

ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่คัดแยกจากดินตะกอน  
บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด ประเทศไทย



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  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2558  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CRUDE OIL BIODEGRADATION EFFICIENCY OF *Exiguobacterium* sp.  
AO-11 ISOLATED FROM AO PHRAO'S SEDIMENT SAMET ISLAND, THAILAND

Miss Phadungkwan Srisuwankarn



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Science

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของ  
*Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่คัดแยกจากดินตะกอน  
บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด ประเทศไทย

โดย

นางสาวผดุงขวัญ ศรีสุวรรณภาพ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.อรุทัย ภิญญาคง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนทร ชูตินธรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทรรศนีย์ พุกกาสิทธิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุทัย ภิญญาคง)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญใจ สมพงษ์ชัยกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดิ์)

ผดุงขวัญ ศรีสุวรรณภาพ : ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่คัดแยกจากดินตะกอนบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด ประเทศไทย (CRUDE OIL BIODEGRADATION EFFICIENCY OF *Exiguobacterium* sp. AO-11 ISOLATED FROM AO PHRAO'S SEDIMENT SAMET ISLAND, THAILAND) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์  
 หลัก: รศ. ดร.อรุณทัย ภิญญาคง, 156 หน้า.

จากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นในอ่าวไทยบริเวณนอกชายฝั่งของเกาะเสม็ดเมื่อเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 ซึ่งเหตุการณ์ในครั้งนี้ถือได้ว่าเป็นหนึ่งเหตุการณ์ที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณชายฝั่งของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ และทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยตัวอย่างดินและดินตะกอนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ถูกเก็บมาจาก 12 บริเวณใกล้กับชายหาดของอ่าวพร้าว ซึ่งเก็บภายหลังจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลประมาณ 1 สัปดาห์ และ 1 เดือน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้น้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นแหล่งพลังงาน แต่เนื่องจากการนำกลุ่มแบคทีเรียไปใช้ในการบำบัดอาจมีข้อจำกัดจึงคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากกลุ่มแบคทีเรียและระบุชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า *Exiguobacterium* sp. AO-11 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ดีที่สุดในงานวิจัยนี้โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เท่ากับประมาณ 90% ในระยะเวลา 10 วัน และเนื่องจากการมีลักษณะสมบัติที่ส่งเสริมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบและยังไม่มีรายงานการก่อโรคจึงเลือกใช้ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ในการบำบัดดินทรายที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ 4% (มวล/มวล) จากผลการวิเคราะห์ 16S Metagenomic analysis พบว่าสามารถตรวจพบ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่เติมลงไปได้ในวันที่ 20 เท่านั้น ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะเข้ามามีบทบาทในการย่อยสลาย อัลเคนสายยาวและอัลเคนสายกลางในช่วงแรก จึงอาจส่งผลให้แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบเพิ่มจำนวนมากขึ้น อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าการเติม *Exiguobacterium* sp. AO-11 ธาตุอาหาร และสารกระจายน้ำมันต่างช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ดังนั้นการใช้ทั้ง 3 วิธีร่วมกันคือการเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ การเติมธาตุอาหาร และการเติมสารกระจายน้ำมัน จึงถือเป็นวิธีที่เหมาะสมและเป็นแนวทางในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก .....

# # 5787192220 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEYWORDS: BIOREMEDIATION / BIOAUGMENTATION / EXIGUOBACTERIUM / CRUDE OIL-CONTAMINATED SANDY SOIL

PHADUNGKWAN SRISUWANKARN: CRUDE OIL BIODEGRADATION EFFICIENCY OF *Exiguobacterium* sp. AO-11 ISOLATED FROM AO PHRAO'S SEDIMENT SAMET ISLAND, THAILAND. ADVISOR: ASSOC. PROF.ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D., 156 pp.

The oil spill in the Gulf of Thailand, off the coast of Samet Island in July 2013 is regarded as one of the serious environmental disasters in Thailand, especially in Ao Phrao, Samet Island. The aim of this study is to isolate crude oil-degrading bacteria and examine its ability to remediate crude oil-contaminated sandy soil. Soil and sediment samples used in this study were collected approximately one week and one month after the oil spill incident. These samples were collected from twelve locations near Ao Phrao beach. Indigenous crude oil-degrading bacterial consortia can be enriched by using 0.25% (v/v) crude oil as the sole carbon source. Due to the limitation of consortia, individual bacterial strains showing crude oil degradation ability were isolated from the consortia and identified by 16S rDNA sequence analysis. As a result, *Exiguobacterium* sp. AO-11 capable of degrading 91.6% of 0.25% (v/v) crude oil within 10 days was the most efficient strain in this study. Because of its characteristics that enhanced capable of degrading crude oil and non-pathogenicity, *Exiguobacterium* sp. AO-11 could be the potential candidate for remediation of 4% (w/w) crude oil-contaminated sandy soil. The results of 16S Metagenomic analysis indicated that *Exiguobacterium* sp. AO-11 was detected only at days 20. As this strain plays the role in degradation of long-chain alkane and medium-chain alkane, this characteristic could enhance the growth of other crude oil-degrading bacterial strains. Nevertheless, the result indicated that the addition of *Exiguobacterium* sp. AO-11, nutrient and dispersant could increase the crude oil degradation efficiency. Therefore, the combination of three treatments, Bioaugmentation Biostimulation and Dispersant, was appropriate approach for the remediation of crude oil contaminated sandy soil.

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

Academic Year: 2015      Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยถ่ายทอดความรู้และให้คำปรึกษา รวมทั้งคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทรรศนีย์ พฤกษาสีทธิ์ ที่กรุณารับเป็นประธานขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญใจ สมพงษ์ชัยกุล และรองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี ในความกรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์พร้อมทั้งให้คำแนะนำเพื่อปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุชนา ชวนิชย์ อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งที่ให้ความอนุเคราะห์ในส่วนของ การเก็บตัวอย่างดิน

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ คุณชนกภรณ์ เมืองจินดา ในส่วนของการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ 16S Metagenomic analysis และคอยให้คำปรึกษา รวมทั้งความช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบพระคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการ 1704/15 1704/14 1704/13 และ 1704/12 ที่คอยให้คำแนะนำและคำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัย รวมทั้งเพื่อนๆ และน้องๆ หลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมที่คอยให้ความช่วยเหลือ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ นายชัยศักดิ์ และนางสมหมาย ศรีสุวรรณภาพ ผู้เป็นบิดามารดา ที่คอยให้กำลังใจและให้ความสนับสนุนตลอดมา

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูป.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	4
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
1.4.1 ตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอนที่ใช้ในงานวิจัย.....	4
1.4.2 เพิ่มจำนวนและทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการ ย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอนบริเวณอ่าวพร้าว เกาะ เสม็ด จังหวัดระยอง.....	4
1.4.3 คัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์.....	4
1.4.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ.....	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 องค์ประกอบและความสำคัญของน้ำมันดิบ.....	7
2.2 สาเหตุของน้ำมันที่ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม.....	9
2.2.1 สาเหตุเกิดจากการซึมของน้ำมันตามธรรมชาติ (Natural oil seepage).....	9
2.2.2 สาเหตุเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์.....	10

2.2.2.1 การสำรวจและขุดเจาะน้ำมัน.....	10
2.2.2.2 การรั่วไหลของน้ำมันจากการขนส่ง .....	10
2.2.2.3 การปนเปื้อนจากการนำน้ำมันมาใช้.....	10
2.3 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อม.....	11
2.3.1 ตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นในประวัติศาสตร์โลก.....	11
2.3.1.1 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลจากอุบัติเหตุของเรือบรรทุกน้ำมัน Exxon Valdez.....	11
2.3.1.2 เหตุการณ์สงครามอ่าวเปอร์เซีย.....	11
2.3.1.3 เหตุการณ์เรือบรรทุกน้ำมัน Prestige จมลงบริเวณนอกชายฝั่งประเทศสเปน .....	11
2.3.1.4 เหตุการณ์แท่นขุดเจาะน้ำมัน Deepwater Horizon ระเบิด.....	11
2.3.2 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลในประเทศไทย .....	12
2.4 ผลกระทบต่อระบบนิเวศชายฝั่ง.....	18
2.5 กระบวนการบำบัดพื้นที่บริเวณชายฝั่ง.....	19
2.5.1 การฟื้นฟูโดยธรรมชาติ .....	19
2.5.2 การกำจัดน้ำมันโดยวิธีทางกายภาพและเคมี .....	19
2.5.3 การบำบัดภายในพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อน .....	19
2.6 การบำบัดภายในพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนโดยวิธีทางชีวภาพ .....	20
2.6.1 การเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Bioaugmentation).....	21
2.6.2 การกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย (Biostimulation).....	23
2.7 การย่อยสลายน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน .....	24
2.7.1 วิธีกรย่อยสลายประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ .....	26
2.7.1.1 วิธีกรย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน.....	26
2.7.1.2 วิธีกรย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน.....	26



2.7.2 ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ส่งเสริมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ .....	27
2.7.2.1 การมีเอ็นที่เกี่ยวข้อกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ.....	27
2.7.2.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์.....	29
2.8 การทดสอบประสิทธิภาพในสภาวะจำลองในระดับห้องปฏิบัติการ.....	30
2.9 การตรวจติดตามการบำบัดโดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล.....	31
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	33
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
3.2 เคมีภัณฑ์ สารเคมีทั้งหมดเป็นสารเคมีเกรดงานวิเคราะห์ (analytical reagent) .....	34
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	38
3.3.1 เพิ่มจำนวนและทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการ ย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอน บริเวณอ่าวพร้าว เกาะ เสม็ด จังหวัดระยอง.....	38
3.3.1.1 ตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอน.....	38
3.3.1.2 วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบโดยวิธี Most Probable Number (MPN).....	40
3.3.1.3 ตรวจสอบเอ็นที่เกี่ยวข้อในการย่อยสลายน้ำมันดิบของตัวอย่าง .....	41
3.3.1.3.1 สกัดดีเอ็นเอของตัวอย่าง.....	41
3.3.1.3.2 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ.....	41
3.3.1.3.3 เพิ่มจำนวนและตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA	42
3.3.1.3.4 ตรวจสอบเอ็นที่เกี่ยวข้อในการย่อยสลายน้ำมันดิบ .....	42
3.3.1.4 เพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย วิธีเอนริชเมนต์ .....	44

3.3.1.5 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียที่ คัดแยกได้ .....	44
3.3.1.5.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย .....	44
3.3.1.5.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ.....	45
3.3.1.5.3 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ GC-FID.....	45
3.3.1.5.4 สกัดและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่จากการย่อย สลาย .....	45
3.3.1.6 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรีย....	46
3.3.1.6.1 สกัดดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย.....	46
3.3.2 คัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์.....	47
3.3.2.1 คัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์.....	47
3.3.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์ บริสุทธิ์.....	48
3.3.2.3 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ .....	48
3.3.2.4 ศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ ชอบน้ำของเซลล์ .....	48
3.3.2.4.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension) .....	49
3.3.2.4.2 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement).....	49
3.3.2.4.3 การวัดค่าดัชนีอิมัลชัน (Emulsion Index, E24).....	49
3.3.2.4.4 การตรวจสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (Hydrophobicity) .49	
3.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ.....	50
3.3.3.1 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของตัวอย่างดินทรายจากอ่าว พร้าว .....	50
3.3.3.2 สร้างชุดทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ ....	50

3.3.3.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในดิน.....	53
3.3.3.3.1 สกัดน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในดินด้วยเฮกเซน.....	53
3.3.3.3.2 สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่.....	53
3.3.3.4 ตรวจสอบตามแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์และการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี 16S Metagenomic analysis .....	53
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	55
4.1 จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบและประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอน บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง.....	55
4.1.1 จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบในตัวอย่าง.....	55
4.1.2 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของตัวอย่าง .....	57
4.1.3 กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบซึ่งเพิ่มจำนวนจากตัวอย่าง.....	59
4.1.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	62
4.1.5 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	63
4.2 ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ.....	66
4.2.1 ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ .....	66
4.2.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรีย .....	72
4.2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของ <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11.....	74
4.2.4 แนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ของ <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11.....	75

4.3 ประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบของ <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11 .....	76
4.3.1 สมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของตัวอย่างดินทรายจากอ่าวพร้าว .....	76
4.3.2 ประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ .....	76
4.3.3 ผลการตรวจติดตามแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เติมลงไปและการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี 16S Metagenomic analysis .....	83
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	87
รายการอ้างอิง.....	98
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	112
ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี.....	113
ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ .....	117
ภาคผนวก ง ข้อมูลดิบต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ.....	130
ภาคผนวก จ ผลวิเคราะห์ตัวอย่างดินเบื้องต้นโดย GC-FID.....	142
ภาคผนวก ฉ รูปเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	144
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	156

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	สรุปตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ระหว่างปีพ.ศ. 2540-2558.....	13
ตารางที่ 2.2	ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ .....	21
ตารางที่ 2.3	เปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดในการใช้วิธีทางชีวภาพในการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อน.....	24
ตารางที่ 2.4	ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ.....	28
ตารางที่ 2.5	ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	29
ตารางที่ 3.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	36
ตารางที่ 3.2	รหัสตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอน บริเวณเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง .....	39
ตารางที่ 3.3	องค์ประกอบของน้ำมันดิบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ .....	40
ตารางที่ 3.4	สถานะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละคู่.....	43
ตารางที่ 3.5	ชุดทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้ดินทรายจากอ่าวพร้าว .....	52
ตารางที่ 4.1	จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยวิธี Most Probable Number (MPN).....	56
ตารางที่ 4.2	ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้ 10 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนของตัวอย่างดินทั้ง 12 ตัวอย่าง.....	58
ตารางที่ 4.3	ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้ 10 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนของกลุ่มแบคทีเรีย.....	65
ตารางที่ 4.4	แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ได้จากการคัดแยก.....	67
ตารางที่ 4.5	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-08...	69
ตารางที่ 4.6	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-09...	69
ตารางที่ 4.7	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-11...	70

ตารางที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-12...	70
ตารางที่ 4.9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-14...	71
ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-15.	71
ตารางที่ 4.11 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของ <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11 .....	75
ตารางที่ 4.12 ผลการส่งวิเคราะห์ตัวอย่างดินชายฝั่งในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน (CT1-M1).....	76
ตารางที่ 4.13 ประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ 4% (มวล/มวล) ใน 6 ชุด.	77
ตารางที่ 5.1 สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะสมบัติของ <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ .....	91



## สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 องค์ประกอบหลักของน้ำมันดิบ .....	7
รูปที่ 2.2 ภาพถ่ายจากดาวเทียมเมื่อเวลา 18.31 น. ของวันที่ 27 กรกฎาคม 2556 .....	16
รูปที่ 2.3 การดำเนินการกำจัดคราบน้ำมันบริเวณอ่าวพร้าวในวันที่ 29 กรกฎาคม 2556 .....	17
รูปที่ 2.4 การดำเนินการกำจัดคราบน้ำมันและแก้ไขปัญหาเบื้องต้นบริเวณอ่าวพร้าว .....	17
รูปที่ 2.5 การดำเนินการกำจัดคราบน้ำมันและแก้ไขปัญหาเบื้องต้นบริเวณอ่าวพร้าว .....	18
รูปที่ 2.6 การย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน .....	25
รูปที่ 2.7 วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน .....	26
รูปที่ 2.8 วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน .....	27
รูปที่ 3.1 ชุดทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้ดินทรายจากอ่าวพร้าว .....	51
รูปที่ 4.1 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ภายหลังจากย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) .....	60
รูปที่ 4.2 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ภายหลังจากย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) .....	61
รูปที่ 4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่มภายหลังการเพิ่มจำนวนโดยวิธีเอนริชเมนต์ .....	62
รูปที่ 4.4 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ภายหลังจากย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นระยะเวลา 10 วัน ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ .....	67
รูปที่ 4.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ทั้ง 6 สายพันธุ์ .....	73
รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของ <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11 (เส้นสีแดง) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (เส้นสีน้ำเงิน) โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 10 .....	73

รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ 4% (มวล/มวล) ใน 6 ชุดการทดลอง และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่โดย GC-FID..... 78

รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบของทั้ง 6 ชุดการทดลองในการเก็บตัวอย่างวันที่ 100..... 79

รูปที่ 4.9 การจัดกลุ่มของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ..... 82

รูปที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ 16S Metagenomic analysis ของตัวอย่างดิน CT1-M1 และชุดการทดลอง B ถึง F..... 84





## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำมันดิบถือเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการแปรรูปเพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำมันชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล น้ำมันหล่อลื่น เป็นต้น ซึ่งเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางหรือใช้ในภาคอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอุตสาหกรรมปิโตรเคมีภัณฑ์ต่างๆ โดยจากรายงานสรุปการจัดการและการจัดจำหน่ายน้ำมันเชื้อเพลิงในปี พ.ศ. 2557 พบว่าความต้องการใช้น้ำมันดิบภายในประเทศคือ 7,754 ล้านลิตร (133,627 บาร์เรล/วัน) (กรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2557) แสดงถึงการนำน้ำมันดิบมาใช้ประโยชน์ในปริมาณที่มาก จึงเป็นการเพิ่มโอกาสในการเกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อมสูงขึ้นเช่นกัน ซึ่งหากเกิดหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลขึ้นแล้วก็จะส่งผลกระทบต่อทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งทรัพยากรทางทะเล

ในประวัติศาสตร์โลกได้เกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อมหลายครั้ง เช่น เหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วไหลจากอุบัติเหตุของเรือบรรทุกน้ำมัน Exxon Valdez หรือเหตุการณ์แท่นขุดเจาะน้ำมัน Deepwater Horizon ระเบิด เป็นต้น ประเทศไทยเองก็มีเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลเกิดขึ้นเช่นกัน โดยจากสถิติของกรมเจ้าท่า ในระหว่างปีพ.ศ. 2540-2558 พบว่าเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลส่วนใหญ่มักจะเกิดขึ้นในบริเวณจังหวัดระยองและจังหวัดชลบุรี เนื่องจากในบริเวณนี้มีนิคมอุตสาหกรรมต่างๆ ประกอบกับมีอุตสาหกรรมปิโตรเคมีรวมทั้งมีกิจกรรมการท่องเที่ยว จึงเป็นสาเหตุให้ในบริเวณดังกล่าวมีเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลเกิดขึ้นอยู่บ่อยครั้งและเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม พ.ศ. 2556 ได้เกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลขึ้นจากท่ออ่อนส่งน้ำมันดิบขนาด 16 นิ้ว ของบริษัท พีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด (มหาชน) ทำให้มีน้ำมันดิบประมาณ 50,000 ลิตร รั่วไหลลงสู่ทะเล ห่างจากชายฝั่งมาบตาพุดไปทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ประมาณ 20 กิโลเมตร ทำให้มีการเคลื่อนตัวของน้ำมันไปสะสมที่บริเวณอ่าวพร้าวและชายฝั่งด้านเหนือของเกาะเสม็ดรวมทั้งอ่าวเพ

จากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นซึ่งเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อทั้งสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งผลกระทบต่อระบบนิเวศชายฝั่ง ได้แก่ ระบบนิเวศหาดทราย ระบบนิเวศหาดหิน และระบบนิเวศแนวปะการัง จึงนำมาสู่กระบวนการบำบัดพื้นที่บริเวณชายฝั่งที่ได้รับการปนเปื้อน ซึ่งวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและใช้ต้นทุนต่ำรวมทั้งมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมคือการบำบัดภายในพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ (Bioremediation) เป็นกระบวนการที่อาศัยการเจริญของสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ ฟีซ เป็นต้น ในการเปลี่ยนรูปแบบของสารพิษ

ให้มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป ซึ่งการใช้จุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียในการบำบัดก็เป็นวิธีที่นิยมใช้เนื่องจากแบคทีเรียถือได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่มีความสามารถและทำหน้าที่ในการย่อยสลายน้ำมันในลำดับแรกภายหลังจากที่มีการรั่วไหลของน้ำมันสู่สิ่งแวดล้อม (Brooijmans และคณะ, 2009) โดยวิธีการในการบำบัดพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันโดยใช้แบคทีเรียมีวิธีการหลักอยู่ 2 วิธี ได้แก่ การเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Bioaugmentation) คือการเติมแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันลงไปในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยสลายในพื้นที่นั้น รวมทั้งแบคทีเรียดังกล่าวยังสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นนวัตกรรมพร้อมใช้เพื่อความสะดวกในการบำบัดในพื้นที่ปนเปื้อนอื่นๆ ได้อีกด้วย และการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย (Biostimulation) คือการเติมสารอาหารหรือสารใดๆ ที่ช่วยในการปรับสภาพให้เหมาะสมและกระตุ้นกิจกรรมการย่อยสลายของแบคทีเรียดั้งเดิมที่อยู่ในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อน เพื่อให้แบคทีเรียในบริเวณดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายมากขึ้น โดยอัตราส่วนธาตุอาหารคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อออกซิเจนที่เหมาะสมคือ 100:10:1 (Almeida และคณะ, 2013)

เนื่องจากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายมักจะสามารถคัดแยกได้จากบริเวณที่มีประวัติการปนเปื้อน ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Hassanshahian และคณะ (2014) คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินตะกอนและน้ำทะเลบริเวณอ่าวเปอร์เซียที่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันดิบ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ โดย *Corynebacterium variabile* PG-Z มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 82% ภายในระยะเวลา 7 วัน ซึ่งการที่แบคทีเรียจะสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น จะขึ้นอยู่กับลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ส่งเสริมต่อการย่อยสลายน้ำมันด้วย ได้แก่ การมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ เช่น ยีน *alkB alkB1 alkB2* เป็นต้น ซึ่งเป็นยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ทำให้มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายสายอัลเคนที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในน้ำมันดิบได้แตกต่างกัน ส่งผลให้สามารถประเมินการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนได้เมื่อตรวจพบยีนดังกล่าว (Jurelevicius และคณะ, 2013) และการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์ ซึ่งจะช่วยเพิ่มการละลายและสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพของน้ำมันได้

นอกจากนี้ก่อนการนำไปพัฒนาเพื่อใช้บำบัดในพื้นที่ปนเปื้อนจริง การทดสอบประสิทธิภาพในระดับห้องปฏิบัติการก็เป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะช่วยประเมินประสิทธิภาพในการย่อยสลายของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2011) ได้ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยวิธีการเติมกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Bioaugmentation) ที่ได้จากการคัดแยก และวิธีการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย (Biostimulation) ด้วยการเติม

สารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในระบบนิเวศจำลองดิน พบว่าวิธี Bioaugmentation สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากกว่า 50% ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีการเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Bioaugmentation) ก็เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายให้ดีขึ้น นอกจากนี้ในระหว่างการบำบัดสามารถตรวจติดตามการอยู่รอดของแบคทีเรียที่เติมลงไป และติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลคือวิธี 16S Metagenomic analysis ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาที่ครอบคลุมจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (unculturable microbes) ซึ่งพบว่ามีมากถึงร้อยละ 99 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด และสามารถศึกษาประชาคมจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน ดินตะกอน น้ำทะเล เป็นต้น

อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินตัวอย่างที่ได้รับการปนเปื้อนโดยใช้วิธีที่หลากหลายทั้งการเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ การปรับธาตุอาหารให้มีความเหมาะสม และการเติมสารกระจายน้ำมันยังมีการศึกษาไม่มากนัก และจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลครั้งใหญ่ในทะเลจังหวัดระยอง ซึ่งบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด เป็นจุดที่ได้รับผลกระทบจากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นมากที่สุด จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะหาวิธีที่เหมาะสมในการบำบัดดินทรายบริเวณชายฝั่ง เพื่อเป็นต้นแบบในการจัดการปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันบริเวณชายฝั่งต่อไป จึงนำมาสู่งานวิจัยนี้ซึ่งจะคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอนบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 1 ชนิด และศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียดังกล่าว รวมทั้งนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ เพื่อประเมินประสิทธิภาพการย่อยสลายและตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียในระหว่างการบำบัด ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจเป็นประโยชน์ในการเป็นแนวทางเพื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปพัฒนาต่อยอดเป็นนวัตกรรมพร้อมใช้สำหรับการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) คัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอนบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง
- 2) ศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ และศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์
- 3) ทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

### 1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอน บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด มีลักษณะสมบัติที่ส่งเสริมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินทรายที่ได้รับการปนเปื้อน

### 1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

#### 1.4.1 ตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอนที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มาจากบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง ซึ่งเป็นตัวอย่างดินบริเวณชายฝั่ง ดินตะกอนแนวปะการัง และดินตะกอนในทะเล ซึ่งมาจากบริเวณที่ได้รับและไม่ได้รับการปนเปื้อนจากเหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วไหล โดยเก็บตัวอย่างภายหลังเหตุการณ์ ประมาณ 1 สัปดาห์ และ 1 เดือน และเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 1.4.2 เพิ่มจำนวนและทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอนบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง

งานวิจัยในขั้นตอนนี้เป็นการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอนโดยใช้วิธี Most Probable Number (MPN) และตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยวิธีเอนริชเมนต์ (Enrichment) และทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรีย โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) และเครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ รวมทั้งตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

#### 1.4.3 คัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

งานวิจัยในขั้นนี้เป็นการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบทั้งหมดโดยใช้วิธี cross streak plate บนอาหารแข็ง 100% Luria-Bertani (LB) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีการย้อมแกรม (Gram staining) และระบุชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography (GC-FID) เพื่อให้ได้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 1 ชนิดและนำไปตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ รวมทั้งทดสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์และ

ศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension) การวัดค่าดัชนีของอิมัลชัน (Emulsion Index, E24) และการวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement)

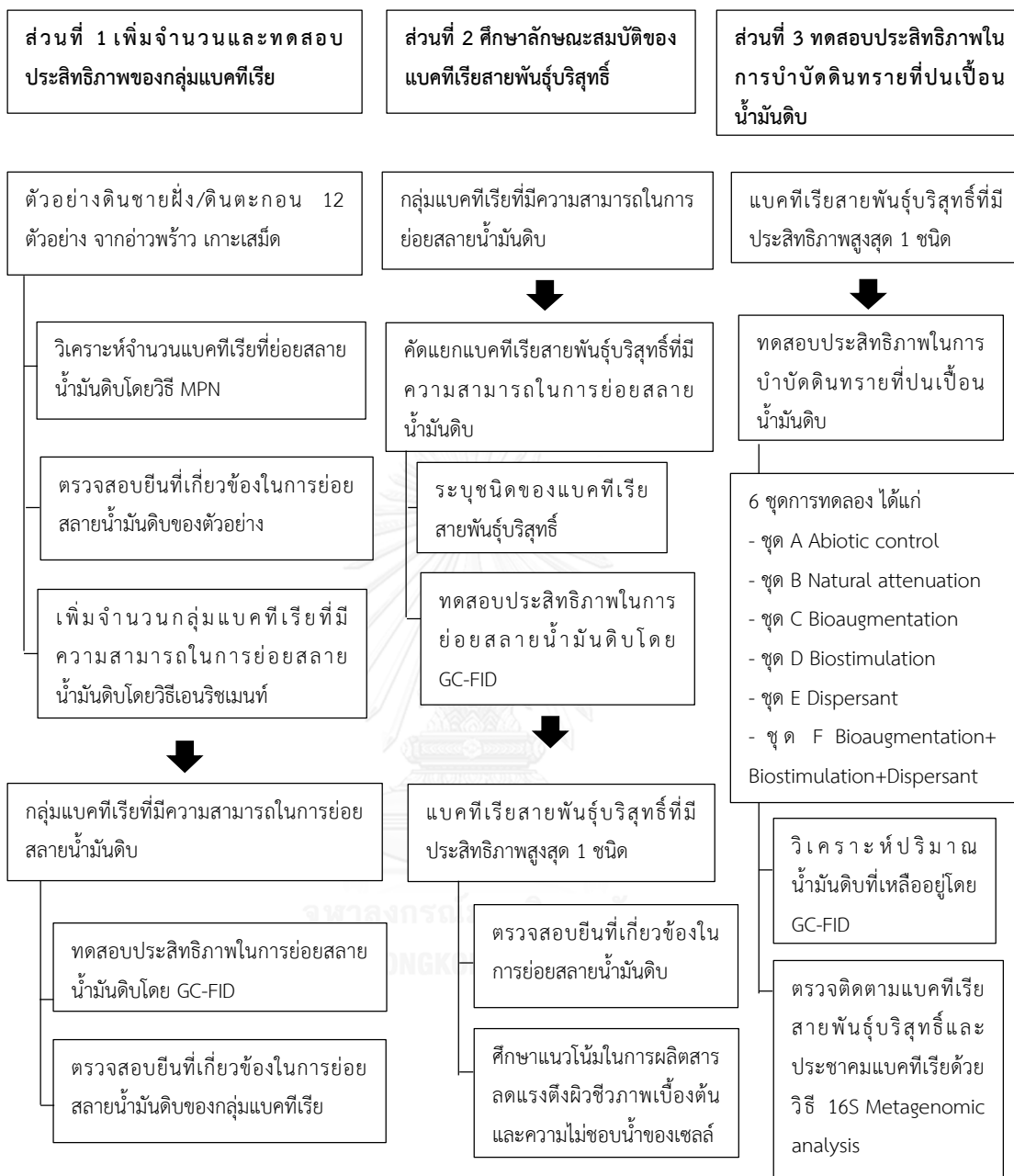
#### 1.4.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ

งานวิจัยในขั้นนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 1 ชนิดโดยใช้ดินทรายชายฝั่งจากบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน (CT1-M1) จากอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด โดยมีทั้งหมด 6 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุด Abiotic control หรือชุดควบคุม ชุด Natural attenuation เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น ชุด Bioaugmentation เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 1 ชนิด ชุด Biostimulation เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโดยการเติมธาตุอาหารที่ปรับให้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสเท่ากับ 100:10:1 ชุด Dispersant เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบหลังจากการเติมสารกระจายน้ำมัน (dispersant) และชุด Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบจากผลของการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 1 ชนิด การเติมธาตุอาหาร และการเติมสาร dispersant โดยทุกชุดการทดลองจะบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 20 40 60 80 และ 100 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่โดยเครื่อง Gas Chromatography (GC-FID) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ รวมทั้งตรวจติดตามแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เติมลงไป และการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียในระบบโดยใช้วิธี 16S Metagenomic analysis

#### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่คัดแยกได้นี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นนวัตกรรมพร้อมใช้สำหรับการบำบัดดินทรายที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบต่อไป

## ภาพรวมงานวิจัย

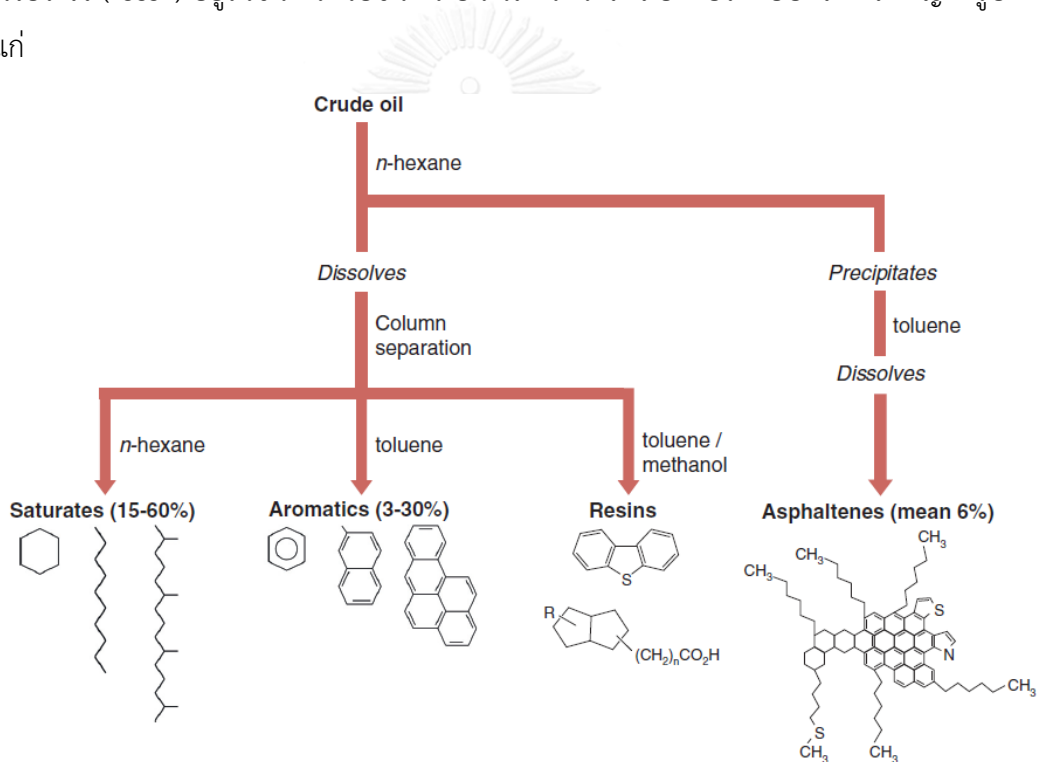


## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 องค์ประกอบและความสำคัญของน้ำมันดิบ

เนื่องจากจำนวนประชากรที่เพิ่มสูงขึ้นจึงทำให้ความต้องการในการใช้พลังงานมีเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ซึ่งพลังงานเชื้อเพลิงถือเป็นพลังงานรูปแบบหนึ่งที่มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง โดยพลังงานรูปแบบดังกล่าวได้มาจากการนำน้ำมันดิบมาใช้ประโยชน์ ซึ่งน้ำมันดิบเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสารเคมีอื่นๆ เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน กำมะถัน เป็นต้น เกิดมาจากการทับถมของซากพืชซากสัตว์โบราณ (fossil) อยู่ในชั้นหินหรือชั้นดินเป็นเวลานานและมีองค์ประกอบหลักที่สำคัญดังรูปที่ 2.1 ได้แก่



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบหลักของน้ำมันดิบ

ที่มา: McGenity (2014)

#### 1) ไฮโดรคาร์บอนประเภทอิ่มตัว (Saturated hydrocarbon)

เป็นสารที่ประกอบด้วยไฮโดรเจนและคาร์บอน โดยมีพันธะเดี่ยวเชื่อมต่อกันระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอน มีคุณสมบัติคือเป็นสารชนิดที่ไม่มีขั้ว ตัวอย่างเช่น อัลเคน (alkane) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดโซ่ตรง และไซโคลอัลเคน (cycloalkanes) หรือไซคลิกอัลเคน

(cyclic alkanes) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบเป็นวง 1 วง หรือมากกว่า 1 วงขึ้นไป เป็นต้น (Hyne, 2011)

### 2) อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Aromatic hydrocarbon)

เป็นสารไฮโดรคาร์บอนชนิดที่ไม่อิ่มตัว มีโครงสร้างหลักเป็นวงเบนซีนที่ประกอบด้วยพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวและมีคาร์บอน 6 อะตอม ตัวอย่างของอนุพันธ์เบนซีน เช่น สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป เช่น ไพรีน ฟิแนนทรีน แอนทราซีน เป็นต้น (Haritash และ Kaushik, 2009)

### 3) เรซิน (Resins)

เป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยออกซิเจน กำมะถันและไนโตรเจน จึงทำให้เป็นสารชนิดที่มีขี้ และมึ่น้ำหนักมวลโมเลกุลต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแอสฟัลทีน แต่สูงกว่าไฮโดรคาร์บอนประเภทอิ่มตัวและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และมีความซับซ้อนน้อยกว่า โครงสร้างของอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มี 2-4 วงรวมกัน (Merola และคณะ, 2016)

### 4) แอสฟัลทีน (Asphaltenes)

เป็นสารที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ออกซิเจน ซัลเฟอร์ วานาเดียม และนิกเกิล เป็นสารชนิดที่มีขี้และมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไฮโดรเจนประมาณ 1:1.2 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา (Boukir และคณะ, 2001)

ดังที่กล่าวข้างต้นว่าน้ำมันดิบสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในรูปแบบของพลังงานเชื้อเพลิง ซึ่งทำได้โดยการนำน้ำมันดิบมาผ่านกระบวนการกลั่นลำดับส่วน ทำให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่

1) ก๊าซปิโตรเลียมเหลว หรือก๊าซหุงต้ม (Liquefied Petroleum Gas, LPG) จะมีสภาพเป็นก๊าซในอุณหภูมิและความดันบรรยากาศ จึงสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหุงต้ม หรือเป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์และรถยนต์

2) น้ำมันเบนซิน (Gasoline) ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์เบนซิน

3) น้ำมันเชื้อเพลิงเครื่องบินไอพัด (Aviation Gasoline) ใช้สำหรับเครื่องบินไอพัด เนื่องจากมีการปรับปรุงคุณภาพให้มีค่าออกเทนสูงเหมาะสมสำหรับเครื่องยนต์ของเครื่องบิน

4) น้ำมันเชื้อเพลิงเครื่องบินไอพ่น (Jet Fuel) ส่วนใหญ่ใช้เป็นเชื้อเพลิงไอพ่นของสายการบินพาณิชย์

5) น้ำมันก๊าด (Kerosene) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ เช่น เป็นส่วนผสมสำหรับยาฆ่าแมลง สีทาน้ำมันชักเงา เป็นต้น

6) น้ำมันดีเซล (Diesel Fuel) ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล



7) น้ำมันเตา (Fuel Oil) ใช้เป็นเชื้อเพลิง เช่น ใช้กับเครื่องยนต์เรือเดินสมุทร หรือใช้สำหรับเตาเผาหรือเตาหลอมในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ

8) ยางมะตอย (Asphalt) สามารถนำยางมะตอยมาใช้ประโยชน์โดยการนำไปผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพเพื่อให้มีสมบัติที่ดีขึ้น เช่น มีความต้านทานต่อสภาพอากาศและแรงกระแทกกระเทือน มีความเหนียวและยืดหยุ่นตัวต่ออุณหภูมิระดับต่าง ๆ เป็นต้น (แผนกวิชาเทคโนโลยียางและพอลิเมอร์ วิทยาลัยเทคนิคจันทบุรี, 2558)

นอกจากนี้ น้ำมันดิบยังมีความสำคัญต่อภาคอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอุตสาหกรรมปิโตรเคมีต่างๆ เนื่องจากการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ได้จากการกลั่นน้ำมันดิบหรือจากการแยกแก๊สธรรมชาติมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเคมีภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่

1) อุตสาหกรรมปิโตรเคมีขั้นต้น (Upstream Petrochemical Industry) เป็นการผลิตผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีลำดับแรกที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตขั้นต่อเนืองต่อไป ได้แก่ กลุ่มอัลเคน กลุ่มโอเลฟินส์ และกลุ่มอะโรมาติก

2) อุตสาหกรรมปิโตรเคมีขั้นกลาง (Intermediate Petrochemical Industry) เป็นอุตสาหกรรมที่นำผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีขั้นต้นมาเป็นวัตถุดิบในการผลิต ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีขั้นกลางสายอัลเคน ผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีขั้นกลางสายโอเลฟินส์ และผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีขั้นกลางสายอะโรมาติก

3) อุตสาหกรรมปิโตรเคมีขั้นปลาย (Downstream Petrochemical Industry) เป็นอุตสาหกรรมที่นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีขั้นต้นและขั้นกลางมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายก่อนที่จะนำไปแปรรูปในอุตสาหกรรมต่อเนือง โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มหลักๆ ตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้แก่ กลุ่มพลาสติก กลุ่มเส้นใยสังเคราะห์ กลุ่มยางสังเคราะห์ และกลุ่มสารเคลือบผิวและผลิตภัณฑ์กาว (สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน, 2553)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำมันดิบเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญ เนื่องจากการนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในด้านของการนำมาแปรรูปเพื่อให้ได้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงและการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในการขับเคลื่อนเศรษฐกิจของประเทศด้วย

## 2.2 สาเหตุของน้ำมันที่ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม

### 2.2.1 สาเหตุเกิดจากการซึมของน้ำมันตามธรรมชาติ (Natural oil seepage)

เนื่องจากสารไฮโดรคาร์บอนในรูปของเหลวและแก๊สสามารถซึมผ่านชั้นมาสู่ผิวดินใต้ทะเลจากแอ่งสะสมน้ำมันใต้ดินตามธรรมชาติได้ จึงทำให้เกิดการรั่วไหลของน้ำมันสู่ทะเลหรือ

มหาสมุทร โดยจากการประมาณการปริมาณน้ำมันที่รั่วไหลจากวิธีนี้พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 600,000 ตันต่อปี (Kvenvolden และ Cooper, 2003)

## 2.2.2 สาเหตุเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์

### 2.2.2.1 การสำรวจและขุดเจาะน้ำมัน

ในระหว่างการขุดเจาะน้ำมันดิบขึ้นมาจากใต้ดิน น้ำใต้ดินที่อยู่ในบริเวณนั้น จะถูกสูบขึ้นมาด้วย ซึ่งน้ำส่วนนี้จะถูกสูบกลับคืนสู่แอ่งน้ำใต้ดินดั้งเดิม หรือทิ้งออกจากแท่นขุดเจาะ ภายหลังจากผ่านกระบวนการเพื่อแยกน้ำมันดิบออก อย่างไรก็ตามอาจพบว่ายังคงมีน้ำมันหลงเหลือ อยู่ในน้ำส่วนนี้ แต่ส่วนใหญ่มักจะละลาย (Disperse) ในน้ำจึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันที่รั่วไหลซึ่งเกิดขึ้นจากอุบัติเหตุต่างๆ

### 2.2.2.2 การรั่วไหลของน้ำมันจากการขนส่ง

#### - การขนส่งทางเรือบรรทุกน้ำมัน

การขนส่งน้ำมันดิบหรือน้ำมันชนิดอื่นๆ ในปริมาณมากจำเป็นที่จะต้องอาศัยการขนส่งโดยเรือบรรทุกน้ำมัน ดังนั้นหากเกิดอุบัติเหตุขึ้นในระหว่างการขนส่งจะทำให้เกิดการรั่วไหลของน้ำมันในปริมาณที่มากและอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมหรือสิ่งมีชีวิตเป็นวงกว้างได้

#### - การขนส่งผ่านท่อส่งน้ำมัน

ในการขนส่งน้ำมันจำเป็นต้องอาศัยระบบท่อส่งน้ำมันซึ่งรวมถึงท่อรวบรวม ท่อส่ง ถังพัก สถานีสูบ และถังเก็บน้ำมันทั้งที่อยู่บนดินและใต้ดิน ดังนั้นหากเกิดการรั่วไหลของน้ำมันขึ้น จะทำให้ลักษณะการรั่วไหลแตกต่างกันออกไป เช่น หากเกิดการรั่วไหลที่ท่อส่งน้ำมันใต้ทะเลก็จะทำให้น้ำมันที่รั่วไหลมีลักษณะคล้ายกับการรั่วไหลที่เกิดจากเรือบรรทุกน้ำมันคือจะมีน้ำมันปนเปื้อนสู่ทะเลโดยตรง

นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการขนส่งน้ำมันทางรถไฟหรือทางถนน แต่ถือเป็นสัดส่วนที่ต่ำเมื่อเทียบกับการขนส่งทางเรือหรือทางท่อส่งน้ำมัน

### 2.2.2.3 การปนเปื้อนจากการนำน้ำมันมาใช้

เนื่องจากน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ผ่านการกลั่นแยกแล้วมีความสำคัญในการนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ทั้งเรือและรถยนต์ หรือสำหรับเครื่องจักรในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ทำให้อาจเกิดการปนเปื้อนของน้ำมันสู่สิ่งแวดล้อมได้ (พิสุทธิ์ เพ็ชรมนกุล และ ญัฐวิญญ์ ขวเลิศพรศิยา, 2556)

## 2.3 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อม

### 2.3.1 ตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นในประวัติศาสตร์โลก

#### 2.3.1.1 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลจากอุบัติเหตุของเรือบรรทุกน้ำมัน Exxon Valdez

ในวันที่ 24 มีนาคม ค.ศ. 1989 เรือบรรทุกน้ำมัน Exxon Valdez ภายหลังจากออกจากท่าเรือ Valdez รัฐอลาสก้า ได้ประสบอุบัติเหตุชนกับแนวปะการัง ทำให้น้ำมันดิบประมาณ 4 ล้านลิตร รั่วไหลลงสู่อ่าว Prince William Sound นอกชายฝั่งของรัฐอลาสก้า ซึ่งถือเป็นเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลจากเรือบรรทุกน้ำมันที่ใหญ่ที่สุดในประเทศสหรัฐอเมริกาและถือเป็นเหตุการณ์ที่สร้างความเสียหายให้กับสิ่งแวดล้อมที่สำคัญเหตุการณ์หนึ่งในประวัติศาสตร์ของประเทศสหรัฐอเมริกา (Carson และคณะ, 2003)

#### 2.3.1.2 เหตุการณ์สงครามอ่าวเปอร์เซีย

ในระหว่าง ค.ศ. 1991 เกิดเหตุการณ์สงครามอ่าวเปอร์เซีย น้ำมันดิบประมาณ 1.7 พันล้านลิตร ได้ถูกปล่อยลงสู่คาบสมุทรอาหรับ และส่งผลกระทบต่อชายฝั่งของประเทศซาอุดีอาระเบียเป็นระยะทางกว่า 800 กิโลเมตร ซึ่งจากการศึกษาภายหลังเกิดเหตุการณ์ 1 ปี พบว่าการปนเปื้อนของน้ำมันอยู่ในบริเวณที่มีน้ำขึ้น-น้ำลง และมีน้ำมันประมาณ 75-100% ปกคลุมอยู่ที่บริเวณหาดเลนกว้างประมาณ 2 กิโลเมตร (Bejarano และ Michel, 2010)

#### 2.3.1.3 เหตุการณ์เรือบรรทุกน้ำมัน Prestige จมลงบริเวณนอกชายฝั่งประเทศสเปน

ในเดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 2002 เรือบรรทุกน้ำมัน Prestige ได้จมลงบริเวณนอกชายฝั่งของประเทศสเปน ทำให้มีน้ำมันดิบประมาณ 15 ล้านลิตร รั่วไหลลงสู่ทะเล และส่งผลให้เกิดตะกอนน้ำมันตามแนวชายฝั่งเป็นระยะทางหลายร้อยกิโลเมตร (Medina-Bellver และคณะ, 2005)

#### 2.3.1.4 เหตุการณ์แท่นขุดเจาะน้ำมัน Deepwater Horizon ระเบิด

ในวันที่ 20 เมษายน ค.ศ. 2010 แท่นขุดเจาะน้ำมัน Deepwater Horizon ของบริษัท บริติช ปิโตรเลียม (British Petroleum, BP) ได้เกิดระเบิดขึ้น โดยแท่นขุดเจาะน้ำมันแห่งนี้อยู่ห่างจากชายฝั่งรัฐหลุยส์เซียนา ประเทศสหรัฐอเมริกาไปทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ประมาณ 66 กิโลเมตร ในอ่าวแม็กซิโก ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก โดยคราบน้ำมันได้ลอยอยู่เหนือผิวน้ำทะเลจนถึงวันที่ 15 กรกฎาคม ค.ศ. 2010 จึงสามารถกำจัดได้หมด ซึ่งพบว่า

น้ำมันดิบที่รั่วไหลลงสู่ทะเลตั้งแต่วันที่เกิดเหตุจนถึงวันที่ 15 กรกฎาคม มีประมาณ 600 ล้านลิตร (Allan และคณะ, 2012)

### 2.3.2 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลในประเทศไทย

จากสถิติของกรมเจ้าท่าระหว่างปี พ.ศ. 2540-2558 พบว่ามีเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลเกิดขึ้นหลายเหตุการณ์ด้วยกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยสถานที่เกิดเหตุมีทั้งในทะเลและบริเวณชายฝั่งรวมทั้งท่าเทียบเรือ เนื่องจากอุบัติเหตุระหว่างการขนถ่ายน้ำมันบริเวณท่าเทียบและอุบัติเหตุอื่นๆ



ตารางที่ 2.1 สรุปตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ระหว่างปีพ.ศ. 2540-2558

ลำดับที่	วัน/เดือน/ปี	ชนิด ของ น้ำมัน	สาเหตุ	สถานที่	ปริมาณ
1	22 พฤษภาคม 2544	น้ำมันดิบ	Brakeaway Coupling ที่ กำลังขนถ่ายจาก เรือ หลุดออก จากกัน	ท่าเรือมาบตาพุด จ.ระยอง	30,000 ลิตร
2	15 มกราคม 2545	น้ำมัน เตา	เรือชนกับหิน ฉลาม	นอกฝั่ง อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี	234,000 ลิตร
3	17 ธันวาคม 2545	น้ำมัน เตา	เรือชนกัน	ทางเข้าท่าเรือ แหลม-ฉะบับ จ.ชลบุรี	210,000 ลิตร
4	20 พฤศจิกายน 2548	น้ำมันดิบ	ท่อเชื่อมต่อหลุด ขณะส่งถ่าย น้ำมัน	บริเวณท่นผูกเรือ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี	20,000 ลิตร
5	4 พฤษภาคม 2549	น้ำมัน เตา	รั่วไหลจากรอย รั่วที่ระวางของ เรือบรรทุกน้ำมัน	บริเวณท่าเทียบ เรือ อ.มาบตาพุด จ.ระยอง	20,000 ลิตร
6	6 ตุลาคม 2550	Saraline 185V	รั่วไหลจากถังเก็บ น้ำมัน	บริเวณแท่นขุด เจาะน้ำมัน	34,000 ลิตร
7	9 ธันวาคม 2550	น้ำมัน ดีเซล และ น้ำมัน เตา	เรือบรรทุกแก๊ส อัปปาง	ในทะเลห่าง ชายฝั่ง อ.สติงพระ จ.สงขลา ประมาณ 6 ไมล์ ทะเล	20,000 ลิตร

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ลำดับที่	วัน/เดือน/ปี	ชนิดของน้ำมัน	สาเหตุ	สถานที่	ปริมาณ
8	15 มิถุนายน 2551	น้ำมันเตา	รั่วไหลจากเรือ บรรทุกสินค้า	บริเวณอยู่เรือ อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ	40,000 ลิตร
9	4 กันยายน 2554	น้ำมันดีเซล (B5)	เรือบรรทุก น้ำมันอับปาง	ห่างจากเกาะ ราชา-ใหญ่ ทาง ตะวันออก ประมาณ 4 ไมล์ ทะเล จ.ภูเก็ต	40,000 ลิตร
10	27 กรกฎาคม 2556	น้ำมันดิบ	รั่วไหลจากท่อ รับน้ำมันดิบ	บริเวณทุ่นรับ น้ำมันกลางทะเล จ.ระยอง	50,000 ลิตร
11	26 มีนาคม 2557	น้ำมันเตา	ไม่ทราบ	ในเขตท่าเรือศรี ราชา จ.ชลบุรี	ไม่ทราบ
12	7 เมษายน 2557	น้ำมันเครื่อง ใช้แล้ว กากน้ำมัน เตา น้ำท้อเรือ	เรือชื่อ “นภสินธุ์” จม	ใกล้ปากแม่น้ำท่า จีน อ.เมือง จ. สมุทรสาคร	10,000 ลิตร

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

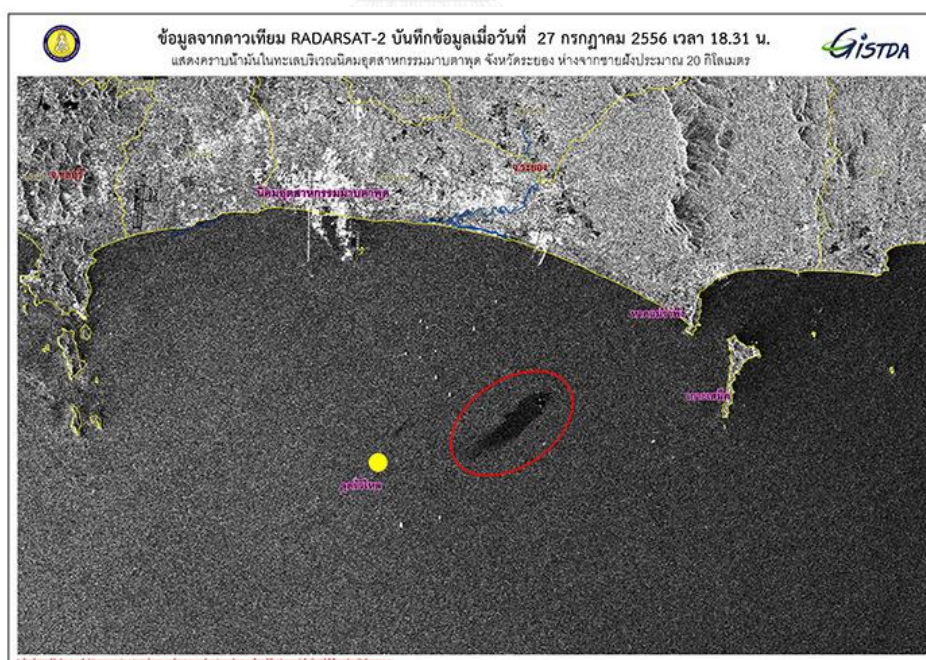
ลำดับที่	วัน/เดือน/ปี	ชนิดของน้ำมัน	สาเหตุ	สถานที่	ปริมาณ
13	8 ตุลาคม 2558	น้ำมันเตา	ท่อระบายอากาศของเรือ HEIKE P ที่เชื่อมผ่านไปยังถังน้ำมันแตกหัก	ท่าเทียบเรือแหลมฉบัง C1	5,000 ลิตร
14	29 พฤศจิกายน 2558	ก้อนน้ำมันสีดำ (Tar ball)	ไม่ทราบ	ชายหาดบริเวณปากน้ำหลังสวนหาดบางมะพร้าว จ.ชุมพร	ไม่ทราบ (เป็นแนวยาวประมาณ 10 กิโลเมตร)
15	17 ธันวาคม 2558	ก้อนน้ำมันสีดำ (Tar ball)	ไม่ทราบ	ชายหาดบริเวณ หมู่ 9 ต.เกาะเพชร อ.หัวไทร จ. นครศรีธรรมราช	ไม่ทราบ (เป็นแนวยาวประมาณ 3 กิโลเมตร)

ที่มา: (กรมเจ้าท่า, 2558)

จากตารางสรุปตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลในประเทศไทยพบว่าเหตุการณ์ส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นในภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดระยองและจังหวัดชลบุรี เนื่องจากในบริเวณนี้มีนิคมอุตสาหกรรมต่างๆ ประกอบกับมีอุตสาหกรรมปิโตรเคมี รวมทั้งมีกิจกรรมการท่องเที่ยว จึงเป็นสาเหตุให้ในบริเวณดังกล่าวมีเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลเกิดขึ้นอยู่บ่อยครั้ง และในปี พ.ศ. 2556 ได้เกิดเหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วไหลครั้งใหญ่ในทะเล จังหวัดระยอง ซึ่งถือเป็นเหตุการณ์

น้ำมันรั่วไหลครั้งสำคัญที่เกิดขึ้นในประเทศไทย เนื่องจากน้ำมันที่รั่วไหลได้ส่งผลกระทบต่อเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง ซึ่งเป็นสถานที่ท่องเที่ยวที่สวยงามแห่งหนึ่งของประเทศ โดยมีลำดับเหตุการณ์และการดำเนินการต่อสถานการณ์น้ำมันดิบรั่วไหลดังนี้

วันที่ 27 กรกฎาคม พ.ศ. 2556 เวลาประมาณ 06.50 น. ขณะที่เรือบรรทุกน้ำมัน Malan Plato สัญชาติกรีซ กำลังถ่ายน้ำมันดิบผ่านทุ่น้ำมันดิบมายังโรงกลั่นน้ำมันของบริษัท พีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด มหาชน (PTTGC) ได้เกิดเหตุที่อรับน้ำมันดิบขนาด 16 นิ้ว รั่วที่บริเวณทุ่น้ำมันดิบ (Single Point Mooring) ซึ่งอยู่ห่างจากชายฝั่งท่าเรือมาบตาพุดไปทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ประมาณ 20 กิโลเมตร ทำให้มีน้ำมันดิบรั่วไหลลงสู่ทะเลประมาณ 50,000 ลิตร โดยภายหลังเกิดเหตุระบบได้ตัดการส่งน้ำมันทันที และใช้เรือขจัดคราบน้ำมันจำนวน 4 ลำ พร้อมใช้ทุ่นลอย (Oil Boom) เพื่อจำกัดวงการกระจายตัวของคราบน้ำมันร่วมกับการใช้เครื่องมือเก็บคราบน้ำมัน (Oil skimmer) โดยภาพถ่ายจากดาวเทียมเมื่อเวลา 18.31 น. ของวันที่ 27 กรกฎาคม แสดงให้เห็นถึงคราบน้ำมันที่ผิวหน้าทะเล มีความกว้างยาวประมาณ 1.5 x 8.3 ตารางกิโลเมตร โดยส่วนหัวของคราบน้ำมันมีการเคลื่อนตัวห่างจากจุดรั่วไหลประมาณ 15 กิโลเมตร และมีทิศทางเคลื่อนที่ไปทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือเข้าหาฝั่ง (กรมเจ้าท่า, 2556; บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน), 2556) ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ภาพถ่ายจากดาวเทียมเมื่อเวลา 18.31 น. ของวันที่ 27 กรกฎาคม 2556

ที่มา: บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) (2556)



วันที่ 28 กรกฎาคม พ.ศ. 2556 เวลา 22.00 น. น้ำมันดิบได้ถูกซัดเข้าสู่อ่าวพร้าว ทางทิศตะวันตกก่อนไปทางเหนือของเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง โดยคราบน้ำมันบริเวณชายหาดของ อ่าวพร้าว มีระยะทางประมาณ 400 เมตร (กรมเจ้าท่า, 2556; บริษัท ปตท.จำกัด (มหาชน), 2556)

วันที่ 29 กรกฎาคม พ.ศ. 2556 เวลา 15.00 น. บริษัทพีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด มหาชน (PTTGC) จัดส่งเรือและเจ้าหน้าที่ไปวางทุ่นดักน้ำมัน ห่างจากชายฝั่งของเกาะเสม็ด ประมาณ 1,000 เมตร และสามารถเก็บคราบน้ำมันบริเวณชายหาดไปได้ประมาณ 5,000 ลิตร คาดการณ์ว่าปริมาณน้ำมันที่อ่าวพร้าว ยังเหลืออยู่อีกประมาณ 5,000 ลิตร ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การดำเนินการกำจัดคราบน้ำมันบริเวณอ่าวพร้าวในวันที่ 29 กรกฎาคม 2556

ที่มา: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (2556)

วันที่ 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2556 มีการแบ่งพื้นที่ดำเนินการขจัดคราบน้ำมัน ออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ 1) ขจัดคราบน้ำมันที่สะสมอยู่บริเวณชายหาด 2) เก็บรวบรวมคราบน้ำมันบริเวณ ชายหาด 3) บริเวณพื้นที่ชายหาดที่ได้รับผลกระทบไม่มากจะดำเนินการภายหลังจากที่ดำเนินการส่วน ที่ 1 แล้วเสร็จ และวันที่ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2556 ดำเนินการเก็บคราบน้ำมันในทะเลและบริเวณ ชายหาดอย่างต่อเนื่อง (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2556) ดังรูปที่ 2.4-25



รูปที่ 2.4 การดำเนินการกำจัดคราบน้ำมันและแก้ไขปัญหาเบื้องต้นบริเวณอ่าวพร้าว ในวันที่ 30 กรกฎาคม 2556

ที่มา: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (2556)



รูปที่ 2.5 การดำเนินการกำจัดคราบน้ำมันและแก้ไขปัญหาเบื้องต้นบริเวณอ่าวพร้าว

ในวันที่ 31 กรกฎาคม 2556

ที่มา: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (2556)

## 2.4 ผลกระทบต่อระบบนิเวศชายฝั่ง

เนื่องจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลครั้งใหญ่ที่เกิดขึ้นในทะเลจังหวัดระยอง ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศชายฝั่งโดยเฉพาะบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด ซึ่งระบบนิเวศที่ได้รับผลกระทบหลักๆ ได้แก่

1) ระบบนิเวศหาดทราย เนื่องจากหาดทรายเป็นบริเวณที่มีการใช้ประโยชน์เพื่อกิจกรรมต่างๆ เช่น การประมง การท่องเที่ยว รวมทั้งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตในบริเวณนั้น เช่น ปู หอยไล่ เตือนทะเล เป็นต้น ซึ่งการที่น้ำมันถูกพัดพามาสะสมตัวอยู่บริเวณชายหาดจะส่งผลกระทบต่อทำให้บริเวณดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการท่องเที่ยวหรือการประมง และส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศได้ นอกจากนี้ น้ำมันจะเป็นตัวขัดขวางการถ่ายเทระหว่างอากาศกับน้ำ ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่สิ่งมีชีวิตได้รับน้อยลง

2) ระบบนิเวศหาดหิน เป็นบริเวณชายหาดที่ประกอบด้วยหินชนิดต่างๆ ในบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลง และจากการผูกพันหรือการกัดเซาะของน้ำทะเล ทำให้เกิดเป็นซอกหินส่งผลให้สิ่งมีชีวิตไปอาศัยอยู่ เช่น หอยชนิดต่างๆ เปรียง และปู โดยน้ำมันที่ตกค้างอยู่บริเวณซอกหินอาจส่งผลกระทบต่อ การเจริญหรือการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตได้

3) ระบบนิเวศแนวปะการัง เนื่องจากปะการังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตในทะเล ดังนั้นเมื่อมีคราบน้ำมันตกลงบนปะการัง ทำให้น้ำมันเข้าไปอุดช่องโครงสร้างของปะการัง ซึ่งอาจทำให้ปะการังฟอกขาวหรือตายได้ รวมทั้งยังส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศของสัตว์น้ำในบริเวณแนวปะการังอีกด้วย

## 2.5 กระบวนการบำบัดพื้นที่บริเวณชายฝั่ง

เนื่องจากผลกระทบของน้ำมันรั่วไหลที่มีต่อระบบนิเวศชายฝั่งถือเป็นผลกระทบในวงกว้าง และหากใช้วิธีการที่ไม่เหมาะสมหรือดำเนินการล่าช้าก็จะมีส่งผลกระทบต่อทั้งสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งวิธีการในการบำบัดพื้นที่บริเวณชายฝั่งที่ได้รับการปนเปื้อนจากน้ำมันมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ทั้งนี้การเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับประเภทของชายฝั่ง รวมทั้งลักษณะและปริมาณของน้ำมันที่ปนเปื้อน โดยมีวิธีการต่างๆ ดังนี้

### 2.5.1 การฟื้นฟูโดยธรรมชาติ

เป็นวิธีที่อาศัยกระบวนการธรรมชาติ เช่น ผลของคลื่นลมและการย่อยสลายทางชีวภาพในการกำจัดน้ำมัน

### 2.5.2 การกำจัดน้ำมันโดยวิธีทางกายภาพและเคมี

เป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับการนำน้ำมันกลับมาใช้และการกำจัดน้ำมัน เช่น การฉีดล้างน้ำมันร่วมกับการนำน้ำมันกลับมาใช้ด้วยเครื่องตักเก็บน้ำมัน โดยจะฉีดล้างบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันเพื่อให้ไขมันไหลมารวมกันและควบคุมน้ำมันที่ถูกชะล้างด้วยฟุ่นลอยน้ำ (Boom) แล้วตักเก็บน้ำมัน นอกจากนี้อาจใช้สารชะล้างพื้นผิว (surface washing agent) ในการช่วยปลดปล่อยน้ำมันที่ยึดเกาะอยู่

### 2.5.3 การบำบัดภายในพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อน

เป็นวิธีการบำบัดหรือฟื้นฟู ณ พื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถช่วยลดของเสียที่จะเกิดขึ้น รวมทั้งขั้นตอนในการขนส่งและการกำจัดของเสียด้วย โดยวิธีที่ใช้ในการบำบัดพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อน เช่น การกวนผสมหรือการเติมอากาศ ซึ่งมีอยู่ 2 แบบคือการกวนผสมแบบแห้งและแบบเปียก โดยการกวนผสมแบบแห้งจะมีจุดประสงค์เพื่อเร่งผลการบำบัดโดยธรรมชาติ และทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้น ซึ่งเหมาะสำหรับอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดเล็ก ส่วนการกวนผสมแบบเปียก มีจุดประสงค์เพื่อทำให้น้ำมันถูกปล่อยจากชั้นตะกอนและสามารถนำกลับน้ำมันที่บริเวณผิวน้ำได้ นอกจากนี้อาจใช้การเคลื่อนย้ายตะกอน การเผาไหม้ การใช้สารเคมีเพื่อช่วยเพิ่มการกระจายตัวของคราบน้ำมันหรือทำความสะอาดชายฝั่ง และการบำบัดโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ (Bioremediation) (พิสุทธิ์ เพ็ชรมนกุล, 2556)

## 2.6 การบำบัดภายในพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนโดยวิธีทางชีวภาพ

การบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) เป็นกระบวนการที่อาศัยการเจริญของสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ ฟังไจ เป็นต้น ในการเปลี่ยนรูปแบบของสารพิษให้มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป หรืออาจเปลี่ยนรูปแบบของสารจากสารอินทรีย์เป็นสารอนินทรีย์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยอาศัยกระบวนการที่เรียกว่า mineralization ซึ่งกระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Das และ Chandran, 2011; Vidali, 2001) นอกจากนี้การบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพยังเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและใช้ต้นทุนต่ำในการบำบัด ซึ่งในการบำบัดพื้นที่ที่ปนเปื้อนน้ำมันวิธีหนึ่งที่มีความน่าสนใจคือการใช้จุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียถือได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่มีความสามารถและทำหน้าที่ในการย่อยสลายน้ำมันในลำดับแรกภายหลังจากที่มีการรั่วไหลของน้ำมันสู่สิ่งแวดล้อม (Brooijmans และคณะ, 2009) จึงทำให้มีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน ดังตารางที่ 2.2 โดยวิธีการในการบำบัดพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันโดยใช้แบคทีเรียมีวิธีการหลักอยู่ 2 วิธี ได้แก่ การเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Bioaugmentation) และการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย (Biostimulation)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ชนิดของแบคทีเรีย	ที่มาของตัวอย่าง	ปริมาณน้ำมันดิบเริ่มต้น	การย่อยสลาย (%)	ระยะเวลา	อ้างอิง
<i>Pseudomonas putida</i> DB1	ดิน	2% (ปริมาตร/ปริมาตร)	65	7 วัน	Vinothini (2015)
<i>Bacillus cereus</i> DB2	ดิน	2% (ปริมาตร/ปริมาตร)	40	7 วัน	
<i>Acinetobacter</i> sp. LS-1	ดิน	1.5% (ปริมาตร/ปริมาตร)	70	7 วัน	Liu และคณะ (2014)
<i>Corynebacterium variabile</i> PZ-G	ดิน ตะกอน และ น้ำทะเล	1% (ปริมาตร/ปริมาตร)	82	7 วัน	Hassanshahian และคณะ (2014)
<i>Pseudomonas putida</i> WL2	ดิน	1% (ปริมาตร/ปริมาตร)	70	6 วัน	Obayori และคณะ (2009)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MVL1	ดิน	1% (ปริมาตร/ปริมาตร)	70	6 วัน	

### 2.6.1 การเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Bioaugmentation)

คือการเติมแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันลงไปในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยสลายในพื้นที่นั้น โดยแบคทีเรียที่เติมลงไปอาจเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีในพื้นที่นั้น (indigenous) หรืออาจเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างถิ่น

(exogenous) ก็ได้ ซึ่งแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพนี้ยังสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นนวัตกรรมพร้อมใช้เพื่อความสะอาดในการบำบัดในพื้นที่ปนเปื้อนต่างๆ ได้อีกด้วย โดยแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายนี้ส่วนใหญ่มักจะคัดแยกได้จากตัวอย่างที่ได้รับการปนเปื้อน เช่นงานวิจัยของ Hassanshahian และคณะ (2014) คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินตะกอนและน้ำทะเลบริเวณอ่าวเปอร์เซียที่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันดิบ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ โดย *Corynebacterium variabile* PG-Z มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 82% ภายในระยะเวลา 7 วัน และงานวิจัยของ ปิยะนุช อยู่คล้ำ (2558) คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินตะกอนบริเวณอ่าวไทย พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย G11 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 80% ภายในระยะเวลา 5 วัน โดยแบคทีเรียเด่นที่คาดว่าน่าจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายในกลุ่ม G11 คือ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Achromobacter xylosoxidans* และตัวอย่างงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2011) ที่นำวิธี Bioaugmentation ไปประยุกต์ใช้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในระบบนิเวศจำลองดิน (microcosm) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับวิธีการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย (Biostimulation) ด้วยการเติมสารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส พบว่าวิธี Biostimulation สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันให้มากขึ้น 8-13% ส่วนวิธี Bioaugmentation สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันได้มากกว่า 50%

นอกจากนี้การนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายมาใช้ในการบำบัดส่วนใหญ่มีอยู่ 2 รูปแบบหลัก ได้แก่การใช้ในรูปของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และกลุ่มแบคทีเรียตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Gentile และคณะ (2016) ที่ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic) *Oleispira antarctica* RB-8<sup>T</sup> โดยใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ น้ำมันดีเซล commercial oil engine น้ำมันเครื่องบิน (Jet Fuel) น้ำมันดิบ และ saline oily wastes และเก็บตัวอย่างในวันที่ 22 โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 4 และ 15 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการเพิ่มจำนวนในช่วง 18 วันแรกของการทดลองในทั้ง 2 สภาวะ และมีอัตราการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนทุกชนิด ยกเว้นน้ำมันดีเซลที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้อาจเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้สำหรับการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนที่มีอุณหภูมิต่ำได้ และงานวิจัยของ Sawadogo และคณะ (2016) ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยใช้น้ำมันดีเซลและน้ำมันใช้แล้ว (SAE40 และ SAE50) พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. S2 และ *Pseudomonas* sp. S7 ได้ จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายทั้งในรูปของ

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์และกลุ่มแบคทีเรีย รวมทั้งการเติมสารอาหาร (yeast extract peptone หรือ trace elements) และสาร surfactant (tween 80 หรือ Sodium Dodecyl Sulfate: SDS) และเก็บตัวอย่างในวันที่ 14 28 42 และ 56 วัน พบว่าการเติมสารอาหาร และการเติมสาร surfactant สามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายน้ำมันไขแล้ว (SAE40 และ SAE50) ได้ แต่ไม่ได้เพิ่มอัตราการย่อยสลายน้ำมันดีเซล และพบว่าการใช้ในรูปแบบของกลุ่มแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าการใช้ในรูปแบบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และตัวอย่างงานวิจัยของ Sathishkumar และคณะ (2008) คัดแยกแบคทีเรียจากดินที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมัน โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ และทดสอบประสิทธิภาพทั้งในรูปแบบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์และกลุ่มแบคทีเรีย โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่  $10^2$  CFU/กรัม และน้ำมันดิบความเข้มข้น 1% พบว่า *Bacillus* sp. IOS1-7 *Corynebacterium* sp. BPS2-6 *Pseudomonas* sp. HPS2-5 และ *Pseudomonas* sp. BPS1-8 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบเท่ากับ 64% 43% 45% และ 67% ตามลำดับในระยะเวลา 25 วัน และแบบกลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 76% ในระยะเวลา 25 วัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรียจะสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามการนำกลุ่มแบคทีเรียมาใช้ในการบำบัดอาจยังมีข้อจำกัดในเรื่องของการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในระหว่างการบำบัด และประชากรในกลุ่มแบคทีเรียอาจแข่งขันหรือเป็นปฏิปักษ์กัน ซึ่งส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายได้

## 2.6.2 การกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย (Biostimulation)

คือการเติมธาตุอาหารหรือสารใดๆ ที่ช่วยในการปรับสภาวะให้เหมาะสมและกระตุ้นกิจกรรมการย่อยสลายของแบคทีเรียดั้งเดิมที่อยู่ในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนเพื่อให้แบคทีเรียในบริเวณนั้นมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายมากขึ้น โดยอัตราส่วนธาตุอาหารคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสที่เหมาะสมคือ 100:10:1 ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Wu และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลของวิธี Bioaugmentation และวิธี Biostimulation ที่มีต่อการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างดินที่ได้รับการปนเปื้อน โดยการทดลองในระบบนิเวศจำลองดิน (microcosm) ซึ่งชุดการทดลอง Bioaugmentation เป็นชุดที่เติม *Acinetobacter* SZ-1 strain KF453955 คัดแยกมาจากดินที่ได้รับการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ส่วนชุดการทดลอง Biostimulation เป็นชุดที่เติมธาตุอาหารโดยใช้  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  และ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ในการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสให้เท่ากับ 100:10:1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าวิธี Bioaugmentation และวิธี Biostimulation สามารถเพิ่มการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ 34% และ 60% ตามลำดับ ภายหลังจาก 6 สัปดาห์ของการบ่ม

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการบำบัดพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันทั้งวิธีการเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Bioaugmentation) และวิธีการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย (Biostimulation) ต่างมีศักยภาพในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายให้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามการนำวิธีการทางชีวภาพมาใช้ในการบำบัดพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนก็ยังมีข้อจำกัดบางประการ ดังแสดงในตารางที่ 2.3

**ตารางที่ 2.3** เปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดในการใช้วิธีทางชีวภาพในการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อน

ข้อดี	ข้อจำกัด
1) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ	1) กระบวนการในการย่อยสลายสารไม่สามารถเกิดขึ้นได้กับสารทุกชนิด
2) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในการย่อยสลายทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์	2) สารที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย อาจมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียได้
3) กระบวนการในการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จึงเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากไม่มีสารตกค้าง	3) ต้องมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย จึงจะทำให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพสูง
4) สามารถฟื้นฟูในพื้นที่ปนเปื้อนจริงได้	4) อาจต้องใช้ร่วมกับการบำบัดด้วยวิธีอื่นๆ เนื่องจากหากสารที่ปนเปื้อนมีความเป็นพิษสูง อาจส่งผลต่อเซลล์ของแบคทีเรียและทำให้แบคทีเรียตายได้
5) มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำกว่าการบำบัดด้วยวิธีอื่นๆ และเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับจากสาธารณชน	5) ใช้ระยะเวลาในการบำบัดนาน

ที่มา: อัจฉราพร ขำโสภณ (2556)

## 2.7 การย่อยสลายน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน

เนื่องจากน้ำมันดิบมักจะเป็นน้ำมันชนิดที่มีการรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะทะเลในปริมาณมากและแบคทีเรียก็ถือเป็นจุลินทรีย์ที่เข้ามามีบทบาทสำคัญที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย ซึ่งส่วนใหญ่คือแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน ดังนั้นออกซิเจนจึงถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในวิธีการย่อยสลายน้ำมันดิบหรือสารมลพิษอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งมีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้

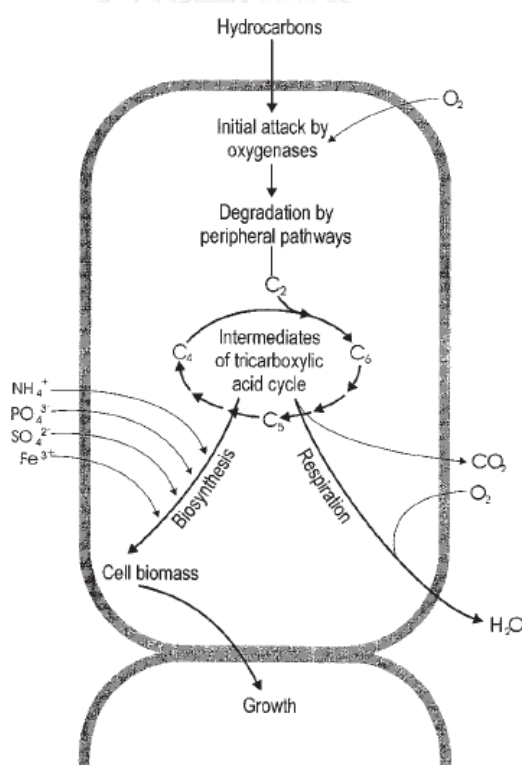


1) การเกิดกระบวนการออกซิเดชัน ซึ่งทำให้เกิดการรวมตัวกันของสารอินทรีย์มลพิษเริ่มต้น และออกซิเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ออกซิจีเนส

2) จากนั้นเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายตามวิถีที่จำเพาะกับสารอินทรีย์มลพิษนั้นๆ เพื่อเปลี่ยนรูปของสารและเกิดเป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ของกระบวนการเมทาบอลิซึมหลัก เช่น tricarboxylic acid (TCA) cycle

3) เกิดกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของเซลล์ (Biosynthesis) จากวิถีเมทาบอลิซึมหลัก เช่น Acetyl-CoA, Succinate, Pyruvate เป็นต้น ส่งผลให้มีการเพิ่มมวลชีวภาพและการเติบโตของเซลล์ (Fritsche และ Hofrichter, 2008) ดังรูปที่ 2.6

ในการย่อยสลายน้ำมันดิบซึ่งประกอบด้วยสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนหลากหลายชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยวิถีในการย่อยสลายที่แตกต่างกันซึ่งจำเพาะต่อโครงสร้างของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดนั้นๆ โดยวิถีหลักในการย่อยสลาย ได้แก่ วิถีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในการย่อยสลายอัลเคน และวิถีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน



รูปที่ 2.6 การย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน

ที่มา: Fritsche และ Hofrichter (2008)

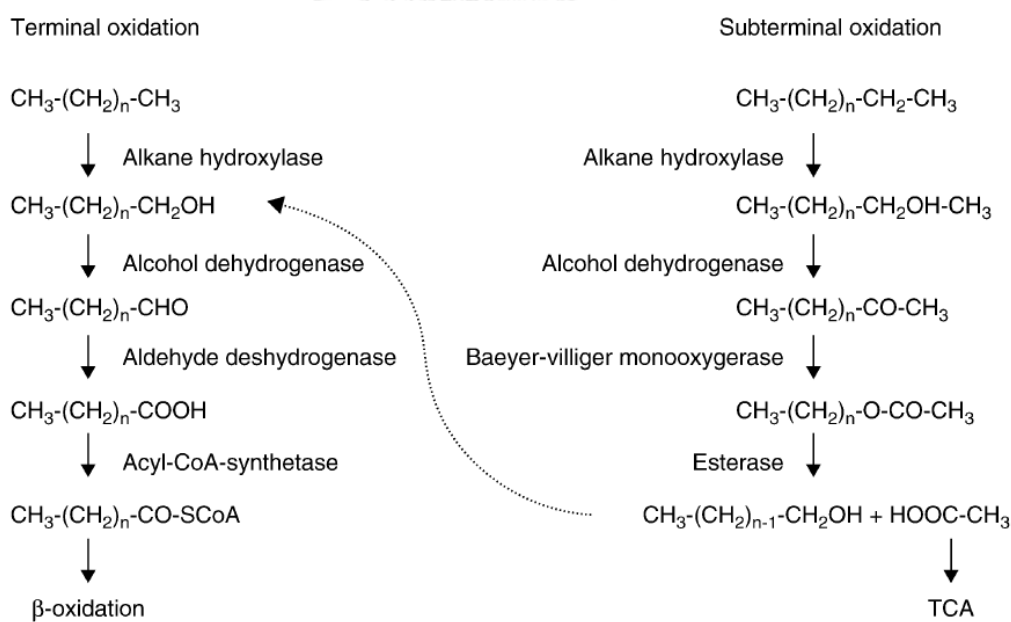
## 2.7.1 วิธีการย่อยสลายประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ

### 2.7.1.1 วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน

สารตั้งต้นที่เป็นอัลเคนสามารถเกิดวิธีการย่อยสลายได้ 2 ทาง คือ

1) การย่อยสลายที่ตำแหน่งปลาย (Terminal oxidation) จะเริ่มต้นจากอัลเคนถูกออกซิไดซ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นแอลดีไฮด์ และสุดท้ายจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน แล้วเข้าสู่วัฏจักรเบต้าออกซิเดชัน ( $\beta$ -oxidation cycle) ต่อไป

2) การย่อยสลายที่ตำแหน่งถัดจากปลาย (Subterminal oxidation) จะเริ่มต้นโดยอัลเคนถูกออกซิไดซ์ได้เป็นแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ (secondary alcohol) จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นเมทิลคีโตน (methylketone) และอะซิทิลเอสเทอร์ ตามลำดับ และจะถูกไฮโดรไลซ์ได้เป็นสาร 2 ตัว คือแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (primary alcohol) และอะซิเตต (acetate) แล้วเข้าสู่วัฏจักรเบต้าออกซิเดชัน ( $\beta$ -oxidation cycle) ต่อไป (Fritsche และ Hofrichter, 2008) ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในสถานะที่มีออกซิเจน

ที่มา: Rojo (2010)

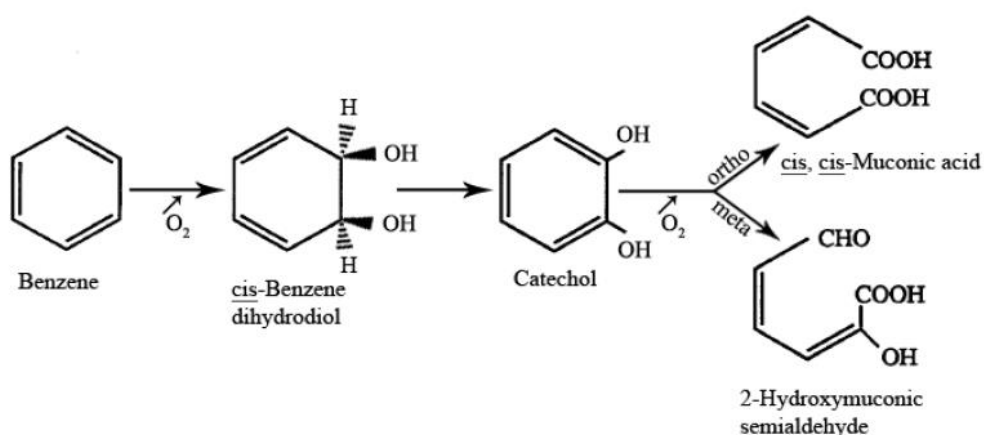
### 2.7.1.2 วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1) การเติมออกซิเจนให้แก่คาร์บอนอะตอมในวงเบนซีนโดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) ได้เป็นซิส-ไดไฮโดรไดออล (cis-dihydrodiol)

2) เอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ทำให้เกิดการย่อยสลายสาร ซิส-ไดไฮโดรไดออล (*cis*-dihydrodiol) ได้เป็นสารคาทีคอล (catechol)

3) สารคาทีคอล (catechol) จะเกิดการแตกวงอะโรมาติก ซึ่งเกิดขึ้นได้ 2 วิธีคือ วิธีเมตา (*meta* pathway) และวิธีออร์โธ (*ortho* pathway) แล้วเข้าสู่ TCA-cycle ต่อไป (Juhasz และ Naidu, 2000) ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน

ที่มา: Leja และ Lewandowicz (2010)

## 2.7.2 ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ส่งเสริมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญและส่งเสริมการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ ซึ่งได้แก่ การมีเอ็นที่เกี่ยวกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์

### 2.7.2.1 การมีเอ็นที่เกี่ยวกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ

เนื่องจากอัลเคนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในน้ำมันดิบ ดังนั้นเอนไซม์อัลเคนไฮดรอกซิเลสจึงเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญและพบได้ในแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคน (Wang และคณะ, 2010) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเกิดจากการประมวลรหัสการสร้างเอนไซม์โดยยีนจึงทำให้สามารถประเมินการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนได้ด้วยการตรวจติดตามจากยีน เช่น ยีน *alkB* (Jurelevicius และคณะ, 2013) โดยการแสดงออกของ

ยีนแต่ละชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนนั้นจะมีการประมวลรหัสเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ทำให้มีความจำเพาะต่อสายอัลเคนที่แตกต่างกันดังตารางที่ 2.4

**ตารางที่ 2.4** ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ

ยีน	หน้าที่	อ้างอิง
<i>alkB</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>6</sub> -C <sub>12</sub>	Kohno และคณะ (2002)
<i>alkM</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายยาว C <sub>12</sub> ขึ้นไป	Kohno และคณะ (2002)
<i>alkB<sub>1</sub></i>	ไม่จำเพาะเจาะจง	Kohno และคณะ (2002)
<i>alkB-1</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>13</sub> -C <sub>23</sub>	Kloos และคณะ (2006)
<i>alkB1</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลางถึง อัลเคนสายยาว C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub> และอัลเคน ที่เป็นโซ่กิ่ง	Whyte และคณะ (2002)
<i>alkB2</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลางถึงอัล เคนสายยาว C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	Whyte และคณะ (2002)
<i>CYP 153</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>6</sub> -C <sub>16</sub>	Wang และคณะ (2011)
<i>CYP 153</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>8</sub> -C <sub>15</sub>	Wang และคณะ (2010)
<i>almA</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>8</sub> -C <sub>16</sub> และอัลเคนสายยาว C <sub>22</sub> -C <sub>36</sub>	Liu และคณะ (2011)
<i>CYP 153</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>8</sub> -C <sub>16</sub>	van Beilen และคณะ (2006)

ดังนั้นจึงทำให้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจติดตามยีนอัลเคนโมโนออกซิจีเนส (*alkB*) เช่นงานวิจัยของ Li และคณะ (2013) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนจากตัวอย่างน้ำเสียบริเวณบ่อน้ำมัน ด้วยการตรวจติดตามยีน *alkB* โดยใช้เทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) พบว่ามีแถบของดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนกันทั้งหมด 13 แถบ ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลพบว่าประกอบด้วย 9 สกุล ได้แก่ *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Acidisphaera*, *Burkholderia*, *Geobacillus*, *Marinobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* และ *Xanthobacter* และพบว่าจำนวน

แบคทีเรียที่ย่อยสลายอัลเคนและจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง  $1.46 \times 10^3$  ถึง  $9.89 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร และ  $1.18 \times 10^4$  ถึง  $6.29 \times 10^5$  เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจติดตามยีน *alkB* ด้วยเทคนิค DGGE เพื่อประเมินความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนในประชาคมแบคทีเรียเพื่อประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันต่อไป

### 2.7.2.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสามารถช่วยเพิ่มการละลายและสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพของน้ำมันได้ โดยตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแสดงดังตารางที่ 2.5 นอกจากนี้การที่เซลล์ของแบคทีเรียมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobicity) หรือมีความไม่ชอบน้ำสูง จะทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าถึงสารที่จะย่อยสลายได้มากขึ้น ช่วยเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะเพื่อให้แบคทีเรียสามารถนำน้ำมันไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ดีขึ้นและส่งผลให้อัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นด้วย (Das และ Chandran, 2011; Panagoda และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	แบคทีเรียที่ผลิต	อ้างอิง
Glycolipid	<i>Bacillus subtilis</i>	Cheng และคณะ (2013)
Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Reis และคณะ (2011)
Lipopeptide	<i>Brevibacterium aureum</i>	Seghal Kiran และคณะ (2010)
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>	Yeh และคณะ (2005)

ตัวอย่างงานวิจัยของ Thavasi และคณะ (2011) ศึกษาผลของการเติม fertilizer และ biosurfactant ต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยมีทั้งหมด 5 ชุดการทดลอง ได้แก่

- ชุดที่ 1 Bacterial cells + mineral salts medium + crude oil (normal)

- ชุดที่ 2 Bacterial cells + mineral salts medium + fertilizer + crude oil (fertilizer คือ ยูเรียและ  $K_2HPO_4$  (1:1 (มวล/มวล))

- ชุดที่ 3 Bacterial cells + mineral salts medium + biosurfactant + crude oil ซึ่ง biosurfactant ที่ใช้จะเป็นชนิดเดียวกับที่แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ผลิตได้ คือชนิด Glycolipid ผลิตโดย *C. kutscheri* ชนิด Glycolipopetide ผลิตโดย *B. megaterium* และชนิด Lipopeptide ผลิตโดย *P. aeruginosa*

- ชุดที่ 4 Bacterial cells + mineral salts medium + fertilizer + biosurfactant + crude oil

- ชุดที่ 5 Crude oil + mineral salts medium (ชุดควบคุม) ป่มเป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง

พบว่าชุดการทดลองที่ 4 ที่มีการเติม fertilizer + biosurfactant ลงไปมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 2% (มวล/ปริมาตร) ได้ดีที่สุด และ *P. aeruginosa* ที่เติม biosurfactant มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบสูงกว่าอีก 2 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม fertilizer + biosurfactant ก็กับการเติม biosurfactant เพียงอย่างเดียว มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่ใกล้เคียงกัน โดยการเติม fertilizer + biosurfactant มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันมากกว่าเพียง 4-5% ดังนั้นการเติม biosurfactant เพียงอย่างเดียวก็เพียงพอที่จะช่วยให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเพิ่มขึ้น

## 2.8 การทดสอบประสิทธิภาพในสภาวะจำลองในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพในสภาวะจำลองในระดับห้องปฏิบัติการเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยในการประเมินประสิทธิภาพการบำบัดก่อนการนำไปใช้ในพื้นที่จริง ซึ่งวิธีที่นิยมใช้คือการสร้างระบบนิเวศจำลอง ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Nikolopoulou และคณะ (2013) ศึกษาผลของการเติมธาตุอาหารต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.5% (มวล/ปริมาตร) ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดินทรายชายหาดโดยใช้ระบบนิเวศจำลอง (microcosm) พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมธาตุอาหารประเภทอนินทรีย์สาร ( $KNO_3$  และ  $K_2HPO_4$ ) และอินทรีย์สาร (uric acid และ lecithin) มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน โดยเมื่อระยะเวลาประมาณ 30 วัน มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายอัลเคน  $C_{12}-C_{35}$  มากกว่า 97% และสามารถย่อยสลายพอลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มี 2-3 วงได้มากกว่า 95% ในระยะเวลา 45 วัน ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเติมธาตุอาหารสามารถช่วยเพิ่มกิจกรรมการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดินทรายชายหาดที่ได้รับการปนเปื้อนได้

ตัวอย่างงานวิจัยของ Almeida และคณะ (2013) ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างดินตะกอนบริเวณชายหาดที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนด้วยระบบนิเวศจำลอง ซึ่งแต่ละชุดการทดลองจะประกอบด้วย 3 ส่วน คือส่วนของตัวอย่างดินตะกอนชายหาด medium และน้ำมันดิบในอัตราส่วน 10:20:0.5 (ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) โดยมี 4 ชุดการทดลอง ได้แก่

- ชุด Biostimulation (BS) คือชุดที่มีการเติมธาตุอาหารให้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสเท่ากับ 100:10:1
- ชุด Autochthonous bioaugmentation (AB) คือชุดที่ตัวอย่างดินตะกอนชายหาดจะผ่านการเติมน้ำมันดิบและบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ก่อนใช้ในการทดลอง
- ชุด Biostimulation + Bioaugmentation (BS + AB) คือชุดที่มีการเติมธาตุอาหารและตัวอย่างดินตะกอนชายหาดที่ผ่านการบ่มด้วยน้ำมันดิบ
- ชุด Natural attenuation (NA) คือชุดที่ศึกษาผลการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ประจำถิ่น พบว่าชุด Biostimulation + Bioaugmentation (BS + AB) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ดีที่สุด

## 2.9 การตรวจติดตามการบำบัดโดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

เนื่องจากการใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลเป็นวิธีหนึ่งที่จะเข้ามามีบทบาทในการศึกษาประชาคมแบคทีเรีย ซึ่งวิธีหนึ่งที่มีความน่าสนใจคือวิธี 16S Metagenomic analysis เป็นวิธีที่สามารถใช้เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมของจีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน ดินตะกอน น้ำทะเล เป็นต้น ซึ่งครอบคลุมจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่มีถึงร้อยละ 90 โดยอาศัยการสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยอาศัยหลักการ คือสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่สนใจ จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rDNA เนื่องจากมีช่วงลำดับเบสที่แตกต่างกันซึ่งสามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ โดยอาศัยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส เพื่อนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ไประบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวอย่าง

ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Singh และ Subudhi (2016) ใช้วิธี 16S Metagenomic analysis ในการศึกษาประชาคมแบคทีเรียที่มีอยู่ในบริเวณบ่อน้ำพุร้อน Deulajhari (ประเทศอินเดีย) โดยใช้ตะกอนจากบ่อน้ำพุร้อน พบว่ามีมากกว่า 28 phyla ที่ตรวจพบ ซึ่ง phyla เด่นที่ยังคงอยู่ได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 69 องศาเซลเซียส pH 8.09 electroconductivity 0.025 dSm<sup>-1</sup> และ total organic carbon 0.356% ได้แก่ Proteobacteria (88.12%) Bacteroidetes (10.76%) Firmicutes (0.35%) Spirochetes (0.18%) และ chloroflexi (0.11%) โดยประมาณ 713 สายพันธุ์ถูกตรวจพบ

ภายใต้สภาวะดังกล่าว ดังนั้นวิธี 16S Metagenomic analysis จึงถือเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยให้ข้อมูลในเชิงปริมาณของประชาคมแบคทีเรียบริเวณบ่อน้ำพุร้อนได้ด้วยการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์





### บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องแก้วและอุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการ
2. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC) ประกอบด้วย
  - เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA
  - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5  
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร  
ภายในเคลือบด้วยเฟนิล เมทิล ซิโลเซน เข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมครอน บริษัท Agilent Technologies, USA
  - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) บริษัท Agilent Technologies, USA
3. เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (mini agarose gel electrophoresis system) รุ่น i-mupid บริษัท Cosmo Bio, Japan
4. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
5. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel Doc 2909™ บริษัท Bio-Rad, USA
6. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
8. เครื่องเขย่า รุ่น PNP, Green SSeriker 2 บริษัท Pana Polytech
9. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (DNA-Thermal Cycle) รุ่น G-STORM บริษัท Gene Technologies, England
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
11. เครื่องวัดความเข้มข้น DNA (UV-vis spectrophotometer) รุ่น Nanodrop 2000 บริษัท Thermo Scientific, USA
12. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA
13. เครื่องวัดแรงตึงผิว (dynamic contact angle meter and tensiometer) รุ่น DCAT21 บริษัท Future Digital Scientific Corp., USA

14. เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) บริษัท Bio-Tex Instrument, USA
15. ชุด PowerSoil DNA Isolation Kit บริษัท MO BIO laboratories, INC., USA
16. ชุด DCode™ System บริษัท Bio-Rad, USA
17. ตู้เขี่ยเชื้อ (ISSCO laminar flow) รุ่น HT-122.5  
บริษัท International Scientific Supply, USA
18. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รุ่น ULT1786  
บริษัท Forma Scientific, USA
19. ตู้แช่แข็งจุดเยือกต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332  
บริษัท Sanyo Electric, Japan
20. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รุ่น BE800 บริษัท Memmert, Germany
21. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บริษัท New Brunswick Scientific, USA
22. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
23. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
24. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
25. เครื่อง Mini-BeadBeater บริษัท Biospec products, USA

### 3.2 เคมีภัณฑ์ สารเคมีทั้งหมดเป็นสารเคมีเกรดงานวิเคราะห์ (analytical reagent)

1. กรดอะซิติก ( $C_2H_4O_2$ ) บริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
3. กลีเซอรอล ( $C_3H_8O_3$ ) บริษัท Research organics, USA
4. กลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) บริษัท Merck, Germany
5. แคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) บริษัท Merck, Germany
6. คลอโรฟอร์ม (chloroform) บริษัท RCI Labscan, Thailand
7. เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) บริษัท Bio Basic, Canada
8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
9. โซเดียมซัลเฟต ( $Na_2SO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
10. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
12. น้ำมันดิบ (Arab light crude oil) บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
13. ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) บริษัท Merck, Germany

14. ทริปโตเนน (tryptone) บริษัท Difco, USA
15. ทริส [ไฮดรอกซีเมทิล] อะมิโนมีเทน (Tris) บริษัท Sigma, USA
16. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) บริษัท Promega, USA
17. โปรติเนสเค (Proteinase K) บริษัท United States Biological, USA
18. แอมโมเนียมไนเตรด ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) บริษัท Merck, Germany
19. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco, USA
20. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
21. โพแทสเซียมอะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) บริษัท Merck, Germany
22. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
23. เฟอริกซิเตรท ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท BDH Chemicals, England
24. เมทานอล ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) บริษัท Merck, Germany
25. แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $\text{MgCl}_2$ ) บริษัท Merck, Germany
26. แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Carlo Erba, France
27. แมงกานีสคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2$ ) บริษัท Merck, Germany
28. รูบิเดียมคลอไรด์ ( $\text{RbCl}$ ) บริษัท Sigma, USA
29. ยูเรีย ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) บริษัท Research organics, USA
30. ไลโซไซม์ (lysozyme) บริษัท Bio Basic, Canada
31. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder บริษัท Geneaid, Taiwan
32. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน Lamda HindIII บริษัท New England Biolabs, UK
33. อะกาโรส (agarose) บริษัท Research organics, USA
34. เอทานอล (ethanol) บริษัท Merck, Germany
35. เอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซีติกแอซิด (EDTA) บริษัท Sigma, USA
36. เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) บริษัท Promega, USA
37. เอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (Rnase A) บริษัท Promega, USA
38. เอนไซม์โปรติเนสเค (proteinase K) บริษัท United States Biological, USA
40. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany
41. เฮกเซน (hexane) บริษัท RCI Labscan, Thailand
42. เฮกซะเดเคน (hexadecane) บริษัท Sigma, USA
43. GoTaq@qPCR Master Mix บริษัท Promega, USA

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ PCR (bp)	อ้างอิง
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA			
314F-GC clamp	CCTACGGGAGGCAGCAG-GC clamp		
314F	CCTACGGGAGGCAGCAG-GC		Muyzer และ
520R	ACCGCGGCTGCTGGC		คณะ (1993)
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะลิฟาติก			
ALK-1F	CATAATAAAGGGCATCACCGT	185	Kohno และ
ALK-1R	GATTCATTCTCGAACTCCAAAC	( <i>alkB</i> )	คณะ (2002)
ALK-2F	GAGACAAATCGTCTAAAACGTAA	271	Kohno และ
ALK-2R	TTGTTATTATTCCAATATGCTC	( <i>alkM</i> )	คณะ (2002)
ALK-3F	TCGAGCACATCCGCGGCCACCA	330	Kohno และ
ALK-3R	CCGTAGTGCTCGACGTAGTT	( <i>alkB<sub>1</sub></i> )	คณะ (2002)
AlkB-1F	AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAAYAA	550	Kloos และ
AlkB-1R	GCRTGRTGRTCNGARTGNCGYTG	( <i>alkB-1</i> )	คณะ (2006)
AlkB1-F	ATCTGGGCGCGTTGGGATTTGAGCG	629	Whyte และ
AlkB1-R	CGCATGGTGATCGCTGTGCCGCTGC	( <i>alkB1</i> )	คณะ (2002)
AlkB2-F	ACTCTGGCGCAGTCGTTTTACGGCC	552	Whyte และ
AlkB2-R	CCCCTGGGCGAGTTGGGCGCACCG	( <i>alkB2</i> )	คณะ (2002)
CYP153-F	ATGTTYATYGCNATGGAYCCN	820	Wang และ
CYP153-R	GCGRTTVCCCATRCARCGR TG	(CYP153)	คณะ (2011)

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

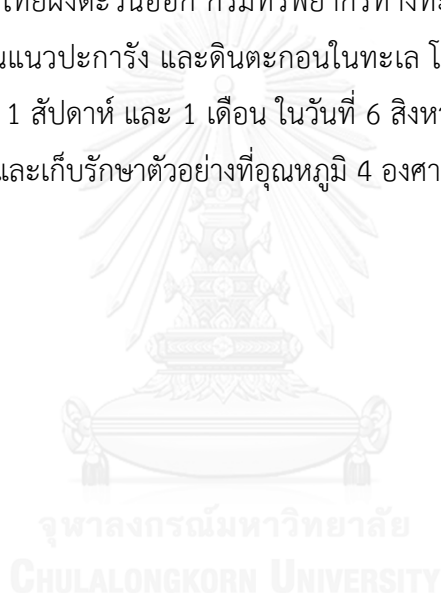
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ PCR (bp)	อ้างอิง
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะลิฟาติก (ต่อ)			
P450F	TGTCGGTTGAAATGTTTCATYGCNMTGGAYCC	800	Wang และคณะ
P450R	TGCAGTTCGGCAAGGCGGTTDCCSRYRCVCK RTG	(CYP153)	(2010)
AlmAwf	GGNGGNACNTGGGAYCTNTT	1131	Liu และคณะ
AlmAwr	ATRTCNGCYTTNAGNGTCC	( <i>almA</i> )	(2011)
P450fw1	GTSGGCGGCAACGACACSAC	339	van Beilen
P450rv3	GCASCGGTGGATGCCGAAGCCRAA	(CYP153)	และคณะ (2006)

### 3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 เพิ่มจำนวนและทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอน บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง

#### 3.3.1.1 ตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอน

ตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มาจากบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุชญา ชวนิชย์ อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง ซึ่งเป็นตัวอย่างดินบริเวณชายฝั่ง ดินตะกอนแนวปะการัง และดินตะกอนในทะเล โดยเก็บตัวอย่างภายหลังเหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วไหลประมาณ 1 สัปดาห์ และ 1 เดือน ในวันที่ 6 สิงหาคม พ.ศ. 2556 และวันที่ 28 และ 30 สิงหาคม พ.ศ. 2556 และเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 3.2



ตารางที่ 3.2 รหัสตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอน บริเวณเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง

รหัส ตัวอย่าง	แหล่งที่มาของตัวอย่าง
CT1-W1	ดินชายฝั่งในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
CT2-W1	ดินชายฝั่งในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
CT1-M1	ดินชายฝั่งในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน
CT2-M1	ดินชายฝั่งในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน
CR1-W1	ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
CR2-W1	ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
CR1-M1	ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน
CR2-M1	ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน
OSB-W1	ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
OS2-W1	ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
OSB-M1	ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน
OS2-M1	ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อน ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน

### 3.3.1.2 วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบโดยดัดแปลงวิธีจาก Johnsen และคณะ (2002) โดยนำสารละลายของน้ำมันดิบที่ละลายใน n-Hexane (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิเปตลงในจานหลุม 96 หลุม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัม/หลุม ระบายสารเคมีประมาณ 30 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient seawater (NSW) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ก) และตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม (ตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน 1 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW 9 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร) และเจือจางตั้งแต่  $10^{-2}$ - $10^{-5}$  โดยทำ 5 หลุม จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นวิเคราะห์ผลการเจริญของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบโดยเติมสารละลายไอโอดีนไตรเตตระโซเลียม-คลอไรด์ (INT dye) ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม 96 หลุม สังเกตตะกอนสีชมพูของ formazan ที่เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของ INT dye แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN และคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบทั้งหมดเพื่อประเมินการมีอยู่ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบในตัวอย่างดินเบื้องต้น โดยชนิดของน้ำมันดิบที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือน้ำมันดิบชนิด Arab Extra Light (AXL) + Arab Light (ARL) มีความหนาแน่นที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.8229 และ 0.8549 (g/cc) ตามลำดับ และมีองค์ประกอบดังตารางที่ 3.3 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยออยล์ จำกัด (มหาชน)

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของน้ำมันดิบที่ใช้ในงานวิจัยนี้

องค์ประกอบ	Arab Extra Light (AXL) Yield (% wgt)	Arab Light (ARL) Yield (% wgt)
LPG	1.64	2.22
Light Naphtha	9.18	5.45
Naphtha	14.08	10.18
Kerosene	24.06	19.54
Gasoil	18.39	18.30
Waxy	24.06	28.63
Short residue	8.59	15.70
Total	100.00	100.00



### 3.3.1.3 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของตัวอย่าง

#### 3.3.1.3.1 สกัดดีเอ็นเอของตัวอย่าง

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอนโดยใช้ชุด PowerSoil DNA Isolation Kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือโดยนำตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน 0.25 กรัม ใส่ลงในหลอดของชุด PowerSoil DNA โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นใส่สาร C1 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร แล้วผสมสารด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที นำตัวอย่างใส่ในเครื่อง Mini-BeadBeater เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วดูดส่วนของเหลวใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จากนั้นใส่สาร C2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วผสมสารด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ อันใหม่แล้วใส่สาร C4 ปริมาตร 1,200 มิลลิลิตร ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนของเหลวใสจากหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปริมาตร 675 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด Spin Filter ที่มาจากชุด PowerSoil DNA จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วทำซ้ำอีกครั้งโดยการดูดส่วนของเหลวใสที่เหลืออยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อีก 675 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด Spin Filter ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง หลังจากนั้นเติมสาร C5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนของเหลวใสทิ้ง จากนั้นนำเฉพาะตัวกรองของ Spin Filter ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ แล้วใส่สาร C6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นนำตัวกรองทิ้งไป จะได้ส่วนของเหลวคือดีเอ็นเอ และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.3.1.3.2 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบความสมบูรณ์ของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1.3.1 ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยเตรียมอะกาโรสเจล เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมในบัฟเฟอร์ Tris-acetate-EDTA ความเข้มข้น 1 เท่า (1X TAE) เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ รอให้อะกาโรสเจลแข็งตัว จากนั้นนำหัวเสียบออกและวางแผ่นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 1X TAE หยอดสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสตีติดตาม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในช่องวิ่ง โดยให้ช่องวิ่งแรกเป็นสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII ที่ผสมกับสตีติดตาม ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 28 นาที แล้วย้อมแผ่นอะกาโรสเจลด้วยสารละลาย

เอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

### 3.3.1.3.3 เพิ่มจำนวนและตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1.3.1 มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ในหลอดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 341-F และ 520-R โดยส่วนผสมสุดท้ายของสารแต่ละชนิดที่ใช้มีดังนี้

- GoTaq® Green Master Mix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร
- สารละลายไพรเมอร์ของแต่ละตัวความเข้มข้น 20 พิโคโมล/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 12 ไมโครลิตร

รวมส่วนผสมทั้งหมดจะมีปริมาตรสุทธิเป็น 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะที่เหมาะสม ดังนี้

- |                                      |                             |                    |
|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1.) Initial denaturation             | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที    |
| 2.) Denaturation                     | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3.) Annealing                        | ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4.) Extension                        | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที    |
| 5.) ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ |                             |                    |
| 6.) Final extension                  | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที    |

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.3.1.3.2 โดยเปรียบเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

### 3.3.1.3.4 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1.3.1 มาตรวจหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะลิฟาติก ดังตารางที่ 3.1 และมีส่วนผสมของสารทั้งหมดในปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.3.3 โดยให้มีสภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละคู่ ดังตารางที่ 3.4

**ตารางที่ 3.4** สภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละคู่

ไพรเมอร์	ขั้นตอน					
	1) Initial denaturation (อุณหภูมิ, ระยะเวลา)	2) Denaturation (อุณหภูมิ, ระยะเวลา)	3) Annealing (อุณหภูมิ, ระยะเวลา)	4) Extension (อุณหภูมิ, ระยะเวลา)	ทำขั้นตอนที่ 2-4 ซ้ำ (รอบ)	5) Final extension (อุณหภูมิ, ระยะเวลา)
ALK-1F ALK-1R และ ALK-2F ALK-2R และ ALK-3F ALK-3R	94 °C, 5 นาที	94 °C, 1 นาที	40 °C, 30 วินาที	72 °C, 30 วินาที	30	72 °C, 5 นาที
AlkB-1F AlkB-1R	90 °C, 5 นาที	90 °C, 30 วินาที	55 °C, 30 วินาที	72 °C, 1 นาที	35	72 °C, 5 นาที
AlkB1-F AlkB1-R และ AlkB2-F AlkB2-R	94 °C, 5 นาที	94 °C, 1 นาที	60 °C, 1 นาที	72 °C, 1 นาที	30	72 °C, 3 นาที
CYP153-F CYP153-R	95 °C, 5 นาที	94 °C, 45 วินาที	54 °C, 30 วินาที	72 °C, 1 นาที	35	72 °C, 10 นาที
P450F P450R	94 °C, 4 นาที	94 °C, 30 วินาที	52 °C, 30 วินาที	72 °C, 1 นาที	32	72 °C, 10 นาที
AlmAwf AlmAwr	94 °C, 5 นาที	94 °C, 30 วินาที	52 °C, 30 วินาที	72 °C, 1 นาที	30	72 °C, 7 นาที
P450fw1 P450rv3	95 °C, 4 นาที	95 °C, 45 วินาที	58 °C, 1 นาที	72 °C, 1 นาที	25	72 °C, 5 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลลี่เล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.3.1.3.2 โดยเปรียบเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

### 3.3.1.4 เพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยวิธีเอนริชเมนต์

เพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยดัดแปลงวิธีจาก Fu และคณะ (2014) โดยนำตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอนจากบริเวณอ่าวพร้าวจำนวน 12 ตัวอย่าง ตัวอย่างละประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เนื่องจากต้องการแบคทีเรียที่จะนำไปใช้บำบัดดินทรายที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันบริเวณชายฝั่งซึ่งเป็นบริเวณที่มีน้ำทะเลท่วมถึง และเติมน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงไปเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยการเลือกใช้ความเข้มข้นของน้ำมันดิบดังกล่าวเพื่อกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีความขุ่นและมีการหายไปของคราบน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ใหม่ ที่มีน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้จนกระทั่งได้กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบในขั้นตอนนี้จะช่วยเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและลดจำนวนของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ไม่สามารถทนความเป็นพิษของน้ำมันดิบหรือไม่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้

### 3.3.1.5 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้

#### 3.3.1.5.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว 0.1 เท่า Luria-Bertani (0.1X LB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) โดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยก 5 มิลลิลิตรลงไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง แขนวลอยเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ให้มีค่าประมาณ 1 ตรวจสอบจำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียที่ได้ และใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ในการปรับหัวเชื้อให้มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $7 \log$  CFU/มิลลิลิตร

### 3.3.1.5.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียโดยแบ่งเป็นชุดทดลองและชุดควบคุม โดยชุดทดลองจะใช้หัวเชื้อที่มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $7 \log$  CFU/มิลลิลิตร 500 ไมโครลิตรที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.5.1 ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW 4.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนชุดควบคุมจะเติมน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW 5 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และ 2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography (GC-FID) รุ่น 6890N

### 3.3.1.5.3 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ GC-FID

ชั่งน้ำมันดิบ 100 มิลลิกรัม ผสมลงในเฮกเซน 10 มิลลิลิตร และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1,000 2,000 4,000 6,000 และ 8,000 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นกรองด้วยหัวกรอง PTFE (PTFE filter) ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC-FID) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำมันระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับค่าความเข้มข้นของน้ำมัน

### 3.3.1.5.4 สกัดและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่จากการย่อยสลาย

สกัดและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่หลังจากการย่อยสลายด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC-FID) ตามวิธีที่อธิบายไว้ในงานวิจัยของ Nopcharoenkul และคณะ (2011) โดยการเติมเฮกเซน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 2 นาที แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกชั้นของเฮกเซน จากนั้นดูดสารชั้นบนซึ่งเป็นเฮกเซนใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสารเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนของเฮกเซน แล้วระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองสารละลายผ่านหัวกรอง PTFE ที่มีขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC-FID) ภายใต้สภาวะ ดังนี้

คอลัมน์ HP-N5	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซน 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร
---------------	---

อุณหภูมิคอลัมน์ เริ่มต้น 80 องศาเซลเซียส เพิ่มด้วยอัตรา 25 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 3 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 220 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 2 นาทีและเพิ่มด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 300 องศาเซลเซียส  
หยุดเป็นเวลา 7 นาที

แก๊สตัวพา ฮีเลียม

อัตราเร็วของแก๊สตัวพา 2.1 มิลลิลิตร/นาที

โหมด splitless

ปริมาณสารที่ฉีดวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร

คำนวณค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ดังสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (\%)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง}) \times 100}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม}}$$

### 3.3.1.6 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรีย

#### 3.3.1.6.1 สกัดดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย

สกัดดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้วิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม (Ausubel และคณะ, 1999) โดยนำเซลล์ของกลุ่มแบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยกปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 3 ครั้ง เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง จากนั้นกระจายตะกอนเซลล์ในบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE) 517 ไมโครลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมนสารละลายไลโซไซม์ ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมนสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมโปรตีนเนสเค ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมนสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 1 นาที และเติมนสารละลายเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ในโซเดียมคลอไรด์ (CTAB/NaCl) ที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมนคลอโรฟอร์มในปริมาตรที่เท่ากับ ปริมาตรของสารละลายสุดท้ายผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็น

เวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ แล้วเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายสารละลายชั้นบนลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ เติมนไอโซโพรพานอลในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรสุดท้ายของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาจนปรากฏสายติเอ็นเอสีขาว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและระเหยจนเอทานอลแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมอาร์เอ็นเอสเอ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จากนั้นตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนและตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA และตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ตามวิธีที่ระบุในข้อที่ 3.3.1.3.2-3.3.1.3.4

### 3.3.2 คัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

#### 3.3.2.1 คัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

คัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด เนื่องจากข้อดีของการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ในการบำบัด ได้แก่ ใช้ต้นทุนต่ำ ขั้นตอนการเตรียมเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ไม่ยุ่งยาก ควบคุมประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ยังไม่มีรายงานการเป็นเชื้อก่อโรคและนำไปพัฒนาต่อยอดในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อใช้สำหรับการบำบัดในพื้นที่ต่างๆ ได้ โดยนำกลุ่มแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 900 มิลลิลิตร และเจือจางตั้งแต่  $10^{-1}$ - $10^{-7}$  จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางที่  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง 100% Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแข็ง (spread plate) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และสังเกตลักษณะรูปแบบของโคโลนีที่แตกต่างกัน จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Velho-Pereira และ Kamat (2011) โดยวิธี cross streak plate ด้วยการนำห่วงเช็ยเช็ย (loop) เช็ยเช็ยที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาลากทำแนวระนาบติดต่อกันลงบนอาหารแข็ง 100% LB จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีการย้อมแกรม (Gram staining) แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำขั้นตอนในส่วนของการ cross streak plate

ซ้ำ ประมาณ 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ จากนั้นระบุชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยการส่งเชื้อไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ และนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปจำแนกชนิดจุลินทรีย์ และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม nucleotide blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

### 3.3.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.1.5.1-3.3.1.5.4 โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และ 10

ดังนั้นจากผลการระบุชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ประกอบกับประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ทำให้ได้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 1 ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อนำไปศึกษาและทดสอบในขั้นต่อไป

### 3.3.2.3 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.1.6.1 และตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 1 ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.1.3.2-3.3.1.3.4

### 3.3.2.4 ศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์

ศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 1 ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดตามวิธีของ Abouseoud และคณะ (2010) โดยเตรียมหัวเชื้อหัวเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.1.5.1 โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ  $7 \log$  CFU/มิลลิลิตร เติมหักเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ปริมาตร 45 มิลลิลิตร และเติมน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานโดยทำควบคู่กับชุดควบคุมที่มีการเติมน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวใส (supernatant) และส่วนตะกอนเซลล์ที่แยกได้ไปศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้



### 3.3.2.4.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

นำส่วนของเหลวใส (supernatant) จากข้อ 3.3.2.4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว (Tensiometer) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกค่าที่ได้และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

### 3.3.2.4.2 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement)

วัดค่าการกระจายน้ำมันโดยดัดแปลงวิธีของ Morikawa และคณะ (2000) โดยเติมน้ำทะเลปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร หยดน้ำมันดิบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้า จากนั้นนำส่วนของเหลวใส (supernatant) จากข้อ 3.3.2.4 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้า น้ำมัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่น้ำมันกระจายตัว (clear zone) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และนำผลมาคำนวณหาพื้นที่การกระจายน้ำมัน ดังสมการ

$$\text{พื้นที่การกระจายน้ำมัน} = \pi r^2$$

### 3.3.2.4.3 การวัดค่าดัชนีอิมัลชัน (Emulsion Index, E24)

นำส่วนของเหลวใส (supernatant) จากข้อ 3.3.2.4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำมันดิบปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 2 นาที โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าความสูงของชั้นอิมัลชันที่เกิดขึ้น และคำนวณค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน ดังสมการ

$$E24 (\%) = \left( \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของของเหลวทั้งหมด}} \right) \times 100$$

### 3.3.2.4.4 การตรวจสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (Hydrophobicity)

นำส่วนตะกอนเซลล์จากข้อ 3.3.2.4 มาตรวจสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ตามวิธีของ (Costa และคณะ, 2010) โดยล้างตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟตยูเรีย แมกนีเซียมซัลเฟต (PUM) จำนวน 1 ครั้ง แลว่นลยเซลล์ในบัฟเฟอร์ PUM จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 1.0 (OD<sub>400</sub> เริ่มต้น) แล้วนำเซลล์ที่แขวนลอยปริมาตร 4 มิลลิลิตร มาผสมกับเฮกซะเดเคน (hexadecane) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูสารแขวนลอยของแบคทีเรีย (สารชั้นล่าง) มาวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตรอีกครั้ง (OD<sub>400</sub> สุดท้าย) และคำนวณการเกิดไฮโดรโฟบิก ดังสมการ

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

### 3.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ

#### 3.3.3.1 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของตัวอย่างดินทรายจาก อ่าวพร้าว

ส่งวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินทราย (ตัวอย่างดินชายฝั่ง จากอ่าวพร้าวบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน (CT1-M1)) ที่โครงการพัฒนาวิชาการดิน-ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อม ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีได้แก่ ลักษณะเนื้อดินใช้วิธี Hydrometer อินทรีย์วัตถุใช้วิธี Walkley and Black ฟอสฟอรัส ใช้วิธี Bray II โปแทสเซียม ไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ใช้ pH meter (ดิน:น้ำ เท่ากับ 1:1) ค่าความชื้น และอัตราส่วน คาร์บอนต่อไนโตรเจน รวมทั้งตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบ ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) โดยดัดแปลงวิธีจาก Johnsen และคณะ (2002)

#### 3.3.3.2 สร้างชุดทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ

ซังดินทราย (ดินบริเวณชายฝั่งตัวอย่าง CT1-M1) 6 กรัม ใส่ลงในขวดแก้ว ฝาเกลียว ขนาด 30 มิลลิลิตร จำนวน 126 ขวด เติมน้ำมันดิบ 4% (มวล/มวล) โดยอ้างอิงจาก งานวิจัยของ Okoh (2013) และน้ำทะเล 1 มิลลิลิตร เพื่อปรับความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ขวด ดังรูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.5 ชุดการทดลอง A (Abiotic control) จะนำตัวอย่างดินทรายหนึ่งขวดที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 ครั้ง/วัน เป็นเวลา 3 วัน ชุดการทดลอง B (Natural attenuation) เพื่อทดสอบการย่อยสลาย น้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น ชุดการทดลอง C (Bioaugmentation) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 1 ชนิด โดยเติม แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีจำนวนหัวเชื้อเริ่มต้นที่ประมาณ 9 log CFU/กรัม น้ำหนักเปียก ชุดการทดลอง D (Biostimulation) เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยการกระตุ้นการเจริญของ แบคทีเรียโดยการเติมธาตุอาหาร เนื่องจากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน CT1-M1 พบว่าธาตุไนโตรเจน ไม่เป็นไปตามสัดส่วนจึงเติมปุ๋ยยูเรีย 0.017 กรัม/กรัมดิน เพื่อปรับให้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อ ไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสเท่ากับประมาณ 100:10:1 ชุดการทดลอง E (Dispersant) เพื่อทดสอบการ

ย่อยสลายน้ำมันดิบภายหลังจากการเติมสารกระจายน้ำมัน (dispersant) ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ Slickgone NS type 2/3 ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ Kerosene (Light petroleum distillates) (ความเข้มข้น 60-70%) CAS No. 64742-47-8 และสาร Sodium Dioctylsulphosuccinate (ความเข้มข้น 1-10%) CAS No.577-11-7 โดยสาร Kerosene ทำหน้าที่เป็นตัวทำละลาย (Solvent) ให้กับสาร Sodium Dioctylsulphosuccinate ที่ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) โดยเจือจางสาร Slickgone NS กับน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50% และเติมลงไปในอัตราส่วนน้ำมันดิบต่อ dispersant เท่ากับ 20:1 ตามคำแนะนำของบริษัท Dasic International Ltd. ที่ระบุว่าสามารถเจือจางสาร Slickgone NS ได้ถึงความเข้มข้น 10% ก็ยังคงมีประสิทธิภาพอยู่ และอัตราส่วนที่ระบุให้ใช้คือ 1 ส่วนของ dispersant ต่อ 20-30 ส่วนของน้ำมัน ชุดการทดลอง F (Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบจากผลของการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 1 ชนิด การเติมธาตุอาหาร และการเติมสาร dispersant โดยทุกชุดการทดลองจะบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 20 40 60 80 และ 100 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC-FID) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ รวมทั้งตรวจติดตามแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เติมลงไปและการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี 16S Metagenomic analysis



**รูปที่ 3.1** ชุดทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้ดินทรายจากอ่าวพร้าว

**หมายเหตุ:** ชุดที่ 1 ชุด Abiotic Control ชุดที่ 2 ชุด Natural attenuation ชุดที่ 3 ชุด Bioaugmentation ชุดที่ 4 ชุด Biostimulation ชุดที่ 5 ชุด Dispersant ชุดที่ 6 ชุด Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant (เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา)

ตารางที่ 3.5 ชุดทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้ดินทรายจากอ่าวพร้าว

ชุดการทดลอง	ดินผ่าน	น้ำมันดิบ	แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์	ธาตุอาหาร	Slicksone NS	ดิน	น้ำทะเล
	การฆ่าเชื้อ	4% (มวล/มวล)	ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 1 ชนิด (จำนวนหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 10 <sup>9</sup> CFU/กรัม น้ำหนักเปียก)	(ปุ๋ยเรีย)	type 2/3	(6 กรัม)	(1 มิลลิตร)*
A. Abiotic control	✓	✓	-	-	-	✓	✓
B. Natural attenuation	-	✓	-	-	-	✓	✓
C. Bioaugmentation	-	✓	✓	-	-	✓	✓
D. Biostimulation (C:N:P เท่ากับ100:10:1)	-	✓	-	✓	-	✓	✓
E. Dispersant	-	✓	-	-	✓	✓	✓
F. Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓

หมายเหตุ: เครื่องหมาย ✓ แสดงถึงการเติมสารที่ระบุลงไป

\*เติมน้ำทะเล 1 มิลลิตร เพื่อปรับความจุสูงสุดในการอุ่นน้ำเป็น 60 เปอร์เซ็นต์

### 3.3.3.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในดิน

#### 3.3.3.3.1 สกัดน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในดินด้วยเฮกเซน

สกัดน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในดินตามวิธีที่อธิบายไว้ในงานวิจัยของ Nopcharoenkul และคณะ (2011) โดยเติมเฮกเซน 4 มิลลิลิตร ลงไปในขวดแก้วฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 2 นาที และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกชั้นของเฮกเซน หลังจากนั้นดูดส่วนเฮกเซนใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนของเฮกเซน นำส่วนของเฮกเซนที่ผ่านการกำจัดน้ำออกไประเหยแห้งที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองสารละลายผ่านหัวกรอง PTFE ที่มีขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC-FID)

#### 3.3.3.3.2 สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่

สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.1.5.3-3.3.1.5.4

#### 3.3.3.4 ตรวจสอบติดตามแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์และการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี 16S Metagenomic analysis

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินในชุดการทดลองโดยใช้ชุด PowerSoil DNA Isolation Kit ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.1.3.1 จากนั้นส่งวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี 16S Metagenomic analysis โดยคุณชนกภรณ์ เมืองจินดา ซึ่งมีขั้นตอนหลัก ดังนี้

1) นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTAA - 3') และ 806R (5'- GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT - 3') (V4 region) (Walters และคณะ, 2016)

2) ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซส (PCR Clean up) โดยใช้ AMPure XP beads ของบริษัท Beckman Coulter, USA เพื่อชะล้างบัฟเฟอร์ไพรเมอร์ และ ไพรเมอร์ไดเมอร์ที่อาจมีปะปนอยู่ในระหว่างขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยการทำ PCR

3) ใช้ 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix ของบริษัท Kapa Biosystems, USA ในการติด Index (ชุด Nextera XT Index Kit ของบริษัท Illumina, USA) ที่บริเวณปลาย sequencing primer ทั้ง 2 ด้าน และติดที่ Illumina sequencing adapters

4) ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ครั้งที่ 2 (PCR Clean up 2) โดยใช้ AMPure XP beads เพื่อขจัดสารละลายไพร์เมอร์ใดเมอร์ที่อาจยังคงมีหลงเหลืออยู่ในระหว่างขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากการทำ PCR ก่อนหน้านี้

5) วัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง DeNovix ของบริษัท DeNovix, USA และคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เจือจางตัวอย่าง และรวมตัวอย่าง (Pooling) โดยมีสูตรคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ดังนี้

$$\frac{(\text{concentration in ng}/\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} \times \text{average library size})} \times 10^6 = \text{concentration in nM}$$

6) วิเคราะห์ Metagenomic sequencing ด้วยเครื่อง Miseq ของบริษัท Illumina, USA โดยใช้ Miseq Reagent kit V2 ของบริษัท Illumina, USA และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียและตรวจติดตามแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เดิมลงไป

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

4.1 จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบและประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอน บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง

#### 4.1.1 จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบในตัวอย่าง

ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบโดยวิธี Most Probable Number (MPN) ในตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอนทั้ง 12 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างทั้งที่ได้รับการปนเปื้อนและไม่ได้รับการปนเปื้อนจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบอยู่ในช่วงตั้งแต่  $4.87 \times 10^4$  –  $2.63 \times 10^5$  MPN/กรัมน้ำหนักเปียก ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งแสดงถึงการมีอยู่ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบจำนวนหนึ่งในทุกตัวอย่างดิน ซึ่งมีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Horel และคณะ (2014) ที่พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายอัลเคนในตัวอย่างดินตะกอนที่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันดิบอยู่ในช่วง  $1.9 \times 10^4$  ถึง  $3.7 \times 10^5$  MPN/กรัมน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยวิธี Most Probable Number (MPN)  
ในตัวอย่างดินชายฝั่งและดินตะกอน

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย (MPN/กรัมน้ำหนักเปียก)
CT1-W1	$8.20 \pm 1.41 \times 10^4$
CT1-M1	$2.17 \pm 0.92 \times 10^5$
CT2-W1	$7.20 \pm 0.00 \times 10^4$
CT2-M1	$2.00 \pm 0.00 \times 10^5$
CR1-W1	$2.43 \pm 1.62 \times 10^5$
CR1-M1	$7.40 \pm 6.58 \times 10^4$
CR2-W1	$1.05 \pm 0.40 \times 10^5$
CR2-M1	$5.47 \pm 3.23 \times 10^4$
OSB-W1	$8.67 \pm 5.80 \times 10^4$
OSB-M1	$4.87 \pm 2.19 \times 10^4$
OS2-W1	$2.63 \pm 1.06 \times 10^5$
OS2-M1	$1.54 \pm 0.70 \times 10^5$

หมายเหตุ: รหัสตัวอย่าง

- CT1-W1: ดินชายฝั่งในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
- CT1-M1: ดินชายฝั่งในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน
- CT2-W1: ดินชายฝั่งในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
- CT2-M1: ดินชายฝั่งในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน
- CR1-W1: ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
- CR1-M1: ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน
- CR2-W1: ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
- CR2-M1: ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน
- OSB-W1: ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
- OSB-M1: ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน
- OS2-W1: ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์
- OS2-M1: ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน



#### 4.1.2 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของตัวอย่าง

จากผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบโดยวิธี Most Probable Number (MPN) พบว่าในทุกตัวอย่างมีจำนวนของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบ ดังนั้นจึงตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบเพื่อยืนยันผลการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งผลการตรวจสอบยีนโดยใช้ 10 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน แสดงตารางที่ 4.2 พบว่าในทุกตัวอย่างสามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคู่ไพรเมอร์ ALK2-F และ ALK2-R ที่ขนาดคาดหวัง 271 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน *alkM* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์อัลเคน ไฮดรอกซิเลส ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนมากกว่า 12 อะตอมขึ้นไป (Kohno และคณะ, 2002) ตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคู่ไพรเมอร์ ALK3-F และ ALK3-R ที่ขนาดคาดหวัง 330 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน *alkB<sub>1</sub>* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์อัลเคน ไฮดรอกซิเลสที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายอัลเคน (Kohno และคณะ, 2002) และตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคู่ไพรเมอร์ P450F และ P450R ที่ขนาดคาดหวัง 800 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน CYP153 ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ P450 ไฮโดโครม โมโนออกซิจีเนส ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-15 อะตอม (Wang และคณะ, 2010) รวมทั้งตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคู่ไพรเมอร์ P450fw1 และ P450rv3 ที่ขนาดคาดหวัง 339 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน CYP153 ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ P450 ไฮโดโครม ไฮดรอกซิเลส ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-16 อะตอม (van Beilen และคณะ, 2006) นอกจากนี้ในตัวอย่าง CR2-W1 CR2-M1 OSB-W1 OSB-M1 OS2-W1 และ OS2-M1 ยังตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคู่ไพรเมอร์ CYP153-F และ CYP153-R ที่ขนาดคาดหวัง 820 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน CYP153 ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ P450 ไฮโดโครม โมโนออกซิจีเนส ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 6-16 อะตอม (Wang และคณะ, 2011) ซึ่งจากการตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบจึงแสดงถึงการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบในทุกตัวอย่างดิน และคาดว่าในทุกตัวอย่างจะสามารถนำไปเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบให้เพิ่มมากขึ้นได้

ตารางที่ 4.2 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้ 10 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนของตัวอย่างดินทั้ง 12 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ไพรเมอร์									
	ALK1 (ยีน <i>alkB</i> )	ALK2 (ยีน <i>alkM</i> )	ALK3 (ยีน <i>alkB<sub>1</sub></i> )	ALKB-1 (ยีน <i>alkB-1</i> )	ALKB1 (ยีน <i>alkB1</i> )	ALKB2 (ยีน <i>alkB2</i> )	CYP153 (ยีน CYP153)	P450 (ยีน CYP153)	AlmA (ยีน <i>alkmA</i> )	P450 fm1 & rv3 (ยีน CYP153)
CT1-W1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
CT1-M1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
CT2-W1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
CT2-M1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
CR1-W1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
CR1-M1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
CR2-W1	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
CR2-M1	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
OSB-W1	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
OSB-M1	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
OS2-W1	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
OS2-M1	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่ใช้พอลิเมอร์เรสตามขนาดที่คาดหวัง

+ หมายถึง พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่ใช้พอลิเมอร์เรสตามขนาดที่คาดหวัง

#### 4.1.3 กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบซึ่งเพิ่มจำนวนจากตัวอย่าง

จากผลการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบและการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบซึ่งพบว่าในทุกตัวอย่างดินมีแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบอยู่ จึงนำตัวอย่างดินมาเพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรียเพื่อให้ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบในจำนวนมาก รวมทั้งอาจมีความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อประโยชน์ในการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป โดยการใช้ไขมันดิบที่ความเข้มข้น 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เพื่อกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Seawater (NSW) พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบให้เพิ่มมากขึ้นได้ในทุกตัวอย่างดิน โดยสังเกตได้จากคราบฟิล์มไขมันที่ลดลงและกากตะกอนน้ำมันบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว รวมทั้งความขุ่นที่เกิดขึ้นเนื่องจากผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียและอาจเนื่องจากการเกิดอิมัลชัน ดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 ซึ่งระยะเวลาที่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงที่แสดงถึงการย่อยสลายน้ำมันดิบที่เกิดขึ้นนั้นพบว่าเป็นช่วงแรกจะใช้ระยะเวลานาน โดยในการเอนริชเมนต์ครั้งที่ 1 ใช้ระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ และครั้งที่ 2-4 ใช้ระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ อาจเนื่องจากจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบยังน้อยอยู่ แต่เมื่อผ่านการถ่ายเชื้อไประยะเวลาหนึ่งพบว่าสามารถสังเกตเห็นผลของการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียได้รวดเร็วขึ้น โดยในการเอนริชเมนต์ครั้งที่ 5 ใช้ระยะเวลาประมาณ 4-5 วัน และครั้งที่ 6-18 ใช้ระยะเวลาประมาณ 3 วัน ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่เพิ่มจำนวนมากขึ้น

Control CT1-W1 CT2-W1 CR1-W1 CR2-W1 OSB-W1 OS2-W1



Control CT1-M1 CT2-M1 CR1-M1 CR2-M1 OSB-M1 OS2-M1



**รูปที่ 4.1** ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดหลวง NSW ภายหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร)

เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (การเอนริชเมนต์ครั้งที่ 1)

**หมายเหตุ:** กลุ่มแบคทีเรีย CT1-W1 CT2-W1 CR1-W1 CR2-W1 OSB-W1 OS2-W1 (รูปบน)

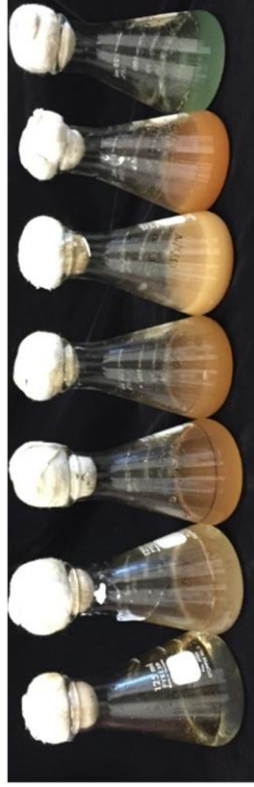
กลุ่มแบคทีเรีย CT1-M1 CT2-M1 CR1-M1 CR2-M1 OSB-M1 OS2-M1 (รูปล่าง)

ชุดควบคุม (ด้านซ้ายสุด)

Control CT1-W1 CT2-W1 CR1-W1 CR2-W1 OSB-W1 OS2-W1



Control CT1-M1 CT2-M1 CR1-M1 CR2-M1 OSB-M1 OS2-M1



**รูปที่ 4.2** ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ภายหลังจากย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นระยะเวลา 3 วัน (การเอริชเมนต์ครั้งที่ 18)

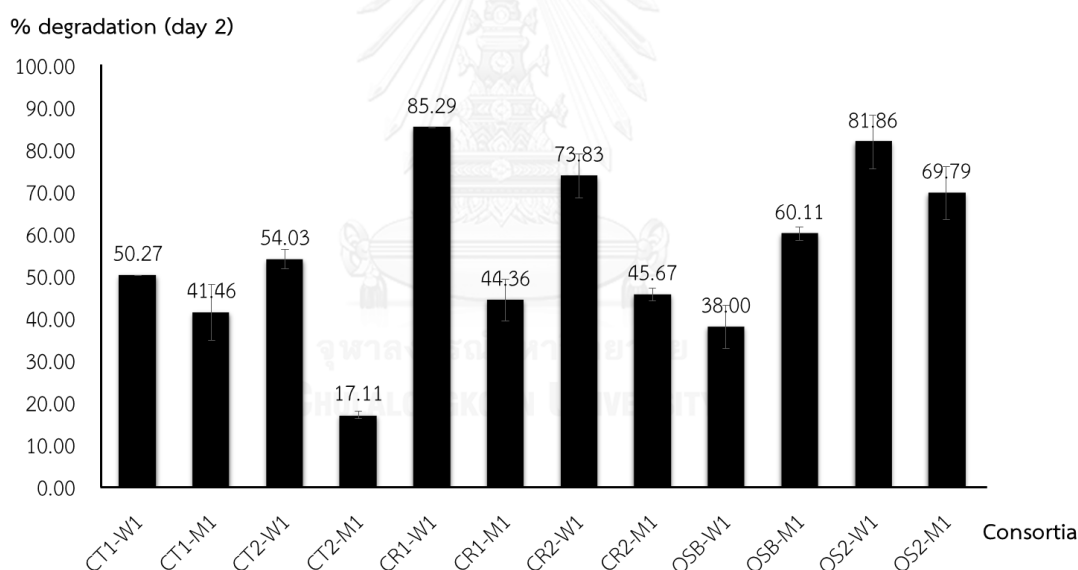
**หมายเหตุ:** กลุ่มแบบคี่เรีย CT1-W1 CT2-W1 CR1-W1 CR2-W1 OSB-W1 OS2-W1 (รูปบน)

กลุ่มแบบคี่เรีย CT1-M1 CT2-M1 CR1-M1 CR2-M1 OSB-M1 OS2-M1 (รูปล่าง)

ชุดควบคุม (ด้านซ้ายสุด)

#### 4.1.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เนื่องจากในระยะหลังของการเอนริชเมนต์พบว่าภายในระยะเวลา 3 วัน ก็สามารถสังเกตเห็นการย่อยสลายของน้ำมันดิบที่เกิดขึ้นโดยกลุ่มแบคทีเรีย ทั้งในส่วนของคราบฟิล์มน้ำมันที่ลดลงและกากตะกอนน้ำมันที่เหลืออยู่บริเวณผิวหน้าอาหาร รวมทั้งลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเปลี่ยนแปลงไปคือมีการขุ่นและการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคาดว่าผลส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย ดังนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 2 เนื่องจากเป็นช่วงที่คาดว่าจะเห็นความแตกต่างของประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของทั้ง 12 กลุ่มแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพโดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC-FID) พบว่าทั้ง 12 กลุ่มแบคทีเรียหลังจากผ่านการเอนริชเมนต์จำนวน 18 ครั้ง เป็นระยะเวลาประมาณ 3 เดือน มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) อยู่ในช่วงตั้งแต่ประมาณ 17-85% ภายในระยะเวลา 2 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่มภายในระยะเวลา 2 วัน

หมายเหตุ: หัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 7 log CFU/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 วัน และทดสอบประสิทธิภาพโดย GC-FID

#### 4.1.5 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เนื่องจากการตรวจพบยีนหลายชนิดสามารถแสดงถึงแนวโน้มการมีอยู่ของแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ที่ทำงานร่วมกันภายในกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งอาจทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมกันหรือแบบปฏิปักษ์กันได้ ดังนั้นจึงตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม และเปรียบเทียบผลที่ได้กับประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งผลการตรวจสอบยีนแสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่าตัวอย่าง CT2-W1 และ OS2-M1 ตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ ALK1-F และ ALK1-R ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 6-12 อะตอม (Kohnno และคณะ, 2002) กลุ่มแบคทีเรีย CT2-W1 CR1-W1 และ OS2-W1 ตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ ALKB-1F และ ALKB-1R ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 13-23 อะตอม (Kloos และคณะ, 2006) กลุ่มแบคทีเรีย CT2-W1 และ OS2-W1 ตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ ALKB1-F และ ALKB1-R ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางถึงอัลเคนสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 12-26 อะตอม และอัลเคนที่เป็นไซกิง (Whyte และคณะ, 2002) กลุ่มแบคทีเรีย CT1-W1 และ CT2-W1 ตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ ALKB2-F และ ALKB2-R ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางถึงอัลเคนสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 12-26 อะตอม (Whyte และคณะ, 2002) กลุ่มแบคทีเรีย CT2-W1 CR1-W1 CR1-M1 CR2-W1 CR2-M1 OS2-W1 และ OS2-M1 ตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ P450F และ P450R ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-15 อะตอม (Wang และคณะ, 2010) กลุ่มแบคทีเรีย CT1-W1 CT2-W1 CT2-M1 CR1-W1 CR1-M1 CR2-W1 CR2-M1 OS2-W1 และ OS2-M1 ตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ P450fw1 และ P450rv3 ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-16 อะตอม (van Beilen และคณะ, 2006) และทุกกลุ่มแบคทีเรียตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ ALK2-F และ ALK2-R ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนมากกว่า 12 อะตอมขึ้นไป (Kohnno และคณะ, 2002) รวมทั้งคูไพรเมอร์ ALK3-F และ ALK3-R ที่ประมวลรหัสเฮนไซม์อัลเคน ไฮดรอกซิเลส ที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายอัลเคน (Kohnno และคณะ, 2002)

เมื่อพิจารณาผลการตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 4.3 กับประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าผลการตรวจสอบยีนอาจไม่สอดคล้องกับประสิทธิภาพการย่อยสลายที่เกิดขึ้น

ตัวอย่างเช่นกลุ่มแบคทีเรีย CT2-W1 ตรวจพบยีน *alkB alkM alkB<sub>1</sub> alkB-1 alkB1 alkB2 CYP153* และ *almA* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เท่ากับประมาณ 54% ในระยะเวลา 2 วัน ส่วนกลุ่มแบคทีเรีย OSB-M1 ที่ตรวจพบยีน *alkM* และ *alkB1* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบเท่ากับประมาณ 60% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบหลากหลายชนิดอาจแสดงถึงการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนหลายสายพันธุ์ แต่อาจมีการทำงานแบบแข่งขันหรือปฏิปักษ์กัน จึงส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบที่เกิดขึ้น ส่วนในกลุ่มแบคทีเรียบางกลุ่มสามารถตรวจพบยีนไม่หลากหลายมากนัก แต่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ดี อาจเนื่องมาจากกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวอาจประกอบด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันดิบ จึงอาจเกิดการแข่งขันกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ส่งผลให้ความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียลดลง หรือแบคทีเรียสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียนั้นทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมกันในการย่อยสลาย





ตารางที่ 4.3 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้ 10 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะซิฟาติกไฮโดรคาร์บอนของกลุ่มแบคทีเรีย

กลุ่ม แบคทีเรีย	ไพรเมอร์										
	ALK1 (ยีน <i>alkB</i> )	ALK2 (ยีน <i>alkM</i> )	ALK3 (ยีน <i>alkB<sub>1</sub></i> )	ALKB-1 (ยีน <i>alkB-1</i> )	ALKB1 (ยีน <i>alkB1</i> )	ALKB2 (ยีน <i>alkB2</i> )	CYP153 (ยีน CYP153)	P450 (ยีน CYP153)	AlmA (ยีน <i>alkA</i> )	P450 fw1 & rv3 (ยีน CYP153)	
CT1-W1	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
CT1-M1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CT2-W1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CT2-M1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
CR1-W1	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
CR1-M1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
CR2-W1	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
CR2-M1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
OSB-W1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OSB-M1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OS2-W1	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
OS2-M1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาสุกซ์พอลิเมอร์เรสตามขนาดที่คาดหวัง

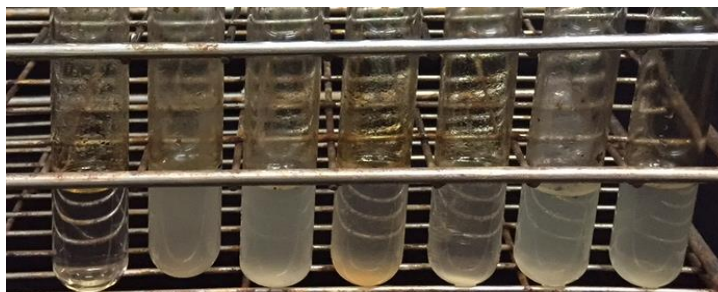
+ หมายถึง พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาสุกซ์พอลิเมอร์เรสตามขนาดที่คาดหวัง

## 4.2 ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ

### 4.2.1 ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ

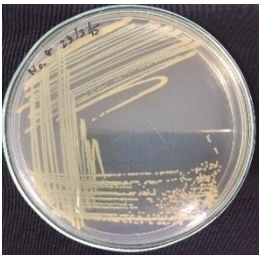
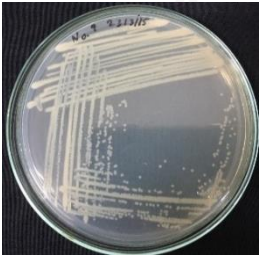
จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่าทั้ง 12 กลุ่มแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ อย่างไรก็ตามการนำกลุ่มแบคทีเรียไปใช้ในการบำบัดพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนต่างๆ อาจเกิดปัญหาเนื่องจากประชาคมแบคทีเรียอาจเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการบำบัด ซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถควบคุมประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ รวมทั้งอาจมีการแข่งขันกันหรือการทำงานเป็นปฏิปักษ์กันภายในกลุ่มแบคทีเรียซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ ดังนั้นการเลือกใช้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ จึงคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพทั้ง 12 กลุ่ม พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ดังรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.4 และผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-08 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* เท่ากับ 100% ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-09 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Ochrobactrum* เท่ากับ 99% ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-11 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Exiguobacterium* เท่ากับ 99% ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-12 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เท่ากับ 100% ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-14 ความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* เท่ากับ 99% และลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-15 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* เท่ากับ 99% ซึ่งการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 6 สายพันธุ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank แสดงดังตารางที่ 4.5-4.10

Control AO-08 AO-09 AO-11 AO-12 AO-14 AO-15



รูปที่ 4.4 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ภายหลังจากย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นระยะเวลา 10 วัน ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ด้านซ้ายสุด)

ตารางที่ 4.4 แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ได้จากการคัดแยก

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์	Gram	ลักษณะของแบคทีเรีย	แหล่งที่มา
AO-08 	(-)	สีส้ม กลม ขอบหยัก	CT1-M1 CT2-W1 CR1-W1 CR1-M1 CR2-W1 CR2-M1 OSB-W1 OS2-W1 OS2-M1
AO-09 	(-)	สีขาวครีม กลม ขอบเรียบ	CR1-M1 OSB-W1 OS2-W1

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์	Gram	ลักษณะของแบคทีเรีย	แหล่งที่มา
AO-11	(+)	สีเหลืองส้ม กลม ขอบเรียบ	CR1-M1 CR2-W1 OSB-W1 OS2-W1 OS2-M1
AO-12	(+)	สีขาวครีม กลม ขนาดใหญ่	CR1-M1 CR2-M1 OSB-M1 OS2-W1
AO-14	(-)	สีเหลือง ขอบหยัก แผ่	CT1-W1 CT2-M1 OSB-M1
AO-15	(-)	สีเหลืองนวล กลม เยิ้ม ขอบเรียบ	CT1-W1 OS2-W1

**ตารางที่ 4.5** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-08  
กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน (%)	อ้างอิง
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 12-4-4(59)	CP013696	1314/1314 (100%)	Karna และคณะ (2016)
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> I-M-1-1-1	KU570306	1314/1314 (100%)	Ma และคณะ (2016)
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ASAI 02	KU563773	1314/1314 (100%)	Ramalakshmi และ คณะ (2016)
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S164S	KU647644	1314/1314 (100%)	Sandhiya (2016)
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RD_AZPRC_22	KU597541	1314/1314 (100%)	Marcano และคณะ

**ตารางที่ 4.6** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-09  
กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน (%)	อ้างอิง
1	<i>Ochrobactrum anthropi</i> S4	KT380595	1314/1315 (99%)	Luo และคณะ (2015)
2	<i>Ochrobactrum anthropi</i> SH23C	KT337526	1314/1315 (99%)	Uchendu-Obi และ คณะ (2015)
3	<i>Ochrobactrum anthropi</i> JPR27	KR045594	1314/1315 (99%)	Saikia และคณะ (2015)
4	<i>Ochrobactrum anthropi</i> OAB	CP008820	1314/1315 (99%)	Bishop-Lilly และคณะ (2014)
5	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	NR074243	1314/1315 (99%)	Chain และคณะ (2011)

ตารางที่ 4.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-11 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน (%)	อ้างอิง
1	<i>Exiguobacterium indicum</i> V5	KU058437	948/951 (99%)	Jinendiran และคณะ (2015)
2	<i>Exiguobacterium indicum</i> 13 (BR43)	KF254737	940/942 (99%)	Maleki-Ravasan และคณะ (2015)
3	<i>Exiguobacterium indicum</i> SHHR3-1	KT216605	945/951 (99%)	Yousaf และคณะ (2015)
4	<i>Exiguobacterium indicum</i> IARI-AR137	KJ713313	941/945 (99%)	Yadav และคณะ (2014)
5	<i>Exiguobacterium indicum</i> JDM5_1B	JN644520	947/952 (99%)	Chandel และคณะ (2013)

ตารางที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-12 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน (%)	อ้างอิง
1	<i>Bacillus thuringiensis</i> SP15	KX121704	1314/1314 (100%)	Priya และคณะ (2016)
2	<i>Bacillus thuringiensis</i> IARI-BGB	KT441034	1314/1314 (100%)	Saxena และคณะ (2015)
3	<i>Bacillus thuringiensis</i> BAPE1	KT206229	1314/1314 (100%)	Aarathi และคณะ (2015)
4	<i>Bacillus</i> sp. Ym7A	KJ944284	1314/1314 (100%)	(Kumar และ Pannu, 2014)
5	<i>Bacillus</i> sp. L319	KJ944158	1314/1314 (100%)	Guo (2014)

ตารางที่ 4.9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-14 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน (%)	อ้างอิง
1	<i>Pseudomonas composti</i> C5	FN652314	1373/1386 (99%)	Gibello และคณะ (2011)
2	<i>Pseudomonas composti</i> C2	NR116992	1373/1386 (99%)	Gibello และคณะ (2011)
3	<i>Pseudomonas</i> sp. IW-223	KF556699	1351/1381 (98%)	Miki และคณะ (2013)
4	<i>Pseudomonas</i> sp. HKF-3	AB633201	1355/1386 (98%)	Fujimori และคณะ (2012)
5	<i>Pseudomonas</i> sp. G3DM-33	EU037280	1358/1387 (98%)	Desai และคณะ (2009)

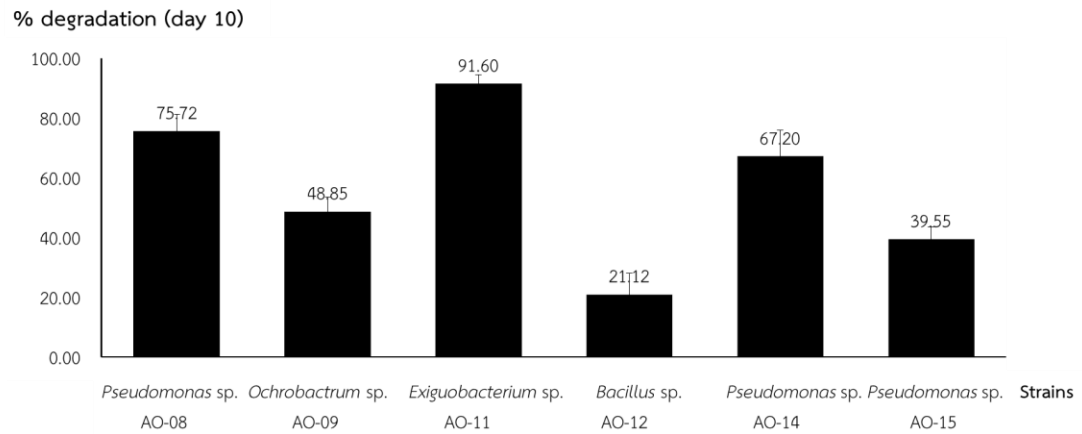
ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AO-15 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน (%)	อ้างอิง
1	<i>Pseudomonas putida</i> HB3267	CP003738	1236/1241 (99%)	Molina และคณะ (2014)
2	<i>Pseudomonas putida</i> MSPP6	KJ452464	1236/1241 (99%)	Meenakshisundaram และ Bharathiraja (2014)
3	<i>Pseudomonas putida</i> BIRD-1	CP002290	1236/1241 (99%)	Matilla และคณะ (2011)
4	<i>Pseudomonas putida</i> B6-2	CP015202	1236/1241 (99%)	Tang และคณะ (2011)
5	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	NR074596	1236/1241 (99%)	Nelson และคณะ (2002)

#### 4.2.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรีย

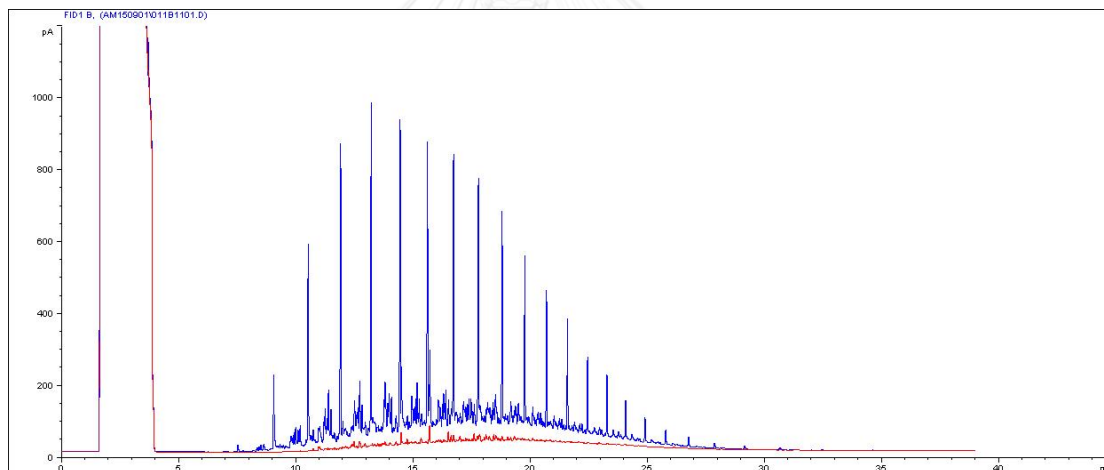
เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 6 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ได้ จึงทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายโดยใช้เครื่อง GC-FID และเก็บตัวอย่างในวันที่ 10 ซึ่งเป็นวันที่สามารถสังเกตเห็นความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและลักษณะของน้ำมันที่ถูกย่อยสลายได้อย่างชัดเจนคือมีลักษณะเป็นกากตะกอนน้ำมันขนาดเล็ก โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพพบว่า *Exiguobacterium* sp. AO-11 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบสูงที่สุดคือประมาณ 90% รองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. AO-08 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ประมาณ 75% และรองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. AO-14 *Ochrobactrum* sp. AO-09 *Pseudomonas* sp. AO-15 และ *Bacillus* sp. AO-12 โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ประมาณ 67% 48% 40% และ 21% ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.5 ดังนั้นจะเห็นได้ว่า *Exiguobacterium* sp. AO-11 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยโครมาโทแกรมประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบแสดงดังรูปที่ 4.6 นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการก่อโรคของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Exiguobacterium indicum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความเหมือนกับ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่ 99% (948/952) เมื่อเปรียบเทียบ ผลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA กับฐานข้อมูล GenBank โดยจากงานวิจัยของ Pindi และคณะ (2013) พบว่าสามารถตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Exiguobacterium* ได้ในน้ำสำหรับดื่มจากการสู่มตัวอย่างน้ำดื่มจากโรงพยาบาลในเขต Mahabubnagar ประเทศอินเดีย แต่ไม่มีการรายงานว่าเป็นเชื้อก่อโรค และจากงานวิจัยของ Truong และคณะ (2016) พบว่าสามารถคัดแยก *Exiguobacterium Indicum* Pn04 ได้จากตัวอย่างที่มาจากบ่อน้ำพุร้อน และแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิต agarase, cellulose, gelatinase และ lipase ได้ ซึ่งมีประโยชน์ต่อภาคอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Exiguobacterium* sp. AO-11 เพื่อนำไปศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียชนิดดังกล่าวที่ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายที่เกิดขึ้น ได้แก่ การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบและศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ รวมทั้งนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบเพื่อเป็นแนวทางในการนำแบคทีเรีย สายพันธุ์นี้ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนต่อไป





รูปที่ 4.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ทั้ง 6 สายพันธุ์

หมายเหตุ: หัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $7 \log$  CFU/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 วัน และทดสอบประสิทธิภาพโดย GC-FID



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 (เส้นสีแดง) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (เส้นสีน้ำเงิน) โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 10

#### 4.2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Exiguobacterium* sp. AO-11

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า *Exiguobacterium* sp. AO-11 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอีก 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมาศึกษาลักษณะสมบัติที่ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดิบที่เกิดขึ้นโดยการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ แสดงดังตารางที่ 4.11 พบว่าตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ ALK2-F และ ALK2-R ที่ขนาดคาดหวัง 271 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน *alkM* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์อัลเคน ไฮดรอกซิเลส ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนมากกว่า 12 อะตอมขึ้นไป (Kohno และคณะ, 2002) ตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ ALK3-F และ ALK3-R ที่ขนาดคาดหวัง 330 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน *alkB<sub>1</sub>* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์อัลเคน ไฮดรอกซิเลส ที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายอัลเคน (Kohno และคณะ, 2002) ตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ ALKB-1F และ ALKB-1R ที่ขนาดคาดหวัง 550 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน *alkB-1* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ Integral membrane non-heme iron monooxygenase ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 13-23 อะตอม (Kloos และคณะ, 2006) รวมทั้งตรวจพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากคูไพรเมอร์ P450fw1 และ P450rv3 ที่ขนาดคาดหวัง 339 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน CYP153 ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ P450 ไฮโดรโครม ไฮดรอกซิเลส ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-16 อะตอม (van Beilen และคณะ, 2006)

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้น่าจะมีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนสายกลางและอัลเคนสายยาวได้ ซึ่งสอดคล้องกับโครมาโทแกรมประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ในการเก็บตัวอย่างวันที่ 10 ดังรูปที่ 4.6 ที่พบว่าแต่ละ peak ของกราฟลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงถึงการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4.11 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Exiguobacterium* sp. AO-11

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์	ไพรเมอร์										
	ALK1 (ยีน <i>alkB</i> )	ALK2 (ยีน <i>alkM</i> )	ALK3 (ยีน <i>alkB<sub>1</sub></i> )	ALKB-1 (ยีน <i>alkB-1</i> )	ALKB1 (ยีน <i>alkB1</i> )	ALKB2 (ยีน <i>alkB2</i> )	CYP153 (ยีน <i>CYP153</i> )	P450 (ยีน <i>CYP153</i> )	almAw (ยีน <i>almA</i> )	P450 fw1 & rv3 (ยีน <i>CYP153</i> )	
<i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	
หมายเหตุ:	-	หมายถึง ไม่พบผลิตภัณฑ์จากลูกโซ่พอลิเมอร์เรสตามขนาดที่คาดหวัง									
	+	หมายถึง พบผลิตภัณฑ์จากลูกโซ่พอลิเมอร์เรสตามขนาดที่คาดหวัง									

#### 4.2.4 แนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ของ *Exiguobacterium* sp. AO-11

ลักษณะสมบัติอีกประการหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียคือการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความไม่ชอบน้ำของเซลล์ เนื่องสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สร้างจากแบคทีเรียสามารถช่วยเพิ่มการละลายและสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพของน้ำมันได้ รวมทั้งการที่เซลล์ของแบคทีเรียมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobicity) หรือมีความไม่ชอบน้ำสูง จะทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าถึงสารที่จะย่อยสลายได้มากขึ้น ซึ่งส่งผลให้อัตราการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้นด้วย ดังนั้นจึงศึกษาลักษณะสมบัติดังกล่าวในแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Exiguobacterium* sp. AO-11 พบว่าสามารถลดแรงตึงผิวเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Seawater (NSW) ที่เติมน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร)) โดยค่าแรงตึงผิวลดลงจาก  $65.33 \pm 2.52$  มิลลินิวตัน/เมตร เหลือ  $51.22 \pm 0.54$  มิลลินิวตัน/เมตร และจากการวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ช่วยให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันดิบหรือสังเกตเห็นบริเวณใสที่น้ำมันกระจายตัว (clear zone) ได้น้อยมาก และไม่พบการเกิดชั้นอิมัลชันเมื่อผ่านไปเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงไม่สามารถวัดค่าดรชนีอิมัลชันได้ ดังนั้นจากผลดังกล่าวจึงแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ค่อนข้างต่ำของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ อย่างไรก็ตามหากมีการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้มีความเหมาะสมอาจช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่นการใช้ น้ำมันมะพร้าว จากงานวิจัยของ Tambekar DH (2013) ที่พบว่า *Exiguobacterium* sp. AMS1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดในน้ำมันมะพร้าว ส่วนการตรวจสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (Hydrophobicity) พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดไฮโดรโฟบิกเท่ากับ  $51.67 \pm 6.35\%$  ซึ่ง

แสดงถึงการมีสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์ที่จะช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถเข้าถึงน้ำมันดิบและช่วยให้เกิดการย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นการตรวจพบยีนที่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายอัลเคนสายกลางและอัลเคนสายยาว รวมทั้งการมีสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์ จึงเป็นลักษณะสมบัติที่ล้วนช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวได้

#### 4.3 ประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบของ *Exiguobacterium* sp. AO-11

##### 4.3.1 สมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของตัวอย่างดินทรายจากอ่าวพร้าว

จากผลการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) สูงถึงประมาณ 90% ในระยะเวลา 10 วัน รวมทั้งยังมีลักษณะสมบัติที่ส่งเสริมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ จึงนำแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบ โดยเลือกใช้ตัวอย่างดินชายฝั่งในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน (รหัสตัวอย่าง CT1-M1) เพื่อเป็นตัวแทนของบริเวณที่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันดิบ และมีผลการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดิน เท่ากับ  $2.0 \pm 0.80 \times 10^6$  MPN/กรัม น้ำหนักเปียก และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบเท่ากับ  $2.17 \pm 0.92 \times 10^5$  MPN/กรัม น้ำหนักเปียก รวมทั้งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดินด้วยการส่งวิเคราะห์ที่โครงการพัฒนาวิชาการดิน-ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อม ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์แสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ผลการส่งวิเคราะห์ตัวอย่างดินชายฝั่งในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน (CT1-M1)

ลักษณะดิน	อินทรีย์วัตถุ (%)	Total N (%)	Total P (%)	ความชื้น (%)	C/N ratio	pH
ดินทราย	0.18	0.01	0.02	31.22	10.00	8.1

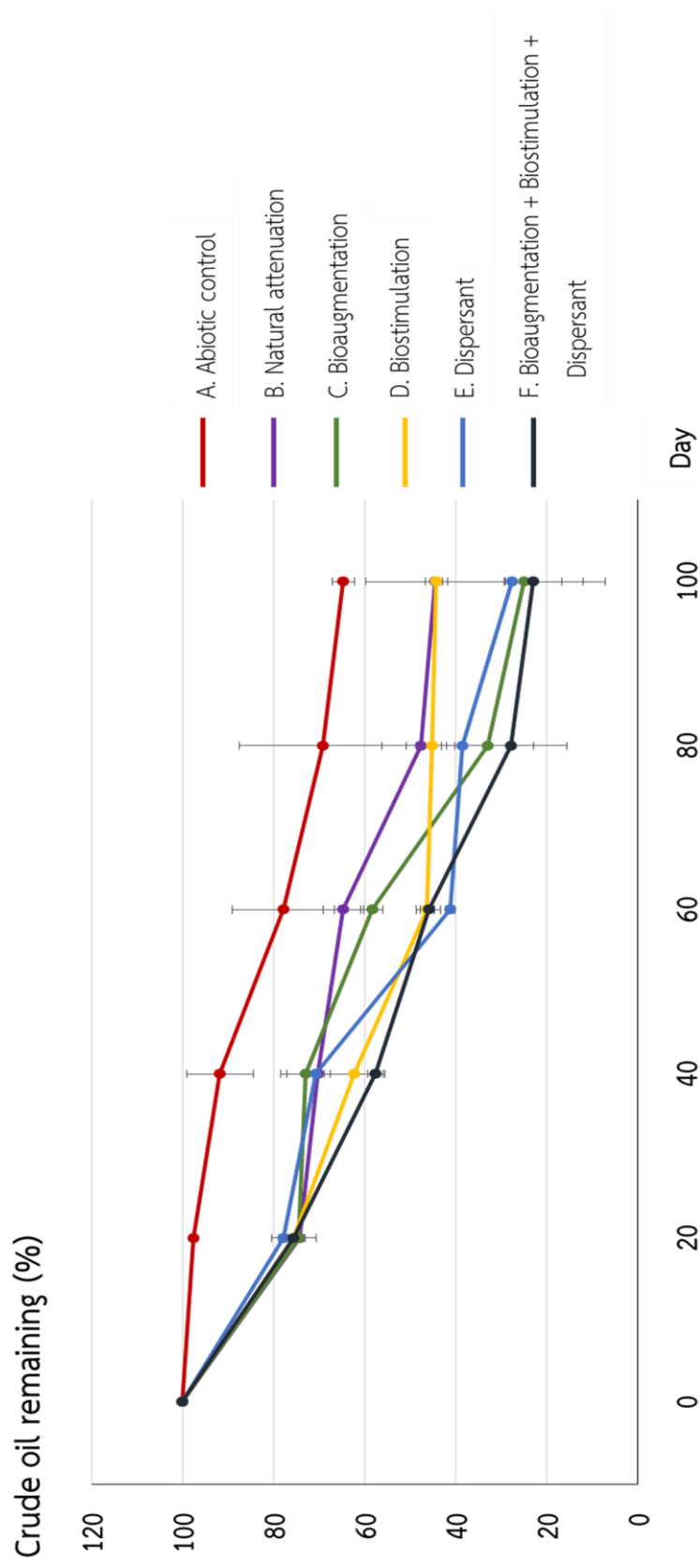
##### 4.3.2 ประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ โดยเติมน้ำมันดิบ 4% (มวล/มวล) น้ำหนักเปียก และทดสอบโดยใช้ 6 ชุดการทดลองคือ ชุด A คือ Abiotic control หรือชุดควบคุม ชุด B คือ Natural attenuation เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์

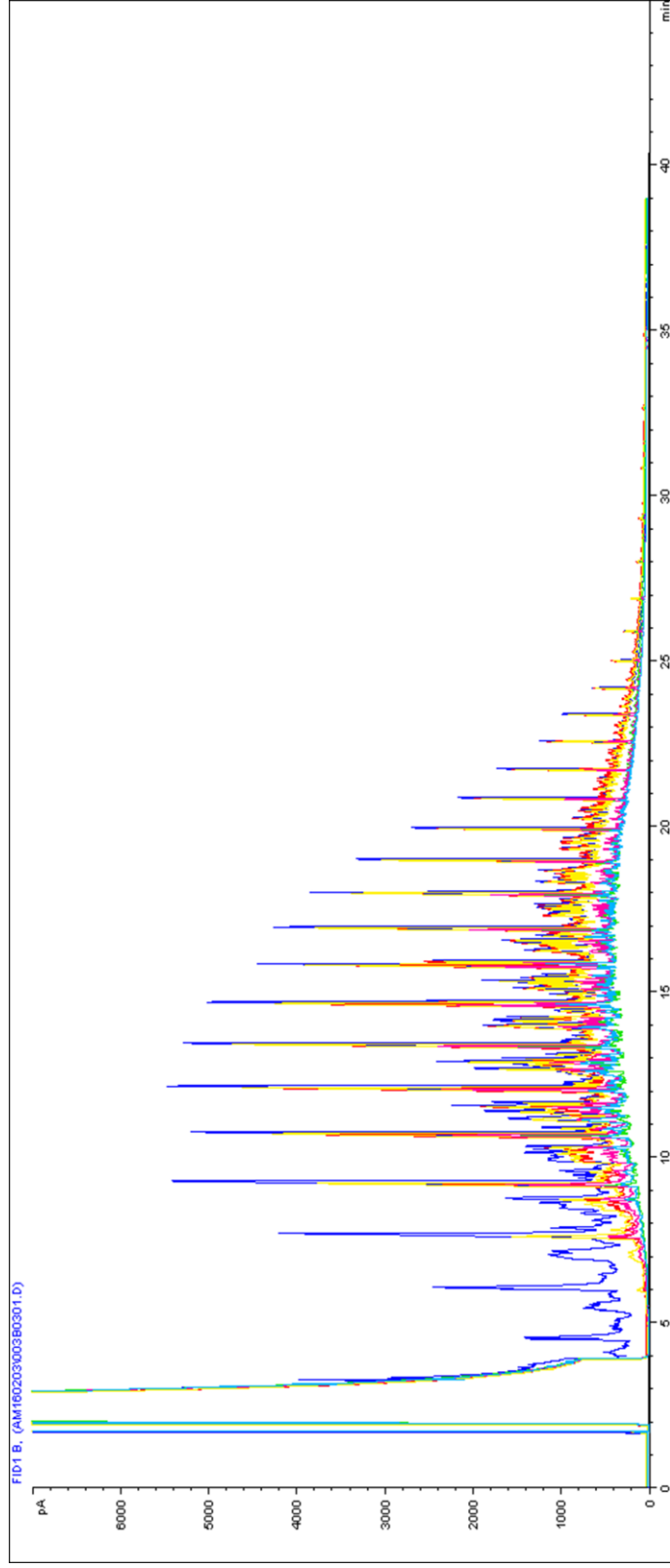
ประจำถิ่น ชุด C คือ Bioaugmentation เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 1 ชนิด คือ *Exiguobacterium* sp. AO-11 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ประมาณ 9 log CFU/กรัม น้ำหนักเปียก ชุด D คือ Biostimulation เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโดยการเติมธาตุอาหารที่ปรับให้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสเท่ากับ 100:10:1 ชุด E คือ Dispersant เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบภายหลังจากการเติมสาร dispersant ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ Slickgone NS type 2/3 โดยเจือจางสารกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 50% และเติมลงไป ในอัตราส่วนน้ำมันดิบต่อ dispersant เท่ากับ 20:1 และชุด F คือ Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบจากผลของการเติม *Exiguobacterium* sp. AO-11 การเติมธาตุอาหาร และการเติมสาร dispersant พบว่าผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 20 40 60 80 และ 100 วัน แสดงดังตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.7 และโครมาโทแกรมประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบของทั้ง 6 ชุดการทดลองในการเก็บตัวอย่างวันที่ 100 แสดงดังรูปที่ 4.8

**ตารางที่ 4.13** ประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ 4% (มวล/มวล) ใน 6 ชุด และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่โดย GC-FID

ชุดการทดลอง	Crude oil remaining (%)				
	วันที่ 20	วันที่ 40	วันที่ 60	วันที่ 80	วันที่ 100
ชุด A Abiotic control	97.5±0.0	91.7±7.4	77.8±8.0	69.1±13.0	64.6±1.7
ชุด B Natural attenuation	74.3±1.4	70.2±2.8	64.6± 4.5	47.7±6.0	44.4±15.2
ชุด C Bioaugmentation	74.5±0.2	73.0±3.0	58.4±1.7	32.9±7.1	25.0±17.9
ชุด D Biostimulation	74.7±3.8	62.3±4.9	46.2±1.2	45.3±2.4	44.2±1.6
ชุด E Dispersant	77.9±0.7	70.7±5.4	41.2±0.6	38.5±3.3	27.6±11.1
ชุด F Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant	75.6±0.8	57.6±1.7	45.9±1.9	27.80±8.7	22.9±6.2



รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายที่เป็นเขื่อนน้ำมันดิบ 4% (มวล/มวล) ใน 6 ชุดการทดลอง และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่โดย GC-FID



**รูปที่ 4.8** โครมาโทแกรมประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายบนเป็อนำมัตบของทั้ง 6 ชุดการทดลองในการเก็บตัวอย่างวันที่ 100

หมายเหตุ: ชุด A Abiotic control: เส้นน้ำเงิน ชุด B Natural attenuation: เส้นสีแดง ชุด C Bioaugmentation: เส้นสีเขียว

ชุด D Biostimulation: เส้นสีเหลือง ชุด E Dispersant: เส้นสีชมพู ชุด F Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant: เส้นสีฟ้า

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ 4% (มวล/มวล) ใน 6 ชุด การทดลอง พบว่าในวันที่ 20 ทุกชุดการทดลองยังไม่เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่อย่างชัดเจน และในวันที่ 40 พบว่า ชุด D (Biostimulation) และ ชุด F (Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) เป็น 2 ชุดการทดลองที่สามารถสังเกตเห็นได้ว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่เท่ากับ  $62.3 \pm 4.9\%$  และ  $57.6 \pm 1.7\%$  ตามลำดับ ในวันที่ 60 พบว่ามี 3 ชุดการทดลองที่มีแนวโน้มการย่อยสลายที่ดี เนื่องจากมีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น คือชุด D (Biostimulation) ชุด E (Dispersant) และ ชุด F (Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่เท่ากับ  $46.2 \pm 1.2\%$   $41.19 \pm 0.6\%$  และ  $45.9 \pm 1.9\%$  ตามลำดับ และในช่วงท้ายของการทดลองคือวันที่ 80 และ 100 พบว่าชุด C (Bioaugmentation) ชุด E (Dispersant) และ ชุด F (Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) เป็นชุดที่มีแนวโน้มการย่อยสลายที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่กับชุดการทดลองอื่น โดยในวันที่ 80 มีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ เท่ากับ  $32.9 \pm 7.1\%$   $38.5 \pm 3.3\%$  และ  $27.80 \pm 8.7\%$  ตามลำดับ และวันที่ 100 มีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่เท่ากับ  $25.0 \pm 17.9\%$   $27.6 \pm 11.1\%$  และ  $22.9 \pm 6.2\%$  ตามลำดับ ดังนั้นชุดการทดลอง F ที่ใช้ทั้ง 3 วิธีร่วมกันคือการเติม *Exiguobacterium* sp. AO-11 การเติมธาตุอาหาร และการเติมสารกระจายน้ำมันน่าจะเป็นชุดที่มีแนวโน้มการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ดีที่สุด

อย่างไรก็ตามเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ระหว่างทุกชุดการทดลองได้อย่างชัดเจนจึงนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าในวันที่ 20 ชุดทดลอง B (Natural attenuation) C (Bioaugmentation) D (Biostimulation) E (Dispersant) และ F (Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) ไม่มีความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับชุด A (Abiotic control)

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ระหว่างทุกชุดการทดลองในวันที่ 40 มีผลดังนี้

- ชุด A มีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่แตกต่างกับชุด D และชุด F ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

- ชุด B C D E และ F ไม่มีความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อนำค่าเฉลี่ยของทุกชุดมาเปรียบเทียบกัน

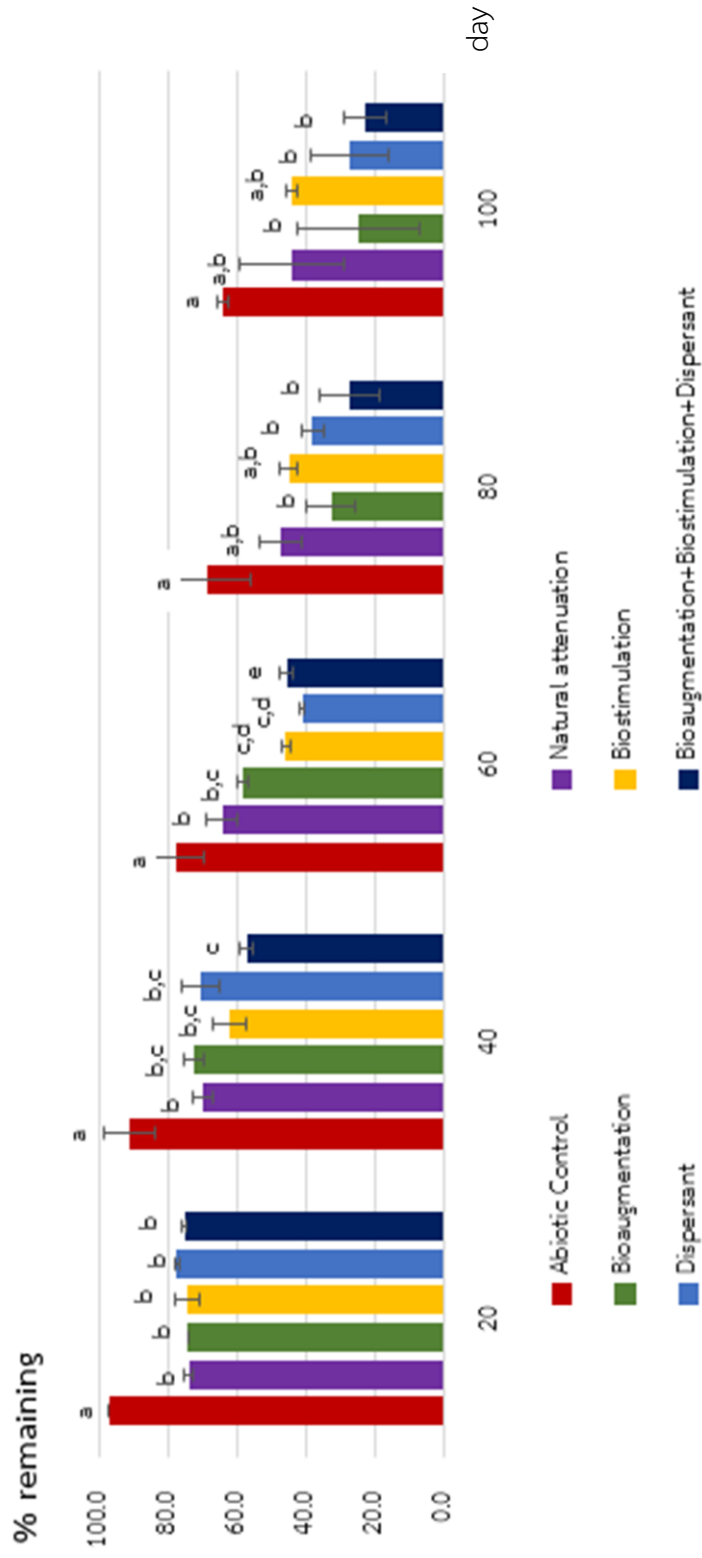
เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ระหว่างทุกชุดการทดลองในวันที่ 60 มีผลดังนี้



- ชุด A มีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่แตกต่างกับชุด D E และชุด F ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

- ชุด B C D E และ F ไม่มีความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อนำค่าเฉลี่ยของทุกชุดมาเปรียบเทียบกัน

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ระหว่างทุกชุดการทดลองในวันที่ 80 และ 100 พบว่าทุกชุดทดลองไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ระหว่างทุกชุดการทดลองในวันที่ 20 40 60 80 และ 100 ด้วยโปรแกรม SPSS แสดงในภาคผนวก ง โดยกราฟแสดงการจัดกลุ่มของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงดังรูปที่ 4.9 และเนื่องจากในงานวิจัยนี้คิดค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่โดยใช้พื้นที่กราฟ จึงอาจส่งผลให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้ค่อนข้างสูง และอาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ของแต่ละชุดทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้งนี้อาจแก้ไขโดยการปรับค่าจากพื้นที่ได้กราฟให้มาอยู่ในรูปของความเข้มข้นก่อนที่จะเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละชุดทดลอง



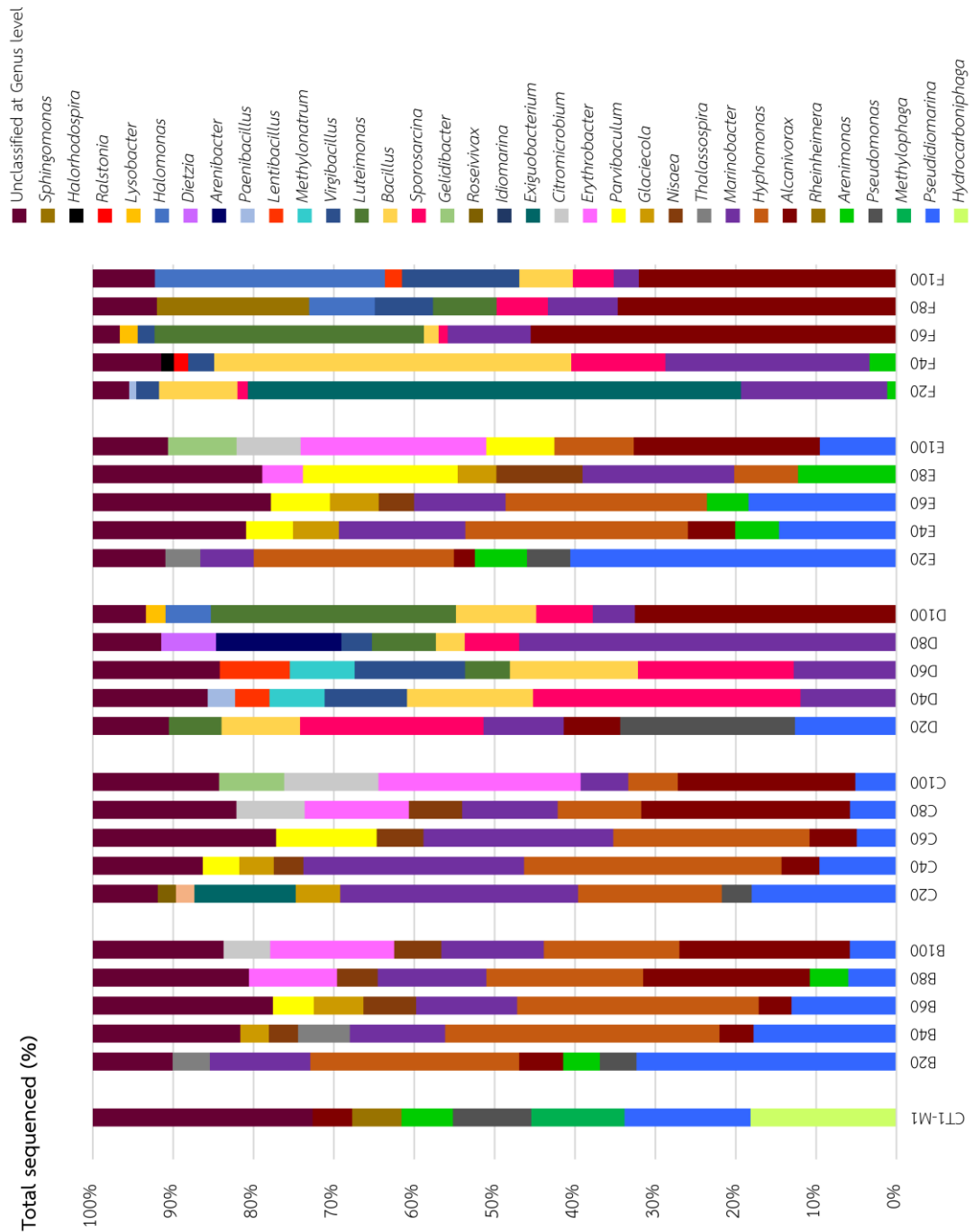
รูปที่ 4.9 การจัดการกลุ่มของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

#### 4.3.3 ผลการตรวจติดตามแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เติมลงไปและการเปลี่ยนแปลงของ ประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี 16S Metagenomic analysis

ในชุดการทดลอง B ถึง F ได้เก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด Powersoil isolation kit และนำดีเอ็นเอที่ได้ส่งวิเคราะห์ผลด้วยวิธี 16S Metagenomic analysis ซึ่งผลที่ได้ แสดงดังรูปที่ 4.10

จากผลการส่งวิเคราะห์ด้วยวิธี 16S Metagenomic analysis พบว่าชุด B (Natural attenuation) ชุด C (Bioaugmentation) และ ชุด E (Dispersant) สามารถตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Hyphomonas* และ *Marinobacter* ได้ในทุกช่วงของการทดลอง จึงคาดว่าน่าจะเป็นประชากรเด่น และมีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดิบ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสกุล *Pseudidiomarina* และ สกุล *Alcanivorax* ที่ตรวจพบในตัวอย่างดิน CT1-M1 ซึ่งใช้ในการทดลองนี้ ยังสามารถตรวจพบได้ใน ทั้ง 3 ชุดการทดลอง จึงคาดว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลาย น้ำมันดิบ อย่างไรก็ตามในชุด C ที่เติม *Exiguobacterium* sp. AO-11 ลงไป พบว่าสามารถตรวจพบ ได้ในการเก็บตัวอย่างวันที่ 20 เท่านั้น ทั้งนี้คาดว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้น่าจะเข้ามามีบทบาทในการ ย่อยสลายอัลเคนสายยาวและอัลเคนสายกลาง จากผลการตรวจสอบยืนยันที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย น้ำมันดิบ จึงทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นสามารถย่อยสลายอัลเคนได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้เกิดการเจริญ และเพิ่มจำนวนมากขึ้นของแบคทีเรียเหล่านี้จนอาจแข่งขันกับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เติมลงไป หรือ แบคทีเรียบางชนิดที่อยู่ในตัวอย่างดินหรือที่เพิ่มจำนวนขึ้นหลังจากได้รับน้ำมันดิบอาจสร้างสารบาง ชนิดที่มีผลยับยั้งต่อการเจริญของแบคทีเรียที่เติมลงไปได้

นอกจากนี้พบว่าชุด D (Biostimulation) และชุด F (Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) สามารถตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Sporosarcina* และ *Bacillus* ได้ ซึ่งตรวจไม่พบใน ชุดการทดลองทั้ง 3 ชุดข้างต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของการเติมธาตุอาหาร ทำให้เกิดสภาวะที่ เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลดังกล่าว และพบว่าชุด F ที่เติม *Exiguobacterium* sp. AO-11 ลงไป สามารถตรวจพบได้ในการเก็บตัวอย่างวันที่ 20 เช่นเดียวกับชุด C แต่มีสัดส่วนของ แบคทีเรียสกุลนี้มากกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของธาตุอาหารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย สายพันธุ์นี้



รูปที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ 16S Metagenomic analysis ของตัวอย่างดิน CT1-M1 และชุดการทดลอง B ถึง F ที่ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างต่างๆ

เมื่อพิจารณาผลของทั้งประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบและการวิเคราะห์ผล 16S Metagenomic analysis พบว่า ชุด F คือ Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant เป็นชุดที่ถึงแม้ว่าอาจจะไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น แต่ก็พบว่าเป็นชุดที่มีแนวโน้มการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ติดต่อกัน การทดลอง โดยในวันที่ 40 80 และ 100 มีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่น้อยกว่าชุดการทดลองอื่น ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพการย่อยสลายที่ดีและรวดเร็ว เนื่องจากการใช้ทั้ง 3 วิธีร่วมกันคือการปรับธาตุอาหารให้มีความเหมาะสม ร่วมกับการเติมสารกระจายน้ำมัน (dispersant) และการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ล้วนช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ซึ่งจากการวิเคราะห์สารไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในตัวอย่างดินเบื้องต้นโดย GC-FID (ภาคผนวก จ) พบว่าสารไฮโดรคาร์บอนที่ตรวจพบในทุกตัวอย่างดินส่วนใหญ่เป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดสายกลางและสายยาว ทั้งนี้สาเหตุหนึ่งอาจเนื่องมาจากสารเหล่านี้ย่อยสลายยากกว่าไฮโดรคาร์บอนชนิดสายสั้นที่อาจเกิดการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นได้ ดังนั้นการเติม *Exiguobacterium* sp. AO-11 จึงน่าจะเป็นตัวหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทในการย่อยสลายอัลเคนสายยาวและอัลเคนสายกลาง ส่งผลให้แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นสามารถย่อยสลายอัลเคนที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันดิบได้ดีขึ้น

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงการเลือกใช้เพียงวิธีใดวิธีหนึ่งจะพบว่าวิธีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Exiguobacterium* sp. AO-11 จะช่วยส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ เนื่องจากในช่วงท้ายของการทดลองพบว่าชุดการทดลองนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ดีขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งน่าจะเนื่องมาจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเพิ่มจำนวนมากขึ้น รวมทั้งพบว่าผลกระทบเมื่อเติมแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่มีต่อประชาคมแบคทีเรียค่อนข้างน้อย ซึ่งสังเกตได้จากประชาคมแบคทีเรียที่ยังคงมีความคล้ายคลึงกับชุด B (Natural attenuation) อยู่

การเติมธาตุอาหารเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย โดยจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียสกุล *Sporosarcina* และ *Bacillus* สามารถเจริญได้ในชุดการทดลองที่มีการเติมธาตุอาหาร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเติมธาตุอาหารช่วยปรับสภาวะให้มีความเหมาะสม และกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ ซึ่งจะพบว่าการย่อยสลายจะเกิดได้ดีในช่วงแรกของการทดลองเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อเวลาผ่านไปธาตุอาหารอาจถูกใช้ไปจนเหลือน้อยลง ซึ่งอาจส่งผลต่อสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ นอกจากนี้ยังพบว่าประชาคมแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุด B (Natural attenuation)

การใช้สารกระจายน้ำมันก็เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยให้แบคทีเรียเกิดการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดี เนื่องจากการเติมสารกระจายน้ำมันลงไปจะช่วยให้น้ำมันแตกตัวและส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเข้าถึงน้ำมันที่จะย่อยสลายได้ดีขึ้น ซึ่งในระหว่างการทดลองจะเห็นว่าชุดที่เติมสารกระจายน้ำมันมี

แนวโน้มการย่อยสลายที่ค่อนข้างดี อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายที่เกิดขึ้นจะไม่คงที่คือมีบางช่วงของการทดลองที่มีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นเช่นในวันที่ 60 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสัดส่วนของแบคทีเรียเด่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการบำบัด จึงทำให้ผลของประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบที่เกิดขึ้นไม่คงที่ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียเด่นยังคงมีความคล้ายคลึงกับชุด B (Natural attenuation) คือแบคทีเรียสกุล *Hyphomonas* และ *Marinobacter*

ดังนั้นจากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ จะเห็นได้ว่าทั้ง 3 วิธี ได้แก่ การเติมแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพ *Exiguobacterium* sp. AO-11 การปรับธาตุอาหารให้มีความเหมาะสม และการเติมสารกระจายน้ำมัน (dispersant) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินทรายที่ได้รับการปนเปื้อนได้ ทั้งนี้การจะเลือกใช้วิธีใดอาจขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการนำไปใช้บำบัดพื้นที่นั้นๆ และการใช้ทั้ง 3 วิธีร่วมกันถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ดีและรวดเร็วที่สุด ซึ่งถือเป็นแนวทางต้นแบบเพื่อนำไปปรับใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนของน้ำมันดิบในพื้นที่จริงต่อไป

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลครั้งใหญ่ในทะเลจังหวัดระยองที่เกิดขึ้นเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม พ.ศ. 2556 เหตุการณ์นี้ได้ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศชายฝั่งทะเลของเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง โดยเฉพาะบริเวณอ่าวพร้าว ซึ่งเป็นบริเวณที่ได้รับผลกระทบมากที่สุด จากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นได้มีการดำเนินการต่างๆ เพื่อกำจัดคราบน้ำมันที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามอาจพบว่ายังคงมีน้ำมันที่หลงเหลืออยู่ในบริเวณชายหาดได้ ซึ่งวิธีหนึ่งที่จะเข้ามามีบทบาทในการกำจัดคราบน้ำมันที่ยังคงตกค้างอยู่หรือบำบัดดินทรายที่ได้รับการปนเปื้อนก็คือการใช้วิธีทางชีวภาพ (bioremediation) ดังนั้นงานวิจัยนี้ซึ่งได้รับตัวอย่างดินจาก 3 บริเวณของอ่าวพร้าว ได้แก่ ดินทรายบริเวณชายฝั่ง ดินตะกอนแนวปะการัง และดินตะกอนในทะเลที่ได้รับและไม่ได้รับการปนเปื้อนจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล จำนวน 12 ตัวอย่าง จึงนำมาคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด และศึกษาลักษณะสมบัติที่ส่งเสริมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ ได้แก่ การมีเอ็นที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ และการศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายที่ได้รับการปนเปื้อนและเป็นเป็นแนวทางต้นแบบเพื่อนำไปปรับใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนของน้ำมันดิบในพื้นที่จริงต่อไป โดยจากผลการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบในทั้ง 12 ตัวอย่างดินด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบในช่วงตั้งแต่  $4.87 \times 10^4$  –  $2.63 \times 10^5$  MPN/กรัมน้ำหนักเปียก ซึ่งมีจำนวนใกล้เคียงเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Horel และคณะ (2014) ที่ประเมินประสิทธิภาพของการเติมธาตุอาหารอินทรีย์เพื่อเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยวิธีทางชีวภาพโดยอาศัยกลุ่มแบคทีเรียที่ยังคงอยู่ในดินทรายบริเวณชายหาดทางตอนเหนือของอ่าวแม่โขง พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายอัลเคนในตัวอย่างดินตะกอนอยู่ในช่วง  $1.9 \times 10^4$  ถึง  $3.7 \times 10^5$  MPN/กรัมน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในงานวิจัยดังกล่าวได้เก็บตัวอย่างดินตะกอนจากบริเวณที่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันดิบ เนื่องจากเหตุการณ์บ่อน้ำมัน Macondo ระเบิดในวันที่ 20 เมษายน พ.ศ. 2553 และทำให้น้ำมันดิบรั่วไหลลงสู่ทะเลและส่งผลกระทบต่อชายฝั่งและระบบนิเวศทางทะเลเป็นอย่างมาก เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ที่เก็บตัวอย่างมาจากบริเวณที่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันดิบ จึงทำให้สามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันได้ใกล้เคียงกัน

จากนั้นจึงนำทุกตัวอย่างดินมาตรวจสอบเอ็นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบเพื่อยืนยันผลการมีอยู่ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบ เนื่องจากเอนไซม์อัลเคนไฮดรอกซิเลสจึงเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญและพบได้ในแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนที่เป็นองค์ประกอบ

ส่วนใหญ่ในน้ำมันดิบ (Wang และคณะ, 2010) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเกิดจากการประมวลผลสารสร้างเอนไซม์โดยยีน จึงทำให้สามารถประเมินการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนได้ด้วยการตรวจติดตามจากยีน เช่น ยีน *alkB* (Jurelevicius และคณะ, 2013) ซึ่งจากผลการตรวจสอบยีนพบว่าในทุกตัวอย่างดินสามารถตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยยีนที่ตรวจพบได้ในตัวอย่างดินจากทั้ง 3 บริเวณมีความคล้ายคลึงกันคือในทุกตัวอย่างสามารถตรวจพบยีน *alkM* ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายยาว  $C_{12}$  ขึ้นไป (Kohno และคณะ, 2002) *alkB<sub>1</sub>* ที่ไม่จำเพาะต่อการย่อยสลายอัลเคน (Kohno และคณะ, 2002) และ CYP153 ที่จำเพาะต่อการย่อยสลายอัลเคนสายกลาง (Wang และคณะ, 2010) ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากการได้รับการปนเปื้อนน้ำมัน ทั้งนี้ นอกจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลครั้งใหญ่ในทะเล จังหวัดระยอง เมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม พ.ศ. 2556 แล้ว ยังอาจเนื่องจากผลของน้ำมันรั่วไหลในทะเลจากการคมนาคมขนส่ง การท่องเที่ยว และจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี รวมทั้งนิคมอุตสาหกรรมต่างๆ

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบและการตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบจึงมีแนวโน้มสูงที่ตัวอย่างดินจากบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จะสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ อย่างไรก็ตามในการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์นั้นเพื่อให้ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงและมีสายพันธุ์ที่หลากหลาย จึงเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในรูปแบบของกลุ่มแบคทีเรียก่อนที่จะนำไปคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ในภายหลัง โดยใช้วิธีเอนริชเมนต์ในการเพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย พบว่าตัวอย่างดินทั้ง 12 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มจำนวนของกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวคือ Nutrient Seawater (NSW) เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่ถูกเก็บมาจากบริเวณชายฝั่งและในทะเล รวมทั้งต้องการนำแบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยกไปใช้บำบัดในพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันบริเวณชายฝั่งที่มีน้ำทะเลท่วมถึง จึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดังกล่าว และเติมน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงไป เพื่อกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวอย่างดิน ซึ่งจะสามารถสังเกตเห็นการย่อยสลายได้จากความขุ่นของอาหารที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากเซลล์ของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นและผลของการเกิดอิมัลชัน รวมทั้งกาคตะกอนน้ำมันที่ถูกย่อยสลายบริเวณผิวหน้าอาหาร เมื่อสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจึงถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวใหม่ที่เติมน้ำมันดิบ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ จำนวน 18 ครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและลดจำนวนของแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบหรือไม่สามารถทนต่อความเป็นพิษของน้ำมันดิบได้ ทั้งนี้เมื่อผ่านการเอนริชเมนต์จำนวน 18 ครั้ง เป็นระยะเวลาประมาณ 3 เดือน จะสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าตัวอย่าง CR1-W1 CR2-W1 OSB-W1 OS2-W1 และ OS2-M1 มีสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็นสี



เขียวฟ้า ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการสังเคราะห์สารบางชนิดของแบคทีเรีย และมีแนวโน้มว่าจะเป็นผลของ *Pseudomonas aruginosa* ที่ผลิตรงควัตถุ pyocyanin ซึ่งเป็นสารประกอบ phenazine ประเภทละลายน้ำที่มีสีเขียวเงิน ตามรายงานวิจัยของ EL-Fouly และคณะ (2015) นอกจากนี้ยังพบว่า *Pseudomonas aruginosa* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถพบได้ในธรรมชาติและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากรายงานวิจัยของ Obayori และคณะ (2009) พบว่า *Pseudomonas aruginosa* MVL1 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้มากกว่า 70% ภายในระยะเวลา 6 วัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเป็นสีเขียวฟ้าน่าจะมี *Pseudomonas aruginosa* เป็นประชากรเด่นในกลุ่มแบคทีเรียนั้น

จากการสังเกตเห็นการย่อยสลายของน้ำมันดิบที่เกิดขึ้นโดยกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ด้วย GC-FID โดยใช้หัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 7 log CFU/มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างในวันที่ 2 พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบในช่วงตั้งแต่ประมาณ 17-85% ภายในระยะเวลา 2 วัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ซึ่งอาจทำงานร่วมกันในการย่อยสลาย ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Rahman และคณะ (2002) ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียทั้งในรูปแบบของกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ Bombay High (BH) 1% ได้ 78% ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์พบว่า *Pseudomonas* sp. DS10-129 *Bacillus* sp. DS6-86 *Micrococcus* sp. GS2-22 *Corynebacterium* sp. GS5-66 และ *Flavobacterium* sp. DS5-73 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 66% 59% 49% 43% และ 41% ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 20 วัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากลุ่มแบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

อย่างไรก็ตามการนำกลุ่มแบคทีเรียมาใช้ในการบำบัดพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนต่างๆ ยังคงมีข้อจำกัด เนื่องจากอาจเกิดการทำงานแบบแข่งขันหรือปฏิปักษ์กันในกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งจะเห็นได้จากงานวิจัยนี้ที่พบว่าผลการตรวจสอบยีนภายหลังจากการเอนริชเมนต์อาจไม่สอดคล้องกับประสิทธิภาพการย่อยสลายที่เกิดขึ้น ตัวอย่างเช่นกลุ่มแบคทีเรีย CT2-W1 ตรวจพบยีน *alkB alkM alkB<sub>1</sub> alkB-1 alkB1 alkB2 CYP153* และ *almA* ซึ่งแสดงถึงแนวโน้มการมีอยู่ของแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ แต่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เท่ากับประมาณ 54% ในระยะเวลา 2 วัน ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย OSB-M1 ที่ตรวจพบยีน *alkM* และ *alkB1* แต่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบเท่ากับประมาณ 60% นอกจากนี้งานวิจัยของ Lei และคณะ (2011) ยังพบว่าแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ SX1 SX2 และ SX3 ที่คัดแยกมาจากบริเวณที่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมัน มีอัตราการย่อยสลาย

ทางชีวภาพเท่ากับ 82.3% 65.8% และ 25.3% และเมื่อให้แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ทำงานร่วมกัน (SX1+SX2+SX3) พบว่ามีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพเท่ากับ 63.7% และงานวิจัยของ Yakimov และคณะ (2004) พบว่า *Thalassolituus* sp. มีการทำงานแบบปฏิปักษ์กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันด้วยการสร้างสาร secondary metabolites บางชนิดที่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการทำงานร่วมกันในรูปแบบกลุ่มแบคทีเรียอาจเกิดการ ทำงานร่วมกันแบบยับยั้งซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ในระหว่างการบำบัดอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียหรือสัดส่วนของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่มแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจส่งผลให้ไม่สามารถควบคุมประสิทธิภาพการย่อยสลายที่เกิดขึ้นได้

ดังนั้นการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถนำมาใช้ในการบำบัดพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนและยังสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในเชิงอุตสาหกรรมได้ จึงคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas* sp. AO-08 *Ochrobactrum* sp. AO-09 *Exiguobacterium* sp. AO-11 *Bacillus* sp. AO-12 *Pseudomonas* sp. AO-14 และ *Pseudomonas* sp. AO-15 โดยพบว่า *Pseudomonas* sp. AO-08 ที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรีย CT1-M1 CT2-W1 CR1-W1 CR1-M1 CR2-W1 CR2-M1 OSB-W1 OS2-W1 และ OS2-M1 สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็นสีเขียวฟ้าที่เกิดขึ้นหลังจากผ่านการเอนริชเมนต์ ซึ่งแสดงถึงการมีอยู่ของ *Pseudomonas aeruginosa* ดังที่กล่าวข้างต้น จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า *Exiguobacterium* sp. AO-11 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบสูงที่สุดคือประมาณ 90% รองลงมาคือ *Pseudomonas aeruginosa* AO-08 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ประมาณ 75% และรองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. AO-14 *Ochrobactrum* sp. AO-09 *Pseudomonas* sp. AO-15 และ *Bacillus* sp. AO-12 โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ประมาณ 67% 48% 40% และ 21% ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า *Exiguobacterium* sp. AO-11 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ จึงนำมาศึกษาลักษณะสมบัติที่ส่งเสริมต่อการย่อยสลายน้ำมัน ได้แก่ การมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบ และการศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ โดยสรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะสมบัติของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1. สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะสมบัติของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ลักษณะของโคโลนีและการย้อมแกรม	การย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน	การตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมัน	การผลิตสารลดแรงตึงผิวและความไม่ชอบน้ำของเซลล์	ลักษณะสมบัติอื่นๆ	เอกสารอ้างอิง
<i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11	สีเหลืองส้ม กลม ขอบเรียบ แกรมบวก	มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ประมาณ 90% ในระยะเวลา 10 วัน	1) <i>alkM</i> ที่จำเพาะกับอัลเคนสายยาว C <sub>12</sub> ขึ้นไป 2) <i>alkB<sub>1</sub></i> ที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายอัลเคน 2) <i>alkB-1</i> ที่จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C-C <sub>13-23</sub> 3) CYP153 ที่จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C-C <sub>8-16</sub>	มีสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดไฮโดรโฟบิกเทคเท่ากับ 51.67±6.35%	สามารถคัดแยกได้จากดินตะกอนในทะเล และเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Seawater ซึ่งมีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร	งานวิจัยนี้
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>		สามารถตรวจพบได้ภายหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบ 3% ด้วยวิธีทางชีวภาพ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์			สามารถเจริญได้ในดินที่มีสภาพเค็ม (Hypersaline)	Al-Maillem และคณะ (2012)
<i>E. aurantiacum</i> และ <i>B. cepacia</i>	เป็นแบคทีเรียที่มีแกรมบวก	สามารถย่อยสลายอัลเคน (C9-C26) ของน้ำมันดีเซลและย่อยสลาย pristine ได้		มีสมบัติการไม่ชอบน้ำของเซลล์ (hydrophobicity)		Mohanty และ Mukherji (2008)

ตารางที่ 5.1 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ลักษณะของ โคลินีและการ ย้อมแกรม	การย่อยสลายสาร ไฮโดรคาร์บอน	การตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการ ย่อยสลายน้ำมัน	การผลิตสารลดแรงดึงผิวและความไม่ชอบน้ำของเซลล์	ลักษณะสมบัติอื่นๆ	เอกสารอ้างอิง
<i>Exiguobacterium</i> sp.	ความสามารถในการย่อยสลาย Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) เช่น <i>Exiguobacterium</i> sp. AR3 ที่สามารถย่อยสลาย พีแนนทรีนที่เป็นเอ็นไอในสิ่งแวดล้อมได้	ตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการ ประมวลผลรหัสการสร้างเอนไซม์ อัลเคนไฮดรอกซิเลส ( <i>Rh-alkB1</i> และ <i>alkB2</i> และ <i>alkB870G</i> ) และ พีแนนทรีนไดออกซิเจเนส ( <i>ndoB</i> )	การผลิตสารลดแรงดึงผิวและ ความไม่ชอบน้ำของเซลล์	KOO (2013)		
<i>Exiguobacterium</i> sp. AMS1 และ <i>Exiguobacterium</i> sp. AMS2	มีสีส้มอ่อน รูปร่าง กลม และ มีแกรมบวก	สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มาจากน้ำมันที่มีมาจากพืชและสาร ไฮโดรคาร์บอนได้	<i>Exiguobacterium</i> sp. AMS1 สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดในน้ำมันมะพร้าว โดยสามารถลดแรงดึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลือ 37.93 มิลลิ นิวตัน/เมตร และวัดบริเวณที่น้ำมันกระจายตัว (clear zone) ได้เท่ากับ 50 มิลลิเมตร รวมทั้งมีเปอร์เซ็นต์ การเกิดอิมัลชันเท่ากับ 35.71% นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ดีในที่มี NaCl เท่ากับ 4% ที่ pH เท่ากับ 10 และ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	สามารถเจริญได้ในสภาพที่มี pH ตั้งแต่ 6-10 และใน สภาพที่มีอุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส รวมทั้งใน สภาพที่มี NaCl ตั้งแต่ 1%-6% โดยสามารถกัดตัดแยก แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว ได้จากทะเลสาบ Lonar ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเค็มและ มีความเป็นด่างสูง	Tambekar DH (2013)	

ดังนั้นจากประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบและการมีลักษณะสมบัติที่ส่งเสริมต่อการย่อยสลายน้ำมันของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 จึงนำแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบ โดยเลือกใช้ตัวอย่างดินทรายชายฝั่งบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน (รหัสตัวอย่าง CT1-M1) เพื่อเป็นตัวแทนของบริเวณที่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันดิบ และทดสอบโดยเติมน้ำมันดิบ 4% (มวล/มวล) น้ำหนักเปียก ลงไปในชุดการทดลองทั้ง 6 ชุด คือ ชุด A คือ Abiotic control หรือชุดควบคุม ชุด B คือ Natural attenuation เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น ชุด C คือ Bioaugmentation เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 1 ชนิด คือ *Exiguobacterium* sp. AO-11 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ประมาณ 9 log CFU/กรัม น้ำหนักเปียก ชุด D คือ Biostimulation เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโดยการเติมธาตุอาหารที่ปรับให้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสเท่ากับ 100:10:1 ชุด E คือ Dispersant เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบหลังจากการเติมสารกระจายน้ำมัน (dispersant) ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ Slickgone NS type 2/3 โดยเจือจางสารกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 50% และเติมลงไปในอัตราส่วนน้ำมันดิบต่อ dispersant เท่ากับ 20:1 และชุด F คือ Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบจากผลของการเติม *Exiguobacterium* sp. AO-11 การเติมธาตุอาหาร และการเติมสาร dispersant

จากผลการทดลองพบว่าชุดที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ดีที่สุดและรวดเร็วที่สุดคือชุด F (Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของการใช้ทั้ง 3 วิธีร่วมกันคือการเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย การเติมธาตุอาหารเพื่อให้มีสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย และการเติมสารช่วยกระจายน้ำมันที่ช่วยให้แบคทีเรียสามารถเข้าถึงน้ำมันที่จะย่อยสลายได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งช่วยส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Almeida และคณะ (2013) ที่พบว่าชุดการทดลอง Biostimulation + Bioaugmentation (BS + AB) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ดีที่สุด และงานวิจัยของ Zhuang และคณะ (2016) ที่ศึกษาผลของการเติมสารกระจายน้ำมัน (dispersant) ต่อการย่อยสลาย South Louisiana crude oil (SLC) ด้วยวิธีทางชีวภาพที่อุณหภูมิ 5 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสารกระจายน้ำมันชื่อทางการค้าคือ JD-2000 สามารถช่วยให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้ดีในทั้ง 2 อุณหภูมิ และการใช้สารกระจายน้ำมันร่วมกับอุณหภูมิที่สูงจะช่วยให้อัตราการย่อยสลายของ Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) 2 และ 3 วงรวดเร็วขึ้น

นอกจากนี้คาดว่าจากการทำงานของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่ช่วยในการย่อยสลายอัลเคนสายกลางและอัลเคนสายยาว ซึ่งเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่ย่อยสลายได้ยากกว่าอัลเคนสายสั้นที่อาจถูกย่อยสลายไปโดยแบคทีเรียประจำถิ่น จึงทำให้ยังคงสามารถพบอัลเคนสายกลางและสายยาวได้ในตัวอย่างดิน ดังนั้นการเติม *Exiguobacterium* sp. AO-11 ลงไปจึงอาจเข้าไปมีบทบาทในการช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้นและย่อยสลายน้ำมันดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยประชากรเด่นที่น่าจะเข้ามามีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดิบของชุดการทดลองนี้คือแบคทีเรียสกุล *Alcanivorax* รวมทั้งสกุล *Sporosarcina* และ *Bacillus* ที่เจริญเนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมเมื่อเติมธาตุอาหาร ซึ่งจากงานวิจัยของ Cappello และคณะ (2007) พบว่าแบคทีเรียสกุล *Alcanivorax* เป็นแบคทีเรียเด่นของประชาคมแบคทีเรียในน้ำทะเลที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบและเติมธาตุอาหารในระบบจำลอง mesocosm และพบว่าสายพันธุ์แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เช่น *Bacillus subtilis* DM-04 จากงานวิจัยของ Das และ Mukherjee (2007) ที่คัดแยก *Bacillus subtilis* DM-04 และ *Pseudomonas aeruginosa* M และ *Pseudomonas aeruginosa* NM จากตัวอย่างดินที่ได้รับการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้จากการทดสอบในระบบนิเวศจำลองดิน (microcosm) รวมทั้งงานวิจัยของ Cheng และคณะ (2013) ที่พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Glycolipid ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียสกุล *Sporosarcina* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ไขมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ (Saisa-ard และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงคาดว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้น่าจะเข้ามามีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดิบ นอกจากนี้แบคทีเรียสกุล *Sporosarcina* และ *Bacillus* ยังอาจผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ช่วยเพิ่มสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพและส่งเสริมประสิทธิภาพในการย่อยสลายให้ดีขึ้นด้วย

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้เพียงวิธีใดวิธีหนึ่งพบว่า การเติมแบคทีเรีย *Exiguobacterium* sp. AO-11 เพียงอย่างเดียว จะสามารถเห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ซึ่งน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลอง B ซึ่งเป็นชุด Natural attenuation หรือการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นได้อย่างชัดเจนในช่วงท้ายของการทดลอง อย่างไรก็ตาม *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่เติมลงไปสามารถตรวจพบได้ในการเก็บตัวอย่างวันที่ 20 เท่านั้น ทั้งนี้คาดว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้น่าจะเข้ามามีบทบาทในการย่อยสลายอัลเคนสายยาวและอัลเคนสายกลาง เนื่องจากผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ตรวจพบยีน *alkM alkB<sub>1</sub> alkB-1* และ *CYP153* ซึ่งเป็นยีนที่ประมวลรหัสการสร้างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายอัลเคนสายยาวและอัลเคนสายกลาง รวมทั้งโครมาโทแกรมประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในการเก็บตัวอย่างวันที่ 10 ที่พบว่าแต่ละ peak ของ

กราฟลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงถึงการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นสามารถย่อยสลายอัลเคนได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้เกิดการเจริญและเพิ่มจำนวนมากขึ้นของแบคทีเรียเหล่านี้จนอาจแข่งขันกับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เดิมลงไป หรือแบคทีเรียบางชนิดที่อยู่ในตัวอย่างดินหรือที่เพิ่มจำนวนขึ้นหลังจากได้รับน้ำมันดิบอาจสร้างสารบางชนิดที่มีผลยับยั้งต่อการเจริญของแบคทีเรียที่เดิมลงไปได้ จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ได้ตลอดระยะเวลาการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม *Exiguobacterium* sp. AO-11 ลงไปส่งผลกระทบต่อประชาคมแบคทีเรียค่อนข้างน้อย สังเกตได้จากประชาคมแบคทีเรียที่ยังคงคล้ายคลึงกับชุด B (Natural attenuation) ซึ่งถือเป็นข้อดีอย่างหนึ่งหากนำไปใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนในพื้นที่จริง

การเติมธาตุอาหารที่ปรับให้มีอัตราส่วนที่เหมาะสมและกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ในตัวอย่างดินเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายให้ดีขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wu และคณะ (2016) พบว่าชุดการทดลอง Biostimulation ซึ่งเป็นชุดที่เติมธาตุอาหารโดยใช้  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  และ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ในการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสให้เท่ากับ 100:10:1 เป็นชุดที่สามารถเพิ่มการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้สูงที่สุดคือเพิ่มขึ้น 60% ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ของการบ่ม อย่างไรก็ตามพบว่าในช่วงแรกเท่านั้นที่เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อเวลาผ่านไปธาตุอาหารอาจถูกใช้ไปจนเหลือน้อยลง และส่งผลต่อสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ โดยคาดว่าประชากรเด่นที่น่าจะเข้ามามีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดิบ คือสกุล *Sporosarcina* และ *Bacillus* ซึ่งอาจช่วยในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้พบว่าการเติมธาตุอาหารส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประชาคมของแบคทีเรียอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับ ชุด B (Natural attenuation)

การเติมสารกระจายน้ำมันเพื่อช่วยให้น้ำมันแตกตัวและส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเข้าถึงน้ำมันที่จะย่อยสลายได้ดีขึ้น พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายที่เกิดขึ้นไม่คงที่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียในระหว่างการบำบัด จึงทำให้บางช่วงของการทดลองจะเห็นได้ว่ามีประสิทธิภาพการย่อยสลายที่ดีเช่นในวันที่ 60 อาจเนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่มีอยู่ในตัวอย่างดินซึ่งสามารถทนต่อความเป็นพิษของสารกระจายน้ำมัน Slickgone NS type 2/3 ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่ถูกใช้เพื่อช่วยกำจัดคราบน้ำมันในเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลในทะเลจังหวัดระยองที่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงอาจทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อความเป็นพิษของสารกระจายน้ำมันและเกิดการย่อยสลายน้ำมันดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยคาดว่าประชากรเด่นที่น่าจะเข้ามามีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดิบของ

ชุดการทดลองนี้คือแบคทีเรียสกุล *Hyphomonas* และสกุล *Marinobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียเด่นในชุด B (Natural attenuation) เช่นกัน รวมทั้งในช่วงท้ายของการทดลองน่าจะเป็นบทบาทของแบคทีเรียสกุล *Parvibaculum* ที่เข้ามาช่วยในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งจากงานวิจัยของ Coulon และคณะ (2007) พบว่าสามารถตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Hyphomonas* ได้ในระบบนิเวศจำลองที่เติมน้ำมันดิบลงไปใต้น้ำทะเล และงานวิจัยของ Li และคณะ (2016) พบว่าสามารถคัดแยก *Hyphomonas* ได้จากตัวอย่างดินตะกอนและน้ำทะเลที่มาจากมหาสมุทรแปซิฟิก และงานวิจัยของ Kostka และคณะ (2011) พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Alcanivorax Marinobacter Pseudomonas* และ *Acinetobacter* ได้จากดินทรายชายหาดที่ปนเปื้อนน้ำมัน และพบว่าจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล Deepwater Horizon ได้ส่งผลต่อประชาคมแบคทีเรียบริเวณชายหาดโดยพบว่า *Gammaproteobacteria (Alcanivorax Marinobacter)* และ *Alphaproteobacteria (Rhodobacteraceae)* มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายน้ำมันในบริเวณนี้ นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Al-Jawasim และคณะ (2015) เมื่อทดสอบผลของการเติมน้ำมันดิบ การเติมสารกระจายน้ำมัน (Corexit 9500A) และการเติมทั้งน้ำมันดิบและสารกระจายน้ำมันร่วมกันต่อประชาคมแบคทีเรียในตะกอนดินน้ำเค็ม โดยใช้ระบบนิเวศจำลอง (microcosm) พบว่าการเติมน้ำมันดิบ การเติม Corexit 9500A ทำให้ประชาคมแบคทีเรียเปลี่ยนไปเล็กน้อยหลังจาก 7 วันของการบ่ม และพบว่าแบคทีเรียสกุล *Chromobacterium* สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นในชุดทดลองที่เติม Corexit 9500A หลังจาก 7 วันของการบ่ม ในขณะที่แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas Advenella Acidocella* และ *Dyella* เพิ่มจำนวนขึ้นหลังจาก 30 วันของการบ่ม และพบว่าสกุล *Parvibaculum* เป็นประชากรเด่นในชุดที่เติมน้ำมันดิบหลังจาก 30 วันของการบ่ม นอกจากนี้ในชุดที่เติมทั้งน้ำมันดิบและ Corexit 9500A ร่วมกันพบว่าแบคทีเรียสกุล *Rhodanobacter Dyella* และ *Frateuria* เป็นประชากรเด่นหลังจาก 30 วันของการบ่ม ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียทั้ง 3 สกุล คือ *Hyphomonas Marinobacter* และ *Parvibaculum* จะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายน้ำมันดิบอย่างมีประสิทธิภาพ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเลือกใช้เพียงวิธีใดวิธีหนึ่งต่างมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน ซึ่งการที่จะเลือกใช้วิธีใดควรเลือกให้มีความเหมาะสมต่อพื้นที่ที่จะนำไปใช้ในการบำบัด โดยพบว่าการเลือกใช้ทั้ง 3 วิธีร่วมกัน คือ การเติมแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพ *Exiguobacterium* sp. AO-11 การปรับธาตุอาหารให้มีความเหมาะสม และการเติมสารกระจายน้ำมัน (dispersant) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ดีที่สุดและรวดเร็วที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากทั้ง 3 วิธีล้วนช่วยส่งเสริมกัน ซึ่งอาจถือเป็นแนวทางต้นแบบเพื่อนำไปปรับใช้ในการบำบัดดินทรายที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบในพื้นที่จริงต่อไป



## บทสรุป

จากงานวิจัยนี้ที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดินตะกอนบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Seawater (NSW) ได้สูงถึงประมาณ 90% ในระยะเวลา 10 วัน และสามารถตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบ รวมทั้งการมีสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์ ซึ่งสมบัติเหล่านี้ล้วนช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการย่อยสลายที่เกิดขึ้น และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบก็พบว่าน่าจะเป็นตัวที่เข้ามามีบทบาทในการย่อยสลายอัลเคนสายยาวและอัลเคนสายกลาง ซึ่งช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นสามารถย่อยสลายอัลเคนที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันดิบได้ดียิ่งขึ้น ถึงแม้ว่า *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่เติมลงไปในระบบไม่ได้คงอยู่ตลอดการทดลอง ซึ่งอาจถือเป็นข้อดีอย่างหนึ่งเนื่องจากการมีอยู่ของแบคทีเรียที่เติมลงไป อาจส่งผลกระทบหรือเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของประชากรของแบคทีเรียประจำถิ่นได้ ดังนั้น *Exiguobacterium* sp. AO-11 จึงอาจเป็นตัวหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมและกระตุ้นให้แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นนวัตกรรมพร้อมใช้เพื่อการบำบัดดินทรายที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบในพื้นที่ต่างๆ ต่อไป

## ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ในระบบยังคงต่ำอยู่ จึงอาจมีการวิจัยและทดลองเพื่อให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถคงอยู่ในระบบได้นานยิ่งขึ้น และทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นการใช้ในรูปแบบของเซลล์ตรึง เพื่อลดความเป็นพิษของน้ำมันดิบที่เซลล์ของแบคทีเรียจะได้รับลง เป็นต้น รวมทั้งการทดสอบประสิทธิภาพในสภาวะที่หลากหลายต่างๆ ซึ่งอาจส่งผลต่อการย่อยสลายและการอยู่รอดของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม และ pH เป็นต้น เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนจริงต่อไป นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Tambekar และคณะ (2013) ที่พบว่า *Exiguobacterium* sp. AMS1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดในน้ำมันมะพร้าว จึงอาจมีการศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นเพิ่มเติมโดยใช้สารอื่นเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อให้มีความเหมาะสมและส่งเสริมให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดียิ่งขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายที่เกิดขึ้น

## รายการอ้างอิง

- Aarathi, M., Eswaran, P., Priya, V., and Balakrishnan, V. 2015. Isolation and characterization of gelatinase-producing halophilic bacteria from the sediments of South Indian mangrove forest. Research and Development Centre, Bharathiar University, Maruthamalai Road, Coimbatore, Tamilnadu 641046, India.
- Abouseoud, M., Yataghene, A., Amrane, A., and Maachi, R. 2010. Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Hazardous Materials. 180(1-3): 131-136.
- Al-Jawasim, M., Yu, K., and Park, J. W. 2015. Synergistic effect of crude oil plus dispersant on bacterial community in a Louisiana salt marsh sediment. FEMS Microbiology Letters. 362(17): fnv144.
- Al-Mailem, D. M., Elias, M., and Radwan, S. S. 2012. Enhanced haloarchaeal oil removal in hypersaline environments via organic nitrogen fertilization and illumination. Extremophiles. 16(5): 751-758.
- Allan, S. E., Smith, B. W., and Anderson, K. A. 2012. Impact of the deepwater horizon oil spill on bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in Gulf of Mexico coastal waters. Environmental science & technology. 46(4): 2033-2039.
- Almeida, C. M. R., Reis, I., Couto, M. N., Bordalo, A. A., and Mucha, A. P. 2013. Potential of the microbial community present in an unimpacted beach sediment to remediate petroleum hydrocarbons. Environmental Science and Pollution Research. 20(5): 3176-3184.
- Ausubel, F. A., Brent, R. K., R.E., Moore, D. D., Seidman, J. G., and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons.
- Bejarano, A. C., and Michel, J. 2010. Large-scale risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in shoreline sediments from Saudi Arabia: Environmental legacy after twelve years of the Gulf war oil spill. Environmental Pollution. 158(5): 1561-1569.

- Bishop-Lilly, K. A., Broomall, S. M., Chain, P. S., Chertkov, O., Coyne, S. R., Daligault, H. E., et al. 2014. Complete Genome Assembly of Reference Strain *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49687. Genome Announcement.
- Boukir, A., Aries, E., Guiliano, M., Asia, L., Doumenq, P., and Mille, G. 2001. Subfractionation, characterization and photooxidation of crude oil resins. Chemosphere. 43(3): 279-286.
- Brooijmans, R. J. W., Pastink, M. I., and Siezen, R. J. 2009. Hydrocarbon degrading bacteria: the oil spill clean up crew. Microbial biotechnology. 2(6): 587-594.
- Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., and Yakimov, M. M. 2007. Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on "oil spill bioremediation" in mesocosms. Microbiological Research. 162(2): 185-190.
- Carson, R. T., Mitchell, R. C., Hanemann, M., Kopp, R. J., Presser, S., and Ruud, P. A. 2003. Contingent Valuation and Lost Passive Use: Damages from the Exxon Valdez Oil Spill. Environmental and Resource Economics. 25(3): 257-286.
- Chain, P. S., Lang, D. M., Comerici, D. J., Malfatti, S. A., Vergez, L. M., Shin, M., et al. 2011. Genome of *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188 T, a Versatile Opportunistic Pathogen and Symbiont of Several Eukaryotic Hosts. Journal of Bacteriology. 193(16): 4274-4275.
- Chandel, K., Mendki, M. J., Parikh, R. Y., Kulkarni, G., Tikar, S. N., Sukumaran, D., et al. 2013. Midgut Microbial Community of *Culex quinquefasciatus* Mosquito Populations from India. PLoS ONE. 8.
- Cheng, F., Tang, C., Yang, H., Yu, H., Chen, Y., and Shen, Z. 2013. Characterization of a blend-biosurfactant of glycolipid and lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* TU2 isolated from underground oil-extraction wastewater. Microbial biotechnology. 23(3): 390-396.
- Costa, S. G. V. A. O., Nitschke, M., Lépine, F., Déziel, E., and Contiero, J. 2010. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. Process Biochemistry. 45(9): 1511-1516.

- Coulon, F., McKew, B. A., Osborn, A. M., McGenity, T. J., and Timmis, K. N. 2007. Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. Environmental Microbiology. 9(1): 177-186.
- Das, K., and Mukherjee, A. K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology. 98(7): 1339-1345.
- Das, N., and Chandran, P. 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. Biotechnology Research International. 2011: 1-13.
- Desai, C., Parikh, R. Y., Vaishnav, T., Shouche, Y. S., and Madamwar, D. 2009. Tracking the influence of long-term chromium pollution on soil bacterial community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes. Res Microbiol. 160(1): 1-9.
- El-Fouly, M. Z., Sharaf, A. M., Shahin, A. A. M., El-Bialy, H. A., and Omara, A. M. A. 2015. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. 8(1): 36-48.
- Fritsche, W., and Hofrichter, M. 2008. Aerobic Degradation by Microorganisms Biotechnology. pp.144-167: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Fu, B., Li, Q. X., Xu, T., Cui, Z. L., Sun, Y., and Li, J. 2014. *Sphingobium* sp. FB3 degrades a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons. International Biodeterioration & Biodegradation. 87: 44-51.
- Fujimori, T., Yoneyama, Y., Taniai, G., Kurihara, M., Tamegai, H., and Hashimoto, S. 2012. Methyl halide production by cultures of marine proteobacteria *Erythrobacter* and *Pseudomonas* and isolated bacteria from brackish water. Limnology and Oceanography. 57: 154-162.
- Gentile, G., Bonsignore, M., Santisi, S., Catalfamo, M., Giuliano, L., Genovese, L., et al. 2016. Biodegradation potentiality of psychrophilic bacterial strain *Oleispira antarctica* RB-8T. Marine Pollution Bulletin. 105(1): 125-130.
- Gibello, A., Vela, A. I., Martin, M., Mengs, G., Alonso, P. Z., Garbi, C., et al. 2011. *Pseudomonas composti* sp. nov., isolated from compost samples. International Journal of Systematic Bacteriology. 61(Pt 12): 2962-2966.

- Guo, X. 2014. Culturable bacteria isolated from biotite. Life Science, Nanjing Agricultural University, Weigang No. 1, Nanjing, Jiangsu 210095, China.
- Haritash, A. K., and Kaushik, C. P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials. 169(1–3): 1-15.
- Hassanshahian, M., Zeynalipour, M. S., and Musa, F. H. 2014. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). Marine Pollution Bulletin. 82(1–2): 39-44.
- Horel, A., Mortazavi, B., and Sobecky, P. A. 2014. Biostimulation of weathered MC252 crude oil in northern Gulf of Mexico sandy sediments. International Biodeterioration & Biodegradation. 93: 1-9.
- Hyne, N. J. 2011. Crude oil Nontechnical Guide to Petroleum Geology, Exploration, Drilling, and Production. 2 ed. Oklahoma: PennWell.
- Jinendiran, S., Boopathi, S., and Sivakumar, N. 2015. Carotenogenic probiotic bacterium isolated from freshwater samples. Department of Molecular Microbiology, Madurai Kamaraj University, School of Biotechnology, Palgalai Nagar, Madurai, Tamil Nadu 625021, India.
- Johnsen, A. R., Bendixen, K., and Karlson, U. 2002. Detection of Microbial Growth on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Microtiter Plates by Using the Respiration Indicator WST-1. Applied and Environmental Microbiology. 68(6): 2683-2689.
- Juhasz, A. L., and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation. 45(1–2): 57-88.
- Jurelevicius, D., Alvarez, V. M., Peixoto, R., Rosado, A. S., and Seldin, L. 2013. The Use of a Combination of alkB Primers to Better Characterize the Distribution of Alkane-Degrading Bacteria. PLoS ONE. 8(6): e66565.
- Karna, S. L., Chen, T., Chen, P., Peacock, T. J., Abercrombie, J. J., and Leung, K. P. 2016. Genome Sequence of a Virulent *Pseudomonas aeruginosa* Strain, 12-4-4(59), Isolated from the Blood Culture of a Burn Patient. Genome Announcement. 4(2).

- Kloos, K., Munch, J. C., and Schloter, M. 2006. A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. Journal of Microbiological Methods. 66(3): 486-496.
- Kohno, T., Sugimoto, Y., Sei, K., and Mori, K. 2002. Design of PCR primers and gene probes for general detection alkane-degrading bacteria. Microbes and Environments. 17(3): 114-212.
- KOO, H. 2013. MICROBIAL RESPONSES TO MC252 IN GULF OF MEXICO SEDIMENTS USING BTEFAP AND BIOINFORMATICS TOOLS. Masters of Biology, the graduate faculty University of Alabama.
- Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., et al. 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(22): 7962-7974.
- Kumar, D., and Pannu, R. 2014. Isolation & characterization of lindane degrading bacteria from New Delhi India. Department of Biotechnology, Deenbandhu Chhotu Ram University of Science and Technology, Murthal, Sonapat, Haryana 131039, India.
- Kvenvolden, K. A., and Cooper, C. K. 2003. Natural seepage of crude oil into the marine environment. Geo-Marine Letters. 23(3): 140-146.
- Lei, Y. D., Yang, Y. S., Du, X. Q., and Cao, Y. Q. (2011). Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon by Indigenous Microorganisms Isolated from an Oil Contaminated Groundwater Site. Xi'an.
- Leja, K., and Lewandowicz, G. 2010. Polymer Biodegradation and Biodegradable. Environmental Microbiology. 19(2): 255-266.
- Li, H., Wang, X.-L., Mu, B.-Z., Gu, J.-D., Liu, Y.-D., Lin, K.-F., et al. 2013. Molecular detection, quantification and distribution of alkane-degrading bacteria in production water from low temperature oilfields. International Biodeterioration & Biodegradation. 76: 49-57.
- Li, X., Li, C., Lai, Q., Li, G., Sun, F., and Shao, Z. 2016. *Hyphomonas pacifica* sp. nov., isolated from deep sea of the Pacific Ocean. Antonie van Leeuwenhoek. 1-9.

- Liu, C., Wang, W., Wu, Y., Zhou, Z., Lai, Q., and Shao, Z. 2011. Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. Environmental Microbiology. 13(5): 1168-1178.
- Liu, H., Yao, J., Yuan, Z., Shang, Y., Chen, H., Wang, F., et al. 2014. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China. International Biodeterioration & Biodegradation. 87: 52-59.
- Luo, J., Lv, P., and Bai, Z. 2015. Diversity of culturable aerobic denitrifying bacteria in the sediment, overlaying water and biofilms in Liangshui River in Beijing, China. Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shuangqing Road 18, Haidian District, Beijing, Beijing 100085, China.
- Ma, W. Y., Zhang, X. M., and Zhang, Q. H. 2016. Effect of dietary astaxanthin on culture-based bacterial community isolated from the intestinal tract and gills of male Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*). College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Huchenghuan Road 999, Lingang New City Pudong New Area, Shanghai 201306, China.
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M. A., Afshar, D., Arandian, M. H., Hajikhani, S., Akhavan, A. A., et al. 2015. Aerobic bacterial flora of biotic and abiotic compartments of a hyperendemic Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) focus. Parasit Vectors. 8: 63.
- Marcano, I. E., Diaz-Alcantara, C. A., Urbano, B., and Gonzalez-Andres, F. Bacterial populations associated with banana tree roots in organic farms in the Dominican Republic contain new bacterial species with plant growth promotion potential for the development of successful biofertilizers. Institute of Environment, Natural Resources and Biodiversity, Universidad de Leon, Avenida de Portugal 41, Leon, Leon ES-24071, Spain.
- Matilla, M. A., Pizarro-Tobias, P., Roca, A., Fernandez, M., Duque, E., Molina, L., et al. 2011. Complete genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. Journal of Bacteriology. 193(5): 1290.

- McGenity, T. J. 2014. Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. Current Opinion in Biotechnology. 27: 46-54.
- Medina-Bellver, J. I., Marin, P., Delgado, A., Rodriguez-Sanchez, A., Reyes, E., Ramos, J. L., et al. 2005. Evidence for *in situ* crude oil biodegradation after the *Prestige* oil spill. Environmental Microbiology. 7(6): 773-779.
- Meenakshisundaram, M., and Bharathiraja, C. 2014. Isolation and Molecular Identification of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Oil Contaminated Soils from Tamilnadu. Indian Journal of Applied Research. 4(7): 39-42.
- Merola, M. C., Carotenuto, C., Gargiulo, V., Stanzione, F., Ciajolo, A., and Minale, M. 2016. Chemical–physical analysis of rheologically different samples of a heavy crude oil. Fuel Processing Technology. 148: 236-247.
- Miki, T., Matsui, K., and Yokokawa, T. 2013. Biodiversity and multi-functionality in a microbial community: A novel theoretical approach to quantify functional redundancy. Center for Marine Environmental Studies, Ehime University, Bunkyo 3, Matsuyama, Ehime 790-8577, Japan.
- Mohanty, G., and Mukherji, S. 2008. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. International Biodeterioration & Biodegradation. 61(3): 240-250.
- Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernandez, M., Molina-Santiago, C., Roca, A., et al. 2014. Antibiotic resistance determinants in a *Pseudomonas putida* strain isolated from a hospital. PLoS ONE. 9(1): e81604.
- Morikawa, M., Hirata, Y., and Imanaka, T. 2000. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 1488(3): 211-218.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 59(3): 695-700.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A., et al. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the



- metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. Environ Microbiol. 4(12): 799-808.
- 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.
- Nopcharoenkul, W., Pinphanichakarn, P., and Pinyakong, O. 2011. The development of a liquid formulation of *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 and its application in the treatment of pyrene-contaminated soil. Journal of Applied Microbiology. 111(1): 36-47.
- Obayori, O. S., Adebusoye, S. A., Adewale, A. O., Oyetibo, G. O., Oluyemi, O. O., Amokun, R. A., et al. 2009. Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strains. Journal of Environmental Sciences. 21(2): 243-248.
- Okoh, A. I. 2013. Biodegradation of Bonny light crude oil in soil microcosm by some bacterial strains isolated from crude oil flow stations savor pits in Nigeria. African Journal of Microbiology. 1(3): 045-048.
- Panagoda, G. J., Ellepola, A. N. B., and Samaranayake, L. P. 2001. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. Mycoses. 44(1-2): 29-35.
- Pindi, P. K., Raghuvver Yadav, P., and Shiva Shanker, A. 2013. Identification of Opportunistic Pathogenic Bacteria in Drinking Water Samples of Different Rural Health Centers and Their Clinical Impacts on Humans. BioMed Research International. 2013: 348250.
- Priya, S., Arumugam, T., Govindarajan, R., Kayalvizhi, N., and Karthikeyan, K. 2016. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from sugarcane industry. Food Science and Nutrition, Periyar University, Science Block I, Salem, Tamil Nadu 636011, India.
- Rahman, K. S. M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., and Banat, I. M. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresource Technology. 85(3): 257-261.
- Ramalakshmi, M., Saboor, A., and Ismail, S. A. 2016. Bioremediation of methyl parathion. Unit of Research in Ecology and Ecotechnology, Department of

Zoology, The New College, #87 Peters Road, Royapettah, Chennai, Tamil Nadu 600014, India.

- Reis, R. S., Pereira, A. G., Neves, B. C., and Freire, D. M. G. 2011. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. Bioresource Technology. 102(11): 6377-6384.
- Rojo, F. 2010. Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. pp.781 - 797. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Saikia, J., Dhandia, R., Bora, T. C., and Saikia, R. 2015. Isolation OF ACC deaminase producing bacteria from stressed agricultural fields of Assam. Biotechnology, CSIR-NEIST, RRL Jorhat, Jorhat, Assam 785006, India.
- Saisard, K., Saimmai, A., and Maneera, S. 2014. Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 36(2): 163-175.
- Sandhiya, S. 2016. Isolation of chocolate wrappers degrading microbes from compost. Department of Biotechnology, Srimad Andavan Arts and Science College, Nelson road, Thiruchirappalli, Tamil Nadu 620005, India.
- Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Baik, S., and Yun, S. 2008. Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium Isolated from Hydrocarbon Contaminated Areas. Clean. 36(1): 92 – 96.
- Sawadogo, A., Ouidobiga, H. C., Nitiema, L. W., Traoré, A. S., and Dianou, D. 2016. Optimization of Hydrocarbons Biodegradation by Bacterial Strains Isolated from Wastewaters in Ouagadougou, Burkina Faso: Case Study of SAE 40/50 Used Oils and Diesel. Journal of Agricultural Chemistry and Environment. 5: 1-11.
- Saxena, A. K., Yadav, A. N., Gulati, S., Sharma, D., Shrivastava, V. L., Rathore, M., et al. 2015. Diversity and microbial communities in rhizospheric soil of five different plants growing in hypersaline environments of Rann of Kutch.
- Seghal Kiran, G., Anto Thomas, T., Selvin, J., Sabarathnam, B., and Lipton, A. P. 2010. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced

- by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. Bioresource Technology. 101(7): 2389-2396.
- Singh, A., and Subudhi, E. 2016. Structural insights of microbial community of Deulajhari (India) hot spring using 16s-rRNA based metagenomic sequencing. Genomics Data. 7: 101-102.
- Tambekar DH, S. A., Gunjekar SR and Gadakh PV. 2013. Isolation of Biosurfactant Producing *Exiguobacterium* sp. from Lonar Lake. INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCES IN PHARMACY, BIOLOGY AND CHEMISTRY. 2(3): 437-442.
- Tang, H., Yu, H., Li, Q., Wang, X., Gai, Z., Yin, G., et al. 2011. Genome sequence of *Pseudomonas putida* strain B6-2, a superdegrader of polycyclic aromatic hydrocarbons and dioxin-like compounds. Journal of Bacteriology. 193(23): 6789-6790.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., and Banat, I. M. 2011. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. Bioresource Technology. 102(2): 772-778.
- Truong, H. A. V., Nguyen, H. T., Nguyen, N. H., and Nguyen, H. K. T. 2016. Characterization of *Exiguobacterium Indicum* Pn04 Isolated From Hot Spring. Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences. 5(1): 34-37.
- Uchendu-Obi, L. U., Atagana, H. I., and Adeleke, R. A. 2015. Characterisation of oil sludge degrading bacteria isolated from compost at different temperature plans. Soil Science, Agricultural Research Council-Institute for Soil, Climate and Water, 600 Belvedere Street, Arcadia, Pretoria, Gauteng 0001, South Africa.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., et al. 2006. Cytochrome P450 Alkane Hydroxylases of the CYP153 Family Are Common in Alkane-Degrading Eubacteria Lacking Integral Membrane Alkane Hydroxylases. Applied and Environmental Microbiology. 72(1): 59-65.
- Velho-Pereira, S., and Kamat, N. M. 2011. Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 73(2): 223-228.

- Vidali, M. 2001. Bioremediation: An overview. Pure and Applied Chemistry. 73: 1163-1172.
- Vinothini, C., Sudhakar, S., and Ravikumar, R. 2015. Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 4(1): 318-329.
- Walters, W., Hyde, E. R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., et al. 2016. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. mSystems. 1(1).
- Wang, L., Wang, W., Lai, Q., and Shao, Z. 2010. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. Environmental Microbiology. 12(5): 1230-1242.
- Wang, Y., Guan, S., Acharya, P., Koop, D. R., Liu, Y., Liao, M., et al. 2011. Ubiquitin-dependent Proteasomal Degradation of Human Liver Cytochrome P450 2E1: IDENTIFICATION OF SITES TARGETED FOR PHOSPHORYLATION AND UBIQUITINATION. The Journal of Biological Chemistry. 286(11): 9443-9456.
- Whyte, L. G., Smits, T. H. M., Labbé, D., Witholt, B., Greer, C. W., and van Beilen, J. B. 2002. Gene Cloning and Characterization of Multiple Alkane Hydroxylase Systems in *Rhodococcus* Strains Q15 and NRRL B-16531. Applied and Environmental Microbiology. 68(12): 5933-5942.
- Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., et al. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation. 107: 158-164.
- Yadav, A. N., Verma, P., Sachan, S. G., and Saxena, A. K. 2014. Bioprospecting of plant growth promoting psychrotrophic Bacilli from cold desert of north western Indian Himalayas. Microbiology, Indian Agricultural Research Institute, Pusa, New Delhi, Delhi 110012, India.
- Yakimov, M. M., Giuliano, L., Denaro, R., Crisafi, E., Chernikova, T. N., Abraham, W. R., et al. 2004. *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine

- bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. International Journal of Systematic Bacteriology. 54(Pt 1): 141-148.
- Yeh, M. S., Wei, Y. H., and Chang, J. S. 2005. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. Biotechnology Progress. 21(4): 1329-1334.
- Yousaf, M., Rehman, Y., and Hasnain, S. 2015. Plant Growth Promoting Bacteria From Histoplane of Three Commercial Wheat Varieties. Microbiology & Molecular Genetics, University of the Punjab, Quaid-e-Azam Campus, Lahore, Punjab 54590, Pakistan.
- Zhao, D., Liu, C., Liu, L., Zhang, Y., Liu, Q., and Wu, W.-M. 2011. Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. International Biodeterioration & Biodegradation. 65(8): 1244-1248.
- Zhuang, M., Abulikemu, G., Campo, P., Platten, W. E., 3rd, Suidan, M. T., Venosa, A. D., et al. 2016. Effect of dispersants on the biodegradation of South Louisiana crude oil at 5 and 25 degrees °C. Chemosphere. 144: 767-774.
- กรมเจ้าท่า. เหตุการณ์น้ำมันรั่ว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง. [ออนไลน์]. 2556. แหล่งที่มา: [http://oldweb.md.go.th/safety\\_environment/oil.php](http://oldweb.md.go.th/safety_environment/oil.php) [18 พฤศจิกายน 2558]
- กรมเจ้าท่า. สถิติน้ำมันรั่วไหล 2558. [ออนไลน์]. 2558. แหล่งที่มา: <http://md.go.th/md/index.php/2014-01-19-05-02-28/2014-01-19-05-14-13/2014-01-19-06-02-02/-51> [28 มีนาคม 2558]
- กรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน. สรุปการจัดการและการจำหน่ายน้ำมันเชื้อเพลิง 2557. [ออนไลน์]. 2557. แหล่งที่มา: [www.doeb.go.th/info/data/datadistribution/Year\\_2557.pdf](http://www.doeb.go.th/info/data/datadistribution/Year_2557.pdf) [18 พฤศจิกายน 2558]
- กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. แผนงานแก้ไข และฟื้นฟูทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด และพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากคราบน้ำมัน จังหวัดระยอง. [ออนไลน์]. 2556. แหล่งที่มา: [http://easyweb.mnre.go.th/ewt/rayong/download/article/article\\_2013102\\_4114301.pdf](http://easyweb.mnre.go.th/ewt/rayong/download/article/article_2013102_4114301.pdf) [18 พฤศจิกายน 2558]
- บริษัท ปตท.จำกัด (มหาชน). กรณีศึกษาสถานการณ์น้ำมันดิบรั่วในทะเล. [ออนไลน์]. 2556. แหล่งที่มา: <http://www.pttplc.com/th/Media-Center/Energy-Knowledge/Pages/pttgc-oil-spill-2013.aspx> [18 พฤศจิกายน 2558]

- ปิยะนุช อยู่คล้าย. 2558. ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินตะกอนอ่าวไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- แผนกวิชาเทคโนโลยียางและพอลิเมอร์ วิทยาลัยเทคนิคจันทบุรี. การกลั่นน้ำมันดิบและผลิตภัณฑ์. [ออนไลน์]. 2558. แหล่งที่มา: [http://www2.technicchan.ac.th/~polymer/index.php?option=com\\_content&task=view&id=59&Itemid=63](http://www2.technicchan.ac.th/~polymer/index.php?option=com_content&task=view&id=59&Itemid=63) [18 พฤศจิกายน 2558]
- พิสุทธิ เพ็ชรมนกุล. แนวทางการบำบัดน้ำมันปนเปื้อนพื้นที่ชายฝั่ง (Shoreline Treatment). [ออนไลน์]. 2556. แหล่งที่มา: <http://www.eng.chula.ac.th/node/836> [19 มกราคม 2558]
- พิสุทธิ เพ็ชรมนกุล, and ณัฐวิญญู ชาวเลิศพรศิยา. น้ำมันรั่วไหล : ในอีกมุมที่ทุกคนควรรู้! [ออนไลน์]. 2556. แหล่งที่มา: [www.eng.chula.ac.th/sites/default/files/chula\\_engineering\\_oil\\_spill\\_article.pdf](http://www.eng.chula.ac.th/sites/default/files/chula_engineering_oil_spill_article.pdf) [19 มกราคม 2558]
- สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน. โครงสร้างอุตสาหกรรมปิโตรเคมี. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: <http://www.eppo.go.th/petro/PT-Petrochemical.pdf> [20 พฤศจิกายน 2558]
- อัจฉราพร ขำโสภณ. เทคโนโลยีการฟื้นฟูทางชีวภาพ (Bioremediation Technology). [ออนไลน์]. 2556. แหล่งที่มา: <http://www.etm.sc.mahidol.ac.th/a10.shtml> [19 มกราคม 2558]



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Seawater (NSW)

แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.02	กรัม
เฟอริกซิเตรต (Ferric citrate)	0.02	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.5	กรัม
น้ำทะเล	200	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มิลลิลิตร และเติมน้ำทะเล 200 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

ทริปโตเนอ (Tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายผงวุ้น 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani เจือจาง 4 เท่า (0.25X LB)

ผสมอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 750 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani เจือจาง 10 เท่า (0.1X LB)

ผสมอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



## ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี

### สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ รอให้เย็นลง แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

### สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

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

### สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	10	กรัม
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	100	มิลลิลิตร

### สารละลาย Tris เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane)	12.11	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกจนมีค่าเท่ากับ 8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0**

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

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนมีค่าเท่ากับ 8 กวนจนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นาไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

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

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

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

**สารละลายไลโซไซม์ เข้มข้น 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร**

ไลโซไซม์ (lysozyme)	60	มิลลิกรัม
สารละลาย TE	1	มิลลิลิตร

**สารละลายโปรตีนเนสเค เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร**

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	10	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	1	มิลลิลิตร

**สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 5 โมลาร์**

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	29.22	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ นาไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลายเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ในโซเดียมคลอไรด์ (CTAB/NaCl)**

เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในปิกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก ให้ความร้อนพออุ่น แล้วค่อยๆละลาย CTAB ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นาไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:1**

ฟีนอล	50	มิลลิลิตร
คลอโรฟอร์ม	50	มิลลิลิตร

**เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์**

เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์	70	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	30	มิลลิลิตร

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

Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane)	242	กรัม
กรดอะซิติก (glacial acetic acid)	57.1	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Tris ในน้ำปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร ในปิกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ เติมกรดอะซิติกและสารละลาย EDTA ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นาไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

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

บัฟเฟอร์ 50X TAE	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	980	มิลลิลิตร

**สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร**

เอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	10	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

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

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	16.9	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	7.3	กรัม
ยูเรีย ( $CH_4N_2O$ )	1.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

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

**สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 8.0**

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	400	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	600	มิลลิลิตร

**สารละลายไอโอดีนไนโตรเตตระโซเนียมคลอไรด์ (INT) เข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร**

INT (iodonitrotetrazolium chloride)	150	มิลลิกรัม
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO)	10	มิลลิลิตร

ละลายสารในไดเมทิลซัลฟอกไซด์จนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ตารางที่ ค-1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของกลุ่มแบคทีเรีย ทั้ง 12 กลุ่ม ภายหลังจากการเพิ่มจำนวนโดยวิธีเอนริชเมนต์ และใช้หัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น ประมาณ 7 log CFU/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 วัน และทดสอบ ประสิทธิภาพโดย GC-FID

กลุ่มแบคทีเรีย	การย่อยสลายน้ำมันดิบในวันที่ 2 (%)
CT1-W1	50.27±6.59
CT1-M1	41.46±1.63
CT2-W1	54.03±0.61
CT2-M1	17.11±0.00
CR1-W1	85.29±4.97
CR1-M1	44.36±3.72
CR2-W1	73.83±1.09
CR2-M1	45.67±5.11
OSB-W1	38.00±1.14
OSB-M1	60.11±6.42
OS2-W1	81.86±6.26
OS2-M1	69.79±0.18

ตารางที่ ค-2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยใช้หัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 7 log CFU/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็น ระยะเวลา 10 วัน และทดสอบประสิทธิภาพโดย GC-FID

สายพันธุ์แบคทีเรีย	การย่อยสลายน้ำมันดิบในวันที่ 2 (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AO-08	75.72±3.94
<i>Ochrobactrum anthropi</i> AO-09	48.85±4.79
<i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11	91.60±1.20
<i>Bacillus thuringiensis</i> AO-12	21.12±6.93
<i>Pseudomonas composti</i> AO-14	67.20±6.23
<i>Pseudomonas putida</i> AO-15	39.55±0.13

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์  
แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-08

GCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCT  
AGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCCTG  
AGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT  
TGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACAC  
TGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC  
GAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGT  
TGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGC  
TAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT  
AAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC  
ATCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATG  
CGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGG  
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGA  
CTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCCGCTGGGGA  
GTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT  
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGA  
TGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGA  
GATGTTGGGTAAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGG  
CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGG  
CCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAG  
GTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAG  
TCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAAT

**แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-09**

CTTGCGGTTAGCACAGCGCCTTCGGGTAACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA  
AGGCCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGC  
ACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAACTGAGATGGCTTTTGGAGATTAGCTCACACTCGCGTGC  
TCGCTGCCACTGTCACCACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGCCGTAAGGGCCATGAGGAC  
TTGACGTCATCCCCACCTTCCTCTCGGCTTATCACCGGCAGTCCCCTTAGAGTGCCCAACTAAA  
TGCTGGCAACTAAGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA  
GCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATCCGGTCCAGCCGAACTGAAAGACACATCTCTGTGTC  
CGCGACCGGTATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCC  
ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCG  
GAATGTTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCGAAGAGTAAACTCCCCAACGGCTAACATTCATCGTT  
TACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCTCCCCACGCTTTCCACCTCAGCGTCAG  
TAATGGTCCAGTGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTA  
CACTCGGAATTCCACTCACCTTACCATACTCAAGACTTCCAGTATCAAAGGCAGTTCCGGGGT  
TGAGCCCCGGGATTTACCCCTGACTTAAAAGTCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAAATC  
CGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTC  
TCCGGTTACCGTCATTATCTTCACCGGTGAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCA  
CGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGG  
AGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTATGGATCGTCG  
CCTTGGTGAGCCTTTACCTACCAACTAGCTAATCCAACGCGGGCCGATCCTTTGCCGATAAAT  
CTTTCCCCCGAAGGGCACATACGGTATTAGCACAAGTTTCCCTGAGTTATTCCGTAGCAAAGG  
TACGTTCCCACGCGTTACTACCCGTCTGCCGCT

**แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-11**

TCGGCCTCCGCGGGTAAAAAAGGAAATTAGTGAAACAATTTAAAGGTTTTTTATTTGCTTCAAC  
CCCGTCCCCCTTCCCCCCCCGCCCTTCTGGGGGGTTCTTGCCGCCCCCCCCCCCCCGAGGCC  
CCACGATCCCCCCCCCCCCCTCGGGGGGGGGGGCTGGGTCCCTCGCCCCCTCCCCCCCC  
CCCTCCCCTTCTCTCTCCCGCCCGGGGGGGGGCCGGGGGGGGGCCTTACTCTATTGTCCGAG  
TAAAAAGAATAGGGGGAGTTGCCCGCCCCCGCGGGGGGAAAGAAACTCTCTCTTCC  
CAACAACCTGTTTCTGCAGAGCCACCCCCCCCCCTCGGTCACTTTTTCTTCCCCTAGGGG  
GACCGTTTTTTTCTATCCCCGCCCGGGGGGATGTCCTACAGAGTCCCATGTTTTTTATGT  
GTGGTTGAAAAATATCCCCCCTTACCCCCCCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT  
TTTTCGTTCAAACGACCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAACTGACGGA  
ACTCTTCGGAGGGAAGGCAGTGGAATGAGCGGCGACGGGTGAGTAACACGTAAGGAACCTGC  
CTCAAGGATTGGGATAACTCCGAGAAATCGGAGCTAATACCGGATAGTTCAACGGACCGCATGG  
TCCGCTGATGAAAGGCGTCCGGCGTCACCTTGAGATGGCCTTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT  
GGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG  
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAA  
AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGG  
GAAGAACACGTACGAGAGGAAATGCTCGTACCTTGACGGTACCTTACGAGAAAGCCACGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA  
GCGCGCGCAGGCGGCCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGAGGGCCATT  
GGAAACTGGAAGGCTTGAGTACAGAAGAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCC  
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCG  
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCT  
AGGTGTTGGGGGTTTTCCGCCCTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG  
TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG  
GTTTAAT



**แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-12**

TGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCA  
TGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAG  
TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG  
ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTG  
TTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCAC  
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG  
CGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGG  
GTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAA  
ATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGA  
GGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA  
GTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG  
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC  
ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTA  
GAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC  
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTT  
GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA  
TGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCG  
AGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA  
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA  
CACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGT

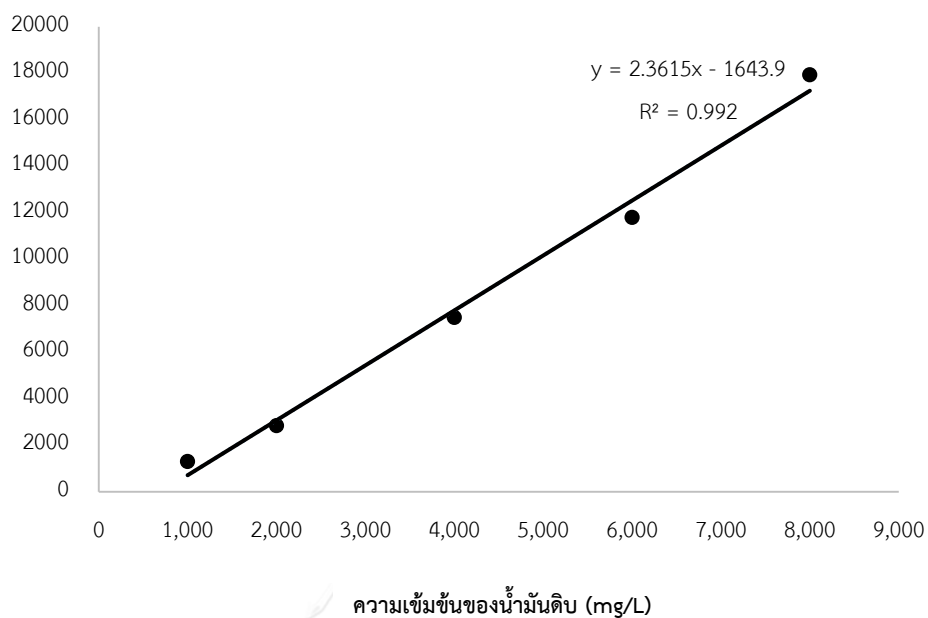
**แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-14**

AGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGG  
GAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGATTAAGCTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGT  
TGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGAAC  
CCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGT  
CATCCCCACCTTCCTCCGTTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGG  
TAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC  
GACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCA  
GCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTG  
TGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCCAAGGCGCGTACTCCCCAGGCGGTCA  
ACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGACATCGATTAC  
GCCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTTCGCACCTCAGTGTCAGTA  
TCAGTCCAGGTAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTAC  
ACAGGAAATTCCACTACCCTCTACCGTACTCTAGCTCGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTT  
GAGCCCGGGCTTTACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCC  
GATTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCT  
GTCGGTAACGTCAAAAATTGCAGAGTATTAATCTACAACCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTAC  
AATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAATAT  
TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCT  
CTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAGCTAATCCGACCT  
AGGCTCATCTAATGGCGCGAGGTCCGAAGATCCCCGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTAT  
TAGCGTCCGTTTCCGAACGTTATCCCCACCACTAGGCAGATTCCTAGGCATTAACCCCGTC  
CGCCGCTCTCAAGAGAAGCAAGCTCCTCTCTACCGCTCGACTT

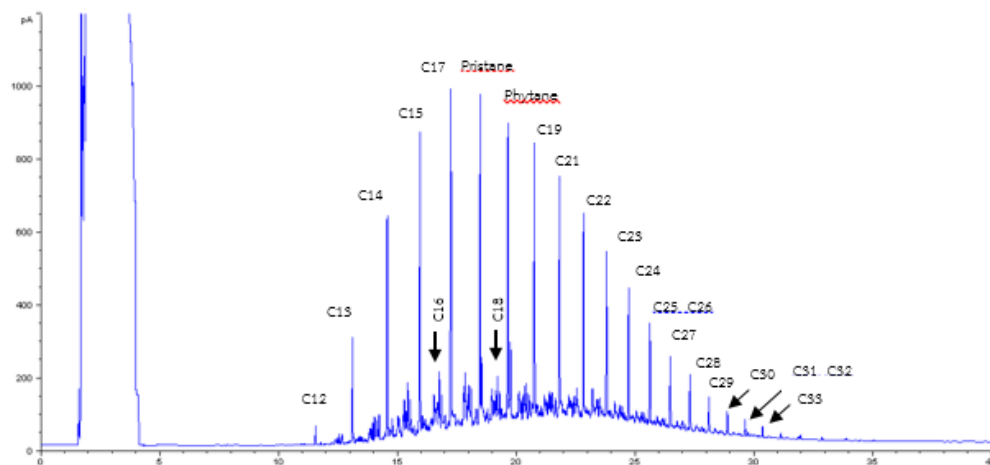
**แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AO-15**

CGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTG  
GCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTT  
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCATAACGT  
GCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG  
CTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGT  
TCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACC  
GCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCATGCGGCGGCGTACTCCCCAGGCGG  
TCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATCCAACGGCTAGTTGACATCGAT  
TACCGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTC  
AGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTTCTATATCTACGCATTTACC  
TACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCAG  
GTTGAGCCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAACAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAAT  
TCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTAT  
TCTGTGCGTAACGTCAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTT  
TACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAA  
TATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCAT  
CCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATCCGA  
CCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGG  
TATTAGCGTTCTTTGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCATTAATCACCC  
GTCCGCCGCTGAATCAAGGAGCAA

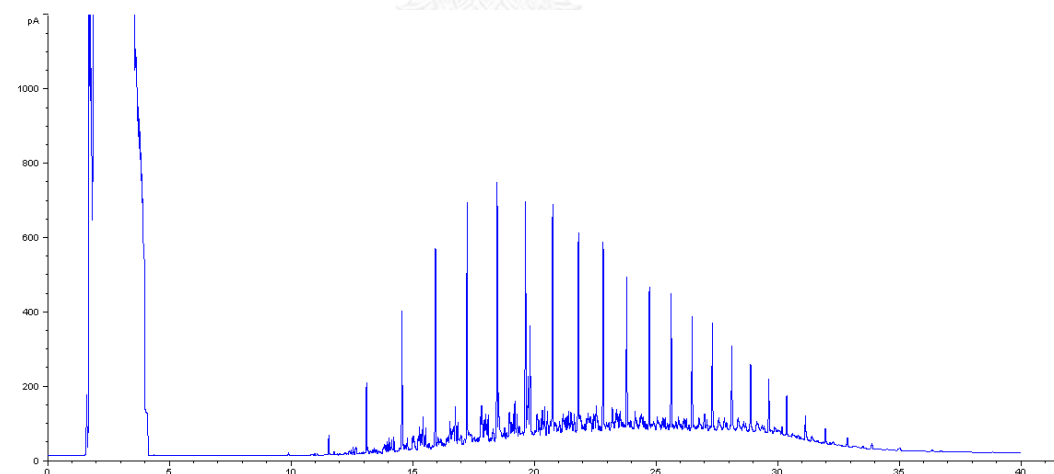
ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ



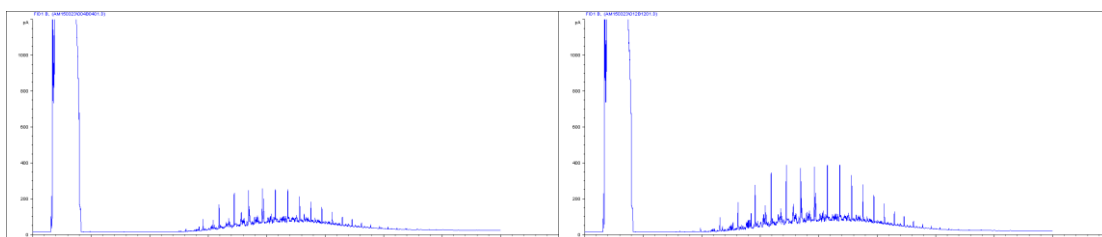
รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของน้ำมันดิบในช่วงความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 8,000 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD Method)



รูปที่ ค-2 โครมาโทแกรมของชุดควบคุมคือชุดที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Seawater (NSW) และเติมน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) วันที่ 0 และวิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method)

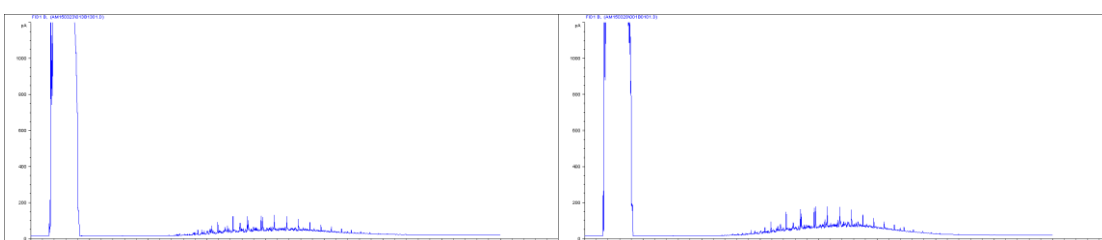


รูปที่ ค-3 โครมาโทแกรมของชุดควบคุมคือชุดที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Seawater (NSW) และเติมน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) วันที่ 2 และวิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method)



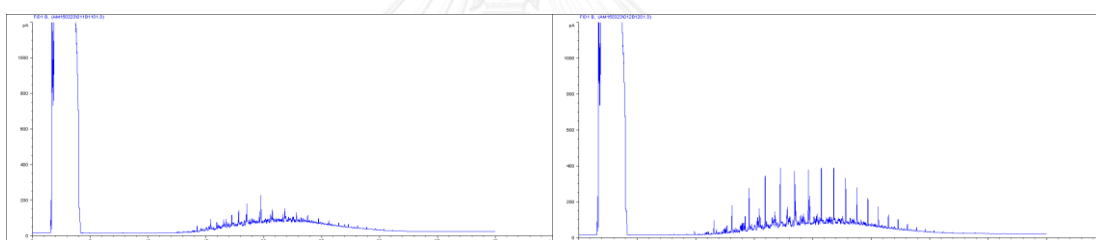
(ก)

(ข)



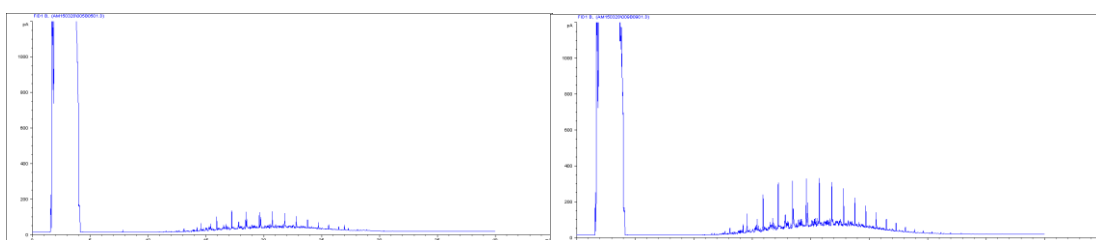
(ค)

(ง)



(จ)

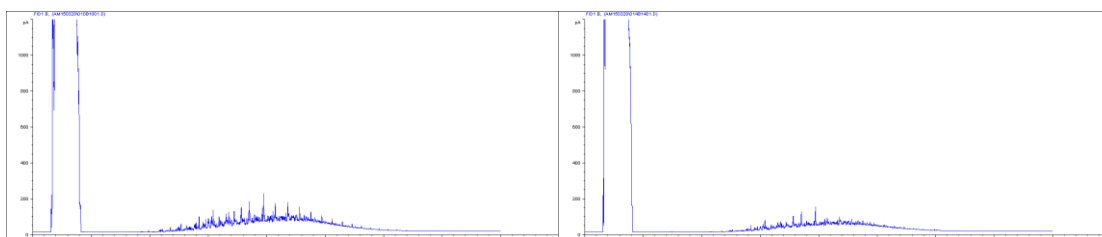
(ฉ)



(ช)

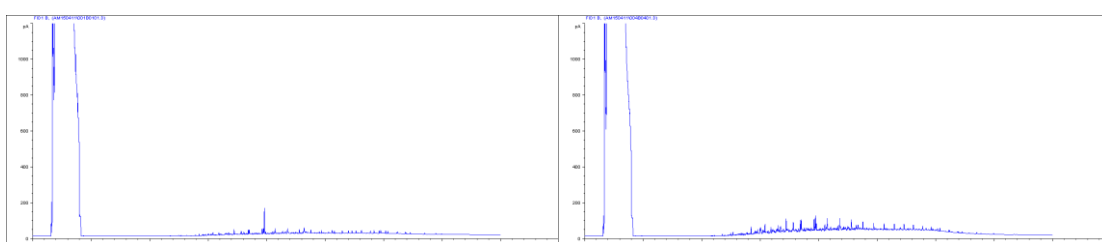
(ซ)

รูปที่ ค-4 โครมาโทแกรมของชุดทดลองในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร)  
วันที่ 2 และวิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method) (ก: CT1-W1 ข: CT1-M1  
ค: CT2-W1 ง: CT2-M1 จ: CR1-W1 ฉ: CR1-M1 ช: CR2-W1 ซ: CR2-M1)



(ฉ)

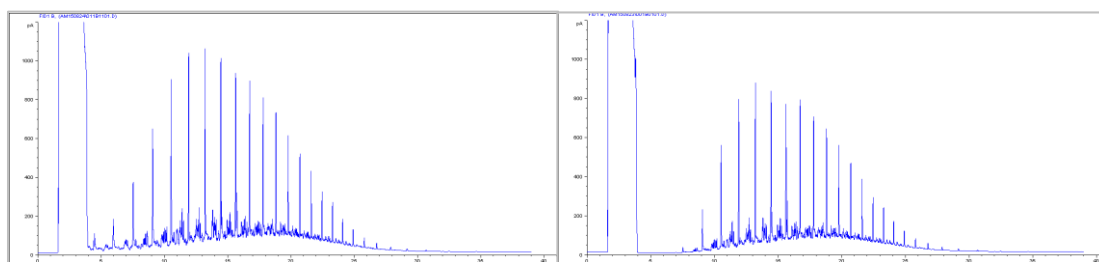
(ญ)



(ฎ)

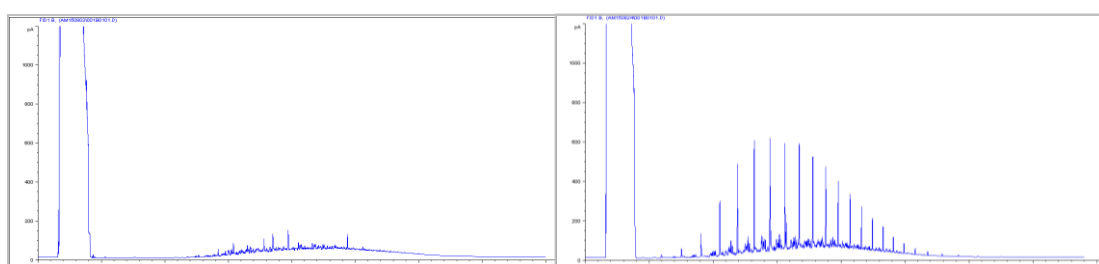
(ฏ)

**รูปที่ ค-4** โครมาโทแกรมของชุดทดลองในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร)  
วันที่ 2 และวิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method) (ต่อ) (ฉ: OSB-W1 ญ: OSB-M1  
ฎ: OS2-W1 ฏ: OS2M1)



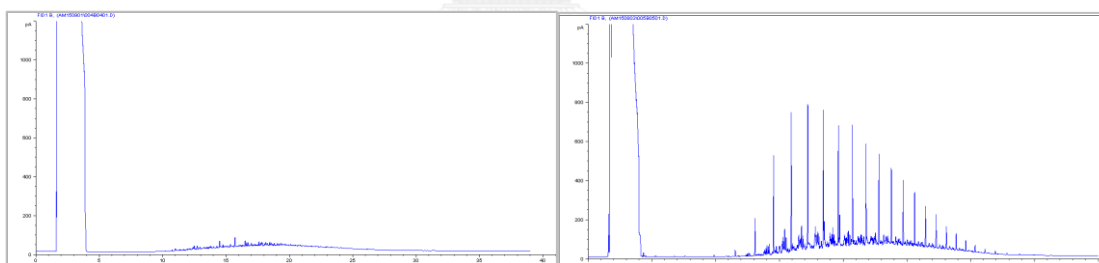
(ก)

(ข)



(ค)

(ง)

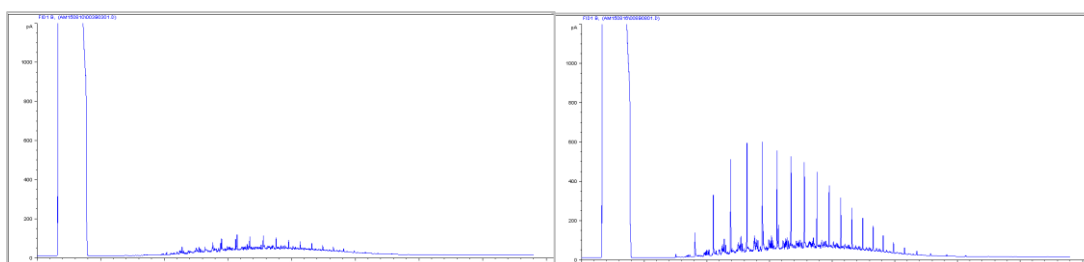


(จ)

(ฉ)

รูปที่ ค-5 โครมาโทแกรมของการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นระยะเวลา 10 วัน และ วิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method) (ก: ชุดควบคุมวันที่ 0 ข: ชุดควบคุมวันที่ 10 ค: *Pseudomonas aeruginosa* AO-08 ง: *Ochrobactrum anthropic* AO-09 จ: *Exiguobacterium* sp. AO-11 ฉ: *Bacillus thuringiensis* AO-12





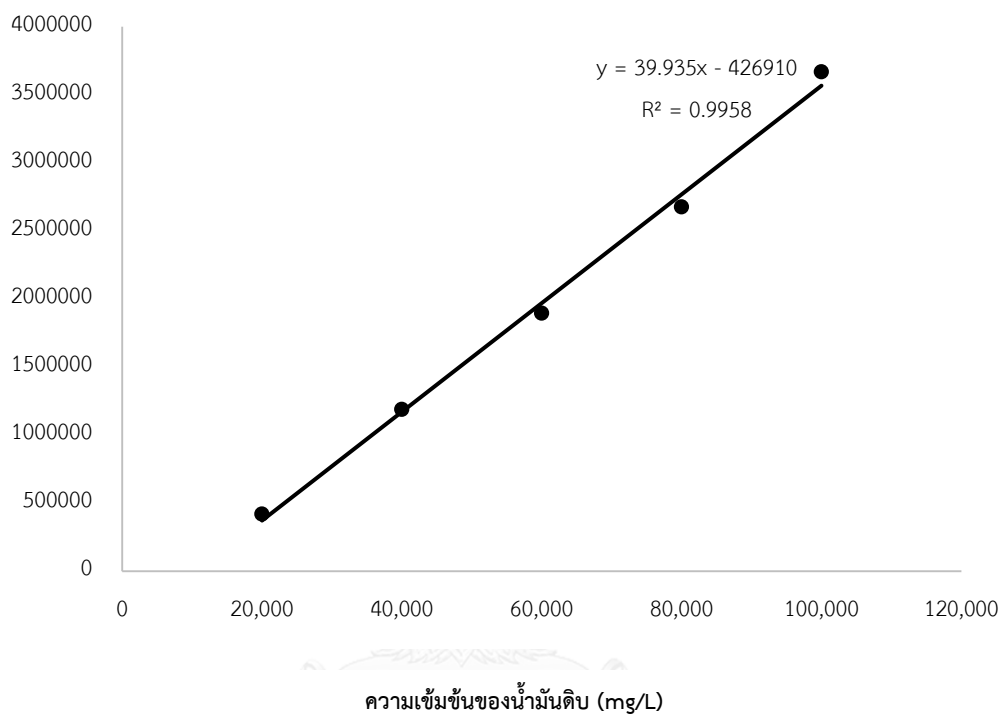
(ซ)

(ช)

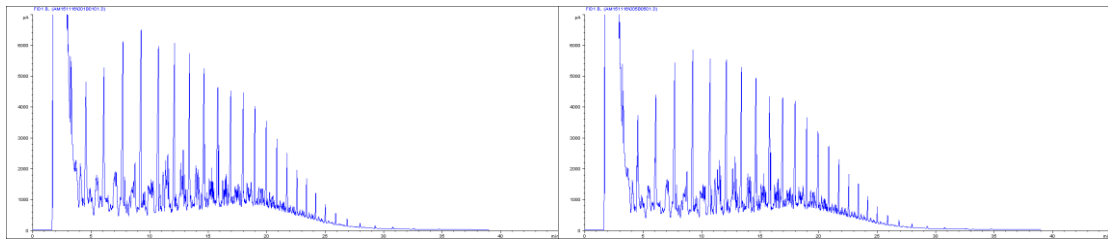
**รูปที่ ค-5** โครมาโทแกรมของการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นระยะเวลา 10 วัน และ วิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method) (ต่อ) (ช: *Pseudomonas composti* AO-14 ช: *Pseudomonas putida* AO-15)

ภาคผนวก ง ข้อมูลดิบต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายปนเปื้อน  
น้ำมันดิบ

ค่าเฉลี่ยพื้นที่ได้กราฟ

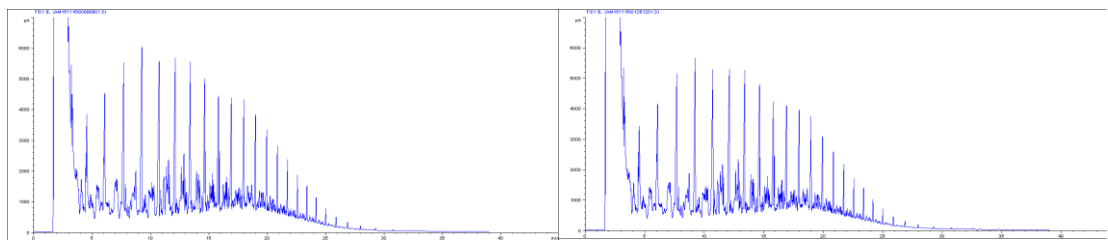


รูปที่ ง-1 กราฟมาตรฐานของน้ำมันดิบในช่วงความเข้มข้น 20,000 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 100,000 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD Method)



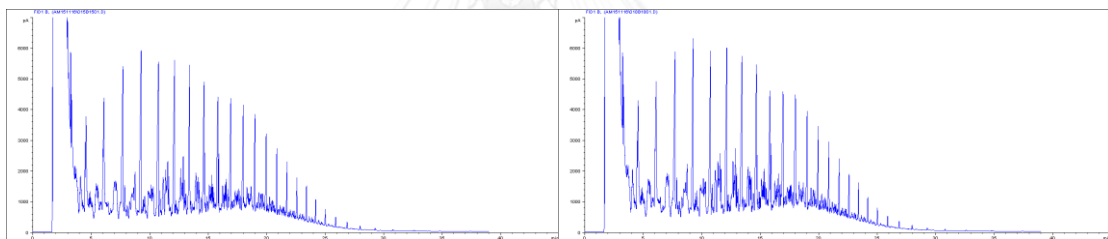
(ก)

(ข)



(ค)

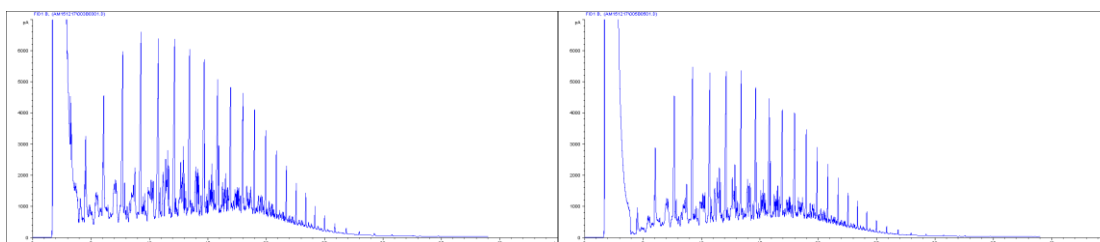
(ง)



(จ)

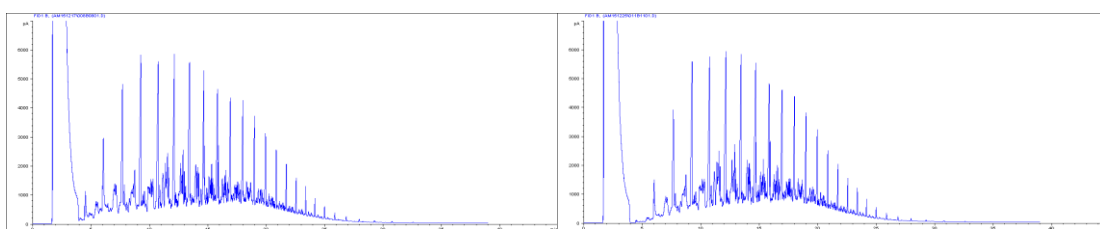
(ฉ)

รูปที่ ง-2 โครมาโทแกรมของการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ 6 จุด การทดลองและวิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method) (ก: ชุด A: Abiotic control ข: ชุด B: Natural attenuation ค: ชุด C: Bioaugmentation ง: ชุด D: Biostimulation จ: ชุด E: Dispersant ฉ: ชุด F: Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) วันที่ 0



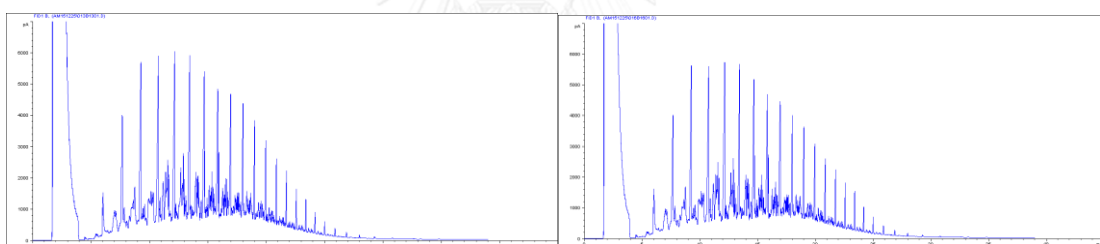
(ก)

(ข)



(ค)

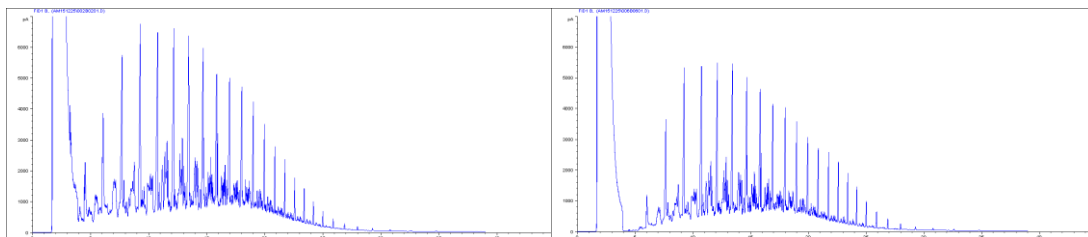
(ง)



(จ)

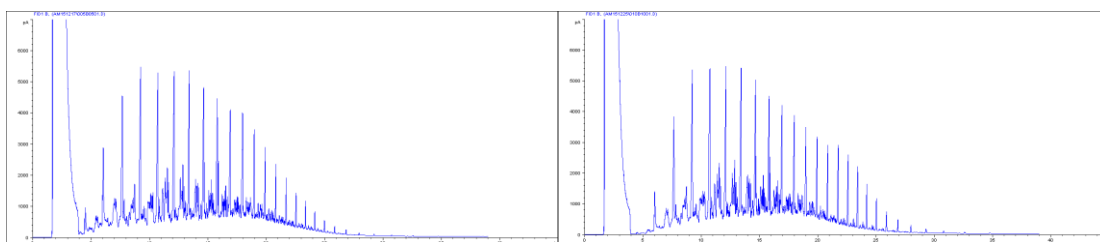
(ฉ)

**รูปที่ ง-3** โครมาโทแกรมของการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ 6 ชุด การทดลองและวิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method) (ก: ชุด A: Abiotic control  
ข: ชุด B: Natural attenuation ค: ชุด C: Bioaugmentation ง: ชุด D: Biostimulation  
จ: ชุด E: Dispersant ฉ: F: Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant)  
วันที่ 20



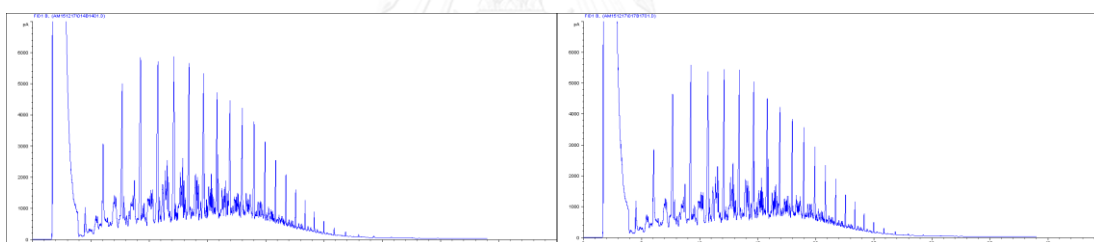
(ก)

(ข)



(ค)

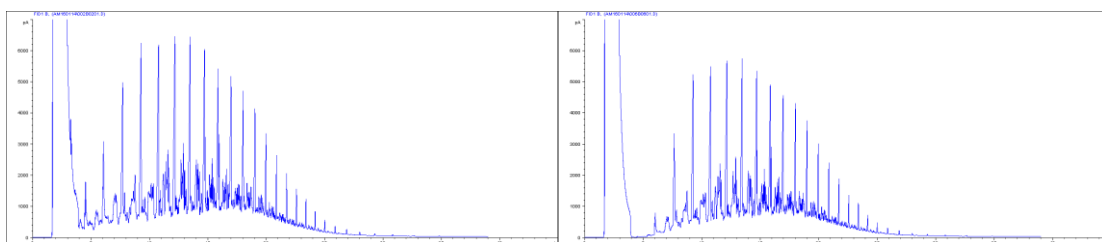
(ง)



(จ)

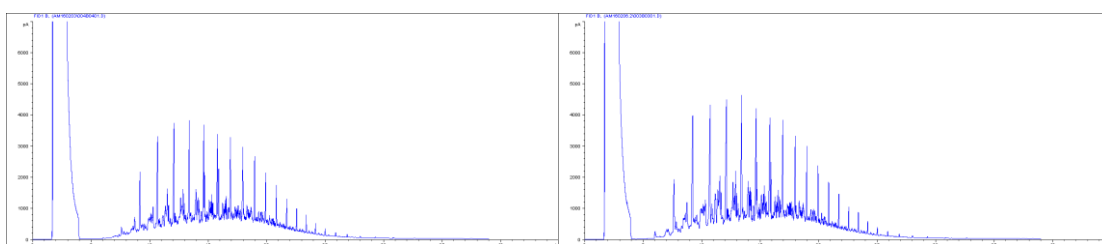
(ฉ)

**รูปที่ ง-4** โครมาโทแกรมของการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายน้ำมันดิบ 6 ชุด การทดลองและวิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method) (ก: ชุด A: Abiotic control ข: ชุด B: Natural attenuation ค: ชุด C: Bioaugmentation ง: ชุด D: Biostimulation จ: ชุด E: Dispersant ฉ: ชุด F: Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) วันที่ 40



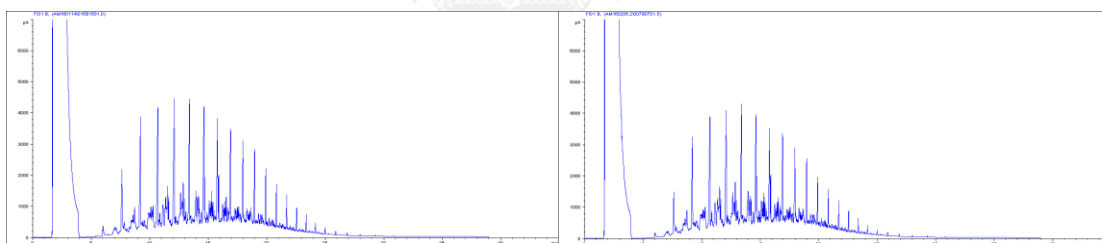
(ก)

(ข)



(ค)

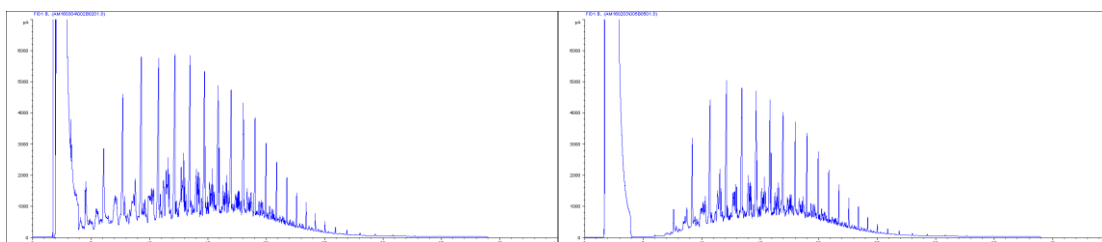
(ง)



(จ)

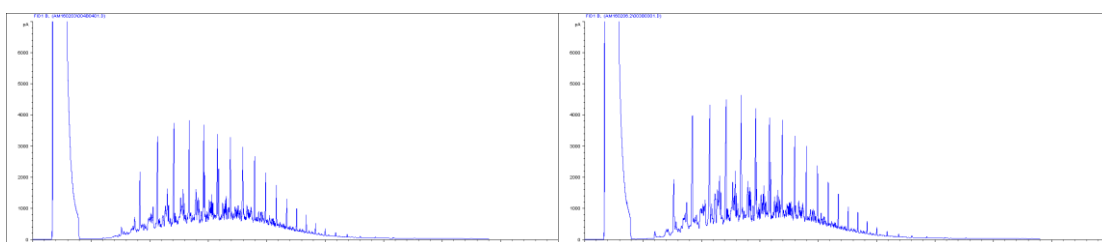
(ฉ)

**รูปที่ ง-5** โครมาโทแกรมของการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายน้ำมันดิบ 6 จุด การทดลองและวิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method) (ก: ชุด A: Abiotic control ข: ชุด B: Natural attenuation ค: ชุด C: Bioaugmentation ง: ชุด D: Biostimulation จ: ชุด E: Dispersant ฉ: F: Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) วันที่ 60



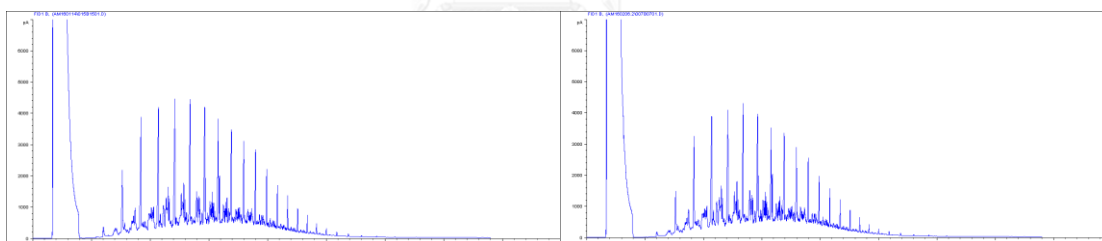
(ก)

(ข)



(ค)

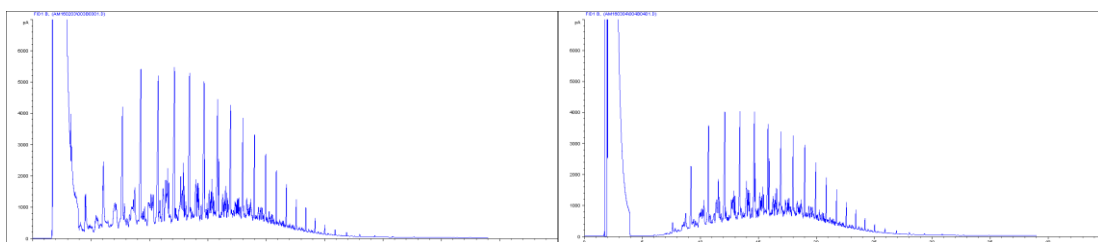
(ง)



(จ)

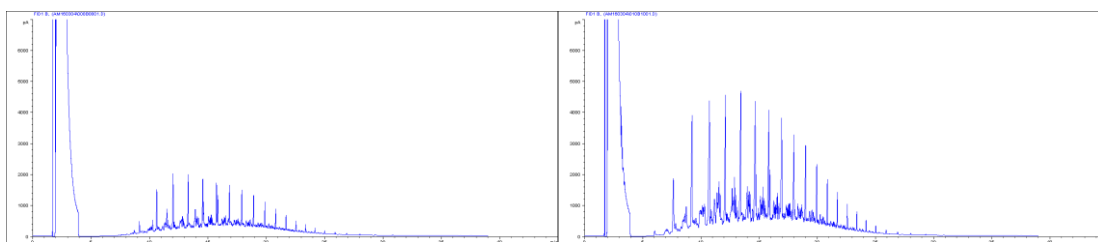
(ฉ)

**รูปที่ ง-6** โครมาโทแกรมของการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ 6 จุด การทดลองและวิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method) (ก: ชุด A: Abiotic control  
ข: ชุด B: Natural attenuation ค: ชุดC: Bioaugmentation ง: ชุด D: Biostimulation  
จ: ชุด E: Dispersant ฉ: F: Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant)  
วันที่ 80



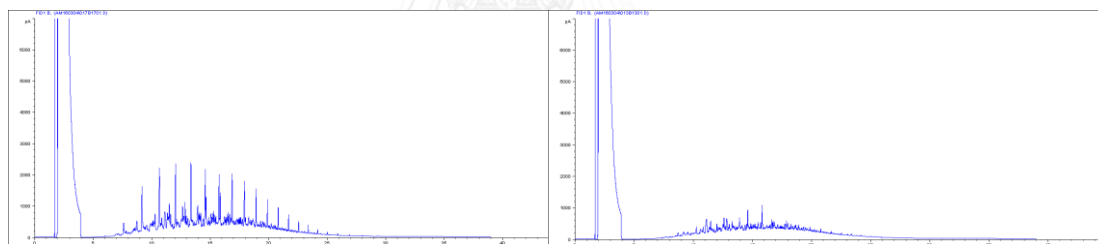
(ก)

(ข)



(ค)

(ง)



(จ)

(ฉ)

**รูปที่ ง-7** โครมาโทแกรมของการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ 6 ชุด การทดลองและวิเคราะห์โดย GC-FID (OILSTD method) (ก: ชุด A: Abiotic control ข: ชุด B: Natural attenuation ค: ชุดC: Bioaugmentation ง: ชุด D: Biostimulation จ: ชุด E: Dispersant ฉ: F: Bioaugmentation + Biostimulation + Dispersant) วันที่ 100



Scheffe

(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	23.18837	2.15891	.001	13.0767	33.3000
	C	23.04837	2.15891	.001	12.9367	33.1600
	D	21.93837	2.15891	.001	11.8267	32.0500
	E	19.63337	2.15891	.002	9.5217	29.7450
	F	21.91352	2.15891	.001	11.8019	32.0252
B	A	-23.18837	2.15891	.001	-33.3000	-13.0767
	C	-.14000	2.15891	1.000	-10.2516	9.9716
	D	-1.25000	2.15891	.995	-11.3616	8.8616
	E	-3.55500	2.15891	.741	-13.6666	6.5566
	F	-1.27485	2.15891	.995	-11.3865	8.8368
C	A	-23.04837	2.15891	.001	-33.1600	-12.9367
	B	.14000	2.15891	1.000	-9.9716	10.2516
	D	-1.11000	2.15891	.997	-11.2216	9.0016
	E	-3.41500	2.15891	.768	-13.5266	6.6966
	F	-1.13485	2.15891	.997	-11.2465	8.9768
D	A	-21.93837	2.15891	.001	-32.0500	-11.8267
	B	1.25000	2.15891	.995	-8.8616	11.3616
	C	1.11000	2.15891	.997	-9.0016	11.2216
	E	-2.30500	2.15891	.937	-12.4166	7.8066
	F	-.02485	2.15891	1.000	-10.1365	10.0868
E	A	-19.63337	2.15891	.002	-29.7450	-9.5217
	B	3.55500	2.15891	.741	-6.5566	13.6666
	C	3.41500	2.15891	.768	-6.6966	13.5266
	D	2.30500	2.15891	.937	-7.8066	12.4166
	F	2.28015	2.15891	.939	-7.8315	12.3918
F	A	-21.91352	2.15891	.001	-32.0252	-11.8019
	B	1.27485	2.15891	.995	-8.8368	11.3865
	C	1.13485	2.15891	.997	-8.9768	11.2465
	D	.02485	2.15891	1.000	-10.0868	10.1365
	E	-2.28015	2.15891	.939	-12.3918	7.8315

\* หมายเหตุ: ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ ง-1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ระหว่างทุกชุดการทดลองในวันที่ 20 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Scheffe

(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	20.46223	6.24646	.190	-8.7942	49.7186
	C	18.75238	6.24646	.247	-10.5040	48.0088
	D	29.37781	6.24646	.049	.1214	58.6342
	E	21.03517	6.24646	.174	-8.2212	50.2916
	F	34.10358	6.24646	.025	4.8472	63.3600
B	A	-20.46223	6.24646	.190	-49.7186	8.7942
	C	-1.70984	6.24646	1.000	-30.9663	27.5466
	D	8.91558	6.24646	.828	-20.3408	38.1720
	E	.57294	6.24646	1.000	-28.6835	29.8294
	F	13.64135	6.24646	.510	-15.6151	42.8978
C	A	-18.75238	6.24646	.247	-48.0088	10.5040
	B	1.70984	6.24646	1.000	-27.5466	30.9663
	D	10.62543	6.24646	.718	-18.6310	39.8818
	E	2.28279	6.24646	.999	-26.9736	31.5392
	F	15.35119	6.24646	.406	-13.9052	44.6076
D	A	-29.37781	6.24646	.049	-58.6342	-.1214
	B	-8.91558	6.24646	.828	-38.1720	20.3408
	C	-10.62543	6.24646	.718	-39.8818	18.6310
	E	-8.34264	6.24646	.861	-37.5991	20.9138
	F	4.72577	6.24646	.984	-24.5307	33.9822
E	A	-21.03517	6.24646	.174	-50.2916	8.2212
	B	-.57294	6.24646	1.000	-29.8294	28.6835
	C	-2.28279	6.24646	.999	-31.5392	26.9736
	D	8.34264	6.24646	.861	-20.9138	37.5991
	F	13.06841	6.24646	.548	-16.1880	42.3248
F	A	-34.10358	6.24646	.025	-63.3600	-4.8472
	B	-13.64135	6.24646	.510	-42.8978	15.6151
	C	-15.35119	6.24646	.406	-44.6076	13.9052
	D	-4.72577	6.24646	.984	-33.9822	24.5307
	E	-13.06841	6.24646	.548	-42.3248	16.1880

\* หมายเหตุ: ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ ง-2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ระหว่างทุกชุดการทดลองในวันที่ 40 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Scheffe

(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	13.17199	5.54202	.435	-12.7851	39.1291
	C	19.40167	5.54202	.153	-6.5554	45.3587
	D	31.61188	5.54202	.021	5.6548	57.5689
	E	36.60540	5.54202	.010	10.6483	62.5625
	F	31.91615	5.54202	.020	5.9591	57.8732
B	A	-13.17199	5.54202	.435	-39.1291	12.7851
	C	6.22968	5.54202	.924	-19.7274	32.1867
	D	18.43989	5.54202	.181	-7.5172	44.3970
	E	23.43341	5.54202	.076	-2.5237	49.3905
	F	18.74416	5.54202	.171	-7.2129	44.7012
C	A	-19.40167	5.54202	.153	-45.3587	6.5554
	B	-6.22968	5.54202	.924	-32.1867	19.7274
	D	12.21021	5.54202	.503	-13.7469	38.1673
	E	17.20373	5.54202	.224	-8.7533	43.1608
	F	12.51448	5.54202	.481	-13.4426	38.4715
D	A	-31.61188	5.54202	.021	-57.5689	-5.6548
	B	-18.43989	5.54202	.181	-44.3970	7.5172
	C	-12.21021	5.54202	.503	-38.1673	13.7469
	E	4.99352	5.54202	.968	-20.9635	30.9506
	F	30.427	5.54202	1.000	-25.6528	26.2613
E	A	-36.60540	5.54202	.010	-62.5625	-10.6483
	B	-23.43341	5.54202	.076	-49.3905	2.5237
	C	-17.20373	5.54202	.224	-43.1608	8.7533
	D	-4.99352	5.54202	.968	-30.9506	20.9635
	F	-4.68925	5.54202	.975	-30.6463	21.2678
F	A	-31.91615	5.54202	.020	-57.8732	-5.9591
	B	-18.74416	5.54202	.171	-44.7012	7.2129
	C	-12.51448	5.54202	.481	-38.4715	13.4426
	D	-30.427	5.54202	1.000	-26.2613	25.6528
	E	4.68925	5.54202	.975	-21.2678	30.6463

\* หมายเหตุ: ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ ง-3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ระหว่างทุกชุดการทดลองในวันที่ 60 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Scheffe

(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	21.39946	10.77527	.594	-29.0685	71.8674
	C	36.22733	10.77527	.175	-14.2406	86.6953
	D	23.86834	10.77527	.498	-26.5996	74.3363
	E	30.68489	10.77527	.285	-19.7830	81.1528
	F	41.33958	10.77527	.111	-9.1284	91.8075
B	A	-21.39946	10.77527	.594	-71.8674	29.0685
	C	14.82787	10.77527	.847	-35.6401	65.2958
	D	2.46889	10.77527	1.000	-47.9990	52.9368
	E	9.28543	10.77527	.973	-41.1825	59.7534
	F	19.94012	10.77527	.653	-30.5278	70.4080
C	A	-36.22733	10.77527	.175	-86.6953	14.2406
	B	-14.82787	10.77527	.847	-65.2958	35.6401
	D	-12.35899	10.77527	.918	-62.8269	38.1089
	E	-5.54244	10.77527	.997	-56.0104	44.9255
	F	5.11225	10.77527	.998	-45.3557	55.5802
D	A	-23.86834	10.77527	.498	-74.3363	26.5996
	B	-2.46889	10.77527	1.000	-52.9368	47.9990
	C	12.35899	10.77527	.918	-38.1089	62.8269
	E	6.81654	10.77527	.993	-43.6514	57.2845
	F	17.47123	10.77527	.751	-32.9967	67.9392
E	A	-30.68489	10.77527	.285	-81.1528	19.7830
	B	-9.28543	10.77527	.973	-59.7534	41.1825
	C	5.54244	10.77527	.997	-44.9255	56.0104
	D	-6.81654	10.77527	.993	-57.2845	43.6514
	F	10.65469	10.77527	.953	-39.8132	61.1226
F	A	-41.33958	10.77527	.111	-91.8075	9.1284
	B	-19.94012	10.77527	.653	-70.4080	30.5278
	C	-5.11225	10.77527	.998	-55.5802	45.3557
	D	-17.47123	10.77527	.751	-67.9392	32.9967
	E	-10.65469	10.77527	.953	-61.1226	39.8132

\* หมายเหตุ: ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ ง-4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ระหว่างทุกชุดการทดลองในวันที่ 80 โดยใช้โปรแกรม SPSS

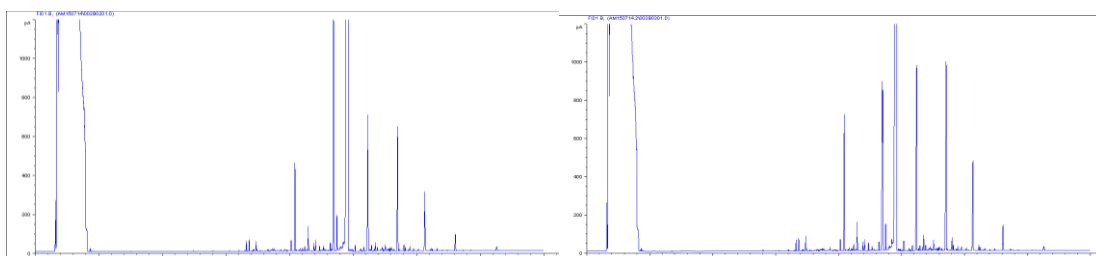
Scheffe

(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	20.20764	12.64032	.761	-38.9956	79.4109
	C	39.59917	12.64032	.218	-19.6041	98.8024
	D	20.43734	12.64032	.753	-38.7659	79.6406
	E	37.04319	12.64032	.264	-22.1601	96.2464
	F	41.75738	12.64032	.185	-17.4459	100.9606
B	A	-20.20764	12.64032	.761	-79.4109	38.9956
	C	19.39153	12.64032	.787	-39.8117	78.5948
	D	22970	12.64032	1.000	-58.9735	59.4330
	E	16.83555	12.64032	.862	-42.3677	76.0388
	F	21.54974	12.64032	.716	-37.6535	80.7530
C	A	-39.59917	12.64032	.218	-98.8024	19.6041
	B	-19.39153	12.64032	.787	-78.5948	39.8117
	D	-19.16183	12.64032	.794	-78.3651	40.0414
	E	2.55599	12.64032	1.000	-61.7592	56.6473
	F	2.15820	12.64032	1.000	-57.0450	61.3615
D	A	-20.43734	12.64032	.753	-79.6406	38.7659
	B	-22970	12.64032	1.000	-59.4330	58.9735
	C	19.16183	12.64032	.794	-40.0414	78.3651
	E	16.60584	12.64032	.868	-42.5974	75.8091
	F	21.32003	12.64032	.724	-37.8832	80.5233
E	A	-37.04319	12.64032	.264	-96.2464	22.1601
	B	-16.83555	12.64032	.862	-76.0388	42.3677
	C	2.55599	12.64032	1.000	-56.6473	61.7592
	D	-16.60584	12.64032	.868	-75.8091	42.5974
	F	4.71419	12.64032	.999	-54.4891	63.9174
F	A	-41.75738	12.64032	.185	-100.9606	17.4459
	B	-21.54974	12.64032	.716	-80.7530	37.6535
	C	-2.15820	12.64032	1.000	-61.3615	57.0450
	D	-21.32003	12.64032	.724	-80.5233	37.8832
	E	-4.71419	12.64032	.999	-63.9174	54.4891

\* หมายเหตุ: ระดับนัยสำคัญ 0.05

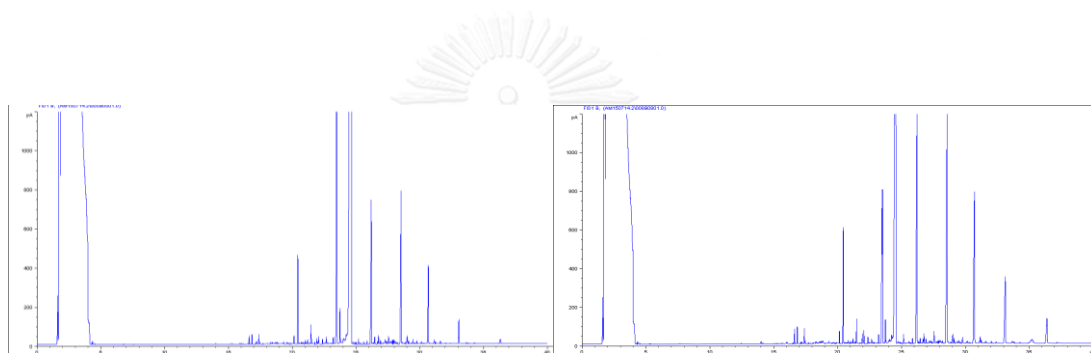
ตารางที่ ง-5 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ระหว่างทุกชุดการทดลองในวันที่ 100 โดยใช้โปรแกรม SPSS

ภาคผนวก จ ผลวิเคราะห์ตัวอย่างดินเบื้องต้นโดย GC-FID



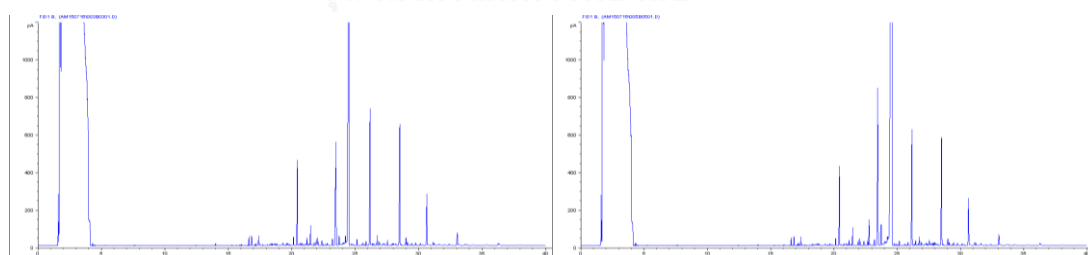
(ก)

(ข)



(ค)

(ง)

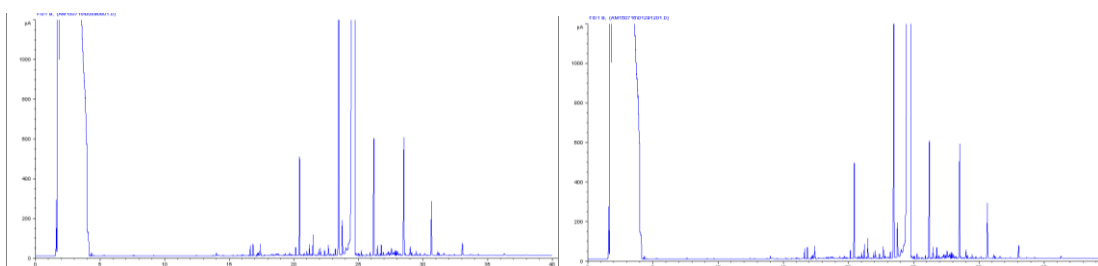


(จ)

(ฉ)

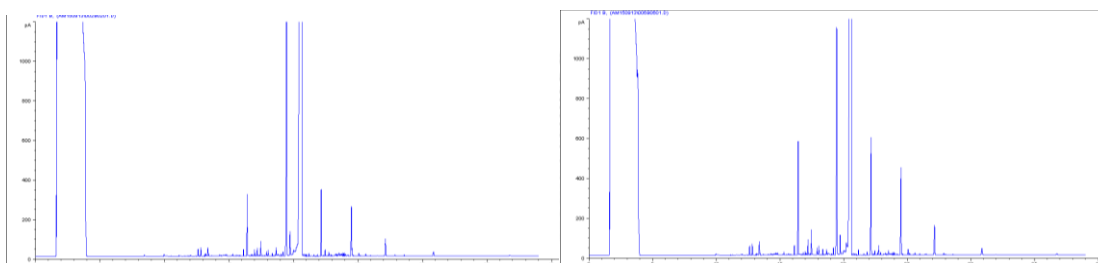
รูปที่ จ-1 โครมาโทแกรมของวิเคราะห์ตัวอย่างดินเบื้องต้นโดย GC-FID (OILSTD method)

(ก: CT1-W1 ข: CT1-M1 ค: CT2-W1 ง: CT2-M1 จ: CR1-W1 ฉ: CR1-M1)



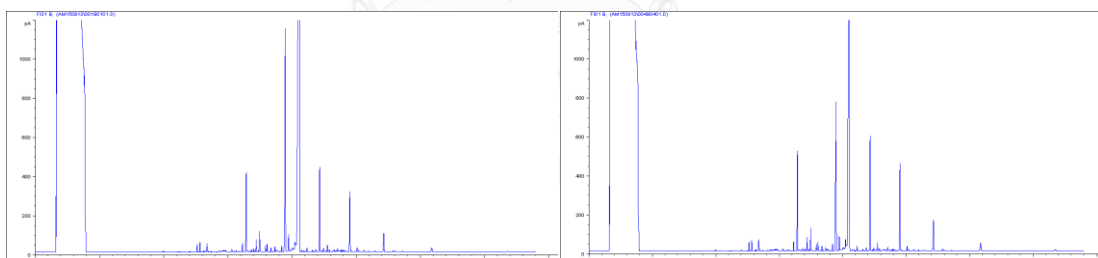
(จ)

(ข)



(ฉ)

(ญ)



(ฎ)

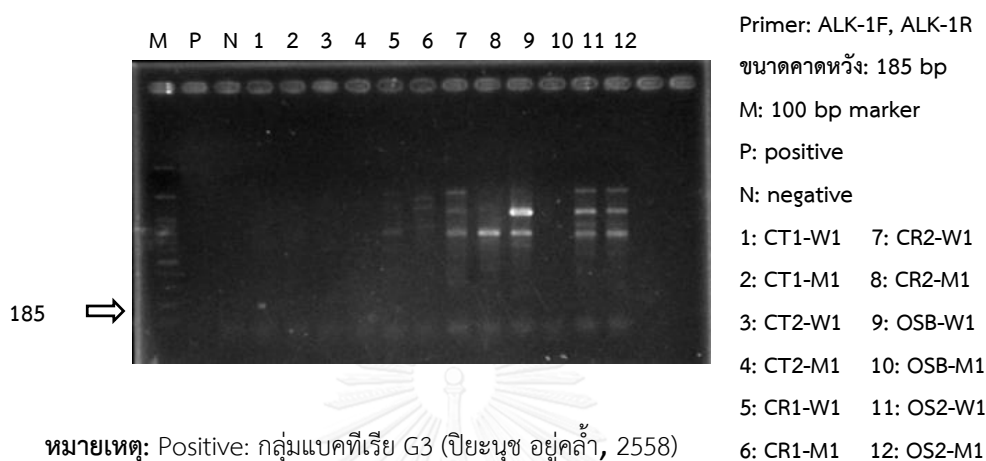
(ฏ)

รูปที่ จ-2 โครมาโทแกรมของวิเคราะห์ตัวอย่างดินเบื้องต้นโดย GC-FID (OILSTD method) (ต่อ)

(ช: CR2-W1 ช: CR2-M1 ฉ: OSB-W1 ญ: OSB-M1 ฎ: OS2-W1 ฏ: OS2M1)

## ภาคผนวก ฉ รูปเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

### ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของตัวอย่างดิน



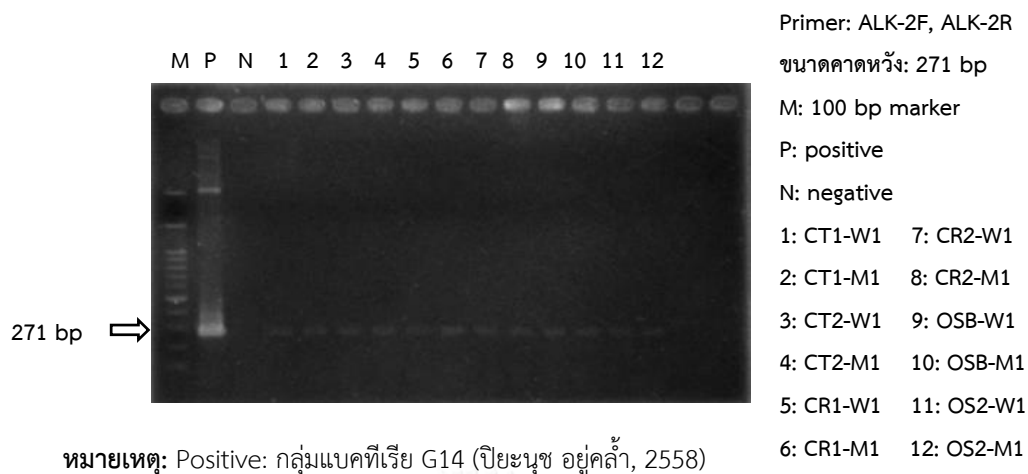
### รูปที่ ฉ-1 ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ด้วยไพรเมอร์ ALK1 ของตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน

#### หมายเหตุ:

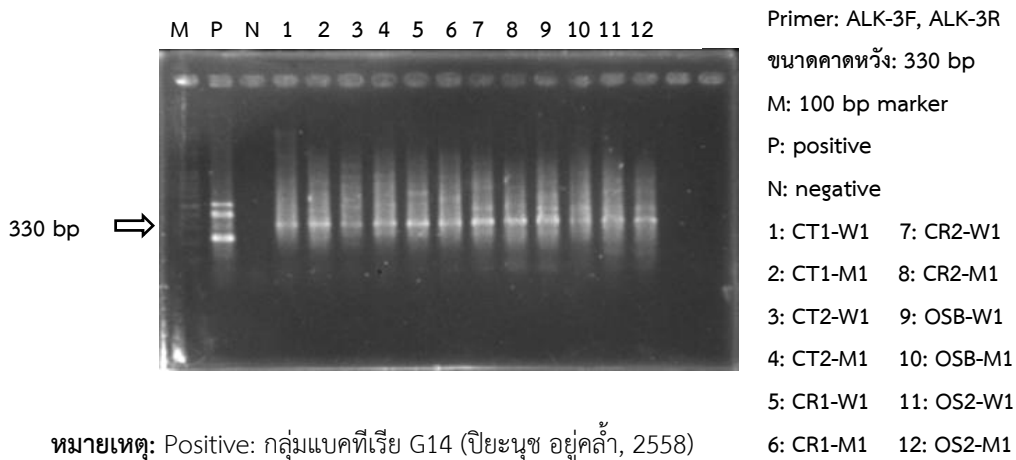
#### รหัสตัวอย่าง

- CT1-W1: ดินชายฝั่งในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์  
 CT1-M1: ดินชายฝั่งในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน  
 CT2-W1: ดินชายฝั่งในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์  
 CT2-M1: ดินชายฝั่งในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน  
 CR1-W1: ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์  
 CR1-M1: ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน  
 CR2-W1: ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์  
 CR2-M1: ดินตะกอนแนวปะการังในบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน  
 OSB-W1: ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์  
 OSB-M1: ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน  
 OS2-W1: ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 สัปดาห์  
 OS2-M1: ดินตะกอนในทะเลบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน

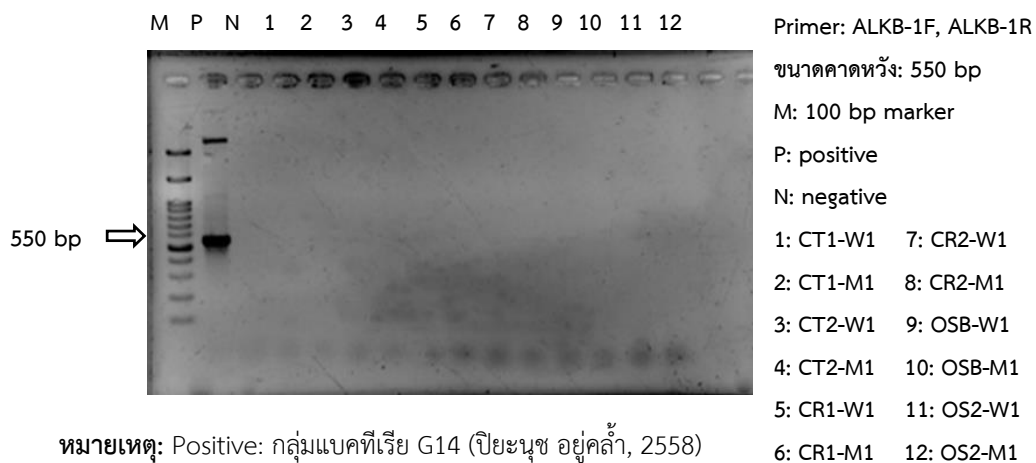




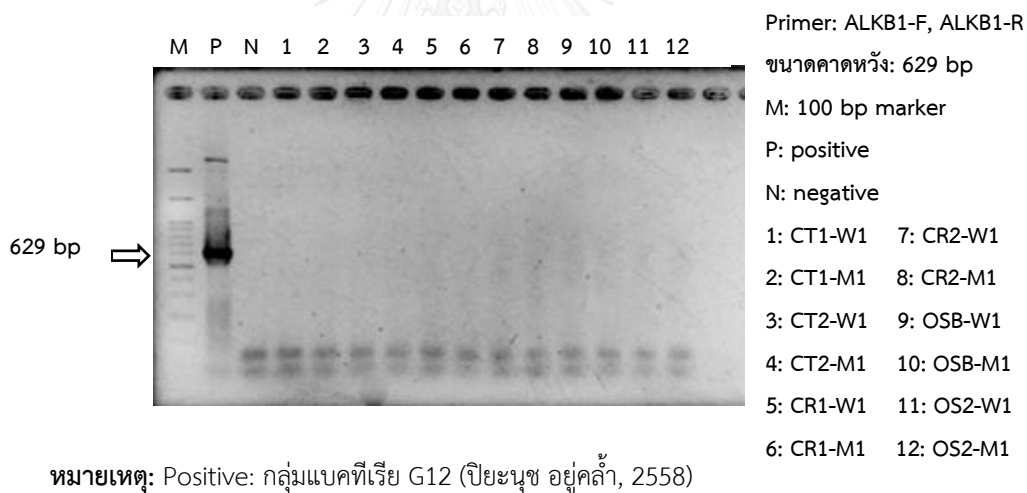
รูปที่ ฉ-2 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ALK2 ของตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน



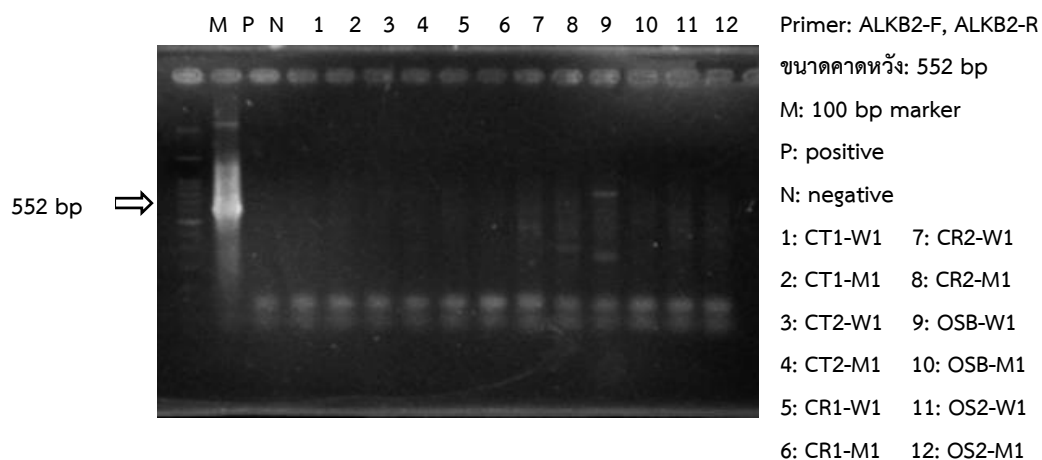
รูปที่ ฉ-3 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ALK3 ของตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน



รูปที่ ฉ-4 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ALKB-1 ของตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน

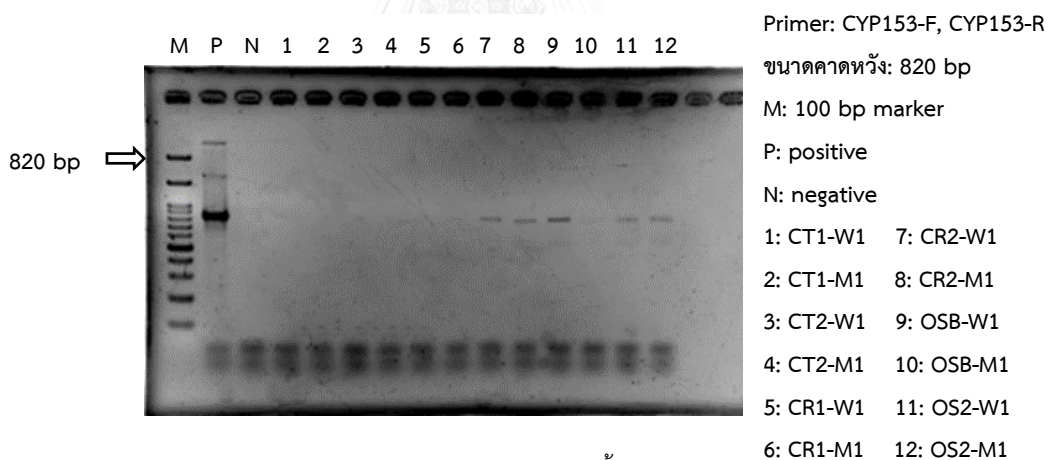


รูปที่ ฉ-5 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ALKB1 ของตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน



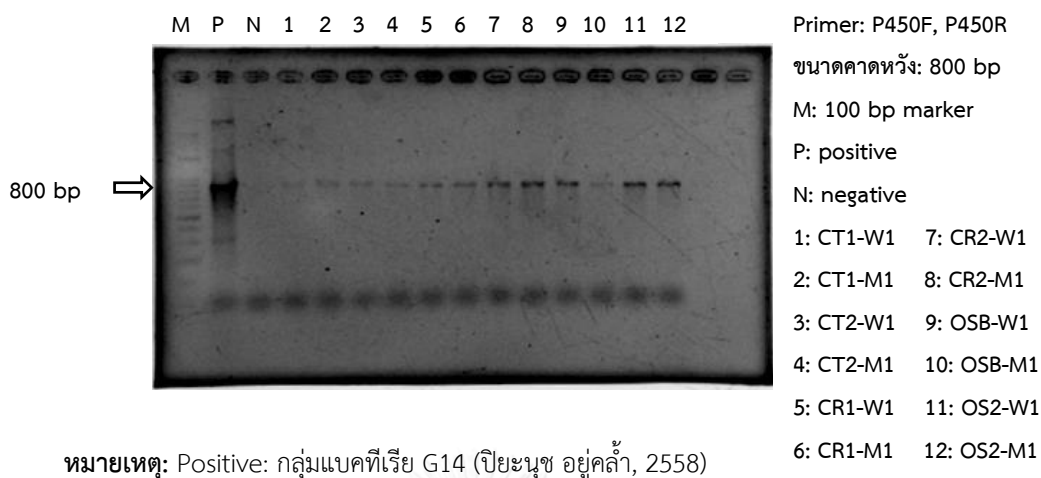
หมายเหตุ: Positive: กลุ่มแบคทีเรีย G12 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)

รูปที่ ๖-6 ผลิตรหัสบาร์โค้ดของพอลิเมอร์เรส ด้วยไพรเมอร์ ALKB2 ของตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน

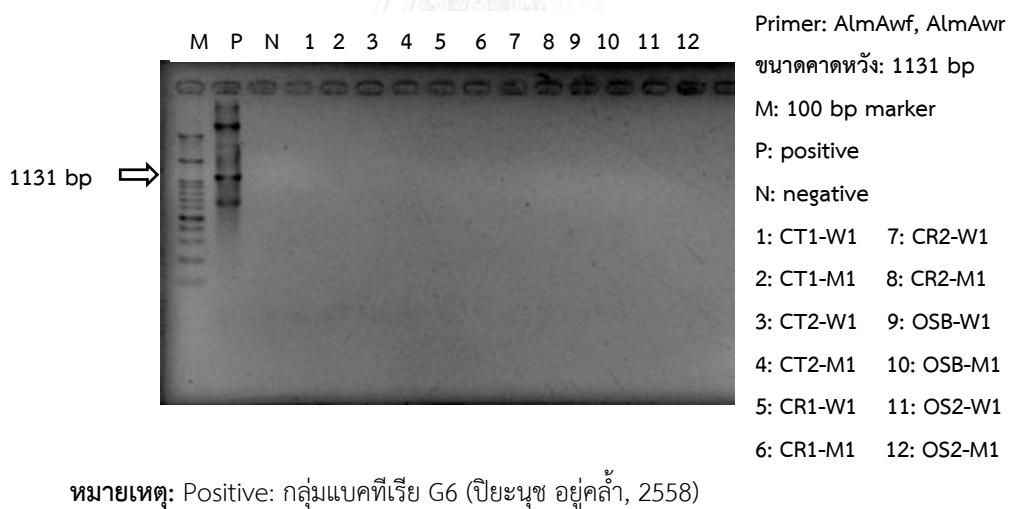


หมายเหตุ: Positive: กลุ่มแบคทีเรีย G3 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)

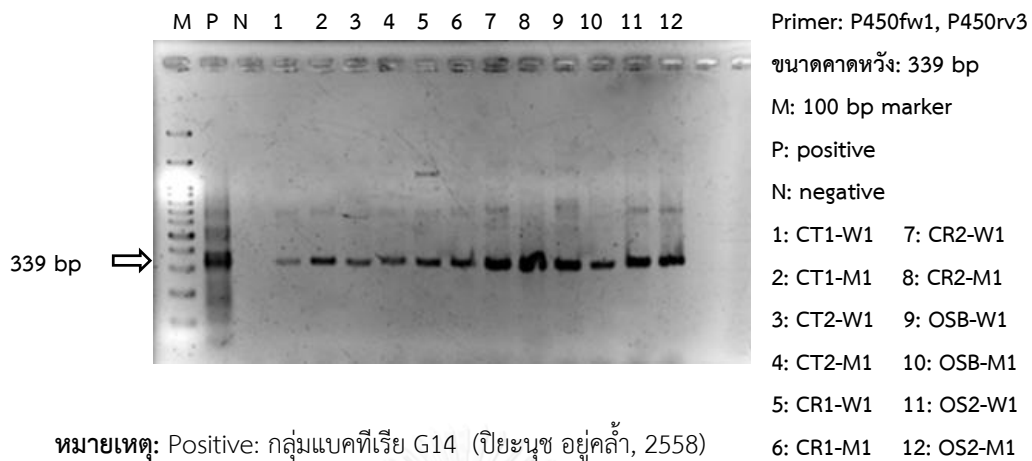
รูปที่ ๖-7 ผลิตรหัสบาร์โค้ดของพอลิเมอร์เรส ด้วยไพรเมอร์ CYP153 ของตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน



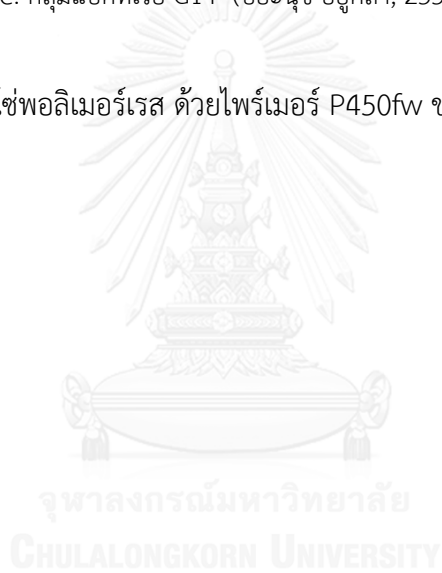
รูปที่ ๘-8 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ P450 ของตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน



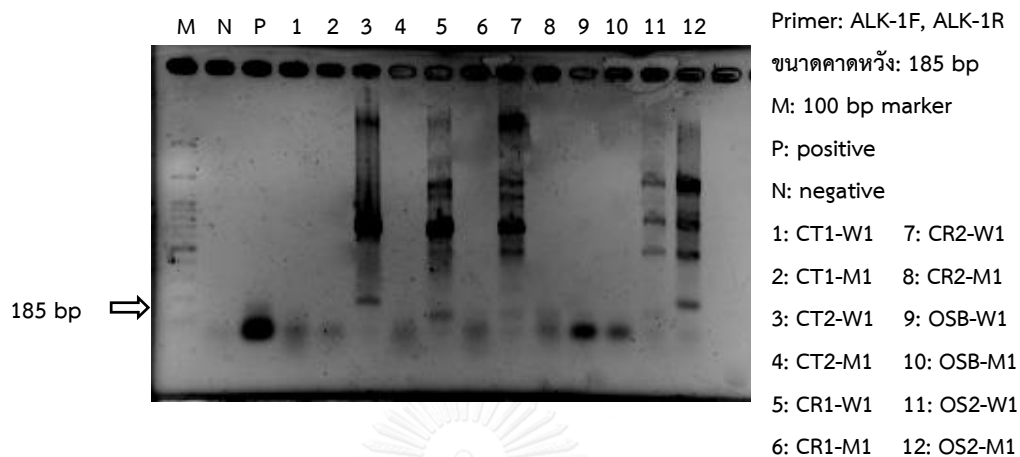
รูปที่ ๘-9 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ AlmAw ของตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน



รูปที่ ฉ-10 ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ด้วยไพรเมอร์ P450fw ของตัวอย่างดินชายฝั่ง/ดินตะกอน

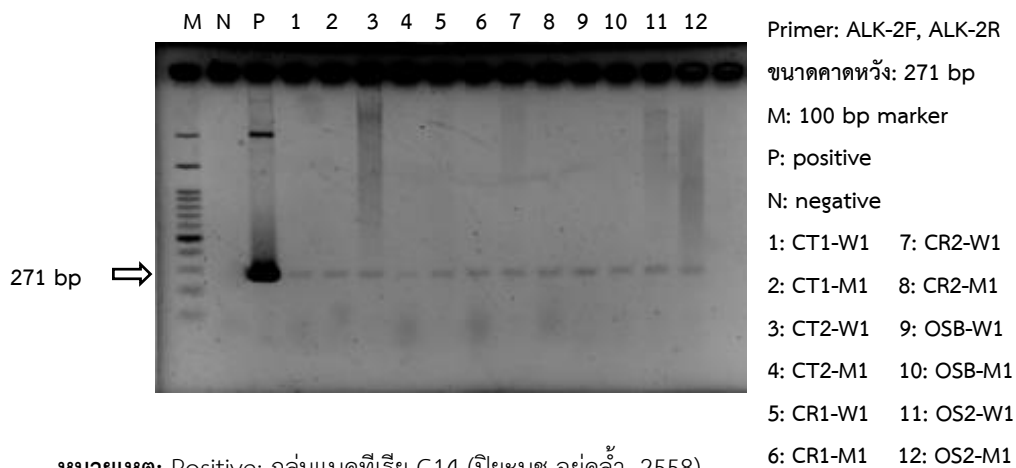


ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรีย



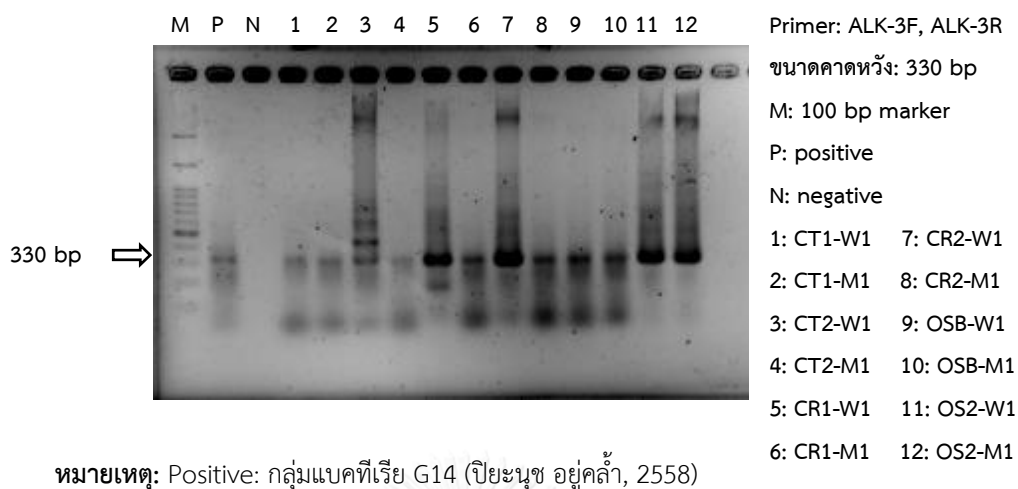
หมายเหตุ: Positive: กลุ่มแบคทีเรีย G3 (ปิยะนุช อยู่กล้า, 2558)

รูปที่ ฉ-11 ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ด้วยไพรเมอร์ ALK1 ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม

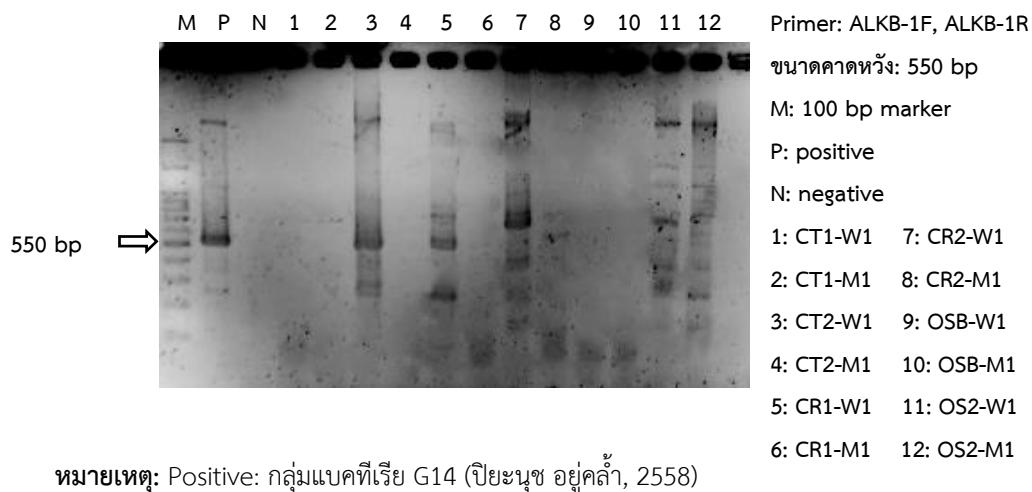


หมายเหตุ: Positive: กลุ่มแบคทีเรีย G14 (ปิยะนุช อยู่กล้า, 2558)

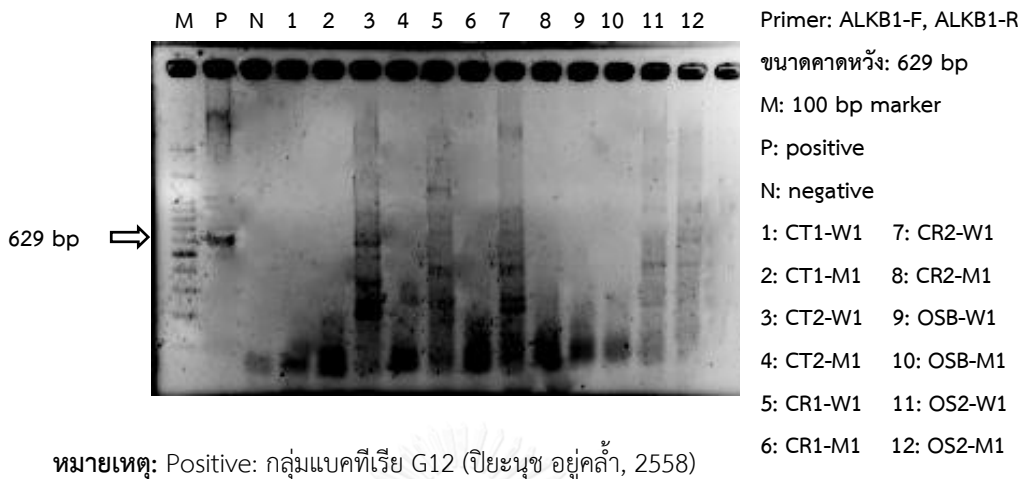
รูปที่ ฉ-12 ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ด้วยไพรเมอร์ ALK2 ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม



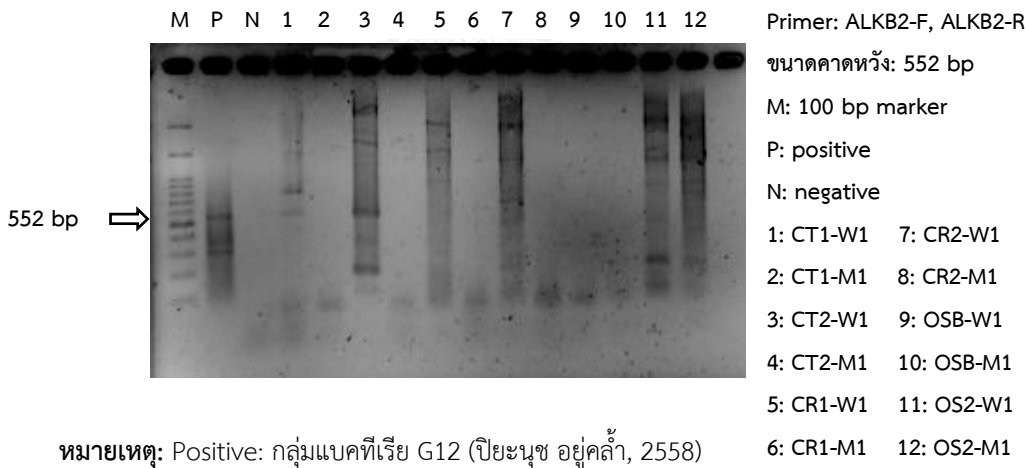
รูปที่ ฉ-13 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ALK3 ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม



รูปที่ ฉ-14 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ALKB-1 ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม

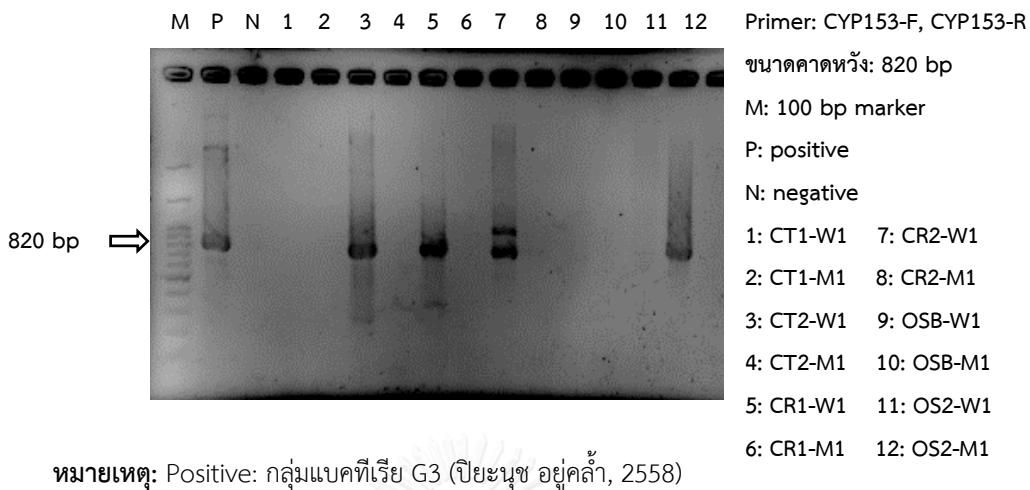


รูปที่ ฉ-15 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ALKB1 ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม

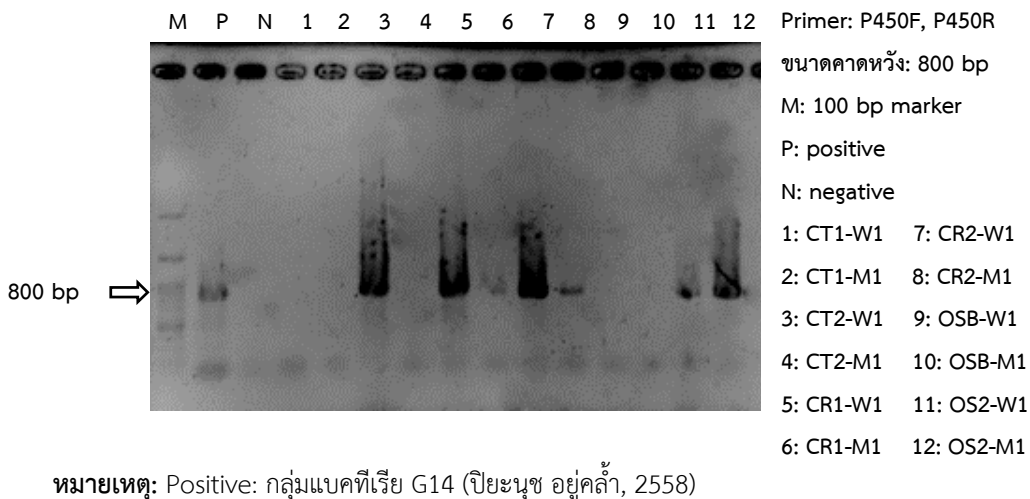


รูปที่ ฉ-16 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ALKB2 ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม

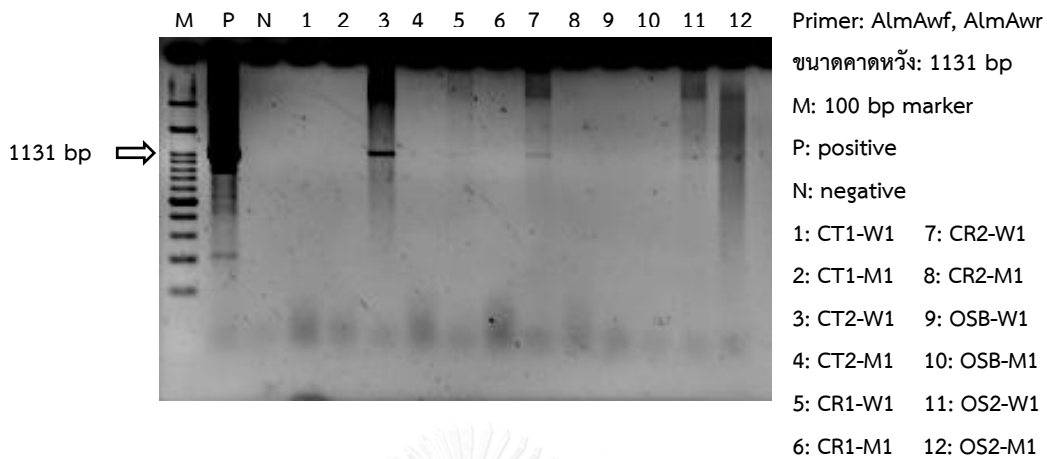




รูปที่ ๑-17 ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ด้วยไพรเมอร์ CYP153 ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม

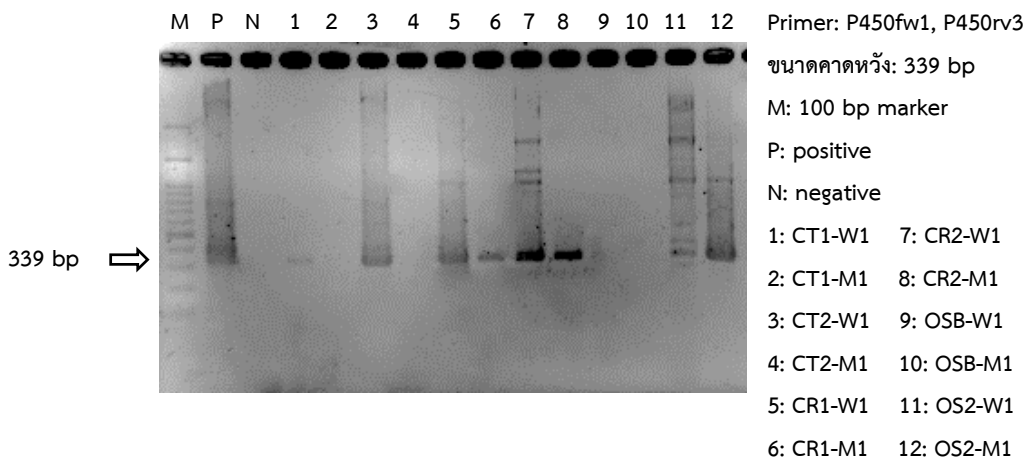


รูปที่ ๑-18 ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ด้วยไพรเมอร์ P450 ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม



หมายเหตุ: Positive: กลุ่มแบคทีเรีย G6 (ปิยะนุช อยู่กล้า, 2558)

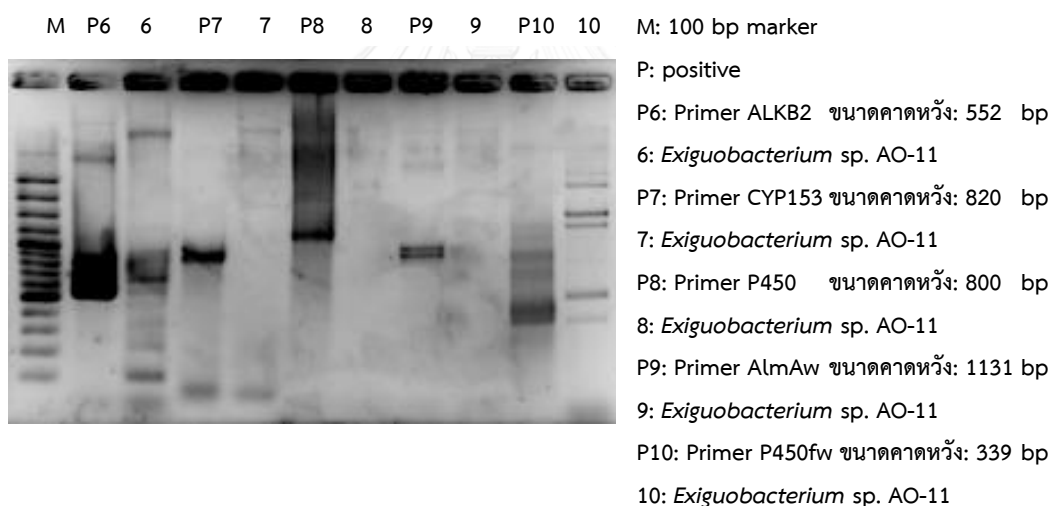
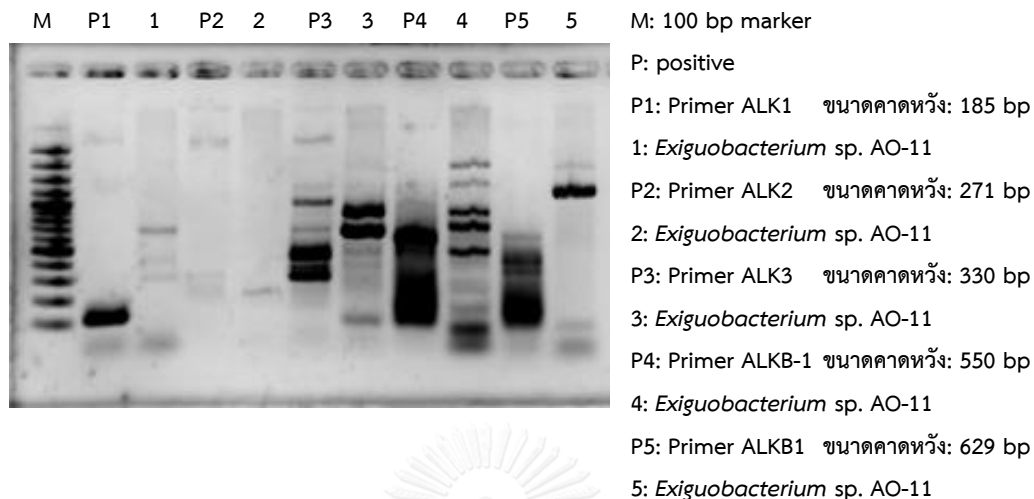
รูปที่ ฉ-19 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ AlmAw ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม



หมายเหตุ: Positive: กลุ่มแบคทีเรีย G14 (ปิยะนุช อยู่กล้า, 2558)

รูปที่ ฉ-20 ผลิตรหัสดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ P450fw ของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม

## ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Exiguobacterium* sp. AO-11



### หมายเหตุ:

- Positive ALK1: กลุ่มแบคทีเรีย G3 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)
- Positive ALK2: กลุ่มแบคทีเรีย G14 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)
- Positive ALK3: กลุ่มแบคทีเรีย G14 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)
- Positive ALKB-1: กลุ่มแบคทีเรีย 14 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)
- Positive ALKB1: กลุ่มแบคทีเรีย G12 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)
- Positive ALKB2: กลุ่มแบคทีเรีย G12 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)
- Positive CYP153: กลุ่มแบคทีเรีย G3 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)
- Positive P450: กลุ่มแบคทีเรีย G14 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)
- Positive AlmAw: กลุ่มแบคทีเรีย G6 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)
- Positive P40fw: กลุ่มแบคทีเรีย G14 (ปิยะนุช อยู่คล้า, 2558)

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวผดุงขวัญ ศรีสุวรรณภาพ เกิดเมื่อวันที่ 29 ธันวาคม พ.ศ. 2531 สำเร็จการศึกษา  
ระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี  
พ.ศ. 2554 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา  
วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีพ.ศ. 2557

