

การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากรากพืชน้ำและการตรึงบนเปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉด
เพื่อการบำบัดเชิงชีวภาพของน้ำปนเปื้อนดีเซล

นางสาวธัญชนก สุเริงฤทธิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION OF BACTERIAL CONSORTIUM FROM AQUATIC PLANT ROOTS
AND IMMOBILIZATION ON COCKLE SHELL AND WATER MIMOSA SPONGE
FOR BIOREMEDIATION OF DIESEL-CONTAMINATED WATER

Miss Thanchanok Surengrit



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากรากพืชน้ำและการตรึงบน
เปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉดเพื่อการบำบัดเชิง
ชีวภาพของน้ำปนเปื้อนดีเซล

โดย

นางสาวธัญชนก สุเริงฤทธิ์

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพระวัฒนา)

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ณัฐพันธุ์ ศุภกา)

ัญชนก สุเริงฤทธิ์ : การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากรากพืชน้ำและการตรึงบนเปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉดเพื่อการบำบัดเชิงชีวภาพของน้ำปนเปื้อนดีเซล (ISOLATION OF BACTERIAL CONSORTIUM FROM AQUATIC PLANT ROOTS AND IMMOBILIZATION ON COCKLE SHELL AND WATER MIMOSA SPONGE FOR BIOREMEDIATION OF DIESEL-CONTAMINATED WATER) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช, 145 หน้า.

กลุ่มแบคทีเรีย TS1 คัดแยกจากรากผักตบชวาจากแหล่งน้ำที่คาดว่ามีการปนเปื้อนดีเซล ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ 84.78% ภายใน 7 วัน ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย TS1 บนเปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉดโดยใช้วิธีการดูดซับ จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและ PCR-DGGE พบแบคทีเรียยีสต์เกาะบนเปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉดแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยและนมผักกระเฉดสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ 97.05% และ 96.26% ตามลำดับ ภายใน 7 วัน ซึ่งมีความสามารถเท่ากับแบคทีเรียอิสระ PCR-DGGE แสดงให้เห็นว่า หลังจากการย่อยสลาย 7 วัน พบ TS1 ทั้งบนวัสดุตรึงและอาหารเหลว เปลือกหอยและนมผักกระเฉดปลอดเชื้อสามารถดูดซับดีเซลได้ประมาณ 30% และ 70% ตามลำดับ นมผักกระเฉดเปื่อยยุ่ยหลังการทดสอบ 7 วัน ซึ่งแตกต่างจากเปลือกหอยไม่ถูกย่อยสลายทางชีวภาพ การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงและการย่อยสลายดีเซลพบว่า ความเข้มข้นเซลล์ที่เหมาะสมกับการตรึงคือ $6 \log \text{CFU/ml}$. ขนาดของเปลือกหอยที่เหมาะสมคือ 5×5 มิลลิเมตร ใช้เวลาในการตรึง 30 นาที กลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 1% 3% และ 5% โดยปริมาตรได้มากกว่าเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถใช้ซ้ำได้มากกว่า 5 รอบ สามารถเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงในถุงซิปลึ้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 เดือน โดยแบคทีเรียยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลได้ กลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลวที่มีปริมาณมากกว่า 20 เท่าของน้ำหนักเปลือกหอยได้ จากการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย TS1 โดยใช้ 16S rDNA พบว่า ในกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ประกอบด้วย *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Microbacterium* sp., *Shinella* sp., *Pusillimonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. และเชื้อเดี่ยวสามารถย่อยสลายดีเซลได้น้อยกว่ากลุ่มแบคทีเรีย TS1 อย่างมีนัยสำคัญ

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ปีการศึกษา 2558

5671983523 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: BACTERIAL CONSORTIUM / DIESEL / BIOREMEDIATION / COCKLE SHELL / IMMOBILIZATION / WATER MIMOSA SPONGE

THANCHANOK SURENGRIT: ISOLATION OF BACTERIAL CONSORTIUM FROM AQUATIC PLANT ROOTS AND IMMOBILIZATION ON COCKLE SHELL AND WATER MIMOSA SPONGE FOR BIOREMEDIATION OF DIESEL-CONTAMINATED WATER. ADVISOR: ASST. PROF.KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr.rer.nat., 145 pp.

Bacterial consortium TS1 was isolated from water hyacinth roots (*Eichhornia crassipes*), collected from diesel-contaminated fresh water. TS1 could utilize 84.78% of 1% diesel within 7 days. TS1 was immobilized on cockle shells and water mimosa sponges by adsorption method. Scanning electron microscope (SEM) revealed bacterial cells attached on the surface of shells and water mimosa sponges. The shell and water mimosa sponges immobilized cells could degrade 1% diesel 97.05% and 96.26% within 7 days, respectively. PCR-DGGE showed that TS1 was present on both carriers as well as in culture media. The sterile shells and water mimosa sponges could absorb diesel 30% and 70%, respectively. After 7 days, water mimosa sponges were decomposed but shells were not biodegradable. Factor affecting immobilization and diesel degradation revealed that the optimum of initial cell concentration, immobilization time and cockle shell size were 6 log CFU/mL for 30 minutes and 5x5 millimeter, respectively. The immobilized cell could degrade 1%, 3% and 5% diesel in liquid medium significantly more than free cells and could be reused more than 5 cycles. The immobilized cells kept in plastic zip lock bag at 4^oC for 2 months remained active for diesel degradation. Moreover, the immobilized cell could degrade 1% diesel in liquid media which was 20-fold of shell weight. TS1 consisted of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Microbacterium* sp., *Shinella* sp., *Pusillimonas* sp. and *Pseudomonas* sp. Individual bacterial strains were significantly less capable of diesel degradation than bacterial consortium TS1.

Department: Microbiology Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial Technology Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยดี โดยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่น ๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ และ ดร.ณัฐพันธ์ ศุภกา เป็นอย่างสูงที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 2/2559 ภาคการศึกษาต้น ปีการศึกษา 2558 งบประมาณ 2559 ให้กับผู้วิจัย

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย และหน่วยปฏิบัติการวิจัยบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่าง ๆ

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ร่วมรุ่นทุกคน และพี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือในหลาย ๆ ด้าน

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาที่เป็นแรงบันดาลใจ และกำลังใจในการศึกษาตลอดมา รวมถึงคอยสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม	5
2.1 ดีเซล.....	5
2.2 สถานการณ์การปนเปื้อนดีเซล	8
2.3 ผลกระทบของดีเซลต่อสิ่งแวดล้อม.....	10
2.3.1 ผลกระทบของดีเซลต่อดิน	10
2.3.2 ผลกระทบของดีเซลต่อน้ำ.....	10
2.3.3 ผลกระทบของดีเซลในอากาศ	11
2.4 การบำบัดดีเซลในสิ่งแวดล้อม	12
2.4.1 วิธีทางกายภาพ.....	12
2.4.2 วิธีทางเคมี	13
2.4.3 วิธีทางชีวภาพ.....	13

2.5 การใช้แบคทีเรียในการบำบัดดีเซลปนเปื้อน	17
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ.....	18
2.7 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ (Microbial immobilization)	21
2.8 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการตรึงเซลล์เพื่อการบำบัดน้ำมันทางชีวภาพ.....	25
2.9 วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย	27
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย	30
อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	30
เคมีภัณฑ์	32
วิธีดำเนินงานวิจัย	36
3.1 การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลจากรากพืชน้ำ	36
3.1.1 ตัวอย่างรากพืชน้ำ.....	36
3.1.2 การคัดแยกและเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียจากรากพืชน้ำ	36
3.1.3 การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย.....	36
3.1.4 คัดกรองกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซล.....	37
3.1.5 การคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยว	37
3.1.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียเดี่ยวที่คัดแยกได้	38
3.2 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย	38
3.2.1 การเตรียมวัสดุตรึง	38
3.2.1.1 เปลือกหอยแครง	38
3.2.1.2 นมผักกระเฉด	39
3.2.2 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย.....	39
3.2.2.1 การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนเปลือกหอย.....	39
3.2.2.2 การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนนมผักกระเฉด.....	39

3.3	ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลายดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	40
3.3.1	ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระในการย่อยสลายดีเซล	40
3.3.2	ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียตรึงในการย่อยสลายดีเซล	40
3.3.3	ความสามารถของแบคทีเรียเดี่ยวในการย่อยสลายดีเซลกับกลุ่มแบคทีเรีย TS1	41
3.4	การตรวจสอบการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนเปลือกหอยและนมผักกระเฉดด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	41
3.5	การติดตามพลวัตประชากรของกลุ่มแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยใช้ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	42
3.5.1	วิธีแยกแบคทีเรียจากวัสดุตรึงเพื่อสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ	42
3.5.1.1	วิธีแยกแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	42
3.5.1.2	วิธีแยกแบคทีเรียจากวัสดุตรึงที่ไม่ปลอดเชื้อ	42
3.5.1.3	วิธีแยกกลุ่มแบคทีเรียตรึงจากเปลือกหอยและนมผักกระเฉด	42
3.5.2	การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ	43
3.5.3	การตรวจสอบดีเอ็นเอ	44
3.5.4	การเพิ่มจำนวนชุดดีเอ็นเอของ 16S rDNA ของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วย ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	44
3.5.5	ตรวจติดตามพลวัตประชากรของกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	45
3.6	การทดสอบแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์และการย่อยสลายดีเซล	46
3.6.1	จำนวนเซลล์ที่ใช้ในการตรึง	46
3.6.2	ผลของระยะเวลาในการตรึงเซลล์บนเปลือกหอย.....	46
3.6.3	ขนาดของวัสดุตรึง	47
3.6.4	ปริมาณดีเซล	47
3.6.5	การใช้ซ้ำกลุ่มแบคทีเรียตรึง.....	47

3.6.6	ระยะเวลาในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียตรึง.....	48
3.6.7	อัตราส่วนของแบคทีเรียตรึงกับปริมาณอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ.....	48
3.7	การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย.....	48
3.7.1	การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count	48
3.7.2	การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงบนเปลือกหอย.....	49
3.7.3	การนับจำนวนแบคทีเรียที่ตรึงบนนมผักกระเฉด.....	49
3.8	วิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลือ	49
3.8.1	การสกัดดีเซล	49
3.8.2	การวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลือด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	50
3.9	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	50
บทที่ 4	ผลการทดลอง	51
4.1	คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลจากรากพืชขึ้นน้ำ	51
4.2	ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว .	55
4.2.1	ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ในการย่อยสลายดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว CFMM.....	55
4.2.2	การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย TS1	56
4.2.3	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเดี่ยวจากกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลาย 1% ดีเซล.....	61
4.3	การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย TS1.....	66
4.3.1	ลักษณะทางกายภาพของวัสดุตรึง.....	66
4.3.2	การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย.....	67
4.4	การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียตรึง	71
4.4.1	การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอย.....	71
4.4.2	การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนนมผักกระเฉด.....	75

4.4.3 ลักษณะของวัสดุตั้งหลังการใช้งาน	79
4.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการตั้งเซลล์และความสามารถในการย่อยสลายดีเซล	82
4.5.1 จำนวนเซลล์ที่ใช้ในการตั้ง	82
4.5.2 ผลของระยะเวลาในการตั้งเซลล์บนเปลือกหอย	84
4.5.3 ขนาดของวัสดุตั้ง	87
4.5.4 ปริมาณดีเซล	91
4.5.5 การใช้ซ้ำกลุ่มแบคทีเรียตั้ง	94
4.5.6 ระยะเวลาในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียตั้ง	97
4.5.7 อัตราส่วนของแบคทีเรียตั้งกับปริมาณอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ	99
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	102
รายการอ้างอิง	115
ภาคผนวก	128
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	145

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน เรื่องกำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันดีเซล
พ.ศ. 2556 6

ตารางที่ 2.2 สถิติปริมาณน้ำมันเชื้อเพลิงบางชนิดที่ผู้ค้าจำหน่ายน้ำมันให้ลูกค้าทั่วประเทศไทย
ตั้งแต่พ.ศ. 2554-2558..... 7

ตารางที่ 2.3 สถิติเหตุการณ์ดีเซลรั่วไหล ณ สถานที่ต่าง ๆ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 – 2555..... 9

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างการตรึงจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษชนิดต่าง ๆ..... 22

ตารางที่ 3.1 ไพรมเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA สำหรับ PCR-DGGE 34

ตารางที่ 4.1 กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากพืชน้ำชนิดต่าง ๆ 52

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยการเทียบลำดับ
นิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของโคลนเดี่ยวที่คัดแยกได้..... 57

ตารางที่ ๓1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลตเมื่อ
เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank..... 138

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 ลักษณะของบวม (A) สกิมเมอร์ (B) และวัสดุดูดซับสังเคราะห์ (C)	12
รูปที่ 2.2 การตรึงเซลล์แบบต่าง ๆ การดูดซับ (A) การเชื่อมขวาง (B) การกักเก็บ (C) การเข้าแคปซูล (D).....	24
รูปที่ 2.3 ลักษณะนมฝักระเจดสีขาว่าที่หุ้มลำต้น	28
รูปที่ 4.1 สีของการเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM ที่มี 0.5% ดีเซล กลุ่มแบคทีเรียจากรากผักตบชวา กลุ่มที่ 1 (A) กลุ่มแบคทีเรียจากรากผักตบชวา กลุ่มที่ 2 (B) และกลุ่มแบคทีเรียรากผักบุ้ง (C) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อ (D) ที่เวลา 0 วัน.....	52
รูปที่ 4.2 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในการทดลองการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน.....	53
รูปที่ 4.3 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในวันที่ 0 และ 7 ของกลุ่มแบคทีเรีย 3 กลุ่มในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล	54
รูปที่ 4.4 ค่าโครงการย่อยสลาย 1% ดีเซลและจำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 และ SJ42	56
รูปที่ 4.5 ปริมาณดีเซลหลังการย่อยสลาย 1% ดีเซลด้วยแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน.....	61
รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมหลังการย่อยสลาย 1% ดีเซลด้วยแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน เทียบกับชุดควบคุมวันที่ 0 และวันที่ 7	63
รูปที่ 4.7 จำนวนแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ หลังการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน.....	65
รูปที่ 4.8 ลักษณะของเปลือกหอยหลังทำความสะอาดแล้ว (A) ขนาด 5x5 มิลลิเมตร (B) และขนาด 2x2 มิลลิเมตร (C)	66
รูปที่ 4.9 ลักษณะของนมฝักระเจดหลังตากแดด (A) ขนาด 5x5 มิลลิเมตร (B).....	67
รูปที่ 4.10 ลักษณะของเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อด้านนอก (A) ด้านใน (B) และเปลือกหอยที่ปลอดเชื้อ ด้านนอก (C) และด้านใน (D) เปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึงหลังจากบ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ลักษณะของเปลือกหอยด้านนอก (E) และด้านใน (F).....	68

รูปที่ 4.11 ลักษณะของนมผักกระเฉดชนิดต่าง ๆ ที่กำลังขยาย 1,000 และ 5,000 เท่าของนมผักกระเฉดสด (A,B) นมผักกระเฉดที่ตากแดด (C,D) และนมผักกระเฉดปลอดเชื้อ (E,F) นมผักกระเฉดที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรียหลังจากบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (G).....	70
รูปที่ 4.12 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 และ 7 ของเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อและกลุ่มแบคทีเรียตรึงในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล.....	72
รูปที่ 4.13 จำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 ของเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อและกลุ่มแบคทีเรียตรึงในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล.....	73
รูปที่ 4.14 การวิเคราะห์ประชากรกลุ่มแบคทีเรีย TS1 โดยวิธี PCR-DGGE หลังการตรึงบนเปลือกหอยและใช้งาน.....	74
รูปที่ 4.15 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 และ 7 ของนมผักกระเฉดที่ไม่ปลอดเชื้อและกลุ่มแบคทีเรียตรึงในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล.....	76
รูปที่ 4.16 จำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 ของนมผักกระเฉดที่ไม่ปลอดเชื้อและกลุ่มแบคทีเรียตรึงในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล.....	77
รูปที่ 4.17 การวิเคราะห์ประชากรกลุ่มแบคทีเรีย TS1 โดยวิธี PCR-DGGE หลังการตรึงบนนมผักกระเฉดและใช้งาน.....	78
รูปที่ 4.18 ลักษณะของวัสดุตรึงชนิดต่าง ๆ ในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล เปลือกหอยตรึงวันที่ 0 (A) เปลือกหอยตรึงวันที่ 7 (B) นมผักกระเฉดตรึงวันที่ 0 (C) นมผักกระเฉดตรึงวันที่ 1 (D) และนมผักกระเฉดตรึงวันที่ 7 (E).....	79
รูปที่ 4.19 ลักษณะของเปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึงหลังจากบ่ม 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนใช้งาน ลักษณะเปลือกหอยด้านนอก (A) และด้านใน (B) และหลังจากผ่านการใช้งาน 7 วัน ลักษณะของเปลือกหอยด้านนอก (C) และด้านใน (D)	80
รูปที่ 4.20 ลักษณะของนมผักกระเฉดที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรียหลังจากบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (A) และหลังจากการใช้งาน 7 วัน (B).....	81
รูปที่ 4.21 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน โดยกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรึงบนเปลือกหอยที่มีจำนวนเซลล์ 6, 8 และ 10 log CFU/มล.....	83
รูปที่ 4.22 จำนวนแบคทีเรียในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน โดยกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรึงบนเปลือกหอยที่มีจำนวนเซลล์ 6, 8 และ 10 log CFU/มล.....	84

รูปที่ 4.23 ปริมาณดีเซลที่เหลือ ในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน ในอาหาร เหลวที่ใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เรียงที่ใช้น้ำจำนวนเซลล์และระยะเวลาการตรึงต่าง ๆ	86
รูปที่ 4.24 จำนวนแบคทีเรียในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน ในอาหาร เหลวที่ใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เรียงที่ใช้น้ำจำนวนเซลล์และระยะเวลาการตรึงต่าง ๆ	87
รูปที่ 4.25 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 และ 7 ในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซล โดยกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรึงบนเปลือกหอยขนาด 2x2 มิลลิเมตร (A) และ 5x5 มิลลิเมตร (B).....	89
รูปที่ 4.26 จำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 ในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลโดย กลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรึงบนเปลือกหอยขนาด 2x2 และ 5x5 มิลลิเมตร	90
รูปที่ 4.27 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 และ 7 ของชุดควบคุมและกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ที่ตรึงบนเปลือกหอย ในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1%, 3% และ 5% ดีเซล	93
รูปที่ 4.28 จำนวนแบคทีเรียในการทดสอบการย่อยสลาย 1%, 3% และ 5% ดีเซลในอาหาร เหลว CFMM เป็นเวลา 7 วัน	94
รูปที่ 4.29 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในการทดสอบการใช้ซ้ำกลุ่มแบคทีเรียที่เรียงเพื่อย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลวจำนวน 5 รอบ.....	95
รูปที่ 4.30 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) ที่กำลังขยาย 5,000 และ 10,000 เท่า แสดงลักษณะพื้นผิวด้านนอก (A,C) และด้านใน (B,D) เปรียบเทียบกับลักษณะพื้นผิวด้านนอก (E,G) และด้านใน (F,H) ของเปลือกหอยหลังจากผ่านการใช้งานต่อเนื่อง 35 วัน	96
รูปที่ 4.31 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ (A) และจำนวนแบคทีเรีย (B) ในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ในอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เรียงที่เก็บรักษาในลักษณะต่าง ๆ.....	98
รูปที่ 4.32 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 และ 7 ของเปลือกหอยที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย TS1 โดยแปรผันอัตราส่วนของเปลือกหอยกับอาหารเหลว 1:1, 0.5:1, 0.1:1 และ 0.05:1 ในอาหาร เหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล.....	100
รูปที่ 4.33 จำนวนแบคทีเรียในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน ในอาหาร เหลว โดยใช้ปริมาณแบคทีเรียที่เรียงอัตราส่วนต่าง ๆ	101

รูปที่ ค1. โครมาโทแกรมของดีเซลวันที่ 0.....	137
รูปที่ ค2. โครมาโทแกรมของอาหารเหลวที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรง (8 log CFU/มล.) บนเปลือกหอย วันที่ 7.....	137
รูปที่ ค3. โครมาโทแกรมของเปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรงวันที่ 7	137



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มล. = มิลลิลิตร

มม. = มิลลิเมตร

% = เปอร์เซ็นต์

bp = base pairs

CFU = colony forming unit



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ดีเซลเป็นส่วนหนึ่งของน้ำมันดิบที่ได้จากโรงกลั่นน้ำมัน (Ameen และคณะ, 2016) ส่วนใหญ่ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสาย (aliphatic hydrocarbons) ที่มีจำนวนคาร์บอนระหว่าง 9-23 อะตอม และสารประกอบที่เป็นวงอะโรมาติก (aromatic compounds) อีกหลายชนิด (Nwinyi และคณะ, 2014) ดีเซลใช้ประโยชน์ในภาคการขนส่ง เป็นเชื้อเพลิงที่สำคัญสำหรับรถยนต์ เรือ และรถไฟ (Nanaki และ Koroneos, 2012)

ในประเทศไทยมีพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการรั่วไหลของน้ำมันสูงมาก ได้แก่ บริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา ชายฝั่งศรีราชา บริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยาถึงชายฝั่งด้านตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน ถึงอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี (กรมควบคุมมลพิษ, 2559) การรั่วไหลของดีเซลสู่สิ่งแวดล้อมอาจเกิดจากอุบัติเหตุหรือจากการกระทำของมนุษย์ ตัวอย่างเหตุการณ์การปนเปื้อนดีเซลลงแหล่งน้ำจืดเช่น เมื่อวันที่ 6 มิถุนายน 2557 เกิดอุบัติเหตุเรือบรรทุกดีเซลชื่อ "พรสมุทรนาวา 5" ล่มกลางแม่น้ำเจ้าพระยา บริเวณท่าน้ำปากคลองสาน เกิดคราบน้ำมันขยายเป็นวงกว้างประมาณ 20 เมตร (ข่าวสดออนไลน์, 2557) ดีเซลที่รั่วไหลก่อให้เกิดมลพิษในอากาศ ดิน และแหล่งน้ำ ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งนั้น ตัวอย่างเช่น สัตว์น้ำอาจกินน้ำมันเข้าไปและสะสมในเนื้อเยื่อ ไข่ปลาบางชนิดไม่สามารถฟักเป็นตัวได้ เป็นต้น ดีเซลยังสามารถสะสมในห่วงโซ่อาหารได้ ส่งผลกระทบกับสุขภาพมนุษย์เช่นกัน ตัวอย่างเช่น การบริโภคอาหารทะเลที่มีการสะสมสารพิษของน้ำมันซึ่งเป็นอันตรายกับสุขภาพ ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ เวียนศีรษะ เป็นต้น (Chang และคณะ, 2014) ดังนั้นการบำบัดดีเซลที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจึงมีความสำคัญและจำเป็นที่ต้องดำเนินการ

การบำบัดดีเซลในสิ่งแวดล้อมสามารถทำได้โดยใช้วิธีทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ ดังนี้

1. วิธีทางกายภาพ เป็นวิธีทั่วไปที่ใช้ควบคุมการแพร่กระจายของน้ำมันในแหล่งน้ำ นิยมใช้ทุ่นลอย (barrier) หรือวัสดุดูดซับชนิดต่าง ๆ วิธีนี้ไม่เปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมัน จึงไม่สามารถบำบัดน้ำมันดีเซลให้หมดไปได้ แต่เป็นการเคลื่อนย้ายน้ำมันออกจากบริเวณหนึ่งไปอีกบริเวณหนึ่ง วิธีนี้มีราคาแพงและจำเป็นต้องนำวัสดุดูดซับที่มีน้ำมัน ไปบำบัดด้วยวิธีอื่น ส่วนวิธีการเผาก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศและอาจเกิดสารที่เล็ดจากการเผาไหม้ (Dave และ Ghaly, 2011; Lin และคณะ, 2014)

2. วิธีทางเคมี วิธีนี้จะใช้ร่วมกับวิธีทางกายภาพ เพื่อจำกัดวงการแพร่กระจายของน้ำมัน โดยใช้สารเคมีที่สามารถเปลี่ยนคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันได้ เช่น การเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthetic surfactant) แต่อาจเกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ (Dave และ Ghaly, 2011)

3. วิธีทางชีวภาพ (bioremediation) คือ การใช้สิ่งมีชีวิตในการกำจัดหรือลดความเป็นพิษของสารปนเปื้อน เช่น พืช แบคทีเรีย รา ยีสต์ เป็นต้น (Dellagnezze และคณะ, 2014) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ราคาถูก และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Liu และคณะ, 2011) การบำบัดด้วยวิธีนี้มี 2 รูปแบบ ได้แก่ การกระตุ้นให้แบคทีเรียประจำถิ่นทำงานได้ดีขึ้น (biostimulation) เป็นวิธีการบำบัดโดยการเติมสารอาหารหรือปรับสภาพที่จำเป็นในการเจริญของจุลินทรีย์ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน การเติมธาตุอาหารที่จำเป็น ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือการเพิ่มออกซิเจน การปรับ pH เพื่อช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายดีเซลให้มากขึ้นและลดระยะเวลาในการบำบัดให้น้อยลง (Kavamura และ Esposito, 2010) วิธีการเติมจุลินทรีย์ (bioaugmentation) เป็นวิธีการบำบัดโดยการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลลงในพื้นที่ปนเปื้อน เหมาะกับพื้นที่ที่มีจุลินทรีย์น้อยหรือจุลินทรีย์ประจำถิ่นไม่สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ จุลินทรีย์ที่เติมลงไปอาจเป็นแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวหรือกลุ่มแบคทีเรีย (Tyagi และคณะ, 2011) การใช้กลุ่มแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและสารเคมีชนิดต่าง ๆ ได้ดีกว่าและรวดเร็วกว่าการใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียว เนื่องจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งสามารถนำสารตัวกลาง (intermediate) ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายจากแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งไปใช้ได้ ทำให้ระบบการบำบัดทางชีวภาพเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Das และ Dash, 2014)

แม้ว่าการใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียวหรือกลุ่มแบคทีเรียจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลได้ แต่ยังคงมีข้อจำกัดกล่าวคือ การเติมแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวหรือกลุ่มแบคทีเรียต่างถิ่นลงในสิ่งแวดล้อมใหม่อาจเกิดการแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น และการเติมจุลินทรีย์ในรูปแบบเซลล์อิสระยังมีข้อจำกัด เช่น เซลล์ที่เติมลงในแหล่งน้ำถูกเจือจาง เซลล์ไม่ทนต่อสารพิษความเข้มข้นสูง เป็นต้น (Liu และคณะ, 2015) ดังนั้นการตรึงจุลินทรีย์กับวัสดุจะช่วยให้จุลินทรีย์มีที่ยึดเกาะ สามารถเพิ่มจำนวนได้ ทนต่อสารพิษมากขึ้น ลดการสูญเสียเซลล์ เซลล์มีความเสถียรและรอดชีวิตได้ เนื่องจากวัสดุตรึงจะช่วยปกป้องเซลล์จากการสัมผัสกับสารพิษโดยตรง (Martins และคณะ, 2013) นอกจากนี้ยังมีข้อดีคือ ปกป้องเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สะดวกต่อการแยกออกมาจากแหล่งที่บำบัด สามารถนำจุลินทรีย์กลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง ลดค่าใช้จ่ายในการบำบัด และสะดวกต่อการเก็บรักษาเซลล์เป็นเวลานานโดยที่เซลล์ไม่สูญเสียความสามารถในการย่อยสลาย วัสดุที่ใช้ตรึงมีหลายชนิดทั้งวัสดุทางชีวภาพและ

วัสดุสังเคราะห์ เช่น แอลจินเต ใยฝ้าย (cotton fiber) เป็นต้น (Lin และคณะ, 2014; Martins และคณะ, 2013) วัสดุที่เหมาะสมกับการตรึงและการบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนสารพิษควรเป็นวัสดุที่ไม่ละลายน้ำ ไม่เป็นพิษ หาได้ง่าย ราคาถูก มีรูปพรุน และให้ประสิทธิภาพในการตรึงแบคทีเรียที่ดี อีกทั้งมีความเหมาะสมกับวิธีการตรึงที่เลือกใช้ (Martins และคณะ, 2013)

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์มีความสนใจในการเลือกใช้วัสดุทางธรรมชาติมาตรึงจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น เพื่อความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากวัสดุธรรมชาติจะสลายตัวได้เองเมื่อเวลาผ่านไป เช่น การใช้ใยบัวหรือฟางข้าวเป็นวัสดุตรึง (สุธาวลัย ดีสวัสดิ์, 2550) อย่างไรก็ตามการบำบัดดีเซลในน้ำควรใช้วัสดุตรึงที่ไม่ละลายน้ำ เนื่องจากวัสดุตรึงที่สลายตัวได้จะทำให้แหล่งน้ำเน่าเสียเพิ่มขึ้น วัสดุที่มักใช้ในการบำบัดน้ำปนเปื้อนสารพิษ ได้แก่ แอลจินเต คาราจีแนน พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) (Martins และคณะ, 2013)

มีรายงานการวิจัยที่ใช้เปลือกหอยเป็นวัสดุตรึง ตัวอย่างเช่น Simons และคณะ (2013) ได้ตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนแอลจินเตและเศษเปลือกหอยแมลงภู่เพื่อย่อยสลาย weathered oil ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรในน้ำทะเล พบว่า การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนเศษเปลือกหอยแมลงภู่และเติมสารอาหาร สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน $C_{32} - C_{40}$ ได้ $75 \pm 14\%$ หลังจาก 12 สัปดาห์ ในขณะที่การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนแอลจินเตสามารถย่อยสลายได้เพียง $20 \pm 14\%$ หรือการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนวัสดุเหลือใช้จากพืช ตัวอย่างเช่น สุธาวลัย ดีสวัสดิ์ (2550) ได้ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนนมผักกระเฉดที่ไม่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรินที่ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถลดปริมาณไพรีนและพีแนนทรินได้อย่างรวดเร็วภายใน 3 วัน จนเหลือ 26.5% และ 2.1% ตามลำดับ

หอยแครงเป็นหอยทะเลชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จึงมีเปลือกหอยเกิดขึ้นอยู่มากมาย เปลือกหอยประกอบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (Bharatham และคณะ, 2014; Othman และคณะ, 2013) และมีลักษณะผิวขรุขระน่าจะเหมาะกับการนำมาตรึงเซลล์

นมผักกระเฉดมีสีขาว ลักษณะคล้ายฟองน้ำ เป็นเนื้อเยื่อแอรินโคมา (aerenchyma tissues) ที่ล้อมรอบต้นผักกระเฉด ช่วยพยุงให้ผักกระเฉดลอยน้ำได้ (Bhunia และ Mondal, 2012) และมีรูปพรุนจึงน่าจะเหมาะกับการนำมาตรึงเซลล์

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลจากรากพืชน้ำจืดจากแหล่งน้ำที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนดีเซล ตรึงกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวบนวัสดุทางธรรมชาติ ได้แก่ เปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉด ทดสอบการย่อยสลายดีเซล ติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรโดยวิธี PCR-DGGE รวมทั้งทดสอบการแปรผันปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของกลุ่มแบคทีเรียตรึง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉดในการบำบัดน้ำปนเปื้อนดีเซล

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉดเพื่อบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนดีเซล



บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรม

2.1 ดีเซล

ดีเซลเป็นน้ำมันที่ได้จากการกลั่นน้ำมันดิบ ที่มีช่วงอยู่ระหว่างน้ำมันเคโรซีน (kerosene) และน้ำมันหล่อลื่น (lubricating oil) ดีเซลมีจุดเดือดอยู่ในช่วง 275 - 400 องศาเซลเซียส (Yasin และคณะ, 2012) มีส่วนประกอบหลักคือไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างเป็นสาย (aliphatic hydrocarbons) มีจำนวนคาร์บอนระหว่าง 9 - 23 อะตอม มีอัลเคนโซ่กิ่งหลายชนิด (branched alkanes) และสารประกอบที่เป็นวงอะโรมาติก (aromatic compound) อื่นๆ หลายชนิด (Luo และคณะ, 2015; Nwinyi และคณะ, 2014) และยังมีฟีนอล (phenol) และสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic compounds) ที่มีไนโตรเจนและซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบ อีกทั้งมีโลหะหนักที่มักพบในดีเซลคือทองแดงและนิกเกิล ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ล้วนมีความเป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม (Santos และคณะ, 2013)

ดีเซลถูกนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงของรถบรรทุก เรือเดินสมุทร และรถไฟ (Nanaki และ Koroneos, 2012) ดีเซลที่มีจำหน่ายในปัจจุบันนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. น้ำมันดีเซลหมุนเร็ว (high speed diesel oil) มีชื่อเรียกอื่น ๆ อีก เช่น น้ำมันโซลา แก๊สออยล์ เป็นต้น เหมาะสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลหมุนเร็วที่มีความเร็วรอบสูงกว่า 1,000 รอบต่อนาที ได้แก่ รถปิคอัพ รถบรรทุก รถโดยสาร รถแทรกเตอร์ เรือประมง และเครื่องกำเนิดไฟฟ้าบางชนิด (แผนกวิชาการน้ำมัน, 2552)

2. น้ำมันดีเซลหมุนช้า (low speed diesel oil) อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า น้ำมันซีโล้ เหมาะสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลหมุนปานกลาง (ระหว่าง 300 - 1,000 รอบต่อนาที) และเครื่องยนต์ดีเซลหมุนช้า (ต่ำกว่า 300 รอบต่อนาที) เช่น เครื่องยนต์ดีเซลขนาดใหญ่ที่ใช้กับเรือประมง เรือเดินสมุทรและเครื่องกำเนิดไฟฟ้าขนาดใหญ่ (แผนกวิชาการน้ำมัน, 2552)

ดีเซลมีคุณสมบัติละลายน้ำได้น้อยเนื่องจากมีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Kauppi และคณะ, 2011) เมื่อเกิดการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดเขม่าควัน ซึ่งสารในเขม่าควันบางชนิดเป็นสารก่อมะเร็งและส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ไนโตรเจนออกไซด์ (nitrogen oxide; NO_x) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide; SO_2) เป็นต้น ดีเซลหมุนเร็วที่มีคุณภาพดีจะมีกำมะถันในปริมาณต่ำ (Yasin และคณะ, 2012)

กรมธุรกิจพลังงานได้กำหนดลักษณะและคุณภาพของดีเซลที่จำหน่ายในประเทศไทยไว้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน เรื่องกำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันดีเซล พ.ศ. 2556

ข้อกำหนด	ดีเซล	
	หมุนเร็ว	หมุนช้า
ความถ่วงจำเพาะ (ที่ 15.6 องศาเซลเซียส)	0.81 - 0.87	<0.92
ความหนืด (cSt)	1.8 - 4.1	<8.0
จำนวนซีเทน	>50	>45
กำมะถัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	<0.005	<1.5
Oxidation Stability (g/m ³)	<25	-
น้ำและตะกอน (ร้อยละโดยปริมาตร)	<0.05	<0.3
จุดวาบไฟ (องศาเซลเซียส)	>52	>52
การกลั่น (องศาเซลเซียส) อุณหภูมิของส่วนที่กลั่นได้โดยปริมาตรในอัตราร้อยละ 90	<357	-
โพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	<11	-
สี *	เหลือง	น้ำตาล
ปริมาณไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (ร้อยละโดยปริมาตร) **	6.5-7	-

* ดูข้อกำหนดอื่น ๆ เพิ่มเติมได้ ในประกาศกรมธุรกิจพลังงาน เรื่องกำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันดีเซล พ.ศ. 2556

** ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน เรื่องกำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันดีเซล (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2558

- คือ ไม่ระบุข้อกำหนด

ที่มา : กรมธุรกิจพลังงาน (<http://www.taia.or.th/home/media/file/550351393067586.pdf>, สืบค้นเมื่อ 7 เมษายน 2559)

ดีเซลถูกนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรมการขนส่งทั้งทางบกและทางน้ำ จึงทำให้ความต้องการในการใช้ดีเซลมีมากขึ้น จากสถิติปริมาณน้ำมันเชื้อเพลิงที่ผู้ค้าจำหน่ายน้ำมันให้ลูกค้าจำแนกตามชนิดน้ำมันเชื้อเพลิงทั่วประเทศไทย ตั้งแต่พ.ศ. 2554-2558 ของกรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน แสดงให้เห็นว่า ความต้องการการใช้ดีเซลหมุนเร็วมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2554 ที่จำหน่ายดีเซลประมาณ 18 พันล้านลิตร และในปีพ.ศ. 2558 สามารถจำหน่ายได้ประมาณ 21 พันล้านลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สถิติปริมาณน้ำมันเชื้อเพลิงบางชนิดที่ผู้ค้าจำหน่ายน้ำมันให้ลูกค้าทั่วประเทศไทย ตั้งแต่พ.ศ. 2554-2558

ชนิดน้ำมัน เชื้อเพลิง	2554	2555	2556	2557	2558
เบนซิน	-	-	616,221.19	498,186.31	501,770.91
ดีเซลหมุน เร็ว	18,070,047.72	20,021,890.76	20,404,522.45	20,562,890.56	21,368,108.79
น้ำมันเตา	2,455,918.02	2,363,322.06	2,154,893.26	2,073,581.09	2,043,012.80
แก๊สโซฮอลล์ อี 20	221,650.31	366,648.66	962,730.82	1,344,037.14	1,510,809.14
แก๊สโซฮอลล์ อี 85	9,094.94	35,739.67	140,566.48	334,038.14	317,460.31

* ตัวเลขที่แสดงมีหน่วยเป็นพันลิตร

ที่มา : สำนักงานสถิติแห่งชาติ (<http://service.nso.go.th/nso/web/statseries/statseries17.html>, สืบค้นเมื่อ 14 มิถุนายน 2559)

2.2 สถานการณ์การปนเปื้อนดีเซล

การปนเปื้อนดีเซลเกิดขึ้นจากอุบัติเหตุ เช่น เรือบรรทุกน้ำมันอัปปาง เป็นต้น หรือเกิดจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ เช่น การทำความสะอาดถังบรรจุดีเซล เป็นต้น (Zhang และคณะ, 2014) มีรายงานการปนเปื้อนดีเซลในแหล่งน้ำทั้งน้ำทะเลและน้ำจืดบ่อยครั้ง ตัวอย่างเช่น

Woolfenden และคณะ (2011) พบการปนเปื้อนดีเซลและน้ำมันหล่อลื่นในดินตะกอนที่แอนตาร์กติก ซึ่งเป็นน้ำมันทั้งสองชนิดถูกนำมาใช้ในยานพาหนะขนส่งและเครื่องจักรต่าง ๆ

Zhang และคณะ (2013) พบการปนเปื้อนดีเซลในแม่น้ำหวงผู้และแม่น้ำแยงซี ซึ่งเป็นแหล่งน้ำจืดที่สำคัญของเอเชียใต้และพบดีเซลตกค้างที่ชายฝั่ง สาเหตุเกิดจากเรือปล่อยน้ำมันสู่แหล่งน้ำ

Xiong และคณะ (2014) รายงานว่า ในแต่ละปีจะมีปิโตรเลียมประมาณ 287,280,000 ลิตรรั่วไหลลงสู่แหล่งน้ำของอเมริกาเหนือ ในจำนวนนี้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิง 48% น้ำมันดิบ 29% และ 25% ของอุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมันในประเทศแคนาดา คือ การรั่วไหลของดีเซล

Karthika และคณะ (2014) รายงานว่า การรั่วไหลของน้ำมันส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่สหรัฐอเมริกาและอาหรับ

Milinkovitch และคณะ (2015) รายงานว่า การขนส่งทางเรือที่เพิ่มมากขึ้นอาจทำให้มีน้ำมันรั่วไหลสู่มหาสมุทรอาร์กติกมากขึ้น และการใช้ดีเซลแทนน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีมวลโมเลกุลสูงจะเป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตในน้ำเพราะมี PAH ในปริมาณที่มากกว่า

Onur และคณะ (2015) รายงานว่า พบดีเซลปนเปื้อนในแม่น้ำคิซิลมาค (Kizilirmak river) บริเวณที่ใกล้กับโรงกลั่นน้ำมันในประเทศตุรกี

Sagerup และคณะ (2016) รายงานว่า อุบัติเหตุน้ำมันรั่วไหลที่ชายฝั่งนอร์เวย์ส่วนใหญ่จะเป็นการรั่วไหลของดีเซลและเบนซินในปริมาณไม่มากนักแต่เกิดขึ้นบ่อยครั้ง

ประเทศไทยมีรายงานเหตุการณ์ดีเซลปนเปื้อนในแหล่งน้ำจืดและน้ำทะเลบ่อยครั้ง ทั้งอุบัติเหตุจากรถขนส่งและเรือบรรทุกน้ำมัน ตัวอย่างเช่น เมื่อวันที่ 6 มิถุนายน พ.ศ. 2557 เกิดอุบัติเหตุเรือบรรทุกน้ำมันดีเซลชื่อว่า "พรสมุทรรวา 5" ล่มกลางแม่น้ำเจ้าพระยาบริเวณท่าหน้าปากคลองสาน เบื้องต้นพบคราบน้ำมันขยายเป็นวงกว้างประมาณ 20 เมตร (ข่าวสดออนไลน์, 2557) และจากการรวบรวมสถิติของกรมเจ้าท่า พ.ศ. 2550 – 2555 พบว่า มีอุบัติเหตุที่ทำให้เกิดการรั่วไหลของดีเซลในปริมาณต่าง ๆ ซึ่งจะพบในจังหวัดที่มีพื้นที่ติดกับบริเวณชายฝั่งทะเลหรือแม่น้ำ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สถิติเหตุการณ์ดีเซลรั่วไหล ณ สถานที่ต่าง ๆ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 – 2555

ปี	ชนิดน้ำมัน	ปริมาณที่รั่วไหล	เหตุการณ์	สถานที่
2550	ดีเซล	20 ลิตร	เรือสนับสนุน การย้ายท่ L-88 ที่กำลังปฏิบัติงานย้าย ท่ SBM	บริเวณโครงการนางนวล นอกชายฝั่งจังหวัดชุมพร ของบริษัท ปตท. สำรวจ และผลิตปิโตรเลียม จำกัด (มหาชน)
	ดีเซล	9,000 ลิตร	รถบรรทุกน้ำมัน ของบริษัท บางชั้น ปิโตรเลียม เกิดอุบัติเหตุ	น้ำมันรั่วไหลลงคลองชะเมา จังหวัดนครศรีธรรมราช
	ดีเซลและ น้ำมันเตา	20,000 ลิตร	เรือบรรทุกแก๊สของ บริษัท เวิร์ลไวด์ ทราน สปอร์ต จำกัด อับปาง	บริเวณห่างจากชายฝั่ง อำเภอสีทิงพระ ประมาณ 6 ไมล์ทะเล จังหวัดสงขลา
2552	ดีเซล	7,000 ลิตร	เรือลำเลียง ท่อนซุงจม	บริเวณทะเลในเขต จังหวัดพังงา
2553	ดีเซล (B5)	40,000 ลิตร	เรือบรรทุกน้ำมันชื่อ ส.โซคถาวร 6 จม	ห่างจากเกาะราชาใหญ่ ทางด้านตะวันออก ประมาณ 4 ไมล์ทะเล จังหวัดภูเก็ต
	ดีเซล และ น้ำมันเครื่อง	ไม่ทราบปริมาณ	เรือ ข.2 ของ กรมเจ้าท่า	บริเวณปลายท่าเทียบเรือ ของศูนย์ฝึกพาณิชย์นาวี จังหวัดสมุทรปราการ
2555	ดีเซล (น้ำ ปนน้ำมัน)	ไม่ทราบปริมาณ	เรือบรรทุกน้ำมันชื่อ VENUS 20 ลักลอบ ปล่อยน้ำมัน	บริเวณทางทิศตะวันออก ของเกาะสมุยห่างฝั่ง ประมาณ 22 ไมล์ทะเล

ที่มา : กรมเจ้าท่า (<http://www.md.go.th/md2/index.php/2014-01-19-05-02-28/2014-01-19-05-14-13/2014-01-19-06-02-02/-oil-spill>, สืบค้นเมื่อ 20 พฤษภาคม 2559)

2.3 ผลกระทบของดีเซลต่อสิ่งแวดล้อม

เนื่องจากดีเซลมีประโยชน์ในภาคการขนส่ง เป็นเชื้อเพลิงที่สำคัญสำหรับรถยนต์ เรือ และรถไฟ จึงอาจเกิดการรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อม ทั้งที่เกิดจากอุบัติเหตุหรือเกิดจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ ก่อให้เกิดมลพิษในอากาศ ดิน แหล่งน้ำผิวดินและแหล่งน้ำใต้ดิน (Zhang และคณะ, 2014) ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์น้ำ นกน้ำ และพืช (Agamuthu และ Darasnia, 2013)

2.3.1 ผลกระทบของดีเซลต่อดิน

เมื่อดีเซลเกิดการรั่วไหลลงสู่ดินจะมีผลกับพืช โดยชะลอการเจริญของรากและลำต้นของพืช เนื่องจากดินที่ปนเปื้อนดีเซลเป็นพิษกับพืช และเกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมกับดินโดยดีเซลจะเข้าไปแทนที่ช่องอากาศในดิน ทำให้อากาศ น้ำและสารอาหารไม่สามารถผ่านเข้าไปในช่องว่างระหว่างดินได้ อาจส่งผลให้อัตราการงอกของเมล็ดพืชลดลง เนื่องจากฟิล์มของไฮโดรคาร์บอนที่เคลือบผิวของเมล็ดพืชจะป้องกันการถ่ายเทน้ำและอากาศของเอ็มบริโอ (embryo) ส่วนผลกระทบในระดับเซลล์พบว่า คลอโรพลาสต์ของพืชที่สัมผัสกับดีเซลจะถูกทำลาย นอกจากนี้ยังพบการผลิตไฟโตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะกดดัน (stress-related phytohormones) เพิ่มมากขึ้นและการสะสมสารพิษในเนื้อเยื่อพืชมากขึ้น ส่งผลต่อขนาดของพืชที่เล็กลง และการเจริญเติบโตของพืชลดลง (Graj และคณะ, 2013; Nikhil และคณะ, 2013)

2.3.2 ผลกระทบของดีเซลต่อน้ำ

เมื่อดีเซลรั่วไหลสู่แหล่งน้ำจะลอยอยู่บนผิวน้ำ จึงส่งผลกระทบต่อเพียงเล็กน้อยกับสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำที่ลึกมากๆ (subtidal species) แต่จะส่งผลกระทบโดยตรงกับสิ่งมีชีวิตที่ต้องสัมผัสกับผิวน้ำ เช่น สาหร่ายเคลป์ (kelp) และหญ้าทะเลบางชนิด สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและนกกน้ำบางชนิดที่หากินในน้ำและต้องโผล่ขึ้นมาที่ผิวน้ำเพื่อหายใจจะต้องสัมผัสกับน้ำมัน เมื่อสิ่งมีชีวิตสัมผัสกับน้ำมัน กินน้ำมันเข้าไป หรือสูดดมไอระเหยของน้ำมันจะเกิดความเป็นพิษในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การสะสมน้ำมันในเนื้อเยื่อ น้ำมันสามารถทำลายดีเอ็นเอได้ ส่งผลกระทบกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน หัวใจทำงานผิดปกติ ไช่ของปลาฝ่อ ตัวอ่อนของปลาทาย นกน้ำสูญเสียความสามารถในการลอยน้ำและขนนกสูญเสียความเป็นฉนวน เป็นต้น มนุษย์ก็ได้รับผลกระทบจากการรั่วไหลของน้ำมันทั้งทางตรงและทางอ้อม ได้แก่ การสูดดมไอระเหยของน้ำมันมีผลต่อสุขภาพโดยตรงและการรับประทานอาหารทะเลที่มีการสะสมสารพิษของน้ำมัน ทำให้เกิดการเจ็บป่วยต่าง ๆ ตั้งแต่อาการเวียนศีรษะ คลื่นไส้ ไปจนถึงเกิดมะเร็ง และมีผลกับระบบประสาทส่วนกลาง สารประกอบอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ (volatile organic compounds; VOCs) สามารถทำลาย

ดีเอ็นเอได้อย่างรุนแรง ทำให้เกิดมะเร็ง ทำลายระบบสืบพันธุ์และระบบประสาท นอกจากนี้ การรั่วไหลของน้ำมันยังส่งผลกระทบต่อชาวประมงที่ไม่สามารถจับปลาในพื้นที่ที่มีน้ำมันรั่วไหลได้ (Chang และคณะ, 2014)

2.3.3 ผลกระทบของดีเซลในอากาศ

การเผาไหม้ของดีเซลทำให้เกิดไอเสีย ซึ่งมีสารประกอบต่าง ๆ กว่าร้อยชนิด อีกทั้งยังมีอนุภาคขนาดเล็ก ไอร์เรหะ และสารอินทรีย์ที่เป็นพิษหลายชนิด องค์การระหว่างประเทศเพื่อการวิจัยโรคมะเร็ง (International Agency for Research on Cancer; IARC) ได้จัดให้ไอเสียจากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ดีเซลเป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่มที่ 1 คือ สารก่อมะเร็งในมนุษย์ โดยใช้ข้อมูลของมนุษย์ สัตว์ และข้อมูลจากการทดลอง พบว่า 25% ของอนุภาคอันตรายทั้งหมดในอากาศมาจากเครื่องยนต์ดีเซล อนุภาคที่เกิดขึ้นจากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ดีเซลร้อยละ 30 ของน้ำหนัก คือ สารประกอบอินทรีย์ทั้งสารประกอบที่มีซัลเฟอร์และไม่มีซัลเฟอร์ เช่น สารประกอบ PAH ชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นสารส่วนใหญ่ที่ปนเปื้อนในอากาศของตัวเมือง อีกทั้งสามารถเป็นสารก่อกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็ง สารเคมีมากกว่า 40 ชนิดถูกจัดให้เป็นสารปนเปื้อนในอากาศที่เป็นพิษ (toxic air contaminants; TACs) ในแคลิฟอร์เนีย ซึ่ง TACs ประกอบด้วยคาร์บอนมอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ สารหนู อะเซทิลดีไฮด์ เบนซีน ฟอร์มัลดีไฮด์ ตะกั่วอินทรีย์ สารประกอบแมงกานีส ชนิดต่าง ๆ สารประกอบปรอทชนิดต่าง ๆ เมทานอล ฟีนอล และสารประกอบไฮยาโนนชนิดต่าง ๆ การสัมผัสไอเสียจากดีเซลที่มีความเข้มข้นสูงอาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งทางเดินหายใจ มีอาการอดโรย การรับรู้กลิ่นแย่งลง ระคายเคืองตา จมูก และลำคอ มีอาการปวดหัว ง่วงซึม คลื่นไส้ จุกเสียดท้อง เกิดลิ้มเลือดเพิ่มมากขึ้นและกระตุ้นเกล็ดเลือด และสามารถทำให้เกิดมะเร็งปอดในมนุษย์ได้ (Lawal และคณะ, 2016)

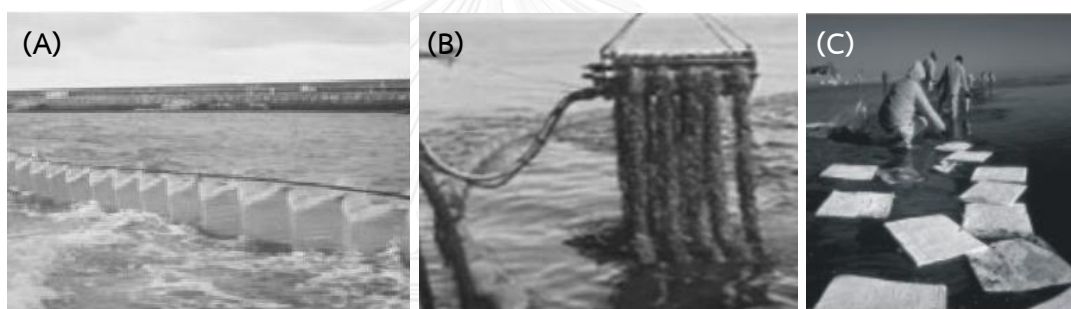
จะเห็นได้ว่าดีเซลมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิด สามารถสะสมในห่วงโซ่อาหารและสามารถถ่ายทอดมาสู่มนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม ดีเซลมีความเป็นพิษสูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องบำบัดดีเซลที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

2.4 การบำบัดดีเซลในสิ่งแวดล้อม

การบำบัดดีเซลในสิ่งแวดล้อมสามารถทำได้หลายวิธีทั้งวิธีทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ (Dave และ Ghaly, 2011) ดังนี้

2.4.1 วิธีทางกายภาพ

วิธีนี้นิยมใช้เพื่อควบคุมการรั่วไหลของน้ำมันในแหล่งน้ำ ส่วนใหญ่จะใช้วัสดุที่สามารถกั้นการแพร่กระจายของน้ำมันโดยไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมัน วัสดุที่นำมาใช้ได้แก่ บูม (boom) สกิมเมอร์ (skimmer) และวัสดุดูดซับ (adsorbent materials) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 วิธีเหล่านี้สามารถใช้ได้กับน้ำมันทุกชนิด แต่มีข้อเสียคือ ราคาแพง และต้องใช้เทคโนโลยีอื่นเข้ามาช่วยกำจัดน้ำมันที่ถูกกำจัดออกแล้ว (Dave และ Ghaly, 2011)



รูปที่ 2.1 ลักษณะของบูม (A) สกิมเมอร์ (B) และวัสดุดูดซับสังเคราะห์ (C) (Dave และ Ghaly, 2011)

นอกจากนี้ดีเซลบางส่วนสามารถสลายตัวเมื่อโดนแสง (photodegradation) (Agamuthu และ Darasnia, 2013) และยังมีวิธีการเผา (thermal remediation) แต่มีข้อเสียคือ การเผาอาจส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำ คนและสิ่งแวดล้อม อีกทั้งปล่อยสารประกอบที่เป็นพิษหลังการเผาไหม้สู่บรรยากาศ และสิ่งที่เหลือจากการเผาอาจมีความหนืดมากกว่าสารดั้งเดิม (Dave และ Ghaly, 2011)

2.4.2 วิธีทางเคมี

วิธีนี้ใช้ร่วมกับวิธีทางกายภาพเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของน้ำมันไปยังชายฝั่งและถิ่นที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำ โดยสารเคมีที่นำมาใช้จะเปลี่ยนสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมัน ตัวอย่างเช่น สารที่ทำให้น้ำมันแตกตัว (dispersants) สารที่ทำให้น้ำมันแข็งตัว (solidifiers) เป็นต้น แต่สารเคมีที่นำมาใช้อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของคนและสิ่งมีชีวิตในน้ำ (Dave และ Ghaly, 2011)

2.4.3 วิธีทางชีวภาพ

วิธีทางชีวภาพ (bioremediation) คือ การใช้สิ่งมีชีวิตในการกำจัดหรือลดความเป็นพิษของสารปนเปื้อน เช่น พืช แบคทีเรีย รา ยีสต์ เป็นต้น (Dellagnezze และคณะ, 2014) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ราคาถูก และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Liu และคณะ, 2011) โดยจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้ไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงแหล่งเดียวในการเจริญ หลังจากการย่อยสลายจะเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และชีวมวลของเซลล์ ซึ่งการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะเรียงลำดับตามการย่อยสลายจากง่ายไปยากตามลักษณะโครงสร้างของสาร เช่น ไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสายจะย่อยสลายได้ง่ายกว่าวงอะโรมาติก เป็นต้น (Maliji และคณะ, 2013) ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในน้ำ เช่น *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Vibrio* เป็นต้น (Dave และ Ghaly, 2011)

การบำบัดทางชีวภาพยังแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ ได้แก่

ก) Biostimulation เป็นการเติมสารอาหารหรือปรับสภาวะให้เหมาะสมและจำเป็นกับการเจริญของจุลินทรีย์ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน โดยสารอาหารที่เติมลงไปอาจเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ (Macaulay และ Rees, 2014) ซึ่งสารอาหารที่จำเป็น ได้แก่ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส หรือการเพิ่มออกซิเจน การปรับ pH เพื่อช่วยกระตุ้นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันให้เพิ่มจำนวนมากขึ้นและลดระยะเวลาในการบำบัดให้น้อยลง (Kavamura และ Esposito, 2010) วิธีนี้เหมาะสมกับการบำบัดในดินและน้ำ ส่วนใหญ่จะใช้ย่อยสลายอัลเคน BTEX และ PAHs (Macaulay และ Rees, 2014) อีกทั้งเป็นวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่ายเนื่องจากไม่จำเป็นต้องขุดดินหรือขนย้ายน้ำที่ปนเปื้อนไปบำบัดนอกพื้นที่ อย่างไรก็ตามการเติมสารอาหารความเข้มข้นสูงลงในน้ำที่ต้องการบำบัด อาจทำให้เกิดการเจริญมากเกินไปของสาหร่าย ส่งผลให้ออกซิเจนในน้ำลดลง อาจเกิดความเป็นพิษต่อมนุษย์และระบบนิเวศทางทะเล จึงควรทดสอบหาความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมก่อนเติมลงไปบำบัด (Macaulay และ Rees, 2014)

ตัวอย่างการบำบัดด้วยวิธี biostimulation

Calvo และคณะ (2010) ได้ทดสอบบำบัดดินเหนียวที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยเติมสารอาหารชนิดต่าง ๆ เช่น สารอาหารอินทรีย์ สารอาหารอนินทรีย์ และสารลดแรงตึงผิว พบว่า ชุดการทดสอบที่เติมสารอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียม สามารถลดปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดได้มากที่สุดถึง $87.6 \pm 0.55\%$ ในขณะที่ ชุดธรรมชาติบำบัดลดได้เพียง $19.6 \pm 0.21\%$

Nikolopoulou และคณะ (2013) ได้ทดสอบบำบัดทรายชายหาดที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยเติมสารอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียม กรดยูริก เลซิทีน และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า ชุดการทดลองที่เติมปุ๋ย ยูริก เลซิทีน และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถย่อยสลายอัลเคนได้ 99% ในเวลา 30 วัน ในขณะที่ ชุดควบคุมที่มีเพียงทรายและน้ำมันดิบย่อยสลายได้ 58%

Jung และคณะ (2014) ได้ทดสอบการย่อยสลายดินที่ปนเปื้อนดีเซลโดยเปรียบเทียบชุดที่เติมดินเหนียวแดงธรรมดา ชุดที่เติมดินเหนียวแดงที่ผ่านกระบวนการ (processed red clay) กับ ชุดควบคุมที่ไม่เติมดินเหนียวแดง พบว่า ชุดที่เติมดินเหนียวธรรมดาและชุดที่เติมดินเหนียวแดงที่ผ่านกระบวนการสามารถย่อยสลายดีเซลได้ 26.4% และ 36% ตามลำดับ ภายใน 35 วัน ในขณะที่ ชุดควบคุมมีดีเซลเหลืออยู่ 94.6% แสดงว่า การเติมดินเหนียวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลของแบคทีเรียในดินได้

Ofoegbu และคณะ (2015) ได้ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินโดยเปรียบเทียบการเติมสารชนิดต่าง ๆ ได้แก่ สารอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียม มูลวัว และถั่วแกลบเมล็ดปาล์ม พบว่า การเติมสารอาหารที่ผสมมูลวัวสามารถย่อยน้ำมันดิบความเข้มข้น 2%, 4% และ 6% ได้ 84.62%, 71.80% และ 58.60% ตามลำดับ ในเวลา 40 วัน ซึ่งให้ผลการย่อยสลายที่ดีกว่าการเติมสารอาหาร มูลวัว และถั่วแกลบเมล็ดปาล์มอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงชนิดเดียว ในขณะที่ชุดควบคุมสามารถย่อยสลายได้เพียง 30% ทุกความเข้มข้น

Horel และคณะ (2015) ได้ทดสอบการย่อยสลายตะกอนทรายชายหาดจำนวน 200 กรัม ที่ปนเปื้อนดีเซลปริมาณ 800 มิลลิกรัม โดยเปรียบเทียบชุดการทดลองที่เติมหญ้าชนิดหนึ่ง (*Spartina alterniflora*) ชุดที่เติมเนื้อเยื่อปลาชนิดหนึ่ง (*Chloroscombrus chrysurus*) และไนโตรเจนและฟอสฟอรัสอินทรีย์ พบว่า ชุดที่เติมเนื้อเยื่อปลาเกิดการย่อยสลายมากที่สุดภายในเวลา 42 วัน โดยสามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายได้ 104% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

Victor และคณะ (2015) ได้ทดสอบการย่อยสลายดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว ความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนัก โดยเปรียบเทียบการเติมเปลือกกล้วยและเปลือกกล้วย (plantain peel) ที่ตากแห้งลงไปบนดิน พบว่า ชุดที่เติมเปลือกกล้วยสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ 93.5% ในเวลา 70 วัน ซึ่งมากกว่าชุดที่เติมเปลือกกล้วยที่ย่อยสลายได้ 84.11%

ข) Bioaugmentation เป็นวิธีการบำบัดโดยการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลลงในพื้นที่ปนเปื้อน เหมาะกับพื้นที่ที่มีจุลินทรีย์ไม่เพียงพอหรือจุลินทรีย์ประจำถิ่นไม่สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ จุลินทรีย์ที่เติมลงไปอาจเป็นแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว กลุ่มแบคทีเรีย หรือแบคทีเรียที่ตัดต่อพันธุกรรม (Tyagi และคณะ, 2011) รวมถึงจุลินทรีย์ที่อยู่ในพื้นที่ปนเปื้อนหรือนอกพื้นที่ปนเปื้อน เป็นวิธีที่สามารถใช้บำบัดได้ทั้งในดินและน้ำที่มีการปนเปื้อน สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้หลายชนิด และการนำจุลินทรีย์ที่อยู่ในพื้นที่ปนเปื้อนมาเพิ่มจำนวนแล้วเติมกลับลงไปเพื่อบำบัดในพื้นที่เดิมจะเพิ่มโอกาสการประสบความสำเร็จในการบำบัดมากขึ้น (Macaulay และ Rees, 2014)

ตัวอย่างการบำบัดด้วยวิธี bioaugmentation

Taccari และคณะ (2012) ได้ทดสอบบำบัดดินที่ปนเปื้อนดีเซลความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก โดยเปรียบเทียบดินที่เติมปุ๋ย ดินที่เติมปุ๋ยและกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนดีเซล และดินที่เติมปุ๋ย กลุ่มแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า ชุดการทดลองของดินที่เติมปุ๋ย กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายดีเซลได้ 96% ภายในเวลา 120 วัน

Pontes และคณะ (2013) ได้ทดสอบการบำบัดน้ำมันฝังตัวในทราย เปรียบเทียบวิธีการบำบัด 3 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดธรรมชาติบำบัด (natural attenuation; NA) ชุดที่เติมสารอาหาร (biostimulation; BS) และชุดที่เติมจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและสารอาหาร (bioaugmentation; BA) ทำการทดลองเป็นเวลา 180 วัน พบว่า ชุดการทดลอง BA สามารถย่อยสลายน้ำมันที่ฝังตัวในทรายได้สูงถึง 80% ในเวลา 60 วัน ในขณะที่ชุดการทดลอง BS ใช้เวลา 120 วัน

Nikolopoulou และคณะ (2013) ได้ทดสอบบำบัดน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยเปรียบเทียบชุดการทดลองเติมสารอาหาร (NPK) กรดยูริกและเลซิทีน สารลดแรงตึงผิว และแบคทีเรีย (pre-adapted indigenous cultures) พบว่า ชุดการทดลองที่เติมสารอาหาร สารลดแรงตึงผิวและแบคทีเรีย สามารถย่อยสลายอัลเคนได้สูงถึง 99% ภายในเวลา 15 วัน ในขณะที่การเติมสารอาหารเพียงอย่างเดียวย่อยสลายอัลเคนได้เพียง 20% ภายในเวลา 60 วัน

Liu และคณะ (2015) ได้ทดสอบการย่อยสลายน้ำทะเลสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนดีเซล ความเข้มข้น 2,342 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ *Rhodococcus pyridinivorans* CC-HCCH11 และ *Gordonia alkanivorans* CC-JG39 ที่ตรึงในเม็ดเจลแคลเซียมแอลจิเนต พบว่า เชลล์ตรึงสามารถย่อยสลายได้ 78% ในเวลา 23 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียตรึงย่อยสลายได้ 35%

Onur และคณะ (2015) ได้ทดสอบบำบัดตัวอย่างน้ำที่ปนเปื้อนดีเซลจากแม่น้ำที่อยู่ใกล้กับโรงกลั่นน้ำมัน โดยใช้ *Acinetobacter haemolyticus* Zn01 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแม่น้ำ พบว่า *A. haemolyticus* สามารถย่อยสลายดีเซลได้ 92% ภายใน 14 วัน และสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ จึงมีแนวโน้มสูงที่จะนำแบคทีเรียดังกล่าวมาประยุกต์ใช้งานด้านการบำบัดทางชีวภาพของน้ำที่ปนเปื้อนดีเซล

Masy และคณะ (2016) นำ *Rhodococcus erythropolis* T902.1 เติบโตในดินเหนียวที่ปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอน พบว่า การเติมแบคทีเรียสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน ($C_{10} - C_{40}$) ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 6.5 กรัมต่อกิโลกรัมต่อน้ำหนักแห้งของดินได้มากกว่าชุดธรรมชาติบำบัดในสภาวะไร้อากาศ และชุดที่เติมออกซิเจน หลังจาก 80 วัน แสดงว่า การเติมแบคทีเรียสามารถลดเวลาในการบำบัดได้ นอกจากนี้ยังพบอัตราส่วนของ *R. erythropolis* เป็น 1% ของประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในดินซึ่งลดลงจาก 25% ในวันที่ 0 และดินที่เติมแบคทีเรียต้องการออกซิเจน 5.89 กรัมในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน 1 กรัมโดยประมาณ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรคาร์บอนแบคทีเรียก็ต้องการออกซิเจนมากขึ้น

Crisafi และคณะ (2016) ได้ทดสอบการบำบัดน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันรั่วไหล โดยแบ่งการทดลองเป็นชุดที่เติมสารอาหาร (NPK) เพียงอย่างเดียว ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและสารอาหาร และชุดที่เติมสารกระจายน้ำมันและสารอาหาร พบว่า การเติมกลุ่มแบคทีเรียและสารอาหารสามารถย่อยสลายน้ำมันในตัวอย่งน้ำทะเลได้ $79 \pm 3.2\%$ ในเวลา 14 วัน ซึ่งมากกว่าชุดที่เติมเพียงสารอาหารอย่างเดียวที่ย่อยสลายเพียง $73 \pm 2.4\%$ และชุดที่เติมสารกระจายน้ำมันย่อยสลายได้ $69 \pm 2.6\%$

2.5 การใช้แบคทีเรียในการบำบัดดีเซลปนเปื้อน

แบคทีเรียสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินและน้ำ โดยใช้ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (Maliji และคณะ, 2013) ซึ่งการย่อยสลายสามารถเกิดขึ้นในสถานะที่ใช้อากาศหรือไม่ใช้อากาศ (Dellagnezze และคณะ, 2014)

ตัวอย่างการใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียวในการย่อยสลายดีเซล เช่น

Maliji และคณะ (2013) นำ *Bacillus cereus* A, *B. cereus* B และ *B. cereus* C ที่คัดแยกจากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมัน มาทดสอบการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 4% โดยปริมาตรในอาหารเหลว พบว่า *B. cereus* A สามารถย่อยสลายอะลิฟาติกและอะโรมาติกในดีเซลได้ดีที่สุดคือ 82.41% และ 81.56% ภายใน 3 วัน

Niazy และคณะ (2016) ได้คัดแยก *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 5 สายพันธุ์จากดินที่ปนเปื้อนดีเซล นำมาทดสอบการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 1% โดยปริมาตรในอาหารเหลว พบว่า *P. aeruginosa* I2 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุดคือ 88% ในเวลา 7 วัน

Nkem และคณะ (2016) นำ *Cellulosimicrobium cellulans* และ *Acinetobacter baumannii* ที่คัดแยกจากก้อนน้ำมัน (tarball) มาทดสอบการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 2% โดยปริมาตรในอาหารเหลว พบว่า *C. cellulans* และ *A. baumannii* สามารถย่อยสลายอัลเคนในดีเซลได้ 64.4% และ 58.1% ภายใน 10 วัน

การใช้กลุ่มแบคทีเรียแทนการใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและสารเคมีชนิดต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งสามารถนำสารตัวกลาง (intermediate) ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายจากแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งไปใช้ได้ ทำให้ระบบการบำบัดทางชีวภาพเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Das และ Dash, 2014)

ตัวอย่างการใช้กลุ่มแบคทีเรียย่อยน้ำมัน เช่น

Zanaroli และคณะ (2010) ได้นำกลุ่มแบคทีเรีย ENZ-G1 และ ENZ-G2 ซึ่งผ่านการเพิ่มจำนวนจากกลุ่มแบคทีเรียทางการค้า ENZTVEBA มาทดสอบการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรในอาหารเหลว minimum mineral medium พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย ENZ-G1 และ ENZ-G2 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ $90.8 \pm 1.2\%$ และ $89.4 \pm 0.1\%$ ตามลำดับ ภายใน 10 วัน

Jayashree และคณะ (2012) ได้คัดแยก *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Serratia* sp. และ *Staphylococcus* sp. จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณท่าเรือ จากนั้นนำแบคทีเรียมาทดสอบการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น (lubricating oil) ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาณในอาหารเหลว minimal salt media เป็นเวลา 30 วัน พบว่า แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ 90.2%, 82.3%, 78.8% และ 25.5% ตามลำดับ แต่เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดมาผสมกัน พบว่า กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ 97.2%

Bao และคณะ (2012) ได้คัดแยก *Ochrobactrum* sp. N1, *Brevibacillus parabrevis* N2, *B. parabrevis* N3 และ *B. parabrevis* N4 จากน้ำทะเลและโคลนที่ปนเปื้อนปิโตรเลียม นำกลุ่มแบคทีเรียมาทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาณใน mineral salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3% เป็นเวลา 14 วัน พบว่า กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยน้ำมันดิบได้ 79%

Al-Wasify และ Hamed (2014) ได้คัดแยก *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* และ *Acinetobacter lwoffii* จากน้ำและดินที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมมาทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.2% โดยปริมาณในอาหาร mineral salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 28 วัน พบว่า *P. aeruginosa*, *B. subtilis* และ *A. lwoffii* ย่อยสลายได้ 67.37%, 63.36% และ 59.26% ตามลำดับ ในเวลา 10 วัน แต่กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยน้ำมันดิบได้ 81.27% แสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบมากกว่าแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว

Mnif และคณะ (2015) ได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนจากดินที่ปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอน นำมาทดสอบการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 5% โดยปริมาณในอาหารเหลว minimal-salt medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 21 วัน พบว่า กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลาย 5% ดีเซลได้ $31.44 \pm 1.64\%$

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ

การบำบัดทางชีวภาพให้ประสบความสำเร็จมีหลายปัจจัยเป็นองค์ประกอบและเกี่ยวข้องทั้งปัจจัยทางชีวภาพและทางกายภาพ เช่น ความสามารถของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายปิโตรเลียม ความเข้มข้นของปิโตรเลียม สารอาหาร ความเค็ม อุณหภูมิ และปัจจัยอื่นๆ (Peixoto และคณะ, 2011) ปัจจัยที่สำคัญได้แก่

1) อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกับกิจกรรมของเอนไซม์ โดยอุณหภูมิช่วงกลาง ๆ (mesophilic) ประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส ถึงช่วงอุณหภูมิสูง (thermophilic) อาจสูงถึงประมาณ 60 องศาเซลเซียส จะเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน นอกจากนี้ อุณหภูมิยังส่งผลกับความสามารถในการละลายของไฮโดรคาร์บอน แต่ช่วงอุณหภูมิต่ำจะทำให้ไขมันหนืดมากขึ้น ซึ่งสามารถช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของน้ำมันบนผิวน้ำ แต่ทำให้ยากต่อการย่อยสลาย (Sonawdekar, 2012) ถึงแม้ว่าการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนทางชีวภาพสามารถเกิดขึ้นได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างแต่ในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ จะมีอัตราการย่อยสลายสูงสุดที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ ในดินที่ช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ในแหล่งน้ำจืดบางแห่งที่ช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส และในทะเลที่ช่วงอุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส (Das และ Chandran, 2011)

2) สารอาหาร

สารอาหารเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยเสริมกิจกรรมการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัส สารอาหารบางชนิดอาจเป็นปัจจัยที่จำกัดการย่อยสลาย เมื่อเกิดเหตุ น้ำมันรั่วไหลในทะเลหรือแหล่งน้ำจืดจะมีแหล่งคาร์บอนเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งปริมาณของสารทั้งสองชนิดที่มีอยู่จะเป็นปัจจัยที่จำกัดการย่อยสลายน้ำมัน ในทะเลมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในระดับต่ำแต่ในแหล่งน้ำจืดขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเนื่องจากธาตุทั้งสองชนิดเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นกับพืช ดังนั้นการเติมสารอาหารจึงจำเป็นสำหรับการเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน ในทางตรงกันข้ามหากเติมสารอาหารมากเกินไปจะยับยั้งความสามารถในการย่อยสลายได้ (Das และ Chandran, 2011) ตามหลักของการบำบัดอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (C:N:P) ควรเป็น 120:10:1 ซึ่งอาจปรับได้ตามชนิดของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ อาจเติมสารอื่น ๆ ตามความต้องการได้ (Sonawdekar, 2012)

3) ความเค็ม

ความเค็มเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลกับการย่อยสลายน้ำมัน จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญในอาหารทดสอบที่มีความเค็มเทียบเท่ากับน้ำทะเลได้ โดยสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.1-2 โมลาร์ แต่ที่ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์จะให้ผลการย่อยสลายสูงที่สุด ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับน้ำทะเลส่วนใหญ่ในธรรมชาติ (Sonawdekar, 2012) หากแหล่งปนเปื้อนมีความเค็มสูงจะยับยั้งการย่อยสลายทางชีวภาพ (Sierra-Garcia และ Oliveira, 2013)

4) จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีวิธีการย่อยสลายที่เหมาะสมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ (Das และ Chandran, 2011) และหากทราบลักษณะทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนปิโตรเลียมอาจทำให้ทราบกลไกการย่อยสลาย (Sierra-Garcia และ Oliveira, 2013)

5) ความเป็นกรด-เบส (pH)

ช่วง pH ที่เหมาะสมกับการย่อยสลายควรมีค่าอยู่ระหว่าง 6-9 (Das และ Chandran, 2011) สภาวะแวดล้อมที่มีค่า pH ต่ำจะยับยั้งการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน (Sonawdekar, 2012)

6) ออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่ต้องใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพ แต่ปริมาณของออกซิเจนที่จะใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องใช้อากาศจะใช้ออกซิเจน 3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยไม่คำนึงถึงมวลรวมของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงสามารถแปรผันได้ตามมวลของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง (Sonawdekar, 2012) ออกซิเจนเป็นตัวช่วยในปฏิกิริยาของเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenases) ในช่วงแรกของการย่อยสลายภายใต้สภาวะมีอากาศ ซึ่งเป็นสภาวะที่เกิดการย่อยสลายอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ (Das และ Chandran, 2011)

7) ชนิดของไฮโดรคาร์บอน

โดยทั่วไปการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนจะเรียงลำดับจากง่ายไปหายาก ดังนี้ อัลเคน > อัลเคนแบบกิ่ง > วงอะโรมาติกน้ำหนักโมเลกุลต่ำ > วงอัลเคน สารประกอบอะโรมาติกน้ำหนักโมเลกุลสูงและสารประกอบที่มีซัลเฟอร์ อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มีประชากรของจุลินทรีย์แตกต่างกันและปัจจัยทางกายภาพแตกต่างกันอาจส่งผลให้ลำดับการย่อยสลายเปลี่ยนแปลงได้ (Sonawdekar, 2012)

8) สมบัติทางกายภาพของไฮโดรคาร์บอน

สมบัติไฮโดรคาร์บอนมีผลต่อการบำบัด เช่น ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ชอบน้ำจะดูดซับกับดิน ไฮโดรคาร์บอนสายสั้นอาจระเหยได้ ความสามารถในการละลายน้ำของไฮโดรคาร์บอน ส่งผลกับการย่อยสลายทางชีวภาพ (Sonawdekar, 2012)

9) ความเข้มข้นของไฮโดรคาร์บอน

อัตราการย่อยสลายของจุลินทรีย์และการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรคาร์บอนขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลาย หากความสามารถในการละลายสูงจะยิ่งทำลายสิ่งมีชีวิต โดยปกติ ถ้าน้ำมันมีความเข้มข้นมากกว่า 5% จะยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ส่งผลกับอัตราส่วนของ C:N:P และจำกัดปริมาณออกซิเจน (Sonawdekar, 2012)

2.7 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ (Microbial immobilization)

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมมากขึ้น นักวิทยาศาสตร์พบว่า วิธีการบำบัดทางชีวภาพมีความหลากหลาย มีความเสถียรสูง สามารถประยุกต์ใช้งานกับสารพิษได้หลายชนิด มีต้นทุนต่ำและมีประสิทธิภาพ (Bayat และคณะ, 2015) อย่างไรก็ตามการบำบัดทางชีวภาพด้วยการเติมจุลินทรีย์มักไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากเซลล์ที่เติมลงในแหล่งน้ำถูกเจือจางหรือเซลล์ไม่ทนต่อสารพิษความเข้มข้นสูง (Liu และคณะ, 2015) ดังนั้นการตรึงเซลล์จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้การบำบัดทางชีวภาพประสบความสำเร็จ ทำให้แบคทีเรียรอดชีวิตและคงกิจกรรมการบำบัดสารพิษได้

สิ่งที่นำมาตรึงมีหลายชนิด เช่น เอนไซม์ ออแกเนลต่าง ๆ ของเซลล์ (cellular organelles) เซลล์พืช เซลล์สัตว์ และเซลล์จุลินทรีย์ นอกจากการประยุกต์ใช้ทางสิ่งแวดล้อม เช่น การบำบัดน้ำเสีย และการบำบัดทางชีวภาพ การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ยังถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น การผลิตสารเคมีที่มีประโยชน์ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เป็นต้น ซึ่งวิธีการตรึงจะช่วยเพิ่มความเสถียรและการอยู่รอดของเซลล์ได้ (Bayat และคณะ, 2015)

ข้อดีของการตรึงเซลล์คือ ทำให้เซลล์แบคทีเรียมีจำนวนมาก สามารถนำเซลล์มาใช้ซ้ำได้ ช่วยแก้ปัญหาเซลล์ถูกเจือจาง เซลล์ตรึงสามารถผลิตสารที่ต้องการปริมาณมากได้ เกิดสภาวะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ ปรับปรุงความเสถียรทางพันธุกรรม ป้องกันเซลล์จากความเสียหายที่เกิดจากแรงเฉือน เซลล์ทนต่อความเป็นพิษของสารเคมี pH อุณหภูมิ ตัวทำละลาย และโลหะหนัก (Bayat และคณะ, 2015)

สิ่งที่ควรคำนึงในการเลือกวัสดุตรึง ควรเป็นวัสดุที่ไม่ละลายน้ำ ไม่เป็นพิษ ไม่ก่อมลพิษ สามารถบรรจุเซลล์ปริมาณมากลงไปได้ ทนต่อสภาพเชิงกล สภาวะทางชีวภาพและทางเคมีได้ มีอายุการเก็บรักษานาน เหมาะสมกับการใช้งาน ราคาถูก ง่ายต่อการแยกออกมาจากอาหาร ง่ายต่อการผลิตและการใช้งาน มีความเหมาะสมกับวิธีการตรึงที่เลือกใช้ (Bayat และคณะ, 2015; Martins และคณะ, 2013)

วัสดุที่ใช้ในการตรึงมีหลายชนิดอาจใช้วัสดุอินทรีย์หรือวัสดุอนินทรีย์

วัสดุอินทรีย์แบ่งเป็นวัสดุทางธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ วัสดุทางธรรมชาติ เช่น แอลจีเนต (alginate) คาราจีแนน (carrageenan) จากสาหร่าย วัสดุสังเคราะห์ เช่น พอลิยูรีเทน (polyurethane) เรซิน (resin) วัสดุอินทรีย์มีมากกว่าวัสดุอนินทรีย์ โดยทั่วไปจะใช้วัสดุสังเคราะห์มากกว่าวัสดุทางธรรมชาติเนื่องจากมีความทนทานมากกว่า

วัสดุอินทรีย์ เช่น ดินเหนียว ถ่านกัมมันต์ เซรามิก เป็นต้น เนื่องจากเป็นวัสดุที่ทนต่อ pH สารเคมี ทนต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ และทนต่อความร้อน จึงนำวัสดุกลุ่มนี้มาใช้ตรึงเซลล์ (Bayat และคณะ, 2015; Martins และคณะ, 2013)

ตัวอย่างการตรึงจุลินทรีย์บนวัสดุเพื่อใช้ในการบำบัดทางชีวภาพของสารพิษชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างการตรึงจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษชนิดต่าง ๆ (Bayat และคณะ, 2015)

สารที่ต้องการบำบัด	วัสดุตรึง	จุลินทรีย์
แคดเมียมและสังกะสี	แอลจิเนต	<i>Pseudomonas fluorescens</i> G7
ดีเซล	พอลิไวนิลแอลกอฮอล์	แบคทีเรียที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน
เอทิลเบนซีน	แอลจิเนต, วัณ, พอลิอะคริลาไมด์	<i>Pseudomonas fluorescens</i> -CS2
กรดไซยานูรีด	ก้อนดินเหนียว	<i>Pseudomonas</i> sp. NRRL B-12228
แนฟทาลีน	แอลจิเนต, วัณ, พอลิอะคริลาไมด์	<i>Pseudomonas</i> sp. Strain NGK 1
ไนโตรฟีนอล	ดินไคอะตอม	<i>Pseudomonas</i> sp.
ฟีนอล	พอลิไวนิลแอลกอฮอล์	<i>Acinetobacter</i> sp. strain PD12
2,4,6-ไตรไนโตรโทลูอีน	แอลจิเนต	<i>Arthrobacter</i> sp.
2,4,6-ไตรคลอโรฟีนอล	คาราจีแนน/เจลเจลาติน	กลุ่มแบคทีเรีย

วิธีการตรึงมีหลายวิธี วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ (Bayat และคณะ, 2015)

ก. การดูดซับ (Adsorption)

วิธีนี้จุลินทรีย์จะยึดเกาะบนพื้นผิววัสดุที่มีลักษณะเป็นรูพรุน วิธีนี้เป็นวิธีการตรึงที่ง่ายที่สุด อาศัยปฏิสัมพันธ์ทางกายภาพระหว่างจุลินทรีย์และพื้นผิววัสดุ (รูปที่ 2.2 A) มีข้อดีคือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีราคาถูก ไม่ต้องใช้สารเคมี และมีประสิทธิภาพ เมื่อเซลล์ยึดเกาะกับวัสดุตรึงแล้ว เซลล์สามารถเจริญบนผิวของวัสดุตรึงได้ การตรึงเซลล์บนวัสดุตรึงที่เหมาะสมจะช่วยกระตุ้น เมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ปกป้องเซลล์จากสารพิษ และยังคงประสิทธิภาพของเซลล์ได้ (Martins และคณะ, 2013)

เทคนิคนี้อาศัยเพียงแรงอ่อน ๆ ยึดเซลล์กับวัสดุตรึง โดยพบว่าแรงที่ใช้มีหลายชนิด เช่น แรงแวน เดอ วาลส์ (van der Waals) พันธะไอออน (ionic bonds) พันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic bonds) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonds) ปัจจัยที่มีผลกับการตรึงเซลล์ แบบดูดซับ ได้แก่ อายุและลักษณะทางสรีรวิทยาของเซลล์ โครงสร้างพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย (แฟลกเจลลาหรือส่วนประกอบอื่น ๆ) ประจุที่ผิวเซลล์ และคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกซึ่งเป็น สิ่งสำคัญที่ทำให้เซลล์เกาะกับพื้นผิวที่แข็งได้ ส่วนประกอบของอาหาร pH และสภาวะแวดล้อม ต่าง ๆ คุณสมบัติของพื้นผิววัสดุตรึง เซลล์จะเกาะกับวัสดุมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับโครงสร้างและ ขนาดของ รูพรุนของวัสดุตรึง สภาพตามธรรมชาติของวัสดุก็เป็นสิ่งสำคัญเช่นกัน โดยพบว่า วัสดุตรึงที่เป็นสารอินทรีย์มีลักษณะหลายแบบและโครงสร้างรูพรุนที่หลากหลาย ในขณะที่วัสดุตรึง ที่เป็นสารอนินทรีย์จะทนต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ (Bayat และคณะ, 2015; Martins และคณะ, 2013)

ข. พันธะโควาเลนต์/การเชื่อมขวาง (Covalent bonding/Cross linking)

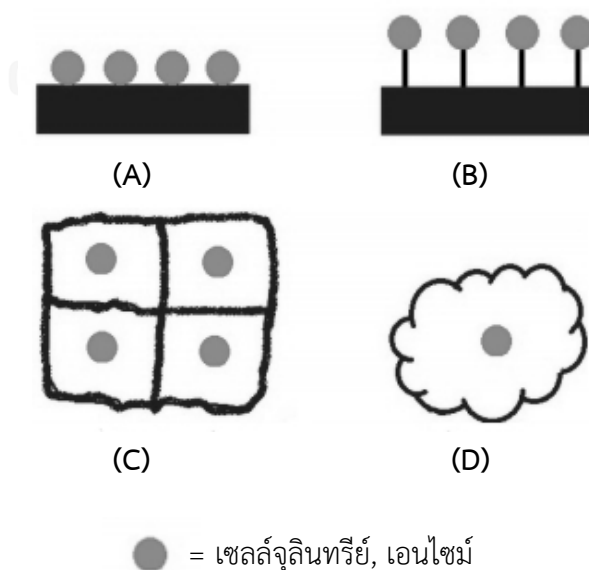
วิธีนี้เกิดขึ้นโดยใช้กลไกการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างวัสดุตรึงกับเซลล์ในสารละลาย ที่มีสารยึดเกาะ (รูปที่ 2.2 B) วิธีนี้ใช้ได้ดีกับการตรึงเอนไซม์ แต่ไม่ค่อยนำมาใช้กับการตรึงเซลล์ เพราะสารที่ใช้เป็นสารยึดเกาะอาจเป็นพิษกับเซลล์ อาจทำให้สูญเสียเซลล์หรือกิจกรรมของเอนไซม์ บางชนิดได้ และยากต่อการหาสภาวะที่เซลล์จะตรึงกับวัสดุโดยที่เซลล์ไม่ถูกทำลายหรือสูญเสีย ความสามารถไป (Martins และคณะ, 2013)

ค. การกักเก็บ (Entrapment)

วิธีนี้เซลล์จะเข้าไปอยู่ในรูพรุนของวัสดุตรึง (รูปที่ 2.2 C) เทคนิคนี้จะช่วยปกป้องเซลล์และยืดอายุเซลล์ทั้งในตอนที่ใช้งานและระหว่างช่วงที่เก็บรักษา วัสดุที่ใช้ตรึงมีหลายชนิด เช่น วัณ แอลจิเนต คาราจีแนน เซลลูโลส คอลลาเจน เจลาติน พอลิสไตรีน (polystyrene) พอลิยูรีเทน (polyurethane) เป็นต้น แอลจิเนตเป็นสารที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ เพราะง่ายต่อการเตรียมและใช้งาน วิธีนี้มีข้อดีคือ เซลล์จะมีความทนต่อสภาวะเชิงกลสูง แต่ก็มีข้อเสีย เช่น เซลล์อาจจะรั่วออกจากวัสดุ มีค่าใช้จ่ายในการตรึง วัสดุตรึงเสียสภาพระหว่างใช้งาน และไม่สามารถตรึงเซลล์หรือเอนไซม์ในจำนวนมากลงไปวัสดุ (Martins และคณะ, 2013)

ง. การเข้าแคปซูล (Encapsulation)

วิธีนี้คล้ายกับเทคนิคการกักเก็บ โดยเซลล์หรือเอนไซม์จะอยู่ในเยื่อหุ้ม (แคปซูล) (รูปที่ 2.2 D) ซึ่งเยื่อหุ้มจะมีหน้าที่ให้สารซึมผ่านได้บางส่วน แต่สารอาหารหรือสารที่ต้องการย่อยสลายซึมผ่านได้อย่างอิสระ และยังคงเก็บเซลล์หรือเอนไซม์ไว้ด้านในได้ ปัจจัยที่ทำให้เกิดลักษณะเช่นนี้คือ ขนาดที่เหมาะสมของรูพรุนของเยื่อหุ้มควรสอดคล้องกับขนาดของสิ่งที่อยู่ด้านในเยื่อหุ้ม ซึ่งเทคนิคนี้จะช่วยปกป้องเซลล์หรือเอนไซม์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ถึงแม้ว่าเทคนิคการเข้าแคปซูลจะสามารถใส่เซลล์จำนวนมากลงไปได้ แต่แคปซูลมีลักษณะเปราะบาง และเซลล์หรือเอนไซม์จะถูกจำกัดการแพร่กระจาย (Martins และคณะ, 2013)



รูปที่ 2.2 การตรึงเซลล์แบบต่าง ๆ การดูดซับ (A) การเชื่อมขวาง (B) การกักเก็บ (C) การเข้าแคปซูล (D)

2.8 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการตรึงเซลล์เพื่อการบำบัดน้ำมันทางชีวภาพ

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีการตรึงเซลล์มาใช้ในการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนน้ำมันต่าง ๆ การตรึงเซลล์ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการดูดซับ รองลงมาคือวิธีการกักเก็บ และวัสดุที่นำมาตรึงมีหลากหลายชนิดทั้งวัสดุอินทรีย์และวัสดุอนินทรีย์

ตัวอย่างการตรึงแบคทีเรียบนวัสดุชนิดต่าง ๆ และนำมาใช้ในการย่อยสลายน้ำมันในน้ำ เช่น Chekroud และคณะ (2011) ได้นำ *Rhodococcus* sp. S และ *Pseudomonas* sp. S และกลุ่มแบคทีเรียมาตรึงบนฟางข้าวโดยวิธีการดูดซับ และตรึงในแอลจีเนตโดยวิธีการกักเก็บ พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 2% โดยปริมาตรในอาหารเหลวที่มีสารลดแรงตึงผิว Triton X-100 ความเข้มข้น 1% โดยปริมาตรได้มากกว่าเซลล์อิสระ โดยเซลล์ที่ตรึงในแอลจีเนตสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ 87.75 - 92% หลังจาก 9 วัน ส่วนเซลล์ที่ตรึงบนฟางข้าวสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ 88 - 90% หลังจาก 12 วัน และฟางข้าวดูดซับน้ำมันได้ 8-10%

Jayashree และคณะ (2012) นำ *Pseudomonas* sp. มาตรึงในแคลเซียมแอลจีเนต พบว่า ผลการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของแบคทีเรียหลังการตรึงไม่ลดลง ในขณะที่เซลล์อิสระที่ย่อยสลายได้ 90.2% ในเวลา 30 วัน

Hou และคณะ (2013) ได้ตรึงแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. F9 บน puffed foxtail millet (PFM) กับเมมเบรนจากสารประกอบแคลเซียมแอลจีเนต-ไคโทซาน จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 1% โดยปริมาตร พบว่า แบคทีเรียตรึงสามารถย่อยดีเซลได้มากกว่า 90% ในเวลา 2 วัน ในขณะที่แบคทีเรียอิสระย่อยสลายดีเซลได้น้อยกว่า 90% ในเวลา 7 วัน

Nopcharoenkul และคณะ (2013) นำ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 มาตรึงบนเม็ดพลาสติกพอลิเอทิลีน (polyethylene plastic pellets) จากนั้นนำไปทดสอบการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การตรึงเซลล์ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายดีเซลความเข้มข้นสูงได้ อีกทั้งสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก 70 รอบในอาหารเหลวที่มีดีเซล 200 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

Maliji และคณะ (2013) ได้ตรึง *B. cereus* A บนฟองน้ำ (sponge) และบวบ (luffa) นำมาย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 2% โดยปริมาตร พบว่า แบคทีเรียที่ตรึงบนบวบ สามารถย่อยสลายอะโรมาติกและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดีเซลได้ 80.67% และ 78.63% ตามลำดับ และสามารถใช้ซ้ำได้ 8 รอบ ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าแบคทีเรียที่ตรึงบนฟองน้ำที่สามารถย่อยสลายอะโรมาติกและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดีเซลได้ 71.97% และ 68.63% ตามลำดับ แต่สามารถใช้ซ้ำได้เพียง 6 รอบ

Simons และคณะ (2013) ได้ตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนแอลจิเนตและเศษเปลือกหอยแมลงภู่ เพื่อย่อยสลาย weathered oil ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรในน้ำทะเล พบว่า การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนเศษเปลือกหอยและเติมสารอาหาร สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน C₃₂ - C₄₀ ได้ 75±14% หลังจาก 12 สัปดาห์ ในขณะที่การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนแอลจิเนตสามารถย่อยสลายได้เพียง 20±14%

Lin และคณะ (2014) ได้ตรึง *Acinetobacter* sp. HC8-3S และ *Vibrio* sp. HC8-3B บนใยฝ้าย (cotton fiber) นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ พบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 30% ที่ pH 5.6-8.6 เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอิสระ

El-Gendy และ Nassar (2015) ได้ตรึง *Pseudomonas aeruginosa* ในเม็ดแคลเซียมแอลจิเนต (Ca-alginate beads) ด้วยวิธีการเข้าแคปซูล แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลได้ 76% ในขณะที่แบคทีเรียอิสระย่อยสลายได้ 74% เมื่อผ่านไป 28 วัน แสดงว่า การตรึงแบคทีเรียไม่ยับยั้งความสามารถการย่อยสลาย เมื่อเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่า แบคทีเรียตรึงยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซล 6 กรัมต่อลิตร โดยสามารถย่อยสลายได้ 75% ภายใน 28 วัน และเมื่อทดสอบใช้ซ้ำ 2 รอบ พบว่า แบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลได้ 76% เมื่อเวลาผ่านไป 56 วัน ซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Kee และคณะ (2015) ได้ตรึงกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนบนขี้เลื่อยและกากลูกปาล์ม จากนั้นนำมาทดสอบในน้ำทะเลสังเคราะห์ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 1% โดยปริมาตร พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ กลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนขี้เลื่อยและกากลูกปาล์มสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 60% และ 65% ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียอิสระย่อยสลายได้เพียง 45%

Shen และคณะ (2015) นำกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs มาตรึงบนถ่านโค้ก (semi-coke) และนำมาทดสอบการย่อยน้ำมันดิบความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว พบว่า กลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 48% ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใน 5 วัน ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรียอิสระสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 27% และ 48% ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ภายใน 7 วัน แสดงว่า การตรึงเซลล์ทำให้แบคทีเรียสามารถปรับตัวในอุณหภูมิต่ำได้ ซึ่งเป็นผลดีกับการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทะเลที่มีน้ำมันรั่วไหลจริง

H. Zhang และคณะ (2016) ได้ตรึง *Corynebacterium variable* HRJ4 บนถ่านชีวภาพ (biochar) จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร ซึ่งมีส่วนประกอบของอัลเคน (C_{16} , C_{18} , C_{19} , C_{26} , C_{28}) และ PAH พบว่า แบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายได้ประมาณ 80% ภายในเวลา 7 วัน ในขณะที่แบคทีเรียอิสระย่อยสลายได้ประมาณ 70% โดยแบคทีเรียตรึงที่สามารถย่อยอัลเคนชนิด C_{16} - C_{19} ลดลงไปมากกว่า 80-90% เมื่อเทียบกับแบคทีเรียอิสระ

2.9 วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย

ก) เปลือกหอยแครง

หอยแครงมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษคือ cockle และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Anadara granosa* เป็นหอยทะเลสองฝาชนิดหนึ่ง เจริญเติบโตในโคลนบริเวณชายฝั่ง หอยแครงเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จึงมีเปลือกหอยแครงเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก เปลือกหอยประกอบด้วยผลึกแคลไซต์ประมาณ 95-99% ที่ก่อตัวเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) (Boro และคณะ, 2012) ซึ่งสามารถนำมาใช้ผลิตกระดูกเทียม (Bharatham และคณะ, 2014) นอกจากนี้แคลเซียมออกไซด์ (CaO) ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ $CaCO_3$ ด้วยกระบวนการ calcination โดย CaO ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การผลิตแก้ว วัสดุก่อสร้าง เป็นต้น (Mohamed และคณะ, 2012) และยังมีการนำ CaO มาใช้ในทางเคมี เช่น ใช้เป็นตัวเร่งในกระบวนการ transesterification เพื่อผลิตไบโอดีเซล (Buasri และคณะ, 2013) นอกจากนี้ยังมีการศึกษานำ CaO จากเปลือกหอยแครงมาใช้เป็นตัวดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในปฏิกิริยา carbonation (Rashidi และคณะ, 2011)

เปลือกหอยแครงเป็นวัสดุทางธรรมชาติเป็นวัสดุเหลือใช้ที่มีอยู่มากมายและมีผิวขรุขระ (Othman และคณะ, 2013) น่าจะเหมาะแก่การนำมาใช้เป็นวัสดุตรึงจุลินทรีย์

ข) นมผักกระเฉด

กระเฉดมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษคือ water mimosa และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Neptunia oleracea* Lour. เป็นพืชน้ำที่ลอยน้ำได้ พบแพร่กระจายในอินเดียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พืชชนิดนี้รับประทานได้ สิ่งหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าพืชนี้มีการแพร่กระจายบนผิวน้ำอย่างรวดเร็วคือ มีท่อนสีขาว ลักษณะเป็นฟองน้ำของเนื้อเยื่อแอรเนโคมา (aerenchyma tissue) ที่เรียกว่านมผักกระเฉด ล้อมรอบลำต้น ช่วยพยุงให้ผักกระเฉดลอยน้ำได้ (Bhunja และ Mondal, 2012) ดังรูปที่ 2.3 แอรเนโคมาประกอบด้วยเซลล์ลูโลส เฮมิเซลล์ลูโลสและลิกนิน (Pereira, 2015)



รูปที่ 2.3 ลักษณะนมผักกระเฉดสีขาวที่หุ้มลำต้น (ลูกศรชี้) (Bhunja และ Mondal, 2012)

การสร้างแอรเนโคมา (aerenchyma) เป็นการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่พบในพืชที่เจริญภายใต้สภาวะน้ำท่วมหรือสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เพื่อเพิ่มการดูดซึมออกซิเจนจากบรรยากาศและการสังเคราะห์แสงของส่วนที่ไม่จมน้ำ เนื้อเยื่อแอรเนโคมา แบ่งออกเป็น 2 ประเภท (Yamauchi และคณะ, 2013) ได้แก่

1. แอรเนโคมาปฐมภูมิ (primary aerenchyma) หรือ cortical aerenchyma ซึ่งเกิดที่รากของพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวโพด (*Zea mays*) ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) เป็นต้น

2. แอรเนโคมาทุติยภูมิ (secondary aerenchyma) จะเกิดรอบ ๆ ลำต้น รากแก้ว รากพิเศษ และปมรากของพืชตระกูลถั่วที่เจริญในสภาวะน้ำท่วม เช่น ถั่วเหลือง (*Glycine max*) ถั่วเหลืองป่า (*Glycine soja*) โสน (*Sesbania aculeata*) โสนอัฟริกัน (*Sesbania rostrata*) ผักกระเฉด (*Neptunia oleracea*) เป็นต้น

นมผักกระเฉดเป็นวัสดุทางธรรมชาติเป็นวัสดุเหลือใช้มีลักษณะคล้ายฟองน้ำที่มีรูพรุน น่าจะเหมาะแก่การนำมาใช้เป็นวัสดุตรึงจุลินทรีย์

งานวิจัยก่อนหน้ารายงานว่า ราในดินสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ 6-82% แบคทีเรียในดินสามารถย่อยสลายได้ 0.13-50% และแบคทีเรียในน้ำทะเลสามารถย่อยสลายได้ 0.003-100% แต่แบคทีเรียในแหล่งน้ำจืดยังไม่ค่อยมีข้อมูลด้านการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมากนัก (Onur และคณะ, 2015) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากรากพืชน้ำจืดจากแหล่งน้ำที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนของดีเซล ซึ่งยังไม่ค่อยมีการศึกษาการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากรากพืชน้ำจืดที่สามารถย่อยสลายดีเซลที่ปนเปื้อนในน้ำได้ จากนั้นนำกลุ่มแบคทีเรียมาตรึงบนเปลือกหอยแครงและนมฝักกระเฉด ซึ่งวัสดุตรึงทั้งสองชนิดเป็นวัสดุทางธรรมชาติที่ยังไม่ค่อยมีการศึกษาด้านการนำมาใช้ในการบำบัดทางชีวภาพของดีเซลที่ปนเปื้อนในน้ำ และยังไม่ค่อยมีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในการย่อยสลายดีเซลในน้ำ



บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nipro (Thailand) Corporation Limited, Thailand
2. ขวดแก้วฝาเกลียว (vial) ขนาด 22 มิลลิลิตร (Screw cap with teflon liner) ของบริษัท Lab System, Thailand
3. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น Sonorex super RK 100 ของบริษัท Banderlin electronic, Germany
4. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 4000 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
5. เครื่องชั่ง รุ่น ME 3002 และ ของบริษัท METTLER-TOLEDO, Switzerland
6. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท TOMY digital biology, Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท HIRAYAMA manufacturing, Japan
7. เครื่องบันทึกภาพจากเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000TM ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
8. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
9. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal Cycler) รุ่น T100 ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesis 20 ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น S20 SevenEasy ของบริษัท METTLER-TOLEDO, Switzerland
12. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop2000) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
13. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan
 - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA 22
14. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น FORCE1418 บริษัท Select BioProducts, USA

15. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE (Polytetrafluoroethylene) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan
16. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด Supor membrane ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.2 ไมโครเมตร รุ่น PN4612 ของบริษัท PALL corporation, USA
17. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC)
 - เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น 6890N ของบริษัท Agilent Technologies, USA
 - คอลัมน์ ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมธิลไซโลเลนความเข้มข้น 5% ทน 0.25 ไมโครเมตร
 - เครื่องตรวจวัด (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID)
 - เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (Microsyrings) ขนาด 10 ไมโครลิตร
18. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis System) รุ่น Mupid-2plus ของบริษัท Mupid, Japan
19. ชุดเครื่องมือทำดีเนเจอร์เกรเดียนต์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Denature Gradient Gel Electrophoresis; DGGE) รุ่น DCode™ system ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
20. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น LV1250 ของบริษัท Official Equipment Manufacturing, Thailand
21. ตู้ดูดสารเคมี (Hood) รุ่น FH150DC ของบริษัท Official Equipment Manufacturing, Thailand
22. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE600 ของบริษัท Memmert, Germany
23. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น UE600 ของบริษัท Memmert, Germany
24. ตู้อบแห้ง (Oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand
25. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น SF-PC697 ของบริษัท Panasonic, Thailand
26. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France
27. หลอดทดลองขนาด 18x180 มิลลิเมตร, 21x200 มิลลิเมตร
28. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (Cryotube) บริษัท Nalgene Nunc International, Denmark

เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Hydrochloric acid 37%) ของบริษัท Merck, Germany
2. กลีเซอรอล (Glycerol), (C₃H₅(OH)₃) ของบริษัท Merck, Germany
3. คลอโรฟอร์ม (Chloroform), (CHCl₃) ของบริษัท V.S.CHEM HOUSE, Thailand
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl₂•2H₂O) ของบริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals, Australia
5. ดีเซล (Diesel oil) ของบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
7. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮเดรต (Anhydrous Na₂SO₄) ของบริษัท Merck, German
8. แอมโมเนียมไนเตรต (NH₄NO₃) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
10. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเดคะไฮเดรต (Na₂HPO₄•12H₂O) ของบริษัท Merck, Germany
11. ทริปโตเน (Tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
12. นอร์มัลเฮกเซน (C₆H₁₄) ของบริษัท Merck, Germany
13. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄) ของบริษัท Merck, Germany
14. โปรตีนเค (Proteinase K) ของบริษัท Worthington Biochemical Corporation, USA
15. ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Bio Springer, France
16. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (FeCl₃•6H₂O) ของบริษัท Poch, Poland
17. เมทานอล (CH₃OH) ของบริษัท Merck, Germany
18. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO₄•7H₂O) ของบริษัท Merck, Germany
19. ไลโซไซม์ (Lysozyme) ของบริษัท Sigma, USA
20. อะกาโรสเจล (Agarose gel) ของบริษัท Cambrex Bio Science Rockland, USA
21. เอทานอล (C₂H₅OH) ของบริษัท Merck, Germany
22. แอมโมเนียมซัลเฟต (NH₄)₂SO₄ ของบริษัท Bio Basic Canada, Canada
23. ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamyl alcohol), (C₅H₁₂O) ของบริษัท AJAX Finechem, Australia
24. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol), (C₃H₈O) ของบริษัท Merck, Germany
25. 1kb DNA ladder ของบริษัท Thermo Fisher Scientific Inc., USA
26. 100 base pair DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, USA

27. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไฟรเมอร์ EUB r1387 ของบริษัท 1st BASE Laboratories, Malaysia
28. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไฟรเมอร์ EUB f933GC ของบริษัท Integrated DNA technologies, USA
29. 40% Acrylamide/Bis solution ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, China
30. CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide), $((C_{16}H_{32}N(CH_3)_3)Br)$ ของบริษัท TCI-EP, Japan
31. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท Takara bio, Japan
32. Dye solution ของบริษัท New England Biolabs, USA
33. EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), $(C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O)$ ของบริษัท Dolindo, Japan
34. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide solution) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
35. ฟอว์มาไมด์ปลอดประจุ (Formamide (Deionized)) ของบริษัท Bio Basic Canada, Canada
36. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท United States Biological, USA
37. SDS (sodium dodecyl sulfate), $(C_{12}H_{25}OSO_3)$ ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
38. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs, USA
39. TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
40. Trisma base (tris (hydroxymethyl) aminomethane), $(C_4H_{11}NO_3)$ ของบริษัท Sigma, USA
41. ยูเรีย (Urea) ของบริษัท Sigma-aldrich, Switzerland

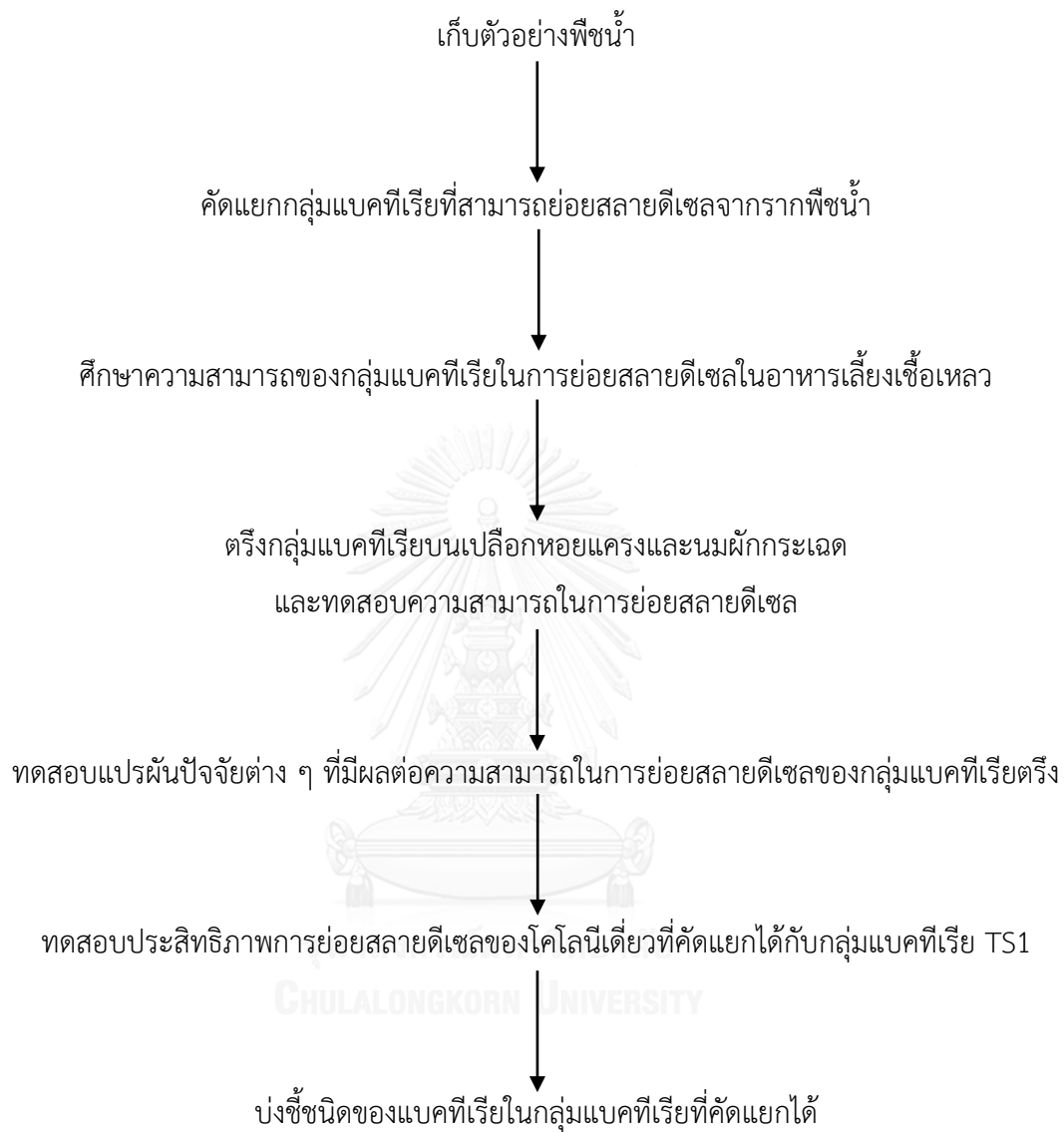
ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA สำหรับ PCR-DGGE

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
EUB 933F+GC	GCG CGC GCG CGC GCG CGC GCG CGC GCG CGC GCG CGC GCG CGC GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTGG	ดัดแปลงจาก Iwamoto และคณะ (2000)
EUB 1387R	GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG	Iwamoto และคณะ (2000)



แผนผังงานวิจัย



วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลจากรากพืชน้ำ

3.1.1 ตัวอย่างรากพืชน้ำ

เก็บตัวอย่างพืชน้ำจากแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของดีเซลในเขตปริมณฑลและต่างจังหวัด ซึ่งตัวอย่างรากพืชน้ำที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ รากผักตบชวาและรากผักบุ้งไทย

ผักตบชวา เก็บจากริมแม่น้ำเจ้าพระยาบริเวณด้านหลังวัดทองคั้ง อำเภอบางบาล จังหวัดสมุทรปราการ และริมแม่น้ำแม่กลองบริเวณด้านหลังวัดบางกุ้ง อำเภอบางคนที จังหวัดสมุทรสงคราม

ผักบุ้งไทย เก็บจากริมคลองพระปรังบริเวณหมู่บ้านริมน้ำ อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี

3.1.2 การคัดแยกและเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียจากรากพืชน้ำ

นำรากพืชมาล้างด้วยน้ำประปาและตัดรากพืชจำนวน 1 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว carbon-free mineral medium (CFMM) (Komukai-Nakamura และคณะ, 1996) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มี 0.5% ดีเซลโดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน ถ่ายน้ำเลี้ยงเชื้อ 10% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ใหม่ที่มีดีเซลความเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตร ทำซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง และเก็บกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกทั้งหมดโดยนำเชื้อที่มีอายุ 7 วันมาผสมกับกลีเซอรอลในอัตราส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3:7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.1.3 การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย

เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากพืชน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมอาหาร Luria-Bertani (LB) ความเข้มข้น 10% (ภาคผนวก ก) และเติมดีเซลความเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 วัน เก็บเชื้อโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 2 ครั้ง กระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 1 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ $8 \log \text{CFU}$ ต่อมิลลิลิตร

3.1.4 คัดกรองกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซล

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียตามวิธีข้อ 3.1.3 นำมาทดสอบในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี 1% ดีเซล แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 ชุด ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซล

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซลและกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากราก ผักตบชวา กลุ่มที่ 1

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซลและกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากราก ผักตบชวา กลุ่มที่ 2

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซลและกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากผักบุ้ง ไทย

ทุกชุดการทดลองทำในหลอดทดลองขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 และนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7

3.1.5 การคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยว

เมื่อได้กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุด นำกลุ่มแบคทีเรียมาคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยวด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ขนาด สีของโคโลนี เป็นต้น นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำซ้ำจนมั่นใจว่าเป็นโคโลนีเดี่ยว สังเกตจากลักษณะโคโลนีจะต้องมีลักษณะเดียวกันทั้งหมด จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหารแข็ง LB slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียเดี่ยวที่คัดแยกได้

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยสังเกตจากลักษณะโคโลนี เช่น ขนาด ลักษณะผิวหน้า สีของโคโลนี เป็นต้น ตรวจสอบรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียด้วยการย้อมสีแกรม (Gram's stain)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ทำได้โดยนำแบคทีเรียเดี่ยวที่คัดแยกได้มา streak plate บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งโคโลนีเดี่ยววิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ 785F และ 907R บริษัท Macrogen, Korea เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอแล้ว เชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.2.5 (Bio Edit Sequence Alignment Editor) และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.2 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย

3.2.1 การเตรียมวัสดุตรึง

3.2.1.1 เปลือกหอยแครง

เก็บเปลือกหอยมาจากร้านอาหาร หน้าปากซอยชุมชนศูนย์การค้าปากน้ำ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งเปลือกหอยมีลักษณะเปียก มีเศษเนื้อและสิ่งสกปรกติดอยู่ นำเปลือกหอยมาล้างด้วยน้ำสะอาดและต้มในน้ำเดือดนาน 15-20 นาที เพื่อกำจัดเศษเนื้อและสิ่งสกปรกโดยไม่ขัดเพื่อคงสภาพเดิมไว้ ล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง จากนั้นอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทบเป็นชิ้นเล็ก คัดเลือกเปลือกหอยขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตรด้วยสายตา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้

สำหรับการเตรียมเปลือกหอยปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นชุดควบคุมการดูดซับดีเซล นำเปลือกหอยที่ทบแล้วไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

3.2.1.2 นมผักกระเฉด

เก็บนมผักกระเฉดมาจากร้านขายผักกระเฉดในตลาดสำโรง อำเภอมือง จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งนมผักกระเฉดเป็นเนื้อเยื่อสีขาวที่รูตออกจากลำต้นผักกระเฉด มีลักษณะเป็ยกขึ้น มีเศษรากและหนวดติดอยู่ นำนมผักกระเฉดมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง ตากแห้งกลางแดดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้

สำหรับการเตรียมนมผักกระเฉดปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นชุดควบคุมการดูดซับดีเซล นำนมผักกระเฉดที่ตัดแล้วไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

3.2.2 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย

3.2.2.1 การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนเปลือกหอย (เชษฐสุตา จิตต์การุณย์, 2556)

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.1.3 นำกลุ่มแบคทีเรียที่มีจำนวนเซลล์ 8 log CFU ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาหยดลงบนเปลือกหอยแครงจำนวน 5 กรัมที่อยู่ในขวดฝาเกลียวให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ละลายแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์จำนวน 2 ครั้ง บันทึกภาพกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนเปลือกหอยแครงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) นับจำนวนแบคทีเรียตรึงตามวิธีข้อ 3.7.2

3.2.2.2 การตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนนมผักกระเฉด (สุธาวัลย์ ตีสวัสดิ์, 2550)

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.1.3 นำกลุ่มแบคทีเรียที่มีจำนวนเซลล์ 8 log CFU ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมนมผักกระเฉด 0.1 กรัมที่อยู่ในขวดฝาเกลียว ผสมให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง vortex mixer บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง บันทึกภาพกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนนมผักกระเฉดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) นับจำนวนแบคทีเรียตรึงตามวิธีข้อ 3.7.3

3.3 ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลายดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

3.3.1 ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระในการย่อยสลายดีเซล

นำกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุดจากวิธีข้อ 3.1.4 มาทดลองซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 แต่เก็บตัวอย่างให้ถึงขึ้นเป็นวันที่ 0, 3, 7, 10 และ 14 เพื่อตรวจสอบเค้าโครงการย่อยสลายดีเซล เพื่อคัดเลือกให้ได้กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงที่สุด 1 กลุ่มเพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุดและกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่คัดแยกโดยสุธาสิณี จิตติมณี ตามวิธีข้อ 3.1.3 นำมาทดสอบในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มี 1% ดีเซล ชุดควบคุมคือ อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซล ทำการทดลองในหลอดทดลองขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 และนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7

3.3.2 ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียตรึงในการย่อยสลายดีเซล

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียตรึงตามวิธีข้อ 3.2.2.1 และ 3.2.2.2 นำมาทดสอบในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี 1% ดีเซล แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 8 ชุด ได้แก่

- ชุดการทดลองที่ 1 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซล
- ชุดการทดลองที่ 2 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซลและเปลือกหอยที่ปลอดเชื้อ
- ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซลและเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อ
- ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซลและนมผักกระเฉดที่ปลอดเชื้อ
- ชุดการทดลองที่ 5 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซลและนมผักกระเฉดที่ไม่ปลอดเชื้อ
- ชุดการทดลองที่ 6 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซลและกลุ่มแบคทีเรียอิสระ (8 log CFU/mL)
- ชุดการทดลองที่ 7 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซลและกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนเปลือกหอย
- ชุดการทดลองที่ 8 อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซลและกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนนมผักกระเฉด

ทุกชุดการทดลองทำในหลอดทดลองขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 และนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7 และสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรโดยวิธี PCR-DGGE ตามวิธีข้อ 3.5 และเก็บ

ตัวอย่างเปลือกหอยและนมผักกระเฉดที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรงไปตรวจสอบการยึดเกาะและการเจริญของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

3.3.3 ความสามารถของแบคทีเรียเดี่ยวในการย่อยสลายดีเซลกับกลุ่มแบคทีเรีย TS1

เตรียมแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตและกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตามวิธีข้อ 3.1.3 นำมาทดสอบในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มี 1% ดีเซล ทำการทดลองในหลอดทดลองขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 และนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7

3.4 การตรวจสอบการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนเปลือกหอยและนมผักกระเฉดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

เตรียมตัวอย่างเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อ เปลือกหอยปลอดเชื้อ นมผักกระเฉดสด นมผักกระเฉดปลอดเชื้อ นมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อ และกลุ่มแบคทีเรียตรงบนเปลือกหอยและนมผักกระเฉดวันที่ 0 และวันที่ 7 และตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียตรงบนเปลือกหอยหลังจากผ่านการใช้ซ้ำ 5 รอบ ตรวจสอบลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงและการยึดเกาะของกลุ่มแบคทีเรียตรงบนเปลือกหอยและนมผักกระเฉดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ขั้นตอนนี้ดำเนินการโดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ ตรึงตัวอย่างวัสดุที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรงด้วย 2.5% กลูทาร์ลดีไฮด์ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ตามด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และกำจัดน้ำออกด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 95% ความเข้มข้นละ 10 นาทีต่อครั้ง จากนั้นล้างด้วย 100% เอทานอลอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำตัวอย่างให้แห้งด้วยเครื่องทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤติ (Critical point deyer, Quorum model K850, UK) จากนั้นนำตัวอย่างมาติดบนแผ่นวางตัวอย่างและฉาบตัวอย่างด้วยทองโดยใช้เครื่องฉาบสารโลหะ (sputter coater, Balzers model SCD 040, Germany) สุดท้ายนำตัวอย่างที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) รุ่น JEOL, model JSM-6400, Tokyo, Japan เพื่อดูการยึดเกาะและการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียบนเปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉด

3.5 การติดตามพลวัตประชากรของกลุ่มแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยใช้ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

3.5.1 วิธีแยกแบคทีเรียจากวัสดุตั้งเพื่อสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

3.5.1.1 วิธีแยกแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เซลล์กลุ่มแบคทีเรียตั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแยกได้โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งจะได้ตะกอนเซลล์เพื่อนำไปสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

3.5.1.2 วิธีแยกแบคทีเรียจากวัสดุตั้งที่ไม่ปลอดเชื้อ

นำเปลือกหอย 5 กรัมใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลุ่มแบคทีเรียปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งจะได้ตะกอนเซลล์เพื่อนำไปสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำนมผักกระเฉด 1.0 กรัมเติมสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 60 วินาที นำแบคทีเรียแขวนลอยใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกเศษนมผักกระเฉดออก ถ่ายส่วนน้ำใสใส่หลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งจะได้ตะกอนเซลล์เพื่อนำไปสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

3.5.1.3 วิธีแยกกลุ่มแบคทีเรียตั้งจากเปลือกหอยและนมผักกระเฉด

นำเปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียตั้งมาทำให้แบคทีเรียหลุดออกจากวัสดุตั้งด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง ที่ความถี่ 35 เมกะเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 60 วินาที ในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และใช้เครื่อง vortex mixer อีก 15 วินาที ทำซ้ำ 4 รอบ โดยเก็บสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่มีแบคทีเรียทุกรอบรวมกันปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ของเปลือกหอย ถ่ายส่วนน้ำที่มีแบคทีเรียแขวนลอยใส่หลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งจะได้ตะกอนเซลล์เพื่อนำไปสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำนมผักกระเฉดที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรงมาทำให้แบคทีเรียหลุดออกจากวัสดุตรง โดยเติม สารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 60 วินาที นำแบคทีเรียแขวนลอยใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกเศษนมผักกระเฉดออก ถ่ายส่วนน้ำใสใส่ หลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งจะได้ตะกอนเซลล์เพื่อนำไปสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

3.5.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Ausubel และคณะ (1995) นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.5.1 มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 517 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตต์ดูดขึ้นลง จากนั้นเติมไลโซไซม์ (Lysozyme) ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที จากนั้นเติม 20% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีนเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่า จนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ใน หลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ตะกอนติดไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่า จนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอด ไมโครพิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 1 นาที จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนของไอโซโพรพานอลทิ้ง

แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70% เอทานอล (ภาคผนวก ข) ที่เย็นจัดปริมาตร 400 ไมโครลิตร โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ค่อย ๆ เทส่วนน้ำใสทิ้งสุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอ

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9% (ภาคผนวก ข) ที่หลอมละลายเทลงในภาชนะเตรียมเจล ใส่หัวเสียบ รोजनเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหัวออก วางแผ่นอะกาโรสที่เตรียมได้ในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมเหนือแผ่นเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรกับสีติดตาม (6X loading dye) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องของอะกาโรสเจล โดยใช้ 1 kb DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 20-30 นาที ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นเวลานาน 15-20 นาที นำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Karthika และคณะ) ด้วยเครื่อง Gel Documentation

วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop2000) คำนวณอัตราส่วนของความยาวคลื่น 260/280 ถ้ามีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่า มีโปรตีนปนเปื้อนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่า มีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ ดีเอ็นเอสายคู่ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) = $A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$

3.5.4 การเพิ่มจำนวนชุดดีเอ็นเอของ 16S rDNA ของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Iwamoto และคณะ, 2000)

ไพรเมอร์ที่ใช้คือ 933F ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ 1387R เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-6,7,8 จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ความยาวประมาณ 500 bp โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

10X PCR buffer (ความเข้มข้น 1 เท่า)	3 ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP (ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์)	0.6 ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (933F+GC) (ความเข้มข้น 0.34 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
รีเวิร์สไพรเมอร์ (1387R) (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
สารละลายดีเอ็นเอ (ความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase (ความเข้มข้น 2.5 หน่วย)	0.2 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	23.2 ไมโครลิตร

รวมส่วนผสมทั้งหมดในหลอด PCR ให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (T100 Thermal Cycler) (Biorad, USA) โดยโปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอร์สใช้สภาวะดังนี้

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

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีข้อ 3.5.3 โดยใช้เจลความเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ในบัฟเฟอร์ 1X TAE เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

3.5.5 ตรวจสอบผลวัฏจักรประชากรของกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ DGGE ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนต์ของสารละลาย denaturant 50-70% (ภาคผนวก ข) จากสารละลาย denaturant 100% ที่มีส่วนประกอบของยูเรียและ 40% ฟอร์มามาइट การทำเกรเดียนต์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนต์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ หลังจากทำเกรเดียนต์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว

ต้องเสียบหัวลิงไประหว่างกระจกแซนวิช ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งให้อะครีลาไมด์เจลแข็งตัวนาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำชุดแซนวิชใส่ในแชมเบอร์ที่มีปั๊มเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนได้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสีติดตาม หยอดลงในช่องวิ่ง แล้วทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง 30 นาที ย้อมฟอลิอะครีลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 15-20 นาที นำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Karthika และคณะ) ด้วยเครื่อง Gel Documentation

3.6 การทดสอบแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์และการย่อยสลายดีเซล

3.6.1 จำนวนเซลล์ที่ใช้ในการตรึง

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียตรึงตามวิธีข้อ 3.2.2.1 โดยใช้จำนวนเซลล์ 6, 8 และ 10 log CFU ต่อ มิลลิลิตร ทดสอบการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มี 1% ดีเซลตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.2 โดยชุดควบคุมได้แก่ อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซล ชุดเปลือกหอยที่ปลอดเชื้อ ชุดเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อ และชุดกลุ่มแบคทีเรียอิสระ 6, 8 และ 10 log CFU/มล. ทุกชุดการทดลองทำในหลอดทดลองขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 โดยแยกสกัดส่วนอาหารเหลวและเปลือกหอย และนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7

3.6.2 ผลของระยะเวลาในการตรึงเซลล์บนเปลือกหอย

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียตรึงตามวิธีที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.6.1 แต่ใช้เวลาในการตรึง 30 นาที และไม่ชะล้างแบคทีเรียส่วนเกิน และใช้เวลาในการตรึง 2 ชั่วโมงและชะล้างแบคทีเรียส่วนเกินด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ทดสอบการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มี 1% ดีเซล ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.2 โดยชุดควบคุมได้แก่ อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซล ชุดเปลือกหอยที่ปลอดเชื้อ ชุดเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อ ทุกชุดการทดลองทำในหลอดทดลองขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 โดยแยกสกัดส่วนอาหารเหลวและเปลือกหอย และนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7

3.6.3 ขนาดของวัสดุตรึง

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียตรึงตามวิธีข้อ 3.2.2.1 โดยใช้จำนวนเซลล์ที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.6.1 และระยะเวลาในการตรึงที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.6.2 มาตรึงบนเปลือกหอยหยาบขนาด 5x5 มิลลิเมตร จำนวน 5 กรัม และเปลือกหอยละเอียดขนาด 2x2 มิลลิเมตร จำนวน 5 กรัม จากนั้นนำมาทดสอบการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี 1% ดีเซล ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.2 โดยชุดควบคุมได้แก่ อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซล ชุดเปลือกหอยที่ปลอดเชื้อ ชุดเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อ และชุดกลุ่มแบคทีเรียอิสระ ทุกชุดการทดลองทำในหลอดทดลองขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 โดยแยกสกัดส่วนอาหารเหลวและเปลือกหอย และนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7

3.6.4 ปริมาณดีเซล

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียตรึงตามวิธีข้อ 3.2.2.1 โดยใช้วิธีที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.6.1 - 3.6.3 มาทดสอบการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีดีเซลความเข้มข้น 1%, 3% และ 5% โดยปริมาตร ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.2 โดยชุดควบคุมได้แก่ อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1%, 3% และ 5% ดีเซล ชุดเปลือกหอยที่ปลอดเชื้อ ชุดเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อ และชุดกลุ่มแบคทีเรียอิสระ ทุกชุดการทดลองทำในหลอดทดลองขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 โดยแยกสกัดส่วนอาหารเหลวและเปลือกหอย และนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7

3.6.5 การใช้ซ้ำกลุ่มแบคทีเรียตรึง

นำแบคทีเรียตรึงที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.6.1 - 3.6.3 มาทดสอบการใช้ซ้ำ 5 รอบ รอบละ 7 วัน ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่เติม 1% ดีเซล ทดสอบในหลอดทดลองขนาด 21 x 200 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อครบ 7 วันแยกเปลือกหอยที่มีแบคทีเรียตรึงถ่ายใส่อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซล เก็บส่วนน้ำจากการทดสอบการย่อยสลายดีเซลในแต่ละรอบนำไปวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 และนับจำนวนแบคทีเรียในส่วนน้ำโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7

3.6.6 ระยะเวลาในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียตรึง

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียตรึงที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.6.1 และ 3.6.3 จากนั้นแบ่งการเก็บรักษาเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เก็บรักษาในหลอดฝาเกลียวขนาด 22 มิลลิลิตร และกลุ่มที่ 2 เก็บรักษาในถุงซิปล็อคขนาด 6 x 8 เซนติเมตร ทุกชุดการทดลองเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือนและ 2 เดือน เมื่อครบกำหนดเวลานำกลุ่มแบคทีเรียตรึงมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มี 1% ดีเซล ทดสอบในหลอดทดลองขนาด 21 x 200 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ชุดควบคุมคือ กลุ่มแบคทีเรียหลังการตรึงเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 และนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7

3.6.7 อัตราส่วนของแบคทีเรียตรึงกับปริมาณอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ

เตรียมกลุ่มแบคทีเรียตรึงที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.6.1 และ 3.6.3 จากนั้นทดสอบการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 และ 10 มิลลิลิตรที่มี 1% ดีเซลตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.2 โดยชุดควบคุมได้แก่ อาหารเหลว CFMM ที่เติม 1% ดีเซล ชุดเปลือกหอยที่ปลอดเชื้อ ชุดเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อ และชุดกลุ่มแบคทีเรียอิสระ ทุกชุดการทดลองทำในหลอดทดลองขนาด 18 x 180 มิลลิเมตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือตามวิธีข้อ 3.8 โดยแยกสกัดส่วนอาหารเหลวและเปลือกหอย และนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้วิธี viable plate count ตามวิธีข้อ 3.7

3.7 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย

3.7.1 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count

เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและ drop plate บนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งหมด คำนวณเป็น CFU ต่อ มิลลิลิตรหรือ CFU ต่อกรัมของวัสดุตรึง

3.7.2 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนเปลือกหอย

นำตัวอย่างเปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียเจริญมาทำให้แบคทีเรียหลุดออกจากวัสดุด้วยเครื่อง sonicator ที่ความถี่ 35 เมกะเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 60 วินาที ในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และใช้เครื่อง vortex mixer อีก 15 วินาที ทำซ้ำ 4 รอบ โดยเก็บสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่มีแบคทีเรียถูกรอบรวมกันปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ ปรับปริมาตรเหลือ 1 มิลลิลิตร เจือจางและ drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งหมดคำนวณเป็น CFU ต่อกรัมของวัสดุ

3.7.3 การนับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนนมผักกระเฉด

เติมสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างนมผักกระเฉดที่มีกลุ่มแบคทีเรียเจริญ 0.1 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 60 วินาที เจือจางและ drop plate บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งหมดคำนวณเป็น CFU ต่อกรัมของวัสดุ

3.8 วิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลือ

3.8.1 การสกัดดีเซล

สกัดดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM โดยเติม *n*-Hexane ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันกับตัวอย่างโดยเครื่อง vortex mixer นานต่อเนื่อง 2 นาที แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดชั้นตัวทำละลายด้านบนแยกใส่หลอดทดลองใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตที่อบแห้งเพื่อดึงน้ำออก ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ทิ้งให้ตกตะกอนกรองส่วนตัวทำละลายด้วย PTFE วิเคราะห์ดีเซลที่เหลือด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีตามวิธีในข้อ 3.8.2

สำหรับชุดการทดลองที่มีวัสดุเจริญ ใช้ช้อนตักสารที่ปลอดเชื้อแยกวัสดุออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เติม *n*-Hexane ปริมาตร 1 เท่า จากนั้นสกัดดีเซลออกจากวัสดุตามวิธีข้างต้น

3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลือด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ใช้คอลัมน์ capillary HP-5 ชนิด 5% Phenyl Methyl Siloxane (ยาว 30 เมตร x กว้าง 0.32 มิลลิเมตร x หนา 0.25 เมตร) อุณหภูมิสูงสุด 325 องศาเซลเซียส ตัวตรวจจับสัญญาณเป็นชนิด Flame Ionizing Detector (FID) อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มที่ 80 องศาเซลเซียส ช่วงต่อมาขึ้นครั้งละ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ช่วงต่อมาขึ้นครั้งละ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 240 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และต่อมาขึ้นครั้งละ 40 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และสุดท้ายคงอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยอัตราการไหลของฮีเลียมเท่ากับ 1.7 มิลลิตรต่อนาที

บันทึกพื้นที่ใต้กราฟทั้ง 18 ค่าที่พีค ณ เวลา ต่าง ๆ ได้แก่ 2.5, 3.0, 3.6, 4.2, 5.0, 6.1, 7.4, 9.4, 11.7, 14.3, 17.2, 20.1, 23.0, 26.0, 28.8, 31.7, 34.5 และ 36.0 นาที จากนั้นนำมาคำนวณปริมาณดีเซลที่เหลือ ดังสูตร

$$\% \text{ ดีเซลคงเหลือ} = \frac{\text{ผลรวมของพื้นที่ใต้กราฟทั้ง 18 พีคของตัวอย่าง}}{\text{ผลรวมของพื้นที่ใต้กราฟทั้ง 18 พีคของวันที่ 0}} \times 100$$

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของผลการย่อยสลายดีเซลโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 วิเคราะห์ด้วย one way-ANOVA โดยใช้ Duncan's multiple range test กำหนดระดับนัยสำคัญ 0.05

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลจากรากพืชน้ำ

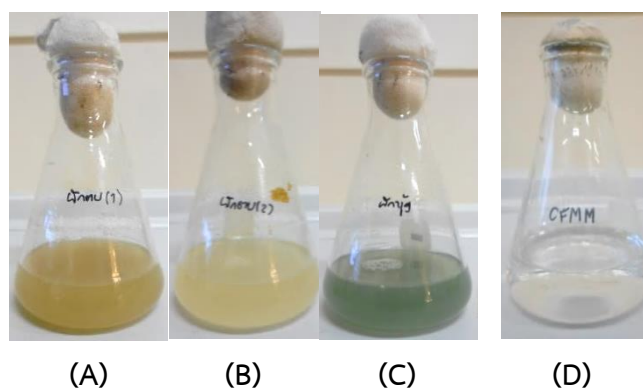
จากการเก็บตัวอย่างพืชน้ำจากแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนดีเซลในจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสงครามและปราจีนบุรี จำนวน 3 สถานที่ สถานที่ละ 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ได้แก่

สถานที่ที่ 1 แม่น้ำเจ้าพระยาบริเวณวัดทองคั้ง จังหวัดสมุทรปราการ พิกัดที่เก็บผักตบชวา คือ GPS: 13.656515, 100.547513

สถานที่ที่ 2 แม่น้ำแม่กลองบริเวณวัดบางกุง จังหวัดสมุทรสงคราม พิกัดที่เก็บผักตบชวา คือ GPS: 13.446381, 99.943072

สถานที่ที่ 3 คลองพระปรังบริเวณหมู่บ้านริมน้ำ จังหวัดปราจีนบุรี พิกัดที่เก็บผักบุงไทย คือ GPS: 13.983711, 101.718559

นำรากพืชใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว carbon-free mineral medium (CFMM) ที่มี 0.5% ดีเซลโดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อ 10% ใส่อาหารใหม่ทุก 7 วัน ทำซ้ำ 5 ครั้ง พบว่า หลังจากผ่านไป 35 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น มีสีน้ำตาลเข้ม น้ำตาลอ่อน และสีเขียวอมน้ำเงิน (รูปที่ 4.1) แสดงว่า ตัวอย่างรากพืชน้ำทั้ง 3 ตัวอย่าง มีกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลในน้ำได้ (ตารางที่ 4.1)

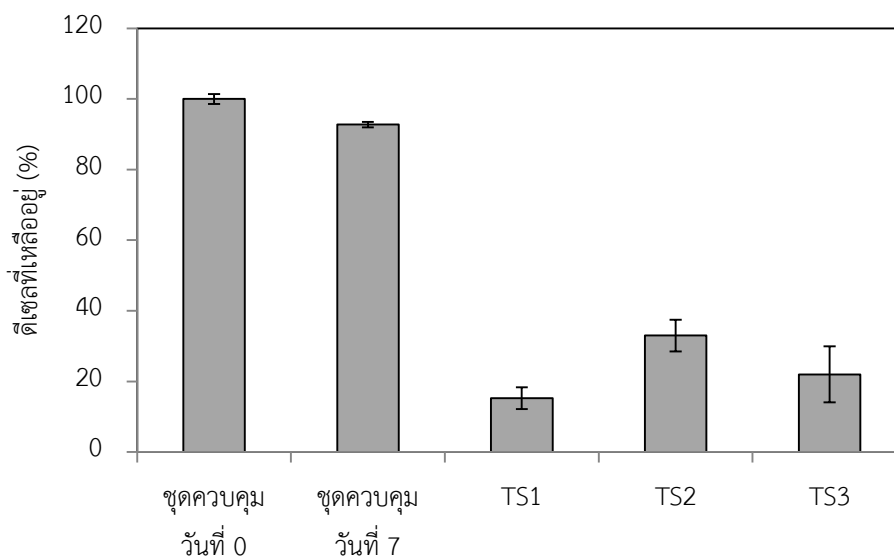


รูปที่ 4.1 สีของการเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM ที่มี 0.5% ดีเซล กลุ่มแบคทีเรียจากรากผักตบชวา กลุ่มที่ 1 (A) กลุ่มแบคทีเรียจากรากผักตบชวา กลุ่มที่ 2 (B) และกลุ่มแบคทีเรียจากรากผักบุ้ง (C) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อ (D) ที่เวลา 0 วัน

ตารางที่ 4.1 กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากพืชน้ำชนิดต่าง ๆ

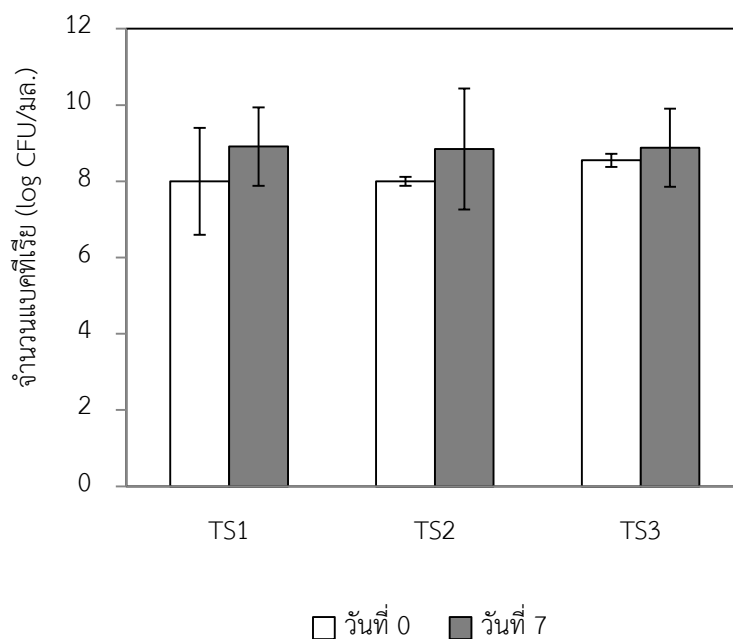
ชนิดของรากพืชน้ำ	สถานที่เก็บตัวอย่างพืชน้ำ	รหัส
ผักตบชวา	แม่น้ำเจ้าพระยา บริเวณวัดทองคั้ง จ.สมุทรปราการ	TS1
ผักตบชวา	แม่น้ำแม่กลอง บริเวณวัดบางกั้ง จ.สมุทรสงคราม	TS2
ผักบุ้งไทย	คลองพระปรัง บริเวณหมู่บ้านริมน้ำ จ.ปราจีนบุรี	TS3

นำกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มที่คัดแยกได้ มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM พบว่า ในวันที่ 7 ชุดควบคุมมีปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่มากที่สุดคือ $92.47 \pm 0.75\%$ ในชุดการทดลองทุกชุดมีปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่น้อยกว่าชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่มีปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่น้อยที่สุดคือ ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TS1 มีปริมาณดีเซลเหลืออยู่ $15.22 \pm 3.09\%$ รองลงมาคือ ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TS3 และ TS2 ที่มีปริมาณดีเซลเหลืออยู่ $21.99 \pm 7.94\%$ และ $32.99 \pm 4.48\%$ ตามลำดับ (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในการทดลองการย่อยสลายไขมันในอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน

จากการนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count วันที่ 0 และ 7 โดยวิธี drop plate พบว่า จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มในอาหารเหลววันที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 8 log CFU/มล. และในวันที่ 7 มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง (รูปที่ 4.3) โดยกลุ่มแบคทีเรีย TS1 มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุดคือ 8.91 ± 1.03 log CFU/มล. รองลงมาคือ กลุ่มแบคทีเรีย TS3 และ TS2 ที่มีจำนวนแบคทีเรีย 8.88 ± 0.17 และ 8.85 ± 0.12 log CFU/มล. ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในวันที่ 0 และ 7 ของกลุ่มแบคทีเรีย 3 กลุ่มในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล

จากผลการทดลองข้างต้น กลุ่มแบคทีเรีย TS1 สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM ได้ดีที่สุด โดยมีดีเซลเหลืออยู่ $15.22 \pm 3.09\%$ ในเวลา 7 วัน ดังนั้นจึงเลือกกลุ่มแบคทีเรีย TS1 มาทำการทดลองขั้นต่อไป

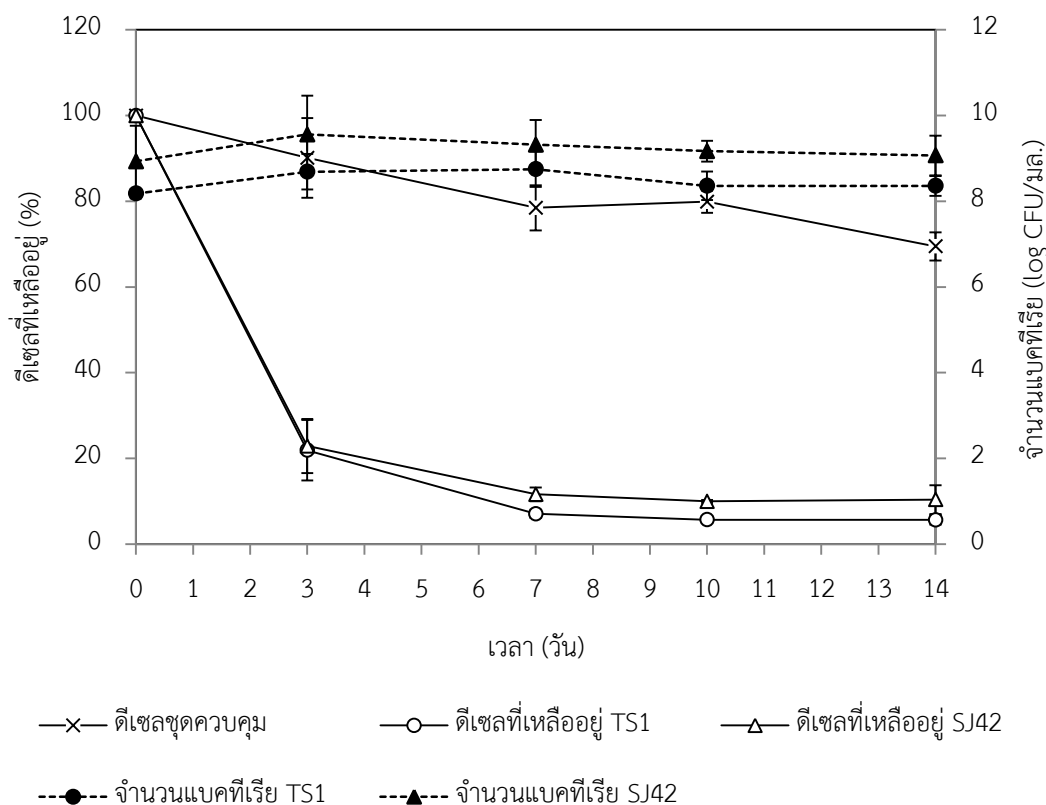
4.2 ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

4.2.1 ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ในการย่อยสลายดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

นำกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 8 ครั้ง มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 แต่เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3, 7, 10 และ 14 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรียและกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากรากผักบุ้งไทย โดยสุธาสิณี จิตติมณี

จากการทดลองพบว่า หลังการทดลอง 14 วัน ชุดควบคุมมีดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหาร $69.49 \pm 3.28\%$ กลุ่มแบคทีเรีย TS1 สามารถย่อยสลายดีเซลจนเหลือ $7.07 \pm 0.95\%$ ภายใน 7 วัน และสามารถย่อยสลายได้มากที่สุดจนเหลือ $5.65 \pm 1.13\%$ ภายใน 14 วัน (รูปที่ 4.4) และจำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 เพิ่มจำนวนมากขึ้น เริ่มต้นมีจำนวนแบคทีเรีย $1.51 \pm 0.11 \times 10^8$ CFU/มล. เพิ่มขึ้นสูงสุดจนถึง $5.67 \pm 0.42 \times 10^8$ CFU/มล. ในวันที่ 7 และค่อย ๆ ลดจำนวนลงจนเหลือ $2.30 \pm 0.23 \times 10^8$ CFU/มล. ในวันที่ 14

กลุ่มแบคทีเรีย SJ42 สามารถย่อยสลายดีเซลจนเหลือ $11.61 \pm 1.61\%$ ภายใน 7 วัน และสามารถย่อยสลายได้สูงสุดจนเหลือ $10.38 \pm 3.39\%$ ภายใน 14 วัน (รูปที่ 4.4) และมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $8.53 \pm 0.83 \times 10^8$ CFU/มล. เพิ่มขึ้นสูงสุดจนถึง $3.67 \pm 0.90 \times 10^9$ CFU/มล. ในวันที่ 3 และค่อย ๆ ลดจำนวนลงจนเหลือ $1.17 \pm 0.46 \times 10^9$ CFU/มล. ในวันที่ 14 เช่นเดียวกับแบคทีเรีย TS1 ดังนั้นเมื่อพิจารณาช่วงเวลา 7 วัน กลุ่มแบคทีเรีย TS1 สามารถย่อยสลายดีเซลได้มากกว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 จึงเลือกกลุ่มแบคทีเรีย TS1 มาศึกษาขั้นต่อไป







รูปที่ 4.4 ค่าโครงการย่อยสลาย 1% ดีเซลและจำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 และ SJ42

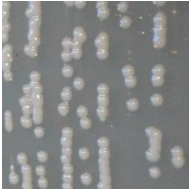
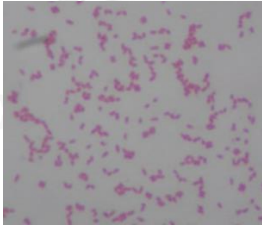
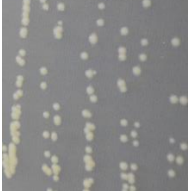

4.2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย TS1

คัดแยกแบคทีเรียจากกลุ่มแบคทีเรีย TS1 โดยคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อ (spread plate) บนอาหารแข็ง LB และนำโคโลนีเดี่ยวมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการขีดเชื้อ (streak plate) บนอาหารแข็ง LB เมื่อพิจารณาลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง พบโคโลนีที่แตกต่างกัน 7 ชนิด ตรวจสอบรูปร่างและการติดสีแกรมด้วยวิธี Gram's stain ได้ผลแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA และเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank พบว่า ทั้ง 7 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Microbacterium* sp., *Shinella* sp., *Pusillimonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA 99-100%


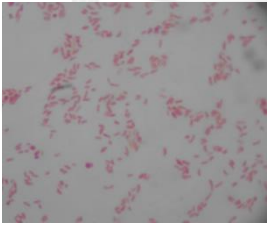
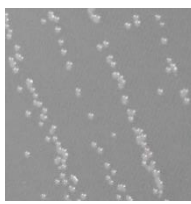
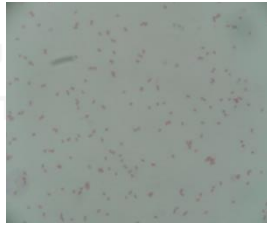
ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของโคโคไลนีเดียมที่คัดแยกได้จำนวน 7 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ลักษณะโคโคไลนี	รูปร่าง/แกรม	Accession number	ชนิด	% ความเหมือน
1	 <p>สีน้ำตาลอ่อน แผ่นกลม ๆ หัว - ท้ายแหลม มีเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ผิวมัน ขนาดประมาณ 4 มม.</p>	 <p>ท่อนสั้น แกรมลบ</p>	CP015877.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SJTD-1	100
2	 <p>สีเหลือง กลม ผิวมัน ผิวหน้าเรียบ ขนาดประมาณ 1.5 มม.</p>	 <p>ท่อนยาว แกรมลบ</p>	AY654621.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. BCc6	99

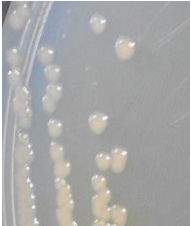

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกแบบที่เรียกโดยอาศัยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของโคโคไลนีเดียที่คัดแยกได้จำนวน 7 ไอโซเลต (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะโคโคไลนี	รูปร่าง/แกรม	Accession number	ชนิด	%ความเหมือน
3	 สีครีม กกลม ผิวเงา ผิวหน้าเรียบ ขนาดประมาณ 1.5 มม.	 ท่อนสั้น แกรมลบ	JQ518359.1	<i>Ochrobactrum</i> sp. CU4B	99
4	 สีเหลือง กกลม ผิวด้าน ผิวหน้าเรียบ ขนาดประมาณ 1 มม.	 ท่อนสั้น แกรมบวก	KR906353.1	<i>Microbacterium</i> sp. HBUM178961	99

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของโคไลฟอร์มเดี่ยวที่คัดแยกได้จำนวน 7 ไอโซเลต (ต่อ)

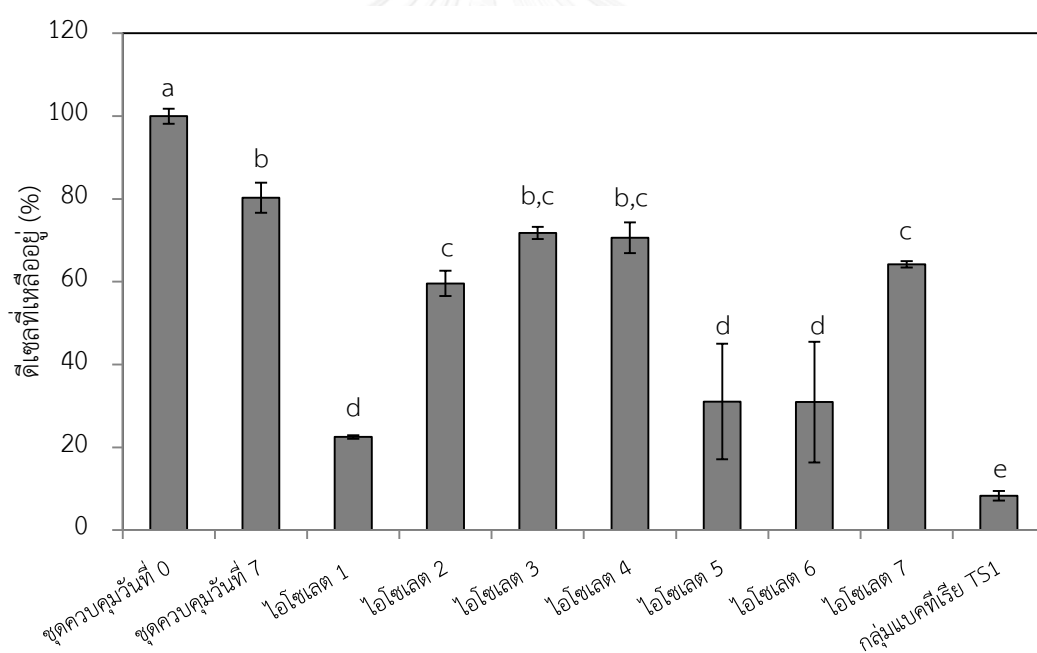
ไอโซเลต	ลักษณะโคไลฟอร์ม	รูปร่าง/แกรม	Accession number	ชนิด	% ความเหมือน
5	 สีครีม กกลม ผิวมัน ผิวหน้าขรุขระ ขนาดประมาณ 1 มม.	 ท่อนสั้น แกรมลบ	JX878616.1	<i>Shinella</i> sp. HZA2	99
6	 สีครีม กกลม ผิวมัน ผิวหน้าเรียบ ขนาดประมาณ 0.05 มม.	 ท่อนสั้น แกรมลบ	JF714704.1	<i>Pusillimonas</i> sp. 208	99

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของโคไลเนีเดียวที่คัดแยกได้จำนวน 7 ไอโซเลต (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะโคไลเนี	รูปร่าง/แกรม	Accession number	ชนิด	% ความเหมือน
7	 <p>สีครีม กกลม ผิวมัน ผิวหน้าเรียบ ขนาดประมาณ 2 มม.</p>	 <p>ท่อนสั้น แกรมลบ</p>	DQ272580.1	<i>Pseudomonas</i> sp. LB-2	99

4.2.3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเดี่ยวจากกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลาย 1% ดีเซล

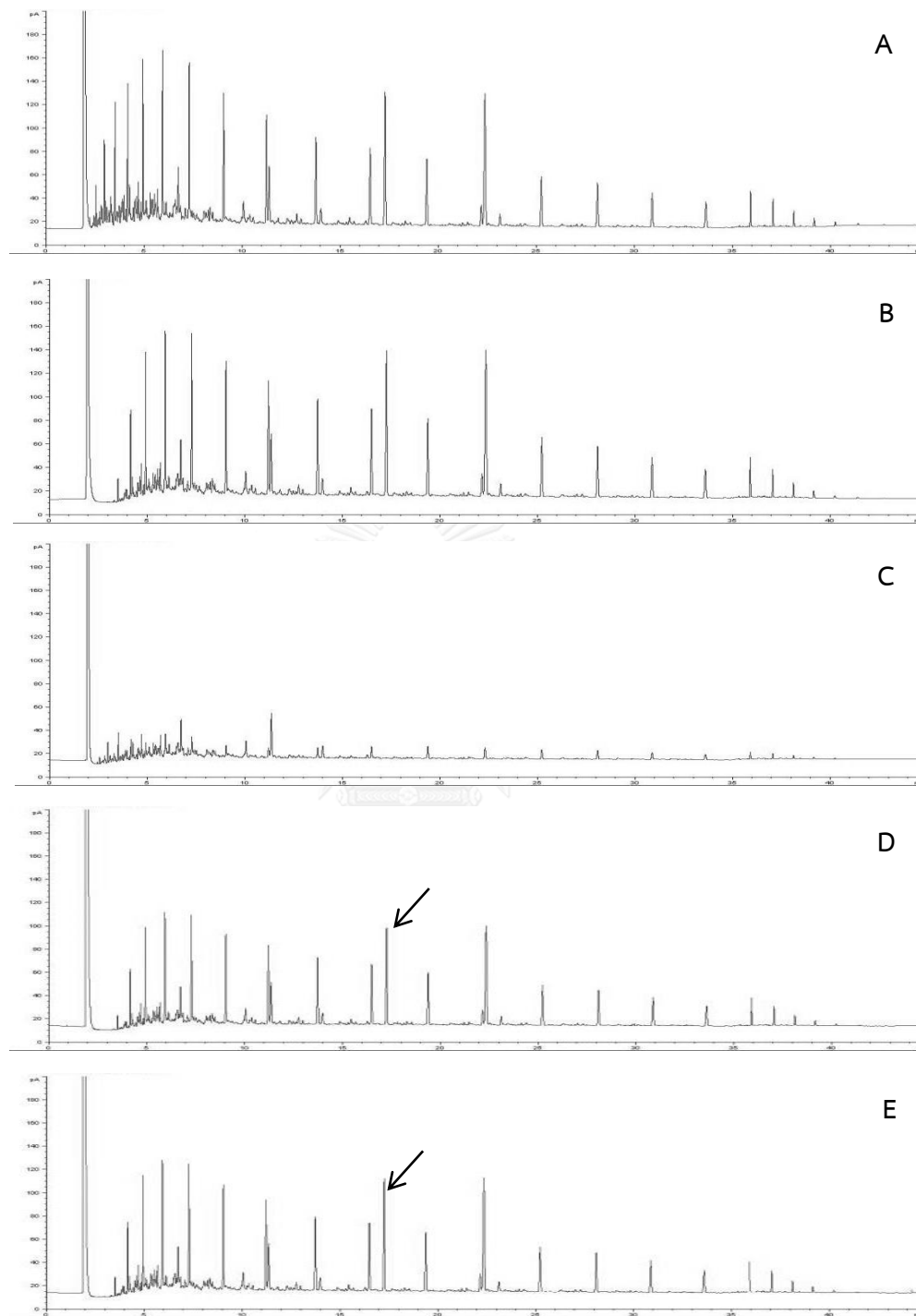
นำแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลกับกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียและวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือ พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลเหลืออยู่ $80.28 \pm 3.62\%$ ไอโซเลต 1, 2, 5, 6 และ 7 พบดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหาร $22.51 \pm 0.43\%$, $59.60 \pm 3.06\%$, $31.05 \pm 13.96\%$, $30.93 \pm 14.59\%$ และ $64.62 \pm 0.75\%$ ตามลำดับ (รูปที่ 4.5) ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไอโซเลต 3 และ 4 มีดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหาร $71.77 \pm 1.49\%$ และ $70.64 \pm 3.72\%$ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกลุ่มแบคทีเรีย TS1 สามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือดีเซลในอาหารเพียง $8.31 \pm 1.14\%$ ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า กลุ่มแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 1% ดีเซลได้รวดเร็วกว่าแบคทีเรียเพียง 1 ชนิด



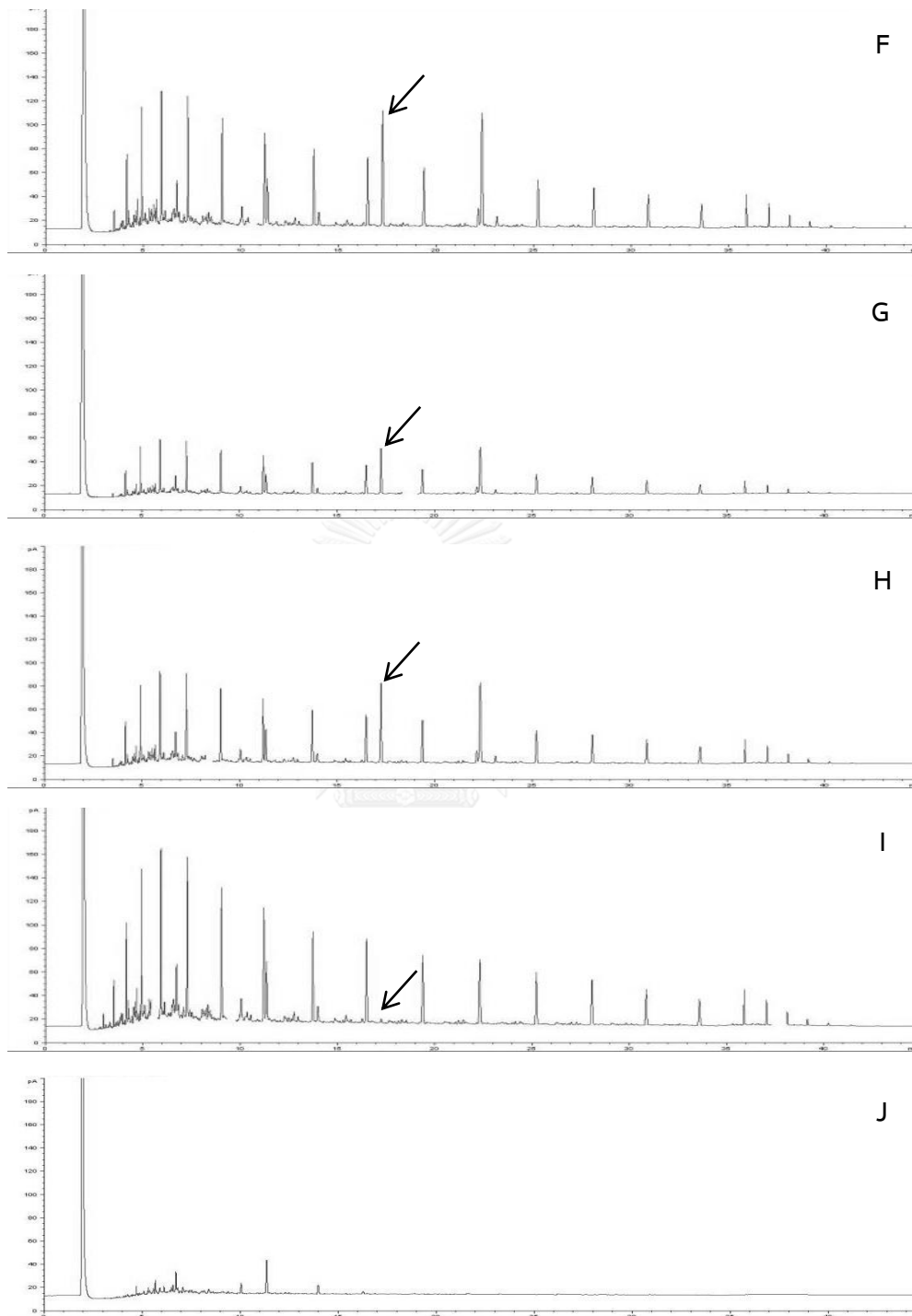
รูปที่ 4.5 ปริมาณดีเซลหลังการย่อยสลาย 1% ดีเซลด้วยแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

จากการสังเกตลักษณะของโครมาโทแกรมของการย่อยสลายดีเซลของแบคทีเรียเดี่ยวทั้ง 7 ไอโซเลตและกลุ่มแบคทีเรีย TS1 (รูปที่ 4.6) พบว่า ชุดควบคุมมีดีเซลเหลืออยู่ในวันที่ 7 มากกว่าชุดแบคทีเรียเดี่ยวทั้ง 7 ชนิดและกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ไอโซเลต 1 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีกว่าแบคทีเรียอีก 6 ไอโซเลต สังเกตจากโครมาโทแกรมที่ลดลงน้อยกว่าแบคทีเรียไอโซเลตอื่น ๆ แบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในดีเซลที่มีโครงสร้างง่าย ๆ ได้ สังเกตจากพีคของช่วงเวลาดัน ๆ ที่ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมวันที่ 7 และแบคทีเรียบางไอโซเลตสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ดีที่สุดสังเกตจากพีคช่วงเวลากลาง ๆ ถึงช่วงท้ายที่ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมวันที่ 7 ได้แก่ ไอโซเลต 1, 2, 5 และ 6 นอกจากนี้แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตจะมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของดีเซลที่แตกต่างกัน ดังแสดงโดยลูกศรในรูปที่ 4.6 กลุ่มแบคทีเรีย TS1 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต สังเกตจากพีคโครมาโทแกรมที่ลดลงน้อยกว่าชุดการทดลองต่าง ๆ



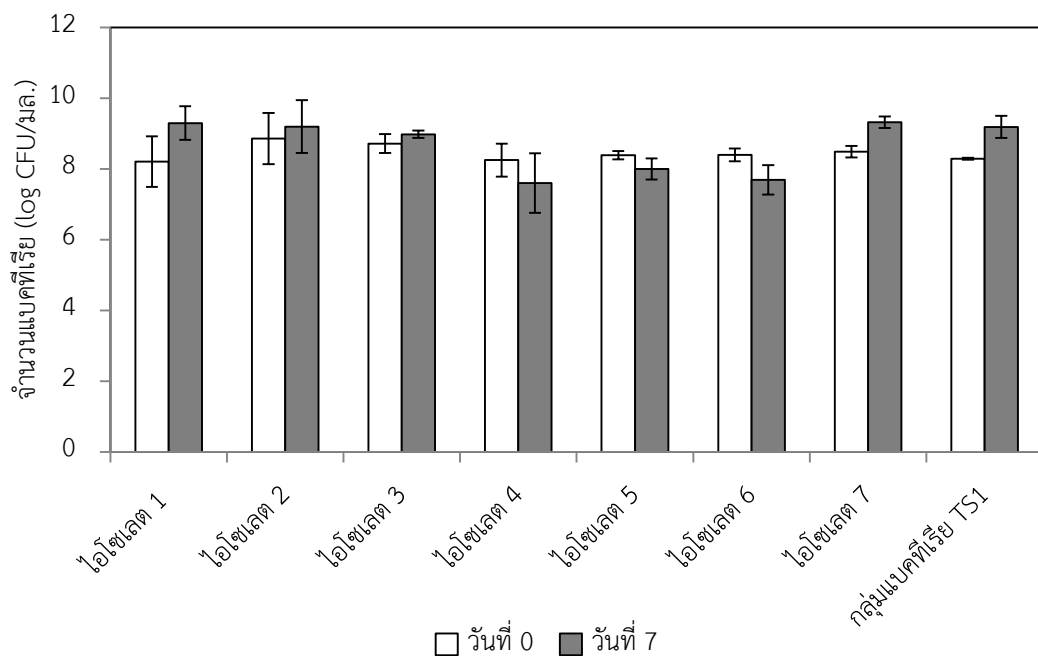


รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมหลังการย่อยสลาย 1% ดีเซลด้วยแบคทีเรียไฮโซเลตต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน ชุดควบคุมวันที่ 0 (A) ชุดควบคุมวันที่ 7 (B) ไฮโซเลตที่ 1 (C) ไฮโซเลตที่ 2 (D) ไฮโซเลตที่ 3 (E) ลูกศรแสดงองค์ประกอบของดีเซลที่ถูกย่อยสลายได้แตกต่างกันโดยแบคทีเรียแต่ละไฮโซเลต



รูปที่ 4.6 (ต่อ) โครมาโทแกรมหลังการย่อยสลาย 1% ดีเซลด้วยแบคทีเรียไฮโซเลตต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ) ไฮโซเลตที่ 4 (F) ไฮโซเลตที่ 5 (G) ไฮโซเลตที่ 6 (H) ไฮโซเลตที่ 7 (I) กลุ่มแบคทีเรีย TS1 (J) ลูกศรแสดงองค์ประกอบของดีเซลที่ถูกย่อยสลายได้แตกต่างกันโดยแบคทีเรียแต่ละไฮโซเลต

จากการนับปริมาณแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 (รูปที่ 4.7) โดยในวันที่ 0 ทุกชุดการทดลอง มีแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ $8 \log \text{ CFU/มล.}$ เมื่อผ่านไป 7 วัน ไอโซเลต 1 มีจำนวนแบคทีเรีย $2.01 \pm 0.48 \times 10^9 \text{ CFU/มล.}$ ไอโซเลต 2 มีจำนวนแบคทีเรีย $1.58 \pm 0.75 \times 10^9 \text{ CFU/มล.}$ ไอโซเลต 3 มีจำนวนแบคทีเรีย $9.60 \pm 0.1 \times 10^8 \text{ CFU/มล.}$ ไอโซเลต 4 มีจำนวนแบคทีเรีย $4.00 \pm 0.84 \times 10^7 \text{ CFU/มล.}$ ไอโซเลต 5 มีจำนวนแบคทีเรีย $1.01 \pm 0.30 \times 10^8 \text{ CFU/มล.}$ ไอโซเลต 6 มีจำนวนแบคทีเรีย $4.87 \pm 0.42 \times 10^7 \text{ CFU/มล.}$ ไอโซเลต 7 มีจำนวนแบคทีเรีย $2.07 \pm 0.16 \times 10^9 \text{ CFU/มล.}$ และกลุ่มแบคทีเรีย TS1 มีจำนวนแบคทีเรีย $1.54 \pm 0.31 \times 10^9 \text{ CFU/มล.}$ แสดงว่า บางไอโซเลตสามารถย่อยสลายดีเซลได้ดี และสามารถใช้ดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของเซลล์

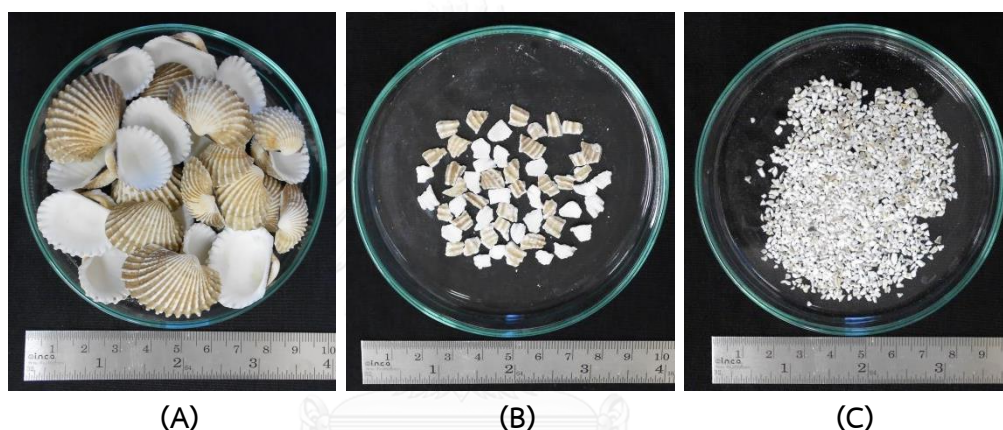


รูปที่ 4.7 จำนวนแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ หลังการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน

4.3 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย TS1

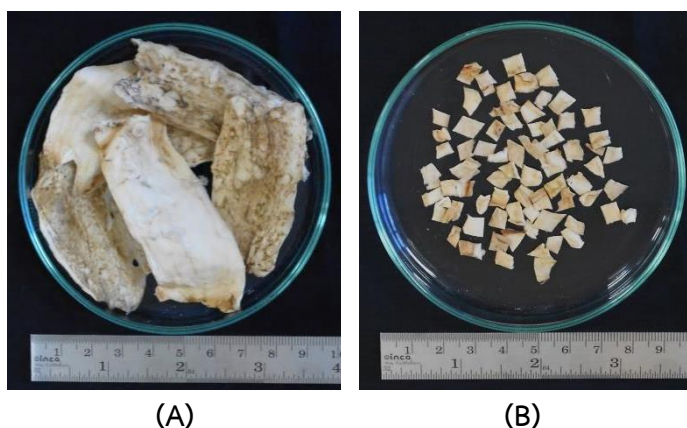
4.3.1 ลักษณะทางกายภาพของวัสดุตรึง

วัสดุตรึงที่ใช้ในการทดลองมี 2 ชนิดคือ เปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉด เก็บเปลือกหอยมาจากร้านอาหาร จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งเปลือกหอยมีลักษณะเป็ยก มีเศษเนื้อและสิ่งสกปรกติดอยู่ นำมาล้างทำความสะอาด อบแห้ง จากนั้นทุบและคัดเลือกด้วยมือให้มีขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร และนำเปลือกหอยที่ทุบละเอียดกรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดของช่องกรองประมาณ 2x2 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.8) เก็บไว้ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 4.8 ลักษณะของเปลือกหอยหลังทำความสะอาดแล้ว (A) ขนาด 5x5 มิลลิเมตร (B) และขนาด 2x2 มิลลิเมตร (C)

นมผักกระเฉดเก็บจากร้านขายผักกระเฉดในตลาดสำโรง จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งนมผักกระเฉดเป็นเนื้อเยื่อสีขาวที่หุ้มรอบลำต้น มีลักษณะเป็ยกขึ้น มีเศษรากและหนวดติดอยู่ รูดนมผักกระเฉดออกจากลำต้น นำมาล้างทำความสะอาด และตากแดดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะได้นมผักกระเฉดที่มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ สีน้ำตาลอ่อน จากนั้นตัดให้มีขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.9) เก็บไว้ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 4.9 ลักษณะของนมผักระยะหลังตากแดด (A) ขนาด 5x5 มิลลิเมตร (B)

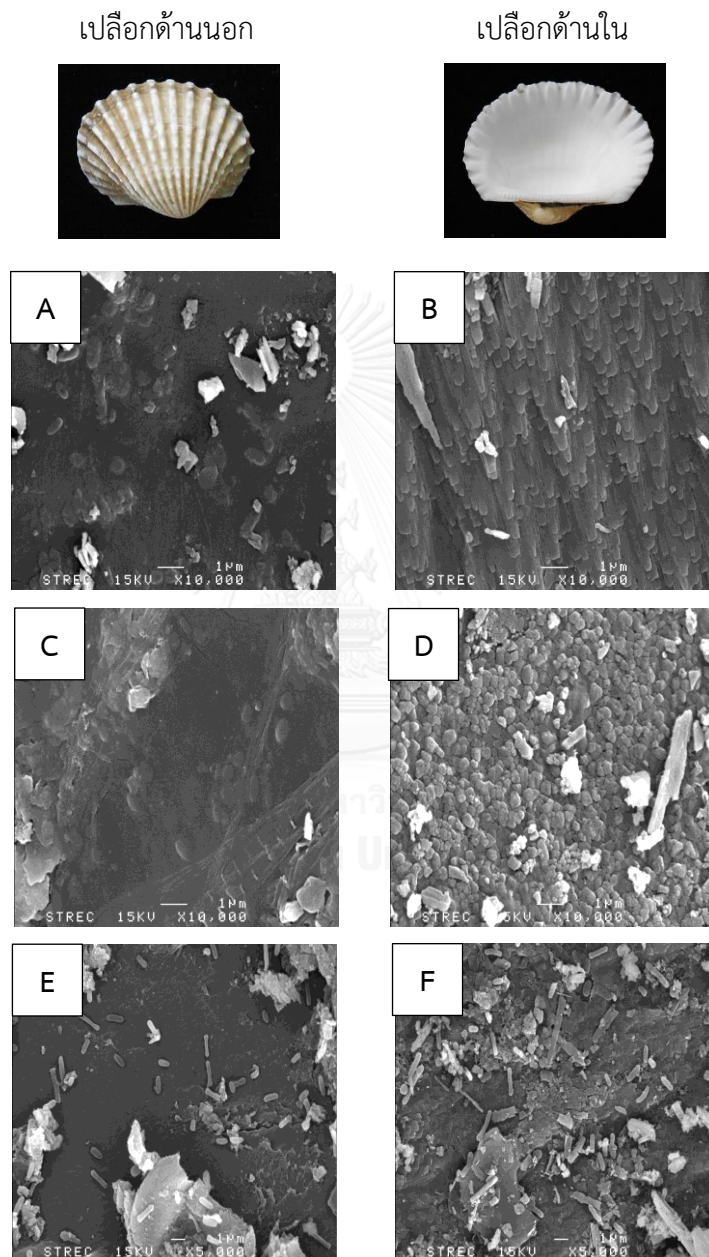
4.3.2 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย

ก) กลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรึงบนเปลือกหอย

นำกลุ่มแบคทีเรีย TS1 จำนวนประมาณ 8 log CFU/มล. ตรึงบนเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อจำนวน 5 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะบนเปลือกหอยด้วยวิธี viable plate count และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า เปลือกหอยก่อนตรึงมีแบคทีเรียตามธรรมชาติที่ติดมากับเปลือกหอยจำนวน 1.57 ± 0.83 log CFU/กรัม ภายหลังจากตรึงกลุ่มแบคทีเรีย TS1 พบแบคทีเรียที่เกาะบนเปลือกหอยจำนวน 7.31 ± 0.19 log CFU/กรัม

เมื่อนำตัวอย่างเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อที่ผ่านการต้ม 15-20 นาที และเปลือกหอยที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย TS1 มาตรวจสอบคุณลักษณะพื้นผิวโดยเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวทั้งด้านในและด้านนอกของเปลือกหอยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อไม่พบเซลล์จุลินทรีย์ แสดงว่า การต้มเปลือกหอยสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเปลือกหอยได้ เปลือกด้านในที่เป็นสีขาวมีลักษณะขรุขระมากกว่าเปลือกด้านนอกที่เป็นสีเทา (รูปที่ 4.10 B) ส่วนเปลือกหอยที่ปลอดเชื้อมีลักษณะพื้นผิวด้านนอกที่ไม่แตกต่างจากเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อ (รูปที่ 4.10 C) แต่มีลักษณะพื้นผิวด้านในแตกต่างจากเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อ (รูปที่ 4.10 D)

จากการตรวจสอบแบคทีเรียที่ตรึงบนเปลือกหอยด้วย SEM แสดงให้เห็นว่า เปลือกหอยที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรียจำนวน $8 \log$ CFU/มล. ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า เปลือกหอยมีลักษณะชุ่มเล็กน้อย และกลุ่มแบคทีเรียสามารถยึดเกาะบนเปลือกหอยทั้งด้านนอก (รูปที่ 4.10 E) และด้านใน (รูปที่ 4.10 F)

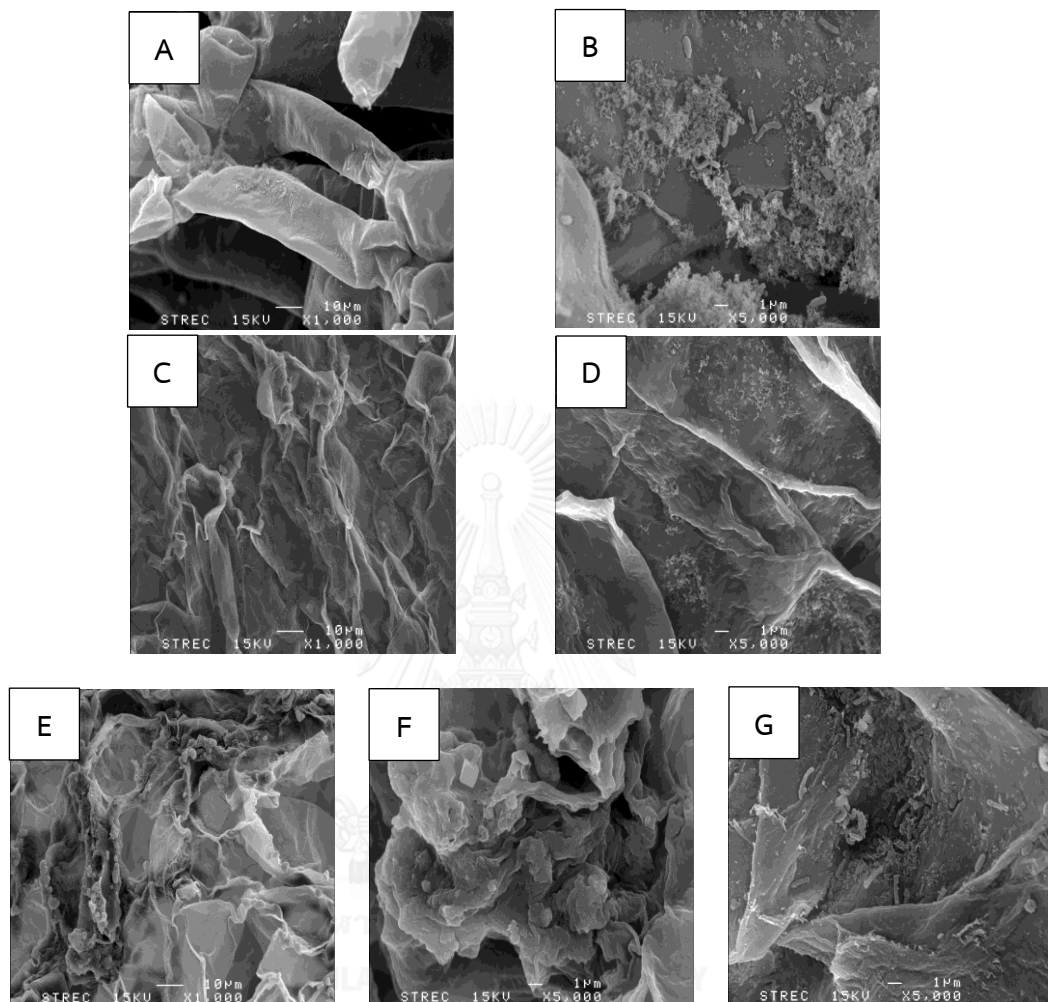


รูปที่ 4.10 ลักษณะของเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อด้านนอก (A) ด้านใน (B) และเปลือกหอยที่ปลอดเชื้อด้านนอก (C) และด้านใน (D) เปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึงหลังจากบ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ลักษณะของเปลือกหอยด้านนอก (E) และด้านใน (F)

ข) กลุ่มแบคทีเรียตรึงบนนมผักกระเฉด

นำกลุ่มแบคทีเรีย TS1 จำนวนประมาณ 8 log CFU/มล. ตรึงบนนมผักกระเฉดที่ไม่ปลอดเชื้อจำนวน 0.1 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะบนเปลือกหอยด้วยวิธี viable plate count และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า นมผักกระเฉดที่ไม่ปลอดเชื้อก่อนตรึงมีแบคทีเรียจำนวน 5.89 ± 0.46 log CFU/กรัม ภายหลังการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย TS1 พบแบคทีเรียที่เกาะบนนมผักกระเฉดจำนวน 11.04 ± 0.16 log CFU/กรัม

เมื่อนำตัวอย่างนมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อที่ผ่านการตากแดดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และนมผักกระเฉดที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย TS1 เพื่อดูลักษณะพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า นมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อไม่พบเซลล์จุลินทรีย์ (รูปที่ 4.11 C,D) และมีลักษณะพื้นผิวที่เปื่อยมากกว่านมผักกระเฉดสดที่ไม่ผ่านการตากแดด (รูปที่ 4.11 A,B) ซึ่งมีจุลินทรีย์เกาะอยู่ และนมผักกระเฉดที่ปลอดเชื้อ (รูปที่ 4.11 E,F) มีลักษณะเปื่อยยุ่ยมากกว่านมผักกระเฉดที่ผ่านการตากแดด นมผักกระเฉดที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรียจำนวน 8 log CFU ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า นมผักกระเฉดมีลักษณะชุ่มเล็กน้อย และกลุ่มแบคทีเรียสามารถยึดเกาะบนนมผักกระเฉดได้ (รูปที่ 4.11 G)



รูปที่ 4.11 ลักษณะของนมผักกระเฉดชนิดต่าง ๆ ที่กำลังขยาย 1,000 และ 5,000 เท่าของนมผักกระเฉดสด (A,B) นมผักกระเฉดที่ตากแดด (C,D) และนมผักกระเฉดปลอดเชื้อ (E,F) นมผักกระเฉดที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรียหลังจากบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (G)

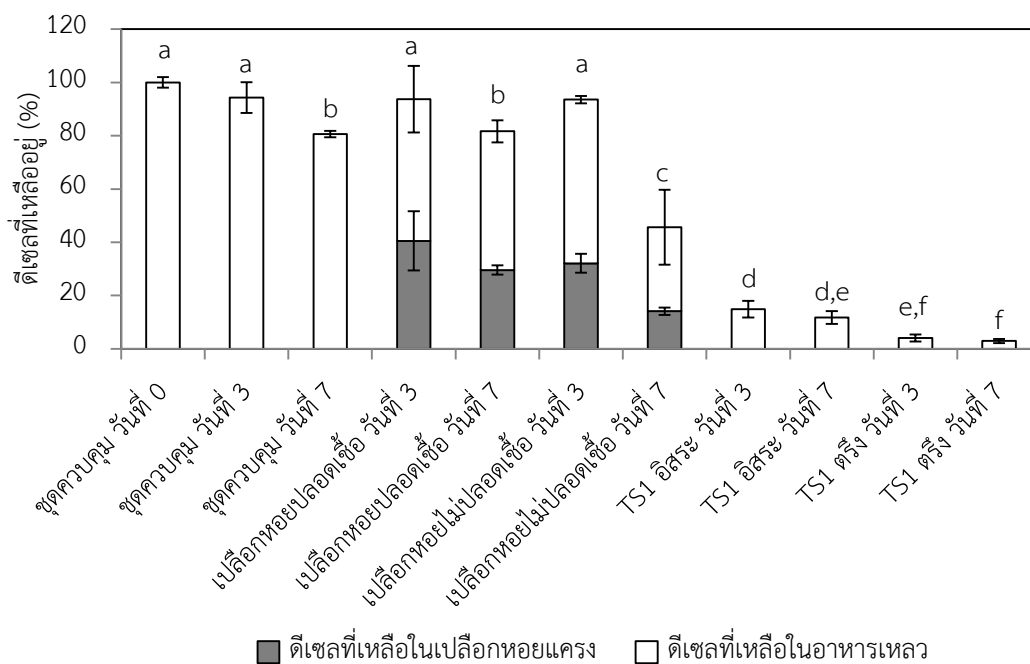
4.4 การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียตรึง

4.4.1 การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอย

นำกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนเปลือกหอยทดสอบการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ อาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล ชุดที่มีเปลือกหอยปลอดเชื้อ ชุดที่มีเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อ และกลุ่มแบคทีเรียอิสระ เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3 และ 7 นับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count และวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลือ

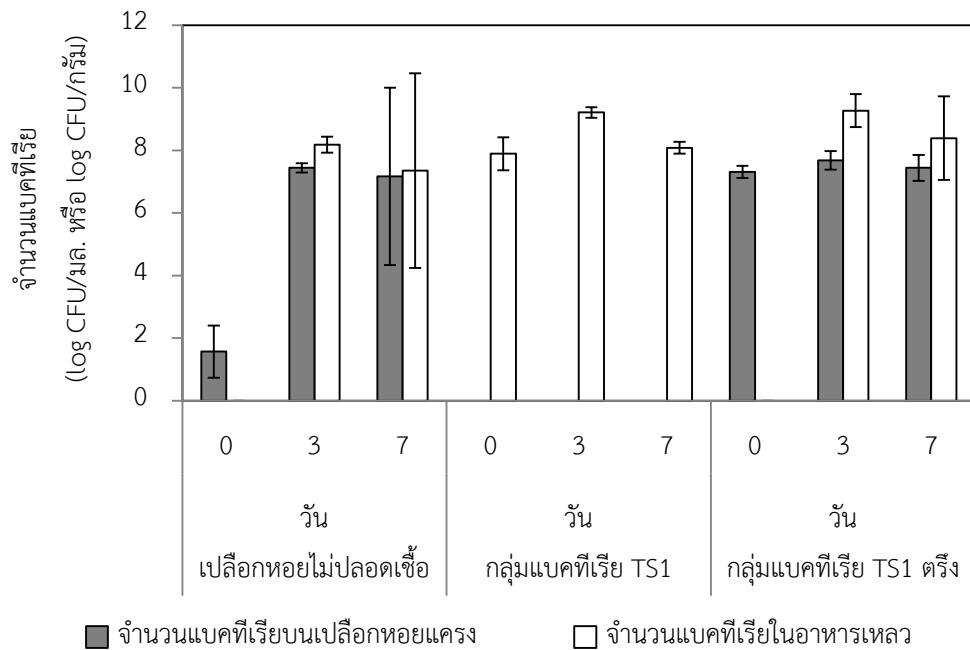
จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอย โดยให้ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 เท่ากับ 100% เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปดีเซลที่เหลืออยู่ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลง (รูปที่ 4.12) ในชุดควบคุมมีดีเซลเหลืออยู่ $94.30 \pm 5.82\%$ และ $80.64 \pm 1.21\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ในชุดการทดลองดีเซลที่เหลือจะอยู่ในส่วนของอาหารเหลวเป็นส่วนใหญ่ เปลือกหอยสามารถดูดซับดีเซลบางส่วนได้ ชุดเปลือกหอยปลอดเชื้อเหลือดีเซล 93.7% และ 81.66% หลังจากบ่มเป็นเวลา 3 และ 7 วันตามลำดับ เปลือกหอยปลอดเชื้อสามารถดูดซับดีเซลได้มากที่สุด $40.54 \pm 11.16\%$ และ $29.59 \pm 1.78\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ในชุดเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อมีดีเซลเหลืออยู่ 93.55% และ 45.67% พบดีเซลคงเหลือในเปลือกหอย $32.11 \pm 3.57\%$ และ $14.12 \pm 1.38\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และพบดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวประมาณ $61.44 \pm 1.38\%$ และ $31.55 \pm 14.06\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ

เมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย TS1 อิสระลงไปในอาหารเหลวที่มีดีเซล TS1 สามารถย่อยสลายดีเซลจนเหลือประมาณ $14.87 \pm 3.14\%$ และ $11.78 \pm 2.35\%$ หลังจากผ่านไป 3 และ 7 วัน ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่มีเฉพาะเปลือกหอยปลอดเชื้อ และชุดเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ และเมื่อใช้กลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรึงบนเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อ พบว่า มีปริมาณดีเซลเหลืออยู่ในอาหารเหลวเพียง $4.03 \pm 1.33\%$ และ $2.95 \pm 0.80\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า กลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลได้มากกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ



รูปที่ 4.12 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 และ 7 ของเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อและกลุ่มแบคทีเรียตรงในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล

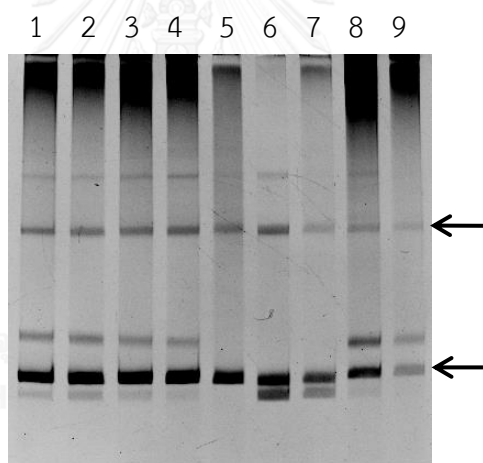
เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียจากการทดลอง พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน แบคทีเรียในทุกชุดการทดลองมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ปริมาณดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 (รูปที่ 4.13) เปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อเริ่มต้นมีจำนวนแบคทีเรีย ประมาณ 1.57 ± 0.83 log CFU/กรัม เมื่อเวลาผ่านไปแบคทีเรียบนเปลือกหอยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ถึง 7.44 ± 0.14 และ 7.17 ± 2.84 log CFU/กรัม ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และมีแบคทีเรีย อีกส่วนหนึ่งที่อยู่ในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณมากกว่าแบคทีเรียที่เกาะบนเปลือกหอย โดยมีจำนวน ประมาณ 8.18 ± 0.25 และ 7.35 ± 3.11 log CFU/มล. ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ในชุด การทดลองกลุ่มแบคทีเรียอิสระวันที่ 0 มีแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 8 log CFU/มล. เมื่อเวลา ผ่านไปมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นถึง 9.21 ± 0.17 และ 8.08 ± 0.19 log CFU/มล. ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และในชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียที่ตรงบนเปลือกหอยวันที่ 0 ซึ่งหลังการตรึงเซลล์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า มีแบคทีเรียที่เกาะบนเปลือกหอยประมาณ 7.31 ± 0.19 log CFU/กรัม เมื่อเวลาผ่านไปมีจำนวนแบคทีเรียบนเปลือกหอยเพิ่มขึ้นประมาณ 7.68 ± 0.30 และ 7.44 ± 0.42 log CFU/กรัม ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และพบแบคทีเรียอีกส่วนหนึ่งที่อยู่ในอาหารเหลวซึ่งมี ปริมาณมากกว่าแบคทีเรียที่เกาะบนเปลือกหอย โดยมีจำนวนประมาณ 9.27 ± 0.53 และ 8.39 ± 1.33 log CFU/มล. ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ



รูปที่ 4.13 จำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 ของเปลือกหอยที่ไม่ปลดเชื้อและกลุ่มแบคทีเรียตรงในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล

จากการสกัดดีเอ็นเอของชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียอิสระ เปลือกหอยที่ไม่ปลดเชื้อและเปลือกหอยตรงกลุ่มแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 จากส่วนของอาหารเหลวและเปลือกหอยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ EUB 933F ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ EUB 1387R ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส หลังจากย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Karthika และคณะ) ด้วยเครื่อง Gel Documentation พบว่า ทุกตัวอย่างมีผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500 bp ปรากฏเพียงแถบเดียวที่เด่นชัด และไม่พบผลิตภัณฑ์ในชุดควบคุมผลลบ (negative control) นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาทำ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) โดยใช้เกรเดียนต์ของสารละลาย denaturant 50-70% เพื่อติดตามพลวัตรประชากรของกลุ่มแบคทีเรียตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการทดสอบ

จากการติดตามพลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียตรงบนเปลือกหอยพบแถบของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ในวันที่ 0 และ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4.14 ช่องวิ่งที่ 1-2 และ 8-9) แสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรีย TS1 สามารถยึดเกาะบนเปลือกหอย (ช่องวิ่งที่ 9) และบางส่วนเจริญเติบโตและหลุดออกจากเปลือกหอยมาอยู่ในส่วนของอาหารเหลวได้ (ช่องวิ่งที่ 8) และพบแถบของกลุ่มแบคทีเรียตามธรรมชาติที่อยู่ในวัสดุตั้งที่ไม่ปลอดเชื้อที่เจริญปะปนกัน (ลูกศรชี้) เช่นเดียวกับชุดการทดลองเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อที่พบแถบของกลุ่มแบคทีเรียทั้งในส่วนของอาหารเหลวและเปลือกหอย (ช่องวิ่งที่ 5-7) และมีแถบสุดท้ายของช่องวิ่งที่ 6-7 ที่ไม่พบในวันที่ 0 แต่พบในวันที่ 7 แสดงว่า เปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อมีแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถย่อยสลายดีเซลและเจริญเติบโตบนเปลือกหอยและหลุดออกมาอยู่ในส่วนของอาหารเหลวได้ ส่วนกลุ่มแบคทีเรีย TS1 อิสระ พบแถบของแบคทีเรียที่มีลักษณะเหมือนกันทั้งในวันที่ 0 และ 7 ของการทดลอง (ช่องวิ่งที่ 3-4) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count และการตรวจสอบการยึดเกาะของแบคทีเรียด้วย SEM



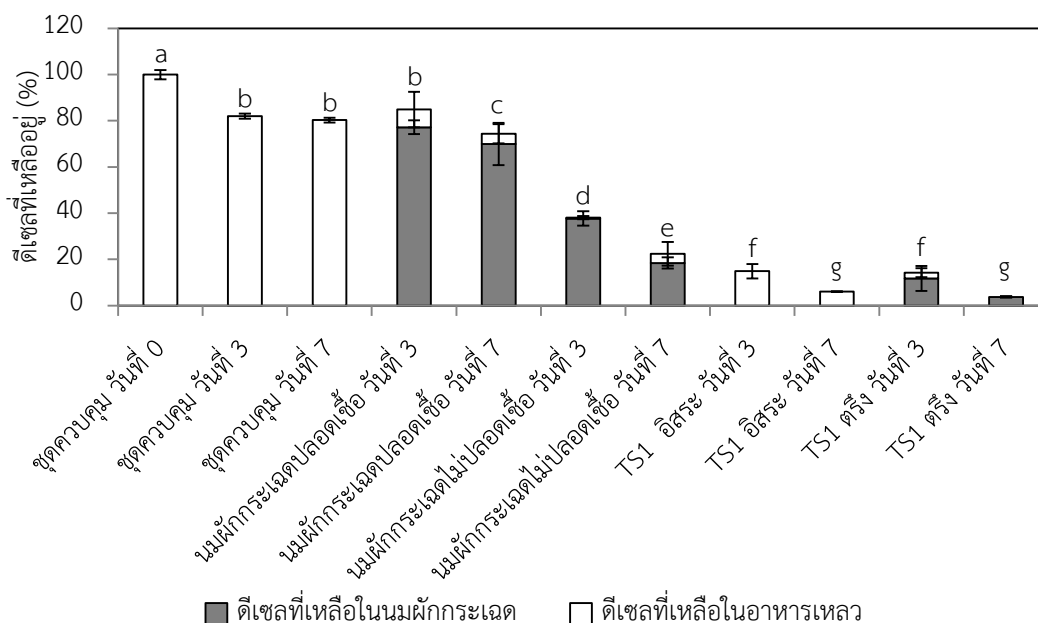
รูปที่ 4.14 การวิเคราะห์ประชากรกลุ่มแบคทีเรีย TS1 โดยวิธี PCR-DGGE หลังการตรึงบนเปลือกหอยและใช้งาน (ช่องวิ่งที่ 1: กลุ่มแบคทีเรีย TS1, ช่องวิ่งที่ 2: TS1 หลังตรึง 2 ชั่วโมง, ช่องวิ่งที่ 3: กลุ่มแบคทีเรีย TS1 อิสระวันที่ 0, ช่องวิ่งที่ 4: กลุ่มแบคทีเรีย TS1 อิสระวันที่ 7, ช่องวิ่งที่ 5: เปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อวันที่ 0, ช่องวิ่งที่ 6: แบคทีเรียในอาหารเหลวของชุดเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อวันที่ 7, ช่องวิ่งที่ 7: แบคทีเรียบนเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อวันที่ 7, ช่องวิ่งที่ 8: แบคทีเรียในอาหารเหลวของชุดเปลือกหอยตรึงกลุ่มแบคทีเรียวันที่ 7, และช่องวิ่งที่ 9: แบคทีเรียบนเปลือกหอยตรึงกลุ่มแบคทีเรียวันที่ 7) ลูกศรชี้แสดง แถบของกลุ่มแบคทีเรียตามธรรมชาติที่ติดมากับเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อที่เจริญปะปนอยู่กับกลุ่มแบคทีเรีย TS1

4.4.2 การย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนนมผักกระเฉด

นำกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนนมผักกระเฉดทดสอบการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ อาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล ชุดที่มีนมผักกระเฉดปลอดเชื้อ ชุดที่มีนมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อ และชุดกลุ่มแบคทีเรียอิสระ เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3 และ 7 นับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count และวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลือ

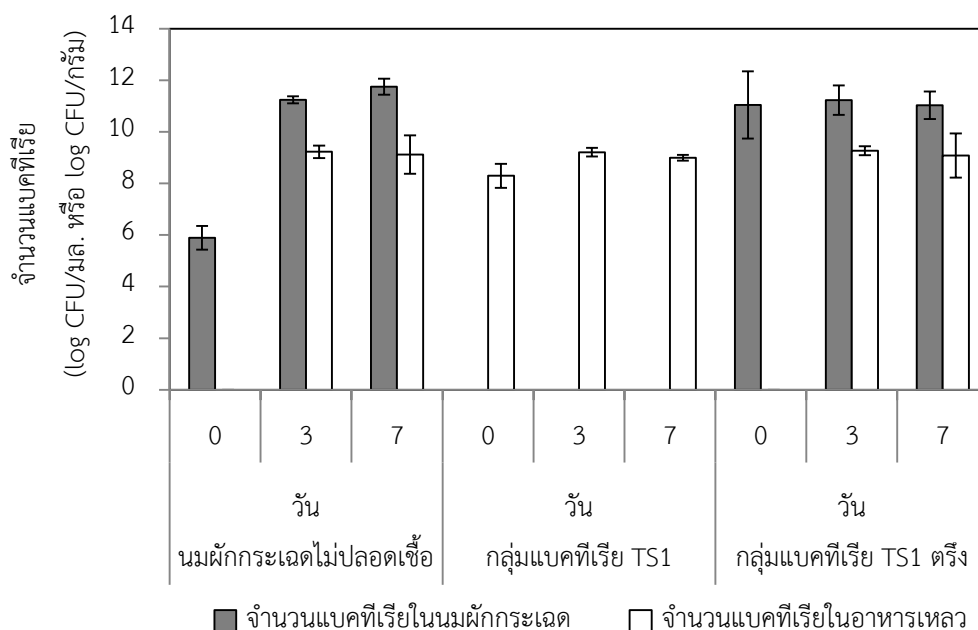
จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนนมผักกระเฉด โดยให้ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 เท่ากับ 100% เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปดีเซลที่เหลืออยู่ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลง (รูปที่ 4.15) ในชุดควบคุมมีดีเซลเหลืออยู่ $82.00 \pm 1.13\%$ และ $80.32 \pm 1.04\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ในชุดการทดลองดีเซลที่เหลือจะอยู่ในส่วนของนมผักกระเฉดเป็นส่วนใหญ่ นมผักกระเฉดสามารถดูดซับดีเซลจากอาหารเหลวได้เกือบหมด นมผักกระเฉดปลอดเชื้อเหลือดีเซล 84.87% และ 74.42% หลังจากบ่มเป็นเวลา 3 และ 7 วัน ตามลำดับ นมผักกระเฉดปลอดเชื้อสามารถดูดซับดีเซลได้มากที่สุด $77.18 \pm 2.96\%$ และ $69.92 \pm 9.12\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ในชุดนมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อมีดีเซลเหลืออยู่ 38.07% และ 22.38% หลังจากบ่มเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบดีเซลคงเหลือในนมผักกระเฉด $37.69 \pm 0.38\%$ และ $18.42 \pm 3.96\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ

เมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย TS1 อิสระลงในอาหารเหลวที่มีดีเซล TS1 สามารถย่อยสลายดีเซลจนเหลือประมาณ $14.87 \pm 3.14\%$ และ $6.02 \pm 0.10\%$ หลังจากผ่านไป 3 และ 7 วัน ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุม ชุดที่มีนมผักกระเฉดปลอดเชื้อ และชุดที่มีนมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ และเมื่อใช้กลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรึงบนนมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อ พบว่า มีปริมาณดีเซลเหลืออยู่ในนมผักกระเฉดประมาณ $11.75 \pm 5.4\%$ และ $3.74 \pm 0.31\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และพบดีเซลที่เหลืออยู่อาหารเหลว $2.50 \pm 1.95\%$ ในวันที่ 3 และวันที่ 7 ไม่พบปริมาณดีเซลในอาหารเหลว ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลได้มากกว่าชุดการทดลองนมผักกระเฉดปลอดเชื้อ นมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มแบคทีเรียอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4.15 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 และ 7 ของนมที่กระเจดที่ไม่ปลอดเชื้อและกลุ่มแบคทีเรียตรงในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล

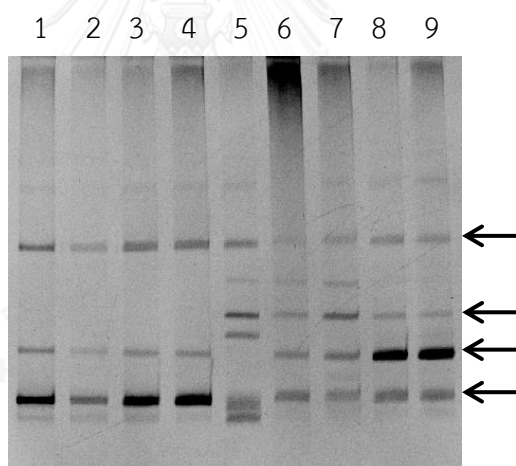
เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียจากการทดลอง พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน แบคทีเรียในทุกชุดการทดลองมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ปริมาณดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 (รูปที่ 4.16) ตัวอย่างนมที่กระเจดที่ไม่ปลอดเชื้อเริ่มต้นมีจำนวนแบคทีเรีย 5.89 ± 0.46 log CFU/กรัม เมื่อเวลาผ่านไปแบคทีเรียบนนมที่กระเจดมีจำนวนเพิ่มขึ้นถึง 11.24 ± 0.13 และ 11.75 ± 0.30 log CFU/กรัม ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และมีแบคทีเรียอีกส่วนหนึ่งที่อยู่ในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าแบคทีเรียที่เกาะบนนมที่กระเจดคือ 9.23 ± 0.24 และ 9.12 ± 0.74 log CFU/มล. ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ในชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียอีสระวันที่ 0 มีแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 8 log CFU/มล. เมื่อเวลาผ่านไปมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นถึง 9.21 ± 0.17 และ 8.99 ± 0.11 log CFU/มล. ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และในชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียที่ตรงบนนมที่กระเจดวันที่ 0 ซึ่งหลังการตรึงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมงพบว่า มีแบคทีเรียที่เกาะบนนมที่กระเจดประมาณ 11.04 ± 1.30 log CFU/กรัม เมื่อเวลาผ่านไปมีจำนวนแบคทีเรียบนนมที่กระเจดเพิ่มขึ้นประมาณ 11.24 ± 0.13 และ 11.75 ± 0.30 CFU/กรัม ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และพบแบคทีเรียอีกส่วนหนึ่งที่อยู่ในอาหารเหลว ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าแบคทีเรียที่เกาะบนนมที่กระเจดซึ่งมีจำนวนประมาณ 9.23 ± 0.24 และ 9.12 ± 0.74 log CFU/มล. ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ



รูปที่ 4.16 จำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 ของนมผักกระเฉดที่ไม่ปลอดเชื้อและกลุ่มแบคทีเรียตรงในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล

จากการสกัดดีเอ็นเอของชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียอิสระ นมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อ และนมผักกระเฉดตรงกลุ่มแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 จากส่วนของอาหารเหลวและนมผักกระเฉด นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ EUB 933F ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ EUB 1387R ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส หลังจากย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Karthika และคณะ) ด้วยเครื่อง Gel Documentation พบว่า ทุกตัวอย่างมีผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500 bp ปรากฏเพียงแถบเดียวที่เด่นชัด และไม่พบผลิตภัณฑ์ในชุดควบคุมผลลบ (negative control) นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาทำ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) โดยใช้เกรเดียนต์ของสารละลาย denaturant 50-70% เพื่อติดตามพลวัตรประชากรของกลุ่มแบคทีเรียตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการทดสอบ

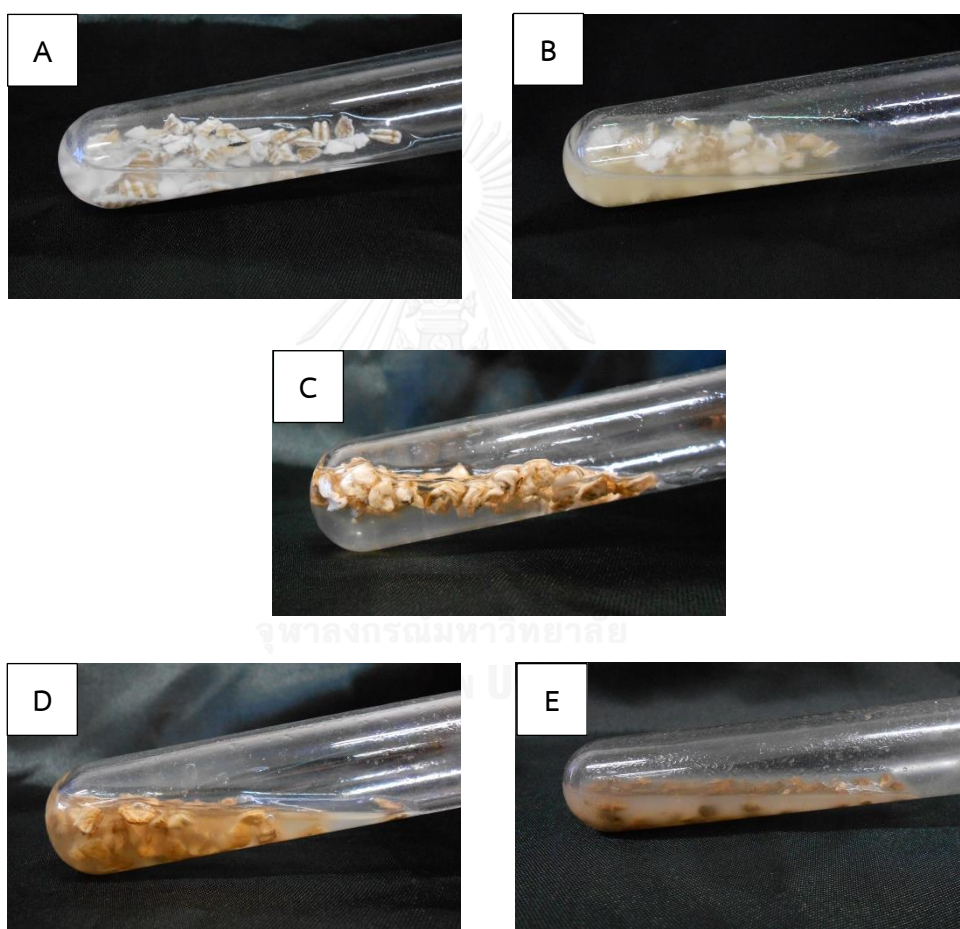
จากการติดตามพลวัตของชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนนมผักกระเฉดพบแถบของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ในวันที่ 0 และ 7 ของการทดลองที่ตรงกับกลุ่มแบคทีเรียอิสระ (รูปที่ 4.17 ช่องวิ่งที่ 1-2 และ 3-4) แสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรีย TS1 สามารถยึดเกาะบนนมผักกระเฉด (ช่องวิ่งที่ 9) และบางส่วนเจริญเติบโตและหลุดออกจากนมผักกระเฉดมาอยู่ในส่วนของอาหารเหลวได้ (ช่องวิ่งที่ 8) และพบบางแถบของกลุ่มแบคทีเรียตามธรรมชาติที่อยู่ในวัสดุตรึงที่ไม่ปลอดเชื้อที่เจริญปะปนกันกับ TS1 (ลูกศรชี้) นอกจากนี้ยังพบว่า ช่องวิ่งที่ 8-9 มีบางแถบที่หนาขึ้นมากกว่าวันที่ 0 (ช่องวิ่งที่ 2) เช่นเดียวกับชุดการทดลองนมผักกระเฉดที่ไม่ปลอดเชื้อที่พบแถบของกลุ่มแบคทีเรียบางแถบทั้งในส่วนอาหารเหลวและนมผักกระเฉด (ช่องวิ่งที่ 5-7) โดยมีบางแถบที่พบในวันที่ 0 แต่ไม่พบในวันที่ 7 และมีบางแถบที่ไม่พบในวันที่ 0 แต่พบในวันที่ 7 แสดงว่า นมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อมีแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถย่อยสลายดีเซลและเจริญเติบโตบนนมผักกระเฉด และหลุดออกมาอยู่ในส่วนของอาหารเหลวได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count และการตรวจสอบการยึดเกาะของแบคทีเรียด้วย SEM



รูปที่ 4.17 การวิเคราะห์ประชากรกลุ่มแบคทีเรีย TS1 โดยวิธี PCR-DGGE หลังการตรึงบนนมผักกระเฉดและใช้งาน (ช่องวิ่งที่ 1: กลุ่มแบคทีเรีย TS1, ช่องวิ่งที่ 2: TS1 หลังตรึง 2 ชั่วโมง, ช่องวิ่งที่ 3: กลุ่มแบคทีเรีย TS1 อิสระวันที่ 0, ช่องวิ่งที่ 4: กลุ่มแบคทีเรีย TS1 อิสระวันที่ 7, ช่องวิ่งที่ 5: นมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อวันที่ 0, ช่องวิ่งที่ 6: แบคทีเรียในอาหารเหลวของชุดนมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อวันที่ 7, ช่องวิ่งที่ 7: แบคทีเรียในนมผักกระเฉดไม่ปลอดเชื้อวันที่ 7, ช่องวิ่งที่ 8: แบคทีเรียในอาหารเหลวของชุดนมผักกระเฉดตรึงกลุ่มแบคทีเรียวันที่ 7, และช่องวิ่งที่ 9: แบคทีเรียในนมผักกระเฉดตรึงกลุ่มแบคทีเรียวันที่ 7) ลูกศรชี้แสดง แถบของกลุ่มแบคทีเรียตามธรรมชาติที่ติดมากับนมผักกระเฉดที่ไม่ปลอดเชื้อที่เจริญปะปนอยู่กับกลุ่มแบคทีเรีย TS1

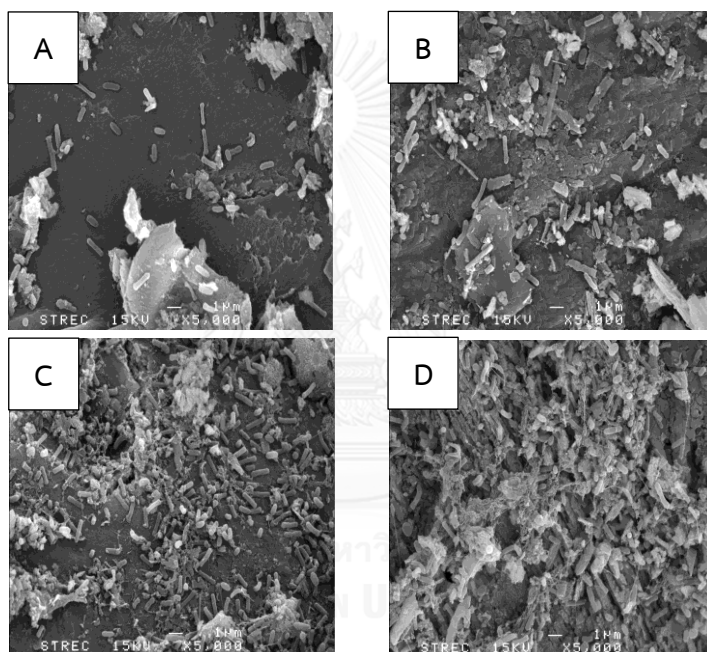
4.4.3 ลักษณะของวัสดุจริงหลังการใช้งาน

เมื่อสังเกตลักษณะของวัสดุจริงหลังการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลเป็นเวลา 7 วัน พบว่า นมผักกระเฉดจริงบางส่วนจมน้ำ บางส่วนแขวนลอยในอาหารเหลว หลังจากการทดสอบผ่านไป 1 วัน และเมื่อผ่านไป 7 วัน พบวัสดุมีสีเข้มขึ้นและเปื่อยยุ่ย แตกต่างจากเปลือกหอยตริงที่มีลักษณะแข็งและคงสภาพได้ดีกว่าเมื่อผ่านไป 7 วัน (รูปที่ 4.18) ดังนั้นเปลือกหอยจึงเป็นวัสดุจริงที่เหมาะสมกับการทดสอบขึ้นไป



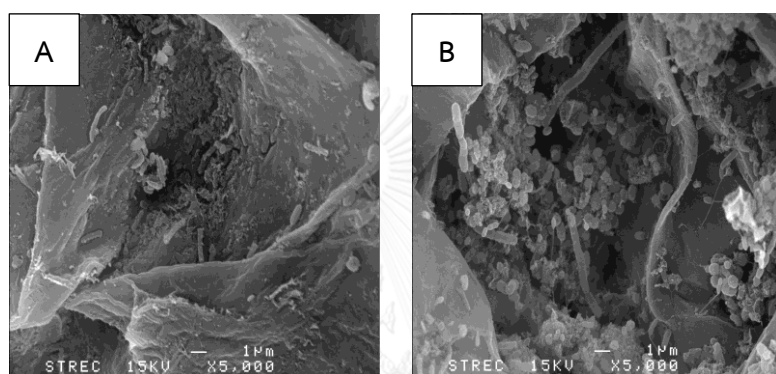
รูปที่ 4.18 ลักษณะของวัสดุจริงชนิดต่าง ๆ ในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล เปลือกหอยตริงวันที่ 0 (A) เปลือกหอยตริงวันที่ 7 (B) นมผักกระเฉดตริงวันที่ 0 (C) นมผักกระเฉดตริงวันที่ 1 (D) และนมผักกระเฉดตริงวันที่ 7 (E)

จากการตรวจสอบการยึดเกาะของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 บนเปลือกหอยทั้งก่อนและหลังใช้งาน เพื่อย่อยสลาย 1% ดีเซล เป็นเวลา 7 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า มีแบคทีเรียบนเปลือกหอยก่อนการใช้งานที่เปลือกด้านนอก (รูปที่ 4.19 A) และด้านใน (รูปที่ 4.19 B) และเปลือกหอยที่มีแบคทีเรียตรึงหลังการใช้งานเป็นเวลา 7 วัน พบกลุ่มแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดบนเปลือกหอยทั้งด้านนอก (รูปที่ 4.19 C) และด้านใน (รูปที่ 4.19 D) แสดงว่า กลุ่มแบคทีเรียสามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนวัสดุตรึง และยังคงความสามารถในการย่อยสลายดีเซล สอดคล้องกับผลจำนวนแบคทีเรียจากวิธี viable plate count และผลการย่อยสลายดีเซลจากการวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือในอาหารเหลว



รูปที่ 4.19 ลักษณะของเปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึงหลังจากบ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนใช้งาน ลักษณะเปลือกหอยด้านนอก (A) และด้านใน (B) และหลังจากผ่านการใช้งาน 7 วัน ลักษณะของเปลือกหอยด้านนอก (C) และด้านใน (D)

จากการตรวจสอบการยึดเกาะของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 บนนมผักกระเฉดทั้งก่อนและหลังใช้งานเพื่อย่อยสลาย 1% ดีเซล เป็นเวลา 7 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า กลุ่มแบคทีเรียที่เรียงบนนมผักกระเฉดก่อนใช้งานพบแบคทีเรียบนนมผักกระเฉด (รูปที่ 4.20 A) และหลังการใช้งานเป็นเวลา 7 วัน พบกลุ่มแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดบนนมผักกระเฉด (รูปที่ 4.20 B) แสดงว่า กลุ่มแบคทีเรียสามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนวัสดุจริงและยังคงความสามารถในการย่อยสลายดีเซล สอดคล้องกับผลจำนวนแบคทีเรียจากวิธี viable plate count และผลการย่อยสลายดีเซลจากการวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือในอาหารเหลว



รูปที่ 4.20 ลักษณะของนมผักกระเฉดที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรียหลังจากบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (A) และหลังจากการใช้งาน 7 วัน (B)

กลุ่มแบคทีเรีย TS1 ที่คัดแยกจากรากผักตบชวาสามารถย่อยสลายดีเซลได้ $88.22 \pm 2.35\%$ ภายใน 7 วัน และเมื่อตรึงกลุ่มแบคทีเรีย TS1 บนเปลือกหอยและนมผักกระเฉดสามารถคงความสามารถในการย่อยสลายดีเซลไว้ได้ กลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนเปลือกหอยสามารถย่อยสลายดีเซลได้มากกว่าชุดควบคุมต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเปลือกหอยยังคงสภาพเดิมหลังจากผ่านการใช้งานเพื่อย่อยสลายดีเซลเป็นเวลา 7 วัน กลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนนมผักกระเฉดสามารถย่อยสลายดีเซลได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มแบคทีเรียอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และนมผักกระเฉดเปื่อยยุ่ยและแขวนลอยในอาหารเหลว จึงไม่เหมาะกับการใช้งานเพื่อบำบัดดีเซลในน้ำ ดังนั้นจึงเลือกกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ที่ตรึงบนเปลือกหอย ซึ่งเหมาะกับการใช้งานเพื่อบำบัดดีเซลในน้ำ มาทดสอบขั้นต่อไป

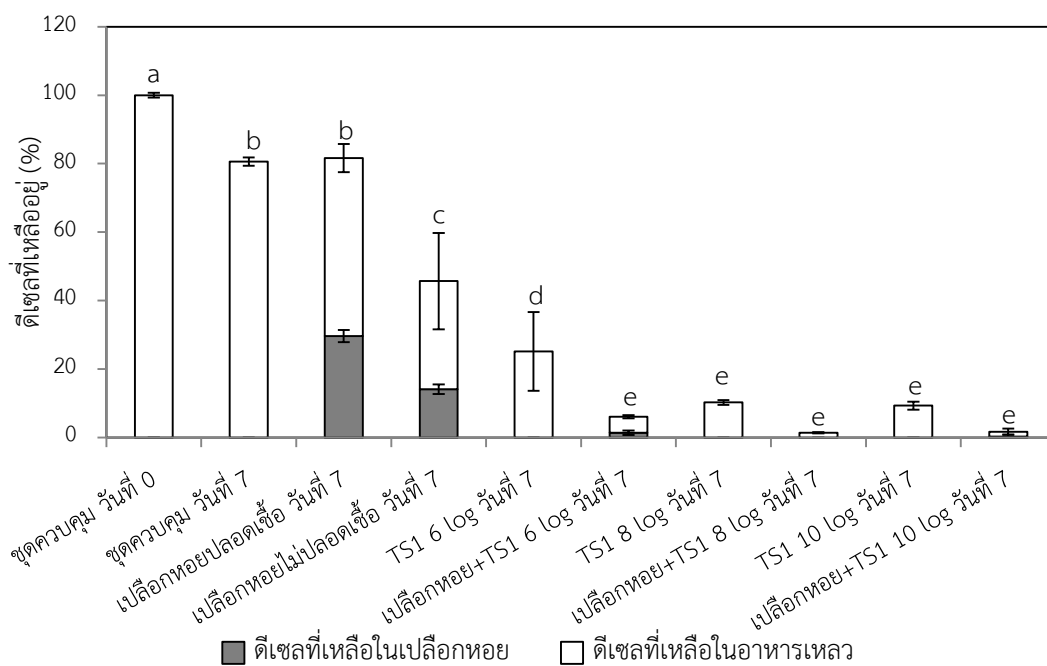
4.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเซลล์และความสามารถในการย่อยสลายดีเซล

4.5.1 จำนวนเซลล์ที่ใช้ในการตรึง

นำกลุ่มแบคทีเรีย TS1 มาตรึงบนเปลือกหอยขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร โดยใช้เซลล์จำนวน 6, 8 และ 10 log CFU/มล. จากนั้นนำมาทดสอบการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อบันทึกจำนวนแบคทีเรียและวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือ

จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ โดยให้ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 เท่ากับ 100% พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปดีเซลที่เหลืออยู่ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมวันที่ 0 (รูปที่ 4.21) โดยชุดควบคุมมีดีเซลที่เหลืออยู่ $80.64 \pm 1.21\%$ ในวันที่ 7 ในชุดการทดลองมีดีเซลที่เหลืออยู่ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของอาหารเหลวและเปลือกหอยสามารถดูดซับดีเซลบางส่วนได้หลังจากทดลอง 7 วัน เปลือกหอยปลอดเชื้อมีดีเซลเหลืออยู่ 81.66% ซึ่งในจำนวนนี้ดีเซลถูกดูดซับในเปลือกหอยประมาณ $29.59 \pm 1.78\%$ และดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวประมาณ $52.07 \pm 4.13\%$ ซึ่งชุดควบคุมและชุดเปลือกหอยปลอดเชื้อมีดีเซลลดลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อมีดีเซลเหลืออยู่ 45.67% ซึ่งในจำนวนนี้ดีเซลถูกดูดซับในเปลือกหอยประมาณ $14.12 \pm 1.38\%$ และดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวประมาณ $31.55 \pm 14.06\%$ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมและชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น่าจะเกิดจากแบคทีเรียที่ติดมากับเปลือกหอยตามธรรมชาติสามารถย่อยสลายดีเซลได้ และเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย TS1 อีสระความเข้มข้นเซลล์ 6, 8 และ 10 log CFU/มล. ลงไปในอาหารเหลวที่มีดีเซล เมื่อผ่านไป 7 วัน พบดีเซลที่เหลืออยู่ประมาณ 25.12±11.52%, 10.23±0.66% และ 9.30±1.17% ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอย พบว่าทุกชุดการทดลองมีดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวในปริมาณที่น้อยกว่ากลุ่มแบคทีเรียอิสระ โดยพบว่า เมื่อตรึงเซลล์ที่มีความเข้มข้น 6 log CFU/มล. สามารถลดปริมาณดีเซลจนเหลือ 6.08% ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $1.41 \pm 0.66\%$ และอยู่ในส่วนอาหารเหลว $4.67 \pm 0.47\%$ แต่เมื่อตรึงเซลล์ความเข้มข้น 8 log CFU/มล. สามารถลดปริมาณดีเซลจนเหลือ 1.40% และไม่มีดีเซลเหลือบนเปลือกหอย และเมื่อตรึงเซลล์ความเข้มข้น 10 log CFU/มล. สามารถลดปริมาณดีเซลจนเหลือ 1.70% ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $0.29 \pm 0.49\%$ และอยู่ในส่วนอาหารเหลว $1.41 \pm 0.90\%$ ทั้งชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรียอิสระและกลุ่มแบคทีเรียตรึงมีปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารน้อยกว่าชุดควบคุม ชุดการทดลองเปลือกหอยปลอดเชื้อ และเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียอิสระความเข้มข้นเซลล์ 8 และ 10 log CFU กับกลุ่มแบคทีเรียตรึงทุกความเข้มข้น

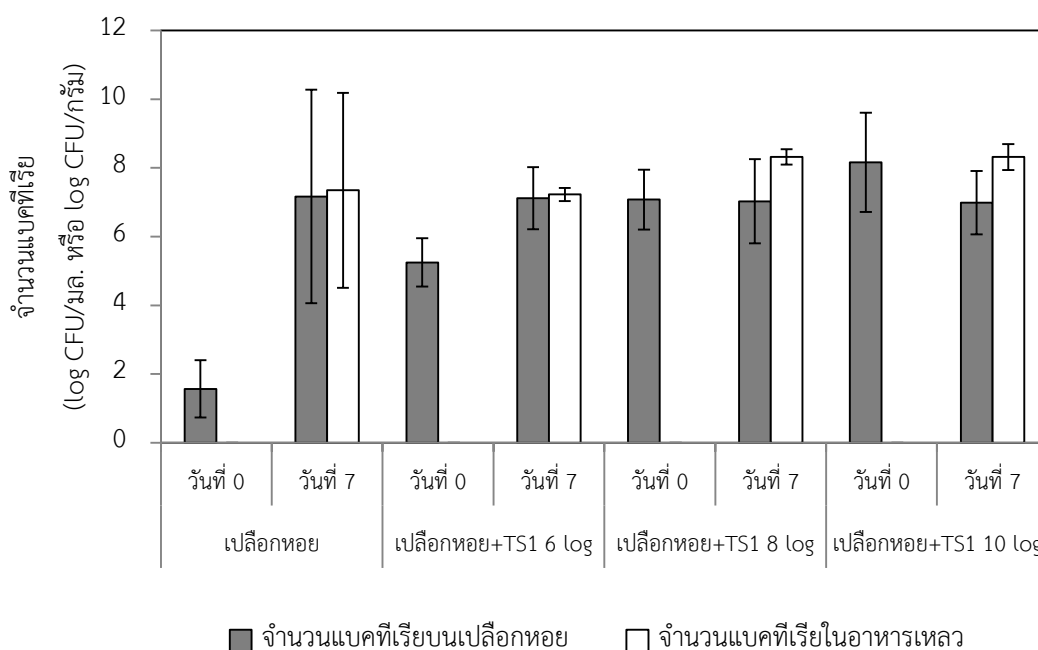
เซลล์ พบว่า มีดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นชุดการทดลองที่เหมาะสมกับการนำมาทดสอบขั้นตอนต่อไปคือ กลุ่มแบคทีเรียตรงที่ใช้เซลล์ ความเข้มข้น 6 log CFU ต่อเปลือกหอย 5 กรัม เพราะสามารถประหยัดเซลล์แต่ยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลไม่แตกต่างจากการใช้เซลล์ความเข้มข้นที่สูงกว่า



รูปที่ 4.21 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน โดยกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรงบนเปลือกหอยที่มีจำนวนเซลล์ 6, 8 และ 10 log CFU/มล.

จากการนับจำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 ของการทดลอง พบว่า หลังจากผ่านการทดสอบ 7 วัน แบคทีเรียในทุกชุดการทดลองมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในขณะที่ปริมาณดีเซลในอาหารเหลวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ในชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียตรงบนเปลือกหอย จะพบแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในอาหารเหลือซึ่งมีปริมาณมากกว่าแบคทีเรียที่เกาะบนเปลือกหอย (รูปที่ 4.22) สำหรับเปลือกหอยที่ตรงกลุ่มแบคทีเรียความเข้มข้น 6 และ 8 log CFU ต่อเปลือกหอย 5 กรัม จะพบแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นบนเปลือกหอยในวันที่ 7 จนมีจำนวนสูงสุดประมาณ 7 log CFU/กรัม และแบคทีเรียบางส่วนหลุดออกมาอยู่ในอาหารเหลือ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเซลล์มากขึ้นเป็น 10 log CFU ต่อเปลือกหอย 5 กรัม กลับพบว่า มีแบคทีเรียบนเปลือกหอยลดลงในวันที่ 7 จนเหลือเซลล์ประมาณ 7 log CFU/กรัม ซึ่งพบในปริมาณที่เท่ากับ

การตรึงเซลล์ความเข้มข้น 6 และ 8 log CFU ส่วนชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียอิสระ พบผลจำนวนเซลล์เช่นเดียวกับชุดกลุ่มแบคทีเรียตรึงคือ ชุดที่เพิ่มความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 6 และ 8 log CFU/มล. หลังจากผ่านไป 7 วัน พบว่า จำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลวเพิ่มมากขึ้น ประมาณ 9 log CFU/มล. แตกต่างจากชุดการทดลองที่เพิ่มความเข้มข้น 10 log CFU/มล. เมื่อผ่านไป 7 วันกลับพบว่า จำนวนแบคทีเรียในอาหารลดลงเหลือประมาณ 9 log CFU/มล.

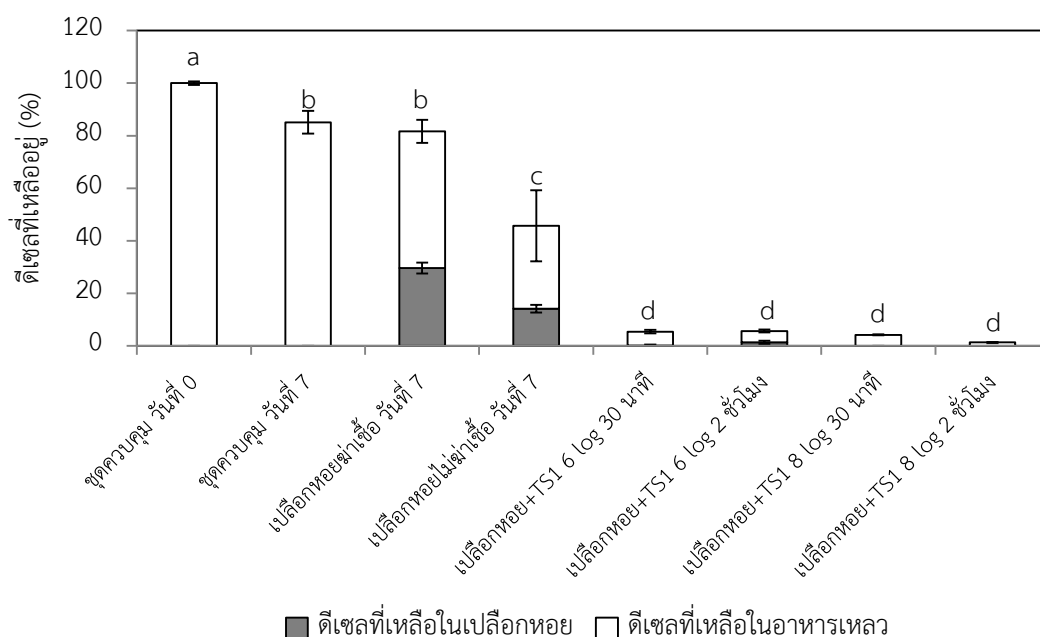


รูปที่ 4.22 จำนวนแบคทีเรียในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน โดยกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรึงบนเปลือกหอยที่มีจำนวนเซลล์ 6, 8 และ 10 log CFU/มล.

4.5.2 ผลของระยะเวลาในการตรึงเซลล์บนเปลือกหอย

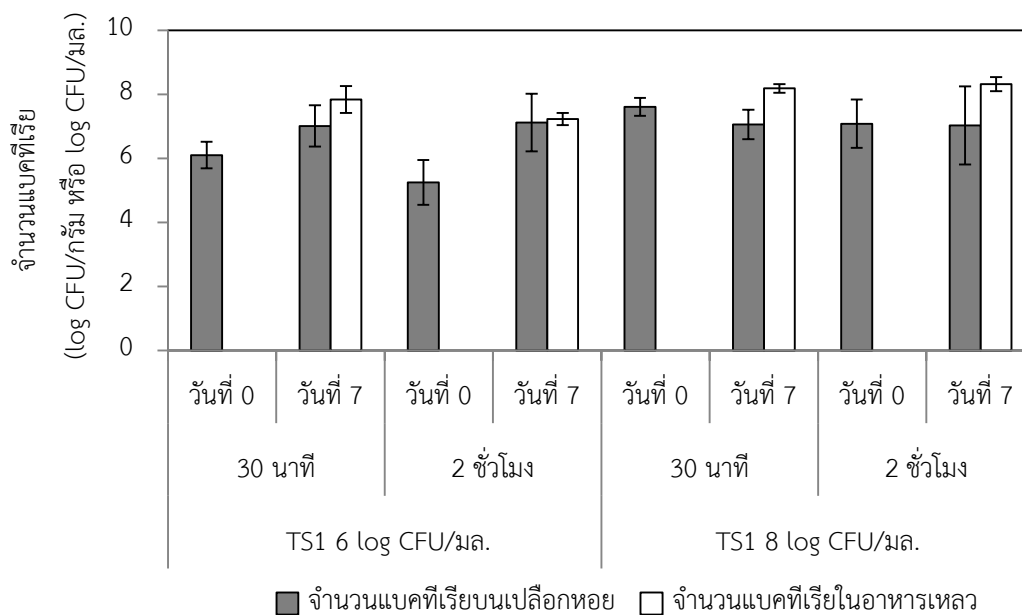
นำเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 6 log CFU/มล. และ 8 log CFU/มล. ตรึงบนเปลือกหอย แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดได้แก่ ชุดที่ 1 ใช้เวลาในการตรึง 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาไม่ชะแบคทีเรียส่วนเกิน และชุดที่ 2 ใช้เวลาในการตรึง 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาชะแบคทีเรียส่วนเกินด้วย 0.85% NaCl จากนั้นนำกลุ่มแบคทีเรียตรึงมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียและวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือ

จากการวิเคราะห์ที่เชื้อที่เหลือในอาหารโดยให้ปริมาณเชื้อที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 เท่ากับ 100% พบว่า ชุดกลุ่มแบคทีเรียที่เรียงให้ผลที่ดีกว่าชุดควบคุม (รูปที่ 4.23) โดยชุดควบคุมมีเชื้อที่เหลืออยู่ $85.09 \pm 4.31\%$ ชุดเปลือกหอยปลอดเชื้อมีเชื้อที่เหลืออยู่ 81.66% ซึ่งในจำนวนนี้เชื้อที่ถูกดูดซับในเปลือกหอยประมาณ $29.59 \pm 1.78\%$ และเชื้อที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวประมาณ $52.07 \pm 4.13\%$ ซึ่งชุดควบคุมและชุดเปลือกหอยปลอดเชื้อมีเชื้อลดลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อมีเชื้อที่เหลืออยู่ 45.67% ซึ่งในจำนวนนี้เชื้อที่ถูกดูดซับในเปลือกหอยประมาณ $14.12 \pm 1.38\%$ และเชื้อที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวประมาณ $31.55 \pm 14.06\%$ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมและชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชุดกลุ่มแบคทีเรียที่เรียงบนเปลือกหอยที่ใช้เซลล์เริ่มต้น $6 \log \text{ CFU/มล.}$ เป็นเวลา 30 นาทีและ 2 ชั่วโมง มีเชื้อที่เหลืออยู่ในอาหาร $5.25 \pm 0.62\%$ และ $4.67 \pm 0.47\%$ ตามลำดับ และชุดกลุ่มแบคทีเรียที่เรียงบนเปลือกหอยที่ใช้เซลล์เริ่มต้น $8 \log \text{ CFU/มล.}$ เป็นเวลา 30 นาทีและ 2 ชั่วโมง มีเชื้อที่เหลืออยู่ในอาหาร $4.19 \pm 0.15\%$ และ $1.40 \pm 0.19\%$ ตามลำดับ แตกต่างจากชุดของเปลือกหอยปลอดเชื้อเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่พบเชื้อที่เหลืออยู่ในอาหารเหลว $31.55 \pm 14.05\%$ และ $52.07 \pm 4.12\%$ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า การเรียงเซลล์ด้วยเซลล์ที่มีความเข้มข้น 6 หรือ $8 \log \text{ CFU/มล.}$ ที่เวลา 30 นาที หรือ 2 ชั่วโมง ให้ผลการย่อยสลายเชื้อที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการเลือกเรียงเซลล์ความเข้มข้น $6 \log \text{ CFU/มล.}$ ที่เวลา 30 นาที จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้งาน เนื่องจากประหยัดเซลล์เริ่มต้นลดเวลาในการเรียง และสามารถนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว



รูปที่ 4.23 ปริมาณดีเซลที่เหลือ ในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน ในอาหารเหลวที่ใช้กลุ่มแบคทีเรียตรงที่ใช้จำนวนเซลล์และระยะเวลาการตรึงต่าง ๆ

จากการนับจำนวนแบคทีเรียบนเปลือกหอยหลังตรึง (รูปที่ 4.24) ด้วยเซลล์ความเข้มข้น 6 และ 8 log CFU/มล. ที่เวลา 30 นาที พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียบนเปลือกหอย 6.10 ± 0.42 และ 7.61 ± 0.28 log CFU/กรัม ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการตรึงนานขึ้นเป็น 2 ชั่วโมงและชะแบคทีเรียที่ไม่เกาะวัสดุตรึงออกจะพบว่า มีแบคทีเรียประมาณ 5.25 ± 0.70 และ 7.08 ± 0.76 log CFU/กรัม ตามลำดับ แสดงว่า ภายในเวลา 30 นาที แบคทีเรียสามารถยึดเกาะและเจริญบนเปลือกหอย แต่เมื่อชะแบคทีเรียตัวที่ไม่เกาะจึงทำให้แบคทีเรียที่พบหลังจากตรึง 2 ชั่วโมงมีปริมาณน้อยกว่าที่เวลาตรึง 30 นาที และหลังจากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน พบว่า แบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นทั้งบนเปลือกหอยและมีแบคทีเรียส่วนใหญ่ในอาหารเหลว โดยแบคทีเรียที่พบบนเปลือกหอยมีจำนวนประมาณ 7 log CFU/กรัม แต่จำนวนแบคทีเรียที่พบในอาหารเหลวมีประมาณ 7-8 log CFU/มล.



รูปที่ 4.24 จำนวนแบคทีเรียในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดิเซลเป็นเวลา 7 วัน ในอาหารเหลวที่ใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงที่ใช้จำนวนเซลล์และระยะเวลาการตรึงต่าง ๆ

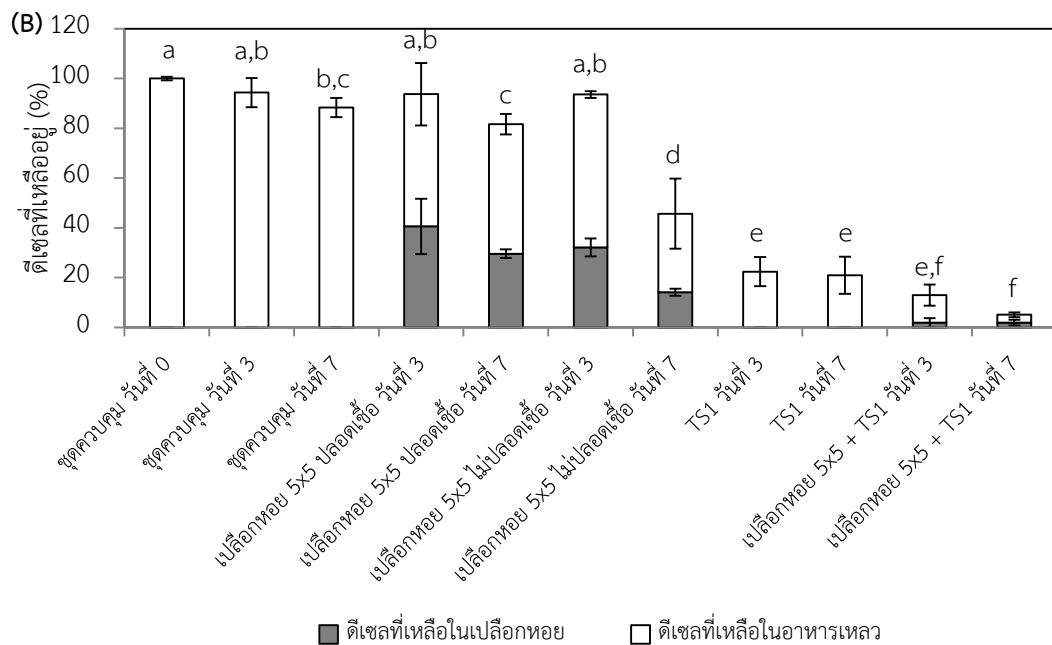
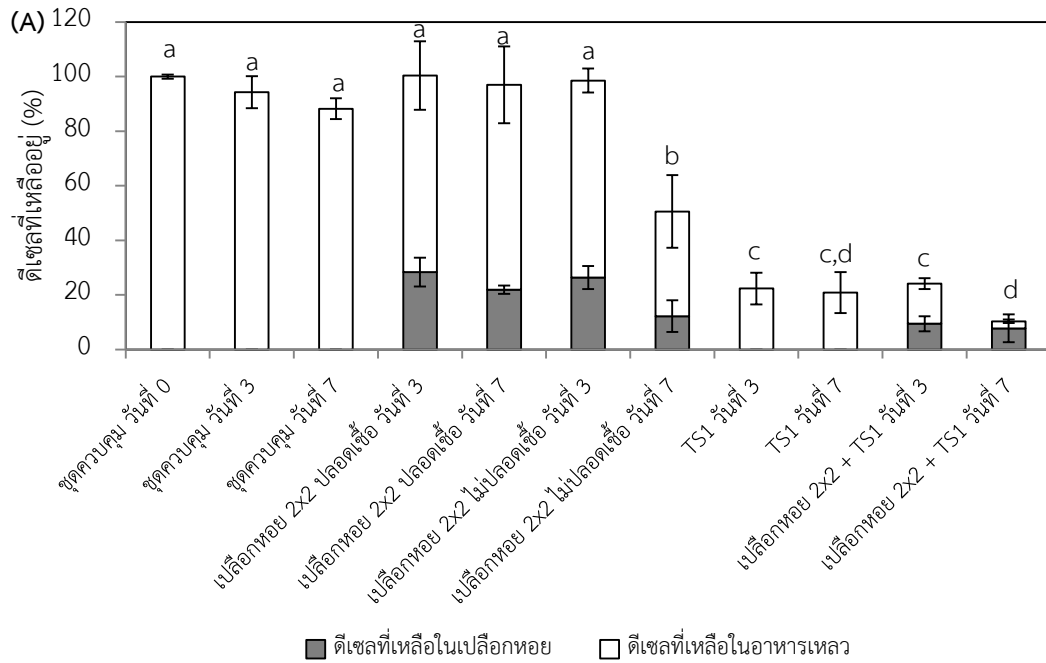
4.5.3 ขนาดของวัสดุตรึง

นำกลุ่มแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเซลล์ 6 log CFU/ml. มาตรึงบนเปลือกหอยขนาด 5x5 มิลลิเมตรและเปลือกหอยละเอียดขนาด 2x2 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาทดสอบการย่อยสลาย 1% ดิเซลในอาหารเหลว CFMM เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3 และ 7 เพื่อบันทึกจำนวนแบคทีเรียและวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือ

จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ โดยให้ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 เท่ากับ 100% จากผลการทดสอบด้วยเปลือกหอยละเอียด ดังแสดงในรูป 4.25 A พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปดีเซลที่เหลืออยู่ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมวันที่ 0 ชุดควบคุมที่มีเพียงอาหารเหลวกับดีเซลมีดีเซลเหลือ 94.30±5.82% และ 88.26±3.85% ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และชุดเปลือกหอยตลอดชีพดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองประมาณ 100% และ 97% ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย 28.38±5.24% และ 21.95±1.54% ตามลำดับ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว 72.01±12.5% และ 75.05±14.06% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดเปลือกหอยไม่ตลอดชีพดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองประมาณ 98.57% และ 50.56% ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย 26.37±4.23% และ 12.24±5.78%

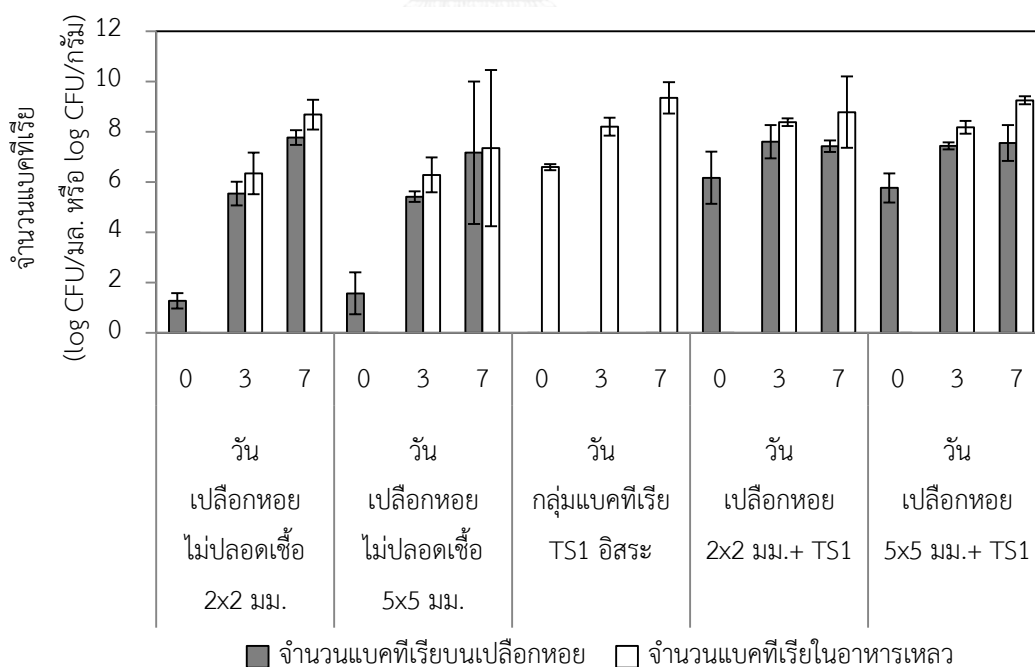
ตามลำดับ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $72.20 \pm 4.37\%$ และ $38.32 \pm 13.31\%$ ตามลำดับ ซึ่งดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 7 แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรียอิสระความเข้มข้น $6 \log$ CFU/มล. สามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือ $22.36 \pm 5.83\%$ และ $20.89 \pm 7.49\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมทั้ง 3 ชุดข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยละเอียดสามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือ 24.16% และ 10.36% ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $9.45 \pm 2.77\%$ และ $7.78 \pm 5.06\%$ ตามลำดับ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $14.71 \pm 1.98\%$ และ $2.58 \pm 0.67\%$ ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลจนมีปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารน้อยกว่าชุดควบคุมต่าง ๆ และกลุ่มแบคทีเรียอิสระภายใน 7 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ โดยให้ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 เท่ากับ 100% จากผลการทดสอบด้วยเปลือกหอยหยาบ ดังแสดงในรูป 4.25 B พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปดีเซลที่เหลืออยู่ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมวันที่ 0 ซึ่งชุดควบคุมมีดีเซลเหลือ $94.30 \pm 5.82\%$ และ $88.26 \pm 3.85\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และชุดเปลือกหอยปลอดเชื้อที่พบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 93.70% และ 81.66% ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $40.54 \pm 11.16\%$ และ $29.59 \pm 1.78\%$ ตามลำดับ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $53.16 \pm 12.54\%$ และ $52.07 \pm 4.12\%$ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อพบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 93.55% และ 45.67% ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $32.11 \pm 3.57\%$ และ $14.12 \pm 1.38\%$ ตามลำดับ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $61.44 \pm 1.38\%$ และ $31.55 \pm 14.05\%$ ตามลำดับ ซึ่งดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 7 แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรียอิสระความเข้มข้น $6 \log$ CFU/มล. สามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือ $22.36 \pm 5.83\%$ และ $20.89 \pm 7.49\%$ ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมทั้ง 3 ชุดข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยหยาบสามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือ 12.89% และ 5.04% ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอยประมาณ $1.91 \pm 1.82\%$ และ $1.93 \pm 1.15\%$ ตามลำดับ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $10.98 \pm 4.25\%$ และ $3.11 \pm 0.99\%$ ตามลำดับ กลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลจนมีปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารน้อยกว่าชุดควบคุมต่าง ๆ และกลุ่มแบคทีเรียอิสระภายใน 7 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นขนาดของวัสดุที่เหมาะสมกับการนำมาทดสอบขั้นต่อไปคือเปลือกหอยหยาบขนาด 5×5 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.25 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 และ 7 ในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซล โดยกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรึงบนเปลือกหอยขนาด 2x2 มิลลิเมตร (A) และ 5x5 มิลลิเมตร (B)

จากการนับจำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0, 3 และ 7 ของการทดลอง พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป แบคทีเรียในทุกชุดการทดลองมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น โดยทุกชุดการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุดในวันที่ 7 ในขณะที่ปริมาณดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวลดลง ในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรียตรงบนเปลือกหอยจะพบแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในอาหารเหลว ซึ่งมีปริมาณมากกว่าแบคทีเรียที่เกาะบนเปลือกหอย (รูปที่ 4.26) ทั้งในชุดการทดลองที่ใช้เปลือกหอยหยาบและเปลือกหอยละเอียด แนวโน้มจำนวนแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นบนเปลือกหอยในวันที่ 3 คือ มีจำนวนแบคทีเรียบนเปลือกหอยประมาณ 7.5 log CFU/กรัม และคงที่ประมาณ 7.5 log CFU/กรัม ในวันที่ 7 และพบแบคทีเรียบางส่วนหลุดออกมาอยู่ในอาหารเหลว ซึ่งมีปริมาณมากกว่าแบคทีเรียที่พบบนเปลือกหอย ส่วนชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียอิสระพบผลจำนวนเซลล์เช่นเดียวกับส่วนของอาหารเหลวของชุดกลุ่มแบคทีเรียตรงคือ ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 6.59 ± 0.12 log CFU/มล. แบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นเป็น 8.21 ± 0.35 log CFU/มล. ในวันที่ 3 และมากที่สุดคือ 9.35 ± 0.63 log CFU/มล. ในวันที่ 7 เช่นเดียวกับชุดควบคุมเปลือกหอยหยาบและเปลือกหอยละเอียดที่ไม่ปลอดเชื้อ พบแบคทีเรียที่สามารถย่อยดีเซลได้และพบจำนวนเซลล์ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปเหมือนชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียอิสระและกลุ่มแบคทีเรียตรง



รูปที่ 4.26 จำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 ในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลโดยกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรงบนเปลือกหอยขนาด 2x2 และ 5x5 มิลลิเมตร

4.5.4 ปริมาณดีเซล

นำเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 6 log CFU/มล. ตรึงบนเปลือกหอยขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร มาทดสอบการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 1%, 3% และ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเหลว CFMM ชุดควบคุมคือ ชุดอาหารเหลวที่เติมดีเซลเพียงอย่างเดียว ชุดที่มีเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อ และชุดที่มีเปลือกหอยปลอดเชื้อ เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียและวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือ

จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ โดยให้ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 เท่ากับ 100% พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ดีเซลที่เหลืออยู่ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมวันที่ 0 (รูปที่ 4.27) โดยพบดีเซลที่เหลืออยู่ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของอาหารเหลวและเปลือกหอยสามารถดูดซับดีเซลบางส่วนได้

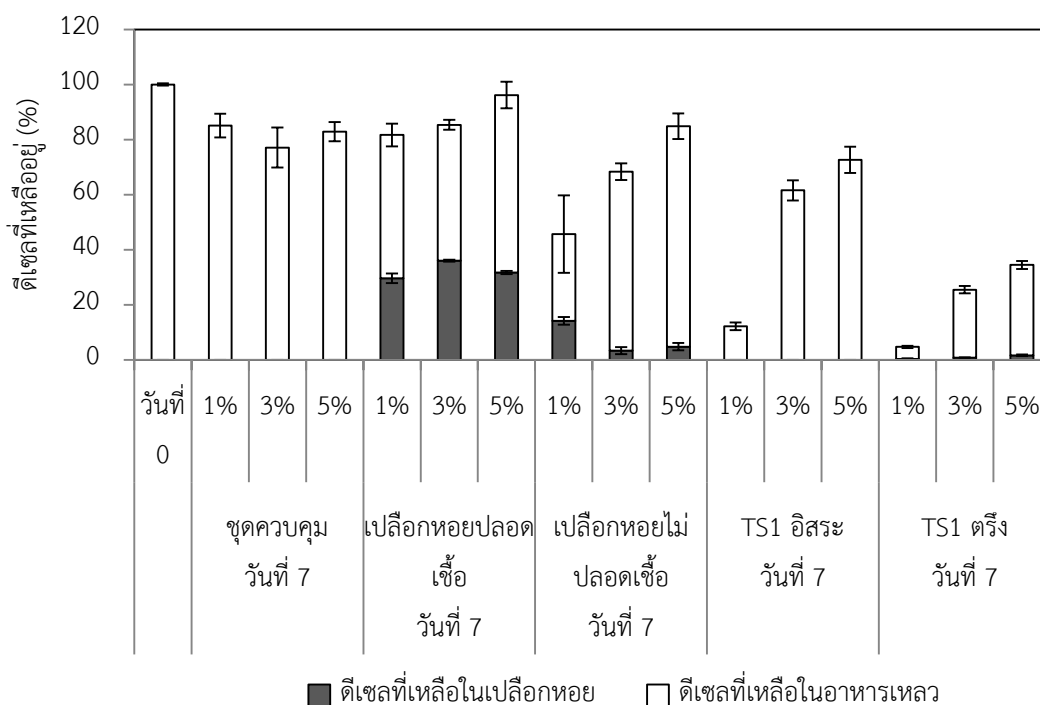
จากการทดลองการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 1% โดยปริมาตร พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปดีเซลที่เหลืออยู่ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมวันที่ 0 ชุดควบคุมที่มีเพียงอาหารเหลวกับดีเซล มีดีเซลเหลือ $85.09 \pm 4.31\%$ ในวันที่ 7 และชุดเปลือกหอยปลอดเชื้อที่พบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองประมาณ 81.66% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $29.59 \pm 1.78\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $52.07 \pm 4.12\%$ ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อที่พบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 45.67% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $14.12 \pm 1.38\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $31.55 \pm 14.05\%$ ซึ่งดีเซลที่เหลืออยู่แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรียอิสระความเข้มข้น 6 log CFU/มล. สามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือ $12.69 \pm 1.41\%$ ในวันที่ 7 ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมทั้ง 3 ชุดข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยสามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือ 5.68% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $0.29 \pm 0.26\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $4.39 \pm 0.41\%$ ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลจนมีปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารน้อยกว่าชุดควบคุมต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มแบคทีเรียอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดลองการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 3% โดยปริมาตร พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปดีเซลที่เหลืออยู่ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมวันที่ 0 ชุดควบคุมที่มีเพียงอาหารเหลวกับดีเซลมีดีเซลเหลือ $77.10 \pm 7.22\%$ ในวันที่ 7 และชุดเปลือกหอยปลอดเชื้อที่พบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 85.36% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $35.99 \pm 0.40\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $49.37 \pm 1.83\%$ ซึ่งแตกต่างจาก

ชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อที่พบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 68.30% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $3.30 \pm 1.26\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $65.00 \pm 2.99\%$ ซึ่งดีเซลที่เหลืออยู่แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรียอิสระความเข้มข้น $6 \log$ CFU/มล. สามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือ $61.55 \pm 3.64\%$ ในวันที่ 7 ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมทั้ง 3 ชุดข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยสามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือ 25.45% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $0.78 \pm 0.13\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $24.67 \pm 1.34\%$ ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลจนมีปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารน้อยกว่าชุดควบคุมต่าง ๆ และกลุ่มแบคทีเรียอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดลองการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปดีเซลที่เหลืออยู่ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมวันที่ 0 ชุดควบคุมที่มีเพียงอาหารเหลวกับดีเซลมีดีเซลเหลือ $82.83 \pm 3.47\%$ ในวันที่ 7 และชุดเปลือกหอยปลอดเชื้อที่พบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 96.17% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $31.70 \pm 0.59\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $64.47 \pm 4.79\%$ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมวันที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมวันที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อพบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 84.83% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $4.77 \pm 1.37\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $80.06 \pm 4.66\%$ ซึ่งดีเซลที่เหลืออยู่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างจากชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรียอิสระความเข้มข้น $6 \log$ CFU/มล. สามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือ $72.61 \pm 4.74\%$ ในวันที่ 7 ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมทั้ง 3 ชุดข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยสามารถย่อยสลายดีเซลได้จนเหลือ 34.45% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $1.64 \pm 0.34\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $32.81 \pm 1.47\%$ ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลจนมีปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารน้อยกว่าชุดควบคุมต่าง ๆ และกลุ่มแบคทีเรียอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

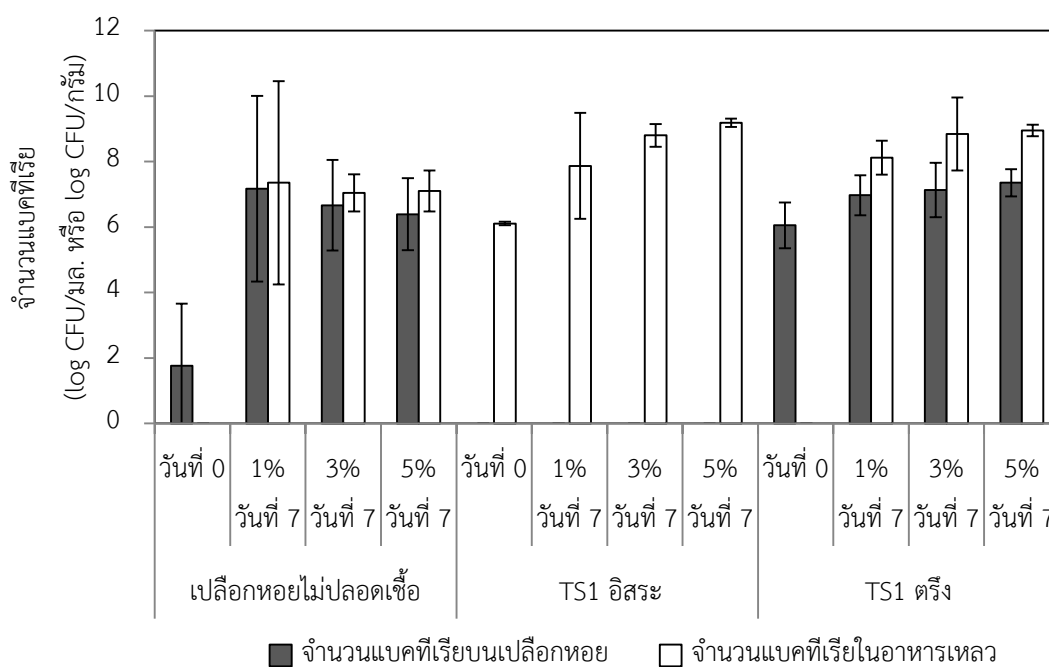
จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของดีเซล กลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนเปลือกหอยสามารถย่อยสลายดีเซลได้อย่างรวดเร็วภายใน 7 วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียอิสระและเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อ แสดงให้เห็นว่า การตรึงเซลล์ทำให้แบคทีเรียทนต่อดีเซลความเข้มข้นสูงได้มากขึ้นและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4.27 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 และ 7 ของชุดควบคุมและกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ที่ตรึงบนเปลือกหอย ในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1%, 3% และ 5% ดีเซล

จากการนับจำนวนแบคทีเรียของทุกชุดการทดลองทั้งชุดเปลือกหอยไม่ปลอດเชื้อและชุดที่มีกลุ่มแบคทีเรีย TS1 พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ในอาหารเหลวที่มีดีเซลความเข้มข้นต่าง ๆ กลุ่มแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้น ในขณะที่ดีเซลที่คงเหลือในอาหารมีปริมาณลดลง (รูปที่ 4.28) โดยพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นดีเซลในชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียอิสระ กลุ่มแบคทีเรียก็ยิ่งเพิ่มจำนวนมากขึ้นจากวันที่ 0 ที่มีจำนวนแบคทีเรีย 6.11 ± 0.05 log CFU/มล. เมื่อผ่านไป 7 วัน พบจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 7.87 ± 1.62 , 8.80 ± 0.34 และ 9.19 ± 0.12 log CFU/มล. ในอาหารเหลวที่มีดีเซลความเข้มข้น 1%, 3% และ 5% ตามลำดับ เช่นเดียวกับชุดการทดลองเปลือกหอยตรึงกลุ่มแบคทีเรียที่พบจำนวนแบคทีเรียในส่วนอาหารเหลวมีปริมาณมากกว่าจำนวนแบคทีเรียที่พบบนเปลือกหอย โดยเมื่อผ่านไป 7 วัน พบกลุ่มแบคทีเรียในอาหารเหลวประมาณ 8.12 ± 0.52 , 8.85 ± 1.11 และ 8.95 ± 0.18 log CFU/มล. จะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของดีเซล ก็จะพบจำนวนแบคทีเรียในส่วนอาหารเหลวมากขึ้น แตกต่างจากจำนวนแบคทีเรียที่พบบนเปลือกหอยซึ่งมีจำนวนที่เท่ากัน ในอาหารเหลวที่มีดีเซลความเข้มข้นต่าง ๆ โดยพบจำนวนแบคทีเรียบนเปลือกหอยประมาณ 7 log CFU/กรัม ชุดการทดลองเปลือกหอยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีจำนวนแบคทีเรียที่พบ

บนเปลือกหอยลดลง เมื่อความเข้มข้นของดีเซลในอาหารมากขึ้น โดยพบว่า วันที่ 0 มีแบคทีเรียบนเปลือกหอยประมาณ 1.77 ± 1.89 log CFU/กรัม เมื่อผ่านไป 7 วัน พบจำนวนแบคทีเรียบนเปลือกหอย 7.17 ± 2.83 , 6.67 ± 1.39 และ 6.39 ± 1.10 log CFU/กรัม ในอาหารเหลวที่มีดีเซลความเข้มข้น 1%, 3% และ 5% โดยปริมาตร ตามลำดับ

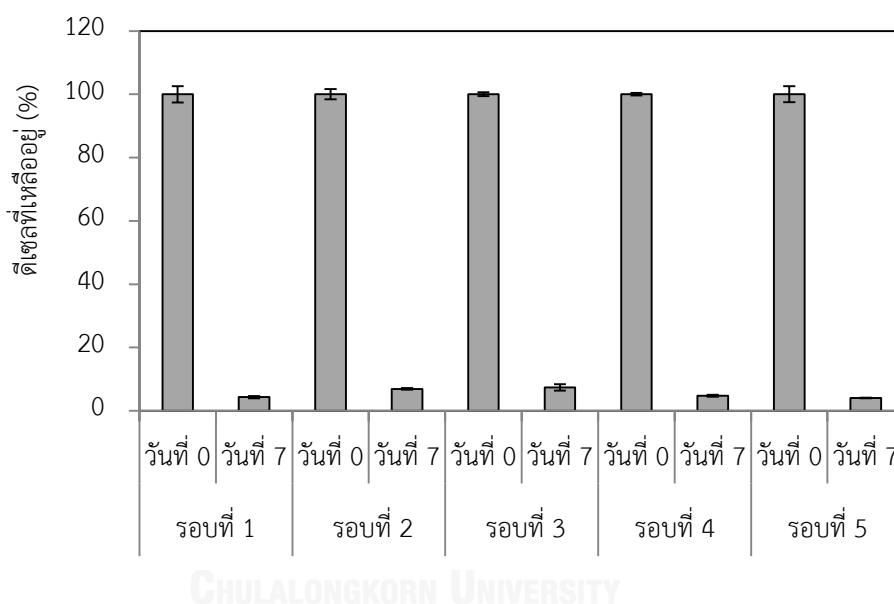


รูปที่ 4.28 จำนวนแบคทีเรียในการทดสอบการย่อยสลาย 1%, 3% และ 5% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM เป็นเวลา 7 วัน

4.5.5 การใช้ซ้ำกลุ่มแบคทีเรียตรง

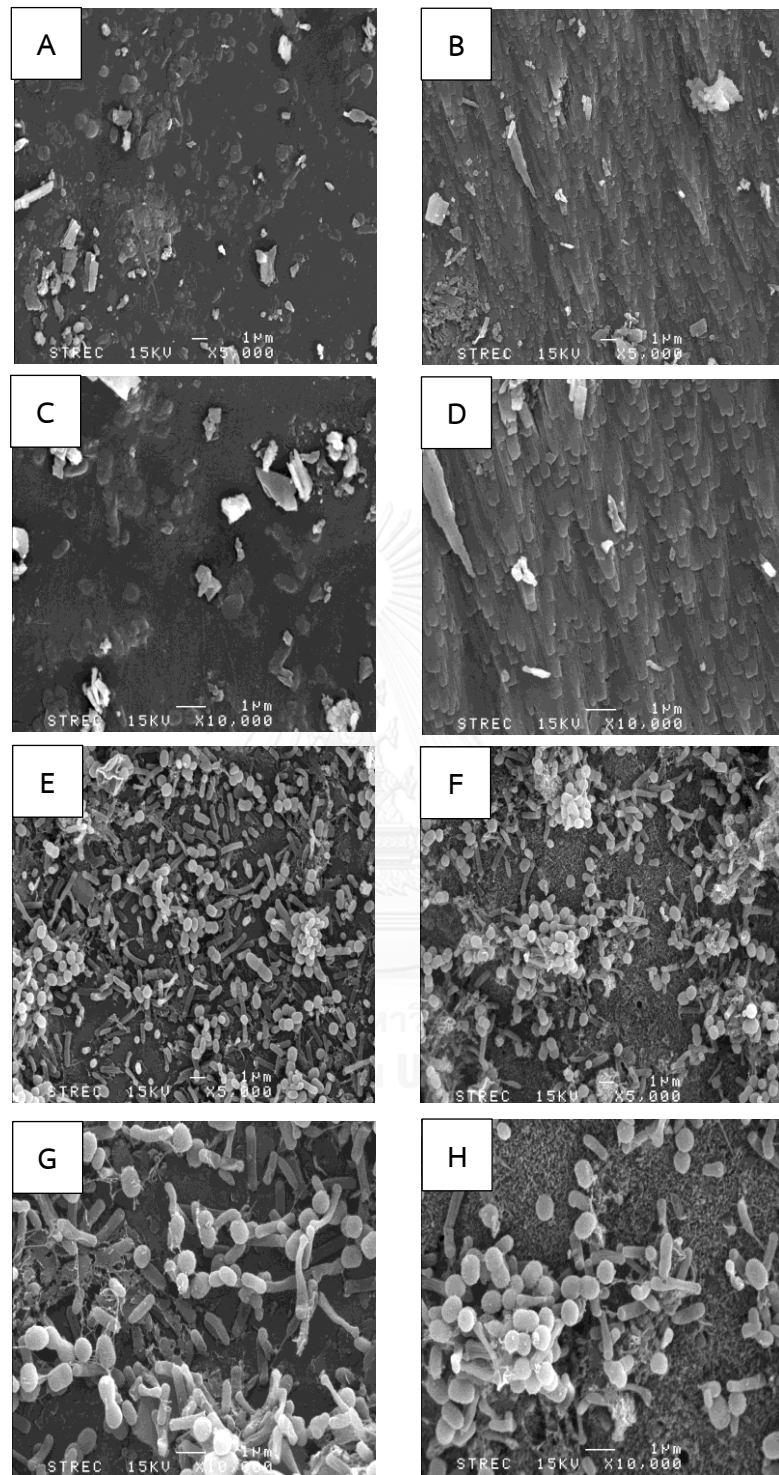
ทดสอบการใช้ซ้ำโดยนำเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 6 log CFU/ml. ตรงบนเปลือกหอยขนาดประมาณ 5×5 มิลลิเมตร มาทดสอบการใช้ซ้ำ 5 รอบ รอบละ 7 วัน เมื่อครบเวลา 7 วัน นำแบคทีเรียที่ตรงบนเปลือกหอยถ่ายใส่หลอดทดลองใหม่ที่มีอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และดีเซลความเข้มข้น 1% โดยปริมาตร ทำเช่นนี้จนครบ 5 รอบ เก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนแบคทีเรียและวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือ

จากการนับจำนวนแบคทีเรียที่ตรงบนเปลือกหอยในวันที่ 0 และจำนวนแบคทีเรียที่พบในอาหารเหลวทุก 7 วัน จำนวน 5 รอบ พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปทุก 7 วัน ดิเซลลดลงจนเหลืออยู่ในช่วง 4-7% (รูปที่ 4.29) และหลังจากการตรึงแบคทีเรียบนเปลือกหอยผ่านไป 2 ชั่วโมงนับเป็นวันที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียบนเปลือกหอยประมาณ 6.05 ± 0.70 log CFU/กรัม เมื่อผ่านไปทุก ๆ 7 วัน พบแบคทีเรียในอาหารเหลวเพิ่มมากขึ้นโดยอยู่ในช่วง 8.5-9 log CFU/มล. และเมื่อผ่านการใช้งาน 5 รอบ มีจำนวนแบคทีเรียบนเปลือกหอยประมาณ 6.48 log CFU/กรัม แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรียที่ตรงบนเปลือกหอยยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดิเซลได้ดีเมื่อผ่านการใช้ซ้ำ 5 รอบ



รูปที่ 4.29 ปริมาณดิเซลที่เหลืออยู่ในการทดสอบการใช้ซ้ำกลุ่มแบคทีเรียตรึงเพื่อย่อยสลาย 1% ดิเซลในอาหารเหลวจำนวน 5 รอบ

จากการตรวจสอบลักษณะเปลือกหอยตรึงกลุ่มแบคทีเรียหลังจากผ่านการใช้ซ้ำเป็นเวลา 35 วัน ได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิววัสดุเปรียบเทียบกับลักษณะของเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อวันที่ 0 พบว่า หลังจากผ่านการใช้ซ้ำเป็นเวลา 35 วัน มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิวของเปลือกหอย จะสังเกตเห็นว่า ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของวันที่ 35 (รูปที่ 4.30 E,G) ไม่แตกต่างจากลักษณะพื้นผิวด้านนอกของวันที่ 0 (รูปที่ 4.30 A,C) แต่ลักษณะพื้นผิวด้านในของวันที่ 35 (รูปที่ 4.30 F,H) มีลักษณะขรุขระคล้ายหนามมากกว่าวันที่ 0 (รูปที่ 4.30 B,D)



รูปที่ 4.30 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) ที่กำลังขยาย 5,000 และ 10,000 เท่า แสดงลักษณะพื้นผิวด้านนอก (A,C) และด้านใน (B,D) เปรียบเทียบกับลักษณะพื้นผิวด้านนอก (E,G) และด้านใน (F,H) ของเปลือกหอยหลังจากผ่านการใช้งานต่อเนื่อง 35 วัน

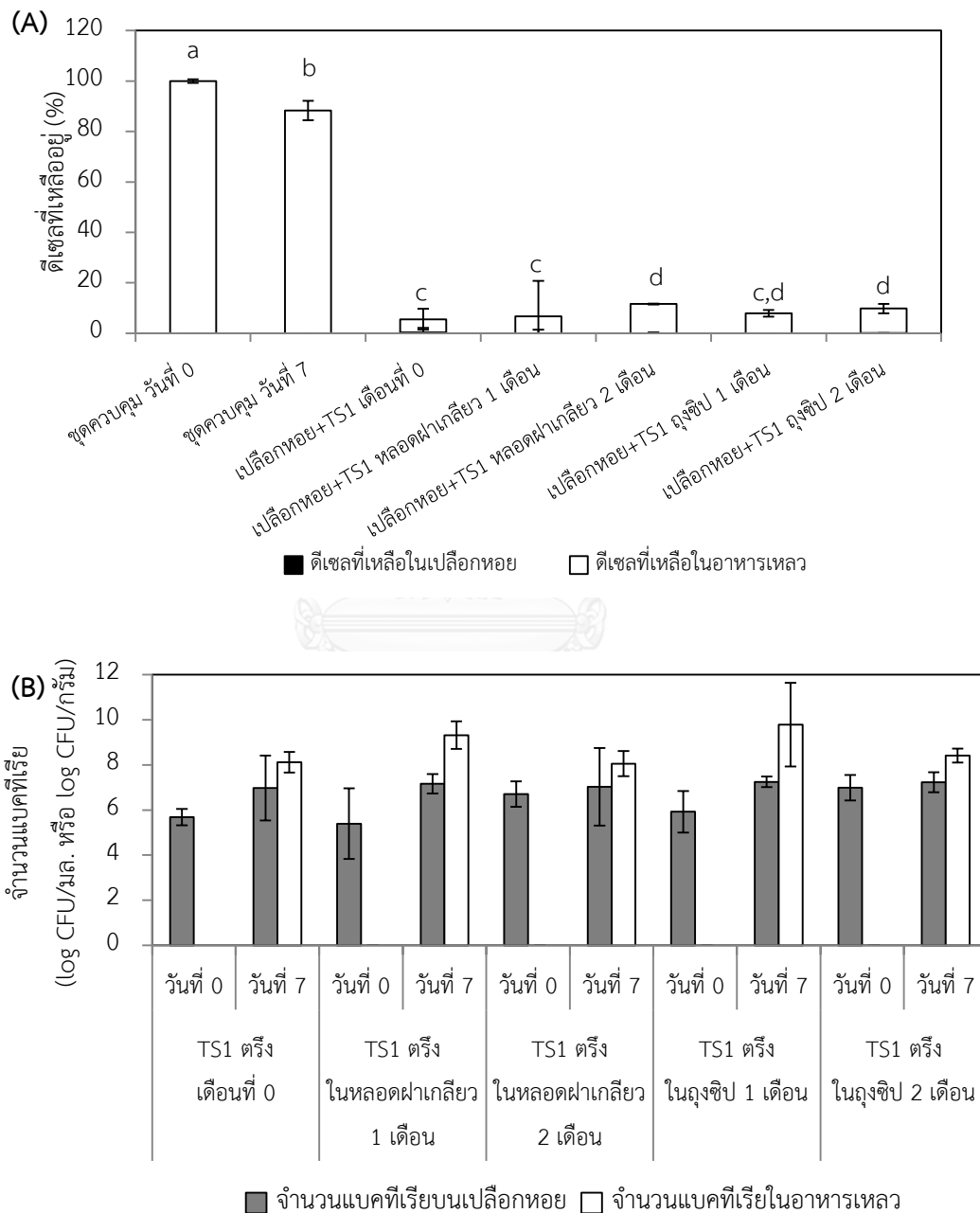
4.5.6 ระยะเวลาในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียตรึง

นำเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น $6 \log \text{CFU/มล.}$ ตีรึงบนเปลือกหอยขนาดประมาณ 5×5 มิลลิเมตร จากนั้นแบ่งการเก็บรักษาเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 เก็บรักษาในหลอดฝาเกลียวขนาด 22 มิลลิตร จำนวน 12 หลอด และกลุ่มที่ 2 เก็บรักษาในถุงซิปล็อคพลาสติกขนาด 6×8 เซนติเมตร เก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือนและ 2 เดือน เมื่อครบกำหนดเวลานำกลุ่มแบคทีเรียตรึงมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 10 มิลลิตร เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียและวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียหลังตรึงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากการวิเคราะห์ดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหาร โดยให้ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 เท่ากับ 100% พบว่า ชุดการทดสอบทุกชุดมีดีเซลที่เหลืออยู่น้อยกว่าชุดควบคุม (รูปที่ 4.31 A) หลังจากผ่านไป 7 วัน ชุดของกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยเดือนที่ 0 มีดีเซลเหลืออยู่ $5.22 \pm 0.20\%$ และชุดของกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยที่เก็บรักษาในหลอดฝาเกลียวและถุงซิปล็อคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผ่านไป 1 เดือน มีดีเซลเหลืออยู่ $6.76 \pm 1.34\%$ และ $7.96 \pm 4.12\%$ ตามลำดับ ซึ่งชุดการทดลองทั้ง 3 ชุดข้างต้นให้ผลในการย่อยสลายดีเซลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ชุดของกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยที่เก็บรักษาในหลอดฝาเกลียวและถุงซิปล็อคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผ่านไป 2 เดือน มีดีเซลเหลืออยู่ $11.60 \pm 1.88\%$ และ $9.73 \pm 0.96\%$ ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองหลังจากเก็บรักษา 2 เดือนแตกต่างจากชุดของกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยเดือนที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยในถุงซิปล็อคเป็นเวลา 1 และ 2 เดือนให้ผลการย่อยสลายดีเซลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า การเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียตรึงในถุงซิปล็อคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 เดือน ยังคงรักษาให้เซลล์มีชีวิตรอด และยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซล อีกทั้งประหยัดพื้นที่ในการเก็บรักษาด้วย

จากการนับจำนวนแบคทีเรียของทุกชุดการทดลอง พบว่า กลุ่มแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นในวันที่ 7 ในขณะที่ดีเซลที่คงเหลือในอาหารมีปริมาณลดลง (รูปที่ 4.31 B) โดยชุดของเปลือกหอยที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรียวันที่ 0 มีแบคทีเรียจำนวน $5.68 \pm 0.36 \log \text{CFU/กรัม}$ เมื่อนำไปเก็บรักษาในหลอดฝาเกลียวและถุงซิปล็อคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผ่านไป 1 เดือนมีจำนวนแบคทีเรีย 5.39 ± 1.57 และ $5.92 \pm 0.92 \log \text{CFU/กรัม}$ ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียใกล้เคียงกับวันที่ 0 แต่เมื่อการเก็บรักษาผ่านไป 2 เดือน พบว่า แบคทีเรียตรึงที่เก็บรักษาในหลอดฝาเกลียวและถุงซิปล็อคมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเป็น 6.70 ± 0.56 และ $6.99 \pm 0.56 \log \text{CFU/กรัม}$ ตามลำดับ แสดงว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ช่วยชะลอการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย หลังจากนำ

กลุ่มแบคทีเรียที่ตรงบนเปลือกหอยไปทดสอบการย่อยสลาย 1% ดีเซล พบว่า แบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นบนเปลือกหอยในทุกชุดการทดลองเมื่อผ่านไป 7 วัน โดยมีจำนวนแบคทีเรียอยู่ในช่วง 7-7.25 log CFU/กรัม และพบแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในอาหารเหลวอีกประมาณ 8-9.8 log CFU/มล.



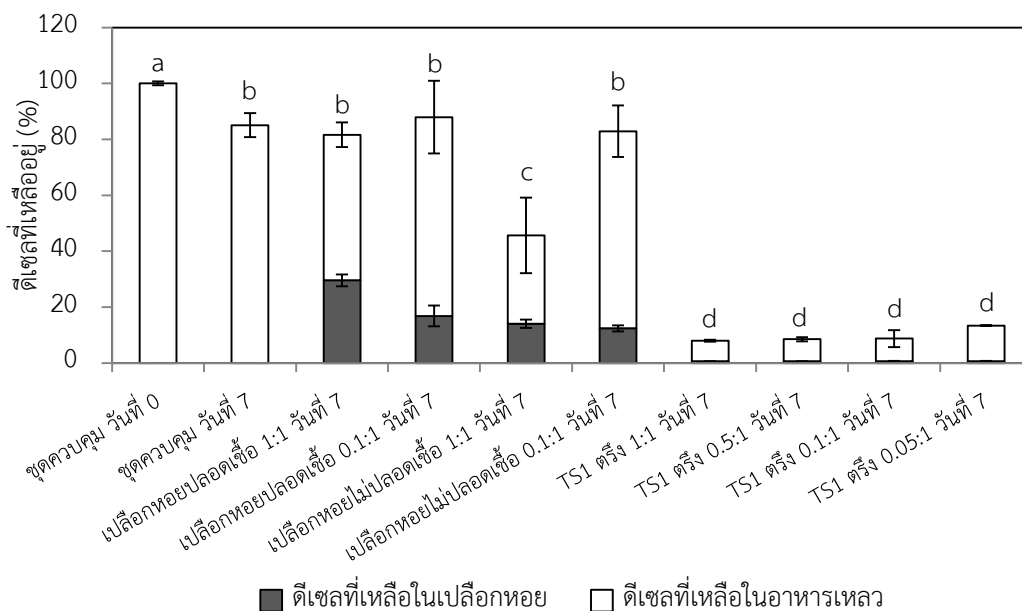
รูปที่ 4.31 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ (A) และจำนวนแบคทีเรีย (B) ในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ในอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้กลุ่มแบคทีเรียตรงที่เก็บรักษาในลักษณะต่าง ๆ

4.5.7 อัตราส่วนของแบคทีเรียตรงกับปริมาณอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ

ใช้เซลล์ที่มีจำนวนเริ่มต้น 6 log CFU/มล. ตรึงบนเปลือกหอยขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด โดยแปรผันจำนวนแบคทีเรียตรงที่ใช้ (กรัม) ต่อปริมาณอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบการย่อยสลาย (มล.) ดังนี้ 1 : 1, 0.5 : 1, 0.1 : 1 และ 0.05 : 1 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 1% ดีเซล เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียและวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือ

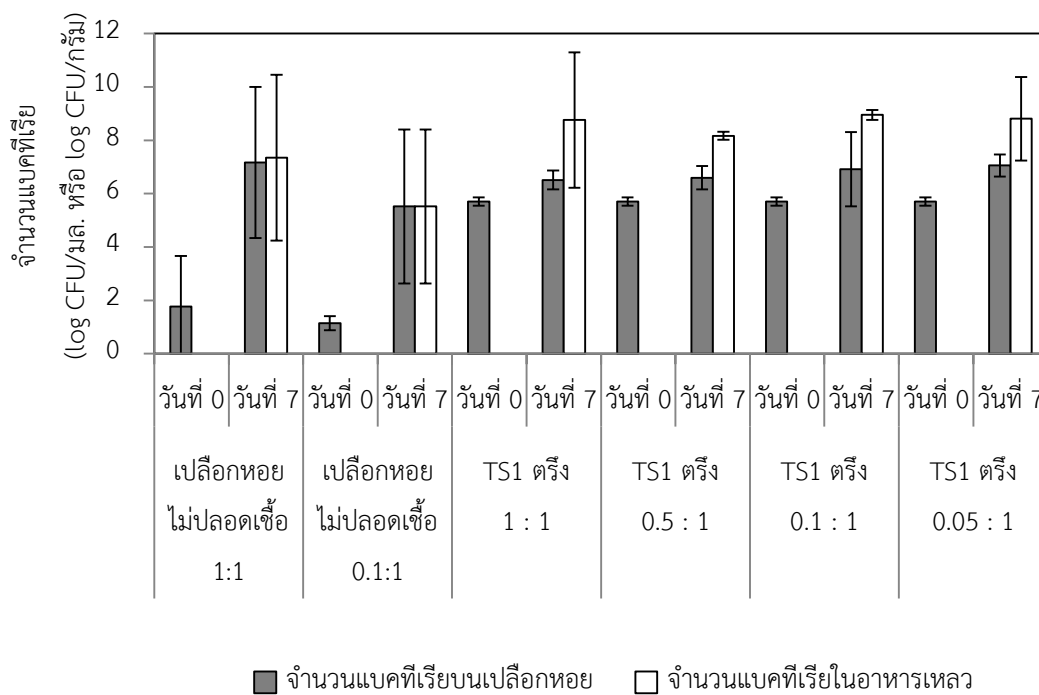
จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหาร โดยให้ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่วันที่ 0 เท่ากับ 100% พบว่า ทุกชุดการทดลองมีปริมาณดีเซลที่เหลือน้อยกว่าชุดควบคุมหลังจากบ่ม 7 วัน (รูปที่ 4.32) ชุดควบคุมมีดีเซลเหลือในอาหารเหลว $85.09 \pm 4.31\%$ ในวันที่ 7 และชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออัตราส่วน 1:1 พบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 81.66% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $29.59 \pm 1.78\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $52.07 \pm 4.12\%$ ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออัตราส่วน 0.1:1 พบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 87.96% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $16.83 \pm 3.73\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $71.13 \pm 13.05\%$ ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้ออัตราส่วน 1:1 พบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 45.67% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $14.12 \pm 1.38\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $31.55 \pm 14.05\%$ ซึ่งดีเซลที่เหลืออยู่แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้ออัตราส่วน 0.1:1 พบดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลอง 82.92% ในวันที่ 7 ซึ่งในจำนวนนี้ถูกดูดซับในเปลือกหอย $12.44 \pm 1.11\%$ และเหลืออยู่ในอาหารเหลว $70.48 \pm 9.20\%$ ซึ่งดีเซลที่เหลืออยู่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดเปลือกหอยปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ชุดอัตราส่วนแบคทีเรียตรงต่ออาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ 1 : 1, 0.5 : 1, 0.1 : 1 และ 0.05 : 1 มีดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหาร $7.33 \pm 0.33\%$, $7.87 \pm 0.73\%$, $8.12 \pm 3.02\%$ และ $12.74 \pm 0.07\%$ ตามลำดับ และพบดีเซลที่เหลืออยู่ในเปลือกหอยในปริมาณน้อยกว่า 1% ซึ่งปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดกลุ่มแบคทีเรียตรงต่อปริมาณอาหารเหลวทุกอัตราส่วนมีปริมาณน้อยกว่าชุดควบคุมชุดเปลือกหอยปลอดเชื้อ และชุดเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

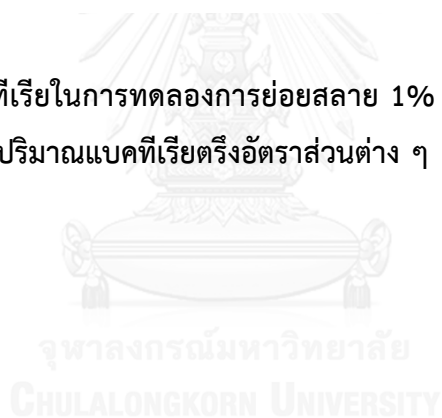


รูปที่ 4.32 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในวันที่ 0 และ 7 ของเปลือกหอยที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย TS1 โดยแปรผันอัตราส่วนของเปลือกหอยกับอาหารเหลว 1:1, 0.5:1, 0.1:1 และ 0.05:1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มี 1% ดีเซล

จากการนับจำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 และ 7 ของชุดการทดลองเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อ และกลุ่มแบคทีเรียตรง พบว่า จำนวนแบคทีเรียในทุกชุดการทดลองเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 7 ในขณะที่ดีเซลที่เหลืออยู่ในอาหารลดลง (รูปที่ 4.33) โดยชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียที่ตรงบนเปลือกหอยเริ่มต้นวันที่ 0 มีจำนวน 5.70 ± 0.16 log CFU/กรัม เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ในชุดการทดลองที่ใช้อัตราส่วนเปลือกหอยตรงต่อปริมาณอาหารเหลว 1 : 1, 0.5 : 1, 0.1 : 1 และ 0.05 : 1 มีจำนวนแบคทีเรียบนเปลือกหอยในปริมาณที่เท่ากันประมาณ 7 log CFU/กรัม และพบจำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลวอยู่ในช่วง 8-9 log CFU/มล. แตกต่างจากชุดเปลือกหอยไม่ปลอดเชื้อ โดยชุดเปลือกหอยอัตราส่วน 0.1:1 และ 1:1 ในวันที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรีย 1.15 ± 0.26 และ 1.77 ± 1.89 log CFU/กรัม ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไปทั้งสองชุดการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นบนเปลือกหอยเป็น 5.52 ± 2.89 และ 7.17 ± 2.84 log CFU/กรัม ตามลำดับ



รูปที่ 4.33 จำนวนแบคทีเรียในการทดลองการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน ในอาหารเหลว โดยใช้ปริมาณแบคทีเรียตรงอัตราส่วนต่าง ๆ



บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

กลุ่มแบคทีเรียมีความสามารถย่อยสลายสารพิษ มักจะแยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารพิษนั้น (Kostka และคณะ, 2011) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากรากพืชน้ำในบริเวณที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนดีเซล เนื่องจากมีรายงานว่าแบคทีเรียเป็นประชากรส่วนใหญ่ของจุลินทรีย์ที่พบในรากพืชน้ำ และพบราและยีสต์ปริมาณเล็กน้อย (Loan และคณะ, 2014) เก็บตัวอย่างรากพืชน้ำ ได้แก่ ผักตบชวาและผักบุ้ง จากแหล่งน้ำที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนดีเซล ในจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสงครามและปราจีนบุรี ซึ่งเป็นลักษณะแหล่งน้ำที่เป็นเส้นทางสัญจรของเรือยนต์ เรือข้ามฟาก หรือเรือขนส่งสินค้าต่าง ๆ จากตัวอย่างรากพืชน้ำทั้ง 3 ตัวอย่างสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียได้ 3 กลุ่ม คือ TS1 TS2 และ TS3 เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซล พบว่า กลุ่มแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้จนเหลือน้อยกว่า 35% ใน 7 วัน โดยกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ที่คัดแยกจากรากผักตบชวาสามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุดคือ $84.78 \pm 3.09\%$ รองลงมาคือ กลุ่มแบคทีเรีย TS2 และ TS3 ที่ย่อยสลายดีเซลได้ $78.01 \pm 7.94\%$ และ $67.01 \pm 4.48\%$ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมที่มีเพียงอาหารเหลวและดีเซลอย่างมีนัยสำคัญ ที่มีดีเซลเหลืออยู่มากถึง $92.47 \pm 0.75\%$ ดีเซลที่ลดลงอาจเกิดจากการระเหยหรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแสงได้ (Agamuthu และ Darasnia, 2013) ดังนั้นแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มสามารถใช้ดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญและย่อยสลายดีเซลไปพร้อมกันได้ (Maliji และคณะ, 2013) และเลือกกลุ่มแบคทีเรีย TS1 มาทำการทดสอบขั้นต่อไป เนื่องจากสามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุด

จากการตรวจสอบเค้าโครงการย่อยสลาย 1% ดีเซลของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 เทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่คัดแยกโดยสุรสาสินี จิตติมณี ซึ่งสามารถย่อยสลายดีเซลได้ พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย TS1 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ $92.93 \pm 0.95\%$ ภายใน 7 วัน มากกว่ากลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่ย่อยสลายได้ $88.39 \pm 1.61\%$ ซึ่งดีกว่ากลุ่มแบคทีเรียอื่นเช่น แบคทีเรีย J4AJ และ U-3 ที่คัดแยกจากรากและลำต้นของพืชน้ำชนิดหนึ่งที่มีลักษณะคล้ายหญ้า (*Scirpus triqueter*) พบว่า สามารถย่อยสลาย 0.75% ดีเซล ได้เพียง 59.65% ภายใน 7 วัน (Zhang และคณะ, 2014) หรือกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนหรือกลุ่มแบคทีเรีย ENZ-G1 และ ENZ-G2 ที่สามารถย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรในอาหารเหลว minimum mineral medium ได้ $90.8 \pm 1.2\%$ และ $89.4 \pm 0.1\%$ ตามลำดับ ภายใน 10 วัน (Zanaroli และคณะ, 2010)

เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลุ่มแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA และเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย TS1 ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ในเวลา 7 วัน ดังนี้

แบคทีเรียไอโซเลต 1 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุด $77.49 \pm 0.43\%$ เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA พบว่า มีความคล้ายเหมือนมากที่สุดกับ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SJTD-1 accession no. CP015877.1 เท่ากับ 100% ซึ่ง *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดหนึ่งที่เรียกว่า แรมโนลิพิด (rhamnolipid) ซึ่งมี 2 ชนิด ได้แก่ มอนอแรมโนลิพิด (mono-rhamnolipid) และไดแรมโนลิพิด (di-rhamnolipid) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเหล่านี้จะนำมาใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและการบำบัดทางชีวภาพ (Leite และคณะ, 2016) โดยเซลล์จะสร้างสารลดแรงตึงผิวเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีไฮโดรคาร์บอน หรือน้ำมันชนิดต่าง ๆ เพื่อลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับน้ำมัน และเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายหรือเปลี่ยนโครงสร้างของสาร (Zhang และคณะ, 2012) จึงมีรายงานว่า *P. aeruginosa* สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ ดีเซล เบนซิน และปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น ๆ ได้ (Chekroud และคณะ, 2011; Prakash และคณะ, 2014)

แบคทีเรียไอโซเลต 2 สามารถย่อยสลายดีเซลได้เพียง $40.40 \pm 3.06\%$ เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA พบว่า มีความคล้ายเหมือนมากที่สุดกับ *Stenotrophomonas* sp. สายพันธุ์ BCc6 accession no. AY654621.1 เท่ากับ 99% ซึ่ง *Stenotrophomonas* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนยาว มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซล และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon; PAH) เช่น ฟิแนนทรีน แนพทาซีน แอนทราซีนได้ (Ganesh และ Lin, 2009; Mujahid และคณะ, 2015)

แบคทีเรียไอโซเลต 3 สามารถย่อยสลายดีเซลได้น้อย ($28.23 \pm 1.49\%$) เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA พบว่า มีความคล้ายเหมือนมากที่สุดกับ *Ochrobactrum* sp. สายพันธุ์ CU4B accession no. JQ518359.1 เท่ากับ 99% ซึ่ง *Ochrobactrum* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น สามารถย่อยสลาย PAH ได้หลายชนิด เช่น ฟิแนนทรีน แอนทราซีน แนพทาซีน ฟลูออรีน ไพรีน เป็นต้น (Arulazhagan และ Vasudevan, 2011) และสามารถสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide) เมื่ออยู่ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมัน จึงสามารถย่อยสลายน้ำมันได้หลายชนิด เช่น ดีเซล เบนซิน เคโรซีน น้ำมันดอกทานตะวัน เป็นต้น และสามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ ได้ (Ramasamy และคณะ, 2014)

แบคทีเรียไอโซเลต 4 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ $29.36 \pm 3.72\%$ เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA พบว่า มีความคล้ายเหมือนมากที่สุดกับ *Microbacterium* sp. สายพันธุ์ HBUM178961 accession no. KR906353.1 เท่ากับ 99% ซึ่ง *Microbacterium* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน แหล่งน้ำ อากาศ และพืชชนิดต่าง ๆ (Nowicka และคณะ, 2013) สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้เช่นกัน (Yan และคณะ, 2014)

แบคทีเรียไอโซเลต 5 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ $68.95 \pm 13.96\%$ เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA พบว่า มีความคล้ายเหมือนมากที่สุดกับ *Shinella* sp. สายพันธุ์ HZA2 accession no. JX878616.1 เท่ากับ 99% ซึ่ง *Shinella* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง ท่อนสั้น สามารถพบได้ในแหล่งน้ำจืดและน้ำทิ้งที่มีสารอินทรีย์ปนเปื้อน สามารถย่อยสลาย PAH ได้ เช่น แอนทราซีน (anthracene) (Ntougias และคณะ, 2015) และสามารถย่อยนิโคตินได้ (Gurusamy และ Natarajan, 2013) เป็นต้น

แบคทีเรียไอโซเลต 6 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ $69.07 \pm 14.59\%$ เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA พบว่า มีความคล้ายเหมือนมากที่สุดกับ *Pusillimonas* sp. สายพันธุ์ 208 accession no. JF714704.1 เท่ากับ 99% ซึ่ง *Pusillimonas* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น สามารถย่อยสลายดีเซลในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ (Cao และคณะ, 2011)

แบคทีเรียไอโซเลต 7 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ $35.38 \pm 0.75\%$ เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่า มีความคล้ายเหมือนมากที่สุดกับ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ LB-2 accession no. DQ272580.1 เท่ากับ 99% ซึ่ง *Pseudomonas* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนได้ เช่น PAH (Ma และคณะ, 2012) น้ำมันเคโรซีน น้ำมันหล่อลื่น ดีเซล น้ำมันดิบ เป็นต้น และสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิพิด (rhamnolipid) (Pacwa-Plociniczak และคณะ, 2014)

กลุ่มแบคทีเรีย TS1 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ $91.69 \pm 1.14\%$ ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองของโคโลนีเดี่ยวทั้ง 7 ไอโซเลตอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า กลุ่มแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลได้รวดเร็วกว่าแบคทีเรียเพียง 1 ชนิด สอดคล้องกับ Prakash และคณะ (2014) ที่พบว่า *Bacillus* sp. APHP6, *Pseudomonas* sp. APHP9, *Pseudomonas* sp. APBP1, *Micrococcus* sp. APIO4 และกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วยแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ 61.2%, 68.4%, 53.7%, 39.3% และ 75.4% ตามลำดับ ภายใน 6 วัน แสดงว่า กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายดีเซลได้มากกว่าแบคทีเรียเดี่ยว เนื่องจากดีเซลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเชิงซ้อน (El-Gendy และ Nassar, 2015) จึงยากต่อการย่อยสลาย

โดยใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียว ดังนั้นการใช้กลุ่มแบคทีเรียจะมีเอนไซม์หลายชนิดช่วยย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนเชิงซ้อนเหล่านี้ (Prakash และคณะ, 2014) และแบคทีเรียชนิดหนึ่งสามารถนำสารตัวกลาง (intermediate) ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายจากแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งไปใช้ได้ ทำให้ระบบการบำบัดทางชีวภาพเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Das และ Dash, 2014)

แม้ว่าการใช้กลุ่มแบคทีเรียจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลได้ แต่ยังคงมีข้อจำกัดคือ การเติมกลุ่มแบคทีเรียอิสระลงในสิ่งแวดล้อมใหม่ อาจเกิดการแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น ดังนั้นการตรึงจุลินทรีย์กับวัสดุจะช่วยให้จุลินทรีย์มีที่ยึดเกาะ สามารถเพิ่มจำนวนได้ และทนต่อสารพิษมากขึ้น (Martins และคณะ, 2013) งานวิจัยนี้เลือกใช้วัสดุตรึงจากธรรมชาติ ได้แก่ เปลือกหอยแครงและนมผักกระเฉด เนื่องจากวัสดุทั้ง 2 ชนิดเป็นวัสดุที่เหลือจากการบริโภค ซึ่งเปลือกหอยมีพื้นผิวขรุขระ ส่วนนมผักกระเฉดสามารถลอยน้ำได้จึงน่าจะเหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้งานด้านการตรึงเซลล์เพื่อบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนดีเซล โดยนำกลุ่มแบคทีเรียมาตรึงบนเปลือกหอยขนาด 5x5 มิลลิเมตร จำนวน 5 กรัม และนมผักกระเฉดขนาด 5x5 มิลลิเมตร จำนวน 0.1 กรัม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้วิธีการดูดซับ (adsorption) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและต้นทุนต่ำ จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย 1% ดีเซล พบว่า แบคทีเรียสามารถยึดเกาะบนเปลือกหอยและนมผักกระเฉดได้ภายในเวลา 2 ชั่วโมง

จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวและการยึดเกาะของกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุทั้ง 2 ชนิด พบว่า ตัวอย่างเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อไม่พบเซลล์จุลินทรีย์ แสดงว่า การล้างและต้มเปลือกหอยสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเปลือกหอยได้ และเปลือกด้านในที่เป็นสีขาวมีลักษณะขรุขระมากกว่าเปลือกด้านนอกที่เป็นสีเทา ส่วนเปลือกหอยที่ปลอดเชื้อมีลักษณะพื้นผิวด้านในขรุขระมากกว่าเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อ แสดงว่า ไอน้ำและความร้อนสูงจากเครื่องนึ่งไอน้ำมีผลกับโครงสร้างทางกายภาพของเปลือกหอย เช่นเดียวกับ Rashidi และคณะ (2011) ที่พบว่า เปลือกหอยมีลักษณะพื้นผิวที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นลักษณะขรุขระมากขึ้นเมื่อผ่านความร้อนสูง

ตัวอย่างนมผักกระเฉดที่ผ่านการตากแดดมีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ สีน้ำตาลอ่อน ไม่พบจุลินทรีย์ และมีลักษณะพื้นผิวที่เปื่อยมากกว่านมผักกระเฉดสดที่ไม่ผ่านการตากแดด ซึ่งมีจุลินทรีย์เกาะอยู่ แสดงว่า การล้างและการตากแดดสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับนมผักกระเฉดได้ และนมผักกระเฉดที่ปลอดเชื้อมีลักษณะเปื่อยยุ่ยมากกว่านมผักกระเฉดที่ผ่านการตากแดด เนื่องจากลักษณะโครงสร้างทางกายภาพถูกทำลายด้วยไอน้ำและความร้อนสูงจากเครื่องนึ่งไอน้ำ และเมื่อตรวจสอบตัวอย่างวัสดุที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรีย พบว่า วิธีการตรึงแบบดูดซับสามารถตรึงแบคทีเรียกับวัสดุได้

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลของกลุ่มแบคทีเรียอิสระกับกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนเปลือกหอยและนมผักกระเฉด พบว่า กลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนเปลือกหอยสามารถย่อยสลายดีเซลได้ $97.05 \pm 0.80\%$ ซึ่งใกล้เคียงกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนนมผักกระเฉดที่ย่อยสลายได้ $96.26 \pm 0.31\%$ และมากกว่ากลุ่มแบคทีเรียอิสระสามารถย่อยสลายดีเซลได้ $93.98 \pm 0.10\%$ ภายใน 7 วัน ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับ Hou และคณะ (2013) ที่ตรึงแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. F9 บน puffed foxtail millet (PFM) กับเมมเบรนจากสารประกอบแคลเซียมแอลจินेट-โคโชนาน พบว่า แบคทีเรียตรึงสามารถย่อย 1% ดีเซลได้มากกว่า 90% ในเวลา 2 วัน ในขณะที่แบคทีเรียอิสระย่อยสลายดีเซลได้น้อยกว่า 90% ในเวลา 7 วัน

ในชุดควบคุมที่มีเฉพาะเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อ พบว่า ดีเซลลดลงเหลือ 45.67% ภายใน 7 วัน อาจเกิดจากการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรียตามธรรมชาติที่ติดมากับเปลือกหอย รวมทั้งการดูดซับดีเซลจากอาหารเหลวโดยเปลือกหอย ซึ่งสอดคล้องกับชุดการทดลองที่ใช้เปลือกหอยปลอดเชื้อที่แสดงว่า เปลือกหอยสามารถดูดซับดีเซลได้จริงและดีเซลในน้ำลดลงเหลือ $52.07 \pm 4.13\%$ ในวันที่ 7 โดยดีเซลถูกดูดซับไว้ที่เปลือกหอย $29.59 \pm 1.78\%$ ซึ่งลดลงจากวันที่ 3 ที่สามารถดูดซับไว้ $40.54 \pm 11.16\%$ ทั้งนี้อาจเกิดจากแรงของน้ำจากการเขย่าและการเสียดสีระหว่างเปลือกหอยแต่ละชิ้นส่งผลให้เปลือกหอยถูกกัดเซาะ ดีเซลจึงออกจากเปลือกหอยมาอยู่ในอาหารเหลว

ในชุดควบคุมที่ใช้นมผักกระเฉดปลอดเชื้อ พบว่า ชุดนมผักกระเฉดสามารถดูดซับดีเซลได้ดีกว่าเปลือกหอย ชุดนมผักกระเฉดปลอดเชื้อสามารถดูดซับดีเซลจากอาหารเหลวได้ $77.18 \pm 2.96\%$ ในวันที่ 3 ซึ่งมากกว่าวันที่ 7 ที่พบดีเซลเหลือ $69.92 \pm 9.12\%$ จากการสังเกตลักษณะของนมผักกระเฉด พบว่า ในวันที่ 7 นมผักกระเฉดเปียกชุ่ม เสียสภาพ จึงเป็นไปได้ที่ ดีเซลจะออกมาอยู่ในอาหารเหลว ในชุดที่ใช้นมผักกระเฉดที่ไม่ปลอดเชื้อพบแบคทีเรียตามธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ 77.62% ในวันที่ 7 อีกทั้งหลังจากผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน พบว่า กลุ่มแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นบนเปลือกหอยและนมผักกระเฉดอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 และยังคงความสามารถในการย่อยสลายดีเซล สอดคล้องกับผลจำนวนแบคทีเรียจากวิธี viable plate count และผลการย่อยสลายดีเซลจากการวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือในอาหารเหลว

ดังนั้นในชุดทดลองที่มีกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตรึงและแบคทีเรียตามธรรมชาติที่ติดมากับวัสดุตรึงช่วยเสริมความสามารถในการย่อยสลายดีเซล ประกอบกับวัสดุตรึงสามารถดูดซับดีเซลได้ และแบคทีเรียที่เกาะบนวัสดุตรึงสามารถใช้ดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ จึงทำให้เกิดการย่อยสลายดีเซลได้อย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับ Tao และคณะ (2010) ที่รายงานว่า การตรึง *Sphingomonas* sp. GY2B บนฟางข้าว สามารถเพิ่มความสามารถในการย่อยสลาย

พีแนนทรินได้ เนื่องจากฟางข้าวสามารถดูดซับพีแนนทรินจึงช่วยเสริมประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในการย่อยสลาย

วัสดุตรึงที่มีพื้นผิวขรุขระจะช่วยให้แบคทีเรียเกาะได้ดีขึ้น เมื่อมีแบคทีเรียจำนวนมากจะเกิดไบโอฟิล์ม (biofilm) ทำให้แบคทีเรียไม่หลุดออกจากวัสดุได้ง่าย อีกทั้งช่องว่างที่เกิดขึ้นในวัสดุตรึงสามารถดูดซับเอนไซม์ หรือปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้ (X. Zhang และคณะ, 2016) นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียบางส่วนหลุดออกจากวัสดุตรึงมาอยู่ในส่วนน้ำช่วยย่อยดีเซลในอาหารเหลวที่ไม่ถูกดูดซับไว้ในวัสดุตรึง จึงสามารถย่อยสลายดีเซลได้อย่างรวดเร็วและย่อยสลายได้มากกว่าการใช้เซลล์อิสระ

เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียตรึงในชุดการทดลอง พบว่า หลังจากทดสอบการย่อย 1% ดีเซลเป็นเวลา 7 วัน ชุดการทดลองที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยพบแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในอาหารเหลวแตกต่างจากกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนนมผักกระเฉดที่พบแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในนมผักกระเฉด แสดงว่า เปลือกหอยสามารถตรึงแบคทีเรียได้มากที่สุด 10^7 CFU/กรัมของเปลือกหอย แต่ในนมผักกระเฉดสามารถตรึงแบคทีเรียได้มากกว่าเปลือกหอย น่าจะเกิดจากนมผักกระเฉดมีลักษณะคล้ายฟองน้ำที่มีโพรงและน้ำหนักเบา แบคทีเรียจึงสามารถเข้าไปอยู่ในโพรงหรือเกาะบนผิวด้านนอกของนมผักกระเฉดได้ แต่เปลือกหอยมีพื้นผิวจำกัด แบคทีเรียจึงเกาะได้แค่ผิวด้านนอกของเปลือกหอย ผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การตรึงเซลล์บนเปลือกหอยและนมผักกระเฉดด้วยวิธีการดูดซับ (adsorption) สามารถคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลไว้ได้ใกล้เคียงกับเซลล์อิสระ

เมื่อสังเกตลักษณะของวัสดุตรึงหลังจากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ทุกชุดการทดลองที่มีนมผักกระเฉดจะสังเกตเห็นนมผักกระเฉดบางส่วนจมน้ำ บางส่วนแขวนลอยในอาหารเหลว สอดคล้องกับ Dave และ Ghaly (2011) ที่พบว่า วัสดุอินทรีย์ธรรมชาติ เช่น ทุเรียน ชี้อ้อย ฟางข้าว เป็นต้น วัสดุเหล่านี้มีความสามารถในการดูดซับน้ำมันประมาณ 3 - 15 เท่าของน้ำหนักวัสดุ แต่มีข้อเสียคือ เมื่อดูดซับน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันจะทำให้วัสดุจมน้ำ และยากต่อการเก็บคืนหลังการใช้งาน อีกทั้งสังเกตว่า นมผักกระเฉดมีสีเข้มขึ้นและเปื่อยยุ่ย อาจเกิดจากนมผักกระเฉดเป็นเซลล์พืชที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน (Pereira, 2015) ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ (Deng, 2016) จึงเหมาะกับการใช้งานด้านการบำบัดดีเซลที่ปนเปื้อนในดินมากกว่าในน้ำ แต่เปลือกหอยมีลักษณะแข็งและคงสภาพได้ดีกว่าเป็นวัสดุอินทรีย์ที่มีราคาถูกและไม่ถูกย่อยสลายทางชีวภาพ จึงเหมาะกับการใช้งานด้านการบำบัดบริเวณริมตลิ่งของแหล่งน้ำจืดที่มีการปนเปื้อนดีเซล ดังนั้นเปลือกหอยจึงเป็นวัสดุตรึงที่เหมาะสมกับการทดสอบขั้นต่อไป

จากชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงในการย่อยสลาย 1% ดีเซล เมื่อตรวจสอบพลวัตของประชากรกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสุดการทดสอบเป็นเวลา 7 วัน ด้วยเทคนิค PCR-DGGE พบว่า ในชุดการทดลองการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนวัสดุหลังจากผ่านไป 2 ชั่วโมง มีดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนวัสดุทั้งสองชนิด ซึ่งสอดคล้องกับผลการนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count และการตรวจสอบการยึดเกาะของแบคทีเรียด้วย SEM อีกทั้งหลังจากการทดสอบผ่านไป 7 วัน ยังพบดีเอ็นเอของชุดกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนวัสดุทั้งสองชนิดที่มีลักษณะรูปแบบเหมือนกับส่วนของอาหารเหลว และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบเป็นของแบคทีเรียตามธรรมชาติที่ติดมากับเปลือกหอยและนมผักกระเฉดด้วย แสดงว่า การย่อยสลายที่เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพเกิดจากการเติมกลุ่มแบคทีเรีย TS1 นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรียที่ติดมากับวัสดุตรึงอาจช่วยย่อยสลายดีเซลได้ และกลุ่มแบคทีเรียยังคงอยู่ในวัสดุตรึง ซึ่งสอดคล้องกับผลจำนวนแบคทีเรียจากวิธี viable plate count ผลการตรวจสอบการยึดเกาะของกลุ่มแบคทีเรียด้วย SEM และผลการย่อยสลายดีเซลจากการวิเคราะห์ดีเซลที่เหลือในอาหารเหลว

เมื่อการตรึงเซลล์บนเปลือกหอยประสบความสำเร็จและเปลือกหอยเหมาะกับการใช้งานในการบำบัดดีเซลในแหล่งน้ำ จึงนำกลุ่มแบคทีเรียตรึงมาทดสอบแปรผันปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตรึงและความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอย โดยแปรผันความเข้มข้นเซลล์ ระยะเวลาในการตรึงเซลล์ ขนาดของเปลือกหอย ปริมาณดีเซล อัตราส่วนของเปลือกหอยตรึงกับอาหารเหลว การนำแบคทีเรียตรึงมาใช้ซ้ำ และระยะเวลาในการเก็บรักษา

จากการแปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่นำมาใช้ตรึงต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 1% ดีเซลภายในเวลา 7 วัน พบว่า เซลล์อิสระความเข้มข้น 8 และ 10 log CFU/มล. มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลภายใน 7 วันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจากเซลล์อิสระความเข้มข้น 6 log CFU/มล. อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกลุ่มแบคทีเรียตรึงโดยใช้เซลล์ ความเข้มข้นต่าง ๆ มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จะเห็นได้ว่า การใช้เซลล์ความเข้มข้นสูงไม่ส่งผลให้การย่อยสลายดีเซลมากขึ้น เปลือกหอยที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรียสามารถตรึงแบคทีเรียได้สูงสุด 7 log CFU/กรัม ในวันที่ 7 ถึงแม้ว่าจะเพิ่มจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 10 log CFU ต่อเปลือกหอย 5 กรัม ก็พบว่า มีแบคทีเรียบนเปลือกหอยลดลงในวันที่ 7 จนเหลือเซลล์ประมาณ 7 log CFU/กรัม อาจเกิดจากเปลือกหอยมีพื้นที่ผิวให้แบคทีเรียเกาะ อย่างจำกัดและอาจเกิดจากการเขย่าและการเสียดสีกันของเปลือกหอยที่ทำให้น้ำเกิดแรงที่สามารถกัดเซาะเปลือกหอยบางส่วนให้หลุดออกไป ส่งผลให้เปลือกหอยมีพื้นที่ผิวน้อยลงเมื่อเทียบกับวันที่ 0 ส่วนกลุ่มแบคทีเรียอิสระที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 6 และ 8 log CFU/มล. หลังจากผ่านไป 7 วันพบว่า จำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลวเพิ่มมากขึ้นเป็น 9 log CFU/มล. แต่แตกต่างจากเซลล์ความเข้มข้น 10 log CFU/มล. เมื่อผ่านไป 7 วันกลับพบว่า จำนวนแบคทีเรียในอาหารลดลงเหลือ

ประมาณ 9 log CFU/มล. เช่นเดียวกับ Wang และคณะ (2012) ที่เปรียบเทียบการใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในโซเดียมแอลจิเนตไดอะโทไมต์ (sodium alginate-diatomite) โดยใช้เซลล์ความเข้มข้น 4, 4.69 และ 5 log CFU/กก. ของวัสดุตรึง ซึ่งเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากกว่าเซลล์อิสระทุกความเข้มข้นเซลล์ แต่ความเข้มข้นเซลล์ตรึงที่ให้ผลการย่อยสลายดีที่สุด (29.8%) คือ 4.69 log CFU/กก. ของวัสดุ ในขณะที่เซลล์อิสระย่อยสลายได้ 21.1% ภายในเวลา 20 วัน สอดคล้องกับ Maliji และคณะ (2013) ที่พบว่า การใช้เซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยจะส่งผลให้มีจำนวนเซลล์และเอนไซม์ไม่เพียงพอกับการย่อยสลาย ในขณะที่เซลล์ความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้เซลล์ขาดออกซิเจนและสารอาหารในการเจริญ ดังนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นจึงมีผลกับอัตราการย่อยสลาย จากผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกกลุ่มแบคทีเรียตรึงที่ใช้เซลล์ความเข้มข้น 6 log CFU/มล. มาทดสอบขั้นต่อไปเพราะสามารถประหยัดเซลล์แต่ยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลไม่แตกต่างจากการใช้เซลล์ความเข้มข้นที่สูงกว่า

จากการทดสอบผลของระยะเวลาในการตรึงเซลล์บนเปลือกหอย เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ในการยึดเกาะกับเปลือกหอย โดยเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่ใช้ตรึงที่ความเข้มข้น 6 และ 8 log CFU/มล. กับเวลาที่ใช้ในการตรึงเซลล์ 30 นาทีกับ 2 ชั่วโมง พบว่าการตรึงเซลล์ด้วยเซลล์ที่มีความเข้มข้น 6 หรือ 8 log CFU/มล. ที่เวลา 30 นาที หรือ 2 ชั่วโมง ให้ผลการย่อยสลายดีเซลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และให้ผลดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรึงโดยวิธีอื่น ตัวอย่างเช่น Chekroud และคณะ (2011) ที่นำแบคทีเรียมาตรึงบนฟางข้าวน้ำหนัก 2 กรัม โดยบ่มในอาหารเหลว nutrient broth เป็นเวลา 48 ชม. ก่อนนำมาทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบ หรือ Kee และคณะ (2015) ที่นำแบคทีเรียมาตรึงบนซีลี้อยและกากลูกปาล์ม โดยเติมแบคทีเรียความเข้มข้น 7 log CFU/มล. ปริมาตร 1 มล. ลงบนวัสดุตรึงแต่ละชนิดจำนวน 1 กรัม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำมาทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบ จะเห็นได้ว่าวิธีต่าง ๆ ข้างต้นใช้เวลาในการตรึงนานกว่า ดังนั้นการเลือกตรึงเซลล์ความเข้มข้น 6 log CFU/มล. ที่เวลา 30 นาที จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมพอและเหมาะสมกับการประยุกต์ใช้งาน เนื่องจากประหยัดเซลล์เริ่มต้น ง่ายต่อการเตรียมและสามารถนำไปใช้งานได้อย่างรวดเร็ว

ขนาดของวัสดุตรึงมีผลต่อการดูดซับเซลล์ เอนไซม์หรือปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยวัสดุตรึงที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวมากกว่าวัสดุตรึงขนาดใหญ่ ทำให้ดูดซับเซลล์ เอนไซม์จากแบคทีเรียหรือปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้มากกว่า ส่งผลให้อัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้น (X. Zhang และคณะ, 2016) ในงานวิจัยนี้ใช้เปลือกหอยหยาบและเปลือกหอยละเอียด เพื่อศึกษาผลของลักษณะทางกายภาพของเปลือกหอยต่อการตรึงเซลล์ การดูดซับดีเซลและการย่อยสลายดีเซลของกลุ่มแบคทีเรียตรึง พบว่า เปลือกหอยละเอียดมีพื้นที่ผิวมากกว่าเปลือกหอยหยาบจึงพบจำนวนแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยในวันที่ 0 มากกว่า แต่การดูดซับดีเซลไว้ในเนื้อวัสดุมีน้อยกว่า

เปลือกหอยหยาบ เนื่องจากเมื่อเทเปลือกหอยลงในหลอดทดลองจะสังเกตเห็นว่า ขนาดของเปลือกหอยเล็กมากจนแทบไม่มีช่องว่างหรือช่องระหว่างวัสดุตั้งแต่ละชั้นค่อนข้างน้อย ส่งผลให้การถ่ายเทอากาศไม่ดี อาหารเหลวและดีเซลไม่สามารถแทรกผ่านช่องว่างระหว่างชั้นของเปลือกหอยได้ ส่งผลให้การย่อยสลายเกิดขึ้นไม่ดีและไม่แตกต่างจากกลุ่มแบคทีเรียอิสระ อีกทั้งวัสดุตั้งที่มีขนาดเล็กยากต่อการเก็บกลับออกมา (recovery) แตกต่างจากเปลือกหอยหยาบที่มีชั้นขนาดใหญ่และเหมาะสมกับการใช้งานมากกว่า เมื่อเทเปลือกหอยลงในหลอดทดลองจะพบว่าเปลือกหอยเรียงตัวกันหลวม ๆ และมีช่องว่างระหว่างเปลือกหอยแต่ละชั้นให้อากาศ อาหารเหลวและดีเซลซึมผ่านได้ ผลการย่อยสลายดีเซลจึงดีกว่ากลุ่มแบคทีเรียอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งเปลือกหอยหยาบง่ายต่อการเก็บกลับออกมา (recovery) สอดคล้องกับ X. Zhang และคณะ (2016) ที่ทดสอบตรึงแบคทีเรียบนฟางข้าวที่มีลักษณะต่างกัน 2 ชนิดคือ ตัวอย่างฟางข้าว MG ที่มีพื้นผิวเรียบและ SY ที่มีพื้นผิวขรุขระ จะพบจำนวนแบคทีเรียบน SY มากกว่า MG และอัตราการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียที่ตรึงบน SY มากกว่าแบคทีเรียที่ตรึงบน MG แสดงว่าพื้นที่ผิวมีผลต่อการตรึงแบคทีเรียเพื่อย่อยสลายน้ำมัน ดังนั้นขนาดของวัสดุที่มีเหมาะสมกับการนำมาทดสอบขั้นต่อไปคือ เปลือกหอยหยาบขนาด 5x5 มิลลิเมตร

ความเข้มข้นของดีเซลมีผลต่อการย่อยสลายของแบคทีเรียโดยดีเซลความเข้มข้นต่ำกว่า 1% จะเป็นแหล่งคาร์บอนของเซลล์ แต่ดีเซลความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษกับจุลินทรีย์ซึ่งจะทำให้ลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้อัตราการย่อยสลายลดลง (Dahalan และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตามการตรึงเซลล์จะช่วยให้ทนต่อสารพิษได้สูงขึ้น (Martins และคณะ, 2013) จึงได้ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของกลุ่มแบคทีเรียตรึง พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของดีเซล จะพบจำนวนแบคทีเรียในส่วนของอาหารเหลวมากขึ้นทั้งในชุดแบคทีเรียอิสระและแบคทีเรียตรึง ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียตรึงที่พบบนเปลือกหอยมีจำนวนสูงสุดประมาณ $7 \log \text{CFU/กรัม}$ ซึ่งอาจเกิดจากพื้นที่ผิวของเปลือกหอยมีจำกัด และชุดการทดลองเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อที่มีจำนวนแบคทีเรียที่พบบนเปลือกหอยมีจำนวนลดลง ซึ่งอาจเกิดจากเปลือกหอยสามารถดูดซับดีเซลจากอาหารเหลวได้ ทำให้แบคทีเรียที่เกาะบนเปลือกหอยสัมผัสกับดีเซลโดยตรงและดีเซลที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นไปเป็นพิษกับเซลล์ของแบคทีเรียบางชนิด จึงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และพบว่าที่ 1% ดีเซล กลุ่มแบคทีเรีย TS1 ที่ตรึงบนเปลือกหอยมีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้มากกว่าชุดควบคุมต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มแบคทีเรียอิสระอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของดีเซลเป็น 3% และ 5% โดยปริมาตร พบว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลได้มากกว่ากลุ่มแบคทีเรียอิสระและกลุ่มแบคทีเรียตามธรรมชาติที่ติดมากับเปลือกหอยอย่างมีนัยสำคัญ จะเห็นได้ว่า กลุ่มแบคทีเรีย TS1 จะเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของดีเซลเพิ่มขึ้น ซึ่งดีเซลความเข้มข้นสูงมีผลดีคือ เซลล์มี

แหล่งคาร์บอนมากขึ้น แต่มีข้อเสียคือ ดีเซลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดจึงส่งผลให้การย่อยสลายลดลง (Palanisamy และคณะ, 2014) ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนในชุดการทดลอง กลุ่มแบคทีเรียอิสระและเปลือกหอยที่ไม่ปลอดเชื้อที่มีผลการย่อยสลายน้อยกว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึง เมื่อความเข้มข้นของดีเซลเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับ Shen และคณะ (2015) ที่พบว่า กลุ่มแบคทีเรียอิสระสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 1-7 กรัมต่อลิตรได้ ซึ่งความเข้มข้นที่ย่อยสลายได้ดีที่สุด (44%) คือ 3 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 5-7 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง และกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงในแคลเซียมแอลจิเนต สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรได้ 47% ซึ่งมากกว่ากลุ่มแบคทีเรียอิสระที่ย่อยสลายได้เพียง 26% ภายในเวลา 5 วัน จะเห็นได้ว่า การตรึงเซลล์มีข้อดีคือ เกิดสภาวะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์และเซลล์สามารถทนต่อสารเคมีความเข้มข้นสูงได้ (Martins และคณะ, 2013)

จากการแปรผันอัตราส่วนของแบคทีเรียตรึงกับปริมาณอาหารเหลวเพื่อจำลองการนำเปลือกหอยตรึงไปบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนดีเซล โดยใช้เปลือกหอยปริมาณต่างกันเป็น 1:1, 0.5:1, 0.1:1 และ 0.05:1 พบว่า ปริมาณเปลือกหอยที่ใช้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลในอาหารเหลวไม่ต่างกัน กล่าวคือ ใช้เปลือกหอยเพียง 0.05 กรัมจะให้ผลเท่ากับการใช้เปลือกหอย 1 กรัม ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว 1 มล. ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า สามารถใช้เซลล์ตรึงในปริมาณที่น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น เช่น Simons และคณะ (2013) ใช้อัตราส่วนของเศษเปลือกหอยที่ตรึงแบคทีเรียจำนวน 875 กรัมต่อน้ำทะเล 5,000 มล. ในการทดสอบการย่อยสลาย weathered oil หรือ H. Zhang และคณะ (2016) ใช้อัตราส่วนของถ่านชีวภาพ (biochar) ที่ตรึงแบคทีเรียจำนวน 5 กรัมต่ออาหารเหลวปริมาตร 25 มล. ดังนั้นอัตราส่วนของเปลือกหอยในงานวิจัยนี้จึงมีประสิทธิภาพมากกว่า

จากการทดสอบการใช้ซ้ำกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนวัสดุเพื่อย่อยสลาย 1% ดีเซล เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 5 รอบ พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลของกลุ่มแบคทีเรียตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำ 5 รอบอยู่ในช่วง 93-96% แสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนเปลือกหอยยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลได้ดีเมื่อผ่านการใช้ซ้ำ และเมื่อเวลาผ่านไปทุก ๆ 7 วัน พบแบคทีเรียในอาหารเหลวเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งแบคทีเรียตรึงสามารถยึดเกาะบนเปลือกหอยได้ตลอดเวลา 35 วัน จากการนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count ที่สอดคล้องกับภาพจาก SEM ในวันที่ 35 นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิวของเปลือกหอย โดยเฉพาะพื้นผิวด้านในที่เป็นสีขาวมีลักษณะขรุขระคล้ายหนามมากกว่าวันที่ 0 แต่ลักษณะพื้นผิวด้านนอกเปลือกหอยที่เป็นสีเทาไม่แตกต่างจากวันที่ 0 แสดงว่า การใช้ซ้ำหลายครั้งส่งผลให้ลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไป อาจเกิดจากแรงเขย่าจากการให้อากาศทำให้เปลือกหอยเกิดการเสียดสีกัน ส่งผลให้พื้นผิวของเปลือกหอยถูกกัดเซาะ และเนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียตรึงที่ผ่านการใช้ซ้ำ 5 รอบ

ยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดี จึงสามารถใช้ซ้ำมากกว่า 5 รอบได้ สอดคล้องกับ Maliji และคณะ (2013) ที่นำ *Bacillus cereus* A ตรึงบนฟองน้ำ (sponge) และบวบ (luffa) พบว่า แบคทีเรียที่ตรึงบนบวบสามารถย่อยสลายดีเซลได้มากกว่าแบคทีเรียที่ตรึงบนฟองน้ำและสามารถใช้ซ้ำได้ 8 รอบ ในขณะที่แบคทีเรียที่ตรึงบนฟองน้ำใช้ซ้ำได้เพียง 6 รอบ เช่นเดียวกับ Nopcharoenkul และคณะ (2013) ที่ตรึง *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 บนเม็ดพลาสติกพอลิเอทิลีน (polyethylene plastic pellets) พบว่า เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรได้และสามารถใช้ซ้ำได้ 70 รอบ โดยยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

จากการทดสอบผลของระยะเวลาในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียตรึง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลหลังจากเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียตรึงในขวดฝาเกลียวและถุงซิปลึ้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือนและ 2 เดือน พบว่า อุณหภูมิต่ำช่วยชะลอการเจริญของแบคทีเรีย และการเก็บรักษาเปลือกหอยตรึงในถุงซิปลึ้นเป็นเวลา 1 และ 2 เดือน ให้ผลการย่อยสลายดีเซล 92.04% และ 90.27% ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แตกต่างจากการเก็บรักษาเปลือกหอยตรึงในหลอดฝาเกลียวที่เวลา 1 และ 2 เดือน ที่ให้ผลการย่อยสลายดีเซล 93.24% และ 88.4% ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อาจเกิดจากหลอดฝาเกลียวมีอากาศมากกว่าแบคทีเรียบางชนิดจึงใช้อากาศเจริญเติบโตและตายไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลง ดังนั้น การเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียตรึงในถุงซิปลึ้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 เดือน ช่วยให้เซลล์มีชีวิตรอด และยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซล อีกทั้งประหยัดพื้นที่ในการเก็บรักษา และเป็นสภาวะที่พร้อมใช้งาน (ready-to-use) ด้วย เช่นเดียวกับ Xu และ Lu (2010) ที่นำกลุ่มแบคทีเรียมาตรึงบนผงเปลือกถั่วลิสงแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า แบคทีเรียมีชีวิตรอดและคงประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากกว่าการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงที่อุณหภูมิห้อง และ El-Gendy และ Nassar (2015) ได้ตรึง *P. aeruginosa* ในเม็ดแคลเซียมแอลจิเนต (Ca-alginate beads) ซึ่งสามารถในการย่อยสลายดีเซลได้ 76% จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วัน พบว่าแบคทีเรียตรึงยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซล 6 กรัมต่อลิตร โดยสามารถย่อยสลายได้ 75%

จะเห็นได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย TS1 ที่คัดแยกจากรากพืชในแหล่งน้ำจืด เมื่อนำมาตรึงบนเปลือกหอยสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ $97.05 \pm 0.80\%$ ซึ่งยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไม่แตกต่างกลุ่มแบคทีเรียอิสระ จากการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตรึงและการย่อยสลาย แสดงให้เห็นว่า จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมกับการตรึงคือ $6 \log$ CFU/มล. เวลาที่เหมาะสมกับการตรึงคือ 30 นาที ขนาดของเปลือกหอยที่เหมาะสมคือ 5×5 มิลลิเมตร การตรึงเซลล์มีข้อดีหลายอย่างได้แก่ ทำให้เซลล์ทนต่อดีเซลความเข้มข้นสูงและย่อยสลายดีเซลได้ดีกว่า

การใช้แบคทีเรียอิสระ กลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในถุงซิปลเป็นเวลา 2 เดือนได้ โดยที่ยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซล และกลุ่มแบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลวที่มีปริมาตรมากกว่า 20 เท่าของน้ำหนักเปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึง อีกทั้งกลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถใช้ซ้ำในอาหารเหลวที่มี 1% ดีเซลได้ไม่ต่ำกว่า 5 รอบ ดังนั้นการตรึงเซลล์บนเปลือกหอยด้วยวิธีการดูดซับสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลได้และเหมาะกับการประยุกต์ใช้งานบริเวณริมตลิ่งแม่น้ำ โดยโปรยเปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึงเพื่อบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนดีเซลที่โดนกระแสน้ำหรือกระแสนลมพัดเข้าหาดลิ่ง หรือวางเปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนตะแกรงลอยน้ำเพื่อบำบัดดีเซลที่ลอยบนผิวน้ำ



ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติมีความเค็ม อุณหภูมิและ pH ต่างกัน ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายดีเซลจึงควรมีการทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลวที่มีปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และอุณหภูมิและ pH ที่ช่วงต่าง ๆ
2. นำกลุ่มแบคทีเรีย TS1 ที่ตรึงบนเปลือกหอยมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดต่าง ๆ เพื่อเพิ่มความสามารถในการใช้งานย่อยสลายน้ำมันชนิดอื่น ๆ นอกจากดีเซล เช่น น้ำมันเบนซิน น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันแก๊สโซฮอล์ เป็นต้น
3. นำกลุ่มแบคทีเรียตรึงไปทดสอบกับตัวอย่างแหล่งน้ำตามธรรมชาติที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนดีเซล เช่น แม่น้ำเจ้าพระยา คลองแสนแสบ เป็นต้น เพื่อทดสอบการประยุกต์ใช้งานกลุ่มแบคทีเรียตรึงในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของดีเซลจริง
4. สามารถออกแบบการทดสอบการย่อยสลายดีเซลในน้ำโดยทำการทดลองในคอลัมน์ (column) ที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนเปลือกหอยโดยใช้ระบบแบบกะหรือแบบต่อเนื่อง (batch or continuous system)

รายการอ้างอิง



ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ. 2559. เกร็ดความรู้มลพิษทางทะเล. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา

http://www.pcd.go.th/info_serv/water_marine.html. [25 พฤษภาคม 2559]

ข่าวสดออนไลน์. 2557. เจ้าหน้าที่กู้เรือประมงล่มที่ท่าย่านคลองสาน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา

http://www.khaosod.co.th/view_newsonline.php?newsid=TVRRd01qOTJOamMwTnc9PO==. [25 พฤษภาคม 2559]

เชษฐสุธา จิตต์การุณย์. 2556. การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย SJ42 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดีเซลบนเปลือกหอยแครง. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

แผนกวิชาการน้ำมัน. 2552. น้ำมันดีเซล. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา

http://www2.egat.co.th/fuel/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=83. [15 พฤษภาคม 2559]

สุธาวลัย ดีสวัสดิ์. 2550. ผลของวัสดุทางการเกษตรในการช่วยลดไพรีนและพีแนนทรินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Agamuthu, P. and Darasnia, A. 2013. Potential of biowastes to remediate diesel fuel contaminated soil. *Global NEST Journal*. 15(4): 474-484.
- Al-Wasify, R. S. and Hamed, S. R. 2014. Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates. *International Journal of Bacteriology*. 2014: 1-8.
- Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S. and Al-Sabri, A. E. 2016. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from red sea coast of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23(2): 211-218.
- Arulazhagan, P. and Vasudevan, N. 2011. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. *Marine Pollution Bulletin*. 62(2): 388-394.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1995). Short Protocols in Molecular Biology (3rd ed). John Wiley and Sons, USA.
- Bao, M., Wang, L., Sun, P., Cao, L., Zou, J. and Li, Y. 2012. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 64: 1177-1185.
- Bayat, Z., Hassanshahian, M. and Cappello, S. 2015. Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: A mini review. *The Open Microbiology Journal*. 9: 48-54.
- Bharatham, B. H., Abu Bakar, M. Z., Perimal, E. K., Yusof, L. M. and Hamid, M. 2014. Development and characterization of novel porous 3D alginate-cockle shell powder nanobiocomposite bone scaffold. *BioMed Research International*. 2014: 146723.
- Bhunja, D. and Mondal, A. K. 2012. Systematic analysis (morphology, anatomy and palynology) of an aquatic medicinal plant water mimosa (*Neptunia oleracea* Lour.) in eastern india. *International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research*. 1: 290-319.

- Boro, J., Deka, D. and Thakur, A. J. 2012. A review on solid oxide derived from waste shells as catalyst for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16: 904-910.
- Buasri, A., Chaikut, N., Worawanitchaphong, P., Loryuenyong, V. and Trongyong, S. 2013. Calcium oxide derived from waste shells of mussel, cockle and scallop as the heterogeneous catalyst for biodiesel production. *The Scientific World Journal*. 2013: 1-7.
- Calvo, C., Silva-Castro, G. A., Uad, I., Manzanera, M., Perucha, C., Laguna, J. and González-López, J. 2010. Biostimulation combined treatments for remediation of diesel contaminated soil. *Environmental Toxicology III*. 1: 111-119.
- Cao, B., Ma, T., Ren, Y., Ren, Y., Li, G., Li, P., Guo, X., Ding, P. and Feng, L. 2011. Complete genome sequence of *Pusillimonas* sp. T7-7, a cold-tolerant diesel oil-degrading bacterium isolated from the Bohai sea in China. *Journal of Bacteriology*. 193(15): 4021-4022.
- Chang, S. E., Stone, J., Demes, K. and Piscitelli, M. 2014. Consequences of oil spills: A review and framework for informing planning. *Ecology and Society*. 19(2).
- Chekroud, Z., Gouda, M. K. and Houhamdi, M. 2011. Biodegradation of crude oil in marine medium. *Proteomics and Bioinformatics*. 4(10): 231-237.
- Crisafi, F., Genovese, M., Smedile, F., Russo, D., Catalfamo, M., Yakimov, M., Giuliano, L. and Denaro, R. 2016. Bioremediation technologies for polluted seawater sampled after an oil-spill in Taranto gulf (Italy): A comparison of biostimulation, bioaugmentation and use of a washing agent in microcosm studies. *Marine Pollution Bulletin*. 106(1-2): 119-126.
- Dahalan, F. A., Yunus, I., Johari, W. L. W., Shukor, M. Y., Halmi, M. I. E., Shamaan, N. A. and Syed, M. A. 2014. Growth kinetics of a diesel-degrading bacterial strain from petroleum-contaminated soil. *Journal of Environmental Biology*. 35: 399-406.
- Das, N. and Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*. 2011: 1-13.
- Das, S. and Dash, H. R. (2014). 1 - Microbial bioremediation: A potential tool for restoration of contaminated areas. Elsevier Inc, Oxford, United States.

- Dave, D. and Ghaly, A. E. 2011. Remediation technologies for marine oil spills: A critical review and comparative analysis. *American Journal of Environmental Sciences*. 7(5): 423-440.
- Dellagnezze, B. M., de Sousa, G. V., Martins, L. L., Domingos, D. F., Limache, E. E., de Vasconcellos, S. P., da Cruz, G. F. and de Oliveira, V. M. 2014. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Marine Pollution Bulletin*. 89(1-2): 191-200.
- Deng, Y. 2016. Lignocellulose as carbon source promotes bacterial synergism and reduces antagonism. Doctor of Philosophy thesis. The University of Southern Mississippi.
- El-Gendy, N. S. and Nassar, H. N. 2015. Kinetic modeling of the bioremediation of diesel oil polluted seawater using *Pseudomonas aeruginosa* NH1. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. 37: 1147-1163.
- Ganesh, A. and Lin, J. 2009. Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. *African Journal of Biotechnology*. 8(21): 5847-5854.
- Graj, W., Lisiecki, P., Szulc, A., Chrzanowski, L. and Wojtera-Kwiczor, J. 2013. Bioaugmentation with petroleum-degrading consortia has a selective growth-promoting impact on crop plants germinated in diesel oil-contaminated soil. *Water Air and Soil Pollution*. 224: 1-15.
- Gurusamy, R. and Natarajan, S. 2013. Current status on biochemistry and molecular biology of microbial degradation of nicotine. *The Scientific World Journal*. 2013: 1-15.
- Horel, A., Mortazavi, B. and Sobecky, P. A. 2015. Input of organic matter enhances degradation of weathered diesel fuel in sub-tropical sediments. *Science of the Total Environment*. 533: 82-90.
- Hou, D., Shen, X., Luo, Q., He, Y., Wang, Q. and Liu, Q. 2013. Enhancement of the diesel oil degradation ability of a marine bacterial strain by immobilization on a novel compound carrier material. *Marine Pollution Bulletin*. 67: 146-151.

- Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa, M., Eguchi, M. and Nasu, M. 2000. Monitoring impact of *in situ* biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 129-141.
- Jayashree, R., Nithya, S. E., Prasanna, P. R. and Krishnaraju, M. 2012. Biodegradation capability of bacterial species isolated from oil contaminated soil. *Journal of Academia and Industrial Research*. 1(3): 140-143.
- Jung, J., Choi, S., Hong, H., Sung, J. S. and Park, W. 2014. Effect of red clay on diesel bioremediation and soil bacterial community. *Microbial Ecology*. 68(2): 314-323.
- Karthika, R., Gopinath, L. R., Archaya, S. and Bhuvanewari, R. 2014. Isolation of diesel degrading bacteria, identification of catechol gene and its biogas production. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. 8(10): 76-82.
- Kauppi, S., Sinkkonen, A. and Romantschuk, M. 2011. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65(2): 359-368.
- Kavamura, V. N. and Esposito, E. 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*. 28(1): 61-69.
- Kee, W. K., Abdullah, P. S., Hazaimah, H., Surif, S. and Mutalib, S. A. 2015. Self-immobilised bacterial consortium culture as ready-to-use seed for crude oil bioremediation under various saline conditions and seawater. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 12: 2253-2262.
- Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K., Yamauchi-Inomata, Y., Toki, H., Venkateswaran, K., Yamamoto, S., Tanaka, H. and Harayama, S. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 82(6): 570-574.
- Kostka, J. E., Prakash, O., Delgardo, J., Overholt, W. A., Norton, N., Green, S. J., Hazen, T. C., Freyer, G. and Canion, M. H. A. 2011. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands

- impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied and environmental microbiology* 77: 7962-7974.
- Lawal, A. O., Davids, L. M. and Marnewick, J. L. 2016. Diesel exhaust particles and endothelial cells dysfunction: An update. *Toxicology in Vitro*. 32: 92-104.
- Leite, G. G. F., Figueirôa, J. V., Almeida, T. C. M., Valões, J. L., Marques, W. F., Duarte, M. D. D. C. and Gorchach-Lira, K. 2016. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. *Biotechnology Progress*. 32(2): 262-270.
- Lin, M., Liu, Y., Chen, W., Wang, H. and Hu, X. 2014. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 88: 8-12.
- Liu, P. W. G., Chang, T. C., Whang, L. M., Kao, C. H., Pan, P. T. and Cheng, S. S. 2011. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65(8): 1119-1127.
- Liu, P. W. G., Liou, J. W., Li, Y. T., Su, W. L. and Chen, C. H. 2015. The optimal combination of entrapped bacteria for diesel remediation in seawater. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 102: 383-391.
- Loan, N. T., Phuong, N. M. and Anh, N. T. N. 2014. The role of aquatic plants and microorganisms in domestic wastewater treatment. *Environmental Engineering and Management Journal*. 13(8): 2031-2038.
- Luo, Q., He, Y., Hou, D. Y., Zhang, J. G. and Shen, X. R. 2015. GPo1 *alkB* gene expression for improvement of the degradation of diesel oil by a bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(3): 649-657.
- Ma, J., Xu, L. and Jia, L. 2012. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. JM2 isolated from active sewage sludge of chemical plant. *Journal of Environmental Sciences*. 24(12): 2141-2148.
- Macaulay, B. M. and Rees, D. 2014. Bioremediation of oil spills: A review of challenges for research advancement. *Annals of Environmental Science*. 8: 9-37.
- Maliji, D., Olama, Z. and Holail, H. 2013. Environmental studies on the microbial degradation of oil hydrocarbons and its application in Lebanese oil polluted

- coastal and marine ecosystem. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2(6): 1-18.
- Martins, S. C. S., Martins, C. M., Fiuza, L. M. C. G. and Santaella, S. T. 2013. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*. 12(28): 4412-4418.
- Masy, T., Demanèche, S., Tromme, O., Thonart, P., Jacques, P., Hilgsmann, S. and Vogel, T. M. 2016. Hydrocarbon biostimulation and bioaugmentation in organic carbon and clay-rich soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 99: 66-74.
- Milinkovitch, T., Geraudie, P., Camus, L., Huet, V. and Thomas-Guyon, H. 2015. Biomarker modulation associated with marine diesel contamination in the Iceland scallop (*Chlamys islandica*). *Environmental Science and Pollution Research International*. 22(23): 19292-19296.
- Mnif, I., Mnif, S., Sahnoun, R., Maktouf, S., Ayedi, Y., Ellouze-Chaabouni, S. and Ghribi, D. 2015. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(19): 14852-14861.
- Mohamed, M., Yusup, S. and Maitra, S. 2012. Decomposition of study of calcium carbonate in cockle shell. *Journal of Engineering Science and Technology*. 7(1): 1-10.
- Mujahid, T. Y., Wahab, A., Padhiar, S. H., Subhan, S. A., Baloch, M. N. and Pirzada, Z. A. 2015. Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria from petrol contaminated soil. *Journal of Basic and Applied Sciences*: 223-231.
- Nanaki, E. A. and Koroneos, C. J. 2012. Comparative LCA of the use of biodiesel, diesel and gasoline for transportation. *Journal of Cleaner Production*. 20(1): 14-19.
- Niazy, Z., Hassanshahian, M. and Ataei, A. 2016. Isolation and characterization of diesel-degrading *Pseudomonas* strains from diesel-contaminated soils in Iran (Fars province). *Pollution*. 2(1): 67-75.

- Nikhil, T., Deepa, V., Rohan, G. and Satish, B. 2013. Isolation, characterization and identification of diesel engine oil degrading bacteria from garage soil and comparison of their bioremediation potential. *International Research Journal of Environment Sciences*. 2(2): 48-52.
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., Norf, H. and Kalogerakis, N. 2013. Enhanced *ex situ* bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids. *Marine Pollution Bulletin*. 77(1-2): 37-44.
- Nkem, B. M., Halimoon, N., Yusoff, F. M., Johari, W. L. W., Zakaria, M. P., Medipally, S. R. and Kannan, N. 2016. Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganu beach, Malaysia. *Marine Pollution Bulletin*. 107(1): 261-268.
- Nopcharoenkul, W., Pinyakong, O. and Netsakulnee, P. 2013. Diesel oil removal by immobilized *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. *Biodegradation*. 24: 387-397.
- Nowicka, D., Ginter-Kramarczyk, D., Holderna-Odachowska, A., Budnik, I., Kaczorek, E. and Lukaszewski, Z. 2013. Biodegradation of oxyethylated fatty alcohols by bacteria *Microbacterium* strain E19. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 91: 32-38.
- Ntougias, S., Melidis, P., Navrozidou, E. and Tzegkas, F. 2015. Diversity and efficiency of anthracene-degrading bacteria isolated from a denitrifying activated sludge system treating municipal wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 97: 151-158.
- Nwinyi, O. C., Kanu, I. A., Tunde, A. and Ajanaku, K. O. 2014. Characterization of diesel degrading bacterial species from contaminated tropical ecosystem. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57(5): 789-796.
- Ofoegbu, R. U., Momoh, Y. O. L. and Nwaogazie, I. L. 2015. Bioremediation of crude oil contaminated soil using organic and inorganic fertilizers. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*. 6(1): 1-6.
- Onur, G., Yilmaz, F. and Içgen, B. 2015. Diesel oil degradation potential of a bacterium inhabiting petroleum hydrocarbon contaminated surface waters and

- characterization of its emulsification ability. *Journal of Surfactants and Detergents*. 18(4): 707-717.
- Othman, N. H., Bakar, B. H. A., Don, M. M. and Johari, M. A. M. 2013. Cockle shell ash replacement for cement and filler in concrete. *Malaysian Journal of Civil Engineering*. 25(2): 201-211.
- Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G. A., Poliwoda, A. and Piotrowska-Seget, Z. 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(15): 9385-9395.
- Palanisamy, N., Ramya, J., Kumar, S., Vasanthi, N., Chandran, P. and Khan, S. 2014. Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 12(142): 1-8.
- Peixoto, R. S., Vermelho, A. B. and Rosado, A. S. 2011. Petroleum-degrading enzymes: Bioremediation and new prospects. *Enzyme Research*. 2011: 1-7.
- Pereira, H. 2015. The rationale behind cork properties: A review of structure and chemistry. *Bioresources*. 10(3): 6207-6229.
- Pontes, J., Mucha, A. P., Santos, H., Reis, I., Bordalo, A., Basto, M. C., Bernabeu, A. and Almeida, C. M. 2013. Potential of bioremediation for buried oil removal in beaches after an oil spill. *Marine Pollution Bulletin*. 76(1-2): 258-265.
- Prakash, A., Bisht, S., Singh, J., Teotia, P., Kela, R. and Kumar, V. 2014. Biodegradation potential of petroleum hydrocarbons by bacteria and mixed bacterial consortium isolated from contaminated sites. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*. 38: 41-50.
- Ramasamy, S., Mathiyalagan, P. and Chandran, P. 2014. Characterization and optimization of EPS-producing and diesel oil-degrading *Ochrobactrum anthropi* MP3 isolated from refinery wastewater. *Petroleum Science*. 11(3): 439-445.

- Rashidi, N. A., Mohamed, M. and Yusup, S. 2011. A study of calcination and carbonation of cockle shell. *International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*. 5(12): 1118-1123.
- Sagerup, K., Nahrgang, J., Frantzen, M., Larsen, L. H. and Geraudie, P. 2016. Biological effects of marine diesel oil exposure in red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) assessed through a water and foodborne exposure experiment. *Marine Environmental Research*. 119: 126-135.
- Santos, C. A., Lenz, D., Brandão, G. P., Chippari-Gomes, A. R. and Gomes, L. C. 2013. Acute toxicity of the water-soluble fraction of diesel in *Prochilodus vimbooides* Kner (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotropical Ichthyology*. 1(1): 193-198.
- Shen, T., Pi, Y., Bao, M., Xu, N., Li, Y. and Lu, J. 2015. Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. *Environmental Science: Processes and Impacts*. 17: 2022-2033.
- Sierra-Garcia, I. N. and Oliveira, V. M. 2013. Microbial hydrocarbon degradation: Efforts to understand biodegradation in petroleum reservoirs. *Biodegradation - Engineering and Technology*: 47-72.
- Simons, K. L., Sheppard, P. J., Adetutu, E. M., Kadali, K., Juhasz, A. L., Manefield, M., Sarma, P. M., Lal, B. and Ball, A. S. 2013. Carrier mounted bacterial consortium facilitates oil remediation in the marine environment. *Bioresource Technology*. 134: 107-116.
- Sonawdekar, S. 2012. Bioremediation: A boon to hydrocarbon degradation. *International Journal of Environmental Sciences*. 2(4).
- Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C. and Ciani, M. 2012. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 66(1): 39-46.
- Tao, X. Q., Liu, J. P., Lu, G. N., Guo, X., Jiang, H. P. and Sun, G. Q. 2010. Biodegradation of phenanthrene in artificial seawater by using free and immobilized strain of *Sphingomonas* sp. GY2B. *African Journal of Biotechnology*. 9(18): 2654-2660.

- Tyagi, M., Fonseca, M. M. R. and Carvalho, C. C. C. R. 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*. 22(2): 231-241.
- Victor, T. O., Celestine, U. A., Emmanuel, O. E. and Oluwatayo, M. 2015. Biostimulation of hydrocarbon utilizing bacteria in soil contaminated with spent engine oil using banana and plantain agro-wastes. *Journal of Soil Science and Environmental Management*. 6(8): 225-233.
- Wang, Z. Y., Xu, Y., Wang, H. Y., Zhao, J., Gao, D. M., Li, F. M. and Xing, B. 2012. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. *Pedosphere*. 22(5): 717-725.
- Woolfenden, E. N. M., Hince, G., Powell, S. M., Stark, S. C., Snape, I., Stark, J. S. and George, S. C. 2011. The rate of removal and the compositional changes of diesel in Antarctic marine sediment. *Science of the Total Environment*. 410-411: 205-216.
- Xiong, W., Bernesky, R., Bechard, R., Michaud, G. and Lang, J. 2014. A tiered approach to distinguish sources of gasoline and diesel spills. *Science of the Total Environment*. 487: 452-462.
- Xu, Y. and Lu, M. 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazard Materials*. 183(1-3): 395-401.
- Yamauchi, T., Shimamura, S., Nakazono, M. and Mochizuki, T. 2013. Aerenchyma formation in crop species: A review. *Field Crops Research*. 152: 8-16.
- Yan, S., Wang, Q., Qu, L. and Li, C. 2014. Characterization of oil-degrading bacteria from oil-contaminated soil and activity of their enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 27(4): 3932-3938.
- Yasin, G., Bhangar, I., Ansari, T. M., Muhammad, S., Naqvi, S. R. and Talpur, F. N. 2012. Quality of commercial high speed diesel and its environmental impact. *Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels*. 3(3): 29-35.
- Zanaroli, G., Toro, S. D., Todaro, D., Varese, G. C., Bertolotto, A. and Fava, F. 2010. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched

- from a nonacclimated, complex source of microorganisms. *Microbial Cell Factories*. 9(10): 1-13.
- Zhang, H., Tang, J., Wang, L., Liu, J., Gurav, R. G. and Sun, K. 2016. A novel bioremediation strategy for petroleum hydrocarbon pollutants using salt tolerant *Corynebacterium variabile* HRJ4 and biochar. *Journal of Environmental Sciences*: 1-7.
- Zhang, X., Liu, X., Wang, Q., Chen, X., Li, H., Wei, J. and Xu, G. 2014. Diesel degradation potential of endophytic bacteria isolated from *Scirpus triqueter*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 87: 99-105.
- Zhang, X., Shang, Q., Zheng, H. and Zhong, Z. 2016. Study on the building mechanism of straw immobilized microorganisms. *International Conference on Electrical, Mechanical and Industrial Engineering (ICEMIE 2016)*: 314-317.
- Zhang, X., Wang, Z., Liu, X., Hu, X., Liang, X. and Hu, Y. 2013. Degradation of diesel pollutants in Huangpu-Yangtze river estuary wetland using plant-microbe systems. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 76: 71-75.
- Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T. and Scherr, K. E. 2012. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*. 209: 138-146.



ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ข. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม
เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม

นำสารส่วน ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. แล้วปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายส่วน ข. ที่เตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป Acrodise[®] syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.2 ไมโครเมตร ลงในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. แล้วปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีการเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยละลายผงวุ้น ปริมาตร 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงไปในอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มี Luria-Bertani (LB) ความเข้มข้น 10%

ก. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโคเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ทริปโตน (tryptone)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.5	กรัม
ข. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม
เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม

นำสารส่วน ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำละลายส่วน ข. ที่ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป Acrodise[®] syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.2 ไมโครเมตร ลงในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มิลลิลิตร

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำกลั่นปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำกลั่นปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0 มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0 มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5. ไลโซไซม์ (Lysozyme)

ชั่ง lysozyme น้ำหนัก 60 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. สารละลาย 20% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 20 กรัม ค่อย ๆ ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 70 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำกลั่นปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

7. สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

8. สารละลาย CTAB/NaCl (10% CTAB ใน 0.7 M NaCl)

CTAB	10 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7 โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

9. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. สารละลาย RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

11. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Trisma base	242 กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1 มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

12. บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE)

บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า	20 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	980 มิลลิลิตร

ผสมน้ำกลั่นกับบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า จนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาในภาชนะที่สะอาดและมีฝาปิด

13. เอทานอล 70%

เตรียมเอทานอล 99% ปริมาณ 700 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นที่ปลอดประจุ 300 มิลลิลิตร

14. อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9%

อะกาโรสเจล	0.9 กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100 มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

CHULALONGKORN UNIVERSITY

15. อะกาโรสเจลเข้มข้น 2%

อะกาโรสเจล	2 กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100 มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

16. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์	0.1 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	10 มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันและเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกัน เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์มีสมบัติในการก่อมะเร็ง)

17. 50% denaturing solution

40% อะคริลาไมด์/บิส	3.26 มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	0.3 มิลลิลิตร
ฟอร์มาไมด์	3 มิลลิลิตร
ยูเรีย	3.1 มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.3 มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 10%	81 ไมโครลิตร
TEMED	4.5 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุ	4.5 มิลลิลิตร

18. 70% denaturing solution

40% อะคริลาไมด์/บิส	3.34 มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	0.3 มิลลิลิตร
ฟอร์มาไมด์	4.2 มิลลิลิตร
ยูเรีย	4.3 มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.3 มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 10%	81 ไมโครลิตร
TEMED	4.5 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุ	4.5 มิลลิลิตร

19. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต
น้ำปลอดประจุ

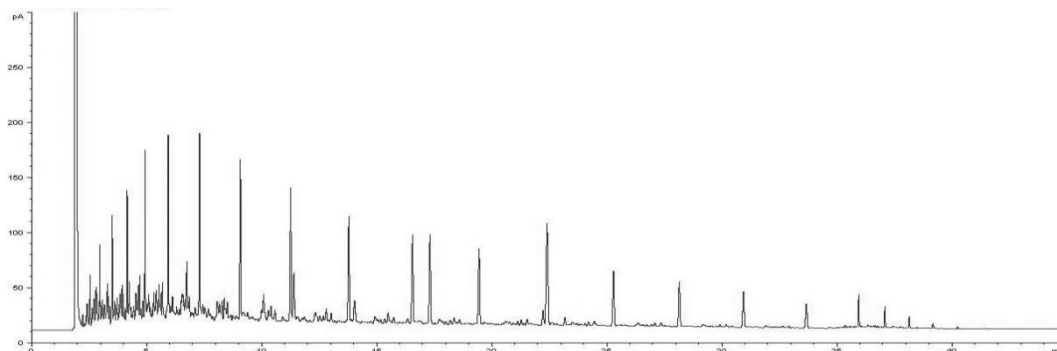
0.1 กรัม

1 มิลลิลิตร

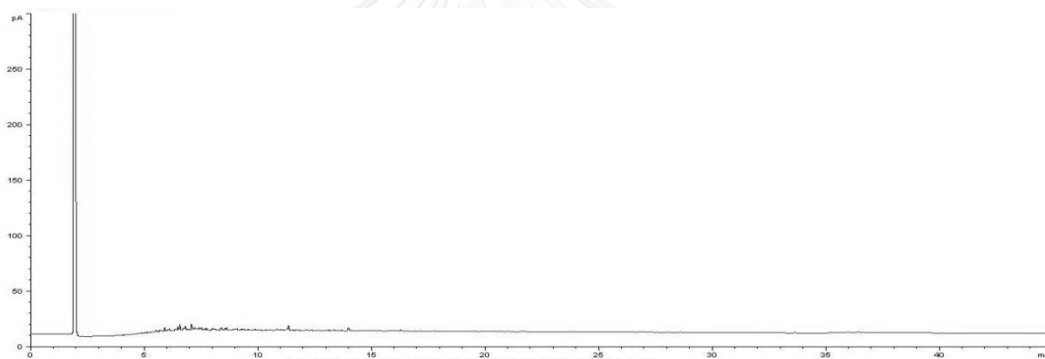


ภาคผนวก ค

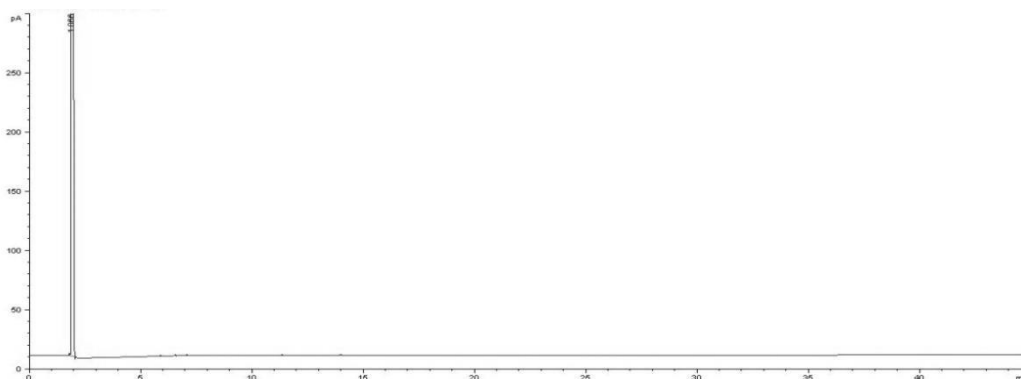
โครมาโทแกรมของดีเซลและกลุ่มแบคทีเรียที่เรียงบนเปลือกหอยจากการวิเคราะห์ด้วย GC



รูปที่ ค1. โครมาโทแกรมของดีเซลวันที่ 0



รูปที่ ค2. โครมาโทแกรมของอาหารเหลวที่มีกลุ่มแบคทีเรียที่เรียง (8 log CFU/มล.) บนเปลือกหอย
วันที่ 7



รูปที่ ค3. โครมาโทแกรมของเปลือกหอยที่มีกลุ่มแบคทีเรียที่เรียงวันที่ 7

ภาคผนวก ง

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ 16S rDNA

ตารางที่ ง1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลตเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank

ไอโซเลต	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA	Accession number	% ความเหมือน
1	CGACTTACCCCAAGTCATGAATCACTCCGTGGTAACCGTCCCTTGGGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAACC CACTCCCATGGTGTACGGCCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTAATCACCGTGACATTTCTGATTCACGATTAC TAGCGATCCGACTTCAGCGAGTCGAGTTGCAGACTCGGATCGGATACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCAC CTCGGGCTTGGCAACCCCTTGTACCGACCAATTTAGCACAGTGTAGCCCTGAGCCCTGAGGATGATGACTT GACGTATCCCCACTTCTCCGGTTGTACCGGAGTCTCTTAGAGTGCCACCAGGCTGCTGGTAACTAA GGACAAAGGTTGGCTGTTACGGGACTTAAACCAACATCTACGACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCT GTGCTGAGTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAGTTCTAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGC GTTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGTTGTGGGGCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGGCGG CGTACTCCCAAGCGGTGACTTATCGGGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACA TCGTTTACGGGTGACTACAGGGTATCTAATCCTGTTGTCTCCACGCTTTCGACCTCAGTGTCAAGTATCAG TCCAGGTGCTCGCTTCGCCACTGGTTCCTTCCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGGAAATCCACCAC CCTTACCGTACTTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCAAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACTTGCT GAACCACTAGCGGGCTTACGCCAGTAATCCGATTAAGCTTGACCCCTCGTATTACCGGGGCTGCTGGCA CGAAGTTAGCGGGTCTATTCTGTTGGTAACTCAAAAACAGCAAGGATTAACCTTACTGCCCCCTCCCAACTT AAAGTCTTTACAATCCGAAGACTTCTTACACACCGCGGATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCAATTTGTTCCAAAT TCCCCACTGCTCCCGTAGGAGTGGACCGTCTCAGTTCAGTGCAGTGCATCCTCTCAGACCCAGTT ACGGATCGTCCCTTGGTAGGCCCTTACCCCAACTAGCTAACTCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGGTGAGGT CCGAAGATCCCCACTTCTCCCTCAGGAGTATGCGGATTAAGCCCGGTTCCGGACGTTATCCCCCACTACCA GGCAGATTCTTAGGCATTACTACCCGTCGGCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTTCATCCGCTCGACTTGCA TGTTGATAGGCTCGCCAGCGGTTCAATCT	CP015877.1	100

ตารางที่ ง1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลตเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank (ต่อ)

ไอโซเลต	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA	Accession number	% ความเหมือน
2	CTGGTAGGACTTCAACCCAGTCAATGGCCACAGTGGAAGCGCCCTCCGGAAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGT GCAACAACTCCATGGTGTACGGGGGGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGAGCAATGATGATCTG CGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAAATCCGGACTGAGATAGGGTTCTGGGATT GGCTCACCGTCCCGGGTTGACGCCCTCTGTCCCTACCAATGTAGTAGGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCAT GATGACTTGACGTATCCCACTTCTCCGGTTGTACCGGGGTCTCTTAGAGTTCCACCATACGTGCTG GCAAGTAAGGACAAGGGTTGGCTGTTGGGGACTTAACCCAAACATCTCAGCACAGACTGACGACAGCCATG CAGACCTGTGTACGGTTCGGAAAGGCAACATCCATCTCTGGAAAGTTCCGTGCAATGTAAGGCCAGGTAAGG TTCTTGGGTTGCATGGAAATTAACCCACATACCTCACCGCTTGGGGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGT CTTGGGTTCCGTTCCAGGGGGGACTTAACGGGTTAGCTTCGATACTGGTGGCCAAATTCACCCAAACATCCA GTTCCGATCGTTTAGGGGTGGACTACAGGGTATCTAATCTGTTTGTCCCAAGCTTCGTGCCTCAGTGTC GTGTTGGCCAGGAGTCCCTTCCAGGGGATGTTCCCTCTGATCTACGCATTTCACTGTACACCCAGGAATT CCACTACCTCTGCCACACTAGTCAACCCAGTTTCCATCGCAATTCACAGGTTGAGCCAGGGCTTTCACGACAG ACTTAATCAACCACTAGGACGCTTACGCCAGTAATCCGAGTAACGTTGCACCCCTTCGTATTACCGGGCT GCTGGCAGAAAGTTAGCCGGTCTTATCTTTGGGTACCGTCAGAACAAATCGGGTATTAAACCGACTGCTTTCTTT CCCAACAAAAGGGCTTACAACCCGAAAGGCTTCTTACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCCATTG TCCAAATTTCCCACTGCTCCCTCCGTAGGAGTCTGACCCTGTCAGTTCCAGTGTGGGTGATCATCCTCTCA GACCAGTACCGATGCTGCCCTTGGTGGCTCTTACCCCGCAACTAGTAAATCGGGCATCGGCTCACTTTCTTCG CGCCAGGCCCGAAGTCCCGGCTTACCCCGTAGGTCGTAGGGTATTAGGGTAAGTTCCCTACGTTATCCC CCACGAAAGAGTAGATCCGATGCAATCTCACCCGTCGCCACTGCCACCCAGAGCAAGCTCTCCTGTGCT GCCGTTGACTTGCAATGTTAGGGCTACCGCCAGCGTTCACTCTGAGCCCTGA	AY654621.1	99

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลตเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank (ต่อ)

ไอโซเลต	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA	Accession number	% ความเหมือน
3	GTTACGATTCACCCCAAGTGGCTGACCTACCGTGGTGGCTTGCCTCTTGGGTTAGCACAGCGCCTTCGGGT AAAACCAACTCCCATGTGTGACGGGGGGTGTACAAAGGCCGGGAACGTATTACCCGGGCATGCTGATCCGC GATTACTAGCGATTCCAACATTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAAATCCGAACCTGAGATGGCTTTGGAGATTAGC TCACACTCGGTGCTCGCTGCCACTGTCAACACCATTTAGCACAGTGTAGCCAGCCGCTAAGGGCCATGAG GACTTGACGTATCCCCACCTTCTCTGGCTTATCACGGCAGTCCCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAA CTAAGGGGAGGGTTGGCTGTTGGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC ACCTGTCTCGATCAGCCGAAGTGAAGGATAGTGTCTCACTAACCCGGATCGGGATGTCAGGGCTGGTAAAGG TTCTGGGGTTGCTTGAATTAACCACATGCTCACCCGCTTGTGGGGCCCCGTCATCTCTTGAAGTTTAAAT CTTGCGACCAAGTCGACGTCCCCAGGGGAATGTTAAATGCGTTAGCTGCGCCACCGAAGATAACTCCCCAAC GGCCTAACATTCATCGTATTACGGGGCCCACTACAGGGTATCTAAATCTGTTTGTCTCCACAGCTTCGACACCTC AGCGTCAGTAAATGTTCCAGTGGCGGCTTCCGCACTGGTGTCTCCGAAATATCTACGAAATTTCACTCTACACT CGGAATCCACTCACTACCATCAAGACTAAGAGTAAAGAGTAAAGGGAGTTCCGGGGTTGAGCCCCGGGATTC ACCCCTGACTTATAGCCCGCTACGTGGCTTTACGCCAGTAAAATCCGAACAACGGCTAGCCCCCTTCGTATTAC CGGGTGTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCCGGTTACCGTCAATTACTTACCGGTGAAAGAGCTTT ACAACCTAGGGCTTTCATCACTACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTGGCCCATTTGCCAATATCCCCACTG CTGCCCTCCGTAAGAGTCTGGGCGGTGTCAGTCCCAAGTGGGTGATCATCTCTCAGACCAAGTATGGATCG TCGCCTTGGTAGGCCTTACCCCAACCAACTAGCTAATCCAAACGGGGCCGATCATTTGCCGATAAATCTTCCCCC CCATAAAATGCCAGGGCATTTATGATTCCTGAAATTTAAAGGGGGCTCATACGGTATTAGCACAAAGTTTCCCT GACTTATCCGTAGCACATGGTAGTCCACGCGTTACTACCCGCTGACCCGCTGACCCGAAAGGGCCGCTCG ACTTGATGTATAAGCTGCCCCAGGGTTCTGTTCTGAAACCATGATCCAAACT	JQ518359.1	99

ตารางที่ ง1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลตเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank (ต่อ)

ไอโซเลต	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA	Accession number	% ความเหมือน
4	TGTTCAAGGTCGCTAGTGGGGTCCCGTCAATTTCTTTGTGTTTTAGCCTTGGGGCCGAAATGGCCAGCGGGGA CTTAATGCGTTAGCTGCGTCACGGAAATCCGTGGAATGGACCCACAACCTAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACT ACCAGGGTATCTAAGCCTGTTGCTCCCCACCTTTCCGCTCCTCAGCGTCAGTTAGGGCCAGAGATCGCCTTCG CCATCGGTTCCTCCTGATATCTGCATTCACCGCTACACAGAAATCCAATCTCCCTACCGCACTCTAGT CTGCCGTACCACCTGAGGCCGAGGTTAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGGACAAACCGCTACGAGCTC TTTACGCCCAATAATTCGGATAACGCTTGGCCCTACGTAATACCGGGCTGTGGCACGTAAGTTAGCCGGCGC TTTTTCTGCAGGTACCGTCACTCGCTTCCTTCCCTGTAAAAGAGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCAC GCGGGTTGCTGCATCAGGTTCCGCCAATGTGCAATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGT GTCTCAGTCCAGTGTGGCGGTACCTCTCAGGCCGCTACCGCTCGACGCTTGGTGAGCCATTACCTCAC AACAAAGCTGATAGGCCGGAGCCCATCCCAACAAAAATTTTCCAACTGAAGATGCTTGGCGGTTCTGT ATCCAGTATTAGACCGCTTCCAGCGCTTATCCAGAGTCAGGGGCAGGTTGCTCACGTTACTCACCCGTTCCG CCACTGATCCACAGGAGCAAGCTCCCGCTTACCGTTCCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTTCATCC TGAGCTGTGACAAAAATCTATAGAGGAGCCGGGAAAAATGGCGAAAGAGGCGGGATAAAATCTCGAAGGCCGA GTTTTTTAAGCCCCAAAAAGGGGGGAAAGGGCGGCCACACCGCACTCAACGGCTCCGCTCTCCGCTCTC CTCACACGGCGTTCCTGTCTCGTCTCTCTCTACTCTCGGCTCTCGGCTCTCGGCTCGGGAGATTCTCTCACAC ACCGGCAGCGTCTCTCTCTGTTCCATCCCGTCTCTCTTCTCTCTCTCACCTCTCTGTTATCTACT CTCCTCTCTACTCTCACTCGGCTGTGCTGTCCTGTCTACTCTCTGCACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTCTCTCGCTACCT CTCCTAGGCCTCCACACCTCTCCACCTTCT TTGCTTTGCT	KR906353.1	99

ตารางที่ ง1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลตเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank (ต่อ)

ไอโซเลต	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA	Accession number	% ความเหมือน
5	GAAGGGGGTTTTCTGGTTCCTTACGGCAGCCAAAGGCCCGAAAGCCGGGGGGGAAACGTTTACGGGTTTCCC TGTTACGACTTACCCCAAGTCGGCTGACCCACCGTGGTGCAGCTGCCTCTTGGGGTTAGCGCATCGCCTTCGGGT AAAACCAACTCCATGGTGTACGGGGGGGTGTACAAGCCCGGAAAGTATTACCCGGGCATGCTGATCCGC GATTAAGCGATTCCAACTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGAATCCGAACTGAGATGGCTTTTGGAGATTAGC TCGACATCGCTGTCGGCTGCCACTGTCAACCACTTGTAGCACGTGTAGCCAGCCGTAAGGGCCATGAG GACTTGACGTATCCCACTTCTCTGGCTTATCACGGCAGTCCCTTAGAGTGCCTCACTGAATGCTGGCAA CTAAGGGCAGGGTTGGCTCTGGGACTTAACCCAACTCAGACACGAGCTGACGACAGCCATGCGAGC ACCTGTTGGTCCAGCCGAACTGAAGGAAACATCTGTAAATCCGGACCGACATGTCGAAGGCTGTTAAGG TTCTGGCGGTTGCTCGAAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAAT CCAATGGAGTCTCCAGCGGATGTTATGCGTTAGCTGCGCCACCGACATGATGATGCGGACGCTAACATTT CATGTTTAGGGGTGGACTACAGGGTATCTAATCTGTTGCTCCCGAGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTAAT GGACCAAGTAAAGCCCTTCGCCACTGGTTCCTCCGAAATCTACGAAATTCACCTTACACTCGGAATCCACT TACCTTTCATACTAGGTACCCAGTATCAAGGCAGTCCGGAGTTGAGCTCGGGATTCACCCCTGACTTA AATACCCGCTACGTGGCTTAGGCCAGTAAATCCGAACAAAGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGGGGCTGCTG GCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTCCGGTTACCGTCAATATCTTACCGGTGAAAGAGCTTTACAACCCCTAGGG CCTTCATCACTCAGGGGCATGGCTGGATCAGGCTGGCCCCATGTCAAATTTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG GAGTTTGGCCGTTCTCAGTCCCAGTGGCTGATCATCTCTCAGACCAAGCTATGGATCGTCGCCCTTGGTAGG CCTTACCCCACTAAGTAAATCCAAAGCGGGCTCATCAACTCCGATAAATCTTTCCCCGAAAGGGGATAC GGTATTAGCACAAAGTTCCCTGAGTTATCCGTTAGAGTTGGGTAGATCCACAGGCTTACTCACCCGCTGCCACT CCCCTTGGGGGGCTTCGACTTGATGTTAAGCCTGCGCCAGCGTTCGTTCT	JX878616.1	99

ตารางที่ ง1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลตเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank (ต่อ)

ไอโซเลต	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA	Accession number	% ความเหมือน
6	GTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGATATTCACCGGACATGCTGATCCGGCATTAAGCGATTACTAGCGATTCCTCGA CTTTCATGCAGGGGAGTTGCAGCCTGCAATCCGGACTACGATCGGGTTCTGGGATTGGCTCCCCCTCGGGGTTG GCGACCTCTGTCCGACCAATTGATGACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCAATCCC CAGCTTCCTCCGGTTGTACCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCTTCGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCCGTCG TTGGGGACTTAACCAACATCTCAGCACGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTGTCCGGTTCTCTTG GAGCACATTTAATCTTTAAAGCTTCAGACATGTCAAGGGTAGGTAAGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATC CACATCATCACCGCTTGTGGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTTGGACCGTAAATCCCCAGGGGGT CACTTCACGGCTTAGCTGCGTACTAAGGCCGAAAGGCCCAAAGCTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTA CCAGGGTATCTAATCTGTTGTCCCGCAGCTTTCGTCATGAGGTCAGTATATCCAGGGGGCTGCCTTCGC CATCGGTAATCCTCCACATCTACGCAATTCACCTGCTACACGTGGAATTCACCCCTCTGACATACTAGTT CGAGAGTTAAAAATGCAGTCCAAAGTTAAGCCTGGGATTCACATCTTTCTTCGAAACCGCCTGGGACGCTT TAGCCAGTAAATCCGATTACGCTTGCACCTACGTAATACCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTCTTA TTCTGCAGGTACCGTCAGTTGGCCAAATTAATTCAGCGCGGTTTCTCCCTGCCAAAAGTGCTTTACAACCCGA AGGCCTTCATCGACACGGGGATGGCTGGATCAGGGTTGCCCAATGTCAAAAATCCCACTGCTGCCTCCC GTAGGAGTCTGGGCCGTCTCAGTCCAGTGTGGCTGGTCTCTCAAACAGCTACAGATCGTTGCCCTGG TAGGCCTTACCCACCAACTAGCTAATCTGATATCGCCCGTCCAAATAGTAGAGGCTTTGCCATCCCCCTTT CCCCCGTAGGGCGTATGGGTAATAGCCACGCTTTCCGGTAGTTATCCCCGCTACTGGGCACGTTCCGATATATT ACTCACCCGTTGCCACTCGCCGCGAAGCGAAGTTCCGGCTGCCGTTGCATGTGTAAGAGCATCCCG CTAG	JF714704.1	99

ตารางที่ ๗1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลตเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank (ต่อ)

ไอโซเลต	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA	Accession number	% ความเหมือน
7	TTACCTGTACGACTTACCCAGTCATGAATCACTCGTGTAAACCGTCCCGGAAAGTTAGACTAGTACTT CTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTACGGGGGGTGTACAAAGGCCCGGAAAGTATTCACCGTGACATTTCTGA TTCAGATTACTAGCGATTCCGACTTACGGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGG ATTAGCTCCACCTCGGGCTTGGCAACCTTTGTACCGACCAATTGAGCAGGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGC CATGATGACTTGACGTACATCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCTTAGAGTGCCACCTTAACGTG CTGGTAACTAAGGACAAGGTTGCGCTGTTACGGGACTTAAACCAACAATCTACGACACGAGCTGACGACAGCC ATGCAGCACCTGTGCAGAGTTCCGAAAGGCACCAATTCATCTCTGAAAGTTCTCTGCATGTC AAGGCTGGTAA GGTTCTTCGGGTTGCTCGAA TTAACACACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTA ACCTTGGGGCGTACTCCCAGGGCTGACTTAA TGGGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGG CTAGTCGACATGTTTACGGGGTGGACTACAGGGTATCTAA TCCCTGTTTGTCCCGACGGCTTCGACCTCAGTG TCAGTATTAGCCAGGTGGCTTCGCCACTGGTGTCCCTCCTATATCTACGCAATTCACCGCTACACAGGAA ATCCACCAACCTCTGCCATCTCTAGTCAGACAGTTTGGATGCAATTCACAGTTGAGCCCGGGCTTTCACAT CCAACTTAAACCACTACGGCGCTTACGCCAGTAA TCCGATTAACGCTTGCACCCCTTCGTA TTAACCGCG GCTGCTGGCAGGAAGTTAGCCGGTCTTATCTGTGGTAAGTCAAGTCAAAACAGCAAGATATTAACTTACTGCCCTTC CTCCCAACTTAAAGTGCTTACAATCCGAAGACCTTCTCACACAGCGGCGATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCAT TGTCCAATATCCCACTGCTGCCCTCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCATCTCT CAGACCAGCTACGGATCGCTTGGTGGCTTTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGGTA GCGGAGGTCGGAAGATCCCGCGCTTCTCCCGTAGGAGTATGCGGATATTAGCTCGAGTTTCCCGGAGTTATCC CCCACTACAGGCAGATTCTTAGGCATTACTACCCCGTCCCGCGCTCGCCGGCATCCCGAAGGACCCGCTGCCCG TCGACTTGCATGT	DQ272580.1	99

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธัญชนก สุเริงฤทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 18 ธันวาคม พ.ศ. 2532 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ในปีการศึกษา 2554 และเข้ารับการศึกษาคือต่อในระดับปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอในรูปแบบรายงานการประชุม (proceeding)

Surengrit, T. and Pattaragulwanit, K. 2015. Immobilization of bacterial consortia on cockle shell for diesel bioremediation. p 361-366. poster code P-EB-10. Proceedings of the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, November 17-20, 2015, Mandarin Hotel Bangkok by Centre Point, Bangkok, Thailand.

