

การบำบัดดินและน้ำเสียปนเปื้อนไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอนโดยใช้สตรูมาและเซลล์ตรึงของ
Pseudoxanthomonas sp. RN402

นางสาววรรณรัก นพเจริญกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย



TREATMENT OF PETROLEUM HYDROCARBON-CONTAMINATED SOIL AND
WASTEWATER BY USING LIQUID FORMULATION AND IMMOBILIZED CELLS OF

Pseudoxanthomonas sp. RN402

Miss Wannarak Nopcharoenkul

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

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การบำบัดดินและน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยใช้
เชื้อจุลินทรีย์และเซลล์ตรึงของ *Pseudoxanthomonas* sp.
RN402

โดย

นางสาววรรณรัก นพเจริญกุล

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิัญญาคง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพจน์ เปี่ยมสมบูรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิัญญาคง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ ไชยิตานนท์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จินต์ อโณทัย)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สรวิศ เผ่าทองสุข)

วรรณรัก นพเจริญกุล: การบำบัดดินและน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยใช้สูตรน้ำและเซลล์ตรึงของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. (TREATMENT OF PETROLEUM HYDROCARBON-CONTAMINATED SOIL AND WASTEWATER BY USING LIQUID FORMULATION AND IMMOBILIZED CELLS OF *Pseudoxanthomonas* sp. RN402) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. อรุณทัย ภิญญาคง, 226 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำ และประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินและน้ำ โดยแบคทีเรียพร้อมใช้สูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 (L-RN402) ซึ่งมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน และปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ถูกพัฒนาเพื่อการเก็บรักษาที่ยาวนาน โดยยังคงรักษาการรอดชีวิตและแอกติวิตีชีวภาพได้ รวมทั้งมีต้นทุนต่ำ L-RN402 ถูกเตรียมโดยแขวนลอยเซลล์ในสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 6.5 ที่เติมกลีเซอรอล 1 % ที่ความเข้มข้น 10^{12} CFU/มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อผ่านการเก็บรักษาที่ 30 °ซ 180 วัน แบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิต 75 % และยังคงประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันได้สูง และมีต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ เท่ากับ 62 บาท/ลิตร เมื่อประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในระบบนิเวศจำลองดิน พบว่าสามารถย่อยสลายไขมัน 300 มิลลิกรัม/ลิตร ให้หมดในเวลา 4 สัปดาห์ นอกจากนี้แบคทีเรียสูตรน้ำมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายในการย่อยสลาย เตตระเดเคน เฮกซะดีเคน น้ำมันดีเซล และน้ำมันดิบ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 450 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 89, 83, 92 และ 65% ตามลำดับ จากนั้นพัฒนาวิธีการใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 สำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยตรึงแบคทีเรียบนพลาสติก BCN-009 ซึ่งพบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นสูงชันกว่าเซลล์อิสระ และมีอัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลในอาหารเหลว CFMM เท่ากับ 165 มิลลิกรัม/ลิตร/กรัมเซลล์ตรึง/วัน นอกจากนี้เซลล์ตรึงยังคงมีประสิทธิภาพสูงตลอดการให้ซ้ำในการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 70 รอบ และจากการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเดิมอากาศที่มีตัวกลาง ปริมาตร 3 ลิตร ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm. พบว่าสามารถบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นสโลดเวีย ซึ่งเป็นน้ำมันหล่อลื่นที่ถูกใช้ในกระบวนการผลิตล้อรถยนต์แบบอลูมิเนียมอัลลอยด์ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50 - 200 มก./ลิตร และสามารถบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดอยู่ในช่วง 22 - 35 มก./ลิตร โดยมีประสิทธิภาพการบำบัดสูงกว่า 90 % และจากการออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมของเซลล์ตรึงด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึงได้ถึง 2.6 เท่า

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....

5187811520 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEYWORDS : PETROLEUM HYDROCARBONS / *PSEUDOXANTHOMONAS* / LIQUID FORMULATION / IMMOBILIZATION / BIOAUGMENTATION

WANNARAK NOPCHAROENKUL : TREATMENT OF PETROLEUM HYDROCARBON-CONTAMINATED SOIL AND WASTEWATER BY USING LIQUID FORMULATION AND IMMOBILIZED CELLS OF *PSEUDOXANTHOMONAS* SP. RN402. ADVISOR : ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, 226 pp.

This study aimed to develop the preparation of bacterial liquid formulation and its application in petroleum-hydrocarbon contaminated soil and water treatment. Liquid formulation of *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 (L-RN402), a strain effectively degrades pyrene and petroleum hydrocarbons, was developed for prolonged storage, maintaining high survival rate and biological activity and low-cost production. L-RN402 was prepared by suspending the cells in potassium phosphate buffer containing 1% (v/v) glycerol at 10^{12} CFU/ml. This liquid formulation could maintain about 75% survival rate with high pyrene degrading ability when kept at 30°C for 180 days. Preliminary estimation of the costs of L-RN402 production was at 62 bahts/L. L-RN402 could efficiently degrade pyrene at a concentration of 300 mg/kg in soil microcosms completely within 4 weeks. Moreover, L-RN402 could degrade diesel, crude oil, *n*-tetradecane and *n*-hexadecane with the initial concentration of 450 mg/L at 89, 83, 92 and 65%, respectively. It was further developed for its application in bioremediation of industrial wastewater contaminated with petroleum hydrocarbons by immobilizing L-RN402 on BCN-009 plastic pellets. It was found that the immobilized form had higher efficacy than those of the free cells by capable of degrading diesel at higher concentration. The diesel oil removal rate of immobilized RN402 in liquid culture was 165 mg/L/g immobilized cells/day. Moreover, the immobilized cells could still maintain high efficacy throughout 70 cycles of bioremediation treatment of diesel at 200 mg/L. It was further applied in a 3-L packed-bed bioreactor with hydraulic retention time of 10 h and air flow rate of 2 vvm. Under this system, it effectively degraded more than 90% of the contaminants in synthetic wastewater which contained sideway oil, lubricant oil used in industry, at 50-200 mg/L and industrial wastewater containing total petroleum hydrocarbons (TPH) at 22-35 mg/L. Furthermore, an experiment design approach for optimizing removal of petroleum hydrocarbon in industrial wastewater by immobilized cells was investigated by response surface methodology and under optimized conditions, the removal was enhanced by 2.6-fold.

Field of Study : Environmental Science..... Student's Signature

Academic Year : 2011..... Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้โอกาส ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และแรงบันดาลใจที่เป็นประโยชน์ จนทำให้ งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี นอกจากนี้ยังให้คำสอน ทักษะคติ และกำลังใจที่ดีมีคุณค่า รวมทั้งการทำงานที่มีคุณภาพของอาจารย์ที่ปรึกษา ก่อให้เกิดเป็นแรงผลักดันและทัศนคติที่ว่า “งานทุกอย่าง เราทำได้ ขอเพียงแค่พยายามและตั้งใจ” ทำให้สามารถฝ่าฟันอุปสรรคต่างๆ นานาได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รอง ศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา ที่กรุณารับเป็นประธานขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ดร.สรวิศ เม่าทองสุข และ รองศาสตราจารย์ ดร.จินต์ อโณทัย ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำปรึกษา และคำแนะนำ ตลอดจน ปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤษณเวศ ทองธนศักดิ์ สำหรับแนวคิดแบบที่เรียสุตธรรมาและ อ.บุญส่ง ศิลปะเจริญกุล ที่กรุณาคำปรึกษา และ คำแนะนำที่มีประโยชน์ต่อการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ แหล่งเงินทุนสำหรับสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ ทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกโครงการ เครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการพัฒนาบุคลากรอุดมศึกษา (CHE-PhD-THA-INV) รุ่นปี 2551 โดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2551 และ 2553 และ "ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย" จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 17 ปีการศึกษา 2554 ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี สำหรับเครื่องมือวิจัยและทุนสนับสนุนการเสนอผลงานในต่างประเทศ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย (ศสอ.) ศูนย์ปฏิบัติการ Advanced Imaging Research Center (AIR Center) สำหรับความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวิจัย

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้อง 406 462 โดยเฉพาะ พิริยะ กลั่นแก้ว สำหรับเชื้อ RN402 และ KOTLB ที่มีคุณภาพ รวมทั้งให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ และ ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน ที่หลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ ถนัด มากทองคำ สำหรับตัวอย่างน้ำเสียจำนวนมาก

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณนพพร นพเจริญกุล คุณพ่อ คุณแม่ สมภาณี เกษตรสุวรรณ และพี่เหมียว ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจ ทำให้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ต
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	6
2.1 ปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน.....	6
2.2 การปนเปื้อนปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม.....	8
2.3 การบำบัดปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยชีววิธี.....	11
2.4 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน... ..	16
2.5 วิธีการย่อยสลายปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน.....	18
2.6 จุลินทรีย์สูตมน้ำ.....	20
2.7 การใช้เซลล์ตรึงเพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน.....	23
2.8 การประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจติดตามจุลินทรีย์ใน การบำบัดโดยชีววิธี.....	29
2.9 การออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย ปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง	31
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	35
4 ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของ <i>Pseudoxanthomonas</i> สายพันธุ์ RN402 เพื่อ ผลิตแบคทีเรียสูตมน้ำ.....	45
4.1 บทนำ.....	45
4.2 ขั้นตอนงานวิจัย.....	47
4.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	47
4.4 ผลการทดลอง.....	51

	หน้า
4.5 อภิปรายผลการทดลอง.....	56
5 พัฒนาการใช้สูตรน้ำของ <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN402 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและการประยุกต์ใช้บำบัดดินปนเปื้อนไฟรีน.....	63
5.1 บทนำ.....	63
5.2 ขั้นตอนงานวิจัย.....	65
5.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	66
5.4 ผลการทดลอง.....	75
5.5 อภิปรายผลการทดลอง.....	91
6 พัฒนาการใช้สูตรน้ำของ <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN402 โดยการตรึงเซลล์สำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันดีเซล.....	99
6.1 บทนำ.....	99
6.2 ขั้นตอนงานวิจัย.....	101
6.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	101
6.4 ผลการทดลอง.....	109
6.5 อภิปรายผลการทดลอง.....	119
7 การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นโดยเซลล์ตรึงของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง.....	125
7.1 บทนำ.....	125
7.2 ขั้นตอนงานวิจัย.....	129
7.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	129
7.4 ผลการทดลอง.....	133
7.5 อภิปรายผลการทดลอง.....	151
8 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ.....	159
8.1 ข้อสรุป.....	159
8.2 ข้อเสนอแนะ.....	162
รายการอ้างอิง.....	165
ภาคผนวก ก.....	190

	หน้า
ภาคผนวก ข.....	192
ภาคผนวก ค.....	200
ภาคผนวก ง.....	207
ภาคผนวก จ.....	223
ภาคผนวก ฉ.....	225
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	226

สารบัญญัตินำ

ตารางที่		หน้า
2.1	แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน.....	16
2.2	ผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในรูปแบบต่างๆ ที่จำหน่ายในท้องตลาด.....	22
2.3	การกระจายระดับของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสมกลาง.....	32
4.1	ผลการทดสอบการเจริญของ <i>Pseudoxanthomonas</i> สายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว LB ที่สภาวะต่างๆ.....	56
4.2	ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน พีแนนทรีน และสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ.....	57
5.1	ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	68
5.2	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียและประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียแขวนลอยที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน.....	76
5.3	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียของแบคทีเรียแขวนลอยที่มีการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน.....	77
5.4	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 270 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10 ¹² CFU/มิลลิลิตร ในสารละลาย PB ที่มีเติมกลีเซอรอลเท่ากับ 1% โดยชุดควบคุมสารละลาย PB ไม่เติมกลีเซอรอล.....	80
5.5	ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งถูกเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ โดยหัวเชื้อเริ่ม 10 ⁶ CFU/มิลลิลิตร ความเข้มข้นไพรีนเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 9 วัน.....	81
5.6	ประเมินต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402.....	82
5.7	ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน.....	84
5.8	แบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนในระบบนิเวศจำลองดิน.....	86
5.9	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ nidA402 กับลำดับนิวคลีโอ	

ตารางที่	หน้า
	99
	หน้า
	89
6.1	106
6.2	110
6.3	111
6.4	113
7.1	129
7.2	132
7.3	132
7.4	134
7.5	139
7.6	142
7.7	143
7.8	145
7.9	146
7.10	154
ง.1	207
ง.2	207
ง.3	208
ง.4	

ตารางที่	หน้า
	เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี viable plate count..... 208
ง.5	การรอดชีวิตของแบคทีเรียของแบคทีเรียแขวนลอยที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน (log CFU/มิลลิลิตร)..... 209
ง.6	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไฟรีนของแบคทีเรียแขวนลอยที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 วัน..... 210
ง.7	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไฟรีนของแบคทีเรียแขวนลอยที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน..... 211
ง.8	การรอดชีวิตของแบคทีเรียแขวนลอยที่มีการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน จากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $9.63 \pm 0.31 \log \text{CFU/มิลลิลิตร}$ 212
ง.9	การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ 4 °ซ เป็นเวลา 180 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ $10^9 \text{CFU/มิลลิลิตร}$ โดยชุดควบคุมคือแบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB และชุดทดลองคือ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB ที่เติม 1% กลีเซอรอล..... 214
ง.10	การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ 4 °ซ เป็นเวลา 180 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ $10^9 \text{CFU/มิลลิลิตร}$ โดยชุดควบคุมคือแบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB และชุดทดลองคือ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB ที่เติม 1% กลีเซอรอล..... 215
ง.11	การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 270 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ $10^{12} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ โดยชุดควบคุมคือแบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB และชุดทดลองคือ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB ที่เติม 1% กลีเซอรอล..... 216
ง.12	ประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรีนของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 270 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ $10^{12} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB..... 217
ง.13	ประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรีนของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 270 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ $10^{12} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB ที่เติม 1% กลีเซอรอล..... 218

ตารางที่	หน้า	
ง.14	ปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายไฟรีนของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในระบบนิเวศจำลองดิน ที่ความเข้มข้นไฟรีนเริ่มต้น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดิน.....	218
ง.15	แบคทีเรียทั้งหมดในระบบนิเวศจำลองดิน (MPN/กรัม ดิน).....	219
ง.16	แบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีนในระบบนิเวศจำลองดิน (MPN/กรัม ดิน).....	219
ง.17	ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน <i>nidA</i> ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดินจากชุดทดลอง bioaugmentation II ด้วยวิธี real-time qPCR.....	220
ง.18	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตรน้ำในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน....	220
ง.19	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในการย่อยสลายอัลเคน น้ำมันดีเซลและน้ำมันดิบ.....	221
ง.20	การถูกย่อยสลายของวัสดุที่ลอยอยู่ในน้ำเสียที่มีน้ำมันดีเซล 2 % (w/v).....	221
ง.21	ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการกำจัดน้ำมันของชุดทดลองโดยการออกแบบการทดลองแบบส่วนกลาง.....	222
จ.1	การแปรผลปริมาณแบคทีเรียมีชีวิตโดยวิธี MPN.....	223

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ตัวอย่างโครงสร้างของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันดิบ..... 7
2.2	การย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีออกซิเจน 12
2.3	วิธีการย่อยสลายสารอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย 19
2.4	วิธีการย่อยสลายสารกลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย 20
2.5	รูปแบบการตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ ก) วิธีการดูดซับ ข) วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ค) วิธีการกักขัง ง) วิธีการตรึงแบบแคปซูล จ) วิธีการเชื่อมไขว้..... 25
2.6	ระบบระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง 27
2.7	ระบบบำบัดทางชีวภาพแบบมีตัวกลางระบบที่มีการโปรยกรอง 28
2.8	การกระจายระดับของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสมกลาง..... 32
4.1	ลักษณะโคโลนีของ RN402 ที่สร้างบริเวณใสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่พันทับด้วยไฟรินเป็นเวลา 14 วัน..... 48
4.2	ประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนทรีน และการเจริญของ RN402 โดยการใช้พีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... 51
4.3	ประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรินและการเจริญของ RN402 โดยการใช้ไฟรินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... 52
4.4	โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณพีแนทรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายพีแนทรีนโดย RN402 หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา ก) 0 วัน ข) 12 วัน..... 52
4.5	โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไฟรินและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไฟรินโดย RN402 หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา ก) 0 วัน ข) 20 วัน..... 52
4.6	ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีสกัดเมกะพลาสมิด ช่องวิ่งที่ 1: เมกะพลาสมิดของ RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟริน ช่องวิ่งที่ 2: เมกะพลาสมิดของ cRN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB..... 54
4.7	ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ ปฏิกริยาถูกใช้พอลิเมอเรส บริเวณยีน <i>nidA</i> ช่องวิ่ง M: ดีเอ็นเอ 100 bp ladder ช่องวิ่งที่ 1: ดีเอ็นเอจาก RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ช่องวิ่งที่ 2: ดีเอ็นเอจาก RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว

รูปที่	หน้า
CFMM ที่เติมพีแนมทริน ช่องวิ่งที่ 3: ดีเอ็นเอจาก RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน ช่องวิ่งที่ 4: ตัวแปรควบคุมผลลบ (น้ำปลอดประจุ) ช่องวิ่งที่ 5: เมกะพลาสมิดของ RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน.....	54
4.8 ภาพอะกาโรสเจลที่มี ช่องวิ่ง M: ดีเอ็นเอ Lambda HindIII ช่องวิ่งที่ 1 ดีเอ็นเอจาก RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน ซึ่งผ่านการตัดด้วย เอนไซม์ BamHI ข) ภาพสัญญาณจากเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นจากผลิตภัณฑ์ ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ยีน <i>nidA</i> (บริเวณลูกศรชี้แสดงถึงสัญญาณที่เกิดขึ้น).....	55
5.1 แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งถูกบรรจุในขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร.....	68
5.2 ระบบนิเวศจำลองดิน โดยบรรจุดิน 6 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียว... ..	71
5.3 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน.....	78
5.4 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 180 วัน โดยหว่านเชื้อเริ่ม 10 ⁶ CFU/มิลลิลิตร ความเข้มข้นไพรีนเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 9 วัน.....	79
5.5 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 270 วันที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10 ¹² CFU/มิลลิลิตร ในสารละลาย PB ที่มีเติมกลีเซอรอลเท่ากับ 1% โดยชุดควบคุมสารละลาย PB ไม่เติมกลีเซอรอล.....	80
5.6 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งถูกเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ โดยหว่านเชื้อเริ่ม 10 ⁶ CFU/มิลลิลิตร ความเข้มข้นไพรีนเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 9 วัน.....	81
5.7 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในระบบนิเวศจำลองดิน ที่ความเข้มข้นไพรีนเริ่มต้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร.....	85
5.8 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากระบบนิเวศจำลองดินประกอบด้วย 3 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดทดลอง biostimulation ชุดทดลอง	

รูปที่	หน้า
bioaugmentation I และ ชุดทดลอง bioaugmentation II โดยเก็บตัวอย่างใน สัปดาห์ที่ 0 2 และ 4 ช่องวงที่ M: แอปติเอ็นเอ RN402.....	87
5.9 การมีอยู่ของยีน <i>nidA</i> ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดิน ด้วยวิธี PCR ช่องวงที่ M: marker 100 bp ช่องวงที่ 1-3: ดีเอ็นเอจากชุดทดลอง biostimulation ในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4, ตามลำดับ ช่องวงที่ 4-6: ดีเอ็นเอจากชุด ทดลอง bioaugmentation I ในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4, ตามลำดับ ช่องวงที่ 7-9: ดี เอ็นเอจากชุดทดลอง bioaugmentation II ในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4, ตามลำดับ.....	88
5.10 การทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ <i>nidA402F</i> และ <i>nidA402R</i> ทำโดย ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสชัน ช่องวงที่ M: marker 100 bp ช่องวงที่ 1: water ช่องวงที่ 2: <i>Sphingobium yanoikuyae</i> สายพันธุ์ B1 ช่องวงที่ 3: <i>Novosphingobium</i> <i>aromaticivorans</i> สายพันธุ์ F199 ช่องวงที่ 4: <i>Sphingobium</i> sp. สายพันธุ์ P2 ช่อง วงที่ 5: <i>Acinetobacter</i> sp. สายพันธุ์ R2 ช่องวงที่ 6: <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402.....	89
5.11 ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียที่มียีน <i>nidA</i> ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสใน ระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี real-time qPCR ประกอบด้วย 3 ชุดทดลอง biostimulation ชุดทดลอง bioaugmentation I และ ชุดทดลอง bioaugmentation II โดยเก็บตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4	91
6.1 วัสดุตั้ง 1) BCN-009 2) BCN-012 และ 3) Dazs Bio-Ring S-1320.....	103
6.2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตริ้น้ำในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิด ต่างๆ ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มก/ลิตร ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10 ⁷ CFU/มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน.....	111
6.3 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลระหว่างเซลล์ตั้งกับเซลล์อิสระ RN402 ในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง (CFMM 50 มิลลิลิตร) ที่เติมน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน.....	114
6.4 ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ ของชุดควบคุม (วัสดุตั้ง ปลอดเชื้อ).....	115
6.5 ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ ของเซลล์ตั้ง RN402.....	115
6.6 อัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตั้ง RN402 ที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่างๆ	116
6.7 ประสิทธิภาพการใช้น้ำของเซลล์ตั้ง RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความ	

รูปที่	หน้า
เข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 70 รอบ.....	116
6.8 ภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์ RN402 บนวัสดุตั้งโดยกล้อง SEM รูป ก) จากเซลล์ตั้งที่ไม่ผ่านการใช้ รูป ข) จากเซลล์ตั้งที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 รอบ ภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์ RN402 บนวัสดุตั้งโดยกล้อง SPM ค) จากเซลล์ตั้งที่ไม่ผ่านการใช้ รูป ง) จากเซลล์ตั้งที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 รอบ.....	117
6.9 ภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์ RN402 ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของเซลล์ตั้งที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 ครั้ง โดยกล้อง CLSM.....	118
6.10 ภาพถ่ายการมีชีวิตของ RN402 ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของเซลล์ตั้งที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 ครั้ง โดยกล้อง CLSM.....	119
7.1 ฟีทีที สไลด์เวย์ ออยล์.....	127
7.2 ระบบบำบัดน้ำเสียของแผนก chip yard บริษัท สยามเลมเมอร์ช จำกัด.....	128
7.3 ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง (aerobic packed-bed bioreactor).....	130
7.4 ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ปริมาตรในการบำบัดน้ำเสีย 3 ลิตร.....	135
7.5 ปริมาณ TPH ในน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 5 10 และ 15 ชั่วโมง ตามลำดับ และการให้อากาศ 2 vvm.....	136
7.6 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์ ที่ความเข้มข้น 50, มิลลิกรัม/ลิตร โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 5 10 และ 15 ชั่วโมง ตามลำดับ และการให้อากาศ 2 vvm.....	136
7.7 ปริมาณ TPH ในน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์ ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm.....	137
7.8 ประสิทธิภาพของการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์ ที่ความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm.....	138
7.9 ก) ปริมาณ COD ข) ปริมาณ TPH ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมไม่ผ่านการเติมสารอาหาร โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm.....	140

รูปที่	หน้า
7.10 ก) ปริมาณ COD ข) ปริมาณ TPH ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผ่านการเติมสารอาหาร โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง.....	141
7.11 ประสิทธิภาพของการบำบัด COD และ TPH ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ก) น้ำเสียที่ไม่ผ่านการเติมสารอาหาร และ ข) น้ำเสียที่ผ่านการเติมสารอาหาร.....	142
7.12 ภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์ RN402 บนพื้นผิววัสดุตั้งโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ก) จากเซลล์ที่ตั้งที่ไม่ผ่านการใช้ ข) จากเซลล์ที่ตั้งที่ผ่านการใช้งานในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง.....	144
7.13 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันที่ได้จากการทดลองและทำนาย	147
7.14 กราฟพื้นผิวการตอบสนอง ก) และรูปแบบเส้นโครงร่าง ข) แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟอสฟอรัสและความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวียต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ที่ตั้ง RN402.....	148
7.15 กราฟพื้นผิวการตอบสนอง ก) และรูปแบบเส้นโครงร่าง ข) แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนและความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวียต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ที่ตั้ง RN402.....	149
7.16 กราฟพื้นผิวการตอบสนอง ก) และรูปแบบเส้นโครงร่าง ข) แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนและปริมาณฟอสฟอรัสต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ที่ตั้ง RN402.....	150
ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าอัตราส่วนพื้นที่และค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล.....	200
ค.2 แสดง TLC-FID โคโรมาโตแกรมของน้ำมันดีเซลของชุดควบคุม 0 วัน ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล 100 มิลลิกรัม/ลิตร 1 2 และ 3 คือ เซททูเรท อะโรมาติก และสเตียรอยด์แอลกอฮอล์ ตามลำดับ.....	201
ค.3 แสดง TLC-FID โคโรมาโตแกรมของน้ำมันดีเซลชุดทดลอง 3 วัน ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล 100 มิลลิกรัม/ลิตร 1 2 และ 3 คือ เซททูเรท อะโรมาติก และสเตียรอยด์แอลกอฮอล์ ตามลำดับ.....	201
ค.4 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าอัตราส่วนพื้นที่และค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำมันสไลด์เวีย.....	202
ค.5 โคโรมาโตแกรมของน้ำมันสไลด์เวียจากชุดควบคุมวันที่ 0 ในการย่อยสลายน้ำมัน	

รูปที่	หน้า
สไลด์เวียความเข้มข้น 200 มก./ลิตร โดยใช้เซลล์อิสระ RN402 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 MPN/ทริตเมนต์ ในอาหารเหลว CFMM (50 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน พืชที่ 1 2 และ 3 คือแซททูเรท อะโรมาติก และสแตียริลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ.....	203
ค.6 โคโรมาโตแกรมของน้ำมันสไลด์เวียจากชุดทดลองวันที่ 7 ในการย่อยสลายน้ำมัน สไลด์เวียความเข้มข้น 200 มก./ลิตร โดยใช้เซลล์อิสระ RN402 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 MPN/ชุดทดลอง ในอาหารเหลว CFMM (50 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน พืชที่ 1 2 และ 3 คือแซททูเรท อะโรมาติก และสแตียริลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ.....	203
ค.7 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนกับพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์โดย GC-FID.....	204
ค.8 โคโรมาโตแกรมของน้ำมันดีเซล ก) ชุดควบคุม ข) ชุดทดลอง ในวันที่ 9 การย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 450 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เซลล์อิสระ RN402 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร.....	205
ค.9 โคโรมาโตแกรมของน้ำมันดิบ ก) ชุดควบคุม ข) ชุดทดลอง ในวันที่ 9 การย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 450 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เซลล์อิสระ RN402 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร.....	206
ด.1 กราฟมาตรฐานระหว่างระหว่างค่า C_t และดีเอ็นเอเจือจาง 10 เท่า ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งสกัดมาจากดินที่ปริมาณเชื้อ RN402 เท่ากับ 1×10^{12} (log MPN/กรัม ดิน)..	225

คำย่อและสัญลักษณ์

A_{260}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 260 นาโนเมตร
A_{280}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 280 นาโนเมตร
bp	=	base pairs
CFU	=	colony forming unit
kb	=	Kilobase
R_t	=	retention time
°ซ	=	องศาเซลเซียส
vvm.	=	volume pervolume per minute
MPN	=	Most probable number

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยมีการพัฒนาเศรษฐกิจอย่างรวดเร็ว ทำให้มีการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในรูปเชื้อเพลิงเหลวซึ่งถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานในการขับเคลื่อนเศรษฐกิจของประเทศ จึงก่อให้เกิดของเสียจำนวนมากจากการใช้ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ข้อมูลจากกรมโรงงานอุตสาหกรรมพบว่า มีโรงงานจำนวนมากที่ผลิตกากของเสียจากน้ำมันหล่อลื่นต่าง ๆ ที่ใช้แล้ว หรือกากตะกอนน้ำมัน หรือของเสียผสมน้ำ-น้ำมัน เช่น อุตสาหกรรมการกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมและเคมีภัณฑ์ โรงผลิตส่วนประกอบยานยนต์ โรงรีดเหล็ก โรงผลิตอะลูมิเนียม และโรงผลิตชิ้นส่วนคอมพิวเตอร์ เป็นต้น (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2554) โดยน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมาจากกระบวนการผลิต และจากกระบวนการทำความสะอาดเครื่องจักร ทำให้มีการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนปริมาณสูงในน้ำเสียส่งผลให้ค่าซีไอดีในน้ำเสียสูงขึ้น และการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีการบำบัดทางกายภาพและเคมี เช่น การเป่าหรือฟองอากาศ (dispersed Air Flotation) การตกตะกอน (sedimentation) ทำได้ยาก และหลังบำบัดแล้วยังคงพบการปนเปื้อนหรือมีสารตกค้าง (Wang และคณะ, 2009) ซึ่งหากจัดการน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเกิดการปนเปื้อนของน้ำมันสู่สิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำผิวดิน และน้ำใต้ดินได้ และจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อชีวิตและทรัพย์สินของมนุษย์ได้ ซึ่งจากองค์ประกอบของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่สำคัญโดยทั่วไป ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว (saturate hydrocarbon) อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) เรซิน (resin) และ แอสฟัลทีน (asphaltene) (Reisinger, 1995) ทั้งนี้องค์ประกอบหลักที่สำคัญที่มีความเป็นพิษ คือพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยวง เบนซีนตั้งแต่สองวงขึ้นไป เช่น แนพทาลีน ฟิแนนทรีน ไพรีน ฟลูออรีน แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน เป็นต้น ซึ่ง PAHs หลายชนิดมีความเป็นพิษเป็นอันตรายต่อทารกในครรภ์ และเป็นสารเหนียวนำก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ก่อมะเร็ง เป็นอันตรายต่อทารกในครรภ์ (Peng และคณะ, 2008; Wu และคณะ, 2010) ดังนั้นเมื่อเกิดการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในดินทำให้องค์ประกอบที่เป็น PAHs มวลโมเลกุลใหญ่ตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป ซึ่งมีความเป็นพิษสูงและสลายตัวได้ยากจะถูกดูดซับโดยสารอินทรีย์ (organic matter) ที่อยู่ในดิน ทำให้ PAHs ที่ถูกดูดซับในดินมีความคงตัวและยากต่อการสลายตัวมากขึ้น จึงนำไปสู่การสะสมในห่วงโซ่อาหาร (Potin และคณะ,

2004) นอกจากนี้การปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนสู่น้ำลำคลองหรือทะเล จะทำให้เกิดคราบน้ำมันลอยอยู่ที่ผิวน้ำและคราบน้ำมันเหล่านี้จะเป็นแผ่นฟิล์มปกคลุมผิวน้ำ ทำให้ออกซิเจนไม่สามารถแทรกซึมลงสู่น้ำ เกิดการขาดออกซิเจนในน้ำ ซึ่งเป็นผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำและทำลายห่วงโซ่อาหาร ส่วนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลสูงจะจมสู่ดินตะกอนในแหล่งน้ำ ทำให้เกิดมลภาวะเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว (Nicodem และคณะ, 1997)

เพื่อแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม วิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน คือ การบำบัดโดยชีววิธี (bioremediation) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนรูปแบบของสารพิษให้อยู่ในรูปไม่เป็นพิษหรือเป็นพิษน้อยลง โดยอาศัยการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย หรือพืช เป็นต้น (Vidali, 2001; Barreto และคณะ, 2010) ซึ่งวิธีการนี้เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และใช้ต้นทุนต่ำกว่าวิธีการบำบัดทางกายภาพ เช่น การลอยน้ำมัน (skimmer) และทางเคมี เช่น การใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactants) การใช้สารเคมีขจัดคราบ (dispersants) (Barreto และคณะ, 2010) การบำบัดโดยชีววิธีที่นิยมใช้ในการบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ วิธีการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ (biostimulation) เช่น การเติมสารอาหาร การเติมอากาศ เพื่อกระตุ้นกิจกรรมจุลินทรีย์ท้องถิ่นในการย่อยสลาย และวิธีการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลาย (bioaugmentation) (Vidali 2001)

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเป็นตัวแปรสำคัญที่ทำให้การบำบัดโดยชีววิธีเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พิริยะ กลั่นแก้ว (2550) คัดแยก *Diaphorobacter* sp. KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในประเทศไทย ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน พีแนนทริน และยังมีการศึกษาเพิ่มเติมในเบื้องต้นพบว่า *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น ชนิด PTT V-120 ในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 77% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร จากสมบัติดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และมีความน่าสนใจในการนำ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 มาผลิตเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้สูตรน้ำเพื่อประยุกต์ในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากวิธีการเตรียมจุลินทรีย์สูตรน้ำมีขั้นตอนการผลิตที่ไม่ซับซ้อนและต้นทุนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมจุลินทรีย์แบบผง นอกจากนี้จุลินทรีย์พร้อมใช้ที่มีการจำหน่ายอยู่ในประเทศไทยเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศจึงมีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาวิธีการผลิตจุลินทรีย์พร้อมใช้สูตรน้ำที่มีประสิทธิภาพในการ

ย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน และคงประสิทธิภาพตลอดอายุการเก็บรักษา เพื่อลดต้นทุนและลดการนำเข้า รวมทั้งจะพัฒนาวิธีการใช้จุลินทรีย์สูตรน้ำในการบำบัดดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในระบบนิเวศจำลองดิน พัฒนาวิธีการใช้จุลินทรีย์สูตรน้ำสำหรับการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมในถังปฏิกรณ์ นอกจากนี้จะพัฒนาการใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจติดตามจุลินทรีย์ในระหว่างการบำบัด ซึ่งเทคนิคดังกล่าวสามารถทำได้อย่างรวดเร็วและให้ผลที่แม่นยำ ทำให้ได้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมระบบบำบัดให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยครั้งนี้ คือการพัฒนาวิธีการผลิตสูตรน้ำของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ และวิธีการใช้งานสูตรน้ำ เพื่อประยุกต์ในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินและน้ำ วัตถุประสงค์ย่อยของงานวิจัยนี้ได้แก่

1. ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 เพื่อผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ
2. พัฒนาวิธีการผลิตสูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน
3. พัฒนาวิธีการใช้สูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ในการบำบัดดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน
4. พัฒนาวิธีการใช้สูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 โดยการตรึงเซลล์สำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 เพื่อผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของ RN402 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ และการตรวจติดตามการมีอยู่ของ RN402 โดยวิธีทางชีวโมเลกุล ซึ่งประกอบไปด้วยงานวิจัยดังนี้ ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนทรีนและไพรีนของ RN402 ตรวจสอบตำแหน่งของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนส และตรวจหาจำนวนชุดของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนส

1.3.2 พัฒนาการผลิตสูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และการประยุกต์ใช้บำบัดดินปนเปื้อนไพลีน

งานวิจัยในขั้นตอนนี้พัฒนาวิธีการผลิตสูตรน้ำของ RN402 และศึกษาประสิทธิภาพของสูตรน้ำของ RN402 ในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ รวมทั้งการประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำในการบำบัดดินปนเปื้อนไพลีน การตรวจติดตามการมีอยู่ของ RN402 โดยวิธีทางชีวโมเลกุล และการประเมินต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ และการบำบัดดินปนเปื้อนไพลีน ซึ่งประกอบไปด้วยงานวิจัยดังนี้ การผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของ RN402 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตรน้ำในการย่อยสลายไพลีนในระบบนิเวศจำลองดิน ตรวจติดตามการมีอยู่ของ RN402 ในระบบนิเวศจำลองดินโดยวิธี PCR-DGGE และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสด้วยวิธี real-time PCR

1.3.3 พัฒนาการใช้สูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 โดยการตรึงเซลล์สำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำในการบำบัดน้ำเสียในสิ่งแวดล้อม จำเป็นต้องใช้แบคทีเรียสูตรน้ำจำนวนมาก เนื่องจากสภาพแวดล้อมในธรรมชาติที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียอาจทำให้แบคทีเรียตาย และต้องใช้แบคทีเรียจำนวนมากเพื่อใช้ในการบำบัด ดังนั้นการตรึงเซลล์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำในการบำบัดน้ำเสีย โดยขั้นตอนนี้ประกอบไปด้วยงานวิจัยดังนี้ คัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์แบคทีเรียสูตรน้ำ ทดสอบการดูดซับน้ำมันของวัสดุตรึง ทดสอบผลของความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง RN402 ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบประสิทธิภาพในการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึง RN402 และตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

1.3.4 ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยเซลล์ตรึงของแบคทีเรียสูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ในระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง

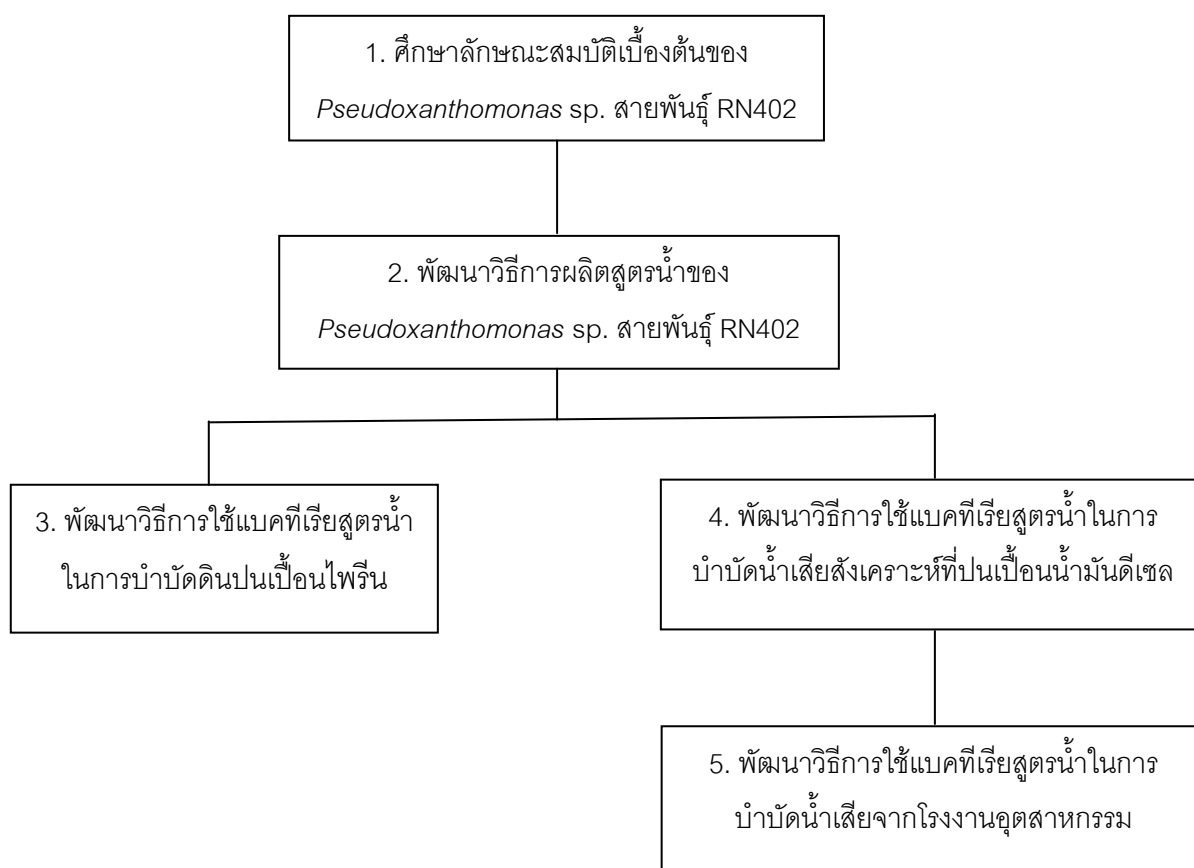
การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง RN402 ในระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางเพื่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม มีขั้นตอนการวิจัยดังนี้ ศึกษาลักษณะสมบัติของน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรม ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางเป็น

แบคทีเรียตรึงบนวัสดุยึดเกาะที่เตรียมจากแบคทีเรียสูตรน้ำ ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง และศึกษาการออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมของเซลล์ตรึงด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. แบคทีเรียสูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน
2. ทราบวิธีการใช้แบคทีเรียสูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ใช้ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน
3. ทราบวิธีการใช้แบคทีเรียสูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ใช้ในการบำบัดดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

1.5 ภาพรวมของงานวิจัย



บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

2.1 ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ประเทศไทยใช้ประโยชน์จากปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในหลายด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในรูปของเชื้อเพลิงเหลว ซึ่งถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงพลังงานในภาคคมนาคมขนส่ง ภาคอุตสาหกรรม หรือการใช้ผลิตภัณฑ์จากการกลั่นน้ำมันเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมปิโตรเคมีภัณฑ์ ต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมปิโตรเคมีภัณฑ์ขั้นต้น ซึ่งเป็นการผลิตโมโนเมอร์ต่างๆ เช่น เบนซีน โทลูอีน ไซลีน และ อุตสาหกรรมปิโตรเคมีภัณฑ์ขั้นต่อเนื่อง ซึ่งเป็นการผลิตพอลิเมอร์ เช่น พลาสติก เป็นต้น ในปัจจุบันประเทศไทยจึงมีอุตสาหกรรมที่หลากหลายที่เกี่ยวข้องกับปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น กลุ่มอุตสาหกรรมโรงกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมเพื่อแยกน้ำมันดิบ และกลุ่มอุตสาหกรรมปิโตรเคมีภัณฑ์ ซึ่งในกระบวนการผลิตและการใช้ผลิตภัณฑ์ของอุตสาหกรรมเหล่านี้ ก่อให้เกิดน้ำเสียที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (petroleum hydrocarbon) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน หลากหลายชนิด ตัวอย่างปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้แก่ น้ำมันดิบ ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน เป็นต้น โดยทั่วไปน้ำมันดิบประกอบด้วยคาร์บอน 82-87% ไฮโดรเจน 12-15% และสารอื่นๆ ประกอบด้วย เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน กำมะถัน (Schobert, 1999) สารไฮโดรคาร์บอนที่สำคัญที่ประกอบ ในน้ำมันดิบ ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว (saturate hydrocarbon) อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) เรซิน (resin) และ แอสฟัลทีน (asphaltene) (Speight, 1999) โดย โครงสร้างของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิดแสดงในรูปที่ 2.1

ไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว

ไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว เป็นสารไฮโดรคาร์บอนโดยมีพันธะระหว่างคาร์บอนและคาร์บอน เป็นพันธะเดี่ยว เป็นสารไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่มีขั้ว (non-polar hydrocarbon) ซึ่งไฮโดรคาร์บอน ชนิดอิ่มตัวถูกพบมากที่สุด ในน้ำมันดิบประมาณ 70% ของน้ำหนัก ประกอบด้วย อัลเคน (alkane) ทั้งแบบโซ่ตรง (straight chain) แบบโซ่กิ่ง (branched chain) และไซโคลอัลเคน (cycloalkanes) แบบวงแหวน (Hyne, 2001; Speight, 1999)

อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

ไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว มีโครงสร้างหลักเป็นวงเบนซีน (benzene ring) ประกอบด้วย คาร์บอน 6 อะตอม โดยต่อเป็นวงด้วยพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยว อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนมี ประมาณ 15% ของน้ำหนักน้ำมันดิบ ประกอบด้วย เบนซีน และอนุพันธ์ของเบนซีน โดยอนุพันธ์ ของเบนซีน ได้แก่ สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic

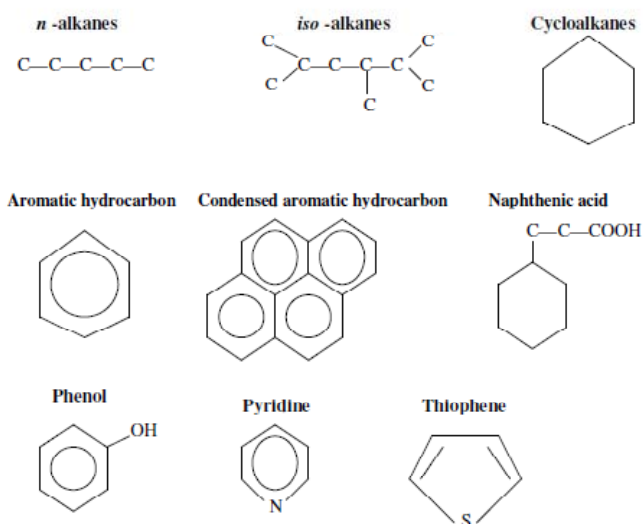
hydrocarbons, PAHs) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่สองวงขึ้นไป เช่น แนพทาลิน ฟีนานทรีน ไพรีน เบนโซ[เอ]ไพรีน เป็นต้น ทั้งนี้สาร PAHs องค์ประกอบหลักที่สำคัญ ที่มีความเป็นพิษ ซึ่ง PAHs หลายชนิดมีความเป็นพิษ และเป็นสารเนี่ยวนำก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ก่อมะเร็ง และก่อให้เกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์ของสิ่งมีชีวิต (Peng และคณะ, 2008 และ Haritash และ Kaushik, 2009)

เรซิน

ไฮโดรคาร์บอนชนิดมีขั้วซึ่งเกิดจากประกอบไนโตรเจน ออกซิเจน กำมะถัน เรซินมีน้ำหนักมวลโมเลกุลมากกว่าไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัวและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน แต่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลน้อยกว่าแอสฟัลทีน (<1000 กรัม/โมล) เรซินทำหน้าที่เป็นตัวกระจายอนุภาคของแอสฟัลทีนในน้ำมันดิบ (Schorling และคณะ, 1999; Boukir และคณะ, 2001)

แอสฟัลทีน

ไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนซึ่งประกอบด้วยกำมะถัน (0.3–10.3%), ออกซิเจน (0.3–4.8%), ไนโตรเจน (0.6–3.3%), และโลหะ ได้แก่ เหล็ก นิกเกิล และวานาเดียม มีน้ำหนักมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,000-20,000 กรัม/โมล (Boukir และคณะ, 2001 Buch และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.1 ตัวอย่างโครงสร้างของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันดิบ (Alloway และ Ayres, 1993)

2.2 การปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันพบปัญหาการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมของประเทศไทยมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณแหล่งอุตสาหกรรม เช่น กรมควบคุมมลพิษได้สำรวจคุณภาพน้ำผิวดินและน้ำทะเลในพื้นที่ตำบลมาตาพุดซึ่งเป็นนิคมอุตสาหกรรมเมื่อเดือนกุมภาพันธ์ 2551 พบว่ามีปริมาณของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเกินค่ามาตรฐานบริเวณปากคลองระบายน้ำของนิคมอุตสาหกรรมมาตาพุด (กรมควบคุมมลพิษ, 2553) และในปีพ.ศ. 2554 กรณีของคลองซากหมากอำเภอมาตาพุดซึ่งอยู่บริเวณใกล้เคียงที่ตั้งนิคมอุตสาหกรรมตรวจพบตะกอนสีดำจากการปนเปื้อนของสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและโลหะหนักบางชนิดในปริมาณที่สูงส่ง และกลิ่นเหม็นน่าเกิดสภาพเสื่อมโทรม ส่งผลต่อการใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำและวิถีชีวิตของคนในชุมชน (กรมควบคุมมลพิษ, 2554) ทั้งนี้ตามประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 27 (พ.ศ. 2549) เรื่องกำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล ซึ่งตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่มที่ 124 ตอนที่ 11 ง วันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2550 หน้า 123-133 ได้กำหนดให้มีปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนไม่เกิน 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร และยังมีรายงานการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนบริเวณปากแม่น้ำแฉมหนูจังหวัดจันทบุรี และปากแม่น้ำระยองจังหวัดระยอง (ชุดีไพบุลย์กิจกุลและคณะ, 2551) ในปี พ.ศ. 2553 ได้สำรวจการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนรวมทั้งหมด (total petroleum hydrocarbon, TPH) ในน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลประเทศไทยทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน พบว่าบริเวณแหล่งชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรมมีการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในปริมาณสูง เฉลี่ยประมาณ 1.2 และ 1.5 ไมโครกรัม/ลิตร ของฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน ตามลำดับ และจากสถิติที่ผ่านมาพบการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่วนหนึ่งมาจากกิจกรรมของมนุษย์ (ศุภวัตร กาญจน์อติเรกกลาก และคณะ, 2554) โดยสามารถแบ่งสาเหตุของการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

1) ภาคอุตสาหกรรม

โดยจากข้อมูลจากกรมโรงงานอุตสาหกรรมพบว่าปริมาณการผลิตกากของเสียจากน้ำมันหล่อลื่นต่าง ๆ ที่ใช้แล้ว หรือกากตะกอนน้ำมัน หรือของเสียผสมน้ำ-น้ำมัน มาจากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตส่วนประกอบยานยนต์ โรงรีดเหล็ก โรงผลิตอลูมิเนียม โรงผลิตชิ้นส่วนคอมพิวเตอร์ (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2553) โดยน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมาจากน้ำชะล้างเครื่องจักรซึ่งใช้จาระบีและน้ำมันหล่อลื่นในอุปกรณ์ต่างๆ และระบบหล่อเย็นของเครื่องจักรในอุตสาหกรรมผลิตชิ้นส่วนโลหะต่างๆ ที่ใช้น้ำมันคูลแลนต์ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำมันอยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้น้ำเสียมีการปนเปื้อนปิโตรเลียม

ไฮโดรคาร์บอนจำนวนมาก ซึ่งน้ำเสียในรูปแบบอิมัลชัน (emulsion) ของน้ำมันและน้ำโดยมีน้ำมันคูลแลนท์เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) โดยน้ำมันหรือตัวทำละลายที่ปนเปื้อนในน้ำเสียเหล่านี้ ได้แก่ น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันดีเซล น้ำเบนซิน ยางมะตอย เฮกเซน และ คลอโรฟอร์ม เป็นต้น (เอ็นแอนด์พีเคมิคัลแอนด์วานซ์. 2553)

สำหรับการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น น้ำเสียจากแหล่งต่างๆ ในโรงกลั่นน้ำมันซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นสองประเภทใหญ่ๆ คือ น้ำเสียที่ไม่มีน้ำมันปน โดยทั่วไปมีคุณสมบัติได้ตามมาตรฐานควบคุม และจะถูกระบายลงสู่บ่อกักน้ำก่อนระบายออกสู่ภายนอก และน้ำเสียที่มีน้ำมันปน ซึ่งจะต้องผ่านขั้นตอนการบำบัดทางกายภาพ ก่อนผ่านเข้าสู่ระบบบำบัดชีวภาพ เช่น การบำบัดด้วยระบบตะกอนเร่ง และลงสู่บ่อกักน้ำ ก่อนระบายออกสู่ภายนอก ทั้งนี้ น้ำเสียจากอุตสาหกรรมโรงกลั่นน้ำมันส่วนใหญ่จะมีมลพิษประเภทน้ำมันปิโตรเลียมจากกระบวนการผลิตที่ติดปนไปกับน้ำเสีย ดังนั้นโรงกลั่นจึงต้องมีการบำบัดน้ำเสีย เพื่อลดมลสารต่างๆ ให้อยู่ในระดับมาตรฐานควบคุม ดังนี้สำคัญที่ใช้กำหนดคุณภาพของน้ำทิ้ง ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณไขมันและน้ำมัน ปริมาณของแข็ง ปริมาณความเข้มข้นของสารอินทรีย์ ปริมาณสารไนโตรเจน ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ปริมาณสารโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว ทองแดง เหล็ก พรอท นิกเกิล และแคดเมียม เป็นต้น และ ปริมาณสารพิษต่างๆ เช่น ดีดีที ฟินอล สารก่อมะเร็งต่างๆ เป็นต้น นอกจากนี้ของเสียจากโรงงานกลั่นน้ำมันยังมีกากตะกอนที่ปนเปื้อนน้ำมัน ที่มาจากก้นถังน้ำมันดิบและจากระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งจะกำจัดโดยวิธีเผาในเตาเผา โดยก่อนเผาจะแยกเอาน้ำและน้ำมันออกจากกากของเสียก่อน ส่วนกากเมื่อเผาแล้วจะกลายเป็นขี้เถ้า ซึ่งจะนำไปฝังกลบหรือนำไปกำจัดนอกโรงกลั่น โดยศูนย์บริการกำจัดกากอุตสาหกรรมต่อไป

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่รายงานว่า การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ ทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ (Gryta และคณะ, 2001) ดังนั้นทางโรงงานอุตสาหกรรมจึงมีการกำจัดน้ำมันออกจากน้ำเสียโดยวิธีการที่นิยมใช้ในเบื้องต้น คือ วิธีทางกายภาพ และเคมี ซึ่งวิธีทางกายภาพ เช่น การดูดซับโดยใช้คาร์บอนกัมมันต์ หรือซีโอไลต์ ส่วนวิธีทางเคมี เช่น การใช้สารเคมีเพื่อไปตัดขั้วของตัวอิมัลซิไฟเออร์และน้ำมันที่ละลายน้ำ ทำให้แยกส่วนน้ำกับน้ำมันออกจากกัน และ การใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติในการรวมตัวของหยดน้ำมัน ให้รวมตัวใหญ่ขึ้นเพื่อให้ไขมันแยกออกจากส่วนน้ำได้ง่ายขึ้น (Ahmadun และคณะ, 2009) แต่เนื่องจากวิธีการเหล่านี้มีข้อด้อยในเรื่องค่าใช้จ่ายที่มีราคาสูง และไม่สามารถกำจัดน้ำมันได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งอาจทำให้มีน้ำมันจากระบบบำบัดกลับมาปนเปื้อนในน้ำเสียได้อีกครั้ง (Amro, 2004 และ Hong และคณะ, 2005) ทำให้เกิดการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียที่ไม่มีประสิทธิภาพ (Zhang และคณะ, 2012)

2) ภาคการคมนาคมขนส่ง

รายงานการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มีสาเหตุมาจากอุบัติเหตุ เช่น กรณีเรือบรรทุกน้ำมันดีเซลล่มบริเวณเกาะราชาใหญ่ จังหวัดภูเก็ต ส่งผลให้น้ำมันรั่วออกออกมาในทะเล (คมชัดลึก, 2554) และจากรายงานการสำรวจการปนเปื้อน PAHs ในดินตะกอนชายฝั่งของประเทศไทย ทั้งภาคตะวันออกและภาคใต้ และในดินตะกอนแม่น้ำเจ้าพระยาซึ่งครอบคลุมจังหวัดอยุธยา ปทุมธานี และนนทบุรี ในปี 2546 พบการปนเปื้อน PAHs ตั้งแต่ 3 ถึง 7 วงเบนซีน ตั้งแต่ 6 - 8,399 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งดินตะกอน (Boonyatumanond และคณะ, 2006) และยังมีรายงานพบการสะสมปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสัตว์ทะเล เช่น ไล่เดือนทะเล ส่วนในหอยตลับลาย ปลาเห็ดโคน ปลาทรายแดง และปลาทรายขาว บริเวณอ่าวเพ จังหวัดระยองในช่วงเดือนมิถุนายนและกันยายน 2543 (จุมพล สงวนสิน และคณะ, 2548)

สำหรับในภาคการคมนาคมขนส่ง สถานีบริการน้ำมันซึ่งมีกิจกรรมเปลี่ยนถ่ายน้ำมันเครื่องและการล้างรถ ก็เป็นแหล่งที่ก่อให้เกิดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (Panpanit และคณะ, 2001 และ Tatong และ Pinyakong, 2008) น้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้จำเป็นต้องได้รับการบำบัดอย่างถูกวิธีก่อนปล่อยออกสู่ธรรมชาติ เนื่องจากปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำเสียดังกล่าวประกอบไปด้วยสารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม เช่น PAHs (Peng และคณะ, 2008 และ Haritash และ Kaushik, 2009)

ทั้งนี้การปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในธรรมชาติและการสะสมในสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญ และก่อให้เกิดผลกระทบต่อมนุษย์ เกิดการสะสมสารพิษเหล่านี้ในสิ่งมีชีวิตในห่วงโซ่อาหาร ที่เรียกว่า การเพิ่มขยายทางชีวภาพ (biomagnifications) ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์ (Zhou และคณะ, 2008) ซึ่งความเป็นพิษของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนถูกกล่าวในหัวข้อต่อไป

2.2.1 ความเป็นพิษของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างโมเลกุลมากกว่าร้อยละ 60 ความเป็นพิษของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนส่วนใหญ่มาจากสาร 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม BTEX ที่ประกอบด้วย เบนซีน (benzene) โทลูอีน (toluene) เอธิลเบนซีน (ethylbenzene) และ ไซลีน (xylenes) และกลุ่ม PAHs (Jiang และคณะ, 2010)

BTEX เป็นสารอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Organic Compounds, VOCs) มีอยู่ในน้ำมันเชื้อเพลิง และเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมประเภทปิโตรเคมี พลาสติก และถูกใช้เป็นตัวทำละลายในโรงงานอุตสาหกรรมหลายประเภท BTEX มีอันตรายต่อระบบประสาทส่วนกลาง ระบบ

ทางเดินหายใจ ระบบฮอร์โมนระบบสืบพันธุ์ เป็นอันตรายต่อทารกในครรภ์ โดยเฉพาะเบนซีนเป็นสารก่อมะเร็ง (ATSDR, 1999; IARC, 1999)

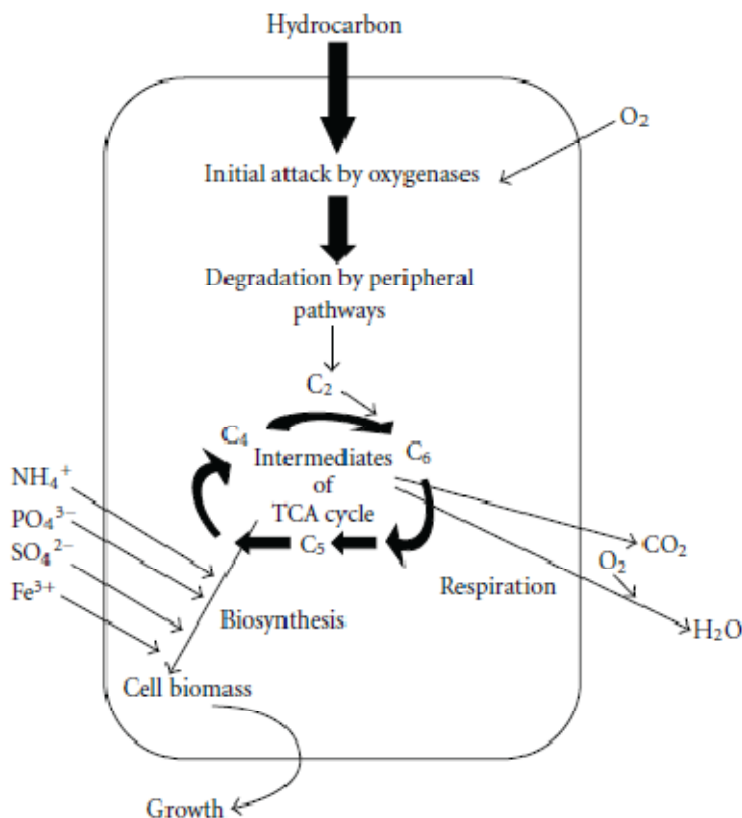
PAHs มีอยู่ในน้ำมันเชื้อเพลิง น้ำมันดิบ สารรักษาเนื้อไม้ และเกิดขึ้นจากกระบวนการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ จากกระบวนการตามธรรมชาติ เช่น ไฟไหม้ป่า หรือจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิง ถ่านหิน ไม้ การประกอบอาหารในครีวเรือน และจากควันบุหรี่ PAHs มีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร ในรูปผลึกของแข็ง สลายตัวได้ช้า เป็นสารไม่มีขั้วจึงละลายได้ดีในไขมัน แต่ละลายน้ำน้อยมาก ทำให้สะสมอยู่ในชั้นไขมันของสิ่งมีชีวิตได้ดี เช่น การปนเปื้อน PAHs ในแหล่งน้ำจะเกิดสะสมอยู่ในแพลงตอนสัตว์ สัตว์น้ำต่าง เมื่อ PAHs ปนเปื้อนในดินจะถูกดูดซับกับสารอินทรีย์ได้อย่างรวดเร็วทำให้ PAHs มีความคงตัวมากขึ้นและยากต่อการกำจัด จึงส่งผลให้มีการปนเปื้อน ตกค้างและสะสมของ PAHs อยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน (Wild และ Jones, 1995; Gan และคณะ, 2009; Jiang และคณะ, 2010; Yang และคณะ, 2010) หลายชนิดมีความเป็นพิษเป็นอันตรายต่อทารกในครรภ์ คลอดก่อนกำหนด ทารกมีน้ำหนักตัวน้อย แท้ง และเป็นสารเหนียวน่าก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ มะเร็ง ได้แก่ เบนโซ[เอ]แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน และไดเบนซี[เอ,เอช]แอนทราซีน และ PAHs อีกหลายชนิดที่อาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์ ได้แก่ แนพทาลีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนธิน เบนโซ[เค]ฟลูออแรนธิน เบนโซ[เจ]ฟลูออแรนธิน ไดเบนโซ[เอ,เอช]ไพรีน ไดเบนโซ [เอ,แอล]ไพรีน ไดเบนโซ[เอ,อี]ไพรีน ไดเบนโซ[เอ,ไอ]ไพรีน เป็นต้น (ATSDR, 1999; IARC, 1999; Peng และคณะ, 2008; Wu และคณะ, 2010)

ดังนั้นเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในธรรมชาติ ซึ่งอาจเกิดจากการปล่อยน้ำเสียจากอุตสาหกรรม หรือจากสถานีบริการน้ำมันลงสู่สิ่งแวดล้อม จึงจำเป็นต้องมีวิธีการบำบัดน้ำเสียอย่างถูกวิธี

2.3 การบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยชีววิธี

เพื่อแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม วิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน คือ การบำบัดโดยชีววิธี (bioremediation) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนรูปแบบของสารพิษให้อยู่ในรูปไม่เป็นพิษหรือเป็นพิษน้อยลง หรืออาจเปลี่ยนรูปของสารจากสารอินทรีย์เป็นสารอนินทรีย์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ และ น้ำ โดยกระบวนการดังกล่าวเรียกว่า mineralization โดยอาศัยการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย หรือ พืช เป็นต้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน (Boopathy, 2000; Vidali, 2001; Haritash และ Kaushik, 2009; Barreto และคณะ 2010) นอกจากนี้การบำบัดโดยชีววิธีเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและใช้ต้นทุนต่ำกว่าวิธีการบำบัดทางกายภาพ เช่น การลอยน้ำมัน (skimmer) และทางเคมี เช่น การใช้สารลดแรงตึงผิว

(surfactants) การใช้สารเคมีขจัดคราบ (dispersants) (Barreto และคณะ 2010; Tyagi และคณะ 2011) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงการบำบัดโดยชีววิธีในสภาวะที่มีอากาศ และหลักการที่สำคัญเกี่ยวกับการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Das และ Chandran, 2011)

การบำบัดโดยชีววิธีที่นิยมใช้ในการบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยชีววิธี มีหลายวิธี เช่น (Boopathy, 2000; Vidali, 2001)

วิธีการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (bioaugmentation) เป็นการเติมจุลินทรีย์ที่ทดสอบแล้วว่ามีความมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ เพื่อเพิ่มการย่อยสลายสารพิษในบริเวณที่มีการปนเปื้อน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายนั้นว่ามีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้

วิธีการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ (biostimulation) การเติมสารอาหารหรือสารใดๆ ได้แก่ ปุ๋ย สารลดแรงตึงผิว เพื่อปรับสภาวะแวดล้อมให้เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์และกระตุ้น

กิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ดั้งเดิมในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารพิษ ทำให้จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีขึ้นหรือทำให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนได้มากขึ้น

วิธีคอมโพสดี้ง (composting) ใช้บำบัดดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนซึ่งถูกผสมด้วยวัสดุทางการเกษตรในลักษณะกองปุ๋ยหมัก ร่วมกับการให้อากาศ เพื่อกระตุ้นการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษนั้นได้ นอกจากความร้อนที่เกิดจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมักช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพิษ

ตัวอย่างรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินและน้ำโดยชีววิธี ได้แก่ Zeng และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลาย PAHs ที่ปนเปื้อนในดินโดยใช้เซลล์อิสระ *Mycobacterium* sp. NJS-1 และ NJS-P ซึ่งทดลองในดิน 50 กรัม ที่มีฟลูออแรนทรีนและไพรีนปนเปื้อนเท่ากับ 1,122 และ 48,490 ไมโครกรัม/กิโลกรัม โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มประมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการกำจัดฟลูออแรนทรีนเท่ากับ 45 และ 54 % ตามลำดับ และประสิทธิภาพในการกำจัดไพรีนเท่ากับ 90 และ 87 % ตามลำดับ

Xu และ Lu (2010) ศึกษาการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบในประเทศจีน โดยใช้แบคทีเรียท้องถิ่นและเติมเปลือกถั่วเพื่อเป็นวัสดุตรึงในดิน 5 กิโลกรัม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เท่ากับ 61 % จากความเข้มข้นปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 29,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

Reddy และคณะ (2011) ศึกษาการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตะกอนสลัดจ์จากกระบวนการบำบัดน้ำเสียจากโรงกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมในประเทศอินเดีย ในระบบบำบัดแบบ slurry phase reactor ขนาด 1 ลิตร ด้วยหัวเชื้อจากดินน้ำเสียชุมชนและดิน โดยการเติมอากาศและควบคุม pH เท่ากับ 7 พบว่า ระบบบำบัดมีประสิทธิภาพในการกำจัดอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน อะลิฟาติก และ แอสฟัลทีน เท่ากับ 48.12 47.31 และ 26.66% ตามลำดับ จากความเข้มข้น PAHs เริ่มต้น 1,569 ไมโครกรัม/ลิตร ในระยะเวลา 10 วัน

Bao และคณะ (2011) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบในน้ำทะเลสังเคราะห์ในระบบนิเวศจำลองขนาดใหญ่ ขนาด 840 ลิตร ด้วยหัวเชื้อกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบซึ่งประกอบด้วย *Ochrobactrum* sp. สายพันธุ์ N1 *Brevibacillus parabrevis* สายพันธุ์ N2 *B. parabrevis* สายพันธุ์ N3 และ *B. parabrevis* สายพันธุ์ N4 พบว่า ระบบบำบัดมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบเท่ากับ 51% จากความเข้มข้นน้ำมันดิบเริ่มต้น 2% (w/v) ในระยะเวลา 10 วัน

2.3.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยชีววิธี

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินและน้ำด้วยกระบวนการบำบัดโดยชีววิธี แบ่งออกเป็น 3 ปัจจัย ได้แก่ 1) ธรรมชาติของสารปนเปื้อน 2) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และ 3) ลักษณะของจุลินทรีย์ (Abbasnezhad และคณะ, 2011) โดย สรุปรายละเอียดของปัจจัยต่างที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดโดยชีววิธีดังนี้

1) ธรรมชาติของสารปนเปื้อน

องค์ประกอบทางเคมีของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยทั่วไปด้วยโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรคาร์บอนกลุ่มต่างๆ ส่งผลต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถเรียงลำดับความยากต่อการย่อยสลายจากง่ายไปยากตามลำดับดังนี้ แอลเคนไซตรง > แอลเคนไซกิ่ง > แอลคีนไซกิ่ง > แอลคิลอะโรมาติกมวโมเลกุลต่ำ > โมโนอะโรมาติก > แอลเคนวงแหวน > PAHs >> แอสฟัลทีน (Van Hamme และคณะ, 2003)

สภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพ (Bioavailability) ของสาร ได้แก่ สามารถในการละลายน้ำของสาร การแพร่กระจายของสารเมื่อปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งไฮโดรคาร์บอนมีความสามารถละลายน้ำได้ต่ำ ทำให้มีสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพต่ำจึงทำให้มีอัตราการย่อยสลายต่ำมาก (Löser และคณะ, 1999; Johnsen และคณะ, 2005; Tyagi และคณะ 2011) การเพิ่มสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพของไฮโดรคาร์บอนทำโดยการเติมสารลดแรงตึงผิวทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ (Yemashova และคณะ, 2007; Sarma และ Pakshirajan, 2011)

ภาวะทางกายภาพของน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน เมื่อเกิดการปนเปื้อนของน้ำมันลงสู่แหล่งน้ำ เกิดการแผ่กระจายและกลายเป็นชั้นฟิล์มบางๆ เมื่อลมและคลื่นในสิ่งแวดล้อมอาจก่อให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำมันและน้ำทำให้มีพื้นที่ผิวมากขึ้น ทำให้จุลินทรีย์เข้าถึงสารได้มากขึ้น ช่วยเพิ่มการย่อยสลายน้ำมัน อย่างไรก็ตามหากเกิดอิมัลชันขนาดใหญ่ทำให้พื้นที่ผิวลดลงทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ยาก (Leahy และ Colwell, 1990) ในกรณีที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันลงสู่ดิน องค์ประกอบและลักษณะของดินส่งผลต่อการย่อยสลาย ในดินที่มีอินทรีย์สารจำนวนมากจะสามารถดูดซับ PAHs และทำให้ PAHs มีความคงตัวมากขึ้น จึงทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์ต่ำลง (Yang และคณะ, 2010)

ความเข้มข้นของน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน น้ำมันที่มีความเข้มข้นสูงจะก่อตัวเป็นชั้นหนาทำให้การละลายของออกซิเจนสู่น้ำลดลง ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ใช้อากาศไม่สามารถย่อยสลายสารพิษได้ และความเข้มข้นสูงของน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอนทำให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์ ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และการลดลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Leahy และ Colwell, 1990; van Hamme และคณะ, 2003; Agarry และคณะ, 2008)

2) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

อุณหภูมิ มีผลต่อลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันและอัตราเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ ส่งผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินอยู่ในช่วง 30–40 °ซ สำหรับแหล่งน้ำอยู่ในช่วง 20–30 °ซ และสำหรับน้ำทะเลอยู่ในช่วง 15-20 °ซ (Leahy และ Colwell, 1990; Das และ Chandran, 2011)

ออกซิเจน จากรูปที่ 2.2 แสดงให้เห็นว่าขั้นแรกของการย่อยสลายของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย และรา ในภาวะมีอากาศ (aerobic conditions) จำเป็นต้องใช้ ออกซิเจนเป็นตัวออกซิไดส์สารดังกล่าว โดยเอนไซม์ในกลุ่มออกซิจีเนส (oxygenases) เพื่อนำสู่การย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในขั้นต่อไป ดังนั้นออกซิเจนจึงสำคัญอย่างยิ่งต่อการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (Leahy และ Colwell, 1990; Haritash และ Kaushik, 2009; Das และ Chandran, 2011)

สารอาหาร การย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำมักมีอัตราการย่อยสลายต่ำ เนื่องจากปริมาณสารอาหารในแหล่งน้ำมีน้อยเกิดภาวะไม่สมดุลของสารอาหาร ดังนั้นจึงต้องมีการปรับอัตราส่วนระหว่างของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (C:N:P) ให้เหมาะสม โดยเติมไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ในรูปแบบต่างๆ เช่น สารเคมี หรือ ปุ๋ยเคมี เพื่อกระตุ้นกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ (Leahy และ Colwell, 1990; Mukred และคณะ, 2008)

ความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์โดยทั่วไป ควรอยู่ในความเป็นกรด-ด่างที่ใกล้เคียงความเป็นกลาง ประมาณ 6-7 ถ้าความเป็นกรด-ด่างในสิ่งแวดล้อมสูงหรือต่ำเกินไปทำให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโต (Yemashova และคณะ, 2007; Tavassoli และคณะ, 2012)

3) ลักษณะของจุลินทรีย์

ลักษณะของหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในกรณีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการบำบัดดินและน้ำปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ซึ่งหัวเชื้อจุลินทรีย์มีทั้งแบบที่เป็นเชื้อเดี่ยวและเชื้อกลุ่ม โดยหัวเชื้อจุลินทรีย์แบบกลุ่มจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้สูงและรวดเร็วกว่าแบบจุลินทรีย์เดี่ยว รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีความหลากหลาย และสามารถย่อยสลายสารที่ความเข้มข้นสูงได้กว่า (Kim และคณะ, 2009; Mroziak และ Piotrowska-Seget, 2010; Lawniczak และคณะ, 2011)

การปรับตัวของจุลินทรีย์ เมื่อเกิดการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมนั้นมีการปรับตัวโดยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถ

ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนได้ ทำให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย การปรับตัวของจุลินทรีย์อาจเกิดจากการสัมผัสสารปนเปื้อนทำให้เกิดการชักนำให้สร้างเอนไซม์เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการย่อยสลาย (Leahy และ Colwell, 1990; Haritash และ Kaushik, 2009)

การเกิดไฮโดรโฟบิกและการสร้างสารลดแรงตึงผิว (hydrophobicity and biosurfactant) เมื่อเซลล์จุลินทรีย์สามารถเกิดไฮโดรโฟบิกกับน้ำมันได้สูง ทำให้จุลินทรีย์สามารถเข้าถึงน้ำมันได้มากขึ้น ส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการย่อยสลายน้ำมัน และการสร้างสารลดแรงตึงผิวของจุลินทรีย์ในรูปแบบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถช่วยเพิ่มสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพของไฮโดรคาร์บอน เป็นการเพิ่มพื้นผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์และน้ำมัน ทำให้อัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้น (Abbasnezhad และคณะ, 2011; Das และ Chandran, 2011)

นอกจากนี้การถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายจากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพไปยังแบคทีเรียดั้งเดิม โดยการถ่ายโอนยีนในแนวขวางแบคทีเรียดั้งเดิมจะปรับตัวและรวมยีนที่ได้รับมาให้เข้าไปอยู่บนดีเอ็นเอของแบคทีเรียดั้งเดิม ซึ่งกระบวนการนี้จัดเป็นวิวัฒนาการของแบคทีเรียและยังทำให้เกิดแบคทีเรียกลุ่มใหม่ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษที่หลากหลายมากขึ้นจากแบคทีเรียดั้งเดิม และเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษให้กับแบคทีเรียดั้งเดิม (Springael และคณะ, 2004; Hedlund และ Staley, 2006; Jussila และคณะ, 2007; Sobecky และคณะ, 2009)

2.4 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจัดเป็นปัจจัยสำคัญในการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และจากรายงานวิจัยจำนวนมากได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น ดิน ดินตะกอน น้ำใต้ดิน ตะกอนสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ชนิดของแบคทีเรีย	ความสามารถในการย่อยสลาย	เอกสารอ้างอิง
อัลเคนและน้ำมันปิโตรเลียม		
<i>Acinetobacter</i> sp.	น้ำมันดีเซล	Lee และคณะ (2010)
<i>Gordonia</i> sp. และ <i>Rhodococcus</i> sp.		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Serratia marcescens</i>	น้ำมันดิบ น้ำมันดีเซล น้ำมันก๊าด	Wongsa และคณะ (2004)
<i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ F92	น้ำมันหล่อลื่น	Quek และคณะ (2006)

ชนิดของแบคทีเรีย	ความสามารถในการย่อยสลาย	เอกสารอ้างอิง
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	น้ำมันดีเซล	Huang และคณะ (2008)
<i>Acinetobacter</i> sp. สายพันธุ์ XA05 และ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ FG03	น้ำมันดีเซล	Liu และคณะ (2008)
<i>Alkaligenes</i> sp.	น้ำมันดิบ	Okoro และ Amund (2010)
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> และ <i>Burkholderia cepacia</i>	เฮกซะดีเคน น้ำมันดีเซล	Mohanty และ Mukherji (2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ DQ8	โดโคเซน เตตราดีเคน น้ำมันดิบ น้ำมันดีเซล	Zhang และคณะ (2010)
<i>Achromobacter denitrificans</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Aeromonas hydrophila/caviae</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Rahnella aquatilis</i> และ <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	น้ำมันดีเซล	Lawniczak และคณะ (2011)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> สายพันธุ์ NTU-1	เฮกซะดีเคน น้ำมันดิบ น้ำมันดีเซล พีแนทรีน ไพรีน ฟลูออแรนธิน	Liu และ Liu (2011)
<i>Ochrobactrum</i> sp. สายพันธุ์ N1 <i>Brevibacillus parabrevis</i> สายพันธุ์ N2 <i>B. parabrevis</i> สายพันธุ์ N3	น้ำมันดิบ	Bao และคณะ (2012)
PAHs		
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1	แนพทาลิน พีแนทรีน ไพรีน ฟลูออแรนธิน เบนโซ[เอ]ไพรีน เป็นต้น	Heitkamp และคณะ (1988); Moody และคณะ (2004)
<i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ UW1	พีแนทรีน ไพรีน ฟลูออแรนธิน และ ไครซีน เป็นต้น	Walter และคณะ (1991)
<i>Sphingobium</i> sp. สายพันธุ์ P2	แนพทาลิน อะซีแนพทรีน อะซีแนพทิลีน พีแนทรีน ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออแรนธิน ฟลูออรีน แอนทราซีน และ น้ำมันหล่อลื่น	Pinyakong และคณะ (2000); Supaka และคณะ (2001); Khondee และคณะ (2012)
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Klebsiella</i>	พีแนทรีน	Kim และคณะ (2009)

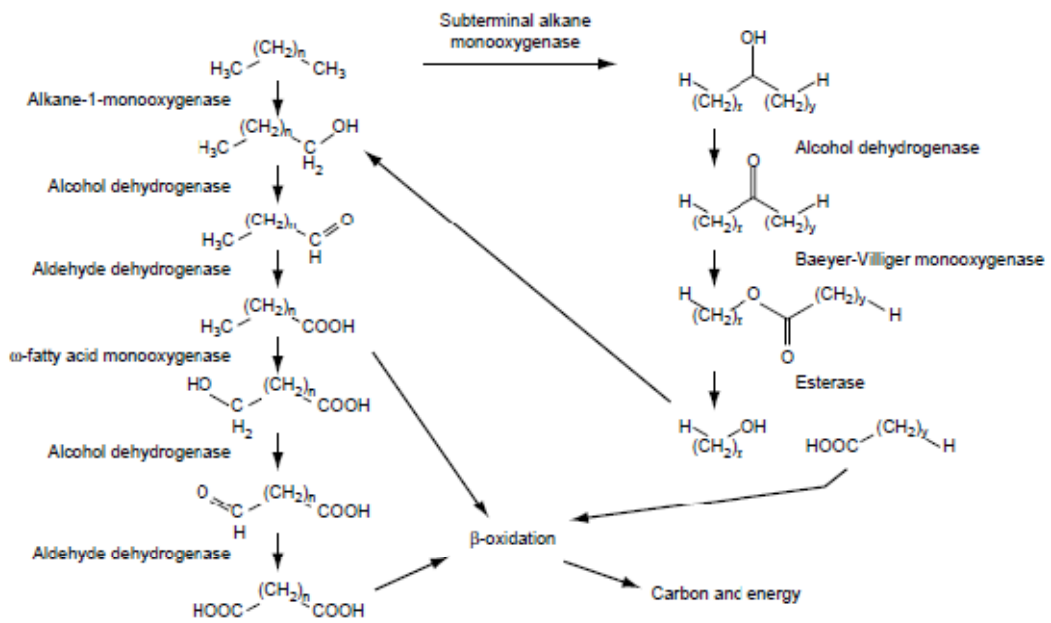
ชนิดของแบคทีเรีย	ความสามารถในการย่อยสลาย	เอกสารอ้างอิง
<i>oxytoca</i> และ <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	ไพลีน	Tiwari และคณะ (2010)
<i>Mycobacterium</i> สายพันธุ์ NJS-1 และ NJS-P	ไพลีน พีแนนทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนธิน และเบนโซ[เอ]ไพลีน	Zeng และคณะ (2010)
<i>Ochrobactrum</i> sp. สายพันธุ์ CH-19	พีแนนทริน	Chang และคณะ (2011)
<i>Achromobacter insolitus</i> สายพันธุ์ MHF ENV IV	แนพธาลีน พีแนนทริน และแอนทราซีน	Janbandhu และคณะ (2011)
<i>Bacillus vallismortis</i> สายพันธุ์ JY3A	ไพลีน	Ling และคณะ (2011)
<i>Brevibacillus</i> sp. สายพันธุ์ PDM-3	แอนทราซีน พีแนนทริน	Reddy และคณะ (2011)
<i>Sphingomonas</i> สายพันธุ์ B22	พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน	Madueño และคณะ (2011)
<i>Streptomyces</i> สายพันธุ์ ERI-CPDA-1	แนพธาลีน พีแนนทริน	Balachandran และคณะ (2012)
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp สายพันธุ์ DMVP2	พีแนนทริน ไพลีน ฟลูออแรนธิน	Patel และคณะ (2012)

2.5 วิธีการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด เช่น แอลเคนแบบไซตรง ไซกิง อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนของแต่ละชนิดโดยแบคทีเรีย จึงต้องอาศัยวิธีการย่อยสลายที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยมีวิธีดังนี้ วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน และวิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (van beilen และคณะ, 2003; Fritsche และ Hofrichiter, 2008)

วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน จากกระบวนการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนที่เป็นอัลเคนโดยแบคทีเรีย ซึ่งอัลเคนที่มีคาร์บอนน้อยกว่า 9 อะตอมเป็นอัลเคนสายสั้นสามารถระเหยออกไป ส่วนอัลเคนสายยาวที่มีคาร์บอนระหว่าง 10 - 24 อะตอม ($C_{10} - C_{24}$) เกิดวิธีการย่อยสลายได้ 2 ทาง โดยเริ่มต้นจากการเติมออกซิเจนที่ตำแหน่งปลาย (terminal) หรือ

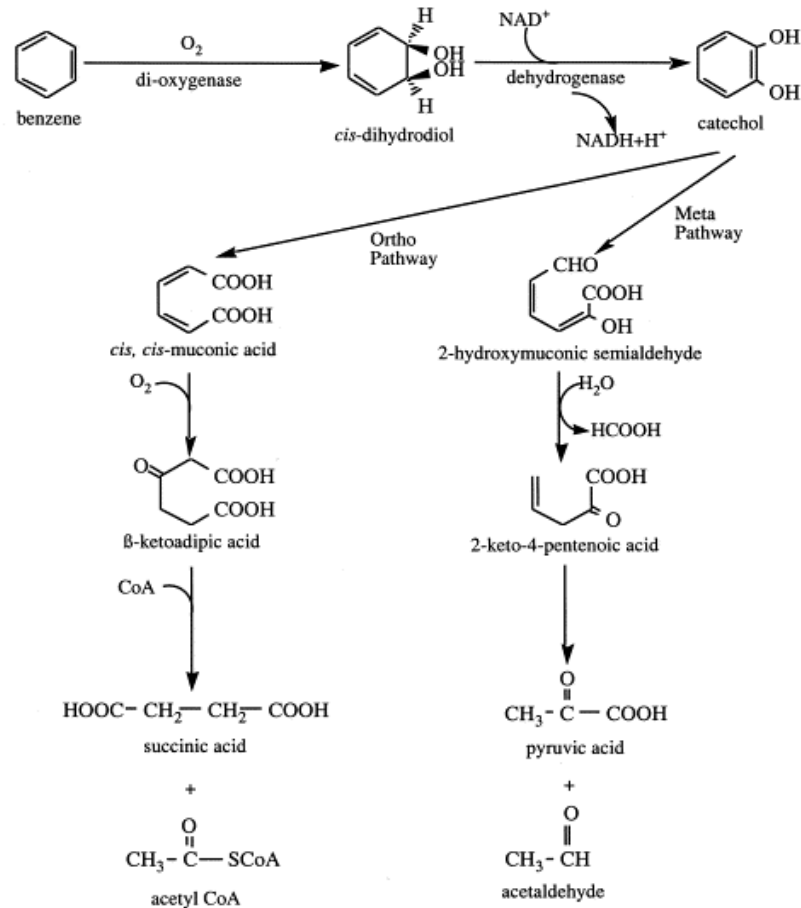
ตำแหน่งถัดจากปลาย (subterminal) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์ โดยอาศัยเอนไซม์อัลเคนโมโนออกซิจีเนส (*n*-alkane monooxygenase) จากนั้น จะเปลี่ยนเป็นแอลดีไฮด์โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และแอลดีไฮด์จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันโดยเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) แล้วเข้าสู่วัฏจักรเบตาออกซิเดชัน (β -oxidation cycle) ต่อไป เกิดการย่อยสลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และมวลเซลล์ ส่วนการย่อยสลายที่ตำแหน่งถัดจากปลาย (subterminal) เริ่มจากอัลเคนถูกออกซิไดซ์ได้เป็นแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ (secondary alcohol) จากนั้นจะเปลี่ยนเมทิลคีโตน (methylketone) และอะซิทิล เอสเทอร์ (acetyl ester) ตามลำดับ จากนั้นจะถูกไฮโดรไลซ์เป็นสาร 2 ตัว คือแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (primary alcohol) และอะซิเตต (acetate) แล้วเข้าสู่วัฏจักรเบตาออกซิเดชันต่อไป (van beilen และคณะ, 2003;Fritsche และ Hofrichter, 2008) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 วิธีการย่อยสลายสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย (Van beilen และคณะ, 2003)

วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย ขั้นแรกของการย่อยสลายสารกลุ่มอะโรมาติกโดยแบคทีเรีย คือ การเติมออกซิเจนแก่คาร์บอนอะตอมในวงเบนซีน โดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) ได้เป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออล (cis-dihydrodiol) จากนั้นถูกย่อยสลายและเปลี่ยนเป็นคาทีคอล (catechol) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งจะเข้าสู่ขั้นตอนการแตกวงอะโรมาติก ซึ่งเกิดขึ้นได้ 2 วิธี คือวิธีเมตา (meta pathway) และวิธีออร์โธ (ortho pathway) แล้ว

เข้าสู่ TCA-cycle ต่อไป (Juhasz และ Naidu, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 และสามารถพบวิถีการย่อยสลายดังกล่าวในแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน



รูปที่ 2.4 วิถีการย่อยสลายสารกลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย (Juhasz และ Naidu, 2000)

2.6 จุลินทรีย์สูตรน้ำ

การใช้ประยุกต์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เพื่อใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ในรูปแบบหัวเชื้อจุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้วิธีการเก็บรักษาที่สามารถคงประสิทธิภาพการย่อยสลายในระยะเวลายาวนาน และหัวเชื้อจุลินทรีย์ต้องอยู่ในสภาวะพร้อมใช้ วิธีการหนึ่งที่มีความน่าสนใจคือ การเตรียมจุลินทรีย์ในรูปสูตรน้ำในของเหลวหรือที่เรียกว่า liquid formulation โดยจุลินทรีย์สูตรน้ำคือเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิตถูกแขวนลอยในของเหลว เพื่อให้อยู่ในสภาวะพร้อมใช้และเก็บรักษาได้ยาวนาน ทั้งยังคง

ประสิทธิภาพอยู่ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีข้อดีหลายประการ เช่น ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและมีความซับซ้อน ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย (Torres และคณะ 2003)

อย่างไรก็ตามการใช้วิธีนี้ในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงหลังการเก็บรักษาและมีประสิทธิภาพในการทำงานเมื่อเวลานานไปใช้นั้นจำเป็นต้องศึกษาหาวิธีและสภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตและประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรีย เช่น ค่า water activity การเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการเก็บ อุณหภูมิ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น เป็นต้น ตัวอย่างรายงานวิจัยที่ผ่านมา อาทิเช่น Costa และคณะ (2000) ศึกษาผลของสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ rehydration media และปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่ออัตราการรอดของ *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 หลังการเก็บรักษา

Torres และคณะ (2003) ได้ศึกษาการปรับค่า water activity และการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์เพื่อช่วยการเก็บรักษาเชื้อยีสต์ *Candida sake* sp. สายพันธุ์ CPA-1 ที่มีประสิทธิภาพเป็นสารควบคุมชีวอินทรีย์ (biocontrol agent) ในการยับยั้งเชื้อ *Penicillium expansum* ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในแอปเปิ้ลโดยการเก็บแบบ liquid formulation พบว่า แลคโตสและทรีฮาโลส เป็นสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ที่ช่วยให้เชื้อยีสต์ดังกล่าวมีอัตราการรอดมากกว่า 70 % หลังการเก็บที่ 4 °ซ เป็นเวลา 4 เดือน

Melin และคณะ (2006) ศึกษาอุณหภูมิการเก็บเชื้อที่มีผลต่อการเก็บเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* ที่มีประสิทธิภาพเป็นสารควบคุมชีวอินทรีย์ ในการยับยั้งเชื้อราบนเมล็ดธัญพืช โดยการเก็บแบบสุตุน้ำในระยะเวลา ที่อุณหภูมิตั้งแต่ -20 ถึง 30 °ซ พบว่าหลังการเก็บเชื้อที่ 4 และ 10 °ซ เป็นเวลาหนึ่งเดือนมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ถึง 75-90% รวมทั้งการเติมทรีฮาโลสซึ่งเป็นสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ช่วยทำให้มีอัตราการรอดของเชื้อมากขึ้นเมื่อเก็บเชื้อที่ 20 และ 30 °ซ

Manikandan และคณะ (2010) ศึกษาการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์เพื่อช่วยการเก็บรักษาแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* sp. สายพันธุ์ Pf1 ที่มีประสิทธิภาพเป็นสารควบคุมชีวอินทรีย์ในการยับยั้งโรคในมะเขือเทศ พบว่าการเติมกลีเซอรอลในอาหารเหลว nutrient broth ทำให้แบคทีเรียอยู่รอดมากกว่า 9.5×10^7 CFU/มล. หลังการเก็บที่ 25 °ซ เป็นเวลา 6 เดือน ขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่เติมกลีเซอรอลแบคทีเรียตายหมดภายใน 3 เดือน

นอกจากการศึกษาค้นคว้าที่เกี่ยวข้องในการผลิตจุลินทรีย์สุตุน้ำที่มีประสิทธิภาพ ต้นทุนการผลิตถือเป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตจุลินทรีย์สุตุน้ำ เนื่องจากการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์สุตุน้ำในการบำบัดสิ่งแวดล้อมจำเป็นต้องใช้จุลินทรีย์สุตุน้ำจำนวนมาก ถ้าจุลินทรีย์สุตุน้ำมีต้นทุนสูงส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการบำบัดด้วยวิธีชีววิธีเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งราคาของผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ของหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้อยู่หลายปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในรูปแบบต่างๆ ที่จำหน่ายในท้องตลาด ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ช่วยลดสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในรูปแบบต่างๆ ที่จำหน่ายในท้องตลาด

ชื่อผลิตภัณฑ์	รูปแบบ	ความสามารถย่อยสลาย	ราคา
Petro-Clear F10 ⁽¹⁾	แบคทีเรียสูตรผง	ดินและน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันเบนซิน ดีเซล น้ำมันหล่อลื่น BTEX	US \$ 710/25 ปอนด์ (21,300 บาท/25 ปอนด์)
Liquid Remediate ^{MT (2)}	จุลินทรีย์สูตรน้ำ	ดินและน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอน	US \$ 43.71/ลิตร (1,311 บาท/ลิตร)
SpillRemed ⁽³⁾	แบคทีเรียสูตรน้ำ	น้ำทะเลและน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมัน ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	US \$4.76/ลิตร (143 บาท/ ลิตร)

หมายเหตุ (1) Nichiporowich (2011) วิธีใช้ผสม Petro-Clear F10 1-2 ปอนด์ ในน้ำ 5 แกลลอน โดยจุลินทรีย์ที่ผสมแล้ว 1 แกลลอนใช้กับ 1 ลูกบาศก์กิโลเมตรของดิน

(2) Envirollogic (2011) วิธีใช้ผสมในอัตราส่วนระหว่างจุลินทรีย์สูตรน้ำและน้ำเท่ากับ 1:10 โดยจุลินทรีย์สูตรน้ำที่ผสมแล้ว 1 แกลลอนใช้กับ 1 ลูกบาศก์กิโลเมตรของดิน และ 200 แกลลอนของน้ำเสีย (3) Sarvabioremed (2011) ที่มาไม่ระบุวิธีใช้

ในขณะที่ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการเตรียมจุลินทรีย์สูตรน้ำเพื่อประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่มักศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง โดยเตรียมเป็นหัวเชื้อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพเท่านั้น จากรายงานวิจัยของ Karabikal และคณะ (2009) ศึกษาการประยุกต์ใช้หัวเชื้อ *Mycobacterium* sp. Spyr1 รูปแบบที่แขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลว M9MM พบว่า หัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU/มล. สามารถย่อยสลายไพรีน 80 มก./ล. ในอาหารเหลว M9MM 100 มล. ได้หมดภายใน 8 วัน แต่เนื่องแบคทีเรียอยู่ในรูปเซลล์อิสระจึงยากต่อการนำหัวเชื้อมาใช้ซ้ำ ดังนั้นจึงได้ศึกษาโดยการตรึง *Mycobacterium* sp. Spyr1 บนตัวกลางแก้ว (glass beads) และทดสอบใช้ซ้ำเซลล์ตรึงในการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 80

มก./ล. ในอาหารเหลว ที่หัวเชื้อเริ่มต้นของทั้งเซลล์ตรึงเท่ากับ 10^6 CFU/มล. โดย 1 รอบ เท่ากับ 8 วัน เป็นจำนวน 10 รอบ พบว่าการใช้หัวเชื้อเซลล์ตรึงไม่ได้ลดประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน ซึ่งคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในช่วง 98-100% ตลอดการใช้งาน

Bao และคณะ (2012) ประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มของ *Ochrobactrum* sp. สายพันธุ์ N1 *Brevibacillus parabrevis* สายพันธุ์ N2 *B. parabrevis* สายพันธุ์ N3 และ *B. parabrevis* สายพันธุ์ N4 ซึ่งคัดแยกจากน้ำทะเลปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มในอาหารเหลว enrichment medium เป็น 24 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว mineral salt medium (MSM) ที่เติมน้ำมันพาราฟิน 0.1% บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 °C เมื่อแบคทีเรียเกิดการย่อยสลายจึงเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มในการใช้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในน้ำเสียทะเลสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นน้ำมันดิบ 0.5% (w/v) โดยหัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มปริมาณ 2% (v/v) น้ำเสียทะเลสังเคราะห์ พบว่า หัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบได้ถึง 79 % ภายในเวลา 14 วัน

2.7 การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน

อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรียสูตรน้ำในการบำบัดน้ำเสียยังมีข้อจำกัดในด้านประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบต่อเนื่อง เนื่องแบคทีเรียสูตรน้ำสามารถเกิดการรั่วไหลออกจากระบบบำบัด จึงต้องใช้แบคทีเรียสูตรน้ำจำนวนมากในการบำบัด ความคงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ และการนำแบคทีเรียกลับมาใช้ซ้ำ การแก้ปัญหาดังกล่าวอาจทำได้โดยการใช้แบคทีเรียที่ถูกตรึงในวัสดุตรึงในการบำบัดน้ำเสีย (Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001; Rahman และคณะ, 2006)

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียสามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม ซึ่งมีข้อดีว่าการใช้แบคทีเรียแบบแขวนลอยดังนี้ (Cohen, 2001; Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001; Gentry และคณะ, 2004)

- เป็นแหล่งค้ำกันเซลล์
- สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เช่น ปริมาณน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง หรือสารอาหารที่มีปริมาณต่ำในน้ำเสีย
- มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น
- เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้
- สามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้
- ป้องกันการรั่วไหลของจุลินทรีย์ออกจากระบบบำบัดน้ำเสีย

- ลดปัญหาตะกอนเบาไม่จมตัวและการเกิดโฟม (bulking and foaming) ในระบบบำบัดน้ำเสีย

2.7.1 วิธีการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์สามารถทำได้หลายรูปแบบ โดยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของวัสดุตรึง และลักษณะการนำไปประยุกต์ใช้ การตรึงเซลล์สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทหลัก ได้แก่ (Cohen, 2001)

1) การยึดเกาะ (attached growth)

การยึดเกาะของจุลินทรีย์บนวัสดุตรึง ซึ่งโครงสร้างของเซลล์จุลินทรีย์ ได้แก่ ผนังเซลล์ ฟิไล (pili) สารเมือก (slime) และ ไกลโคคาลิกซ์ (glycocalyx) เป็นเปลือกนอกของแคปซูล (capsule) ซึ่งเป็นสารเอ็กสตราเซลลูลาโพลีแซคคาไรด์ (Extracellular Polysaccharide, EPS) มีความสามารถในการยึดเกาะและเกิดเป็นชั้นของไบโอฟิล์ม โดยการยึดเกาะเกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวของวัสดุตรึง ความคงทนของการยึดเกาะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ลักษณะของพื้นผิว ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และรูปแบบการไหลของน้ำ (Cohen, 2001)

2) การตรึงแบบประดิษฐ์ (artificial immobilization)

การตรึงแบบประดิษฐ์ของจุลินทรีย์บนวัสดุตรึง สามารถแบ่งออกเป็น 5 วิธี ดังนี้

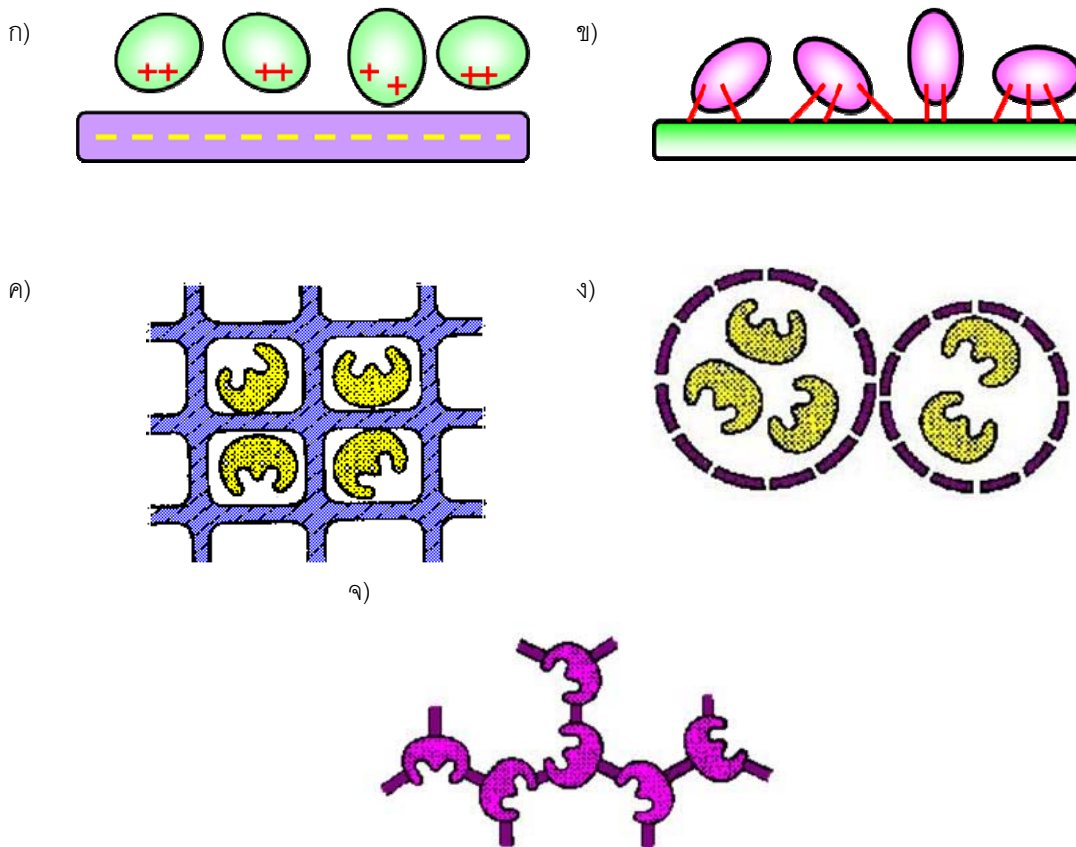
การดูดซับ (adsorption) เป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่ายที่สุด เซลล์ถูกทำลายน้อย โดยการยึดเกาะของเซลล์กับพื้นผิวของวัสดุตรึงด้วยแรงจากไฟฟ้าสถิตย์ เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ พันธะไฮดรอกซิล พันธะไฮโดรเจน (Brickerstaff, 1997)

การเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding) เป็นวิธีการเชื่อมโดยตรงระหว่างวัสดุตรึงกับเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ เป็นการที่เซลล์เกิดเกาะติดกับวัสดุตรึงโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของกลุ่มเซลล์กับวัสดุตรึง (Brickerstaff, 1997)

การกักขัง (entrapment) เป็นวิธีตรึงที่ใช้หลักการเกิดเจล ทำให้เกิดโครงสร้างข่าย 3 มิติ มีลักษณะเป็นรูพรุน ซึ่งเซลล์สามารถเคลื่อนที่อย่างอิสระภายในช่องว่างรูพรุนของเจล โดยน้ำและสับสเตรตสามารถผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ วัสดุตรึงที่เหมาะสมกับวิธีการกักขัง เช่น พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) พอลิไวนิล แอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol, PVA) (Cassidy และคณะ, 1996; Brickerstaff, 1997)

การตรึงแบบแคปซูล (encapsulation) เป็นการตรึงเซลล์ด้วยการห่อหุ้มเซลล์ภายในเยื่อกึ่งผ่าน (semipermeable membrane) เฉพาะซับสเตรทและผลิตภัณฑ์สามารถผ่านเข้าออกเยื่อกึ่งผ่านได้อย่างอิสระ โดยเซลล์สามารถเคลื่อนที่อย่างอิสระภายในช่องว่างของแคปซูล (Brickerstaff, 1997)

การเชื่อมไขว้ (crosslinking) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยเชื่อมเซลล์เข้ากับสารพาหะ โดยใช้สารเคมีจำพวกพวก 2 หมู่ฟังก์ชันหรือสารมัลติฟังก์ชัน เช่น กลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และโทลูอีน ไดไอโซไซยาเนต (toluendiisocyanate) เป็นต้น และเกิดเป็นการรวมกลุ่มของเซลล์ (flocculation) ซึ่งการเชื่อมไขว้เป็นวิธีการตรึงโดยไม่อาศัยวัสดุตรึง (Brickerstaff, 1997)



รูปที่ 2.5 รูปแบบการตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ ก) วิธีการดูดซับ ข) วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ ค) วิธีการกักขัง ง) วิธีการตรึงแบบแคปซูล จ) วิธีการเชื่อมไขว้ (Bickerstaff, 1997)

2.7.2 วัสดุจริง

วัสดุจริงที่เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย ต้องเป็นวัสดุที่ไม่พิษต่อจุลินทรีย์ มีความทนทานต่อการสลายของจุลินทรีย์ ทนทานต่อแรงกล หาง่าย และราคาถูก โดยวัสดุจริงหลากหลายชนิดที่นิยมมาประยุกต์ใช้ สามารถเป็น 2 ประเภท ได้แก่

วัสดุจริงธรรมชาติ เช่น ไคติน ไคโตซาน ก้อนหิน ก้อนกรวด วัสดุทางการเกษตร เป็นต้น

วัสดุจริงสังเคราะห์ เช่น พอลิยูรีเทน อัลจิเนต พอลิอะคริลาไมด์ พอลิไวนิล แอลกอฮอล์ ซิลิกา เซรามิค ตัวกลางแก้ว ถ่านกัมมันต์ และตัวกลางพลาสติก เป็นต้น

รายงานการใช้เซลล์จริงในการบำบัดน้ำเสียบนเป็อนปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ Rahman และคณะ (2006) ใช้แบคทีเรียจริงในอัลจิเนตเพื่อการบำบัดน้ำทะเลสังเคราะห์ที่ปนเป็อนปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน พบว่าเซลล์จริงมีประสิทธิภาพในการถูกใช้ซ้ำได้มากกว่า 150 วันโดยไม่ลดความสามารถในการย่อยสลายปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

Gentili และคณะ (2006) นำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพย่อยปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่รับบนไคตินและไคโตซานจากกุ้งและใช้ในการบำบัดน้ำทะเลที่ปนเป็อนน้ำมันดิบในระบบบำบัดระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าการตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ และเพิ่มการอยู่รอดของแบคทีเรียในระบบบำบัด

นอกจากนี้ Lan และคณะ (2009) ได้ศึกษาความสามารถของเซลล์จริงบนแคลเซียมอัลจิเนตในการย่อยสลายน้ำมันและการลดค่า COD ซึ่งพบว่าการตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มความเร็วของเซลล์ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง และเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง และช่วยลด COD ได้ดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ และพบว่าเซลล์จริงมีความเสถียรเมื่อถูกเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และถูกนำกลับมาใช้ได้ 12 ครั้ง

Karabika และคณะ (2009) ได้ศึกษาการนำมาใช้ซ้ำของเซลล์จริง *Mycobacterium sp. Spyr1* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้แก่ อะซีแนพทีน พีแนนทรีน ฟลูออเรนธิน ไพรีน และแอนทราซีน โดยตัวกลางแก้ว (glass beads) เป็นวัสดุจริง จากการใช้ซ้ำเซลล์จริงในการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเหลวเป็นจำนวน 10 รอบ พบว่าการใช้ซ้ำเซลล์จริงไม่ได้ลดประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีน ซึ่งคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในช่วง 98-100% ตลอดการใช้งาน

Rodríguez-Martínez และคณะ (2006) ศึกษาการบำบัดน้ำมันดีเซลที่ปนเป็อนในน้ำใต้ดินโดยหัวเชื้อเป็นจุลินทรีย์พื้นถิ่น (indigenous microorganism) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลนำไปตรึงบนถ่านกัมมันต์ชนิดก้อน (granular activated carbon: GAC) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.9 มม. ปริมาณ 11 กิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งบรรจุอยู่ใน fluidized bed

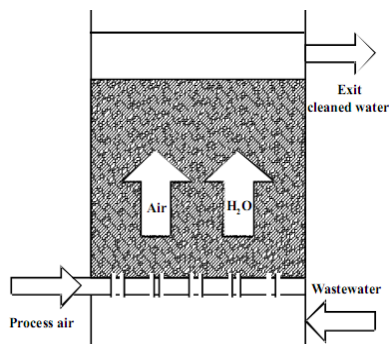
reactor ทำด้วยพีวีซีซึ่งขนาดความจุ 50 ลิตร โดยมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส เท่ากับ 30:5:1 ผลการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนเท่า 97 ถึง 99% ของความเข้มข้นสารไฮโดรคาร์บอนเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ค่า hydraulic retention time (HRT) เท่ากับ 14 นาที

Allia และคณะ (2006) นำทราย หินภูเขาไฟ ตัวกลางพลาสติกมาประยุกต์ใช้เพื่อวัสดุตรึง ในระบบบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีทางชีวภาพ พบว่าประสิทธิภาพในการ ย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนสูงถึง 90 %

Barreto และคณะ (2010) นำสปอร์ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ LAMI008 โดยตรึงวิธี กักขังด้วยโคโตซานร่วมกับการเติมสารกลูตาอัลดีไฮด์เพื่อช่วยในการ crosslinking ทำให้เซลล์ตรึง บนเม็ดโคโตซานขนาด 3 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบการย่อยสลายเฮกซะเดเคนในอาหารเหลว mineral medium ที่เติม 1% กลูโคส พบว่า เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเฮกซะเดเคน ได้ถึง 100 % ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 % (w/v) ภายในเวลา 72 ชั่วโมง

2.7.3 การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงในระบบบำบัดน้ำเสีย

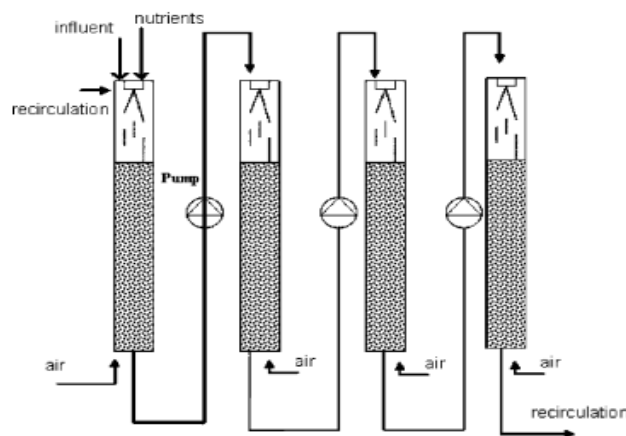
การประยุกต์ใช้ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง (aerobic packed-bed bioreactor) ในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพดังรูปที่ 2.6 ข้อดีระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มี ตัวกลางเมื่อเปรียบเทียบกับระบบบำบัดแบบตะกอนเร่ง (activated sludge) มีประสิทธิภาพใน การกำจัดสารปนเปื้อนต่างๆ ได้สูงกว่า สามารถลดกลิ่นเหม็นซึ่งเกิดจากกระบวนการบำบัด ป้องกันการรั่วไหลของจุลินทรีย์ออกจากระบบบำบัดน้ำเสีย ลดปัญหาตะกอนเบาไม่จมตัวและการ เกิดโฟมในระบบบำบัดน้ำเสีย และมีความทนทานต่อสภาวะต่างๆ ในระหว่างการบำบัด เช่น ความเป็นพิษสูงจากในน้ำเสีย นอกจากนี้คุณสมบัติที่สำคัญคือการกรองอนุภาคต่างที่ปนเปื้อนอยู่ใน น้ำเสียเป็นการช่วยขั้นตอนการกำจัดตะกอนจากระบบบำบัด ส่งผลให้ ระบบบำบัดแบบเติม อากาศที่มีตัวกลางเป็นทางเลือกในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Benthack และคณะ, 2001; Cohen, 2001)



รูปที่ 2.6 ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง (Benthack และคณะ, 2001)

รายงานการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ Ji และคณะ (2009) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดแบบ up-flow fixed-bed (UFB) bioreactor ในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอน โดยตั้ง bioreactor สร้างจาก polymethyl methacrylate ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 70 มม. ความสูง 750 มม. ความจุของถัง 2.1 ล. โดยใช้ polyurethane foam เป็นวัสดุตรึง หัวเชื้อที่ใช้ในการตรึงเป็นสัดตั้งจากระบบบำบัดน้ำเสียจากหลุมฝังกลบขยะ ผลการทดลองพบว่าที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ (hydraulic retention time: HRT) 1.8 ชม. ระบบสามารถกำจัดไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอนได้ถึง 90-93% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอน 48.7 มิลลิกรัม/ลิตร

Bravo และคณะ 2009 ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดทางชีวภาพแบบมีตัวกลางระบบที่มีการโปรยกรอง (trickling-flow fixed-film biological reactor) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนเบนซีนและน้ำดีเซล โดยใช้ ไซไลท์ (xylite) เป็นวัสดุตรึงซึ่งไซไลท์เป็นวัสดุที่มากการกระบวนการผลิตถ่านหินมีลักษณะโครงสร้างคล้ายไม้ และราคาถูก โดยวัสดุตรึงปริมาณ 500 g บรรจุลงคอลัมน์ขนาด 55 × 12 ซม. และหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรึงคัดเลือกมาจากดินและน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอนจากประเทศเม็กซิโก ผลการทดลองพบว่า ระบบสามารถลดปริมาณเบนซีนได้ถึง 0.55 ไมโครกรัม/ลิตร จากความเข้มข้นเริ่มต้นของเบนซีน 2000 มิลลิกรัม/ลิตร ภายใน 12 วัน ในขณะที่ไม่สามารถลดปริมาณน้ำมันดีเซลความเข้มข้นเริ่มต้น 2000 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ ดังนั้นคณะวิจัยได้เปลี่ยนระบบการไหลเข้าของน้ำเสียเป็นทางด้านล่างของคอลัมน์ (up flow) พบว่าที่ระยะเวลา 8 วัน ระบบสามารถปริมาณน้ำดีเซลจาก 2000 มิลลิกรัม/ลิตร เหลือ 0.12 มิลลิกรัม/ลิตร



รูปที่ 2.7 ระบบบำบัดทางชีวภาพแบบมีตัวกลางระบบที่มีการโปรยกรอง (four-column trickling-flow fixed-film biological reactor) (Bravo และคณะ, 2009)

Dong และคณะ (2011) ประยุกต์ใช้ระบบบำบัดน้ำเสียที่มีตัวกรองชีวภาพเคลื่อนที่ (moving bed biofilm reactor) เป็นถังแก้ว ปริมาตรในการบำบัด 5 ลิตร โดยใช้วัสดุตั้งเป็น ตัวกลางเซรามิค และใช้หัวเชื้อจากตะกอนสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม เพื่อใช้บำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากการขุดเจาะน้ำมันที่ผ่านการบำบัดทางกายภาพ ที่ระยะเวลาเก็บกัก 10 ชั่วโมง พบว่า ระบบมีประสิทธิภาพในการกำจัด PAHs จาก 65% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของ PAHs 1,022 ไมโครกรัม/ลิตร

2.8 การประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจติดตามจุลินทรีย์ในการบำบัดโดยชีววิธี

การย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจำเป็นต้องตรวจติดตามความเข้มข้นของสารพิษที่เหลืออยู่และจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เพื่อใช้ในการดำเนินระบบบำบัดอย่างมีประสิทธิภาพ โดยการปรับสภาพแวดล้อมในระบบบำบัดให้เหมาะสมต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น การเติมสารอาหาร การเติมอากาศ การเติมจุลินทรีย์ เป็นต้น (Phrommanich และคณะ, 2009) ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจติดตามจุลินทรีย์จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจวิธีหนึ่ง เนื่องจากวิธีการตรวจติดตามนี้มีความรวดเร็วกว่าวิธีนับจำนวนจุลินทรีย์ซึ่งต้องใช้เวลาสำหรับการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่การตรวจติดตามจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลสามารถดำเนินการได้อย่างสะดวกและรวดเร็วโดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม และตรวจติดตามได้ทันทีและมีความแม่นยำสูง เนื่องจากการติดตามยีนที่ประมวลรหัสของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้โดยตรงทำให้ทราบกิจกรรมของจุลินทรีย์ในระบบ (Shi และคณะ, 2010) ซึ่งการตรวจติดตามจุลินทรีย์โดยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลสามารถประยุกต์ใช้ได้กับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมหลายชนิดได้แก่ ดิน (Phrommanich และคณะ, 2009), น้ำใต้ดิน (Kao และคณะ, 2010), น้ำเสียและสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสีย (Shannon และคณะ, 2007)

ตัวอย่างการตรวจติดตามจุลินทรีย์โดยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล ได้แก่

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

PCR-DGGE เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม และวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในสิ่งแวดล้อม ซึ่งในศึกษาโครงสร้างประชาคมของแบคทีเรียทำได้โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยวิธี

DGGE เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่ที่มีความยาวเท่ากันแต่ลำดับเบสต่างกัน โดยใช้เกรเดียนท์ของความเข้มข้นของสารเคมี เช่น ยูเรียและฟอร์มาไมด์ทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อดีเอ็นเอสายคู่ถูกทำลายพันธะไปบางส่วนจะหยุดการเคลื่อนที่ โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีลำดับเบสที่ไม่เหมือนทำให้ตำแหน่งที่หยุดเคลื่อนที่ของแบคทีเรียแต่ละตัวไม่เท่ากัน เมื่อนำเจลไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็นเป็นแถบดีเอ็นเออยู่ภายในเจล โดยการวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียสังเกตได้จากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (Felske และ Akkermans, 1998; Muyzer และคณะ, 1993; Torsvik และคณะ, 2002)

การตรวจนับจำนวนยีนโดย real-time PCR

การตรวจนับจำนวนยีนโดย real-time PCR หรือ (quantitative real-time PCR, qPCR) เป็นเทคนิคที่อาศัยพื้นฐานของการตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงจากผลิตภัณฑ์ PCR ในระหว่างขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยการเรืองแสงของผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นจากการเข้าเกาะกันระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ (double-strand DNA, dsDNA) และสารเรืองแสง คือ SYBR green โดย SYBR green จะถูกกระตุ้นด้วยแสง UV และคายพลังงานออกมาในรูปแสง ซึ่งระดับความเข้มของแสงที่ถูกปล่อยออกมาจากสอดคล้องกับปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นโดยแต่จำนวนรอบของ PCR ที่เพิ่มทำให้ระดับความเข้มของแสงเพิ่มขึ้นเช่นกัน จากหลักการดังกล่าวถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดจำนวนเชิงปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่าง ทำได้โดยเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นหรือจำนวนของยีนพร้อมกับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณ และนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR โดยนำค่าที่วัดได้จากตัวอย่างเปรียบเทียบกับค่าจากดีเอ็นเอมาตรฐานทำให้ทราบถึงจำนวนของตัวอย่าง ได้แก่ จำนวนชุดของยีน (copy number) ปริมาณเชื้อ (CFU/มิลลิลิตร) (Cunliffe และคณะ, 2006; Cébron และคณะ, 2008)

จากรายงานงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE และการตรวจนับจำนวนยีนที่ประมวลผลของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดย real-time PCR มีดังต่อไปนี้

Kao และคณะ, 2010 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE โดยศึกษาดินและน้ำใต้ดินจากบริเวณที่มีการรั่วไหลของท่อส่งน้ำมันเบนซินในประเทศไต้หวัน ผลจากการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย พบแถบดีเอ็นเอเด่นของแบคทีเรียใหม่ที่ยังไม่รายงานการค้นพบ จำนวน 2 สายพันธุ์ และพบแถบดีเอ็นเอเด่นของ *Geobacteraceae* sp และ *Novosphingobium capsulatum* สายพันธุ์ 213 ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

Cébron และคณะ (2008) ศึกษาการออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจติดตามยีนที่ประมวลผลของเอนไซม์ PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD_α) ของกลุ่มแบคทีเรีย

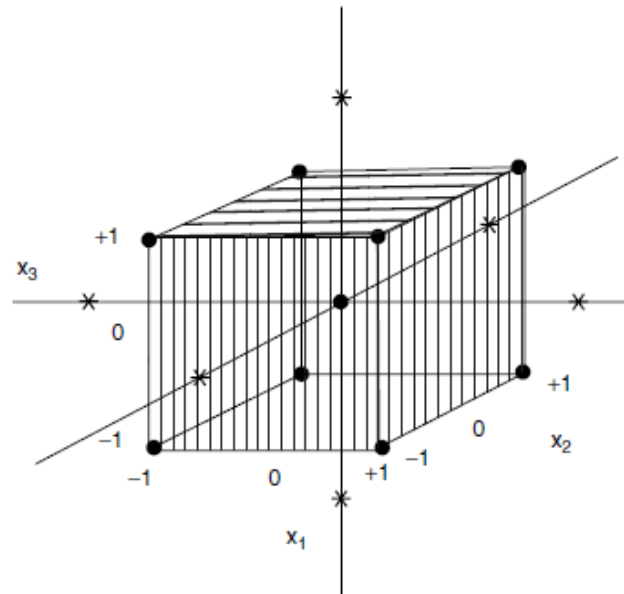
แกรมบวกและแกรมลบ เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจนับจำนวนยีนดังกล่าวด้วยวิธี real-time PCR ในดินที่มีการปนเปื้อน PAHs ผลจากการตรวจนับจำนวนยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ PAH-RHD α วิธี real-time PCR มีความสอดคล้องจำนวนชุดยีน 16S rRNA และระดับการปนเปื้อน PAHs ในดินตะกอน

Phrommanich และคณะ (2009) ประยุกต์ใช้เทคนิค real-time PCR ในการตรวจนับจำนวน *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ MUB ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันในตัวอย่างดิน โดยยีนเป้าหมายคือ ยีน *alkM* พบว่า เทคนิค real-time PCR สามารถใช้ตรวจนับจำนวน *Acinetobacter* sp. ที่อยู่ในอาหารเหลวและดิน ซึ่งมีค่าสูงสุดที่สามารถตรวจวัดได้ 540 และ 5.4 ± 10^4 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.9 การออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติที่เรียกว่า design of experiment (DOE) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์เข้าช่วยในการศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรหลายตัว โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ เป็นการออกแบบทดลองอย่างเป็นระบบ โดยตัวแปรแต่ละตัวมีความอิสระต่อกัน (orthogonal) และนำผลการทดลองที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยสถิติทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากเป็นการออกแบบการทดลองโดยใช้หลักสถิติทำให้สามารถตัดชุดทดลองที่ไม่เกี่ยวข้องออกไป ทำให้จำนวนชุดการทดลองลดลง และยังประหยัดทั้งเวลาและต้นทุนในการทดลองได้มากกว่าการทดลองแบบลองผิดลองถูก (Montgomery, 2001; Huang และคณะ, 2008, Mohajeri และคณะ, 2010)

การออกแบบการทดลองที่นำมาประยุกต์ใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยพื้นผิวตอบสนอง ได้แก่ การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design) และการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสมกลาง (Central Composite Designs, CCD)



รูปที่ 2.8 การกระจายระดับของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสมกลาง (Nakai และคณะ, 2006)

การออกแบบส่วนผสมกลาง เป็นการออกแบบการทดลองแบบฟูลแฟกทอเรียล (full factorial designs) โดยข้อมูลของตัวแปรจากจุดศูนย์กลางไปยังด้านข้าง เพื่อหาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองที่มีค่าสูงสุด มีการกำหนดระดับของปัจจัย โดยให้ค่ากลาง (center point) เท่ากับ 0 กำหนดค่าสูง เท่ากับ +1 และกำหนดค่าต่ำ เท่ากับ -1 โดยจุดรูปร่างเป็นค่าสูงสุดและต่ำสุดของปัจจัย กำหนดค่าเป็น $+\alpha$ และ $-\alpha$ ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ซึ่งค่า α สามารถหาได้จากรากที่สี่ของจำนวนการทดลองฟูลแฟกทอเรียลทั้งหมด $(2^k)^{1/4}$ ในกรณีที่มี 3 ปัจจัย ค่า α จะมีค่าเท่ากับ 1.682 ดังนั้นระดับค่าสูงสุดและต่ำสุดของปัจจัยเท่ากับ +1.682 และ -1.682 โดยนำระดับเหล่านี้ไปใช้ในการออกแบบการทดลองดังในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ระดับของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสมกลาง สำหรับการทดลองที่มี 3 ปัจจัย (Montgomery, 2001)

การทดลองที่	ปัจจัยที่ 1	ปัจจัยที่ 2	ปัจจัยที่ 3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1

การทดลองที่	ปัจจัยที่ 1	ปัจจัยที่2	ปัจจัยที่3
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1.682	0	0
10	1.682	0	0
11	0	-1.682	0
12	0	1.682	0
13	0	0	-1.682
14	0	0	1.682
15	0	0	0

จากรายงานงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง มีดังต่อไปนี้

Castorena-Cortés และคณะ (2009) ประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสลัดจ์น้ำมันจากโรงงานกลั่นน้ำมัน พบว่าความชื้น สารลดแรงตึงผิว และอัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน เป็นตัวแปรสำคัญต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ดั้งเดิม โดยมีสภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ความชื้น 70% ปริมาณสารลดแรงตึงผิว 0.5% และอัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน 15 ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเพิ่มขึ้น 20 %

Mohajeri และคณะ (2010) ประยุกต์ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองและการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในดิน พบว่า ที่ความเข้มข้นน้ำมันดิบ 2 กรัม/กิโลกรัม ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.8×10^6 เซลล์/ไนโตรเจน 0.680 กรัม/กิโลกรัม ฟอสฟอรัส 0.14 กรัม/กิโลกรัม ทำให้ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบเพิ่มขึ้นจาก 12 เป็น 83%

Zahed และคณะ (2010) ศึกษาการประยุกต์ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล โดยทดลองในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุน้ำทะเล 250 มล. ที่ความเข้มข้นของน้ำมันดิบเท่ากับ 100 มก./ล. ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10^7 CFU/มล. และศึกษาตัวแปรที่เกี่ยวข้องได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และเวลาในการย่อย

สลาย พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน 13.62 มก./ล. ปริมาณฟอสฟอรัส 1.39 มก./ล. ในเวลา 20 วัน โดยประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากการทำนายเท่ากับ 98 % ในขณะที่ผลจากการทดลองเท่ากับ 95%

Ghevariya และคณะ (2011) ประยุกต์ใช้วิธีการฟื้นผิวดอกสนองและการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ โดยดัดแปลงสูตรอาหารเหลว Bushnell-Haas เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไครซีนโดย *Achromobacter xylosoxidans* พบว่า เฟอริกคลอไรด์ (FeCl_3) แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) และแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) เป็นตัวแปรสำคัญต่อการย่อยสลายไครซีน โดยมีสภาวะที่เหมาะสมดังนี้ เฟอริกคลอไรด์ 0.02 กรัม/ลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมไนเตรต 0.525 กรัม/ลิตร ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายไครซีนของ *Achromobacter xylosoxidans* เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การสกัดฟีแนนทรินและไพรีนในอาหารเหลวและวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรินและไพรีนที่เหลืออยู่โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การสกัดฟีแนนทรินและไพรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยเอทิลอะซีเตตตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1992) นำอาหารเหลวมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0 โดยเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น จากนั้นเติมเอทิลอะซีเตตปริมาตร 1 เท่าของอาหารเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสมด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นและดูดชั้นของเอทิลอะซีเตตเก็บไว้ สกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง ด้วยเอทิลอะซีเตตปริมาตร 1 เท่าของอาหารเหลวตามวิธีเดิม รวมเอทิลอะซีเตตที่ได้ เติม anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบข้ามคืนประมาณ 0.5 กรัม เพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ จากนั้นนำส่วนของเอทิลอะซีเตตไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน และเปลี่ยนตัวทำละลายโดยเติมเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด polytetrafluoroethylene (PTFE) ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

นำสารละลายที่สกัดได้ ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรินและไพรีนด้วยวิธี HPLC คอลัมน์ inertsil[®] ODS ขนาด 4.6×150 มม. ซึ่งมีสภาวะต่างๆ ในระบบดังนี้

ตัวชะสาร (mobile phase)	เมทานอล 80%
อัตราไหล (flow rate)	1 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิคอลัมน์	40°C
ความยาวคลื่นแสง UV ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์	275 นาโนเมตร
ปริมาณสารที่วิเคราะห์	10 ไมโครลิตร

นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาร้อยละของปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่โดยเทียบกับชุดควบคุม

$$\text{ปริมาณฟีแนนทรินหรือไพรีนที่เหลือ (\%)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟชุดทดลอง}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟชุดควบคุม}} \times 100$$

3.2 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียที่เรียงตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยนำเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ 4°C 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) 517 ไมโครลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์ เติมสารละลายไลโซไซม์ (lysozyme) เข้มข้น 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาและบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) เข้มข้น 10% (ภาคผนวก ข) 30 ไมโครลิตร และโปรตีนเนสเค (proteinaseK) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 120 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) 220 ไมโครลิตร บ่มที่ 65°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายชั้นบนมาเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเดิม นำสารละลายชั้นบนมาเติมไอโซโพรพานอล 0.6 เท่าของปริมาตรสุดท้าย กลับหลอดให้เข้ากันจนปรากฏสายดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% (ภาคผนวก ข) 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนใสทิ้ง ระเหยเอทานอลจนแห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 100 ไมโครลิตรและไรโบนิวคลีเอสเอ (RNase A) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.3 สกัดเมกะพลาสมิด

สกัดเมกะพลาสมิดของ RN402 ตามวิธีของ Hu และคณะ (2008) จากเซลล์ RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB อาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน และ cRN402 เริ่มขั้นตอนการสกัดโดยล้างตะกอนเซลล์ด้วย สารละลาย Tris-HCl pH8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง ละลายเซลล์ด้วย สารละลาย Tris-HCl pH8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม Lysis solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดเก็บสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นสารละลายเมกะพลาสมิด

นำเมกะพลาสติดทั้งหมดคัดแยกโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7% จากนั้นทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นคัดแยกเมกะพลาสติดที่สกัดได้ทั้งหมดจากเจลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8% ที่หลอดในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) เเทงในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ เมื่ออะกาโรสแข็งตัว วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทปบัฟเฟอร์ให้ท่วมอะกาโรสเจล ผสมผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้กับสปีดติดตาม หยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งที่ 1 จะหยอดด้วยดีเอ็นเอ Lambda HindIII ที่ผสมกับสปีดติดตามแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสปีดติดตามเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่เหมาะสม ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 1 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) ที่ความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ต 312 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอทำได้โดย นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.4 สกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

ตัดส่วนจีโนมที่ดีเอ็นเอจากเจล และทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย DNA EASYTRAP™ Ver.2 (TAKARA BIO INC, Japan) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยตัดแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการจากเจล นำเจลใส่ลงในหลอดไมโครพิวซ์ ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล เติมสารละลายบัฟเฟอร์ NaI ปริมาตรเป็น 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เพื่อให้ชิ้นอะกาโรสเจลละลายจนหมด เติม glass powder โดยใช้สัดส่วนของ glass powder ปริมาตร 5 ไมโครลิตร / ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม กลับหลอดให้เข้ากัน เพื่อดูดซับดีเอ็นเอในสารละลายด้วย glass powder ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง บั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลายล้าง แล้วเติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง เพื่อล้าง glass powder เติมสารละลายล้าง บ่มที่อุณหภูมิ 55°C จน glass powderแห้ง เติมสารละลาย TE ปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตร glass powder บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อละลายดีเอ็นเอออกจาก glass powder บั่นเหวี่ยงที่ 13,000

รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครพีพอร์หลอดใหม่ เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.5 เซาเทิร์นบลอตไฮบริไดเซชัน (Southern Blot Hybridization)

1) เซาเทิร์นบลอต (Southern blot)

เซาเทิร์นบลอตคือย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน นำอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอตัวอย่าง ล้างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายที่เติม denaturation buffer (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายที่เติม neutralization buffer (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายที่ จากนั้นถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธี Capillary transfer (Sambrook, 2001) โดยใช้ $20\times\text{SSC}$ (ภาคผนวก ข) เป็น transfer buffer นำไนลอนเมมเบรนที่ได้ไปตรึงด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 3 นาที เก็บไนลอนเมมเบรนไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ได้นาน 6 เดือน จนกว่าจะนำมาใช้

2) เตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)

ใช้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสที่เพิ่มดีเอ็นเอจากบริเวณยีน *nidA* เป็นดีเอ็นเอติดตาม ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี random labeling โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสที่เพิ่มดีเอ็นเอจากบริเวณยีน *nidA* ให้ได้ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 16 ไมโครลิตร นำไปทำให้เดือดที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมสารละลาย DIG High Prime (หลอดหมายเลข 1) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม สารละลาย EDTA pH 8.0 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยวิธีการตกตะกอนโดยเอทานอล 99% เริ่มจากการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 0.1 เท่าของปริมาตรสุดท้าย และเติมเอทานอล 99% 2 เท่าของปริมาตรสุดท้าย แช่ที่ -70°C 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4°C 15,000 รอบ/นาที 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระเหยเอทานอลจนแห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 30 ไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3) ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอติดตาม

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยเติมสารละลาย Hybridization buffer (DIG Easy Hyb) (หลอดหมายเลข 7) (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 42°C ลงบนไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอ นำไปต้มที่อุณหภูมิ 42°C ใน Hybridization oven เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตามสำหรับการไฮบริไดเซชัน โดยเติมดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมไว้ลงในสารละลาย Hybridization buffer (DIG Easy Hyb) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิไฮบริไดเซชัน (42°C) เทสารละลายที่ prehybridization ที่ทิ้ง แล้วเติมสารละลายดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมไว้ข้างต้น นำไปต้มที่อุณหภูมิ 42°C ใน Hybridization oven เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทสารละลายดีเอ็นเอติดตามและเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำมาใช้ในครั้งต่อไป จากนั้นนำไนลอนเมมเบรนที่ได้ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินด้วยสารละลาย 2×SSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.5×SSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอติดตามด้วยวิธี Enzyme immunoassay โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime labeling and Detection Starter Kit I ตามวิธีดังนี้ นำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินแล้ว ล้างด้วย Buffer1 (Maleic acid) (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติม Buffer2 (Blocking solution ที่ผสมกับ Buffer1) (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติม antibody solution (Anti-DIG-AP conjugate) (หลอดหมายเลข 4) (ภาคผนวก ข) ที่เจือจางด้วย Buffer2 เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้าง Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินด้วย Buffer1 เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วเติม Buffer3 (detection buffer) (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเตรียมสับสเตรท NBT/BCIP (หลอดหมายเลข 5) (ภาคผนวก ข) โดยเจือจางใน Buffer3 (เตรียมก่อนใช้และห้ามให้โดนแสง) เทสับสเตรทลงในถุงที่มีไนลอนเมมเบรน ปิดผนึก นำไปต้มในที่มืดจนพบแถบสีชัดเจน นำเมมเบรนมาล้างในน้ำป้อนตลอดระยะเวลา 10 นาที ซับแล้วตากให้แห้งแล้วจึงเก็บใส่ถุงเพื่อถ่ายรูป

3.6 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในดินโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

1) ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

ซึ่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 9 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน ดูดส่วนน้ำใสด้านบนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม 96 หลุม (96-well plate) ชนิดก้นแบนซึ่งมีอาหารเหลว LB 180 ไมโครลิตร และเจือจางตั้งแต่ 10^{-2} - 10^{-9} โดยทำ 5 หลุม จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่ 30°C นาน 2 วัน แล้วนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร นับจำนวนหลุมที่มีการเจริญของแบคทีเรียของแต่ละความเจือจาง (dilution) และนำไปเทียบกับตาราง MPN เพื่อคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (ภาคผนวก จ)

2) ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญได้โดยใช้ไฟรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

นำไฟรีนที่ละลายในเฮกเซนความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม 96 หลุม วางทิ้งไว้ที่ตู้ดูดควันจนเฮกเซนระเหยออกไปหมด เติมอาหารเหลว CFMM 180 ไมโครลิตร ซึ่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์, pH 7.0 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน ดูดส่วนน้ำใสด้านบนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรกของจานหลุม 96 หลุม ซึ่งมีอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีนที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 500 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมสารให้เข้ากัน และเจือจางตั้งแต่ 10^{-2} - 10^{-9} โดยทำ 5 หลุม จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นปิดด้านบนของจานหลุม 96 หลุม และห่อด้วยกระดาษทึบที่เปียกน้ำ แล้วห่อทับด้วยพลาสติกใสเพื่อป้องกันน้ำในอาหารระเหยออก บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำมาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต โดยเติมสารละลายอิเล็กตรอนโดเนอร์ (electron donor solution) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ก) และเติมสาร cell proliferation reagent WST-1 (Roche, Germany) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลุม 96-well plate นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบ/นาที ประมาณ 5 ชั่วโมง หรือจนเกิดสีเหลือง นำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 นาโนเมตร (A_{450} และ A_{540}) A_{450} เป็นความยาวคลื่นที่สาร cell proliferation reagent WST-1 ดูดกลืนได้มากที่สุด และ A_{540} เป็นความยาวคลื่นที่สาร cell proliferation reagent WST-1 ดูดกลืนได้น้อย คำนวณค่า A_{450} ลบ A_{540} เปรียบเทียบชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย (Johnsen และคณะ, 2002) นำค่าไปเทียบกับตาราง MPN เพื่อคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีน

3.7 วิเคราะห์ปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ในดิน

วิเคราะห์ปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ในระบบบิโอสจาลองดิน โดยใช้วิธีของ Deangrueng (2004) โดยเติมเฮกเซน 4 มิลลิลิตร และ 15% TritonX-100 1.5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ใน

ตัวอย่างดิน 2 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้ส่วนของดินจับตัวกัน ดูดส่วนไสทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติม anhydrous Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำออกจากสารสกัด และกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะวิเคราะห์

วิเคราะห์ปริมาณไฟรีนด้วยวิธี gas chromatography (GC) โดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิล เมทิล ซิโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID) โดยวิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น 80°C

อุณหภูมิขั้นที่ 1 25°C /นาที จนอุณหภูมิ 160°C hold 3 นาที

อุณหภูมิขั้นที่ 2 3°C /นาที จนอุณหภูมิ 220°C hold 2 นาที

อุณหภูมิขั้นที่ 3 40°C /นาที จนอุณหภูมิ 300°C hold 7 นาที

โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาไหลด้วยอัตราเร็ว 1.7 มิลลิลิตร/นาที

โดยค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรีนมีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (\%)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟชุดควบคุม(วันที่ 0)} - \text{พื้นที่ใต้กราฟชุดทดลอง(วันที่ n)})}{\text{พื้นที่ใต้กราฟชุดควบคุม(วันที่ 0)}} \times 100$$

3.8 สกัดดีเอ็นเอจากดิน

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินด้วยชุดสกัด Bio 101 FastDNA spin kit (Q-BIOgene, Irvine, CA, USA) โดยนำตัวอย่างดิน 0.5 กรัม ใส่ลงหลอด Lysing Matrix E เติมด้วยสารละลาย Lysis buffer ที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 978 ไมโครลิตร และ MT buffer ปริมาตร 122 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดนำไปเขย่าด้วยเครื่อง FastPrep ที่ความเร็ว 5.5 เป็นเวลา 30 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เก็บส่วนน้ำใสลงในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ 1.5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย PPS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเป็นจำนวน 10 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสลงในหลอดไมโครเซนติพิวจ์และเติมด้วยสารละลาย Binding Matrix ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 2 นาที และตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอนเป็นเวลา 3 นาที ดูดทิ้งส่วนน้ำใส 500 ไมโครลิตร จากผสมสารที่เหลือให้เข้า

กันและดูกลงในคอลัมน์ SPIN Filters นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที และปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 3 ครั้ง ล้างดีเอ็นเอบนผนังซิลิกาในคอลัมน์ด้วย SEWS-M ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที และปั่นเหวี่ยงจนผนังซิลิกาแห้ง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาที และละลายดีเอ็นเอบนผนังซิลิกาด้วยสารละลาย DES ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำคอลัมน์ SPIN Filters วางบนหลอดไมโครเซนติพิวจ์นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่ผ่านกระดาษกรองในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ที่ -20°C

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที โดยผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสียติดตามหยอดลงในช่องวิ่งของอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9% (W/V) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอดีเอ็นเอจากเจล จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GeneClean Spin kit (Q-BIOgene, Irvine, CA, USA) นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 และคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยสมการจากข้อ 3.3 จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำดีเอ็นเอไปใช้หากการมีอยู่ของ RN402 ในระบบนิเวศจำลองดิน ตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน *nidA* และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ที่ประมวลผลหาลงในไฮโดรเจลด้วยวิธี real-time qPCR ในการทดลองต่อไป

3.9 วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียของระบบนิเวศจำลองด้วยวิธี DGGE ทำโดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 30 – 70% (100% denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40% formamide) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจล ปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว นำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแทมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 60°C นำผลิตภัณฑ์ PCR ผสมกับสียติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่ 60°C นาน 5 ชม. จากนั้นย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน 20 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจสอบเจลที่ความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ต 312 นาโนเมตร

3.10 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตในอาหารเหลวและวัสดุตั้งโดยวิธี MPN

1) ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลว

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ดูดส่วนน้ำใส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม 96 หลุม ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน นำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (บริษัท Bio-tek Instruments, INC., United States) นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN เพื่อคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิต

2) ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียบนวัสดุตั้ง

เซลล์ตั้งปริมาณ 1 กรัม ในสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์หลุดออกจากวัสดุตั้งโดยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงนาน 2 นาที และนำไปวางบนเครื่องปั่นผสมนาน 1 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้ทั้งหมดมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตด้วยวิธี MPN เช่นเดียวกับการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลว

3.11 สกัดน้ำมันและการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่โดยวิธี thin-layer chromatography with flame ionization detection (TLC-FID)

1) สกัดน้ำมันจากตัวอย่าง

สกัดน้ำมันจากตัวอย่างด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Oh และคณะ (2000) เติมนิโตรเจนคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.25 โมลาร์ ลงในตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมนิโตรเจนเตตระไฮไดรด์ 6.25 มิลลิกรัม (ใน 1 มิลลิลิตรคลอโรฟอร์ม) แล้วเติมนิโตรเจนคลอโรฟอร์มปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งจนแยกชั้น ดูดชั้นล่างเป็นคลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 4 มิลลิลิตร และสเตรียลแอลกอฮอล์ 6.25 มิลลิกรัม ใน 1 มิลลิลิตรคลอโรฟอร์ม แล้วระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบปั่นเหวี่ยง จนปริมาตรของสารละลายเหลือ 1 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 °C

2) เตรียมน้ำมันและสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ TLC-FID

ชั่งน้ำมัน 5, 10, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสเตรียลแอลกอฮอล์ 12.5 มิลลิกรัม ใน 1 มิลลิลิตรคลอโรฟอร์ม ปรับปริมาตรด้วยคลอโรฟอร์ม ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID นำข้อมูลที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานของน้ำมันระหว่างค่าอัตราส่วนพื้นที่ (พื้นที่ใต้กราฟของน้ำมันดีเซล/พื้นที่ใต้กราฟของสเตรียลแอลกอฮอล์) และค่าอัตราส่วนความเข้มข้น (ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล/ความเข้มข้นของสเตรียลแอลกอฮอล์)

3) วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลือโดยวิธี TLC-FLD

นำสารละลายที่สกัดได้จำนวน 1 ไมโครลิตร หยด (spot) ลงบนแท่งโครมาโรด (chromarod) ที่วางในภาชนะที่อ้อมตัวด้วยไอของ n-hexane จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 10 ซม. (ประมาณ 25 นาที) จากนั้นวางในภาชนะที่อ้อมตัวด้วยไอของไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) 2 ครั้ง ครั้งแรกให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 6.5 ซม. และครั้งที่สอง 4 ซม. (ประมาณ 12 นาที และ 5 นาทีตามลำดับ) และไดคลอโรมีเทน/เมทานอล (dichloromethane/methanol) อัตราส่วน 95: 5 (v/v) ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 1 ซม. (ประมาณ 1 นาที) โดยแต่ละครั้งของการเปลี่ยนตัวทำละลาย จะนำ chromarod มาทำแห้งในเครื่องอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบปริมาณไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ flame ionization detector (FID) (บริษัท Iatron Labs, Japan) ที่มีอัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน และอัตราการไหลของอากาศเป็น 160 และ 2,000 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ อัตราเร็วของการสแกนคือ 30 วินาที/chromarod นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำมันแต่ละชนิดดังแสดงในภาคผนวก ข

3.12 การสกัดอัลเคนและวิเคราะห์ปริมาณอัลเคนโดยวิธี gas chromatography (GC)

โดยสกัดอัลเคนที่เหลืออยู่และวิเคราะห์ปริมาณอัลเคนโดยวิธี GC โดยวิธีของดัดแปลงจาก Zhang และคณะ (2010) ซึ่งนำอาหารเหลวเติมด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 เท่าของอาหารเหลวผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แยกส่วนของชั้นเฮกเซน (n-hexane) และเติม anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อกำจัดน้ำออกจาก แล้วนำส่วนของ n-hexane กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร วิเคราะห์ปริมาณอัลเคนโดยวิธี GC รุ่น 6890N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิล เมทิล ซิโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID) วิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้น 40°C (2 นาที) จนอุณหภูมิ 320°C ที่ 10°C/นาที อุณหภูมิตรวจวัด 320°C ปริมาตรตัวอย่าง 0.5 ไมโครลิตร Splitless โดยใช้ฮีเลียมเป็นก๊าซตัวพา ไหลด้วยอัตราเร็ว 1.7 มิลลิลิตร/นาที โดยค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายมีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (\%)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟชุดควบคุม(วันที่ 9)} - \text{พื้นที่ใต้กราฟชุดทดลอง(วันที่ 9)})}{\text{พื้นที่ใต้กราฟชุดควบคุม(วันที่ 9)}} \times 100$$

บทที่ 4

ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 เพื่อผลิตแบคทีเรียสูบน้ำ

4.1 บทนำ

ปัจจุบันมีกิจกรรมการผลิตและการใช้ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น ใช้ในทางการเกษตร อุตสาหกรรม การขนส่งและคมนาคม ซึ่งทำให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มีส่วนประกอบสารอินทรีย์หลายชนิดที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อม สารอันตรายที่สำคัญคือสารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs) มีการตรวจพบการปนเปื้อน PAHs ทั้งดิน น้ำ และอากาศ (Jameson และคณะ, 2004; Piotrowska-Seget, 2010) ซึ่ง PAHs หลายชนิดมีความเป็นพิษ และเป็นสารเหนียวยาก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ก่อมะเร็ง และก่อให้เกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์ของสิ่งมีชีวิต (Peng และคณะ, 2008 และ Haritash และ Kaushik, 2009) ดังนั้นการปนเปื้อน PAHs ในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องแก้ไขอย่างถาวรและยั่งยืน

การบำบัดการปนเปื้อนสารพิษโดยวิธีทางชีววิธี (Bioremediation) เป็นการใช้อุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายหรือลดปริมาณสารพิษ เป็นวิธีการที่ได้ผลดี มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำ ไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างเพิ่มเติม และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Talley, 2006; Peng และคณะ, 2008; Haritash และ Kaushik, 2009) โดยการบำบัดสารพิษโดยชีววิธีจำเป็นต้องมีจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารพิษต่างๆ จึงก่อให้เกิดงานวิจัยเป็นจำนวนมากที่ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษจากสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนเป็นระยะเวลานาน เช่น ดินปนเปื้อนน้ำมัน ดินจากหลุมฝังกลบขยะ กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย ดินตะกอนป่าชายเลน และน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมัน เป็นต้น (Lin และ Cai, 2008; Molina และคณะ, 2008; Guo และคณะ, 2010; Janbandhu และคณะ, 2011)

ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบแบคทีเรียจำนวนมากที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs โดยคัดแยกจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ *Mycobacterium* sp. (Johnsen และคณะ, 2007; Churchill และคณะ, 2008; Zeng และคณะ, 2010), *Rhodococcus* sp. (Walter และคณะ, 1991; Song และคณะ, 2011) *Sphingomonas* sp. (Liu และคณะ, 2004; Madueño และคณะ, 2011) *Pseudomonas* sp. (Obayori และคณะ, 2008) *Acinetobacter* sp. (Chen และคณะ, 2010) และ *Streptomyces* sp. (Balachandran และคณะ, 2012) พีริยะ กลิ่นแก้ว (2550) คัด

แยกแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 จากดินบริเวณริมถนนราชดำเนิน ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีน พีแนนทรีน และ ฟลูออแรนทีน และพบตำแหน่งของยีน *nidA* อยู่บนเมกะพลาสมิด ซึ่งยีน *nidA* เป็นยีนที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก อยู่ในระบบเอนไซม์ แนพทาลีนอินดิวดส์ไดออกซิจีเนส (naphthalene induced dioxygenase: NID) และยีน *nidA* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนส โดยมีขนาดยีน *nidA* ประมาณ 1,500 bp ซึ่งเป็นประมวลรหัสเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (aromatic ring-hydroxylating dioxygenase) เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรีน โดยเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนแก่อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนและนำไปสู่การแตกวงอะโรมาติกแล้วเข้าสู่ TCA-cycle ได้เป็นพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย (Khan และคณะ, 2001; Priefert และคณะ, 2004; Liang และคณะ, 2006; Doyle และคณะ, 2008)

จากคุณลักษณะของ RN402 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ตรวจพบยีน *nidA* ที่เกี่ยวข้องกับ การย่อยสลายไพรีนซึ่งมักพบในแบคทีเรียแกรมบวก โดยอาจเกิดได้จากการถ่ายโอนยีนในแนว ขวาง (horizontal gene transfer; HGT) ระหว่างแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิด ในธรรมชาติ ยีนที่สามารถถ่ายโอนในแนวขวางต้องอยู่บนองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่สามารถ เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements) ได้แก่ พลาสมิด ฟาจ (Phage) เป็นต้น โดยอาศัย กระบวนการทรานสโพซิชั่น (transposition) คอนจูเกชัน (conjugation) และการแทรก (insertion) การถ่ายโอนยีนไปยังแบคทีเรียโดยการถ่ายโอนยีนในแนวขวางแบคทีเรียจะปรับตัวและรวมยีนที่ได้ รับมาให้เข้าไปอยู่บนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ซึ่งกระบวนการนี้จัดเป็นวิวัฒนาการของแบคทีเรียและ ยังทำให้เกิดแบคทีเรียกลุ่มใหม่ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษที่หลากหลายมากขึ้น จากแบคทีเรียดั้งเดิม ดังนั้นการถ่ายโอนยีนในแนวขวางจึงเป็นกระบวนการสำคัญในการกระจาย ยีนและมีบทบาทในการบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Springael และคณะ, 2004; Sobecky และคณะ, 2009) นอกจากนี้เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ ให้กับแบคทีเรียดั้งเดิม (Hedlund และ Staley, 2006; Jussila และคณะ, 2007; Jung และคณะ , 2011)

งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายงานวิจัยโดยมุ่งเน้นการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของ RN402 ในการย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีน โดยพีแนนทรีนเป็นต้นแบบการศึกษาการย่อยสลายของ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ และไพรีนเป็นต้นแบบการศึกษาการย่อยสลายของ PAHs มวลโมเลกุลสูง ซึ่งงานวิจัยนี้ประกอบด้วย การทดสอบรูปแบบการเจริญของ RN402 โดยการใส่พีแนนทรีนและ ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน การตรวจหาตำแหน่งและจำนวนชุดของยีน *nidA* และการ

ทดสอบบทบาทของ พลาสมิดในการย่อยสลายไฟรีนโดยการทำให้พลาสมิดควิริง (plasmid curing) การเจริญของ RN402 ในอาหารเหลว LB ที่สภาวะต่างๆ โดยประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเตรียมแบคทีเรียพร้อมใช้ในรูปแบบแบคทีเรียสูตรน้ำของ RN402 สำหรับการบำบัดสารพิษปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การประยุกต์ใช้เทคนิคชีวโมเลกุล ในการการตรวจติดตามการมีอยู่และนับจำนวน RN402 ในระบบบำบัด รวมถึงขอบเขตของการประยุกต์ใช้ RN402 สำหรับการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำเพื่อใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารพิษ

4.2 ขั้นตอนงานวิจัย

4.2.1 การทดสอบรูปแบบการเจริญของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 โดยการใช้พีแนทรีนและไฟรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

4.2.2 การตรวจหาตำแหน่งของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 และการทดสอบบทบาทของพลาสมิดในการย่อยสลายไฟรีนโดยการทำให้พลาสมิดควิริง

4.2.3 การตรวจหาจำนวนชุดของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402

4.2.4 การทดสอบการเจริญของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว LB ที่สภาวะต่างๆ

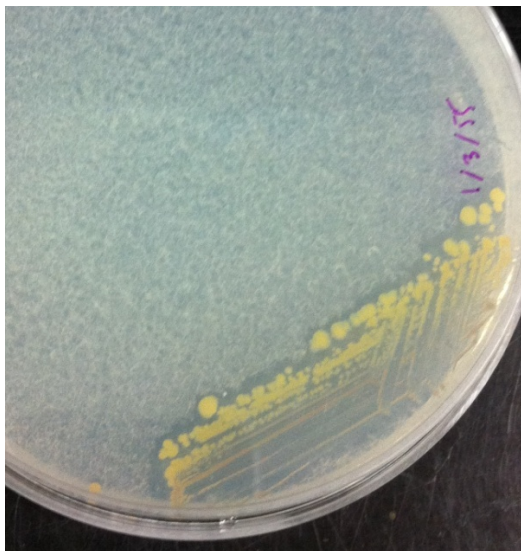
4.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

4.3.1 การทดสอบรูปแบบการเจริญของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 โดยการใช้พีแนทรีนและไฟรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

4.3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำโคโลนีที่สร้างบริเวณใสจากอาหารแข็ง CFMM ที่ถูกพันทับด้วยไฟรีน (รูปที่ 4.1) เลี้ยงในอาหารแข็ง 0.25×LB ที่เติมไฟรีนความเข้มข้น 100 ppm (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญไปเลี้ยงในอาหารเหลว 0.05×LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ 30°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลายันแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำอีก 1 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยในอาหารเหลว CFMM วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางสารแขวนลอยเซลล์ให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 จากนั้นจึงนำ

สารแขวนลอยเซลล์ไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียใช้สารอาหารที่สะสมอยู่ในเซลล์ให้หมดไป



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของ RN402 ที่สร้างบริเวณใสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่พ่นทับด้วยไพรีนเป็นเวลา 14 วัน

4.3.1.2 การทดสอบรูปแบบการเจริญของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 โดยการใส่พีแนนทรินและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

สำหรับการทดลองรูปแบบการเจริญของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 โดยการใส่พีแนนทรินและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรีย จากข้อ 4.3.1.1 เติมลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมพีแนนทรินหรือไพรีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ppm โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU/มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างเป็นช่วงเวลา โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับการทดลองประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนนทรินและไพรีน มีชุดการควบคุม 2 ชุด คืออาหารเหลว CFMM ที่เติมพีแนนทรินหรือไพรีน แต่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย และอาหารเหลว CFMM ที่เติมเชื้อแบคทีเรียแต่ไม่เติมพีแนนทรินหรือไพรีน เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable plate count) และปริมาณพีแนนทรินและไพรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยวิธี HPLC ตามที่ระบุในข้อ 3.1

4.3.2 การตรวจหาตำแหน่งของยีน *nidA* และการทำพลาสมิดคิวิริง

4.3.2.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

โดยนำเซลล์ RN402 จากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมพีแนนทรินและไพรีน 50 มิลลิเมตร ที่ผ่านการบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน นำไปเขย่าที่ 30°C เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจาก RN402 ตามที่ระบุในข้อ 3.2

4.3.2.2 การทำพลาสมิดคิวิริงและการสกัดเมกะพลาสมิด

นำเซลล์ RN402 ที่ผ่านการต่อเชื้อในอาหารเหลว LB เป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยเซลล์ RN402 ที่ผ่านการต่อเชื้อจะไม่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีน สำหรับใช้ทดสอบบทบาทของพลาสมิดในการย่อยสลายไพรีนโดยการทำพลาสมิดคิวิริง โดย RN402 ที่ผ่านการต่อเชื้อในอาหารเหลว LB เป็นจำนวน 3 ครั้ง จะถูกเรียกว่า cRN402 สกัดเมกะพลาสมิดของ RN402 และ cRN402 ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3 และสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลวิธีที่ระบุในข้อ 3.4

4.3.2.3 ตรวจหายีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอ็นไซม์ไดออกซิจีเนส ของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 4.3.2.1- 4.3.2.2 ประกอบด้วย จีโนมิกดีเอ็นเอจาก RN402 จากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB และอาหารเหลว CFMM ที่เติมพีแนนทรินและไพรีน เมกะพลาสมิดของ RN402 จากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มียื่นเป้าหมายเป็นยีน *nidA* โดยใช้ไพรเมอร์ *nidAF* 5'-ATCTTCGGCGCGGCTGGGTGTTTCTC GG-3' และ *nidAR* 5'-AATTGTCGGCGGCTGTCTTCCAGTTCGC-3' (Khan และคณะ 2001) ซึ่งผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มีความยาวประมาณ 508 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้ สารละลาย MgCl₂ ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1xTaq DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมล ดีเอ็นเอแม่แบบ ประมาณ 300 ng ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) โดยมีโปรแกรมดังนี้

1. Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing	ที่อุณหภูมิ 65°C	เป็นเวลา 1 นาที
4. Extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 1 นาที

5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ

6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

4.3.3 ตรวจหาจำนวนชุดของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสได้ออกซิจีเนสของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402

นำจีโนมดีเอ็นเอจาก RN402 จากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพริน จากข้อ

4.3.2.1 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งตัดอยู่นอกบริเวณลำดับเบสของยีน *nidA* โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

สกัดจีโนมดีเอ็นเอ	1 ไมโครลิตร
10x บัฟเฟอร์	1 ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>Bam</i> HI	0.5 ไมโครลิตร
Bovine Serum Albumin (BSA)	1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	6.5 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้ทั้งหมด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9 % (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 25 นาที โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder จากนั้นนำอะกาโรสเจลที่ได้ไปตรวจติดตามจำนวนชุดของยีน *nidA* ด้วยวิธีเซาเทิร์นบลอตไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามของยีน *nidA* ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.5

4.3.4 ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว LB ที่สภาวะต่างๆ

เตรียมหัวเชื้อ RN402 ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.1.1 ถ่ายหัวเชื้อ RN402 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น 10^6 MPN/มิลลิลิตร ลงใน จานหลุม 96 หลุม (96-well plate) ชนิดกันแบนซึ่งมีอาหารเหลว LB ปริมาตร 180 ไมโครลิตร โดยแปรผันสภาวะต่างๆ ดังต่อไปนี้ ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 1 2 และ 3% (w/v) และค่า pH ที่ 2 4 9 และ 11 ตามลำดับ และมีชุดควบคุมคือ อาหารเหลว LB ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5% และค่า

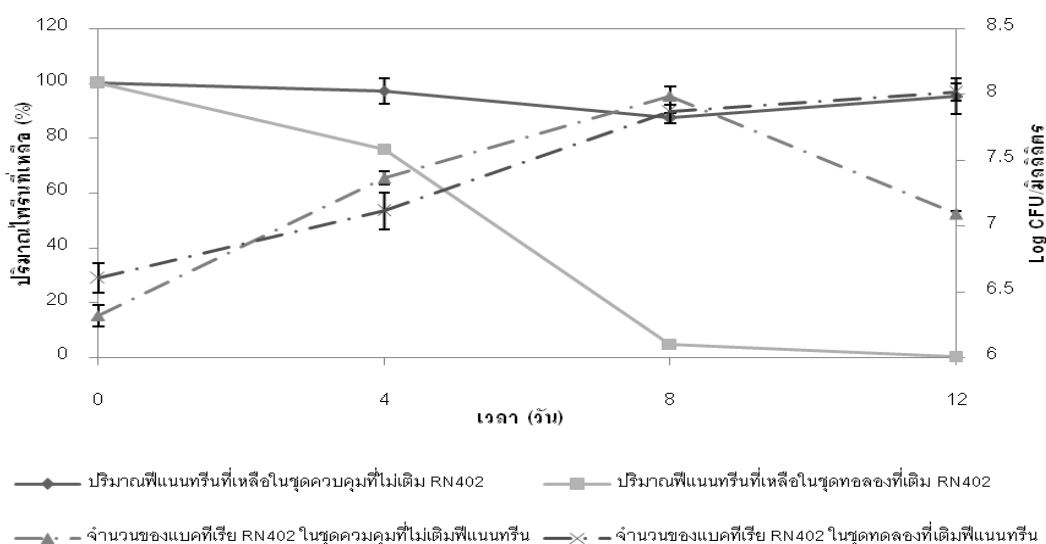
pH 7 จากนั้นเจือจางหัวเชื้อตั้งแต่ 10^{-2} - 10^{-9} โดยทำ 5 หลุม จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่ 30°C นาน 2 วัน แล้วนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร นับจำนวนหลุมที่มีการเจริญของแบคทีเรียของแต่ละความเจือจาง (dilution) และนำไปเทียบกับตาราง MPN เพื่อคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (ภาคผนวก จ.)

4.4 ผลการทดลอง

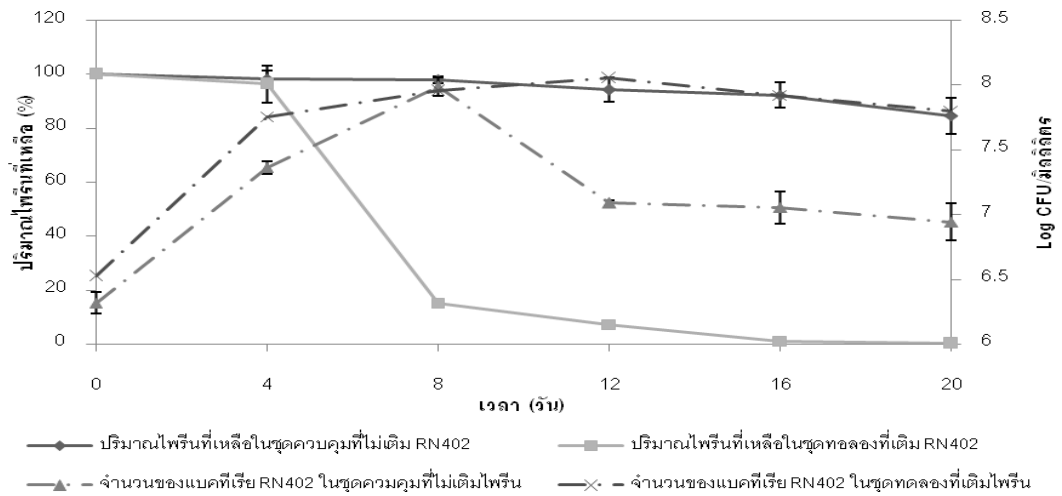
4.4.1 การทดลองรูปแบบการเจริญของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 โดยการใช้พีแนทรีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนทรีนและไพรีนของ RN402 ทำให้ทราบรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียโดยการใช้พีแนทรีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยการเลี้ยงหัวเชื้อของ RN402 ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมพีแนทรีนและไพรีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัม/ลิตร และวิเคราะห์ปริมาณพีแนทรีนและไพรีนที่เหลืออยู่พบว่า RN402 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีแนทรีน เท่ากับ 99% ภายในเวลา 12 วัน มีจำนวนของแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจากเริ่มต้น 6.52 log CFU/มิลลิลิตร ไปเป็น 8.05 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนของแบคทีเรียมากกว่าในชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 4.2

ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนของ RN402 เท่ากับ 99% ภายในเวลา 16 วัน มีจำนวนของแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจากเริ่มต้น 6.60 log CFU/มิลลิลิตร ไปเป็น 8.01 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนของแบคทีเรียมากกว่าในชุดควบคุมเช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.3

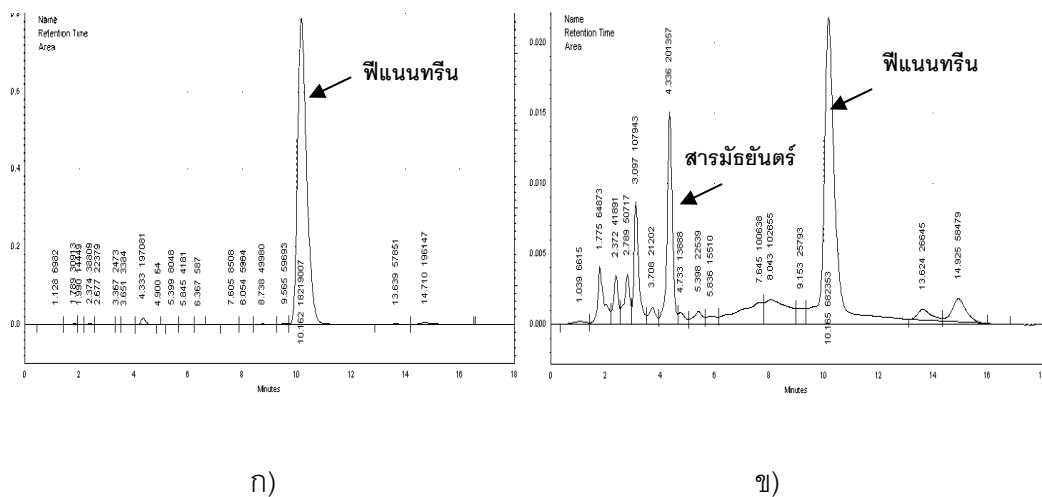


รูปที่ 4.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนทรีน และการเจริญของ RN402 โดยการใช้พีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

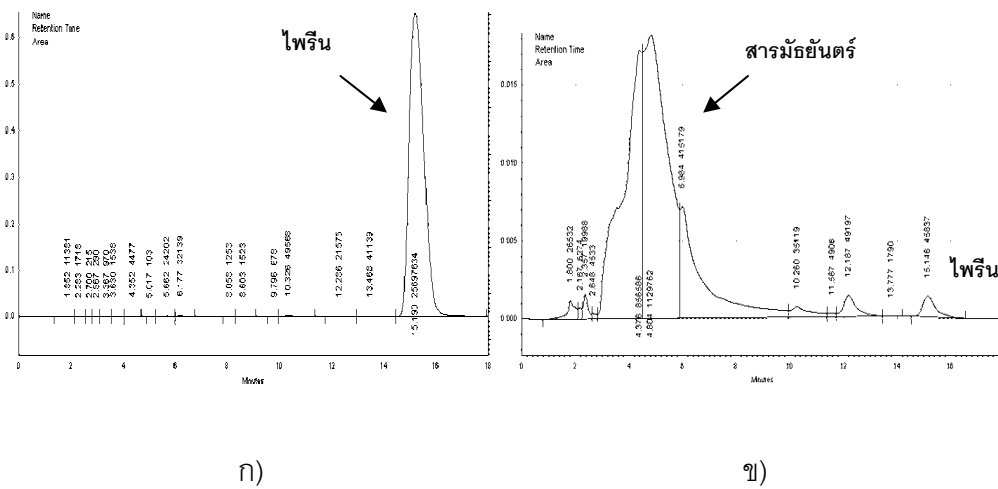


รูปที่ 4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไทรินและการเจริญของ RN402 โดยการใช้ไทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

จากผลการติดตามโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC เพื่อติดตามการลดลงของพีแนนทรินและไทริน พบว่ามีพีคของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของพีแนนทรินและไทรินโดย RN402 และพีคของสารมัธยันตร์เพิ่มขึ้น ในขณะที่พีคของพีแนนทรินและไทรินกลับลดลงเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และ 4.5



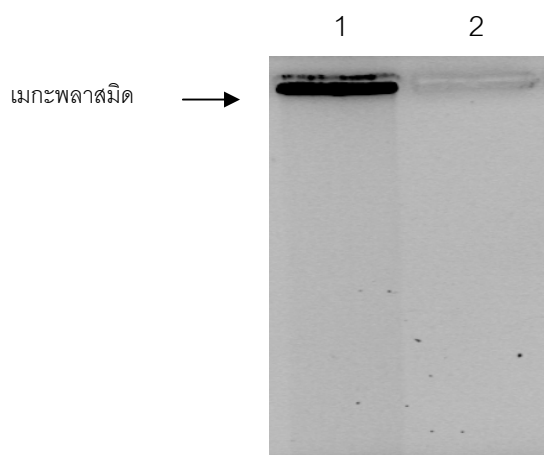
รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณพีแนนทรินและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายพีแนนทรินโดย RN402 หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา ก) 0 วัน ข) 12 วัน



รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดย RN402 หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา ก) 0 วัน ข) 20 วัน

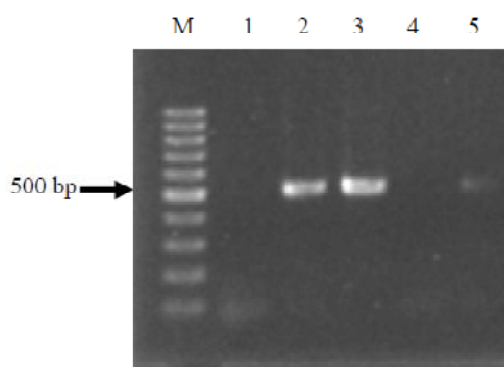
4.4.2 การตรวจหาตำแหน่งของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402

การตรวจหาตำแหน่งของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนส โดยการสกัดจีโนมดีเอ็นเอและเมกะพลาสมิดของ RN402 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ *nidAF* และ *nidAR* เพื่อระบุตำแหน่งของยีน *nidA* จากการสกัดดีเอ็นเอพบจีโนมดีเอ็นเอจาก RN402 จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB และ CFMM ที่เติมไพรีน แต่เมื่อสกัดเมกะพลาสมิดจาก cRN402 ซึ่งได้จากการต่อเชื้อในอาหารเหลว LB เป็นจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งเซลล์ของ cRN402 ที่ผ่านการต่อเชื้อจะถูกนำไปทดสอบการย่อยสลายไพรีนในอาหารเหลว CFMM และวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ด้วย HPLC เพื่อยืนยันว่าไม่เกิดการย่อยสลายไพรีน จากรูปที่ 4.6 ไม่พบดีเอ็นเอที่เป็นเมกะพลาสมิดจาก cRN402 ในขณะที่ตรวจพบดีเอ็นเอที่เป็นเมกะพลาสมิดจากการเลี้ยงแบคทีเรียใน CFMM ที่เติมไพรีน



รูปที่ 4.6 ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีสกัดเมกะพลาสมิด **ช่องวิ่งที่ 1:** เมกะพลาสมิดของ RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน **ช่องวิ่งที่ 2:** เมกะพลาสมิดของ cRN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB

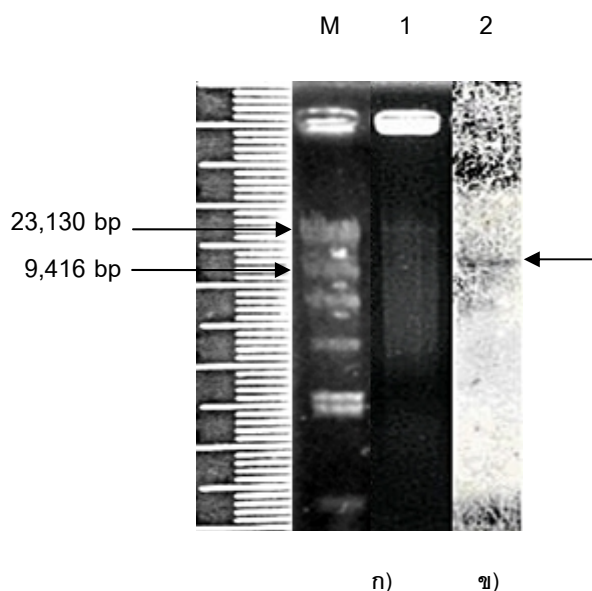
การตรวจหาตำแหน่งของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซีจีนส์โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดตามที่คาดหวัง 508 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ *nidAF* และ *nidAR* โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากอาหารเหลว CFMM ที่เติมพีแนนทริน และไพรีน ดีเอ็นเอจากเมกะพลาสมิดของ RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน แต่เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากอาหารเหลว LB ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR แสดงดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส บริเวณยีน *nidA* **ช่องวิ่ง M:** ดีเอ็นเอ 100 bp ladder **ช่องวิ่งที่ 1:** ดีเอ็นเอจาก cRN402 **ช่องวิ่งที่ 2:** ดีเอ็นเอจาก RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมพีแนนทริน **ช่องวิ่งที่ 3:** ดีเอ็นเอจาก RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน **ช่องวิ่งที่ 4:** ตัวแปรควบคุมผลลบ (น้ำปลอดประจุ) **ช่องวิ่งที่ 5:** เมกะพลาสมิดของ RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน

4.4.3 การตรวจหาจำนวนชุดของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402

จากนำดีเอ็นเอจาก RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีนซึ่งผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI เพื่อตรวจหาจำนวนชุดของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสและเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับใช้ตรวจติดตามการมีอยู่และนับจำนวนของ RN402 โดยเทคนิคชีวโมเลกุล จากการทดลองพบภาพสัญญาณจากเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นจากผลิตภัณฑ์ PCR ยีน *nidA* บนดีเอ็นเอของ RN402 มีจำนวน 1 ชุดยีน และมีขนาดประมาณ 16 กิโลเบส โดยสังเกตจากสัญญาณไฮบริไดเซชันที่เกิดขึ้นซึ่งมีลักษณะเป็นแถบสีดำในช่องที่ 2 ของรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มี ช่องวิ่ง M: ดีเอ็นเอ Lambda *Hind*III ladder ช่องวิ่งที่ 1: ดีเอ็นเอจาก RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน ซึ่งผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ข) ภาพสัญญาณจากเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นจากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสยีน *nidA* (บริเวณลูกศรชี้แสดงถึงสัญญาณที่เกิดขึ้น)

4.4.4 การทดสอบการเจริญของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว LB ที่สภาวะต่างๆ

การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว LB ที่สภาวะต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการประยุกต์ RN402 ในรูปแบบแบคทีเรียสูตรน้ำและทำให้ทราบถึง

ขอบเขตการใช้งานเพื่อบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อมที่สภาวะต่างๆ ในเบื้องต้น พบว่า RN402 สามารถเจริญในสภาวะที่มีค่าเค็มที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 และ 2 % และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นด่างที่ค่า pH 9 และเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลว LB ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5% ที่ค่า pH 7 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบการเจริญของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว LB ที่สภาวะต่างๆ

สภาวะของอาหารเหลว LB	MPN/มิลลิลิตร
ชุดควบคุม*	$2.15 \times 10^8 \pm 0.40$
ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์	
1%NaCl	$3.13 \times 10^8 \pm 0.16$
2%NaCl	$3.87 \times 10^6 \pm 0.16$
3%NaCl	0.00
ความเป็นกรด-ด่าง	
pH 2	0.00
pH 4	0.00
pH 9	$7.63 \times 10^7 \pm 0.19$
pH 11	0.00

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ อาหารเหลว LB ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5% ที่ค่า pH 7

4.5 อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนนนทรีนและไพรีนของ RN402 ทำให้ทราบถึงรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียโดยการใช้พีแนนนทรีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน จากการทดลอง พบว่า RN402 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีแนนนทรีน เท่ากับ 99% ภายในเวลา 12 วัน และ ไพรีน 99% เวลา 20 วัน จากการย่อยสลายพีแนนนทรีนและไพรีนของ RN402 ที่มีประสิทธิภาพสูงนี้ ทำให้เห็นศักยภาพในการประยุกต์ RN402 ในการบำบัดพีแนนนทรีนและไพรีนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียในอาหารที่มีปริมาณคาร์บอนมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนนนทรีนและไพรีน ซึ่งในการทดลองนี้ใช้อาหารเหลว 0.05xLB เพื่อ

เตรียมหัวเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับผลการทดลองของพิริยะ (2550) ที่เตรียมในอาหารเหลว 0.1xLB พบว่า ประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีแนทรีนเพิ่มขึ้นจาก 96 % ไปเป็น 99% จากความเข้มข้นพีแนทรีนเริ่มต้น 100 ppm ภายในเวลา 12 วัน และประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนเพิ่มขึ้นจากประมาณ 70 % ไปเป็น 99% จากความเข้มข้นไพรีนเริ่มต้น 100 ppm ภายในเวลา 20 วัน

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า RN402 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้สูงกว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน 48 % ความเข้มข้นไพรีนเริ่มต้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายในเวลา 72 ชั่วโมง (Heitkamp และคณะ, 1988) *Gordonia* สายพันธุ์ HBS1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน 97 % ความเข้มข้นไพรีนเริ่มต้น 50 ppm ภายในเวลา 17 วัน (Xu และคณะ, 2011) *Bacillus cereus* สายพันธุ์ Py5 และ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ Py6 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน 65 และ 33% ความเข้มข้นไพรีนเริ่มต้น 50 ppm ภายในเวลา 21 วัน (Lin และ Cai, 2008) *Klebsiella oxytoca* สายพันธุ์ PYR-1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน 18% ความเข้มข้นไพรีนเริ่มต้น 12 ppm ภายในเวลา 18 วัน (Zhang และ Zhu, 2012) เป็นต้น ในปีค.ศ. 2012 Patel และคณะ (2012) คัดแยก *Pseudoxanthomonas* sp สายพันธุ์ DMVP2 จากดินตะกอนแม่น้ำ ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มี ความสามารถในการย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ให้หมดไปภายใน 3 วัน นอกจากนี้ได้สรุปเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน พีแนทรีน และสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ แสดง ในตารางที่ 4.2

จากการมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายพีแนทรีนและไพรีนของ RN402 แสดงให้เห็น ศักยภาพในการประยุกต์ใช้ RN402 เพื่อเป็นหัวเชื้อในการบำบัดพีแนทรีนและไพรีนที่ปนเปื้อนใน สิ่งแวดล้อมต่อไป

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน พีแนทรีน และสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ของ แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

ชนิดของแบคทีเรีย	การย่อยสลายไพรีน และ พีแนทรีน	การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ	เอกสารอ้างอิง
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1	ไพรีน 0.5 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ได้ 48% ใน เวลา 72 ชั่วโมง	แนพทาลีน พีแนทรีน ฟลูออแรนธิน เบนโซ[เอ]ไพรีน เป็นต้น	Heitkamp และคณะ (1988); Moody และ คณะ (2004)

ชนิดของแบคทีเรีย	การย่อยสลายไพรีน และ พีแนนทริน	การย่อยสลายสาร ประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ	เอกสารอ้างอิง
<i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ UW1	ไพรีน 500 ppm ได้ 72% ในเวลา 2 สัปดาห์	พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และ ไครซีน เป็นต้น	Walter และคณะ (1991)
<i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ P2	พีแนนทริน 100 ppm ได้ 100% ภายใน 3 วัน	แนพทาลีน อะซีแนพทริน อะซีแนพริลีน ไดเบนโซฟู แรน ฟลูออแรนธิน ฟลูออรีน และ แอนทราซีน	Pinyakong และคณะ (2000); Supaka และ คณะ (2001)
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> และ <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	พีแนนทริน 2,000 ppm ได้ 48 11 และ 9% ภายใน 15 วัน	-	Kim และคณะ (2009)
<i>Achromobacter</i> <i>xylooxidans</i>	ไพรีน 200 ppm ได้ 80% ในเวลา 21วัน	-	Tiwari และคณะ (2010)
<i>Mycobacterium</i> สายพันธุ์ NJS-1 และ NJS-P	ไพรีน 100 ppm ได้ 87 และ 92% ในเวลา 14 วัน	พีแนนทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนธิน และเบนโซ [เอ]ไพรีน	Zeng และคณะ (2010)
<i>Ochrobactrum</i> sp. สายพันธุ์ CH-19	พีแนนทริน 1,000 ppm ได้ 90% ในเวลา 7 วัน	-	Chang และคณะ (2011)
<i>Achromobacter insolitus</i> สายพันธุ์ MHF ENV IV	พีแนนทริน 100 ppm ได้ 100% ภายใน 14 วัน	แนพทาลีน และ แอนทรา ซีน	Janbandhu และ คณะ (2011)
<i>Bacillus vallismortis</i> สายพันธุ์ JY3A	ไพรีน 150 ppm ได้ 90% ในเวลา 15 วัน	-	Ling และคณะ (2011)
<i>Brevibacillus</i> sp. สายพันธุ์ PDM-3	พีแนนทริน 250 ppm ได้ 93% ในเวลา 6 วัน	แอนทราซีน	Reddy และคณะ (2011)

ชนิดของแบคทีเรีย	การย่อยสลายไพรีน และ พีแนทรีน	การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ	เอกสารอ้างอิง
<i>Sphingomonas</i> สายพันธุ์ B22	พีแนทรีน 26 ppm ได้ 96 % ในเวลา 3 วัน	ฟลูออแรนทีน	Madueño และคณะ (2011)
<i>Streptomyces</i> สายพันธุ์ ERI-CPDA-1	พีแนทรีน 1,000 ppm ได้ 14% ในเวลา 7 วัน	แนพทาลีน	Balachandran และคณะ (2012)
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp สายพันธุ์ DMVP2	พีแนทรีน 300 ppm ได้ 100% ภายใน 3 วัน	ไพรีน ฟลูออแรนทีน	Patel และคณะ (2012)
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp สายพันธุ์ RN402	พีแนทรีน และไพรีน 100 ppm ได้ 100% ภายใน 12 และ 20 วัน	ฟลูออแรนทีน	งานวิจัยครั้งนี้

ในงานวิจัยของ พิริยะ (2550) รายงานว่า RN402 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนที่จัดเป็นสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง และมียีน *nidA* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนซึ่งมักพบในแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่มแบคทีเรียสกุล *Mycobacterium* ได้แก่ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 (Khan และคณะ, 2001) *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ JLS KMS และ MCS (Miller และคณะ, 2004) *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ S65 (Sho และคณะ, 2004) *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ SNP11 (Pengnut และคณะ, 2007) *Mycobacterium* สายพันธุ์ SKEW SCSH และ SKEY (Guo และคณะ, 2010) เป็นต้น และพบยีน *nidA* อยู่บนเมกะพลาสมิดของ RN402 โดยการทำให้บริสุทธิ์ได้ซึ่งพบว่าเกิดสัญญาณขึ้นกับเมกะพลาสมิดของ RN402 แต่เนื่องจากสัญญาณที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจน ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงทดลองตรวจหาตำแหน่งของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซีซีเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและเมกะพลาสมิดของ RN402 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ไพรเมอร์ *nidAF* และ *nidAR* เพื่อระบุตำแหน่งของยีน *nidA* จากการทดลองพบผลิตภัณฑ์ PCR การใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจาก RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมพีแนทรีนและไพรีน แต่เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจาก RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR และเมื่อสกัดเมกะพลาสมิดจาก RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB และอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน พบดีเอ็นเอที่เป็นเมกะพลาสมิดจาก RN402 ที่เลี้ยงในอาหาร

เหลวที่เติมไพรินแต่ไม่พบในอาหารเหลว LB และพบผลิตภัณฑ์ PCR การใช้ดีเอ็นเอจากเมกะพลาสมิดของ RN402 แสดงให้เห็นว่า ยีน *nidA* อยู่บนเมกะพลาสมิด ดังในรูปที่ 4.5 และเมื่อนำเซลล์ RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB มาใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยไพริน พบว่า หัวเชื้อดังกล่าวไม่สามารถย่อยสลายไพรินซึ่งสอดคล้องกับการไม่พบเมกะพลาสมิดและไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ในดีเอ็นเอที่สกัดจาก RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB แสดงว่า ยีน *nidA* อยู่บนเมกะพลาสมิดของ RN402 เกี่ยวข้องกับความสามารถย่อยสลายพีแนทรีนและไพริน

การมีอยู่ของยีน *nidA* บน RN402 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ แต่ตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรินซึ่งมักพบในแบคทีเรียแกรมบวก โดยอาจเกิดได้จากการถ่ายโอนยีนในแนวขวาง (horizontal gene transfer; HGT) ระหว่างแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ยีนที่สามารถถ่ายโอนในแนวขวางต้องอยู่บนองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements) ได้แก่ พลาสมิด ฟาจ (Phage) เป็นต้น โดยอาศัย ทรานสปอซอน (transposons) คอนจูเกชัน (conjugation) และการแทรก (insertion) การถ่ายโอนยีนไปยังแบคทีเรียโดยการถ่ายโอนยีนในแนวขวางแบคทีเรียจะปรับตัวและรวมยีนที่ได้รับมาให้เข้าไปอยู่บนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ซึ่งกระบวนการนี้จัดเป็นวิวัฒนาการของแบคทีเรียและยังทำให้เกิดแบคทีเรียกลุ่มใหม่ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษที่หลากหลายมากขึ้นจากแบคทีเรียดั้งเดิม ดังนั้นการถ่ายโอนยีนในแนวขวางจึงเป็นกระบวนการสำคัญในการกระจายยีนและมีบทบาทในการบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Springael และคณะ, 2004; Sobecky และคณะ, 2009) ในกรณีของ RN402 อาจเกิดจากพลาสมิดของ RN402 ได้รับการถ่ายโอนยีน *nidA* มาจากแบคทีเรียสกุล *Mycobacterium* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพริน ทำให้แบคทีเรีย RN402 มีความสามารถในการย่อยสลายไพริน

ในกรณีการถ่ายโอนมาจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ ได้แก่ การพบยีน *ndoB* บน *Pseudomonas* sp. หลายๆ สายพันธุ์ ที่คัดแยกจากดินจากแอนตาร์กติกที่มีการปนเปื้อนของสารปิโตรเลียม โดยยีน *ndoB* ที่อยู่บนเมกะพลาสมิดมาจากการถ่ายโอนยีนแนวขวาง (Ma และคณะ, 2005) การพบยีน *nahAc* บนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Pseudoalteromonas* sp. สายพันธุ์ EH-2-1 จากน้ำทะเล สามารถย่อยสลายแนพทาลีนได้ และยีน *nahAc* ที่พบมีลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายกับ *nahAc* ของ *Neptunomonas naphthovorans* สายพันธุ์ ATCC700637^T แสดงให้เห็นว่า *Pseudoalteromonas* sp. สายพันธุ์ EH-2-1 ได้รับยีนจากการถ่ายโอนยีนแนวขวาง (Hedlund และ Staley, 2006) การถ่ายโอนยีนแนวขวางของยีน *xplAB* *Gordonia* sp. สายพันธุ์ KTR9 ไปสู่ *Gordonia polyisoprenivorans* *Rhodococcus jostii* สายพันธุ์ RHA1 และ *Nocardia* sp. สายพันธุ์ TW2 ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการย่อย

สลายสารวัตรระเบิด (RDX) (Jung และคณะ, 2011) จากคุณลักษณะเบื้องต้นของ RN402 ที่ยีน *nidA* บนเมกะพลาสมิดซึ่งเป็นองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนที่ได้มีโอกาสสูงในการเกิดถ่ายโอนยีนแนวขวาง ทำให้ยีน *nidA* บนเมกะพลาสมิดสามารถถ่ายโอนยีนไปสู่แบคทีเรียดั้งเดิมที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม และเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีแนทรีนและไพรีนให้กับแบคทีเรียดั้งเดิม ซึ่งเป็นข้อดีเนื่องจากแบคทีเรียดั้งเดิมจะสามารถทนทานกับสภาพแวดล้อมนั้นๆ ได้

การตรวจหาจำนวนชุดของยีน *nidA* พบภาพสัญญาณจากเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นจากผลิตภัณฑ์ PCR ยีน *nidA* บนดีเอ็นเอของ RN402 มีจำนวน 1 ชุดยีน และมีขนาดประมาณ 16 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่า 1 ชุดยีน มีจำนวนของ RN402 เท่ากับ 1 เซลล์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับใช้ตรวจติดตามการมีอยู่และนับจำนวนของ RN402 โดยวิธี real-time PCR ต่อไป

จากงานวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับคุณลักษณะเบื้องต้นของ RN402 ว่ามียีน *nidA* บนเมกะพลาสมิดซึ่งสามารถถ่ายโอนยีนไปสู่แบคทีเรียดั้งเดิมที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายพิษ และมีจำนวนชุดยีน *nidA* เท่ากับ 1 ชุดยีน และเท่ากับจำนวนของ RN402 1 เซลล์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับใช้นับจำนวนของ RN402 โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล นอกจากนี้ RN402 เจริญได้ในสภาวะที่มีค่าเค็มที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 และ 2 % และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นด่างที่ค่า pH 9 จากคุณลักษณะทั้งหมดทำให้เห็นศักยภาพในการนำ RN402 ไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตแบคทีเรียสุตรน้ำเพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่อไป

บทที่ 5

พัฒนาวิธีการผลิตสูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และการประยุกต์ใช้บำบัดดินปนเปื้อนไพรีน

5.1 บทนำ

การปนเปื้อน PAHs ในสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นได้หลายสาเหตุ เช่น จากการเผาไหม้ น้ำมัน เชื้อเพลิง ถ่านหิน ไม้ ถ่าน การเผาไหม้ในเครื่องยนต์ และการรั่วไหลของผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมจากการขนส่งและจากอุบัติเหตุ เนื่องจาก PAHs หลายชนิดมีความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง เป็นสารเนื้องอกก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ก่อมะเร็ง และก่อให้เกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์ของสิ่งมีชีวิต (Jameson และคณะ, 2004; Johnsen และคณะ, 2007; Peng และคณะ, 2008; Haritash และ Kaushik, 2009) และจากสมบัติของ PAHs มวลโมเลกุลใหญ่ตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป ซึ่งมีความเป็นพิษสูงและสลายตัวได้ยากจะถูกดูดซับโดยสารอินทรีย์ที่อยู่ในดิน ทำให้ PAHs ที่ถูกดูดซับในดินมีความคงตัว และยากต่อการสลายตัวมากขึ้น จึงนำไปสู่การสะสมในห่วงโซ่อาหาร (Potin และคณะ 2004; Johnsen และคณะ. 2005) ดังนั้นการปนเปื้อนการปนเปื้อน PAHs ในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องแก้ไข วิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการกำจัด PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อม คือ bioaugmentation เป็นวิธีหนึ่งในการบำบัดโดยชีววิธี โดยการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษลงในพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษ จุลินทรีย์ดังกล่าวจะเปลี่ยนรูปแบบของสารพิษให้อยู่ในรูปแบบไม่เป็นพิษหรือเป็นพิษน้อยลง โดยอาศัยการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต (Vidali และคณะ, 2001; Mrozik และ Piotrowska-Seget, 2010) ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบแบคทีเรียจำนวนมากที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs โดยคัดแยกจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ *Mycobacterium* sp. (Boldrin และคณะ, 1993; Schneider และคณะ, 1996; Rehmann และคณะ, 1998; Churchill และคณะ, 1999; Vila และคณะ, 2001; Habe และคณะ, 2004; Johnsen และคณะ, 2007; Churchill และคณะ, 2008) *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ UW1 (Walter และคณะ, 1991) *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 (Pinyakong และคณะ, 2000) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ZL5 (Liu และคณะ, 2004) *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ LP1 (Obayori และคณะ, 2008) *Achromobacter xylosoxidans* (Ghevariya และคณะ, 2011) และ *Brevibacillus* sp. สายพันธุ์ PDM-3 (Reddy และคณะ, 2011)

การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับวิธี bioaugmentation เป็นกุญแจสำคัญที่จะทำให้การบำบัดสารพิษโดยชีววิธีประสบผลสำเร็จได้ จุลินทรีย์ที่เหมาะสม

สำหรับวิธี bioaugmentation มีคุณลักษณะดังต่อไปนี้ จุลินทรีย์ต้องเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เพราะเลี้ยงได้ง่าย ทนทานต่อสารพิษที่ความเข้มข้นสูง คงประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพิษและมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อม (Cunliffe และคณะ, 2006; Mrozik และ Piotrowska-Seget, 2010) นอกจากนี้การมี catabolic genes อยู่บนพลาสมิดของจุลินทรีย์สำหรับ bioaugmentation สามารถถ่ายโอนยีนทางพลาสมิดไปยังแบคทีเรียในท้องถิ่นเป็นการเพิ่มย่อยสลายสารพิษทำให้สารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมถูกกำจัดได้เร็วขึ้น (Springael และ Top, 2004; Quan และคณะ, 2010) สอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน และตรวจพบยีน *nidA* ซึ่งประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ซึ่งจากผลการทดลองในบทที่ 2 พบว่า *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 มียีน *nidA* บนเมกะพลาสมิด ด้วยลักษณะสมบัติข้างต้นของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 นี้ให้ว่า *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 มีความเหมาะสมกับการประยุกต์เป็นหัวเชื้อสำหรับ bioaugmentation ในการบำบัดสารพิษปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

จุลินทรีย์สูตรน้ำเป็นหนึ่งทางเลือกในการเก็บหัวเชื้อเชิงพาณิชย์ก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์สูตรน้ำคือเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิตถูกแขวนลอยในของเหลวหรือที่เรียกว่า liquid formulation เพื่อให้อยู่ในสภาวะพร้อมใช้และเก็บรักษาได้ยาวนาน ทั้งยังคงประสิทธิภาพอยู่ตลอดการเก็บรักษา ข้อดีหลายประการของการเตรียมจุลินทรีย์สูตรน้ำ เช่น วิธีการผลิตไม่ซับซ้อน ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิต การใช้งานทำได้ง่าย สะดวก และมีค่าใช้จ่ายต่ำอีกด้วย (Torres และคณะ 2003; Melin และคณะ, 2006; Melin และคณะ, 2010) จึงทำให้การผลิตจุลินทรีย์สูตรน้ำเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความน่าสนใจสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการผลิตจุลินทรีย์สูตรน้ำเพื่อให้จุลินทรีย์มีอัตราการรอดชีวิตสูงหลังการเก็บรักษา และมีประสิทธิภาพในการทำงานตลอดการเก็บรักษา เช่น การปรับค่า water activity การเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ (protective agents) คุณภูมิในการเก็บรักษา ปริมาณเซลล์เริ่มต้น เป็นต้น (Abadias และคณะ, 2003; Torres และคณะ, 2003; Tittabutra และคณะ, 2007; Albareda และคณะ, 2008; Liu และคณะ, 2009) ตัวอย่างรายงานวิจัยที่ผ่านมาของ Melin และคณะ (2006) ศึกษาคุณภูมิการเก็บเชื้อที่มีผลต่อการเก็บ *Pichia anomala* ที่มีประสิทธิภาพเป็นสารควบคุมชีวอินทรีย์ ในการยับยั้งเชื้อราบนเมล็ดธัญพืช โดยการเก็บแบบสูตรน้ำในระยะยาว ที่

อุณหภูมิตั้งแต่ -20 ถึง 30 °ซ พบว่าหลังการเก็บเชื้อที่ 4 และ 10 °ซ เป็นเวลาหนึ่งเดือนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียของเซลล์ถึง 75-90% รวมทั้งการเติมทรีฮาโลสซึ่งเป็นสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ช่วยทำให้มีอัตราการอยู่รอดของเชื้อมากขึ้นเมื่อเก็บเชื้อที่ 20 และ 30 °ซ นอกจากนี้ Manikandan และคณะ (2010) ศึกษาการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์เพื่อช่วยการเก็บรักษา *Pseudomonas fluorescens* sp. สายพันธุ์ Pf1 ที่มีประสิทธิภาพเป็นสารควบคุมชีวอินทรีย์ในการยับยั้งโรคในมะเขือเทศ พบว่าการเติมกลีเซอรอลในอาหารเหลว nutrient broth ทำให้แบคทีเรียอยู่รอดมากกว่า 9.5×10^7 CFU/มิลลิลิตร หลังการเก็บที่ 25 °ซ เป็นเวลา 6 เดือน ขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่เติมกลีเซอรอล แบคทีเรียตายหมดภายใน 3 เดือน นอกจากนี้การเตรียมหัวเชื้อในอาหารต่างชนิดกันมีผลต่อการรอดชีวิต กระบวนการเผาผลาญสารอาหารของแบคทีเรียและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของแบคทีเรียในการบำบัดดินปนเปื้อนสารพิษ (Cunliffe และคณะ, 2006) จากงานวิจัยของ Karabikal และคณะ (2009) พบว่าการประยุกต์ใช้หัวเชื้อ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ Spyr1 ในรูปแบบที่แขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลว M9MM มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในระบบนิเวศจำลองดิน สูงกว่าการใช้หัวเชื้อแบบเซลล์ตรึง ดังนั้นจุลินทรีย์สูตรน้ำเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการประยุกต์ใช้ในการบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในดินโดยชีววิธี โดยจุลินทรีย์สูตรน้ำที่ดีต้องมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูง เก็บรักษาได้ยาวนาน อีกทั้งยังคงประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ตลอดการเก็บรักษา

ในการดำเนินระบบบำบัดอย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องตรวจติดตามความเข้มข้นของสารพิษที่เหลืออยู่ และจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการปรับสภาพแวดล้อมในระบบบำบัดให้เหมาะสมต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น การเติมสารอาหาร การเติมอากาศ การเติมจุลินทรีย์ เป็นต้น (Saylor และคณะ, 1995; Phrommanich และคณะ, 2009) ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจติดตามจุลินทรีย์จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจวิธีหนึ่ง เนื่องจากวิธีการตรวจติดตามนี้มีความรวดเร็วกว่าวิธีนับจำนวนจุลินทรีย์ซึ่งต้องใช้เวลาสำหรับการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่การตรวจติดตามจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลสามารถดำเนินได้อย่างสะดวกและรวดเร็วโดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมและตรวจติดตามได้ทันทีและมีความแม่นยำสูง เนื่องจากการติดตามยีนที่ประมวลรหัสของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้โดยตรงทำให้ทราบกิจกรรมของจุลินทรีย์ในระบบ และทำให้ทราบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารพิษในระบบบำบัด เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการควบคุมและดำเนินงานของระบบบำบัดอย่างมีประสิทธิภาพ (Phrommanich และคณะ, 2009; Shi และ

คณะ, 2010) ตัวอย่างการตรวจติดตามจุลินทรีย์โดยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Zhou และคณะ, 2009) การตรวจนับจำนวนยีนที่ประมวลรหัสของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดย real-time qPCR (Cébron และคณะ, 2008) ซึ่งมีการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมหลายชนิดได้แก่ ดิน (Phrommanich และคณะ, 2009) น้ำใต้ดิน (Kao และคณะ, 2010) และน้ำเสียและสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสีย (Shannon และคณะ, 2007)

งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายงานวิจัยโดยมุ่งหาวิธีการเตรียมแบคทีเรียพร้อมใช้ในรูปแบบแบคทีเรียสูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ให้มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนตลอดการเก็บรักษา มีต้นทุนต่ำ ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ไพรีนเป็นต้นแบบเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของแบคทีเรียสูตรน้ำ เนื่องจากไพรีนเป็นตัวแทนของ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง ซึ่งถูกจัดอยู่ใน PAHs 16 ชนิด เป็นสารพิษอันตรายที่ควรให้ความสำคัญ (Cerniglia และคณะ, 1992) นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์แบคทีเรียสูตรน้ำในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อไป และการประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนในระบบนิเวศจำลองดิน พร้อมทั้งการตรวจติดตามจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดินด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล โดยประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อสามารถผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม และมีต้นทุนต่ำในการผลิต และเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการต่อยอดงานวิจัยของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ในเชิงพาณิชย์และประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำสำหรับบำบัดมลพิษในสิ่งแวดล้อม เพื่อลดการนำเข้าหัวเชื้อจุลินทรีย์จากต่างประเทศ

5.2 ขั้นตอนงานวิจัย

5.2.1 พัฒนาการผลิตสูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีน

- 1) คัดเลือกสารละลายที่เหมาะสมสำหรับแขวนลอยเซลล์
- 2) พัฒนาแบคทีเรียสูตรน้ำโดยการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์
- 3) ทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษา
- 4) พัฒนาปรับปรุงการเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำ
- 5) ประเมินต้นทุนเบื้องต้นและค่าใช้จ่ายเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ

5.2.2 พัฒนาวิธีการใช้สูตรน้ำของ RN402 ในการบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีน

- 1) เก็บตัวอย่างดิน และวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน
- 2) ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Most Probable Number (MPN)
- 3) ประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในการบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีนในระบบนิเวศจำลองดิน
- 4) ตรวจติดตามการมีอยู่ของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ในระบบนิเวศจำลองดินโดยวิธี PCR-DGGE
- 5) ตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี PCR
- 6) ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี real-time qPCR

5.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

5.3.1 คัดเลือกสารละลายที่เหมาะสมสำหรับแขวนลอยเซลล์ RN402

คัดเลือกสารละลายที่เหมาะสมสำหรับแขวนลอยเซลล์ RN402 เพื่อเป็นสารละลายพื้นฐานสำหรับการพัฒนาเป็นแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 โดยเตรียมหัวเชื้อ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 จากงานวิจัยของ Klankeo และคณะ (2009) ทำได้โดยนำโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว 0.1xLB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ในสารละลายไซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำอีก 1 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยในอาหารเหลว carbon free minimal medium (CFMM) pH 7 หรือ 0.1xLB หรือ CFMM ที่เติมไซเดียมอะซิเตท 0.25 % (w/v) หรือสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (potassium phosphate buffer, PB) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ให้มีแบคทีเรีย 10^9 MPN/มิลลิลิตร โดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางแบคทีเรียแขวนลอยให้มีค่าดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.45 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำแบคทีเรียแขวนลอยเก็บรักษาในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุแบคทีเรียแขวนลอยปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C เป็นเวลา 30 วัน เก็บตัวอย่างแบคทีเรียแขวนลอยในวันที่ 0 และ 30 วัน เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย ทดสอบ

ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลิน และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติตามวิธีที่ระบุในข้อ 5.3.1.1 -
5.3.1.3

5.3.1.1 ตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย

ตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count โดยนำสารแขวนลอยเซลล์เชื้อจากด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น เพื่อวัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียโดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย} = 100 - \frac{(\log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตรวันที่ } 0 - \log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตรวันที่ } n) \times 100}{\log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตรวันที่ } 0}$$

หมายเหตุ n หมายถึง วันที่เก็บตัวอย่าง

5.3.1.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลินจากแบคทีเรียแขวนลอย

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลินของแบคทีเรีย โดยนำแบคทีเรียแขวนลอยแบบต่างๆ ซึ่งเก็บรักษาที่ 4 และ 30 °C เป็นเวลา 0 10 20 และ 30 วัน โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU/มิลลิลิตร เติมนลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมไพลินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัม/ลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ระยะเวลา 9 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับการทดลองประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลิน มีชุดการทดลองควบคุมคือ อาหารเหลว CFMM ที่เติมไพลินแต่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย วิเคราะห์ปริมาณไพลินที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยวิธี HPLC ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1

5.3.1.3 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$ การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5

5.3.2 พัฒนาแบคทีเรียสูตรน้ำโดยการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์

นำสารละลายที่เหมาะสมสำหรับแขวนลอยเซลล์ RN402 จากผลการทดลองข้อ 5.3.1 โดยเตรียมหัวเชื้อตามวิธีที่ระบุในข้อ 5.3.1 และนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาแขวนลอยในสารละลายที่เหมาะสม ซึ่งพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงและต้นทุนต่ำในการผลิต เติมนด้วยสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ดังในตารางที่ 5.1 ที่ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร เพื่อผลิตเป็น

แบคทีเรียสูตรน้ำแบบต่างๆ โดยชุดควบคุมคือแบคทีเรียแขวนลอยที่ไม่มีการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ จากนั้นนำแบคทีเรียสูตรน้ำเก็บรักษาในขวดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 60 มิลลิลิตร โดยบรรจุแบคทีเรียสูตรน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน ดังแสดงในรูปที่ 5.1 เก็บตัวอย่างแบคทีเรียสูตรน้ำแบบต่างๆ เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรีน และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติตามวิธีที่ระบุในข้อ 5.3.1.1 - 5.3.1.3



รูปที่ 5.1 แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งถูกบรรจุในขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร

ตารางที่ 5.1 ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของสารรักษาสภาพจุลินทรีย์	% ความเข้มข้น (w/v)
แลคโทส (lactose)	1, 5, 10
ทรีฮาโลส (trehalose)	1, 5, 10
กลูโคส (glucose)	1, 5
ซอร์บิทอล (sorbitol)	1, 5
กลีเซอรอล (glycerol)	1, 5
พอลิเอทิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol:PEG)	1, 5
โพรลีน (proline)	1, 5
ไกลซีน (glycine)	1, 5

5.3.3 ทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษา

คัดเลือกแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 จากข้อ 5.3.2 โดยคัดเลือกแบคทีเรียสูตรน้ำที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงสุด และมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลิน เพื่อทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษาแบคทีเรียสูตรน้ำ โดยใช้ขวดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 60 มิลลิลิตร ที่บรรจุแบคทีเรียสูตรน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 180 วัน และศึกษาผลของการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ในการเก็บรักษาในระยะยาว โดยเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียสูตรน้ำที่เติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์กับแบคทีเรียสูตรน้ำที่ไม่เติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ (ชุดควบคุม) เก็บตัวอย่างแบคทีเรียสูตรน้ำทุก 30 วัน เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลิน และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติตามวิธีที่ระบุในข้อ 5.3.1.1 - 5.3.1.3

5.3.4 พัฒนาปรับปรุงการเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402

พัฒนาปรับปรุงการเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 เพื่อลดต้นทุนในการผลิต ลดปริมาณการใช้หัวเชื้อ และยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนาน โดยคัดเลือกแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 จากข้อ 5.3.2 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงสุด โดยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นจาก 10^9 เป็น 10^{12} CFU/มิลลิลิตร และชุดควบคุมคือ แบคทีเรียสูตรน้ำที่ไม่เติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ โดยนำแบคทีเรียสูตรน้ำเก็บรักษาในขวดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 60 มิลลิลิตร ที่บรรจุแบคทีเรียสูตรน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 270 วัน เก็บตัวอย่างทุก 30 วัน เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลินตามวิธีที่ระบุในข้อ 5.3.1.1 และ 5.3.1.2

5.3.5 ประเมินต้นทุนเบื้องต้นและค่าใช้จ่ายเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ

ประเมินต้นทุนเบื้องต้นและค่าใช้จ่ายเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ ปริมาตร 1 ลิตร โดยรายละเอียดดังต่อไปนี้ ได้แก่ ค่าสารเคมี ค่าอุปกรณ์ ค่าไฟฟ้า เป็นต้น โดยเปรียบเทียบต้นทุนเบื้องต้นระหว่างสูตรดั้งเดิมในข้อ 5.3.3 กับสูตรปรับปรุงในข้อ 5.3.4

5.3.6 พัฒนารูปแบบการใช้สูตรน้ำของ RN402 ในการบำบัดดินปนเปื้อนไพลิน

5.3.6.1 เก็บตัวอย่างดิน และวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

1) เก็บตัวอย่างดิน

คัดเลือกดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ โดยเลือกดินบริเวณข้างสวนผลไม้ ต. บางเขน อ. เมือง จ. นนทบุรี เก็บจากผิวดินลึกลงไปประมาณ 10 ซม. ผึ่งลมไว้ข้ามคืน นำมาบดและร่อน

ผ่านตะแกรงขนาดรู 1.18 มม. (เบอร์16) ปรับสภาพความเป็นกรดต่างของดินเท่า pH 7 โดยใช้ปูนขาว และบ่มดินไว้ 24 ชม. จากนั้นเก็บตัวอย่างดินไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนเริ่มทำการทดลอง

2) วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

วิเคราะห์ลักษณะเนื้อดิน ปริมาณความชื้น ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง สภาพการนำไฟฟ้า ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน สารอินทรีย์ อินทรีย์คาร์บอน แมกนีเซียม แคลเซียม ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม โดยนำตัวอย่างดินส่งตรวจที่กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการเกษตร กรมวิชาการเกษตรวิเคราะห์

5.3.6.2 ประยุกต์ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนในระบบนิเวศจำลองดิน

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน จากข้อ 5.3.3 ในการย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในดิน โดยนำดินตัวอย่างจากข้อ 5.3.6.1 มาสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่มีการปนเปื้อนด้วยไพรีน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนระหว่างการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ที่เตรียมใหม่ แบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน และการไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย ที่มีผลกระทบต่อการใช้ไพรีนในระบบนิเวศจำลอง โดยระบบนิเวศจำลองดินนี้ประกอบด้วย 4 ชุดทดลอง ได้แก่

1) ชุดทดลอง abiotic control

สร้างระบบนิเวศจำลอง โดยบรรจุดิน 6 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียว (รูปที่ 5.2) หนึ่งขวดที่ 121 °C 30 นาที 3 ครั้ง โดยระหว่างการฆ่าเชื้อแต่ละครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน จึงจะฆ่าเชื้อครั้งต่อไป เพื่อกำจัดสปอร์เชื้อราในดิน จากนั้นเติมด้วยไพรีนที่ละลายในอะซิโตนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดิน ตั้งทิ้งไว้ 1 คืนให้อะซิโตนระเหย ปรับอัตราส่วนระหว่าง คาร์บอน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส (C:N:P) ให้ใกล้เคียง 100 : 8 : 2 โดยเติมอาหารเหลว CFMM ปรับความชื้นให้เป็น 40% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นทุกๆ 7 วัน เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้เท่ากับน้ำหนักเริ่มต้นการทดลองเพื่อรักษาความชื้น เก็บตัวอย่างดินทุก 2 สัปดาห์ นาน 8 สัปดาห์ โดยใช้ดิน 1 กรัม เพื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.6 ใช้ดิน 1 กรัม ใช้ดิน 2 กรัม เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.7 และไนใช้ดิน 1 กรัม ในการสกัดดีเอ็นเอจากดินตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8

2) ชุดทดลอง biostimulation

สร้างระบบนิเวศจำลองเช่นเดียวกับวิธีที่ระบุในข้อ 1 โดยใช้ดินไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้เท่ากับน้ำหนักเริ่มต้นการทดลองเพื่อรักษาความชื้น เก็บตัวอย่างดินเป็น 200 มิลลิกรัม/ลิตร

3) ชุดทดลอง bioaugmentation I

สร้างระบบนิเวศจำลองเช่นเดียวกับวิธีที่ระบุในข้อ 1 โดยใช้ดินไม่ผ่านการฆ่าเชื้อเติม แบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ที่ไม่ผ่านการเก็บรักษา โดยมีแบคทีเรียเริ่มต้น 10^8 CFU / กรัม ดิน

4) ชุดทดลอง bioaugmentation II

สร้างระบบนิเวศจำลองเช่นเดียวกับวิธีที่ระบุในข้อ 1 โดยใช้ดินไม่ผ่านการฆ่าเชื้อเติม แบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน โดยมีแบคทีเรียเริ่มต้น 10^8 CFU / กรัม ดิน



รูปที่ 5.2 ระบบนิเวศจำลองดิน โดยบรรจุดิน 6 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียว

5.3.7 ตรวจติดตามการมีอยู่ของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ในระบบนิเวศจำลองดินโดยวิธี PCR-DGGE

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากดินในข้อ 5.3.6.2 จากชุดทดลอง biostimulation bioaugmentation I และ bioaugmentation II มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ 341FGC (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') ซึ่งมี GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3') เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ 520R (5'-ACCGCGGCTGCTGGC-3') (Muyzer และคณะ, 1993) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 200 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา เป็นดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ $1 \times Taq$ DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมล ดีเอ็นเอแม่แบบ ประมาณ 300 ng ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) โดยมีโปรแกรมดังนี้

1. Initial denaturation step อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 5 นาที
2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ
 - 2.1 Denaturation step อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 1 นาที
 - 2.2 Annealing step อุณหภูมิ 65°ซ เวลา 1 นาที
(อุณหภูมิลดลงทีละ 0.5°ซ ในแต่ละรอบ จนถึง 55°ซ)
 - 2.3 Extension step อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 2 นาที
3. Denaturation step อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 1 นาที
4. Annealing step อุณหภูมิ 55°ซ เวลา 1 นาที
5. Extension step อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 2 นาที
6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 20 รอบ
7. Final extension อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 7 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้วิเคราะห์การมีอยู่ของ RN402 ในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียของระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี DGGE ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.9

5.3.8 ตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 5.3.6.2 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มียื่นเป้าหมายเป็นยีน *nidA* โดยใช้ไพรเมอร์ *nidAF* 5'-ATCTTCGGGCGCGGCTGGGTGTTTCTCGG-3' และ *nidAR* 5'- AATTGTCGGCGGCTGTCTTCCAGTTCGC-3' (Khan และคณะ 2001) ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 508 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้ สารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ $1 \times Taq$ DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมล ดีเอ็นเอแม่แบบประมาณ 300 ng ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีโปรแกรมดังนี้

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ เป็นเวลา 5 นาที

- | | | |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 65°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำขั้นตอนนี้ 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 7 นาที |

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

5.3.9 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสด้วยวิธี real-time qPCR

5.3.9.1 ออกแบบไพรเมอร์และทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับ real-time qPCR

การออกแบบไพรเมอร์ให้เหมาะสำหรับวิธี real-time qPCR โดยใช้โปรแกรม FastPCR version 5.1.70 ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nidA* จาก *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 (GenBank accession no. FJ032197) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์มีดังนี้ *nidA402F* 5'-ACGTTCTACCTCGACCTCATTGC-3' และ *nidA402R* 5'-GTTCTGCAGCGAGATTTCCGCTG-3' ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 222 bp การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ *nidA402F* และ *nidA402R* ปฏิบัติโดยวิธี PCR โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากแบคทีเรียดังนี้ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่มียีน *nidA* *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 ที่มียีน *arh* (Kouzuma และคณะ, 2006) *Novosphingobium aromaticivorans* sp. สายพันธุ์ F199 ที่มียีน *bph* (Romine และคณะ, 1999) *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 ที่มียีน *bph* (Pinyakong และคณะ, 2000) และ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ R2 ที่มียีน *alkM* (Tathong และคณะ, 2008) โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาเป็นดังนี้ สารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1xTaq DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมล ดีเอ็นเอแม่แบบ ประมาณ 300 ng ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาโดยใช้พอลิเมอร์เรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีโปรแกรมหดังนี้

- | | | |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 60.5°C | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 10 นาที |

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

นอกจากนี้ยังทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์บนเครื่องคอมพิวเตอร์ (*in silico*) โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์กับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

5.3.9.2 เตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับ real-time qPCR

นำดินจากข้อ 5.3.6.1 ปริมาณ 9 กรัม ใส่ลงหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ เดิมด้วยแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 จากข้อ 5.3.3 ที่ทราบปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1 \pm 1.18 \times 10^{13}$ MPN/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำดิน 1 กรัม เพื่อสกัดดีเอ็นเอและทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8 โดยให้ปริมาณสุดท้ายของดีเอ็นเอที่ละลายในสารละลาย TE เท่ากับ 40 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้เจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ โดยปิเปตดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร ใส่ในน้ำปลอดประจุ TE 18 ไมโครลิตร ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง $1 \pm 1.18 \times 10^4$ to $1 \pm 1.18 \times 10^{12}$ MPN/กรัม ดิน นำดีเอ็นเอเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับ real-time qPCR เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (C_t) และปริมาณเชื้อ (log MPN/กรัม ดิน)

5.3.9.3 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ด้วยวิธี real-time qPCR

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* จากดินตัวอย่างในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี real-time qPCR โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 5.3.6.2 ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอจากชุดทดลอง biostimulation ชุดทดลอง bioaugmentation I และ ชุดทดลอง bioaugmentation II เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 1x Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมล ดีเอ็นเอแม่แบบ 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตร 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เลส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่ง

ประกอบด้วย MiniOpticon Real-Time PCR detector (Bio-Rad) ประมวลผลโดยโปรแกรม MJ Opticon Monitor Analysis Software version 3.1 (Bio-Rad) โดยมีโปรแกรมดังนี้

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที
5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ

6. Melting curve analysis ที่อุณหภูมิ 65-95°C

(โดยอ่านสัญญาณตามอุณหภูมิเพิ่มขึ้นทีละ 0.5°C ทุกๆ 10 วินาที จนถึง 95°C)

การแปลผลจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ทำโดยเปรียบเทียบค่า Ct ของตัวอย่างดินกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่า C_t และปริมาณเชื้อ (log MPN/กรัม ดิน) (ภาคผนวก ฉ)

5.4 ผลการทดลอง

5.4.1 การคัดเลือกสารละลายที่เหมาะสมสำหรับแขวนลอยเซลล์

ผลจากการคัดเลือกสารละลายที่เหมาะสมสำหรับแขวนลอยเซลล์ เพื่อเป็นสารละลายพื้นฐานสำหรับการพัฒนาวิธีการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 โดยเลือกใช้สารละลายดังต่อไปนี้ อาหารเหลว CFMM pH 7 อาหารเหลว 0.1xLB อาหารเหลว CFMM ที่เติมโซเดียมอะซิเตท 0.25 % (w/v) และสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตฟอสเฟอรัส (PB) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ให้มีแบคทีเรีย 10^9 CFU/มิลลิลิตร เก็บรักษาแบคทีเรียแขวนลอยที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C เป็นเวลา 30 วัน จากผลการทดลองพบว่า การเตรียมแบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงที่สุด เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C เป็นเวลา 30 วัน เท่ากับ 91 และ 90 % ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไฟรีนมากกว่า 90% จากความเข้มข้นไฟรีนเริ่มต้น 100 มก/ลิตร ในอาหารเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 9 วัน ดังแสดงในตารางที่ 5.2 เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียในสารละลายทั้ง 4 ชนิด ซึ่งผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่เมื่อพิจารณาจากวิธีการเตรียมและราคาต้นทุนพบว่า สารละลาย PB มีราคาต้นทุนต่ำที่สุด และง่ายต่อการเตรียม ทำให้สารละลาย PB ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 6.5 เป็นสารละลายที่เหมาะสมสำหรับแขวนลอยเซลล์เพื่อใช้ในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำในข้อ 5.3.2

ตารางที่ 5.2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียและประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพลินของแบคทีเรียแขวนลอยที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน

สารละลาย	4 °ซ		30 °ซ	
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพลิน(%)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพลิน(%)
CFMM	88.77±1.96 ^a	99.90±0.11 ^a	86.21±0.03 ^a	99.97±0.02 ^a
CFMM+0.25%(w/v) ของโซเดียมอะซิเตท	87.91±0.83 ^a	88.38±19.82 ^a	78.12±0.90 ^b	99.86±0.11 ^a
0.1xLB	88.47±2.12 ^a	97.49±2.99 ^a	80.44±0.97 ^b	99.46±0.12 ^a
PB	91.34±0.97 ^a	91.89±10.61 ^a	90.41±1.54 ^a	93.99±9.22 ^a

หมายเหตุ a b แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ทดสอบโดย DMRT (P<0.05)

5.4.2 การพัฒนาแบคทีเรียสูตรน้ำโดยการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์

เมื่อนำแบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 6.5 เติมด้วยสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ ได้แก่ แล็กโทส ทรีฮาโลส กลูโคส ซอร์บิทอล กลีเซอรอล PEG ไกลซีน และ โปรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อผลิตเป็นแบคทีเรียสูตรน้ำแบบต่างๆ และพิจารณาผลของการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ต่อการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือแบคทีเรียแขวนลอยที่ไม่มีการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ จากผลการทดลองการเก็บรักษาแบคทีเรียสูตรน้ำที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน พบว่า พบว่า การเติมซอร์บิทอล 1% กลีเซอรอล 1 และ 5% PEG 1% และ ทรีฮาโลส 1 5 และ 10% สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งมากกว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียในชุดควบคุมที่ไม่มีเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ และพบว่า การเติมกลีเซอรอล 1 % และ PEG 5% ลงในแบคทีเรียแขวนลอย ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 วัน ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 95.58 ± 3.04 และ 94.62 ± 1.86 % จากปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 10⁹ CFU/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 5.3 และพบว่า มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไพลิน แต่เมื่อพิจารณาจากราคาต้นทุนการผลิต พบว่าการเตรียมกลีเซอรอลมีราคาสูงกว่า PEG และยังใช้สารปริมาณน้อยกว่า จึงทำให้กลีเซอรอล 1 % เป็นสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดในงานวิจัยนี้ ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ประกอบด้วยสารละลาย PB 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ที่เติมกลีเซอรอล 1 % และแบคทีเรีย RN402 ความเข้มข้น 10⁹ CFU/มิลลิลิตร จากนั้นนำแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่ได้ไปทดสอบการเก็บรักษาในระยะยาวต่อไป

ตารางที่ 5.3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียแขวนลอยที่มีการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน

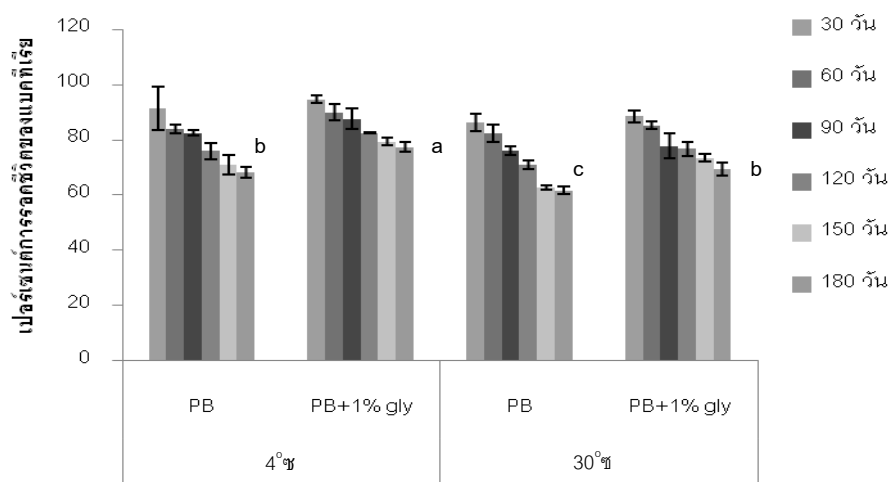
สารรักษาสภาพจุลินทรีย์	ความเข้มข้น % (v/w)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย	
		4 °ซ	30 °ซ
ชุดควบคุม (PB)	-	91.36 ± 7.97 ^{ab}	86.19 ± 2.36 ^{ab}
ซอร์บิทอล	1	91.08 ± 3.73 ^{ab}	74.48 ± 0.29 ^{bcde}
	5	86.23 ± 1.42 ^{bc}	72.07 ± 2.05 ^{bcde}
กลูโคส	1	80.47 ± 2.35 ^f	74.01 ± 3.23 ^g
	5	72.47 ± 3.80 ^f	68.81 ± 2.18 ^g
แลกโทส	1	86.58 ± 1.73 ^{cd}	75.38 ± 3.72 ^{cde}
	5	80.57 ± 2.26 ^{de}	70.62 ± 2.79 ^f
	10	78.56 ± 1.49 ^{de}	77.16 ± 3.79 ^{ef}
ทรีฮาโลส	1	89.51 ± 0.14 ^{bc}	78.87 ± 2.82 ^{cde}
	5	87.50 ± 1.82 ^{bc}	79.52 ± 3.37 ^{abc}
	10	90.40 ± 1.32 ^{cd}	69.83 ± 2.00 ^{ef}
กลีเซอรอล	1	94.62 ± 1.86 ^a	88.44 ± 1.22 ^a
	5	90.67 ± 0.39 ^{bc}	75.94 ± 1.99 ^{abcd}
PEG	1	93.80 ± 7.66 ^{ab}	81.07 ± 0.69 ^{abc}
	5	95.58 ± 3.04 ^a	76.06 ± 3.83 ^{abc}
ไกลซีน	1	65.51 ± 1.34 ^{ef}	54.14 ± 4.63 ^g
	5	69.54 ± 4.47 ^f	57.33 ± 3.03 ^g
โปรลีน	1	87.32 ± 2.70 ^{bcd}	71.96 ± 3.94 ^{cde}
	5	86.45 ± 1.24 ^{cd}	65.13 ± 2.18 ^{cde}

หมายเหตุ a b c แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ทดสอบโดย DMRT (P<0.05)

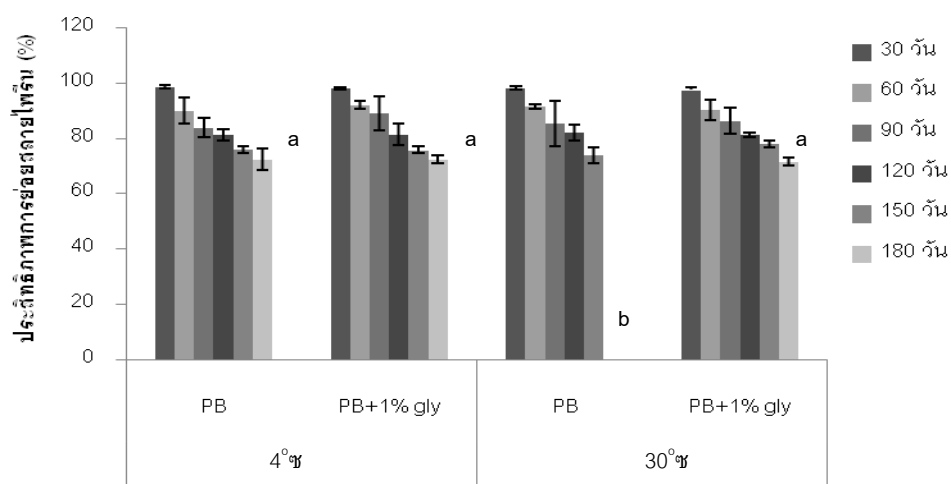
5.4.3 การทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษา

นำแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงสุดจากข้อ 5.4.2 โดยคัดเลือกแบคทีเรียสูตรน้ำที่เตรียมจากสารละลาย PB 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ที่เติมกลีเซอรอล 1 % และแบคทีเรีย RN402 ความเข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร เพื่อทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษาแบคทีเรียสูตรน้ำ ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 180 วัน และศึกษาผลของการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ในการเก็บรักษาในระยะยาวโดยเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียสูตรน้ำที่เติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์กับแบคทีเรียสูตรน้ำที่ไม่เติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ (ชุดควบคุม) จากผล

การทดลองหลังผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน พบว่า แบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส 1 % มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลิน เท่ากับ 80% และ 75% ตามลำดับ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลิน เท่ากับ 75% และ 70% ตามลำดับ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 5.3 และ 5.4 ในขณะที่ชุดควบคุมสามารถตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลินของแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัสที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ เท่านั้น โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลินของแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส เท่ากับ 70% และ 70% ตามลำดับ เนื่องจากการเก็บแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัสที่เก็บที่อุณหภูมิ 30 °ซ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียเท่ากับ 60% ซึ่งน้อยกว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลิน จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเติมกลีเซอรอล 1 % ในแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส RN402 สามารถยืดอายุการเป็นรักษาแบคทีเรียมีชีวิตได้ แต่เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียมีชีวิตของวันที่ 180 มีปริมาณเท่ากับ 10^6 CFU/มิลลิลิตร จึงต้องใช้แบคทีเรียสเตรปโทคอกคัสจำนวนมากจึงจะพอเพียงกับการประยุกต์ใช้ในการบำบัดสารพิษ ดังนั้นในการทดลองข้อ 5.3.4 จะเป็นการพัฒนาปรับปรุงการเตรียมแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส RN402 โดยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น เพื่อลดต้นทุนในการผลิต ลดปริมาณการใช้หัวเชื้อ และยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนาน



รูปที่ 5.3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน



รูปที่ 5.4 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียสเตรนน้ำ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 180 วัน โดยหัวเชื้อเริ่ม 10^6 CFU/มิลลิลิตร ความเข้มข้นไขมันเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 9 วัน

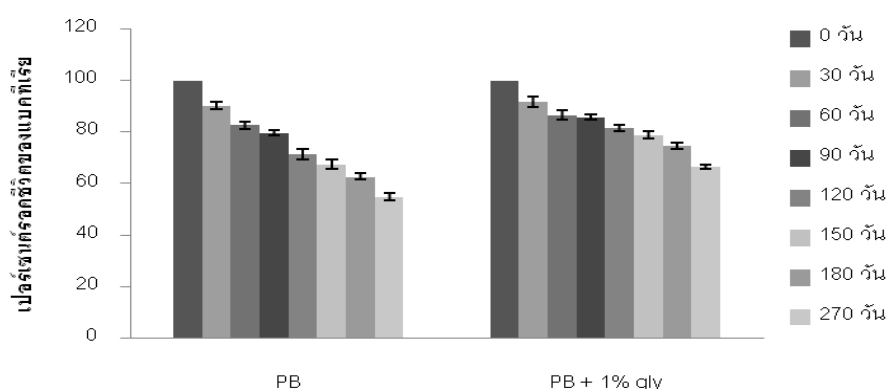
5.4.4 การพัฒนาปรับปรุงการเตรียมแบคทีเรียสเตรนน้ำ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402

พัฒนาปรับปรุงการเตรียมแบคทีเรียสเตรนน้ำ RN402 เพื่อลดต้นทุนในการผลิต ลดปริมาณการใช้หัวเชื้อ และยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนาน โดยคัดเลือกแบคทีเรียสเตรนน้ำ RN402 จากข้อ 5.3.2 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงสุด โดยเพิ่มให้มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นจาก 10^9 เป็น 10^{12} CFU/มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมคือ แบคทีเรียสเตรนน้ำที่ไม่เติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 °ซ และเก็บตัวอย่างทุกๆ 30 วัน เป็นเวลา 270 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในแบคทีเรียสเตรนน้ำเท่ากับ 66 % หรือประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมกลีเซอรอล พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในแบคทีเรียสเตรนน้ำเท่ากับ 55 % หรือประมาณ 10^6 CFU/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 5.4 และรูปที่ 5.5 นอกจากนี้ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันได้เพียงแบคทีเรียสเตรนน้ำ RN402 ที่มีเติมกลีเซอรอล พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในระยะเวลา 9 วัน เท่ากับ 10% ซึ่งแสดงผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5.5 และรูปที่ 5.6

เมื่อเปรียบเทียบผลของเปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส (หัวเชื้อเริ่มต้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร) เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน ในสภาวะการเก็บรักษาเช่นเดียวกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย RN402 เหลืออยู่ 4.23×10^6 CFU/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัสที่ปรับปรุงแล้วถึง 1000 เท่า จากประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรลินของแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัสที่ปรับปรุงมีอายุการเก็บรักษาเท่ากับ 180 วัน และยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไฟรลินเท่ากับ 70%

ตารางที่ 5.4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส RN402 ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 270 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10^{12} CFU/มิลลิลิตร ในสารละลาย PB ที่มีเติมกลีเซอรอลเท่ากับ 1% โดยชุดควบคุมสารละลาย PB ไม่เติมกลีเซอรอล

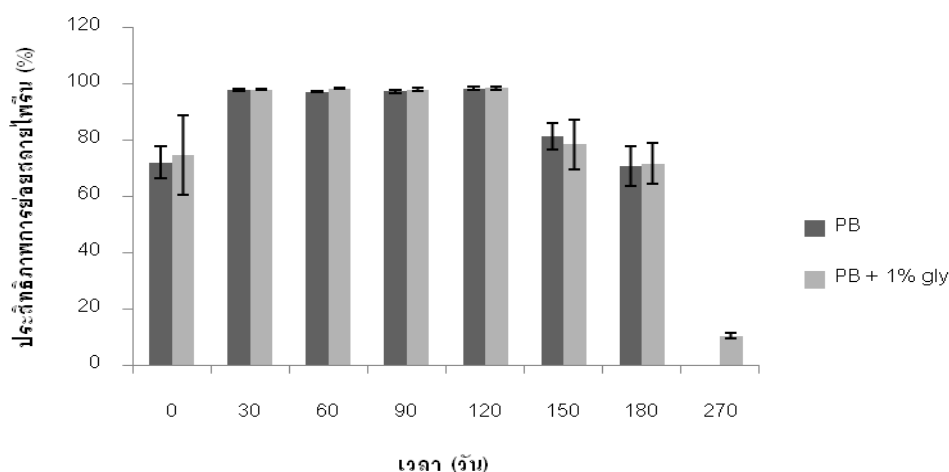
ระยะเวลา (วัน)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย		จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิต (CFU/มิลลิลิตร)	
	ชุดควบคุม (PB)	PB + 1% กลีเซอรอล	ชุดควบคุม (PB)	PB + 1% กลีเซอรอล
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	1.35×10^{12}	1.01×10^{12}
30	90.49 ± 1.49	91.80 ± 2.16	8.70×10^{10}	1.99×10^{11}
60	82.79 ± 1.43	86.66 ± 1.93	1.06×10^{10}	3.57×10^{10}
90	79.85 ± 1.62	85.77 ± 0.65	4.67×10^9	2.83×10^{10}
120	71.47 ± 1.56	81.61 ± 1.81	5.17×10^8	8.33×10^9
150	67.66 ± 1.91	78.95 ± 1.31	1.57×10^8	4.00×10^9
180	62.81 ± 1.18	74.80 ± 1.12	3.67×10^7	1.17×10^9
270	55.03 ± 1.36	66.69 ± 0.71	4.67×10^6	1.20×10^8



รูปที่ 5.5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส RN402 ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 270 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10^{12} CFU/มิลลิลิตร ในสารละลาย PB ที่มีเติมกลีเซอรอลเท่ากับ 1% โดยชุดควบคุมสารละลาย PB ไม่เติมกลีเซอรอล

ตารางที่ 5.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรיןของแบคทีเรียสเตรปโทมัยซิส RN402 ซึ่งถูกเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ โดยหัวเชื้อเริ่ม 10^6 CFU/มิลลิลิตร ความเข้มข้นไฟรินเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 9 วัน

ระยะเวลา (วัน)	ประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟริน (%)	
	ชุดควบคุม (PB)	PB + 1% กลีเซอรอล
0	72.06 ± 5.69	74.61 ± 14.10
30	97.90 ± 0.21	97.96 ± 0.19
60	97.27 ± 0.30	98.54 ± 0.30
90	97.43 ± 0.55	98.05 ± 0.70
120	98.53 ± 0.71	98.62 ± 0.55
150	81.46 ± 4.80	78.53 ± 8.83
180	70.70 ± 7.12	71.80 ± 7.34
270	-	10.38 ± 0.98



รูปที่ 5.6 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรินของแบคทีเรียสเตรปโทมัยซิส RN402 ซึ่งถูกเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ โดยหัวเชื้อเริ่ม 10^6 CFU/มิลลิลิตร ความเข้มข้นไฟรินเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 9 วัน

5.4.5 ประเมินต้นทุนเบื้องต้นและค่าใช้จ่ายเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสเตรปโทมัยซิส

ประเมินต้นทุนเบื้องต้นและค่าใช้จ่ายเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสเตรปโทมัยซิส ปริมาตร 1 ลิตร โดยเปรียบเทียบต้นทุนเบื้องต้นระหว่างชุดดั้งเดิม (จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร) กับชุดปรับปรุง (จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 10^{12} CFU/มิลลิลิตร) เท่ากับ 50.26 และ 62.88 บาท/ลิตร แบคทีเรียสเตรปโทมัยซิส รายละเอียดดังในตารางที่ 5.6

ตารางที่ 5.6 ประเมินต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402

ขั้นตอน	รายการ	ปริมาณ	หน่วย	ต้นทุน/หน่วย (บาท)	รวมต้นทุน (บาท)		
					ชุดดั้งเดิม	ชุดปรับปรุง	
ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ	สารเคมี						
		โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.1	กรัม	0.22	0.02	0.04
		สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.1	กรัม	2	0.20	0.40
		ทริปโตน (tryptone)	2	กรัม	5.2	10.40	20.80
		น้ำกลั่น	1997.8	มิลลิลิตร	0.001	2.00	4.00
		<u>รวมค่าใช้จ่ายสารเคมี</u>				12.62	25.24
		ค่าไฟฟ้า					
		Incubator	0.384	กิโลวัตต์*ชม.	2.5	0.96	0.96
		<u>รวมค่าใช้จ่ายค่าไฟฟ้า</u>				0.96	0.96
		<u>รวมต้นทุนขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ</u>				13.58	26.20
ขั้นตอนการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ	สารเคมี						
		ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.261	กรัม	1.6	0.42	0.42
		โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.475	กรัม	1.6	0.76	0.76

ขั้นตอน	รายการ	ปริมาณ	หน่วย	ต้นทุน/หน่วย (บาท)	รวมต้นทุน (บาท)		
					ชุดดั้งเดิม	ชุดปรับปรุง	
	น้ำกลั่น	999.264	มิลลิลิตร	0.001	1.00	1.00	
	กลีเซอรอล (glycerol)	10	มิลลิลิตร	1.2	12.00	12.00	
	<u>รวมค่าใช้จ่ายสารเคมี</u>					14.18	14.18
	ค่าบรรจุภัณฑ์						
	ขวดพลาสติก	25	ขวด	0.9	22.50	22.50	
	<u>รวมค่าบรรจุภัณฑ์</u>					22.50	22.50
	<u>รวมต้นทุนขั้นตอนการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ</u>					36.68	36.68
	<u>รวมต้นทุน</u>					50.26	62.88

ที่มา: 2554

หมายเหตุ สูตรดั้งเดิม คือแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย PB 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ที่เติมกลีเซอรอล 1 % และแบคทีเรีย RN402 ความเข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร

สูตรปรับปรุง คือแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย PB 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ที่เติมกลีเซอรอล 1 % และแบคทีเรีย RN402 ความเข้มข้น 10^{12} CFU/มิลลิลิตร

5.4.6 การวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

จากผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินบริเวณข้างสวนผลไม้ ต. บางเขน อ. เมือง จ. นนทบุรี โดยส่งตัวอย่างดินเพื่อตรวจวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินที่กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ได้ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน ดังแสดงในตารางที่ 5.7 โดยมีอัตราส่วนของ C: N: P ของตัวอย่างดินนนทบุรี เท่ากับ 92: 8: 2 จากการตรวจวัดค่า pH ของดินเท่ากับ 4.4 แสดงว่าดินมีความเป็นกรด ดังนั้นก่อนนำดินมาทดลองจึงต้องเติมปูนขาวเพื่อปรับค่า pH ให้เท่า 7 นอกจากนี้วิเคราะห์การปนเปื้อนไพรีนของตัวอย่างดินด้วยเครื่อง GC-FID ไม่พบการปนเปื้อนไพรีนในดินตัวอย่าง วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เท่ากับ 4.65×10^8 MPN/กรัม ดิน จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน เท่า 1.45×10^5 MPN/กรัม ดิน

ตารางที่ 5.7 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

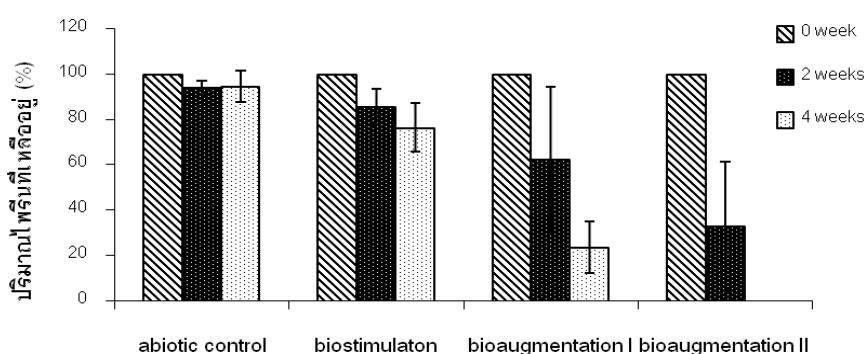
พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์
ลักษณะเนื้อดิน	ดินร่วนเหนียว
ปริมาณความชื้น (%)	7.64
ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (%)	64.75
ความเป็นกรดต่าง	4.4
สภาพการนำไฟฟ้า (dS/m)	0.100
อินทรีย์คาร์บอน (%)	2.755
ไนโตรเจน (%)	0.238
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม/ลิตร)	6
โพแทสเซียม (มิลลิกรัม/ลิตร)	162

ที่มา: กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

5.4.7 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนในระบบนิเวศจำลองดิน

จากประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในดิน โดยสร้างระบบนิเวศจำลองดิน จำนวน 6 กรัม เติมไพรีนในอะซิโตนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300

มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดิน ในการทดลองนี้ประกอบด้วย 4 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดทดลอง abiotic control ชุดทดลอง biostimulation (เติมสารสกัดจากยีสต์) ชุดทดลอง bioaugmentation I (เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402) และ ชุดทดลอง bioaugmentation II (เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน) จากผลการทดลองพบว่า ไม่สามารถตรวจพบไฟรีนที่เหลืออยู่ในชุดทดลอง bioaugmentation II หลังจากผ่านการบ่มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในขณะที่ชุดทดลอง bioaugmentation I มีปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ 23.75 % จากความเข้มข้นของไฟรีนเริ่มต้น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดิน และไฟรีนลดลงเพียงเล็กน้อยในชุดทดลอง biostimulation คือมีปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ 76.47 % และในชุดทดลอง abiotic control มีปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่มากกว่า 90 % ดังแสดงในรูปที่ 5.7 ด้วยเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของไฟรีนที่ได้จากการสกัด เท่ากับ 99.37 ± 32.18 (ภาคผนวก ค.) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการลดลงของไฟรีนของชุดทดลอง bioaugmentation I และ bioaugmentation II มาจากกิจกรรมการย่อยสลายของแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีนตลอดการทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่า แบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีนของชุดทดลอง bioaugmentation I และ II มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับชุดทดลอง biostimulation มีจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีนเพิ่มขึ้นจาก 5 เป็น 7 log MPN/กรัม ดิน แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดั้งเดิมในดินสามารถปรับตัวและมีความสามารถย่อยสลายไฟรีน ซึ่งสอดคล้องกับการค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องของไฟรีนในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของชุดทดลอง biostimulation ในขณะที่ชุดทดลอง abiotic control ไม่มีการตรวจพบแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีนตลอดทั้ง 4 สัปดาห์ ดังแสดงในรูปที่ 5.7 และตารางที่ 5.8 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไฟรีนในดิน และมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้วิธีการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อยู่ในดิน



รูปที่ 5.7 ปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายไฟรีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในระบบนิเวศจำลองดิน ที่ความเข้มข้นไฟรีนเริ่มต้น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดิน

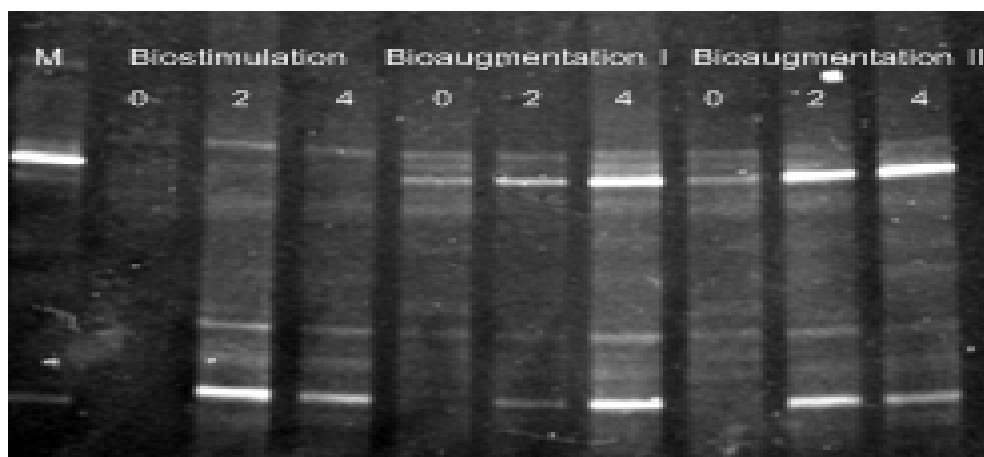
ตารางที่ 5.8 แบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีนในระบบนิเวศจำลองดิน

ชุดทดลอง	แบคทีเรียทั้งหมด			แบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีน		
	(log MPN/กรัม ดิน)			(log MPN/กรัม ดิน)		
	เวลา (สัปดาห์)			เวลา (สัปดาห์)		
	0	2	4	0	2	4
abiotic control	0 ± 0.00	0 ± 0.00	3.72 ± 1.84	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
biostimulation	8.67 ± 0.00	7.76 ± 0.34	8.50 ± 0.53	5.10 ± 0.07	6.92 ± 0.68	7.87 ± 0.21
bioaugmentation I	8.84 ± 0.23	9.18 ± 0.55	9.91 ± 0.21	8.94 ± 0.07	8.83 ± 0.15	9.77 ± 0.27
bioaugmentation II	8.82 ± 0.76	9.23 ± 0.76	9.85 ± 0.21	8.70 ± 0.12	9.17 ± 0.16	9.66 ± 0.29

5.4.8 การตรวจติดตามการมีอยู่ของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ในระบบนิเวศจำลองดินโดยวิธี PCR-DGGE

จากการตรวจติดตามการมีอยู่ของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ในระบบนิเวศจำลองดินโดยวิธี PCR-DGGE ซึ่งประกอบด้วย 3 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดทดลอง biostimulation เพื่อตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน ชุดทดลอง bioaugmentation I และ ชุดทดลอง bioaugmentation II เพื่อตรวจติดตามการมีอยู่และบทบาทในการย่อยสลายไฟรีนในระบบนิเวศจำลองดิน โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากดินจากระบบนิเวศจำลองดินในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4 และนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้คู่ไพรมอร์ 341F GC clamp และ 520R (Muyzer และคณะ, 1993) นำมาตรวจติดตามโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี DGGE โดยพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีเกรเดียนท์ของความเข้มข้น denaturant 30% – 70% จากผลการทดลอง พบว่า จากโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียที่เกิดขึ้นจากระบบนิเวศจำลองดิน มีแถบดีเอ็นเอเด่นของ RN402 อยู่ตลอดช่วงการทดลองในชุดทดลอง bioaugmentation I และ II ดังแสดงในรูปที่ 5.8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า RN402 เป็นประชากรหลักในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย และเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายไฟรีนในระบบนิเวศจำลองดิน ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีนในชุดทดลอง bioaugmentation I และ II ดังแสดงในตารางที่ 5.8 นอกจากนี้ในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียของชุดทดลอง biostimulation ชุดทดลอง bioaugmentation I และ II ยังพบแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียดั้งเดิมในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของทุกชุดทดลอง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดั้งเดิมในดินสามารถปรับตัวและมีความสามารถย่อยสลายไฟรีนหรือสามารถใช้ไฟรีนเป็นแหล่ง

คาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการเติมแบคทีเรียสูตราบน้ำ RN402 มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไพรีนในระบบนิเวศจำลองดิน

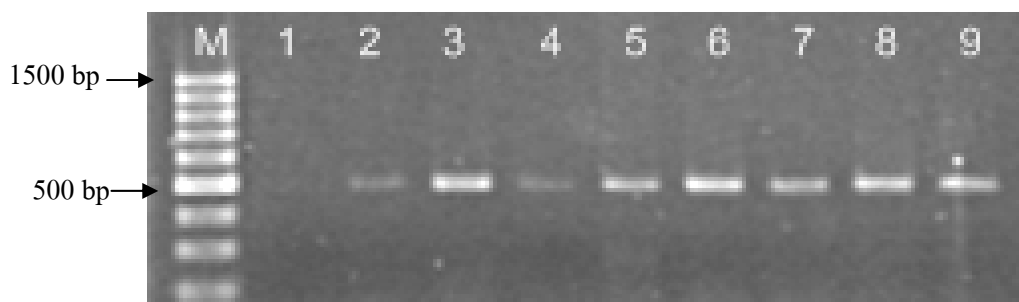


รูปที่ 5.8 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากระบบนิเวศจำลองดิน ประกอบด้วย 3 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดทดลอง biostimulation ชุดทดลอง bioaugmentation I และ ชุดทดลอง bioaugmentation II โดยเก็บตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4 ช่องวิ่งที่ M : แอปติเอ็นเอ RN402

5.4.9 การตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี PCR

ยีน *nidA* มีหน้าที่ในการประมวลรหัสหน่วยย่อยของแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์เริ่มต้นของวิถีการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรีย จากการตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน *nidA* ด้วยวิธี PCR โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากดินจากระบบนิเวศจำลองดินในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4 ของทั้ง 3 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดทดลอง biostimulation ชุดทดลอง bioaugmentation I และ ชุดทดลอง bioaugmentation II และนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ *nidAF* และ *nidAR* (Khan และคณะ 2001) จากผลการทดลองพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดตามที่คาดหวัง 508 bp ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของชุดทดลอง biostimulation แต่ไม่มีการตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ในสัปดาห์ที่ 0 เนื่องจากแบคทีเรียดั้งเดิมในดินสามารถปรับตัวและมีความสามารถย่อยสลายไพรีน ทำให้จำนวนแบคทีเรียดั้งเดิมที่สามารถย่อยสลายไพรีนเพิ่มขึ้นมากพอที่จะตรวจพบยีน *nidA* โดยวิธี PCR สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนในชุดทดลอง

biostimulation ดังแสดงในตารางที่ 5.8 ในขณะที่ชุดทดลอง bioaugmentation I และ II ตรวจพบการมีอยู่ของยีน *nidA* ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 และแถบดีเอ็นเอมีความเข้มข้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 เนื่องจากการเติมแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 และมีการเพิ่มจำนวนของ RN402 และแบคทีเรียดั้งเดิมในดินที่สามารถย่อยสลายไพรีน ดังแสดงในตารางที่ 5.8 และ รูปที่ 5.9

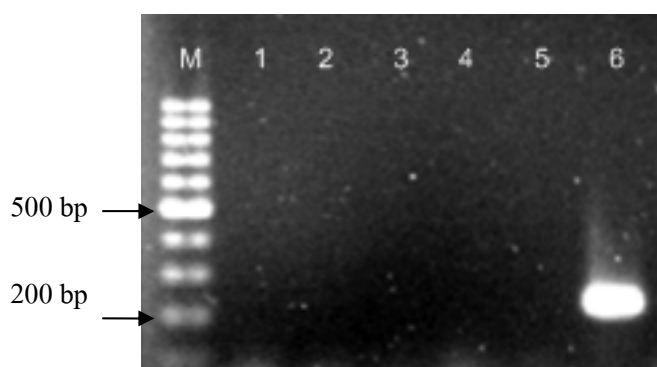


รูปที่ 5.9 การมีอยู่ของยีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซีจีเนสในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี PCR ช่องวิ่งที่ M: marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 1-3: ดีเอ็นเอจากชุดทดลอง biostimulation ในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4, ตามลำดับ ช่องวิ่งที่ 4-6: ดีเอ็นเอจากชุดทดลอง bioaugmentation I ในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4, ตามลำดับ ช่องวิ่งที่ 7-9: ดีเอ็นเอจากชุดทดลอง bioaugmentation II ในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4, ตามลำดับ

5.4.10 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับ real-time qPCR

จากการออกแบบไพรเมอร์สำหรับ real-time PCR โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน *nidA* โดยใช้โปรแกรม FastPCR version 5.1.70 โดยออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nidA* จาก *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 (GenBank accession no. FJ032197) คือ คู่ไพรเมอร์ *nidA402F* และ *nidA402R* การทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ทำโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากแบคทีเรียดังนี้ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Kouzuma และคณะ, 2006) *Novosphingobium aromaticivorans* sp. สายพันธุ์ F199 (Romine และคณะ, 1999) *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 (Pinyakong และคณะ, 2000) และ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ R2 (Tathong และคณะ, 2008) จากผลการทดลองพบว่า คู่ไพรเมอร์ *nidA402* มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของ RN402 เท่านั้น ซึ่งตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดตามที่คาดหวัง 222 bp ในขณะที่คู่ไพรเมอร์นี้ไม่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอจากแบคทีเรียตัวอื่น ดังแสดงในรูปที่ 5.10

นอกจากนี้การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยวิธี *in silico* โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์กับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า คู่ไพรเมอร์นี้มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nidA* (ไฟรีนไดออกซิจีเนส) ของ *Mycobacterium* หลายสายพันธุ์ เท่า 100 % แต่ไม่จำเพาะกับไดออกซิจีเนสชนิดอื่น ดังแสดงในตารางที่ 5.9 จากผลการทดลองทั้งหมดยืนยันว่าคู่ไพรเมอร์ *nidA402* มีความจำเพาะสูงต่อยีน *nidA* ดังนั้นคู่ไพรเมอร์นี้จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ในระบบนิเวศจำลองดินวิธี real-time qPCR ในหัวข้อถัดไป



รูปที่ 5.10 การทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ *nidA402F* และ *nidA402R* ทำโดยปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรส ช่องวิ่งที่ M: marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 1: water ช่องวิ่งที่ 2: *Sphingobium yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 ช่องวิ่งที่ 3: *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 ช่องวิ่งที่ 4: *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 ช่องวิ่งที่ 5: *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ R2 ช่องวิ่งที่ 6: *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402

ตารางที่ 5.9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ *nidA402* กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn)

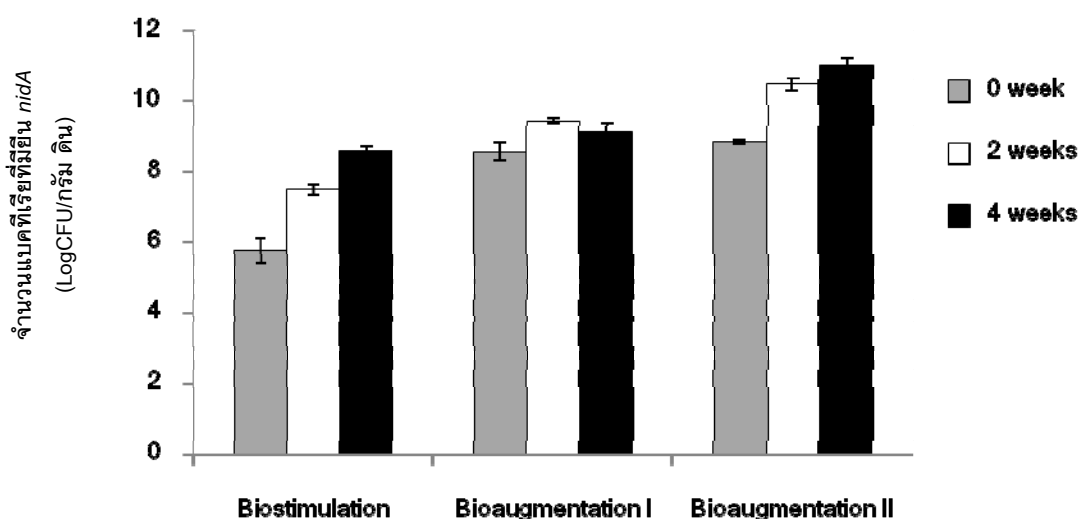
No.	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402	FJ032197	23/23 (100%)	Klankeo และคณะ, 2009
2	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ PY148	HM049728.1	23/23 (100%)	DeBruyn และคณะ, 2012
3	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ PY142	HM049723.1	23/23 (100%)	DeBruyn และคณะ, 2012

No.	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
4	<i>Bacterium</i> sp. สายพันธุ์ py114	HM049713.1	23/23 (100%)	DeBruyn และคณะ, 2012
5	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	GU586859	23/23 (100%)	Zhang และคณะ, 2010
6	<i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB	FJ032196	23/23 (100%)	Klankeo และคณะ, 2009
7	<i>Mycobacterium gilvum</i>	EU872100	23/23 (100%)	Kim , 2008. ไม่ตีพิมพ์
8	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ 6PY1	AJ494745	23/23 (100%)	Krivobok และคณะ, 2003
9	<i>Mycobacterium gilvum</i> สายพันธุ์ BB1	AF548347	23/23 (100%)	Brezna และคณะ, 2002. ไม่ตีพิมพ์
10	<i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ HH6	DQ192653	23/23 (100%)	Zhou และคณะ, 2006

5.4.11 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี real-time qPCR

จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี real-time qPCR โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากดินจากระบบนิเวศจำลองดินในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4 ของทั้ง 3 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดทดลอง biostimulation ชุดทดลอง bioaugmentation I และ ชุดทดลอง bioaugmentation II และนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *nidA* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *nid402F* และ *nid402R* โดยนำค่า C_t ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ฉ) เพื่อคำนวณเป็นจำนวนแบคทีเรีย จากผลการนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ด้วยวิธี real-time qPCR พบว่า แบคทีเรียที่มียีน *nidA* ในชุดทดลอง biostimulation มีจำนวนน้อยกว่าในชุดทดลอง bioaugmentation ทั้ง 2 ชุด และเมื่อปมเป็นระยะเวลาขึ้นจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ของทุกชุดทดลองก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5.11 ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียดั้งเดิมที่สามารถย่อยสลายไพลินอยู่ในดิน และในชุดทดลอง bioaugmentation II ในสัปดาห์ที่ 4 สามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ได้มากที่สุด เท่ากับ $11 \log \text{CFU/กรัม}$ ดิน ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายไพลิน ดังแสดงในรูปที่ 5.7 จากผลการทดลอง

แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่า RN402 มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไพรีน ส่วนชุดทดลอง bioaugmentation I และ II มีจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* เริ่มต้นเท่ากัน ขณะที่ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า ในชุดทดลอง bioaugmentation II ที่เติมแบคทีเรียสูบน้ำที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน มีจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* และมีอัตราการย่อยสลายไพรีนมากกว่าในชุดทดลอง bioaugmentation I ดังแสดงในรูปที่ 5.11 และตารางที่ 5.8 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สถานภาพทางสรีรวิทยาของเซลล์มีผลกระทบต่อกิจกรรมการย่อยสลายของเซลล์ ดังนั้นการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ในรูปแบบแบคทีเรียสูบน้ำสามารถรักษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ในการย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในดิน



รูปที่ 5.11 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี real-time qPCR ประกอบด้วย 3 ชุดทดลอง biostimulation ชุดทดลอง bioaugmentation I และ ชุดทดลอง bioaugmentation II โดยเก็บตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4

5.5 อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาวิธีการเตรียมแบคทีเรียพร้อมใช้ในรูปแบบแบคทีเรียสูบน้ำ RN402 จากหลายหลากสูตร พบว่าแบคทีเรียสูบน้ำ RN402 สามารถรักษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียได้สูงและคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเซลล์ตลอดอายุการเก็บรักษา โดยวิธีการเตรียมแบคทีเรียสูบน้ำที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นแบคทีเรียสูบน้ำเชิงพาณิชย์นอกประสิทธิภาพสูงในการบำบัดแล้ว ควรมีวิธีการเตรียมอย่างง่าย ไม่ซับซ้อน และมีต้นทุนการผลิตต่ำ จากการ

ทดสอบหาสารละลายที่เหมาะสมเพื่อผลิตแบคทีเรียแขวนลอย พบว่าแบคทีเรียที่ถูกแขวนลอยด้วยสารละลายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ อาหารเหลว CFMM pH 7 อาหารเหลว 0.1xLB อาหารเหลว CFMM ที่เติมโซเดียมอะซิเตท 0.25 % (w/v) และสารละลาย PB ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ที่ถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียและประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรินที่ใกล้เคียงกันอย่างมีนัยสำคัญ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 5.2) เนื่องจากการนำเซลล์แบคทีเรียมาแขวนลอยด้วยสารละลายที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนและพลังงานอยู่อย่างจำกัด ทำให้เกิดสภาวะการอดอาหาร (starvation-stress response) ซึ่งขนาดของเซลล์แบคทีเรียจะขนาดเล็กลง นำไปสู่การลดอัตราการเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ จนหยุดการเจริญ เพื่อรักษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียเป็นระยะเวลายาวนาน (Moat และคณะ, 2002) แบคทีเรียสามารถรอดชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลาหลายปีในสภาวะอดอาหาร (Cunningham และคณะ, 2007) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim และคณะ (2001) ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactococcus lactis* ที่ผ่านการเก็บรักษาในสภาวะการอดอาหารเป็นระยะเวลายาวนาน พบว่าการเก็บรักษาเชื้อ *L. lactis* ในอาหารเหลว M17 ที่ปราศจากกลูโคส ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 350 วัน มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าแบคทีเรียที่ถูกเก็บในอาหารเหลว M17 ที่มีกลูโคส ดังนั้นการผลิตแบคทีเรียแขวนลอยในสารละลายที่เหมาะสมจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการยื่นอายุการเก็บรักษาแบคทีเรียที่ยังมีชีวิต และเนื่องจากจุดประสงค์ในงานวิจัยนี้ต้องการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำเพื่อเป็นต้นแบบในการใช้ในเชิงพาณิชย์ ผู้วิจัยจึงเลือกสารละลาย PB ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร pH 6.5 เป็นสารละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตแบคทีเรียแขวนลอยสูตรน้ำ เนื่องจากต้นทุนในการผลิตสารละลาย PB ต่ำกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Melin และคณะ (2006) ที่เลือกใช้สารละลาย PB ในการผลิตสูตรน้ำของสารควบคุมชีวภาพ (biocontrol agent) ของ *Pichia anomala* เพื่อศึกษาการรอดชีวิตหลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลายาวนาน

จากการทดสอบการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในแบคทีเรียแขวนลอย เพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย และยืดอายุการเก็บรักษาของแบคทีเรียแขวนลอย พบว่าการเติมซอร์บิทอล 1% กลีเซอรอล 1 และ 5% PEG 1% และ ทรีฮาโลส 1 5 และ 10% สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งมากกว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียในชุดควบคุมที่ไม่มีเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ (ตารางที่ 5.3) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Torres และคณะ (2003) รายงานว่าการเติม กลีเซอรอล PEG และทรีฮาโลส ในสารละลาย PB ของสารควบคุมชีวภาพของ *Candida sake* มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ

แบคทีเรียสูงกว่า 60% เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 เดือน สารป้องกันทำหน้าที่ปรับสมดุลของแรงดันออสโมติกในเซลล์ และมีผลต่อยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมตาบอลิซึม ทำให้สามารถหยุดการเจริญของแบคทีเรียได้ (Barton และคณะ, 2005) และพบว่า การเติมกลีเซอรอล 1 % และ PEG 5% ลงในแบคทีเรียแขวนลอย ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ 4 °C ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 95 และ 94% จากปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 10^9 MPN/มิลลิลิตรและมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไฟรีน แต่เมื่อพิจารณาจากราคาดัชนีทุนการผลิต พบว่าการเตรียมกลีเซอรอลมีราคาถูกกว่า PEG และยังใช้สารปริมาณน้อยกว่า จึงทำให้ กลีเซอรอล 1 % เป็นสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย PB 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ที่เติมกลีเซอรอล 1 % และแบคทีเรีย RN402 ความเข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร

จากผลการทดลองการเก็บแบคทีเรียสูตรน้ำในระยะยาว หลังผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน (รูปที่ 5.3) พบว่า แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่เติมกลีเซอรอล 1 % มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอล ทั้งในการเก็บรักษาที่ 4 และ 30 °C อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าในชุดทดลองที่เติมกลีเซอรอลซึ่งถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 °C มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียใกล้เคียงกับชุดควบคุมซึ่งถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในสารละลาย PB ที่เติมกลีเซอรอล 1 % ไม่จำเป็นต้องเก็บรักษาในที่อุณหภูมิต่ำ และยังมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูง ดังนั้นจึงสามารถลดต้นทุนการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำโดยลดที่ต้นทุนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ อีกทั้งกลีเซอรอลเป็นสารพอลิออล (polyol) ที่ราคาไม่แพงและเป็นสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ที่ดี นอกจากนี้กลีเซอรอลสามารถปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียด รักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกในเซลล์ และควบคุมเข้าออกของผนังเซลล์ (transmembrane transportation) (Gutierrez และคณะ, 1995; Li และคณะ, 2009) กลีเซอรอลสามารถเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ในสภาพความร้อนสูง (stability of thermolabile enzymes) และป้องกันการหยุดชะงักของเอนไซม์ (inactivation of enzymes) ในสภาวะที่มีความร้อนสูง (Zancan และ Sola-Penna, 2005) เช่น การเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเหลว nutrient broth สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ *Pseudomonas fluorescens* sp. สายพันธุ์ Pf1 และคงประสิทธิภาพความเป็นสารควบคุมชีวอินทรีย์ในการยับยั้งโรคในมะเขือเทศ (Manikandan และคณะ, 2010) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเติมกลีเซอรอล 1 % ในแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 สามารถยืดอายุการเก็บรักษาแบคทีเรียมีชีวิตได้ แต่เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียมีชีวิตของวันที่ 180 มีปริมาณเพียง 10^6 CFU/มิลลิลิตร จึงต้องใช้

แบคทีเรียสูตรน้ำจำนวนมากจึงจะพอเพียงกับการประยุกต์ใช้ในการบำบัดสารพิษ ดังนั้นยังต้องมีการพัฒนาปรับปรุงการเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและลดต้นทุนการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ

การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการพัฒนาปรับปรุงการเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 เพื่อลดต้นทุนในการผลิต ลดปริมาณการใช้หัวเชื้อ และยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนาน โดยใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่เตรียมจากสารละลาย PB 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ที่เติมกลีเซอรอล 1 % โดยให้มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นจาก 10^9 ไปเป็น 10^{12} CFU/มิลลิลิตร เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 180 วัน พบว่า มีแบคทีเรียรอดชีวิตประมาณ 74 % หรือประมาณ 10^9 CFU/มิลลิลิตร (รูปที่ 5.5) ซึ่งมากกว่าการเตรียมแบบเดิมประมาณ 1,000 เท่า และแบคทีเรียที่เก็บในสูตรดังกล่าวยังคงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ดีประมาณ 70 % เนื่องจากการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ผ่านการเก็บรักษา เช่น การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นของ *Lactococcus lactis* Sr. 3.54 จาก 10^9 เป็น 10^{10} CFU/มิลลิลิตรก่อนผ่านเก็บรักษาแบบ freeze dring พบว่าแบคทีเรียมีการรอดสูงขึ้นประมาณ 1.7 เท่าจากการรอดชีวิตของการเตรียมแบบเดิม (Berner และ Viernstein, 2006) ดังนั้นการเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำโดยใช้เซลล์เริ่มต้นเพิ่มขึ้นนี้จะทำให้มีเซลล์คงเหลืออยู่มากกว่าเมื่อผ่านการเก็บรักษาแล้ว ซึ่งทำให้ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำในปริมาณที่น้อยลงได้ในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ (สูตรปรับปรุง) สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารพิษเป็นการลดต้นทุนในการดำเนินการบำบัดสารพิษในระบบบำบัดที่นำเอาแบคทีเรียสูตรน้ำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

จากการประเมินต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำปริมาตร 1 ลิตร เมื่อผ่านเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 วัน เท่ากับ 62 บาท ซึ่งต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรโดยการเตรียมแบบเดิม เท่ากับ 50 บาท (ตารางที่ 5.6) ซึ่งพบว่าต้นทุนสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การเตรียมที่นี้สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรีย ยืดอายุการเก็บรักษา และลดปริมาณการใช้แบคทีเรียสูตรน้ำในบำบัดสารพิษได้ เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนเบื้องต้นแบคทีเรียสูตรน้ำที่ผลิตจากงานวิจัยครั้งนี้กับแบคทีเรียสูตรน้ำที่มีการจำหน่าย ยี่ห้อ SpillRemed ที่ผลิตในสหรัฐอเมริกา ซึ่งราคาขายเท่ากับ 143 บาท/ลิตร พบว่ามีราคาที่ถูกลงกว่าถึง 2 เท่า และจากประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ทำให้เห็นแนวโน้มความเป็นไปได้ในพัฒนาการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคตได้

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในการบำบัดดินปนเปื้อนไพลิน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในย่อยสลายไพลินที่ปนเปื้อนในดิน โดยสร้างระบบนิเวศจำลองดิน จำนวน 6 กรัม เติมไพลินในอะซิโตนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดิน ในการทดลองนี้ประกอบด้วย 4 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดทดลอง abiotic control ชุดทดลอง biostimulation (เติมสารสกัดจากยีสต์) ชุดทดลอง bioaugmentation I (เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402) และ ชุดทดลอง bioaugmentation II (เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน) จากผลการทดลองพบว่า ในชุดทดลอง bioaugmentation II มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการกำจัดไพลิน เมื่อเทียบกับชุดทดลอง abiotic control ชุดทดลอง biostimulation (รูปที่ 5.7) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 กับแบคทีเรียแวนดอย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ Spyr1 โดยใช้เวลา 14 วัน สำหรับย่อยสลายไพลินให้หมดไป ที่ความเข้มข้นไพลินเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในระบบนิเวศจำลองดิน 50 กรัม (Karabika และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 มีประสิทธิภาพสูงกว่า *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพลิน ซึ่งใช้เป็นหัวข้อสำหรับ bioaugmentation ในดิน ได้แก่ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ NJS-1, NJS-P สามารถย่อยสลายไพลินได้เพียง 52 และ 48% ที่ความเข้มข้นไพลินเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ โดยใช้เวลา 8 สัปดาห์ (Zeng และคณะ, 2010) *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ LP1 สามารถย่อยสลายไพลินได้เพียง 65% ที่ความเข้มข้นไพลินเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยใช้เวลา 39 วัน (Pizzul และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน มีประสิทธิภาพสูงกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาสามารถอธิบายได้ด้วยสภาวะการอดอาหาร เช่น การอดอาหารในหัวข้อแบคทีเรียสามารถเพิ่มการรอดชีวิตและกระตุ้นกิจกรรมการย่อยสลายสารพิษของแบคทีเรีย (Watanabe และคณะ, 2000) ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษามีประสิทธิภาพสูงกว่า อาจเนื่องมาจากสภาวะการอดอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับแบคทีเรีย

จากการตรวจติดตามการมีอยู่ของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ในระบบนิเวศจำลองดินโดยวิธี PCR-DGGE จากดีเอ็นเอที่สกัดจากดินจากระบบนิเวศจำลองดินในสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4 ซึ่งประกอบด้วย 3 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดทดลอง biostimulation ชุดทดลอง bioaugmentation I และ ชุดทดลอง bioaugmentation II สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอต้นของ RN402 อยู่ตลอดช่วงการทดลองในชุดทดลอง bioaugmentation I และ II (รูปที่ 5.8) และสอดคล้องกับการตรวจพบยีน *nidA* อยู่ตลอดช่วงการทดลอง (รูปที่ 5.9) แสดงให้เห็นว่า RN402

เป็นประชากรหลักในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย และเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายไฟรีนในระบบนิเวศจำลองดิน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองอย่างรวดเร็วของไฟรีนในชุดทดลอง bioaugmentation I และ II เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลอง biostimulation ที่ไม่เติม RN402 (รูปที่ 5.7) จากผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า RN402 เป็นแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นหัวเชื้อในการบำบัดดินปนเปื้อนโดยวิธีชีววิธี และเป็นปัจจัยสำคัญในการบำบัดสารพิษโดยชีววิธีประสบผลสำเร็จได้ ซึ่งหัวเชื้อแบคทีเรียที่เติมเข้าไปในสิ่งแวดล้อมต้องสามารถแข่งขันกับแบคทีเรียดั้งเดิมและมีชีวิตอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมได้ (Robles-Gonzalez และคณะ, 2008; Mroziak และ Piotrowska-Seget, 2010) จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการเติมแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไฟรีนในระบบนิเวศจำลองดิน

การตรวจพบยีน *nidA* ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของชุดทดลอง biostimulation (รูปที่ 5.8) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดั้งเดิมในดินสามารถปรับตัวและมีความสามารถย่อยสลายไฟรีนหรือสามารถใช้ไฟรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ ทำให้จำนวนแบคทีเรียดั้งเดิมที่สามารถย่อยสลายไฟรีนเพิ่มขึ้นมากพอที่จะสามารถตรวจพบยีน *nidA* โดยวิธี PCR ดังเช่นการเติมสารไฮโดรคาร์บอนสามารถกระตุ้นกิจกรรมการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียดั้งเดิมในดินและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน (Aleer และคณะ, 2011)

จากรายงานที่ผ่านมาการเติมสารสกัดจากยีสต์สามารถกระตุ้นการย่อยสลายไฟรีนในการบำบัดดินแบบ *in situ* เนื่องจากสารสกัดจากยีสต์สามารถใช้เป็นสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดั้งเดิมได้ (Bach และคณะ, 2005) ในขณะที่ผลการทดลองครั้งนี้พบการลดลงเพียงเล็กน้อยของไฟรีนที่เกิดจากการย่อยสลายไฟรีนในชุดทดลอง biostimulation ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลอง bioaugmentation (รูปที่ 5.7) และมีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ในชุดทดลอง biostimulation (ตารางที่ 5.8) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเติมสารสกัดจากยีสต์มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียดั้งเดิมที่มีความสามารถในการย่อยสลายไฟรีน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ในชุดทดลอง biostimulation มีแนวโน้มที่ลดลงอย่างต่อเนื่องหากยีสต์ระยะเวลาในการบ่มให้เพียงพอสำหรับการปรับตัวและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียดั้งเดิม ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของกระบวนการ biostimulation เพิ่มขึ้น (Lee และคณะ, 2007; Venkata Mohan และคณะ, 2008) ดังนั้นหากมีการประยุกต์ใช้กระบวนการ biostimulation ร่วมกับกระบวนการ bioaugmentation โดยการเติมแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 จะทำให้เกิดการบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนไฟรีนที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการบำบัดดินปนเปื้อนอย่างมีประสิทธิภาพโดยชีววิธี การตรวจติดตามจำนวนแบคทีเรียเหล่านี้ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลาย เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการควบคุมระบบบำบัดให้เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายของแบคทีเรีย ทำให้เกิดระบบบำบัดที่มีประสิทธิภาพสูง (Phrommanich และคณะ, 2009) ในงานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนในระบบนิเวศจำลองดินด้วย 2 วิธี คือ การใช้ real-time qPCR โดยติดตามที่ยีน *nidA* เป็นยีนเป้าหมาย และการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนด้วยวิธี MPN จากการทดลองพบว่า การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนด้วยวิธี real-time qPCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง มีผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนได้มากกว่าการตรวจนับด้วยวิธี MPN เล็กน้อย (ตารางที่ 5.8 และ รูปที่ 5.11) ซึ่งสามารถอธิบายได้หลายเหตุผล เช่น การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี MPN ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งด้วยสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่สามารถทำให้แบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนที่มีทั้งหมดเจริญได้ (Amann และคณะ, 1995) และยีน *nidA* บนเมกะพลาสมิดของ RN402 ที่สามารถเคลื่อนที่ไปสู่แบคทีเรียดั้งเดิมที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Nancharaiah และคณะ (2008) ได้ศึกษาพบว่า ยีน *TOL* บนพลาสมิดของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2442 สามารถเคลื่อนที่ไปสู่กลุ่มของแบคทีเรียดั้งเดิม ทำให้เพิ่มอัตราการย่อยสลาย benzyl alcohol นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากข้อจำกัดของการเพิ่มจำนวนขึ้นส่วนดีเอ็นเอวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งผลที่ได้จากการเพิ่มจำนวนขึ้นส่วนดีเอ็นเอจากเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายของแบคทีเรีย (Shannon และคณะ, 2007) การเพิ่มจำนวนขึ้นส่วนอาร์เอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR จึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดดังกล่าวสำหรับการนับจำนวนแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารพิษ ในทางกลับกันในงานวิจัยนี้มีการประยุกต์ใช้การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีอาศัยการเพาะเลี้ยงและไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง จากทั้งสองเทคนิคนี้ทำให้ได้ข้อมูลที่มีควมถ่วง แต่อย่างไรก็ตามการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนโดยวิธี MPN ต้องใช้เวลานานอย่างน้อย 3 สัปดาห์ ในการบ่ม (Johnsen และคณะ, 2002) จึงทำให้การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนโดยวิธี real-time PCR มีความเหมาะสมมากกว่า เนื่องจากสามารถตรวจวัดได้ทันทีจากตัวอย่างดินในสิ่งแวดล้อมโดยไม่ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อบ่งชี้จำนวน จากรายงานวิจัยจำนวนมากเลือกใช้เทคนิคนี้สำหรับตรวจนับและประเมินประสิทธิภาพของการบำบัดสารพิษโดยชีววิธีในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ดิน (Dominguez และคณะ, 2008; Phrommanich และคณะ, 2009), น้ำใต้ดิน (Nyssönen และ

คณะ, 2009; Kao และคณะ, 2010), น้ำเสียและสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสีย (Shannon และคณะ, 2007) ดังนั้นการประยุกต์ใช้การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มี *nidA* ด้วยวิธี real-time PCR จึงเป็นวิธีตรวจติดตามที่รวดเร็วในการวิเคราะห์จำนวนประชากรแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีน และได้รับข้อมูลอย่างรวดเร็ว เพื่อใช้ข้อมูลดังกล่าวในการดูแลและควบคุมระบบบำบัดให้ดำเนินงานอย่างมีประสิทธิภาพ

จากงานวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้แบคทีเรียสูตร RN402 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไฟรีนและมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน วิธีการเตรียมประกอบด้วยสารละลาย PB 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ที่เติมกลีเซอรอล 1 % และแบคทีเรีย RN402 ที่ความเข้มข้นเริ่ม 10^{12} CFU/มิลลิลิตร โดยแบคทีเรียสูตรน้ำดังกล่าวสามารถเก็บรักษาได้ที่ 30°C เป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือน และแบคทีเรียสูตร RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน สามารถใช้เป็นหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีนที่ความเข้มข้นเริ่ม 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดิน โดยใช้เวลา 4 สัปดาห์ในการย่อยสลายไฟรีนได้อย่างสมบูรณ์ จากประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 และต้นทุนการผลิตชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยไปสู่การผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำเชิงพาณิชย์ และประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 เพื่อเป็นหัวเชื้อในการบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม

บทที่ 6

พัฒนาวิธีการใช้สูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 โดย การตรึงเซลล์สำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

6.1 บทนำ

ปัจจุบันน้ำมันดีเซลจัดเป็นเชื้อเพลิงพลังงานในภาคคมนาคมขนส่ง ภาคอุตสาหกรรม ที่มีปริมาณการใช้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น (สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน, 2555) ผลจากการใช้น้ำมันดีเซลจำนวนมากทำให้มีแนวโน้มสูงในการก่อให้เกิดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจำนวนมาก และการรั่วไหลของน้ำมันดีเซลจากอุบัติเหตุทางคมนาคม นำไปสู่การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เช่น กรณีเรือบรรทุกน้ำมันดีเซลของขบวนการลักลอบขนน้ำมันเถื่อนล่มบริเวณทะเล อ.บ้านฉาง จ.ระยอง (เทศบาลนครระยอง, 2553) กรณีเรือบรรทุกน้ำมันดีเซลล่มบริเวณเกาะราชาใหญ่จังหวัดภูเก็ตส่งผลให้น้ำมันรั่วออกออกมาในทะเล (คมชัดลึก, 2554) นอกจากนี้น้ำมันดีเซลยังประกอบด้วย PAHs ซึ่งมีความเป็นพิษ และเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นการปนเปื้อนน้ำมันดีเซลในธรรมชาติอาจเกิดการสะสมในสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญและก่อให้เกิดผลกระทบต่อมนุษย์ เนื่องจากความเกี่ยวข้องกับห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิต (Lohi และคณะ, 2008; Chandran และ Das, 2011) ดังนั้นเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในธรรมชาติ ซึ่งอาจเกิดจากการปล่อยน้ำเสียจากอุตสาหกรรม หรืออุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมันลงสู่สิ่งแวดล้อม จึงจำเป็นต้องมีวิธีการบำบัดน้ำเสียอย่างถูกวิธี

วิธีการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางกายภาพ ทางเคมี แต่เนื่องจากวิธีการเหล่านี้มีข้อด้อยในเรื่องค่าใช้จ่ายที่มีราคาสูง และไม่สามารถกำจัดน้ำมันได้อย่างสมบูรณ์ (Hong และคณะ, 2005; Vieira และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงมีการใช้วิธีทางชีววิธีมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน เนื่องจากการบำบัดโดยชีววิธีเป็นการใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดสารพิษจึงไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม (EPA, 2001) โดยจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนเปลี่ยนเป็นมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวทำให้น้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียถูกกำจัดได้อย่างสมบูรณ์โดยจุลินทรีย์ (Das และ Chandran, 2011; Tyagi และคณะ, 2011)

ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลโดยชีววิธี (Tyagi และคณะ, 2011) จากรายงานพบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* *Acinetobacter*

Alcaligenes Burkholderia Gordonia Mycobacterium Pseudomonas Serratia และ *Rhodococcus* (Wongsa และคณะ, 2004; Quek และคณะ, 2006; Chavan และคณะ, 2008; Li และคณะ, 2008; Kaczorek และคณะ, 2010; Wang Lee และคณะ, 2010) อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรียสูตรน้ำในการบำบัดน้ำเสียยังมีข้อจำกัดในด้านการเตรียมเซลล์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ ความคงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ และการนำแบคทีเรียกลับมาใช้ซ้ำ การแก้ปัญหาดังกล่าวอาจทำได้โดยการใช้แบคทีเรียที่ถูกตรึงในวัสดุตรึงในการบำบัดน้ำเสีย (Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001; Rahman และคณะ, 2006)

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียสามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม ซึ่งจะช่วยให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เช่น ปริมาณน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง หรือสารอาหารที่มีปริมาณต่ำในน้ำเสีย ทำให้อัตราการรอดของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ (Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001; Gentry และคณะ, 2004; Wu และคณะ, 2009; Lee และคณะ, 2011) เช่น Lee และคณะ (2011) ทดสอบการตรึงเซลล์แบคทีเรียกลุ่ม (*Acinetobacter* sp., *Gordonia* sp. and *Rhodococcus* sp.) บนวัสดุตรึงผสมระหว่างพีทมอส (peat moss) เบนโทไนท์ (bentonite) และอัลจีเนต (alginate) พบว่าเซลล์ตรึงสามารถกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้นสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ Lawniczak และคณะ (2011) พบว่าเมื่อตรึงเซลล์จากแบคทีเรียกลุ่มบนวัสดุตรึงเซลลูโลส (cellulose-based carrier) มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงกว่าเซลล์อิสระ นอกจากนี้ยังสามารถนำแบคทีเรียที่ถูกตรึงนี้กลับมาใช้ซ้ำได้ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการบำบัดน้ำเสียในระยะยาวต่ำ การตรึงเซลล์ทำได้หลายรูปแบบ เช่น การจับกลุ่มของเซลล์ การดูดซับบนผิววัสดุตรึง การสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์กับวัสดุตรึง การเชื่อมกันของเซลล์ การบรรจุเซลล์ในวัสดุตรึง และการทำให้เซลล์ติดอยู่ในเมทริกซ์ (Cassidy และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุตรึงหลากหลายชนิด เช่น ไคติน ไคโตซาน พอลิยูรีเทน อัลจีเนต ตัวกลางแก้ว ถ่านกัมมันต์ ก้อนหิน ก้อนกรวด ฟางข้าว และตัวกลางพลาสติก เป็นต้น (Gentili และคณะ, 2006; Rodríguez-Martínez และคณะ, 2006; Karabika และคณะ, 2009; Liu และคณะ, 2009; Wu และคณะ, 2009; Das และ Chandran, 2011; Lee และคณะ, 2011)

งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะมุ่งหาวิธีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่มีประสิทธิภาพจากผลการทดลองในบทที่ 3 เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันดีเซลโดยการใช้เทคนิคตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม ทั้งนี้งานวิจัยนี้เริ่มจากการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อ

จะได้ทราบขอบเขตความสามารถในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียชนิดนี้ต่อไป จากนั้นพัฒนาวิธีการใช้แบคทีเรียสูตอร์น้ำ RN402 สำหรับการบำบัดน้ำเสีย โดยใช้วิธีการตรึงแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการกำจัดน้ำมันดีเซล และทดสอบการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึง RN402 นอกจากนี้มีการตรวจติดตามการยึดเกาะของเซลล์ RN402 ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของวัสดุตรึงโดยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์ (confocal laser scanning microscopy, CLSM) ซึ่งให้ผลการตรวจติดตามเป็นภาพถ่ายที่ชัดเจน และรวดเร็ว โดยผลการทดลองนี้จะทำให้ทราบขอบเขตความสามารถของเซลล์ตรึง RN402 และเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง RN402 สำหรับบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

6.2 ขั้นตอนงานวิจัย

6.2.1 ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียสูตอร์น้ำ RN402 ในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ

1) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตอร์น้ำ RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม

2) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตอร์น้ำ RN402 ในการย่อยสลายอัลเคน

6.2.2 คัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์แบคทีเรียสูตอร์น้ำของ RN402

1) ทดสอบการดูดซับน้ำมันของวัสดุตรึง

2) ทดสอบการย่อยสลายของวัสดุตรึงที่ลอยอยู่ในน้ำเสียสังเคราะห์

6.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

1) ทดสอบผลของความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึง RN402

2) ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ

3) ทดสอบประสิทธิภาพในการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึง RN402

4) ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

6.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

6.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตอร์น้ำ RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมชนิดต่างๆ 10 ชนิด ได้แก่ กลุ่มน้ำมันดีเซล PTT Diesel, PTT Diesel B5 กลุ่มน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เบนซิน Performa, Performa

Semi-Synthetic, Performa Synthetic, กลุ่มน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนดีเซล Dynamic Super Synthetic, Dynamic premier, Dynamic Synthetic, PTT V-120, และกลุ่มผลิตภัณฑ์หล่อลื่น จาระบี PTT cup grease ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันแต่ละชนิดเท่ากับ 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่เติมแบคทีเรียสูตรน้ำตามข้อ 5.3.4 ซึ่งถูกเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน ให้มีปริมาณเชื้อ เริ่มต้นประมาณ 10^7 CFU/มิลลิลิตร นำมาบ่มบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน โดยมีชุดควบคุม คือ ไม่มีการเติมหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อดูการลดลงของน้ำมันที่เกิดจากปัจจัยทางกายภาพ ทุกชุดทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำเสีย เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.11 และ คำนวณประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของแบคทีเรียสูตรน้ำจากสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน (\%)} = 100 - \left[\frac{\text{ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในชุดควบคุม(วันที่3)} - \text{ปริมาณ น้ำมันที่เหลืออยู่ในชุดทดลอง(วันที่3)}}{\text{ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นในชุด ควบคุม(วันที่3)}} \times 100 \right]$$

6.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในการย่อยสลายอัลเคน

นำแบคทีเรียสูตรน้ำจากข้อ 4.3.4 ที่มีผลการอยู่รอดของแบคทีเรียที่สูงที่สุดและประสิทธิภาพ ในการย่อยสลายสูง ที่ถูกเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน ใส่ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ให้ปริมาณของแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/มิลลิลิตร และเติมอัลเคนชนิดต่างๆ ได้แก่ เตตระเดเคน (*n*-tetradecane) เฮกซะดีเคน (*n*-hexadecane) น้ำมันดีเซล และน้ำมันดิบ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 450 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วย ความเร็ว 200 รอบ/นาที ระยะเวลา 9 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ มีชุดควบคุมคือไม่เติมเชื้อ เพื่อ ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในการย่อยสลายอัลเคน โดยสกัดอัลเคนที่ เหลืออยู่และวิเคราะห์ปริมาณอัลเคนโดยวิธี GC ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.12

6.3.3 คัดเลือกวัสดุตั้งที่เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ RN402

คัดเลือกวัสดุตั้งที่เหมาะสมโดยวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำมันของวัสดุตั้งแต่ละชนิดในข้อ 1) และสมบัติการย่อยสลายของวัสดุตั้งในข้อ 2) โดยชนิดของวัสดุตั้งที่ใช้ทดสอบ มี 3 ประเภท ได้แก่ (1) (1) BCN-009 (บริษัท 2H GmbH, Germany) (2) BCN-012 (บริษัท 2H GmbH, Germany) และ (3) Dazs Bio-Ring S-1320 (บริษัท Sze Sun Aquarium & Pets Co., Ltd.) ดังแสดงในรูปที่ 6.1



รูปที่ 6.1 วัสดุตรึง 1) BCN-009 2) BCN-012 และ 3) Dazs Bio-Ring S-1320

1) ทดสอบการดูดซับน้ำมันของวัสดุตรึง

การวิเคราะห์การดูดซับน้ำมันของวัสดุตรึงทำโดยใช้วิธีตาม ASTM F726-81 (1986) ที่มีการดัดแปลงบางส่วน โดยเติมวัสดุตรึงชนิดแห้งปริมาณ 300 มิลลิกรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร วางขวดทดลองบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 140 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำมันที่ทราบปริมาณลงไปในช่วงทดลองเพียงเล็กน้อย นำขวดทดลองไปวางบนเครื่องเขย่าต่อทันทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำมันลงไปในช่วงทดลอง และนำไปวางบนเครื่องเขย่าอีกครั้ง ทำเช่นนี้ต่อไปจนกระทั่งสังเกตเห็นคราบน้ำมันลอยอยู่บนผิวน้ำ เสียสังเคราะห์ภายหลังการให้อากาศ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าการดูดซับน้ำมันของวัสดุตรึงแต่ละชนิดมีหน่วยเป็น กรัม/กรัมของวัสดุตรึง โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{ค่าการดูดซับน้ำมันของวัสดุตรึง} = \frac{\text{ปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับ}}{\text{น้ำหนักวัสดุตรึง}}$$

2) ทดสอบการสลายตัวของวัสดุตรึงที่ลอยอยู่ในน้ำเสียสังเคราะห์

เติมวัสดุตรึงปริมาณ 1 กรัม ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำมันปริมาณ 2 % ของปริมาณทั้งหมด สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของวัสดุตรึง และนำวัสดุตรึงที่ลอยในน้ำเสียสังเคราะห์มาชั่งเพื่อหาน้ำหนักที่ลดลง ทำการทดลอง 15 วัน 3 ซ้ำ ค่าการสลายตัวของวัสดุตรึงแต่ละชนิดมีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{ค่าการสลายตัวของวัสดุตรึง} = \frac{(\text{น้ำหนักของวัสดุตรึง(วันที่ 0)} - \text{น้ำหนักของวัสดุตรึงก่อนใช้(วันที่ 15)})}{\text{น้ำหนักของวัสดุตรึง (วันที่ 0)} \times 100}$$

6.3.4 ทดสอบผลของความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลาย โดยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึง RN402

จากผลการคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์แบคทีเรียสูตตรน้ำ RN402 ในข้อ 6.3.3 และนำวัสดุตรึงดังกล่าวผ่านการตรึงเซลล์โดยใช้แบคทีเรียสูตตรน้ำ RN402 เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีของปรีชาติ (2554) ซึ่งมีขั้นตอนการตรึงดังนี้ วัสดุตรึง 5 กรัม น้ำมันดีเซล 0.5 % (w/v) ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 MPN/ชุดทดลอง และเขย่าเป็นเวลา 6 วัน นำเซลล์ตรึงที่ได้มาทดสอบผลของความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ โดยเตรียมอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยเติมน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร และเติมน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุด ชุดที่ 1 เติมน้ำมันดีเซล ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 MPN/ชุดทดลอง และชุดที่ 2 เติมน้ำมันดีเซลที่มีอายุ 6 วัน จำนวน 1 กรัม ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 MPN/ชุดทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ชุดควบคุมแบ่งออกเป็น 2 ชุด คืออาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุกๆ 3 วัน ชุดที่ 1 ไม่เติมแบคทีเรีย ชุดที่ 2 เติมน้ำมันดีเซลปลอดเชื้อ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุตรึงปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตในอาหารเหลว CFMM โดยวิธี MPN และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่โดยวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.10 และ 3.11 ตามลำดับ

6.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ

ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาอัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง RN402 โดยขั้นตอนดังนี้เตรียมอาหารเหลว CFMM 50 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 500 1,000 5,000 10,000 และ 20,000 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำมันดีเซลจำนวน 5 กรัม ซึ่งปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 MPN/ชุดทดลอง และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ชุดควบคุมคืออาหารเหลว CFMM ที่เติมน้ำมันดีเซลและวัสดุตรึงปลอดเชื้อ เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่โดยวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.11 และเก็บตัวอย่างในวันที่ 7 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุ

ตริงปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตในอาหารเหลวโดยวิธี MPN ตามวิธีที่ระบุใน 3.10 อัตราการกำจัดน้ำมันดีเซล มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/ลิตร/กรัมเซลล์ตริง/วัน โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{อัตราการกำจัดน้ำมันดีเซล} = (\text{ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่(วันที่ 0)} - \text{ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่(วันที่ 7)})/7/5$$

(มิลลิกรัม/ลิตร/กรัมเซลล์ตริง/วัน)

นำข้อมูลของอัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลของแต่ละความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลสร้างกราฟระหว่างอัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลและความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล เพื่อหาค่าอัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงสุด

6.3.6 ทดสอบประสิทธิภาพในการใช้ซ้ำของเซลล์ตริง RN402

ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตริง RN402 เพื่อทดสอบในการใช้ซ้ำในอาหารเหลวและการใช้งานในระยะยาว โดยขั้นตอนดังนี้เตรียมอาหารเหลว CFMM 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 มิลลิกรัม/ลิตร เติมเซลล์ตริงจำนวน 1 กรัม ซึ่งปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 MPN/ชุดทดลอง แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ตริงมาล้างด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเติมลงไปอาหารเหลว CFMM ในขวดใหม่ที่เติมน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำซ้ำเป็นจำนวน 70 ครั้ง วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่โดยวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.10 นำเซลล์ตริงก่อนใช้งาน และที่ผ่านการใช้งาน 70 ครั้งเพื่อถ่ายภาพการยึดเกาะของเซลล์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) (บริษัท JEOL Ltd., Tokyo, Japan) กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์ (confocal laser scanning microscopy, CLSM) (บริษัท Nikon Canada, Mississauga, Canada) และการสร้างไปโอโอฟิล์มโดยกล้องจุลทรรศน์แบบสแกนภาพอะตอม (scanning probe microscopy, SPM) (บริษัท Veeco Instruments, Woodbury, NY, USA)

สำหรับการตรวจติดตามการยึดเกาะของเซลล์ RN402 ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของวัสดุตริงโดยกล้อง CLSM โดยมีขั้นตอนดังนี้นำเซลล์ตริงที่ผ่านการใช้งาน 70 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ย้อมด้วยสีย้อม FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit (บริษัท MolecularProbes, Eugene, OR, USA) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นถ่ายภาพการยึดเกาะของเซลล์โดยกล้อง CLSM

การมีชีวิตของ RN402 ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของวัสดุตริง โดยมีขั้นตอนดังนี้นำตัวอย่างเซลล์ตริงข้างต้นแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผ่านการกรองปริมาตร 2 มิลลิลิตร และชุบด้วยไม้จิ้ม

พื้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อนำเอาเซลล์ออกจากพื้นผิวของวัสดุตั้ง นำเซลล์แขวนลอยปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผ่านการกรองปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และย้อมด้วยสีย้อม FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที ดูดตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร และหยดบนสไลด์ จากนั้นถ่ายภาพการมีชีวิตของ RN402 ในไบโอฟิล์มโดยกล้อง CLSM นำภาพถ่ายที่ได้นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ถูกย้อมติดสีโดยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ImageJ (Abramoff และคณะ, 2004) การมีชีวิตของ RN402 มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{การมีชีวิตของ RN402 (\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีเขียว}}{\text{จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีทั้งหมด}} \times 100$$

6.3.7 ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

6.3.7.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำเซลล์ตั้งที่ผ่านการใช้งาน 70 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ชุดด้วยไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อนำเอาเซลล์ออกจากพื้นผิวของวัสดุตั้ง และนำเซลล์มาสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอ วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2

6.3.7.2 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยวิธี PCR

นำดีเอ็นเอจากเซลล์ตั้งที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและไพรเมอร์ที่มียื่นเป้าหมายเป็นยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายอัลเคน ดังในตารางที่ 6.1

ตารางที่ 6.1 ไพรเมอร์ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเบื้องต้น

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เป้าหมาย	อุณหภูมิ (°C) Annealing	ขนาดคาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
ALK-1F	5'-CAT AAT AAA GGG CAT CAC CGT-3'	<i>alkB</i>	54	185	Kohno และคณะ, 2002
ALK-1R	5'-GAT TTC ATT CTC GAA ACT CCA AAC-3'				
ALK-2F	5'-GAG ACA AAT CGT CTA AAA CGT AA-3'	<i>alkM</i>	54	271	
ALK-2R	5'-TTG TTA TTA TTC CAA				

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เป้าหมาย	อุณหภูมิ (°ซ) Annealing	ขนาดคาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
	CTA TGC TC-3'				
ALK-3F	5'-TCG AGC ACA TCC GCG GCC ACC A-3'	alkB1	54	330	
ALK-3R	5'-CCG TAG TGC TCG ACG TAG TT-3'				
alkB-1F	5'-AAY CAN GCN CAY GAR CTN GGN CAY AA-3'	alkB	55	550	Kloos และคณะ, 2006
alkB-1R	5'-GCR TGR TGR TCN GAR TGN CGY TG-3'				
CYP153- F1	5'-ATG TTY A TY GCN ATG GAY CCN-3'	CYP153	54	820	Wang และคณะ, 2011
CYP153- R2	5'-GCG RTT VCC CAT RCA RCG RTG-3'				
P450fw1	5'-GTS GGC GGC AAC GAC ACS AC-3'	CYP153	58	Multiband	Beilen และคณะ, 2006
P450rv3	5'-GCA SCG GTG GAT GCC GAA GCC RAA-3'				

ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสปริมาณสุทธิ 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ Taq DNA polymerase ปริมาณ 0.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ดีเอ็นเอ ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาณด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ หลังจากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler, model 2400) (บริษัท Perkin Elmer, MA, USA) โดยให้มีสภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์กันดังนี้

ไพรเมอร์ ALK-1F และ ALK-1R ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 54°ซ เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ เป็นเวลา 30 วินาที
5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ

6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

ไพรเมอร์ ALK-2F และ ALK-2R ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 54°C เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที
5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ
6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

ไพรเมอร์ ALK-3F และ ALK-3R ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 54°C เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที
5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ
6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

ไพรเมอร์ alkB-1F และ alkB-1R ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที
5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ
6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

ไพรเมอร์ CYP153-F1 และ CYP153-R1 ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 54°C เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที
5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ

6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

ไพรเมอร์ P450fw1 และ P450rv3 ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 45 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 58°C เป็นเวลา 1 นาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที
5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 25 รอบ
6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

6.4 ผลการทดลอง

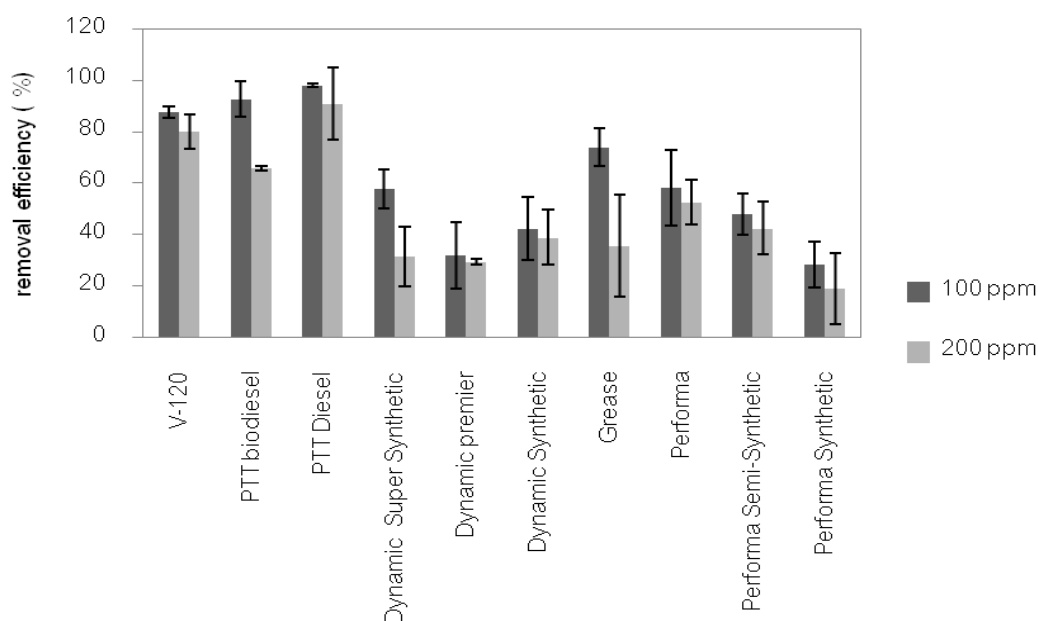
6.4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 10 ชนิด ได้แก่ PTT Diesel, PTT Diesel B5, PTT V-120, Performa, Performa Semi-Synthetic, Performa Synthetic, Dynamic Super Synthetic, Dynamic premier, Dynamic Synthetic และ PTT cup grease ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันแต่ละชนิดในอาหารเหลว CFMM เท่ากับ 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน เติมน้ำเสียสังเคราะห์ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^7 CFU /มิลลิตร นำมาบ่มบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน พบว่าประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในการย่อยสลาย PTT Diesel และ PTT Diesel B5 ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร มีประสิทธิภาพสูงประมาณ 90% ขึ้นไป ทั้งนี้ 80-90% ในน้ำมันดีเซลประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวซึ่งแบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่เหลืออีก 10 – 20 % เป็นอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 สามารถย่อยสลายได้เช่นกัน ผลส่งให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดังกล่าวสูง ส่วนประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ดีเซลชนิด PTT V-120 สูงถึง 80 % ในขณะที่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันอื่นๆในกลุ่มน้ำมันหล่อลื่นทั้ง 2 กลุ่มคือน้ำมันหล่อลื่น

เครื่องยนต์ดีเซล และน้ำมันหล่อลื่นจาระบืออยู่ระหว่าง 20 – 60 % ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 6.2 และรูปที่ 6.2 เนื่องจาก PTT V-120 เป็นน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน (mineral base oil) ในขณะที่น้ำมันในกลุ่ม Performa และ Dynamic เป็นน้ำมันหล่อลื่นที่มีส่วนผสมของสารเคมีที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานและอายุการใช้งานของน้ำมันหล่อลื่น ซึ่งสารสังเคราะห์เหล่านี้จะมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนทำให้ยากต่อการย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 6.2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสุตรน้ำในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ชนิดน้ำมัน	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (%)	
	100 มิลลิกรัม/ ลิตร	200 มิลลิกรัม/ ลิตร
V-120	87.81±2.11	80.22±6.72
PTT biodiesel	92.93±6.82	65.99±0.93
PTT Diesel	98.17±0.67	91.00±14.12
Dynamic Super Synthetic	57.87±7.49	31.63±11.60
Dynamic premier	31.92±12.95	29.43±0.99
Dynamic Synthetic	42.47±12.43	38.92±10.68
Grease	74.15±7.34	35.59±19.79
Performa	58.28±14.59	52.72±8.52
Performa Semi-Synthetic	48.08±8.08	42.52±10.31
Performa Synthetic	28.41±8.97	19.06±13.84



รูปที่ 6.2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตมน้ำในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มก/ลิตร ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^7 CFU/มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

6.4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตมน้ำ RN402 ในการย่อยสลายอัลเคน

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตมน้ำ RN402 ในการย่อยสลายอัลเคน ได้แก่ *n*-เตตระเดคเคน *n*-เฮกซะดีเคน น้ำมันดีเซล และน้ำมันดิบ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 450 มิลลิกรัม/ลิตร โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 9 วัน พบว่า ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตมน้ำ RN402 ในการย่อยสลาย เตตระเดคเคน เฮกซะดีเคน น้ำมันดีเซล และน้ำมันดิบ เท่ากับ 89 83 92 และ 65% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6.3

ตารางที่ 6.3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตมน้ำ RN402 ในการย่อยสลายอัลเคน น้ำมันดีเซล และน้ำมันดิบ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 450 มิลลิกรัม/ลิตร

ชนิดน้ำมัน	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย
	วันที่ 0	วันที่ 9	
น้ำมันดีเซล	$5.6 \times 10^8 \pm 0.34$	$3.20 \times 10^9 \pm 0.12$	89.02 ± 12.14
น้ำมันดิบ	$5.6 \times 10^8 \pm 0.34$	$8.00 \times 10^8 \pm 0.12$	83.24 ± 6.87
<i>n</i> -เตตระเดคเคน	$5.6 \times 10^8 \pm 0.34$	$2.62 \times 10^9 \pm 0.38$	92.56 ± 1.11
<i>n</i> -เฮกซะดีเคน	$5.6 \times 10^8 \pm 0.34$	$1.67 \times 10^9 \pm 0.24$	65.52 ± 5.90

6.4.3 คัดเลือกวัสดุตั้งที่ที่เหมาะสมสำหรับริงเซลล์ RN402

ผลจากการคัดเลือกวัสดุตั้งที่จำหน่ายในท้องตลาด โดยพิจารณาจากราคา การหาซื้อได้ง่าย ประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำมันของวัสดุตั้งเซลล์แต่ละชนิดและสมบัติการย่อยสลาย โดยทดสอบวัสดุตั้ง 3 ประเภท ได้แก่ (1) BCN-009 (2) BCN-012 และ (3) Dazs Bio-Ring S-1320 เพื่อใช้ตั้งแบคทีเรียสูตราบน้ำสำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน พบว่า ค่าการดูดซับน้ำมันดีเซลของวัสดุตั้งทั้ง 3 ประเภท น้อยกว่า 1 ไมโครลิตร ส่วนทดสอบการย่อยสลายของวัสดุตั้งที่ลอยอยู่ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันดีเซล 2 % (w/v) เป็นเวลา 15 วัน พบว่าการสลายตัวของวัสดุตั้ง BCN-009 BCN-012 และ Dazs Bio-Ring S-1320 เท่ากับ 0.216 0.282 และ 0.316 % ของน้ำหนักวัสดุตั้งเริ่มต้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าวัสดุตั้ง BCN-009 เหมาะสมสำหรับริงเซลล์เพื่อประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เนื่องจากค่าการดูดซับน้ำมันดีเซลน้อยกว่า 1 ไมโครลิตร และมีการสลายตัวน้อยที่สุดในการทดลอง นอกจากนี้เป็นวัสดุที่หาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาด ผลิตจากพลาสติก high-density polyethylene (HDPE) ซึ่งสามารถทนต่อการย่อยสลายได้สูง และมีลักษณะใกล้เคียงกับตัวกลางที่ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียขนาดใหญ่ที่จำหน่ายในท้องตลาด ทำให้ BCN-009 จึงเป็นวัสดุตั้งที่มีความทนทานสูงที่เหมาะสมสำหรับการนำศึกษาหาสภาวะตั้งเซลล์ที่เหมาะสมเพื่อประยุกต์ใช้เป็นตัวกลางสำหรับระบบบำบัดจำลองแบบเติมอากาศที่มีตัวกรองชีวภาพในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันดีเซลในขั้นตอนต่อไป

6.4.4 ทดสอบผลของความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยเซลล์อิสระ และเซลล์ตั้ง RN402

จากผลงานวิจัยของปาริฉัตร (2553) พบว่า วิธีการเตรียมเซลล์ตั้ง RN402 ที่เหมาะสมทำ โดยใช้ปริมาณแบคทีเรียสูตราบน้ำ RN402 เริ่มต้น 10^8 MPN/ชุดทดลอง บนวัสดุตั้ง BCN-009 ปริมาณ 5 กรัม ในอาหารเหลว CFMM 50 มิลลิตร ที่เติมน้ำมันดีเซล 0.5% (w/v) เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน มีปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนวัสดุตั้งประมาณ 10^8 MPN/กรัม วัสดุตั้ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการตั้งเซลล์ข้างต้นในการผลิตเซลล์ตั้ง RN402 เพื่อใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการทดลองต่อไป และการประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ในการทดสอบผลของความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยเซลล์อิสระ และเซลล์ตั้ง RN402 โดยใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 10^8 MPN/ชุดทดลอง ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิตร ในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยเติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลระหว่างเซลล์อิสระ

ของแบคทีเรียสูตรน้ำและและเซลล์ตรึง RN402 จากผลการทดลองพบว่า มีการสะสมของปริมาณน้ำมันดีเซลเพิ่มในชุดทดลองเซลล์อิสระ ตั้งแต่วันที่ 6 ของการทดลองซึ่งมีการเติมน้ำมันลงไปเพิ่มเติม แสดงว่าให้เห็นว่าเกิดการย่อยสลายน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียที่ลดลง จาก $1.57 \times 10^8 \pm 1.27$ เหลือ $3.37 \times 10^6 \pm 3.70$ MPN/ชุดทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของปาริฉัตร (2553) ที่ใช้เซลล์ตรึง ปริมาณน้ำมันดีเซลลดลงอย่างคงที่ตลอดการทดลอง และสอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่ยังคงมีอยู่ที่ประมาณ 10^8 MPN/ชุดทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 6.3 และตารางที่ 6.4)

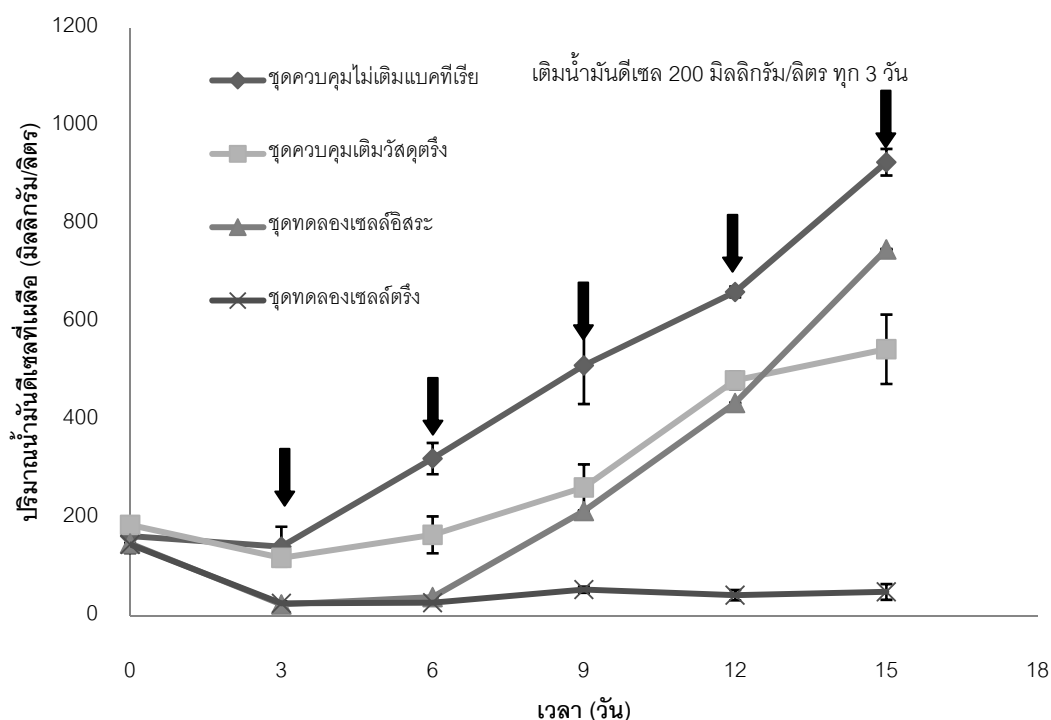
ในขณะที่ชุดควบคุมทั้งที่เป็นวัสดุตรึงปลอดเชื้อและเซลล์ตรึง RN402 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่า มีการสะสมของปริมาณน้ำมันดีเซลเพิ่มขึ้น ตั้งแต่วันที่ 9 ของการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำมันที่ถูกเติมเข้าไป แสดงให้เห็นว่า การดูดซับน้ำมันดีเซลโดยเซลล์ตายของ RN402 เกิดขึ้นน้อยมาก ดังนั้นการลดลงของน้ำมันดีเซลที่เกิดขึ้นในชุดทดลองที่เติมเซลล์ตรึงมาจากกิจกรรมการย่อยสลายโดย RN402 ซึ่งจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเซลล์ตรึง RN402 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่สูงและดีกว่าเซลล์อิสระ

ตารางที่ 6.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อปริมาณเชื้อหลังการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง (CFMM 50 มิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัม/ลิตร และเติมน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วันโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง RN402

เวลา (วัน)	เซลล์อิสระ ¹		เซลล์ตรึง ²	
	ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM (MPN/ชุดทดลอง)	ปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุตรึง (MPN/ชุดทดลอง)	ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM (MPN/ชุดทดลอง)	
3	$2.27 \times 10^8 \pm 0.09$	$2.10 \times 10^8 \pm 0.52$	$5.3 \times 10^{10} \pm 0.39$	
6	$1.30 \times 10^8 \pm 0.09$	$2.64 \times 10^8 \pm 1.85$	$7.10 \times 10^{10} \pm 0.85$	
9	$8.33 \times 10^7 \pm 0.13$	$3.13 \times 10^8 \pm 1.27$	$6.55 \times 10^{10} \pm 0.33$	
12	$1.23 \times 10^6 \pm 0.02$	$2.53 \times 10^8 \pm 1.79$	$1.52 \times 10^{11} \pm 1.37$	
15	$1.67 \times 10^6 \pm 0.09$	$2.00 \times 10^8 \pm 5.32$	$1.79 \times 10^{11} \pm 1.79$	

หมายเหตุ ¹ ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ $1.57 \times 10^8 \pm 1.27$ MPN/ชุดทดลอง

² ผลการทดลองของปาริฉัตร (2553)

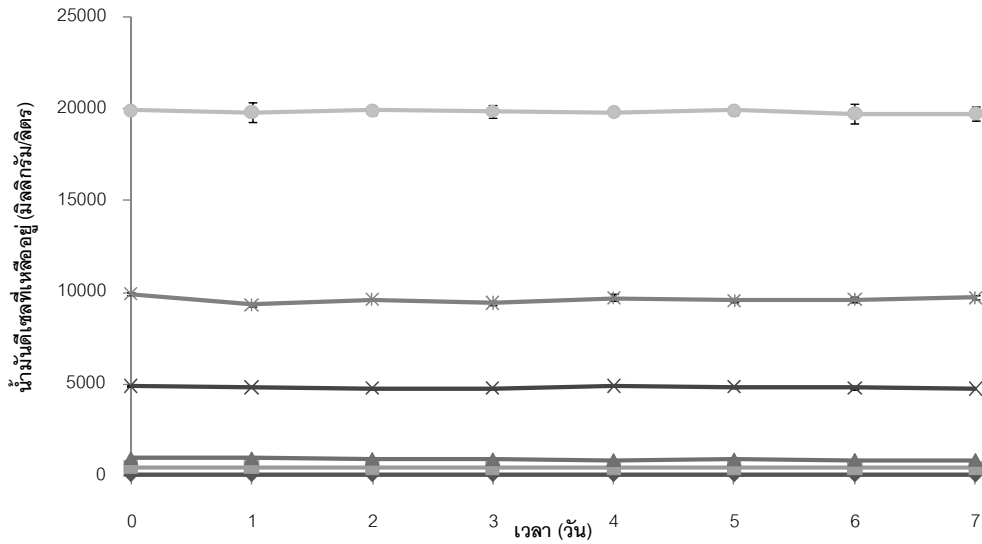


รูปที่ 6.3 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลระหว่างเซลล์ตรึงกับเซลล์อิสระ RN402 ในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง (CFMM 50 มิลลิกรัม/ลิตร) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัม/ลิตร และเติมน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน ตามตำแหน่งของลูกศร

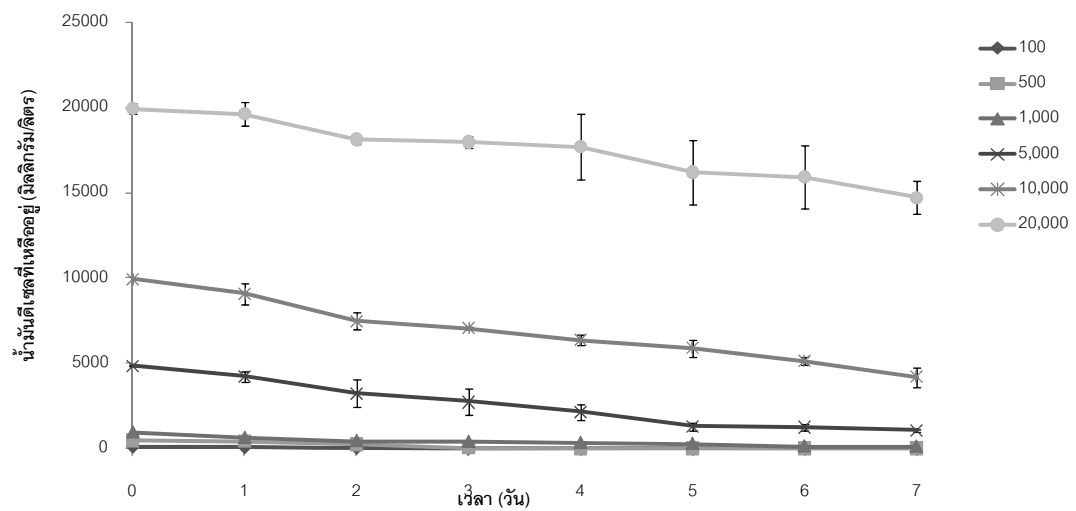
6.4.5 ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากผลการทดลองข้อ 6.4.4 ซึ่งให้เห็นว่า การตรึงเซลล์ RN402 บนวัสดุตรึง BCN-009 สามารถรักษาประสิทธิภาพการย่อยสลายของเซลล์ตรึง RN402 เมื่อความเข้มข้นน้ำมันดีเซลเพิ่มขึ้น ซึ่งในการทดลองนี้ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อให้ทราบถึงขอบเขตการใช้งานของเซลล์ตรึง RN402 ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทดสอบในอาหารเหลว CFMM ปริมาณ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล 100 500 1,000 5,000 10,000 และ 20,000 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 MPN/ชุดทดลอง จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ตรึง RN402 กำจัดน้ำมันดีเซล 100 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 6.5) ให้หมดไปภายในเวลา 7 วัน เซลล์ตรึง RN402 มีอัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงสุด 165 มิลลิกรัม/ลิตร/กรัมเซลล์ตรึง/วัน ที่ความเข้มข้นน้ำมันดีเซล 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 6.6) ในขณะที่อัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลเริ่มลดลงที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล 20,000 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่ลดลงส่งผลให้

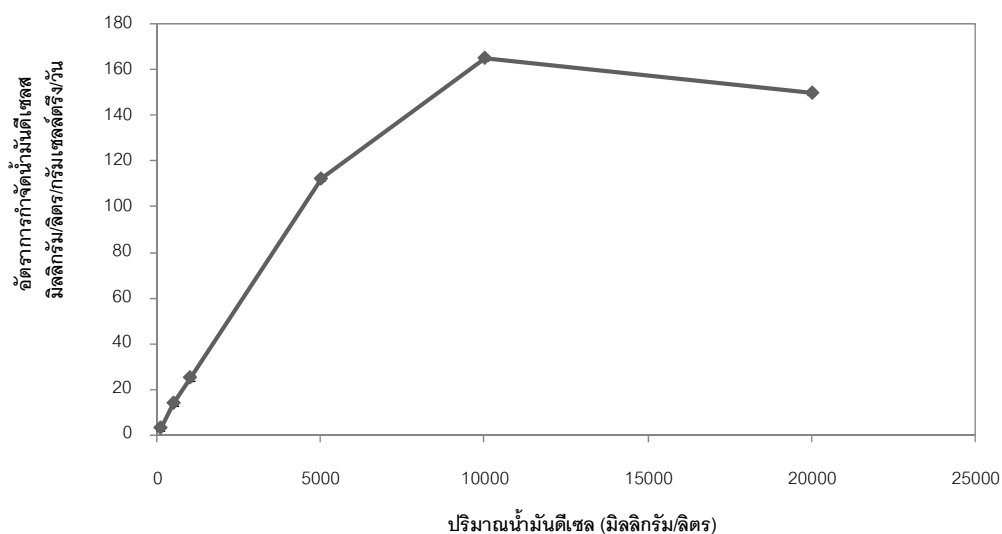
ประสิทธิภาพในการกำจัดลดลง (ภาคผนวก จ) ในขณะที่ชุดควบคุมมีการลดลงของปริมาณน้ำมันดีเซลเกิดขึ้นน้อยมาก (รูปที่ 6.4)



รูปที่ 6.4 ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ ของชุดควบคุม (วัสดุครึ่งหลอดเชื้อ)



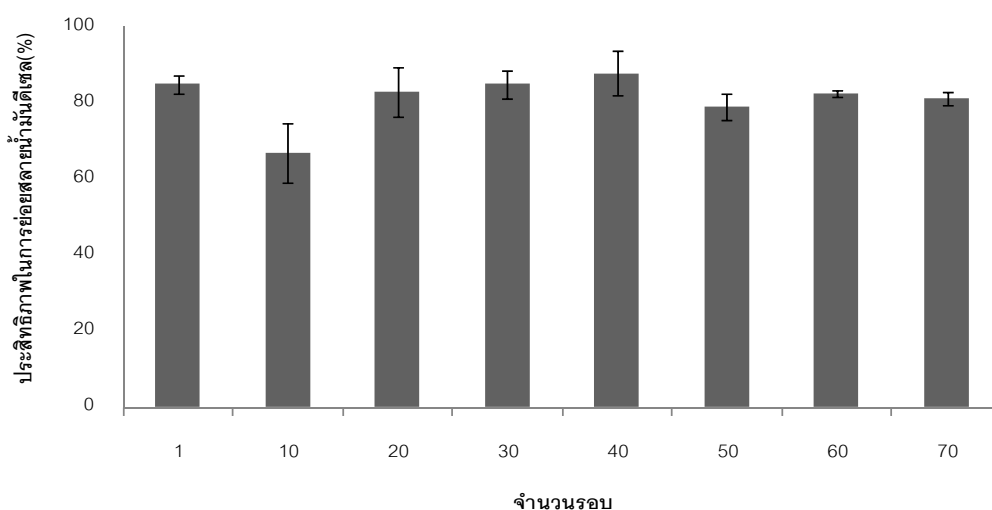
รูปที่ 6.5 ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ ของเซลล์ครึ่ง RN402



รูปที่ 6.6 อัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง RN402 ที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่างๆ

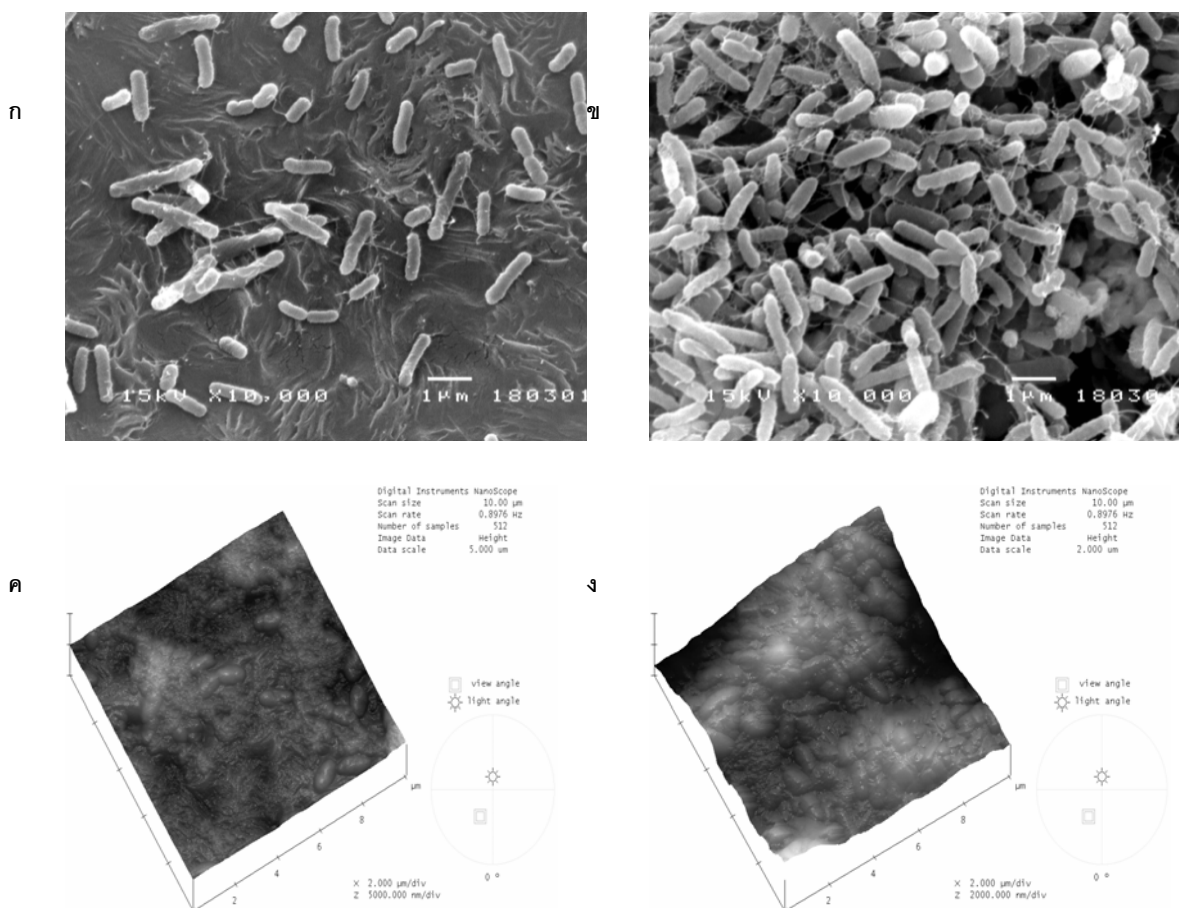
6.4.6 ทดสอบประสิทธิภาพในการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึง RN402

จากการทดสอบประสิทธิภาพการซ้ำใช้ซ้ำของเซลล์ตรึง RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 70 รอบ โดยใช้เซลล์ตรึงจำนวน 1 กรัม ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 MPN/ชุดทดลอง พบว่า เซลล์ตรึง RN402 ยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลสูงตลอดการซ้ำใช้เป็นจำนวน 70 รอบ เซลล์ตรึงยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลซึ่งมากกว่า 80 % ดังแสดงในรูปที่ 6.7



รูปที่ 6.7 ประสิทธิภาพการซ้ำใช้ซ้ำของเซลล์ตรึง RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 70 รอบ

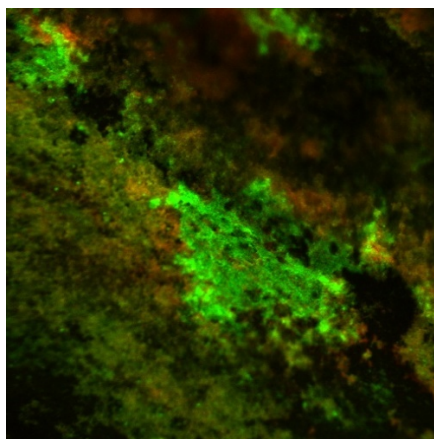
จากภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์ RN402 บนวัสดุตั้งโดยกล้อง SEM และ SPM ทั้งก่อนใช้และหลังการใช้ 70 รอบ แสดงให้เห็นว่า มีการเกาะตัวกันของเซลล์ RN402 บนพื้นผิวของวัสดุตั้งเป็นลักษณะของไบโอฟิล์มหนาขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 6.8 ก และ ข) โดยไบโอฟิล์มมีความหนาเพิ่มขึ้นประมาณ 4000 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับเซลล์ตั้งที่ยังไม่ผ่านการใช้งาน (รูปที่ 6.8 ค และ ง)



รูปที่ 6.8 ภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์ RN402 บนวัสดุตั้งโดยกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า รูป ก) จากเซลล์ตั้งที่ยังไม่ผ่านการใช้ รูป ข) จากเซลล์ตั้งที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 รอบ ภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์ RN402 บนวัสดุตั้งโดยกล้อง SPM ค) จากเซลล์ตั้งที่ยังไม่ผ่านการใช้ รูป ง) จากเซลล์ตั้งที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 รอบ

6.4.7 ตรวจติดตามการยึดเกาะของเซลล์และการมีชีวิตของ RN402 ด้วยกล้อง CLSM

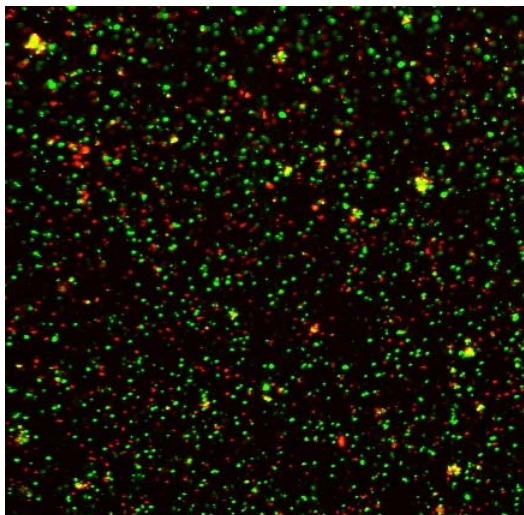
ผลการตรวจติดตามการยึดเกาะของเซลล์ RN402 ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 ครั้ง ด้วยการย้อมเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงโดยตรงด้วยสีย้อม FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit ซึ่งประกอบด้วย SYTO®9 fluorescent stain และ propidium iodide fluorescent stain และส่องด้วยกล้อง CLSM แสดงให้เห็นการยึดเกาะของเซลล์และชีวิตของเซลล์ RN402 บนพื้นผิวของวัสดุตรึง โดยเซลล์สีเขียวที่ถูกย้อมติดสีด้วย SYTO®9 fluorescent stain คือเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนเซลล์สีแดงที่ถูกย้อมติดสีด้วย propidium iodide fluorescent stain คือเซลล์ตาย ดังในรูปที่ 6.9 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 ครั้ง ตรวจพบแบคทีเรีย RN402 ที่มีชีวิตจำนวนมากอยู่บนไบโอฟิล์ม ซึ่งสอดคล้องกับการคงประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซลตลอดการทดลอง 70 ครั้ง



รูปที่ 6.9 ภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์ RN402 ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 ครั้ง โดยกล้อง CLSM ที่กำลังขยาย 20 เท่า

นอกจากนี้จากการติดตามการยึดเกาะของเซลล์และการมีชีวิตของ RN402 ด้วยกล้อง CLSM สามารถหาค่าการมีชีวิตของ RN402 ได้โดยตรงมีขั้นตอนดังนี้ โดยการชุบเซลล์ที่เกาะบนพื้นผิววัสดุตรึง นำเซลล์ที่ได้ย้อมด้วยสีย้อม FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit จากนั้นนำตัวอย่างส่องด้วยกล้อง CLSM จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 ครั้ง มีค่าการมีชีวิตของ RN402 เท่ากับ $60.09 \pm 6.57\%$ ของจำนวนเซลล์ที่ถูกย้อมติดสีทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่ 6.10 ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว แม่นยำ โดยไม่อาศัย

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ และสามารถนับจำนวนเซลล์ได้โดยตรงจากการส่องกล้อง CLSM



รูปที่ 6.10 ภาพถ่ายการมีชีวิตของ RN402 ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของเซลล์จริงที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 ครั้ง โดยกล้อง CLSM ที่กำลังขยาย 60 เท่า

6.4.8 ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

จากความสามารถของ RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ และอัลเคน (C14 และ C16) จึงคาดว่า RN402 อาจมียีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนส ในการเพิ่มจำนวนขึ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่รหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์จริงของ RN402 ที่ผ่านการใช้ซ้ำเป็นจำนวน 70 ครั้ง เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆ ที่จำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ได้แก่ *alkB* *alkM* และ CYP153 ซึ่งยีนทั้งสามชนิดเป็นยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายอัลเคนชนิดที่เป็นสายสั้นและสายยาวโดยมีจำนวนคาร์บอนที่ต่างกัน เช่น ยีน *alkB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 5 – 16 อะตอม ยีน *alkM* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอนมากกว่า 12 อะตอม และยีน CYP153 ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ไซโตโครม พี450 แอลเคนไฮดรอกซิเลส (cytochrome P450 alkane hydroxylase) สามารถย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 8 – 16 อะตอม (Kohno และคณะ, 2002; Smith และคณะ, 2002; Van และคณะ, 2006) ผลจากการทดลองพบว่า ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ทุกคู่

6.5 อภิปรายผลการทดลอง

แบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันดิบ น้ำมันดีเซล (PTT Diesel และ PTT Diesel B5) และน้ำมันเครื่อง PTT V120 เมื่อพิจารณาโครมาโตแกรมของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลและน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 พบว่า มีการลดลงอย่างมากของอัลเคนที่เป็นส่วนประกอบของน้ำมันดีเซลและน้ำมันดิบ (ภาคผนวก ค) ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในการย่อยสลายอัลเคน (เตตระเดเคน (C14) และ เฮกซะดีเคน (C17)) ซึ่งอัลเคนทั้ง 2 ชนิดสามารถพบในน้ำมันดีเซลและน้ำมันดิบ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลระหว่าง RN402 และ *Rhodococcus erythropolis* พบว่า *R. erythropolis* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้สูงถึง 75% ที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 1% w/v ในน้ำทะเลสังเคราะห์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ภายในเวลา 7 วัน ซึ่งสูงกว่าประสิทธิภาพของ RN402 (Huang และคณะ, 2008) จากงานวิจัยของ Klankeo (2009) พบว่า RN402 มีความสามารถในการย่อยสลาย ไพรีน พีแนนทรีน และฟลูออแรนทรีน และจากรายงานจำนวนมากรายงานว่า แบคทีเรียสกุล *Pseudoxanthomonas* สามารถย่อยสลาย PAHs ไดคลอโรไดฟีนิลไตรคลอโรอีเทน (dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT) บีเทค (BTEX) เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน (hexachlorocyclohexane) ได้แก่ *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04, *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2, *Pseudoxanthomonas indica* sp., *Pseudoxanthomonas sacheonensis* sp. and *Pseudoxanthomonas jiangsuensis* sp. (Lee และคณะ 2008; Kumari และคณะ 2011; Nayak และคณะ 2011; Wang และคณะ 2011; Patel และคณะ 2012) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่พบว่า แบคทีเรียสกุล *Pseudoxanthomonas* มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ น้ำมันดีเซล เตตระเดเคน และ เฮกซะดีเคนและจากประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของ RN402 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนต่อไป

การพัฒนาวิธีการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 สำหรับการบำบัดน้ำเสียจำเป็นต้องนำวิธีการรีเจเนอเรชันมาประยุกต์ เพื่อช่วยเป็นแหล่งค้ำกัน อีกทั้งยังทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เช่น ปริมาณน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง หรือสารอาหารที่มีปริมาณต่ำในน้ำเสีย ทำให้อัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ และการนำแบคทีเรียกลับมาใช้ซ้ำเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย (Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001; Gentry และคณะ, 2004; Wu และคณะ, 2009; Lee และคณะ, 2011) โดยใช้วิธีการตรึงแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม เริ่มจากการ

คัดเลือกวัสดุตั้งซึ่งพบว่า BCN-009 ของบริษัท Wassercare Co., Ltd. เป็นวัสดุตั้งที่มีเหมาะสมเนื่องเป็นวัสดุที่หาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาด ผลิตจาก HDPE ซึ่งสามารถทนต่อการย่อยสลายได้สูงและยังมีลักษณะใกล้เคียงกับตัวกลางที่ใช้ในระบบน้ำเสียขนาดใหญ่ที่จำหน่ายในท้องตลาดซึ่งทำให้ง่ายต่อการขยายปริมาณในของระบบบำบัดต่อไปในอนาคต

จากงานวิจัยของปาริฉัตร (2553) พบว่าสภาวะการตรึงเซลล์ที่เหมาะสมในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วัสดุตั้ง 5 กรัม ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 MPN/ขวดทดลอง น้ำมันดีเซล 0.5 % (w/v) เป็นเวลา 6 วัน โดยวัสดุตั้ง 1 กรัม มีปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนวัสดุตั้งประมาณ 10^8 MPN/กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัม/ลิตรทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลมากกว่า 80 % ตลอดการทดลอง เนื่องจากวัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์จะปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากน้ำมันที่ความเข้มข้นสูงๆ (Prieto และคณะ, 2002) ในขณะที่เซลล์อิสระไม่สามารถทนทานต่อความเข้มข้นที่สูงขึ้นของน้ำมันได้ (Kayode และคณะ, 2008) ทำให้ลดประสิทธิภาพการย่อยสลายลงอย่างมาก จากงานวิจัยของ Liu และคณะ (2008) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายกลุ่มปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในกลุ่มฟีนอล โดยเชื้อ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ XA05 และ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ FG03 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) พบว่า เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัม/ลิตร เท่ากับ 95% ภายใน 35 ชั่วโมง ส่วนในเซลล์อิสระที่ความเข้มข้นของฟีนอลที่มากกว่า 500 มิลลิกรัม/ลิตร ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเซลล์อิสระลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของฟีนอลที่สูงจะยับยั้งการเจริญของเซลล์ ส่วนการใช้เซลล์ตรึงจะมีวัสดุตั้งหุ้มอยู่สำหรับปกป้องกันเซลล์จากความเข้มข้นของฟีนอลที่สูงและมีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงได้ ดีกว่าเซลล์อิสระ ในงานวิจัยของ Chandran และ Das (2011) พบว่าการตรึงเซลล์ *Candida tropicalis* บนรำข้าวสาลีสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลจาก 80% (เซลล์อิสระ) ได้ถึง 98% (เซลล์ตรึง) ที่ความเข้มข้นน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 2% (v/w) ภายในเวลา 7 วัน นอกจากนี้การตรึงเซลล์โดยใช้หุ้มเชื้อเป็นกลุ่มแบคทีเรีย ได้แก่ *Achromobacter denitrificans* *Acinetobacter baumannii* *Aeromonas hydrophila/caviae* *Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas stutzeri* *Rahnella aquatilis* และ *Stenotrophomonas maltophilia* บนวัสดุตั้งเซลลูโลส (cellulose-based carrier) ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลเพิ่มขึ้น 2 เท่า จาก

35% (เซลล์อิสระ) เป็น 80% (เซลล์ตรึง) ที่ความเข้มข้นน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 10% (v/w) ภายในเวลา 7 วัน (Lawniczak และคณะ, 2011)

การทดลองประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้นตั้งแต่ 100 500 1,000 5,000 10,000 และ 20,000 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อให้ทราบถึงขอบเขตการใช้งานของเซลล์ตรึง RN402 ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันดีเซล พบว่า เซลล์ตรึง RN402 มีอัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงสุด 165 มิลลิกรัม/ลิตร/กรัมเซลล์ตรึง/วัน ที่ความเข้มข้นน้ำมันดีเซล 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึง RN402 สามารถคงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลได้ถึง 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่อัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลเริ่มลดลงที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล 20,000 มิลลิกรัม/ลิตร เนื่องจากน้ำมันดีเซลที่มีความเข้มข้นสูงทำให้เป็นพิษต่อเซลล์และส่งผลกระทบต่อกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เรียกว่า การยับยั้งจากสารอาหาร (substrate inhibition) (Agarry และคณะ, 2008) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง RN402 กับเซลล์ตรึงของแบคทีเรียกลุ่ม (*Acinetobacter* sp., *Gordonia* sp. and *Rhodococcus* sp.) บนวัสดุตรึงผสมระหว่างพีทมอส เบนโทไนท์ และอัลจิเนต พบว่าเซลล์ตรึงของแบคทีเรียกลุ่มสามารถกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นสูงถึง 59% ที่ความเข้มข้นน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 10 กรัม/ลิตร ในอาหารเหลว Bushnell Haas ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ภายในเวลา 7 วัน (Lee และคณะ, 2010) อย่างไรก็ตามเซลล์ตรึง RN402 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลได้สูงกว่าเซลล์ตรึง *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ F92 บนโพลียูรีเทนโฟม ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซล 80% ความเข้มข้นน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 0.5 (v/w) ในน้ำทะเลสังเคราะห์ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ภายในเวลา 14 วัน (Quek และคณะ, 2006)

การทดสอบประสิทธิภาพในการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึง RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า เซลล์ตรึง RN402 สามารถใช้ซ้ำได้ถึง 70 รอบ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึง RN402 มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในอาหารเหลว และสามารถใช้ซ้ำได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการตรึงเซลล์บนวัสดุที่เหมาะสมโดยใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตรน้ำ

การยึดเกาะของเซลล์ RN402 บนวัสดุตรึงและการสร้างไบโอฟิล์มของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำ 70 รอบ โดยกล้อง SEM และ SPM พบว่าเมื่อเซลล์ตรึงผ่านการใช้งานทำให้ชั้นของไบโอฟิล์มหนา ในขณะที่การตรวจติดตามด้วยกล้อง CLSM ร่วมกับสีย้อม FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit แสดงให้เห็นการมีชีวิตของแบคทีเรียบนพื้นผิววัสดุได้ทันที ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว แม่นยำ โดยไม่ต้องผ่านการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และสามารถนับจำนวนเซลล์จากภาพถ่ายได้โดยตรง จากการตรวจติดตามด้วยวิธีดังกล่าวพบ

แบคทีเรีย RN402 มีชีวิตจำนวนมากอยู่บนไบโอฟิล์ม ซึ่งสอดคล้องกับการคงประสิทธิภาพของ เซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซลตลอดการทดลอง 70 ครั้ง การมีชีวิตของแบคทีเรียมีความสำคัญ ต่อความคงตัวของไบโอฟิล์มและการรักษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเซลล์บนไบโอฟิล์ม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sivan และคณะ (2006) ศึกษาการมีชีวิตของ *Rhodococcus ruber* บนไบโอฟิล์มด้วยกล้อง CLSM พบเซลล์มีชีวิตของ *R. ruber* จำนวนมาก และยังคงประสิทธิภาพ การย่อยสลายโพลีเอทิลีน (polyethylene) เมื่อผ่านการบ่มเป็นเวลา 60 วัน

จากรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการใช้ซ้ำแสดงให้เห็นว่า เซลล์ตรึงที่ ผ่านการใช้ซ้ำสามารถคงประสิทธิภาพการย่อยสลาย และเหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในระบบ บำบัดน้ำเสียทางชีวภาพได้ (Karabika และคณะ, 2009; Djefal-Kerrar และคณะ, 2011) จากผล ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่า เซลล์ตรึง RN402 สามารถใช้ซ้ำได้มากกว่าเซลล์ตรึง *Yarrowia lipolytica* W29 ในแคลเซียมอัลจิเนตซึ่งสามารถใช้ซ้ำได้เพียง 12 รอบเท่านั้น (Wu และคณะ, 2009) นอกจากนี้การตรึงเซลล์ RN402 บนชั้นพลาสติกมีความคงตัวสูงในระบบบำบัดที่ดำเนินงานเป็น ระยะยาวนานได้ ในขณะที่เซลล์ตรึง *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ XA05 และ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ FG03 บน PVA สามารถใช้ซ้ำได้เพียง 20 รอบ (Liu และคณะ, 2008) ดังนั้นจาก ผลการวิจัยทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า เซลล์ตรึง RN402 บนชั้นพลาสติก BCN-009 มีคุณลักษณะที่ หลากหลาย เช่น ประสิทธิภาพการย่อยสลายสูง ทนทาน การลอยตัวในน้ำ อายุการใช้งานยาวนาน ทำให้เซลล์ตรึง RN402 เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียในงานวิจัยต่อไป

นอกจากนี้จากความสามารถของ RN402 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ และอัล เคน (C14 และ C16) ดังนั้น RN402 ต้องมียีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนส โดย ประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิ จีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลบนดีเอ็นเอของ RN402 พบว่า ไม่พบ ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพโรเมอร์ทุกคู่ ซึ่งอาจเนื่องมาจากยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนส ของ RN402 มีความแตกต่างยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสที่มีรายงานในปัจจุบัน ซึ่ง ไพโรเมอร์ส่วนใหญ่ออกแบบมาจากลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสของ แบคทีเรียสกุลต่างๆ ที่ไม่ครอบคลุมกับแบคทีเรียในสกุล *Pseudoxanthomonas* อีกทั้งยังไม่ ปรากฏรายงานที่มีการพบยีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสของแบคทีเรียในสกุล *Pseudoxanthomonas* เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่พบว่าแบคทีเรียในสกุล *Pseudoxanthomonas* มีความสามารถในการย่อยสลาย น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ และอัลเคน ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษายีนที่ประมวลรหัสอัลเคนโมโนออกซิจีเนสในแบคทีเรียในสกุล

Pseudoxanthomonas เพื่อให้มีข้อมูลความหลากหลายของยีนเพิ่มขึ้น และประโยชน์ต่อการประยุกต์ในอนาคตต่อไป

จากงานวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบวิธีการใช้แบคทีเรียสกุลน้ำของ RN402 สำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยตรึงแบคทีเรียบนพลาสติก BCN-009 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียสกุลน้ำ ลดปริมาณการใช้หัวเชื้อแบคทีเรีย และสามารถใช้งานในระบบบำบัดได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งพบว่าเซลล์ตรึง RN402 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นสูงชันกว่าเซลล์อิสระ โดยเซลล์ตรึง RN402 มีอัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงสุด 165 มิลลิกรัม/ลิตร/กรัมเซลล์ตรึง/วัน ที่ความเข้มข้นน้ำมันดีเซล 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร และสามารถคงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลได้ถึง 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร และจากการใช้พบว่าเซลล์ตรึง RN402 ยังคงมีประสิทธิภาพสูงตลอดการใช้ซ้ำในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 70 รอบ แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ซึ่งมีอายุการใช้งานในยาวนานมากกว่า 210 วัน นอกจากนี้การวิเคราะห์การยึดเกาะของเซลล์ RN402 บนวัสดุตรึง และการสร้างไบโอฟิล์มของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำ 70 รอบ โดยกล้อง SEM และ SPM ทำให้เห็นชั้นของไบโอฟิล์มซึ่งมีความหนาอย่างชัดเจนเมื่อเซลล์ตรึงมีอายุการใช้ซ้ำมากขึ้น ในขณะที่การตรวจติดตามด้วยกล้อง CLSM ร่วมกับสีย้อม FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรีย RN402 ที่มีชีวิตจำนวนมากอยู่บนไบโอฟิล์ม ซึ่งสอดคล้องกับการคงประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซลตลอดการทดลอง 70 ครั้ง การมีชีวิตของแบคทีเรียมีความสำคัญต่อความคงตัวของไบโอฟิล์มและการรักษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเซลล์บนไบโอฟิล์ม จากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง RN402 ความคงทนต่อน้ำมันดีเซลความเข้มข้น และการคงประสิทธิภาพของการกำจัดน้ำมันดีเซลตลอดอายุการใช้งานของเซลล์ตรึง RN402 แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวกรองชีวภาพในระบบบำบัดน้ำเสียแบบต่อเนื่องในการทดลองต่อไป

บทที่ 7

การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นโดยเซลล์ตรึงของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง

7.1 บทนำ

ในปัจจุบันประเทศไทยมีอุตสาหกรรมที่หลากหลายที่เกี่ยวข้องกับปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น กลุ่มอุตสาหกรรมโรงกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม กลุ่มอุตสาหกรรมปิโตรเคมีภัณฑ์ และกลุ่มอุตสาหกรรมผลิตชิ้นส่วนและอุปกรณ์ประกอบสำหรับยานยนต์ ซึ่งในกระบวนการผลิตก่อให้เกิดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ซึ่งน้ำเสียเหล่านี้ประกอบด้วยของแข็งแขวนลอย โลหะ อิมัลซิไฟเออร์ และน้ำมันซึ่งมักพบน้ำมันหล่อลื่นชนิดต่างๆ น้ำมันไฮดรอลิก จาระบี น้ำมันคูลแลนท์ที่อยู่ในรูปของอิมัลชันระหว่างน้ำมัน สารอิมัลซิไฟเออร์ และน้ำ และเรียกลักษณะแบบนี้ว่า อิมัลชันเสถียร (stabilized emulsion) (Jang และ Lee, 2000) นอกจากนี้ส่วนประกอบข้างต้นทำให้น้ำมันที่อยู่ในรูปอิมัลชันย่อยสลายได้ยาก โดยลักษณะของอิมัลชันที่พบในน้ำเสียเป็นแบบ oil-in-water (o/w) หรือเป็นแบบ water-in-oil (w/o) การบำบัดน้ำเสียอิมัลชันด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมี เช่น การทำให้ตะกอนลอยด้วยการเป่าอากาศ (air flotation) การเติมสารก่อการจับก้อน (coagulant) การดูดซับ (adsorption) การแยกด้วยเมมเบรน (membrane separation process) เป็นต้น แต่เนื่องจากวิธีการเหล่านี้มีข้อด้อยในเรื่องค่าใช้จ่ายที่มีราคาสูงและไม่สามารถกำจัดน้ำมันได้อย่างสมบูรณ์ซึ่งอาจทำให้น้ำมันจากระบบบำบัดกลับมาปนเปื้อนในน้ำเสียได้อีกครั้ง รวมถึงมีข้อด้อยในเรื่องค่าใช้จ่ายในการลงทุนและดำเนินการที่มีราคาสูง (Amro, 2004; Hong และคณะ, 2005; Vieira และคณะ, 2007; Li และคณะ, 2011; Maiti และคณะ, 2011) เมื่อระบบบำบัดที่มีอยู่ไม่สามารถกำจัดน้ำเสียในรูปอิมัลชันได้หมดผล ส่งผลให้น้ำทิ้งจากระบบเหล่านี้มีการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนไปสู่สิ่งแวดล้อม ถึงแม้ว่าปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำเสียเหล่านี้มีความเข้มข้นต่ำ แต่หากถูกปล่อยทิ้งลงแหล่งน้ำในธรรมชาติ ทำให้เป็นพิษต่อสัตว์น้ำและเกิดการสะสมสารพิษเหล่านี้ในสิ่งมีชีวิตในห่วงโซ่อาหารที่เรียกว่า การเพิ่มขยายทางชีวภาพ (biomagnifications) ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (Lohi และคณะ, 2008; Zhou และคณะ, 2008; Chandran และ Das, 2011) ดังนั้นเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในธรรมชาติ ซึ่งอาจเกิดจากการปล่อยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมจึงจำเป็นต้องมีวิธีการบำบัดน้ำเสียอย่างถูกวิธี

ดังนั้นจึงมีการใช้วิธีทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันเนื่องจากวิธีทางชีวภาพส่วนใหญ่เป็นการใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดสารพิษจึงไม่เป็นอันตรายต่อ

มนุษย์และสิ่งแวดล้อม โดยจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนเปลี่ยนเป็นมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวทำให้น้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียถูกกำจัดได้อย่างสมบูรณ์โดยจุลินทรีย์ (EPA, 1996; Das และ Chandran, 2011) และเนื่องจากน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมมีจำนวนมากจึงจำเป็นต้องใช้ระบบบำบัดที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสีย โดยการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง (aerobic packed-bed bioreactor) เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากประสิทธิภาพในการกำจัดสารปนเปื้อนต่างๆ ได้สูง และมีความทนทานต่อสภาวะต่างๆ ในระหว่างการบำบัด เช่น ความเป็นพิษสูงจากในน้ำเสีย นอกจากนี้มีสมบัติที่สำคัญคือการกรองอนุภาคต่างๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียเป็นการช่วยขั้นตอนการกำจัดตะกอนจากระบบบำบัด (Benthack และคณะ, 2001) ปัจจุบันมีรายงานจำนวนมากได้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ระบบบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน Ji และคณะ (2009) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดทางชีวภาพที่มีตัวกลางแบบป้อนน้ำเสียจากด้านล่างถึงบำบัด (up-flow fixed-bed bioreactor; UFB) เพื่อใช้บำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ระบบสามารถกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ถึง 90-93% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 48.7 มิลลิกรัม/ลิตร และ Bravo และคณะ (2009) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดทางชีวภาพที่มีตัวกลางแบบระบบโปรยกรอง (trickling-flow fixed-film biological reactor) เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนเบนซีนและน้ำดีเซล สามารถลดปริมาณน้ำดีเซลจาก 2000 มิลลิกรัม/ลิตร เหลือ 0.12 มิลลิกรัม/ลิตร

นอกจากนี้การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีชีวภาพ จำเป็นต้องศึกษาตัวแปรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส ความเข้มข้นน้ำมัน pH ระยะเวลาในการบ่ม และ อุณหภูมิในการบ่ม เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาและการทดลองจำนวนมาก ดังนั้นการประยุกต์ใช้หลักการทางสถิติในการออกแบบการทดลอง ได้แก่ วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology: RSM) จะสามารถลดระยะเวลาและจำนวนการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถทำนายผลการทดลองได้อีกด้วย (Mohajeri และคณะ, 2010; Zahed และคณะ, 2010) รายงานการประยุกต์ใช้วิธีทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ Zahed และคณะ (2010) ศึกษาการประยุกต์ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล โดยทดลองในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุน้ำทะเล 250 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำมันดิบเท่ากับ 100 มก./ล. ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร และศึกษาตัวแปรที่

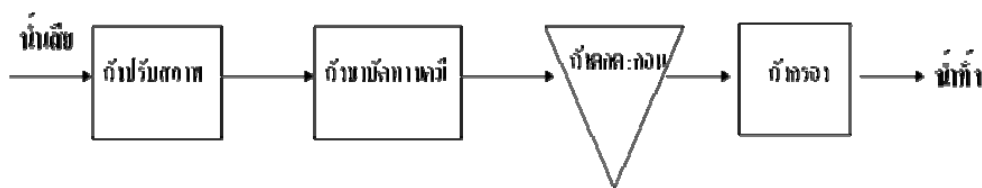
เกี่ยวข้องได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และเวลาในการย่อยสลาย พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน 13.62 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณฟอสฟอรัส 1.39 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 20 วัน โดยประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากการทำนายเท่ากับ 98 % ในขณะที่ผลจากการทดลองเท่ากับ 95%

งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายงานวิจัยโดยมุ่งศึกษาการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงในระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางสำหรับบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ในงานวิจัยนี้ใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตชิ้นส่วนและอุปกรณ์ประกอบสำหรับยานยนต์ บริษัท สยามเลมเมอร์ส จำกัด 42 หมู่ที่ 5 ถนนหนองปลากระตี ตำบลหนองปลาหมอ อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี โดยใช้น้ำเสียจากแผนก chip yard โดยน้ำเสียในรูปแบบอิมัลชันระหว่างน้ำมันสไลด์เวย์และน้ำ โดยมีน้ำมันคูลแลนต์เป็นตัวอิมัลซิไฟเลอร์ โดยน้ำมันสไลด์เวย์เป็นน้ำมันหล่อลื่น (รูปที่ 7.1) ซึ่งใช้ในสายพานการผลิตและใช้สำหรับเคลือบผิวล้ออัลลอยสำหรับรถยนต์ น้ำเสียดังกล่าวผ่านการบำบัดน้ำเสียดังนี้ ขั้นตอนแรกรวบรวมน้ำเสียสู่ถังปรับสภาพ (equalization tank) ขั้นตอนที่ 2 เป็นถังบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางเคมี (chemical reaction tank) ซึ่งเติมสารพอลิเมอร์และสารเคมีเพื่อปรับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกน้ำมันออกจากน้ำ และเกิดการรวมตัวเป็นตะกอนของน้ำมันแยกออกจากน้ำได้อย่างชัดเจนและลอยสู่ด้านบน ขั้นตอนที่ 3 ตกตะกอนจากการบำบัดทางเคมีด้วยถังตกตะกอน (sedimentation tank) ขั้นตอนที่ 4 กรองตะกอนด้วยถังกรอง (filter tank) และปล่อยสู่ระบบบำบัดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรมโดยไม่มีการใช้วิธีการบำบัดทางชีวภาพ ดังแสดงในรูปที่ 7.2



รูปที่ 7.1 พีทีที สไลด์เวย์ ออยล์

ที่มา: ปตท (2554)



รูปที่ 7.2 ระบบบำบัดน้ำเสียของแผนก chip yard บริษัท สยามเลมเมอร์ช จำกัด

ที่มา: สยามเลมเมอร์ช (2554)

อย่างไรก็ตามระบบบำบัดของโรงงานดังกล่าวประสบปัญหาที่บางครั้งที่มียอดการผลิตจำนวนมาก พบว่าน้ำทิ้งจากระบบดังกล่าว น้ำขุ่น ไม่ใส มีค่า FOG, BOD, COD และ SS เกินมาตรฐานที่เขตประกอบอุตสาหกรรม เอส ไอ แอล สระบุรี ปรับปรุงฉบับล่าสุด พ.ศ. 2551 กำหนดคือ ไม่มากกว่า 10 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้โรงงานต้องเสียค่าปรับให้แก่นิคมอุตสาหกรรมเพื่อค่าใช้จ่ายบำบัดน้ำเสียในวันที่มีปัญหา นอกจากนี้ยังมีผลกระทบต่อชื่อเสียงของโรงงานเนื่องจากบริษัทผลิตชิ้นรถยนต์ให้กับบริษัทผลิตรถยนต์หลากหลายยี่ห้อได้แก่ โตโยต้า ฮอนด้า อีซูซุ วอลโว่ และ เมอร์เซเดส-เบนซ์ เป็นต้น ซึ่งทางบริษัทและบริษัทคู่ค้าเหล่านี้ได้ผ่านการรับรองมาตรฐานระบบการจัดการสิ่งแวดล้อม ISO 14000 หากมีการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจำนวนมากในน้ำเสียจนทำให้ค่าไขมันและน้ำมัน (fat oil and grease, FOG) เกินค่ามาตรฐาน ส่งผลให้โรงงานถูกปรับจากนิคมข้อมูลดังกล่าวจะถูกบันทึกและแจ้งต่อบริษัทผลิตรถยนต์เหล่านี้ทราบ ทำให้มีผลต่อการพิจารณาการต่อสัญญาการดำเนินธุรกิจระหว่างบริษัทผลิตรถยนต์และโรงงาน ดังนั้นการเพิ่มระบบบำบัดทางชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียที่มีอยู่เดิมในการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและลดค่า FOG จึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

ทั้งนี้งานวิจัยนี้เริ่มจากศึกษาลักษณะสมบัติของน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรม สร้างระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ และทดสอบประสิทธิภาพของระบบบำบัดในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเพื่อหาสภาวะในการบำบัดอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ได้ศึกษาการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติร่วมกับวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองเพื่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 โดยประโยชน์ที่จะได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้คือสามารถใช้เป็นข้อมูลในการสร้างระบบบำบัดต้นแบบและข้อมูลสำหรับควบคุมระบบบำบัดให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพสำหรับการประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป

7.2 ขั้นตอนงานวิจัย

7.2.1 การศึกษาลักษณะสมบัติของน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรม

7.2.2 การสร้างระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

7.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

1) การทดสอบระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์โดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง

2) การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์โดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง

7.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

7.2.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมของเซลล์ตริง RN402 ด้วยวิธีพินผิวตอบสนอง

7.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

7.3.1 การศึกษาลักษณะสมบัติของน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรม

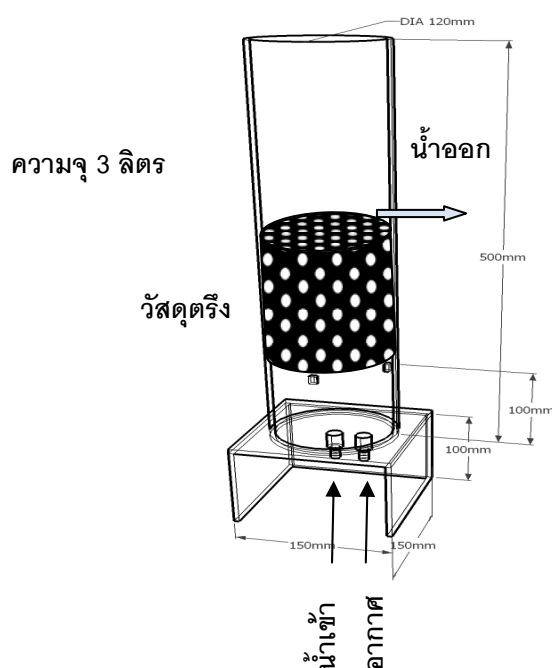
นำน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานผลิตชิ้นส่วนและอุปกรณ์ประกอบสำหรับยานยนต์และเครื่องยนต์ บริษัท สยามเลมเมอร์ซ จำกัด โดยใช้น้ำเสียจากแผนก chip yard ที่ผ่านกระบวนการบำบัดทางกายภาพและทางเคมี นำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำทั้งตามวิธีมาตรฐานเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในตารางที่ 7.1

ตารางที่ 7.1 วิธีวิเคราะห์ลักษณะสมบัติต่างๆ ของน้ำเสีย

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
pH	pH Meter
FOG	สกัดด้วยตัวทำละลาย แล้วแยกหาน้ำหนักของน้ำมันและไขมัน
TPH	เครื่องวัดปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (TLC-FID)
TSS	ระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 103 -105°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
COD	Potassium Dichromate Digestion
Total N	Macro Kjeldahl
Total P	Ascorbic acid method

7.3.2 การสร้างระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

สร้างระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง โดยดัดแปลงจากระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางของ Juneson และคณะ (2002) ประกอบด้วยท่ออะคริลิกเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 120 มิลลิเมตร ความสูง 500 มิลลิเมตร ความจุ 5.5 ลิตร โดยต่อเข้ากับปั้มน้ำและปั้ลม เพื่อป้อนน้ำเข้าและอากาศทางด้านล่างระบบบำบัด ซึ่งทิศทางการไหลของน้ำไหลจากด้านล่างสู่ด้านบน แสดงดังรูปที่ 7.3 โดยนำระบบบำบัดนี้ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม บริษัท สยามเลมเมอร์ช ซึ่งน้ำเสียดังกล่าวผ่านการบำบัดทางกายภาพและทางเคมี แต่ยังคงพบว่ามีปัญหาการปนเปื้อนของค่า FOG เกินมาตรฐานน้ำทิ้งของนิคมอุตสาหกรรม



รูปที่ 7.3 ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง (aerobic packed-bed bioreactor)

7.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

7.3.3.1 การทดสอบระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์โดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

นำระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางจากข้อ 7.3.2 ปริมาตรในการบำบัดน้ำเสียเท่ากับ 3 ลิตร ซึ่งบรรจุด้วยเชลล์ตรง RN402 ที่เตรียมจากแบคทีเรียสูตรน้ำจำนวน 200 กรัม เพื่อบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์ ซึ่งเตรียมจากอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมด้วย 0.1% (v/v) tween80 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ

50 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมโดยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปกวนโดยใช้เครื่องกวนสารเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดฟองที่เกิดขึ้นจากการปั่นและทำให้น้ำเสียอยู่ในรูปอิมัลชันมีความเสถียรมากขึ้น จากนั้นปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร (Panpanit และ Visvanathan, 2001) โดยแปรผันระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียเท่ากับ 5 10 และ 15 ชั่วโมง ตามลำดับ และให้อากาศ 2 vvm. โดยชุดควบคุมคือระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ เก็บตัวอย่างน้ำเข้าและออกเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่โดยวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.11

7.3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวียโดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

นำระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางจากข้อ 7.3.2 ปริมาตรในการบำบัดน้ำเสีย 3 ลิตร ซึ่งบรรจุด้วยเซลล์ตรึง RN402 ที่เตรียมจากแบคทีเรียสุตรน้ำจำนวน 200 กรัม เพื่อบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวีย โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำมัน 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm. เก็บตัวอย่างน้ำเข้าและออกเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่โดยวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.11

7.3.4 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

นำระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางจากข้อ 7.3.2 ปริมาตรในการบำบัดน้ำเสีย 3 ลิตร ซึ่งบรรจุด้วยเซลล์ตรึง RN402 จำนวน 200 กรัม เพื่อบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรม บริษัท สยามเลมเมอร์ จำกัด ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm. โดยแบ่งการทดลอง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ไม่เติมสารอาหาร กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่เติมสารอาหารโดยเติมสารอาหารเหลว CFMM ในอัตราส่วนระหว่างน้ำเสียและอาหารเหลว CFMM เท่ากับ 1:1 เก็บตัวอย่างน้ำเข้าและออกเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่โดยวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.11 ปริมาณ COD และปริมาณ FOG

7.3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมด้วยวิธีพื้นผิวดอปสนอง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำมันหล่อลื่นในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการกำจัดน้ำมัน โดยการออกแบบการทดลองด้วย

วิธีทางสถิติร่วมกับวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง ซึ่งการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสมกลาง ประกอบด้วย 3 ตัวแปร โดยแต่ละปัจจัยเปลี่ยนแปลงได้ 5 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 7.2 และ 7.3 โดยตัวแปรที่ใช้ศึกษาได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน (แอมโมเนียมไนเตรต; NH_4NO_3) ปริมาณ ฟอสฟอรัส (ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) และความเข้มข้นของ น้ำมัน (น้ำมันสโกลด์เวย์) และทดลองในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยน้ำเสีย จากโรงงานอุตสาหกรรมปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติม tween80 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.01%(v/v) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของเซลล์ตรึงเท่ากับ 10^9 MPN/ขวดทดลอง เติมสารอาหารต่างๆ ตามสภาวะที่กำหนดไว้ในตารางที่ 7.3 และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7 จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ น้ำมันที่เหลืออยู่โดยวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.11 นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความถดถอย เชิงซ้อนหรือพหุคูณ (multiple regression analysis) โดยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 8 (บริษัท StatSoft, สหรัฐอเมริกา) และหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างการกำจัดน้ำมันกับตัวแปรต่างๆ ในรูปแบบของการวิเคราะห์หาพื้นผิวการตอบสนอง (response surface plot) และรูปแบบเส้นโครงร่าง (contour plot) สำหรับหาสภาวะเหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402

ตารางที่ 7.2 ตัวแปรและระดับตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปร	ระดับ				
	-1.682	-1	0	+1	1.682
ไนโตรเจน (กรัม/ลิตร)	0.795	2.5	5	7.5	9.205
ฟอสฟอรัส (กรัม/ลิตร)	0.636	2	4	6	7.364
น้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)	46	2000	5000	8000	10046

ตารางที่ 7.3 ชุดทดลองโดยการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสมกลาง

ชุดทดลองที่	ไนโตรเจน (กรัม/ลิตร)	ฟอสฟอรัส (กรัม/ลิตร)	น้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)
1	2.5	2	2000
2	7.5	2	2000
3	2.5	6	2000
4	7.5	6	2000
5	2.5	2	8000

ชุดทดลองที่	ไนโตรเจน (กรัม/ลิตร)	ฟอสฟอรัส (กรัม/ลิตร)	น้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)
6	7.5	2	8000
7	2.5	6	8000
8	7.5	6	8000
9	0.795	4	5000
10	9.205	4	5000
11	5	0.636	5000
12	5	7.364	5000
13	5	4	46
14	5	4	10046
15	5	4	5000
16	0	0	46
17	0	0	2000
18	0	0	5000
19	0	0	8000
20	0	0	10046

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 16-20 เป็นชุดควบคุม โดยเตรียมจากน้ำเสียจริงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่เติมน้ำมันที่ความเข้มข้นต่างๆ และเติมวัสดุตั้งปอดเชื้อ

7.4 ผลการทดลอง

7.4.1 ลักษณะสมบัติของน้ำเสียปนเปื้อนไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรม

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียที่ปนเปื้อนไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานผลิตชิ้นส่วนและอุปกรณ์ประกอบสำหรับยานยนต์และเครื่องยนต์ บริษัท สยามเลมเมอร์ช ตามวิธีมาตรฐาน เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ pH, FOG, COD, TSS, total phosphorus, total nitrogen และ TPH ดังแสดงในตารางที่ 7.3 โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียจำนวน 4 ครั้ง ได้แก่ ในวันที่ 3 สิงหาคม 2553 วันที่ 14 มกราคม 2554 วันที่ 4 เมษายน 2554 และ วันที่ 28 มิถุนายน 2554

ตารางที่ 7.4 ผลการวิเคราะห์น้ำเสียตัวอย่าง

ดัชนีคุณภาพน้ำ	ผลการวิเคราะห์ ⁽¹⁾	มาตรฐานของนิคมฯ ⁽²⁾	มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง ⁽³⁾
ลักษณะทั่วไป	ขุ่นเล็กน้อยถึงขุ่นมาก มีกลิ่นเล็กน้อย	-	-
pH	7 -14	5.5-9.0	5.5-9.0
FOG (มิลลิกรัม/ลิตร)	28-177	ไม่เกิน 10	5-15
COD (มิลลิกรัม/ลิตร)	83-1,553	ไม่เกิน 1,250	120-400
TSS (มิลลิกรัม/ลิตร)	32	-	50-150
Total N (มิลลิกรัม/ลิตร)	1.1-2.2	-	-
Total P (มิลลิกรัม/ลิตร)	0.4-0.65	-	-
TPH (มิลลิกรัม/ลิตร)	43-161	-	-

ที่มา: 2554

หมายเหตุ ⁽¹⁾ ข้อมูลผลการวิเคราะห์น้ำเสียแสดงเป็นช่วงระหว่างค่าต่ำสุดถึงสูงสุด จาก 4 ตัวอย่าง ที่ถูกเก็บเมื่อวันที่ 3 สิงหาคม 2553 วันที่ 14 มกราคม 2554 วันที่ 4 เมษายน 2554 และวันที่ 28 มิถุนายน 2554

⁽²⁾ มาตรฐานที่เขตประกอบอุตสาหกรรม เอส ไอ แอล สระบุรี ปรับปรุงฉบับล่าสุด พ.ศ. 2551

⁽³⁾ มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม ลงวันที่ 3 มกราคม 2539 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 13ง ลงวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2539

โดยน้ำเสียในรูปแบบอิมัลชันระหว่างน้ำมันสโกลด์เวย์และน้ำโดยมีน้ำมันคูลแลนท์เป็นตัวอิมัลซิไฟเลอร์ น้ำเสียปนเปื้อนไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานผลิตชิ้นส่วนและอุปกรณ์ประกอบสำหรับยานยนต์และเครื่องยนต์จากแผนก chip yard เป็นน้ำเสียมาจากการล้างเครื่องจักรในการขึ้นรูปล้อแม็กซ์โดยมีการปนเปื้อนน้ำมันสโกลด์เวย์ซึ่งเป็นน้ำมันหล่อลื่นซึ่งใช้ในสายพานการผลิตและใช้สำหรับเคลือบผิวล้ออัลลอยสำหรับรถแม็กซ์รถยนต์ โดยน้ำเสียในรูปแบบอิมัลชันระหว่างน้ำมันสโกลด์เวย์และน้ำโดยมีน้ำมันคูลแลนท์เป็นตัวอิมัลซิไฟเลอร์ ซึ่งน้ำเสียดังกล่าวเมื่อผ่านกระบวนการบำบัดทางกายภาพและทางเคมี ผลจากการวิเคราะห์พบว่าน้ำเสียดังกล่าวมีค่า FOG อยู่ในช่วง 43-177 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเกินมาตรฐานที่เขตประกอบอุตสาหกรรม เอส ไอ แอล สระบุรี ปรับปรุงฉบับล่าสุด พ.ศ. 2551 กำหนดคือ ไม่มากกว่า 10 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อ

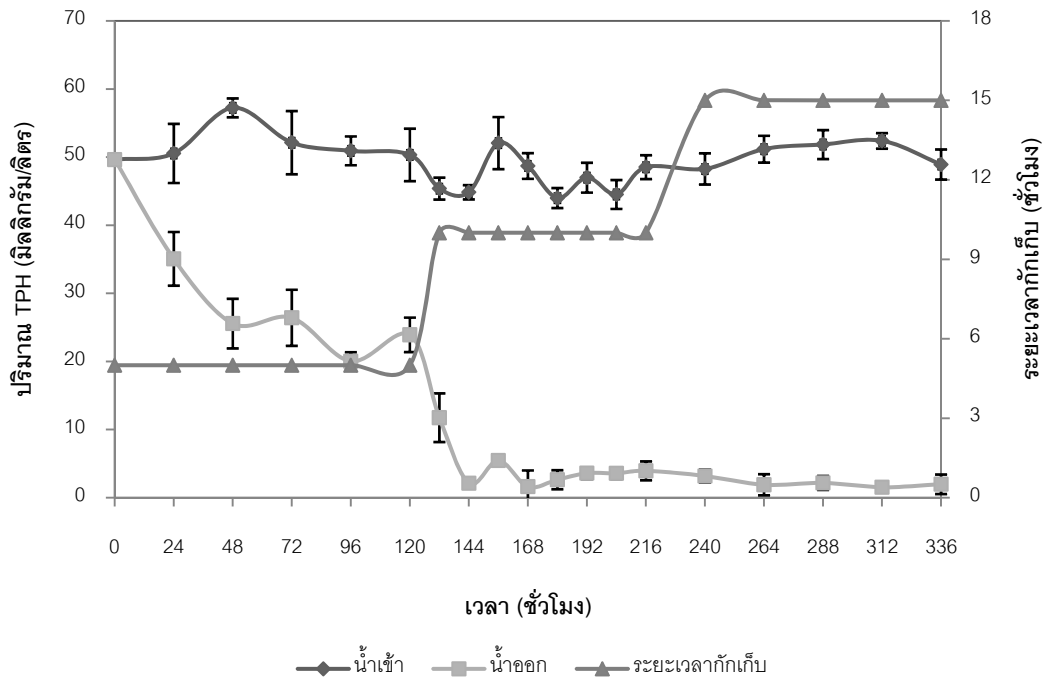
วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในน้ำเสียตัวอย่างโดยเครื่อง TLC-FID พบว่าค่า TPH อยู่ในช่วง 50 - 161 มิลลิกรัม/ลิตร จากผลวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการบำบัดทางกายภาพและทางเคมีไม่สามารถลดค่า FOG ให้ต่ำกว่าค่ามาตรฐาน ดังนั้นการบำบัดทางชีวภาพจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะนำมาใช้บำบัดน้ำเสียจากโรงงานนี้ โดยใช้ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางเป็นเซลล์ตรึง RN402 ในการบำบัดน้ำเสียจากระบบบำบัดทางกายภาพและทางเคมีเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียมากยิ่งขึ้น

7.4.2 การทดสอบระยะเวลาการกักเก็บน้ำเสียในระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

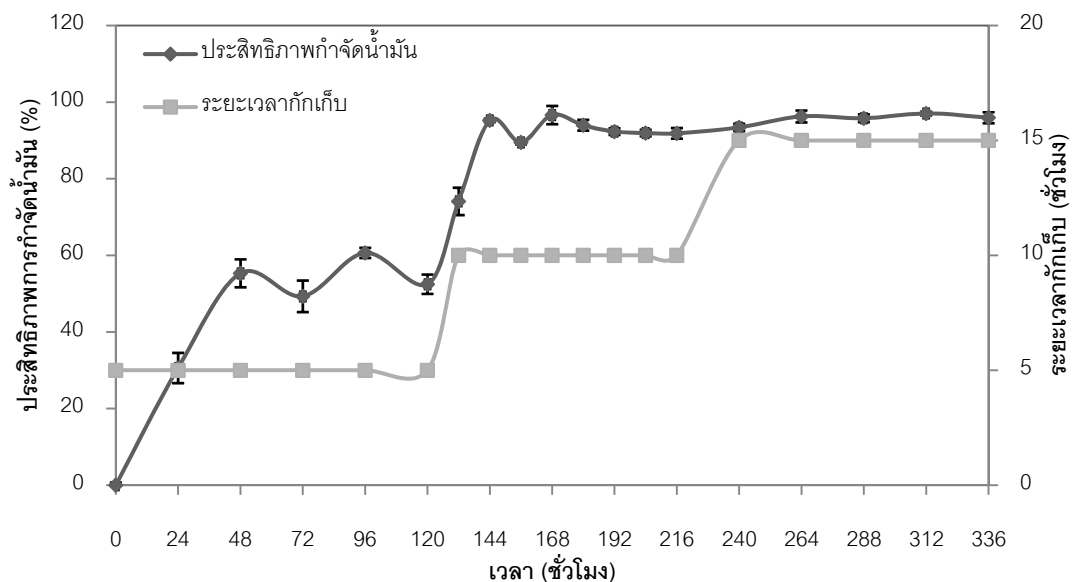
นำระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางดังแสดงในรูปที่ 7.4 ปริมาตรในการบำบัดน้ำเสีย 3 ลิตร ซึ่งบรรจุด้วยเซลล์ตรึง RN402 ที่เตรียมจากแบคทีเรียสูตรน้ำจำนวน 200 กรัม เพื่อบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสโกลด์เวย์ ความเข้มข้นของน้ำมัน 50 มิลลิกรัม/ลิตร โดยแปรผันระยะเวลาการกักเก็บน้ำเสียเท่ากับ 5 10 และ 15 ชั่วโมง ตามลำดับ และการให้อากาศ 2 vvm. จากผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาการกักเก็บ 15 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันมากกว่า 95 % แต่เมื่อพิจารณาถึงการประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดจริง พบว่า ระยะเวลาการกักเก็บ 10 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันที่ใกล้เคียงกันซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่า 90 % ดังแสดงในรูปที่ 7.5 และ 7.6 และยังทำให้อัตราการบำบัดน้ำเสียของระบบสูงขึ้น ทำให้ระบบบำบัดสามารถบำบัดน้ำเสียได้มากขึ้นกว่าการใช้ระยะเวลาการกักเก็บ 15 ชั่วโมง ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้พบว่า ระยะเวลาการกักเก็บ 10 ชั่วโมง จึงเหมาะสมสำหรับการบำบัดน้ำเสียในระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง



รูปที่ 7.4 ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ปริมาตรในการบำบัดน้ำเสีย 3 ลิตร



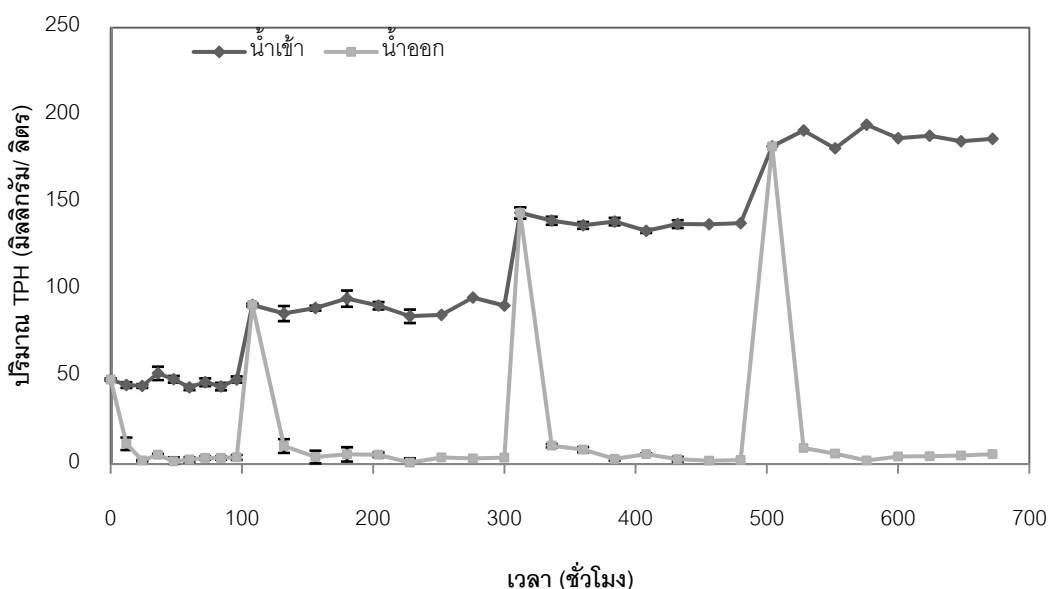
รูปที่ 7.5 ปริมาณ TPH ในน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 5 10 และ 15 ชั่วโมง ตามลำดับ และการให้อากาศ 2 vvm.



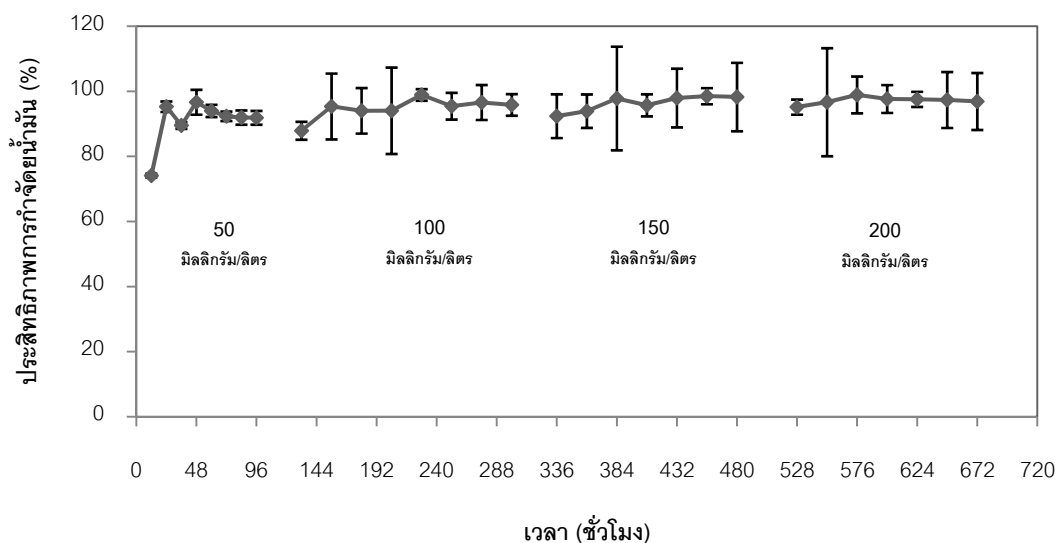
รูปที่ 7.6 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์ ที่ความเข้มข้น 50, มิลลิกรัม/ลิตร โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 5 10 และ 15 ชั่วโมง ตามลำดับ และการให้อากาศ 2 vvm.

7.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวียโดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวียโดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ปริมาตรในการบำบัดน้ำเสีย 3 ลิตร ซึ่งบรรจุด้วยเซลล์ตรึง RN402 จำนวน 200 กรัม เพื่อบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวีย ที่ความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm. พบว่า ปริมาณ TPH ในน้ำเสียสังเคราะห์หลังจากผ่านระบบบำบัด อยู่ในช่วง 0.94 – 11.75 มิลลิกรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 7.7 และประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันของระบบบำบัด อยู่ในช่วง 90-98 % ดังแสดงในรูปที่ 7.8 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นได้ว่า ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย และประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ยังเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการใช้งานเป็นเวลานาน โดยสังเกตจากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันของระบบบำบัดที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้น และความหนาของชั้นไบโอฟิล์มที่เกาะอยู่บนวัสดุตรึง นอกจากนี้ยังไม่พบปัญหาการอุดตันของระบบหลังจากดำเนินการบำบัด ซึ่งในการทดลองต่อไป ระบบบำบัดนี้จะถูกนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรม



รูปที่ 7.7 ปริมาณ TPH ในน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวีย ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm.



รูปที่ 7.8 ประสิทธิภาพของการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสไลด์เวย์ ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm.

7.4.6 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการ

ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรม บริษัท สยามเลมเมอร์ จำกัด ด้วยระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ปริมาตรในการบำบัด 3 ลิตร ซึ่งบรรจุด้วยเซลล์ตริง RN402 จำนวน 200 กรัม ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm. จากการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมดังกล่าวที่เก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 28 มิถุนายน 2554 ดังแสดงในตารางที่ 7.5

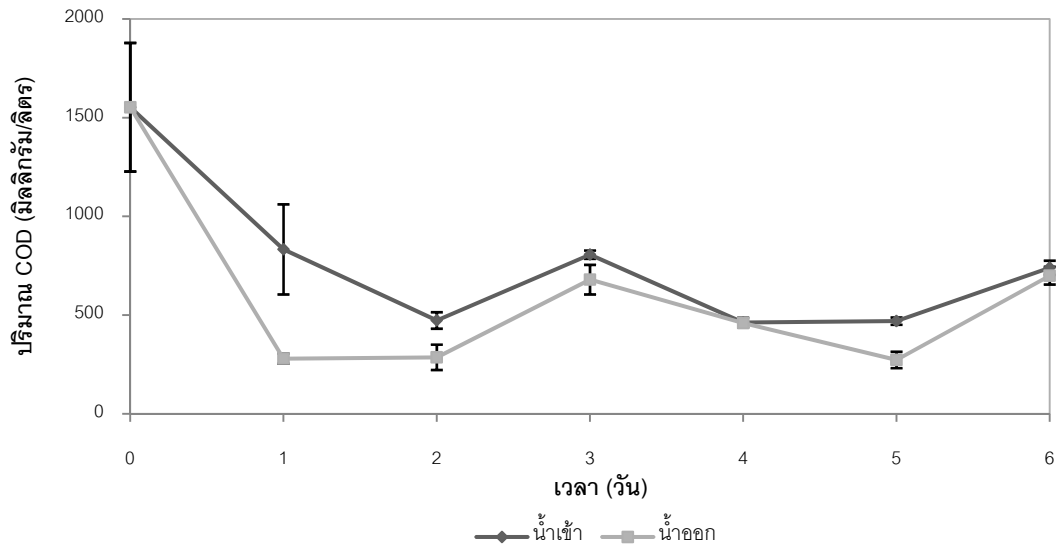
ตารางที่ 7.5 วิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมบริษัท สยามเลมเมอร์ซ จำกัด

พารามิเตอร์	หน่วย (มิลลิกรัม/ลิตร)
TPH	43.4-63.2
COD	463-1,553
FOG	17.9-28
ไนโตรเจนทั้งหมด	2.2
ฟอสฟอรัสทั้งหมด	0.4
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด	33

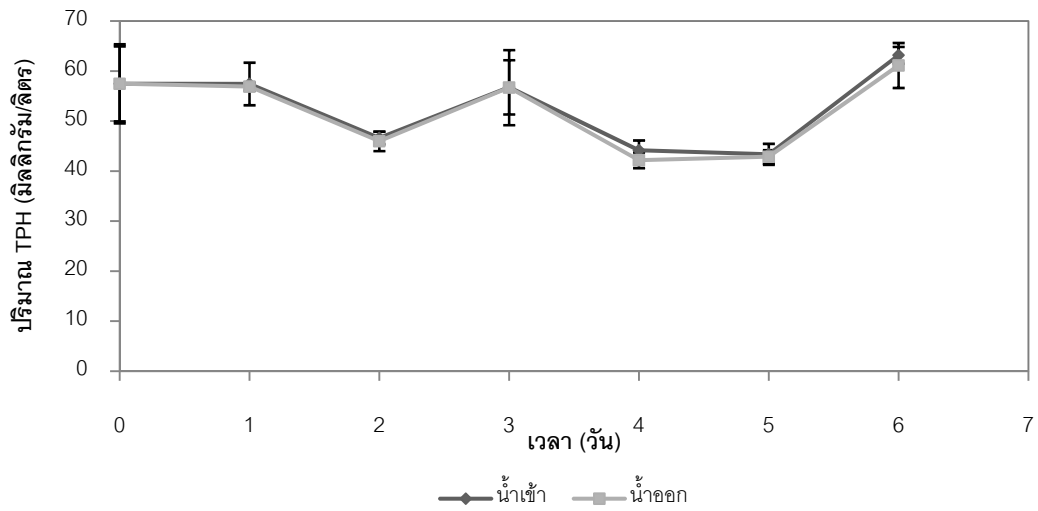
ที่มา: 2554

จากผลการวิเคราะห์ พบว่า ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและฟอสฟอรัสทั้งหมดในน้ำเสียมีปริมาณน้อย อาจก่อให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย จากผลการวิเคราะห์นี้ เพื่อก่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดของเซลล์ในการย่อยสลาย น้ำมัน การทดลองจึงแบ่งการทดลอง ออกเป็น 2 กลุ่มคือ น้ำเสียที่ไม่ผ่านการเติมสารอาหาร และน้ำเสียที่ผ่านการเติมสารอาหารที่ อัตราส่วนระหว่างน้ำเสียและอาหารเหลว CFMM เท่ากับ 1:1 จากผลการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำเสียของระบบบำบัดลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในกลุ่มของน้ำเสียที่ไม่เติมสารอาหาร เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย สิ่งเคราะห์ และยังไม่สามารถลด COD ได้ ในขณะที่ระบบบำบัดน้ำเสียที่เติมสารอาหารมี ประสิทธิภาพในการลด TPH สูงถึง 99 % และประสิทธิภาพของการลด COD อยู่ในช่วง 50-70 % ดังแสดงในรูปที่ 7.9 – 7.11 และ ตารางที่ 7.6 - 7.7 จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางเป็นเซลล์ตรึง RN402 ที่เตรียมจากแบคทีเรียสูตรน้ำมี ประสิทธิภาพสูงในการบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม บริษัท สยามเลมเมอร์ซ จำกัด ในสภาวะที่มีการเติมสารอาหาร ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm. โดยทำให้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ผ่านค่ามาตรฐานได้ นอกจากนี้ยังไม่พบ ปัญหาการอุดตันของระบบที่เกิดจากตะกอนของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและมีอายุการใช้งานที่ยาวนาน ซึ่งจากผลการทดลองเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อในการสร้างระบบบำบัดน้ำ เสียขนาดใหญ่ในอนาคตต่อไป

ก)

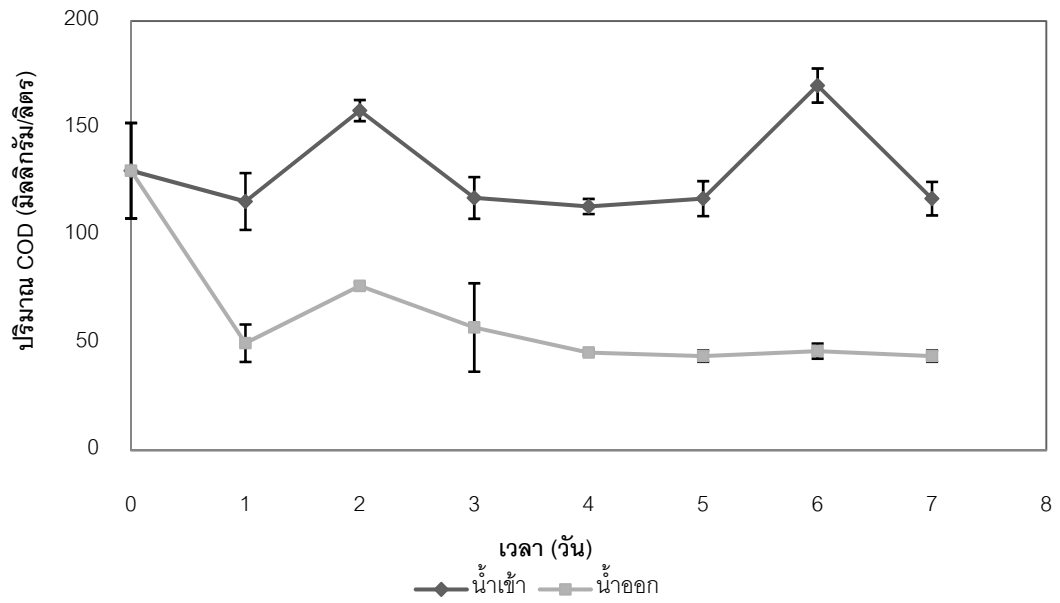


ข)

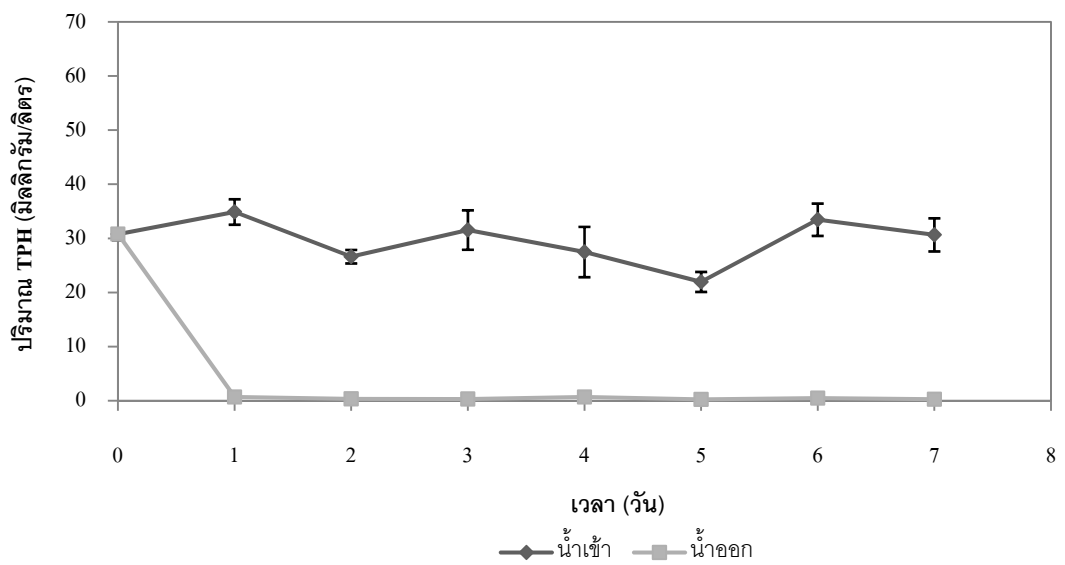


รูปที่ 7.9 ก) ปริมาณ COD ข) ปริมาณ TPH ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมไม่ผ่านการเติมสารอาหาร โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm.

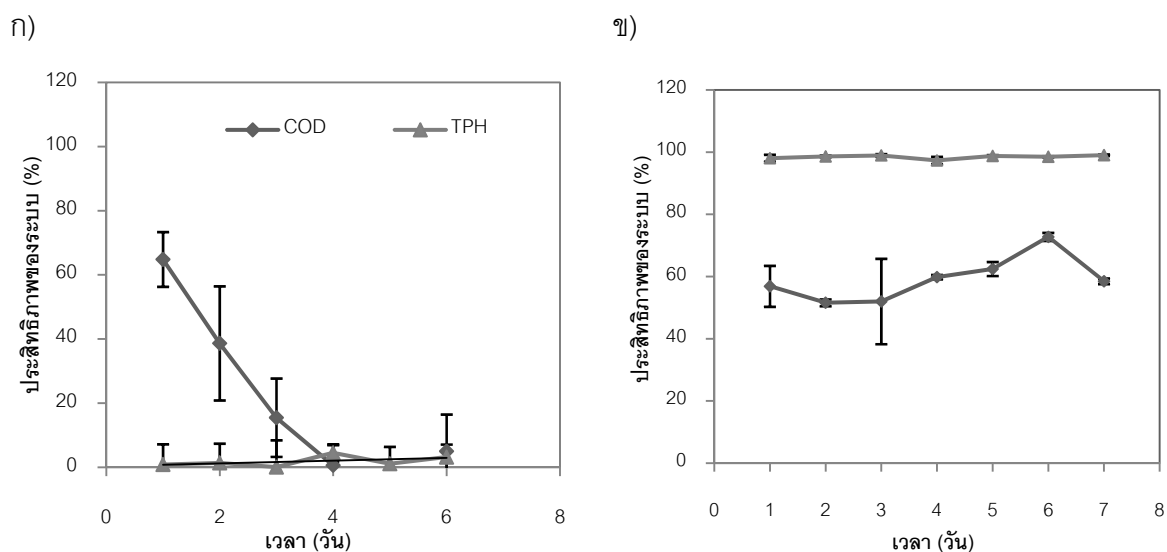
ก)



ข)



รูปที่ 7.10 ก) ปริมาณ COD ข) ปริมาณ TPH ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผ่านการเติมสารอาหาร โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง



รูปที่ 7.11 ประสิทธิภาพของการบำบัด COD และ TPH ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ก) น้ำเสียที่ไม่ผ่านการเติมสารอาหาร และ ข) น้ำเสียที่ผ่านการเติมสารอาหาร

ตารางที่ 7.6 ปริมาณ COD FOG และ TPH ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ไม่เติมสารอาหาร โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง

วันที่	ปริมาณ COD (มิลลิกรัม/ลิตร)		ปริมาณ FOG (มิลลิกรัม/ลิตร)		ปริมาณ TPH (มิลลิกรัม/ลิตร)	
	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก
0	1553.0 ± 325.78	1553.0 ± 325.78	28.0	28.0	57.5 ± 7.91	57.5 ± 7.91
1	833.3 ± 228.10	280.0 ± 25.58	-	-	57.4 ± 4.25	56.9 ± 0.81
2	473.3 ± 41.63	286.7 ± 64.29	-	-	46.6 ± 1.25	46.0 ± 1.95
3	806.7 ± 20.81	680.0 ± 75.01	-	-	56.8 ± 5.42	56.7 ± 7.51
4	463.0 ± 24.06	460.0 ± 5.77	-	-	44.2 ± 1.98	42.2 ± 1.55
5	-	-	17.6	16.0	43.4 ± 2.09	42.9 ± 1.34
6	740.0 ± 36.05	700.0 ± 45.00	22.0	20.8	63.2 ± 1.68	61.1 ± 4.52

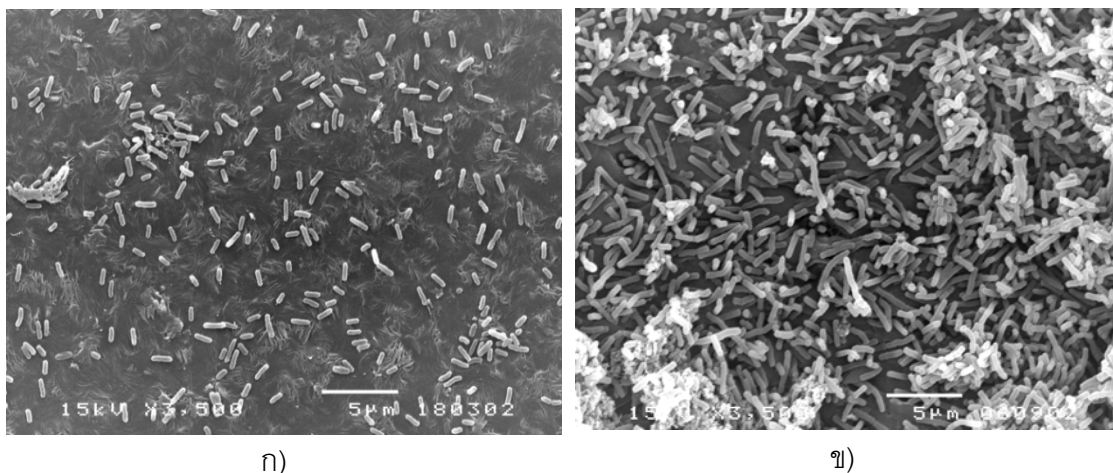
หมายเหตุ น้ำเสียถูกเติมวันละ 1 ครั้ง ลงในถังรวบรวมน้ำเสียก่อนเข้าระบบบำบัด

ตารางที่ 7.7 ปริมาณ COD FOG และ TPH ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ผ่านการเติมสารอาหาร โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง

วันที่	ปริมาณ COD (มิลลิกรัม/ลิตร)		ปริมาณ FOG (มิลลิกรัม/ลิตร)		ปริมาณ TPH (มิลลิกรัม/ลิตร)	
	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก
0	130.3 ± 22.23	130.3 ± 22.23	26.0	26.0	30.8 ± 1.05	30.8 ± 1.05
1	116.0 ± 13.22	50.0 ± 8.72	11.4	0.8	34.9 ± 2.35	0.7 ± 0.44
2	158.3 ± 4.93	76.7 ± 1.53	12.9	2.8	26.6 ± 1.25	0.4 ± 0.60
3	117.7 ± 9.71	57.3 ± 20.60	12.9	4.3	31.6 ± 3.65	0.3 ± 0.15
4	113.7 ± 3.51	45.7 ± 1.15	16.8	3.9	27.5 ± 4.64	0.7 ± 0.20
5	117.3 ± 8.14	44.0 ± 2.65	-	-	22.0 ± 1.85	0.3 ± 0.06
6	170.0 ± 7.93	46.3 ± 3.51	-	-	33.5 ± 2.98	0.5 ± 0.15
7	117.3 ± 7.81	44.0 ± 2.64	13.9	3.6	30.7 ± 3.05	0.3 ± 0.25

หมายเหตุ น้ำเสียถูกเติมวันละ 1 ครั้ง ลงในถังรวบรวมน้ำเสียก่อนเข้าระบบบำบัด

นอกจากนี้จากภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์ RN402 บนพื้นผิวของวัสดุตรึงในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นว่า มีการเกาะตัวกันของเซลล์ RN402 และจุลินทรีย์อื่นๆ บนพื้นผิวของวัสดุตรึงเป็นลักษณะของไบโอฟิล์มหนาขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงที่ยังไม่ผ่านการใช้งานดังแสดงในรูปที่ 7.12



รูปที่ 7.12 ภาพถ่ายการยึดเกาะของเชลล์ RN402 บนพื้นผิววัสดุจริงโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ก) จากเชลล์ที่ตรงที่ไม่ผ่านการใช้ ข) จากเชลล์ที่ตรงที่ผ่านการใช้งานในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง

7.4.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมด้วยวิธีพื้นผิวดอปสนอง

จากผลการทดลองในข้อ 7.4.5 แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพน้ำเสียก่อนเข้าระบบบำบัด โดยการเติมสารอาหารทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของระบบบำบัด แต่เนื่องจากการเติมสารอาหารในการทดลองนี้ทำโดยการเติมอาหารเหลว CFMM ซึ่งมีส่วนประกอบของสารเคมีหลายชนิดทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมและทำให้ต้นทุนในการบำบัดสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมของเชลล์ที่ตรง RN402 มีประสิทธิภาพลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์ ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพเชลล์ที่ตรงในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมจึงนำไปสู่ทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และ ความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์ในการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมด้วยวิธีพื้นผิวดอปสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนกลางและทดลองในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 MPN/ขวดทดลอง ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7.8 ดังนี้

ตารางที่ 7.8 ประสิทธิภาพของเซลล์ตริง RN402 ในการกำจัดน้ำมันของชุดทดลองโดยการ
ออกแบบการทดลองแบบส่วนกลาง

ชุดทดลองที่	ไนโตรเจน (กรัม/ลิตร)	ฟอสฟอรัส (กรัม/ลิตร)	น้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)	การกำจัดน้ำมันที่	
				ได้จากการทดลอง (มิลลิกรัม/ลิตร)	จากการทำนาย (มิลลิกรัม/ลิตร)
1	2.5	2	2000	1679 ± 151	1445.27
2	7.5	2	2000	1655 ± 197	1738.80
3	2.5	6	2000	1719 ± 64	2151.69
4	7.5	6	2000	1688 ± 39	750.31
5	2.5	2	8000	154 ± 3014	1539.79
6	7.5	2	8000	4853 ± 1217	4867.72
7	2.5	6	8000	2891 ± 560	3254.82
8	7.5	6	8000	4206 ± 315	4887.84
9	0.795	4	5000	3581 ± 262	2637.92
10	9.205	4	5000	3949 ± 160	4258.15
11	5	0.636	5000	2463 ± 336	1935.76
12	5	7.364	5000	2653 ± 426	2546.79
13	5	4	46	28 ± 7	649.88
14	5	4	10046	5341 ± 2587	4108.42
15	5	4	5000	4152 ± 459	4215.57
16	5	4	5000	4194 ± 137	4215.57

และนำข้อมูลจากตารางที่ 7.8 นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความถดถอยเชิงซ้อนหรือพหุคูณ (multiple regression analysis) โดยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 8 (บริษัท StatSoft, สหรัฐอเมริกา) เพื่อหาสัมพันธของตัวแปรต่างๆ ได้แก่ x_1 (ปริมาณไนโตรเจน) x_2 (ปริมาณฟอสฟอรัส) และ x_3 (ความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์) ที่มีผลต่อค่าการตอบสนองของปัจจัย คือ ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร) โดยพิจารณาที่ค่า p -value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.10 ดังแสดงในตารางที่ 7.9

ตารางที่ 7.9 ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของการกำจัดน้ำมัน

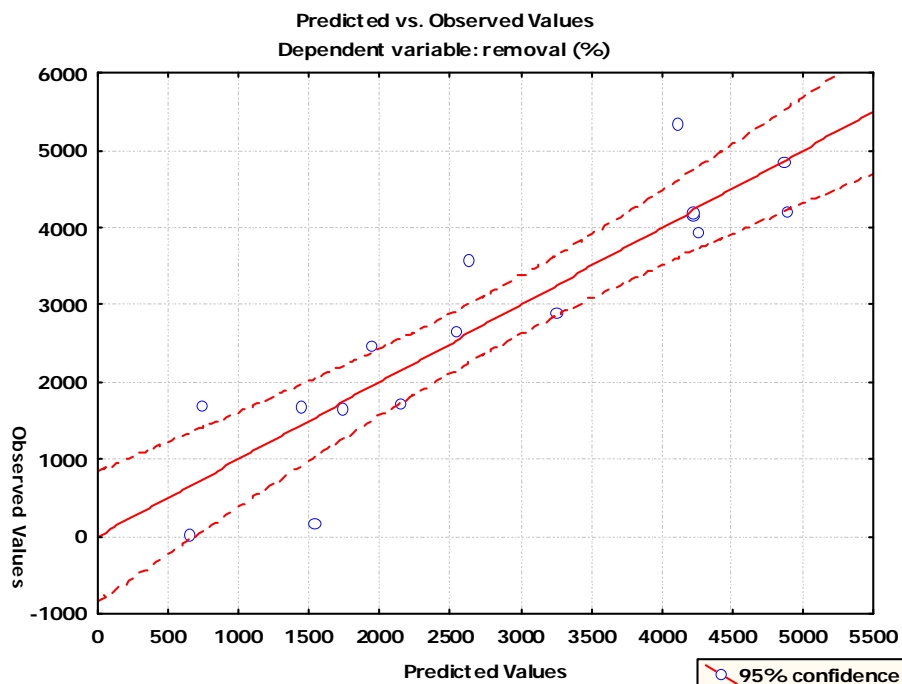
ตัวแปร	ค่าสัมประสิทธิ์	ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	p-value
constant	-2929.11	3406.203	0.422848
x_1	459.98	693.444	0.531768
x_2	1700.11	866.805	0.097512 ^a
x_3	0.42	0.541	0.467505
x_1x_2	-84.75	75.435	0.304192
x_1x_3	0.10	0.050	0.090996 ^a
x_2x_3	0.04	0.063	0.528665
x_1^2	-43.41	55.969	0.467467
x_2^2	-174.46	87.452	0.093077 ^a
x_3^2	0.00	0.000	0.109624

หมายเหตุ a หมายถึง มีนัยสำคัญ (significant) ที่ระดับนัยสำคัญน้อยกว่า 0.05

จากค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยในตารางที่ 7.6 พบว่าตัวแปรที่มีผลต่อการกำจัดน้ำมัน ได้แก่ ฟอสฟอรัส พจนัระหว่างไนโตรเจนและความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์ และกำลังสองของฟอสฟอรัส ซึ่งแสดงในรูปสมการการถดถอยที่เหมาะสมเป็นสมการประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมัน มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.8209 ดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)} = -2929.11 + 459.98x_1 + 1700.11x_2 + 0.42x_3 - 84.75x_1x_2 + 0.01x_1x_3 + 0.04x_2x_3 - 43.41x_1^2 - 174.46x_2^2$$

จากความสัมพันธ์ในสมการถดถอยดังกล่าว สามารถนำมาใช้ทำนายการเปลี่ยนแปลงของประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมัน ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์ในการกำจัดน้ำมันโดยเซลล์ตรึง RN402 โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทำนายพบว่าค่าที่ได้จากการทำนายสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลองดังแสดงในรูปที่ 7.13



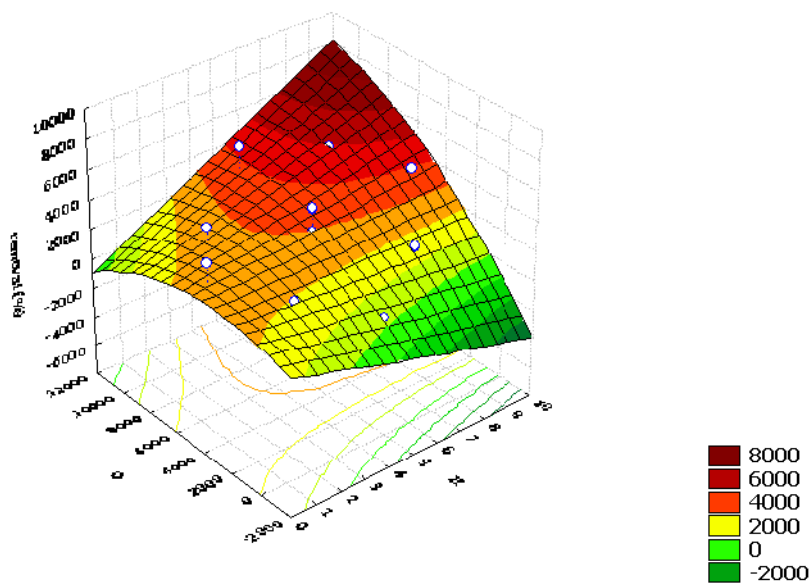
รูปที่ 7.13 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันที่ได้จากการทดลองและทำนาย

และจากสมการถดถอยดังกล่าว สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการกำจัดน้ำมันกับตัวแปรต่างๆ ในรูปแบบของการวิเคราะห์หาพื้นผิวการตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และรูปแบบเส้นโครงร่าง (ภาพ 2 มิติ) สำหรับหาสถานะเหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 โดยกราฟจะแสดงอิทธิพลของแต่ละตัวแปรต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 ดังแสดงในรูปที่ 7.14 - 7.16

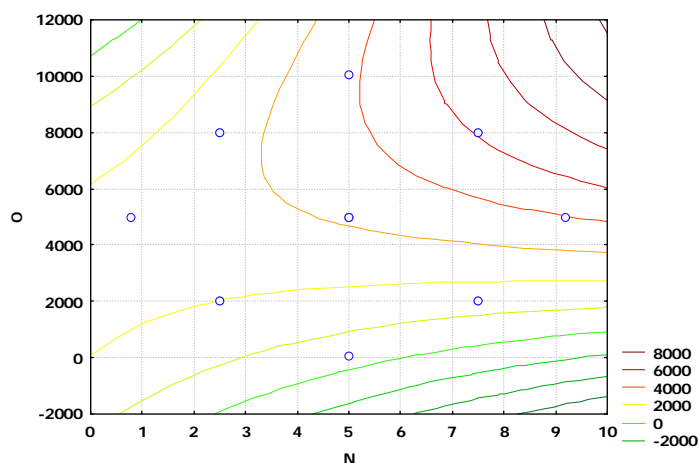
จากค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยในตารางที่ 7.8 พบว่าฟอสฟอรัสและน้ำมันมีผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 อย่างมีนัยสำคัญ จึงนำกราฟพื้นผิวตอบสนองระหว่างปริมาณฟอสฟอรัสและความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์มาพิจารณาเป็นอันดับแรก จากรูปที่ 7.14 พบว่า ปริมาณไนโตรเจนและความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์เท่ากับ 0.231 กรัม/ลิตร และ 3413 มิลลิกรัม/ลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 จากรูปที่ 7.15 พบว่า ปริมาณไนโตรเจนและปริมาณฟอสฟอรัสเท่ากับ 0.33 และ 6.27 กรัม/ลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 และจากรูปที่ 7.16 พบว่า ปริมาณปริมาณฟอสฟอรัสและความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์เท่ากับ 4.762 กรัม/ลิตร และ 8133 มิลลิกรัม/ลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 จากนั้นค่าสถานะต่างๆของทั้ง 3 ตัวแปร โดยมีสถานะดังนี้ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และความเข้มข้นน้ำมันสไลด์

เวทย์เริ่มต้น เท่ากับ 0.33 กรัม/ลิตร 6.27 กรัม/ลิตร และ 3414 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อแทนค่าลงในสมการถดถอยพบว่าสามารถคำนวณประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตริง RN402 ได้เท่ากับ 2426.88 มิลลิกรัม/ลิตร

ก)

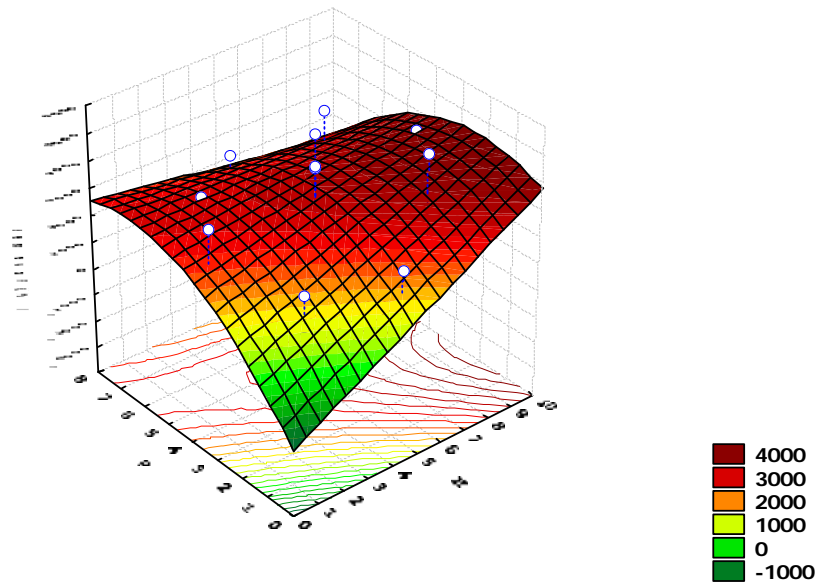


ข)

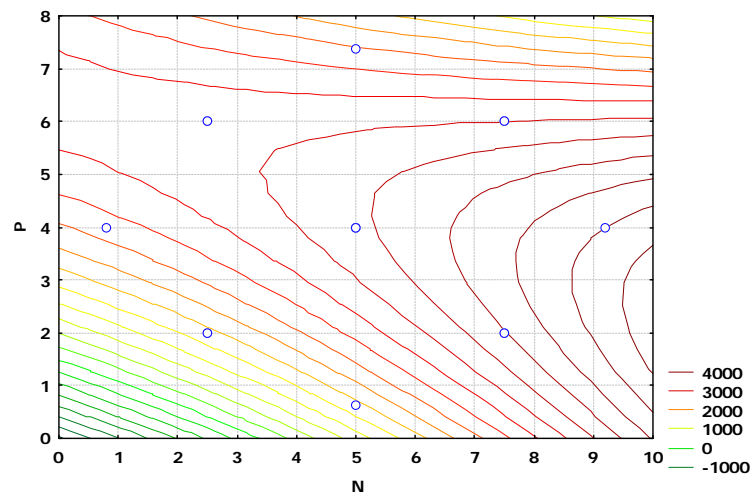


รูปที่ 7.14 กราฟพื้นผิวการตอบสนอง ก) และรูปแบบเส้นโครงร่าง ข) แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนและความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวทย์ต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตริง RN402

ก)

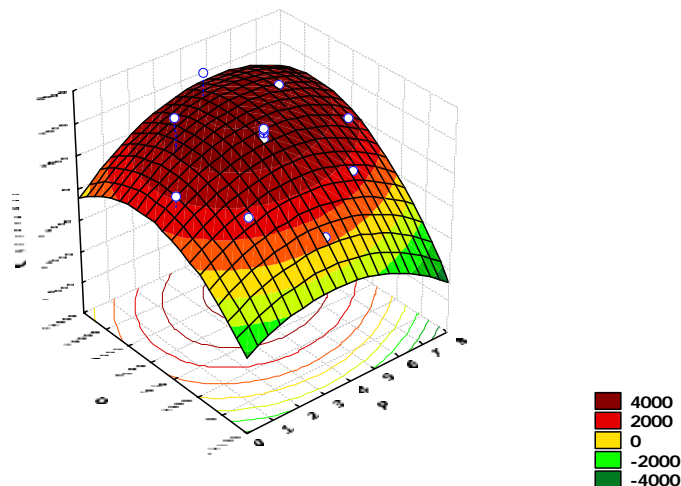


ข)

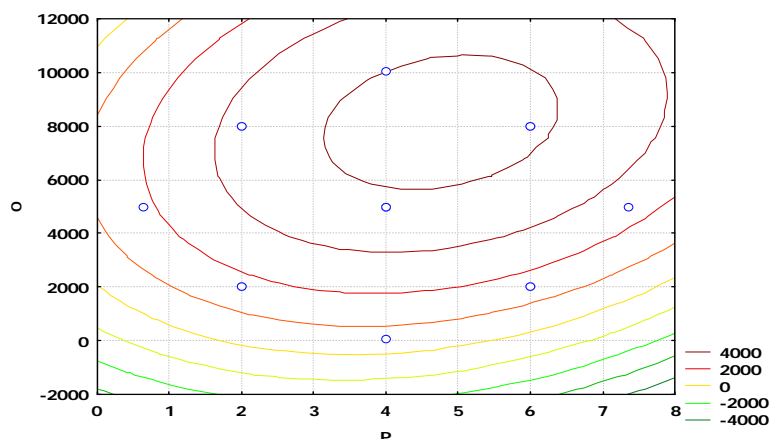


รูปที่ 7.15 กราฟพื้นผิวการตอบสนอง ก) และรูปแบบเส้นโครงร่าง ข) แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนและปริมาณฟอสฟอรัสต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402

ก)



ข)



รูปที่ 7.16 กราฟพื้นผิวการตอบสนอง ก) และรูปแบบเส้นโครงร่าง ข) แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟอสฟอรัสและความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์ต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตริง RN402

จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองและจากสมการประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมัน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมของเซลล์ตริง RN402 มีดังนี้ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์เริ่มต้น เท่ากับ 0.33 กรัม/ลิตร 6.27 กรัม/ลิตร และ 3414 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่

pH 7 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 MPN/ชุดทดลอง ซึ่งผ่านการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 ได้ เท่ากับ 2426.88 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมนี้ไปทดสอบการกำจัดน้ำมันพบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันได้ถึง 3019.42 ± 310 มิลลิกรัม/ลิตร และมีประสิทธิภาพในการกำจัดสูง 2.65 ± 0.279 เท่า โดยเปรียบเทียบกับ การทดสอบในน้ำเสียที่ไม่ได้ปรับสภาพอาหาร

7.5 อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง RN402 ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ปริมาตร 3 ลิตร ในการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เริ่มจากการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดกับน้ำเสียสังเคราะห์เพื่อศึกษาหาสภาวะเบื้องต้นในการดำเนินระบบบำบัด อย่างมีประสิทธิภาพ ระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการกำจัดมลพิษต่างๆ ของระบบบำบัด และระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียเป็นช่วงเวลาในการสัมผัสระหว่างน้ำเสีย อากาศ และจุลินทรีย์ในระบบบำบัด เมื่อระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียเพิ่มขึ้นทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียเพิ่มสูงขึ้น และระยะเวลาการกักเก็บที่เหมาะสมควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในการดำเนินการบำบัด (Ghosh และ Gopal, 2010; Rodríguez และคณะ, 2011; Shariati และคณะ, 2011) ในงานวิจัยนี้การศึกษาระยะเวลากักเก็บน้ำเสียที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสโกลด์เวย์ ความเข้มข้นของน้ำมัน 50 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า ระยะเวลาการกักเก็บ 10 และ 15 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันที่ใกล้เคียงกันซึ่งมี ประสิทธิภาพมากกว่า 90 % ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาการกักเก็บน้ำเสีย 10 ชั่วโมง สำหรับการประยุกต์ใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีระยะเวลาการกักเก็บน้ำเสียที่น้อยกว่า ทำให้อัตราการบำบัดน้ำเสียของระบบสูงและสามารถบำบัดน้ำเสียได้มากขึ้นกว่าการใช้ระยะเวลาการกักเก็บ 15 ชั่วโมง ในขณะที่ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันลดลงเมื่อลดระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียเป็น 5 ชั่วโมง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim และคณะ (2008) พบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดไฮยาไนท์ของระบบบำบัดน้ำเสียลดลงจาก 74 % เป็น 10% ที่ความเข้มข้นไฮยาไนท์เริ่มต้น 6 % เมื่อลดระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียจาก 27.8 ชั่วโมง เป็น 11.5 ชั่วโมง

จากการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสโกลด์เวย์โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ปริมาตรในการบำบัดน้ำเสีย 3 ลิตร ซึ่งบรรจุด้วยเซลล์ตรึง RN402 จำนวน 200 กรัม เพื่อบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันสโกลด์เวย์ ที่ความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm. พบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันของระบบบำบัด อยู่

ในช่วง 90-98 % ดังแสดงในรูปที่ 7.7 - 7.8 และสามารถบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ความเข้มข้นของ TPH อยู่ในช่วง 22 - 35 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีประสิทธิภาพบำบัดได้มากกว่า 99 % ในสภาวะน้ำเสียก่อนเข้าระบบบำบัดผ่านการเติมสารอาหาร ที่อัตราส่วนระหว่างน้ำเสียและอาหารเหลว CFMM เท่ากับ 1:1 ในขณะที่การไม่เติมสารอาหารน้ำเสียก่อนเข้าระบบบำบัดทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดลดลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากการเติมสารอาหารเป็นปรับค่า N: P ให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย TPH (Chavan และ Mukherji, 2008) จากงานวิจัยของ Huang และคณะ (2008) ในการหาสภาวะของสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดย *Rhodococcus erythropolis* พบว่า เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) ไตรโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na₂HPO₄) และ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) จำนวน 2.53, 2.75 และ 0.1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ลงในน้ำทะเลสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล พบว่า ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย TPH เพิ่มขึ้นจาก 12.61% เป็น 75% นอกจากนี้ยังพบว่าระบบบำบัดในงานวิจัยนี้สามารถใช้งานอย่างต่อเนื่องได้อย่างน้อย 90 วัน โดยยังไม่พบปัญหาการอุดตันของระบบที่เกิดจากตะกอนของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และมีอายุการใช้งานที่ยาวนาน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นได้ว่า ระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย และประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ยังเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการใช้งานเป็นเวลานาน โดยสังเกตจากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันของระบบบำบัดที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้น และความหนาของชั้นไบโอฟิล์มที่เกาะอยู่บนวัสดุตรึง นอกจากนี้ยังไม่พบปัญหาการอุดตันของระบบหลังจากดำเนินการบำบัด

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันของระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางของงานวิจัยนี้กับระบบบำบัดน้ำเสียที่มีตัวกลางชีวภาพแบบอื่นๆ พบว่า ระบบบำบัดน้ำเสียที่มีเซลล์ RN402 เป็นตัวกลางมีประสิทธิภาพการบำบัดได้ใกล้เคียงกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบอื่น ได้แก่ งานวิจัยของ Zhao และคณะ (2006) พบว่า ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดน้ำเสียที่มีตัวกลางชีวภาพเคลื่อนที่ ซึ่งสร้างจากท่ออะคริลิกเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 100 มิลลิเมตร ความสูง 200 มิลลิเมตร ปริมาตรในการบำบัด 1.57 ลิตร โดยต่อเข้ากับปั้มน้ำและปั้ลมเพื่อป้อนน้ำเข้าและอากาศทางด้านล่างระบบบำบัด ซึ่งทิศทางการไหลของน้ำจากด้านล่างสู่ด้านบน ที่ระยะเวลาพักเก็บ 4 ชั่วโมง โดยใช้จุลินทรีย์กลุ่ม B350M ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม พบว่า ระบบมีประสิทธิภาพระบบในการกำจัดน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำเสียจากการขุดเจาะน้ำมันได้ถึง 94% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมัน 20 มิลลิกรัม/ลิตร

Ji และคณะ (2009) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดทางชีวภาพที่มีตัวกลางแบบป้อนน้ำเสียจากด้านล่างถึงบำบัด ซึ่งสร้างจากท่ออะคริลิกเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 70 มิลลิเมตร

ความสูง 750 มิลลิเมตร ปริมาตรในการบำบัด 2.1 ลิตร ซึ่งทิศทางการไหลของน้ำและอากาศจากด้านล่างสู่ด้านบน ที่ระยะเวลาพักเก็บ 1.5 ชั่วโมง โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์จากตะกอนสลัดจ์ของระบบบำบัดน้ำเสียจากหลุมฝังกลบขยะที่ตึ๊งบนโพลียูรีเทนโฟม พบว่า ระบบสามารถกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ถึง 90-93% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 48.7 มิลลิกรัม/ลิตร

Khondee และคณะ (2012) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบอากาศยกที่มีตัวกรองชีวภาพ ซึ่งสร้างจากแก้วทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 150 มิลลิเมตร ความสูง 500 มิลลิเมตร ปริมาตรในการบำบัด 2.5 ลิตร โดยต่อเข้ากับปั้มน้ำและปั้มลมเพื่อป้อนน้ำเข้าและอากาศทางด้านล่างระบบบำบัด ซึ่งทิศทางการไหลของน้ำจากด้านล่างสู่ด้านบน ที่ระยะเวลาพักเก็บ 2 ชั่วโมง โดยใช้ *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 ตึ๊งบนโคโคโตรซาน พบว่า ระบบมีประสิทธิภาพระบบในการกำจัดน้ำมันหล่อลื่นในน้ำเสียจากการล้างรถในสถานีบริการน้ำมันได้ถึง 96% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันหล่อลื่น 50 มิลลิกรัม/ลิตร

นอกจากนี้ได้สรุปเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของระบบบำบัดน้ำเสียที่มีตัวกลางชีวภาพแบบอื่นๆ แสดงในตารางที่ 7.10

ตารางที่ 7.10 ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของระบบบำบัดน้ำเสียที่มีตัวกลางชีวภาพแบบอื่นๆ

ระบบบำบัด	ขนาด	ชนิดของตัวกลาง/หัวเชื้อจุลินทรีย์	ชนิดของน้ำเสีย	ระยะเวลา กักเก็บ	ประสิทธิภาพในการบำบัด	เอกสารอ้างอิง
ระบบบำบัดที่มีตัวกลางชีวภาพ (fixed film biological aerated filter reactor)	ท่อแก้ว/เส้นผ่านศูนย์กลาง: ความสูง 1500:200 มิลลิเมตร/ ปริมาตรในการบำบัด 4.4 ลิตร	ตัวกลางเซรามิค/หัวเชื้อจากน้ำเสีย	น้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันจากโรงงานกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมที่ผ่านการบำบัดทางกายภาพ	1 ชั่วโมง	94%จากความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมัน 10 มิลลิกรัม/ลิตร	Xie และคณะ (2007)
submerged membrane bioreactor (SMBR)	ท่ออะคริลิก/ ปริมาตรในการบำบัด 4.4 ลิตร	Hollow fibre membranes / หัวเชื้อจากตะกอนสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม	น้ำเสียปนเปื้อนฟินอลจากโรงงานกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมที่ผ่านการบำบัดทางกายภาพ	10 ชั่วโมง	99% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของฟินอล 15 มิลลิกรัม/ลิตร	Viero และคณะ (2008)
ระบบบำบัดที่มีตัวกลางชีวภาพ (biological aerated filter reactor)	ถังบำบัดซีเมนต์/ปริมาตรในการบำบัด 2.1 ลูกบาศก์เมตร	วงแหวนพลาสติกที่บรรจุเส้นใยสังเคราะห์/หัวเชื้อกลุ่มที่คัดแยกมาจากดินปนเปื้อนน้ำมันดิบ	น้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากการขุดเจาะน้ำมันที่ผ่านการบำบัดทางกายภาพ	32 ชั่วโมง	68% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 23 มิลลิกรัม/ลิตร	Lu และคณะ (2009)
ระบบบำบัดที่มีตัวกลางชีวภาพแบบระบบที่มีการโปรยกรอง (trickling-fixed-film bioreactor)	ท่อแก้ว/เส้นผ่านศูนย์กลาง: ความสูง 550:120 มิลลิเมตร/ ปริมาตรการบำบัด 5.5 ลิตร	หินไนไลต์/หัวเชื้อกลุ่มที่คัดแยกมาจากน้ำใต้ดินบริเวณแหล่งขุดเจาะน้ำมัน	น้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนน้ำดีเซล	-	สามารถลดปริมาณน้ำดีเซลจาก 2000 มิลลิกรัม/ลิตร เหลือ 0.12 มิลลิกรัม/ลิตร	Bravo และคณะ (2009)

ระบบบำบัด	ขนาด	ชนิดของตัวกลาง/หัวเชื้อจุลินทรีย์	ชนิดของน้ำเสีย	ระยะเวลาที่กักเก็บ	ประสิทธิภาพในการบำบัด	เอกสารอ้างอิง
ระบบถังกวนผสมแบบต่อเนื่อง (continuous stirred tank reactor (CSTR))	ถังสแตนเลส/ปริมาตรในการบำบัด 9 ลิตร	หัวเชื้อจากตะกอนสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี	น้ำเสียปนเปื้อน PAHs จากโรงงานผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี	2 วัน	87% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของPAHs 65 นาโนกรัม/ลิตร	Sponza และคณะ (2009)
ระบบบำบัดที่มีตัวกลางชีวภาพแบบหมุนเวียน (recycled packed bed reactor)	ท่อแก้ว/เส้นผ่านศูนย์กลาง: ความสูง 12:10 มิลลิเมตร ปริมาตรในการบำบัด 46.5 มิลลิเมตร	หิโนภูไม้และทราย/ หัวเชื้อ <i>Pleurotus ostreatus</i>	น้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนฟลูออรีน	8 วัน	68% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของฟลูออรีน 30 มิลลิกรัม/ลิตร	Akdogan และ Pazarlioglu (2011)
ระบบบำบัดน้ำเสียที่มีตัวกรองชีวภาพเคลื่อนที่ (moving bed biofilm reactor)	ถังแก้ว/ ปริมาตรในการบำบัด 5 ลิตร	ตัวกลางเซรามิค/หัวเชื้อจากตะกอนสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม	น้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากการขุดเจาะน้ำมันที่ผ่านการบำบัดทางกายภาพ	10 ชั่วโมง	65% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของPAHs 1,022 ไมโครกรัม/ลิตร	Dong และคณะ (2011)
ระบบบำบัดน้ำเสียที่มีตัวกรอง	ท่ออะคริลิก/ ปริมาตรในการบำบัด 3 ลิตร	ตัวกลางพลาสติก/หัวเชื้อจาก RN402	น้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่น	10 ชั่วโมง	90% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันหล่อลื่น 200 มิลลิกรัม/ลิตร	งานวิจัยครั้งนี้

จากผลการปรับสภาพของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมก่อนเข้าระบบบำบัดโดยการเติมสารอาหาร ทำให้ระบบบำบัดสามารถดำเนินงานอย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากการเติมสารอาหารในทดลองนี้ใช้อาหารเหลว CFMM ซึ่งมีส่วนประกอบของสารเคมีหลายชนิดทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมและทำให้ต้นทุนในการบำบัดสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมของเซลล์ตรึง RN402 มีประสิทธิภาพลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองจึงนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากวิธีพื้นผิวตอบสนองสามารถลดระยะเวลาการทดลองและสามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ ได้อย่างถูกต้อง (Montgomery, 2008; Irani, 2011)

จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ RN402 เป็นสมการประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมัน ซึ่งเป็นสมการการถดถอยที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากค่า p -value < 0.5 และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ 0.8209 ซึ่งมากกว่า 0.7 จึงแสดงให้เห็นว่าสมการที่ได้มีความแม่นยำสูง (Hu, 1999) สมการนี้จึงเหมาะสมสำหรับประยุกต์ใช้ทำนายการเปลี่ยนแปลงของประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมัน

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของตัวแปรที่ศึกษาคือ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์ กับค่าการตอบสนองคือประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสมีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 อย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Su และคณะ (2011) ศึกษาการประยุกต์ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันเครื่อง พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสเป็นตัวแปรที่มีบทบาทมากที่สุดต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายของน้ำมันเครื่อง โดย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU-1 และงานวิจัยของ Zahed และคณะ (2010) ศึกษาการประยุกต์ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล พบว่า ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และเวลาในการย่อยสลาย เป็นตัวแปรที่มีบทบาทมากที่สุดต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายของน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ดั้งเดิมในน้ำทะเล

นอกจากนี้การประยุกต์ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองและการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 เพิ่มขึ้นเป็น 1.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการกำจัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ไม่ผ่านการปรับสภาวะ และสอดคล้องกับงานวิจัยจำนวนมากที่มีการประยุกต์ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารปิโตรเลียม

ไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดโดยชีววิธีที่มีศักยภาพยิ่งขึ้น ได้แก่ Castorena-Cortés และคณะ (2009) ประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสลัดจ์น้ำมันจากโรงงานกลั่นน้ำมันพบว่า ความชื้น สารลดแรงตึงผิว และอัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน เป็นตัวแปรสำคัญต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ดั้งเดิม โดยมีสภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ความชื้น 70% ปริมาณสารลดแรงตึงผิว 0.5% และอัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน 15 ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเพิ่มขึ้น 20 %

Mohajeri และคณะ (2010) ประยุกต์ใช้วิธีการฟื้นฟูดอกบสนองและการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในดินพบว่า ที่ความเข้มข้นน้ำมันดิบ 2 กรัม/กิโลกรัม ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.8×10^6 เซลล์/ไนโตรเจน 0.680 กรัม/กิโลกรัม ฟอสฟอรัส 0.14 กรัม/กิโลกรัม ทำให้ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบเพิ่มขึ้นจาก 12 เป็น 83%

Ghevariya และคณะ (2011) ประยุกต์ใช้วิธีการฟื้นฟูดอกบสนองและการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ โดยดัดแปลงสูตรอาหารเหลว Bushnell-Haas เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไครซินโดย *Achromobacter xylosoxidans* พบว่า เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) เป็นตัวแปรสำคัญต่อการย่อยสลายไครซิน โดยมีสภาวะที่เหมาะสมดังนี้ เฟอร์ริกคลอไรด์ 0.02 กรัม/ลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมไนเตรต 0.525 กรัม/ลิตร ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายไครซินของ *Achromobacter xylosoxidans* เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า

จากงานวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง RN402 ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเดิมอากาศที่มีตัวกลาง ปริมาตร 3 ลิตร ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm. สามารถบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นสไลด์เวย์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50 - 200 มก./ลิตร และสามารถบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดอยู่ในช่วง 22 - 34 มก./ลิตร โดยมีประสิทธิภาพบำบัดได้มากกว่า 90 % และจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติร่วมกับวิธีฟื้นฟูดอกบสนอง พบว่า จากการปรับสภาวะที่เหมาะสมทำให้เซลล์ตรึง RN402 สามารถประยุกต์ใช้ในน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันที่ความเข้มข้นสูงได้ส่งผลให้เพิ่มขอบเขตของความเข้มข้นน้ำมันที่เซลล์ตรึงสามารถกำจัดได้ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมของเซลล์ตรึง RN402 มีดังนี้ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์เริ่มต้น เท่ากับ 0.33 กรัม/ลิตร 6.27 กรัม/ลิตร และ 3414 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่

pH 7 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 MPN/ชุดทดลอง ซึ่งผ่านการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 ได้ เท่ากับ 2426.88 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมนี้ไปทดสอบการกำจัดน้ำมันพบว่า มี ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันได้ถึง 3019.42 ± 310 มิลลิกรัม/ลิตร และมีประสิทธิภาพในการ กำจัดสูง 2.65 ± 0.279 เท่า โดยเปรียบเทียบกับ การทดสอบในน้ำเสียที่ไม่ได้ปรับสภาวะอาหาร จาก ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมัน ทำให้เห็นศักยภาพของ เซลล์ตรึง RN402 ในการประยุกต์ในระบบบำบัดน้ำเสียขนาดใหญ่ต่อไป

บทที่ 8

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

8.1 ข้อสรุป

การกระบวนการผลิตและใช้ประโยชน์จากปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทำให้การปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมจัดเป็นปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่ต้องได้รับการแก้ไขอย่างถูกต้องและยั่งยืน วิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนคือ การบำบัดโดยชีววิธี (bioremediation) โดยการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ แต่เนื่องจากจุลินทรีย์พร้อมใช้ที่มีการจำหน่ายอยู่ในประเทศไทยเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศจึงมีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาวิธีการผลิตจุลินทรีย์พร้อมใช้สูตรน้ำที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน และคงประสิทธิภาพตลอดอายุการเก็บรักษา เพื่อลดต้นทุนและลดการนำเข้าหัวเชื้อจุลินทรีย์จากต่างประเทศ อีกทั้งวิธีการเตรียมจุลินทรีย์สูตรน้ำมีขั้นตอนการผลิตที่ไม่ซับซ้อน ทำได้ง่าย และต้นทุนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมจุลินทรีย์แบบผง ทำให้เห็นความเป็นไปได้ในการพัฒนาการผลิตในเชิงธุรกิจ นอกจากนี้ได้พัฒนาวิธีการใช้แบคทีเรียสูตรน้ำในการบำบัดดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในระบบนิเวศจำลอง และพัฒนาวิธีการใช้แบคทีเรียสูตรน้ำสำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนด้วยระบบบำบัดในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถสรุปผลการศึกษาดังนี้

8.1.1 ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของ *Pseudoxanthomonas* สายพันธุ์ RN402 เพื่อผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ

Pseudoxanthomonas สายพันธุ์ RN402 มียีน *nidA* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน อยู่บนบนเมกะพลาสมิด ซึ่งเป็นคุณลักษณะสำคัญของหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดสารพิษโดยชีววิธี เนื่องจากแบคทีเรีย RN402 สามารถถ่ายโอนยีนไปสู่แบคทีเรียดั้งเดิมที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถอยู่รอดและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายพิษในสิ่งแวดล้อมนั้นได้ และมีจำนวนชุดยีน *nidA* เท่ากับ 1 ชุดยีน ดังนั้นสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับใช้นับจำนวนของ RN402 โดยวิธีทางชีวโมเลกุล โดย 1 ชุดยีน เท่ากับจำนวนของ RN402 1 เซลล์ และนอกจากนี้ RN402 เจริญได้ในสภาวะที่มีค่าเค็มที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 และ 2 % และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นด่างที่ค่า pH 9 จากคุณลักษณะทั้งหมดทำให้เห็นศักยภาพในการนำ RN402 ไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิต

แบคทีเรียสเตรปโทมัยซีที่ใช้ในการบำบัดสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆต่อไป ซึ่งสามารถช่วยลดมลพิษที่เกิดขึ้นได้อย่างยั่งยืน

8.1.2 พัฒนาการผลิตสเตรปโทมัยซีของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และการประยุกต์ใช้บำบัดดินปนเปื้อนไฟรีน

งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาการแบคทีเรียสเตรปโทมัยซี RN402 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไฟรีนและมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน วิธีการเตรียมประกอบด้วยสารละลาย PB 0.05 โมลาร์ pH 6.5 ที่เติมกลีเซอรอล 1 % และแบคทีเรีย RN402 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^{12} CFU/มิลลิลิตร โดยแบคทีเรียสเตรปโทมัยซีดังกล่าวสามารถเก็บรักษาได้ที่ 30°C เป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือน และแบคทีเรียสเตรปโทมัยซี RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน สามารถใช้เป็นหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีนที่ความเข้มข้นเริ่ม 300 ppm โดยใช้เวลา 4 สัปดาห์ในการย่อยสลายไฟรีนได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้การประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจติดตามการมีอยู่ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีน ได้แก่ ตรวจติดตามการมีอยู่ของ RN402 ในระบบนิเวศจำลองดินโดยวิธี PCR-DGGE ตรวจติดตามยีน *nidA* ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไฟรีนในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี PCR และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ในระบบนิเวศจำลองดินด้วยวิธี real-time qPCR ซึ่งวิธีการเหล่านี้จัดเป็นวิธีที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้สิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลาย เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการควบคุมระบบบำบัดให้เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายของแบคทีเรีย ทำให้เกิดระบบบำบัดที่มีประสิทธิภาพสูง จากประสิทธิภาพของแบคทีเรียสเตรปโทมัยซี RN402 และจากประสิทธิภาพของแบคทีเรียสเตรปโทมัยซีและต้นทุนการผลิตที่ถูกกว่าแบคทีเรียสเตรปโทมัยซีที่มีจำหน่ายในท้องตลาดจึงชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยไปสู่การผลิตแบคทีเรียสเตรปโทมัยซีเชิงพาณิชย์ และประยุกต์ใช้แบคทีเรียสเตรปโทมัยซี RN402 เพื่อเป็นหัวเชื้อในการบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม

8.1.3 พัฒนาการใช้แบคทีเรียสเตรปโทมัยซี RN402 โดยการตรึงเซลล์สำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการใช้แบคทีเรียสเตรปโทมัยซีของ RN402 สำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยตรึงแบคทีเรียบนพลาสติก BCN-009 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียสเตรปโทมัยซี ลดปริมาณการใช้หัวเชื้อแบคทีเรีย และสามารถใช้งานในระบบบำบัดได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งพบว่าเซลล์ตรึง RN402 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่

ความเข้มข้นสูงขึ้นกว่าเซลล์อิสระ โดยเซลล์ตรึง RN402 มีอัตราการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงสุด 165 มิลลิกรัม/ลิตร/กรัมเซลล์ตรึง/วัน ที่ความเข้มข้นน้ำมันดีเซล 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร และสามารถคงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลได้ถึง 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร และจากการใช้ซ้ำพบว่าเซลล์ตรึง RN402 ยังคงมีประสิทธิภาพสูงตลอดการใช้ซ้ำในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 70 รอบ แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ซึ่งมีอายุการใช้งานในยาวนานมากกว่า 210 วัน นอกจากนี้การวิเคราะห์การยึดเกาะของเซลล์ RN402 บนวัสดุตรึง และการสร้างไบโอฟิล์มของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำ 70 รอบ โดยกล้อง SEM และ SPM ทำให้เห็นชั้นของไบโอฟิล์มซึ่งมีความหนาอย่างชัดเจนเมื่อเซลล์ตรึงมีอายุการใช้ซ้ำมากขึ้น ในขณะที่การตรวจติดตามด้วยกล้อง CLSM ร่วมกับสีย้อม FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรีย RN402 ที่มีชีวิตจำนวนมากอยู่บนไบโอฟิล์ม ซึ่งสอดคล้องกับการคงประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซลตลอดการทดลอง 70 ครั้ง การมีชีวิตของแบคทีเรียมีความสำคัญต่อความคงตัวของไบโอฟิล์มและการรักษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเซลล์บนไบโอฟิล์ม จากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง RN402 ความคงทนต่อน้ำมันดีเซลความเข้มข้น และการคงประสิทธิภาพของการกำจัดน้ำมันดีเซลตลอดอายุการใช้งานของเซลล์ตรึง RN402 แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวกรองชีวภาพในระบบบำบัดน้ำเสียแบบต่อเนื่องในการทดลองต่อไป

8.1.4 การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นโดยเซลล์ตรึงของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในระบบบำบัดแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง

จากงานวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง RN402 ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง ปริมาตร 3 ลิตร ระยะเวลาเก็บกักน้ำ 10 ชั่วโมง และการให้อากาศ 2 vvm. สามารถบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นสไลด์เวย์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 - 200 มก./ลิตร และสามารถบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดอยู่ในช่วง 22 - 34 มก./ลิตร โดยมีประสิทธิภาพบำบัดได้มากกว่า 90 % และระบบบำบัดที่พัฒนาขึ้นสามารถลดค่า FOG ของน้ำเสียที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลางระดับห้องปฏิบัติการให้ต่ำกว่าค่ามาตรฐานของนิคมอุตสาหกรรมกำหนดไว้ และจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมของเซลล์ตรึง RN402 มีดังนี้ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และความเข้มข้นน้ำมันสไลด์เวย์เริ่มต้น เท่ากับ 7.262 กรัม/ลิตร 0.565 กรัม/ลิตร และ 6536.119 มิลลิกรัม/ลิตร ในน้ำเสียจาก

โรงงานอุตสาหกรรมปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ pH 7 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 MPN/ขวดทดลอง ซึ่งผ่านการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 ได้เท่ากับ 3261.248 มิลลิกรัม/ลิตร นอกจากนี้การประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึง RN402 ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการกำจัดน้ำมันได้ถึง 2.6 เท่า จากประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันที่ไม่ผ่านการปรับสภาวะที่เหมาะสม จากผลงานวิจัยทั้งหมดแสดงให้เห็นศักยภาพของเซลล์ตรึง RN402 ในการประยุกต์ในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพในโรงงานอุตสาหกรรม โดยใช้เป็นระบบบำบัดที่ต่อเนื่องมาจากระบบบำบัดทางกายภาพและทางเคมีที่มีอยู่เดิมของโรงงานอุตสาหกรรม และทำให้เพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ระบบบำบัดของโรงงานอุตสาหกรรมให้สามารถกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียได้มากขึ้น ทำให้ลดปริมาณการปนเปื้อนของน้ำมันในน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียอันเนื่องมาจากระบบบำบัดที่ไม่มีประสิทธิภาพ และสามารถลดการปนเปื้อนน้ำมันในสิ่งแวดล้อมได้อย่างยั่งยืน

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้งานวิจัยนี้ถือเป็นรายงานทางวิชาการฉบับแรกที่น่าเสนอการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำสำหรับประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินและน้ำเสียที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และด้วยวิธีการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำที่ไม่ซับซ้อนและมีต้นทุนต่ำ ทำให้เห็นถึงศักยภาพในการต่อยอดเพื่อผลิตในเชิงพาณิชย์และสามารถ ถ่ายทอดความรู้ดังกล่าวแก่ประชาชนทั่วไปเพื่อนำประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดการมีส่วนร่วมของประชาชนในการดูแลและรักษาสิ่งแวดล้อมต่อไปในอนาคต

8.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 มีประสิทธิภาพในการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ เตตระเดเคน เฮกซะดีเคน พีแนนทริน ไพรีน น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันหล่อลื่นบางชนิด ซึ่งจากการทดลองพบว่า แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 มีข้อจำกัดของในด้านเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายที่ต้องใช้ระยะเวลาในการกำจัดสารพิษดังกล่าวให้หมดไป ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตร RN402 จึงอาจเพิ่มแบคทีเรียกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการสลายสารพิษลงไปพร้อมกับแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่มีอยู่เดิม โดยอาศัยวิธีการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ ทำให้ได้แบคทีเรียสูตรน้ำในรูปแบบของหัวเชื้อกลุ่มซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษได้

สูงขึ้น มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีความหลากหลายมากขึ้น ดังเช่นงานวิจัยของ Kim และคณะ (2009) ประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มของ *Acinetobacter baumannii Klebsiella oxytoca* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ซึ่งคัดแยกจากตะกอนสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสีย สามารถย่อยพีแนทรีนความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ลิตร ให้หมดไปภายใน 36 ชั่วโมง Zhong และคณะ (2011) ประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มระหว่าง *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ A1-PYR และ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ PheB4 สามารถย่อยสลายพีแนทรีนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ให้หมดไปภายใน 3 วัน Lawniczak และคณะ (2011) ประยุกต์ใช้หัวเชื้อเป็นกลุ่มแบคทีเรีย ได้แก่ *Achromobacter denitrificans Acinetobacter baumannii Aeromonas hydrophila/caviae Pseudomonas fluorescens Pseudomonas stutzeri Rahnella aquatilis* และ *Stenotrophomonas maltophilia* สามารถกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นน้ำมันเริ่มต้น 10% (v/w) ได้ถึง 80% ภายในเวลา 7 วัน Bao และคณะ (2012) ประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มของ *Ochrobactrum* sp. สายพันธุ์ N1 *Brevibacillus parabrevis* สายพันธุ์ N2 *B. parabrevis* สายพันธุ์ N3 และ *B. parabrevis* สายพันธุ์ N4 ซึ่งคัดแยกจากน้ำทะเลปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในน้ำเสียทะเลสังเคราะห์

การพัฒนาการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำไปสู่การผลิตในเชิงการค้าจำเป็นต้องคำนึงถึงต้นทุนในการผลิต เมื่อพิจารณาที่ต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 พบว่า ต้นทุนส่วนใหญ่ถูกใช้ในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อในส่วนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในการลดต้นทุนการผลิต ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นทุนต่ำและยังคงประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตรน้ำไว้ได้ โดยเลือกวัตถุดิบที่มีราคาถูกและมีจำหน่ายทั่วไปร่วมกับการใช้เครื่องมือทางสถิติในการออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ผลทดลองเพื่อพัฒนาสูตรอาหารที่มีคุณภาพและต้นทุนต่ำ ดังเช่นงานวิจัยของ Pereira และคณะ (2010) ประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken design เพื่อพัฒนาสูตรอาหารสูตรอาหารต้นทุนต่ำในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอล Tomas และคณะ (2010) ประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองด้วยการออกแบบส่วนประสมกลาง เพื่อพัฒนาสูตรอาหารต้นทุนต่ำและมีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตของชีวมวลและแบคทีริโอซินของ *Lactobacillus salivarius* สายพันธุ์ CRL 1328

จากการพัฒนาวิธีการใช้แบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 โดยการตรึงเซลล์สำหรับการบำบัดน้ำเสีย ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายน้ำมันชนิดอื่นๆ จะทำให้ทราบขอบเขตการประยุกต์ใช้งานที่หลากหลายมากขึ้น นอกจากนี้อาจศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย จากรายงานวิจัยของ Sarma และ Pakshirajan (2011) ประยุกต์ใช้ tween80 เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของเซลล์ตรึงของ *Mycobacterium frederiksbergense* บนแคลเซียมอัลจิเนต โดยสามารถย่อยสลายไขมันความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม ในอาหารเหลว Bushnell Hass ให้หมดไปภายในเวลา 10 วัน Thavasi และคณะ (2011) พบว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด glycolipopetide และ lipopeptide ลงในอาหารเหลว mineral salt medium มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Pseudomonas aeruginosa* และจากงานวิจัยของ Schreiberová และคณะ (2012) พบว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Novanik และ rhamnolipid ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง *Rhodococcus erythropolis*

จากการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง RN402 ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง อาจศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับตัวแปรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศที่มีตัวกลาง เช่น ปริมาณของเซลล์ตรึง ปริมาณการให้อากาศ ปริมาณสารอาหาร ค่า pH เป็นต้น ร่วมกับการใช้เครื่องมือทางสถิติในการออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ผลทดลอง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดบีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของระบบบำบัดน้ำเสีย ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปประยุกต์ในการปรับปรุงประสิทธิภาพและขยายขนาดของระบบบำบัดเพื่อใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- คมชัดลึก. 2554. เรื่อน้ำมัน 4 หมื่นลิตรอับปางกลางทะเลอันดามัน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.komchadluek.net/detail/20100904/72098/เรื่อน้ำมัน4หมื่นลิตรอับปางกลางทะเลอันดามัน.html> [19 มีนาคม 2554]
- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2553. การดำเนินการแก้ไขปัญหามลพิษในพื้นที่มาบตาพุด. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.pcd.go.th/Info_serv/pol_Maptapoot_water51.html [29 กันยายน 2553]
- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2554. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการการจัดทำกรอบการประเมินสิ่งแวดล้อมระดับยุทธศาสตร์ (strategic environmental framework) สำหรับการเป็นเมืองอุตสาหกรรมเชิงนิเวศ (eco industrial town) กรณีศึกษาพื้นที่มาบตาพุด จ.ระยอง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.ehwm.chula.ac.th/maptaphut/water-maptaphut.pdf> [19 มีนาคม 2554]
- จุมพล สงวนสิน สุธิดา กาญจนอติเรกลาภ ศุภวัตร กาญจนอติเรกลาภ และ สมพงษ์ บันติวิวัฒน์กุล, 2548. การศึกษาการสะสมของสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสัตว์พื้นทะเลบางชนิด. วารสารการประมง. 58: 263-271.
- ชลี ไพบูลย์กิจกุล, สุวรรณภา ภาณุตระกูล, ศุภวัตร กาญจนอติเรกลาภ และ สุชาติพิทย์ มาฟู. 2551. การเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนบริเวณปากแม่น้ำแฉมหนูจังหวัดจันทบุรีและปากแม่น้ำระยองของจังหวัดระยอง. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 46, หน้า 509-516. 29 มีนาคม-1 กุมภาพันธ์ 2551 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- เทศบาลนครระยอง. 2553. เรือบรรทุกน้ำมันเกือบล่มกลางทะเลระยอง [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.rayongcity.com/index.php?option=com_content&view=article&catid=1%3Alatest&id=151%3Agas-shipping-failed&Itemid=2 [24 ธันวาคม 2553]
- ปาริฉัตร เนตรสกุลณี. 2553. การย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยตรึงเซลล์ Pseudoxanthomonas sp. RN402. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ผู้จัดการ. 2554. เตรียมประชาพิจารณ์อ่างประดู่หลังพบมีสารปนเปื้อน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www2.manager.co.th/Around/ViewNews.aspx?NewsID=9550000016665&tabID=2&> [19 มีนาคม 2554]

- พลังงาน, กระทรวง. 2555. ข้อมูลพลังงาน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.eppo.go.th/info/2petroleum_stat.htm [19 มีนาคม 2554]
- พริยะ กลั่นแก้ว. 2550. แบคทีเรียชนิดใหม่ที่ย่อยสลายไพรีนที่คัดแยกจากดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. โรงงานอุตสาหกรรม, กรม. 2553. รายงานชนิดและปริมาณสารมลพิษที่ระบายออกจากโรงงานประจำปีพ.ศ. 2547 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://reg.diw.go.th/env/Result_waste.asp [24 พฤษภาคม 2553]
- ศุภวัตร กาญจน์อติเรกลาก, สุธิดา กาญจน์อติเรกลาก และ วิษณุพงศ์ วิเชียรรัตนกุล. 2554. การปนเปื้อนของสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนรวมทั้งหมดในน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลประเทศไทยปี 2553. ใน สัมมนาวิชาการกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งประจำปี 2554, 26-28 มิถุนายน 2554 ณ โรงแรมโนโวเทล จังหวัดชุมพร.
- เอ็นแอนด์พีเคมิคัลแอนด์วานซ์. 2553. การบำบัดน้ำมันคูแลนท์. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.npchem.com/kulantoil.htm> [17 ตุลาคม 2552]

ภาษาอังกฤษ

- Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N., and Viñas, I. 2003. Liquid Formulation of the Postharvest Biocontrol Agent *Candida sake* CPA-1 in Isotonic Solutions. Phytopathology. 93: 436-442.
- Abbasnezhad, H., Gray, M., and Foght, J. 2011. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. Applied Microbiology and Biotechnology. 92: 653-675.
- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., and Ram, S.J. 2004. Image Processing with ImageJ. Biophotonics International. 11: 36-42.
- Agarry, S.E., Solomon, B.O., and Layokun, S.K. 2008. Substrate inhibition kinetics of phenol degradation by binary mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescence* from steady state and wash-out data. African Journal of Biotechnology. 7: 3927-3933.
- Ahmadun, R.F., Pendashteh, A., Abdullah, C.L., Biak, A.R.D., Madaeni, S.S., and Abidin, Z. Z. 2009. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. Journal of Hazardous Material. 170: 530-551.

- Akdogan, H.A., and Pazarlioglu, N.K. 2011. Fluorene biodegradation by *P. osteratus* – part II: biodegradation by immobilized cells in a recycled packed bed reactor. Process Biochemistry. 46: 840-846.
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M., and Temprano, F.J. 2008. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. Soil Biology and Biochemistry. 40: 2771-2779.
- Aleer, S., Adetutu, E., Makadia, T., Patil, S., and Ball, A. 2011. Harnessing the hydrocarbon-degrading potential of contaminated soils for the bioremediation of waste engine oil. Water, Air, and Soil Pollution. 218: 121-130.
- Al-Mutairi, N., Bufarsan, A., and Al-Rukaibi, F. 2008. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. Chemosphere. 74: 142-148.
- Amann, R.L., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews. 59: 143-169.
- Amro, M. M. 2004. Treatment techniques of oil-contaminated soil and water aquifers. in International conference on water resources and arid environment. 5-8 December 2004 King Saud University Riyadh Saudi Arabia.
- ATSDR. 1999. Toxicological profile for total petroleum hydrocarbons (TPH). Agency for Toxic Substances and Disease Registry [online]. Available from <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp123.pdf> [2012, January 20]
- Bach, Q.D., Kim, S.J., Choi, S.C., and Oh, Y.S. 2005. Enhancing the intrinsic bioremediation of PAH-contaminated anoxic estuarine sediments with biostimulating agents. Journal of Microbiology. 43: 319-324.
- Balachandran, C., Duraipandiyar, V., Balakrishna, K., and Ignacimuthu, S. 2012. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. Bioresource Technology. 112: 83-90.

- Bao, M.T., Wang, L.N., Sun, P.Y., Cao, L.X., Zou, J., and Li, Y.M. 2012. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. Marine Pollution Bulletin.
- Barreto, R.V.G., Hissa, D.C., Paes, F.A., Grangeiro, T.B., Nascimento, R.F., Rebelo, L.M., Craveiro, A.A., and Melo, V.M.M. 2010. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. Bioresource Technology. 101: 2121-2125.
- Barton, L.L. 2005 Structural and functional relationships in prokaryotes. New York: Springer.
- Benthack, C., Srinivasan, B., and Bonvin, D. 2001. An optimal operating strategy for fixed-bed bioreactors used in wastewater treatment. Biotechnology and Bioengineering. 72: 34-40.
- Berner, D., and Viernstein, H. 2006. Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. Scientia Pharmaceutica. 74: 137 - 149.
- Boldrin, B., Tiehm, A., and Fritzsche, C. 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. Applied and Environmental Microbiology. 59: 1927-1930.
- Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A., Takada, H. 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediment in Thailand. Marine Pollution Bulletin. 52:942-256.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology. 74: 63-67.
- Boukir, A., Aries, E., Guiliano, M., Asia, L., Doumenq, P., and Mille, G. 2001. Subfractionation, characterization and photooxidation of crude oil resins. Chemosphere. 43: 279-286.
- Bravo, V., Spyra, W., and Antaño-López, R. 2009. Biodegradation of high concentrations of benzene and diesel in a fixed-film reactor. Water, Air, and Soil Pollution. 204: 351-361.

- Brickerstaff, G.F. 1997. Immobilization of enzymes and cells. New Jersey, Humana Press Inc.
- Buch, L., Groenzin, H., Buenrostro-Gonzalez, E., Andersen, S.I., Lira-Galeana, C., and Mullins, O.C. 2003. Molecular size of asphaltene fractions obtained from residuum hydrotreatment. Fuel. 82: 1075-1084.
- Cassidy, M.B., Lee, H., and Trevors, J.T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 16: 79-101.
- Castorena-Cortés, G., Roldán-Carrillo, T., Zapata-Peñasco, I., Reyes-Avila, J., Quej-Aké, L., Marín-Cruz, J., and Olguín-Lora, P. 2009. Microcosm assays and taguchi experimental design for treatment of oil sludge containing high concentration of hydrocarbons. Bioresource Technology. 100: 5671-5677.
- Cébron, A., Norini, M.P., Beguiristain, T., and Leyval, C. 2008. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from gram positive and gram negative bacteria in soil and sediment samples. Journal of Microbiological Methods. 73: 148-159.
- Chandran, P., and Das, N. 2011. Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels. Biodegradation. 22: 1181-1189.
- Chavan, A., and Mukherji, S. 2008. Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: Effect of N:P ratio. Journal of Hazardous Materials. 154: 63-72.
- Chen, Y., et al. 2010. Microcalorimetric investigation of the toxic action of pyrene on the growth of PAH-degrading bacteria *Acinetobacter junii*. Journal of Environmental Science and Health, Part A. 45: 668-673.
- Chrzanowski, L., Dziadas, M., Lawniczak, L., Cyplik, P., Biaias, W., Szulc, A., Lisiecki, P., and Jelen, H. 2012. Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. Bioresource Technology. 111: 328-335.

- Chu, K.H., Feng, X., and Yuan, G. 2011. Application of dual media biofilm reactors for removing organic matter and ammonia from pesticide wastewaters. Journal of Advanced Chemical Engineering. 1: 1-6.
- Churchill, P.F., Morgan, A.C., and Kitchens, E. 2008. Characterization of a pyrene-degrading *Mycobacterium* sp. strain CH-2. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. 43: 698 - 706.
- Churchill, S.A., Harper, J.P., and Churchill, P.F. 1999. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology. 65: 549-552.
- Cohen, Y. 2001. Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. Bioresource Technology. 77: 257-274.
- Cunliffe, M., Kawasaki, A., Fellows, E., and Kertesz, M.A. 2006. Effect of inoculum pretreatment on survival, activity and catabolic gene expression of *Sphingobium yanoikuyae* B1 in an aged polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. FEMS Microbiology Ecology. 58: 364-372.
- Cunningham, A.B., Sharp, R.R., Caccavo Jr, F., and Gerlach, R. 2007. Effects of starvation on bacterial transport through porous media. Advances in Water Resources. 30: 1583-1592.
- Deangrueng, P. 2004. Survival and PAHs degradative ability of *Sphingomonas* sp. strain P2 in PAHs contaminated soil after soil acclimatization, Master's Thesis, Inter-Department of Science in Environmental Management, Chulalongkorn University.
- DeBruyn, J.M., Mead, T.J., and Sayler, G.S. 2011. Horizontal transfer of PAH catabolism genes in *Mycobacterium*: evidence from comparative genomics and isolated pyrene-degrading bacteria. Environmental Science and Technology. 46: 99-106.
- Djefal-Kerrar, A., Abdoun, K.O., Chouikrat, R., El-Kahina, R.G., Khodja, A.J., and Mahlous, M. 2011. Study of bacterium fixation stability on gamma radiation synthesized carriers to improve degradation. Journal of Bioremediation and Biodegradation. 2: 117.

- Dong, Z., Lu, M., Huang, W., and Xu, X. 2011. Treatment of oilfield wastewater in moving bed biofilm reactors using a novel suspended ceramic biocarrier. Journal of Hazardous Materials. 196: 123-130.
- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A.M., and Clipson, N. 2008. Microbial PAH degradation, In: S.S. Allen I. Laskin, M.G. Geoffrey (eds.), Advances in applied microbiology. New York: Academic Press
- Envirologic. 2011. Microbial hydrocarbon remediation formula [online]. Available from <http://www.spillaway.com/products/lremediact.html> [2011, March 17]
- EPA. 1996. A citizen's guide to bioremediation [online]. Available from: <http://www.clu-in.org/download/remed/biorem.pdf> [2009, June 12]
- Fakhrul-Razi, A., Pendashteh, A., Abdullah, L.C., Biak, D.R.A., Madaeni, S.S., and Abidin, Z.Z. 2009. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. Journal of Hazardous Materials. 170: 530-551.
- Fritsche, W., and Hofrichter, M. 2008. Aerobic degradation by microorganisms, Biotechnology. Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim.
- Gan, S., Lau, E.V., and Ng, H.K. 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Journal of Hazardous Materials. 172: 532-549.
- Gentili, A.R., Cubitto, M.A., Ferrero, M., and Rodríguez, M.S. 2006. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. International Biodeterioration and Biodegradation. 57: 222-228.
- Gentry, T., Rensing, C., and Pepper, I.A.N. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 34: 447-494.
- Ghevariya, C.M., Bhatt, J.K., and Dave, B.P. 2011. Enhanced chrysene degradation by halotolerant *Achromobacter xylosoxidans* using response surface methodology. Bioresource Technology. 102: 9668-9674.
- Ghosh, D., and Gopal, B. 2010. Effect of hydraulic retention time on the treatment of secondary effluent in a subsurface flow constructed wetland. Ecological Engineering. 36: 1044-1051.

- Grifoll, M., Casellas, M., Bayona, J.M., and Solanas, A.M. 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. Applied and Environmental Microbiology. 58: 2910-2917.
- Gryta, M., Karakulski, K., and Morawski, A.W. 2001. Purification of oily wastewater by hybrid UF/MD. Water Research. 35: 3665-3669.
- Guo, C., Dang, Z., Wong, Y., and Tam, N.F. 2010. Biodegradation ability and dioxygenase genes of PAH-degrading *Sphingomonas* and *Mycobacterium* strains isolated from mangrove sediments. International Biodeterioration and Biodegradation. 64: 419-426.
- Gutierrez, C., Abee, T., and Booth, I.R. 1995. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. International Journal of Food Microbiology. 28: 233-244.
- Habe, H., Kanemitsu, M., Nomura, M., Takemura, T., Iwata, K., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of an alkaliphilic bacterium utilizing pyrene as a carbon source. Journal of Bioscience and Bioengineering. 98: 306-308.
- Haritash, A.K., and Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Journal of Hazardous Materials. 169: 1-15.
- Hedlund, B.P., and Staley, J.T. 2006. Isolation and characterization of *Pseualteromonas* strains with divergent polycyclic aromatic hydrocarbon catabolic properties. Environ. Microbiol. 8: 178-182.
- Heitkamp, M.A., Franklin, W., and Cerniglia, C.E. 1988. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. Applied and Environmental Microbiology. 54: 2549-2555.
- Hidayat, A. and Tachibana, S. 2012. Biodegradation of aliphatic hydrocarbon in three types of crude oil by *Fusarium* sp. F092 under stress with artificial sea water. Journal of Environmental Science and Technology. 5: 64-73.
- Hong, J.H., Kim, J., Choi, O.K., Cho, K.-S., and Ryu, H.W. 2005. Characterization of a diesel-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* IU5, isolated from oil-

- contaminated soil in Korea. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21: 381-384.
- Hu, R. 1999. Food product Design: a computer - aided statistical approach. Lancaster: Technomic Publishing Co Inc.
- Hu, X., Mamoto, R., Fujioka, Y., Tani, A., Kimbara, K., and Kawai, F. 2008. The pva operon is located on the megaplasmid of *Sphingopyxis* sp. strain 113P3 and is constitutively expressed, although expression is enhanced by PVA. Applied Microbiology Biotechnology. 78: 685-693.
- Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F.I., Liu, R.L., and Li, G.Q. 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. Marine Pollution Bulletin. 56: 1714-1718.
- Hyne, N.J. 2001. Nontechnical guide to petroleum geology, exploration, drilling, and production. PennWell.
- IARC. 1999. Overall Evaluations of Carcinogenicity of Humams. International Agency for Research on Cancer [online]. Available from <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol3/volume3.pdf>. [2011, January 20]
- Irani, Z.A., Mehrnia, M.R., Yazdian, F., Soheily, M., Mohebali, G., and Rasekh, B. 2011. Analysis of petroleum biodesulfurization in an airlift bioreactor using response surface methodology. Bioresource Technology. 102: 10585-10591.
- Jameson, C.W. 2004. Report on carcinogens--History and process. Chemical Health and Safety. 12: 9-14.
- Janbandhu, A., and Fulekar, M.H. 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. Journal of Hazardous Materials. 187: 333-340.
- Janbandhu, A., and Fulekar, M.H. 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. Journal of Hazardous Materials. 187: 333-340.
- Ji, G., Liao, B., Tao, H., and Lei, Z. 2009. Analysis of bacteria communities in an up-flow fixed-bed (UFB) bioreactor for treating sulfide in hydrocarbon wastewater. Bioresource Technology. 100: 5056-5062.

- Jiang, Z., Huang, Y., Xu, X., Liao, Y., Shou, L., Liu, J., Chen, Q., and Zeng, J. 2010. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. Acta Ecologica Sinica. 30: 8-15.
- Johnsen, A.R., Bendixen, K., and Karlson, U. 2002. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration Indicator WST-1. Applied and Environmental Microbiology. 68: 2683-2689.
- Johnsen, A.R., Schmidt, S., Hybholt, T.K., Henriksen, S., Jacobsen, C.S., and Andersen, O. 2007. Strong Impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading community of a PAH-polluted soil but marginal effect on PAH degradation when priming with bioremediated soil dominated by Mycobacteria. Applied and Environmental Microbiology 73: 1474-1480.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., and Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution. 133: 71-84.
- Juhasz, A.L., and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation. 45: 57-88.
- Juneson, C., Ward, O.P., and Singh, A. 2002. Biodegradation of dimethyl phthalate with high removal rates in a packed-bed reactor. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18: 7-10.
- Jung, C.M., Crocker, F.H., Eberly, J.O., and Indest, K.J. 2011. Horizontal gene transfer (HGT) as a mechanism of disseminating RDX-degrading activity among Actinomycete bacteria. Journal of Applied Microbiology. 110: 1449-1459.
- Jussila, M.M., Zhao, J., Suominen, L., and Lindström, K. 2007. TOL plasmid transfer during bacterial conjugation in vitro and rhizoremediation of oil compounds in vivo. Environmental Pollution. 146: 510-524.
- Kaczorek, E., Urbanowicz, M., and Olszanowski, A. 2010. The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas hydrophila* during diesel oil biodegradation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 81: 363-368.
- Kao, C.M., et al. 2010. Application of real-time PCR, DGGE fingerprinting, and culture-based method to evaluate the effectiveness of intrinsic bioremediation on the

- control of petroleum-hydrocarbon plume. Journal of Hazardous Materials. 178: 409-416.
- Karabika, E., Kallimanis, A., Dados, A., Pilidis, G., Drainas, C., and Koukkou, A. 2009. Taxonomic identification and use of free and entrapped cells of a new *Mycobacterium* sp., strain spyr1 for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Applied Biochemistry and Biotechnology. 159: 155-167.
- Karigar, C.S., and Rao, S.S. 2011. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. Enzyme Research: 11.
- Khan, A.A., Wang, R.F., Cao, W.W., Doerge, D.R., Wennerstrom, D., and Cerniglia, C.E. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Applied and Environmental Microbiology 67: 3577-3585.
- Khondee, N., Tathong, S., Pinyakong, O., Powtongsook, S., Chatchupong, T., Ruangchainikom, C., and Luepromchai, E. 2012. Airlift bioreactor containing chitosan-immobilized *Sphingobium* sp. P2 for treatment of lubricants in wastewater. Journal of Hazardous Materials. 213–214: 466-473.
- Kim, W.S., Park, J.H., Ren, J., Su, P., and Dunn, N.W. 2001. Survival response and rearrangement of plasmid DNA of *Lactococcus lactis* during long-term starvation. Applied and Environmental Microbiology. 67: 4594-4602.
- Kim, Y.M., Ahn, C.K., Woo, S.H., Jung, G.Y., and Park, J.M. 2009. Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. Journal of Biotechnology. 144: 293-298.
- Kim, Y.M., Park, D., Jeon, C.O., Lee, D.S., and Park, J.M. 2008. Effect of HRT on the biological pre-denitrification process for the simultaneous removal of toxic pollutants from cokes wastewater. Bioresource Technology. 99: 8824-8832.
- Klankeo, P., Nopcharoenkul, W., and Pinyakong, O. 2009. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil. Journal of Bioscience and Bioengineering. 108: 488-495.

- Kloos, K., Munch, J., and Schloter, M., 2006. A new method for the detection of alkanemonooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. Journal of Microbiological Methods. 66: 486–496.
- Kohno, T., Sugimoto, Y., Sei, K., and Mori, K., 2002. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. Microbes and Environments. 17: 114–121.
- Kouzuma, A., Pinyakong, O., Nojiri, H., Omori, T., Yamane, H., and Habe, H. 2006. Functional and transcriptional analyses of the initial oxygenase genes for acenaphthene degradation from *Sphingomonas* sp. strain A4. Microbiology. 152: 2455-2467.
- Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J.C., and Jouanneau, Y. 2003. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6py1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. Journal of Bacteriology. 185: 3828-3841.
- Kumari, K., Sharma, P., Tyagi, K., and Lal, R. 2011. *Pseudoxanthomonas indica* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dumpsite. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 61: 2107-2111.
- Labud, V., Garcia, C., and Hernandez, T. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. Chemosphere. 66: 1863-1871.
- Leahy, J.G., and Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. 54: 305-315.
- Lee, D.S., et al. 2008. *Pseudoxanthomonas sacheonensis* sp. nov., isolated from BTEX-contaminated soil in Korea, transfer of *Stenotrophomonas dokdonensis* Yoon et al. 2006 to the genus *Pseudoxanthomonas* as *Pseudoxanthomonas dokdonensis* comb. nov. and emended description of the genus *Pseudoxanthomonas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58: 2235-2240.
- Lee, S.H., Lee, S., Kim, D.Y., and Kim, J.G. 2007. Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. Journal of Hazardous Materials. 143: 65-72.

- 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: 940-944.
- Li, L., Ye, Y., Pan, L., Zhu, Y., Zheng, S., and Lin, Y. 2009. The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. Biochemical and Biophysical Research Communications. 387: 778-783.
- Li, S., Zhou, P., Ding, L., and Feng, K. 2011. Treatment of Oily Wastewater Using Composite Flocculant of Polysilicate Ferro-Aluminum Sulfate – Rectorite. Journal of Water Resource and Protection. 3: 253-261.
- Li, S.Q., Zhou, P.J., Ding, L., and Feng, K. 2011. Treatment of oily wastewater using composite flocculant of polysilicate ferro-aluminum sulfate–rectorite. Journal of Water Resource and Protection. 3: 253-261.
- 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: 181-187.
- Liang, Y., Gardner, D.R., Miller, C.D., Chen, D., Anderson, A.J., Weimer, B.C., and Sims, R.C. 2006. Study of biochemical pathways and enzymes involved in pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KMS. Applied and Environmental Microbiology. 72: 7821-7828.
- Lin, Y., and Cai, L.X. 2008. PAH-degrading microbial consortium and its pyrene-degrading plasmids from mangrove sediment samples in Huian, China. Marine Pollution Bulletin. 57: 703-706.
- Lindquist, J. 2001. The Most Probable Number Method. Department of Bacteriology, University of Wisconsin–Madison, Madison[online]. Available from: <http://www.jlindquist.net/generalmicro/102dil3.html> [2009, June 2]
- Ling, J., Zhang, G., Sun, H., Fan, Y., Ju, J., and Zhang, C. 2011. Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A. Science of The Total Environment. 409: 1994-2000.

- Liu, C.W., and Liu, H.S. 2011. *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors. Process Biochemistry. 46: 202-209.
- Liu, J., Tian, S.P., Li, B.Q., and Qin, G.Z. 2009. Enhancing viability of two biocontrol yeasts in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant. BioControl. 54: 817-824.
- Liu, X., and Dong, C. 2011. Simultaneous COD and nitrogen removal in a micro-aerobic granular sludge reactor for domestic wastewater treatment. Systems Engineering Procedia. 1: 99-105.
- Liu, Y., Zhang, J., and Zhang, Z. 2004. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Sphingomonas* sp. strain ZL5. Biodegradation. 15: 205-212.
- Liu, Y.J., Zhang, A.N., and Wang, X.C. 2009. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. Biochemical Engineering Journal. 44: 187-192.
- 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: 105-111.
- Löser, C., Seidel, H., Hoffmann, P., and Zehnsdorf, A. 1999. Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil. Applied Microbiology and Biotechnology. 51: 105-111.
- Lu, M., Zhang, Z., Yu, W., and Zhu, W. 2009. Biological treatment of oilfield-produced water: A field pilot study. International Biodeterioration & Biodegradation. 63: 316-321.
- Lu, S., Teng, Y., Wang, J., and Sun, Z. 2010. Enhancement of pyrene removed from contaminated soils by *Bidens maximowicziana*. Chemosphere. 81: 645-650.
- Ma, Y., Wang, L., and Shao, Z. 2006. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. Environmental Microbiology. 8: 455-465.

- Maiti, S., Mishra, I.M., Bhattacharya, S.D., and Joshi, J.K. 2011. Removal of oil from oil-in-water emulsion using a packed bed of commercial resin. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 389: 291-298.
- Manikandan, R., Saravanakumar, D., Rajendran, L., Raguchander, T., and Samiyappan, R. 2010. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium wilt* of tomato. Biological Control. 54: 83-89.
- Melin, P., Håkansson, S., Eberhard, T.H., and Schnürer, J. 2006. Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations at different temperatures, assessed by flow cytometry. Journal of Applied Microbiology. 100: 264-271.
- Melin, P., Schnürer, J., and Håkansson, S. 2010. Formulation and stabilisation of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. Antonie van Leeuwenhoek: 1-6.
- Miller, C. D., Hall, K., Liang, Y.N., Nieman, K., Sorensen, D., Issa, B., Anderson, A.J., and Sims, R.C. 2004. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolated from soil. Microbial Ecology 48: 230-238.
- Moat, A.G., Foster, J.W., and Spector, M.P. 2002. Microbial physiology. New York. Wiley-Liss.
- Mohajeri, L., Aziz, H.A., Isa, M.H., and Zahed, M.A. 2010. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. Bioresource Technology. 101: 893-900.
- Mohanty, G., and Mukherji, S. 2008. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. International Biodeterioration & Biodegradation. 61: 240-250.
- Molina, M., González, N., Bautista, L., Sanz, R., Simarro, R., Sánchez, I., and Sanz, J. 2009. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. Biodegradation. 20: 789-800.
- Montgomery, D.C. 2008. Design, analysis of experiments. 7th ed., New York; John Wiley and Sons, Inc.

- Montgomery, D.C., 2001. Design and Analysis of Experiments, fifth ed. New York: John Wiley
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Fu, P.P., and Cerniglia, C.E. 2004. Degradation of Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Applied and Environmental Microbiology. 70: 340-345.
- Mrozik, A., and Piotrowska-Seget, Z. 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. Microbiological Research. 165: 363-375.
- Mukred, A.M., Hamid, A.A., Hamzah, A., and Yusoff, W.M. 2008. Enhancement of biodegradation of crude petroleum-oil in contaminated water by the addition of nitrogen sources. Pakistan Journal of Biological Sciences. 11: 2122-2127.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 59: 695-700.
- Nakai., S., Li-Chan., E.C.Y., and Dou., J. 2006. Experimental Design and Response-Surface Methodology, in: S.S. Sablani, A.K. Datta, M.S. Rehman, A.S. Mujumdar (Eds.), Handbook of Food and Bioprocess Modeling Techniques. Boca Raton: CRC Press.
- Nayak, A.S., Sanjeev Kumar, S., Santosh Kumar, M., Anjaneya, O., and Karegoudar, T.B. 2011. A catabolic pathway for the degradation of chrysene by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04. FEMS Microbiology Letters. 320: 128-134.
- Nichiporowich. 2011. Petro-clear for water and soil contamination [online]. Available from <http://www.bioremediate.com/oil.html> [2011, March 17]
- Obayori, O., Ilori, M., Adebusoye, S., Oyetibo, G., and Amund, O. 2008. Pyrene-degradation potentials of *Pseudomonas* species isolated from polluted tropical soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24: 2639-2646.
- Obuekwe, C.O., and Al-Muttawa, E. 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. Biotechnology Letters. 23: 1025-1032.

- Okoro, C.C., and Amund, O.O. 2010. Biodegradation of produce water hydrocarbons by pure cultures of *Alcaligenes* sp. Journal of American Science. 6: 107-113.
- Pagnout, C., Frache, G., Poupin, P., Maunit, B., Muller, J.-F., and Féraud, J.-F. 2007. Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: expression in *Mycobacterium smegmatis* mc2155. Research in Microbiology. 158: 175-186.
- Panpanit, S., and Visvanathan, C. 2001. The role of bentonite addition in UF flux enhancement mechanisms for oil/water emulsion. Journal of Membrane Science. 184: 59-68.
- Park, I.S., and Park, J.W. 2011. Determination of a risk management primer at petroleum-contaminated sites: Developing new human health risk assessment strategy. Journal of Hazardous Materials. 185: 1374-1380.
- Patel, V., Cheturvedula, S., and Madamwar, D. 2012. Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. Journal of Hazardous Materials. 201–202: 43-51.
- Patiño, V.M., et al. 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. Journal of Applied Microbiology. 99: 540-550.
- Peng, R.H., et al. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS Microbiology Reviews. 32: 927-955.
- Pereira, F.B., Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A., and Domingues, L. 2010. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. Bioresource Technology. 101: 7856-7863.
- Perelo, L.W. 2010. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. Journal of Hazardous Materials. 177: 81-89.
- Phrommanich, S., et al. 2009. Quantitative detection of the oil-degrading bacterium *Acinetobacter* sp. strain MUB1 by hybridization probe based real-time PCR. Microbiological Research. 164: 486-492.

- Pinyakong, O., et al. 2000. Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2. FEMS Microbiology Letters. 191: 115-121.
- Pizzul, L., Sjögren, Å., Castillo, M.d., and Stenström, J. 2007. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a two-step sequential treatment. Biodegradation. 18: 607-616.
- Potin, O., Veignie, E., and Rafin, C. 2004. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. FEMS Microbiology Ecology. 51: 71-78.
- Priefert, H., et al. 2004. Indene bioconversion by a toluene inducible dioxygenase of *Rhodococcus* sp. I24. Applied Microbiology and Biotechnology. 65: 168-176.
- Quan, X.C., Tang, H., Xiong, W.C., and Yang, Z.F. 2010. Bioaugmentation of aerobic sludge granules with a plasmid donor strain for enhanced degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Journal of Hazardous Materials. 179: 1136-1142.
- Quek, E., Ting, Y.P., and Tan, H.M. 2006. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. Bioresource Technology. 97: 32-38.
- Rahman, R.N., Ghaza, F.M., Salleh, A.B., and Basri, M. 2006. Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells. The Journal of Microbiology. 44: 354-359.
- Ramírez, M.E., Zapién, B., Zegarra, H.G., Rojas, N.G., and Fernández, L.C. 2009. Assessment of hydrocarbon biodegradability in clayed and weathered polluted soils. International Biodeterioration & Biodegradation. 63: 347-353.
- Reddy, M.S., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N.C., Dhanasri, G., and Devi, P. 2010. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. Bioresource Technology. 101: 7980-7983.
- Rehmann, K., Noll, H.P., Steinberg, C.E.W., and Kettrup, A.A. 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. Chemosphere. 36: 2977-2992.

- Robles-Gonzalez, I., Fava, F., and Poggi-Varaldo, H. 2008. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. Microbial Cell Factories. 7: 5.
- Rodríguez, F.A., Reboleiro-Rivas, P., Osorio, F., Martínez-Toledo, M.V., Hontoria, E., and Poyatos, J.M. 2012. Influence of mixed liquid suspended solids and hydraulic retention time on oxygen transfer efficiency and viscosity in a submerged membrane bioreactor using pure oxygen to supply aerobic conditions. Biochemical Engineering Journal. 60: 135-141.
- Rodríguez-Martínez, E. M., Pérez, E. X., Schadt, W. C., Zhou, J., and Massol-Deyá, A. 2006. Microbial diversity and bioremediation of a hydrocarbon-contaminated aquifer (Vega Baja, Puerto Rico). Int J Environ Res Public Health 3: 292-300.
- Romine, M.F., et al. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. Journal of Bacteriology. 181: 1585-1602.
- Sambrook, J. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell. New York: Cold Spring Harbor.
- Sarma, S.J., and Pakshirajan, K. 2011. Surfactant aided biodegradation of pyrene using immobilized cells of *Mycobacterium frederiksbergense*. International Biodeterioration and Biodegradation. 65: 73-77.
- Sarvabioremed. 2011. SpillRemed (Industrial) - case studies and testimonials [online]. Available from [http://www.sarvabioremed.com/product_detail?productName=SpillRemed %20\(Industrial\)](http://www.sarvabioremed.com/product_detail?productName=SpillRemed%20(Industrial)) [2011, March 17]
- Sayler, G., Layton, A., Lajoie, C., Bowman, J., Tschantz, M., and Fleming, J. 1995. Molecular site assessment and process monitoring in bioremediation and natural attenuation. Applied Biochemistry and Biotechnology. 54: 277-290.
- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., and Warshawsky, D. 1996. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. Applied and Environmental Microbiology. 62: 13-19.
- Schobert, H.H. 1999. The chemistry of hydrocarbon fuels. London: Butterworth-Heinemann.

- Schorling, P.C., Kessel, D.G., and Rahimian, I. 1999. Influence of the crude oil resin/asphaltene ratio on the stability of oil/water emulsions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 152: 95-102.
- Schreiberová, O., Hedbávná, P., Cejková, A., Jirku, V., and Masák, J. 2012. Effect of surfactants on the biofilm of *Rhodococcus erythropolis*, a potent degrader of aromatic pollutants. New Biotechnology.
- Shannon, K.E., Lee, D.Y., Trevors, J.T., and Beaudette, L.A. 2007. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. Science of The Total Environment. 382: 121-129.
- Shariati, S.R.P., Bonakdarpour, B., Zare, N., and Ashtiani, F.Z. 2011. The effect of hydraulic retention time on the performance and fouling characteristics of membrane sequencing batch reactors used for the treatment of synthetic petroleum refinery wastewater. Bioresource Technology. 102: 7692-7699.
- Shi, Z., Tian, L., and Zhang, Y. 2010. Molecular biology approaches for understanding microbial polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation. Acta Ecologica Sinica. 30: 292-295.
- Sho, M., Hamel, C., and Greer, C.W. 2004. Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp. strain S65. FEMS Microbiology Ecology. 48: 209-220.
- Singh, B.K., Walker, A., Morgan, J.A.W., and Wright, D.J. 2004. Biodegradation of Chlorpyrifos by *Enterobacter* Strain B-14 and Its Use in Bioremediation of Contaminated Soils. Applied and Environmental Microbiology. 70: 4855-4863.
- Sivan, A., Szanto, M., and Pavlov, V. 2006. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. Applied Microbiology and Biotechnology. 72: 346-352.
- Sobecky, P.A., and Coombs, J.M. 2009. Horizontal gene transfer in metal and radionuclide contaminated soils. Methods Mol Biol. 532: 455-472.
- Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., and Hu, Z. 2011. Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic

- aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. Marine Pollution Bulletin. 62: 2122-2128.
- Sponza, D.T., and Gök, O. 2010. Effect of rhamnolipid on the aerobic removal of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and COD components from petrochemical wastewater. Bioresource Technology. 101: 914-924.
- Springael, D., and Top, E.M. 2004. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. Trends in Microbiology. 12: 53-58.
- Su, W.T., Wu, B.S., and Chen, W.J. 2011. Characterization and biodegradation of motor oil by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and optimizing medium constituents. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 42: 689-695.
- Supaka, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Omori, T., and Juntongjin, K. 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. scienceAsia. 27: 021-028.
- Talley, W.J. 2006. Bioremediation of recalcitrant compounds. CRC Press, New York.
- Tathong, S. 2008. Assessment of bioremediation potential of wastewater from petrol station. Master's Thesis, Interdisciplinary Program of Science Program Environmental Management, Chulalongkorn University.
- Tavassoli, T., Mousavi, S.M., Shojaosadati, S.A., and Salehizadeh, H. 2012. Asphaltene biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. Fuel. 93: 142-148.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., and Banat, I.M. 2011. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. Bioresource Technology. 102: 772-778.
- Tittabutra, P., Payakaponga, W., Teaumroonga, N., Singletonb, W.P., and Boonkerda, N. 2007. Growth, survival and field performance of *Bradyrhizobial* liquid inoculant formulations with polymeric additives. ScienceAsia. 33: 69-77.

- Tiwari, J., Reddy, M., Patel, D., Jain, S., Murthy, R., and Manickam, N. 2010. Isolation of pyrene degrading *Achromobacter xylooxidans* and characterization of metabolic product. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 26: 1727-1733.
- Tomás, J.M., Bru, E., Wiese, B., and Nader-Macías, M. 2010. Optimization of low-cost culture media for the production of biomass and bacteriocin by a urogenital *Lactobacillus salivarius* strain. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2: 2-11.
- Torres, R., Usall, J., Teixidó, N., Abadias, M., and Viñas, I. 2003. Liquid formulation of the biocontrol agent *Candida sake* by modifying water activity or adding protectants. Journal of Applied Microbiology. 94: 330-339.
- Tyagi, M., da Fonseca, M., and de Carvalho, C. 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation. 22: 231-241.
- van Beilen, J.B., Funhoff, E.G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Rothlisberger, M., Li, Z., and Witholt, B., 2006. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkanedegrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. Applied and Environmental Microbiology. 72: 59–65.
- van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M., and Witholt, B. 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil and Gas Science and Technology. 58.427-440.
- van Hamme, J.D., Singh, A., and Ward, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67: 503–549.
- Venkata Mohan, S., Prasanna, D., Purushotham Reddy, B., and Sarma, P.N. 2008. Ex situ bioremediation of pyrene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode: Influence of bioaugmentation. International Biodeterioration & Biodegradation. 62: 162-169.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry. 73: 1163.
- Vieira, P.A., Vieira, R.B., de França, F.P., and Cardoso, V.L. 2007. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. Journal of Hazardous Materials. 140: 52-59.

- Viero, A.F., de Melo, T.M., Torres, A.P.R., Ferreira, N.R., Sant'Anna Jr, G.L., Borges, C.P., and Santiago, V.M.J. 2008. The effects of long-term feeding of high organic loading in a submerged membrane bioreactor treating oil refinery wastewater. Journal of Membrane Science. 319: 223-230.
- Vila, J., Lopez, Z., Sabate, J., Minguillon, C., Solanas, A.M., and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel Metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology. 67: 5497-5505.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., and Rehm, H.J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Applied Microbiology and Biotechnology. 34: 671-676.
- Wang, X.B., Ch, C.Q., Nie, Y., Tang, Y.Q., Tan, Y., Wu, G., and Wu, X.L., 2011. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6-C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. Bioresource Technology. 102: 7755-7761.
- Wang, G.I., Bi, M., Liang, B., Jiang, J.D., and Li, S.P. 2011. *Pseudoxanthomonas jiangsuensis* sp. Nov., a DDT-degrading bacterium isolated from a long-term DDT-polluted soil. Current Microbiology. 62: 1760-1766.
- Wang, Z.Z., Liu, X.Y., Zhang, X.Y., Wang, J., Cao, Z.N., Zhong, C.L., and Su, P.C. 2010. Wetland bacteria isolated from Huangpu river-Yangtze river estuary and its degradation on diesel. Journal of Shanghai University. 14: 292-296.
- Watanabe, K., Miyashita, M., and Harayama, S. 2000. Starvation improves survival of bacteria introduced into activated sludge. Applied and Environmental Microbiology. 66: 3905-3910.
- Wild, S.R., and Jones, K.C. 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary source inventory and budget. Environmental Pollution. 88: 91-108.
- 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: 415-422.
- Wu, J., Hou, H., Ritz, B., and Chen, Y. 2010. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and missed abortion in early pregnancy in a Chinese population. Science of The Total Environment. 408: 2312-2318.
- Wu, L., Ge, G., and Wan, J. 2009. Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. Journal of Environmental Sciences. 21: 237-242.
- Xie, W., Zhong, L., and Chen, J. 2007. Treatment of slightly polluted wastewater in an oil refinery using a biological aerated filter process. Wuhan University Journal of Natural Sciences. 12: 1094-1098.
- Xu, L., Gao, Z., Luo, M., Cheng, Y., and Jin, J. 2010. Isolation and identification of a pyrene-degrading bacterial strain from contaminated soil. Wei Sheng Wu Xue Bao. 51: 313-319.
- Yang, Y., Tao, S., Zhang, N., Zhang, D.Y., and Li, X.Q. 2010. The effect of soil organic matter on fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: a microcosm study. Environmental Pollution. 158: 1768-1774.
- Yemashova, N., Murygina, V., Zhukov, D., Zakharyantz, A., Gladchenko, M., Appanna, V., and Kalyuzhnyi, S. 2007. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 6: 315-337.
- Zahed, M.A., Aziz, H.A., Mohajeri, L., Mohajeri, S., Kutty, S.R.M., and Isa, M.H. 2010. Application of statistical experimental methodology to optimize bioremediation of n-alkanes in aquatic environment. Journal of Hazardous Materials. 184: 350-356.
- Zancan, P., and Sola-Penna, M. 2005. Trehalose and glycerol stabilize and renature yeast inorganic pyrophosphatase inactivated by very high temperatures. Archives of Biochemistry and Biophysics. 444: 52-60.
- Zeng, J., Lin, X., Zhang, J., and Li, X. 2010. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading *Mycobacterium* spp. and the degradation in soil. Journal of Hazardous Materials. 183: 718-723.

- Zhang, D., and Zhu, L. 2012. Effects of tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1. Environmental Pollution. 164: 169-174.
- Zhang, J., Dai, J., Du, X., Li, F., Wang, W., and Wang, R. 2012. Distribution and sources of petroleum-hydrocarbon in soil profiles of the Hunpu wastewater-irrigated area, China's northeast. Geoderma. 173–174: 215-223.
- Zhang, Q.Q., Zhao, Y.J., Yang, C.G., Liu, F.W., He, J., Shen, B., and Ran, W. 2010. Isolation, identification, and degrading effect of a pyrene-degrading strain SE12. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. 21: 1851-1858.
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., and Xu, P. 2011. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. Bioresource Technology. 102: 4111-4116.
- Zhao, X., Wang, Y., Ye, Z., Borthwick, A.G.L., and Ni, J. 2006. Oil field wastewater treatment in Biological Aerated Filter by immobilized microorganisms. Process Biochemistry. 41: 1475-1483.
- Zhong, Y., Luan, T., Lin, L., Liu, H., and Tam, N.F.Y. 2011. Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp. Bioresource Technology. 102: 2965-2972.
- Zhou, H., Wong, A., Yu, R., Park, Y., Wong, Y., and Tam, N. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced structural shift of bacterial communities in mangrove sediment. Microbial Ecology. 58: 153-160.
- Zhou, H.W., Guo, C.L., Wong, Y.S., and Tam, N.F. 2006. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. FEMS Microbiol Lett. 262: 148-157.
- Zhou, Y.B., Tang, X.Y., Hu, X.M., Fritschi, S., and Lu, J. 2008. Emulsified oily wastewater treatment using a hybrid-modified resin and activated carbon system. Separation and Purification Technology. 63: 400-406.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM broth)

ก. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_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 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7 หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายในส่วน ข. ที่ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารส่วน ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และละลายผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากนั้นหนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

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

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นหนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายไพรีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

พีแนทรีน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร

สารละลายไพรีนในอะซิโตน ความเข้มข้น 12,000 ppm

พีแนทรีน	0.12	กรัม
อะซิโตน	10	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 20 นาที

80% กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อใหม่อีก 2-3 ครั้ง

สารละลาย Triton x-100 15%

Triton x-100	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	85	มิลลิลิตร

70% เอทานอล

99% เอทานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS)

Sodium dodecyl sulfate	20	กรัม
------------------------	----	------

น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เติม SDS ในขณะที่น้ำปลอดประจุอุณหภูมิประมาณ 80°C ละลายให้เข้ากัน

20% สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K)

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	20	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	มิลลิลิตร

สารละลาย Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Tris-base ($C_4H_{11}NO_3$)	1.2	กรัม
-------------------------------	-----	------

ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8.0 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์

EDTA ($C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaCl)	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียม ไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	10	มิลลิลิตร
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์	0.2	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย CTAB/NaCl

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1	กรัม
CTAB	10	กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 65 °ซ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

DNA extraction buffer

Tris-HCl, pH 8.0	100	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมฟอสเฟต, pH 8.0	100	มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA, pH 8.0	100	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	1.5	โมลาร์
CTAB	1%	(w/v)

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24:1 (v/v) เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

ผสมสารละลายฟีนอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อ ปริมาตร) เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่า คนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้แยกชั้น เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°ซ

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า

Tris-base	242	กรัม
EDTA	18.6	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร

ละลาย EDTA และ Tris-base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแม่เหล็กจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติมกรดอะซิติกเข้มข้นและน้ำปลอดประจุให้เป็น

ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9%

อะกาโรสเจล	0.9	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	100	มิลลิลิตร
หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน		

อะกาโรสเจลเข้มข้น 2%

อะกาโรสเจล	2	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	100	มิลลิลิตร
หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน		

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์	0.1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันเก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกัน เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง)

ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit (Roche, Germany)

ประกอบด้วย

หลอดหมายเลข 1	DIG-High Prime, 5× conc.
หลอดหมายเลข 2	DIG-labeled control DNA 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
หลอดหมายเลข 3	DNA dilution buffer
หลอดหมายเลข 4	Anti-Digoxigenin-AP Conjugate 750 ยูนิต/ มิลลิลิตร
หลอดหมายเลข 5	NBT/BCIP, 50× conc.
หลอดหมายเลข 6	Blocking solution, 10×
หลอดหมายเลข 7	DIG Easy Hyb Granules

สารละลาย Buffer1 (Maleic acid buffer)

กรดมาเลอิก	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Buffer2

สารละลาย 10× blocking solution ใน Buffer1 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

Buffer3 (Detection buffer)

Tris-base	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 9.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Denaturation buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.5 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	1.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จนหมดแล้วจึงละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Neutralization buffer

Tris-base	0.5 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ต่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 20×SSC

โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์
โซเดียมซิเตรท	0.3 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ต่างเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 2×SSC

ละลาย 20×SSC ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 0.5×SSC/0.1%SDS

ละลาย 20×SSC ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในน้ำปลอดประจุ 96.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

สารละลาย 2×SSC/0.1%SDS

ละลาย 20×SSC ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำปลอดประจุ 89 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์

ละลายโซเดียมอะซิเตทน้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ต่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซิติกปริมาตรประมาณ 57 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

Lysis solution สำหรับสกัดเมกะพลาสมิด

ผสม Tris-base ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 2 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ DGGE

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10% (Ammonium persulfate: ASP)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

30% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์/บิส 37.5:1	3.25	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	0.3	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	8.25	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.3	มิลลิลิตร
ฟอร์มามาไมด์ (formamide)	1.8	มิลลิลิตร
ยูเรีย เข้มข้น 7 โมลาร์	1.9	มิลลิลิตร
TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine)	15	ไมโครลิตร
10% ASP	0.15	มิลลิลิตร

40% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์/บิส 37.5:1	3.25	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	0.3	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	7.25	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.3	มิลลิลิตร
ฟอร์มามาไมด์ (formamide)	2.4	มิลลิลิตร
ยูเรีย เข้มข้น 7 โมลาร์	2.5	มิลลิลิตร
TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine)	15	ไมโครลิตร
10% ASP	0.15	มิลลิลิตร

70% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์/บิส 37.5:1	3.25	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	0.3	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	4.25	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.3	มิลลิลิตร
ฟอร์มามาไมด์ (formamide)	4.3	มิลลิลิตร
ยูเรีย เข้มข้น 7 โมลาร์	4.4	มิลลิลิตร
TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine)	15	ไมโครลิตร
10% ASP	0.15	มิลลิลิตร

80% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์/บิส 37.5:1	3.25	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	0.3	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	3.55	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.3	มิลลิลิตร
ฟอร์มามาไมด์ (formamide)	4.6	มิลลิลิตร
ยูเรีย เข้มข้น 7 โมลาร์	4.7	มิลลิลิตร
TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine)	15	ไมโครลิตร
10% ASP	0.15	มิลลิลิตร

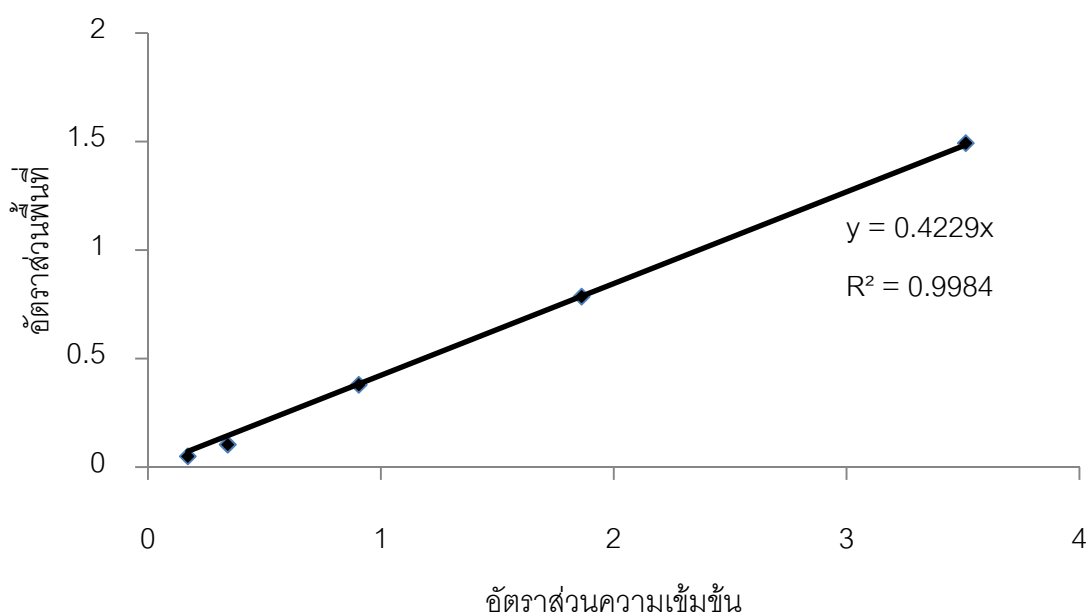
สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	10	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของน้ำมันชนิดต่างๆ

กราฟมาตรฐานของน้ำมันดีเซล



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าอัตราส่วนพื้นที่และค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล

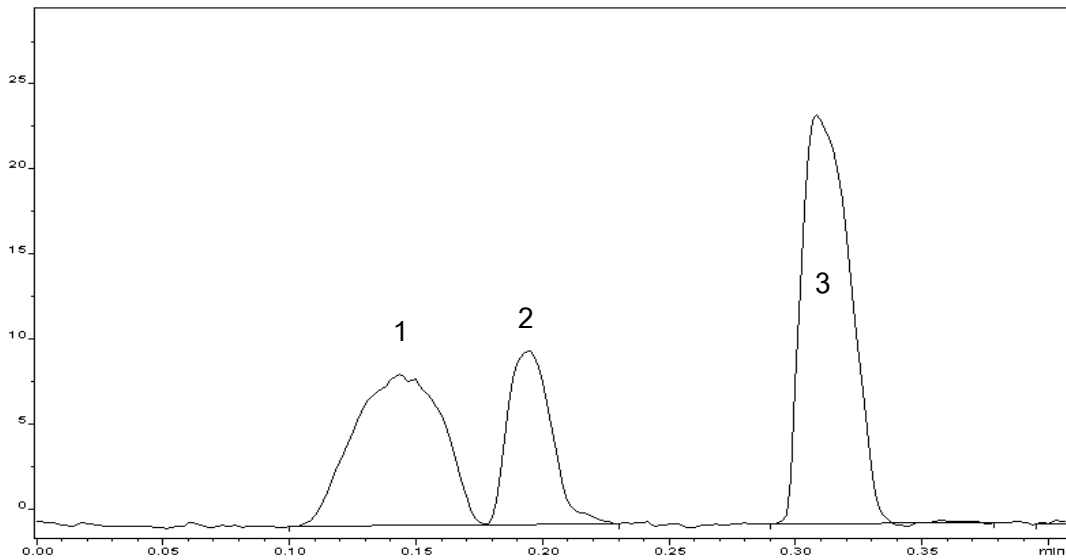
กราฟมาตรฐานของน้ำมันดีเซลสร้างจากค่าอัตราส่วนพื้นที่ (พื้นที่ที่ได้กราฟของน้ำมันดีเซล/พื้นที่ที่ได้กราฟของสเตียริลแอลกอฮอล์) และค่าอัตราส่วนความเข้มข้น (ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล/ความเข้มข้นของสเตียริลแอลกอฮอล์)

หาปริมาณน้ำมันดีเซลโดยการนำค่าพื้นที่ที่ได้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID มาหาอัตราส่วนพื้นที่ แล้วแทนค่าในสมการ

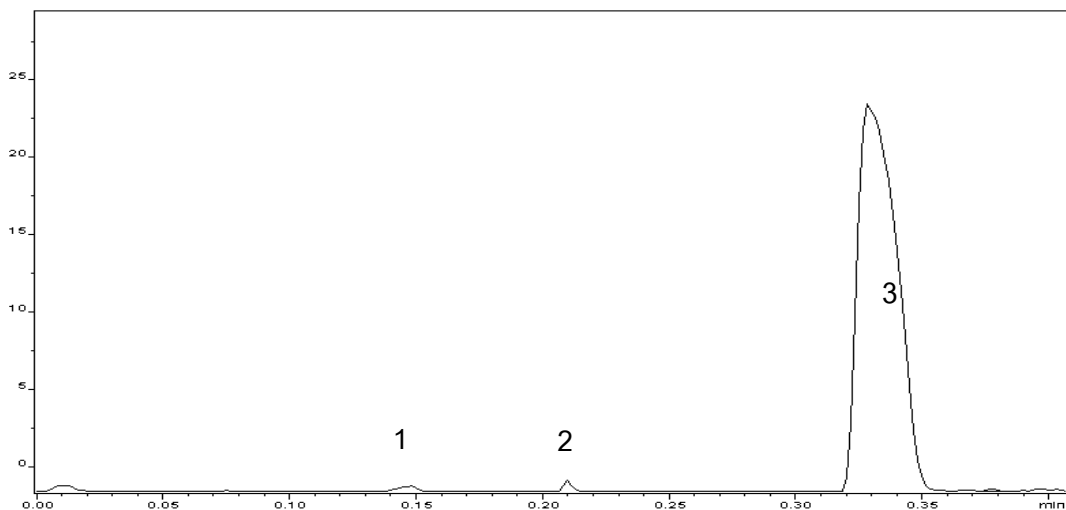
$$\text{อัตราส่วนพื้นที่ (y)} = 0.422 \text{ อัตราส่วนความเข้มข้น (x)}$$

จากนั้นหาค่าปริมาณน้ำมันดีเซลด้วยการแทนค่าอัตราส่วนความเข้มข้นในสมการด้านล่าง

$$\text{ปริมาณของน้ำมัน (มิลลิกรัม)} = \text{อัตราส่วนความเข้มข้น} \times \text{ปริมาณของสเตียริลแอลกอฮอล์ (มิลลิกรัม)}$$

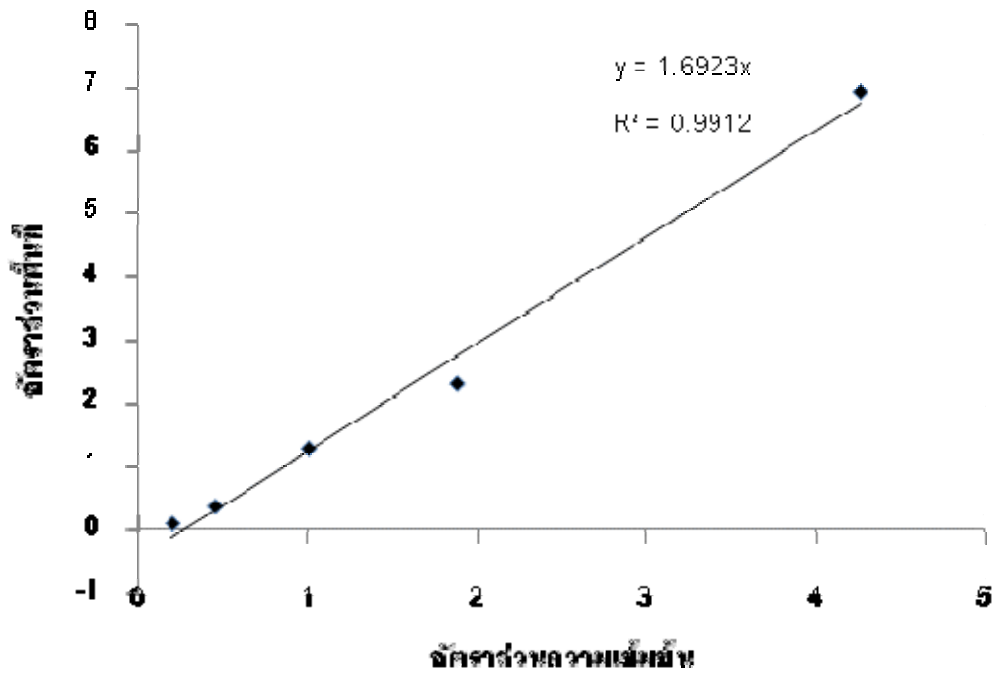


รูปที่ ค.2 แสดง TLC-FID โคโรมาโตแกรมของน้ำมันดีเซลของชุดควบคุม 0 วัน ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล 100 มิลลิกรัม/ลิตร 1 2 และ 3 คือแซททูเรท อะโรมาติก และสเตียริลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ



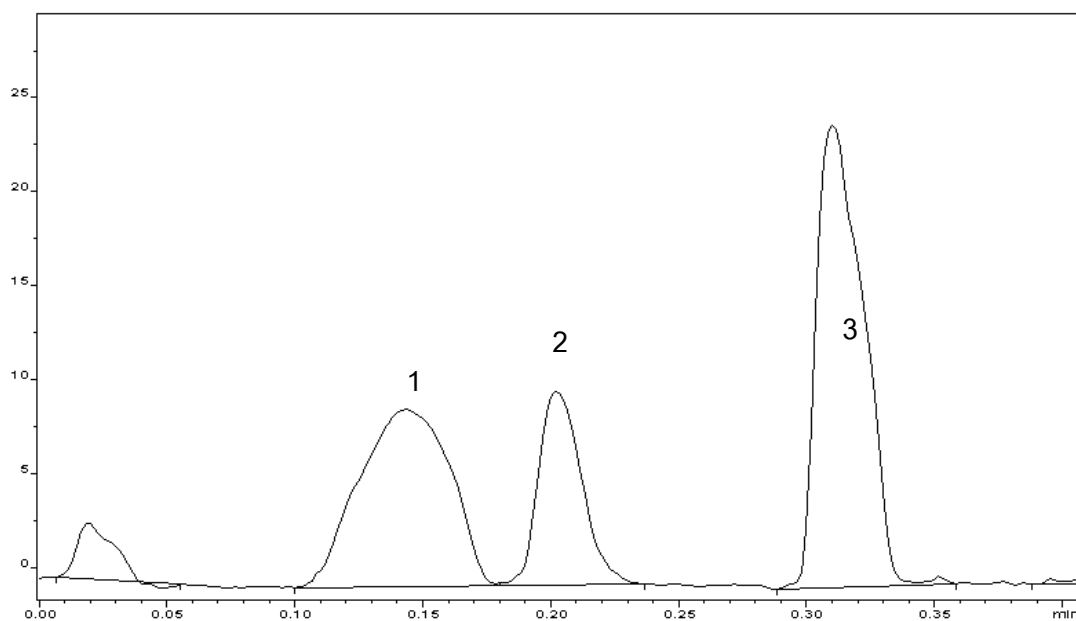
รูปที่ ค.3 แสดง TLC-FID โคโรมาโตแกรมของน้ำมันดีเซลชุดทดลอง 3 วัน ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล 100 มิลลิกรัม/ลิตร 1 2 และ 3 คือแซททูเรท อะโรมาติก และสเตียริลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ

กราฟมาตรฐานของน้ำมันสไลด์เวย์

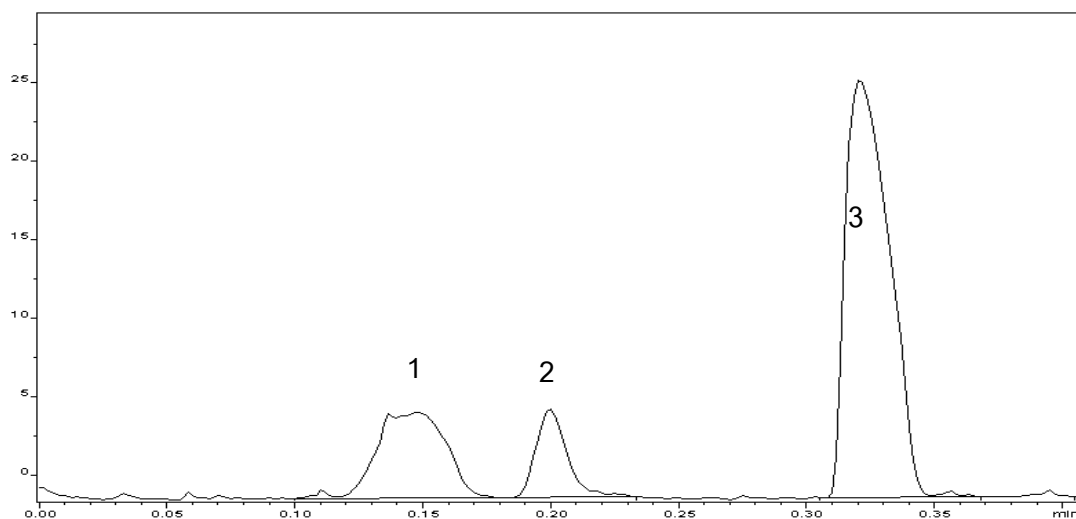


รูปที่ ค.4 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าอัตราส่วนพื้นที่และค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำมันสไลด์เวย์

หาปริมาณน้ำมันสไลด์เวย์โดยการนำค่าพื้นที่ที่ได้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID มาหาอัตราส่วนพื้นที่ แล้วแทนค่าในสมการจากกราฟมาตรฐานและสมการปริมาณของน้ำมันเช่นเดียวกับการหาค่าปริมาณน้ำมันดีเซล



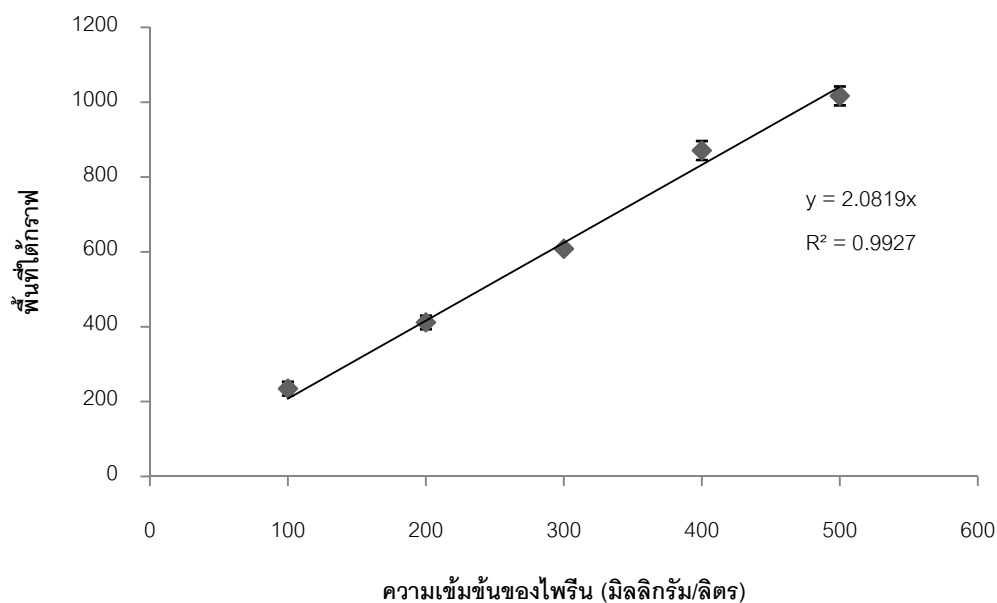
รูปที่ ค.5 โครมาโตแกรมของน้ำมันสไลด์เวย์จากชุดควบคุมวันที่ 0 ในการย่อยสลายน้ำมันสไลด์เวย์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เซลล์อิสระ RN402 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 MPN/ทริตเมนต์ ในอาหารเหลว CFMM (50 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน พีคที่ 1 2 และ 3 คือ แชนทูปเรท อะโรมาติก และสเตียริลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ



รูปที่ ค.6 โครมาโตแกรมของน้ำมันสไลด์เวย์จากชุดทดลองวันที่ 7 ในการย่อยสลายน้ำมันสไลด์เวย์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เซลล์อิสระ RN402 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 MPN/ชุดทดลอง ในอาหารเหลว CFMM (50 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วันพีคที่ 1 2 และ 3 คือ แชนทูปเรท อะโรมาติก และสเตียริลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ

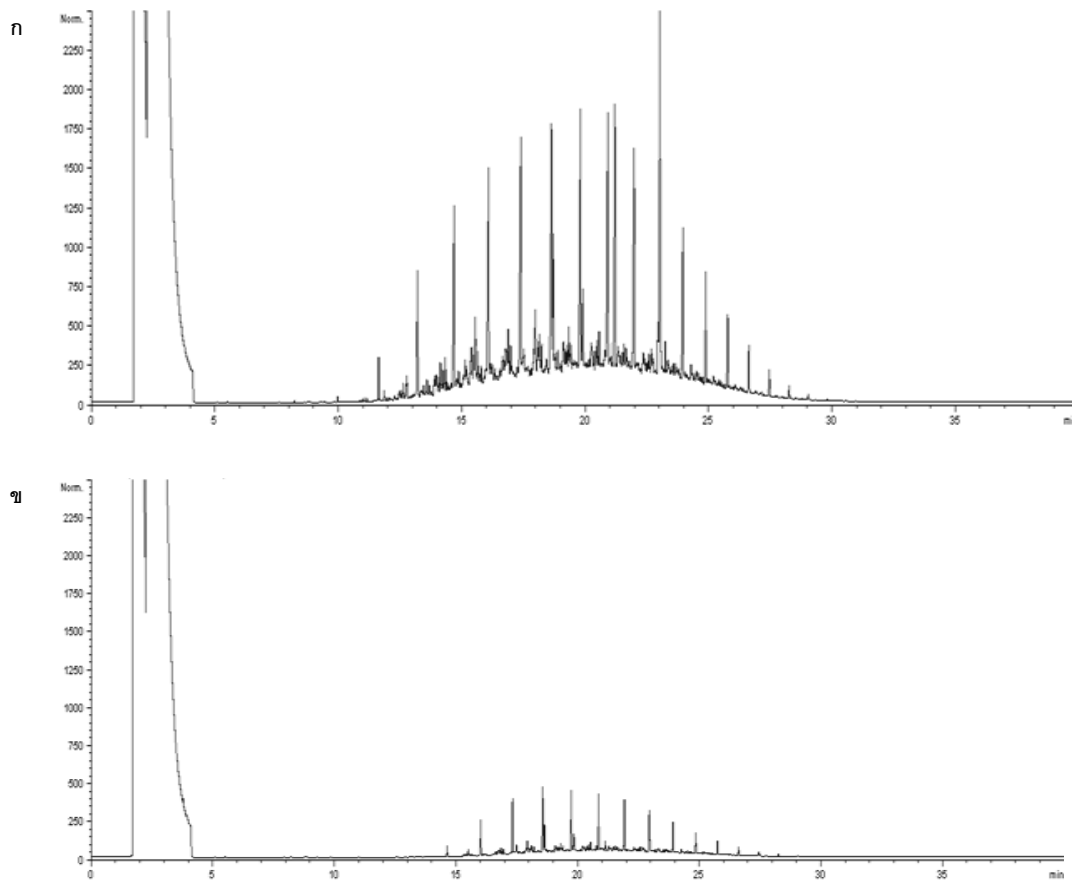
GC โครมาโตแกรม

กราฟมาตรฐานของไพรีน

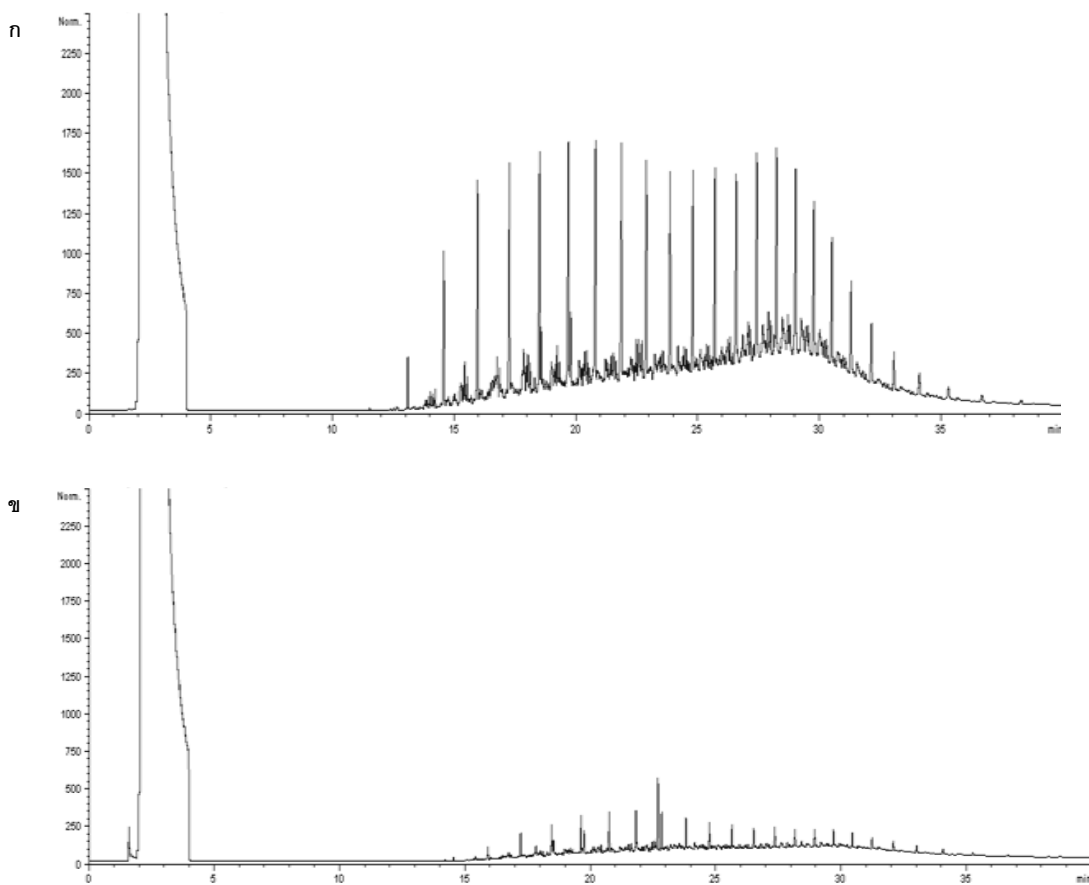


รูปที่ ค.7 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนกับพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์โดย GC-FID

จากกราฟสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของไพรีนที่ได้จากการสกัด โดยดินตัวอย่างเติมด้วยไพรีนที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ในดินจำนวน 6 กรัม จากนั้นการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่สกัดได้ด้วยเครื่อง GC-FID แล้วจึงนำค่าพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างที่สกัดได้เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำให้ความเข้มข้นที่แน่นอนจึงคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของไพรีนที่ได้จากการสกัด จากผลการวิเคราะห์พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของไพรีนที่ได้จากการสกัด เท่ากับ $99.37\% \pm 32.18$



รูปที่ ค.8 โครมาโตแกรมของน้ำมันดีเซล ก) ชุดควบคุม ข) ชุดทดลอง ในวันที่ 9 การย่อยสลาย
น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 450 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เซลล์อิสระ RN402 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8
CFU/มิลลิลิตร



รูปที่ ค.9 โครมาโตแกรมของน้ำมันดิบ ก) ชุดควบคุม ข) ชุดทดลอง ในวันที่ 9 การย่อยสลาย
น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 450 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เซลล์อิสระ RN402 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8
CFU/มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ง.1 ปริมาณพีแนทรีนที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มีพีแนทรีนความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง RN402 เวลาต่างๆ

วัน	ปริมาณพีแนทรีนที่เหลือ (%)			
	ชุดควบคุมที่ไม่เติม RN402		ชุดทดลองที่เติม RN402	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
0	100.00	0.00	100.00	0.00
4	97.24	4.64	76.03	1.05
8	87.24	2.04	4.76	1.22
12	95.12	6.47	0.42	0.01
16	100.00	0.00	100.00	0.00
20	97.24	4.64	76.03	1.05

ตารางที่ ง.2 จำนวนแบคทีเรีย RN402 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีพีแนทรีน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Viable plate count

วัน	จำนวนของแบคทีเรีย (log CFU/มิลลิลิตร)			
	ชุดควบคุมที่ไม่เติมพีแนทรีน		ชุดทดลองที่เติมพีแนทรีน	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD.
0	6.32	0.08	6.60	0.11
4	7.36	0.05	7.11	0.14
8	7.99	0.07	7.87	0.09
12	7.09	0.02	8.01	0.06
16	6.32	0.08	6.60	0.11
20	7.36	0.05	7.11	0.14

ตารางที่ ง.3 ปริมาณไฟรินที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟรินความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัม/ลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง RN402 เวลาต่างๆ

วัน	ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%)			
	ชุดควบคุมที่ไม่เติม RN402		ชุดทดลองที่เติม RN402	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
0	100.00	0.00	100.00	0.00
4	98.40	3.01	96.39	6.87
8	97.84	1.20	15.07	0.94
12	94.21	4.47	7.19	1.33
16	92.24	4.62	0.91	0.40
20	84.66	6.73	0.03	0.00

ตารางที่ ง.4 จำนวนแบคทีเรีย RN402 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟริน ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Viable plate count

วัน	จำนวนของแบคทีเรีย (log CFM/มิลลิลิตร)			
	ชุดควบคุมที่ไม่เติมไฟริน		ชุดทดลองที่เติมไฟริน	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD.
0	6.32	0.08	6.52	0.02
4	7.36	0.05	7.76	0.30
8	7.99	0.07	7.95	0.08
12	7.09	0.02	8.05	0.07
16	7.05	0.13	7.92	0.13

ตารางที่ ง.5 การรอดชีวิตของแบคทีเรียของแบคทีเรียแขวนลอยที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน (log CFM/มิลลิลิตร)

สารละลาย	เวลา (วัน)	อุณหภูมิ 4°ซ			อุณหภูมิ 30°ซ		
		จำนวน แบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ย	SD	จำนวน แบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ย	SD
CFMM	0	9.97	9.894	0.133	9.288	9.262	0.024
		9.97			9.241		
		9.74			9.258		
	10	9.45	9.466	0.020	8.991	9.010	0.017
		9.49			9.013		
		9.45			9.025		
	20	9.59	9.551	0.079	8.188	8.135	0.048
		9.46			8.124		
		9.61			8.093		
	30	8.64	8.781	0.123	7.978	7.985	0.025
		8.88			7.964		
		8.82			8.013		
CFMM+0.25 %(w/v) ของ โซเดียมอะซิเตท	0	9.771	9.742	0.088	9.556	9.594	0.100
		9.643			9.519		
		9.813			9.708		
	10	9.531	9.559	0.024	7.978	7.894	0.114
		9.571			7.940		
		9.575			7.763		
	20	9.233	9.289	0.232	7.785	7.784	0.043
		9.090			7.826		
		9.544			7.740		
	30	8.775	8.618	0.168	7.771	7.717	0.050
		8.637			7.672		
		8.441			7.708		
0.1xLB	0	9.839	9.808	0.028	9.262	9.258	0.026
		9.785			9.230		
		9.799			9.281		

สารละลาย	เวลา (วัน)	อุณหภูมิ 4 °ซ			อุณหภูมิ 30 °ซ		
		จำนวน แบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ย	SD	จำนวน แบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ย	SD
	10	9.598	9.550	0.079	8.892	8.899	0.103
		9.459			8.799		
		9.593			9.004		
	20	9.531	9.408	0.174	8.149	8.143	0.054
		9.483			8.086		
		9.210			8.193		
	30	8.556	8.622	0.060	7.326	7.232	0.095
		8.635			7.137		
		8.674			7.233		
PB	0	9.362	9.421	0.067	9.185	9.155	0.094
		9.408			9.230		
		9.494			9.049		
	10	9.176	9.171	0.055	8.699	8.589	0.295
		9.223			8.813		
		9.114			8.255		
	20	9.279	9.161	0.102	8.230	8.118	0.115
		9.104			8.124		
		9.100			8.000		
	30	8.623	8.605	0.032	8.230	8.276	0.059
		8.623			8.255		
		8.568			8.342		

ตารางที่ ง.6 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียแขวนลอยที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 วัน

สารละลาย	เวลา (วัน)	ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ (%)		ประสิทธิภาพการ ย่อยสลาย (%)	ค่าเฉลี่ย	SD
		ชุดควบคุม	ชุดทดลอง			
CFMM	0	94.57	16.37	82.69	87.13	8.743
		91.10	2.54	97.21		
		85.31	15.77	81.52		

	30	94.57	0.04	99.96	99.90	0.11
		91.10	0.21	99.77		
		85.31	0.02	99.98		
CFMM+0.25	0	94.57	28.58	69.78	73.01	3.04
% (w/v) ของ		91.10	22.03	75.81		
ไซเดียมอะซี		85.31	22.64	73.46		
เตท	30	94.57	0.14	94.57	88.38	19.81
		91.10	0.19	99.79		
		85.31	29.43	65.51		
10xLB	0	94.57	44.26	53.19	69.80	14.38
		91.10	19.89	78.17		
		85.31	18.73	78.05		
	30	94.57	5.59	94.08	97.48	2.94
		91.10	0.27	99.7		
		85.31	1.13	98.68		
PB	0	94.57	22.82	75.87	75.12	0.64
		91.10	23.01	74.74		
		85.31	21.53	74.76		
	30	94.57	3.71	96.07	91.89	10.60
		91.10	18.37	79.83		
		85.31	0.19	99.78		

ตารางที่ ง.7 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพลีนของแบคทีเรียแขวนลอยที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน

สารละลาย	เวลา (วัน)	ปริมาณไพลีนที่เหลืออยู่ (%)		ประสิทธิภาพการ ย่อยสลาย (%)	ค่าเฉลี่ย	SD
		ชุดควบคุม	ชุดทดลอง			
CFMM	94.57	78.91	19.94	74.48	4.56	94.57
	91.10	69.81	27.50			91.10
	85.31	74.71	21.58			85.31

	94.57	99.98	0.02	99.97	0.02	94.57
	91.10	99.94	0.05			91.10
	85.31	99.98	0.02			85.31
CFMM+0.25%	94.57	83.27	15.82	79.94	3.54	94.57
(w/v) ของ	91.10	80.32	17.93			91.10
โซเดียมอะซิเตท	85.31	76.22	20.29			85.31
	94.57	99.93	0.07	99.86	0.11	94.57
	91.10	99.74	0.24			91.10
	85.31	99.93	0.06			85.31
10xLB	94.57	84.25	14.89	78.99	6.79	94.57
	91.10	71.33	26.12			91.10
	85.31	81.40	15.87			85.31
	94.57	99.38	0.59	99.46	0.12	94.57
	91.10	99.41	0.54			91.10
	85.31	99.60	0.34			85.31
PB	94.57	80.13	18.79	74.24	6.59	94.57
	91.10	67.13	29.94			91.10
	85.31	75.46	20.93			85.31
	94.57	99.78	0.20	93.99	9.22	94.57
	91.10	98.84	1.06			91.10
	85.31	83.36	14.20			85.31

ตารางที่ ง.8 การรอดชีวิตของแบคทีเรียแขวนลอยที่มีการเติมสารรักษาสภาพจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °ซ เป็นเวลา 30 วัน จากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $9.63 \pm 0.31 \log \text{CFU/มิลลิลิตร}$

สารรักษาสภาพ จุลินทรีย์	ความเข้มข้น % (v/w)	อุณหภูมิ (°ซ)	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
ชุดควบคุม (PB)	-	4	8.38	8.36	9.63	8.79	0.73
		30	8.08	8.63	8.18	8.30	0.30

สารรักษาสภาพ จุลินทรีย์	ความเข้มข้น % (v/w)	อุณหภูมิ (°ซ)	จำนวนแบคทีเรีย			ค่าเฉลี่ย	SD
			(log CFU/มิลลิลิตร)				
ซอร์บิทอล	1	4	8.97	8.36	8.97	8.77	0.35
		30	6.97	7.18	7.36	7.17	0.20
	5	4	8.18	8.36	8.36	8.30	0.11
		30	6.97	6.97	6.88	6.94	0.05
กลูโคส	1	4	7.63	7.63	7.97	7.75	0.19
		30	7.32	7.18	6.88	7.12	0.23
	5	4	6.97	6.63	7.32	6.97	0.34
		30	6.58	6.97	6.32	6.62	0.33
แลกโทส	1	4	8.36	8.18	8.46	8.33	0.15
		30	7.04	7.36	7.36	7.25	0.18
	5	4	7.66	7.63	7.97	7.75	0.19
		30	6.63	6.58	7.18	6.80	0.33
	10	4	7.66	7.66	7.36	7.56	0.17
		30	7.32	7.32	7.63	7.43	0.18
ทรีฮาโลส	1	4	8.63	8.63	8.58	8.62	0.03
		30	7.97	7.63	7.18	7.59	0.40
	5	4	8.32	8.36	8.58	8.42	0.14
		30	7.97	7.63	7.36	7.65	0.30
	10	4	8.66	8.63	8.81	8.70	0.09
		30	6.88	6.97	6.32	6.72	0.35
กลีเซอรอล	1	4	9.18	8.97	9.18	9.11	0.12
		30	8.32	8.63	8.58	8.51	0.17
	5	4	8.97	8.63	8.58	8.73	0.21
		30	7.20	7.36	7.36	7.31	0.09
PEG	1	4	9.04	9.08	8.96	9.03	0.06
		30	7.81	7.63	7.97	7.80	0.17
	5	4	8.38	9.63	9.58	9.20	0.71

สารรักษาสภาพ จุลินทรีย์	ความเข้มข้น % (v/w)	อุณหภูมิ (°ซ)	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
		30	7.30	7.30	7.36	7.32	0.04
ไกลซีน	1	4	6.08	6.63	6.20	6.31	0.29
		30	5.18	4.88	5.58	5.21	0.35
	5	4	6.87	6.63	6.58	6.69	0.15
		30	5.04	5.63	5.88	5.52	0.43
โปรลีน	1	4	8.38	8.87	7.97	8.41	0.45
		30	6.97	6.63	7.18	6.93	0.27
	5	4	8.20	8.18	8.58	8.32	0.23
		30	6.56	6.45	5.81	6.27	0.41

ตารางที่ ง.9 การรอดชีวิตของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ 4 °ซ เป็นเวลา 180 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10^9 CFU/มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมคือ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB และชุดทดลองคือ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB ที่เติม 1% กลีเซอรอล

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/มิลลิลิตร)					
	ชุดควบคุม (PB)	ค่าเฉลี่ย	SD	PB + 1% กลีเซอรอล	ค่าเฉลี่ย	SD
30	9.18	9.11	0.12	8.32	8.51	0.17
	8.97			8.63		
	9.18			8.58		
60	8.63	8.66	0.30	8.08	8.19	0.12
	8.97			8.32		
	8.38			8.18		
90	8.66	8.42	0.39	7.32	7.49	0.42
	8.63			7.18		
	7.97			7.97		
120	6.97	6.62	0.47	7.38	7.61	0.21
	6.80			7.66		
	6.08			7.80		
150	6.97	6.86	0.09	7.38	7.57	0.16
	6.80			7.66		

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/มิลลิลิตร)					
	ชุดควบคุม (PB)	ค่าเฉลี่ย	SD	PB + 1% กลีเซอรอล	ค่าเฉลี่ย	SD
180	6.80			7.66		
	6.97	6.65	0.31	6.97	7.32	0.33
	6.36			7.63		
	6.63			7.36		

ตารางที่ ง.10 การรอดชีวิตของแบคทีเรียสุตรน้ำ RN402 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ 30 °ซ เป็นเวลา 180 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10⁹ CFU/มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมคือ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB และชุดทดลองคือ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB ที่เติม 1% กลีเซอรอล

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/มิลลิลิตร)					
	ชุดควบคุม (PB)	ค่าเฉลี่ย	SD	PB + 1% กลีเซอรอล	ค่าเฉลี่ย	SD
30	8.97	8.73	0.21	7.20	7.31	0.09
	8.63			7.36		
	8.58			7.36		
60	8.38	7.94	0.41	7.66	7.13	0.68
	7.87			7.38		
	7.58			6.36		
90	7.81	7.45	0.44	6.97	6.63	0.51
	6.96			6.04		
	7.58			6.88		
120	5.97	6.01	0.06	6.88	7.09	0.23
	5.97			7.32		
	6.08			7.08		
150	5.97	6.01	0.06	6.88	7.01	0.12
	5.97			7.08		
	6.08			7.08		
180	5.63	5.86	0.19	6.32	6.59	0.24
	5.97			6.63		
	5.97			6.80		

ตารางที่ ง.11 การรอดชีวิตของแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส RN402 ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 270 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10^{12} CFU/มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมคือ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB และชุดทดลองคือ แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB ที่เติม 1% กลีเซอรอล

เวลา (วัน)	ชุดควบคุม (PB)					PB + 1% กลีเซอรอล				
	(log CFU/ml)		ค่าเฉลี่ย	SD		(log CFU/ml)		ค่าเฉลี่ย	SD	
0	12.33	11.88	12.06	12.09	0.1878	12.06	12.06	12.33	12.15	0.1281
30	10.97	10.88	10.97	10.94	0.0440	10.97	10.87	11.63	11.16	0.3393
60	9.97	9.88	10.18	10.01	0.1258	10.32	10.63	10.63	10.53	0.1467
90	9.78	9.70	9.48	9.65	0.1274	10.38	10.26	10.63	10.42	0.1573
120	8.32	8.62	8.96	8.64	0.2621	9.97	9.97	9.81	9.91	0.0765
150	9.04	9.00	8.95	9.00	0.0356	9.34	9.48	9.26	9.36	0.0913
180	8.78	8.00	8.90	8.56	0.3995	9.08	9.23	9.18	9.16	0.0626
270	6.78	6.70	6.48	6.65	0.1274	8.23	8.00	7.95	8.06	0.1209

ตารางที่ ง.12 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรีนของแบคทีเรียสเตรปโทคอกคัส RN402 ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 270 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10^{12} CFU/มิลลิลิตร แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB

เวลา (วัน)	ปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ (%)		ประสิทธิภาพการย่อย (%)	ค่าเฉลี่ย	SD
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง			
0	98.32	30.96	68.50	72.06	5.69
	99.28	30.72	69.05		
	93.67	20.02	78.62		
30	99.41	1.84	98.14	97.90	0.20
	95.71	2.12	97.78		
	99.86	2.22	97.77		
60	93.37	2.22	97.61	97.27	0.29
	95.37	2.77	97.08		
	99.46	2.86	97.11		
90	100.91	3.17	96.85	97.43	0.55
	102.82	2.10	97.95		

	97.30	2.43	97.50		
120	97.54	2.15	97.78	98.53	0.71
	93.10	1.30	98.59		
	105.81	0.83	99.21		
150	95.79	32.17	66.41	70.7	7.34
	104.61	25.11	75.99		
	99.45	29.21	70.62		
270	94.65	94.65	0	0	0
	95.67	95.67	0		
	101.50	101.50	0		

ตารางที่ ง.13 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรีนของแบคทีเรียสเตรปโทมัยซิส RN402 ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 270 วัน ที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10¹² CFU/มิลลิลิตร แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย PB ที่เติม 1% กลีเซอรอล

เวลา (วัน)	ปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ (%)		ประสิทธิภาพการย่อย (%)	ค่าเฉลี่ย	SD
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง			
0	98.32	39.08	60.25	74.61	14.10
	99.28	24.68	75.14		
	93.68	10.84	88.43		
30	99.41	2.17	97.81	97.96	0.19
	95.71	2.01	97.90		
	99.87	1.82	98.18		
60	93.37	1.68	98.20	98.54	0.30
	95.38	1.22	98.72		
	99.47	1.29	98.70		
90	100.91	1.89	98.13	98.05	0.70
	102.82	2.76	97.32		
	97.31	1.26	98.71		
120	97.54	1.92	98.03	98.62	0.55
	93.11	0.83	99.10		
	105.81	1.35	98.72		
150	98.37	24.72	74.87	71.80	7.12

	98.19	30.12	69.32		
	73.44	22.18	69.80		
270	94.65	84.06	11.19	10.38	0.98
	95.68	85.49	10.65		
	101.51	92.08	9.29		

ตารางที่ ง.14 ปริมาณไฟรินที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายไฟรินของแบคทีเรียสูตรน้ำ RN402 ในระบบนิเวศจำลองดิน ที่ความเข้มข้นไฟรินเริ่มต้น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดิน

ชุดทดลอง	เวลา (สัปดาห์)	ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%)	ค่าเฉลี่ย	SD
abiotic control	0	100.00	100.00	0.00
		100.00		
		100.00		
	2	91.04	94.0	2.92
		96.88		
		94.14		
	4	86.52	94.55	6.99
		97.84		
		99.28		
biostimulaton	0	100.00	100.00	0.00
		100.00		
		100.00		
	2	83.67	85.61	7.97
		94.37		
		78.79		
	4	68.90	76.47	6.58
		80.79		
		79.73		
bioaugmentation I	0	100.00	100.00	0.00
		100.00		
		100.00		
	2	90.21	62.71	31.88
		70.17		
		27.76		

ชุดทดลอง	เวลา (สัปดาห์)	ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%)	ค่าเฉลี่ย	SD
bioaugmentation II	4	27.79	23.75	11.28
		32.46		
		11.00		
	0	100.00	100.00	0.00
		100.00		
		100.00		
	2	18.30	33.02	28.29
		15.12		
		65.64		
	4	0.00	0.00	0.00
		0.00		
		0.00		

ตารางที่ ง.15 แบคทีเรียทั้งหมดในระบบนิเวศจำลองดิน (MPN/กรัม ดิน)

เวลา (สัปดาห์)	abiotic control		biostimulaton		bioaugmentation I		bioaugmentation II	
0	0.00E+00	0.00E+00	9.30E+07	9.30E+07	2.30E+08	1.39E+08	9.30E+06	1.33E+08
	0.00E+00		9.30E+07		9.30E+07		1.50E+08	
	0.00E+00		9.30E+07		9.30E+07		2.40E+08	
2	0.00E+00	0.00E+00	9.30E+07	3.55E+07	1.39E+08	3.21E+08	1.33E+08	3.70E+08
	0.00E+00		4.30E+06		7.50E+08		9.30E+08	
	0.00E+00		9.30E+06		7.50E+07		4.60E+07	
4	0.00E+00	7.67E+02	2.10E+07	1.58E+07	9.30E+07	4.43E+08	4.30E+07	9.28E+08
	0.00E+00		1.15E+07		3.06E+08		3.40E+08	
	2.30E+03		1.50E+07		9.30E+08		2.40E+09	

ตารางที่ ง.16 แบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรินในระบบนิเวศจำลองดิน (MPN/กรัม ดิน)

เวลา (สัปดาห์)	abiotic control		biostimulaton		bioaugmentation I		bioaugmentation II	
0.00E+00	0.00E+00	2.80E+04	2.57E+04	4.30E+08	2.96E+08	1.20E+08	1.02E+08	0.00E+00
0.00E+00		2.10E+04		2.80E+07		9.30E+07		0.00E+00
0.00E+00		2.80E+04		4.30E+08		9.30E+07		0.00E+00
0.00E+00	0.00E+00	9.30E+05	1.78E+06	1.80E+08	1.41E+08	2.90E+08	3.10E+08	0.00E+00
0.00E+00		2.40E+06		9.30E+07		4.30E+08		0.00E+00

เวลา (สัปดาห์)	abiotic control	biostimulaton	bioaugmentation I	bioaugmentation II
0.00E+00	2.00E+06	1.50E+08	2.10E+08	0.00E+00
0.00E+00	0.00E+00	2.40E+07	1.61E+07	9.30E+08
0.00E+00	9.30E+06	2.40E+09	1.50E+09	0.00E+00
0.00E+00	1.50E+07	7.50E+08	1.20E+09	0.00E+00

ตารางที่ ง.17 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *nidA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดินจากชุดทดลอง bioaugmentation II ด้วยวิธี real-time qPCR

ชุดทดลอง	MPN/กรัม ดิน	ค่าเฉลี่ย
Biostimulation in 0 week	3.77E+05	1.44E+06
Biostimulation in 2 weeks	3.89E+07	3.63E+07
Biostimulation in 4 weeks	3.67E+08	3.03E+08
Bioaugmentation I in 0 week	7.09E+08	2.63E+08
Bioaugmentation I in 2 weeks	2.80E+09	2.26E+09
Bioaugmentation I in 4 weeks	2.36E+09	7.85E+08
Bioaugmentation II in 0 week	6.92E+08	7.59E+08
Bioaugmentation II in 2 week	1.71E+10	3.06E+10
Bioaugmentation II in 4 week	7.10E+10	7.27E+10

ตารางที่ ง.18 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตมน้ำในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ชนิดของน้ำมัน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน (%)	ค่าเฉลี่ย	SD		
V-120	100	85.17	90.22	88.05	87.81	2.11
PTT biodiesel	100	88.54	97.13	92.76	92.93	6.82
PTT Diesel	100	99.43	97.94	96.87	98.17	0.67
Dynamic Super Synthetic	100	66.29	55.12	52.22	57.87	7.49
Dynamic premier	100	43.49	27.95	24.31	31.92	12.95
Dynamic Synthetic	100	48.37	29.78	49.25	42.47	12.43
Grease	100	69.19	70.03	83.18	74.15	7.34
Performa	100	74.44	50.27	50.14	58.28	14.59
Performa Semi-Synthetic	100	46.9	58.23	39.18	48.08	8.08
Performa Synthetic	100	28.11	19.3	37.82	28.41	8.79

ชนิดของน้ำมัน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน (%)			ค่าเฉลี่ย	SD
V-120	200	80.9	74.33	87.18	80.22	6.72
PTT biodiesel	200	74.16	53.78	69.99	65.99	0.93
PTT Diesel	200	96.35	94.61	82.04	91.00	14.12
Dynamic Super Synthetic	200	40.22	28.71	24.38	31.63	11.60
Dynamic premier	200	14.5	35.12	38.08	29.43	0.99
Dynamic Synthetic	200	24.97	40.95	48.76	38.92	10.68
Grease	200	57.82	27.6	21.08	35.59	19.79
Performa	200	48.38	47.12	61.59	52.72	8.52
Performa Semi-Synthetic	200	50.26	55.87	22.12	42.52	10.31
Performa Synthetic	200	12.31	28.51	16.43	19.06	13.84

ตารางที่ ง.19 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ในการย่อยสลายอัลเคน น้ำมันดีเซล และน้ำมันดิบ

ชนิด	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (%)			ค่าเฉลี่ย	SD
น้ำมันดีเซล	81.47	92.79	97.14	89.02	12.06
น้ำมันดิบ	91.04	80.57	76.39	82.67	7.55
n-เตตระเดเคน	92.07	91.75	93.86	92.56	1.13
n-เฮกซะดีเคน	68.93	58.71	68.93	65.53	5.90

ตารางที่ ง.20 การถูกย่อยสลายของวัสดุที่ลอยอยู่ในน้ำเสียที่มีน้ำมันดีเซล 2 % (w/v)

วัสดุ	น้ำหนัก		การถูกย่อยสลายตัว		SD
	ก่อนใช้งาน	หลังใช้งาน	(%)		
BCN012	943.6	941.2	0.254345	0.216867	0.065335
	848.5	847.3	0.141426		
	941.8	939.4	0.254831		
BCN009	999.4	998.4	0.10006	0.182001	0.113527
	1042	1040.6	0.134357		
	1027	1023.8	0.311587		
Dazs Bio- Ring S-	1797.3	1789	0.461804	0.316314	0.19064
	1890.5	1888.6	0.100503		

วัสดุ	น้ำหนัก		การถุกย่อยสลายตัว (%)	SD
	ก่อนใช้งาน	หลังใช้งาน		
1320	1008.7	1004.8	0.386636	

ตารางที่ ง.21 ประสิทธิภาพของเซลล์ตริง RN402 ในการกำจัดน้ำมันของชุดทดลองโดยการ
ออกแบบการทดลองแบบส่วนกลาง

ชุด ทดลองที่	ไนโตรเจน (กรัม/ ลิตร)	ฟอสฟอรัส (กรัม/ ลิตร)	น้ำมัน (มิลลิกรัม/ ลิตร)	การกำจัดน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
1	2.5	2	2000	1801.19	1509.82	1725.87	1678.96	911.33
2	7.5	2	2000	1751.44	1428.15	1785.30	1654.96	904.03
3	2.5	6	2000	1645.11	1763.86	1746.86	1718.61	922.17
4	7.5	6	2000	1643.96	1717.44	1701.39	1687.60	909.12
5	2.5	2	8000	3620.26	3447.25	3174.67	3414.99	225.98
6	7.5	2	8000	5876.84	5173.81	3507.73	4852.79	3096.81
7	2.5	6	8000	3029.42	2274.20	3368.30	2890.64	2676.30
8	7.5	6	8000	4491.62	4259.16	3867.67	4206.15	2873.52
9	0.795	4	5000	3314.54	3588.90	3838.31	3580.59	2059.26
10	9.205	4	5000	3890.88	3826.33	4129.51	3948.90	2179.41
11	5	0.636	5000	2080.96	2713.64	2594.83	2463.14	1767.08
12	5	7.364	5000	2989.34	2173.64	2795.49	2652.82	1810.84
13	5	4	46	15.88	28.12	15.88	19.96	13.56
14	5	4	10046	2355.85	6768.50	6900.29	5341.55	3871.32
15	5	4	5000	3629.16	4333.09	4492.13	4151.46	2263.98
16	5	4	5000	4217.03	4316.27	4046.36	4193.22	2267.05

ภาคผนวก จ

ตารางแปรผลปริมาณแบคทีเรียมีชีวิตรโดยวิธี MPN

ตารางที่ จ.1 แสดงการแปรผลปริมาณแบคทีเรียมีชีวิตรโดยวิธี MPN

Positive tube				MPN/มิลลิลิตร	Positive tube				MPN/มิลลิลิตร
0	0	0		<3.0	2	2	0	21	
0	0	1		3.0	2	2	1	28	
0	1	0		3.0	2	2	2	35	
0	1	1		6.1	2	3	0	29	
0	2	0		6.2	2	3	1	36	
0	3	0		9.4	3	0	0	23	
1	0	0		3.6	3	0	1	38	
1	0	1		7.2	3	0	2	64	
1	0	2		11	3	1	0	43	
1	1	0		7.4	3	1	1	75	
1	1	1		11	3	1	2	120	
1	2	0		11	3	1	3	160	
1	2	1		15	3	2	0	93	
1	3	0		16	3	2	1	150	
2	0	0		9.2	3	2	2	210	
2	0	1		14	3	2	3	290	
2	0	2		20	3	3	0	240	
2	1	0		15	3	3	1	460	
2	1	1		20	3	3	2	1100	
2	1	2		27	3	3	3	>1100	

ที่มา: Lindquist (2001)

การคำนวณปริมาณแบคทีเรียโดยวิธี MPN

ปริมาณแบคทีเรียบนไบโอบอล (MPN/ชุดทดลอง) = ปริมาณแบคทีเรียจากตาราง x dilution factor

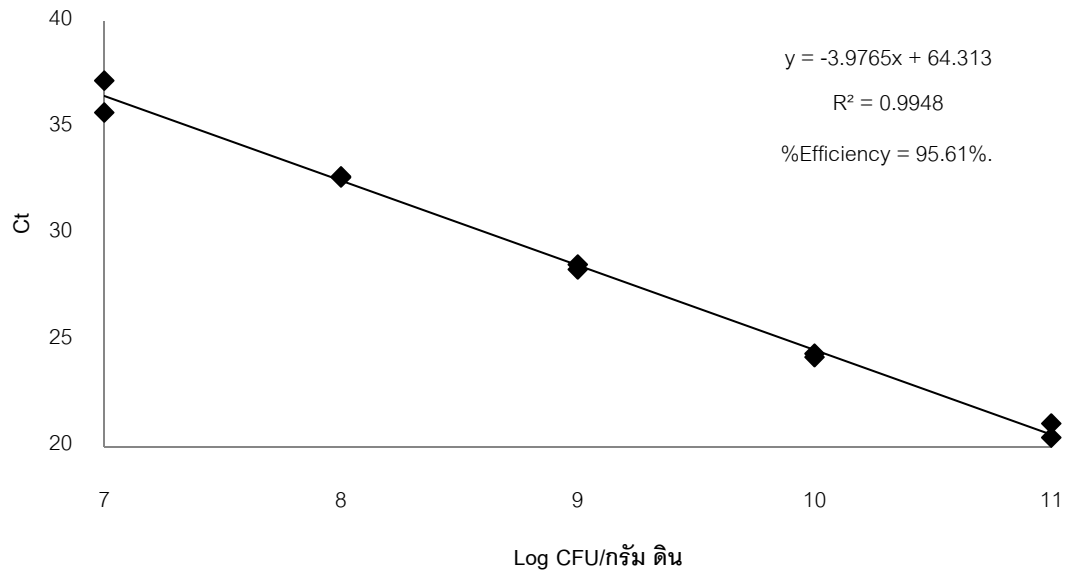
- หมายเหตุ** - ปริมาณแบคทีเรียบนไบโอบอล (MPN/ชุดทดลอง) หมายถึง ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตบนไบโอบอล 1 กรัม ในอาหารเหลว CFMM 50 มิลลิลิตร
- dilution factor คือค่าการเจือจาง

ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลว (MPN/ชุดทดลอง) = ปริมาณแบคทีเรียตาราง x dilution factor

- หมายเหตุ** - ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM (MPN/ชุดทดลอง) หมายถึง ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิต ในอาหารเหลว CFMM 50 มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วย real-time PCR



รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานระหว่างระหว่างค่า C_t และดีเอ็นเอเจือจาง 10 เท่า ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งสกัดมาจากดินที่ปริมาณเชื้อ RN402 เท่ากับ 1×10^{12} (log MPN/กรัม ดิน)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ผู้เขียน	นางสาว วรณรรักษ์ นพเจริญกุล
ที่อยู่	25/161 ถ.พิบูลสงคราม ต.บางเขน อ.เมือง จ.นนทบุรี
2543	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
2547	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2551	เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2548-ปัจจุบัน	ตำแหน่ง อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย) สาขาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
อีเมล	n.wannarak@gmail.com

การเผยแพร่ผลงานวิชาการ

ระดับชาติและนานาชาติ

1. Nopcharoenkul, W., Pinphanichakarn, P. and Pinyakong, O. (2009) Liquid formulation of pyrene-degrading *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. Poster Presentation. In 21st Annual Meeting and International Conference of The Thai Society for Biotechnology, September 24-25, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand
2. Nopcharoenkul, W., Pinphanichakarn, P. and Pinyakong, O. 2010. Liquid formulation of *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 and its application in pyrene-contaminated soil treatment. Poster Presentation. In American Society for Microbiology 110th General Meeting, May 23-27, San Diego, CA, USA.
3. Nopcharoenkul, W., Netsakulnee, P., and Pinyakong, O. 2011. Biodegradation of diesel by free and immobilized *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. Poster Presentation. 15th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, September 19-24, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria.

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. Klankeo, P., Nopcharoenkul, W., and Pinyakong, O. 2009. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil. Journal of Bioscience and Bioengineering. 108: 488-495.
2. Nopcharoenkul, W., Pinphanichakarn, P., and Pinyakong, O. 2011. The development of a liquid formulation of *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 and its application in the treatment of pyrene-contaminated soil. Journal of Applied Microbiology. 111: 36-47.
3. Nopcharoenkul, W., Netsakulnee, P. and Pinyakong, O. 2012. Diesel oil removal by immobilized *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. Biodegradation (under revision).