บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำมันที่ถูกปลดปล่อย และปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำต่าง ๆ ส่วนใหญ่มาจากแหล่งกำเนิดที่อยู่บนพื้นดิน เช่น น้ำเสียจากโรงกลั่นน้ำมันชายฝั่ง น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ น้ำเสียจากแหล่งชุมชน น้ำจากแม่น้ำ น้ำที่ไหลบ่าลงมาจากพื้นที่ต่าง ๆ บนบก เช่น สถานีบริการน้ำมัน คลังน้ำมัน พื้นที่การเกษตร ถนนหนทาง และกองขยะต่าง ๆ เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีสารไฮโดรคาร์บอนจากน้ำมันที่ถูกปลดปล่อยจากยานพาหนะต่าง ๆ และจากการเผาไหม้อื่น ๆออกสู่บรรยากาศ จากนั้นก็ถูกฝนชะตกลงมายังพื้นดิน หรือตกลงมาเอง แล้วลงสู่แหล่งน้ำในที่สุด และการปนเปื้อนของน้ำมันจากน้ำที่ไหลบ่าจากพื้นดินที่พบมากที่สุดก็คือ น้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว หรือที่เรียกกันว่า น้ำมันเครื่องเก่า (ทูเฟก ซิส, 2534) จึงกล่าวได้ว่า แหล่งที่มาของสารไฮโดรคาร์บอน จากแหล่งกำเนิดที่อยู่บนพื้นดินนี้ มีทั้งที่มาจากน้ำมันโดยตรง (petrogenic sources) และจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงต่าง ๆ (pyrogenic sources) ประกอบกับปัจจุบันนี้ เริ่มจะมีการใช้น้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ (synthetic lubricating oil) แทนน้ำมันหล่อลื่นทั่วไปกันมากขึ้น เนื่องจาก เป็นน้ำมันหล่อลื่นที่มีประสิทธิภาพในการหล่อลื่นสูงกว่าน้ำมันหล่อลื่นที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียมโดยตรง จึงมีส่วนในการลดการใช้น้ำมันหล่อลื่นที่มาจากแหล่งปิโตรเลียมซึ่งมีอยู่จำกัดลง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติที่ดี คือ สามารถถูกสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) จึงคาดการณ์ว่าในอนาคตจะมีการใช้กันมากขึ้น และมีการปล่อยออกมา ทั้งทางท่อระบายน้ำทิ้ง น้ำที่ไหลผ่านบ้านเรือน ชุมชน ถนนหนทางต่าง ๆ น้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์เก่าหรือน้ำมันเครื่องเก่า จึงเป็นสิ่งที่ควรให้ความสนใจ และเฝ้าระวังติดตาม เพราะนอกจากจะมีแนวโน้มถูกปล่อยออกมาในปริมาณสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามความเจริญของชุมชนแล้ว น้ำมันเครื่องยนต์ หรือน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ใช้แล้วเหล่านี้ ยังประกอบด้วยสาร Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ที่เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ในปริมาณสูง และสาร PAHs เหล่านี้ก็นับเป็นสารก่อมะเร็งที่สำคัญกลุ่มหนึ่ง(Wells และคณะ, 1993) จึงอาจส่งผลต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์ได้

น้ำมันเครื่อง หรือน้ำมันหล่อลื่นส่วนใหญ่ที่ปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมนั้น มักเป็นน้ำมันหล่อลื่นชนิดต่าง ๆ และน้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ที่มาจากสถานีบริการน้ำมัน โรงกลั่นน้ำมัน โรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านอุตสาหกรรมโลหะ และการขนส่ง แต่ที่เห็นได้เด่นชัด ก็คือ สถานีบริการน้ำมัน ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการปลดปล่อยน้ำมันหล่อลื่นชนิดต่าง ๆลงสู่สิ่งแวดล้อมค่อนข้างสูง โดย

เฉพาะแหล่งน้ำ ซึ่งจะก่อให้เกิดมลพิษทางน้ำ คือ, มีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำ สิ่งมีชีวิต และระบบนิเวศน์ของแหล่งน้ำ ทำให้การใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติจากแหล่งน้ำของมนุษย์ลดน้อยลง ส่งผลกระทบต่ออาชีพ รายได้ของประชาชน และเศรษฐกิจของประเทศชาติ ดังนั้น เพื่อเป็นการเตรียมรับสถานการณ์ อันเกิดจากการสะสมของมลพิษที่เกิดจากน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ จนเกิดภาวะสมดุลทางธรรมชาติจะกำจัดให้หมดสิ้นไป ประกอบกับยังไม่มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์โดยตรง จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษา การสลายชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ (Esso ultron ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานจำพวกเอสเทอร์สังเคราะห์ และ Castrol GTX ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานจำพวกไฮโดรคาร์บอนสังเคราะห์ที่คล้ายกับปิโตรเลียม ที่ยังไม่ได้ผ่านการใช้งาน เป็นโครงการนำร่อง ก่อนที่จะทำการศึกษาการสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ผ่านการใช้งานแล้วต่อไป) เพื่อช่วยให้เกิดการสลายตัวเร็วขึ้นกว่าในธรรมชาติ จึงได้ใช้แบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Pseudomonas putida* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (strickly aerobic bacteria) และ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (facultative anaerobic bacteria) และสามารถสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงคาดว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้น่าจะสามารถสลายสารประกอบเอสเทอร์สังเคราะห์ และไฮโดรคาร์บอนสังเคราะห์ซึ่งเป็นน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานของน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ดังกล่าวนี้ได้

วัตถุประสงค์การศึกษา

เพื่อศึกษาการสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารพื้นฐานที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas putida, Bacillus subtilis* และเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกัน ในห้องปฏิบัติการ

สมมติฐานการศึกษา

1. *Psudomonas putida* และ *Bacillus subtilis* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารอาหารพื้นฐานที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ระดับความเข้มข้นเดียวกัน จะมีลักษณะแตกต่างกัน
2. การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารอาหารพื้นฐานที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของ *Pseudomonas putida, Bacillus subtilis* และเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกัน

ขอบเขตการศึกษา

ขั้นตอนแรก ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทั่วไปของแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* 12 สายพันธุ์ และ *Bacillus subtilis* 8 สายพันธุ์ ก่อนที่จะคัดเลือกชนิดละ 1 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการศึกษา (ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข)

ขั้นตอนที่สอง ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิด ๆ ละ 1 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่มีสารอาหารพื้นฐาน (mineral base medium) และที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (tryptic soy broth) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ด้วยวิธีทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization) โดยมีปริมาตรตัวอย่างละ 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วปิดปากขวดด้วยสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าตลอดเวลา ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เพื่อให้มีการถ่ายเทออกซิเจนจากอากาศลงสู่ตัวอย่างได้ และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28.5 - 35.0 องศาเซลเซียส) เพื่อวัดการเจริญเติบโต และระยะเวลาแบ่งตัวต่อรุ่น (generation หรือ growth doubling time) โดยการนับจำนวนเซลล์ หรือโคโลนีของแบคทีเรีย ด้วยเครื่องนับโคโลนี โดยวิธี total plate count เทคนิค spread plate ในชั่วโมงที่ 0 (เริ่มต้น), 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 48, 72, 96, 120, 144,168, 192, 216, 240, 288, 336, 408, 504, 672, 912, 1,152 และ 1,440 ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ขั้นตอนที่สาม ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิด ๆ ละ 1 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MBM ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา 2 ชนิด คือ น้ำมันหล่อลื่นฯ Esso ultron และ Castrol GTX แต่ละชนิด ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร หรือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ 0.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ ลงในอาหารชนิดเหลว MBM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยมีปริมาตรตัวอย่างละ 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิมิตร แล้วปิดปากขวดด้วยกระดาษอลูมิเนียม เพื่อป้องกันการปนเปื้อน และปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมแบคทีเรียแต่ละชนิด (ที่ได้ผ่านการทดสอบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ (sterility) ก่อนที่จะนำมาใช้ศึกษา คือ ต้องไม่มีเชื้อชนิดอื่น ๆ) ดังเช่นขั้นตอนที่สอง ลงไปในตัวอย่างดังกล่าว และเอาสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิดปากขวดแทนกระดาษอลูมิเนียม แล้วดำเนินการทดลองต่อไป ดังเช่นขั้นตอนที่สอง โดยมีตัวควบคุมที่ไม่เติมน้ำมัน และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อวัดการเจริญเติบโต และระยะเวลาแบ่งตัวต่อรุ่น เช่นเดียวกัน

ขั้นตอนที่สี่ ศึกษาการลดลงของน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ 2 ชนิด ในอาหารชนิดเหลว MBM โดยดำเนินการทดลอง ดังเช่นขั้นตอนที่สาม แต่เติมน้ำมันเฉพาะระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิดอย่างเหมาะสม ที่ได้จากผลการทดลองขั้นตอนที่สาม แล้วเติมแบคทีเรียแต่ละชนิด และทั้งสองชนิดร่วมกัน ลงในตัวอย่างดังกล่าว โดยมีตัวควบคุมที่ไม่เติม

น้ำมัน และตัวควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันที่ละลายในตัวอย่าง ด้วยวิธีการสกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซน (n - hexane) โดยใช้กรวยสำหรับแยกเพื่อหาปริมาณสารไฮโดรคาร์บอน โดยการชั่งน้ำหนัก และชนิดสารไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีไฮเปอร์ ฟอร์เมนท์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (High performance liquid chromatography) (HPLC), ในวันที่ 0 (เริ่มต้น), 7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ขั้นตอนที่ห้า วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารอาหารพื้นฐาน MBM คือ Na^+, K^+, NH_4^+, Mg^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-} และ PO_4^{3-} ด้วยวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (APHA, 1992) พร้อมทั้งวัดอุณหภูมิ (temperature) และวัดค่า พี - เอช (pH) ในวันที่ 0 (เริ่มต้น), 7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ขั้นตอนที่หก วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (Statistic Package for Social Sciences (SPSS for Window)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อทำการศึกษาการกำจัดน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ปนเปื้อน ในแหล่งน้ำ โดยใช้แบคทีเรีย

2. เป็นแนวทางในการกำจัดน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ปนเปื้อน ในแหล่งน้ำ โดยวิธีทางชีวภาพร่วมกันกับวิธีทางกายภาพ และ/หรือทางเคมี เพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพน้ำของแหล่งน้ำ