

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์จากทรายทะเลที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ

จากการเก็บตัวอย่างทรายทะเล และน้ำทะเลบริเวณ ชายหาดพัทยา จ.ชลบุรี และ ชายหาดหัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ รวมทั้งหมด 12 ตัวอย่าง แล้วนำตัวอย่างทรายทะเล และน้ำทะเลมาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบในอาหารเหลว BH (Bushnell - Hass medium) ที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบ หรือ BH sea ที่เติมน้ำมันดิบ 0.5 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. แล้ว เป็นเวลา 5 วัน เพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ให้มากขึ้นต่อไป โดยถ่ายอาหารที่มีเชื้อลงในอาหารเหลว BH sea และ น้ำมันดิบ 0.5 % ที่เตรียมใหม่ซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงอาหารแข็ง BH sea ที่มีน้ำมันดิบปกคลุม เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 3-4วัน ผลการคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์หรือไฮโซเลตที่มีความสามารถในการย่อยสลายคราบน้ำมันพบโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์หรือไฮโซเลตต่างๆ จำนวนทั้งสิ้น 23 ไฮโซเลต แยกเป็นไฮโซเลตจากชายหาดหัวหินจำนวน 12 ไฮโซเลต และชายหาดพัทยาจำนวน 11 ไฮโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และเมื่อสังเกตดูรายละเอียดของลักษณะการเจริญ และสีของโคโลนี และผลการทดสอบแกรมของไฮโซเลตแล้ว สามารถจำแนกเป็นไฮโซเลตที่แตกต่างกันจากชายหาดหัวหินจำนวน 3 ไฮโซเลต และชายหาดพัทยาจำนวน 3 ไฮโซเลตดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

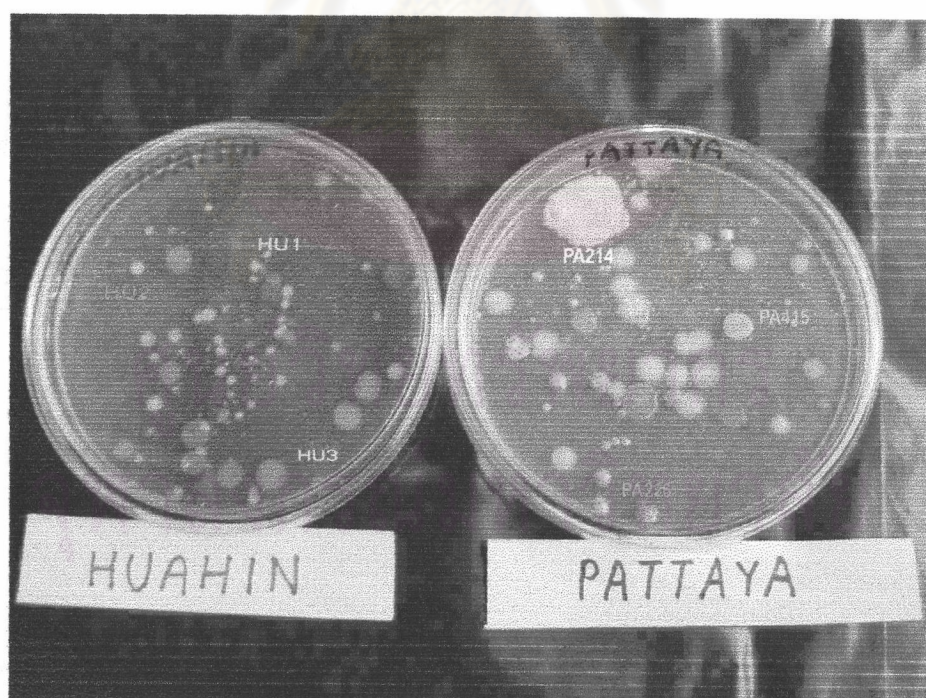
ตารางที่ 4.1 ผลสรุปการคัดเลือกจุลินทรีย์จากทรายทะเลที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ

สถานที่	จำนวนไอโซเลตที่มีความสามารถ ในการย่อยสลายคราบน้ำมัน (isolates)
1.ชายหาดหัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	12
1.1 ร้านอาหารหาดทราย	3
1.2 สะพานปลา	2
1.3 สถานีสมุทรศาสตร์	2
1.4 อาคารรับรองนาวิกิกรมย์	2
1.5 ภัตตาคาร ร่มทะเลซีฟู้ด	1
1.6 น้ำทะเลสะพานปลา	2
2.ชายหาดพัทยา จ.ชลบุรี	11
2.1 ศาลเจ้าพ่อเกตุขาม พัทยาเหนือ	2
2.2 โรงแรมฮาร์ตริค พัทยากลาง	2
2.3 รอยัลการ์เด้นท์พลาซ่า พัทยาใต้	1
2.4 สะพานปลา พัทยาใต้	2
2.5 ป้อมตำรวจจอมเทียน	2
2.6 น้ำทะเลบริเวณพัทยาใต้	2
	23

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ผลสรุปลักษณะไอโซเลตที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ ที่คัดเลือกได้

สถานที่	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบน อาหารแข็ง BH sea	ผลการทดสอบแกรม และ ลักษณะรูปร่าง
ชายหาดหัวหิน	HU 1	โคโลนีสีขาวครีม เป็นฝ้าบางๆ	แกรมลบ ท่อนสั้น
	HU 2	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ขอบเรียบ	แกรมลบ ท่อนสั้น
	HU 3	โคโลนีสีส้มนูน เป็นจุดเล็กๆ	แกรมบวก เป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์
ชายหาดพัทยา	PA214	โคโลนีสีขาวขุ่น กกลม เป็นมันเยิ้ม	แกรมลบ ท่อนสั้น
	PA226	โคโลนีสีส้มนูน เป็นจุดเล็กๆ	แกรมบวก เป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์
	PA415	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ	แกรมลบ ท่อนสั้น



รูปที่ 4.1 ลักษณะไอโซเลตที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบที่คัดเลือกได้จากบริเวณชายหาดหัวหิน และชายหาดพัทยา บนอาหารแข็ง BH ที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบ (BH sea)

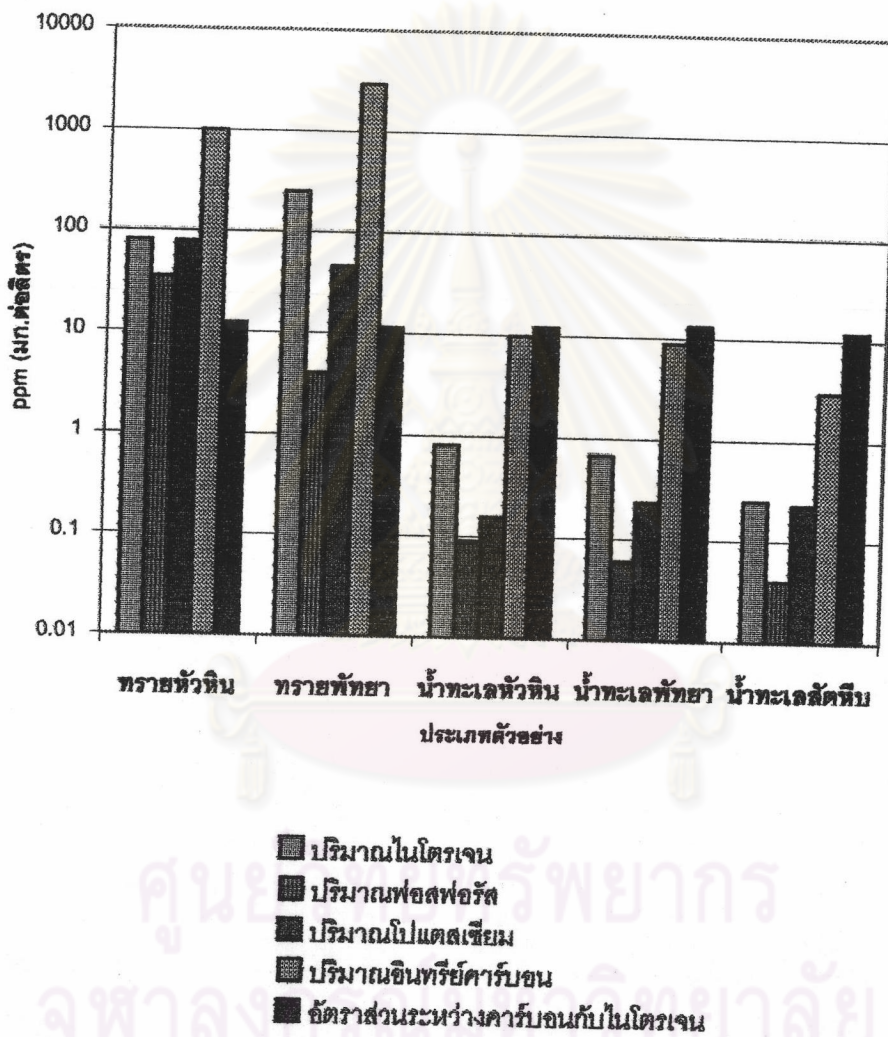
4.2 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของทรายทะเล น้ำทะเลและน้ำมันดิบที่นำมาใช้ในการวิจัย

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของทรายทะเล และน้ำทะเลที่นำมาใช้ในการวิจัย

ทรายทะเลและน้ำทะเลจากบริเวณชายหาดหัวหินและพัทลุงรวมทั้งน้ำทะเลจากบริเวณชายหาดสตั๊ปป นำมาวิเคราะห์ลักษณะ ทางกายภาพและองค์ประกอบเคมีต่างๆ ซึ่งเป็นปัจจัยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในทรายทะเล และน้ำทะเล อันได้แก่ ความเป็นกรด-ด่างความเค็ม ปริมาณ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โบตแลสเซียม อินทรีย์คาร์บอน สารอินทรีย์ปริมาณไขมันและน้ำมัน ปริมาณบีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณธาตุอาหารสำคัญที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในแต่ละตัวอย่าง รวมทั้งอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของทรายทะเล และน้ำทะเลที่นำมาใช้ในการวิจัย

รายการวิเคราะห์	ทรายทะเล		น้ำทะเล		
	หัวหิน	พัทลุง	หัวหิน	พัทลุง	สตั๊ปป
ลักษณะทราย	ทรายละเอียด	ทรายหยาบ	-	-	-
ความเป็นกรด-ด่าง	7.4	7.8	7.7	7.9	7.9
ความเค็ม %	1.6	1.5	3.0	3.1	3.1
ปริมาณไนโตรเจน ppm	80	250	0.81	0.67	0.25
ปริมาณฟอสฟอรัส ppm	35	4	0.09	0.06	0.04
ปริมาณโบตแลสเซียม ppm	79	46	0.157	0.235	0.230
ปริมาณสารอินทรีย์ ppm	1700	5000	17	15	5
ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน ppm	1000	2900	10	9	3
อัตราส่วนคาร์บอน ต่อไนโตรเจน	12.5	11.6	12.3	13.4	12.0
ปริมาณไขมันและน้ำมัน ppm	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
ปริมาณบีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ppm	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5



รูปที่ 4.2 ปริมาณธาตุอาหารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของทราษทะเล และ น้ำทะเลที่นำมาใช้ในการวิจัย

4.2.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบที่นำมาใช้ในการวิจัย

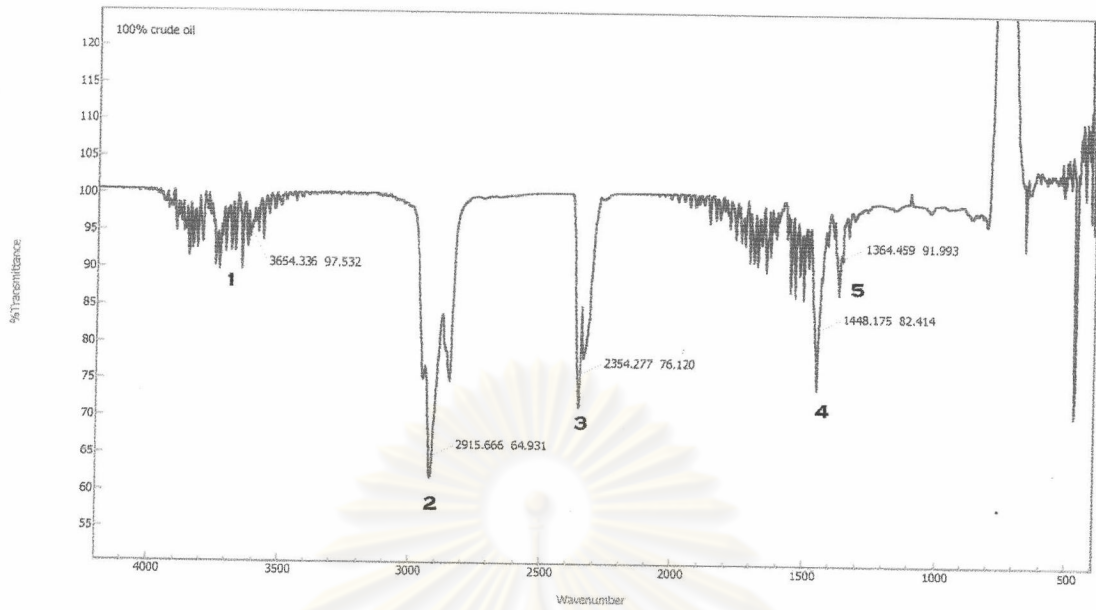
ผลการวิเคราะห์น้ำมันดิบด้วย FTIR พบอินฟราเรดสเปกตรัมที่เด่น 5 พีค ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ก

- พีคที่ 1 ช่วง 3,700-3,600 cm^{-1} เป็น C-H stretching ของ H_2O
- พีคที่ 2 ช่วง 3,000-2,840 cm^{-1} เป็น C-H stretching ของ alkane
- พีคที่ 3 ช่วง 2,400-2,300 cm^{-1} เป็น C-O stretching ของ CO_2
- พีคที่ 4 ช่วง 1,493-1,429 cm^{-1} เป็น CH_2 -methylene group ของ alkane
- พีคที่ 5 ช่วง 1,379-1,360 cm^{-1} เป็น CH_3 -methyl group ของ alkane

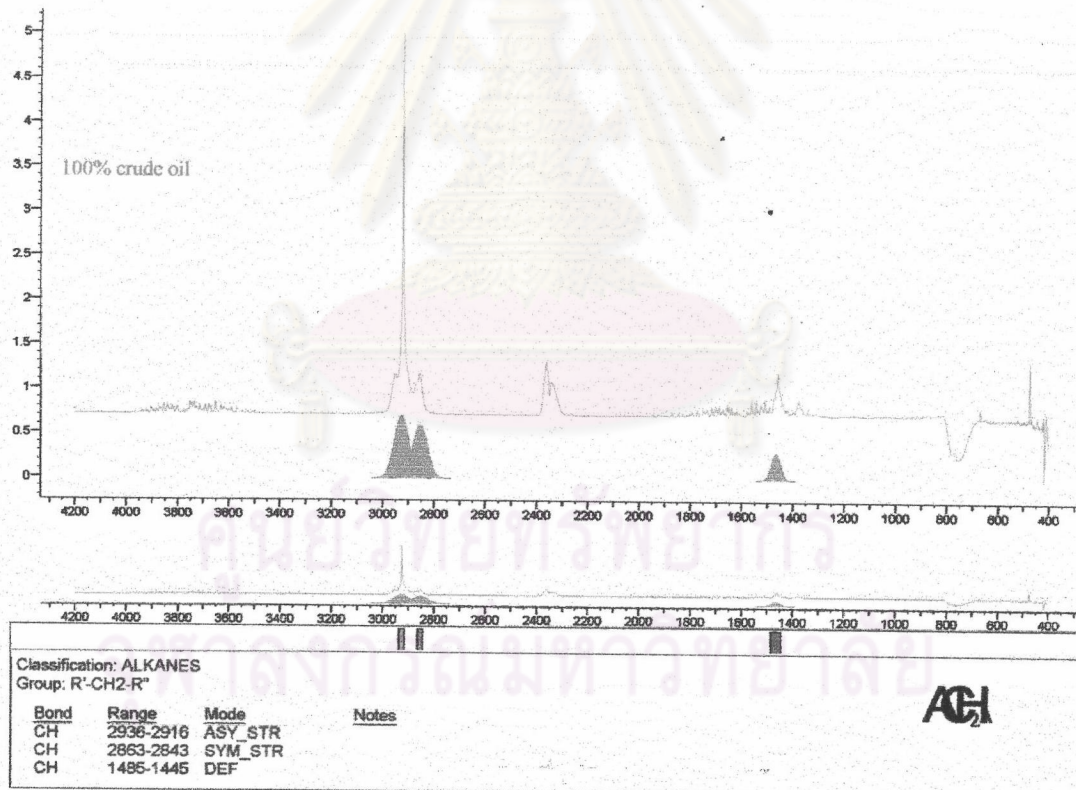
เมื่อนำพีคทั้ง 5 พีค มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Biorad Merlin พบว่าน้ำมันดิบเป็นสารกลุ่มอัลเคน (alkanes) มีพีคเด่นในช่วงคลื่น 2,936-2,916 cm^{-1} , 2,863-2,843 cm^{-1} และ 1,485-1,445 cm^{-1} มีสูตรโครงสร้างเป็น $\text{R}'\text{-CH}_2\text{-R}''$ ดังรูปที่ 4.3 ข สามารถใช้อินฟราเรดสเปกตรัมของน้ำมันดิบที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงคลื่น 2,936-2,843 cm^{-1} สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำมันดิบ เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบต่อไปดังภาคผนวก ค.หมายเลข 1

ผลการวิเคราะห์น้ำมันดิบด้วย GC-FID และแปลผลด้วยโปรแกรม Simdist Varian Postpro พบว่า แก๊สโครมาโตแกรมของน้ำมันดิบปรากฏพีคเด่นของอัลเคนที่ C_{13} - C_{36} (Tridecane $\text{C}_{13}\text{H}_{28}$ - Hexatricosane $\text{C}_{36}\text{H}_{74}$) โดยเปรียบเทียบกับ Retention Time (RT) ของสารมาตรฐานอัลเคน และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และพบว่า อัลเคนชนิด C_{17} (Heptadecane $\text{C}_{17}\text{H}_{36}$) ที่ RT 12.12 นาที มีปริมาณในน้ำมันดิบสูงสุด 7.675 % จากพื้นที่รวมของ C_{13} - C_{36} เท่ากับ 58.547 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

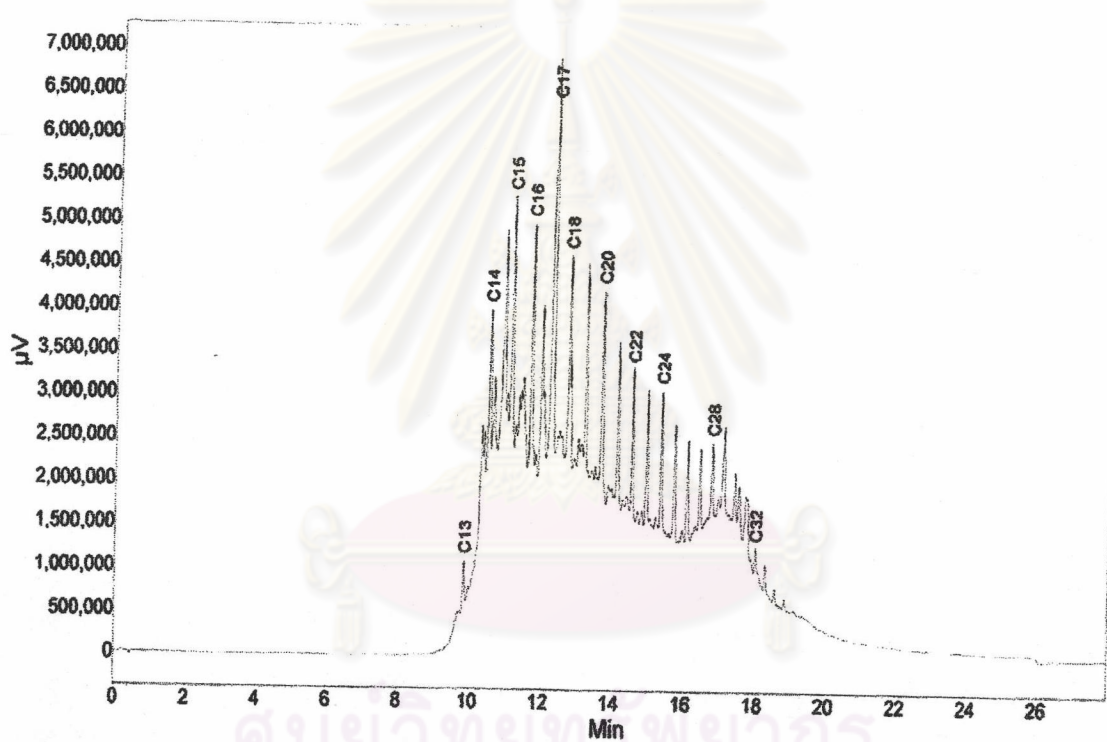


(ก)



(ข)

รูปที่ 4.3 แสดงผลอินฟราเรดสเปกตรัมของน้ำมันดิบ ก) แสดงผลเป็นค่า %Transmittance
ข) แสดงผลเป็นค่า Absorbance



รูปที่ 4.4 แสดงผลแก๊สโครมาโตแกรมของน้ำมันดิบ

4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของไอโซเลตที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาการเจริญและการย่อยสลายน้ำมัน (Biodegradation) ของไอโซเลต HU1, HU2, HU3 และกลุ่มแบคทีเรีย HU (mixed culture HU) ที่คัดเลือกได้จากทรายบริเวณชายหาดหัวหิน PA214, PA226, PA451 และกลุ่มแบคทีเรีย PA ที่คัดเลือกได้จากทรายบริเวณชายหาดพิทยา และแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อ 2% ในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบ 50 % มีทรายทะเลที่ปลอดเชื้อ และมีน้ำมันดิบเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร ที่ pH 7.5 เซย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 0-8 วัน และค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเป็น 64 mN/m ศึกษาการเจริญ ของเชื้อโดยวิธี viable plate count หาปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายโดยการสกัดด้วย คาร์บอนเตตระคลอไรด์และวิเคราะห์ด้วย FTIR ที่ค่าดูดกลืนแรงอินฟราเรดที่ช่วงคลื่น 2,936-2,843 ซม.⁻¹ และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.5, 4.6, 4.7 และ 4.8 พบว่า

ไอโซเลต HU1 ที่วันที่ 0 ในอาหารเหลว BH sea ที่ไม่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.5×10^5 CFU ต่อมล. วันที่ 6 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 1.2×10^7 CFU ต่อมล. ส่วนในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 9.0×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 7 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 6.3×10^7 CFU ต่อมล. ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบในอาหารลดลงเหลือ 24.53 % อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.08 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 59.0 mN/m

ไอโซเลต HU2 ที่วันที่ 0 ในอาหารเหลว BH sea ที่ไม่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.5×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 3 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 1.5×10^7 CFU ต่อมล. ส่วนในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.0×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 7 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 2.0×10^8 CFU ต่อมล. ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบในอาหารลดลงเหลือ 10.41 % อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.05 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 51.3 mN/m

ไอโซเลต HU3 ที่วันที่ 0 ในอาหารเหลว BH sea ที่ไม่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.0×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 8 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 6.0×10^6 CFU ต่อมล. ส่วนในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2.0×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 7 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 5.0×10^7 CFU ต่อมล. ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบในอาหารลดลงเหลือ 72.40 % อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.39 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 57.5 mN/m

ไอโซเลต PA214 ที่วันที่ 0 ในอาหารเหลว BH sea ที่ไม่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น

2.0×10^5 CFU ต่อมล. วันที่ 5 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 5.0×10^5 CFU ต่อมล. ส่วนในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 6 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 2.5×10^8 CFU ต่อมล. ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบในอาหารลดลงเหลือ 36.20 % อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.03 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 56.0 mN/m

ไอโซเลต PA226 ที่วันที่ 0 ในอาหารเหลว BH sea ที่ไม่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.2×10^5 CFU ต่อมล. วันที่ 7 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 1.2×10^6 CFU ต่อมล. ส่วนในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0×10^5 CFU ต่อมล. วันที่ 2 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 7.0×10^7 CFU ต่อมล. ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบในอาหารลดลงเหลือ 69.23 % อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.35 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 63.0 mN/m

ไอโซเลต PA415 ที่วันที่ 0 ในอาหารเหลว BH sea ที่ไม่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.1×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 3 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 1.5×10^7 CFU ต่อมล. ส่วนในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.7×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 2 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 6.0×10^7 CFU ต่อมล. ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบในอาหารลดลงเหลือ 41.63 % อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.15 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 58.4 mN/m

กลุ่มแบคทีเรีย HU ที่วันที่ 0 ในอาหารเหลว BH sea ที่ไม่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 9.0×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 7 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 1.85×10^7 CFU ต่อมล. ส่วนในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 9.0×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 5 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 2.5×10^6 CFU ต่อมล. ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบในอาหารลดลงเหลือ 10.00 % อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.01 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 51.5 mN/m

กลุ่มแบคทีเรีย PA ที่วันที่ 0 ในอาหารเหลว BH sea ที่ไม่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.8×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 3 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 8.0×10^6 CFU ต่อมล. ส่วนในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 5 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 5.0×10^6 CFU ต่อมล. ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบในอาหารลดลงเหลือ 33.94 % อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.05 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 58.0 mN/m

แบคทีเรีย *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ที่วันที่ 0 ในอาหารเหลว BH sea ที่ไม่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.7×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 4 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 7.0×10^7 CFU ต่อมล. ส่วนในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.0×10^6 CFU ต่อมล. วันที่ 4 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 8.25×10^6 CFU ต่อมล. ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบในอาหารลดลงเหลือ 52.04 % อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.95 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 45.5 mN/m

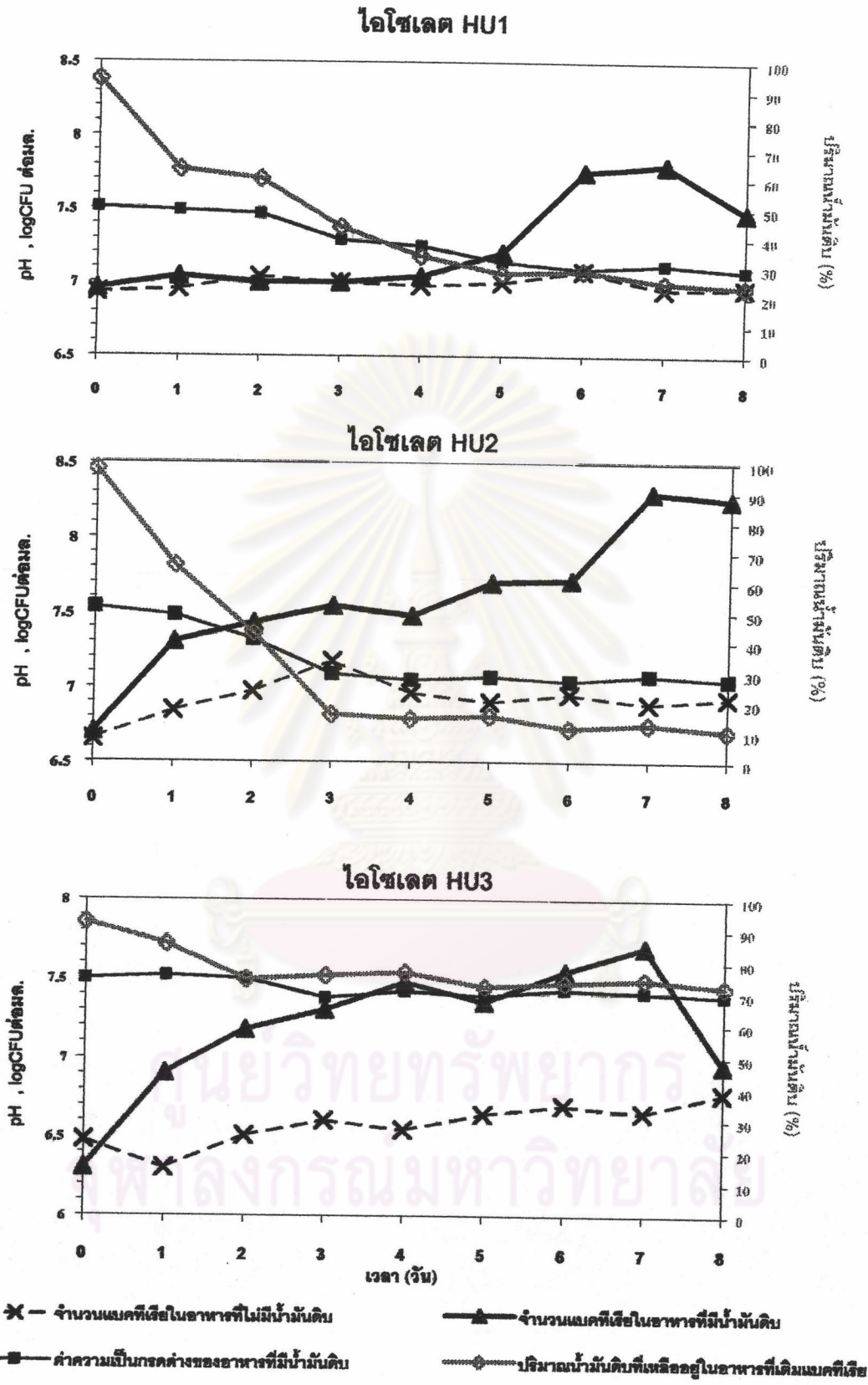
แบคทีเรีย *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ที่วันที่ 0 ในอาหารเหลว BH sea ที่ไม่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0×10^5 CFU ต่อมล. วันที่ 5 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 1.8×10^7 CFU ต่อมล. ส่วนในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0×10^5 CFU ต่อมล. วันที่ 4 มีปริมาณเชื้อสูงสุด 2.75×10^7 CFU ต่อมล. ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบในอาหารลดลงเหลือ 42.53 % อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.11 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 39.0 mN/m

ส่วนชุดควบคุมการย่อยสลายน้ำมันดิบ เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ (ไม่มีการเติมแบคทีเรีย) ในวันที่ 8 ปริมาณน้ำมันดิบลดลงเหลือ 77.83 % อาหารเลี้ยงเชื้อ มีค่าความเป็นกรด-ด่างของเป็น 7.40 ค่าแรงตึงผิวเป็น 63.0 mN/m

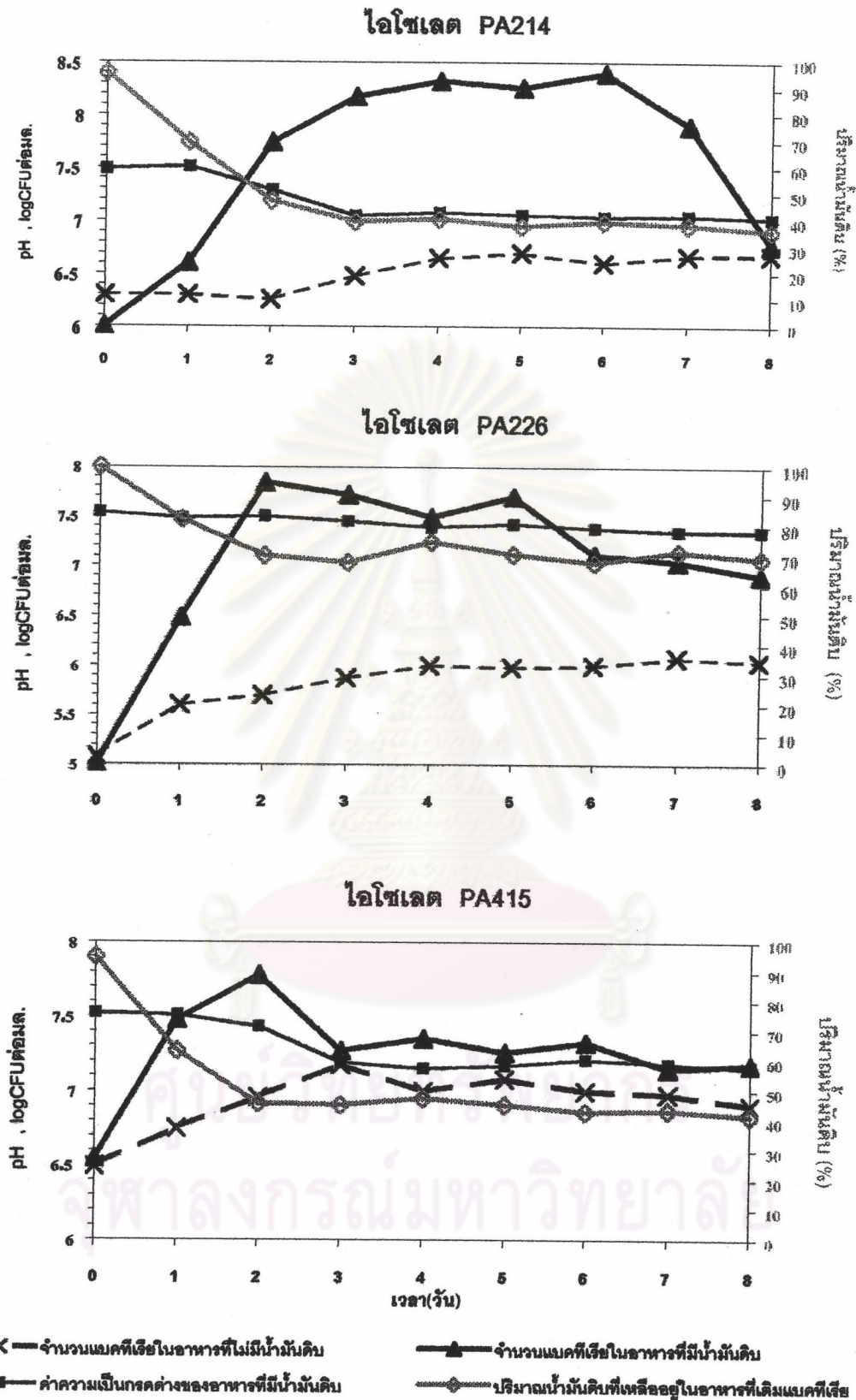
เมื่อคุณผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันของไฮโซเลตที่คัดแยกได้ พบว่าไฮโซเลต HU2 มีความสูงที่สุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 89.59 % ส่วนไฮโซเลตอื่นๆ เรียงลำดับความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดังนี้

ไฮโซเลต HU1 76.47 % ไฮโซเลต PA214 63.30 % ไฮโซเลต PA 415 58.37 %
ไฮโซเลต PA226 30.77 % ไฮโซเลต HU3 27.60 % เปรียบเทียบกับความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันทางกายภาพ (ชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย) 22.17 % ส่วนกลุ่มแบคทีเรีย HU มีความสามารถใกล้เคียงกับไฮโซเลต HU2 90.00 % เช่นเดียวกับกลุ่มแบคทีเรีย PA มีความสามารถใกล้เคียงกับ ไฮโซเลต PA 214 66.06 % ส่วนแบคทีเรียที่สามารถสร้างลดแรงตึงผิว *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 สามารถย่อยสลายน้ำมันได้เช่นกัน โดยมีความสามารถ 47.96 และ 57.47 % ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.9

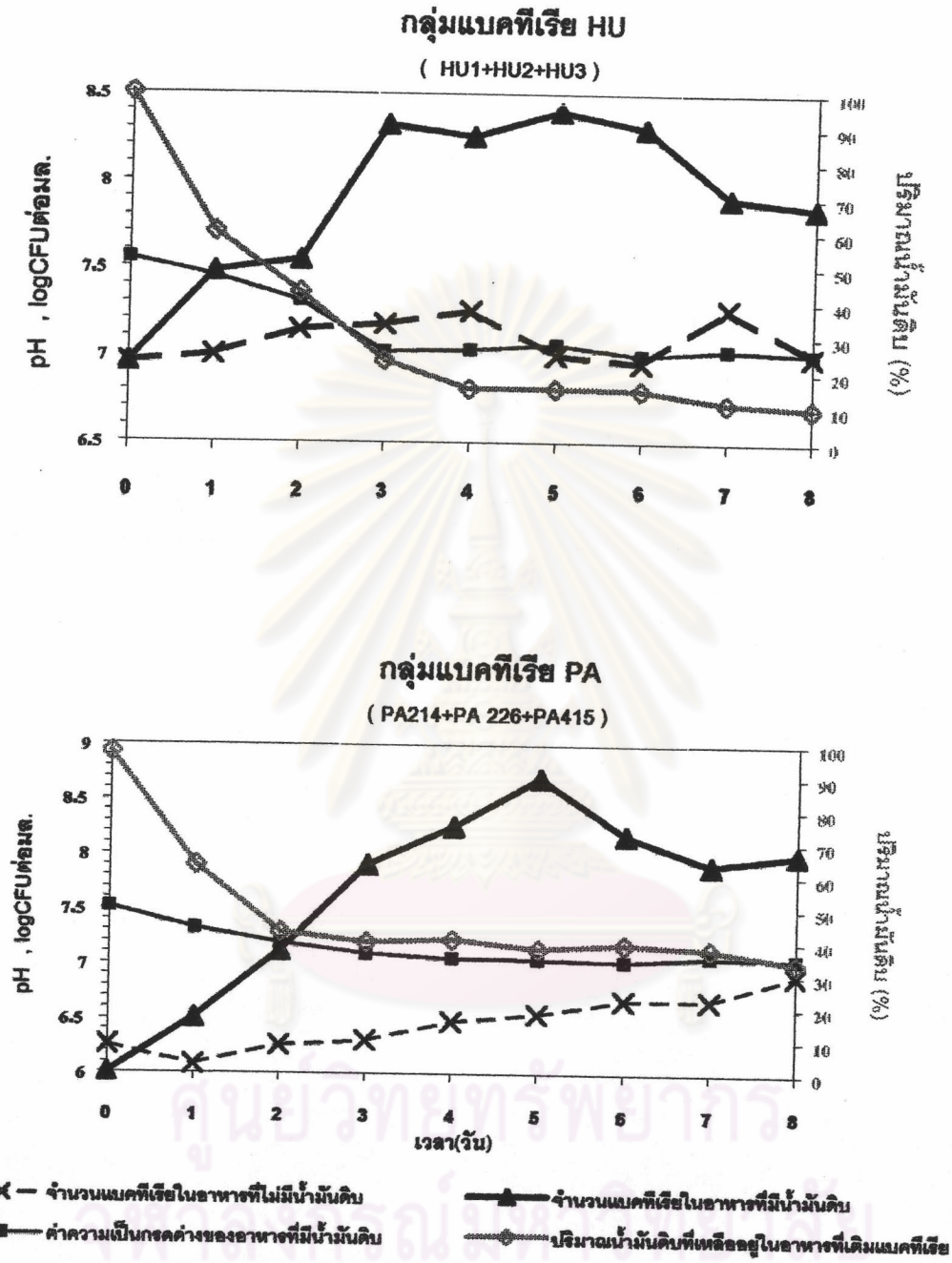
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



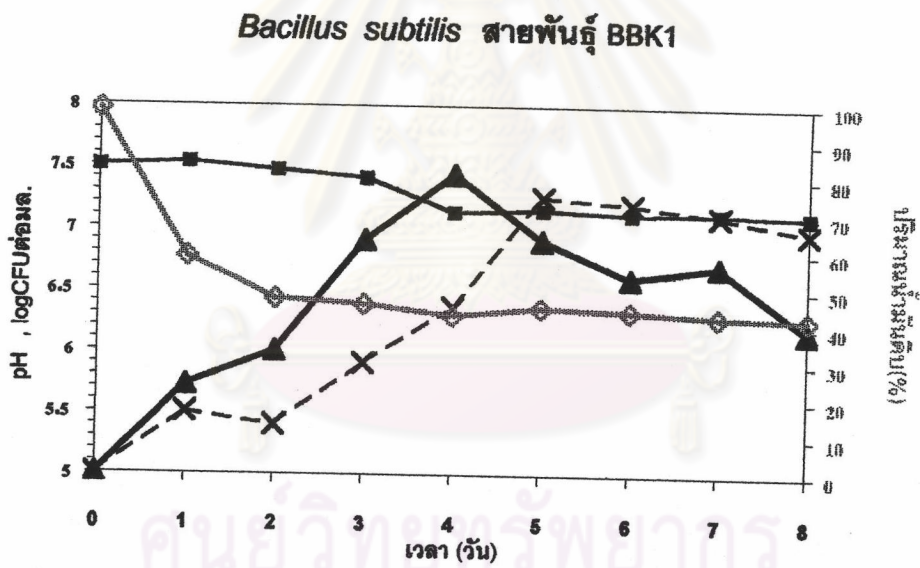
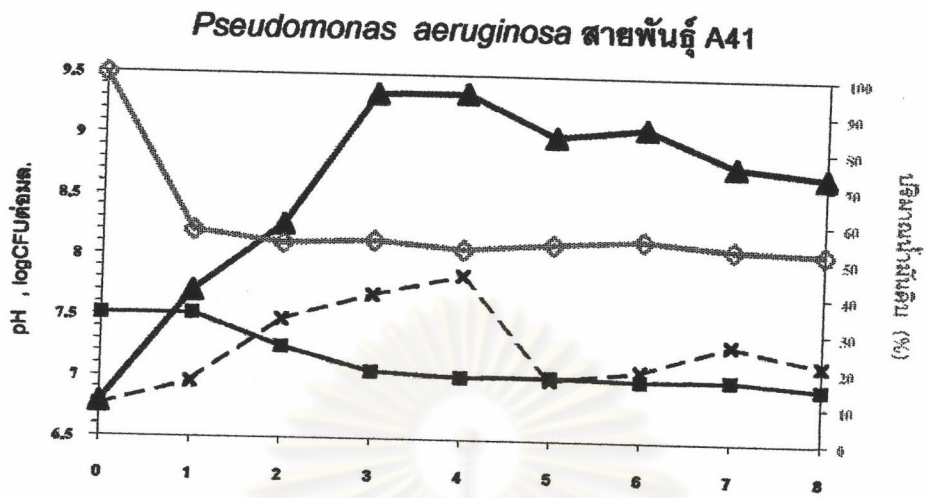
รูปที่ 4.5 การเจริญของไอโซเลต HU1, HU2 และ HU3 ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร



รูปที่ 4.6 การเจริญของไอโซเลต PA214, PA226 และ PA415 ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดย ปริมาตร

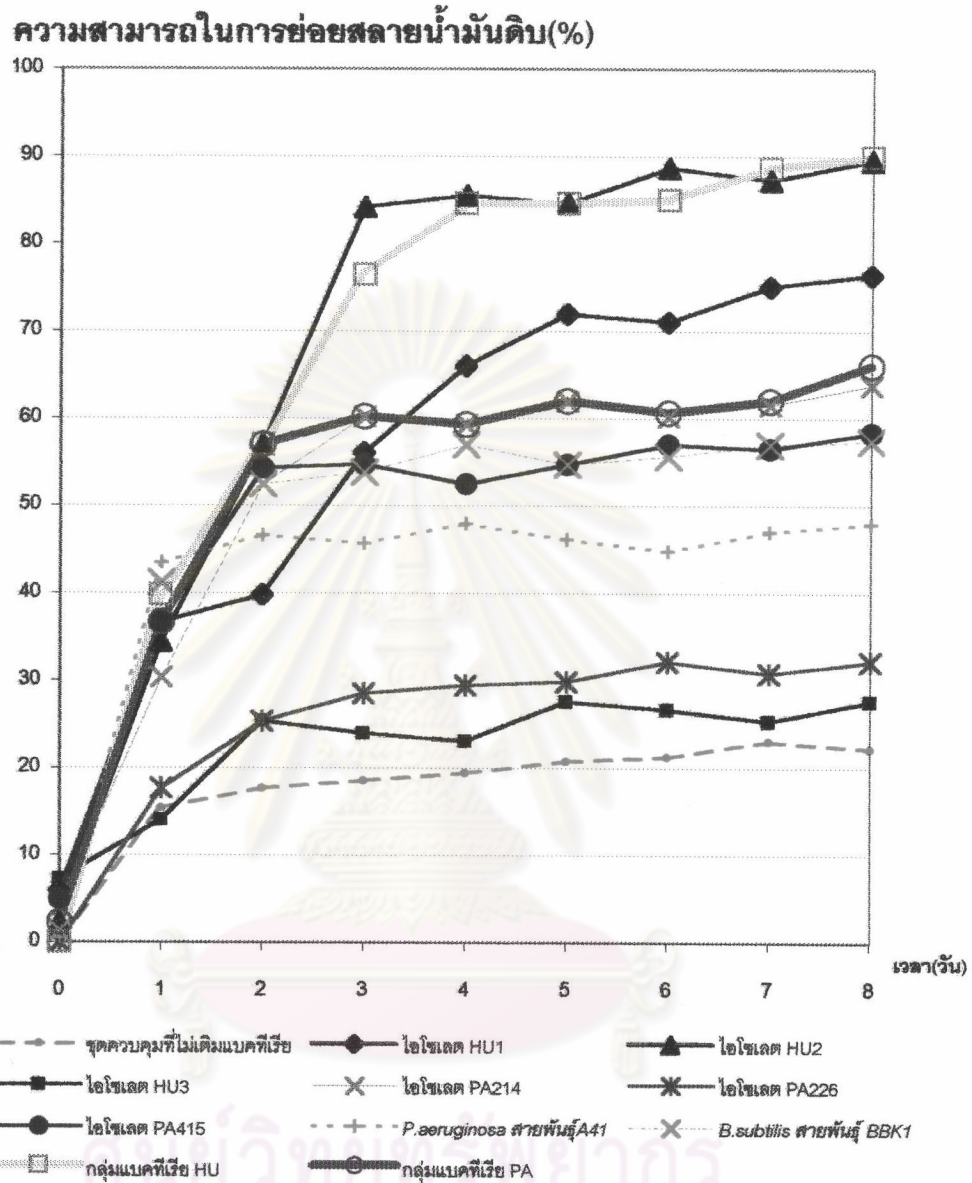


รูปที่ 4.7 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย HU และ กลุ่มแบคทีเรีย PA ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดย ปริมาตร



- X - จำนวนแบคทีเรียในอาหารที่ไม่มีน้ำมันดิบ
- ■ - ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารที่มีน้ำมันดิบ
- ▲ - จำนวนแบคทีเรียในอาหารที่มีน้ำมันดิบ
- ◆ - ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในอาหารที่เดิมแบคทีเรีย

รูปที่ 4.8 การเจริญของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดย ปริมาตร

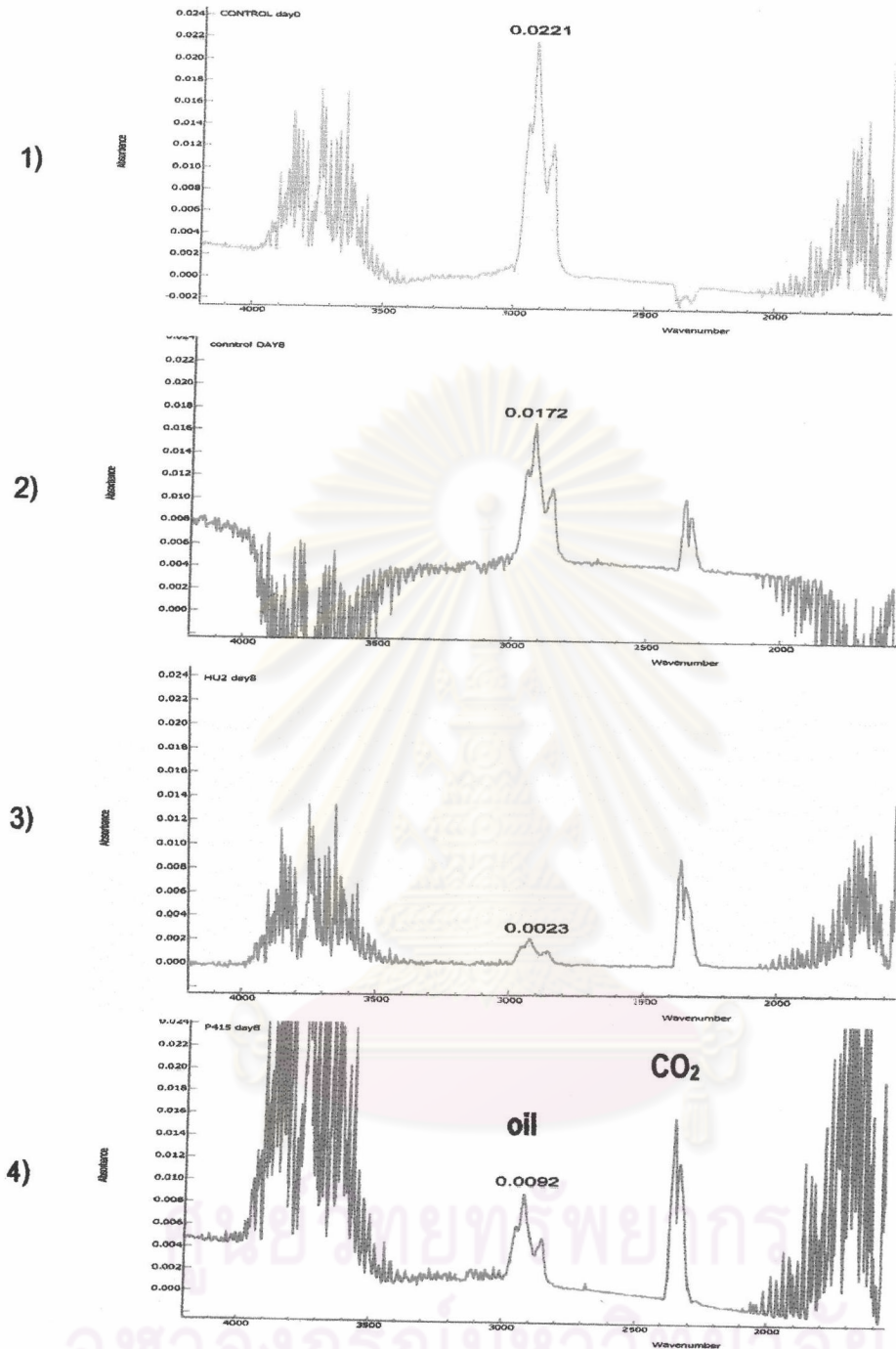


รูปที่ 4.9 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของไอโซเลต และกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตรเป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว และชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ จากการย่อยสลายโดยไฮโดรไลซิสที่คัดแยกได้ โดยใช้ FTIR (รูปที่ 4.10) พบว่า อินฟราเรดสเปกตรัมของอัลเคน ที่ช่วงคลื่น 2,936-2,843 ซม.⁻¹ ในวันที่ 0 จะมีพีคสูงสุด (รูปที่ 4.10 หมายเลข 1) และพีคจะเริ่มต่ำลงมาในวันที่ 2 เนื่องจากน้ำมันดิบเกิดการย่อยสลาย และจะมีพีคของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ช่วงคลื่น 2,400-2,300 ซม.⁻¹ เกิดขึ้น (รูปที่ 4.10 หมายเลข 2) ผลของเจริญของไฮโดรไลซิสจะเกิดการย่อยสลายน้ำมันดิบ ทำให้พีคของอัลเคนเริ่มต่ำลง และเกิดพีคของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.10 หมายเลข 3 และ 4

ผลการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของแต่ละไฮโดรไลซิสในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตรและเติมฟีนอลเรด พบว่า ผลของการเจริญและย่อยสลายน้ำมันดิบของไฮโดรไลซิส HU1, HU2, HU3, PA214, PA226, PA415 , กลุ่มแบคทีเรีย HU, กลุ่มแบคทีเรีย PA, แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 นั้นทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นเปลี่ยนจากสีแดง (pH 7.5) เป็นสีส้ม (pH 7.2-6.9) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรียอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในรูปที่ 4.11 และ 4.12 แสดงให้เห็นว่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบไปเป็นกรดอินทรีย์ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง และให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับผลการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เวลา 0-8 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 แสดงผลอินฟราเรดสเปกตรัม ของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น จากการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย

- 1) ชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย ที่เวลา 0 วัน
- 2) ชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย ที่เวลา 8 วัน
- 3) การเจริญของไฮโซเลต HU2 ที่เวลา 8 วัน
- 4) การเจริญของไฮโซเลต PA 415 ที่เวลา 8 วัน



รูปที่ 4.11 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลว BH sea ที่มีพินอคอร์ต และเติม น้ำมันดิบ จากการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ที่เวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับ ชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย และแบคทีเรีย ที่สร้างสารลดแรงตึงผิว

หลอดที่ 1 ไม่มีแบคทีเรีย (ชุดควบคุม)

หลอดที่ 2 มีไอโซเลต HU 1

หลอดที่ 3 มีไอโซเลต HU 2

หลอดที่ 4 มีไอโซเลต HU 3

หลอดที่ 5 มีกลุ่มแบคทีเรีย HU

หลอดที่ 6 มีไอโซเลต PA 214

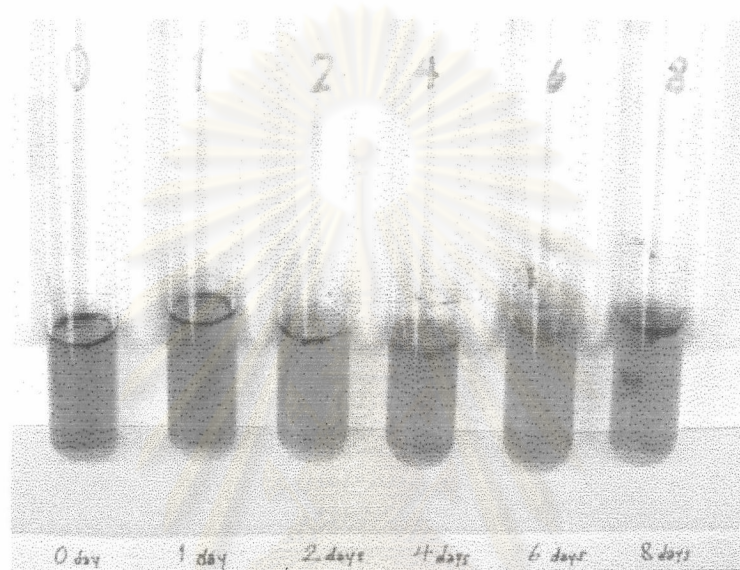
หลอดที่ 7 มีไอโซเลต PA 226

หลอดที่ 8 มีไอโซเลต PA 415

หลอดที่ 9 มีกลุ่มแบคทีเรีย PA

หลอดที่ 10 มีแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ A41

หลอดที่ 11 มีแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK1



รูปที่ 4.12 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลว BH sea ที่มีฟินอลเรด และเติม น้ำมันดิบ จากการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียไฮโซเลต HU 2 ที่เวลา 0,2,4,6 และ 8 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลการจำแนกทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

4.4.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) ของไอโซเลต HU2

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไอโซเลต HU2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมัน คัดแยกได้จากบริเวณชายหาดหัวหิน การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอแล้วเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ให้ได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอไทด์ ประมาณ 1,400-15,00 bp แล้วจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (จากผลวิเคราะห์ของหน่วยบริการชีวภาพ) ด้วยโปรแกรม DNASIS นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ 1,425 bp (รูปที่ 4.13) เปรียบเทียบกับ Gene Bank ด้วยโปรแกรม Blast N ของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ดังแสดงในรูปที่ 4.14

จากรูปที่ 4.14 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไอโซเลต HU2 มีความคล้ายคลึงกับ 16S rDNA ของ *Brevundimonas vesicularis* สายพันธุ์ LMG 2350 โดยเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,383 เบส จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,392 เบส ซึ่งจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมือนกันอยู่ 9 ตำแหน่ง ซึ่งรวมการเพิ่มช่วงว่าง (gap) อีก 4 แห่ง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง 99.3% ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไอโซเลต HU2 ได้นำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของแบคทีเรียสกุล *Brevundimonas* สายพันธุ์ต่างๆ ใน Gene Bank ซึ่งพบว่ามีความคล้ายคลึงกันหลายสายพันธุ์โดยมีความคล้ายคลึงกัน 99.0-99.3% ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

AAATAGAGAGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAC
 TCTTCGGAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTGCCCTTT 100
 AGGTTCGGAATAACTCAGGGAACTTGAGCTAATACCGGATGTGCCCTTC
 GGGGAAAGATTTATCGCCTTTAGAGCGGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTT 200
 GGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGA
 TGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCA 300
 GCAGTGGGGAATCTTGC GCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCCATGCCGC
 GTGAATGATGAAGGTCTTAGGATTGTAAAATCTTTTCAACGGGGACGATA 400
 ATGACGGTACCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGA 500
 GCGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGG
 AATTGCCTTTGATACTGGGTGTCCTGAGTATGAGAGAGGTGTGTGGAAC 600
 CCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGAAGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGACACACTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCTCAAAGCGTGGGGAGC 700
 AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTGCTAG
 TTGTGCGGGATGCATGCATTTTCGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCAATCC 800
 GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGC
 CCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGCAGAACC 900
 TTACCACCTTTTGACATGCCCGGACCGCCAGAGAGATCTGGCTTTCCCTT
 CGGGGACTGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGA 1000
 GATGTTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTCGCCATTAGTTGCCA
 TCATTTAGTTGGGAACTCTAATGGGACTGCCGGTGCTAAGCCGGAGGAAG 1100
 GTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACAGGGTGGGCTACACACG
 TGCTACAATGGCGACTACAGAGGGTTAATCCTTAAAAGTCGTCTCAGTTC 1200
 GGATTGTCCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCG
 CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGCACACACCGCC 1300
 CGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACCCGAAGGCGCTGCGCTGACCGACA
 AGGAGGCACGGCGACCACGGTAGGGTCAGCGACATGGGGTGAAGTCGTAA 1400
 TACAGTACACACTAGGGACCCTCGT

รูปที่ 4.13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,425 bp ของ 16S rDNA ของไอโซเลต
 HU2 เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS

รูปที่ 4.14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไอโซเลต HU2 เปรียบเทียบกับ ข้อมูลและเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Brevundimonas vesicularis* สายพันธุ์ LMG 2350 ที่มีอยู่ใน Gene Bank ด้วยโปรแกรม BlastN

>gi|4127599|emb|AJ227780.1|BVJ227780 *Brevundimonas vesicularis* DNA for 16S ribosomal RNA, strain LMG 2350

Length = 1416

Score = 2656 bits (1340), Expect = 0.0

Identities = 1383/1392 (99.3%), Gaps = 4/1392 (0%)

Strand = Plus / Plus

```

Isolate HU2:      9  gaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacgaactcttcggagttagtgccgg 68
   |||
B.vesicularis:   4  gaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacgaactcttcggagttagtgccgg 63

Isolate HU2:      69  acgggtgagtaaacagtgaggacgtgcctttaggttcggaataactcagggaaacttgag 128
   |||
B.vesicularis:   64  acgggtgagtaaacagtgaggacgtgcctttaggttcggaataactcagggaaacttgag 123

Isolate HU2:      129 ctaataccggatgtgccttcgggggaaagattatcgctttagagcggcccgctctg 188
   |||
B.vesicularis:   124 ctaataccgaatgtgccttcgggggaaagattatcgctttagagcggcccgctctg 183

Isolate HU2:      189 attagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgatcagtagctggtctgagagg 248
   |||
B.vesicularis:   184 attagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgatcagtagctggtctgagagg 243

Isolate HU2:      249 atgatcagccacattgggactgagacacggcccaactcctacgggaggcagcagtgagg 308
   |||
B.vesicularis:   244 atgatcagccacattgggactgagacacggcccaactcctacgggaggcagcagtgagg 303

Isolate HU2:      309 aatcttgcgcaatggggcgaagcctgacgcagccatgcccgtgaatgatgaaggtctta 368
   |||
B.vesicularis:   304 aatcttgcgcaatggggcgaagcctgacgcagccatgcccgtgaatgatgaaggtctta 363

Isolate HU2:      369 ggattgtaaaattctttaccggggacgataatgacgggtaccgggagaagaagccccggc 428
   |||
B.vesicularis:   364 ggattgtaaaattctttaccggggacgataatgacgggtaccgggagaagaagccccggc 423

Isolate HU2:      429 taacttcgtgccagcagccggttaatacgaaggggctagcgttgctcgggaattactgg 488
   |||
B.vesicularis:   424 taacttcgtgccagcagccggttaatacgaaggggctagcgttgctcgggaattactgg 483

Isolate HU2:      489 gcgtaaagggagcgttagcggacatttaagtcaggggtgaaatccccggggtcaacctcg 548
   |||
B.vesicularis:   484 gcgtaaagggagcgttagcggacatttaagtcaggggtgaaatccccggggtcaacctcg 543

Isolate HU2:      549 gaattgcctttgatactgggtgtccttgagtatgagagaggtgtgtggaactccgagtgt 608
   |||
B.vesicularis:   544 gaattgcctttgatactgggtgtccttgagtatgagagaggtgtgtggaactccgagtgt 603

Isolate HU2:      609 gaggtgaaattcgtagatattcggaagaacaccagtgggcgaaggcgacacactggctcat 668
   |||
B.vesicularis:   604 gaggtgaaattcgtagatattcggaagaacaccagtgggcgaaggcgacacactggctcat 663

```

Isolate HU2: 669 tactgacgctgaggctc-aagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtcca 727
 |||
B. vesicularis: 664 tactgacgctgaggctcGaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtcca 723

Isolate HU2: 728 cgccgtaaacgatgattgctagtgtgcgggatgcatgcatttcggtgacgcagctaaccg 787
 |||
B. vesicularis: 724 cgccgtaaacgatgattgctagtgtgcgggatgcatgcatttcggtgacgcagctaaccg 783

Isolate HU2: 788 attaagcaatccgcctggggagtacggtcgcaagattaaaactcaaaggaattgacgggg 847
 |||
B. vesicularis: 784 attaagcaatccgcctggggagtacggtcgcaagattaaaactcaaaggaattgacgggg 843

Isolate HU2: 848 gcccgacacaagcgggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgacagcaaccttaccacc 907
 |||
B. vesicularis: 844 gcccgacacaagcgggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgacagcaaccttaccacc 903

Isolate HU2: 908 ttttgacatgccGggaccgccagagagatctggcttcccttcggggactgggacacagg 967
 |||
B. vesicularis: 904 ttttgacatgccTggaccgccagagagatctggcttcccttcggggactaggacacagg 963

Isolate HU2: 968 tgctgcatggctgctgcagctcgtgctgagatggtgggtaagtcccgaacgagcg 1027
 |||
B. vesicularis: 964 tgctgcatggctgctgcagctcgtgctgagatggtgggtaagtcccgaacgagcg 1023

Isolate HU2: 1028 caaccctcgccattagtggccatcatttagttgggaactctaattgggactgccgggtgcta 1087
 |||
B. vesicularis: 1024 caaccctcgccattagtggccatcatttagttgggaactctaattgggactgccgggtgcta 1083

Isolate HU2: 1088 agccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcctcatggcccttacaggggtggctacaca 1147
 |||
B. vesicularis: 1084 agccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcctcatggcccttacaggggtggctacaca 1143

Isolate HU2: 1148 cgtgctacaatggcgactacagagggttaatccttaaagtcgtctcagttcggattgtc 1207
 |||
B. vesicularis: 1144 cgtgctacaatggcgactacagagggttaatccttaaagtcgtctcagttcggattgtc 1203

Isolate HU2: 1208 ctctgcaactcgagggcatgaagttggaatcgctagtaatcgcgatcagcatgcccgcg 1267
 |||
B. vesicularis: 1204 ctctgcaactcgagggcatgaagttggaatcgctagtaatcgcgatcagcatgcccgcg 1263

Isolate HU2: 1268 tgaatacgttcccgggccttgCacacaccgccgtcacaccatgggagttggttctacc 1327
 |||
B. vesicularis: 1264 tgaatacgttcccgggccttgTcacacaccgccgtcacaccatgggagttggttctacc 1323

Isolate HU2: 1328 gaaggcgtgcgctgaccgAcaaggaggcaCggcgaccacggtagggtcagcgacatggg 1387
 |||
B. vesicularis: 1324 gaaggcgtgcgctgaccg-caaggaggca-ggcgaccacggtagggtcagcgac-tggg 1380

Isolate HU2: 1388 gtgaagtcgtaa 1399
 |||
B. vesicularis: 1381 gtgaagtcgtaa 1392

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไฮโซเลต HU2 (1,425 bp) และสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีอยู่ใน GeneBank ด้วยโปรแกรม BlastN

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ขนาดของ 16S rDNA (bp)	ความคล้ายคลึง (% Homology)	เอกสารอ้างอิง
<i>Brevundimonas vesicularis</i> LMG 2350	1,416	99.3	Abraham และคณะ 1999
<i>Brevundimonas</i> sp. V4 .BO .07	1,416	99.3	Abraham และคณะ 1999
<i>Brevundimonas</i> sp. V4 .BO .05	1,415	99.3	Fritz และคณะ 2005
<i>Brevundimonas nasdae</i>	1,427	99.2	Li และคณะ 2004
<i>Brevundimonas intermedia</i> ATCC15262	1,416	99.1	Abraham และคณะ 1999
<i>Brevundimonas</i> sp. LMG 9567t1	1,416	99.0	Fritz และคณะ 2005

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไฮโซเลต HU2 ดังกล่าวนี้จึงจัดจำแนกไฮโซเลตนี้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Brevundimonas* และตั้งชื่อไฮโซเลต HU2 นี้ว่า *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2

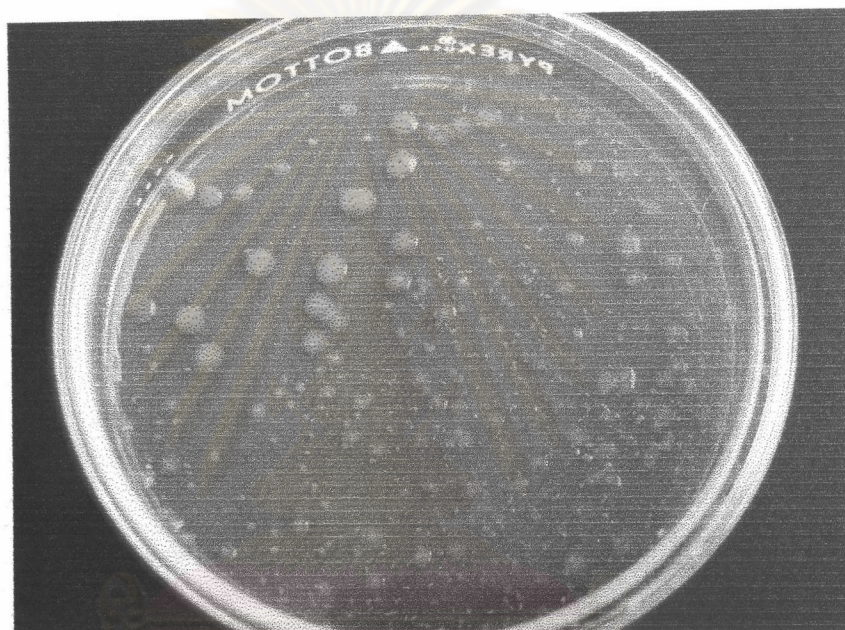
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมีของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 บนอาหารแข็ง NA sea พบว่า โคโลนีมีสีเหลืองเข้ม ขอบเรียบ เป็นมันเยิ้ม (รูปที่ 4.15) เมื่อศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าลักษณะเป็นท่อนสั้น ดิดสิแกรมลบ (รูปที่ 4.16) และทำการศึกษากายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 15,000 เท่า พบว่า มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง ลักษณะค่อนข้างผอม ปลายมน พื้นผิวเซลล์ค่อนข้างเรียบ มีขนาดประมาณ 1.5 ไมครอน (รูปที่ 4.17)

เมื่อตรวจสอบสมบัติทางสรีรวิทยาของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU 2 พบว่า สามารถเจริญได้ในที่มีเกลือ 0-10% ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.5-12.0 และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-40°C. ไม่สามารถเคลื่อนที่ ไม่เจริญบนอาหาร MacConkey และ TSI ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส คะตะเลส ยูรีเอส ดีอะมิเนส แต่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส และอินโดล สามารถย่อยสลายกลูโคสในที่มีและไม่ออกซิเจนได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ผลการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน พบว่า สามารถใช้ โดเดกเคน เฮกซะเดกเคน พาราฟินออย น้ำมันดิบ น้ำมันดีเซล น้ำมันเครื่อง น้ำมันก๊าด และน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ไม่สามารถใช้ เฮกเซน ไโซโคลเฮกเซน แอนทราซีน เบนโซ [เอ]ไพรีน CTAB SDS ไตรตคอนท์เร็กซ์-100 สารเคมีกำจัดความเน่ามัน คอมเทค 307 แรมโนลิพิด และเซอร์แฟคติน ดังแสดงในตารางที่ 4.6 นอกจากนี้เมื่อทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ 95 ชนิด ด้วยชุดพิลูจาร์แบคทีเรีย Biolog GN2 Microplate พบว่าสามารถใช้ น้ำตาลและคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด กรดอินทรีย์ 19 ชนิด กรดอะมิโนและอนุพันธ์ 20 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4.7



รูปที่ 4.15 ลักษณะโคโลนีของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 บนอาหารแข็ง NA sea ที่เวลา 7 วัน โดยวิธี pour plate

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.16 ลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมลบ ของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 4.17 ลักษณะโครงสร้างภายนอก ขนาด รูปร่าง และลักษณะพื้นผิวของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 15,000 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2

ลักษณะที่ศึกษา	ผลการ ศึกษา	ลักษณะที่ศึกษา	ผลการ ศึกษา
การเจริญในที่ที่มีเกลือ 0 %	+	การเจริญบนอาหาร MacConkey agar	-
0.5 %	+	การเจริญบนอาหาร Blood Agar	+, γ
1 %	+	การเจริญบนอาหาร Triple Sugar Iron (TSI)	K/N
1.5 %	+	การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase)	-
3 %	+	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase)	-
5 %	+	การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urease)	-
10 %	+	การสร้างเอนไซม์ดีอะมิเนส (Deaminase)	-
การเจริญที่ pH 5.0	-	การสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase)	+
pH 7.5	+	การย่อยสลายเอสคิวลิน (Esculin Hydrolysis)	-
pH 9.0	+	การสร้างอินโดล (Indole production)	+
pH 12.0	+	การทดสอบเมทิลเรด (Methyl Red (MR) test)	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 10 ^o ซ.	-	การทดสอบวี-พี (Voges-Proskaver (VP) test)	-
20 ^o ซ.	+	การใช้ซิเตรท (Citrate utilization)	-
30 ^o ซ.	+	การเคลื่อนที่ (Motility)	-
40 ^o ซ.	+	การย่อยสลายกลูโคสใน ที่มี / ไม่มีออกซิเจน และใน	+/+
55 ^o ซ.	-	ภาชนะน้ำทะเล (Modified-Oxidative/Fermentative (MOF) of glucose)	

- หมายเหตุ + เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยา (Positive)
 - ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยา (Negative)
 γ ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Non-hemolysis)
 K/N ไม่เกิดกรด / ไม่เกิดแก๊ส

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบการใช้ไฮโดรคาร์บอน น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว ชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2

แหล่งคาร์บอน	ผลการศึกษา
ไฮโดรคาร์บอน	
เฮกเซน (Hexane) (C ₆ H ₁₄)	-
ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane) (C ₆ H ₁₂)	-
โดเดเคน (Dodecane) (C ₁₂ H ₂₆)	+
เฮกซะเดเคน (Hexadecane) (C ₁₆ H ₃₄)	+
แอนทราซีน (Anthracene) (C ₁₄ H ₁₀)	-
ไดเบนโซ [เอ] ไพรีน (Dibenzo[a] pyrene) (C ₂₄ H ₁₄)	-
น้ำมัน	
พาราฟินออย (Paraffin oil)	+
น้ำมันดิบ (Murban crude-oil)	+
น้ำมันดีเซล (Diesel)	+
น้ำมันเครื่องใช้แล้ว (Engine oil)	+
น้ำมันก๊าด หรือคีโรซีน (Kerosene)	+
น้ำมันปาล์ม (Palm oil)	+
สารลดแรงตึงผิว	
CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)	-
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	-
ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton x-100)	-
เคมีเทค 307 (Chemtec 307 Dispersant)	-
แรมโนลิพิด (Rhamnolipid)	-
เซอร์แฟคติน (Surfactin)	-

หมายเหตุ + สามารถใช้ได้ (Positive),
- ไม่สามารถใช้ได้ (Negative)

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนจำนวน 95 ชนิด เป็นแหล่งพลังงานของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 โดยใช้ชุดพิสูจน์แบคทีเรีย GN2 Microplate

แหล่งคาร์บอน	ผลการ ศึกษา	แหล่งคาร์บอน	ผลการ ศึกษา	แหล่งคาร์บอน	ผลการ ศึกษา
L-Arabinose	+	Acetic Acid	+	L-Asparagine	+
D-Arabitol	-	Cis-Aconitic Acid	+	L-Aspartic Acid	+
Adonitol	-	Citric Acid	+	L-Glutamic Acid	+
D-Cellulobiose	-	Formic Acid	-	Glycyl-L-Aspartic Acid	+
D-Erythritol	-	D-Galactonic Acid Lactone	+	Glycyl-L-Glutamic Acid	+
D-Fructose	-	D-Galacturonic Acid	-	L-Histidine	+
L-Fucose	-	D-Gluconic Acid	+	Hydroxy-L-Proline	-
D-Galactose	-	D-Glucosaminic Acid	-	L-Leucine	+
Gentiobiose	-	D-Glucuronic Acid	-	L-Ornithine	+
α -D-Glucose	+	α -Hydroxy Butyric Acid	-	L-Phenylalanine	+
m-Inositol	-	β -Hydroxy Butyric Acid	+	L-Proline	+
α -D-Lactose	-	γ -Hydroxy Butyric Acid	+	L-Pyrogutamic Acid	+
Lactulose	-	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	+	D-Serine	+
Maltose	+	Itaconic Acid	+	L-Serine	+
D-Mannitol	-	α -Keto Butyric Acid	-	L-Threonine	-
D-Mannose	-	α -Keto Glutaric Acid	+	D,L-Camitine	-
D-Melibiose	-	α -Keto Valeric Acid	-	γ -Amino Butyric Acid	+
D-Psicose	-	D,L-Lactic Acid	+	Urocanic Acid	+
D-Raffinose	-	Melonic Acid	-	Inosine	-
L-Rhamnose	-	Propionic Acid	+	Uridine	-
D-Sorbitol	-	Quinic Acid	-	Thymidine	-
Sucrose	-	D-Saccharic Acid	+	Phenylethylamine	+
D-Trehalose	-	Sebacic Acid	+	Putrescine	-
Turanose	-	Succinic Acid	+	2-Aminoethanol	-
Xylitol	-	Bromo Succinic Acid	+	2,3-Butanediol	-
α -Cyclodextrin	-	Succinamic Acid	+	Glycerol	-
Dextrin	-	Methyl Pyruvate	+	D,L- α -Glycerol Phosphate	-
Glycogen	-	Mono-Methyl -Succinate	+	Glucose-1-Phosphate	-
Tween 40	+	Glucuronamide	-	Glucose-6-Phosphate	-
Tween 80	+	L-Alaninamide	+		
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	D-Alanine	+		
N-Acetyl-D-Glucosamine	-	L-Alanine	+		
β -Methyl-D-Glucoside	-	L-Alanyl-Glycine	+		

หมายเหตุ + สามารถใช้ได้ (Positive), - ไม่สามารถใช้ได้ (Negative)

4.5 ผลการศึกษาสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการวิจัย

4.5.1 ผลการผลิตและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

ผลการผลิตและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิพิด โดย *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ตามวิธีของนอร์ตัน (2545) พบว่า ปริมาณที่ผลิตได้ 1.775 กรัมต่อลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ มีค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ 29.8 mN/m และค่าแรงตึงผิวของแรมโนลิพิดกึ่งบริสุทธิ์ 30.0 mN/m

เซอร์แฟคติน ผลิตโดย *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ตามวิธีของนิรันดร์ (2542) พบว่า ปริมาณที่ผลิตได้ 1.194 กรัมต่อลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ มีค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ 29.0 mN/m และค่าแรงตึงผิวของเซอร์แฟคตินกึ่งบริสุทธิ์ 29.5 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

สมบัติของสาร	แรมโนลิพิด (Rhamnolipid)	เซอร์แฟคติน (Surfactin)
1. ปริมาณที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร) (น้ำหนักสารต่อปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อ)	1.775	1.194
2. ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ (mN/m)	29.8	29.0
3. ค่าแรงตึงผิวของสารกึ่งบริสุทธิ์ (mN/m)	30.0	29.5

4.5.2 ผลของการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารเคมีขจัดคราบน้ำมันเคมเทศ

307

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารเคมีขจัดคราบน้ำมันเคมเทศ 307 ด้วยเครื่อง FTIR พบอินฟราเรดสเปกตรัมที่เด่น 6 พีค ดังแสดงในรูปที่ 4.18 ก และ ข

- พีคที่ 1 ช่วง 3,000-2,840 cm^{-1} เป็น C-H symmetric stretching ของ alkane
 พีคที่ 2 ช่วง 1,770-1,650 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของ ester
 พีคที่ 3 ช่วง 1,500-1,430 cm^{-1} เป็น CH_2 methylene group ของ alkane
 พีคที่ 4 ช่วง 1,380-1,350 cm^{-1} เป็น C-H asymmetric stretching ของ alkane
 พีคที่ 5 ช่วง 1,200-1,000 cm^{-1} เป็น O=S=O stretching ของ sulphonate (R-SO_3^-)
 พีคที่ 6 ช่วง 700 – 650 cm^{-1} เป็น S-O stretching ของ sulphonate (R-SO_3^-)

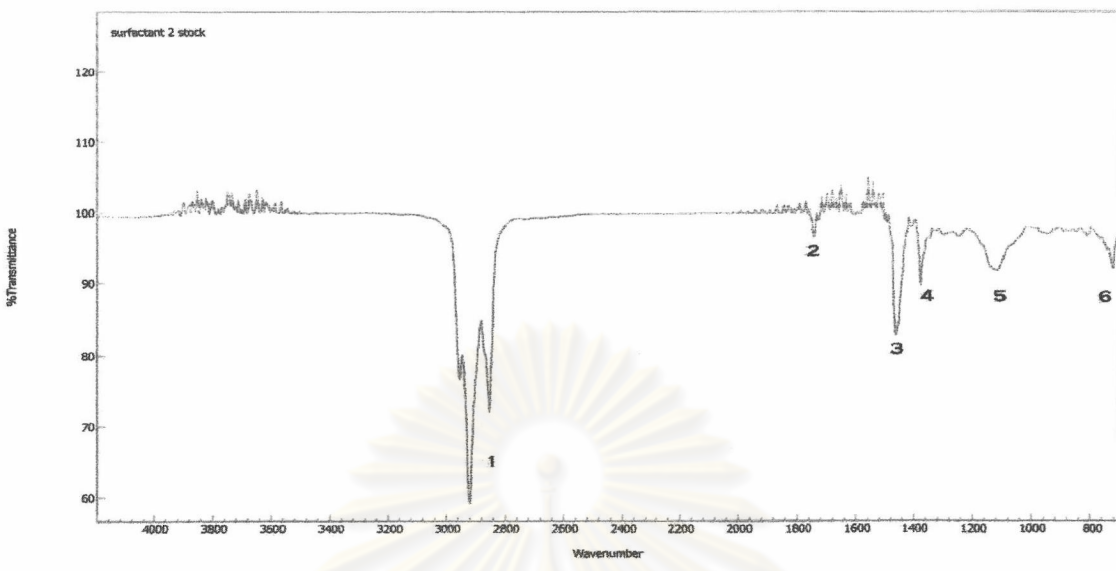
จากอินฟราเรดสเปกตรัมดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า สารเคมีขจัดคราบน้ำมันเคมเทศ 307 เป็นสารประกอบของ Alkyl Sulphonate Ester มีสูตรโครงสร้างเป็น $\text{R-(CHO)}_n\text{-SO}_3^-$ และเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ให้ประจุลบ (anionic surfactant)

เมื่อศึกษาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวอื่น ที่นำมาใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่า ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton X-100) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไร้ประจุ (non-ionic surfactant) เป็นสารประกอบกลุ่ม Ethoxylated Alkyl Phenol มีสูตรเคมีเป็น $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{C}_6\text{H}_4\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{H}$ และมีสูตรโครงสร้าง ดังแสดงในรูปที่ 4.19 หมายเลข 1

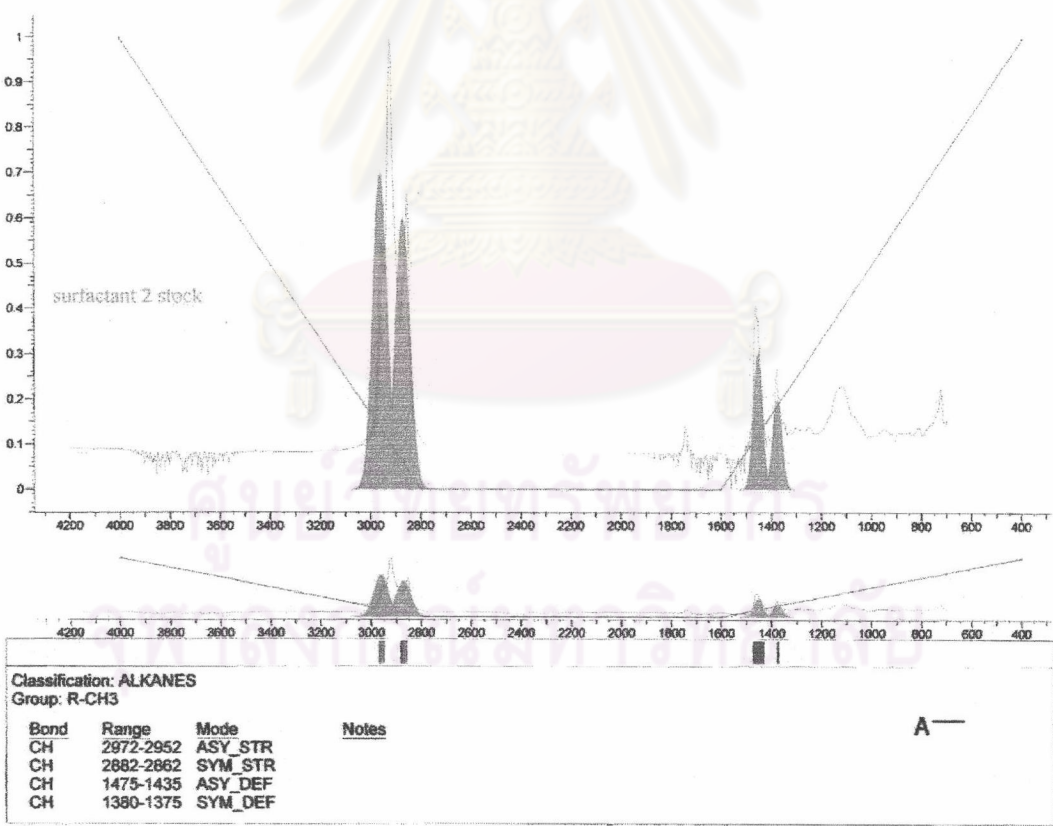
แรมโนลิพิด (Rhamnolipid) เป็นสารประกอบกลุ่มไกลโคลิพิด (Glycolipid) ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส (Rhamnose) และกรดไขมันแบบต้าไฮดรอกซี (β -hydroxy Fatty Acid) มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 4.19 หมายเลข 2

เซอร์แฟคติน (Surfactin) เป็นสารประกอบกลุ่มไลโปเพปไทด์ (Lipopeptide) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ชนิด เชื่อมต่อกับกรดไขมันมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 4.19 หมายเลข 3

ก)



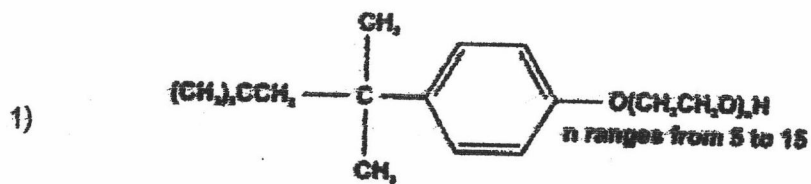
ข)



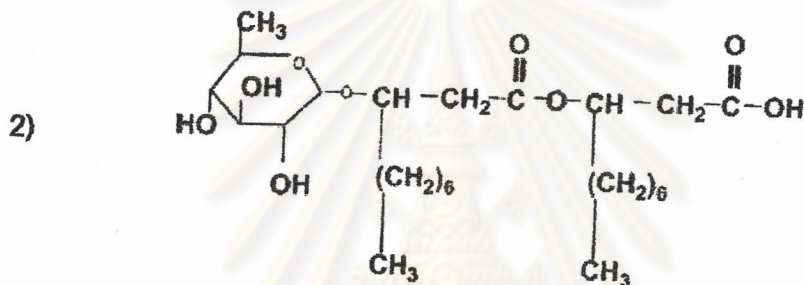
รูปที่ 4.18 แสดงผลอินฟราเรดสเปกตรัมของสารเคมีขจัดคราบน้ำมัน เคมีเทค 307

ก) แสดงผลเป็นค่า %Transmittance

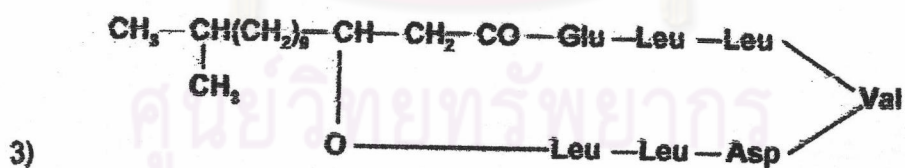
ข) แสดงผลเป็นค่า Absorbance



ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton X-100)



แรมโนลิพิด (Rhamnolipid)



เซอร์แฟคติน (Surfactin)

รูปที่ 4.19 แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการวิจัย

1) ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton X-100) (Edwards และคณะ, 2003)

2) แรมโนลิพิด (Rhamnolipid) (Thaniyavarn และคณะ, 2005)

3) เซอร์แฟคติน (Surfactin) (Roongsawang และคณะ, 2002)

4.5.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิวทั้ง 4 ชนิด ไตรตอนเอ็กซ์-100 เคมีเทค 307 แรมโนลิพิด และเซอร์แฟคติน นำไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) หาค่าจุดวิกฤติของความเข้มข้นในการเกิดไมเซลล์ (CMC; Critical Micelle Concentration) ดังแสดงในตารางที่ 4.9 รูปที่ 4.22 และ 4.23 และหาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement) ของสารลดแรงตึงผิวทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า

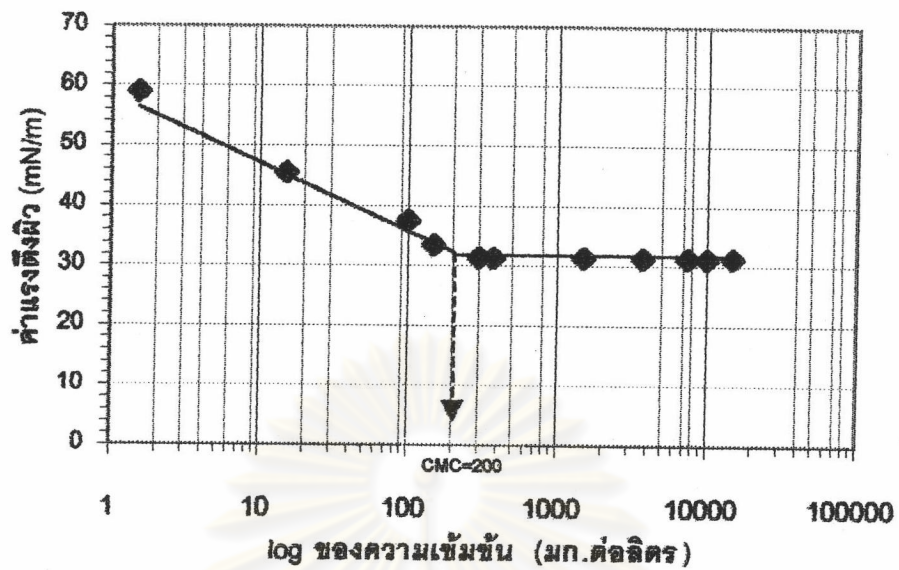
ไตรตอนเอ็กซ์-100 วัดค่าแรงตึงผิวได้ 31.3 mN/m ที่จุด CMC ซึ่งมีค่า 200 มก.ต่อลิตร
 เคมีเทค 307 วัดค่าแรงตึงผิวได้ 28.5 mN/m ที่จุด CMC ซึ่งมีค่า 2,500 มก.ต่อลิตร
 แรมโนลิพิด วัดค่าแรงตึงผิวได้ 30.0 mN/m ที่จุด CMC ซึ่งมีค่า 260 มก.ต่อลิตร
 เซอร์แฟคติน วัดค่าแรงตึงผิวได้ 29.5 mN/m ที่จุด CMC ซึ่งมีค่า 180 มก.ต่อลิตร

จากรูปที่ 4.24 ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 มก.ต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวทั้ง 4 ชนิด จะมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่ต่ำ ซึ่งต่ำกว่า 4 ตร.ซม. ที่ความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อลิตร สามารถวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันของไตรตอนเอ็กซ์-100 เซอร์แฟคติน แรมโนลิพิด และเคมีเทค 307 ได้มีค่า 28.3, 23.8, 7.1 และ 3.8 ตร.ซม. ตามลำดับ สารลดแรงตึงผิวทั้ง 4 ชนิดนี้ มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่เท่ากันที่ 78.6 ตร.ซม. ที่ความเข้มข้นของไตรตอนเอ็กซ์-100 3,750 มก.ต่อลิตร เซอร์แฟคติน 14,200 มก.ต่อลิตร แรมโนลิพิด 20,500 มก.ต่อลิตร และ เคมีเทค 307 ที่ความเข้มข้น 130,000 มก.ต่อลิตร

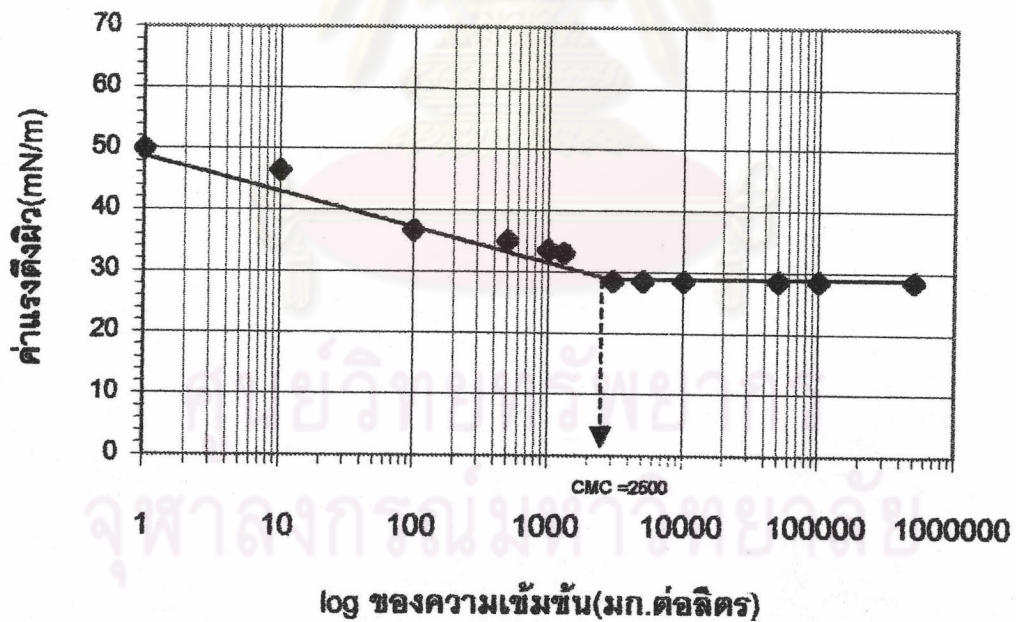
ตารางที่ 4.9 สรุปสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการวิจัย

สารลดแรงตึงผิว	โครงสร้างของสาร	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่า CMC (มก.ต่อลิตร)
ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton X-100)	Ethoxylated Alkyl Phenol	31.3	200
เคมีเทค 307 (Chemtec 307)	Alkyl Sulphonate Ester	28.5	2,500
แรมโนลิพิด (Rhamnolipid)	Glycolipid	30.0	260
เซอร์แฟคติน (Surfactin)	Lipopeptide	29.5	180

ไตรตอนเอ็กซ์-100



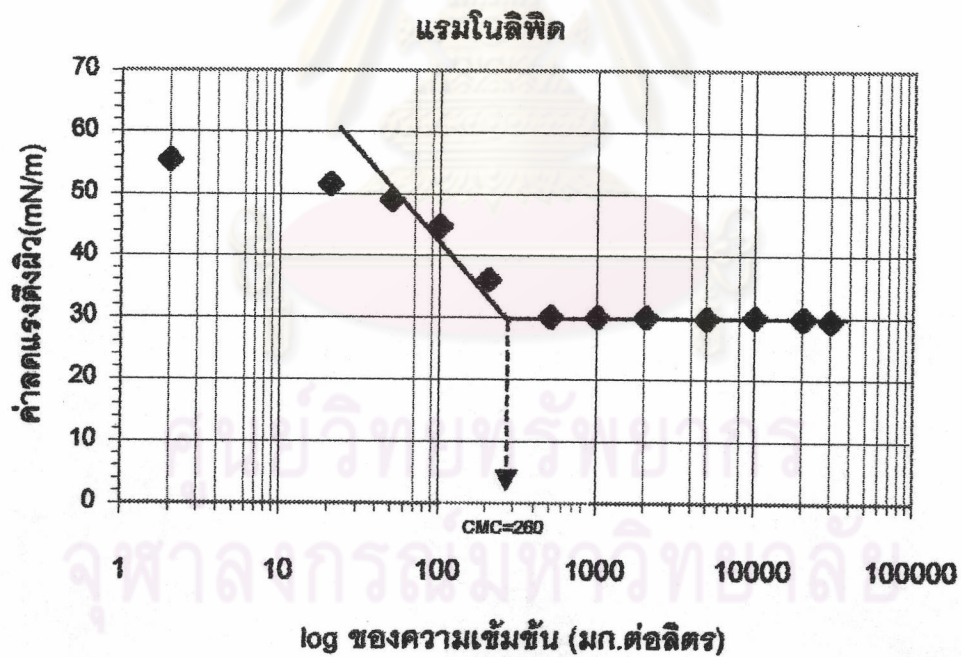
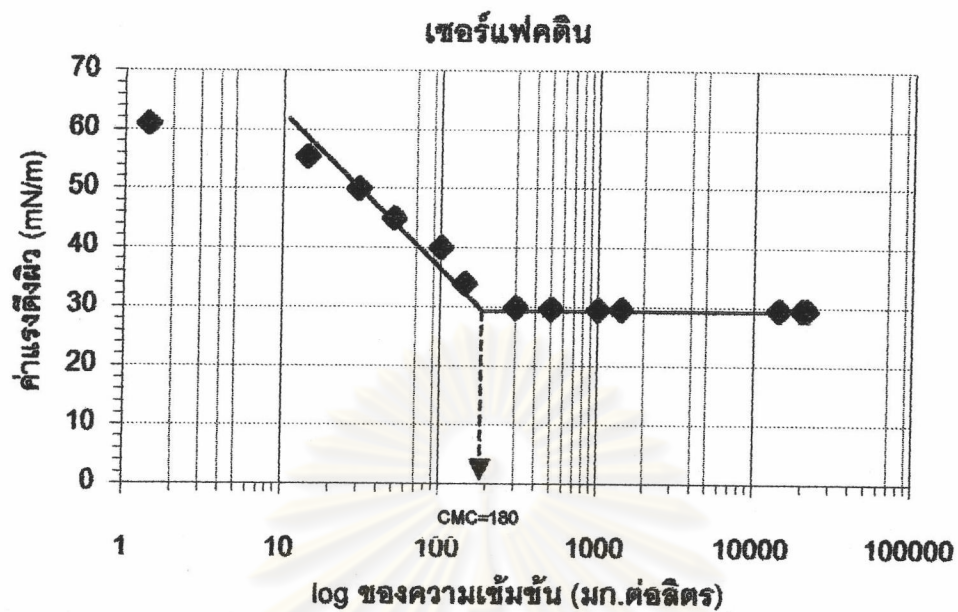
เคมีเทค 307



รูปที่ 4.20 แสดงค่า CMC ของสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์

ไตรตอนเอ็กซ์-100 มีค่า CMC 200 มก.ต่อลิตร

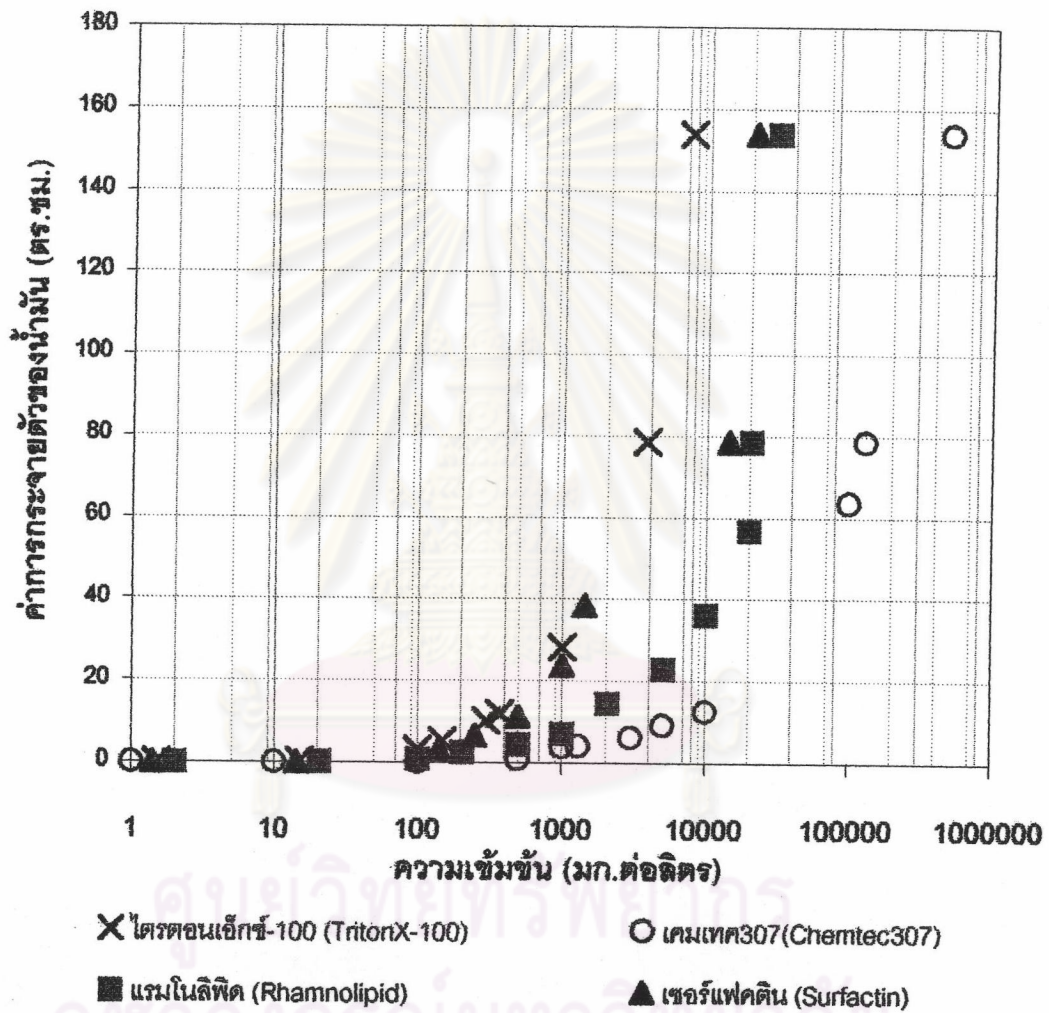
เคมีเทค 307 มีค่า CMC 2,500 มก.ต่อลิตร



รูปที่ 4.21 แสดงค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

เซอร์แฟคติน มีค่า CMC 180 มก.ต่อลิตร

แรมโนลิพิด มีค่า CMC 260 มก.ต่อลิตร



รูปที่ 4.22 แสดงค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement) ของสารลดแรงตึงผิว ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.6 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันโดย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2

4.6.1 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวที่ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่เท่ากัน ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่า CMC

จากการศึกษาผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน โดย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 ใช้ปริมาตรหัวเชื้อ 1 มล. (2 %) ในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 500 ไมโครลิตร (เข้มข้น 1% โดยปริมาตร) และทรายปลอดเชื้อ ที่ pH 7.5 เปรียบเทียบการเติมสารลดแรงตึงผิว 4 ชนิด ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นที่ทำให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่เท่ากัน ที่ 78.6 ตร.ซม. โดยใช้ความเข้มข้นดังนี้

ไตรตอนเอ็กซ์ 3,750 มก.ต่อลิตร (0.375%) เซอร์แฟคติน 14,200 มก.ต่อลิตร (1.42%)

แรมโนลิพิค 20,500 มก.ต่อลิตร (2.05%) และเคมเทค 307 ที่ 130,000 มก.ต่อลิตร (13%)

โดยเป็นค่าความเข้มข้นที่สูงกว่าค่า CMC นำมาเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 0-4 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.23 (ก-ง) และ รูปที่ 4.24 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเติมสารลดแรงตึงผิวแต่ไม่เติมแบคทีเรีย และชุดควบคุมซึ่งเติมแบคทีเรียแต่ไม่เติมสารลดแรงตึงผิว พบว่า

การเติมแรมโนลิพิค มีผลให้แบคทีเรียเจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว จากเริ่มต้น 3.75×10^6 CFU ต่อมล. เพิ่มขึ้นเป็น 2.5×10^7 CFU ต่อมล. ในวันที่ 1 โดยไม่มี lag phase หลังจากนั้นการเจริญจะหยุดและลดลง เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ พบว่าจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และไม่มีน้ำมันเหลืออยู่เลยในวันที่ 2 ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และเริ่มคงที่ในวันที่ 2 ในขณะที่ชุดควบคุมที่เติมแรมโนลิพิค แต่ไม่เติมเชื้อ ในวันที่ 2 และ 4 มีน้ำมันดิบเหลืออยู่ 72.40 และ 54.75 % ตามลำดับ และชุดควบคุมที่เติมแบคทีเรียอย่างเดียวในวันที่ 2 และ 4 ของการเลี้ยงเชื้อมีน้ำมันเหลืออยู่ 45.25 และ 15.84 % ตามลำดับ

การเติมเซอร์แฟคติน และ เคมเทค 307 ให้ผลเช่นเดียวกับแรมโนลิพิคคือ แบคทีเรียจะเจริญขึ้นและปริมาณน้ำมันดิบจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และไม่มีน้ำมันดิบเหลืออยู่ในวันที่ 2 ในขณะที่ชุดควบคุมที่เติมเซอร์แฟคติน ในวันที่ 2 และ 4 มีน้ำมันเหลืออยู่ 74.21 และ 56.56 % ตามลำดับ ส่วนการเติมเคมเทค 307 ในวันที่ 2 และ 4 มีน้ำมันเหลืออยู่ 70.13 และ 53.39 % ตามลำดับ

การเติมไตรตอนเอ็กซ์-100 ให้ผลการเจริญของแบคทีเรียและการย่อยสลายที่ช้ากว่า โดยเชื้อเริ่มต้น 3.1×10^6 CFU ต่อมล. แล้วค่อยๆเจริญจนวันที่ 2 มีจำนวนเชื้อสูงสุด 1.5×10^7 CFU ต่อมล. ขณะที่ปริมาณน้ำมันดิบจะลดลงจนตรวจไม่พบในวันที่ 3 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมไตรตอนเอ็กซ์ -100 ในวันที่ 3 และ 4 มีน้ำมันดิบเหลืออยู่ 67.87 และ 61.09 % ตามลำดับ

4.6.2 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC

เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นเท่ากับ CMC โดยใช้ความเข้มข้นของ ไตรตอนเอ็กซ์-100 200 มก.ต่อลิตร (0.02%) เคมเทค 307 ที่ 2,500 มก. ต่อลิตร (0.25%) แรมโนลิพิค 260 มก.ต่อลิตร (0.026%) และเซอร์แฟคติน 180 มก.ต่อลิตร (0.018%) ลงในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1 % โดยปริมาตร สำหรับเพาะเลี้ยง *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU 2 เป็นเวลา 0-4 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.25 พบว่า

การเติมแรมโนลิพิคที่ความเข้มข้น เท่ากับ CMC จะทำให้แบคทีเรียเจริญอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และเริ่มคงที่ในวันที่ 2 และเชื้อจะย่อยสลายน้ำมันดิบอย่างรวดเร็ว จนไม่พบน้ำมันดิบเหลืออยู่ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับการเติมเซอร์แฟคติน และเคมเทค 307 ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC ส่วนการเติมไตรตอนเอ็กซ์ 100 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ CMC ทำให้เชื้อมีการเจริญและค่อยๆเจริญขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 และสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบจนไม่พบเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ

4.6.3 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเท่ากัน และมีค่า น้อยกว่าค่า CMC

เมื่อเติมไตรตอนเอ็กซ์-100 เคมเทค 307 แรมโนลิพิค และ เซอร์แฟคติน ที่ความเข้มข้นเท่ากัน 100 มก.ต่อลิตร (0.01%) ซึ่งเป็นเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า CMC ลงไปในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1 % ดังแสดงรูปในรูปที่ 4.25 พบว่า แรมโนลิพิค และเซอร์แฟคตินที่ความเข้มข้นเท่ากันและต่ำกว่า CMC นี้ ทำให้เชื้อ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 ค่อยๆมีการเจริญและเจริญสูงสุดในวันที่ 3 และสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบจนไม่เหลืออยู่ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนการเติมไตรตอนเอ็กซ์-100 และ เคมเทค 307 ที่ความเข้มข้นเท่ากัน และต่ำกว่าค่า CMC เชื้อสามารถเจริญได้ แต่ไม่สามารถย่อยน้ำมันดิบจนไม่เหลืออยู่ภายใน 4 วันได้ โดยปริมาณน้ำมันดิบยังคงเหลืออยู่ที่ 4.52 และ 12.67 % ตามลำดับ

4.7 ผลของการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2

เมื่อเติม *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 หรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ที่มีปริมาตรหัวเชื้อ 200 ไมโครลิตร (0.4 %) ลงไปในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 พบว่า

การเติม *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ทำให้เชื้อ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 จะค่อยๆเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่ปริมาณน้ำมันดิบจะลดลง จนตรวจไม่พบในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับการเติม *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ไม่พบน้ำมันเหลืออยู่ในวันที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 4.23 (จ-ข) และรูปที่ 4.24

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่หลังจากที่เติมสารลดแรงตึงผิวลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันดิบสำหรับเพาะเลี้ยง *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 โดยใช้เครื่อง FTIR ดังแสดงในรูปที่ 4.26 พบว่า

อินฟราเรดสเปกตรัมของอัลเคน ที่ช่วงคลื่น 2,936-2,843 ซม.⁻¹ จะมีพีคต่ำลงในวันที่ 1 และไม่พบพีคของอัลเคนในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบจากการย่อยสลายของเชื้อ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 เปรียบเทียบกับการย่อยสลายทางกายภาพ (Abiotic degradation) ในชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย ด้วยวิธี GC-FID ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.27 พบว่า

แก๊สโครมาโตแกรมของไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบปรากฏพีคของไฮโดรคาร์บอน ชนิด C₁₄-C₃₂ ที่ Retention time 10.40-17.97 นาที เมื่อมีการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 ในวันที่ 2 พีคของชนิด C₁₄-C₃₂ จะต่ำลง และพบพีคต่ำๆ ของไฮโดรคาร์บอนชนิด C₁₃ (Tridecane, C₁₃H₂₆) และเมื่อเติมแรมโนลิฟิดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า พีคของชนิด C₁₄-C₃₂ ต่ำลงสุดจนขีด Base line และพบพีคต่ำๆ ของไฮโดรคาร์บอนชนิด C₅ (Pentane, C₅H₁₂) และ C₁₂ (C₁₂H₂₆, Dodecane)

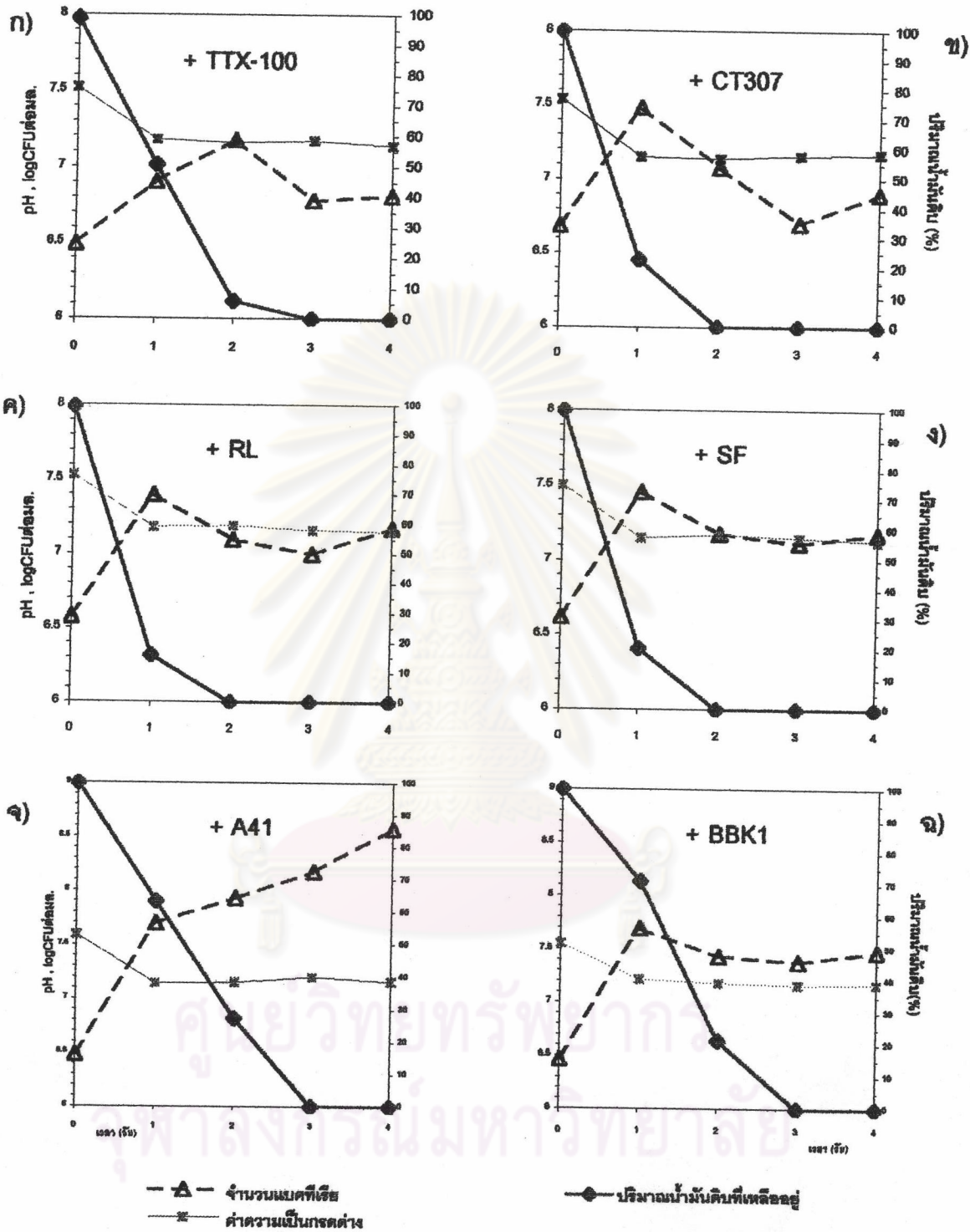
การสลายไปของไฮโดรคาร์บอนของน้ำมันดิบในอาหารเหลวที่ไม่ใส่แบคทีเรีย (ชุดควบคุม) ที่เวลา 2 วัน ไม่พบไฮโดรคาร์บอนชนิด C₁₄(Tetradecane, C₁₄H₃₀) เหลืออยู่ ไฮโดรคาร์บอนชนิด C₁₅-C₂₄ จะสลายไปลดลงได้เร็วกว่าชนิด C₂₅-C₃₂ และปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด (TPH) ลดลง 17.25 % (เหลืออยู่ 82.75 %) ส่วนการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยเชื้อ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 พบว่าไฮโดรคาร์บอนชนิดตั้งแต่ C₁₄-C₃₂ จะถูกย่อยสลายได้ดี ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้ง

หมดลดลง 54.75 % (เหลืออยู่ 45.25%) นอกจากนี้ยังพบว่าไฮโดรคาร์บอนชนิด C_{13} (Tridecane, $C_{13}H_{28}$) เกิดขึ้นด้วย

และหลังจากเลี้ยงเชื้อผ่านไป 2 วัน พบว่าปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดลดลงมากถึง 99.80 % (เหลืออยู่เพียง 0.20 %) ไฮโดรคาร์บอนชนิด C_{14} ถูกย่อยสลายหมด ส่วนชนิด C_{15} - C_{32} เหลืออยู่น้อยมากเหลืออยู่ต่ำกว่า 0.15 % และยังพบไฮโดรคาร์บอนชนิด C_{12} (Dodecane $C_{12}H_{26}$) และ C_5 (Pentane, C_5H_{12}) ดังแสดงในรูปที่ 4.28

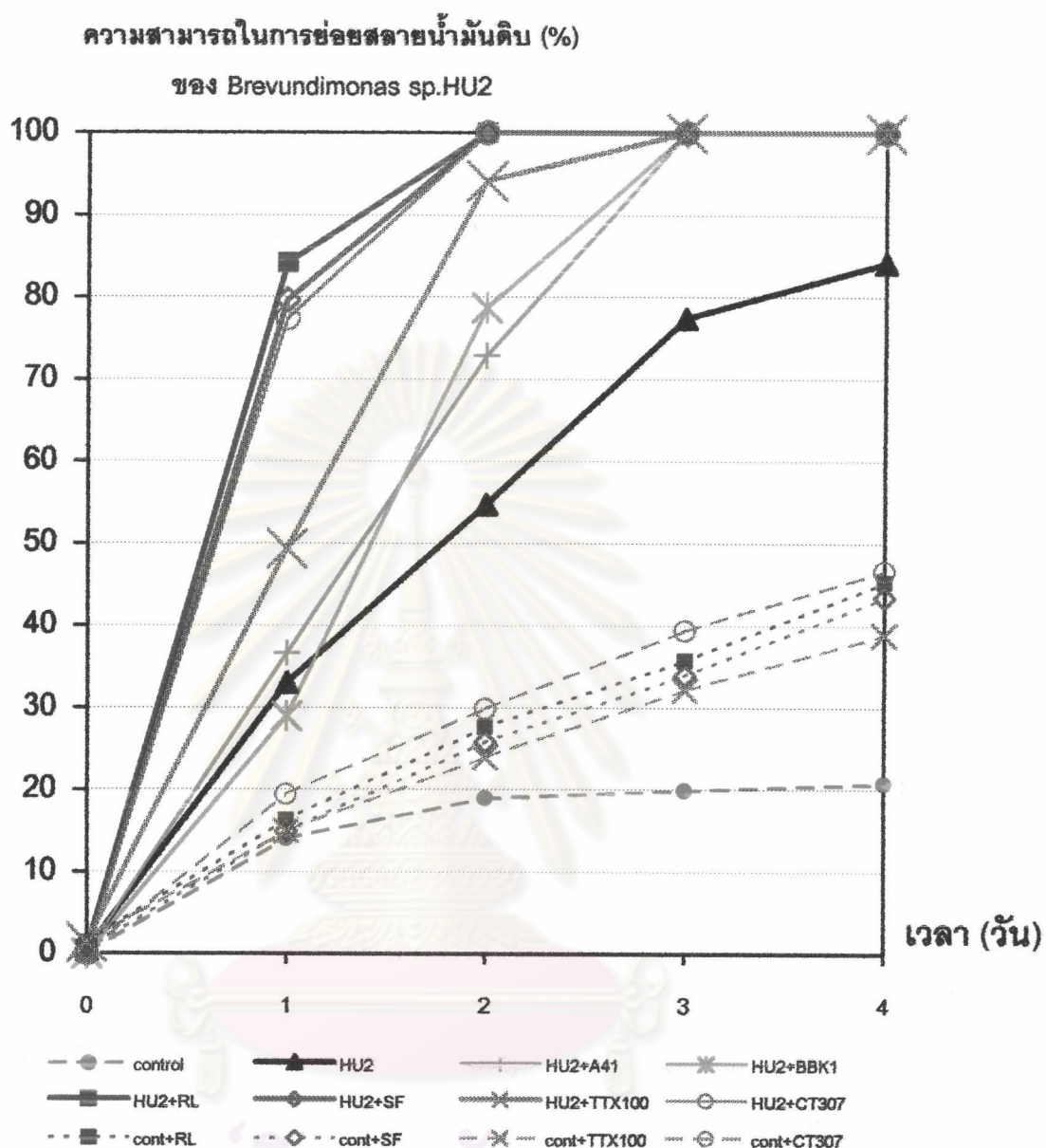


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



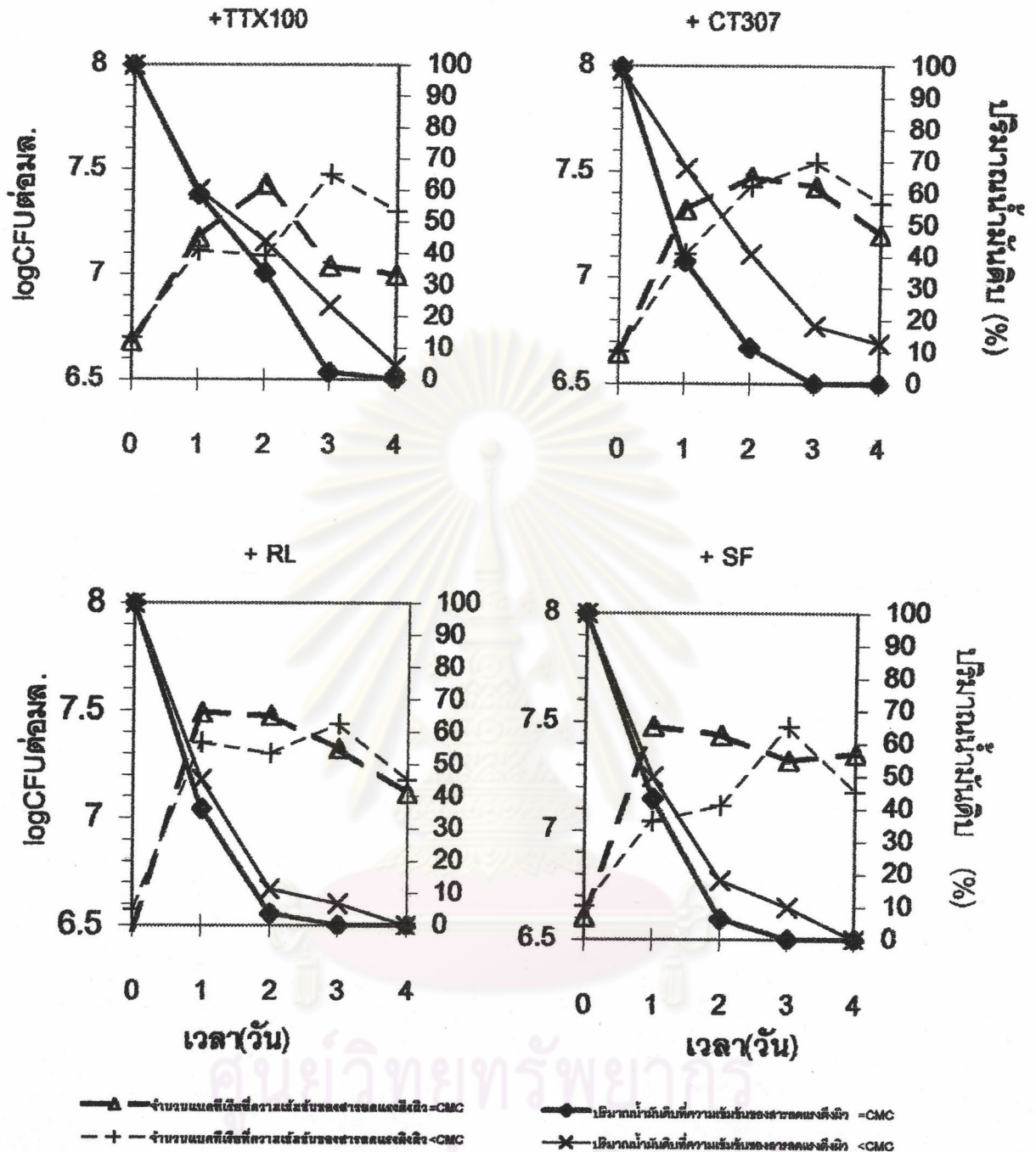
รูปที่ 4.23 ผลของชนิดสารลดแรงตึงผิว ที่ความเข้มข้นที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่เท่ากัน ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร ต่อการเจริญ และ การย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Brevundimonas sp.HU2* เป็นเวลา 4 วัน เปรียบเทียบกับการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว

- +TTX100 เติมไตรคอนเอ็กซ์100
- +CT307 เติมเคมเทค 307
- +RL เติมแรมโนลิพิค
- +SF เติมเซอร์นฟอคติน
- +A41 เติม *P.aeruginosa* A41
- +BBK1 เติม *B.subtilis* BBK1



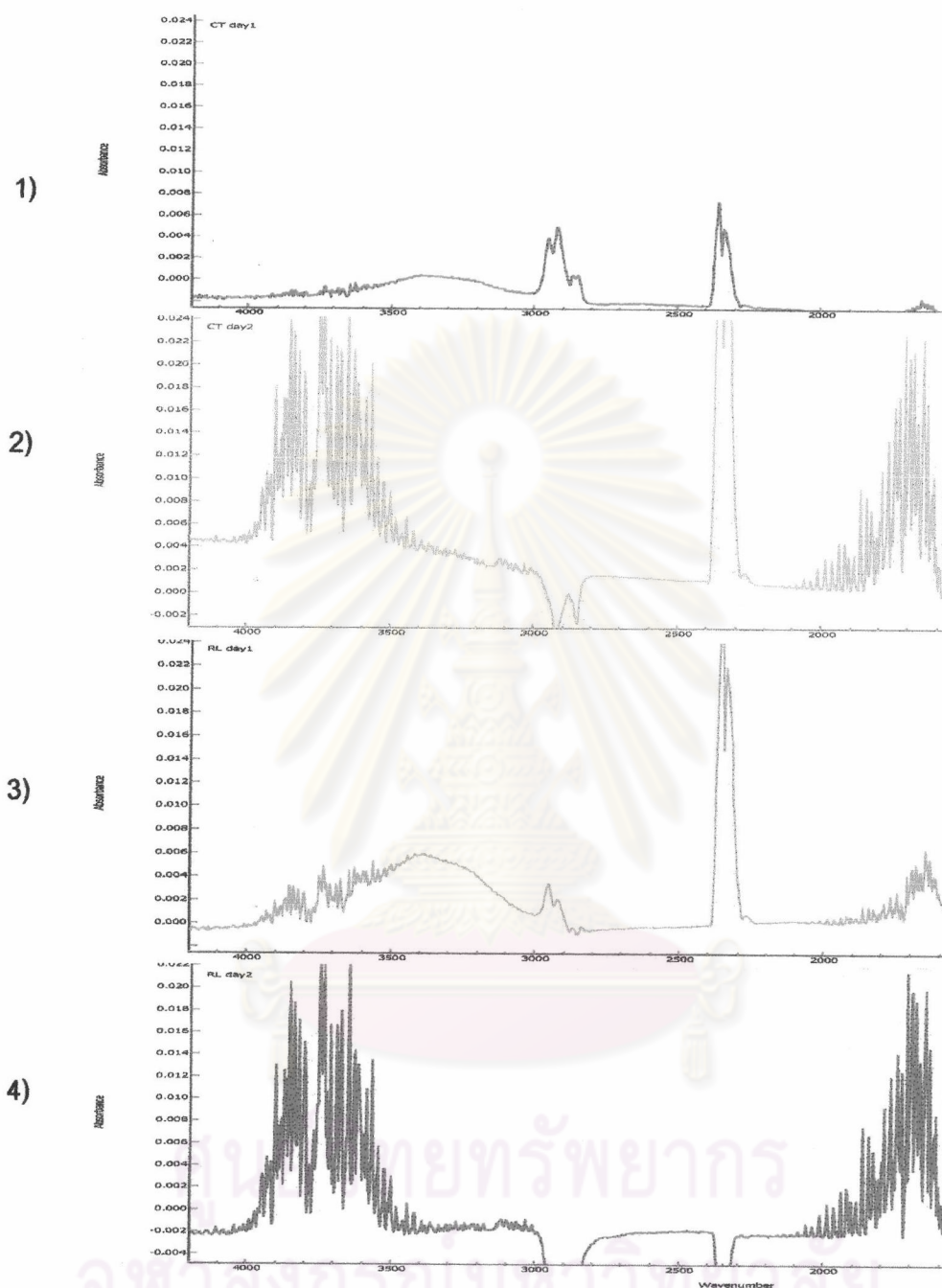
รูปที่ 4.24 ผลของชนิดสารลดแรงตึงผิว ที่ความเข้มข้นที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่เท่ากัน ต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Brevundimonas* sp. HU2 ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร เป็น เวลา 4 วัน เปรียบเทียบกับการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวและ ชุดควบคุมที่เติมสารลดแรงตึงผิว แต่ไม่เติม *Brevundimonas* sp.HU2

HU2	เติม <i>Brevundimonas</i> sp.HU2	Control	ชุดควบคุม (ไม่เติม <i>Brevundimonas</i> sp. HU2 และ ไม่เติม สารลดแรงตึงผิว)
HU2+RL	เติม <i>Brevundimonas</i> sp.HU2 และ แรมโนลิทิด	Cont+RL	ชุดควบคุมที่เติม แรมโนลิทิด
HU2+SF	เติม <i>Brevundimonas</i> sp.HU2 และ เซอร์แฟคติน	Cont+SF	ชุดควบคุมที่เติม เซอร์แฟคติน
HU2+TTX100	เติม <i>Brevundimonas</i> sp.HU2 และ ไตรคอนเอ็กซ์100	Cont+TTX100	ชุดควบคุมที่เติม ไตรคอนเอ็กซ์100
HU2+CT307	เติม <i>Brevundimonas</i> sp.HU2 และ เคมเทค 307	Cont+CT307	ชุดควบคุมที่เติม เคมเทค 307
HU2+A41	เติม <i>Brevundimonas</i> sp.HU2 และ <i>P.aeruginosa</i> A.41		
HU2+BBK1	เติม <i>Brevundimonas</i> sp.HU2 และ <i>B.subtilis</i> BBK1		



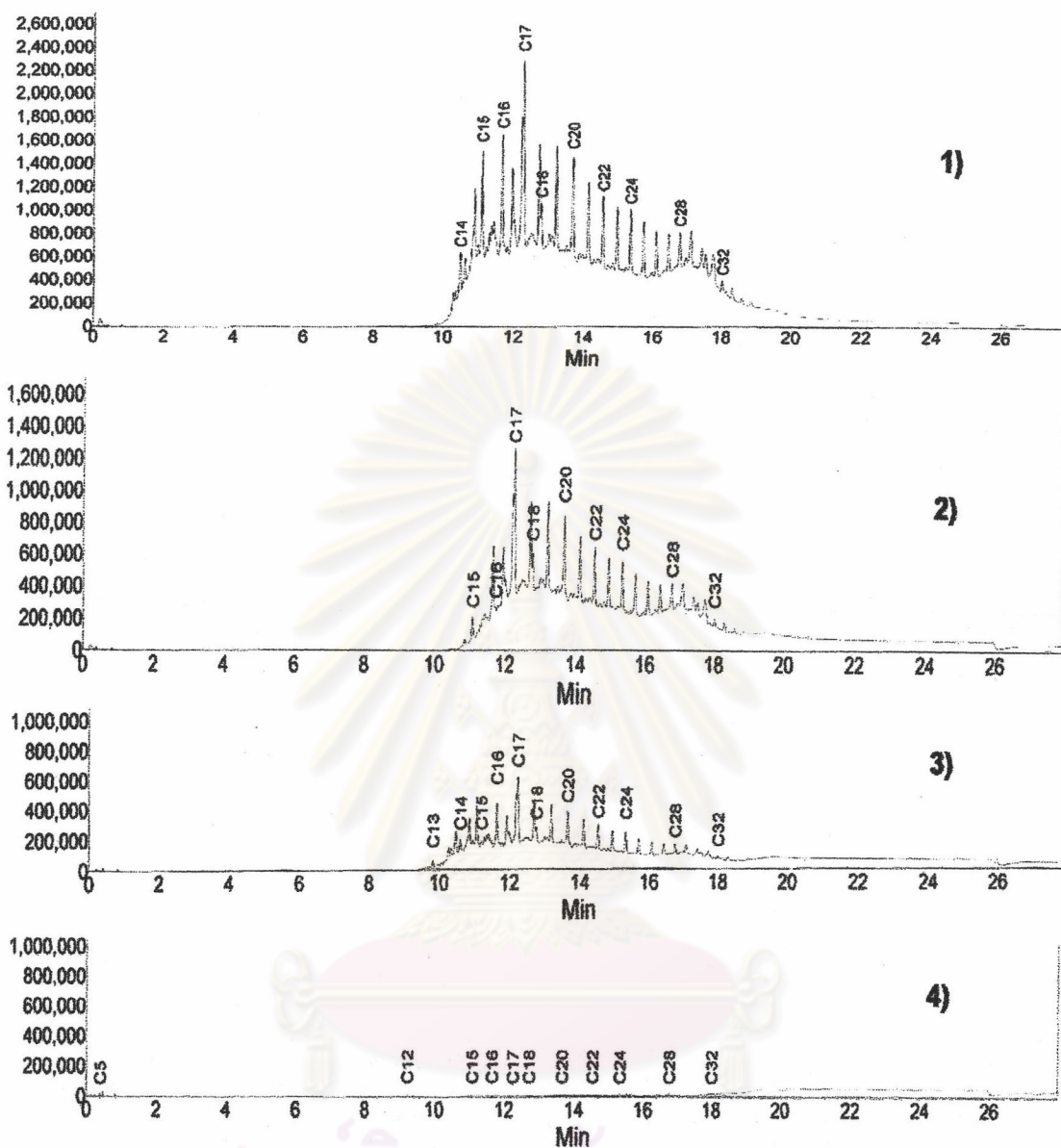
รูปที่ 4.25 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น เท่ากับค่าCMC และน้อยกว่าค่าCMC ต่อการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Brevundimonas* sp.HU2 เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร เป็นเวลา 4 วัน

+TTX100 เติมไตรคอนเล็กซ์100 +CT307 เติมเคมเทค 307
 +RL เติมแรมโนลพิค +SF เติมเซอร์แฟคติน



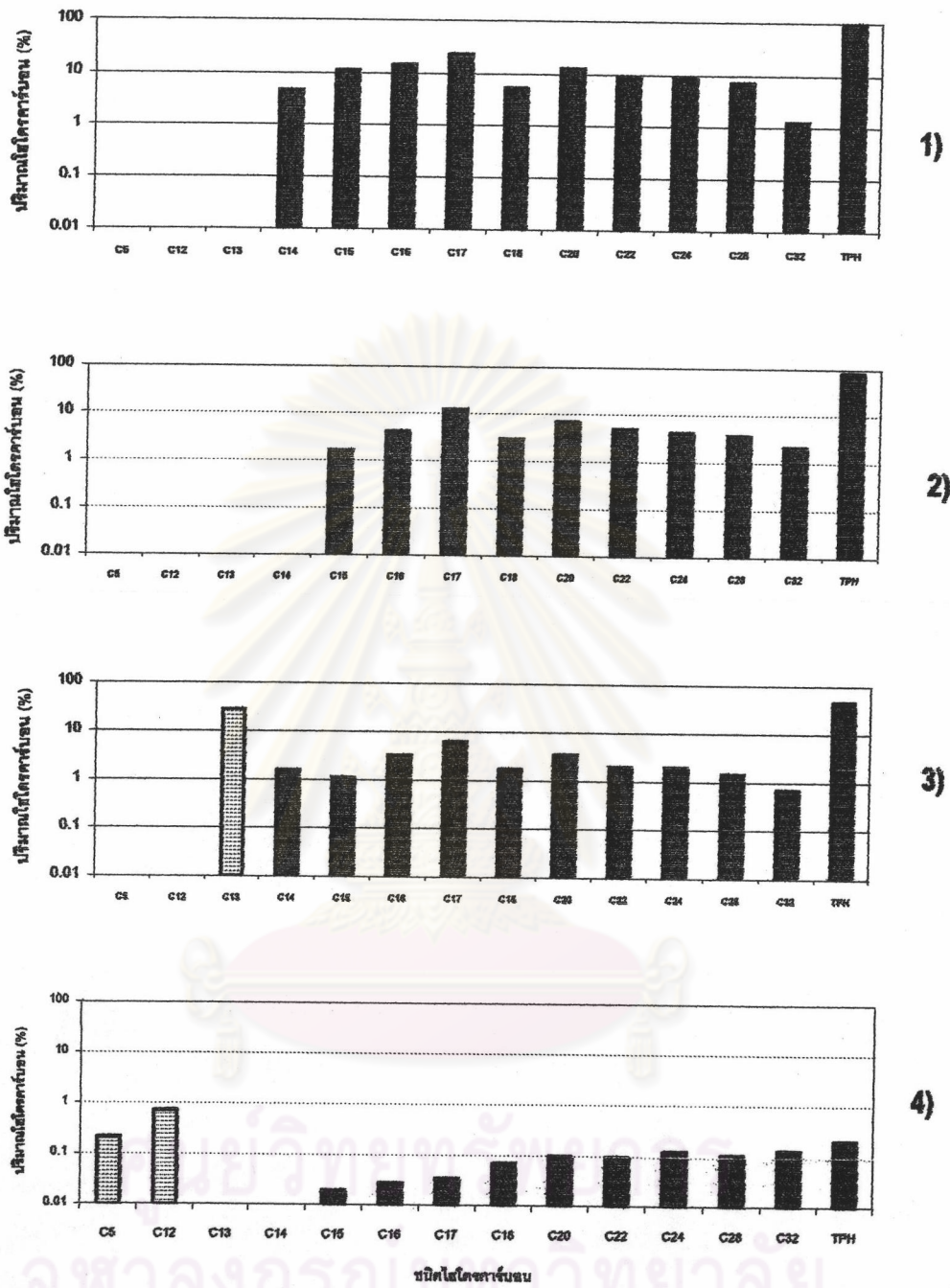
รูปที่ 4.26 แสดงผลอินฟราเรดสเปกตรัมของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ จากการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% ต่อการเจริญของ *Brevundimonas* sp.HU2 ที่เวลา 1 และ 2 วัน

- 1) เติมเคมเทค 307 ที่เวลา 1 วัน
- 2) เติมเคมเทค 307 ที่เวลา 2 วัน
- 3) เติมแรมโนลิทิด ที่เวลา 1 วัน
- 4) เติมแรมโนลิทิด ที่เวลา 2 วัน



รูปที่ 4.27 แสดงผลแก๊สโครมาโตแกรมของชนิดและปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ในน้ำมันดิบ จากการเจริญของ *Brevundimonas* sp.HU2 และชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรียในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร ที่เวลา 2 วัน

- 1) ชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย ที่เวลา 0 วัน
- 2) ชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย ที่เวลา 2 วัน
- 3) การเจริญของ *Brevundimonas* sp.HU2 ที่เวลา 2 วัน
- 4) การเจริญของ *Brevundimonas* sp.HU2 เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิจิด ที่เวลา 2 วัน



รูปที่ 4.28 แสดงชนิดและปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ในน้ำมันดิบ จากการเจริญของ *Brevundimonas* sp.HU2 และชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร ที่เวลา 2 วัน

- 1) ชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย ที่เวลา 0 วัน
- 2) ชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย ที่เวลา 2 วัน
- 3) การเจริญของ *Brevundimonas* sp.HU2 ที่เวลา 2 วัน
- 4) การเจริญของ *Brevundimonas* sp.HU2 เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิว แรมโบลิทิด

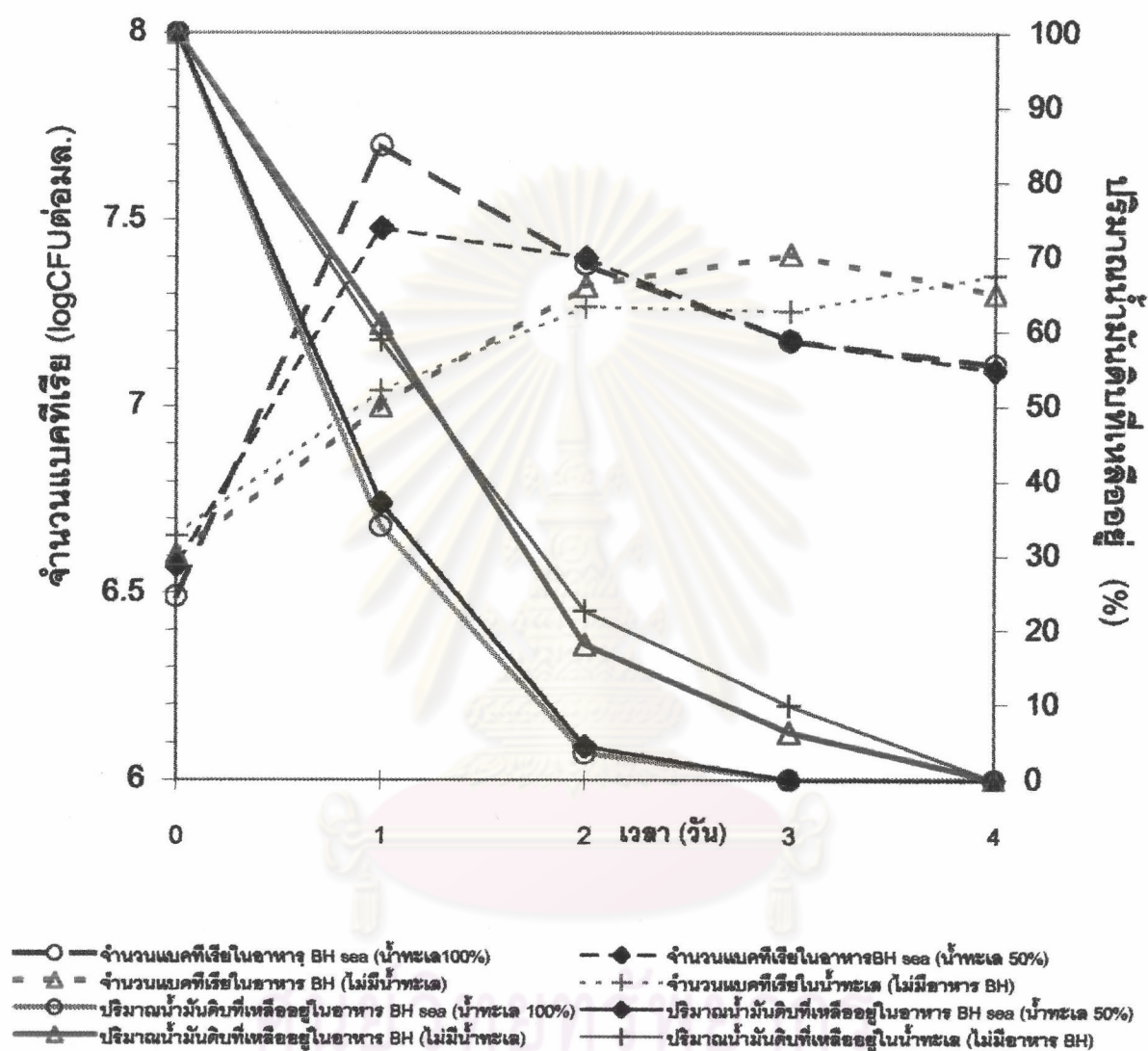
C ชนิดไฮโดรคาร์บอนตามจำนวนของคาร์บอนอะตอม

TPH ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำมันดิบ (Total Petroleum Hydrocarbon)

4.8 ผลการศึกษาผลของธาตุในอาหาร BH และน้ำทะเล ต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2

เมื่อเติมแรมโนลิทิดความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC 260 มก.ต่อลิตร (0.026 %) ในอาหารเหลวปริมาตร 50 มล. ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 500 ไมโครลิตร (1%) ปนอยู่กับทรายทะเลที่ปลอดเชื้อ 5 กรัม สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 จากรูปที่ 4.29 พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำทะเลเข้มข้น 100 % เชื้อสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในวันที่ 1 การย่อยสลายน้ำมันดิบเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จนไม่พบน้ำมันดิบเหลืออยู่ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อซึ่งผลการย่อยสลายน้ำมันดิบ เป็นเช่นเดียวกันกับการเลี้ยงเชื้อในอาหาร BH sea ที่มีความเข้มข้น 50% เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่ไม่มีน้ำทะเล การเจริญและของเชื้อจะค่อยๆเพิ่มขึ้น และมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 และเกิดการย่อยสลายน้ำมันดิบจนไม่พบน้ำมันดิบเหลืออยู่ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับการเลี้ยงเชื้อในน้ำทะเลที่มีทรายทะเลแต่ไม่มีอาหาร BH การเจริญของเชื้อในอาหารนี้จะช้ากว่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.29 ผลของอาหาร BH และ น้ำทะเล ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร และเติมสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิพิด ที่ความเข้มข้น เท่ากับค่า CMC ต่อการเจริญ และการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Brevundimonas sp. HU2* เป็นเวลา 4 วัน