bio Science Rockland, ประเทศสหรัฐอเมริกา
42. อะคริลลาไมด์:บิส (Acrylamide:bis) (37:1) 40 % บริษัท Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
43. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) บริษัท Dolindo, ประเทศญี่ปุ่น
44. เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) บริษัท Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
45. โปรตีเนสเค (Proteinase K) บริษัท Worthington Biochemical Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา
46. ไลโซไซม์ (Lysozyme) บริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา
47. อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A) บริษัท United States Biological, ประเทศสหรัฐอเมริกา
48. *Taq* ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) บริษัท New England Biolabs, ประเทศสหรัฐอเมริกา
49. แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) บริษัท BDH Chemicals, ประเทศออสเตรเลีย

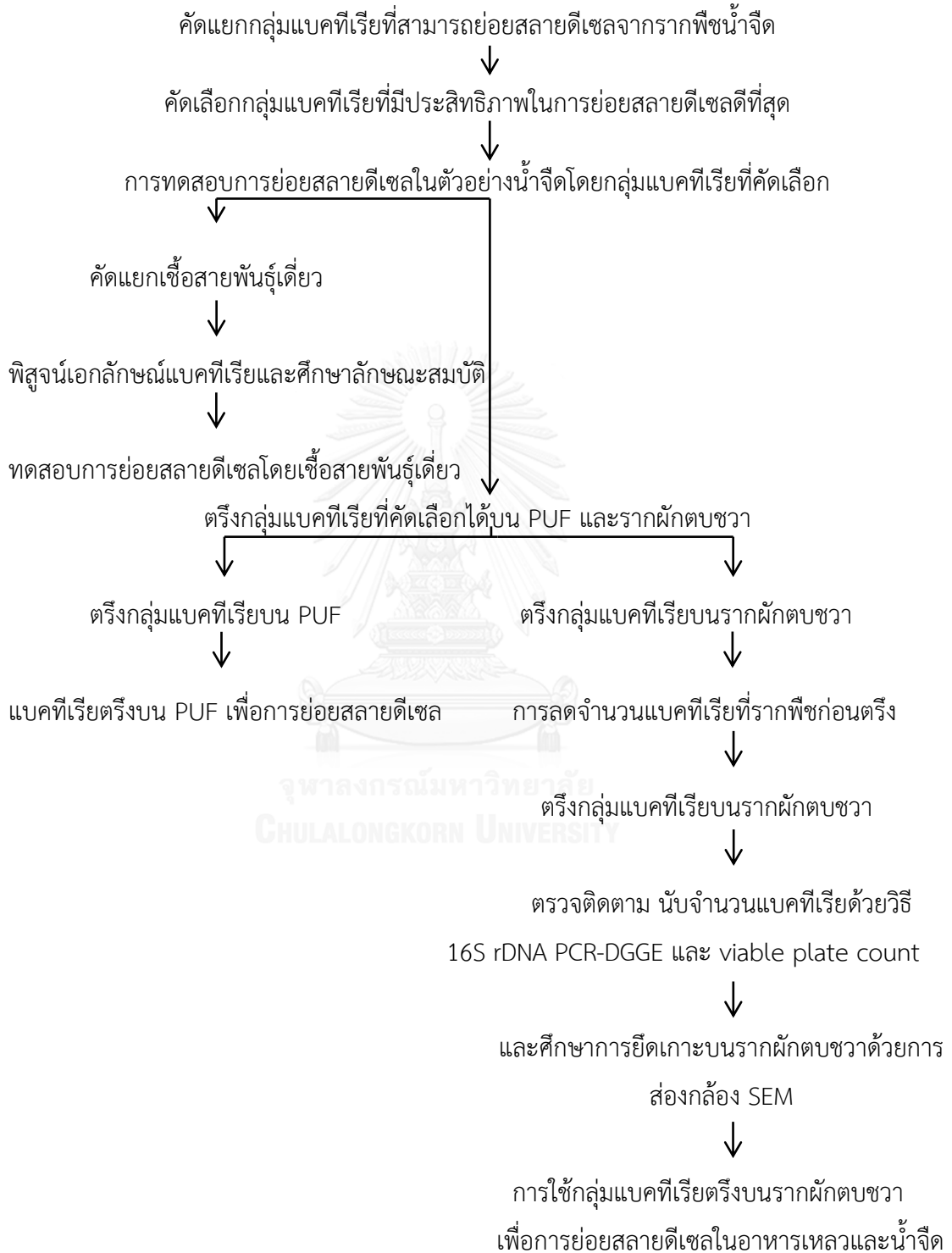
50. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) บริษัท Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
51. ไอโซโพรพานอล บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
52. ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี
53. เฮกซะเดคเคน บริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา
54. นอร์มัลเฮกเซน Merck, ประเทศเยอรมนี
55. dNTP PCR Grade, Na-Salt (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) บริษัท Takara bio, ประเทศญี่ปุ่น



ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อ้างอิง	บริษัท
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, M=C หรือ A	Porsby และคณะ, 2008	Macrogen, ประเทศเกาหลี
518F	CCAGCAGCCGCGGTAATACG		Macrogen, ประเทศเกาหลี
800R	TACCAGGGTATCTAATCC		Macrogen, ประเทศเกาหลี
933FGC-clamp	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG	Kawai และคณะ, 2002	Integrated DNA technologies, ประเทศ สหรัฐอเมริกา
1387R	GCCCGGGAACGTATTCACCG		1 <sup>st</sup> BASE Laboratories, ประเทศมาเลเซีย
1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT, Y=C หรือ T	Porsby และคณะ, 2008	Macrogen, ประเทศเกาหลี

## แผนผังงานวิจัย



## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลจากรากพืชน้ำ

#### 3.1.1 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืชน้ำได้แก่ ผักตบชวาและผักบุ้งไทย จากคลองหรือแม่น้ำทั้งที่มีการเดินเรือและไม่มี การเดินเรือแต่ผ่านแหล่งชุมชนหรือติดกับถนนที่มีรถสัญจรเป็นประจำซึ่งอาจมีการปนเปื้อนของดีเซลในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล โดยเก็บพืชทั้งต้นใส่ถุงพลาสติกพร้อมทั้งน้ำจากแหล่งที่เก็บพืชชนิดนั้นเพื่อรักษาสภาพรากต้นพืชให้คงเดิม ตำแหน่งของแหล่งที่เก็บพืชทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ค

#### 3.1.2 การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย

ตัดรากพืชจำนวน 1 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว carbon-free mineral medium (CFMM) (Komukai-Nakamura และคณะ, 1996) (ภาคผนวก ก) 100 มล. โดยเติมดีเซลความเข้มข้น 1% โดยปริมาตร (1% ดีเซล) และเติมนิสแตติน (Nystatin) ความเข้มข้น 40 มก./มล. (ภาคผนวก ข) เพื่อยับยั้งรา บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายน้ำเลี้ยงเชื้อจากขวดที่มีการเจริญของแบคทีเรียปริมาตร 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ใหม่ที่เติม 1% ดีเซล ทำซ้ำ 5 ครั้ง เพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้โดยใช้ดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว และเก็บกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกทั้งหมดในกลีเซอรอล อัตราส่วน 3:7 ในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายดีเซลต่อไป

### 3.2 ความสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลของกลุ่มแบคทีเรีย

#### 3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย

เติมกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.1.2 ปริมาตร 30 มล. (หัวเชื้อ 10%) เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 270 มล.ที่เติม 1% ดีเซล เขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์กลุ่มแบคทีเรียที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 2 ครั้ง ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย CFMM อีก 1 ครั้ง และปรับความ



เข้มข้นของปริมาณเซลล์กลุ่มแบคทีเรียให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ซึ่งมีปริมาณเซลล์ประมาณ 8 log CFU/มล.

### 3.2.2 การคัดกรองกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

เติมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียจากข้อ 3.2.1 ปริมาตร 1 มล. ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 4 มล. ที่เติม 1% ดีเซล บ่มแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ชุดทดสอบ ส่วนชุดควบคุมมีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 5 มล. ที่เติม 1% ดีเซล เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 7, 14 นับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count บนอาหารวุ้น LB (ภาคผนวก ก) ตามวิธีในข้อ 3.10 สกัดและวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ตามวิธีในข้อ 3.11 ทำ 3 ซ้ำ เลือกกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายดีเซลได้มากที่สุดในเวลาให้น้อยที่สุดเพื่อใช้ต่อไป

### 3.2.3 ความสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อ 3.2.1 ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.2.2 แต่เพิ่มระยะเวลาการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 0, 1, 3, 7 และ 14 วัน

### 3.2.4 ความสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในอาหารเหลว Hoagland's

หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อ 3.2.1 ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.2.2 แต่ใช้อาหารเหลว Hoagland's แทนอาหาร CFMM

## 3.3 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42

### 3.3.1 ตัวอย่างน้ำจืด

เก็บตัวอย่างน้ำจืดจากคลองและแม่น้ำ ได้แก่ คลองแสนแสบ คลองสามเสน คลองบางซื่อ คลองลาดพร้าว คลองสองรังสิตประยูรศักดิ์ และแม่น้ำเจ้าพระยา วัดอุณหภูมิจน สถานที่เก็บ บันทึกลักษณะสี กลิ่น และความขุ่น วัดค่า pH ส่งวิเคราะห์ค่าบีโอดี ซีโอดี ไนโตรเจนทั้งหมด และฟอสฟอรัสทั้งหมด ที่บริษัท บางกอกเอ็นจิเนียริง เซอร์วิส แอนด์ เทคโนโลยี จำกัด สกัดดีเซลตามวิธีในข้อ 3.11.1 และวิเคราะห์ปริมาณดีเซลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในข้อ 3.11.4 กรอง

ตัวอย่างน้ำที่เก็บมาได้ทั้งหมดด้วยผ้าขาวบางเพื่อนำสิ่งปนเปื้อนขนาดใหญ่ออก เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อทำได้โดยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 3.3.2 การย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดโดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือก

หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อ 3.2.1 ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.3 แต่ใช้ตัวอย่างน้ำจืดแทน และชุดควบคุมตัวคืออย่างน้ำปริมาตร 5 มล.ที่ไม่ปลอดเชื้อและปลอดเชื้อที่เติม 1% ดีเซลและไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย ทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

## 3.4 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียเดี่ยวจากกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้

### 3.4.1 การคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยว

คัดแยกแบคทีเรียเดี่ยวจากกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุด โดยใช้วิธีการเกลี่ยเชื้อบนอาหารวุ้น LB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง คัดแยกลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันและนำมาซีตบนจานอาหารวุ้น LB และ CFMM ที่เติม 1% ดีเซล เพื่อให้บริสุทธิ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สำหรับ LB และ 5-7 วัน สำหรับ CFMM เก็บรักษาแบคทีเรียเดี่ยวที่คัดแยกได้บางส่วนใน LB/CFMM slant ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อการทดลองต่อไป

### 3.4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียเดี่ยวที่คัดแยกได้

พิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียเดี่ยวที่คัดแยกได้โดย ศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แก่ การย้อมสีแกรม (gram stain) การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test) โดยชุดทดสอบ API 20NE (BioMérieux®) และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยบ่มเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส ส่งโคโลนีเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ 27F, 518F, 800R และ 1492R ที่ดำเนินการโดยบริษัท Macrogen, ประเทศเกาหลี เชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่โดยโปรแกรม BioEdit version 7.2.5 จัดจำแนกและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLASTn ทำ Phylogenetic tree โดยโปรแกรม MEGA5

### 3.5 ลักษณะสมบัติของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรียเดี่ยว

#### 3.5.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรียเดี่ยวในอาหาร CFMM ปริมาตร 90 มล. ที่เติม 1% ดีเซลในขวดรูปชมพู่ เขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 ต่อนาที 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ นำไปวัดแรงตึงผิว (surface tension) ด้วยเครื่องวิเคราะห์แรงตึงผิว (Tensiometer), (Force Tensiometer-K100, Krüss, ประเทศเยอรมนี) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ และนำตะกอนเซลล์ไปทดสอบความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ตามวิธีของ Costa และคณะ (2010) โดยล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ PUM (phosphate-urea-magnesium sulfate) (ภาคผนวก ข) 1 ครั้ง แขนงลอยเซลล์ในบัฟเฟอร์ PUM ให้มีค่า OD<sub>400</sub> ประมาณ 1.0 นำสารแขวนลอยของแบคทีเรีย ปริมาตร 4 มล. ผสมกับเฮกซะเดเคนปริมาตร 1 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมนาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ตูตสารแขวนลอยของแบคทีเรีย (ชั้นล่าง) มาวัดค่า OD<sub>400</sub> (OD<sub>400</sub>สุดท้าย) คำนวณหา % ความไม่ชอบน้ำ ดังสมการแสดงด้านล่าง

$$\% \text{ ความไม่ชอบน้ำ} = \frac{(1 - \text{OD}_{400} \text{ สุดท้าย}) \times 100}{\text{OD}_{400} \text{ เริ่มต้น}}$$

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซล เป็นชุดควบคุม

#### 3.5.2 ความสามารถในการผลิตไบโอฟิล์ม (ดัดแปลงจาก Tribelli และคณะ, 2012)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มล. บรรจุในหลอดแก้วฝาเกลียวปิดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (A<sub>600</sub>) ห้ามเขย่าหลอดขณะดูด เพื่อวัดปริมาณแบคทีเรียที่แขวนลอยในอาหารที่ไม่ได้ยึดเกาะกับขวดแก้ว (เซลล์แบคทีเรียอิสระ) ส่วนแบคทีเรียที่เหลือติดอยู่ที่หลอดแก้วคือส่วนของแบคทีเรียยึดเกาะ ซึ่งจะย้อมด้วยคริสตัลไวโอเลตความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 5 มล. เป็นเวลา 20 นาที ค่อยๆล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนหมด ซะสีของคริสตัลไวโอเลตที่ติดเซลล์แบคทีเรียด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 5 มล. ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีคริสตัลไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (A<sub>550</sub>) โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ค่าการผลิตสารไบโอฟิล์ม คำนวณจากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ถูกย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตต่อค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์อิสระ ดังสมการด้านล่าง

ปริมาณไบโอฟิล์ม =  $A_{550}/A_{600}$  หน่วยเป็น (ACV/APL)

### 3.5.3 ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตรวจสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเหลว CFMM ดำเนินการทดลองตามวิธีในข้อ 3.2.3 เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3, 7 และ 14 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.10 บนอาหารรุ้น LB สกัดและวิเคราะห์ปริมาณดีเซลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในข้อ 3.11 ชุดควบคุมคืออาหารเหลว CFMM ที่เติมดีเซลความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5% โดยปริมาตร โดยไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย ทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

### 3.5.4 ความสามารถของแบคทีเรียเดี่ยวในการย่อยสลาย 1% ดีเซล

หัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวที่แยกได้จากข้อ 3.3 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB เจือจางให้เหลือความเข้มข้น 10% ปริมาตร 270 มล. ที่เติม 1% ดีเซล เขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นหมუნเหวียงเพื่อแยกตะกอนเซลล์กลุ่มแบคทีเรียที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เติมน้ำเลี้ยงเชื้อทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 2 ครั้ง ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย CFMM และปรับความเข้มข้นของปริมาณเซลล์กลุ่มแบคทีเรียให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ซึ่งมีปริมาณเซลล์ประมาณ 8 log CFU/มล. หัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวดำเนินการทดลองตามวิธีในข้อ 3.2.3 เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3, 7 และ 14 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.10 บนอาหารรุ้น LB สกัดและวิเคราะห์ปริมาณดีเซลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในข้อ 3.11 ชุดควบคุมคืออาหารเหลว CFMM ที่เติมดีเซล 1% โดยไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย ทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

## 3.6 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนพอลิยูรีเทนโฟม

### 3.6.1 การเตรียมวัสดุตรึง

พอลิยูรีเทนโฟมจากบริษัท Thai Product Foam, ประเทศไทย ล้างด้วยน้ำประปาเพื่อกำจัดฝุ่นและสิ่งปนเปื้อน ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตัดให้มีขนาดกว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 0.5 x 1 x 2 ซม. (Chanthamalee และ Luepromchai, 2012)

### 3.6.2 การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพื่อใช้ตรึงบน PUF

เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.2.1 ปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ  $8 \log$  CFU/มล. เติมนลงในอาหารเหลว CFMM ปลอดเชื้อปริมาตร 500 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ที่บรรจุ PUF ขนาด  $0.5 \times 1 \times 2$  ซม. น้ำหนัก 2.5 กรัม เขย่าที่ 130 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยเก็บตัวอย่างอาหารเหลวและ PUF เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงทุกวันโดยวิธี viable plate count บนอาหารวุ้น LB ตามวิธีในข้อ 3.10

### 3.6.3 การนับจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่ถูกตรึงบน PUF

เก็บตัวอย่าง PUF หลังจากตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรียเป็นเวลา 1 2 และ 3 วัน ซับอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนเกินด้วยกระดาษชำระที่ปลอดเชื้อ นำ PUF ปริมาตร 1 กรัม ใส่หลอดแก้วฝาเกลียวปลอดเชื้อ เติมนสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 9 มล. นำเข้าเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงโดยใช้กำลังแรงที่สุด (35 กิโลเฮิร์ตซ์) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นผสมด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำสองครั้ง จากนั้นเจือจางสารละลายและนับจำนวนแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.10

### 3.6.4 ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียตรึงบน PUF ในการย่อยสลาย 1% ดีเซล

กลุ่มแบคทีเรียตรึงบน PUF จากข้อ 3.6.3 ปริมาณ 250 มก. เติมนลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล. ที่มีอาหารเหลว CFMM 50 มล. เขย่าที่ 130 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 5 และ 7 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count บนอาหารวุ้น LB ตามวิธีในข้อ 3.10 สกัดดีเซลตามวิธีในข้อที่ 3.11.2

## 3.7 การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา

### 3.7.1 การเตรียมผักตบชวา

เก็บผักตบชวาจากบ่อน้ำข้างภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลือกผักตบชวาที่สมบูรณ์ดี ใส่ลงในถังพลาสติกขนาด 100 ลิตร โดยบรรจุน้ำจากแหล่งน้ำดังกล่าว พักต้นผักตบชวาที่เก็บจากแหล่งน้ำ โดยเลี้ยงในแหล่งน้ำเดิมเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในถังพลาสติก ที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียสและแสงตามธรรมชาติในโรงเรือนสำหรับเลี้ยงพืช คัดเลือกต้นผักตบชวาที่สมบูรณ์อายุ 1 สัปดาห์ ย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงพืช 50% Hoagland's (Toyama และคณะ, 2006) (ภาคผนวก ก) ประมาณ 2 สัปดาห์ผักตบชวาที่ใช้ทดลองจะมีขนาดยาวประมาณ 20-25 ซม. จากยอดจนถึงปลายรากต้นแผ่กว้างประมาณ 15-20 ซม. มีจำนวนใบ 6-8 ใบ

### 3.7.2 การลดจำนวนแบคทีเรียที่รุกรานผักตบชวา

#### 3.7.2.1 การลดจำนวนแบคทีเรียโดยวิธีการแช่ในสารเคมี (ดัดแปลงจาก Daud และคณะ, 2012)

แช่ผักตบชวาจากข้อ 3.7.1 ลงในอาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อปริมาตร 200 มล. ที่เติม nystatin ความเข้มข้น 0.04 มก./มล. (Al-Mahdi และคณะ, 2012) บรรจุในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. ลดจำนวนแบคทีเรียที่รุกรานผักตบชวาโดยเติมสารเคมีลงในอาหารเหลว Hoagland's สารที่ใช้ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (6-14% คลอรีน) ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-3% โดยปริมาตร คลอโรกซ์ (โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 6% ซึ่งมีคลอรีน 5.7%) ความเข้มข้น 0.5-1.5% โดยปริมาตร และน้ำยาฆ่าเชื้อ เตทอลความเข้มข้น 0.5-3% โดยปริมาตร แช่ผักตบชวาในอาหารเหลวที่ผสมสารฆ่าเชื้อดังกล่าว เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกลักษณะของผักตบชวาหลังจากแช่ สารเคมี ตัดรากทั้งก่อนและหลังลดจำนวนแบคทีเรีย ชับรากด้วยกระดาษชำระปลอดเชื้อจนไม่มีน้ำ ส่วนเกินออกมาจากรากผักตบชวา ใส่ในหลอดแก้วปลอดเชื้อที่บรรจุสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์และนับจำนวนแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.7.4

#### 3.7.2.2 การลดจำนวนแบคทีเรียโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Kirzhner และคณะ, 2009)

แช่ผักตบชวาจากข้อ 3.7.1 ลงในอาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อปริมาตร 200 มล. ที่เติม nystatin ความเข้มข้น 0.04 มก./มล. บรรจุในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. ลดจำนวนแบคทีเรียที่รุกรานผักตบชวาโดยลดจำนวนแบคทีเรียรุกรานพืชโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง โดยใช้บีกเกอร์ที่มีพีชลงในอ่างของเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงโดยใช้กำลังแรงที่สุด (35 กิโลเฮิร์ตซ์) ทุก 5 นาที ย้ายผักตบชวาใส่ลงในบีกเกอร์ที่บรรจุอาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อปริมาตร 200 มล. ใหม่ แล้วใส่ลงในอ่างเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงต่ออีก 5 นาที ทำซ้ำจนครบ 20 นาที ตัดรากทั้งก่อนและหลังลดจำนวนแบคทีเรีย ชับรากด้วยกระดาษชำระปลอดเชื้อจนไม่มีน้ำส่วนเกินออกมาจากรากผักตบชวา ใส่ในหลอดแก้วปลอดเชื้อที่บรรจุสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์และนับจำนวนแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.7.4 สำหรับพืชที่ไม่ต้องการลดจำนวนแบคทีเรียสามารถนำไปทดลองโดยการล้างด้วยน้ำประปาโดยปล่อยน้ำไหลผ่านนาน 2 นาทีก่อนนำไปทดลอง

### 3.7.2.3 การลดจำนวนแบคทีเรียโดยวิธีการแช่ในสารเคมีร่วมกับการใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง

แช่ผักตบชวาจากข้อ 3.7.1 ลงในอาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อปริมาตร 200 มล. ที่เติม nystatin ความเข้มข้น 0.04 มก./มล. บรรจุในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. ลดจำนวนแบคทีเรียที่รอบรอกผักตบชวาโดยลดจำนวนแบคทีเรียรอบรอกผักตบชวาใช้สารเคมีที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.7.2.1 ก่อนและตามด้วยการลดจำนวนโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงโดยใช้กำลังแรงที่สุด (35 กิโลเฮิร์ตซ์) ตามวิธีในข้อ 3.7.2.2 ใส่บีกเกอร์ที่มีพีชลงในอ่างของเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงโดยใช้กำลังแรงที่สุด (35 กิโลเฮิร์ตซ์) ทุก 5 นาทีย้ายผักตบชวาใส่ลงในบีกเกอร์ที่บรรจุอาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อปริมาตร 200 มล. ใหม่ แล้วใส่ลงในอ่างเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ต่ออีก 5 นาที ทำซ้ำจนครบ 20 นาที ตัดรากทั้งก่อนและหลังลดจำนวนแบคทีเรีย ชั้บรากด้วยกระดาษชำระปลอดเชื้อจนไม่มีน้ำส่วนเกินออกมาจากรากผักตบชวา ใส่ในหลอดแก้วปลอดเชื้อที่บรรจุสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์และนับจำนวนแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.7.4 สำหรับพีชที่ไม่ต้องการลดจำนวนแบคทีเรียสามารถนำไปทดลองโดยการล้างด้วยน้ำประปาโดยปล่อยน้ำไหลผ่านนาน 2 นาทีก่อนนำไปทดลอง

### 3.7.3 การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา

เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.2.1 แต่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland's และใช้อาหารเหลว Hoagland's ปรับปริมาณให้เซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $8 \log \text{CFU/มล.}$  ใส่หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ปริมาตร 500 มล. ในบีกเกอร์ปลอดเชื้อขนาด 500 มล. ที่มีแท่งแม่เหล็กกวนปลอดเชื้อ นำผักตบชวาจากข้อ 3.7.1 แช่ลงในบีกเกอร์แล้วกวนด้วยเครื่องกวนผสมสารเพื่อให้ น้ำเกิดการไหลเวียนที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ปล่อยไว้ในโรงเรือนโดยให้สภาวะมีแสง 12 ชั่วโมง มีด 12 ชั่วโมง ตามธรรมชาติ ที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 2 และ 3 วัน ตัดรากทั้งก่อนและหลังตรึง ชั้บรากด้วยกระดาษชำระปลอดเชื้อจนไม่มีน้ำส่วนเกินออกมาจากรากผักตบชวา ใส่ในหลอดแก้วปลอดเชื้อที่เติมสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากรากตามวิธีในข้อ 3.7.4 และอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 3.10 สกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรโดยวิธี PCR-DGGE ตามวิธีในข้อ 3.12

ทดสอบการตรึงกลุ่มแบคทีเรียทั้งในผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียบริเวณราก และผักตบชวาที่ไม่ผ่านการลดแบคทีเรีย บันทึกสภาพของพีชก่อนและหลังการตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย หา น้ำหนักแห้งของรากและต้นผักตบชวา ตรวจสอบการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนพื้นผิวรากผักตบชวาโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เทียบกับรากพีชก่อนตรึง เพื่อศึกษา ลักษณะการยึดเกาะของกลุ่มแบคทีเรียที่ผิวรากตามวิธีในข้อ 3.7.5

### 3.7.4 การนับจำนวนแบคทีเรียบนรากผักตบชวา

ตัดตัวอย่างรากผักตบชวาน้ำหนักเปียกประมาณ 1 กรัมก่อนและหลังการลดจำนวนแบคทีเรียจากรากและการตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยใช้น้ำส่วนเกินออกจากรากด้วยกระดาษชำระที่ปลอดเชื้อ ใส่รากในหลอดแก้วฝาเกลียวปลอดเชื้อที่บรรจุด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 9 มล. นำเข้าเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงโดยใช้กำลังแรงที่สุด (35 กิโลเฮิร์ตซ์) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นผสมด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำสองครั้ง จากนั้นเจือจางสารละลายและนับจำนวนแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.10

### 3.7.5 ตรวจสอบการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวากับกล้องจุลทรรศน์

#### อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

เตรียมตัวอย่างรากผักตบชวาทั้งก่อนและหลังการลดจำนวนแบคทีเรีย และรากผักตบชวาที่ผ่านการตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรียเป็นเวลา 1 วันใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวปลอดเชื้อเพื่อส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดดูการยึดเกาะของแบคทีเรียบนรากผักตบชวา เตรียมตัวอย่างตามวิธีของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างรากผักตบชวาถูกตรึงด้วยกลูทาร์ลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5% ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.2 นาน 1-2 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟตสองครั้ง นานครั้งละ 10 นาทีแล้วตามด้วยน้ำกลั่นอีก 1 ครั้งนาน 10 นาทีเช่นกัน กำจัดน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 30 50 70 และ 95% โดยใช้เวลาความเข้มข้นละ 10 นาที สุดท้ายล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้น 100% เป็นจำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที ทำแห้งตัวอย่างด้วยเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤติ (Critical point dryer, Quorum model K850, UK) ตัดตัวอย่างที่ผ่านการทำให้แห้งโดยสมบูรณ์แล้วบนแท่นวางตัวอย่างแล้วฉาบด้วยทองโดยใช้เครื่องฉาบโลหะ (sputter coater, Balzers model SCD 040, ประเทศเยอรมนี) ตัวอย่างที่ได้นำส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รุ่น JEOL model JSM-6400, ประเทศญี่ปุ่น)



### 3.8 การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวา

#### 3.8.1 การย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's

การทดลองทั้งหมดสามารถแบ่งเป็น 5 ชุด ดังนี้

1. อาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อที่มี 1% ดีเซล
2. อาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อที่มี 1% ดีเซลและเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42อิสระ
3. อาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อที่มี 1% ดีเซลและผักตบชวา
4. อาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อที่มี 1% ดีเซลและผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียจากราก
5. อาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อที่มี 1% ดีเซลและผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียจากรากแล้วตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42

ใช้ผักตบชวาที่มีกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงจากข้อที่ 3.7.3 จำนวน 1 ต้นต่ออาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อปริมาตร 500 มล. ในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. ที่เติม 1% ดีเซล กวนด้วยเครื่องกวนผสมสารเพื่อให้น้ำเกิดการไหลเวียนที่ความเร็ว 100 รอบ/นาทีและปล่อยไว้ในโรงเรือนโดยให้สภาพมีแสงตามธรรมชาติ ที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งน้ำหนักรวมทั้งบีกเกอร์ในวันที่ 0 ที่ทดลองและเติมอาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อ ทุกวันให้เท่ากับน้ำหนักรวมทั้งบีกเกอร์ในวันที่ 0 บันทึกอุณหภูมิและอากาศ เก็บตัวอย่างน้ำและรากผักตบชวาในวันที่ 0 และ 7 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากรากตามวิธีในข้อ 3.7.4 และอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 3.10 สกัดดีเซลตามวิธีในข้อที่ 3.11.2 และ 3.11.3 สกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรโดยวิธี PCR-DGGE ตามวิธีในข้อ 3.12 ทุกชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ เก็บต้นและรากผักตบชวาทั้งหมดอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเพื่อหาน้ำหนักแห้ง วิเคราะห์ผลการทดลองและข้อมูลเชิงสถิติตามวิธีในข้อ 3.12

#### 3.8.2 การย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืด

ตัวอย่างน้ำที่ใช้ทดสอบเก็บจากแม่น้ำเจ้าพระยาที่บริเวณท่าเรือสะพานพุทธฝั่งพระนคร ใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงบนรากผักตบชวาตามวิธีในข้อ 3.7.3 จำนวน 1 ต้นต่อตัวอย่างน้ำจืดไม่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 500 มล. ในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. ที่มี 1% ดีเซล ทดสอบการย่อยสลายโดยแบ่งเป็นชุดทดลองเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.8.1 ยกเว้นชุดที่ใช้ผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียจากราก เนื่องจากต้องการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนรากผักตบชวากับผักตบชวาตามธรรมชาติ

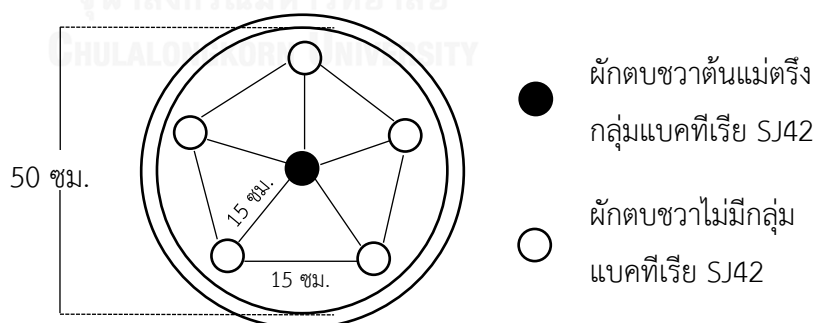
### 3.9 การแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวา

#### 3.9.1 การเตรียมผักตบชวาตามวิธีในข้อ 3.7.3

เก็บผักตบชวาจากบ่อน้ำภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทั้งหมด 5 ต้นที่มีและน้ำหนักขนาดใกล้เคียงกับผักตบชวาต้นแม่ ล้างด้วยการเปิดน้ำประปาไหลผ่าน นาน 2 นาทีก่อนใช้ ชับน้ำส่วนเกินออกจากรากด้วยกระดาษชำระปลอดเชื้อ ตัดรากปริมาณ 1 กรัม น้ำหนักเปียกเพื่อสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจติดตามประชากรแบคทีเรียในรากก่อนการทดลองโดยวิธี PCR-DGGE ตามวิธีในข้อ 3.12

#### 3.9.2 การแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จากต้นผักตบชวาต้นแม่สู่ต้นผักตบชวาอื่น

นำผักตบชวา ใส่ลงในภาชนะพลาสติกกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ซม. โดยวางผักตบชวาที่ตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรงกลางล้อมด้วยผักตบชวาอีก 5 ต้นโดยกำหนดระยะห่างระหว่างแต่ละต้นเท่ากับ 15 ซม. ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ที่งไว้ในโรงเรือนสำหรับเลี้ยงพืชโดยไม่มีการกวนน้ำเพื่อให้อากาศ และมีอุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียสให้แสงตามธรรมชาติ เก็บตัวอย่างรากผักตบชวาเมื่อผ่านไป 7 วัน โดยตัดรากปริมาณ 1 กรัม น้ำหนักเปียกเพื่อสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจติดตามประชากรแบคทีเรียและแบคทีเรีย SJ42 หลังการทดลองโดยวิธี PCR-DGGE ตามวิธีในข้อ 3.12



รูปที่ 3.1 การทดลองการแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ระหว่างรากผักตบชวา

### 3.10 การนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count

เจือจางตัวอย่างแบบ serial dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 % เพื่อให้ได้ปริมาณที่เหมาะสมและใช้เทคนิคหยด (drop plate) ลงบนอาหารวุ้น LB ปริมาตร 10 ไมโครลิตร. หยดซ้ำ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง ส่วนอาหาร CFMM ที่เติม 1% ดีเซล ใช้เทคนิคเกลี่ยบนจานอาหาร (spread plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงสำหรับอาหารวุ้น LB และ 5-7 วันสำหรับอาหาร CFMM ที่เกลี่ยด้วย 1% ดีเซล ทิ้งไว้ก่อนใช้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งหมด คำนวณเป็น CFU ต่อมล.หรือต่อกรัมตัวอย่าง

### 3.11 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณดีเซล

#### 3.11.1 การสกัดดีเซลในอาหารเหลวและตัวอย่างน้ำจืดปริมาตร 5 มล.

สกัดดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และ Hoagland's ปริมาตร 5 มล. โดยการเติมนอร์มัลเฮกเซน ปริมาณ 1 เท่า 5 มล.) ผสมให้เข้ากันกับตัวอย่างโดยเครื่องปั่นผสมนานต่อเนื่อง 2 นาที แช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายด้านบนแยกใส่หลอดทดลองใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตที่อบแห้งข้ามคืนเพื่อดึงน้ำที่เหลืออยู่ในตัวอย่างออก ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน กรองส่วนตัวทำละลายด้วยชุดกรองสำเร็จรูป PTFE วิเคราะห์ดีเซลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในข้อ 3.11.4

#### 3.11.2 การสกัดดีเซลจากอาหารเหลวและตัวอย่างน้ำจืดจำนวนมาก

ตัวอย่างอาหารเหลว Hoagland's และตัวอย่างน้ำจืดปริมาตร 500 มล. โดยใช้วิธีดัดแปลงจากวิธี liquid-liquid extraction (Al-Baldawi และคณะ, 2013) ในการสกัดดีเซลออกจากตัวอย่าง โดยใส่ตัวอย่างในกรวยแยกขนาด 1 ลิตร ค่อยๆเติมไดคลอโรมีเทนปริมาตรทั้งหมด 250 มล. (เนื่องจากตัวอย่างมีปริมาณมากจะสกัดอย่างน้อยสองรอบหรือจนกว่าจะไม่เหลือดีเซลในกรวยแยก) เขย่านาน 2 นาทีต่อเนื่อง (ความเร็ว 200 รอบ/นาที) ทิ้งให้แยกชั้นแล้วปล่อยให้ส่วนใสด้านล่างลงขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟตที่อบแห้งข้ามคืนที่ 60 องศาเซลเซียสเพื่อดูดน้ำในตัวอย่างออก ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมแล้วทิ้งให้ตกตะกอน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ขวดรูปชมพู่ใหม่ และระเหยสารไดคลอโรมีเทนในตู้ดูดควันโดยแช่ในภาดอลูมิเนียมและให้ความร้อนผ่านน้ำในภาด 60 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ 1-2 วันจนเหลือเฉพาะดีเซล ละลายดีเซลในขวดรูปชมพู่ด้วย นอร์มัลเฮกเซน

ปริมาตร 1 มล. และกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูป PTFE เก็บใส่ในหลอดแก้วขนาด 2 มล. สำหรับฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีตามวิธีในข้อ 3.11.4

### 3.11.3 การสกัดดีเซลจากรากพืช

ตัดรากพืชตัวอย่างทั้งหมด และทิ้งไว้จนไม่มีน้ำหยด แล้วใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. และตัดให้มีขนาดเล็กประมาณ 1-2 ซม. เติมนอร์มัลเฮกเซนปริมาณ 20 มล. จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาทีเป็นเวลา 2 นาทีต่อเนื่อง แล้วผสมด้วยเครื่องปั่นผสมอีก 2 นาทีต่อเนื่อง ดูดส่วนสารละลายทั้งหมดใส่ในขวดรูปชมพู่ใหม่ เติมนอร์มัลเฮกเซนที่อบแห้งข้ามคืนที่ 60 องศาเซลเซียส เพื่อดึงน้ำส่วนเกินในตัวอย่างออก ปั่นผสมเครื่องปั่นผสมแล้วทิ้งให้ตกตะกอน ดูดสารละลายใส่หลอดแก้วใหม่ ระบายสารที่ 80 องศาเซลเซียส ละลายด้วยนอร์มัลเฮกเซนปริมาณ 1 มล. และกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูป PTFE เก็บใส่ในหลอดแก้วขนาด 2 มล. สำหรับฉีดเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีตามวิธีข้อ 3.11.4 รวมรากผักตบชวาที่เหลือทั้งหมดจากการสกัดนำไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักแห้งเพื่อใช้คำนวณความเข้มข้นดีเซลที่ย่อยสลายได้ต่อกรัมรากผักตบชวา โดยเทียบกับสมการจากกราฟมาตรฐานดีเซล (ภาคผนวก ค)

$$\text{ความเข้มข้นดีเซล (มก.)} = \left[ \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟตัวอย่าง} \times 20 \text{ มล.}}{1,040.93} \right] / 2$$

### 3.11.4 การวิเคราะห์ปริมาณดีเซลโดยเครื่องวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟี

ตัวอย่างที่บรรจุในหลอดแก้วขนาด 2 มล. ฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์โดยใช้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยล้างเข็มก่อนฉีด 2 ครั้ง จากนั้นปั๊มตัวอย่างขึ้นลง 6 ครั้งก่อนฉีดผ่านคอลัมน์ capillary HP-5 ชนิด 5% Phenyl Methyl Siloxane (ยาว 30 เมตร x กว้าง 0.32 มิลลิเมตร x หนา 0.25 เมตร) อุณหภูมิคอลัมน์ทนได้สูงสุด 325 องศาเซลเซียส ใช้โหมด split ด้วยอัตราส่วนปล่อยทิ้งและฉีดเข้าเครื่อง 20 ต่อ 1 ใช้เครื่องตรวจจับสัญญาณเป็นชนิด Flame ionizing Detector (FID) โดยใช้อุณหภูมิสูง 320 องศาเซลเซียส ช่วงต้นอุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มที่ 80 องศาเซลเซียส ช่วงต่อมาขึ้นครั้งละ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ช่วงต่อมาขึ้นครั้งละ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 240 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และต่อมาขึ้นครั้งละ 40 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และสุดท้ายคงอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อัตราการไหลของฮีเลียมเท่ากับ 1.7 มล.ต่อนาที อุณหภูมิในส่วน inlet เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส

### 3.12 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรในกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE

#### 3.12.1 การสกัดดีเอ็นเอ

##### 3.12.1.1 การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียจากอาหารเหลว

สกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจาก Ausubel และคณะ (2003) ตัวอย่างแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารเหลวปริมาณ 5 มล. หมุนเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาทีในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ละลายตะกอนเซลล์ด้วย TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 517 ไมโครลิตร เติมเอ็นไซม์ไลโซไซม์ ความเข้มข้น 60 มก./มล. (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมา บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30-60 นาที เติม 20% โดยน้ำหนัก SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร กลับหลอดเพื่อผสมให้เข้ากัน เติมโปรตีนเนสความเข้มข้น 10 มก./มล. (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กลับหลอดเพื่อผสม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30-60 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 250 ไมโครลิตรอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียสก่อนใช้ บ่มหลอดที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตรเท่ากับสารในหลอด เขย่าอย่างแรงเพื่อผสมแล้วหมุนเหวี่ยงแยกชั้นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดสารเฉพาะส่วนบนใสหลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์มปริมาณเท่ากับสารในหลอด ผสมโดยดัดแปลงอย่างแรง หมุนเหวี่ยงแยกชั้นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ดูดสารเฉพาะส่วนบนใสหลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาณเท่ากับสารในหลอดเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอโดยผสมหลอดกลับประมาณ 1 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาทีแล้วเทส่วนไอโซโพรพานอลทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอลเย็นจัด ปริมาตร 400 มล. และหมุนเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทเอทานอลทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เติม TE บัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตร ที่มี RNaseA ความเข้มข้น 10 มก./มล. (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงเพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

##### 3.12.1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากรากผักตบชวา

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.12.1.1 จากตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียจากรากผักตบชวาจากข้อ 3.7.4 ปริมาตร 5 มล. เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.12.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอ

หลอมละลายอะกาโรสเจลสำหรับวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้ความเข้มข้นเจล 0.9% (ภาคผนวก ข) ใน TAE บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า เทลงบนภาชนะเตรียมเจลพร้อมหัวเสียบรอนเจลแข็ง ประมาณ 40 นาที ยกภาชนะย้ายใส่ในแชมเบอร์เพื่อต่อเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ เดิม TAE บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า จนท่วมเจล ประมาณ 2-3 มิลลิเมตรพร้อมดึงหัวที่เสียบออก โหลดดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ที่ผสมสี (6X loading dye) 1 ไมโครลิตรลงในช่องวิ่งโดยมีดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII DNA ladder ในช่องวิ่งอื่น เพื่อเปรียบเทียบ จากนั้นเปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที นำเจลออกจากเครื่องเพื่อย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ข) นาน 15-20 นาที ตรวจสอบแบนดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ด้วยเครื่อง Gel Documentation

การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ( $A_{260}$ ) และ 280 ( $A_{280}$ ) นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิด UV-VIS (Nanodrop2000) เพื่อคำนวณอัตราส่วนของความยาวคลื่น 260/280 ซึ่งค่าที่ได้ต่ำกว่า 1.8 หมายถึงตัวอย่างมีการปนเปื้อนของโปรตีนสูง และถ้ามากกว่า 2.0 แสดงถึงตัวอย่างนั้นปนเปื้อนอาร์เอ็นเอสูง โดยการคำนวณดีเอ็นเอสายคู่ เป็นดังสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

### 3.12.3 การเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยวิธีปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอเรส (Iwamoto และคณะ, 2000)

ตัวอย่างแม่แบบดีเอ็นเอจากข้อ 3.12.1.1 และ 3.12.1.2 เพิ่มจำนวนชุดดีเอ็นเอ 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 933F-GC Clamp ทางด้าน 5' และ 1387R ซึ่งจำเพาะต่อบริเวณ V6, 7, 8 region และให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 500 bp โดยใน 1 ปฏิกริยา (30 ไมโครลิตร) ใช้สารและความเข้มข้นสารดังนี้

10x PCR บัฟเฟอร์ (ความเข้มข้น 1 เท่า)	3	ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์)	0.6	ไมโครลิตร
Forward ไพรเมอร์ (933F-GC) (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Reverse ไพรเมอร์ (1387R) (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ Taq DNA polymerase (ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.2	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอต้นแบบ (ความเข้มข้นประมาณ 100-200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	23.2	ไมโครลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยดำเนินการปฏิกิริยา ตามสภาวะดังนี้

- |                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 1. Initial denaturation          | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที |
| 2. Denaturation                  | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที |
| 3. Annealing                     | อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส 1 นาที |
| 4. Extension                     | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที |
| 5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ |                                 |
| 6. Final extension               | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที |

### 3.12.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นโดยหลอมละลายอะกาโรสเจลสำหรับวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ความเข้มข้นเจล 2% (ภาคผนวก ข) ใน 1X TAE บัฟเฟอร์ เทลงบนถาดเตรียมเจลพร้อมหัวเสียบรองจนเจลแข็ง ประมาณ 40 นาที ยกถาดเจลย้ายใส่ในแชมเบอร์เพื่อต่อเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส เติม 1X TAE บัฟเฟอร์ จนท่วมเจล ประมาณ 2-3 มิลลิเมตรพร้อมตั้งหัวที่เสียบออก โหลดดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ที่ผสมสี (6X loading dye) 1 ไมโครลิตรลงในช่องวิ่งโดยเปรียบเทียบกับสารละลาย DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder ในช่องวิ่งอื่น จากนั้นเปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที นำเจลออกจากเครื่องเพื่อย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ข) นาน 15-20 นาที ตรวจสอบแบนดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ด้วยเครื่อง Gel Documentation

### 3.12.5 การตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.11.2 วิเคราะห์ประชากรแบคทีเรียด้วยวิธี DGGE (Muangchinda และคณะ, 2013) โดยใช้เครื่อง DGGE (DCode™ system, Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 8% ซึ่งมีความเข้มข้นของ denaturant ได้แก่ ยูเรียและฟอร์มาไมด์ เป็นเกรเดียนต์เท่ากับ 50-80% (องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจล ปริมาตร 32 มล. แสดงในตารางที่ 3.2) (ภาคผนวก ข) จากสารละลาย 100% โดยใช้ระบบจ่าย เกรเดียนต์ตามวิธีการเตรียมที่ระบุในคู่มือ ทำพอลิอะคริลาไมด์เจลในกระจกแซนวิช เมื่อได้เจลพร้อมเกรเดียนต์แล้วใส่หัวระหว่างกระจกแซนวิชเพื่อสร้างช่องสำหรับโหลดดีเอ็นเอ โดยห้ามมิให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องอย่างสมบูรณ์ข้ามคืนหรืออย่างน้อย 5 ชั่วโมง

นำชุดเจลพร้อมกระจกแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 1 เท่าของบัฟเฟอร์ TAE ปริมาตร 7 ลิตร โดยอุ่นบัฟเฟอร์ก่อนใช้ให้ได้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอปริมาตร 25 ไมโครลิตรกับสีติดตาม 5 ไมโครลิตรก่อนดูดใส่ช่องวิ่งของเจล ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสโดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ระยะเวลา 4 ชั่วโมง 30 นาที ย้อมฟอลิอะครีลาไมด์ เจลด้วย สาระละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ข) นาน 15-20 นาที ตรวจสอบและถ่ายภาพแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร (UV) ด้วย เครื่อง Gel Documentation





ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี denaturant 30-80%

สาร	ปริมาณของสาร (มล.)				ความเข้มข้นสุดท้าย
	denaturant 30%	denaturant 50%	denaturant 70%	denaturant 80%	
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	8.5	6.5	4.5	3.5	-
40 %อะคริลาไมด์:บิส (37:1)	3.0	3.0	3.0	3.0	8%
50 XTAE*	0.3	0.3	0.3	0.3	1X
7 โมลาร์ ยูเรีย*	1.9	3.1	4.3	4.9	แปรผัน
40% ฟอร์มาไมด์	1.8	3.0	4.2	4.8	แปรผัน
กลีเซอรอล	0.3	0.3	0.3	0.3	2%
10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS)*	0.081	0.081	0.081	0.081	0.5 กรัม/ล.
เตตระเมทิลีนไดอะมีน (TEMED)	0.01	0.01	0.01	0.01	-

\* วิธีเตรียมตามที่ระบุไว้ในภาคผนวก ข

### 3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของผลการย่อยสลายดีเซล การเปลี่ยนแปลงจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 คัดแยก พิสูจน์เอกลักษณ์ และศึกษาลักษณะสมบัติต่างๆของกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลาย  
ดีเซลจากรากพืชน้ำจืด

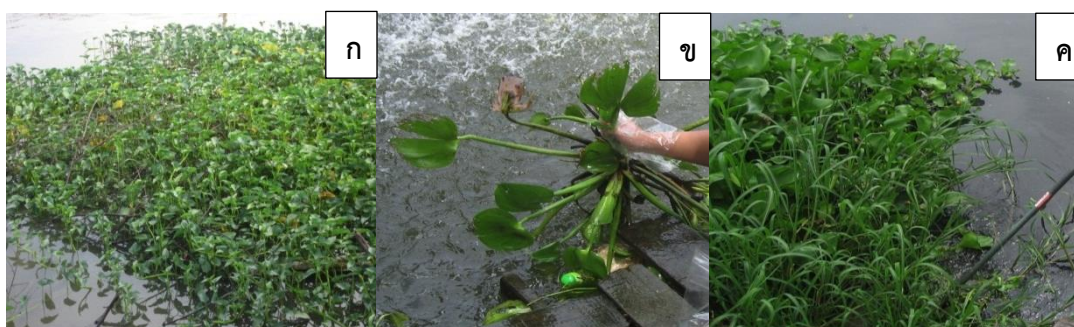
#### 4.1 การคัดแยกและคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซล

##### ก. การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากรากพืชน้ำจืด

พืชน้ำจืดที่ใช้ทดลองนี้คือ ผักตบชวา ผักบู่ไทย และหญ้าน้ำ เก็บตัวอย่างพืชน้ำจำนวน 45 ต้น  
ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลจากคลองและแม่น้ำดังที่สรุปในตารางที่ 4.1 และภาคผนวก ค  
เก็บพืชทั้งต้นและน้ำจากแหล่งอาศัยของพืช (รูปที่ 4.1) ตัดราก 1 กรัม (น้ำหนักเปียก) ใส่ลงในอาหาร  
CFMM ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน เติม 1% ดีเซลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว เขย่า 200 รอบ/  
นาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังผ่านไป 21 วัน พบอาหารเหลวที่เกิด  
การเปลี่ยนแปลงสีและความขุ่นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมรากพืช

ตารางที่ 4.1 กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากพืชน้ำชนิดต่างๆจากต่างแหล่งที่มา

ที่มา	จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย	ชื่อกลุ่มแบคทีเรีย
รากผักบู่	32	SJ31, SJ32, SJ41, SJ42, SJ51, SJ81, SJ82, SJ101, SJ102, PP1-PP23
รากผักตบชวา	17	SJ12, SJ61, SJ62, SJ71, SKR1-SKR13
หญ้าน้ำ	1	SJ91



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างผักบู่ (ก) ผักตบชวา (ข) และหญ้าน้ำ (ค) ที่เก็บเพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อย  
สลายดีเซล

#### ข. การคัดกรองกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM

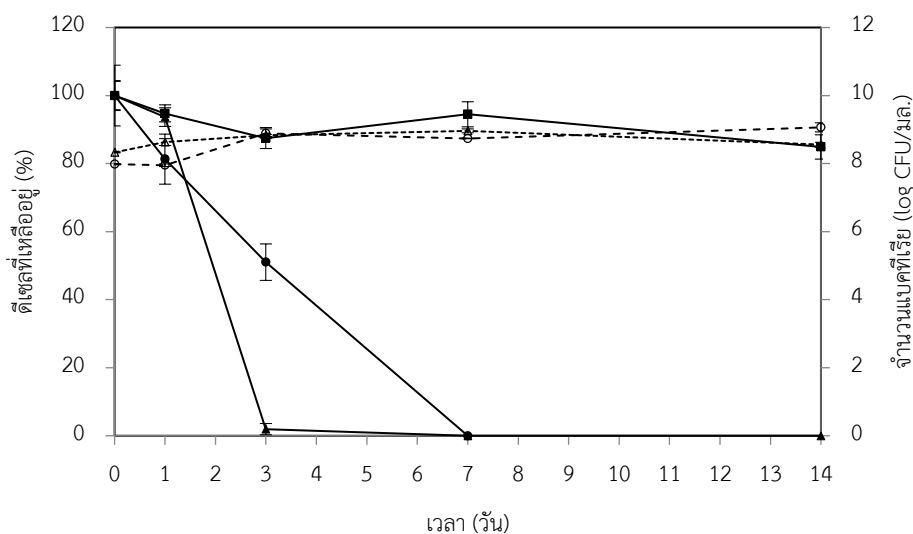
นำกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 50 กลุ่ม ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ในอาหารเหลว CFMM พบว่า มีกลุ่มแบคทีเรียที่ลดปริมาณดีเซลได้มากกว่า 95% ในเวลา 7 วัน จำนวน 14 กลุ่ม ดังแสดงในภาคผนวก ค กลุ่มแบคทีเรียได้แก่ SJ12, SJ41, SJ42, SJ51, PP3, PP8, PP9, PP10, PP20, PP21, PP22, PP23, SKR8 และ SKR12 กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้มากที่สุดคือ กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และ SJ51 ย่อยสลายดีเซลได้  $98.51 \pm 2.0\%$  และ  $98.6 \pm 0.9\%$  ตามลำดับ จึงเลือกกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และ SJ51 เพื่อศึกษาการย่อยสลายดีเซลต่อไป

#### 4.2 ความสามารถในการย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือก

##### ก. การย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว CFMM โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และ SJ51 ที่คัดเลือก

เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มที่คัดเลือกนั้นมีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้ดีพอๆกัน จึงได้เพิ่มระยะการตรวจสอบให้ละเอียดขึ้น โดยเฉพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และ SJ51 ในอาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซล เพื่อเป็นหัวข้อสำหรับทดสอบการย่อยสลายดีเซลตามวิธีในข้อ 3.3.2 เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 7 และ 14 พบว่าทั้งสองกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และ SJ51 มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้ถึง 100% ในเวลา 7 วัน โดยที่กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นั้นสามารถย่อยสลายดีเซลได้เร็วกว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ51 ที่เวลา 3 วัน ย่อยดีเซลได้  $98.06 \pm 1.6\%$  ส่วนกลุ่มแบคทีเรีย SJ51 ย่อยดีเซลได้  $48.7 \pm 5.3\%$  ในขณะที่ชุดควบคุมวันที่ 3 ดีเซลลดลง  $12.49 \pm 3.0\%$  จำนวนแบคทีเรียในชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และ SJ51 มีจำนวนเพิ่มสูงสุดที่  $8-9 \log \text{CFU/มล.}$  ในวันที่ 7 และวันที่ 14 ตามลำดับ (รูปที่ 4.2)

ดังนั้นความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ51 ที่คัดเลือกมาทดสอบ ซึ่งงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพื่อศึกษาขั้นต่อไป




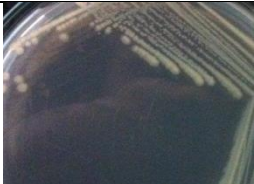
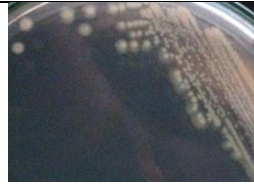



รูปที่ 4.2 การย่อยสลาย 1% ดีเซล และจำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และ SJ51

- ดีเซลในชุดควบคุม
- ▲ ดีเซลที่เหลืออยู่ (SJ42)
- ดีเซลที่เหลืออยู่ (SJ51)
- △ จำนวนแบคทีเรีย (SJ42)
- จำนวนแบคทีเรีย (SJ51)

#### ข. การคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียเดี่ยวในกลุ่มแบคทีเรีย SJ42

จากความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่คัดแยกได้ ผู้วิจัยต้องการทราบว่าแบคทีเรียชนิดใดบ้างที่เป็นสมาชิกของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ดังนั้นจึงต้องการคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยวจากกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 โดยวิธีการ spread plate พบแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่ต่างกันสามชนิด ดังแสดงในตาราง 4.3 ได้แก่ไอโซเลต S4A, S4B และ S4C พิสูจน์เอกลักษณ์ไอโซเลตจากลักษณะโคโลนี ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ รูปร่างเซลล์ การติดสีแกรม ความสามารถในการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 4.3) พบว่าทั้งสามไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ไอโซเลต S4A สามารถเคลื่อนที่ได้เพียงชนิดเดียว

ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต S4A S4B และ S4C

วิธีการพิสูจน์	ไอโซเลต S4A	ไอโซเลต S4B	ไอโซเลต S4C
ลักษณะ โคโลนี	 <p>สีน้ำตาลอ่อนขนาด ประมาณ 3-4 มม. แผ่น ผิวมัน</p>	 <p>สีเหลืองอมขาวขนาด ประมาณ 1 มม. กลม ผิวหน้าเรียบ และมัน วาว</p>	 <p>สีขาวขุ่นขนาดประมาณ 1 มม. กลม ผิวหน้า เรียบและมันวาว</p>
รูปร่าง/แกรม/ การเคลื่อนที่	 <p>ท่อนสั้น แกรมลบ เคลื่อนที่ได้</p>	 <p>ท่อนสั้น แกรมลบ เคลื่อนที่ไม่ได้</p>	 <p>ท่อนสั้น แกรมลบ เคลื่อนที่ไม่ได้</p>

ตารางที่ 4.3 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต

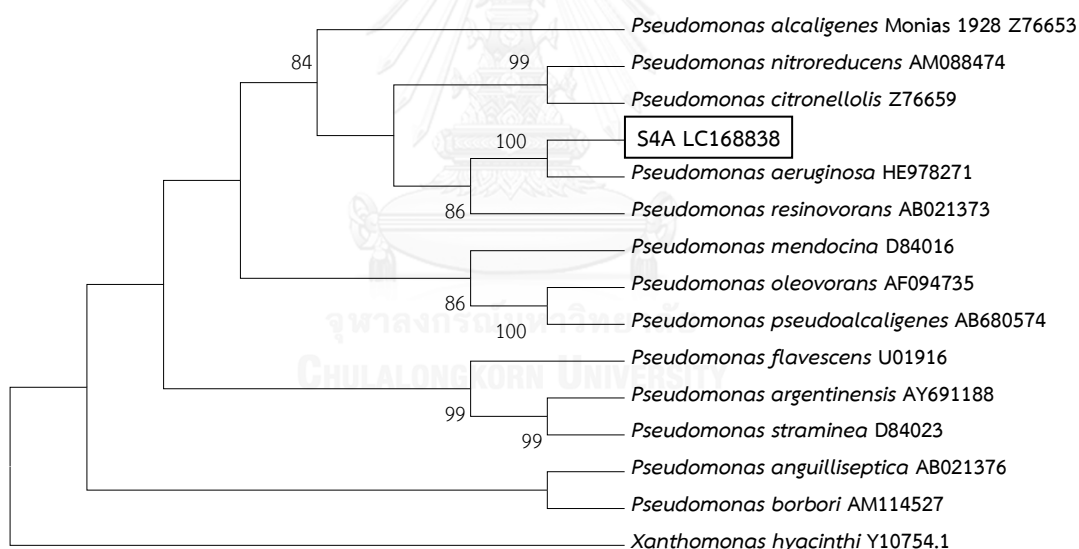
การทดสอบทางชีวเคมี	แบคทีเรียไอโซเลต		
	S4A	S4B	S4C
Nitrate reduction	+	+	+
Indole production	-	-	-
Glucose fermentation	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	-	-
Urease production	+	-	+
$\beta$ -glucosidase production	+	+	+
Gelatin hydrolysis (protease)	+	+	-
$\beta$ -galactosidase production	+	+	-
D-glucose assimilation	+	+	+
L-arabinose assimilation	-	-	+
D-mannose assimilation	-	+	+
D-mannitol assimilation	+	-	+
N-acetyl-glucosamine assimilation	+	+	+
D-maltose assimilation	-	+	+
Potassium gluconate assimilation	+	-	+
Capric acid assimilation	+	-	+
Adipic acid assimilation	+	-	-
Malic acid assimilation	+	+	+
Trisodium citrate assimilation	+	+	+
Phenylacetic acid assimilation	-	-	-
Oxidase production	+	+	+

การทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ API 20NE test kit ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3 บ่งชี้ว่าไอโซเลต S4A, S4B และ S4C เป็นแบคทีเรียชนิด *Pseudomonas aeruginosa* ความเหมือน 99.9%, *Stenotrophomonas maltophilia* ความเหมือน 99.9% และ *Ochrobactrum anthropic* ความเหมือน 85.9% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียเดี่ยว

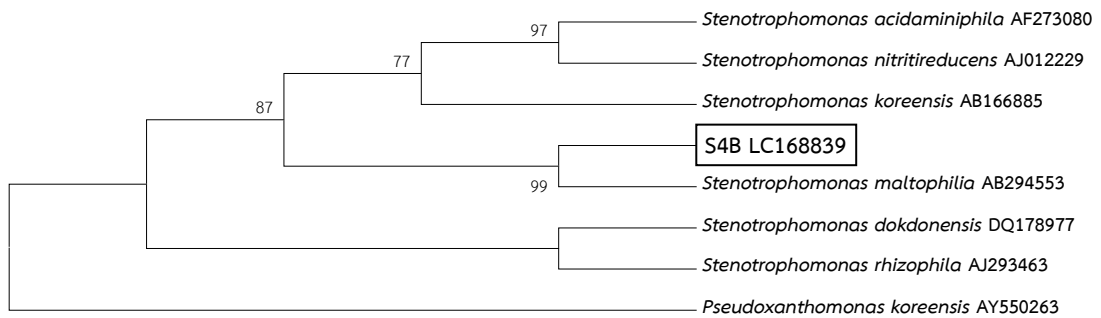
ไอโซเลต	ความเหมือนกับแบคทีเรีย	ชื่อลำดับ (Accession No.)	อ้างอิง
S4A	100% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C-NN2	LT883143.1	Fischer และคณะ, 2016
	100% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCBH4851	CP021380.1	Silveira และคณะ, 2014
	100% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692	CP017149.1	Demange และคณะ, 1990
	100% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> E6130952	CP020603.1	Xiong และคณะ, 2017
	100% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Zs1	KY437088.1	Cheng และคณะ, 2017
S4B	99% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ZSB1	KT037116.1	Sunithakumari และคณะ, 2016
	99% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> D457	HE798556.1	Lira และคณะ, 2012
	99% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ICE272	KX588617.1	Gaglio และคณะ, 2017
S4C	99% <i>Ochrobactrum intermedium</i> 13.9	HQ696468.1	Singh และคณะ, 2016
	99% <i>Ochrobactrum intermedium</i> CCUG 43465	AM490610.1	Kuss และคณะ, 2011
	99% <i>Ochrobactrum intermedium</i> M86	AB840696.1	Kulkarni และคณะ, 2013

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ ไอโซเลต S4A, S4B และ S4C โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 926, 933 และ 951 เบส ตามลำดับ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Gen Bank (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้โปรแกรม BLASTn ผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่า แบคทีเรียไอโซเลต S4A มีความเหมือนกับ *Pseudomonas aeruginosa* 100% ไอโซเลต S4B มีความเหมือนกับ *Stenotrophomonas maltophilia* 99% และไอโซเลต S4C มีความเหมือนกับ *Ochrobactrum intermedium* 99% ดังแสดงผลในตารางที่ 4.4 จากผลการวิเคราะห์แผนภาพต้นไม้ (phylogenetic analysis) โดยใช้โปรแกรม MEGA5 โดยวิธี Neighbor-Joining ตัวเลขที่กิ่งสาขาบ่งบอกผลการนับซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap แสดงว่า ไอโซเลต S4A มีความเหมือนกับ *Pseudomonas aeruginosa* ไอโซเลต S4B มีความเหมือนกับ *Stenotrophomonas maltophilia* และไอโซเลต S4C มีความเหมือนกับ *Ochrobactrum intermedium*

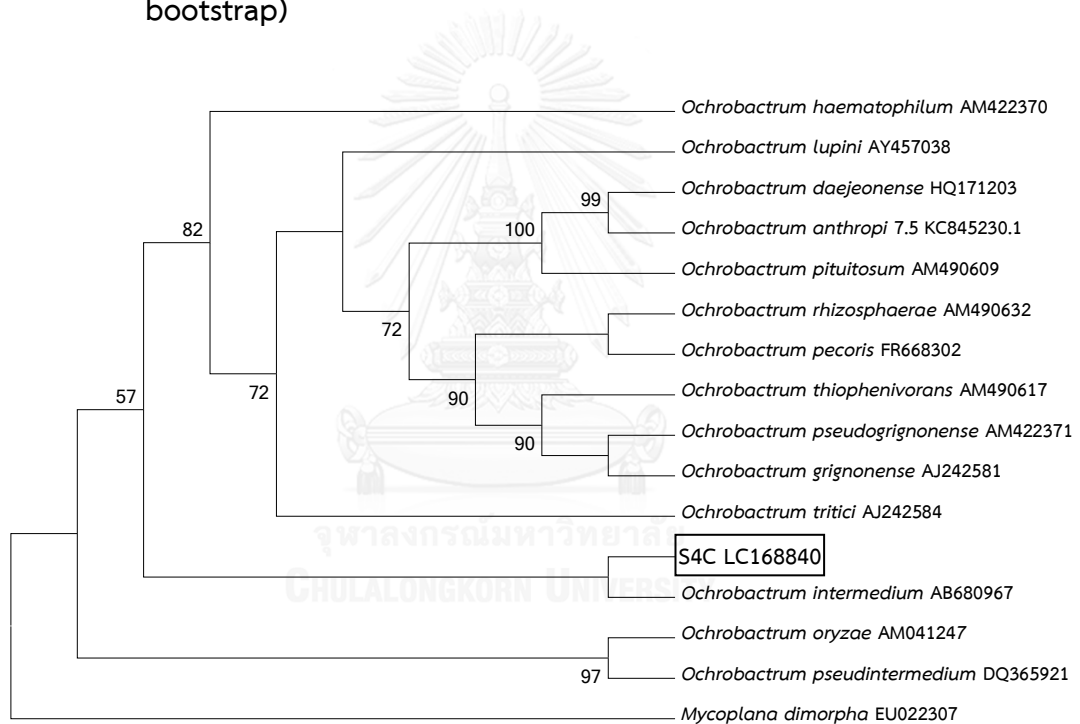


รูปที่ 4.3 การวิเคราะห์ Phylogenetic ของแบคทีเรียไอโซเลต S4A (ใช้โปรแกรม MEGA5 โดยวิธี Neighbor-Joining ตัวเลขที่กิ่งสาขา คือ ผลการนับซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap)





รูปที่ 4.4 การวิเคราะห์ Phylogenetic ของแบคทีเรียไอโซเลต S4B (ใช้โปรแกรม MEGA5 โดยวิธี Neighbor-Joining ตัวเลขที่กิ่งสาขา คือ ผลการนับซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap)



รูปที่ 4.5 การวิเคราะห์ Phylogenetic ของแบคทีเรียไอโซเลต S4C (ใช้โปรแกรม MEGA5 โดยวิธี Neighbor-Joining ตัวเลขที่กิ่งสาขา คือ ผลการนับซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap)

มีรายงานว่า *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยสลายดีเซลได้ เช่น *Pseudomonas* sp. NM1 ที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมัน สามารถย่อยสลายองค์ประกอบดีเซล (fatty acid methyl ester, C18) ได้ 76% (Di Gregorio และคณะ, 2016, Mohanram และคณะ, 2016). หรือ รายงานการใช้ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®9027 ร่วมกับพืชช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยเฉพาะดีเซลในดิน (Agnello และคณะ, 2016)

*Stenotrophomonas maltophilia* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ที่รอบรากพืช (rhizosphere) (Ryan และคณะ, 2009) และส่งเสริมการเจริญของพืชและมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารพิษ โดยเฉพาะดีเซล (Ryan และคณะ, 2009, Meyer และคณะ, 2014, Larik และคณะ, 2016)

เช่นเดียวกับแบคทีเรียในจีนัส *Ochrabactrum* สามารถใช้เพื่อบำบัดดีเซลได้ เช่น *Ochrabactrum intermedium* UFRGS14 (Colla และคณะ, 2014) และ *Ochrabactrum tritici* (Dadrasnia และ Agamuthu, 2013)

### ค. การศึกษาลักษณะสมบัติของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42

ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ดีคือ การผลิตสารลดแรงตึงผิว (Wei และคณะ, 2005, Zhang และคณะ, 2014) และความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (Kaczorek และคณะ, 2015) ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรีย ไอโซเลต S4A, S4B และ S4C

#### ค.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามข้อ 3.5.1 พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรีย S4A, S4B และ S4C สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ในงานวิจัยนี้ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ S4A สามารถลดแรงตึงผิวเหลือเท่ากับ 44.15 mN/m *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* J4 สามารถผลิตสารลดตึงผิวชนิดแรมโนลิพิดโดยใช้ดีเซลและเคโรซีนเป็นซับสเตรตในการผลิตได้ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตนั้นมีบทบาทในการช่วยให้เกิดการย่อยสลายน้ำมันได้เพิ่มขึ้นได้ (Wei และคณะ, 2005) *Pseudomonas* sp. IR1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวและสามารถย่อยสลายเนพธาลีน พีแนนทริน และไพรีนได้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นชนิดไกลโคลิพิดที่มีค่าแรงตึงผิวลดจาก 72 เหลือ 35 mN/m ซึ่งตรวจพบในระหว่างการย่อยสลายไพรีน (Kumar และคณะ, 2006) *Pseudomonas* sp. U-3 ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยก

จากพืช *Scirpus triqueter* สามารถย่อยสลายดีเซลได้ โดยมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถลดแรงตึงผิวลงได้ 30.9 mN/m (Zhang และคณะ, 2014c)

*Stenotrophomonas maltophilia* สายพันธุ์ S4B สามารถลดแรงตึงผิวเหลือเท่ากับ 56.57 mN/m มีรายงานว่า *Stenotrophomonas maltophilia* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ เช่น *Stenotrophomonas maltophilia* NBS-11 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวซึ่งลดแรงตึงผิวจาก 71±0.5 mN/m เหลือ 29.3±0.9 mN/m (Hemlata และคณะ, 2015)

*Ochrobactrum intermedium* สายพันธุ์ S4C สามารถลดแรงตึงผิวเหลือเท่ากับ 42.42 mN/m มีรายงานว่า *Ochrobactrum intermedium* สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ เช่น *Ochrobactrum intermedium* CN3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวซึ่งลดแรงตึงผิวจาก 71 mN/m เหลือ 36 mN/m (Bezza และคณะ, 2015)

กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถลดแรงตึงผิวได้มากกว่าแบคทีเรียเดี่ยว โดยสามารถลดแรงตึงผิวจาก 75.04 mN/m เหลือ 34.25 mN/m ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากคัดแยกจากสลัดจ์จากโรงงานปิโตรเคมี สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวโดยลดแรงตึงผิวได้เหลือ 36 mN/m แล้วยังสามารถย่อยสลายตะกอนสลัดจ์ปนเปื้อนน้ำมันอะโรมาติกได้ 80-90% ในเวลา 40 วัน ดังนั้นจึงเป็นอีกปัจจัยที่เกี่ยวข้องและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซล (Cerqueira และคณะ, 2011)

## ค.2. ความไม่ชอบน้ำของเซลล์แบคทีเรีย

ปัจจัยของค่าความไม่ชอบน้ำของเซลล์นั้นมีผลต่อการย่อยสลายดีเซล เนื่องจากค่าความไม่ชอบน้ำที่ผิวเซลล์ส่งผลต่อค่า bioavailability ของสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ชอบน้ำ ในที่นี้คือ ดีเซล แบคทีเรียที่มีความไม่ชอบน้ำสูงจะสามารถเข้าถึงและย่อยสลายน้ำมันนั้นได้ดีกว่าแบคทีเรียที่มีค่าความไม่ชอบน้ำที่ต่ำ (Kaczorek และคณะ, 2015)

ผลการวัดค่าความไม่ชอบน้ำของเซลล์กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีค่าความไม่ชอบน้ำเท่ากับ 35.19±0.09% *P. aeruginosa* สายพันธุ์ S4A ค่าความไม่ชอบน้ำเท่ากับ 52.92±3.40% *S.maltophilia* สายพันธุ์ S4B ค่าความไม่ชอบน้ำเท่ากับ 32.03±4.97% และ *O. intermedium* สายพันธุ์ S4C มีค่าความไม่ชอบน้ำเท่ากับ 52.84±3.69%

เมื่อเปรียบเทียบค่าความไม่ชอบน้ำของเซลล์แบคทีเรียในการทดลองนี้ พบว่ามีค่าความไม่ชอบน้ำที่ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบรายงานการก่อนหน้า เช่น *Sphingomonas* sp. VA1 และ *Acinetobacter junii* VA2 มีค่าความไม่ชอบน้ำที่สูงถึง 94% และ 81% และสามารถย่อยสลาย

น้ำมันปิโตรเลียมได้ที่ความเข้มข้น 0.5 มก./มล. ได้ 82.6% และ 75.8% ตามลำดับในเวลา 15 วัน (Kaczorek และคณะ, 2015)

นอกจากนี้การที่มีค่าความไม่ชอบน้ำที่สูงของแบคทีเรียจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการลอยตัวของเซลล์แบคทีเรีนั่นๆ และสามารถเข้าถึงน้ำมันที่ลอยที่ผิวน้ำได้ (Zhang และคณะ, 2014a) จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์ S4A และ *O. intermedium* สายพันธุ์ S4C มีค่าความไม่ชอบน้ำสูงกว่า *S. maltophilia* สายพันธุ์ S4B จึงอาจเป็นแบคทีเรียแรกเริ่มในการเข้าถึงดีเซลในอาหารเหลว ส่วน *S. maltophilia* สายพันธุ์ S4B มีค่าความไม่ชอบน้ำที่ต่ำ ซึ่งอาจมีบทบาทต่อการย่อยสลายดีเซลในส่วนสารละลายน้ำได้ตัวท้ายๆ (Gargouri และคณะ, 2015) ซึ่งจากผลการย่อยสลายดีเซลโดยแบคทีเรียเดี่ยวทั้งสามชนิด พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ S4A เท่านั้นที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ ซึ่งสอดคล้องกับค่าความไม่ชอบน้ำที่วัดได้ (รูปที่ 4.6)

### ค.3 การสร้างไบโอฟิล์ม

การทดสอบการผลิตไบโอฟิล์มโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรียเดี่ยวตามวิธีในข้อ 3.5.2 โดยดัชนีที่ใช้วัดคือ ACV/APL หลังจาก 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตไบโอฟิล์มโดยแบคทีเรียเดี่ยวทั้งสามชนิดพบว่า สามารถผลิตไบโอฟิล์มได้ และกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถผลิตไบโอฟิล์มได้ดีกว่าแบคทีเรียเดี่ยวทุกชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4.5 การผลิตไบโอฟิล์มมีผลต่อส่งเสริมการย่อยสลายดีเซลได้ เช่น *Pseudomonas extremaustralis* สามารถผลิตไบโอฟิล์มโดยมี PHA และ 5% ดีเซลในระบบเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการผลิต ไบโอฟิล์มที่ผลิตได้นั้นช่วยส่งเสริมการย่อยสลายดีเซลได้จาก 5% เป็น 20% ในระยะเวลา 7 วัน (Tribelli และคณะ, (2012) รายงานว่า *Pseudomonas aeruginosa* สามารถผลิตไบโอฟิล์มได้ อีกทั้งยังส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากขึ้น 20-40% เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม (Dasgupta และคณะ, 2013)

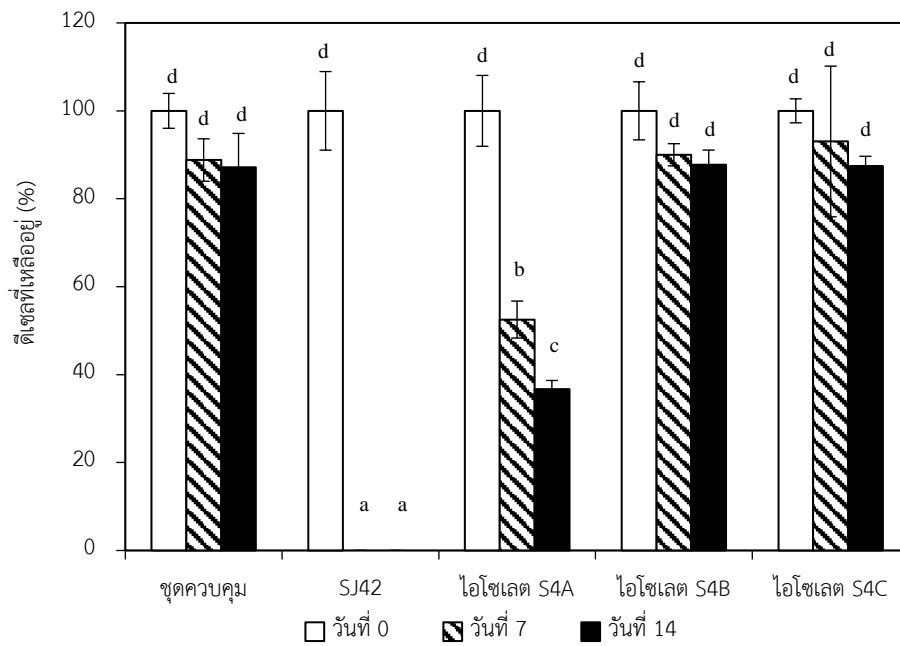
ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและความไม่ชอบน้ำของกลุ่ม  
แบคทีเรียและแบคทีเรียเดี่ยว

แบคทีเรีย	การผลิตไบโอฟิล์ม (Biofilms formation) (ACV/APL)	การสร้างสารลดแรงตึงผิว (Surface tensions) (mN m <sup>-1</sup> )	% ความไม่ชอบน้ำของ เซลล์ (Hydrophobicity)
ชุดควบคุม	-	75.04	-
SJ42	2.72±0.16	34.25	35.19±0.09
S4A	1.34±0.47	44.15	52.92±3.40
S4B	1.22±0.20	56.57	32.03±4.97
S4C	1.97±1.39	42.42	52.84±3.69

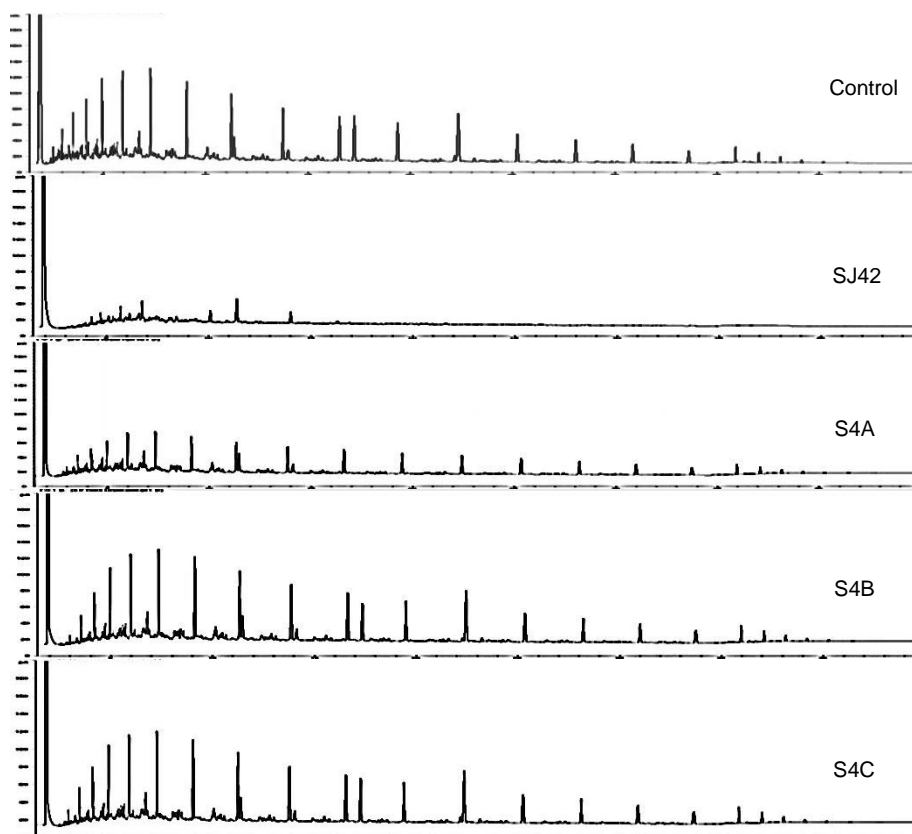
ค.4 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM ของแบคทีเรีย  
เดี่ยว

นำแบคทีเรียเดี่ยวทั้งสามไอโซเลตมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่า *P. aeruginosa* S4A เป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุด 63.30±1.9% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุม ซึ่งดีเซลลดลงเพียง 12.85±7.7% และย่อยสลายดีเซลได้น้อยกว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่ย่อยสลายดีเซลได้จนหมดตั้งแต่ 7 วัน *S. maltophilia* S4B และ *O. intermedium* S4C ไม่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ ซึ่งดีเซลที่ลดลงไม่แตกต่างจากชุดควบคุม

โครมาโทแกรมในรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นองค์ประกอบต่างๆในดีเซลที่ลดลงอย่างมากเมื่อย่อยสลายด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ภายในเวลา 14 วัน ในขณะที่ *P. aeruginosa* S4A สามารถลดองค์ประกอบต่างๆได้บางส่วน *S. maltophilia* S4B และ *O. intermedium* S4C ไม่สามารถลดองค์ประกอบของดีเซลได้ และมีลักษณะโครมาโทแกรมที่เหมือนกับชุดควบคุม



รูปที่ 4.6 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรียเดี่ยวไอโซเลต S4A, S4B และ S4C



รูปที่ 4.7 GC โครมาโทแกรมของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรียเดี่ยวไอโซเลต S4A, S4B และ S4C ในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซล 14 วัน

จากผลการศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 รวมถึงการย่อยสลาย 1% ดีเซล สันนิษฐานได้ว่า *P. aeruginosa* S4A น่าจะเป็นแบคทีเรียลำดับแรกในการย่อยสลายดีเซล ทั้งมีแนวโน้มในการสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ดีพอกๆกับ *O. intermedium* S4C เพราะแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากจะส่งผลต่อการย่อยสลายดีเซลได้ดีขึ้น (Onur และคณะ, 2015) เพียงแต่ *O. intermedium* S4C ไม่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ แต่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้สูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น จึงเป็นไปได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในการเข้ายึดเกาะกับรากพืช ซึ่งไบโอฟิล์มที่แบคทีเรียสร้างนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งของแบคทีเรีย rhizosphere ในการอยู่อาศัยร่วมกับรากพืชและการยึดเกาะ (Compant และคณะ, 2010) และแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ยังมีค่าความไม่ชอบน้ำที่สูง จึงเป็นไปได้ว่าเป็นแบคทีเรียลำดับแรกๆในการย่อยสลาย ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ และแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีต่ำของ *S. maltophilia* S4B แสดงให้เห็นว่าอาจเป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายองค์ประกอบดีเซลลำดับท้ายๆเพื่อย่อยสลายสารที่ได้จากการย่อยสลายดีเซลโดยแบคทีเรีย

อื่นที่สามารถละลายในน้ำได้ สุกทำยเมื่อรวมเป็นกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 แล้วนั้นพบว่าแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวและการสร้างไบโอฟิล์มได้มากขึ้น ทำให้ยึดเกาะรากพืชได้ดีและย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุด ส่วนความไม่ชอบน้ำของเซลล์อาจเป็นผลมาจากสัดส่วนของ *S. maltophilia* S4B ที่มีสัดส่วนมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นในกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ทั้งยังเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่อาศัยที่รากพืชน้ำ

จากการนับจำนวนแบคทีเรีย พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ S4A ที่พบการเพิ่มจำนวนมากขึ้นจากวันที่ 0 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรีย SJ42 เท่ากับ  $7.98 \pm 0.01$  log CFU/มล. เพิ่มขึ้นสูงสุดวันที่ 14 เท่ากับ  $9.06 \pm 0.13$  log CFU/มล. และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ S4A มีแบคทีเรียเริ่มต้น  $8.23 \pm 0.1$  log CFU/มล. สูงสุดในวันที่ 14 เท่ากับ  $8.87 \pm 0.19$  log CFU/มล. ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณดีเซลที่ลดลง แสดงถึงแบคทีเรียสามารถย่อยสลายดีเซลเพื่อใช้ในการเจริญได้ในขณะที่ *S. maltophilia* สายพันธุ์ S4B และ *O. intermedium* สายพันธุ์ S4C นั้นมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น ซึ่งแบคทีเรีย *S. maltophilia* สายพันธุ์ S4B ลดลงเล็กน้อยแต่ยังคงอยู่ที่ 8 log CFU/มล.

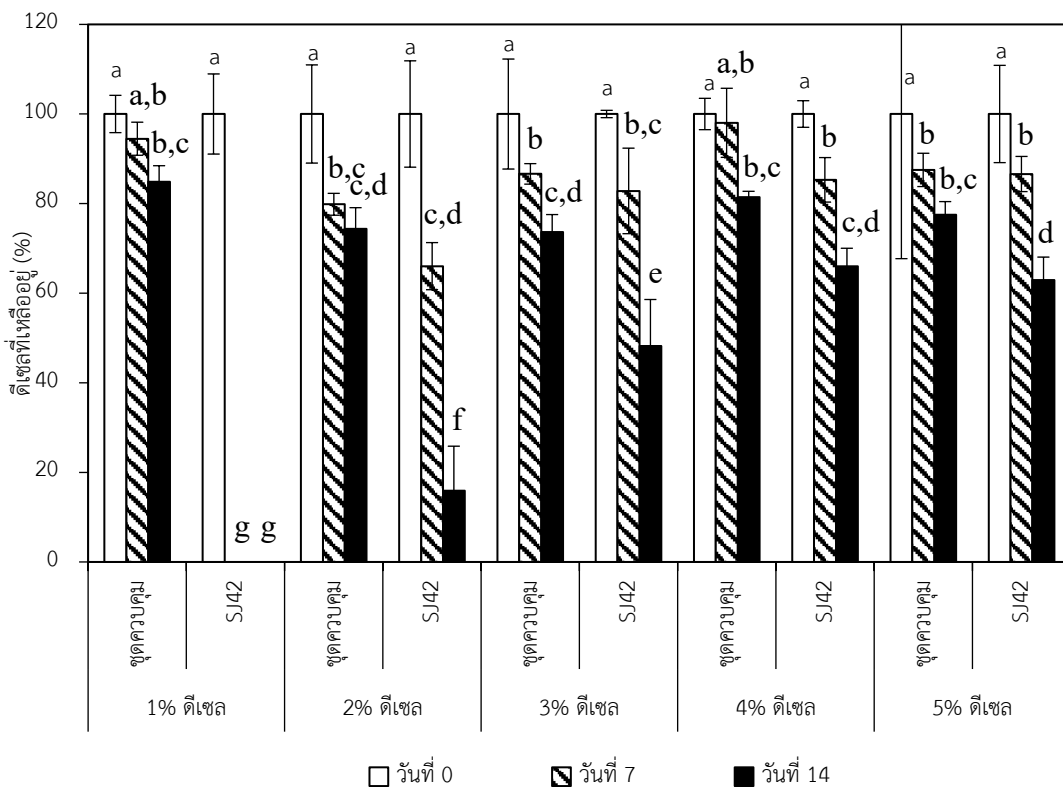
เนื่องด้วยดีเซลเป็นสารประกอบที่ค่อนข้างซับซ้อนและต้องการเอนไซม์ที่หลากหลายชนิดเพื่อการย่อยสลายสารต่างๆที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งไม่มีแบคทีเรียเดี่ยวที่สามารถย่อยสลายสารประกอบในดีเซลได้ทั้งหมด (Das และ Chandran, 2011) จากผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายดีเซลโดยแบคทีเรียเดี่ยวในการทดลองนี้ ได้ผลการย่อยสลายไม่ดีเท่ากับการใช้กลุ่มแบคทีเรีย SJ42

จากการศึกษาความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลได้สูงและใช้ระยะเวลาสั้น ทางผู้วิจัยจึงคาดว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นี้จะสามารถย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นสูงกว่า 1% ได้ ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2% ถึง 5% โดยปริมาตร

#### ง. ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลว CFMM

ทดลองเพิ่มความเข้มข้นดีเซลจาก 1% เป็น 2, 3, 4 และ 5% ตามวิธีในข้อ 3.5.3 เป็นเวลา 14 วัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถย่อยสลาย 1%, 2%, 3%, 4% และ 5% ดีเซล ในเวลา 14 วัน ได้ 100%,  $84.12 \pm 9.9\%$ ,  $51.81 \pm 10.3\%$ ,  $34.01 \pm 4.0\%$  และ  $37.10 \pm 5.1\%$  ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมดีเซลลดลงเท่ากับ  $15.20 \pm 3.5\%$ ,  $25.62 \pm 4.7\%$ ,  $26.33 \pm 3.8\%$ ,  $18.55 \pm 1.2\%$  และ  $22.53 \pm 2.9\%$  ตามลำดับ (รูปที่ 4.8)





รูปที่ 4.8 การย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในอาหารเหลว

CFMM

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในการทดลองนี้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง กล่าวคือจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นมีประมาณ 7.3-7.9 log CFU/มล. และหลังจาก 14 วัน มีจำนวนเพิ่มเป็น  $9.06 \pm 0.13$  log CFU/มล.,  $8.97 \pm 0.2$  log CFU/มล.,  $8.58 \pm 0.2$  log CFU/มล.,  $8.84 \pm 0.1$  log CFU/มล. และ  $8.95 \pm 0.04$  log CFU/มล. ในชุดการทดลองที่เติม 1% ดีเซล, 2% ดีเซล, 3% ดีเซล, 4% ดีเซล และ 5% ดีเซล ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถย่อยสลายดีเซลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้

ความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ลดลง เมื่อความเข้มข้นดีเซลเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมดีเซล พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ยังสามารถย่อยสลายดีเซลได้ ที่ดีเซลความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ย่อยสลายได้  $37.10 \pm 5.1\%$  ในเวลา 14 เมื่อเทียบกับรายงานการย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียจากพืช *Azolla pinnata* สามารถย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 4% โดยปริมาตร ในอาหารเหลวได้ 50% โดยใช้

เวลา 19 วัน (Cohen, (2002) และกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย 3 ชนิด สามารถย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร ในอาหารเหลวได้ 31% ในเวลา 21 วัน (Mnif และคณะ, 2015) จะพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นสูงโดยใช้ระยะเวลาสั้นกว่า

เมื่อการทดลองย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในอาหารเหลวได้ผลการทดลองที่ดี การทดลองต่อไปเพื่อต้องการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายดีเซลในน้ำจืดตัวอย่างในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลในน้ำจืดและความสามารถในการอยู่รอดในตัวอย่างไม่น้ำ โดยที่ตัวอย่างน้ำที่จะใช้ทดลองจะเป็นน้ำจากคลองระบายน้ำกับน้ำจากคลองที่สามารถใช้เพื่อการอุปโภคได้ เพื่อให้เกิดความหลากหลายของลักษณะน้ำจืด



## ตอนที่ 2 ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในน้ำจืด

### 4.3 ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืด

#### ก. ตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำที่ใช้ทดลองเก็บจากคลองแสนแสบ (SS) คลองสามเสน (SN) คลองลาดพร้าว (LP) คลองบางซื่อ (BZ) คลองรังสิตประยูรศักดิ์ (RS) และแม่น้ำเจ้าพระยา (CPY) (รายละเอียดแหล่งที่เก็บ ดังแสดงในภาคผนวก) ค่าพารามิเตอร์แสดงในภาคผนวก (ตารางที่ ค-3) และตรวจวัดดีเซลในตัวอย่างน้ำ ซึ่งจากการวิเคราะห์ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืด พบว่าไม่สามารถตรวจพบดีเซลได้ในระดับที่วิเคราะห์ โดยใช้ GC

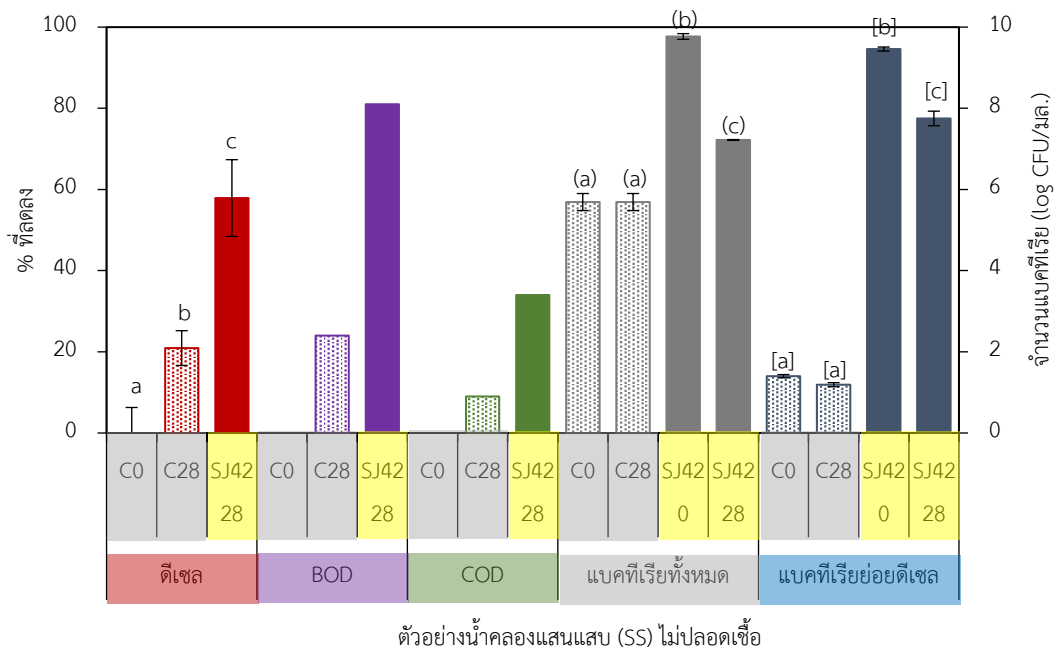


รูปที่ 4.9 ลักษณะคลองและตัวอย่างน้ำที่เก็บเพื่อใช้ทดสอบการย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 (ก. คลองแสนแสบ, ข. คลองสามเสน, ค. คลองลาดพร้าว, ง. คลองบางซื่อ, จ. คลองรังสิตประยูรศักดิ์ และ ฉ. แม่น้ำเจ้าพระยา)

### ข. ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดไม่ปลอดเชื้อ

ทดสอบความสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซล โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตามวิธีในข้อ 3.3.2 เป็นเวลา 28 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 28 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียย่อยสลายดีเซล ปริมาณดีเซลที่ลดลง BOD COD (รูปที่ 4.10ก-ฉ) ไนโตรเจนทั้งหมด และฟอสฟอรัสทั้งหมด (ภาคผนวก ค) โดย C0, C28 และ SJ42 28 หมายถึงชุดควบคุมวันที่ 0, 28 และชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรียวันที่ 28

การทดสอบการย่อยดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดไม่ปลอดเชื้อ พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีความสามารถย่อยสลายดีเซลต่างกันในแต่ละน้ำจืดที่ต่างกัน โดยหลังจากผ่านไป 28 วัน ชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 แนวโน้มผลการทดลองพบว่า สามารถย่อยสลายดีเซลได้มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถลด BOD COD ในตัวอย่างน้ำได้มากกว่าชุดควบคุม แต่พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0



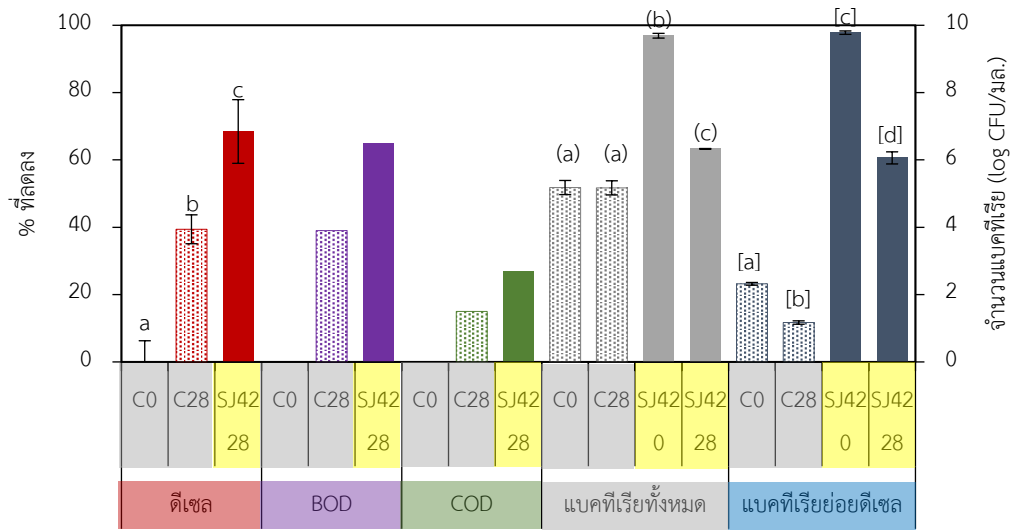
รูปที่ 4.10ก ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองแสนแสบไม่ปลดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล



ตัวอย่างน้ำคลองสามเสน (SN) ไม่ปลอดภัย

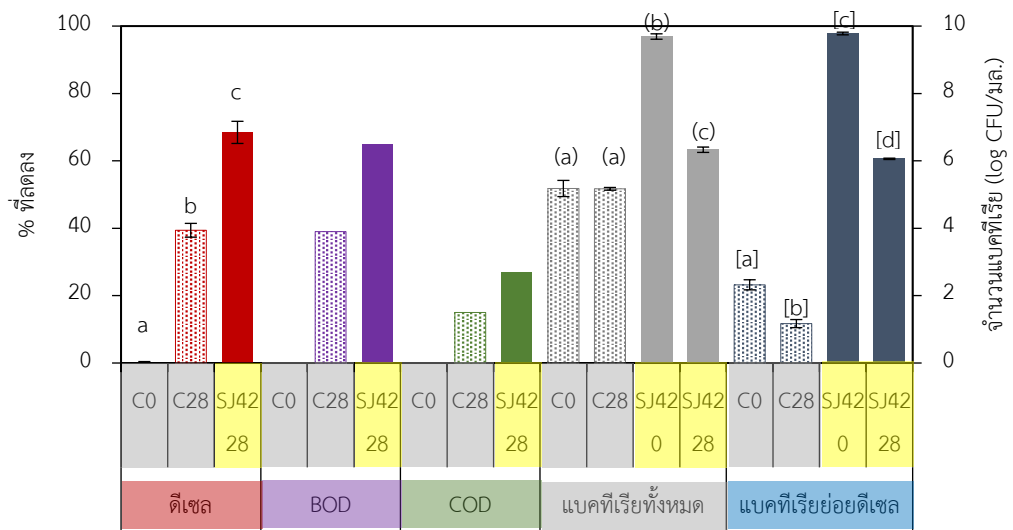
รูปที่ 4.10x ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองสามเสนไม่ปลอดภัยหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล



ตัวอย่างน้ำคลองลาดพร้าว (LP) ไม่ปลอดเชื้อ

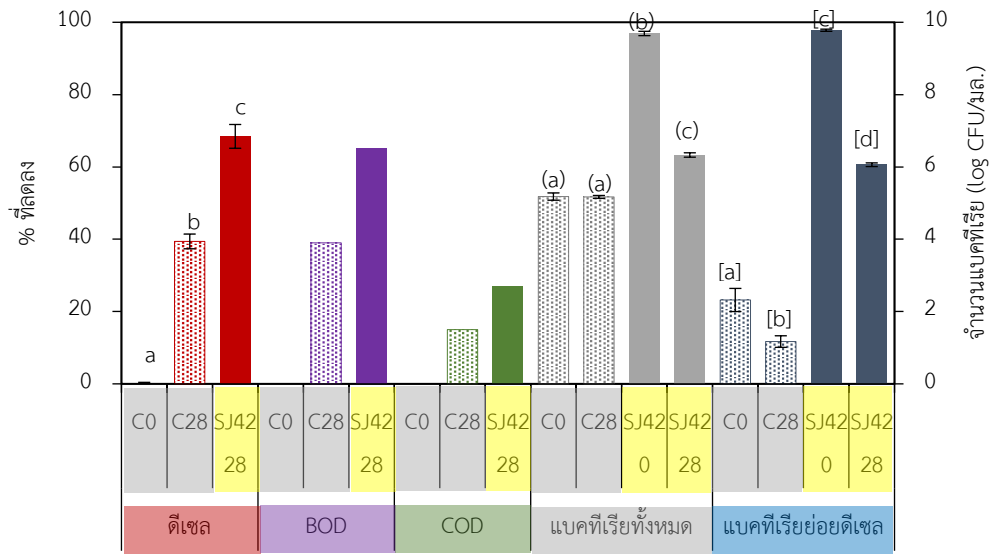
รูปที่ 4.10ค ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองลาดพร้าวไม่ปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล



ตัวอย่างน้ำจืดจากคลองบางซื่อ (BZ) ไม่ปลอดเชื้อ

รูปที่ 4.10ง ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองบางซื่อไม่ปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน

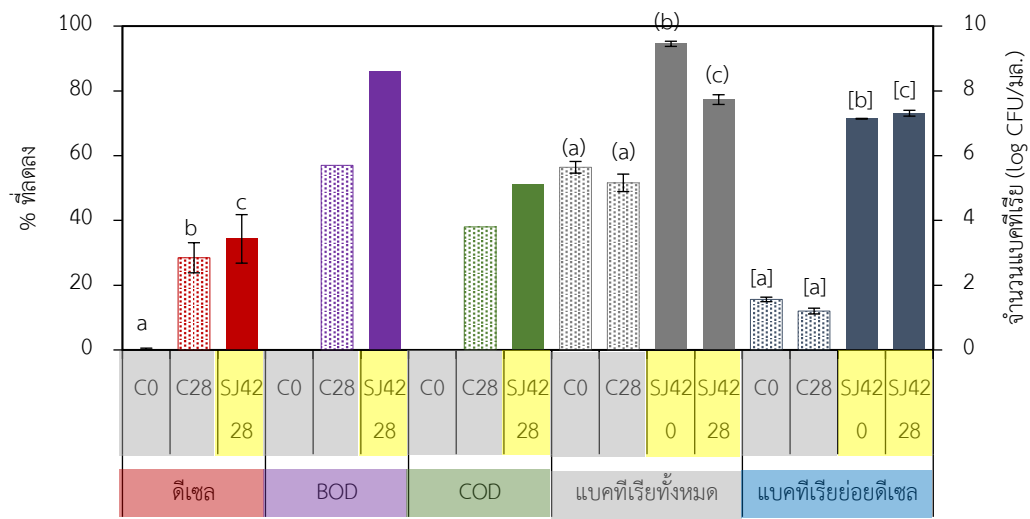
(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล





ตัวอย่างน้ำคลองรังสิตประยูรศักดิ์ (RS) ไม่ปลอดภัย

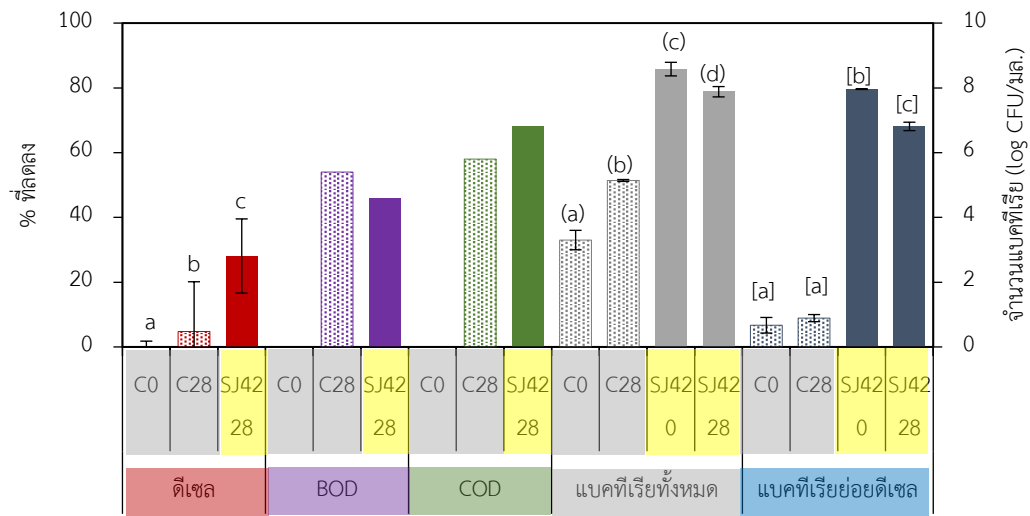
**รูปที่ 4.10จ ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ไม่ปลอดภัยหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน**

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล



ตัวอย่างน้ำแม่ น้ำเจ้าพระยา (CPY) ไม่ปลอดภัย

**รูปที่ 4.10ฉ ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากแม่น้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดภัย หลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน**

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล

ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ในตัวอย่างน้ำจากคลอง แสนสบ พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลง  $20.93 \pm 4.2\%$  ในขณะที่ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $57.89 \pm 9.45\%$  ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดควบคุมไม่เปลี่ยนแปลงแต่แบคทีเรียย่อยดีเซลลดลงเล็กน้อย ในขณะที่ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลลดลงจาก  $9.77 \pm 0.07$  เป็น  $7.11 \pm 0.01$  log CFU/มล. และ  $9.46 \pm 0.05$  เป็น  $7.75 \pm 0.18$  log CFU/มล. ตามลำดับ

ทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจากคลองสามเสน พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลง  $39.40 \pm 3.7\%$  และชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $68.45 \pm 5.2\%$  ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดควบคุมไม่เปลี่ยนแปลงแต่แบคทีเรียย่อยดีเซลลดลงเล็กน้อยจาก  $2.32 \pm 0.1$  เป็น  $1.17 \pm 0.04$  log CFU/มล. ในขณะที่ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลลดลงจาก  $9.69 \pm 0.08$  เป็น  $6.33 \pm 0.35$  log CFU/มล. และ  $9.78 \pm 0.07$  เป็น  $6.06 \pm 0.09$  log CFU/มล. ตามลำดับ

ทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจากคลองลาดพร้าว พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลง  $45.48 \pm 2.0\%$  และชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $61.72 \pm 3.2\%$  ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดควบคุมมีการลดลงเล็กน้อยจาก  $5.67 \pm 0.24$  เป็น  $4.99 \pm 0.04$  log CFU/มล. ส่วนแบคทีเรียย่อยดีเซลในชุดควบคุมไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลลดลงจาก  $10.13 \pm 0.08$  เป็น  $7.19 \pm 0.08$  log CFU/มล. และ  $9.53 \pm 0.04$  เป็น  $6.72 \pm 0.02$  log CFU/มล. ตามลำดับ

ทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจากคลองบางซื่อ พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลง  $21.22 \pm 7.21\%$  และชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $75.18 \pm 5.1\%$  ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดควบคุมลดลงเล็กน้อยจาก  $5.81 \pm 0.1$  เป็น  $5.17 \pm 0.04$  log CFU/มล. ส่วนแบคทีเรียย่อยดีเซลในชุดควบคุมไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลลดลงจาก  $10.01 \pm 0.06$  เป็น  $7.32 \pm 0.06$  log CFU/มล. และ  $9.48 \pm 0.03$  เป็น  $7.06 \pm 0.05$  log CFU/มล. ตามลำดับ

ทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลง  $34.30 \pm 7.48\%$  และชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $28.46 \pm 4.6\%$  ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดควบคุมลดลงเล็กน้อยจาก  $5.64 \pm 0.18$  เป็น  $5.16 \pm 0.27$  log CFU/มล. ส่วนแบคทีเรียย่อยดีเซลในชุดควบคุมไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดลดลงจาก  $8.45 \pm 0.08$  เป็น  $7.33 \pm 0.15$  log CFU/มล. ส่วนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยา พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลงเพียง  $4.76 \pm 15.37\%$  และชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $28.09 \pm 11.4\%$  ซึ่งแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก  $3.30 \pm 0.3$  เป็น  $5.14 \pm 0.03$  log CFU/มล. ส่วนแบคทีเรียย่อยดีเซลในชุดควบคุมไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลลดลงจาก  $8.23 \pm 0.21$  เป็น  $7.88 \pm 0.16$  log CFU/มล. และ  $7.96 \pm 0.01$  เป็น  $6.81 \pm 0.13$  log CFU/มล. ตามลำดับ

ผลการนับจำนวนแบคทีเรียของน้ำไม่ปลอดเชื้อเริ่มต้นจะมีแบคทีเรียทั้งหมด  $3.3-5.69$  log CFU/มล. และพบว่ามีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยในทุกตัวอย่างน้ำหลังผ่านไป 28 วัน ยกเว้นในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยา (CPY) ในชุดควบคุม เช่นเดียวกับชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เริ่มต้นจะพบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด  $8.23-10.13$  log CFU/มล. จากนั้นจะลดลงเหลือ  $6.33-7.88$  log CFU/มล. หลังผ่านไป 28 วัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างน้ำจากคลองแสนแสบ (SS) คลองสามเสน (SN) คลองลาดพร้าว (LP) และคลองบางซื่อ (BZ) จะพบแนวโน้มการลดลงของแบคทีเรียอย่างเห็นได้ชัดในตัวอย่างน้ำไม่ปลอดเชื้อหลัง 28 วันในชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ต่างจากในตัวอย่างน้ำจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ (RS) และแม่น้ำเจ้าพระยา (CPY)

ในส่วนผลการนับจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้นั้น พบว่า มีปริมาณน้อยกว่าแบคทีเรียที่นับได้ทั้งหมดในน้ำตัวอย่างเริ่มต้น ซึ่งมีอยู่  $0.6-1.8$  log CFU/มล. แต่ภายหลังการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลเพิ่มสูงขึ้นและอยู่ที่ประมาณ  $7.1-9.7$  log CFU/มล. หลังการย่อยสลายดีเซล 28 วันพบว่าจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในชุดควบคุมนั้นลดลงเล็กน้อยไม่แตกต่างจากวันที่ 0 แต่ในชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จะเห็นการลดลงอย่างชัดเจนในตัวอย่างน้ำจากคลองแสนแสบ (SS) คลองสามเสน (SN) คลองลาดพร้าว (LP) และคลองบางซื่อ (BZ) เช่นเดียวกับผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

โดยสรุปกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ย่อยสลายดีเซลได้มากที่สุดในตัวอย่างน้ำจากคลองบางซื่อ (BZ) ย่อยได้  $75.18 \pm 5.1\%$  ในเวลา 28 วัน ในชุดควบคุมดีเซลจะลดลงเพียง  $21.22 \pm 7.21\%$  ซึ่งแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ในตัวอย่างน้ำแหล่งอื่น ผลการทดลองสอดคล้องกันคือ ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จะลดปริมาณดีเซลได้ดีกว่าชุดควบคุม และแบคทีเรียประจำถิ่นในแหล่งน้ำนั้นสามารถย่อยสลายดีเซลได้บ้าง

จากการทดลองเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ลงในน้ำตัวอย่างปนเปื้อน 1% ดีเซลแล้วพบว่าสามารถเพิ่มการย่อยสลายดีเซลได้สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย เช่น รายงานการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานที่ปนเปื้อนไปด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เมื่อเติมกลุ่มจุลินทรีย์ลงในระบบบำบัดจะสามารถลดค่า COD ได้ 95% และลดปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจาก 320 มล./

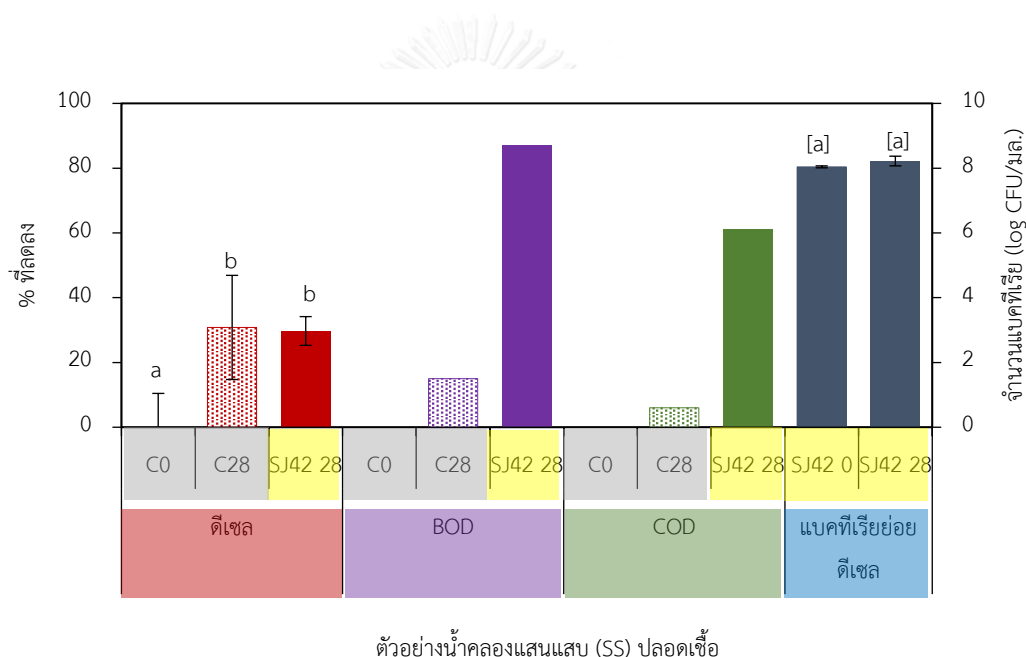
ลิตร เหลือเพียง 8 มล./ลิตร ภายในเวลา 225 วัน Gargouri และคณะ (2011) หรือการเติมกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย *Acinetobacter haemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis* type II และ *Brevibacillus brevis* เพื่อบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำเสียระบบขนาด 750 ลิตร พบว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน จากเริ่มต้น 1086 มก./ล. เหลือ 56 มก./ล. และ 18 มก./ล. ในเวลา 21 และ 104 วันตามลำดับ (Poi และคณะ, 2016)

ผลการย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำ RS และ CPY มีค่าที่ต่ำกว่าน้ำตัวอย่างอีก 4 แหล่ง โดยผลการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ลงในน้ำนั้นเพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายดีเซลในสภาวะน้ำจริงซึ่งให้ผลแตกต่างไปจากการทดลองในอาหารเหลว ทั้งนี้เกิดการปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยสลาย เช่น

- ปัจจัยทางด้านสารอาหาร ความต้องการสารอาหารโดยเฉพาะปริมาณ คาร์บอน ฟอสเฟต ไนโตรเจน ในการเจริญของแบคทีเรีย ส่งผลโดยตรงต่อปริมาณแบคทีเรียนำไปสู่ผลต่อการย่อยสลายดีเซล ซึ่งจากอัตราส่วนที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียคือ C:N:P เท่ากับ 100:10:1 ทั้งนี้ในตัวอย่างน้ำ RS และ CPY พบว่าปริมาณ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสที่ต่ำ ซึ่งน้อยกว่าสัดส่วนที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย ทำให้การย่อยสลายดีเซลในน้ำตัวอย่างทั้งสองมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างน้ำอีก 4 แหล่ง (Lin และคณะ, 2014, Mouginot และคณะ, 2014)
- ปัจจัยในด้านการแข่งขันของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 กับแบคทีเรียประจำถิ่น ซึ่งพบว่าการที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในวันที่ 0 คือจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ และหลังจากผ่านไป 28 วัน ในทุกการทดลองพบว่าจำนวนลดลง และลดลงเหลือเท่ากับปริมาณที่พบในน้ำจืดปกติคือ ประมาณ 6 log CFU/ มล. (Nzila และคณะ, 2016)
- ปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ และแสง อาจไม่ส่งผลแตกต่างในการทดลองนี้ เนื่องจากทำการทดลองในสภาวะปิด ควบคุม อุณหภูมิ และ แสงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ แต่ผลของค่า pH ในน้ำตัวอย่างอาจส่งผลให้กลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายได้น้อยลง เช่นรายงานผลกระทบของ pH ต่อการย่อยสลายดีเซล (Palanisamy และคณะ, 2014)

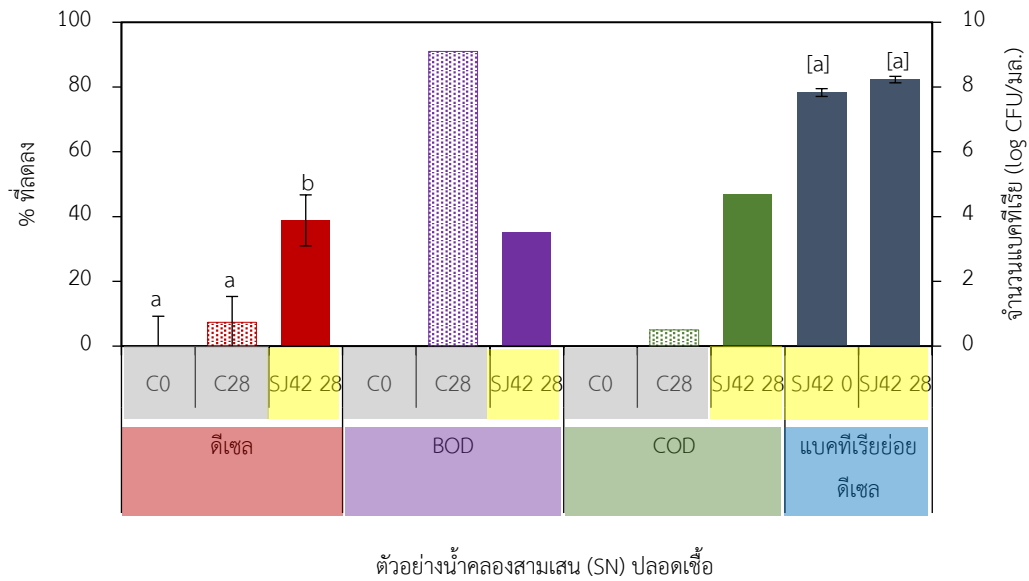
### ค. ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในตัวอย่างน้ำจืด ปลอดภัย

เนื่องจากแบคทีเรียประจำถิ่นอาจมีผลยับยั้งการทำงานของกลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไป การเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพื่อทดสอบการย่อยสลายดีเซลในสภาวะที่มีปัจจัยจากสารอาหารในน้ำ ตัวอย่างต่อการเจริญของแบคทีเรีย SJ42 โดยตรง ดังนั้นในขั้นตอนนี้ จึงทดสอบการย่อยสลายดีเซลในน้ำปลอดภัย เช่นกันกับการทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำที่ไม่ปลอดภัยตามวิธีในข้อ 3.3.2 ทดลองเป็นเวลา 28 วัน ใช้ตัวอย่างน้ำทั้ง 6 แหล่งในสภาวะที่ปลอดภัย (รูปที่ 4.11ก-4.11ฉ) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณดีเซลที่ลดลง BOD COD และจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล



รูปที่ 4.11ก ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองแสนแสบปลอดภัยหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล (a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด [a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล



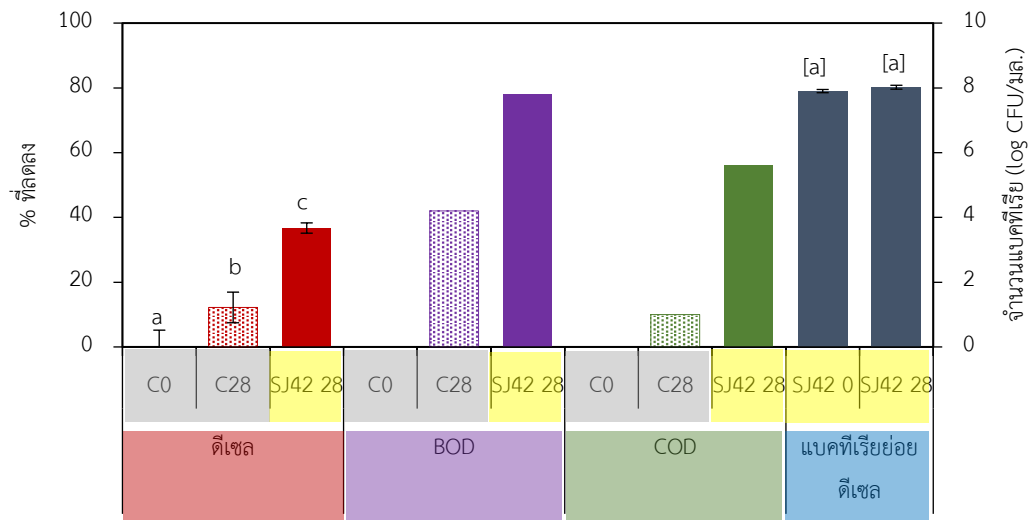
รูปที่ 4.11x ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองสามเสนปลอดเชื้อหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล



ตัวอย่างน้ำคลองลาดพร้าว (LP) ปลอดภัย

**รูปที่ 4.12ค ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองลาดพร้าวปลอดภัยหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน**

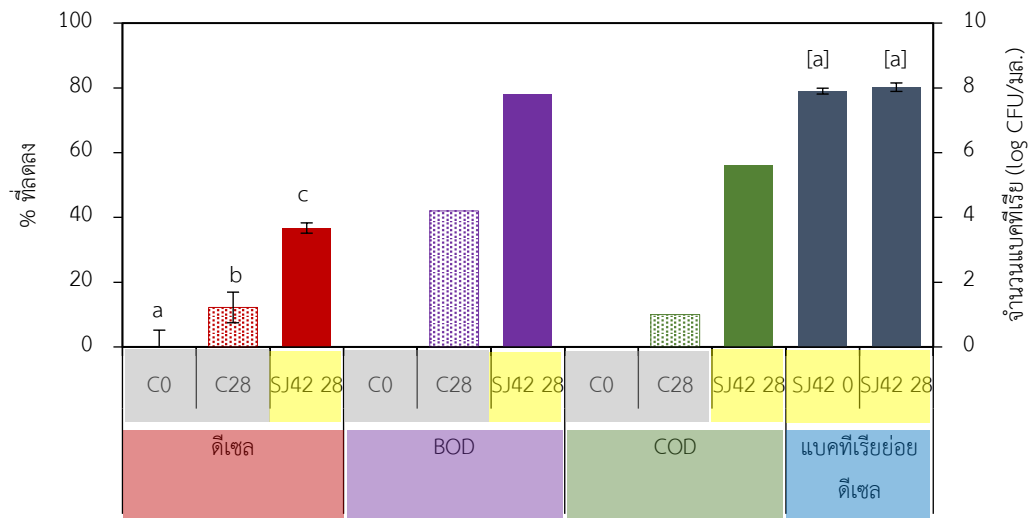
(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล





ตัวอย่างน้ำคลองบางซื่อ (BZ) ปลอดภัย

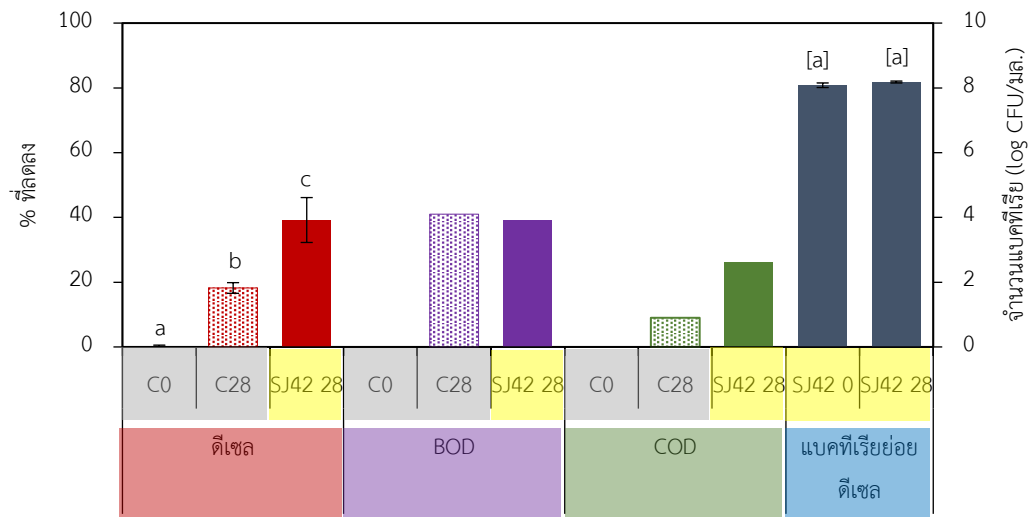
รูปที่ 4.11ง ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองบางซื่อปลอดภัยหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล



ตัวอย่างน้ำคลองรังสิตประยูรศักดิ์ (RS) ปลอดภัย

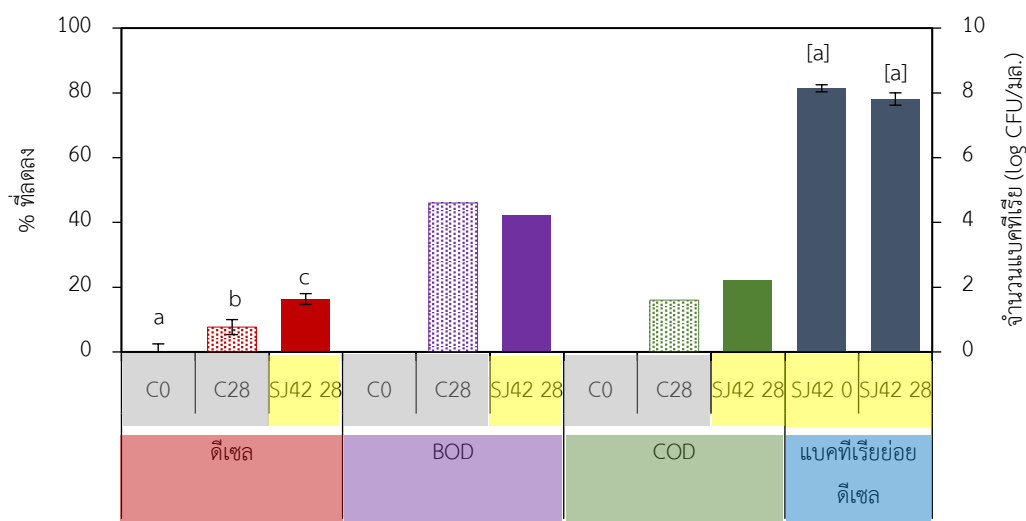
**รูปที่ 4.11จ ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ปลอดภัยหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน**

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล



ตัวอย่างน้ำแม่น้ำเจ้าพระยา (CPY) ปลอดภัย

**รูปที่ 4.11จ** ปริมาณดีเซล BOD COD จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดจากแม่น้ำเจ้าพระยาปลอดภัยหลังการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 28 วัน

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย

a, b, c เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของดีเซล

(a), (b), (c) เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

[a], [b], [c] เปรียบเทียบนัยสำคัญทางสถิติของชุดข้อมูลการลดลงของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล

เมื่อทดสอบการย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำปลอดภัยจากคลองแสนแสบ พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลง  $30.82 \pm 16.07\%$  ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดที่เดิมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่มีดีเซลลดลง  $29.72 \pm 4.43\%$  การย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำปลอดภัยจากคลองสามเสน พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลง  $7.36 \pm 7.98\%$  และชุดที่เดิมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $38.84 \pm 7.86\%$  ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำปลอดภัยจากคลองลาดพร้าว พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลง  $12.20 \pm 4.73\%$  และชุดที่เดิมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $36.72 \pm 1.58\%$  ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำปลอดภัยจากคลองบางซื่อ พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลง  $22.92 \pm 3.73\%$  และชุดที่เดิมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $41.43 \pm 11.39\%$  ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำปลอดภัยจากคลองรังสิตประยูร

ศักดิ์ พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลง  $18.21 \pm 1.64\%$  และชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $39.19 \pm 6.92\%$  ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อจากแม่น้ำเจ้าพระยา พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลลดลงเพียง  $7.68 \pm 2.31\%$  และชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีดีเซลลดลง  $16.34 \pm 1.67\%$  ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยสรุปแล้วในการทดสอบการย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อ พบว่า การเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพื่อย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อจากคลองสามเสน คลองลาดพร้าว คลองบางซื่อ และคลองรังสิตประยูรศักดิ์ สามารถลดดีเซลได้ดีใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญคือเท่ากับ  $38.84 \pm 7.86\%$ ,  $36.72 \pm 1.58\%$ ,  $41.43 \pm 11.39\%$  และ  $39.19 \pm 6.92\%$  ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อจากคลองแสนแสบและแม่น้ำเจ้าพระยา พบว่า การเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นั้นไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการย่อยสลายดีเซลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในทุกชุดการทดลองในทุกตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลที่วันที่ 28 มีจำนวนระหว่าง  $7.81 \pm 0.19$  ถึง  $8.23 \pm 0.1$  log CFU/มล.

การย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อนั้นเป็นผลจากการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพียงเท่านั้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะสามารถประเมินความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลายดีเซลโดยไม่มีผลของแบคทีเรียประจำถิ่นในแหล่งน้ำมารบกวนเหมือนเช่นในการทดสอบในน้ำตัวอย่างไม่ปลอดเชื้อ ซึ่งจากผลการทดลองนั้น ดีเซลลดลงได้น้อยกว่าการทดลองในตัวอย่างน้ำไม่ปลอดเชื้อ และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุมสำหรับตัวอย่างน้ำจากคลองแสนแสบและแม่น้ำเจ้าพระยา และเมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียย่อยดีเซล พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทั้งนี้อาจเกิดจากกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นั้นสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในตัวอย่างน้ำ แต่อาจมีสารอาหารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญน้อย โดยดูจากปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัสประกอบกัน (ภาคผนวก ค) และอาจเนื่องจากสารอาหารที่ละลายอยู่ในน้ำหลังจากทำให้ปลอดเชื้อ พบการตกตะกอนขึ้นซึ่งเมื่อเขย่าจะละลายได้เล็กน้อยแต่ยังคงเหลือตะกอนอยู่ จากเหตุการณ์นี้อาจเกิดจากความร้อนที่ใช้ในการทำให้ตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อมีผลต่อการเปลี่ยนโครงสร้างของสารละลายในน้ำให้อยู่ในรูปที่แบคทีเรียไม่สามารถใช้ได้หรือใช้ได้ยากขึ้น (Vincent และคณะ, 2014) ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียโดยตรง ซึ่งการที่พบแบคทีเรียจำนวนเท่าเดิม แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะนี้จากปริมาณที่เท่ากับตอนเริ่มต้น แต่ไม่สามารถมีกิจกรรมในการย่อยสลายดีเซลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ เพราะไม่มีสารอาหารมาช่วยให้เกิดการสร้างเอนไซม์มาย่อยสลาย

การเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ของน้ำจืดในการทดลองย่อยสลาย 1% ดีเซล โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 หลังจาก 28 วัน พบว่าค่าไนโตรเจนลดทั้งหมดลงเล็กน้อยในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในตัวอย่างน้ำจืดไม่ปลอดเชื้อ ในทุกตัวอย่างน้ำจืด ยกเว้น ตัวอย่างน้ำจืด LP และ

BZ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนชุดควบคุม พบว่าหลังจาก 28 วัน ไนโตรเจนลดลงจากวันที่ 0 ในตัวอย่างน้ำจืดไม่ปลอดเชื้อไม่ปลอดเชื้อ SS, RS และ CPY แต่กลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นในตัวอย่างน้ำ SN, LP และ BZ (ภาคผนวก ค)

ปริมาณฟอสฟอรัสที่ตรวจวิเคราะห์ได้หลังจาก 28 วันในน้ำตัวอย่างไม่ปลอดเชื้อ มีปริมาณลดลงในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ส่วนชุดทดลองที่ไม่ได้เติมกลุ่มแบคทีเรียนั้นมีค่าไม่เปลี่ยนแปลง (ภาคผนวก ค) ซึ่งปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่ลดลงนั้น อาจเป็นผลมาจากการใช้เป็นแร่ธาตุในการเจริญของแบคทีเรียในระหว่างการย่อยสลายดีเซล ซึ่งต้องมีปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและทำงานในการย่อยสลายดีเซลต่อได้ (Mouginot และคณะ, 2014) ปริมาณไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 28 ของการทดลองย่อยสลายดีเซล บางส่วนอาจได้มาจากเซลล์แบคทีเรียที่เกิดการตาย หรือการสลายตัวของสารที่อยู่ในตัวอย่างน้ำจืดที่ใช้ทดลอง

การวิเคราะห์ค่า BOD และ COD ในการทดลองย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในตัวอย่างน้ำไม่ปลอดเชื้อและปลอดเชื้อ พบว่า ค่า BOD และ COD ในชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีค่าลดลงในทุกตัวอย่างน้ำและลดลงมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ร่วมกับแบคทีเรียประจำถิ่น สามารถลด BOD และ COD ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าใช้เพียงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพียงอย่างเดียว ซึ่งการเติมกลุ่มแบคทีเรียหรือแบคทีเรียเดี่ยวเพื่อบำบัดน้ำเสีย สามารถลด BOD COD ได้มากกว่าชุดควบคุม เช่น งานวิจัยก่อนหน้าที่ใช้การเติมแบคทีเรียเพื่อเพิ่มการบำบัดค่า BOD และ COD โดยการเติมแบคทีเรีย *Gordonia* สายพันธุ์ JW8 ลงในน้ำเสียที่ปนเปื้อนลิกนินจากโรงงานกระดาษ พบว่า JW8 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด BOD และ COD ได้สูงสุดเท่ากับ 96.4% ในเวลา 45 วัน และ 87.8% ในเวลา 50 วัน ตามลำดับ โดยสามารถลดค่า BOD และ COD ได้มากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรีย *Gordonia* สายพันธุ์ JW8 โดยเฉลี่ย 5.9 และ 5.1% ตามลำดับ (Chen และคณะ, 2012) หรือการเติมแบคทีเรียย่อยฟินอลเพื่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแยกก๊าซ สามารถช่วยเพิ่มการกำจัด COD ได้มากกว่า 58-78% (Fang และคณะ, 2013). หรือแบคทีเรีย *Serratia* sp. BDG-2 ที่คัดแยกได้จาก ตะกอนสลัดจ์ นำมาย่อยสลายไดเอทิลีน ไกลคอล โมโนบิวทิล อีเธอร์ (DGBE) ในระหว่างการบำบัด พบว่า สามารถลดค่า COD ได้ 96.92% ในเวลา 39.9 ชั่วโมง (Chen และคณะ, 2016)

โดยสรุป ผลการทดลองย่อยสลายดีเซลในน้ำจืดตัวอย่างทั้งปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สรุปได้ว่า กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถช่วยย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดไม่ปลอดเชื้อได้ดีกว่าปลอดเชื้อ ซึ่งพบว่าสามารถย่อยดีเซลได้  $75.18 \pm 5.1\%$  ในขณะที่ชุดควบคุมเหลือปริมาณดีเซลสูง  $21.22 \pm 7.21\%$  ในตัวอย่างน้ำจืด BZ โดยที่การทดลองทั้งหมดนั้น สอดคล้องกันคือการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ลงในตัวอย่างน้ำไม่ปลอดเชื้อ ส่งผลในการย่อยสลายดีเซลได้มากกว่าชุดควบคุม ทั้งนี้ในส่วนของจำนวนแบคทีเรียที่พบทั้งหมดนั้น มีปริมาณสูงกว่าจำนวนแบคทีเรียที่สามารถ

ย่อยดีเซลได้ โดยอยู่ที่ประมาณ 6 log CFU/มล. ในขณะที่พบแบคทีเรียย่อยดีเซลได้ในน้ำตัวอย่างอยู่ประมาณ 2 log CFU/มล. หลังจากการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จำนวนแบคทีเรียในน้ำจะเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยอยู่ที่ประมาณ 9 log CFU/มล. หลังผ่านไป 28 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดลดลง เช่นเดียวกับแบคทีเรียย่อยสลายดีเซล

ในตัวอย่างน้ำไม่ปลอดเชื้อ การลดลงของดีเซลทั้งหมดไม่ได้เกิดจากการที่กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ย่อยสลายได้ แต่เป็นการทำงานร่วมกับแบคทีเรียประจำถิ่น จึงส่งผลให้ค่าปริมาณดีเซลที่ย่อยสลายได้มากกว่าการทดลองในน้ำปลอดเชื้อ ผลการทดลองยังสอดคล้องกับการกำจัดค่า BOD และ COD ที่พบว่ามีการลดลงสูงสุดที่ 86% และ 68% ตามลำดับ ซึ่งพบในตัวอย่างน้ำ RS และ CPY ไม่ปลอดเชื้อ ส่วนในตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อ กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ชนิดเดียวสามารถลดค่า BOD และ COD ได้สูงถึง 91% และ 61% ตามลำดับ ซึ่งพบจากตัวอย่าง SN และ SS

หลังจากทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลายดีเซลในน้ำจืดแล้ว พบว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายดีเซลได้มากกว่าชุดควบคุม จึงศึกษาการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายดีเซล โดยผู้วิจัยมีแผนงานที่จะตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวา ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิต แต่ก่อนทดลองได้ทดลองตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนวัสดุสังเคราะห์ที่สามารถลอยน้ำได้ (พอลิยูรีเทนโฟม) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลกับกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ก่อนการตรึงพบรากผักตบชวา

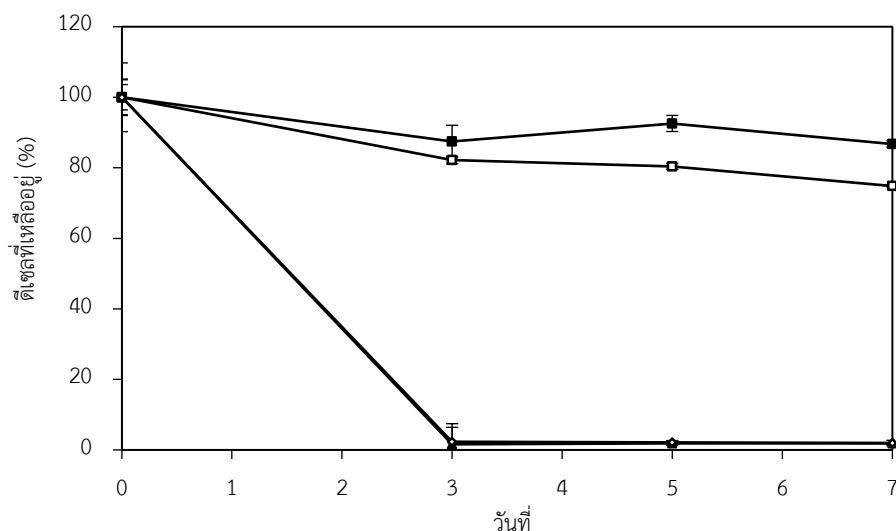
#### 4.4 การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนพอลิยูรีเทนโฟม (PUF)

นำกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จำนวน 8 log CFU/ มล. ตรึงบน PUF ปริมาณ 2500 มก./ล. ตรึงเป็นเวลา 3 วัน โดยตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทุกวัน ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในการทดลองตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนพอลิยูรีเทนโฟม (PUF) ในเวลาที่ต่างกัน

วันที่	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	
	บน PUF (log CFU/มก.)	ใน CFMM (log CFU/มล.)
0	-	9.16±0.11
1	7.82±0.04	7.82±0.30
2	7.97±0.06	7.57±0.45
3	7.99±0.07	6.97±0.29

การทดลองตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บน PUF เพื่อทดลองการย่อยสลายดีเซล ตรึงกลุ่มแบคทีเรียบน PUF วันที่ 1 พบจำนวนแบคทีเรียใน PUF มีจำนวนเท่ากับ  $7.82 \pm 0.04 \log \text{CFU/มก.}$  และพบว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถเกาะติดกับ PUF ได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการตรึง จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการตรึงเพียงแค่ 1 วัน แบคทีเรียสามารถยึดเกาะบน PUF สูงมากเนื่องจากโครงสร้างรูพรุน ทำให้การยึดเกาะของแบคทีเรียสูงถึง 90% ในเวลา 2 วัน (Quek และคณะ, 2006) นำไปทดลองย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว พบว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึงบน PUF สามารถย่อยสลายดีเซลได้  $98.19 \pm 0.52\%$  ซึ่งเทียบกันได้ดีกับชุดที่ใช้แบคทีเรีย SJ42 อิสระที่ดีเซลลดลง  $98.04 \pm 0.76\%$  จากการทดลองตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บน PUF สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chanthamalee และคณะ (2013) ที่ตรึงแบคทีเรีย *Gordonia* sp. JC11 บน PUF เพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องในน้ำทะเลสังเคราะห์เป็นเวลา 10 วันโดยไม่มีการลดลงของแบคทีเรีย ซึ่งมีจำนวนประมาณ 8-9 log MPN/Treatment และแนวโน้มการย่อยสลายดีเซลในการทดลองนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chanthamalee และคณะ (2013) ที่ใช้แบคทีเรีย *Gordonia* sp. JC11 ตรึงบน PUF ย่อยสลายน้ำมันเครื่องใช้แล้ว 1000 มก./มล. ในน้ำที่ได้จากใต้ท้องเรือ ซึ่งสามารถบำบัดได้ 40-50% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เติมแบคทีเรียตรึง นอกจากนี้ยังรายงานเกี่ยวกับการดูดซับน้ำมันเครื่องใช้แล้วไว้ที่ PUF อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นผลสนับสนุนในการทดลองครั้งนี้ที่พบปริมาณดีเซลลดลงในชุดที่เติม PUF อย่างเดียวได้มากกว่าในชุดควบคุมที่มีแต่อาหาร แสดงว่าน้ำมันบางส่วนถูกดูดซับไว้กับ PUF ส่งผลให้ชุดที่เติมแบคทีเรีย SJ42 ตรึง สามารถย่อยสลายดีเซลที่ถูกดูดซับไว้ที่ PUF ได้ งานวิจัยของ Quek และคณะ (2006) ในการตรึงแบคทีเรีย *Rhodococcus* sp. F92 บน PUF สามารถย่อยสลาย n-alkanes ได้ 90% ภายในเวลา 7 วันซึ่งย่อยสลายได้ดีเท่ากับแบคทีเรียอิสระ เช่นเดียวกับในงานวิจัยนี้ จากรายงานวิจัยดังกล่าวจึงเป็นการยืนยันว่าการใช้แบคทีเรียตรึงบน PUF สามารถใช้เพื่อการย่อยสลายน้ำมันและองค์ประกอบของดีเซลได้ดีเท่ากับแบคทีเรียอิสระ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

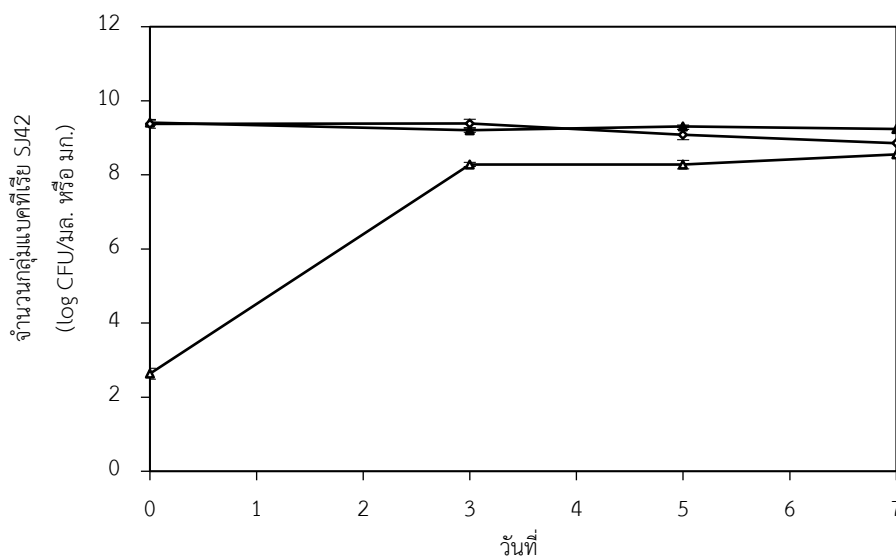


รูปที่ 4.12 การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบน PUF เทียบกับกลุ่มแบคทีเรียอิสระในอาหารเหลว CFMM

- ดีเซลในชุดควบคุม (CFMM)
- ดีเซลในชุดควบคุม (PUF)
- ▲ ดีเซลที่เหลืออยู่ (PUF ตรึง SJ42)
- ◇ ดีเซลที่เหลืออยู่ (SJ42 อิสระ)

จำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบน PUF พบว่า ในส่วนของ PUF ที่ตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีจำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 เท่ากับ  $8.01 \pm 0.06 \log \text{CFU/มก.}$  และยังคงที่จนวันที่ 7 ซึ่งเท่ากับ  $7.83 \pm 0.03 \log \text{CFU/มก.}$  ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ากลุ่มแบคทีเรียหลุดออกมากตั้งแต่วันแรกของการทดลอง ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ  $2.63 \pm 0.05 \log \text{CFU/มล.}$  เพิ่มจำนวนสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ  $9.28 \pm 0.56 \log \text{CFU/มล.}$  (รูปที่ 4.13) กลุ่มแบคทีเรียอิสระเริ่มต้นมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ  $9.37 \pm 0.03 \log \text{CFU/มล.}$  แต่พบว่ามีปริมาณลดลงเล็กน้อยเหลือเท่ากับ  $8.85 \pm 0.47 \log \text{CFU/มล.}$





รูปที่ 4.13 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียตรึงบน PUF และกลุ่มแบคทีเรียอีสุระในอาหารเหลว CFMM

- ▲ จำนวนแบคทีเรียใน PUF (PUF/SJ42)
- △ จำนวนแบคทีเรียใน CFMM (PUF/SJ42)
- ◇ จำนวนแบคทีเรีย SJ42 อีสุระ)

จากผลการทดลองตรึงกลุ่มแบคทีเรียบน PUF นั้นสามารถรักษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังช่วยให้จำนวนแบคทีเรียในระหว่างการทดลองไม่ลดจำนวนลง

ตอนที่ 3 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวาและการใช้กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงเพื่อ  
บำบัด 1% ดีเซลในอาหารเหลวและน้ำจืด

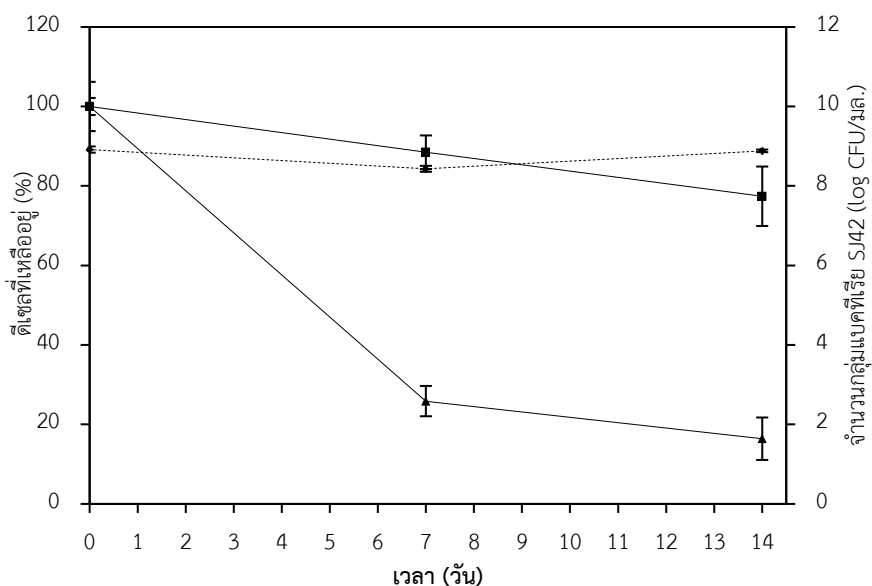
#### 4.5 การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา

ในงานวิจัยนี้ใช้ผักตบชวาที่เจริญตามธรรมชาติในบ่อน้ำข้างภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะ  
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland's ความเข้มข้น 50% เป็น  
เวลา 3 สัปดาห์ก่อนใช้ตรึงกับกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในอาหารเหลว Hoagland's โดยเลี้ยงในเรือน  
เพาะชำ

##### ก. ความสามารถในการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42

เนื่องจากในแผนการทดลองจะตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากพืชเพื่อบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนดีเซล  
ดังนั้นจึงต้องทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการเจริญและย่อยสลายดีเซลในอาหาร  
เหลว Hoagland's ซึ่งเป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงพืชและศึกษาความสามารถในการย่อยสลาย  
ดีเซลในอาหารดังกล่าว

นำกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มาทดสอบโดยทดลองเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.2 แต่ใช้อาหาร  
Hoagland's แทน เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 7 และ 14 โดยชุดควบคุมคืออาหาร Hoagland's ที่ไม่เติม  
กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 หลังจาก 7 วัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้  
 $74.14 \pm 4.2\%$  และวันที่ 14 ได้เท่ากับ  $83.60 \pm 7.4\%$  ตามลำดับ จำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรีย  
SJ42 ในอาหารเหลว Hoagland's เมื่อเริ่มต้นมีจำนวนเท่ากับ  $8.91 \pm 0.07 \log \text{CFU/มล.}$  ลดจำนวน  
ลงเหลือ  $8.43 \pm 0.07 \log \text{CFU/มล.}$  ในวันที่ 7 ก่อนจะเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น  $8.88 \pm 0.03 \log \text{CFU/มล.}$   
ในวันที่ 14 (รูปที่ 4.13) จากผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว  
Hoagland's สำหรับการเลี้ยงพืชนั้นให้ผลการทดลองย่อยสลายดีเซลได้น้อยกว่าการทดสอบใน  
อาหารเหลว CFMM ทั้งนี้เนื่องจากสูตรอาหารของ Hoagland's นั้นมีสารอาหารที่มีความเข้มข้นน้อย  
กว่า CFMM (ภาคผนวก ก) (Mouginot และคณะ, 2014) อีกทั้งแหล่งไนโตรเจนอยู่ในรูปของไนเตรต  
ที่เหมาะสมกับความต้องการของพืชมากกว่าแบคทีเรียที่ใช้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนีย



รูปที่ 4.14 การย่อยสลาย 1% ดิวเทิลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในอาหารทะเลว Hoagland's

- ดิวเทิลในชุดควบคุม
- ▲ ดิวเทิลที่เหลืออยู่ (SJ42)
- ◆ จำนวนแบคทีเรีย

#### ข. การลดจำนวนแบคทีเรียจากรากผักตบชวาโดยใช้สารเคมี

ใช้ผักตบชวาอายุ 3 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทะเลว นำมาวัดความยาวราก ลำต้น ซึ่งน้ำหนักเปียก เพื่อเลือกผักตบชวาให้มีขนาดใกล้เคียงกัน ผักตบชวาที่ใช้ทดลองจะมีขนาดลำต้นจนถึงปลายรากยาวประมาณ 20-25 ซม. ต้นแผ่กว้างประมาณ 15-20 ซม. มีจำนวนใบ 6-8 ใบหนักประมาณ 20-30 กรัม (หลังซับน้ำด้วยกระดาษให้แห้ง) ตัดราก ประมาณ 1 กรัมมาหาจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น จำนวนแบคทีเรียบนรากมีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 6-7 log CFU/กรัมราก การที่รากมีแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์อยู่แล้วอาจส่งผลให้การตรึงไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากมีการแข่งขันระหว่างแบคทีเรียที่เติมลงและแบคทีเรียประจำถิ่น จึงต้องลดจำนวนแบคทีเรียที่รากก่อน วิธีที่สามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่รากอาจใช้สารเคมี และสารเคมีที่นิยมใช้ทำให้พืชปลอดเชื้อคือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ และแอลกอฮอล์ (Barzanti และคณะ, 2007) แต่ในการทดลองนี้จำเป็นต้องให้พืชยังคงลักษณะเดิม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาปริมาณของสารเคมีที่ไม่เป็นอันตรายต่อพืชทั้งยังสามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้ดีที่สุด



รูปที่ 4.15 ลักษณะต้นผักตบชวาอายุ 3 สัปดาห์ที่ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 50 % Hoagland's  
ในเรือนเพาะชำ

การทดสอบความสามารถในการลดจำนวนแบคทีเรียได้สูงสุดของการใช้คลอโรกซ์ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) และเตตตอลที่ความเข้มข้นซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อผักตบชวา ผลแสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่าการใช้ 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระยะเวลา 20 นาที ดีที่สุด แบคทีเรียจากรากพืชลดลงจาก  $6.26 \pm 0.25$  log CFU/กรัม เหลือ  $3.95 \pm 0.16$  log CFU/กรัม ซึ่งลดแบคทีเรียลงได้ 36.90%

ตารางที่ 4.7 การใช้สารเคมีที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อลดจำนวนแบคทีเรียบนรากผักตบชวา

สารที่ทดสอบและเวลาที่ใช้	จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น (log CFU/กรัม)	จำนวนแบคทีเรียหลังลดจำนวน (log CFU/กรัม)	% จำนวนแบคทีเรียที่ลดลง
คลอโรอกซ์ 0.5% โดยปริมาตร 5 นาที	7.28±0.18	6.65±0.08	8.65
คลอโรอกซ์ 1.0% โดยปริมาตร 5 นาที	6.88±0.11	5.60±0.34	18.60
คลอโรอกซ์ 1.5% โดยปริมาตร 5 นาที	6.21±0.26	5.51±0.11	11.27
NaClO 0.5% โดยปริมาตร 20 นาที	7.17±0.10	6.23±0.14	13.11
NaClO 1.0% โดยปริมาตร 20 นาที	6.53±0.08	5.73±0.10	12.25
NaClO 1.5% โดยปริมาตร 20 นาที	6.15±0.07	4.18±0.32	32.03
NaClO 2.0% โดยปริมาตร 20 นาที	6.26±0.25	3.95±0.16	36.90
Dettol 5% โดยปริมาตร 15 นาที	6.09±0.10	5.04±0.12	17.24

เนื่องจากการใช้คลอโรอกซ์ที่ความเข้มข้น 2% ขึ้นไป ส่งผลให้รากผักตบชวาฟอกสี จากสีดำอมม่วง กลายเป็นสีเขียวขี้ม้าหลังจากแช่ 5 นาที ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกทดลองโดยใช้เวลา 5 นาที ในการแช่ผักตบชวาและลดความเข้มข้นคลอโรอกซ์ให้เจือจางลงเท่ากับ 0.5-1.5% และการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) ที่เข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 2% หลังจากแช่ 25 นาที ส่งผลผักตบชวาใบเริ่มเหี่ยว ดังนั้นงานวิจัยจึงได้ทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 0.5-2% และลดเวลาลงเป็น 20 นาที การใช้เดตตอลที่ความเข้มข้น 5% เป็นเวลาดังแต่ 5-30 นาที พบว่า ตั้งแต่ 20 นาทีที่พืชมีลักษณะใบซีด จึงได้เลือกใช้การทดสอบที่เวลา 15 นาที

จากผลการลดจำนวนแบคทีเรียที่ได้จากการทดลองนี้ ยังคงเหลือปริมาณแบคทีเรียที่รากจำนวนมาก ผู้วิจัยจึงเพิ่มวิธีการลดจำนวนแบคทีเรียที่รากนอกเหนือจากการใช้สารเคมี โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในการทดลองลดจำนวนแบคทีเรียที่รากผักตบชวา

### ค. การลดจำนวนแบคทีเรียจากรากผักตบชวาโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง

นำผักตบชวานำมาใส่ในบีกเกอร์ที่มีอาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อ 200 มล. จากนั้นนำเข้าเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงโดยใช้ความแรงสูงสุด (35 กิโลเฮิร์ตซ์) เป็นเวลา 20 นาที (Kirzhner และคณะ, 2009) จึงเปลี่ยนอาหารเหลวใหม่ทุก 5 นาที พบว่าการใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงสามารถลดจำนวนแบคทีเรียเฉลี่ย 15.31% และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผักตบชวา (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อลดจำนวนแบคทีเรียบนรากผักตบชวา

ใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ผักตบชวาต้นที่)	จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น log CFU/กรัม	จำนวนแบคทีเรียหลังกระทำ log CFU/กรัม	% จำนวนแบคทีเรียที่ลดลง
1	6.43±0.32	5.36±0.06	16.25
2	6.22±0.17	5.37±0.10	13.67
3	6.43±0.10	5.60±0.13	12.91
4	6.95±0.14	5.67±0.19	18.42
เฉลี่ย			15.31

อย่างไรก็ตามการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในการทดลองนี้ลดจำนวนแบคทีเรียได้เพียงบางส่วน ผู้วิจัยจึงใช้วิธีการนี้ทดสอบร่วมกับการใช้สารเคมีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดจำนวนแบคทีเรียที่รากผักตบชวา

### ง. การลดจำนวนแบคทีเรียจากรากผักตบชวาโดยใช้ 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับ เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง

ผักตบชวานำมาใส่ในบีกเกอร์ที่มีอาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อที่เติมและไม่เติม 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ จากนั้นนำเข้าเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงโดยใช้ความแรงสูงสุด (35 กิโลเฮิร์ตซ์) เป็นเวลา 20 นาที ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 และ 2 พบว่า เมื่อใช้อาหารเหลวปลอดเชื้อที่ไม่เติม 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ และใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง สามารถลดจำนวนแบคทีเรีย 20.33% ซึ่งใกล้เคียงกับผลที่แสดงในตารางที่ 4.10 แต่เมื่อเติม 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้สูง 53.81% ซึ่งสูงที่สุด ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจะใช้วิธีการลดจำนวนโดยใช้อาหารเหลว Hoagland's ปลอดเชื้อที่เติม 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ร่วมกับเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงที่ความแรงสูงสุด (35 กิโลเฮิร์ตซ์) เป็นเวลา 20 นาที (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 การใช้สารเคมีร่วมกับเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงเพื่อลดจำนวนแบคทีเรียบนรากผักตบชวา

ชุดการทดลอง	จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น (log CFU/กรัม)	จำนวนแบคทีเรียหลังกระทำด้วยสารเคมี และ/หรือเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (log CFU/กรัม)	% จำนวนแบคทีเรียที่ลดลง
Hoagland's ปลอดเชื้อที่เติม NaClO 2.0%	6.26±0.25	3.95±0.16	36.90
Hoagland's ปลอดเชื้อและใช้คลื่นเสียง	6.69±0.09	5.33±0.07	20.33
Hoagland's ปลอดเชื้อที่เติม NaClO 2.0% และใช้คลื่นเสียง	6.69±0.09	3.09±0.08	53.81

ดังนั้น การลดจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นที่รากผักตบชวาก่อนการตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จะเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการยึดเกาะของกลุ่มแบคทีเรียที่ใส่เพิ่มลงไปบนราก ซึ่งการลดจำนวนแบคทีเรียออกจากรากได้มากที่สุดคือการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 2% โดยปริมาตร ร่วมกับการการใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง จะสามารถกำจัดได้ 53.81% งานวิจัยก่อนหน้านี้

ต้องการลดจุลินทรีย์นั้น อาจใช้แช่ด้วยสารเคมีได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับต้องการกำจัดจุลินทรีย์จากพืช หรือ เมล็ดพืช จากงานวิจัยของ Daud และคณะ (2012) พบว่าการทดลองที่ใช้สารเมอร์คิวรีคลอไรด์ ( $HgCl_2$ ) และ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นที่ไม่เกิน 2% สามารถใช้กำจัดจุลินทรีย์จากส่วนต่างๆของพืช  $HgCl_2$  สามารถลดจุลินทรีย์ได้มากกว่า 90 % ในเวลา 15 นาที อย่างไรก็ตามการใช้สารดังกล่าวอาจเกิดพิษจากสาร  $HgCl_2$  ในบางงานวิจัยยังใช้สารเคมีมากกว่า 1 ชนิด เพื่อการกำจัดจุลินทรีย์รอบรากพืช เช่น 70% เอทานอลร่วมกับการใช้ 2.5% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ โดยแช่ไว้นาน 20 นาที (Barzanti และคณะ, 2007) แต่การใช้สารดังกล่าวนั้นเหมาะกับการใช้กับพืชเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือใช้เพื่อศึกษาจุลินทรีย์ที่รากโดยไม่ต้องใช้พืชที่ยังมีชีวิต ดังนั้นการทดลองการใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงจะเป็นการช่วยให้แบคทีเรียที่รากเกิดการหลุดออกมาได้และไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อพืช (White และคณะ, 2015)

#### จ. การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวา

เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตามวิธีในข้อ 3.7.3 ตัดรากก่อนและหลังตรึง ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 โดยวิธี PCR-DGGE

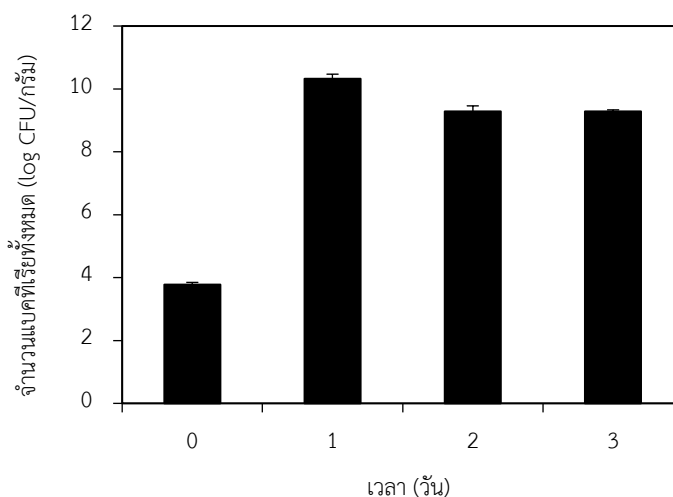
รากผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียก่อนใช้ มีจำนวนแบคทีเรียที่รากเริ่มต้นเท่ากับ  $3.77 \pm 0.07 \log$  CFU/กรัม. เมื่อตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 1 วัน จำนวนแบคทีเรียที่รากเพิ่มเป็น  $10.32 \pm 0.15 \log$  CFU/กรัม. และมีจำนวนลดลงเหลือ  $9.28 \pm 0.18 \log$  CFU/กรัม. และ  $9.28 \pm 0.05 \log$  CFU/กรัม. ในวันที่ 2 และ 3 ของการตรึง (รูปที่ 4.16)

จากผลการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนรากผักตบชวาแสดงให้เห็นว่า เมื่อเลี้ยงผักตบชวา 1 วัน จะมีแบคทีเรียที่รากเพิ่มขึ้นสูงที่สุด ไม่ว่าจะใช้รากที่ผ่านหรือไม่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่ราก อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นนี้อาจเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น หรือกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ดังนั้นจึงต้องนำรากผักตบชวาที่ผ่านการตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ไปวิเคราะห์ด้วย DGGE ต่อไป

จากรายงานของ Kirzhner และคณะ (2009) พบว่า ผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่รากด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงแล้วนำมาเลี้ยงในน้ำเสีย หลังผ่านไปเพียง 3 วันแรก จำนวนจุลินทรีย์ที่รากเพิ่มจำนวนสูงขึ้น และจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นนั้นแปรผันตรงกับปริมาณน้ำเสียที่ใช้เพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในน้ำเสียสามารถเข้าไปยึดเกาะที่รากผักตบชวาได้ตั้งแต่ 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยง ยังมีการใช้แทนในการบำบัดไนโตรฟีนอลในอาหารเหลวโดยใช้แทนที่ผ่านการลดจุลินทรีย์และเพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อมาทำการทดลองโดยการตรึงกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไนโตรฟีนอลได้ เพียงเพาะนำแทนใส่ลงในอาหารที่แขวนลอยด้วยกลุ่มแบคทีเรียและทิ้งระยะเวลาเพียง 10 นาที จะสามารถพบแบคทีเรีย 2 ชนิด ทั้งหมด 3 ชนิดที่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย



ดังกล่าว และยังพบว่าหลังจากการทดลองใช้แผ่นตรึงกลุ่มแบคทีเรียนี้ในการย่อยสลายไนโตรพีนอลเป็นเวลา 1 วัน มีแบคทีเรียหลุดออกมาอยู่ในอาหาร แต่กลับพบว่าจำนวนแบคทีเรียที่รากเหวนั้นยังคงเท่าเดิม (Kristanti และคณะ, 2014)

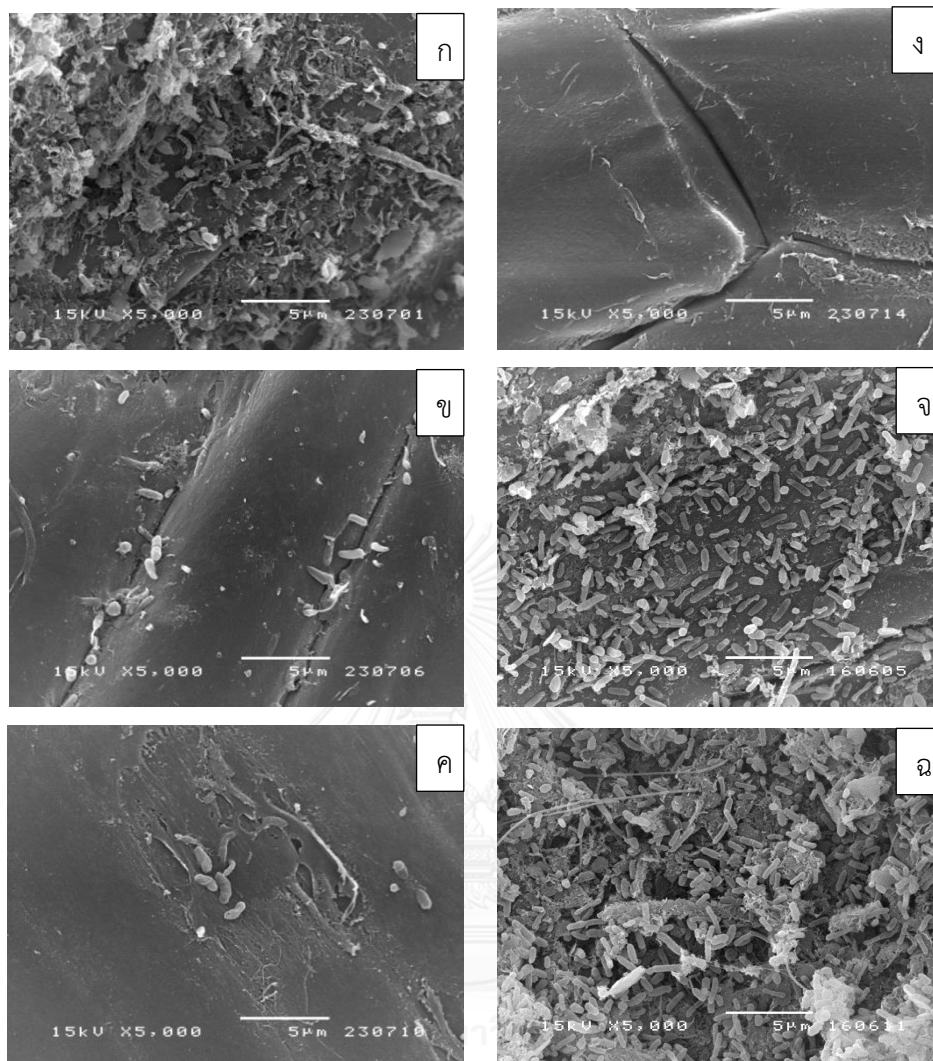


รูปที่ 4.16 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่รากผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียก่อนตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42

#### ฉ. การตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวา

##### ฉ.1 การตรวจสอบแบคทีเรียบนรากผักตบชวาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

การตรวจสอบแบคทีเรียบนรากผักตบชวาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า รากผักตบชวาที่ผ่านการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีแบคทีเรียที่ผิวรากมีจำนวนมาก แต่ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าแบคทีเรียที่ผิวรากจำนวนมากคือกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ดังนั้น การลดจำนวนแบคทีเรียที่รากลงโดยล้างน้ำประปานั้นจะยังพบแบคทีเรียอยู่ เมื่อลดจำนวนแบคทีเรียลงโดยใช้ 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ร่วมกับเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง จะพบแบคทีเรียจำนวนน้อยมากบนผิวราก และเมื่อสังเกตที่ผิวรากแล้วไม่มีความต่างจากรากที่ล้างด้วยน้ำประปา เมื่อตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จะเห็นแบคทีเรียจำนวนมากบนรากผักตบชวา แสดงว่า SJ42 สามารถยึดติดกับรากได้เป็นอย่างดี (รูปที่ 4.17)

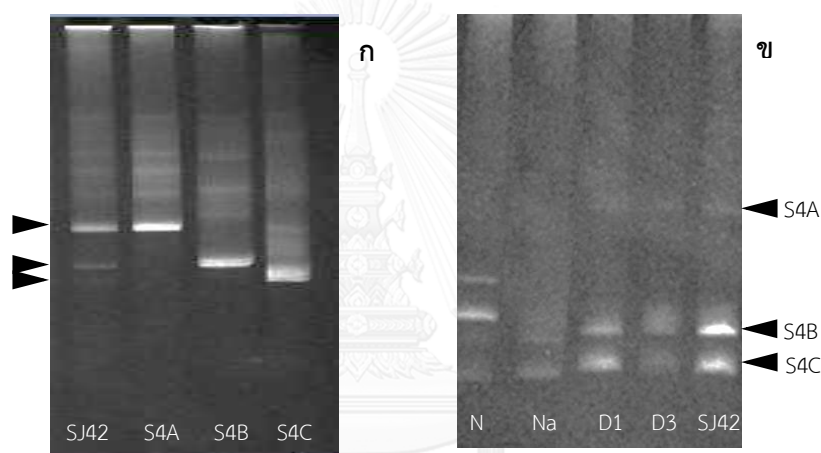


รูปที่ 4.17 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงแบคทีเรียที่รากผักตบชวา

- ก. รากผักตบชวาปกติ
- ข. รากหลังการลดจำนวนแบคทีเรียด้วยน้ำประปา
- ค. รากหลังการลดจำนวนแบคทีเรียโดย 2% NaClO
- ง. รากหลังการลดจำนวนแบคทีเรียโดย 2% NaClO ร่วมกับเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง
- จ. รากผักตบชวาปกติหลังตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42
- ฉ. รากผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียโดย 2% NaClO ร่วมกับเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงหลังตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42

## ฉ.2 การตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ด้วยวิธี Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

เนื่องจากแบคทีเรียที่ติดบนรากอาจเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นหรือเป็น กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์รากก่อนและหลังตรึงโดย PCR-DGGE ซึ่งทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากราก ผักตบชวา เพื่อใช้เป็นแม่แบบของ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA ของแบคทีเรียจากราก จากนั้นใช้ เทคนิค PCR-DGGE เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เป็นของกลุ่มแบคทีเรีย โดยมีดีเอ็นเอของกลุ่ม แบคทีเรีย SJ42 เพื่อเปรียบเทียบ (รูปที่ 4.18) จากผล PCR-DGGE แสดงให้เห็นว่าเมื่อผ่านไป 1 วัน สามารถพบกลุ่มแบคทีเรียที่รากผักตบชวาและยังคงพบจนวันที่ 3 ของการตรึง ซึ่งเป็นการยืนยันว่า กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นั้นยึดเกาะอยู่ติดกับรากผักตบชวาได้

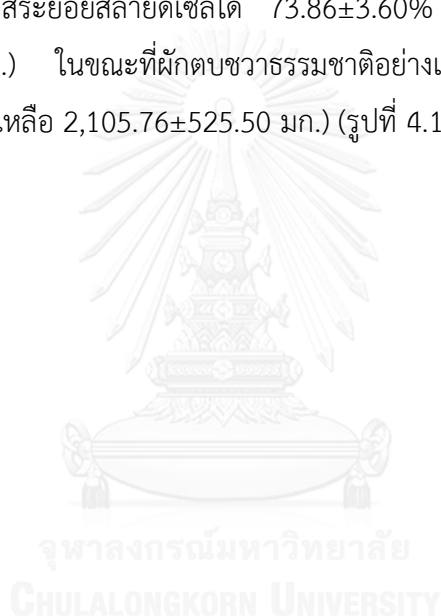


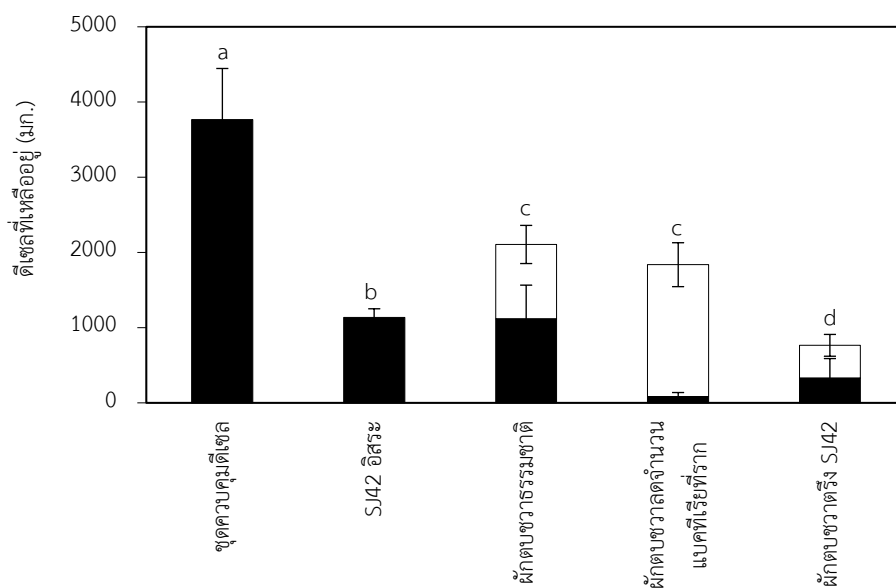
รูปที่ 4.18 แถบดีเอ็นเอจาก PCR-DGGE (เกรเดียนต์ 30-70% ยูเรีย-ฟอร์มามาไมด์) ในการวิเคราะห์ 16S rDNAของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ไอโซเลต S4A ไอโซเลต S4B และไอโซเลต S4C (ก) และ แถบดีเอ็นเอจาก PCR-DGGE (เกรเดียนต์ 50-80% ยูเรีย-ฟอร์มามาไมด์) ในการวิเคราะห์ 16S rDNAของกลุ่มแบคทีเรียที่รากก่อนตรึง (N) รากหลังลดจำนวนด้วย NaClO ร่วมกับเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Na) และรากหลังจากตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 1 วัน (D1) และ 3 วัน (D3) เทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 (ข).

#### 4.6 การย่อยสลาย 1% ดีเซล โดยกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนรากผักตบชวา

##### ก. การย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's

การย่อยสลาย 1% ดีเซล (4,164 มก.) ในอาหารเหลว Hoagland's ปริมาตร 500 มล. โดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวา พบว่าหลัง 7 วัน ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนรากผักตบชวา สามารถกำจัดดีเซลได้สูงที่สุดจาก 3,502.20±64.43 มก. เหลือ 764.83±294.89 มก. (78.16±7.41%) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่เติมเฉพาะผักตบชวาผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่ราก ลดดีเซลจาก 4,396.40±357.40 มก. เหลือ 1,836.98±238.67 มก. (58.21±1.21%) ชุดควบคุมที่มีเฉพาะอาหารเหลวยังคงเหลือดีเซลสูงถึง 3,767.58±678.37 มก. กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อีสรย่อยสลายดีเซลได้ 73.86±3.60% (4,343.04±203.15 มก. เหลือ 1,135.15±115.39 มก.) ในขณะที่ผักตบชวาธรรมชาติอย่างเดียวลดดีเซลได้ 37.96±13.11% (3,394.69±139.97 มก. เหลือ 2,105.76±525.50 มก.) (รูปที่ 4.19)





รูปที่ 4.19 ปริมาณดีเซลในตัวอย่างอาหารเหลว Hoagland's และที่รากผักตบชวา หลังการบำบัดด้วยวิธีต่างๆเป็นเวลา 7 วัน

□ รากผักตบชวา

■ อาหารเหลว Hoagland's

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05)

ตารางที่ 4.10 และ 4.11 แสดงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในการทดลองต่างๆ จากการทดลอง พบว่า จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่รากผักตบชวาในทุกชุดการทดลองมีจำนวนเพิ่มขึ้น และพบว่ามีแบคทีเรียจำนวนหนึ่งหลุดออกและอยู่ในอาหารเหลว จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากรากพืชสามารถปลดปล่อยสารที่ช่วยเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้ ทั้งสารอินทรีย์ กรดอะมิโนและกรดไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน พอลิแซ็กคาไรด์ และโปรตีนต่างๆ ที่แบคทีเรียสามารถใช้เพื่อการเจริญได้ (Stout และ Nüsslein, 2010, Rohrbacher และ St-Arnaud, 2016)

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในรากจะมีแบคทีเรียเริ่มต้นที่ 8 log CFU/กรัม และเมื่อลดจำนวนแบคทีเรียด้วย 2% NaClO จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่รากลดลงเหลือประมาณ 4 log CFU/กรัม หลังตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 รากผักตบชวาพบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นเป็น 8-9 log CFU/กรัม และเมื่อเวลาผ่านไป 7 วันของการทดลองย่อยสลายดีเซล จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในราก

ผักตบชวาที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรียไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนในอาหารเหลวพบจำนวนลดลงจากจำนวนที่พบในรากแต่ยังคงสูงถึง 7-8 log CFU/มล.

ตารางที่ 4.10 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดการทดสอบย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างอาหารเหลว Hoagland's

ชุดการทดลอง	จำนวนแบคทีเรียที่ราก (log CFU/กรัม)				จำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลว (log CFU/มล.)	
	รากเริ่มต้น	รากผ่านการลดจำนวนแบคทีเรีย	รากหลังตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42	รากวันที่ 7	อาหารเหลววันที่ 0	อาหารเหลววันที่ 7
SJ42 อีสระ	-	-	-	-	9.16±0.13	8.90±0.14
ผักตบชวาธรรมชาติ	8.26±0.04	-	-	8.65±0.32	-	7.10±0.04
ผักตบชวา/ NaClO	8.17±0.26	4.15±0.07	-	6.51±0.15	-	4.81±0.06
ผักตบชวาตรึง SJ42	8.11±0.13	4.45±0.11	8.88±0.33	8.89±0.17	-	8.27±0.07

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่นับได้นั้นยังคงไม่เพียงพอต่อการสนับสนุนข้อมูลของการลดลงของดีเซลได้เนื่องจากจำนวนที่แสดงเป็นจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบ แต่ไม่ใช่จำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนับจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้ เพื่อสนับสนุนข้อมูลการย่อยสลายดีเซลที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลอง ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยที่พบว่า จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลที่รากผักตบชวาในทุกชุดการทดลองมีจำนวนเพิ่มขึ้น หลังจาก 7 วันของการย่อยสลายดีเซล โดยในชุดการทดลองใช้ผักตบชวาตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลที่พบในรากนั้นยังคงมีสูงถึง 8 log CFU/กรัม และยังพบแบคทีเรียที่ย่อยสลายดีเซลแขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวปริมาณสูงถึง 7 log CFU/มล. เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลวและรากผักตบชวา

ชุดการทดลอง	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/กรัม)				จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/มล.)	
	รากเริ่มต้น	รากผ่านการลดจำนวนแบคทีเรีย	รากหลังตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42	รากวันที่ 7	อาหารเหลววันที่ 0	อาหารเหลววันที่ 7
SJ42 อีสระ	-	-	-	-	8.40±0.13	8.33±0.23
ผักตบชวาธรรมชาติ	7.35±0.18	-	-	7.72±0.09	-	6.20±0.16
ผักตบชวา/ NaClO	6.87±0.11	2.70±0.07	-	3.62±0.06	-	2.95±0.14
ผักตบชวา/ ตรึง SJ42	6.17±0.13	2.78±0.09	8.91±0.04	8.30±0.30	-	7.74±0.08

หลังจากการทดลอง 7 วัน ทดสอบความสามารถในสะสมดีเซลที่รากผักตบชวา พบว่า รากผักตบชวาสามารถดูดซับดีเซลได้เพิ่มขึ้นกว่าวันที่ 0 โดยดีเซลจะถูกสะสมอยู่ที่รากผักตบชวาธรรมชาติได้ 47% แต่เมื่อลดจำนวนแบคทีเรียที่รากออก ส่งผลให้ดีเซลสะสมที่รากผักตบชวาเพิ่มสูงขึ้นเป็น 95% ส่วนดีเซลที่สะสมในรากผักตบชวาตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีปริมาณลดลงเหลือ 62% ทั้งนี้ ความเข้มข้นดีเซลที่ลดลงอาจเกิดจากการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ร่วมกับแบคทีเรียประจำถิ่นบนรากผักตบชวา เมื่อพิจารณาเทียบกับรากที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียยังคงพบปริมาณดีเซลสูง และผักตบชวาธรรมชาติสามารถลดดีเซลลงได้บางส่วน โดยสรุปแล้วปริมาณดีเซลทั้งหมดในวันที่ 7 มีแนวโน้มลดลงในทุกชุดการทดลองเมื่อเทียบกับดีเซลทั้งหมดในวันที่ 0 และเกิดการสะสมดีเซลที่รากผักตบชวาสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป

การทดลองนี้เป็นข้อมูลที่ได้จากการสกัดดีเซลออกจากส่วนราก หลังจากวิเคราะห์ด้วย GC ปริมาณดีเซลที่สะสมอยู่ที่รากคิดจากพื้นที่ใต้กราฟของปริมาณดีเซลจากรากที่ตรวจวัดได้ เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากปริมาณดีเซลเมื่อเริ่มต้นทั้งหมดในวันที่ 0 คำนวณเปรียบเทียบกับกราฟดีเซลมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นดีเซลที่รากผักตบชวา และรายงานเป็น % ความเข้มข้นดีเซลในราก ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ปริมาณดีเซลที่สะสมในรากผักตบชวา

ชุดการทดลอง	ดีเซลทั้งหมด วันที่ 0 (มก.)	ดีเซลที่ราก วันที่ 0 (มก.)	% สะสม ดีเซลที่ราก วันที่ 0	ดีเซลทั้งหมด วันที่ 7 (มก.)	ดีเซลที่ราก วันที่ 7 (มก.)	% สะสมดีเซล ที่ราก วันที่ 7
ผักตบชวา ธรรมชาติ	3394.69	333.90	9.79±1.81	2105.75	985.65	47.53±12.41
ผักตบชวา/ NaClO	4396.40	1335.60	30.15±4.28	1836.97	1753.26	95.15±3.30
ผักตบชวา ตรึง SJ42	3502.20	400.84	11.39±4.17	764.83	435.60	62.03±24.34

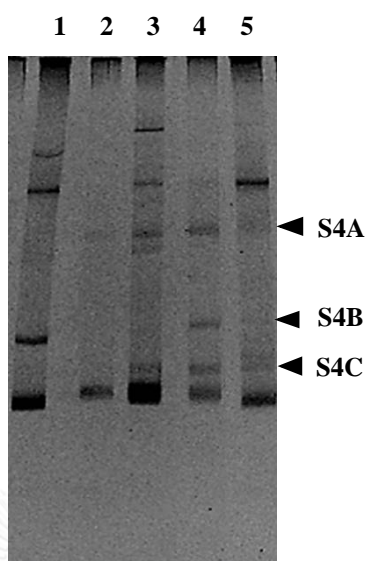
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่รากพืชนั้นสามารถอยู่รอดได้ในระหว่างการกำจัดดีเซล สอดคล้องกับปริมาณดีเซลที่ลดลงตามลำดับ ซึ่งการลดลงของดีเซลนั้นเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในรากผักตบชวาที่ถูกตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 กล่าวได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นั้นช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's ได้ดีกว่าการใช้เพียงพืชหรือกลุ่มแบคทีเรียอิสระ ส่วนการลดลงของดีเซลในชุดที่มีผักตบชวาธรรมชาตินั้น อาจเกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรียที่รากผักตบชวา เนื่องจากไม่มีการลดจำนวนแบคทีเรียที่รากก่อนการทดลอง เพียงแค่ล้างสิ่งสกปรกออกจากรากด้วยน้ำประปาจะสามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้เพียงแค่ 1 log CFU/กรัม ราก ดังนั้นจะยังคงมีแบคทีเรียรอบรากประจำถิ่นเหลืออยู่ อีกทั้งการทดลองนี้พบจำนวนของแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลได้ในผักตบชวาธรรมชาติ ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าดีเซลที่ลดลงเกิดจากการย่อยสลายบางส่วนโดยแบคทีเรีย และเนื่องจากยังไม่มีรายงานว่ามีผักตบชวาสามารถย่อยสลายดีเซลได้ ดีเซลที่หายไปบางส่วน อาจเป็นผลมาจากการดูดซับดีเซลโดยผักตบชวา (Ukiwe และคณะ, 2012, Yang และคณะ, 2014)

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากพืชน้ำจืดโดยตรึงบนรากผักตบชวาหรือพืชน้ำจืดอื่นเพื่อการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลวในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่คัดแยกได้ เมื่อตรึงบนรากผักตบชวาส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด 1% ดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's ดีกว่าการใช้เพียงผักตบชวาธรรมชาติเพียงอย่างเดียว และยิ่งไปกว่านั้นยังกำจัดดีเซลได้ดีกว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อิสระโดยตรง



### ก.1 การตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่ตรึงบนรากผักตบชวาก่อนและหลังใช้บำบัด ดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's

สกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 16S rDNA ของแบคทีเรียจากรากผักตบชวาก่อนและหลังการทดลอง ตรวจสอบติดตามโดยเทคนิค PCR-DGGE การติดตามกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวาที่ใช้เพื่อย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างอาหารเหลว Hoagland's พบว่าหลังจาก 7 วันยังสามารถพบกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวา แต่แถบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ไอโซเลต S4B ในกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ไม่ถูกตรวจพบในวันที่ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4.20) อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรีย ไอโซเลต S4B ไม่รอดชีวิต หรือมีจำนวนน้อยลงจนไม่สามารถถูกตรวจพบได้ และการรบกวนจากแบคทีเรียประจำถิ่นรวมถึงสถานะของตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาก็อาจมีผลกระทบร่วมด้วย อีกทั้งแบคทีเรีย ไอโซเลต S4B ด้วยตัวเองไม่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ แต่แม้ว่าแบคทีเรีย ไอโซเลต S4B จะไม่ถูกตรวจพบก็ตาม การย่อยสลายดีเซลยังคงให้ผลที่ดีกว่า เมื่อใช้ชุดการทดลองที่มีผักตบชวาตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เมื่อเทียบกับชุดผักตบชวาที่ไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย หรือใช้กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อีสุระ



รูปที่ 4.20 รูปแบบ DGGE ของ 16S rDNA ที่พบในรากผักตบชวาในระหว่างการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึง (30-70% ยูเรีย-ฟอร์มาไมด์ เกรเดียนท์)

ช่องวิ่งที่ 1 ผักตบชวาไม่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่ราก

ช่องวิ่งที่ 2 ผักตบชวาผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่ราก

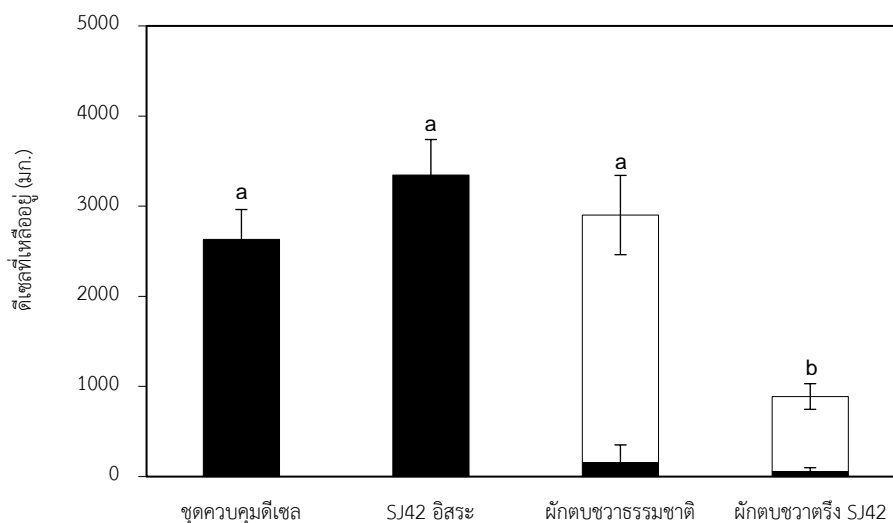
ช่องวิ่งที่ 3 ผักตบชวาผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่รากตรึง SJ42 หลังจาก 7 วัน

ช่องวิ่งที่ 4 กลุ่มแบคทีเรีย SJ42

ช่องวิ่งที่ 5 ผักตบชวาผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่รากตรึง SJ42

**ข. การย่อยสลาย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42  
ตรึงบนรากผักตบชวา**

การย่อยสลาย 1% ดีเซล (4,164 มก.) ทดสอบในตัวอย่างน้ำจืดจากแม่น้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวา ใช้ตัวอย่างน้ำปริมาตร 500 มล. ที่เติม 1% ดีเซล ชุดควบคุม คือ ชุดที่ไม่มีพีซี ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อีสระ และผักตบชวาธรรมชาติ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลาย (ทำ 3 ซ้ำ) หลังจาก 7 วัน พบว่าชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนรากผักตบชวา สามารถกำจัดดีเซลได้สูงที่สุดจาก  $4,704.73 \pm 513.14$  มก. เหลือ  $888.61 \pm 175.29$  มก. ( $81.11 \pm 0.91\%$ ) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอีกสามชุดการทดลองคือ ชุดที่เติมผักตบชวาธรรมชาติอย่างเดียวลดดีเซลได้  $33.99 \pm 4.41\%$  ( $4,396.40 \pm 357.40$  มก. เหลือ  $2,901.99 \pm 284.48$  มก.) ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อีสระย่อยสลายดีเซลได้  $31.48 \pm 8.1\%$  ( $4,880.85 \pm 420.85$  มก. เหลือ  $3,344.29 \pm 395.35$  มก.) และชุดควบคุมที่มีเฉพาะอาหารเหลวยังคงเหลือดีเซล  $2,633.30 \pm 329.58$  มก. (รูปที่ 4.21)



รูปที่ 4.21 การย่อยสลายดีเซลในตัวอย่งน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรีงบนรากผักตบชวาที่เวลา 7 วัน

- น้ำเจ้าพระยา
- รากผักตบชวา

(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์โดยใช้วิธี one way-ANOVA (Duncan's alpha test) กำหนดค่าตัวอักษรให้มีระดับนัยสำคัญ 0.05)

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่นับได้ในรากผักตบชวาจริงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เริ่มต้นมี  $8.92 \pm 0.05$  log CFU/กรัม และในจำนวนนี้เป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายดีเซล  $7.56 \pm 0.05$  log CFU/กรัม เมื่อผ่านไป 7 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น  $9.29 \pm 0.05$  log CFU/กรัม และ  $8.21 \pm 0.07$  log CFU/กรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า จำนวนแบคทีเรียที่รากผักตบชวาจริงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นี้ สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ในระหว่างการย่อยสลายดีเซล ทั้งนี้ยังพบจำนวนแบคทีเรียและแบคทีเรียที่ย่อยสลายดีเซลได้ในส่วนของน้ำเจ้าพระยาเช่นกันแต่จำนวนน้อยกว่าที่พบในรากผักตบชวาจริงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ส่วนจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลในชุดที่เติมเฉพาะกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อีสระนั้น เมื่อผ่านไป 7 วัน ลดลงจาก  $8.83 \pm 0.24$  เหลือ  $7.34 \pm 0.06$  log CFU/มล. และ  $7.63 \pm 0.08$  เหลือ  $6.78 \pm 0.10$  log CFU/มล. ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับชุดที่มีเฉพาะผักตบชวาธรรมชาติ มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลเท่ากับ  $7.75 \pm 0.20$  log CFU/กรัม และ  $4.41 \pm 0.35$  log CFU/กรัม ลดลงจากจำนวนเริ่มต้นในวันที่ 0 ที่มีเท่ากับ  $8.29 \pm 0.16$  และ

$6.84 \pm 0.09$  log CFU/กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.13) ซึ่งจากผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลนั้นสอดคล้องกับการลดลงของดีเซลในตัวอย่างน้ำเจ้าพระยา โดยที่แม้ว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในรากจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่อผ่านไป 7 วัน แต่กลับพบจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ลดลง ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's



ตารางที่ 4.13 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดและรากผักตบชวา

ชุดการทดลอง	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/กรัม)			จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/มล.)		
	รากเริ่มต้น	รากผ่านการลดจำนวนแบคทีเรีย	รากหลังตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42	รากวันที่ 7	ตัวอย่างน้ำจืดวันที่ 0	ตัวอย่างน้ำจืดวันที่ 7
แบคทีเรียทั้งหมด						
น้ำเจ้าพระยา / ดีเซล	-	-	-	-	3.54±0.05	3.48±0.25
SJ42 อีสระ	-	-	-	-	8.83±0.24	7.34±0.06
ผักตบชวาธรรมชาติ	8.29±0.16	-	-	7.75±0.20	5.43±0.07	5.67±0.04
ผักตบชวา /NaClO ตรึง SJ42	7.27±0.12	3.96±0.10	8.92±0.05	9.29±0.05	5.43±0.12	6.42±0.09
แบคทีเรียย่อยดีเซล						
น้ำเจ้าพระยา / ดีเซล	-	-	-	-	2.66±0.24	2.27±0.10
SJ42 อีสระ	-	-	-	-	7.63±0.08	6.78±0.10
ผักตบชวาธรรมชาติ	6.84±0.09	-	-	4.41±0.35	3.53±0.08	3.65±0.14
ผักตบชวา /NaClO ตรึง SJ42	3.31±0.08	1.43±0.09	7.56±0.05	8.21±0.07	4.11±0.11	5.26±0.08

หลังจากการทดลอง 7 วัน ได้ทดสอบหาการสะสมดีเซลที่รากผักตบชวา พบว่า รากผักตบชวาสามารถสะสมดีเซลได้เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และในวันที่ 7 ดีเซลสะสมอยู่ที่รากผักตบชวามากกว่า 94% โดยคิดเทียบกับปริมาณดีเซลทั้งหมดวันที่ 0 ซึ่งการคำนวณนั้นดังได้กล่าวไว้แล้วในผลการทดลองที่ 4.3.2 ข้อที่ 1 (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.14 ปริมาณดีเซลที่สะสมในรากผักตบชวา

ชุดการทดลอง	ดีเซลทั้งหมด (มก.)	ดีเซลที่รากวันที่ 0 (มก.)	% สะสมดีเซลที่รากวันที่ 0	ดีเซลทั้งหมด (มก.)	ดีเซลที่รากวันที่ 7 (มก.)	% สะสมดีเซลที่รากวันที่ 7
ผักตบชวาธรรมชาติ	4396.40	1335.60	30.16±4.28	2901.99	2745.06	94.27±7.24
ผักตบชวาตรึง SJ42	4704.73	1603.37	33.37±9.7	888.61	833.00	94.17±4.42

การตรวจวัดค่าพารามิเตอร์เฉพาะในการทดลองที่ใช้ตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยา พบว่าในวันที่ 0 ที่มีการเติม 1% ดีเซลไปแล้วนั้น ส่งผลให้ค่า BOD และ COD เพิ่มขึ้นสูงมาก เมื่อเทียบกับตัวอย่างน้ำที่ไม่มีดีเซล แต่หลังจาก 7 วัน เกิดการลดลงของของค่าค่า BOD และ COD ในชุดที่เติมผักตบชวาที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มากกว่าชุดที่มีแต่ผักตบชวา หรือกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง โดยที่ผักตบชวาตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถลด BOD และ COD ได้สูงถึง 86.5% และ 80.1% ตามลำดับ ส่วนผักตบชวาธรรมชาติสามารถลดได้ 26.9% และ 22.4% ตามลำดับ กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อิสระลด BOD และ COD ได้ 19.5% และ 14.1% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมวันที่ 7 สามารถลดได้ 9.5% และ 18.2% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่าที่วัดได้ในวันที่ 0 ส่วนปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยามีค่าค่อนข้างต่ำ และพบว่าหลังจาก 7 วัน มีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.15

จากการทดลองจะพบว่าผักตบชวาสามารถลด BOD และ COD ได้ แม้ไม่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งมีรายงานว่า ผักตบชวานั้นสามารถใช้บำบัดน้ำเสียได้ พร้อมทั้งสามารถลดปริมาณ BOD และ COD ได้ เช่นการใช้ผักตบชวาธรรมชาติเพื่อลดค่า COD ในบึงประดิษฐ์เพื่อบำบัดน้ำเสียจากฟาร์มเลี้ยงเป็ดไข่ พบว่า ผักตบชวาสามารถลดค่า COD ได้ 64.44% ในเวลา 40 วัน (Jianbo และคณะ, 2008) ผักตบชวาสามารถลด COD ได้ 51.9% และ BOD ได้ 43.3% จากบ่อบำบัดน้ำเสียในมหาวิทยาลัย Ibadan ประเทศไนจีเรีย (Achi และคณะ, 2014) จากงานวิจัยก่อนหน้าจะเห็นว่าผักตบชวามี

ความสามารถในการลด BOD และ COD อยู่แล้ว แต่งานวิจัยนี้ จะพบว่าเมื่อตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ก่อนย่อยสลายดีเซลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการลด BOD และ COD ในตัวอย่างน้ำได้สูงขึ้น

ปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เพิ่มมานั้น ทั้งในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรียอิสระ และเติมผักตบชวาทั้งที่ตรึงและไม่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อาจมีสาเหตุมาจากการที่มีเซลล์แบคทีเรีย ปริมาณสูง และมีบางส่วนที่ตายไป ปลดปล่อยแร่ธาตุออกมาจากองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียเอง (Fagerbakke และคณะ, 1996) หรือบางส่วนอาจมาจากการปลดปล่อยสารอาหารจากรากผักตบชวา เพื่อส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย (Compant และคณะ, 2010)



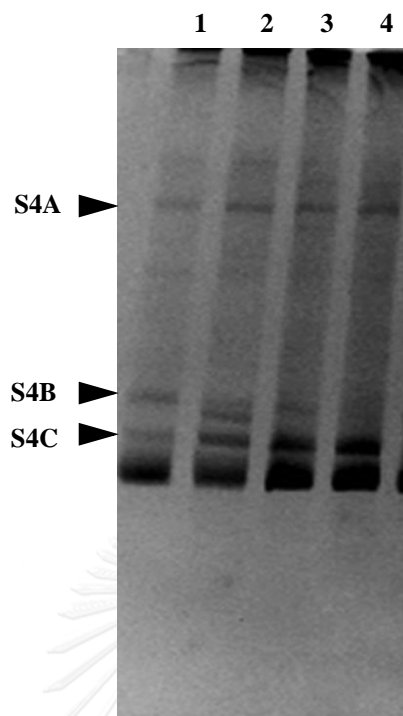


ตารางที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ของตัวอย่างน้ำในการทดลองย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่ม  
แบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวา เป็นเวลา 7 วัน

ชุดการทดลอง	พารามิเตอร์			
	ไนโตรเจนทั้งหมด (มก./ล.)	ฟอสฟอรัสทั้งหมด (มก./ล.)	BOD (มก./ล.)	COD (มก./ล.)
น้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยา	1.7	0.53	1.3	275
น้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาเดิม 1% ดีเซล วันที่ 0	0.6	0.68	2,325	10,537
น้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาเดิม 1% ดีเซล วันที่ 7	0.9	1.00	2,105	8,617
SJ42 อีสระวันที่ 0	2.4	2.8	7,075	15,917
SJ42 อีสระวันที่ 7	2.1	0.46	5,691	13,670
ผักตบชวาธรรมชาติ วันที่ 7	2.2	1.30	1,698	8,177
ผักตบชวา/NaClO ตรึง SJ42 วันที่ 7	3.8	8.00	312	2,100

### ข.1 การตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่ตรึงบนรากผักตบชวาก่อนและหลังใช้บำบัด ติเซลในตัวอย่างน้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดภัย

สกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 16S rDNA ของแบคทีเรียจากรากผักตบชวาก่อนและหลังการทดลอง ตรวจสอบติดตามโดยเทคนิค PCR-DGGE การติดตามกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวาที่ใช้เพื่อย่อยสลายติเซลในตัวอย่างน้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดภัย พบว่าหลังจาก 7 วันยังสามารถพบกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวา แต่แถบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ไอโซเลต S4B ในกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ไม่ถูกตรวจพบในวันที่ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4.22) อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรีย ไอโซเลต S4B ไม่รอดชีวิต หรือมีจำนวนน้อยลงจนไม่สามารถถูกตรวจพบได้ และการรบกวนจากแบคทีเรียประจำถิ่นรวมถึงสภาวะของตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาก็อาจมีผลกระทบร่วมด้วย อีกทั้งแบคทีเรีย ไอโซเลต S4B ด้วยตัวเองไม่สามารถย่อยสลายติเซลได้ แต่แม้ว่าแบคทีเรีย ไอโซเลต S4B จะไม่ถูกตรวจพบก็ตาม การย่อยสลายติเซลยังคงให้ผลที่ดีกว่า เมื่อใช้ชุดการทดลองที่มีผักตบชวาตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เมื่อเทียบกับชุดผักตบชวาที่ไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย หรือใช้กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อีสุระ



รูปที่ 4.22 รูปแบบ DGGEของ 16S rDNAของแบคทีเรียบนรากผักตบชวาในระหว่างการย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำเจ้าพระยาโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึง (เกรเดียนต์ 50-80% ยูเรีย-ฟอร์มาไมด์)

ช่องวิ่งที่ 1 กลุ่มแบคทีเรีย SJ42

ช่องวิ่งที่ 2 ผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่ราก

ช่องวิ่งที่ 3 ผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่รากตรึง SJ42

ช่องวิ่งที่ 4 ผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่รากตรึง SJ42 วันที่ 7

จากผล DGGE แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถเข้าไปยึดเกาะกับรากผักตบชวาได้ กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ประกอบด้วย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ S4A *S. maltophilia* สายพันธุ์ S4B และ *O. intermedium* สายพันธุ์ S4C ซึ่งจัดว่าเป็น rhizosphere แบคทีเรีย (Hassan และคณะ, 2014, Nayak และคณะ, 2016, Singha และ Pandey, 2017) จึงสามารถเข้ายึดเกาะกับรากพืชได้ แม้ว่ารากพืชนั้นจะไม่ใช่นิตเดียวกับที่กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ถูกคัดแยกมาก็ตาม เพราะพืชเองสามารถสร้างสารเพื่อกระตุ้นการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียได้ (Hoang และคณะ, 2010, Graj และคณะ, 2013) พืชและแบคทีเรียรอบรากพืชนั้นพึ่งพาอาศัยกัน โดยพืชสามารถปลดปล่อยอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียได้ แล้วแบคทีเรียที่รากจะช่วยพืชโดยการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้พืชเพื่อใช้ใน

การเจริญเช่นกัน เช่นงานวิจัยของ Afzal และคณะ (2013) ที่ทดลองนำแบคทีเรีย *Burkholderia phytofirmans* PsJN ที่คัดแยกจากรากหัวหอมมาเพื่อให้เกิดการยึดเกาะกับหญ้าโดยการทดลองใส่แบคทีเรียร่วมกับเมล็ดหญ้า หลังจากเมล็ดงอก พบว่าแบคทีเรียสามารถยึดเกาะที่รากได้โดยวิธีการใส่ลงในดินโดยตรงมากที่สุด และสามารถช่วยเพิ่มการย่อยสลายได้ 24-49% ในเวลา 90 วัน

โดยสรุป จากผลการทดลองย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's และน้ำตัวอย่างจากแม่น้ำเจ้าพระยาโดยใช้ผักตบชวาที่ตรึงและไม่ตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าว พบว่าการใช้ผักตบชวาตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ให้ผลการย่อยสลายดีเซลได้สูงสุดในเวลา 7 วัน การใช้ผักตบชวาตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ดีกว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อิสระ และผักตบชวาเพียงอย่างเดียว ในขณะที่ชุดควบคุมดีเซลในอาหารเหลว ดีเซลลดลงบางส่วนจากการสลายตัวทางกายภาพ เช่น การระเหย (Serrano และคณะ, 2008) การสลายตัวโดยแสง (Zhong และคณะ, 2003) ดังนั้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ผักตบชวาที่มีกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลอย่างมีนัยสำคัญ ผลที่ได้ในงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับการใช้แบคทีเรียตรึงที่รากพืช *Dracaena* ที่เติมแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากรากพืชดังกล่าวเพื่อการย่อยสลาย Bisphenol A (BPA) พบว่า BPA ความเข้มข้น 20  $\mu$ M ในอาหารเหลว Hoagland's ลดลงสูงถึง 85% หลังจาก 20 วัน ขณะที่การใช้พืชอย่างเดียว BPA ถูกกำจัดเพียง 50% (Saiyood และคณะ, 2010)

นอกจากนี้ การลดจำนวนแบคทีเรียจากรากพืชก่อนการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 มีความจำเป็นเนื่องจากที่รากพืชจะมีแบคทีเรียประจำถิ่นและอาจต่อต้านการยึดติดของจุลินทรีย์อื่น โดยการสร้างไบโอฟิล์ม ทำให้ยากต่อการหลุดออกจากราก (Kirzhner และคณะ, 2009) ส่งผลให้แบคทีเรียใหม่ไม่สามารถเข้ายึดเกาะรากได้ ผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียที่รากก่อนตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จึงมีกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เข้าไปเกาะอยู่ได้ดี ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายดีเซลได้ดีกว่าการใช้ผักตบชวาที่ไม่ได้ลดจำนวนแบคทีเรียที่รากก่อนตรึง จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่าผักตบชวาสามารถย่อยสลายดีเซลได้ ดังนั้นดีเซลที่ลดลงเป็นไปได้ว่าอาจจะมาจากจุลินทรีย์ในรากผักตบชวาที่สามารถย่อยสลายได้ ยิ่งไปกว่านั้นจำนวนแบคทีเรียที่รากมีจำนวนคงที่จนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งเป็นไปได้ว่าผักตบชวามีการหลั่งสารเพื่อช่วยให้แบคทีเรียยึดติด สารที่พืชหลั่งออกมาจากรากนั้นจะมีความจำเพาะจากการที่พืชเจริญในสภาวะต่างๆ ทำให้ดึงดูดแบคทีเรียที่แตกต่างกันมายึดเกาะที่รากได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย rhizosphere (Compant และคณะ, 2010)

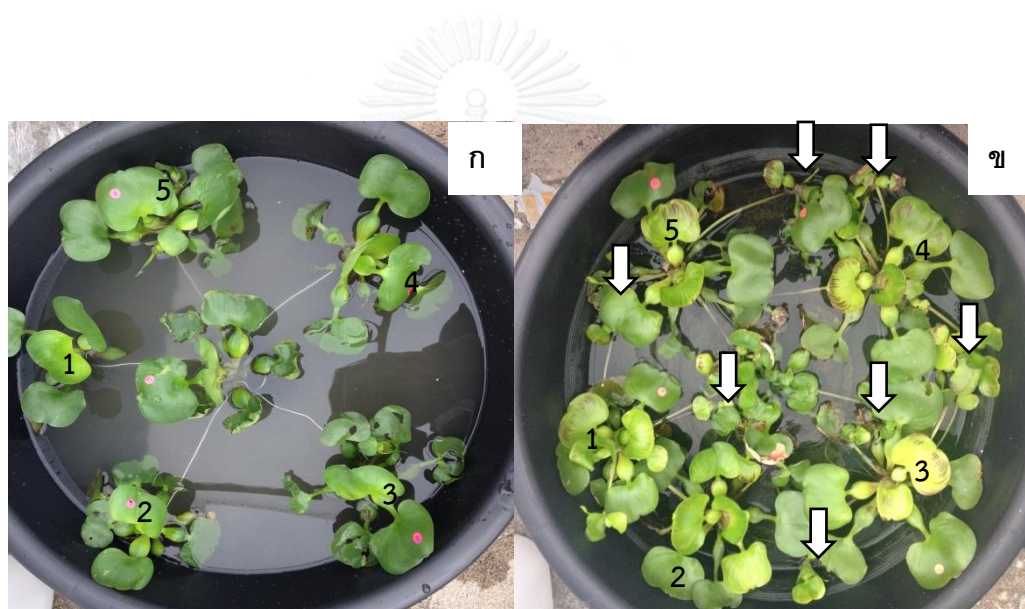
การเติมกลุ่มแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารมลพิษในสิ่งแวดล้อมส่วนมาก จะเป็นการเติมแบคทีเรียลงไปพร้อมกับพืชเพื่อการบำบัด แต่การตรึงกลุ่มแบคทีเรียกับรากพืชเพื่อการย่อยสลายสารมลพิษในสิ่งแวดล้อมนั้นก็พบว่า สามารถทำได้และทำให้การย่อยสลายเพิ่มขึ้น ดังเช่นผลการทดลองในงานวิจัยนี้ การใช้กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากแหล่งที่ประกอบด้วยแบคทีเรีย

ย่อยสลายไนโตรพินอล (*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ MFR-1, *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ PFR-1 และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ DFR-1) เติบโตในน้ำปนเปื้อน 2-ไนโตรพินอล 3-ไนโตรพินอล 4-ไนโตรพินอล และ 2,4-ไดไนโตรพินอล ร่วมกับการตรึงที่รากแหวน ซึ่งพบแบคทีเรียเพียงแค่ 2 ชนิด อยู่บนราก คือ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ PFR-1 และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ DFR-1 แหวนที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย จะสามารถย่อยสลายได้หมดทุกสารที่ทดลองในเวลา 4 วัน และหลังจาก 1 วันของการทดลองย่อยสลายพบแบคทีเรียหลุดออกมาอยู่ในอาหารเหลว แต่จำนวนแบคทีเรียที่รากไม่มีการลดลง อีกทั้งสามารถพบแบคทีเรียที่รากยังคงสูงเท่าเดิมหลังการย่อยสลายซ้ำ 5 รอบ (Kristanti และคณะ, 2014)

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากพืชน้ำจืดโดยตรึงบนราก ผักตบชวาหรือพืชน้ำจืดอื่นเพื่อการย่อยสลายดีเซลในน้ำจืด ดังนั้นจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่คัดแยกได้ เมื่อตรึงบนรากผักตบชวาส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด 1% ดีเซลในน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดภัย ดีกว่าการใช้เพียงผักตบชวาธรรมชาติเพียงอย่างเดียว และยิ่งไปกว่านั้นยังกำจัดดีเซลได้ดีกว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อิสระโดยตรง

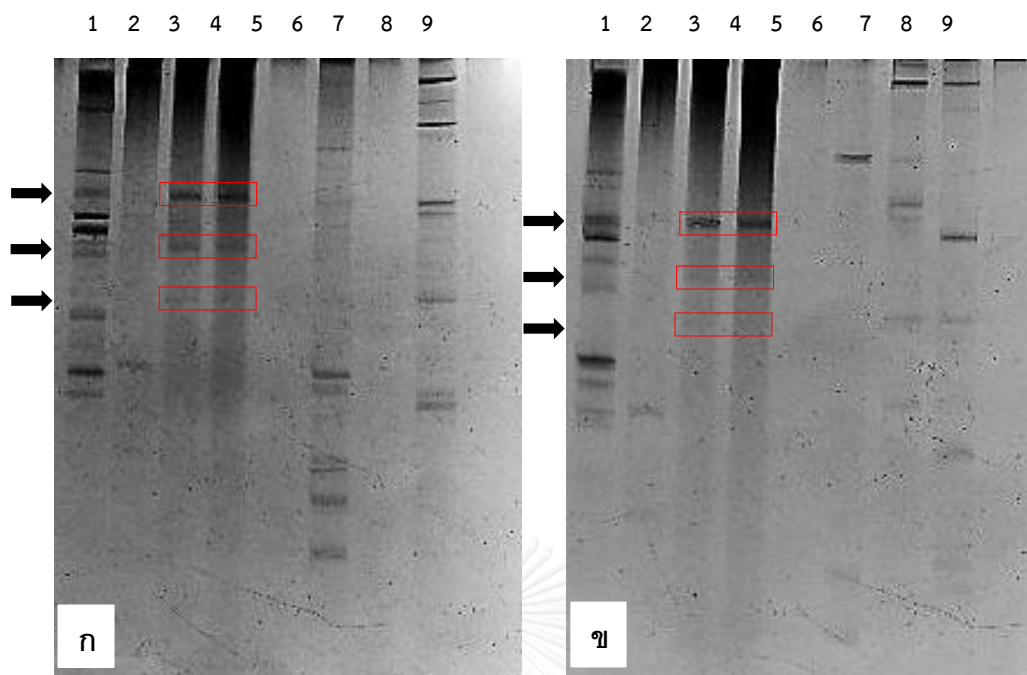
#### 4.7 การแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวาสู่ผักตบชวาอื่น

การทดลองตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวาและเพาะเลี้ยงในพลาสติกทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ซม. โดยวางผักตบชวาต้นที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนรากอยู่ตรงกลาง และผักตบชวาต้นอื่นๆอีก 5 ต้น นั้นไม่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และไม่ได้ลดจำนวนแบคทีเรียที่ราก โดยกำหนดระยะห่างระหว่างต้นเท่ากับ 15 ซม. ผูกไว้ด้วยลวด โดยทดลองเลี้ยงในน้ำจืดจากแหล่งที่เก็บผักตบชวา หลังจาก 7 วัน พบว่าผักตบชวาทุกต้นเจริญเพิ่มจำนวนโดยสังเกตจากไหลงอกจากต้นแม่ ออกมาจนเต็มพื้นที่ (รูปที่ 4.24 ลูกศร) ตัดรากผักตบชวาทั้งก่อนและหลังการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และหลังจาก 7 วันเพื่อสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียเพื่อตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ว่าจะสามารถแพร่ไปยังต้นข้างเคียงได้หรือไม่ โดยวิธี PCR-DGGE



รูปที่ 4.23 การทดลองเพื่อทดสอบการแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42

ก. เริ่มต้นการทดลอง และ ข. วันที่ 7 ของการทดลอง



รูปที่ 4.24 รูปแบบ 16S rDNA DGGEของแบคทีเรียจากรากผักตบชวาในการทดลอง  
แพร่กระจายกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในวันที่ 0 (ก.) และ วันที่ 7 (ข.)

ช่องวิ่งที่ 1): ผักตบชวาต้นแม่ 2): ตัวอย่างน้ำ 3,4): SJ42 5): ผักตบชวาต้นที่ 1  
6): ผักตบชวาต้นที่ 2 7): ผักตบชวาต้นที่ 3 8): ผักตบชวาต้นที่ 4  
9): ผักตบชวาต้นที่ 5

จากรากผักตบชวาที่ถูกตรึงด้วยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 (ต้นแม่) ซึ่งจะพบแถบดีเอ็นเอที่เป็นของ  
กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 (ลูกศรสีดำ) ทั้งในวันที่ 0 และ 7ของการทดลอง แต่ไม่พบว่าจะมีกลุ่มแบคทีเรีย  
SJ42 สามารถย้ายไปยังต้นข้างเคียงได้ แม้ว่า *P. aeruginosa* สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา  
ได้ ซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการเข้ายึดเกาะรากพืชของแบคทีเรีย rhizosphere หรือ  
endosphere (Compant และคณะ, 2010) กล่าวโดยสรุปแล้ว กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นั้นอาจไม่  
สามารถเคลื่อนที่ไปยังต้นผักตบชวาต้นอื่นในระยะห่าง 15 ซม.ในเวลา 7 วันได้

พบการเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียที่พบที่รากในระหว่างระยะเวลา 7 วัน ซึ่งแถบดี  
เอ็นเอของแบคทีเรียบางส่วนยังสามารถพบได้ และแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียบางส่วนไม่ถูกตรวจเจอ  
ในวันแรกของการทดลอง

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### บทสรุป

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลจากรากตัวอย่างพืชน้ำทั้งหมดจำนวน 45 ต้น ได้กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 50 กลุ่มแบคทีเรีย ในจำนวนนี้มีกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลได้มากกว่า 95% ในเวลา 7 วัน ทั้งสิ้น 14 กลุ่มแบคทีเรีย โดยกลุ่มแบคทีเรีย 2 กลุ่มที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้มากที่สุดใน 7 วัน คือ กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และ SJ51 สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ 98.5% และ 98.6% ตามลำดับ แต่พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ51 ที่คัดเลือกมาทดสอบ เนื่องจากสามารถย่อยสลายดีเซลได้เร็วกว่า ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพื่อเป็นตัวแทนมาศึกษาขั้นต่อไป

การศึกษากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 โดยคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยวจากกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 พบแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่ต่างกันสามชนิด คือ ไอโซเลต S4A, S4B และ S4C ซึ่งผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่า แบคทีเรียไอโซเลต S4A มีความเหมือนกับ *Pseudomonas aeruginosa* 100% ไอโซเลต S4B มีความเหมือนกับ *Stenotrophomonas maltophilia* 99% และไอโซเลต S4C มีความเหมือนกับ *Ochrobactrum intermedium* 99% การศึกษาคุณสมบัติในการสร้างสารลดแรงตึงผิวของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรีย S4A, S4B และ S4C พบว่าสามารถลดแรงตึงผิวได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถลดแรงตึงผิวได้มากกว่าแบคทีเรียเดี่ยว การวัดค่าความไม่ชอบน้ำของเซลล์ พบว่าเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นมีค่าความไม่ชอบน้ำที่แตกต่างกันโดยเฉพาะ *P. aeruginosa* S4A และ *O. intermedium* S4C ซึ่งให้ค่าความไม่ชอบน้ำสูงกว่า *S. maltophilia* S4B และกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 การศึกษาความสามารถในการผลิตสารไบโอฟิล์มโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และแบคทีเรียเดี่ยวทั้งสามชนิดพบว่า สามารถผลิตไบโอฟิล์มได้โดยที่กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถผลิตไบโอฟิล์มได้ดีมากกว่าแบคทีเรียเดี่ยว

ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยแบคทีเรียเดี่ยวเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในอาหารเหลว CFMM 14 วัน พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* S4A เป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุด ย่อยสลายได้ 63% ในขณะที่ชุดควบคุมย่อยได้ 12 % แต่กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถย่อยสลายดีเซลได้จนหมดตั้งแต่ 7 วัน *Stenotrophomonas maltophilia* S4B และ *Ochrobactrum intermedium* S4C ไม่สามารถย่อยสลายดีเซลได้



ความสามารถย่อยสลายดีเซลความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลว CFMM โดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถย่อยสลาย 1-5% ดีเซลได้ โดยย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตรได้ 37% ในเวลา 14 วัน (ตารางที่ 5.1) โดยจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในการทดลองนี้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นั้นสามารถย่อยสลายดีเซลและเจริญเติบโตได้ แสดงว่าดีเซลที่เพิ่มขึ้นนั้นไม่ได้เป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียแต่อาจต้องเพิ่มเวลาในการทดลองเพื่อให้สามารถย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นสูงได้มากขึ้น

ตารางที่ 5.1 ความสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุดโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในสถานะต่างๆ

กลุ่มแบคทีเรีย SJ42	ความเข้มข้นดีเซล (โดยปริมาตร)	สถานะที่ใช้ทดลอง/ระยะเวลา	การย่อยสลายดีเซล (%)	
เซลล์อิสระ	1%	อาหารเหลว CFMM/3 วัน	98.06±1.6	
		อาหารเหลว Hoagland's/7 วัน	74.14±4.2	
		น้ำจืดไม่ปลอดเชื้อ (คลองบางซื่อ)/28 วัน	75.18±5.1	
	2%	อาหารเหลว CFMM/14 วัน		84.12±9.9
				51.81±10.3
				34.01±4.0
	5%		37.10±5.1	
ตรึง PUF	1%	อาหารเหลว CFMM/3 วัน	98.19±0.52	
ตรึงบนรากผักตบชวา	1%	อาหารเหลว Hoagland's/7 วัน	78.16±7.41	
		น้ำจืดไม่ปลอดเชื้อ (แม่น้ำเจ้าพระยา)/7 วัน	81.11±0.91	

ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในตัวอย่างน้ำจืดจากคลองแสนแสบ (SS) คลองสามเสน (SN) คลองลาดพร้าว (LP) คลองบางซื่อ (BZ) คลองรังสิตประยูรศักดิ์ (RS) และแม่น้ำเจ้าพระยา (CPY) ทั้งสภาวะปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ โดยสรุปการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถช่วยย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำจืดไม่ปลอดเชื้อได้ดีกว่าปลอดเชื้อ ซึ่งกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ย่อยสลายดีเซลได้มากที่สุดในตัวอย่งน้ำจากคลองบางซื่อ (BZ) ในสภาวะไม่ปลอดเชื้อ ย่อยได้  $75.18 \pm 5.1\%$  ในเวลา 28 วัน (ตารางที่ 5.1) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม ส่วนในตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อ พบว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เพื่อย่อยสลายดีเซลในตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อจากคลองสามเสน คลองลาดพร้าว คลองบางซื่อ และคลองรังสิตประยูรศักดิ์สามารถลดดีเซลได้ดีใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ตัวอย่างน้ำปลอดเชื้อจากคลองแสนแสบและแม่น้ำเจ้าพระยา พบว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นั้นไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการย่อยสลายดีเซลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้จะสามารถลดดีเซลในน้ำจืดตัวอย่างโดยการเติมกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 แล้วยังช่วยลดค่า BOD และ COD ในตัวอย่างน้ำได้ทุกแหล่งทั้งไม่ปลอดเชื้อและปลอดเชื้อ

การตรึงกลุ่มแบคทีเรียเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายดีเซลพบว่า การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนพอลิยูรีเทนโฟม (PUF) ซึ่งใช้ระยะเวลาในการตรึงเพียงแค่ 1 วัน แบคทีเรียสามารถยึดเกาะบน PUF และสามารถย่อยสลายดีเซลได้ 98.19% เทียบกันได้ดีกับชุดที่ใช้แบคทีเรีย SJ42 อิสระที่ดีเซลถูกย่อยสลายได้ 98.04% (ตารางที่ 5.1) นอกจากนี้การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 บนรากผักตบชวาที่ลดจำนวนแบคทีเรียที่รากผักตบชวาก่อนโดยใช้การแช่ใน 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับการใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงที่เวลา 20 นาที ที่สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้สูงที่สุด 53.81% หลังตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 เป็นเวลา 1 วัน จำนวนแบคทีเรียที่รากเพิ่มเป็น  $9.17 \pm 0.25 \log \text{CFU/กรัม}$  และเมื่อตรวจสอบด้วย SEM พบว่าที่ผิวรากผักตบชวหลังการตรึงจะพบแบคทีเรียเกาะอยู่จำนวนมาก เมื่อตรวจติดตามด้วยวิธี 16S rDNA PCR-DGGE แสดงให้เห็นว่าเมื่อผ่านไป 1 วัน สามารถพบกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่รากผักตบชวาและยังคงพบจนวันที่ 3 ของการตรึงซึ่งเป็นการยืนยันว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 นั้นยึดเกาะอยู่ติดกับรากผักตบชวาได้

ก่อนการประยุกต์ใช้กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวาเพื่อย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's และตัวอย่างน้ำจืดจากแม่น้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดเชื้อ ได้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว Hoagland's พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ 74% และ 83% ในวันที่ 7 และ 14 ตามลำดับ (ตารางที่ 5.1)

การประยุกต์ใช้ผักตบชวาตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ย่อยสลาย 1% ดีเซลอาหารเหลว Hoagland's หลัง 7 วัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึงรากผักตบชวา สามารถกำจัดดีเซลได้ดี ( $78.16 \pm 7.41\%$ ) (ตารางที่ 5.1) เทียบเท่ากับกับการเติมกลุ่มแบคทีเรียอิสระ ( $73.86 \pm 3.60\%$ ) แต่

ดีกว่าการใช้ผักตบชวาเพียงอย่างเดียว ( $37.96 \pm 13.11\%$ ) เช่นเดียวกับการทดลองย่อยสลายดีเซลในน้ำจืดตัวอย่างไม่ปลอดเชื้อจากแม่น้ำเจ้าพระยา กลุ่มแบคทีเรียตรึงรากผักตบชวาสามารถกำจัดดีเซลได้สูงสุด ( $81.11 \pm 0.91\%$ ) ซึ่งดีกว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรียอิสระ ( $31.48 \pm 8.1\%$ ) และผักตบชวาธรรมชาติเพียงอย่างเดียว ( $33.99 \pm 4.41\%$ ) และหลังจาก 7 วันยังคงพบกลุ่มแบคทีเรียที่รากผักตบชวาทั้งสองการทดลอง นอกจากรากผักตบชวาจะเป็นที่ยึดเกาะของกลุ่มแบคทีเรียแล้ว รายงานนี้ยังพบว่ารากผักตบชวายังเกิดการสะสมดีเซลที่รากโดยการเกาะของดีเซลที่รากจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน จากนั้นแบคทีเรียที่รากผักตบชวาจะย่อยสลายดีเซลที่เกาะที่ผิวรากนั้น การใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงรากผักตบชวานอกจากจะสามารถกำจัดดีเซลได้สูงสุดแล้วยังช่วยลด BOD และ COD ในน้ำจืดตัวอย่างไม่ปลอดเชื้อจากแม่น้ำเจ้าพระยาได้มากกว่าชุดที่มีเพียงผักตบชวาธรรมชาติ หรือกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 อิสระ

การศึกษาการแพร่กระจายของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวาสู่ผักตบชวาอื่น เพื่อเป็นการลดขั้นตอนการตรึงกลุ่มแบคทีเรียกับผักตบชวาหลายๆต้น ถ้าทดสอบแล้วพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถแพร่กระจายสู่รากผักตบชวาต้นอื่นๆตามธรรมชาติได้ แต่การทดลองพบว่าหลังจาก 7 วัน ผักตบชวาทุกต้นเจริญเพิ่มจำนวนได้จนเต็มพื้นที่เพาะเลี้ยง แต่กลับไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในรากผักตบชวาที่ไม่ได้ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย

โดยสรุปกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ดีในงานวิจัยนี้จะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถนำไปใช้เพื่อบำบัดดีเซลในน้ำจืดได้ โดยที่ใช้ร่วมกับการตรึงบนผักตบชวาที่ผ่านการลดจำนวนแบคทีเรียก่อนตรึง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลได้มากกว่าการใช้กลุ่มแบคทีเรียอิสระหรือผักตบชวาเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง

### ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในงานวิจัยนี้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลแล้วนั้นมีประสิทธิภาพดี รวมถึงการที่สามารถยึดเกาะบนผักตบชวาได้แล้วส่งผลต่อการย่อยสลายได้มากกว่าการใช้กลุ่มแบคทีเรียอิสระ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น

1. การศึกษาปัจจัยที่พืชและจุลินทรีย์ส่งเสริมซึ่งกันและกันในด้านการเจริญ การทนต่อความเข้มข้นดีเซล อัตราการย่อยสลายดีเซล
2. ศึกษาคุณสมบัติการสร้างสารทิ้งของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 และผักตบชวา ที่ส่งผลต่อการย่อยสลายดีเซลในแหล่งน้ำ เช่น ปริมาณและชนิดของฮอร์โมนพืช หรือสารอาหารอื่นๆ
3. ศึกษาความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ตรึงบนรากผักตบชวาในการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นสูงกว่า 1 %
4. การทดลองในระบบการหมุนเวียนน้ำเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายต่อการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย 1 ครั้ง และตรวจติดตามประชากรและกลุ่มแบคทีเรียในระหว่างการทดลอง
5. ศึกษาด้านการก่อโรคของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้
6. ศึกษาด้านพันธุกรรมที่ส่งผลในการย่อยสลายดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียถึงการทำงานของกลุ่มแบคทีเรียในระหว่างการย่อยสลายดีเซล ยีนที่มีความจำเป็นต่อการย่อยสลายดีเซล
7. ศึกษาเป็นไปได้ของกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ในการยึดเกาะกับรากพืชชนิดอื่นนอกเหนือจากการใช้ผักตบชวา เพื่อย่อยสลายดีเซลที่ปนเปื้อนในน้ำ

จากงานวิจัยนี้ ได้นำเสนอแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลจากการเติมเพียงกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลเป็นการใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงบนพีชชาน้ำ ซึ่งให้ผลดีในการบำบัด จึงเป็นวิธีการอีกหนึ่งวิธีที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะการบำบัดน้ำเสียที่เป็นน้ำจืด ทั้งสามารถปรับเปลี่ยนชนิดของพืชเพื่อให้เหมาะสมต่อพื้นที่ในการบำบัดได้ เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียในการทดลองนี้สามารถยึดเกาะได้กับรากพืชอื่นที่ไม่ใช่รากพืชชนิดเดิมที่ได้จากการคัดแยก โดยใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาการบำบัดทางชีวภาพสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้

## รายการอ้างอิง

- Achi, C.G., Sridhar, M.K.C. and Coker, A.O. 2014. Performance evaluation of a water hyacinth based institutional wastewater treatment plant to mitigate aquatic macrophyte growths at Ibadan, Nigeria. *International Journal of Applied Science and Technology*, 4(3): 117-124.
- Achuba, F.I. and Ogwumu, M.D. 2014. Effect of palm oil and beef liver on diesel-induced haematotoxicity in Wistar albino rats. *Biokemistri*, 26(4): 120-123.
- Adenipekun, C.O., Ayanleye, O.O. and Oyetunji, O.J. 2013. Bioremediation of soil contaminated by spent diesel oil using *Pleurotus pulmonarius* Fries (Quelet) and its effects on the growth of *Corchorus olitorius* (L). *Journal of Applied Biosciences*, 68: 5366-5373.
- Afzal, M., Khan, S., Iqbal, S., Mirza, M.S. and Khan, Q.M. 2013. Inoculation method affects colonization and activity of *Burkholderia phytofirmans* PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85: 331-336.
- Afzal, M., Yousaf, S., Reichenauer, T.G. and Sessitsch, A. 2012. The inoculation method affects colonization and performance of bacterial inoculant strains in the phytoremediation of soil contaminated with diesel oil. *International Journal of Phytoremediation*, 14(1): 35-47.
- Agnello, A.C., Bagard, M., Van Hullebusch, E.D., Esposito, G. and Huguenot, D. 2016. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science Of The Total Environment*, 563-564: 693-703.
- Ajao, A.T., Yakubu, S.E., Umoh, V.J. and Ameh, J.B. 2013. Bioremediation of refinery wastewater using immobilised *Burkholderia cepacia* and *Corynebacterium* sp. and their transconjugants. *Journal of Xenobiotics*, 3(1): 4.

- Al-Baldawi, I.A., Abdullah, S.R., Anuar, N., Suja, F. and Idris, M. 2013. A phytotoxicity test of bulrush (*Scirpus grossus*) grown with diesel contamination in a free-flow reed bed system. *Journal of Hazardous Materials*, 252-253: 64-69.
- Al-Baldawi, I.A., Abdullah, S.R.S., Anuar, N. and Mushrifah, I. 2017. Bioaugmentation for the enhancement of hydrocarbon phytoremediation by rhizobacteria consortium in pilot horizontal subsurface flow constructed wetlands. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(1): 75-84.
- Al-Baldawi, I.A., Abdullah, S.R.S., Anuar, N., Suja, F. and Mushrifah, I. 2015. Phytodegradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in diesel-contaminated water using *Scirpus grossus*. *Ecological Engineering*, 74: 463-473.
- Al-Mahdi, A.Y., Abdullah, Q.Y.M., Al-Mahbashi, A.A., Homed, A.A., Al-Kaeat, S.H. and Al-Galibi, S.M. 2012. *Inhibition of mycoparasitic growth by filamentous nonpolyne chitinolytic producing bacteria*. Paper presented at the International conference on medical, biological and pharmaceutical sciences (ICMBPS'2012), Bangkok.
- Al-Sbani, N.H., Abdullah, S.R.S., Idris, M., Hasan, H.A., Jehawi, O.H. and Ismail, N.I. 2016. Sub-surface flow system for PAHs removal in water using *Lepironia articulate* under greenhouse conditions. *Ecological Engineering*, 87: 1-8.
- Andreolli, M., Lampis, S., Brignoli, P. and Vallini, G. 2016. *Trichoderma longibrachiatum* Evx1 is a fungal biocatalyst suitable for the remediation of soils contaminated with diesel fuel and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9): 9134-9143.
- Auffret, M., Labbe, D., Thouand, G., Greer, C.W. and Fayolle-Guichard, F. 2009. Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24): 7774-7782.
- Auffret, M.D., Yergeau, E., Labbe, D., Fayolle-Guichard, F. and Greer, C.W. 2015. Importance of *Rhodococcus* strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5): 2419-2430.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology* (ringbou ed.): John Wiley & Sons, Inc.
- Balseiro-Romero, M., Gkorezis, P., Kidd, P.S., Vangronsveld, J. and Monterroso, C. 2016. Enhanced degradation of diesel in the rhizosphere of after inoculation with diesel-degrading and plant growth-promoting bacterial strains. *Journal of Environmental Quality*, 45(3): 924-932.
- Barzanti, R., Ozino, F., Bazzicalupo, M., Gabbrielli, R., Galardi, F., Gonnelli, C. and Mengoni, A. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology*, 53(2): 306-316.
- Bento, F.M., Camargo, F.A., Okeke, B.C. and Frankenberger, W.T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96(9): 1049-1055.
- Bezza, F.A., Beukes, M. and Chirwa, E.M.N. 2015. Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. *Process Biochemistry*, 50(11): 1911-1922.
- Blomberg, A., Tornqvist, H., Desmyter, L. and Deneys, V.a.H., C. 2005. Exposure to diesel exhaust nanoparticles does not induce blood hypercoagulability in an at-risk population. *journal of thrombosis and haemostasis*, 3(9): 2103-2105.
- Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Vainstein, M.H., Camargo, F.A.O., Peralba, M.C.R. and Bento, F.M. 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, 102(23): 11003-11010.
- Chandran, P. and Das, N. 2011. Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels. *Biodegradation*, 22(6): 1181-1189.
- Chanthamalee, J. and Luepromchai, E. 2012. Isolation and application of *Gordonia* sp. JC11 for removal of boat lubricants. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(1): 19-31.

- Chanthamalee, J., Wongchitphimon, T. and Luepromchai, E. 2013. Treatment of oily bilge water from small fishing vessels by PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11. *Water, Air, and Soil Pollution*, 224(7): 1601-1613.
- Chen, J., Zhan, P., Koopman, B., Fang, G. and Shi, Y. 2012. Bioaugmentation with *Gordonia* strain JW8 in treatment of pulp and paper wastewater. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 14(5): 899-904.
- Chen, M., Fan, R., Zou, W., Zhou, H., Tan, Z. and Li, X. 2016. Bioaugmentation for treatment of full-scale diethylene glycol monobutyl ether (DGBE) wastewater by *Serratia* sp. BDG-2. *Journal of Hazardous Materials*, 309: 20-26.
- Chen, Q., Li, J., Liu, M., Sun, H. and Bao, M. 2017. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. *PLoS One*, 12(3): 1-23.
- Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Xu, P., Zhang, C. and Liu, Y. 2016. Hydroxyl radicals based advanced oxidation processes (AOPs) for remediation of soils contaminated with organic compounds: A review. *Chemical Engineering Journal*, 284: 582-598.
- Cheng, T., Liang, J., He, J., Hu, X., Ge, Z. and Liu, J. 2017. A novel rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* ZS1 isolate derived from petroleum sludge suitable for bioremediation. *AMB Express*, 7(1): 120.
- Chilcott, R.P. and Chapd, H.Q. 2011. Health protection agency: Compendium of chemical hazards: Diesel. *Health Protection Agency*, 1: 1-34.
- Chunkao, K., Nimpee, C. and Duangmal, K. 2012. The King's initiatives using water hyacinth to remove heavy metals and plant nutrients from wastewater through Bueng Makkasan in Bangkok, Thailand. *Ecological Engineering*, 39: 40-52.
- Cohen, F.M., Williams, J. and Yamasaki, H. 2002. Biodegradation of diesel fuel by an *Azolla*-Derived bacterial consortium. *Journal of Environmental Science and Health*, A37(No. 9): 1093-4529.
- Colla, T.S., Andrezza, R., Bucker, F., de Souza, M.M., Tramontini, L., Prado, G.R., Frazzon, A.P.G., Camargo, F.A.d.O. and Bento, F.M. 2014. Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4): 2592-2602.



- Colla, T.S.A., R. Bucker, F. de Souza, M. M. Tramontini, L. Prado, G. R. Frazzon, A. P. Camargo, F. A. Bento, F. M. 2014. Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4): 2592-2602.
- Compant, S., Clément, C. and Sessitsch, A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5): 669-678.
- Costa, S.G.V.A.O., Nitschke, M., Lépine, F., Déziel, E. and Contiero, J. 2010. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. *Process Biochemistry*, 45(9): 1511-1516.
- Cuenca, M.A., Vezuli, J., Lohi, A. and Upreti, S.R. 2006. Anaerobic biodegradation of diesel fuel-contaminated wastewater in a fluidized bed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29(1): 29-37.
- Dadrasnia, A. and Agamuthu, P. 2013. Dynamics of diesel fuel degradation in contaminated soil using organic wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10(4): 769-778.
- Das, N. and Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011: 1-14.
- Dasgupta, D., Ghosh, R. and Sengupta, T.K. 2013. Biofilm-mediated enhanced crude oil degradation by newly isolated *Pseudomonas* species. *ISRN Biotechnology*, 2013: 1-14.
- Daud, N.H., Jayaraman, S. and Mohamed, R. 2012. Methods Paper: An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 20(2): 55-58.
- Dave, D. and Ghaly, A.E. 2011. Remediation Technologies for Marine Oil Spills: A Critical Review and Comparative Analysis. *American Journal of Environmental Sciences*, 7(5): 423-440.

- Davidson, W.F., Lee, K. and Cogswell, A. 2008. *Oil Spill Response: A Global Perspective* (1 ed.). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands.
- De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. and Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4): 292-302.
- Dede, E.B. and Kaglo, H.D. 2001. Aqua-toxicological effects of water soluble fractions (WSF) of diesel fuel on *o. Niloticus* fingerlings. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 5(1): 93-96.
- Demange, P., Wendenbaum, S., Linget, C., Mertz, C., Cung, M.T., Dell, A. and Abdallah, M.A. 1990. Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins Pa, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biometals*, 3(3): 155-170.
- Deng, F., Liao, C., Yang, C., Guo, C. and Dang, Z. 2016. Enhanced biodegradation of pyrene by immobilized bacteria on modified biomass materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110: 46-52.
- Dhar, K., Dutta, S. and Anwar, M. 2014. Biodegradation of petroleum hydrocarbon by indigenous fungi isolated from ship breaking yards of Bangladesh. *International Research Journal of Biological Sciences*, 3: 22-30.
- Dhir, B., Sharmila, P. and Saradhi, P.P. 2009. Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(9): 754-781.
- Di-Gregorio, S., Siracusa, G., Becarelli, S., Mariotti, L., Gentini, A. and Lorenzi, R. 2016. Isolation and characterization of a hydrocarbonoclastic bacterial enrichment from total petroleum hydrocarbon contaminated sediments: potential candidates for bioaugmentation in bio-based processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(11): 10587-10594.
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N. and Johri, A.K. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3): 143-152.
- Ebel, M., Evangelou, M.W. and Schaeffer, A. 2007. Cyanide phytoremediation by water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). *Chemosphere*, 66(5): 816-823.

- Fagerbakke, K.M., Heldal, M. and Norland, S. 1996. Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 10(1): 15-27.
- Falciglia, P.P., Maddalena, R., Mancuso, G., Messina, V. and Vagliasindi, F.G. 2016. Lab-scale investigation on remediation of diesel-contaminated aquifer using microwave energy. *Journal of Environmental Management*, 167: 196-205.
- Fan, M.-Y., Xie, R.-J. and Qin, G. 2014. Bioremediation of petroleum-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with yeast. *Environmental Technology*, 35(4): 391-399.
- Fang, F., Han, H., Zhao, Q., Xu, C. and Zhang, L. 2013. Bioaugmentation of biological contact oxidation reactor (BCOR) with phenol-degrading bacteria for coal gasification wastewater (CGW) treatment. *Bioresource Technology*, 150: 314-320.
- Farhadian, M., Duchez, D., Vachelard, C. and Larroche, C. 2008. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors-a review. *Water Research*, 42(6-7): 1325-1341.
- Fischer, S., Klockgether, J., Moran Losada, P., Chouvarine, P., Cramer, N., Davenport, C.F., Dethlefsen, S., Dorda, M., Goesmann, A., Hilker, R., Mielke, S., Schonfelder, T., Suerbaum, S., Turk, O., Woltemate, S., Wiehlmann, L. and Tummeler, B. 2016. Intracolonial genome diversity of the major *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14. *Environmental Microbiology Reports*, 8(2): 227-234.
- Fodelianakis, S., Antoniou, E., Mapelli, F., Magagnini, M., Nikolopoulou, M., Marasco, R., Barbato, M., Tsiola, A., Tsikopoulou, I., Giaccaglia, L., Mahjoubi, M., Jaouani, A., Amer, R., Hussein, E., Al-Horani, F.A., Benzha, F., Blaghen, M., Malkawi, H.I., Abdel-Fattah, Y., Cherif, A., Daffonchio, D. and Kalogerakis, N. 2015. Allochthonous bioaugmentation in ex situ treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome. *Journal of Hazardous Materials*, 287: 78-86.
- Gaglio, R., Barbera, M., Aleo, A., Lommatzsch, I., La Mantia, T. and Settanni, L. 2017. Inhibitory activity and chemical characterization of *Daucus carota* subsp. *Maximus* essential oils. *Chemistry & Biodiversity*, 14(5): 1612-1880.

- Gargouri, B., Karray, F., Mhiri, N., Aloui, F. and Sayadi, S. 2011. Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 189(1-2): 427-434.
- Gargouri, B., Mhiri, N., Karray, F., Aloui, F. and Sayadi, S. 2015. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading yeast strains from petroleum contaminated industrial wastewater. *BioMed Research International*, 2015: 1-11.
- Goi, A., Trapido, M., Kulik, N., Palmroth, M.R.T. and Tuhkanen, T. 2006. Ozonation and fenton treatment for remediation of diesel fuel contaminated soil. *Ozone: Science and Engineering*, 28(1): 37-46.
- Govindaswamy, S., Schupp, D.A. and Rock, S.A. 2011. Batch and continuous removal of arsenic using hyacinth roots. *International Journal of Phytoremediation*, 13(6): 513-527.
- Graj, W., Lisiecki, P., Szulc, A., Chrzanowski, L. and Wojtera-Kwiczor, J. 2013. Bioaugmentation with petroleum-degrading consortia has a selective growth-promoting impact on crop plants germinated in diesel oil-contaminated soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224: 1676-1691.
- Guidini, C.Z., Fischer, J., Santana, L.N.S., Cardoso, V.L. and Ribeiro, E.J. 2010. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochemical Engineering Journal*, 52(2): 137-143.
- Hamza, U.D., Mohammed, I.A. and Sale, A. 2012. Potentials of bacterial isolates in bioremediation of petroleum refinery wastewater. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*, 1(3): 131-138.
- Hassan, M.N., Afghan, S., Hassan, Z.U. and Hafeez, F.Y. 2014. Biopesticide activity of sugarcane associated rhizobacteria: *Ochrobactrum intermedium* strain NH-5 and *Stenotrophomonas maltophilia* strain NH-300 against red rot under field conditions. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(2): 27-37.

- Hemlata, B., Selvin, J. and Tukaram, K. 2015. Optimization of iron chelating biosurfactant production by *Stenotrophomonas maltophilia* NBS-11. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2): 135-143.
- Hoang, H., Yu, N., Toyama, T., Inoue, D., Sei, K. and Ike, M. 2010. Accelerated degradation of a variety of aromatic compounds by *Spirodela polyrrhiza*-bacterial associations and contribution of root exudates released from *S. polyrrhiza*. *Journal of Environmental Sciences*, 22(4): 494-499.
- Holakoo, L. 2001. *On the capability of rhamnolipids for oil spill control of surface water*. Concordia university.
- Hou, D., Shen, X., Luo, Q., He, Y., Wang, Q. and Liu, Q. 2013. Enhancement of the diesel oil degradation ability of a marine bacterial strain by immobilization on a novel compound carrier material. *Marine Pollution Bulletin*, 67(1-2): 146-151.
- IARC. 1989. Diesel Fuels. *IARC Monographs*, 45: 1-19.
- Ita, S.O. and Udofia, U.A. 2011. Comparative study of some haematological parameters in rats following ingestion of crude oil (nigerian bonny light), petrol, kerosene and diesel. *Asian Journal of Biological Sciences*, 4(6): 498-505.
- Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa, M., Eguchi, M. and Nasu, M. 2000. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(2): 129-141.
- Jansi Rani, M., Murugan, M. and Subramaniam, P.a.S., E. 2014. A study on water hyacinth *Eichhornia crassipes* as oil sorbent. *Journal of Applied and Natural Science*, 6(1): 134-138.
- Jasrotia, S., Kansal, A. and Mehra, A. 2015. Performance of aquatic plant species for phytoremediation of arsenic-contaminated water. *Applied Water Science*, 7(2): 889-896.
- Jianbo, L., Zhihui, F. and Zhaozheng, Y. 2008. Performance of a water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) system in the treatment of wastewater from a duck farm and the effects of using water hyacinth as duck feed. *Journal of Environmental Sciences*, 20(5): 513-519.
- Kaczorek, E., Smutek, W., Zgoła-Grze<sup>Ś</sup>kowiak, A., Bielicka-Daszkiewicz, K. and Olszanowski, A. 2015. Effect of Glucopton 215 on cell surface properties of

- Pseudomonas stutzeri* and diesel oil biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104: 129-135.
- Kavamura, V.N. and Esposito, E. 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*, 28(1): 61-69.
- Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M. 2002. 16S Ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2): 699-704.
- Khaled, M.A.R., Abdel, A.A.Z., Hassanien, S.E. and Eissa, H.F. 2012. Biodegradation of used lubricating and diesel oils by a new yeast strain *Candida viswanathii* KA-2011. *African Journal of Biotechnology*, 11(77): 14166-14174.
- Kirzhner, F., Zimmels, Y., Malkovskaja, A. and Starosvetsky, J. 2009. Removal of microbial biofilm on water hyacinth plants roots by ultrasonic treatment. *Ultrasonics*, 49(2): 153-158.
- Kisukuri, C.M. and Andrade, L.H. 2015. Production of chiral compounds using immobilized cells as a source of biocatalysts. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(40): 10086-10107.
- Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K., Yamauchi-Inomata, Y., Toki, H., Venkateswaran, K., Yamamoto, S., Tanaka, H. and Harayama, S. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(6): 570-574.
- Kösesakal, T., Unal, M., Kulen, O., Memon, A. and Yuksel, B. 2016. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons by using a freshwater fern species *Azolla filiculoides* Lam. *International Journal of Phytoremediation*, 18(5): 467-476.
- Kristanti, R.A., Kanbe, M., Toyama, T., Tanaka, Y., Tang, Y., Wu, X. and Mori, K. 2012. Accelerated biodegradation of nitrophenols in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*. *Journal of Environmental Sciences*, 24(5): 800-807.
- Kristanti, R.A., Toyama, T., Hadibarata, T., Tanaka, Y. and Mori, K. 2014. Bioaugmentation involving a bacterial consortium isolated from the rhizosphere of *Spirodela*

- polyrhiza* for treating water contaminated with a mixture of four nitrophenol isomers. *RSC Advances*, 4(4): 1616-1621.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J. . 2003. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(1): 6-15.
- Kulkarni, G., Dhotre, D., Dharne, M., Shetty, S., Chowdhury, S., Misra, V., Misra, S., Patole, M. and Shouche, Y. 2013. Draft genome of *Ochrobactrum intermedium* strain M86 isolated from non-ulcer dyspeptic individual from India. *Gut pathogens*, 5(7): 1-5.
- Kumar, M., Leona, V., Materano, A.D.S., Ilzinsa, O.A., Galindo-Castro, I. and Fuenmayora, S.L. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. IR1. *Z. Naturforsch*, 61c: 203-212.
- Kuss, S.K. 2011. *Gastrointestinal influences on poliovirus replication, dissemination and pathogenesis in mice*.
- Labana, S., Kapur, M., Malik, D.K., Prakash, D. and Jain, R.K. 2007. Diversity, Biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In Singh, S.N. and Tripathi, R.D. (Eds.), *Environmental Bioremediation Technologies*: 409-443. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Larik, I., A.Q., Muneer, A.K., Asif, R.M., Shahida, A., Safia, J., Muhammad, R.K., Nisar, A. 2016. Biodegradation of petrochemical hydrocarbons using an efficient bacterial consortium: A2457. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 41(6): 2077-2086.
- Ławniczak, Ł., Kaczorek, E., Olszanowski, A. 2011. The influence of cell immobilization by biofilm forming on the biodegradation capabilities of bacterial consortia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5): 1183-1188.
- Lee, Y.C., Shin, H.J., Ahn, Y., Shin, M.C., Lee, M. and Yang, J.W. 2010. Biodegradation of diesel by mixed bacteria immobilized onto a hybrid support of peat moss and additives: a batch experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3): 940-944.

- Li, H., Hao, H., Yang, X., Xiang, L., Zhao, F., Jiang, H. and He, Z. 2012. Purification of refinery wastewater by different perennial grasses growing in a floating bed. *Journal of Plant Nutrition*, 35(1): 93-110.
- Li, Y.-Q., Liu, H.-F., Tian, Z.-L., Zhu, L.-H., Wu, Y.-H. and Tang, H.-Q. 2008. Diesel pollution biodegradation: Synergetic effect of mycobacterium and filamentous fungi. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(3): 181-187.
- Lin, M., Yuhua, L., Weiwei, C., Hui, W. and Xiaoke, H. 2014. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88: 8-12.
- Lira, F., Hernández, A., Belda, E., Sánchez, M.B., Moya, A., Silva, F.J. and Martínez, J.L. 2012. whole-genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* D457, a clinical isolate and a model strain. *Journal of Bacteriology*, 194(13): 3563-3564.
- Liu, P.-W.G., Chang, T.C., Chen, C.-H., Wang, M.-Z. and Hsu, H.-W. 2014. Bioaugmentation efficiency investigation on soil organic matters and microbial community shift of diesel-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95: 276-284.
- Liu, P.-W.G., Yang, D.-S., Tang, J.-Y., Hsu, H.-W., Chen, C.-H. and Lin, I.K. 2016. Development of a cell immobilization technique with polyvinyl alcohol for diesel remediation in seawater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 113: 397-407.
- Liu, Q., Tang, J., Bai, Z., Hecker, M. and Giesy, J.P. 2015. Distribution of petroleum degrading genes and factor analysis of petroleum contaminated soil from the Dagang Oilfield, China. *Scientific Reports*, 5: 1-12.
- Liu, X., Zou, J., Wang, Z., Hu, X., Liang, X. and Wei, J. 2012. Degradation of diesel pollutants in Huangpu-Yangtze river estuary wetland using a plant-microbes system. *Procedia Environmental Sciences*, 16: 656-660.
- Lohi, A., Alvarez Cuenca, M., Anania, G., Upreti, S.R. and Wan, L. 2008. Biodegradation of diesel fuel-contaminated wastewater using a three-phase fluidized bed reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3): 105-111.
- Lu, X., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Homyok, K. 2004. Removal of cadmium and zinc by water hyacinth, *Eichhornia crassipes*. *Science Asia*, 30: 93-103.



- Maddela, N.R., Masabanda, M. and Leiva-Mora, M. 2015. Novel diesel-oil-degrading bacteria and fungi from the Ecuadorian Amazon rainforest. *Water Science and Technology*, 71(10): 1554-1561.
- Márquez-Rocha, F.J., Hernández-Rodríguez, V. and Lamela, M.T. 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Pollution*, 128(3): 313-320.
- Meyer, D.D.B., Bücker, S.A., Peralba, F., Frazzon, M.C.R.G, Osti, A.P., Andrezza, J.F., Camargo, R.A.O., Bento, F., Menezes, F. 2014. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95: 356-363.
- Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Coppa, A. and Roda, A. 2010. Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(1): 227-238.
- Miranda, R.d.C., Souza, C.S.d., Gomes, E.d.B., Lovaglio, R.B., Lopes, C.E. and Sousa, M.d.F.V.d. 2007. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape Port in the state of Pernambuco-Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1): 147-152.
- Pipeline leaks 18,000 gallons of crude oil onto Kingfisher Co. farmland. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://kfor.com/2017/04/24/pipeline-leaks-18000-gallons-of-crude-oil-onto-kingfisher-co-farmland/>. 2017.
- Mnif, I., Ellouze-Chaabouni, S., Ayedi, Y. and Ghribi, D. 2014. Treatment of diesel- and kerosene-contaminated water by *B. subtilis* SPB1 biosurfactant-producing strain. *Water Environment Research*, 86(8): 707-716.
- Mnif, I., Mnif, S., Sahnoun, R., Maktouf, S., Ayedi, Y., Ellouze-Chaabouni, S. and Ghribi, D. 2015. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19): 14852-14861.
- Mohanram, R., Jagtap, C. and Kumar, P. 2016. Isolation, screening, and characterization of surface-active agent-producing, oil-degrading marine bacteria of Mumbai Harbor. *Marine Pollution Bulletin*, 105(1): 131-138.

- Mouginot, C., Kawamura, R., Matulich, K.L., Berlemont, R., Allison, S.D., Amend, A.S. and Martiny, A.C. 2014. Elemental stoichiometry of fungi and bacteria strains from grassland leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry*, 76: 278-285.
- Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W. and Pinyakong, O. 2013. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samut Songkram Province, Thailand. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5): 1311-1324.
- Nayak, B., Roy, S., Mitra, A. and Roy, M. 2016. Isolation of multiple drug resistant and heavy metal resistant *Stenotrophomonas maltophilia* strain BN1, a plant growth promoting rhizobacteria, from mangrove associate *Ipomoea pes-caprae* of Indian sundarbans. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(4): 3131-3140.
- Nopcharoenkul, W., Netsakulnee, P. and Pinyakong, O. 2013. Diesel oil removal by immobilized *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. *Biodegradation*, 24(3): 387-397.
- Nwaogu, L.A., Onyeze, G.O.C. and Nwabueze, R.N. 2008. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *African Journal of Biotechnology*, 7(12): 1939-1943.
- Nzila, A., Razzak, S. and Zhu, J. 2016. Bioaugmentation: An emerging strategy of industrial wastewater treatment for reuse and discharge. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(846): 1-20.
- Olu-Arotiowa, O.A., Aremu, M.O. and Alade, A.O. 2007. Ex-situ bioremediation of diesel polluted wastewater in tropical hot climate. *Asian Journal of Information Technology*, 6(9): 961-963.
- Onur, G., Yilmaz, F. and Icgen, B. 2015. Diesel oil degradation potential of a bacterium inhabiting petroleum hydrocarbon contaminated surface waters and characterization of its emulsification ability. *Journal of Surfactants and Detergents*, 18(4): 707-717.
- Ozaki, S., Kishimoto, N. and Fujita, T. 2007. Change in the predominant bacteria in a microbial consortium cultured on media containing aromatic and saturated hydrocarbons as the sole carbon source. *Microbes and Environments*, 22(2): 128-135.

- Palanisamy, N., Ramya, J., Kumar, S., Vasanthi, N.S., Chandran, P. and Khan, S. 2014. Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(142): 1-8.
- Paul, B.K., George, M.M. and Nisha, P. 2016. Biosurfactant production and diesel degradation by bacterial consortium isolated from crude oil polluted soil. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 6(3): 326-331.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 15-39.
- Płaza, G.A., Łukasik, K., Wypych, J., Natęcz-Jawecki, G. and Berry, C., Brigmon, R.L. . 2008. Biodegradation of crude oil and distillation products by biosurfactant-producing bacteria. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17(1): 87-94.
- Poi, G., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Mok, P.C. and Ball, A.S. 2016. Large scale bioaugmentation of municipal waste water contaminated with petroleum hydrocarbons. *JSM Environmental Science & Ecology*, 4(3): 1-5.
- Porsby, C.H., Nielsen, K.F. and Gram, L. 2008. *Phaeobacter* and *Ruegeria* species of the *Roseobacter clade* colonize separate niches in a Danish turbot (*Scophthalmus maximus*)-rearing farm and antagonize *Vibrio anguillarum* under different growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23): 7356-7364.
- Priya, A., Avishek, K. and Pathak, G. 2012. Assessing the potentials of *Lemna minor* in the treatment of domestic wastewater at pilot scale. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(7): 4301-4307.
- 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(1): 32-38.
- Rezania, S., Ponraj, M., Talaiekhosani, A., Mohamad, S.E., Din, M.F.M., Taib, S.M., Sabbagh, F. and Sairan, F.M. 2015. Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater. *Journal of Environmental Management*, 163: 125-133.

- Nunavik village says water remains contaminated by 2015 fuel spill. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: [http://www.nunatsiaqonline.ca/stories/article/65674nunavik\\_community\\_says\\_water\\_sources\\_still\\_contaminated\\_by\\_2015\\_fuel\\_s/.2017](http://www.nunatsiaqonline.ca/stories/article/65674nunavik_community_says_water_sources_still_contaminated_by_2015_fuel_s/.2017).
- Rohrbacher, F. and St-Arnaud, M. 2016. Root exudation: The ecological driver of hydrocarbon rhizoremediation. *Agronomy*, 6(1): 1-27.
- Rudell, B., Ledin, M.C., Hammarström, U., Stjernberg, N., Lundbäck, B. and Sandström, T. 1996. Effects on symptoms and lung function in humans experimentally exposed to diesel exhaust. *Occupational and Environmental Medicine*, 53(10): 658-662.
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., van der Lelie, D. and Dow, J.M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7): 514-525.
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., Lelie, D.V.D. and Dow, J.M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7): 514-525.
- Safdari, M.-S., Kariminia, H.-R., Ghobadi Nejad, Z. and Fletcher, T.H. 2016. Study potential of indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in bioremediation of diesel-contaminated water. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(37): 1-7.
- Saiyood, S., Vangnai, A.S., Thiravetyan, P. and Inthorn, D. 2010. Bisphenol A removal by the *Dracaena* plant and the role of plant-associating bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1-3): 777-785.
- Saleh, H.M. 2012. Water hyacinth for phytoremediation of radioactive waste simulate contaminated with cesium and cobalt radionuclides. *Nuclear Engineering and Design*, 242: 425-432.
- Samanta, S.K., Singh, O.V. and Jain, R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20(6): 243-248.
- Schmidt, C.W. 2011. Study to examine health effects in Deepwater horizon oil Spill cleanup Workers. *Environmental Health Perspectives*, 119(5): A204.

- Serrano, A., Gallego, M., González, J.L. and Tejada, M. 2008. Natural attenuation of diesel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil. *Environmental Pollution*, 151(3): 494-502.
- Silveira, M., Albano, R., Asensi, M. and Assef, A.P.C. 2014. The draft genome sequence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain CCBH4851, a nosocomial isolate belonging to clone SP (ST277) that is prevalent in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(8): 1086-1087.
- Simons, K.L., Sheppard, P.J., Adetutu, E.M., Kadali, K., Juhasz, A.L., Manefield, M., Sarma, P.M., Lal, B. and Ball, A.S. 2013. Carrier mounted bacterial consortium facilitates oil remediation in the marine environment. *Bioresource Technology*, 134: 107-116.
- Singh, P., Saini, H.S. and Raj, M. 2016. Rhamnolipid mediated enhanced degradation of chlorpyrifos by bacterial consortium in soil-water system. *Ecotoxicology and environmental safety*, 134: 156-162.
- Singha, L.P. and Pandey, P. 2017. Glutathione and glutathione-S-transferase activity in *Jatropha curcas* in association with pyrene degrader *Pseudomonas aeruginosa* PDB1 in rhizosphere, for alleviation of stress induced by polyaromatic hydrocarbon for effective rhizoremediation. *Ecological Engineering*, 102: 422-432.
- Stout, L. and Nusslein, K. 2010. Biotechnological potential of aquatic plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3): 339-345.
- Sunithakumari, K., Padma Devi, S. and Vasandha, S. 2016. Zinc solubilizing bacterial isolates from the agricultural fields of Coimbatore, Tamil Nadu, India. *Current Science*, 110(2): 196-205.
- Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C. and Ciani, M. 2012. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 66(1): 39-46.
- Talano, M.A., Frontera, S., Gonzalez, P., Medina, M.I. and Agostini, E. 2010. Removal of 2,4-dichlorophenol from aqueous solutions using tobacco hairy root cultures. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3): 784-791.

- Tara, N., Afzal, M., Ansari, T.M., Tahseen, R., Iqbal, S. and Khan, Q.M. 2014. Combined use of alkane-degrading and plant growth-promoting bacteria enhanced phytoremediation of diesel contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 16(7-12): 1268-1277.
- Toyama, T., Furukawa, T., Maeda, N., Inoue, D., Sei, K., Mori, K., Kikuchi, S. and Ike, M. 2011. Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[a]pyrene in the *Phragmites australis* rhizosphere by bacteria-root exudate interactions. *Water Research*, 45(4): 1629-1638.
- Toyama, T., Yu, N., Kumada, H., Sei, K., Ike, M. and Fujita, M. 2006. Accelerated aromatic compounds degradation in aquatic environment by use of interaction between *Spirodela polyrrhiza* and bacteria in its rhizosphere. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(4): 346-353.
- Tribelli, P.M., Di Martino, C., Lopez, N.I. and Raiger lustman, L.J. 2012. Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*. *Biodegradation*, 23(5): 645-651.
- Ukiwe, L.N., Egereonu, U.U., Njoku, P.C. and Nwoko, C.I.A. 2012. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil leachate by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *International Journal of Chemistry*, 4(5): 1-7.
- Vincent, A.G., Sundqvist, M.K., Wardle, D.A. and Giesler, R. 2014. Bioavailable soil phosphorus decreases with increasing elevation in a subarctic tundra landscape. *PLoS One*, 9(3): 1-11.
- Wang, X., Wang, X., Liu, M., Bu, Y., Zhang, J., Chen, J. and Zhao, J. 2015. Adsorption-synergic biodegradation of diesel oil in synthetic seawater by acclimated strains immobilized on multifunctional materials. *Marine Pollution Bulletin*, 92(1-2): 195-200.
- Wei, Y.-H., Chou, C.-L. and Chang, J.-S. 2005. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 27(2): 146-154.
- White, L.J., Brözel, V.S. and Subramanian, S. 2015. Isolation of rhizosphere bacterial communities from soil. *Bio-protocol*, 5(16): 1-9.

- Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I. and Okuyama, H. 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Current Microbiology*, 49(6): 415-422.
- Wu, M.-H., Huang, S.-B. and Lee, G.-B. 2010. Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab on a Chip*, 10(8): 939-956.
- Xia, H. 2008. Enhanced disappearance of dicofol by water hyacinth in water. *Environmental Technology*, 29(3): 297-302.
- Xiong, J., Déraspe, M., Iqbal, N., Krajden, S., Chapman, W., Dewar, K. and Roy, P.H. 2017. Complete genome of a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, isolated from a patient with respiratory failure in a canadian community hospital. *Genome announcements*, 5(22): 1-2.
- Yadav, A.K., Manna, S., Pandiyan, K., Singh, A., Kumar, M., Chakdar, H., Kashyap, P.L. and Srivastava, A.K. 2016. Isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus* sp. from diesel fuel-contaminated site. *Microbiology*, 85(1): 56-62.
- Yamaga, F., Washio, K. and Morikawa, M. 2010. Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*. *Environmental Science and Technology*, 44(16): 6470-6474.
- Yang, X., Chen, S. and Zhang, R. 2014. Utilization of two invasive free-floating aquatic plants (*Pistia stratiotes* and *Eichhornia crassipes*) as sorbents for oil removal. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(1): 781-786.
- Zahed, M.A., Aziz, H.A., Mohajeri, L., Mohajeri, S., Kutty, S.R. and Isa, M.H. 2010. Application of statistical experimental methodology to optimize bioremediation of n-alkanes in aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 184(1-3): 350-356.
- Zhang, J., Wang, X., Bu, Y., Wang, X., Song, J., Xia, P., Ma, R., Louangsouphom, B., Ma, S. and Zhao, J. 2016. Remediation of diesel polluted water through buoyant sunlight responsive iron and nitrogen co-doped TiO<sub>2</sub> coated on chitosan carbonized fly ash. *Chemical Engineering Journal*, 306: 460-470.
- Zhang, Q., Wang, D., Li, M., Xiang, W.-N. and Achal, V. 2014a. Isolation and characterization of diesel degrading bacteria, *Sphingomonas* sp. and

- Acinetobacter junii* from petroleum contaminated soil. *Frontiers of Earth Science*, 8(1): 58-63.
- Zhang, X., Chen, L., Liu, X., Wang, C., Chen, X., Xu, G. and Deng, K. 2014b. Synergic degradation of diesel by *Scirpus triquetar* and its endophytic bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(13): 8198-8205.
- Zhang, X., Liu, X., Wang, Q., Chen, X., Li, H., Wei, J. and Xu, G. 2014c. Diesel degradation potential of endophytic bacteria isolated from *Scirpus triquetar*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87: 99-105.
- Zhao, D., Liao, X., Yan, X., Huling, S.G., Chai, T. and Tao, H. 2013. Effect and mechanism of persulfate activated by different methods for PAHs removal in soil. *Journal of Hazardous Materials*, 254-255: 228-235.
- Zhong, P., Kong, L.R., Lin, Z.F. and Liu, G.M. 2003. Photodegradation of diesel oil in aqueous solutions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(6): 1128-1135.
- Ziabari, S.S., Khezri, S.M. and Kalantary, R.R. 2016. Ozonation optimization and modeling for treating diesel-contaminated water. *Marine Pollution Bulletin*, 104(1-2): 240-245.
- รายชื่อสารเคมีขจัดครบน้ำมัน 2558 [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: [http://www.pcd.go.th/info\\_serv/water.html.2558](http://www.pcd.go.th/info_serv/water.html.2558).
- สถิติน้ำมันรั่วไหล ปี 2558. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.md.go.th/md/index.php/2014-01-19-05-02-28/2016-07-25-03-15-33/2016-11-23-07-40-37/2195-13-2558.2559>.
- น้ำมันรั่วไหล (Oil Spill). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.mkh.in.th/index.php/2010-03-22-18-05-34/2011-08-24-04-53-01.2554>.
- มองย้อน 1 ปี ครบน้ำมันกลืน 'อ่าวพร้าว' เกาะเสม็ด. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.thairath.co.th/content/439975.2557>.
- ท่อน้ำมันดิบ ปตท.รั่วกลางทะเลระยอง. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.manager.co.th/Local/ViewNews.aspx?NewsID=9560000092290.2556>.
- เรือบรรทุกน้ำมันชนเรือข้ามฟากจมเจ้าพระยาหน้าวัดพนัญเชิง บาดเจ็บ 4 ราย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.manager.co.th/local/viewnews.aspx?NewsID=9590000000299.2559>.
- ศูนย์พยากรณ์และสารสนเทศพลังงาน, ก. 2558. สรุปสถานการณ์การใช้้ำมันและไฟฟ้าของไทย ปี 2558: 1-16.



รายงานสถิติพลังงานรายปี 2559. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <https://drive.google.com/file/d/0B72dHL3q3jybU2JscXJsQi10elk/view.2559>.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

**ภาคผนวก ก**  
**สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

**อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM)**

ก.	แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	3.0	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเดคะไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	5.5	กรัม
	โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.8	กรัม
ข.	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.1	กรัม
	เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.05	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.05	กรัม

ซึ่งสารส่วน ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายในส่วน ข. ที่ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารส่วน ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายแบคโตเอการ์ 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มล. ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

**อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)**

	ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
	สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเตรียมโดยละลายผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

#### อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Hoagland's

โพแทสเซียมไนเตรต ( $\text{KNO}_3$ )	36.1	มก.
ไดโพแทสเซียมซัลเฟต ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )	293	มก.
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	3.87	มก.
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	103	มก.
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	147	มก.
เฟอร์ริกซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	3.33	มก.
กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0.95	มก.
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.39	มก.
กรดโมลิบดีก ( $\text{H}_2\text{MoO}_4$ )	0.254	มก.
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.03	มก.
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.08	มก.

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ภาคผนวก ข**  
**สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี**

**สารละลายนิสแตตินความเข้มข้น 40 มก./มล.**

ชั่งนิสแตติน 400 มก. ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 10 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร เก็บในที่ไม่มีแสง

**สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0**

EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt)	16.81	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มล.

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 50 มล. ในบีกเกอร์โดยมีแท่งกวนแม่เหล็ก ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนมีค่าเท่ากับ 8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลาย Tris-EDTA (Tris-ethylenediaminetetraacetic acid, TE)**

สารละลาย Tris เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	1.0	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	0.2	มล.
น้ำปลอดประจุ	98.8	มล.

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลายไลโซไซม์ ความเข้มข้น 06 มก./มล.**

ไลโซไซม์ (lysozyme)	60	มก.
สารละลาย TE	1	มล.

**สารละลายโปรตีนเนสเค ความเข้มข้น 10 มก./มล.**

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	10	มก.
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	1	มล.

**สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%**

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

**สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 5 โมลาร์**

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 29.22 กรัม ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 100 มล. นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์**

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 3.9996 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. สุดท้ายจะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

**สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้น 20 %**

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	20	กรัม
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	100	มล.

**สารละลายเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ในโซเดียมคลอไรด์ (CTAB/NaCl)**

เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มล.

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุ 70 มล. ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก อุ่นให้ความร้อน ค่อยๆละลาย CTAB ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**บัฟเฟอร์ Tris-acetate-EDTA เข้มข้น 50 เท่า (50X TAE)**

Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane)	242	กรัม
กรดอะซิติก (glacial acetic acid)	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มล.

ละลาย Tris ในน้ำปลอดประจุ 600 มล. ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ เติมกรดอะซิติกและสารละลาย EDTA ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### บัฟเฟอร์ Tris-acetate-EDTA เข้มข้น 1 เท่า (1X TAE)

บัฟเฟอร์ 50X TAE	20	มล.
น้ำกลั่น	980	มล.

#### บัฟเฟอร์ PUM (phosphate-urea-magnesium sulfate)

ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	16.9	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	7.3	กรัม
ยูเรีย ( $CH_4N_2O$ )	1.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### สารละลายยูเรีย (urea) เข้มข้น 7 โมลาร์

ยูเรีย ( $CH_4N_2O$ )	42.042	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

#### สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) เข้มข้น 10 %

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ( $(NH_4)_2S_2O_8$ )	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มล.

**ภาคผนวก ค**  
**ข้อมูลต่างๆในการทดลอง**

**ตารางที่ ค-1**    **กลุ่มแบบคที่เรียที่คัดแยกจากรากพืชน้ำชนิดต่างๆจากต่างแหล่งที่มา**

กลุ่ม แบบคที่เรีย	ชนิดพืช/แหล่งที่มา	กลุ่ม แบบคที่เรีย	ชนิดพืช/แหล่งที่มา
SJ12	ผักตบชวา/เจ้าพระยา ท่าน้ำศิริราช	PP12	ผักบุง/ประตู่ระบายน้ำคลองจิก รามคำแหง
SJ31	ผักบุง/คลองรังสิตประยูรศักดิ์ คลอง 2 บริเวณร้านก๋วยเตี๋ยวเรือสวัสดิ์ ตำบลประชาธิปไตย ปทุมธานี	PP13	
SJ32		PP14	
SJ41		PP15	ผักบุง/คลองลาดพร้าวท่าเรือสุทธิสาร วินิจฉัย เขตห้วยขวาง
SJ42		PP16	บึงบริเวณสุวินทวงศ์ ปตท. สุวินท วงศ์ เขตมีนบุรี
SJ51		PP17	
SJ61		PP18	
SJ62	ผักตบชวา/คลองเปรมประชากร ถนนเดช อุดม ตำบลหลักหก ปทุมธานี	PP19	ผักบุง/คลองบึงใหญ่ สุวินทวงศ์ ซอย 9 เขตมีนบุรี
SJ71	ผักบุง/คลองเปรมประชากร ถนนเดชอุดม ตำบลหลักหก ปทุมธานี	PP20	ผักบุง/บึงบริเวณ ส.น จระเข้บ่อย
SJ81		PP21	ผักบุง/คลองประเวศบุรีรมย์ วัดปลูก ศรัทธา เขตประเวศ
SJ82		PP22	
SJ91	PP23		
SJ101	ผักบุง/คลองมหาสวัสดิ์ ท่าเรือวัดศาลวัน	SKR1	ผักตบชวา/เจ้าพระยา ท่าน้ำศิริราช
SJ102	ตำบลศาลายา นครปฐม	SKR2	
PP1	ผักบุง/คลองแสนแสบ ท่าเรือบางกะปิ	SKR3	ผักตบชวา/ประตู่ระบายน้ำคลองจิก รามคำแหง
PP2		SKR4	ผักตบชวา/คลองลาดพร้าวท่าเรือ สุทธิสารวินิจฉัย เขตห้วยขวาง
PP3	ผักบุง/คลองอ้อมนนท์ เขตบางอ้อ	SKR5	ผักตบชวา/คลองแสนแสบ รามคำแหง 157/3
PP4	ผักบุง/คลองสี่ ถนนสุวิทวงศ์ เขตมีนบุรี	SKR6	ผักตบชวา/คลองแสนแสบ รามคำแหง 190/3
PP5		SKR7	ผักตบชวา/คลองสี่ ถนนสุวิทวงศ์ เขต มีนบุรี



ตารางที่ ค-1 (ต่อ)

กลุ่ม แบคทีเรีย	ชนิดพืช/แหล่งที่มา	กลุ่ม แบคทีเรีย	ชนิดพืช/แหล่งที่มา
PP6	ผักบุ้ง/คลองไผ่เหลือง ถนนสุวิทวงศ์ เขต มีนบุรี	SKR8	ผักตบชวา/คลองไผ่เหลือง
PP7		SKR9	ผักตบชวา/คลองไผ่เหลือง
PP8		SKR10	ผักตบชวา/คลองลำต้นไทร วัดใหม่ ลำนกแขก
PP9	ผักบุ้ง/คลองลำต้นไทร วัดใหม่ลำนกแขก	SKR11	ผักตบชวา/สวนสันติชัยปราการ
PP10	ผักบุ้ง/คลองลำต้นไทร วัดใหม่ลำนกแขก	SKR12	ผักตบชวา/ท่าพระอาทิตย์
PP11	ผักบุ้ง/ทำนน้ำวัดกระทุ่มเสือปลา เขต ประเวศ	SKR13	ผักตบชวา/ท่าพระปิ่นเกล้า

ตารางที่ ค-2 ความสามารถในการย่อยสลายดีเซลและจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของกลุ่มแบคทีเรีย  
ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 50 กลุ่มแบคทีเรีย

กลุ่ม แบคทีเรีย	ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ (%)			จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (log CFU/มล.)		
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
SJ12**	100	3.73±2.3	1.68±0.7	8.69±0.41	8.93±0.16	8.57±0.24
SJ31*	100	5.19±3.8	1.64±1.0	8.01±0.20	8.18±0.17	8.67±0.23
SJ32*	100	9.61±6.1	2.97±1.7	8.59±0.21	8.87±0.24	8.33±0.12
SJ41**	100	4.41±3.4	1.39±0.9	8.55±0.39	8.69±0.22	8.53±0.26
SJ42**	100	1.49±2.0	0.59±0.9	8.00±0.19	8.67±0.27	8.69±0.23
SJ51**	100	1.40±0.9	0.27±0.2	8.26±0.16	8.74±0.13	8.47±0.11
SJ61	100	21.64±5.6	2.51±0.5	7.75±0.39	9.06±0.41	8.66±0.38
SJ62	100	11.19±3.9	1.20±0.8	8.75±0.27	9.08±0.10	9.45±0.12
SJ71	100	41.34±2.7	6.95±4.6	8.41±0.22	8.89±0.29	9.09±0.07
SJ81*	100	6.17±3.0	3.39±1.3	8.52±0.27	9.11±0.08	9.04±0.78
SJ82*	100	9.84±2.4	4.00±1.8	8.11±0.12	9.12±0.21	8.6±0.1
SJ91*	100	5.47±1.5	4.26±2.5	8.17±0.10	8.47±0.14	8.41±0.15
SJ101	100	20.63±7.4	0.13±0.1	8.36±0.22	9.14±0.05	8.93±0.12
SJ102	100	14.01±4.2	0.00±0.0	8.68±0.32	8.84±0.13	8.06±0.04

\* ย่อยสลายดีเซลได้มากกว่า 90% ในเวลา 7 วัน

\*\* ย่อยสลายดีเซลได้มากกว่า 95% ในเวลา 7 วัน

\*\*\*ย่อยสลายดีเซลได้มากกว่า 95% ในเวลา 14 วัน

## ตารางที่ ค-2 ต่อ

กลุ่ม แบคทีเรีย	ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ (%)			จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (log CFU/มล.)		
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
PP1*	100	9.60±1.6	2.70±0.3	7.14±0.20	7.64±0.05	7.50±0.02
PP2*	100	5.70±1.2	2.30±0.6	7.40±0.02	7.50±0.01	8.68±0.02
PP3**	100	3.10±0.7	5.40±1.5	7.95±0.01	7.63±0.01	7.47±0.01
PP4***	100	23.60±2.8	1.60±0.4	7.50±0.02	8.11±0.05	8.25±0.02
PP5	100	62.80±6.2	17.30±2.2	8.40±0.02	8.50±0.01	8.68±0.02
PP6	100	32.80±4.9	5.30±0.7	7.95±0.01	8.44±0.01	7.82±0.06
PP7***	100	19.10±4.6	1.60±0.0	7.85±0.03	8.03±0.03	8.21±0.04
PP8**	100	3.60±0.5	1.70±0.6	8.00±0.01	8.77±0.01	8.39±0.03
PP9**	100	4.20±0.4	2.20±0.7	7.22±0.11	7.53±0.05	7.81±0.02
PP10**	100	2.40±0.6	0.80±0.0	7.38±0.09	7.82±0.10	7.87±0.02
PP11***	100	10.20±1.2	3.50±0.5	7.22±0.11	8.28±0.01	9.07±0.03
PP12	100	31.10±0.4	9.50±0.5	7.99±0.02	8.96±0.04	9.25±0.04
PP13	100	24.50±0.5	7.80±0.9	7.94±0.02	8.74±0.01	8.36±0.01
PP14	100	25.20±0.5	8.80±0.9	7.87±0.09	8.35±0.02	8.62±0.11
PP15*	100	5.90±1.3	2.40±0.7	7.95±0.01	7.88±0.01	7.80±0.02
PP16*	100	5.60±0.3	2.40±0.4	7.95±0.01	7.88±0.01	7.80±0.02
PP17***	100	38.10±4.8	2.90±0.3	8.25±0.06	8.07±0.02	8.22±0.04
PP18***	100	14.50±2.7	2.50±0.4	7.68±0.03	8.17±0.01	8.22±0.04
PP19	100	15.50±0.8	5.00±0.4	7.69±0.02	7.85±0.06	8.08±0.02
PP20**	100	4.50±2.9	1.70±0.4	7.24±0.02	7.73±0.03	7.95±0.03
PP21**	100	3.10±1.1	1.10±0.2	7.30±0.03	8.02±0.02	8.09±0.01
PP22**	100	2.70±0.2	1.20±0.3	7.45±0.03	8.17±0.04	8.27±0.02
PP23**	100	2.60±0.6	1.20±0.2	7.42±0.01	8.14±0.03	8.30±0.01

\* ย่อยสลายดีเซลได้มากกว่า 90% ในเวลา 7 วัน

\*\* ย่อยสลายดีเซลได้มากกว่า 95% ในเวลา 7 วัน

\*\*\* ย่อยสลายดีเซลได้มากกว่า 95% ในเวลา 14 วัน

## ตารางที่ ค-2 ต่อ

กลุ่ม แบคทีเรีย	ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ (%)			จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (log CFU/มล.)		
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
SKR1***	100	15.03±3.5	0.96±0.3	8.72±0.06	8.90±0.03	8.70±0.06
SKR2*	100	8.49±0.4	0.95±0.14	8.39±0.21	8.39±0.05	8.09±0.33
SKR3*	100	9.63±6.14	1.14±0.11	8.72±0.17	8.28±0.16	8.17±0.10
SKR4*	100	6.86±7.3	0.57±0.5	8.23±0.15	8.40±0.05	8.36±0.11
SKR5***	100	32.34±30.7	1.76±0.5	8.31±0.06	8.46±0.02	7.40±0.16
SKR6	100	67.57±17.1	15.34±13.5	7.91±0.05	8.30±0.07	8.14±0.08
SKR7***	100	16.23±3.7	2.05±0.2	8.39±0.21	8.36±0.01	7.94±0.01
SKR8**	100	3.55±0.9	1.34±0.7	8.44±0.23	8.45±0.01	8.33±0.01
SKR9	100	57.08±25.4	5.04±3.9	8.46±0.02	8.99±0.01	8.40±0.01
SKR10***	100	23.28±2.9	4.30±1.8	8.45±0.01	8.47±0.01	8.34±0.02
SKR11***	100	44.52±11.6	3.23±2.9	8.14±0.08	8.34±0.01	8.37±0.02
SKR12**	100	4.7±2.2	1.72±0.8	8.13±0.06	8.46±0.02	8.21±0.04
SKR13*	100	8.94±2.1	2.51±1.5	8.09±0.05	8.58±0.07	8.49±0.08

\* ย่อยสลายดีเซลได้มากกว่า 90% ในเวลา 7 วัน

\*\* ย่อยสลายดีเซลได้มากกว่า 95% ในเวลา 7 วัน

\*\*\*ย่อยสลายดีเซลได้มากกว่า 95% ในเวลา 14 วัน

ตารางที่ ค-3 ค่าพารามิเตอร์ของน้ำจืดตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำจืด	พารามิเตอร์							
	ปริมาณไนโตรเจน (มก./ล.)	ปริมาณฟอสฟอรัส (มก./ล.)	BOD (มก./ล.)	COD (มก./ล.)	pH	อุณหภูมิ	สีของน้ำ	ปริมาณดีเซล (มก./ล.)
คลองแสนแสบ (SS)	7.8	3.34	26.1	58	7.47	31.0	เหลือง ขุ่น อด น้ำตาล มีตะกอน	ND
คลองสามเสน (SN)	7.7	2.60	13.0	33	7.30	31.5	เหลือง น้ำตาล	ND
คลองลาดพร้าว (LP)	8.4	3.37	24.5	56.3	7.51	28.0	เหลือง น้ำตาล มีตะกอน	ND
คลองบางซื่อ (BZ)	6.7	2.16	27.1	48.7	7.45	30.0	เหลือง	ND
คลองรังสิตประยูรศักดิ์ (RS)	2.2	0.86	5.1	28.6	8.27	30.5	เหลือง	ND
แม่น้ำเจ้าพระยา (CPY)	2.24	1.41	4.7	64.0	7.55	27.5	เหลือง ส้ม	ND

ตารางที่ ค-4 สถานที่เก็บน้ำตัวอย่างทั้ง 6 แห่ง

แหล่งน้ำ	แหล่งที่เก็บน้ำ	วันที่เก็บ	เวลา
คลองแสนแสบ	โลตัสพระราม 1 แขวงวังใหม่	25 ก.ย. 2557	13:23
คลองสามเสน	กำแพงเพชร 5 แขวงสามเสนใน	25 ก.ย. 2557	15:00
คลองลาดพร้าว	ถนนสุทธิสารวิจิตร แขวงสามเสนนอก	25 ก.ย. 2557	16:13
คลองบางซื่อ	ถนนพระราม 6 ซอย 36 แขวงบางซื่อ	25 ก.ย. 2557	15:30
คลองรังสิตประยูรศักดิ์	คลอง 2 ตำบลประชาธิปัตย์ อำเภอธัญบุรี	5 ม.ค. 2559	13:05
แม่น้ำเจ้าพระยา	ทำนบกั้นน้ำพระยา แขวงบางรัก	5 ม.ค. 2559	16:05

ตารางที่ ค-5 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และฟอสฟอรัสทั้งหมดของตัวอย่างน้ำไม่ปลอดเชื้อในการทดลองย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42

ตัวอย่างน้ำ	ไนโตรเจนทั้งหมด (มก./ล.)			ฟอสฟอรัสทั้งหมด (มก./ล.)		
	เริ่มต้น วันที่ 0	เติม SJ42 วันที่ 28	ไม่เติม SJ42 วันที่ 28	เริ่มต้น วันที่ 0	เติม SJ42 วันที่ 28	ไม่เติม SJ42 วันที่ 28
SS	9.2	6.7	8.6	3.8	1.4	2.8
SN	9.2	6.2	9.6	2.9	1.5	2.5
LP	8.2	9.5	9.5	2.6	1.8	2.8
BZ	10.3	11.8	10.8	2.6	1.9	2.9
RS	13.6	6.0	7.8	7.3	3.1	6.4
CPY	16.2	8.0	10.6	6.6	4.7	6.4

ตารางที่ ค-6 BOD และ COD ของตัวอย่างน้ำไม่ปลอดเชื้อและปลอดเชื้อในการทดลองย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย SJ42

ตัวอย่างน้ำ	การลดลง (%)							
	BOD				COD			
	น้ำไม่ปลอดเชื้อ		น้ำปลอดเชื้อ		น้ำไม่ปลอดเชื้อ		น้ำปลอดเชื้อ	
	+SJ42	-SJ42	+SJ42	-SJ42	+SJ42	-SJ42	+SJ42	-SJ42
SS	81	24	87	15	34	9	61	6
SN	65	39	91	35	27	15	47	5
LP	72	45	78	42	40	22	56	10
BZ	68	44	87	36	43	13	37	6
RS	86	57	39	41	51	38	26	9
CPY	46	54	42	46	68	58	22	16

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNAของแบคทีเรีย

*Pseudomonas aeruginosa* S4A (GenBank accession no. LC168838)

5'CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGC  
 TCCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAAC  
 GTCCGAAACGGGCGCTAATACCGCATACTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCT  
 CACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC  
 GATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTA  
 CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT  
 GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCT  
 TGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
 CGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTCAGCAAGTT  
 GGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTA  
 GAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGC  
 GAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAG  
 TGGCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAATACTCAAAT  
 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC  
 CTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCCAGAC  
 ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCCTAACGAGC  
 GCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA  
 CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGC  
 TACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGT  
 AGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGA  
 ATGTCACGGTGAATACGTTCCCCGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTG  
 CTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCAT3'

***Stenotrophomonas maltophilia* S4B (GenBank accession no. LC168839)**

5'CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGC  
TCCTGGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAAC  
GTCCGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCT  
CACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC  
GATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT  
GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCT  
TGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
CGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTT  
GGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTA  
GAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGC  
GAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAG  
TGCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAT  
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC  
CTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGAC  
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGC  
GCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA  
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGC  
TACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAACCGATCGT  
AGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGA  
ATGTCACGGTGAATACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTG  
CTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCAT3'

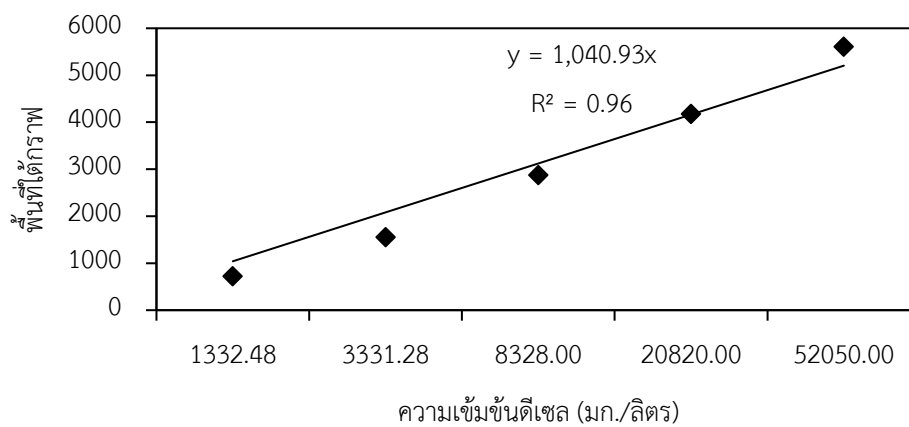
***Ochrobactrum intermedium* S4C (GenBank accession no. LC168840)**

5'AGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGC  
AGACGGGTGAGTAACGCGTGGAACGTACCATTTGCTACGGAATAACTCAGGGAACTTGTGCT  
AATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGCAAATGATCGGCCCGCGTTGGATTAGC  
TAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC  
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA  
TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTT  
TCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGA  
CTAATAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGTTAGTCTT  
GAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAAC  
ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA  
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGGTGTTTA  
CACTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA  
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC  
GCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGTTAGTGGAGACACTATCCTTCAGTTCGG  
CTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTC  
CCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGC  
CGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGC  
TACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAA  
AAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATC  
GCGGATCAGCATGCCGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTCACACCA3'



ตารางที่ ค-7 ข้อมูลดิบการวัดค่าการสร้างสรรค์ไปโอฟิล์มของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* S4A, *S.maltophilia* S4B, *O. intermedium* S4C และกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 และ 600 นาโนเมตร

Bacteria	No.	ACV (OD550)	APL (OD600)	ACV/APL	Average ACV/APL	SD
SJ42	1	2.594	0.989	2.622	2.727	0.160
	2	2.582	1.033	2.499		
	3	2.636	0.914	2.884		
	4	2.655	0.946	2.806		
	5	2.617	0.926	2.826		
S4A	1	2.186	1.248	1.751	1.344	0.479
	2	1.891	1.282	1.475		
	3	2.451	1.436	1.706		
	4	1.634	1.346	1.213		
	5	0.771	1.338	0.576		
S4B	1	1.28	0.967	1.323	1.229	0.202
	2	1.698	1.353	1.254		
	3	1.413	1.366	1.034		
	4	1.409	0.935	1.506		
	5	1.349	1.311	1.028		
S4C	1	1.694	1.344	1.260	1.975	1.393
	2	2.275	0.517	4.400		
	3	1.645	0.867	1.897		
	4	2.017	1.548	1.302		
	5	1.597	1.572	1.015		



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานดีเซลที่ความเข้มข้น 0.16, 0.4, 1, 2.5 และ 6.25% เทียบเป็นหน่วย มก./ลิตร



ตารางที่ ค-8 ปริมาณดีเซลที่สะสมในรากผักตบชวาในการทดลองย่อยสลาย 1% ดีเซล ในอาหาร  
เหลว Hoagland's

ชุดการทดลอง	ดีเซลทั้งหมด วันที่ 0 (มก.)	ดีเซลที่ราก วันที่ 0 (มก.)	% สะสม ดีเซลที่ราก วันที่ 0	ดีเซลทั้งหมด วันที่ 7 (มก.)	ดีเซลที่ราก วันที่ 7 (มก.)	% สะสมดีเซล ที่ราก วันที่ 7
ผักตบชวา ธรรมชาติ (1)	3553.78	417.95	11.76	1851.80	1145.11	61.83
ผักตบชวา ธรรมชาติ (2)	3290.44	310.07	9.42	2709.99	1118.61	41.27
ผักตบชวา ธรรมชาติ (3)	3339.85	273.66	8.19	1755.46	693.23	39.48
เฉลี่ย	3394.69	333.90	9.79±1.81	2105.75	985.65	47.53±12.41
ผักตบชวา/ NaClO (1)	4807.64	1671.82	34.77	2112.14	2089.60	98.93
ผักตบชวา/ NaClO (2)	4220.68	1240.31	29.38	1686.13	1564.11	92.76
ผักตบชวา/ NaClO (3)	4160.86	1094.67	26.30	1712.64	1606.07	93.77
เฉลี่ย	4396.40	1335.60	30.15±4.28	1836.97	1753.26	95.15±3.30
ผักตบชวา ตรึง SJ42(1)	3552.33	455.26	12.81	949.69	602.36	63.42
ผักตบชวา ตรึง SJ42(2)	3524.74	517.33	14.67	424.74	363.78	85.64
ผักตบชวา ตรึง SJ42(3)	3429.52	229.93	6.70	920.06	340.67	37.02
เฉลี่ย	3502.20	400.84	11.39±4.17	764.83	435.60	62.03±24.34

ตารางที่ ค-9 ปริมาณดีเซลที่สะสมในรากผักตบชวาในการทดลองย่อยสลาย 1% ดีเซลในน้ำจาก  
แม่น้ำเจ้าพระยาไม่ปลอดภัย

ชุดการทดลอง	ดีเซลทั้งหมด (มก.)	ดีเซลที่ราก วันที่ 0 (มก.)	% สะสมดีเซลที่ราก วันที่ 0	ดีเซลทั้งหมด (มก.)	ดีเซลที่ราก วันที่ 7 (มก.)	% สะสมดีเซลที่ราก วันที่ 7
ผักตบชวา ธรรมชาติ 1	4807.64	1671.82	34.77	3228.05	3201.68	99.18
ผักตบชวา ธรรมชาติ 2	4220.68	1240.31	29.38	2773.42	2708.89	97.67
ผักตบชวา ธรรมชาติ 3	4160.86	1094.67	26.30	2704.48	2324.60	85.95
เฉลี่ย	4396.40	1335.60	30.16±4.28	2901.99	2745.06	94.27±7.24
ผักตบชวา/ SJ42 (1)	4918.11	1821.04	37.03	1045.11	976.37	93.42
ผักตบชวา/ SJ42 (2)	5076.74	2069.33	40.7610	699.19	691.65	98.92
ผักตบชวา/ SJ42 (3)	4119.33	919.74	22.33	921.51	830.98	90.17
เฉลี่ย	4704.73	1603.37	33.37±9.7	888.61	833.00	94.17±4.42

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุธาสินี จิตติมณี เกิดเมื่อวันที่ 6 กันยายน พ.ศ.2529 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี การศึกษา 2550 และสำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี การศึกษา 2552

การเผยแพร่ผลงานวิชาการระดับนานาชาติ

1. Jittimanee, S., Pattaragulwanit, K. 2012. Isolation of bacterial consortia capable of diesel degradation from aquatic plant rhizosphere. Abstract. 17 th Biological Sciences Graduate Congress (17 th BSGC). Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 8-10 Dec.

2. Jittimanee, S., Pattaragulwanit, K. 2013. Degradation of diesel in fresh water samples by bacterial consortia SJ4 2 and SJ5 1 . Extended Abstract. International Conference on Environmental and Hazardous Substance Management. Bangkok, Thailand, 21-23 May.

3. Jittimanee, S., Pattaragulwanit, K. 2014. Immobilization of bacterial consortia SJ42 and SJ51 on water hyacinth root. Abstract. 18th Biological Sciences Graduate Congress (18th BSGC). University Malaya, Malaysia, 6-8 Jan.

4 Jittimanee,S., Pattanasupong, A. and Pattaragulwanit, K. 2015 . Immobilization of diesel-degrading rhizosphere bacterial consortium SJ42 on water hyacinth root for diesel degradation in liquid medium. Abstract. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Mandarin hotel Bangkok, Bangkok, Thailand, 17-19 Nov.

