

การบำบัดเชิงชีวภาพของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลชายฝั่งโดย
แบคทีเรียตรึงบนโพลิเมอร์

นางสาวจิรภัทร จันทมาลี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



BIOREMEDIATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS CONTAMINATED IN COASTAL
SEAWATER BY POLYURETHANE FOAM-IMMOBILIZED BACTERIA

Miss Jirapat Chanthamalee

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

จิรภัทร จันทมาลี : การบำบัดเชิงชีวภาพของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล
 ชายฝั่งโดยแบคทีเรียตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน. (BIOREMEDIATION OF PETROLEUM
 HYDROCARBONS CONTAMINATED IN COASTAL SEAWATER BY POLYURETHANE
 FOAM-IMMOBILIZED BACTERIA) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย
 , 189 หน้า.

ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเป็นสารก่อมลพิษที่สำคัญในเขตชายฝั่งทะเล ซึ่งเกิดจากการรั่วไหลของน้ำมัน
 ชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันดิบ และน้ำมันเตา หรือจากการปล่อยน้ำขังใต้ท้องเรือที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นลงสู่ทะเล จึง
 จำเป็นต้องมีผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันทางชีวภาพสำหรับใช้ลดปริมาณน้ำมันในพื้นที่ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์
 เพื่อพัฒนาวิธีทางชีวภาพสำหรับบำบัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล โดยได้ผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้จาก
 การตรึงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมัน โดยเฉพาะน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง ในขั้น
 แรกได้คัดแยกแบคทีเรียและยีสต์จำนวน 10 ไอโซเลท จากเขตชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก โดยใช้เทคนิคการเพิ่ม
 จำนวนเชื้อในอาหารที่เติมน้ำมันดิบ และศึกษาประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นชนิดต่างๆ แม้ว่าจุลินทรีย์ทุก
 สายพันธุ์เจริญโดยใช้น้ำมันดิบได้ แต่มีเพียงบางเชื้อที่สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นได้ดี ซึ่ง *Gordonia* sp. JC11 มี
 ประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นทั้งชนิดที่ใช้งานแล้ว และชนิดที่ยังไม่ได้ใช้งาน นอกจากนี้เชื้อ JC11
 สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีเมื่อใช้เทอร์อะเคนและพีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีสมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้ม
 เซลล์สูง (~80%) และทำให้น้ำมันแตกตัวเป็นอิมัลชันได้ดี (ส่วนตะกอนเซลล์มีค่า E_{254} ~ 32%) ซึ่งช่วยเพิ่ม
 ประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันและการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุตรึง การผลิตหัวเชื้อพร้อมใช้ทำโดยตรึงเซลล์ของเชื้อ
 JC11 บนโฟมพอลิยูรีเทน (PUF) แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือทั้ง
 ในระดับห้องปฏิบัติการและในพื้นที่จริง การทดสอบในระบบจำลองที่ไม่เติมสารอาหารพบว่าเซลล์ตรึงมี
 ประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อประจำถิ่นในน้ำขังใต้ท้องเรือ โดยประมาณ 48 และ 12% ของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วจาก
 เครื่องยนต์เรือประมงที่เข้มข้นเริ่มต้น 1,000 มก./ล. ถูกย่อยสลายโดย JC11 และเชื้อประจำถิ่น ตามลำดับ ต่อมา
 นำหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ชนิดนี้ไปใช้งานในห้องเครื่องยนต์ของเรือประมงขนาดเล็ก บริเวณท่าเรือประมงสิงห์
 อำนาจ จ. จันทบุรี โดยใช้ระยะเวลาทดสอบ 168 ชั่วโมง ทั้งนี้เรือประมงที่ใช้เป็นกรณีศึกษานี้มีการเติมน้ำมัน
 น้ำมันหล่อลื่นและน้ำมันดีเซลเพิ่มเกือบทุกวัน พบว่าปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บน PUF ที่ไม่ตรึงเซลล์ มีค่าสูงสุด
 เท่ากับ 25,967 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ปริมาณน้ำมันบนชั้นโฟมของเซลล์ตรึง (10^8
 MPN/กรัม PUF) มีค่าเพียง 15,127 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ปริมาณน้ำมันที่มีค่าต่ำกว่านี้แสดงถึงการย่อยสลาย
 น้ำมันโดยเชื้อ JC11 อย่างไรก็ตามภายหลัง 96 ชั่วโมง ปริมาณน้ำมันบนชั้นโฟมของเซลล์ตรึงมีค่าไม่แตกต่างจาก
 ชุดควบคุม PUF ซึ่งเกิดจากการลดจำนวนของ *Gordonia* sp. JC11 บนโฟม สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย
 SEM และ PCR-DGGE ที่พบว่า JC11 เป็นประชากรเด่นบน PUF เฉพาะในช่วงเวลา 96 ชั่วโมงแรก ดังนั้นสามารถ
 นำ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทนไปย่อยคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลได้ แต่ควรเปลี่ยน
 หัวเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทุกๆ 96 ชั่วโมง เพื่อให้สามารถบำบัดคราบน้ำมันได้อย่างต่อเนื่อง

ภาควิชา....จุลชีววิทยา.....
 สาขาวิชา....จุลชีววิทยา.....
 ปีการศึกษา.....2553.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

4973870623 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEYWORDS : PETROLEUM HYDROCARBONS / BILGE SEAWATER / *GORDONIA* /
IMMOBILIZATION / BIOAUGMENTATION

JIRAPAT CHANTHAMALEE : BIOREMEDIATION OF PETROLEUM
HYDROCARBONS CONTAMINATED IN COASTAL SEAWATER BY
POLYURETHANE FOAM-IMMOBILIZED BACTERIA. ADVISOR : ASST. PROF.
EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., 189 pp.

Petroleum hydrocarbon is a major pollutant of coastal regions that caused by spills of various oils such as crude and fuel oils or by discharges of bilge seawater containing lubricants into the sea. Therefore, effective bioremediation agents are required for oil removal *in situ*. This study aimed to develop a bioremediation technique for remediate petroleum hydrocarbons contaminated in seawater. A ready-to-use inoculum was made by immobilizing microorganisms that effectively degrade oil, especially fishing boat engine lubricants. At first, several marine bacteria and yeasts were isolated from the Eastern Thai coastal samples by crude oil enrichment culture techniques and characterized based on lubricating oils-degrading activity. Although all of the tested microorganisms were able to grow on crude oil, few strains demonstrated high ability to degrade lubricants. *Gordonia* sp. JC11, the most effective bacterium, was able to degrade various types of fresh and waste lubricants. In addition, the bacterium grew well on tetradecane and phenanthrene and possessed high cellular hydrophobicity (~80% MATH assay) and emulsifying activity (32% E_{24} of cell residues). These cellular properties are important for the stable attachment of cells onto immobilizing material and increasing oil degradation activity. To produce a ready-to-use inoculum, the bacterium was immobilized on polyurethane foam (PUF) and was tested as bioremediation agents for bilge seawater treatment both in laboratory and *in situ*. The microcosm test without additional nutrients showed that the immobilized cells had higher efficiency than indigenous bacteria, of which around 48% and 12% of the total hydrocarbons in 1,000 mg/L boat engine lubricant were removed by the immobilized bacteria and the indigenous microorganisms, respectively. The ready-to use inoculum was later applied inside an engine room of a small fishing boat at Singamnuy fishing pier, Chanthaburi for 168 h. During the test, more diesel oil and lubricant were applied to the case studied boat almost every day. The amount of oil in the uninoculated-PUF was highest at 25,967 mg oil/g PUF after 24 h, while PUF-immobilized cells (10^8 MPN/g PUF) contained 15,127 mg oil/g PUF. The lower amount of absorbed oil in the immobilized-PUF indicated that it was degraded by the immobilized bacteria. However, the oil content on the immobilized-PUF was not different from the uninoculated-PUF after 96 hr. This could be due to the decreasing number of *Gordonia* sp. JC11, which corresponded to SEM and PCR-DGGE analysis that showed JC11 as a dominant population on PUF only before 96 hr. In conclusion, JC11 immobilized-PUF could be used to degrade lubricants in bilge seawater, however the immobilized-PUF should be replaced every 96 hr to maintain the oil removal efficiency.

Department : Microbiology..... Student's Signature

Field of Study : Microbiology..... Advisor's Signature

Academic Year : 2010.....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้ความรู้ โอกาส คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี นอกจากนี้ยังให้คำสอนและทัศนคติที่มีคุณค่า ซึ่งสามารถนำไปปรับใช้ได้ในการประกอบอาชีพและการดำเนินชีวิต

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีรยวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ และได้ให้ข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิญญาคง อาจารย์ ดร. ตะวัน ลิมปิยากร และอาจารย์ ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบและตรวจแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิญญาคง ที่ได้ช่วยสอนเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลแก่ข้าพเจ้าในช่วงต้นของการทำวิจัย ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณแหล่งเงินทุนสนับสนุนสำหรับดำเนินงานวิจัยนี้ ได้แก่ “ทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา” รุ่นปี 2549 (CHE-PhD-THA-INV) ดำเนินงานโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และ “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 10 ปีงบประมาณ 2552

ขอขอบคุณน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการ 462 406 และ 448 โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณนันท์ธรร ภาราช คุณปิยะมาศ คงแถม คุณณิชากร คอนดี และคุณชนกภรณ์ เมืองจินดา ที่ช่วยสอนเทคนิค PCR-DGGE ขอขอบคุณ คุณจวน ผาหนองสิง เจ้าของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ที่อนุญาตให้ข้าพเจ้าใช้พื้นที่ทำวิจัย อีกทั้งอำนวยความสะดวกต่างๆ ขอขอบคุณ คุณชื่นสมน บุญเจริญ ที่มีส่วนช่วยงานวิจัยของข้าพเจ้าเป็นอย่างมาก

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดา และสมาชิกในครอบครัว ที่ให้กำลังใจ และการสนับสนุนในด้านต่างๆ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญคำย่อ.....	ด
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์	
2.1 การปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในทะเลไทย	
2.1.1 คุณภาพน้ำทะเลชายฝั่ง.....	7
2.1.2 ชนิดและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล.....	9
2.1.3 ปัญหาการทิ้งน้ำขังใต้ท้องเรือที่ปนเปื้อนน้ำมัน (bilge oil).....	11
2.1.4 สถานภาพของประเทศไทยต่อการแก้ปัญหามลพิษของเสียจากเรือ.....	13
2.2 การบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลด้วยวิธีชีวภาพ	
2.2.1 ความหมาย.....	15
2.2.2 ตัวอย่างรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำมันด้วยวิธีชีวภาพ.....	16
2.2.3 จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเล.....	17
2.2.4 วิธีการย่อยสลายอัลเคนสายยาวและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน.....	21
2.2.5 การบำบัดเชิงชีวภาพของน้ำท้องเรือที่ปนเปื้อนน้ำมัน.....	24
2.2.6 ผลิตภัณฑ์จัดคราบน้ำมัน (Oil spill cleanup products).....	25

2.3 การใช้เซลล์ตรึงเพื่อบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล	
2.3.1 ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงและตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เซลล์ตรึงย่อยสลาย น้ำมันในน้ำทะเล.....	27
2.3.2 ลักษณะของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับการตรึงบนวัสดุ.....	29
2.3.3 ลักษณะของวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับใช้ในน้ำทะเล.....	32
บทที่ 3 การคัดแยกและศึกษาจุลินทรีย์จากระบบนิเวศทะเลที่สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์เรือประมง	
3.1 บทนำ.....	34
3.2 ขั้นตอนงานวิจัย.....	36
3.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	37
3.4 ผลการทดลอง.....	44
3.5 อภิปรายการทดลอง.....	57
บทที่ 4 การพัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ เรือประมง	
4.1 บทนำ.....	61
4.2 ขั้นตอนงานวิจัย.....	63
4.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	64
4.4 ผลการทดลอง.....	70
4.5 อภิปรายผลการทดลอง.....	83
บทที่ 5 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือโดย <i>Gordonia</i> sp. JC11 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน: การศึกษาระดับห้องปฏิบัติการและในพื้นที่จริง	
5.1 บทนำ.....	90
5.2 ขั้นตอนงานวิจัย.....	92
5.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	93
5.4 ผลการทดลอง.....	101
5.5 อภิปรายผลการทดลอง.....	129

บทที่ 6	ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	
6.1	ข้อสรุป.....	136
6.2	ข้อเสนอแนะ.....	139
	รายการอ้างอิง.....	141
ภาคผนวก		
	ภาคผนวก ก.....	161
	ภาคผนวก ข.....	164
	ภาคผนวก ค.....	169
	ภาคผนวก ง.....	175
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	189

สารบัญญัตราสาร

ตารางที่		หน้า
2.1	เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลลงสู่ทะเลไทยระหว่างปีพ.ศ. 2550-2554.....	7
2.2	ชนิดของแบคทีเรียทะเลที่ย่อยสลายคราบน้ำมัน.....	19
2.3	รายชื่อผลิตภัณฑ์กำจัดคราบน้ำมันตามประกาศของ USEPA (2011).....	26
3.1	ส่วนประกอบของน้ำมันแต่ละชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	38
3.2	การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันที่คัดแยกจากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย.....	45
3.3	ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วและการเจริญในอาหาร NSW ที่เติม เททระเดคเคน 0.1% หรือพีแนทรีน 100 มก./ล.....	47
3.4	สมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ และการสร้าง EPS ของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์.....	48
3.5	ความสามารถในการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชันของส่วนตะกอนเซลล์ และส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ ของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์.....	49
3.6	ประสิทธิภาพของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 ในการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ.....	54
4.1	สมบัติทางกายภาพของวัสดุตั้งเซลล์ชนิดต่างๆ.....	70
4.2	การกำจัดไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติกที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของเซลล์ตั้งเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ.....	74
4.3	การย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 ที่ตรึงบนโพรพอลิยูรีเทน ซึ่งเก็บที่ 4 °ซ เป็นเวลา 0-8 สัปดาห์.....	77
4.4	การย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 ที่ตรึงบนโพรพอลิยูรีเทน.....	79
4.5	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำทะเลที่ผิวน้ำน้ำทะเลที่มีระดับความลึกประมาณ 60 ซม. ณ ท่าเรือประมงสิงห์อำนวย จ.จันทบุรี ระหว่าง 27 กุมภาพันธ์ 2552 ถึง 21 มกราคม 2553.....	80

ตารางที่	หน้า
4.6	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำทะเลที่เก็บจากผิวน้ำ บริเวณท่าเรือประมงสิงห์ อำนาจ จ.จันทบุรี..... 81
4.7	ความสามารถในการย่อยไฮโดรคาร์บอนอินทรีย์และอะโรมาติกของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียทะเลบางสายพันธุ์..... 89
5.1	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ตรวจวิเคราะห์ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ณ ท่าเรือประมงสิงห์ อำนาจ จ.จันทบุรี ระหว่าง 24 ตุลาคม 2552 ถึง 8 พฤศจิกายน 2553..... 102
5.2	ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่ตรวจวัดในน้ำขังใต้ท้องเรือ ท่าเรือ ประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี ระหว่างวันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2552 ถึง 8 พฤศจิกายน 2553..... 103
5.3	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของตัวอย่างน้ำขังใต้ท้องเรือ ที่เก็บจากท่าเรือประมงสิงห์ อำนาจ จ.จันทบุรี เมื่อวันที่ 21 มกราคม 2553..... 104
5.4	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำขังใต้ท้องเรือ ที่เก็บจากจุดปล่อยน้ำออกนอกตัวเรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ก่อนและหลังเติม PUF-immobilized cells..... 113
5.5	ปริมาณน้ำมันที่เติมลงในเครื่องยนต์เรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ และ สภาพอากาศในระหว่างที่ออกเรือเพื่อทำประมง..... 116
5.6	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำขังใต้ท้องเรือ ที่เก็บจากจุดปล่อยน้ำออกนอกตัวเรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ก่อนและหลังเติม PUF-immobilized cells..... 128
5.7	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึง <i>Gordonia</i> sp. JC11 ในการลดปริมาณ ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดเทียบกับการลดลงของน้ำมันตามธรรมชาติ ในระดับห้องปฏิบัติการ..... 130

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
2.1	บริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำเภอย จ.จันทบุรี (ก) ซึ่งมีการทิ้งน้ำเสียจากกิจกรรมต่างๆ ลงทะเลทำให้มีคราบไขมัน (ข) และคราบน้ำมันลอยบนผิวน้ำทะเล (ค).....	8
2.2	สภาพห้องเครื่องยนต์ใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็กลำหนึ่งในอ.แหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี (ก) และลักษณะของน้ำขังใต้ท้องเรือปนเปื้อนคราบน้ำมัน (ข).....	13
2.3	วิธีการย่อยสลายอัลเคนสายยาวโดยแบคทีเรียในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน.....	23
2.4	วิธีการตรึงเซลล์.....	28
3.1	ลักษณะความขุ่นและการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในอาหาร NSW ที่เติมน้ำมันดิบความเข้มข้น 5,000 มก./ล. บ่มเชื้อที่ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง 7 วัน เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ.....	44
3.2	ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นเบอร์ 1 (ก) และจำนวนเซลล์ (ข) ของ <i>Candida</i> sp. JC 4 (◆), <i>Microbacterium</i> sp. JC9 (■) และ <i>Gordonia</i> sp. JC11 (▲) ที่เลี้ยงในอาหาร NSW เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ (□) โดยมีปริมาณน้ำมันเริ่มต้น 200 มก./ล. และมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 OD ₆₀₀	51
3.3	ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว เบอร์ 2 (ก) และจำนวนเซลล์ (ข) ของ <i>Candida</i> sp. JC 4 (◆), <i>Microbacterium</i> sp. JC9 (■) และ <i>Gordonia</i> sp. JC11 (▲) ที่เลี้ยงในอาหาร NSW ต่อเวลา เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ (●) โดยมีปริมาณน้ำมันเริ่มต้นคือ 200 มก./ล. และปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 OD ₆₀₀ ข้อมูลที่แสดงเป็นแบบ mean ± SD.....	52
3.4	จีซีโครมาโตแกรมของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 (ก) และเบอร์ 4 (ข) ในวันที่ 5 ของการทดลอง เติม <i>Gordonia</i> sp. JC11 (1.0 OD ₆₀₀) ในอาหาร NSW ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (1,000 มก./ล.) และบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ชุดควบคุมสำหรับการทดลองนี้ได้แก่ชุดที่ไม่เติมเชื้อ (uninoculated)	56
4.1	การเตรียมเซลล์ตรึงโดยเติมหัวเชื้อ <i>Gordonia</i> sp. JC11 ลงในพลาสติกบรรจุอาหาร NSW ที่มีวัสดุตรึง PUF ปลอดภัย (ก) และเซลล์ตรึงพร้อมใช้ที่ได้จากการตรึงเซลล์ 3 วัน (ข).....	67

ภาพที่	หน้า
4.2 การเกาะติดของแบคทีเรียทั้งหมดบนพื้นผิว PUF ของ (■) <i>Gordonia</i> sp. JC11 (▲) <i>Microbacterium</i> sp. JC9 (○) <i>Brucella</i> sp. JC12 และ (x) เชื้อผสมของ JC11+JC9+JC12 แสดงผลในรูปแบบ mean ± SD.....	71
4.3 รูปจากกล้อง SEM (x 5000) แสดงกลุ่มเซลล์ของแบคทีเรียย่อยน้ำมันสายพันธุ์ต่างๆ ที่เกาะอยู่บน PUF ภายหลังจากตรึงเซลล์บนเครื่องเขย่า (130 รอบ/นาที) อุณหภูมิห้อง 5 วัน (ก) <i>Gordonia</i> sp. JC11 (ข) <i>Microbacterium</i> sp. JC9 (ค) <i>Brucella</i> sp. JC12 และ (ง) เชื้อผสม ของ JC11+JC9+JC12.....	72
4.4 ผลการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของแบคทีเรียแต่ละชนิด เมื่อเตรียมในรูปแบบ PUF-immobilized cells และเซลล์อิสระ บ่มที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง 5 วัน แสดงผลในรูปแบบ mean ± SD.....	73
4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ ซึ่งผลิตโดยการตรึงเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน มาวิเคราะห์ 1) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ JC11 บน PUF 2) วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันคงเหลือบน PUF 3) ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึง แสดงผลในรูปแบบ mean ± SD.....	75
4.6 การย่อยองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วความเข้มข้น 100 มก./ล. เป็นเวลา 24 ชม.ของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 ที่ตรึงบนโพรพิลีนโกลีเรีย และปริมาณเซลล์มีชีวิตที่อยู่บนเซลล์ตรึง หลังจากเก็บเซลล์ตรึงที่ 4°C เป็นเวลา 0-8 สัปดาห์ แสดงผลในรูปแบบ mean ± SD.....	77
4.7 โครงสร้างของ PUF ที่มีรูพรุนปริมาณมาก (SEM, x50) (ก) และเซลล์ตรึงที่ผ่านการเก็บที่ 4°C นาน 8 สัปดาห์ จะเห็นกลุ่มเซลล์ของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 จำนวนมาก เกาะ หรือฝังตัวอยู่ในรูพรุนของ PUF (SEM, x10000) (ข).....	78
4.8 การเก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนวย จ. จันทบุรี.....	80
4.9 ผลการย่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่ความเข้มข้น 100 มก./ล. ของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 ที่ตรึงบน PUF (bioaugmentation) และเชื้อประจำถิ่นในน้ำทะเล (natural attenuation) ในการบ่มเชื้อที่ความเร็ว 130 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 ชม. แสดงค่าในรูปแบบ mean ± SD.....	82
4.10 การเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ทั้งหมด และจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ในน้ำทะเลที่ไม่เติมสารอาหาร ที่เติมน้ำมัน (100 มก./ล.) (natural attenuation) และในระบบจำลองน้ำทะเลที่เติมน้ำมัน และเซลล์ตรึง (bioaugmentation).....	83

ภาพที่	หน้า	
5.1	ลักษณะภายในห้องเครื่องยนต์เรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องยนต์ดีเซลอยู่ตรงกลางของห้องเครื่องยนต์เรือ (ก) และเติมตัวอย่าง PUF-packages ลงบนผิวหน้าของน้ำซังใต้ท้องเรือ บริเวณใต้ฐานเครื่องยนต์ (ข)	95
5.2	Uninoculated PUF packages ที่มีพื้นที่ผิวขนาด 40 ซม. ² /ชิ้น ที่เติมลงไปบนผิวหน้าน้ำซังใต้ท้องเรือของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์.....	96
5.3	PUF-immobilized <i>Gordonia</i> sp. JC11 packages ที่มีพื้นที่ผิวขนาด 40 ซม. ² /ชิ้น (ก) และที่เติมลงไปในห้องเครื่องยนต์เรือ (ข).....	97
5.4	ตัวอย่าง PUF- packages พื้นที่ผิว 40 ซม. ² /ชิ้น ที่ประกอบด้วย PUF-immobilized JC11 packages และ Uninoculated PUF packages ที่เติมลงในพื้นที่ทดสอบ โดยมีท่อนลอยติดไว้ตรงกลาง เพื่อให้ตัวอย่างลอยอยู่บนผิวน้ำทะเล (ก) และตัวอย่าง PUF-packages ที่ติดแท่งโฟม เพื่อให้ต่างจาก PUF-packages แบบแรก และใช้สำหรับเติมลงในพื้นที่ทดสอบในภายหลัง (ข).....	98
5.5	จุดเก็บตัวอย่างน้ำซังใต้ท้องเรือที่ปล่อยออกจากเรือประมง ก่อนและหลังเติม PUF-packages ในห้องเครื่องยนต์เรือ.....	99
5.6	การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว (1,000 มก./ล.) ในน้ำเสียจากท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริงเมื่อวันที่ 21 มกราคม 2553 ในระดับปฏิบัติการเมื่อเติมแบคทีเรียตรึงของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 (bioaugmentation) เทียบกับเชื้อประจำถิ่น (natural attenuation) แสดงค่าในรูป mean \pm SD.....	105
5.7	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในระบบที่เติมแบคทีเรียตรึงเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำเสียจากท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริง เมื่อวันที่ 21 มกราคม 2553 แสดงค่าในรูป mean \pm SD.....	106
5.8	การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว (1,000 มก./ล.) ที่ปนเปื้อนในน้ำซังใต้ท้องเรือ ที่เก็บจากพื้นที่จริงเมื่อวันที่ 12 สิงหาคม 2553 เมื่อเติมแบคทีเรียตรึงของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 (bioaugmentation) เทียบกับการย่อยสลายน้ำมันตามธรรมชาติ (natural attenuation) แสดงค่าในรูป mean \pm SD.....	107

ภาพที่	หน้า
5.9 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในระบบ bioaugmentation (ก) และ natural attenuation (ข) เมื่อเติมน้ำเสียจากท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริงเมื่อวันที่ 12 สิงหาคม 2553 แสดงค่าในรูป mean ± SD.....	108
5.10 รูปจากกล้อง SEM [x5,000 (ก, ค, จ); x10,000 (ข, ง, ฉ); x20,000 (ซ, ซ)] แสดงกลุ่มเซลล์ของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 ที่ตรึงบน PUF ก่อนใช้งาน (ก,ข) และภายหลังทดสอบการย่อยน้ำมัน นาน 4 วัน (ค, ง) และ 10 วัน (จ, ฉ) ซึ่งพบการสร้างเส้นใยเกาะกลุ่มเซลล์ในวันที่ 4 (ซ) และการฝังตัว (encapsulation) ของเซลล์อยู่ในไบโอฟิล์ม ในวันที่ 10 (ซ).....	110
5.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดเนื่องจากการดูดซับของ Uninoculated PUF packages ที่มีพื้นที่ผิว 40 ซม. ² /ชิ้น ซึ่งเติมบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ระหว่างวันที่ 23-28 กันยายน พ.ศ. 2553 โดยมีจำนวนเริ่มต้น 33 ชิ้น และเก็บตัวอย่าง 3 ชิ้นทุกๆ 12 ชม. แสดงค่าในรูป mean ± SEM.....	111
5.12 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ TPH ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ในพื้นที่จริง เนื่องจากการดูดซับและการย่อยสลายของ PUF-immobilized <i>Gordonia</i> sp. JC11 packages ซึ่งเติมบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือ ระหว่างวันที่ 1-6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถูกสุ่มในชั่วโมงที่ 12, 36, 60, 84 และ 108 แสดงถึงการเติมน้ำมันในเครื่องยนต์เรือก่อนออกทำการประมง แสดงค่าในรูป mean ± SEM.....	113
5.13 จีซีโครมาโตแกรมของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือในพื้นที่จริงที่ถูกดูดซับโดยโพรพอลิยูรีเทน ภายหลังเติม PUF-immobilized <i>Gordonia</i> sp. JC11 packages เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ก) 96 ชั่วโมง (ข) และ 108 ชั่วโมง (ค).....	114
5.14 ลักษณะของ PUF-immobilized <i>Gordonia</i> sp. JC11 packages ที่ผูกติดกับ Uninoculated PUF package ที่มีพื้นที่ผิวนาน 40 ซม. ² /ชิ้น ณ ชั่วโมงที่ 0 (ก) และภายหลังการเติมลงไป ในน้ำขังใต้ท้องเรือในพื้นที่จริงนาน 24 ชม. (ข) และ 168 ชม. (ค).....	115
5.15 การเปลี่ยนแปลงของ TPH ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ในพื้นที่จริง เนื่องจากการดูดซับและการย่อยของ PUF-immobilized <i>Gordonia</i> sp. JC11 packages ที่ผูกติดกับ Uninoculated PUF packages ถูกสุ่มในชั่วโมงที่ 12, 36, 60, 84, 108 และ 132 แสดงถึงการเติมน้ำมันในเครื่องยนต์เรือก่อนออกทำการประมง.....	117

รูปที่	หน้า
5.16	118
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่เกาะอยู่บน PUF-immobilized <i>Gordonia</i> sp. JC11 เทียบกับ Uninoculated PUF packages ที่มีปริมาณ 125 มก./ชุดทดลอง ซึ่งใช้เติมบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม พ.ศ. 2553 แสดงค่าในรูป mean \pm SD.....	
5.17	119
จีซีโครมาโตแกรมของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือในพื้นที่จริงที่ถูกดูดซับ โดย PUF ภายหลังเติม PUF-packages เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) 60 ชั่วโมง (ข) และ 156 ชั่วโมง (ค).....	
5.18	121
การเปลี่ยนแปลงของ TPH ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม พ.ศ. 2553 ถูกตรวจในชั่วโมงที่ 12, 36, 60, 84, 108 และ 132 แสดงถึงการเติมน้ำมัน ในเครื่องยนต์เรือ แสดงค่าในรูป mean \pm SEM.....	
5.19	121
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ในน้ำขังใต้ท้องเรือซึ่งทดลองในพื้นที่จริง ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม 2553 แสดงค่าในรูป mean \pm SD.....	
5.20	123
รูปจากกล้อง SEM (x50) แสดงโครงสร้างของ Uninoculated PUF packages ก่อนนำไปใช้บำบัดคราบน้ำมัน (ก) และภายหลังนำไปใช้ในพื้นที่จริงนาน 168 ชั่วโมง (ข) และ SEM (x5,000) แสดงลักษณะการเกาะติดของจุลินทรีย์ บน Uninoculated PUF packages ที่เวลา 0 ชั่วโมง (ค) และภายหลังการนำไปเติม ในน้ำเสียท้องเรือในพื้นที่จริงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ง,จ) และ 168 ชั่วโมง (ฉ).....	
5.21	124
กล้องจุลทรรศน์ SEM (x10,000) แสดงลักษณะการเกาะติดของ <i>Gordonia</i> sp. JC11 บน PUF ที่เวลา 0 ชั่วโมง (ก) และภายหลังการนำไปใช้บำบัดคราบน้ำมัน ในน้ำเสียท้องเรือในพื้นที่จริงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ข,ค) และ 168 ชม. (ง).....	
5.22	127
การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA โดยวิธี DGGE ของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 179 bp ในพอลิอะคริลาไมด์ เจลที่มี 30-70% denaturant ของ (1) <i>Gordonia</i> sp. JC11 (2) PUF-immobilized <i>Gordonia</i> sp. JC11 ที่เติมลงไปในพื้นที่จริงนาน 30 นาที (3) แบคทีเรียจริงของเชื้อ JC11 ที่เติมลงไปในพื้นที่จริง 96 ชั่วโมง และ (4) 168 ชั่วโมง (5) Uninoculated PUF packages ที่เติมในพื้นที่จริงนาน 30 นาที (6) 96 ชั่วโมง และ (7) 168 ชั่วโมง.....	

สารบัญคำย่อ

CMC	=	Critical Micelle Concentration
EPS	=	Exopolysaccharide
log CFU/g	=	log Colony Forming Unit/gram
NSW	=	Nutrient Seawater Medium
PAHs	=	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PUF	=	Polyurethane foam
SEM	=	Scanning Electron Microscopy
TPH	=	Total Petroleum Hydrocarbon
ซม.	=	เซนติเมตร
ชม.	=	ชั่วโมง
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ล.	=	ลิตร
เซลล์/ซม. ³	=	เซลล์/ลูกบาศก์เซนติเมตร
กก./ม ³	=	กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยประสบปัญหาการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลอย่างต่อเนื่อง กัลยา วัฒยากร และสมภพ รุ่งสุภา (2552) ศึกษาการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำทะเล บริเวณเกาะสีชัง-ศรีราชา จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนพฤษภาคม 2552 พบว่าปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลชายฝั่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.05 - 12.55 ไมโครกรัม/ลิตร และศศิวิมล ชัยณรงค์ (2551) รายงานถึงปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำทะเล บริเวณชายฝั่งอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในช่วงพ.ศ.2549-2550 มีค่า 0 - 87.95 ไมโครกรัม/ลิตร นอกจากนี้ Wattayakorn และคณะ (1998) ตรวจวัดปริมาณน้ำมันในรูปของน้ำมันที่กระจายตัวและที่ละลายอยู่ในน้ำทะเล ช่วงปี 2537-2538 พบว่าน้ำทะเลชายฝั่งในบริเวณอ่าวไทยมีปริมาณน้ำมันปนเปื้อนตลอดช่วงการศึกษาประมาณ 4 ไมโครกรัม/ลิตร ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงเดียวกับรายงานในปี 2551-2552 จะเห็นได้ว่าตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลมีความเข้มข้นสูงกว่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล ตามประกาศของคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 27 (พ.ศ. 2549) ซึ่งกำหนดค่าปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลมีค่าสูงสุด ≤ 5 ไมโครกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, สำนักจัดการคุณภาพน้ำ, 2553) การกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนออกจากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากองค์ประกอบบางชนิดของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจัดอยู่ในกลุ่มสารเคมีอันตรายที่มีผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ และระบบนิเวศ

การปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลมีที่มาจากการขยายตัวที่รวดเร็วของการขนส่ง อุตสาหกรรม และชุมชน โดยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนมีหลายชนิด เช่น น้ำมันดิบ ที่มักมีการขนส่งทางทะเล และเป็นน้ำมันพื้นฐานที่ใช้ผลิตน้ำมันอื่นๆ และน้ำมันเตา ซึ่งมักใช้เป็นเชื้อเพลิงของเรือเดินทะเลขนาดใหญ่ รวมถึงคราบน้ำมันจากกิจกรรมต่างๆ บริเวณเขตชายฝั่งที่รั่วไหลลงทะเล นอกจากนี้มลพิษต่างๆ ที่มาจากเรือ ได้แก่ น้ำมันเชื้อเพลิง กากน้ำมัน ขยะน้ำมัน ผลิตภัณฑ์จากการกลั่น ของเหลวที่เป็นพิษ นับเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำมันในน้ำทะเลอย่างต่อเนื่อง มีรายงานว่าบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยฝั่งตะวันออกมักมีการลักลอบถ่ายน้ำทิ้งปนเปื้อนน้ำมันลงทะเล ทำให้เกิดคราบน้ำมันขึ้นบนชายหาด โดยเฉพาะจังหวัดระยอง (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรมควบคุมมลพิษ, 2554) และในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2551 มีรายงานว่าบริษัทเดินเรือเฟอร์รี่แห่งหนึ่ง ซึ่ง

ให้บริการเรือข้ามฟากบริเวณเกาะสมุยมีการลักลอบปล่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วลงสู่ทะเล (สำนักข่าวไทย, 2551) สอดคล้องกับข้อมูลที่รายงานว่าประเทศไทยมีเรือเดินสมุทรเทียบท่าปีละ 7,000 เทียบต่อปี และในเรือแต่ละลำจะมีกากของเสียและน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วประมาณ 5 ตัน รวมแล้วมีกากของเสียที่ต้องกำจัดประมาณ 35,000 ตันต่อปี (กองบก.ฐานเศรษฐกิจ, 2553) อย่างไรก็ตามประเทศไทยยังไม่ได้กำหนดค่ามาตรฐานปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทิ้งที่ปล่อยจากเรือโดยตรง จึงคาดว่าจะมีมาตรการในการตรวจสอบปัญหามลพิษต่างๆ ที่มาจากเรือที่เข้มงวดมากขึ้นในอนาคต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อบำบัดคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันหล่อลื่น ซึ่งในปัจจุบันยังมีการศึกษาวิจัยน้อย

การย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทะเลเกิดขึ้นได้ยากเนื่องจากมีองค์ประกอบเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาว และยังมีสารเติมแต่งอีกหลายชนิดที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต เช่น โลหะหนักชนิดต่างๆ หรือ สารเพิ่มคุณภาพน้ำมัน เป็นต้น (Aluyor และ Ori-jesu, 2009) ด้วยเหตุดังกล่าวน้ำมันชนิดนี้จึงตกค้างอยู่นานในน้ำทะเล และอาจเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตหรือส่งผลกระทบต่อแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ซึ่งวิธีการการปนเปื้อนของคราบน้ำมันในน้ำทะเล ประกอบด้วยวิธีทางกายภาพและชีวภาพ แต่การกำจัดน้ำมันออกไปจากระบบนิเวศได้อย่างสมบูรณ์จะต้องใช้วิธีย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันแบคทีเรียกำจัดน้ำมันที่ใช้ในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งคัดแยกจากแหล่งที่มีภูมิอากาศและสภาพแวดล้อม แตกต่างไปจากประเทศไทยที่อยู่ในเขตร้อนชื้น เมื่อนำมาใช้งานจึงเกิดปัญหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายคราบน้ำมันลดลง (นิทัศน์ เพราแก้ว, 2541) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจคัดแยกและศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดแยกจากเขตชายฝั่งทะเลในภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยแหล่งคัดแยกเป็นเขตท่าเรือที่มีปัญหามลพิษน้ำมันอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มโอกาสของการได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยน้ำมัน เนื่องจากจุลินทรีย์มีการปรับตัวเพื่อให้ใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำมัน นอกจากนี้การใช้เชื้อย่น้ำมันสายพันธุ์ท้องถิ่นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดคราบน้ำมันในน้ำทะเล เนื่องจากแบคทีเรียจะคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมที่ใช้ งาน สามารถปรับตัวและดำเนินกิจกรรมต่างๆ ได้ดี (Hosokawa และคณะ, 2009)

อย่างไรก็ดีการเติมจุลินทรีย์อิสระลงไปเพื่อบำบัดคราบน้ำมันในน้ำทะเลโดยตรง อาจมีปัญหาเนื่องจากการตายของจุลินทรีย์ (Wilson และ Bradley, 1997) จากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้อต่อการเจริญของเชื้อ และยังมีผลไม่สะดวกในการเตรียมและนำหัวเชื้อไปยังพื้นที่ปนเปื้อน (Monohar และคณะ, 2001) จากปัญหาดังกล่าวทำให้งานวิจัยนี้มุ่งพัฒนาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเตรียมและนำหัวเชื้อไปใช้บำบัดคราบน้ำมันในน้ำทะเล โดยตรึงเซลล์จุลินทรีย์ย่น้ำมันบนวัสดุที่ลอยน้ำได้ จากการทบทวนวรรณกรรม (บทที่ 2) พบว่าชนิดของ

จุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์ คือ (1) มีสมบัติความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์ (2) มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide: EPS) (3) มีความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และ (4) มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันชนิดที่ต้องการบำบัด งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะเลือกชนิดแบคทีเรียสำหรับการตรึงบนวัสดุดูดซับจากสมบัติที่เหมาะสมทั้งหมดที่กล่าวข้างต้น และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงเซลล์ชนิดที่เป็นพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) กับโฟมพอลิยูรีเทน (polyurethane foam; PUF) เพื่อหาวัสดุตรึงที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการบำบัดน้ำมันปนเปื้อนในน้ำทะเล นอกจากนี้ประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อมแล้ว ยังสามารถนำความรู้ที่ได้รับมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้ (ready-to-use inoculum) เพื่อประโยชน์ทางการค้าต่อไป

ในการประเมินประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงที่ผลิตขึ้น งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในพื้นที่จริง โดยการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการได้นำน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมงเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือในน้ำทะเลที่เก็บจากพื้นที่จริงที่ไม่เติมสารอาหารเพิ่ม สำหรับการศึกษาในพื้นที่จริงได้นำเซลล์ตรึงไปทดลองบำบัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือของเรือประมงขนาดเล็ก บริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี โดยนำน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือ (bilge oil) เป็นส่วนผสมของน้ำมันหล่อลื่น น้ำมันเชื้อเพลิง กากน้ำมัน (oily sludge) น้ำมันไฮดรอลิค น้ำมันเกียร์ น้ำที่รั่วซึมจากท่อ (internal pipes) และน้ำทะเลที่รั่วซึมเข้ามาในห้องอับเฉาเรือ รวมถึงสารเคมีหลายชนิดจากส่วนเครื่องยนต์เรือ เช่น ตัวทำละลาย สารชะล้าง เกล็ดของโลหะหนัก เป็นต้น (Nievas และคณะ, 2006) ดังนั้น น้ำขังใต้ท้องเรือปนเปื้อนน้ำมันจึงเป็นแหล่งกำเนิดสำคัญของมลพิษน้ำมัน การบำบัดน้ำเสียเหล่านี้มักจะใช้เครื่องแยกน้ำมัน (oily water separator) ที่ติดตั้งไว้บนเรือ อย่างไรก็ตาม Lin และคณะ (2007) รายงานว่าเรือประมงขนาดเล็กมักไม่ได้ติดตั้งเครื่องแยกน้ำมันไว้ จึงปล่อยน้ำเสียท้องเรือปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นทั้งชนิดที่ยังไม่ได้ใช้งานและชนิดที่ใช้งานแล้วออกสู่ภายนอก ซึ่งเจ้าของเรือประมงขนาดเล็กในบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี ได้ให้ข้อมูลว่ามีการสูบน้ำขังใต้ท้องเรือลงสู่ทะเลด้วยระบบปั๊มอัตโนมัติระหว่างการเดินเรือ (จวน ผาหนองสิง, สัมภาษณ์, 12 สิงหาคม 2553) จึงนับได้ว่าน้ำเสียจากท้องเรือในพื้นที่นี้ เป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลชายฝั่งในเขตอำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี จึงสมควรที่จะมีการทดลองใช้จุลินทรีย์ย่อยน้ำมันเพื่อบำบัดคราบน้ำมัน โดยงานวิจัยนี้เน้นการบำบัดที่แหล่งกำเนิดสำคัญของคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำทะเล ได้แก่ น้ำขังใต้ท้องเรือของเรือประมงขนาดเล็กซึ่งจอดเทียบท่าบริเวณท่าเรือนี้ ซึ่งสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ รวมถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ท้องถิ่นที่คัดแยกได้ และหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ที่ได้พัฒนาขึ้น ไปปรับใช้บำบัดคราบน้ำมันในเขตพื้นที่อื่นที่มีสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกันได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ คือการพัฒนาวิธีทางชีวภาพสำหรับบำบัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล โดยใช้เซลล์ตรึงของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง วัตถุประสงค์ย่อยของงานวิจัยนี้ได้แก่

1.2.1 คัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายคราบน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล และคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตเซลล์ตรึง

1.2.2 พัฒนารูปแบบผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้สำหรับย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง

1.2.3 ทดสอบการนำหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ไปบำบัดคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในพื้นที่จริง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 การคัดแยกและศึกษาจุลินทรีย์จากระบบนิเวศทะเลที่สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมัน ใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนเชื้อแบบ Enrichment โดยใช้ตัวอย่างทรายทะเล และน้ำทะเล จากพื้นที่เก็บตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน ได้แก่ ชายหาดแหลมสิงห์ ท่าเทียบเรือประมงสิงห์อำนวยการ จังหวัดจันทบุรี อ่าวอุดม ท่าเทียบเรือแหลมฉบัง และเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน งานวิจัยขั้นต่อมาเป็นการเลือกชนิดของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการนำมาตรึงด้วยวัสดุตรึงเพื่อใช้บำบัดน้ำทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน โดยทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์เรือประมง ทั้งชนิดที่ใช้งานแล้ว และยังไม่ได้ใช้งาน ทดสอบสมบัติของเซลล์ที่จำเป็นต่อการตรึงอยู่บนวัสดุดูดซับ ได้แก่ ความไม่ชอบน้ำ การสร้างสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ การทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชัน และจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

1.3.2 การพัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้สำหรับย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์เรือประมง

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ได้ทดสอบสมบัติทางกายภาพของวัสดุตั้งสังเคราะห์ชนิด PUF และ พลาสติกชีวภาพ เช่น KU-GREEN และ BIO และนำวัสดุตั้งซึ่งมีสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม มาใช้ในการตรึงเซลล์ที่คัดเลือกจากข้อ 1.3.1 โดยศึกษาการเกาะติดของจุลินทรีย์แต่ละชนิดบน วัสดุตั้ง และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงของ เซลล์ตรึงเทียบกับเซลล์อิสระ คัดเลือกชนิดของเซลล์ตรึงที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยน้ำมัน และเกาะติดได้ดีบนวัสดุตั้ง มาใช้ในการพัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้สำหรับย่อยสลาย น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง ซึ่งประกอบด้วย การทดลองตรึงเซลล์ในสภาวะที่คล้ายกับการ นำไปใช้งานในพื้นที่จริง และการทดสอบอายุการเก็บเซลล์ตรึงที่ 4 °ซ หลังจากนั้นเป็นการทดสอบ ประสิทธิภาพการใช้งานของหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ โดยศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการ ย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงชนิดใช้แล้วที่ความเข้มข้น 200-1,000 มก./ล. และ ศึกษาความสามารถในการเจริญและย่อยน้ำมันหล่อลื่นของเซลล์ตรึงในน้ำทะเลที่ไม่เติม สารอาหาร ในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3.3 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือโดย *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน: การศึกษาระดับห้องปฏิบัติการและในพื้นที่จริง

การทดลองในขั้นสุดท้ายเป็นการนำเซลล์แบคทีเรียย่อยน้ำมันที่ตรึงบนวัสดุตั้งจากผล การทดลองในข้อ 1.3.2 ไปใช้บำบัดคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือในระดับห้องปฏิบัติการ และในพื้นที่จริง สำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยคราบน้ำมันของหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ (bioaugmentation) กับการสลายตัวของน้ำมันโดยธรรมชาติ (natural attenuation) โดยใช้น้ำตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่จริง 2 ครั้ง ระยะเวลาการเก็บห่างกัน ประมาณ 6 เดือน เพื่อประเมินความเป็นไปได้ของการเจริญ และการอยู่รอดของเซลล์ตรึง รวมถึง การคงประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของเซลล์ตรึงในน้ำทะเลที่มีคุณภาพแตกต่างกัน หลังจากนั้น นำหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ ท้องเรือในพื้นที่จริง โดยใช้ห้องเครื่องยนต์เรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จังหวัดจันทบุรี เป็นกรณีศึกษา แล้ววิเคราะห์การลดลงของน้ำมัน ปริมาณจุลินทรีย์ และการ เปลี่ยนแปลงของสังคมจุลินทรีย์ในระบบทดสอบ

บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

2.1 การปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในทะเลไทย

ทะเลไทยมีพื้นที่ประมาณ 350,000 ตารางกิโลเมตร มีชายฝั่งทะเลยาว 2,631 กิโลเมตร นับเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มีความหลากหลายและมีคุณค่ามาก อย่างไรก็ตามประเทศไทยประสบปัญหาการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลอย่างต่อเนื่อง โดยกรมควบคุมมลพิษ สำนักจัดการคุณภาพน้ำ รายงานในพ.ศ. 2553 ถึงสถิติการเกิดน้ำมันรั่วไหลในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2516-2553 จำนวนทั้งสิ้น 123 เหตุการณ์ ซึ่งเกิดบริเวณชายฝั่งทะเลด้านตะวันออก และปากแม่น้ำเจ้าพระยาเป็นส่วนใหญ่ และข้อมูลในตารางที่ 2.1 แสดงให้เห็นว่ามีน้ำมันหลายชนิด เช่น น้ำมันดิบ น้ำมันเตา น้ำมันดีเซล น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว และน้ำมันอากาศยาน ที่รั่วไหลลงสู่ทะเลไทยในช่วงปี พ.ศ. 2550-2554 ซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนในช่วง 10 ลิตร ถึง 100,000 ลิตร พื้นที่ที่มีเหตุการณ์เกิดขึ้น ได้แก่ ชลบุรี ระยอง สมุทรปราการ นครศรีธรรมราช ภูเก็ต และสงขลา โดยมีสาเหตุหลักเกิดจากอุบัติเหตุทางเรือ เช่น เรือชนกัน การอับปางของเรือ การรั่วไหลขณะขนถ่ายน้ำมัน นอกจากนี้บริเวณอ่าวไทยตอนในยังมีปัญหาน้ำมันปนเปื้อนมากกว่าพื้นที่ส่วนอื่น เนื่องจากเป็นที่ตั้งของเขตอุตสาหกรรมชายฝั่ง และบริเวณท่าเรือ พร้อมกันนี้การเคลื่อนตัวของน้ำทะเลในอ่าวไทยเกิดได้ช้า โดย กัลยา วัฒนากร และสมภพ รุ่งสุภา (2552) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำทะเล บริเวณเกาะสีชัง-ศรีราชา จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนตุลาคม 2551-พฤษภาคม 2552 พบว่าปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลชายฝั่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.05 - 12.55 ไมโครกรัม/ลิตร และศศิวิมล ชัยณรงค์ (2551) รายงานถึงปริมาณสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำทะเล บริเวณชายฝั่งอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในช่วงพ.ศ. 2549-2550 มีค่า 0-87.95 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนน้ำมันในทะเลไทยเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สำคัญซึ่งเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีแนวโน้มที่จะทวีความรุนแรงขึ้นหากไม่ได้รับการแก้ไข

ตารางที่ 2.1 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลลงสู่ทะเลไทยระหว่างปีพ.ศ. 2550-2554

เวลา	ชนิดน้ำมัน/ปริมาณ	สถานที่	สาเหตุ	อ้างอิง
2 ก.พ. 2554	น้ำมันอากาศยาน 10 ลิตร	อ.มาบตาพุด จ.ระยอง	การรั่วไหลโดยอุบัติเหตุ	(1)
5 ก.ย. 2553	น้ำมันเชื้อเพลิง 45,000 ลิตร	ทะเลอันดามัน จ.ภูเก็ต	เรือโชคถาวร 6 อับปาง เนื่องจากมรสุม	(2)
3 ม.ค.2552	ไม่ทราบชนิด (≈ 1 พันลิตร)	เกาะสมุย จ.นครศรีธรรมราช	เรือบรรทุกน้ำมันสำหรับ เติมเรือประมง อับปาง	(3)
15 มิ.ย. 2551	น้ำมันเตา (≥ 40 ตัน)	จ. สมุทรปราการ	รั่วไหลจากเรือสินค้าของ เกาหลีเหนือ	(4)
9 ธ.ค. 2550	น้ำมันดีเซล และ น้ำมันเตา ประมาณ 20,000 ลิตร	จ. สงขลา	เรือบรรทุกแก๊สของบริษัท เวิร์ลไวด์ ทรานสปอร์ต จำกัด อับปาง	(5)
20 พ.ย. 2550	น้ำมันดิบ ≈100,000 ลิตร	อ่าวศรีราชา จ.ชลบุรี	น้ำมันรั่วขณะขนถ่ายจาก เรือ ส่งไปตามท่อใต้ทะเล	(3)

แหล่งที่มา:(1) กรมควบคุมมลพิษ, 2554 (2) หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ, 2553

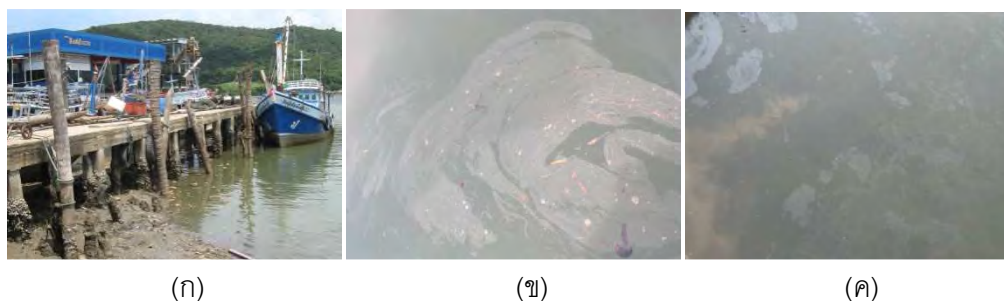
(3) กรมควบคุมมลพิษ, ศูนย์ข้อมูลอุบัติการณ์ตราชายและเคมีภัณฑ์, 2553

(4) กรมควบคุมมลพิษ, ฝ่ายมลพิษทางทะเล, 2552 (5) กรมเจ้าท่า, 2551

2.1.1 คุณภาพน้ำทะเลชายฝั่ง

จากรายงานผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำทะเลชายฝั่งทั่วประเทศ ในปี พ.ศ.2552 จำนวน 240 จุดเก็บตัวอย่าง ในช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม-เมษายน) และฤดูฝน (มิถุนายน) โดยประเมินจากดัชนีคุณภาพน้ำทะเล และรายงานคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ดีมาก ดี พอใช้ เสื่อมโทรม และเสื่อมโทรมมาก ร้อยละ 5, 51, 34, 5 และ 5 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบกับคุณภาพน้ำ 2 ปีก่อนหลัง พบว่าคุณภาพน้ำโดยรวมเสื่อมโทรมลง (กรมควบคุมมลพิษ, สำนักจัดการคุณภาพน้ำ, 2552) โดยส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเล โดยกิจกรรมต่างๆ ของโรงงานน้ำมัน ท่าเรือ และท่าเทียบเรือประมง ซึ่งส่วนใหญ่ตั้งอยู่บริเวณชายฝั่งเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญของการเกิดน้ำมันปนเปื้อนในน้ำทะเลชายฝั่ง บริเวณท่าเรือส่วนใหญ่มีการรั่วไหลของน้ำมันจากการซ่อมเครื่องยนต์ การถ่ายน้ำมันเครื่อง น้ำทิ้งจากห้องเรือ และการทำความสะอาดเรือ น้ำมันยังเป็นสินค้า

หลักที่ขนส่งในทะเลไทย ทั้งโดยเรือค้าต่างประเทศและเรือค้าชายฝั่ง ในช่วงปี พ.ศ.2540-2546 มีการขนส่งน้ำมันโดยเรือค้าต่างประเทศร้อยละ 45 และโดยเรือค้าชายฝั่งถึงร้อยละ 88 (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ, 2546) ดังนั้นจึงมีโอกาสสูงที่จะเกิดการรั่วไหลของน้ำมันได้ นอกจากนี้บริเวณท่าเทียบเรือประมงและสะพานปลาทั่วประเทศที่มีอยู่ 735 แห่ง (กรมควบคุมมลพิษ, ส่วนแหล่งน้ำทะเล, 2551) ยังปล่อยน้ำทิ้งจากการล้างทำความสะอาดสัตว์น้ำแปรรูปสัตว์น้ำและการล้างทำความสะอาดท่าและเรือประมง ลงสู่แหล่งน้ำโดยตรง ทำให้น้ำทะเลบริเวณท่าเทียบเรือประมงมักมีคราบไขมัน คราบน้ำมัน เศษซากสัตว์น้ำ และเศษขยะมูลฝอยลอยอยู่บนผิวน้ำ เช่น บริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ อำเภอลำลูกกา จังหวัดจันทบุรี (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 บริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี (ก) ซึ่งมีการทิ้งน้ำเสียจากกิจกรรมต่างๆ ลงทะเลทำให้มีคราบไขมัน (ข) และคราบน้ำมันลอยบนผิวน้ำทะเล (ค)

ทั้งนี้ ศรัณย์ เพ็ชรพิรุณ (2531) ได้ศึกษาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเล บริเวณชายฝั่งทะเลตั้งแต่พัทยาถึงตราด จำนวน 40 สถานี ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2530 และเดือนเมษายน พ.ศ. 2531 และพบว่าน้ำทะเลบริเวณท่าเทียบเรือประมงจะมีการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมากกว่าบริเวณหาดท่องเที่ยว และแหล่งเพาะเลี้ยง โดยมีค่าความเข้มข้นสูงสุดบริเวณชายฝั่งทะเล จ.ระยอง รองลงมาได้แก่ บริเวณชายฝั่งทะเล จ.ชลบุรี (พัทยา) ตราด และจันทบุรี ตามลำดับ และจากรายงานผลการสำรวจคุณภาพน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง ทั่วประเทศในปี พ.ศ. 2543 พบว่าน้ำเสียมีค่าบีโอดีอยู่ในช่วง 46-12,780 มก./ล. ค่าสารแขวนลอยทั้งหมดอยู่ในช่วง 60-5,878 มก./ล. ไนโตรเจนในรูปทีเคเอ็น (TKN) อยู่ในช่วง 0-1,059 มก./ล. รวมทั้งน้ำมันและไขมันอยู่ในช่วง 3-1,779 มก./ล. (กรมควบคุมมลพิษ, ส่วนแหล่งน้ำทะเล, 2551) พารามิเตอร์เหล่านี้มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน (ตารางที่ 4.6) ดังนั้นการแก้ไขปัญหาคุณภาพน้ำทะเลชายฝั่งเสื่อมคุณภาพจึงเป็นเรื่องจำเป็นที่ต้องดำเนินการอย่างรีบด่วน

2.1.2 ชนิดและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล

น้ำมันที่มักพบปนเปื้อนในน้ำทะเลมีหลายชนิด เช่น น้ำมันดิบ น้ำมันเตา (fuel oil) น้ำมันดีเซลชนิดหนัก และน้ำมันหล่อลื่น เป็นต้น ซึ่งเกิดจากอุบัติเหตุน้ำมันรั่วไหล หรือการลักลอบทิ้งน้ำมันอย่างผิดกฎหมาย ถึงแม้จะมีการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเลไปแล้วโดยวิธีทางกายภาพ แต่อย่างไรก็ดีน้ำมันที่ตกค้างบางส่วนจะเคลื่อนตัวเข้าหาฝั่งเนื่องจากกระแสคลื่นและลม จึงมักพบน้ำมันบริเวณชายฝั่งในลักษณะคราบน้ำมันซึ่งสลายตัวช้าตามธรรมชาติ การสลายตัวของน้ำมันขึ้นกับปัจจัยทางกายภาพและปริมาณที่ปนเปื้อน ซึ่งโครงสร้างบางส่วนของน้ำมันจะสลายไปตามธรรมชาติเนื่องจากการระเหยโดยแสง (photolysis) และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ แนวทางการเคลื่อนตัวของน้ำมันในทะเลได้รับอิทธิพลจากทิศทางลม กระแสน้ำ และคลื่น (Lee และ Merlin, 1999; Harayama และคณะ, 2004)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันที่พบปนเปื้อนบริเวณชายฝั่งทะเล คือ สารเคมี 4 กลุ่ม ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว (saturate hydrocarbon) อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) เรซิน (resin) ที่ประกอบด้วยไพริดีน (pyridines) ควิโนลีน (quinolines) คาร์บาโซล (carbazoles) และเอไมด์ (amides) องค์ประกอบทางเคมีชนิดที่ 4 ของน้ำมัน คือ แอสฟัลทีน (asphaltene) ที่ประกอบด้วยฟีนอล กรดไขมัน คีโตน (ketones) เอสเทอร์ (esters) และพorphyrines (Das และ Chandran, 2011) นอกจากนี้จะพบอะตอมของ ซัลเฟอร์ ออกซิเจน และไนโตรเจนอยู่ในโครงสร้างของน้ำมันดิบตามธรรมชาติในสัดส่วนที่ไม่เกินร้อยละ 3 รวมถึงมีฟอสฟอรัส และโลหะหนักจำพวก วานาเดียม และนิกเกิล ประมาณร้อยละ 1 (Head และคณะ, 2006; Okoh, 2006) โดยอะโรมาติกเป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมที่ก่อให้เกิดพิษแบบเฉียบพลันต่อสิ่งมีชีวิตได้มากที่สุด และยังทำให้เกิดพิษในระยะยาวต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่ง Das และ Chandran (2011) รายงานว่า จุลินทรีย์สามารถย่อยองค์ประกอบแต่ละชนิดของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ตามลำดับ ดังนี้ อัลเคนสายตรง (linear alkanes) > อัลเคนที่มีโครงสร้างเป็นสาขา (branched alkanes) > อะโรมาติกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (small aromatics) > อัลเคนที่มีโครงสร้างเป็นวง (cyclic alkanes)

น้ำมันดิบได้จากการสำรวจขุดค้นแล้วสูบขึ้นมาจากใต้ดิน ทั้งบนบกและใต้ทะเล มีลักษณะเป็นของเหลวสีดำ องค์ประกอบหลักเป็นสารไฮโดรคาร์บอนและมีสารเจือปนอื่นๆ เช่น กำมะถัน น้ำมันดิบมีหลายชนิด มีชื่อเรียกตามสถานที่ผลิตและปริมาณองค์ประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันดิบ เมอร์บาน ไลท์ (Murban light crude oil) หมายถึง น้ำมันดิบจากแหล่งผลิตอาบูดาบี ประเทศสหรัฐอาหรับเอมิเรตส์ มีองค์ประกอบเป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดเบา โดยทั่วไปน้ำมันดิบจะถูกกลั่นไปเป็นผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมชนิดต่างๆ เช่น ก๊าซหุงต้ม น้ำมันเบนซินรถยนต์ น้ำมันดีเซล น้ำมัน

เครื่องบิน น้ำมันก๊าด น้ำมันเตา น้ำมันหล่อลื่น ฯลฯ กระบวนการกลั่นน้ำมันของแต่ละโรงกลั่นอาจแตกต่างกันบ้างขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น คุณสมบัติของน้ำมันดิบที่นำมากลั่น ชนิดและคุณภาพของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่ต้องการ เทคโนโลยีของกระบวนการที่ใช้ (การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย, ฝ่ายจัดการเชื้อเพลิง, 2554)

น้ำมันหล่อลื่น (lubricating oils) ถูกสังเคราะห์ขึ้นหลายสูตร ทั้งนี้ขึ้นกับวัตถุประสงค์การใช้งาน ประกอบด้วย น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน (base fluid) และน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน ได้แก่ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน พาราฟินชนิดที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงและวง (linear and cyclic paraffins) อัลเคนชนิดที่มีโครงสร้างเป็นวง และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Jirasripongpun, 2002) น้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์มีการเติมสารเพิ่มคุณภาพ (chemical additives) เช่น เอสเทอร์ อัลฟา-โอลิฟิน (α -olefin) อัลคิลเลทแนพทาซีน (alkylated naphthalenes) ได-ฟีนิลลามีน (di-phenylamines) ซึ่งทำหน้าที่ในการชะล้างและกระจายสิ่งสกปรก ป้องกันสนิมและการกัดกร่อน ด้านทานการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ป้องกันการสึกหรอ เพิ่มค่าดัชนีความข้นใส และลดจุดไหลเท การผลิตน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์สามารถลดปริมาณพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs) ที่เป็นสารอันตรายลงได้ และอาจเพิ่มสมบัติการถูกย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ แต่การใช้งานน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ยังคงมีเปอร์เซ็นต์น้อยมากเมื่อเทียบกับน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน

Irwin และคณะ (1997) รายงานว่าน้ำมันหล่อลื่นชนิดใช้แล้วมี PAHs ชนิด ไดเบนซี [เอ, ซี] แอนทราซีน (dibenz [a, c] anthracene) 4-เมทิลไพรีน (4-methylpyrene) ฟลูออแรนทีน (fluoranthene) เบนซี [เอ] แอนทราซีน (benz [a] anthracene) เบนโซ [อี] ไพรีน (benzo [e] pyrene) เบนโซ [จี, เอช, ไอ] เพอร์ลิเนน (benzo [g, h, i] perylene) และ เบนโซ [เอ] ไพรีน ในปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่าน้ำมันหล่อลื่นชนิดที่ยังไม่ใช้งานถึง 36, 49, 253, 720, 1, 112, 4,770 และ 7,226 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ Baker และคณะ (2002) พบการปนเปื้อนของสาร MTBE (Methyl Tert-Butyl Ether) และ BTEX (Benzene Toluene Ethylbenzene Xylene) ในน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้งานแล้ว แต่ไม่พบสารทั้งสองกลุ่มนี้ในน้ำมันหล่อลื่นบริสุทธิ์ที่ยังไม่ผ่านการใช้งาน ทำให้น้ำมันหล่อลื่นที่ใช้งานแล้วส่งผลเสียต่อระบบนิเวศที่ปนเปื้อนในระยะยาว นอกจากนี้ Mandri และ Lin (2007) รายงานว่าการสัมผัสน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่ความเข้มข้นสูงๆ เป็นระยะเวลาานาน อาจจะทำให้เป็นโรคไต โรคตับ หรือทำให้เกิดอันตรายต่อไขกระดูกได้

น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเป็นแหล่งกำเนิดใหญ่ที่สุดของมลพิษน้ำมันในน้ำทะเล (Kawakami และ Nishimura, 1981) GESAMP (1993) รายงานว่าทั่วโลกมีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่เข้าสู่ระบบ

นิเวศทะเลประมาณ 4.4% ต่อปี ซึ่งการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้งานแล้ว จะทำให้เกิดผลเสียต่อคุณภาพน้ำทะเลได้มากกว่าผลกระทบเนื่องจากน้ำมันรั่วไหล เนื่องจากน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วปริมาณเพียง 1 ลิตร จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำทะเลในปริมาณสูงถึง 1 ล้านลิตร (Adelowo และคณะ, 2006) นอกจากนี้ น้ำมันหล่อลื่นที่ใช้งานแล้วจะมีสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนและโลหะหนักในปริมาณสูงกว่าน้ำมันหล่อลื่นบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตสูงกว่า สำหรับในประเทศไทยมีการใช้น้ำมันหล่อลื่นทั้งในยานพาหนะ อุตสาหกรรม เกษตรกรรม การประมง สถานีบริการเชื้อเพลิง และกิจกรรมอื่นๆ โดยกลุ่มประมงมีการใช้น้ำมันหล่อลื่น 16.9 ล้านลิตร/ปี (ศิริพร แก่นสียา, 2546) การใช้งานน้ำมันหล่อลื่นในกิจกรรมต่างๆ ดังกล่าวทำให้เกิดน้ำมันเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 212.5 ล้านลิตรในปี พ.ศ. 2536 เป็น 220, 243 และ 252 ล้านลิตร/ปี ระหว่างปี พ.ศ. 2537-2539 (จันทร์เพ็ญ ขำแก้ว, 2540) และมีปริมาณกว่า 230 ล้านลิตร/ปี ใน พ.ศ. 2546 (ศิริพร แก่นสียา, 2546)

น้ำมันปริมาณเพียงเล็กน้อยที่รั่วไหลลงสู่ทะเล จะทำให้มีสารไฮโดรคาร์บอนละลายในน้ำทะเลในระดับความเข้มข้นที่สูงเกินมาตรฐาน ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศโดยรวมทั้งส่วนประกอบที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ยิ่งไปกว่านั้นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมัน ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารก่อมะเร็ง และสารที่มีผลต่อระบบประสาท (Spence และคณะ, 2005) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในระบบนิเวศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำทะเลชายฝั่งที่มีความสำคัญในแง่เป็นเขตเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เขตเศรษฐกิจ แหล่งนันทนาการ การเกิดน้ำมันปนเปื้อนในน้ำทะเลชายฝั่งเกิดผลเสียต่อชุมชน ทั้งในรูปของผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของมนุษย์เนื่องจากการสัมผัส การรับประทานสัตว์ทะเลที่มีสารไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อน หรือผลกระทบทางอ้อมจากผลเสียที่เกิดกับระบบนิเวศชายฝั่ง ซึ่งในที่สุดก็เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจโดยรวม

2.1.3 ปัญหาการทิ้งน้ำขังใต้ท้องเรือที่ปนเปื้อนน้ำมัน (bilge oil)

น้ำเสียจากท้องเรือที่ถูกปล่อยลงสู่ทะเลมักปนเปื้อนด้วยของเสียน้ำมัน (bilge oily waste) ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันหล่อลื่น น้ำมันดีเซลที่มักใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์เรือ น้ำมันไฮดรอลิครวมถึงสารเคมีหลายชนิดจากส่วนเครื่องกลเรือ เช่น ตัวทำละลาย สารชะล้าง รวมถึงโลหะหนัก เช่น สารหนู ทองแดง แคดเมียม โครเมียม ตะกั่ว นิกเกิล ปรอท ซีลีเนียม และสังกะสี (Ghidossi และคณะ, 2009; Sun และคณะ, 2009) ปริมาณการปล่อยน้ำเสียจากท้องเรือในเขตต่างๆ ทั่วโลก มีค่าเป็น 188,000 ตัน/ปี ในปี ค.ศ. 2007 (GESAMP) กิจกรรมต่างๆ ของเรือ และท่าเทียบเรือ ทำให้การ

ปล่อยน้ำเสียจากท้องเรือเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีรายงานต่างๆ ที่พบว่าการปล่อยน้ำมันจากน้ำซังใต้ท้องเรือลงสู่ทะเล เป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญของมลพิษน้ำมันในหลายภูมิภาคทั่วโลก เช่น Chandru และคณะ (2008) พบว่าการปล่อยน้ำเสียเป็นน้ำมันจากเรือที่จอดบริเวณท่าเรือทั้งหมด 6 แห่ง ในเขตชายฝั่งทะเลด้านตะวันออกของคาบสมุทรมาเลเซีย เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดน้ำมันปนเปื้อนในเขตชายฝั่งทะเลดังกล่าว Ferraro และคณะ (2007) รายงานเกี่ยวกับมลพิษน้ำมันในเขตทะเลเมดิเตอร์เรเนียนซึ่งมีแหล่งกำเนิดสำคัญมาจากกิจกรรมของเรือ Al-Thukair และคณะ (2007) พบว่าระบบนิเวศทะเลของจังหวัดชายฝั่งทะเลด้านตะวันออกของประเทศซาอุดีอาระเบียที่มีปัญหามลพิษน้ำมัน มีสาเหตุหนึ่งจากการทิ้งน้ำเสียจากเรือต่างๆ นอกจากนี้ Cram และคณะ (2006) รายงานว่าน้ำซังใต้ท้องเรือเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญของไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลของอ่าวเม็กซิโก สำหรับในประเทศไทย กรมควบคุมมลพิษ ฝ่ายมลพิษทางทะเล (2552) รายงานว่าโอกาสเกิดคราบน้ำมันในทะเลจากการลักลอบปล่อยน้ำล้างถังน้ำมัน และการสูบน้ำเสียจากท้องเรือ มีถึงร้อยละ 22 จากรายงานต่างๆ จะเห็นได้ว่าน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมันที่ถูกปล่อยจากท้องเรือเป็นแหล่งกำเนิดสำคัญของมลพิษน้ำมันในทะเล

ประเทศไทยก็พบการปล่อยน้ำเสียจากท้องเรือลงสู่ทะเลเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเรือประมงขนาดเล็กมักจะปล่อยน้ำเสียจากท้องเรือลงสู่ทะเลโดยตรง เนื่องจากไม่ได้ติดตั้งเครื่องแยกน้ำมันไว้ทำให้เกิดปัญหามลพิษน้ำมันแบบเรือร้าง น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วจากเครื่องยนต์เรือประมงมักมีลักษณะหนืด สีดำ ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุต่างๆ ได้แก่ เครื่องหลวม ทำให้เขม่าลงไปปนกับน้ำมันเครื่อง นอกจากนี้อาจเกิดจากชิ้นส่วนเครื่องยนต์ภายในที่สกปรกมาก เพราะเป็นเครื่องเก่า หรือน้ำมันเก่าที่ถูกทิ้งไว้จนจนตกตะกอนในท้องเรือ และไม่ได้ทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างเครื่องยนต์ ดังนั้นเมื่อเติมน้ำมันใหม่เข้าไปจึงไปชะล้างตะกอนออกมาเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้สีดำของน้ำมันเครื่องใช้แล้วอาจเกิดจากเครื่องยนต์ทำงานรอบสูงหนัก ๆ และเกิดการสึกหรอมาก จนน้ำมันไปล้างสิ่งสกปรกออกมามาก ซึ่งปริมาณการปนเปื้อนและองค์ประกอบของ bilge oil จากเรือแต่ละลำมีค่าแตกต่างกัน ขึ้นกับสภาพเครื่องยนต์ และกิจกรรมของเจ้าของเรือเป็นสำคัญ กล่าวคือถ้าเครื่องยนต์มีสภาพหลวม ถูกใช้งานหนัก ก็จะทำให้มีปริมาณการรั่วไหลของน้ำมันมากขึ้นตามไปด้วย และทำให้มีคราบน้ำมันปริมาณมากปนเปื้อนในน้ำท้องเรือ (รูปที่ 2.2)



ก



ข

รูปที่ 2.2 สภาพห้องเครื่องยนต์ใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็กลำหนึ่งในอ.แหลมสิงห์ จ.จันทบุรี (ก) และลักษณะของน้ำขังใต้ท้องเรือปนเปื้อนคราบน้ำมัน (ข)

น้ำมันหล่อลื่นที่ใช้งานสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงขนาดเล็กมีหลายชนิด เช่น ในท่าเรือประมงสิงห์อำเภวย จ.จันทบุรี และท่าเรือประมงแหลมงอบ ในจ.ตราด นิยมใช้น้ำมันหล่อลื่นยี่ห้อ เทรนซูเปอร์ เอชดี (Trane Super HD), สเตทส์ ซูเปอร์ เอชดี (States Super HD), ดีเซล ดี-3 พลัส (Diesel D-3 Plus), ซูเปอร์เดอรัลด์ เอชดี 40 (Super Deluxe HD 40), ลอง เดรน (Long Drain) และไดนามิกส์ (Dynamic) (จวน ผาหนองสิง, สัมภาษณ์, 12 สิงหาคม 2553) โดยปกติน้ำเสียจะถูกสูบถ่ายออกจากท้องเรือเมื่อปริมาณน้ำสูงถึงระดับที่ตั้งไว้ โดยที่อัตราการปล่อยน้ำเสียขึ้นกับขนาดและอายุการใช้งานของเรือ จากข้อมูลข้างต้นจะพบว่าน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญของมลพิษในทะเล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องบำบัดน้ำท้องเรือก่อนที่จะปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม

2.1.4 สถานภาพของประเทศไทยต่อการแก้ปัญหาพิษของเสียจากเรือ

ในปัจจุบันทั่วโลกต่างตระหนักถึงความสำคัญของปัญหาพิษของเสียจากเรือ จึงได้จัดทำอนุสัญญาระหว่างประเทศว่าด้วยการป้องกันมลพิษจากเรือ (MARPOL) เพื่อดูแลป้องกันสิ่งแวดล้อมทางทะเล โดยกำหนดให้เรือที่มีน้ำหนักเกิน 400 ตันกรอส จะต้องติดตั้งเครื่องแยกน้ำมันไว้ในเรือ เพื่อให้แยกน้ำมันที่ปนเปื้อนอยู่กับน้ำใต้ท้องเรือก่อนสูบถ่ายออกสู่ภายนอก โดยเรือจะต้องปล่อยน้ำเสียที่มีปริมาณน้ำมันปนเปื้อนไม่เกิน 15 มก./ล. ในระยะห่างอย่างน้อย 12 ไมล์ทะเลจากฝั่ง (Sun และคณะ, 2009; Korbahiti และ Artut, 2010) ประเทศไทยให้สัตยาบันในการเข้าเป็นภาคีอนุสัญญา MARPOL ต่อองค์การทางทะเลระหว่างประเทศและมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2551 (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2554) ข้อบังคับของอนุสัญญา MARPOL จะครอบคลุมถึงการ

ควบคุมมลพิษทุกอย่างที่เกิดขึ้นจากการปฏิบัติงานตามปกติของเรือ ทั้งนี้เพื่อให้สอดคล้องกับอนุสัญญา MARPOL 73/78 รัฐบาลไทยจึงกำหนดนโยบายด้านการลดปัญหามลพิษทางทะเล โดยดำเนินกิจกรรมต่างๆ เช่น โครงการจัดตั้งอุปกรณ์รองรับกากของเสียปนน้ำมันจากเรือ ณ ท่าเรือแหลมฉบัง ดำเนินงานโดยบริษัทบริหารและพัฒนาเพื่อการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม จำกัด (มหาชน) (เจนโก้) และการท่าเรือแห่งประเทศไทย เพื่อจัดการกับมลพิษต่างๆ ที่มาจากเรือ นอกจากนี้ยังได้เริ่มโครงการนำร่องการรวบรวมของเสียจากเรือโดยเฉพาะน้ำมันเสีย ดำเนินโครงการโดยบริษัทโกลบอล ยูทิลิตี้ เซอร์วิส (GUSCO) ซึ่งของเสียจากจากเรือทุกลำที่ใช้บริการของท่าเรืออุตสาหกรรมมาบตาพุด จะถูกสูบน้ำถ่ายและขนส่งไปยังโรงงานปรับปรุงคุณภาพน้ำมันเสีย โดยการนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนในเตาเผาอุณหภูมิสูง ของกลุ่มโรงปูนซีเมนต์ และกลุ่ม Oil Blender (บริษัทโกลบอล ยูทิลิตี้ เซอร์วิส, 2554)

นอกจากนี้รัฐบาลได้เห็นชอบให้มีคณะกรรมการเฉพาะกิจ เพื่อพิจารณากำหนดมาตรการและแผนปฏิบัติการในรายละเอียดเพื่อป้องกันและแก้ไขปัญหาน้ำมันรั่วไหล เช่น กำหนดมาตรฐานการสูบน้ำถ่ายน้ำมันกลางทะเล รวมถึงออกประกาศกรมเจ้าท่า ที่ 498/2541 เรื่อง การป้องกันน้ำมัน หรือเคมีภัณฑ์ หรือสิ่งปนเปื้อนอันตรายขณะขนถ่ายทางน้ำ (กรมควบคุมมลพิษ, ส่วนแหล่งน้ำทะเล, 2554) ออกประกาศกรมเจ้าท่าที่ 329/2545 และประกาศกรมการขนส่งทางน้ำและพาณิชยนาวีที่ 143/2546 ให้เขตท่าเรือต่างๆ เป็นเขตที่ต้องจัดการบริการรองรับของเสียจากเรือ โดยในปัจจุบันมีผู้ให้บริการจัดเก็บและบำบัดของเสียจากเรือที่ได้รับอนุญาตจากกรมโรงงานอุตสาหกรรมทั้งสิ้น 20 บริษัท (กรมเจ้าท่า, 2554) เช่น บริษัทพลูตาหลวง จำกัด ที่ให้บริการรับจัดเก็บและบำบัดของเสียจากเรือเดินทะเล (บริษัทพลูตาหลวงวิเซเคิล จำกัด, 2554) ในส่วนของกรมควบคุมมลพิษได้พัฒนาเทคโนโลยีในการลดมลพิษทางทะเล โดยพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ที่ใช้คาดการณ์แนวทางการเคลื่อนตัวของคราบน้ำมันในทะเล พัฒนาระบบสนับสนุนการตัดสินใจในการขจัดคราบน้ำมัน และระบบประเมินความเสี่ยงการเกิดคราบน้ำมันในทะเล เพื่อให้เป็นแนวในการเลือกเทคนิคขจัดคราบน้ำมันที่มีความเหมาะสม และมีประสิทธิภาพสูงสุดระหว่างที่เกิดน้ำมันรั่วไหลในทะเล (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรมควบคุมมลพิษ, 2554) นอกจากนี้ยังมีการจัดตั้งคณะทำงานอาเซียนด้านสิ่งแวดล้อมทางทะเล กำหนดกรอบการดำเนินงานด้านการวางแผนปฏิบัติการระดับชาติ เพื่อป้องกันความเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อมทางทะเลจากการทิ้งของเสีย และน้ำเสียที่มีน้ำมันปนเปื้อนจากเรือ (กรมควบคุมมลพิษ, ส่วนแหล่งน้ำทะเล, 2547) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่า ในปัจจุบันประชาคมทุกภาคส่วนต่างตระหนักถึงความสำคัญของปัญหามลพิษจากเรือ

ดังนั้นประเทศไทยจำเป็นต้องพัฒนาเทคโนโลยีการบำบัดน้ำมันเสียที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือก่อนปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม

2.2 การบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลด้วยวิธีชีวภาพ

2.2.1 ความหมาย

การลดปริมาณน้ำมันที่ปนเปื้อนโดยวิธีชีวภาพ (bioremediation) หมายถึง การใช้สิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (biodegradation) เพื่อฟื้นฟูสภาพสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์เหล่านี้มักเป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในพื้นที่ปนเปื้อน การใช้เทคนิคชีวภาพเพื่อลดมลพิษน้ำมันในสิ่งแวดล้อมที่ได้ผลสมบูรณ์ คือการที่จุลินทรีย์ย่อยน้ำมันสามารถเปลี่ยนโครงสร้างของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจนได้เป็นน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ สารอนินทรีย์ชนิดต่างๆ และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ นอกจากนี้ bioremediation ยังมีความหมายรวมถึงการเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของน้ำมันไปเป็นสารมัธยันตร์ที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนชนิดต่างๆ โดยจุลินทรีย์ การบำบัดเชิงชีวภาพของคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเลมีข้อดีเนื่องจากเสียค่าใช้จ่ายต่ำ เริ่มเป็นที่ยอมรับมากขึ้นในปัจจุบัน และเป็นเทคโนโลยีที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม เพราะอาจกำจัดคราบน้ำมันได้อย่างสมบูรณ์ สอดคล้องกับรายงานของ Das และ Chandran (2011) ที่พบว่าการใช้เทคนิคทางกายภาพเพื่อลดการปนเปื้อนของน้ำมันในสิ่งแวดล้อมมีข้อเสีย เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง และมีประสิทธิภาพต่ำในการกำจัดน้ำมัน อีกทั้งในปัจจุบันมีข้อห้ามการเผาหรือฝังกลบกากน้ำมันที่มีปริมาณมากๆ อย่างไรก็ตามการใช้วิธีทางชีวภาพในการบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ใช้เวลานาน มีความยุ่งยากในการเตรียมหัวเชื้อ จึงไม่สะดวกในการนำไปใช้งาน หรือต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้าน นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันที่นำเข้าจากต่างประเทศมักมีราคาแพง และอาจไม่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันเท่าที่ควร เนื่องจากประกอบด้วยสายพันธุ์จุลินทรีย์จากต่างถิ่นซึ่งมักไม่สามารถเพิ่มจำนวนในสิ่งแวดล้อมที่ใช้งานได้

จากรายงานของ Tyagi และคณะ (2010) แบ่งวิธีชีวภาพที่ใช้บำบัดคราบน้ำมันในทะเลออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ วิธีกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ (biostimulation) โดยเติมสารอาหารหรือสารตั้งต้นลงไปใต้น้ำทะเล เพื่อส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นให้สามารถนำน้ำมันไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ อีกวิธีหนึ่งคือการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันลงไปใต้น้ำทะเล (bioaugmentation) ในกรณีนี้ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่ได้คัดเลือกและศึกษากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันในห้องปฏิบัติการแล้ว โดยเชื้อที่ใช้อาจมีสมบัติอื่นเพิ่มเติม เช่น ทน

ความเข้มข้นสูงของน้ำมันได้ดี สามารถเจริญได้ในน้ำทะเลที่มีปริมาณเกลือสูง หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (transformation) ของโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำมันหล่อลื่นได้ โดยทั่วไปน้ำทะเลชายฝั่งมักมีปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันมากกว่าในทะเลเปิด (Radwan และคณะ, 1999) เนื่องจากเป็นแหล่งรองรับน้ำเสียที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันจากท่าเรือ ท่าเรือประมง และกิจกรรมต่างๆ บริเวณชายฝั่ง และยังสามารถนำวิธีชีวภาพมาใช้บำบัดคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำทะเลชายฝั่งที่เป็นเขตน้ำตื้น พื้นที่แคบและมีคลื่นลมไม่แรงมาก เช่น บริเวณท่าเรือประมง ในขณะที่วิธีนี้ไม่สามารถใช้ได้ผลในการขจัดคราบน้ำมันในทะเลเปิด เพราะเชื้อหรือสารอาหารที่เติมลงไปจะมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากถูกชะล้างออกไป หรือถูกทำให้เจือจาง (Lee และ Merlin, 1999; Radwan และคณะ, 2002)

2.2.2 ตัวอย่างรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำมันด้วยวิธีชีวภาพ

ตัวอย่างรายงานวิจัยด้านการใช้วิธีชีวภาพในการกำจัดมลพิษน้ำมันในสิ่งแวดล้อมในประเทศ ไทย ยกตัวอย่างเช่น อภิรดี สุวรรณวงศ์ (2547) พัฒนาการเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเตชันในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* MU 01 โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) และสามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ PMU 01 ที่มีประสิทธิภาพย่อยน้ำมันดิบมากขึ้นกว่าเดิม และนิอร ภูรัตน์ (2545) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบและการพัฒนาของไบโอฟิล์มโดยแบคทีเรีย *Acinetobacter calcoaceticus* ในระบบ batch reactor ผลการทดลองพบว่าเชื้อนี้สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยย่อยสารไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดได้ 80.39% และย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสายตรงในน้ำมันดิบ (C₉-C₃₀) ได้ 77.39% และพบว่าเชื้อสร้างไบโอฟิล์มโดยมีค่าความหนา 113.32 ไมครอน นอกจากนี้วันดร วิชัยสกุล (2544) รายงานการใช้ปุ๋ยที่สามารถละลายในน้ำมันในการกำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ RBC 109 สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีน้ำมันดิบปนเปื้อนอยู่ไม่เกินร้อยละ 1 (v/v) ในน้ำที่มีระดับความเค็มตั้งแต่ 0 ถึง 30 ส่วนในพันส่วน และพบว่าการใช้ปุ๋ยที่สามารถละลายในน้ำมันสูตร 2 ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 32.5 กรัมต่อลิตร และฟอสฟอรัส 3.25 กรัมต่อลิตร ทำให้อัตราการลดลงของไฮโดรคาร์บอนมีค่าร้อยละ 29.1 ที่เวลา 120 ชั่วโมงของการทดลอง และกุลวดี ทองภูเบศร์ (2541) ได้แยกเชื้อย่อยน้ำมันดิบจำนวน 127 ชนิด โดยใช้อาหาร Bushnell Haas (BH) ที่มีน้ำมันดิบ Tapis 1% พบว่ากลุ่มเชื้อ M14 มีประสิทธิภาพสูงในการลดปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด และอัลเคนในช่วง C₉-C₃₃ ได้ 69% และ 86% ภายในเวลา 1 วัน ส่วนนัทศน์ เพราแก้ว (2541) รายงานการคัดแยกจุลินทรีย์ประจำถิ่น *Pseudomonas* sp. JM-5 ที่สามารถเจริญ

และกำจัดคราบไขมันดิบได้ดีในภูมิภาคพื้นเมือง (25-37 องศาเซลเซียส) ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน ทั้งในน้ำจืดและในน้ำเค็ม ในช่วง pH 6 - 8 ขณะที่เชื้อกำจัดคราบไขมันจากต่างประเทศไม่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิดังกล่าว นอกจากนี้ยังได้ทดสอบการใช้เซลล์ในระบบบำบัดน้ำเสียจำลอง และพบว่าสามารถกำจัดคราบไขมันที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียจากสถานีบริการน้ำมัน Esso PTT และในอาหารที่เตรียมขึ้นได้ในอัตราร้อยละ 100, 99.7 และ 99.4 ตามลำดับ

Quek และคณะ (2006) รายงานว่าการเติมกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดคราบไขมันปนเปื้อนในน้ำทะเลชายฝั่ง จะให้ผลดีกว่าการเติมสารอาหารลงไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อประจำถิ่น ในกรณีที่มีสารที่ย่อยสลายได้ยากอยู่ในองค์ประกอบของไขมัน มีการลดปริมาณของสารอาหาร มีการสะสมสารมัธยันต์ที่เป็นพิษซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนรูปของไขมัน การที่เชื้อเปลี่ยนไปใช้แหล่งคาร์บอนอื่นหรือมีจุลินทรีย์ย่อยไขมันอยู่ปริมาณน้อยในน้ำทะเล นอกจากนี้ Obuekwe และ Al-Muttawa (2001) ยังพบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ไม่มีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบที่มีอยู่ในน้ำมันได้ทุกชนิด ซึ่ง NMRL (Naval Materials Research Laboratory, Amherst) ได้เสนอวิธีบำบัดคราบไขมันปนเปื้อนบริเวณท่าเรือ โดยเติมกลุ่มแบคทีเรียทะเล 5 ชนิด ที่สามารถย่อยสลายไขมันและสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ลงไปในระบบทดสอบที่จำลองการเคลื่อนตัวของคลื่นในทะเล พร้อมทั้งเติมสารอาหารลงไปในระบบทดสอบด้วย ผลการทดลองพบว่าคราบไขมันเกิดการกระจายตัวเป็นอิมัลชัน เนื่องจากผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำให้แบคทีเรียนำน้ำมันเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น และการเติมสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ทำให้แบคทีเรียย่อยน้ำมันมีอัตราการอยู่รอดสูง เกิดผลดีต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของคราบไขมันที่เกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง (Pavitrans และคณะ, 2006)

2.2.3 จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเล

มีจุลินทรีย์กลุ่ม แบคทีเรีย และรา หลายชนิด ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเล โดยแบคทีเรียประจำถิ่นในน้ำทะเลที่มีบทบาทเด่นในการย่อยน้ำมัน แสดงข้อมูลในตารางที่ 2.2 ซึ่งประกอบด้วย *Pseudomonas* *Thalassolituus* *Alcanivorax* *Pseudoalteromonas* *Oleibacter* *Corynebacterium* *Cycloclasticus* *Oleispira* *Oleiphilus* *Planococcus* *Vibrio* *Marinomonas* *Alteromonas* *Nocardia* *Rhodococcus* *Gordonia* *Neptunomonas* *Marinobacter* *Planomicrobacterium* *Caulobacter* *Halomonas* พบว่ากลุ่มแบคทีเรียทะเลเหล่านี้สามารถย่อยน้ำมันดิบ น้ำมันเตา และองค์ประกอบของน้ำมัน ได้แก่ อัลเคน พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เรซิน และแอสฟัลทีน

สำหรับราและยีสต์ มีบทบาทเด่นในการย่อยสลายความชื้นที่สะสมอยู่ในดินตะกอนก้นทะเล หรือที่บริเวณผิวน้ำ ได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus* *Penicillium* *Fusarium* *Amorphoteca* *Neosartorya* *Paecilomyces* *Talaromyces* *Graphium* ยีสต์ในสกุล *Candida* *Yarrowia* และ *Pichia* (Chaillana และคณะ, 2004; Kaczorek และคณะ, 2008) ส่วนราที่สามารถย่อยน้ำมันได้ คือ *Dendryphiella* *Corollospora* *Varicosporina* *Lulworthia* ซึ่งเป็นราที่อาศัยอยู่กับหญ้าทะเล เอนไซม์ที่สำคัญจากราและยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยน้ำมัน คือ ไซโตโครม พี450 โมโนออกซิจีเนส (cytochrome P450 monooxygenases) ซึ่งจะออกซิไดส์ PAHs ไปเป็นไดไฮโดรไดออกอล ฟีนอล และสารมัธยันตร์ชนิดอื่นๆ และมีราบางชนิด เช่น *Phanerochaete chrysosporium* ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันอย่างสมบูรณ์จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (Kirk และ Gordon, 1988; Kirk และคณะ, 1991; van Beilen และคณะ, 2003)

ตารางที่ 2.2 ชนิดของแบคทีเรียทะเลที่ย่อยสลายคราบน้ำมัน

ชนิดแบคทีเรีย	องค์ประกอบน้ำมัน/ชนิดน้ำมัน	อ้างอิง
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	อัลเคนสายยาว น้ำมันเตา	Chaerun และคณะ, 2004
<i>Thalassolituus oleivorans</i>	อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน	Yakimov และคณะ, 2004
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	อัลเคน	de Lorenzo, 2006
<i>Pseudoalteromonas</i>	อัลเคนสายสั้น	Lin และคณะ, 2009
<i>Oleibacter marinus</i>	อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน	Teramoto และคณะ, 2011
<i>Corynebacterium</i>	น้ำมันดิบ	Mazzella และคณะ, 2005
<i>Cycloclasticus pugetii</i>	อะโรมาติก	Head และคณะ, 2006
<i>Oleispira antarctica</i>	อัลเคน	Head และคณะ, 2006
<i>Oleiphilus messinensis</i>	อัลเคน	Head และคณะ, 2006
<i>Thalassolituus oleivorans</i>	อัลเคน	Head และคณะ, 2006
<i>Planococcus</i>	ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	Harayama และคณะ, 2004
<i>Vibrio</i>	ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	Harayama และคณะ, 2004
<i>Marinomonas</i>	ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	Harayama และคณะ, 2004
<i>Alteromonas</i>	ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	Harayama และคณะ, 2004
<i>Nocardia</i>	อัลเคนสายยาว	Quatrini และคณะ, 2008
<i>Rhodococcus</i>	อัลเคนสายยาว	Quatrini และคณะ, 2008
<i>Gordonia</i>	อัลเคนสายยาว	Quatrini และคณะ, 2008
<i>Neptunomonas naphthovorans</i>	อะโรมาติก	Head และคณะ, 2006
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	อัลเคน	Head และคณะ, 2006
<i>Planomicrobacterium alkanoclasticum</i>	อัลเคน	Head และคณะ, 2006
<i>Caulobacter</i>	อัลเคน อะโรมาติก เรซิน แอสฟัลทีน	Nakaumra และคณะ. 2007
<i>Halomonas</i>	อัลเคน อะโรมาติก เรซิน แอสฟัลทีน	Nakaumra และคณะ. 2007

อย่างไรก็ดีพบว่าแบคทีเรียมีบทบาทในการย่อยสลายคราบน้ำมันในน้ำทะเลมากกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น และจะทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายปฐมภูมิในระบบนิเวศทางทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมัน (Das และ Chandran, 2011) นอกจากนี้พบว่ามีจำนวนชนิดของแบคทีเรียย่อยน้ำมันมากที่สุดเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น Head และคณะ (2006) พบว่าแบคทีเรียย่อยน้ำมันมีจำนวนใกล้เคียง 200 สายพันธุ์ ในขณะที่มีจำนวนไซยาโนแบคทีเรีย รา และสาหร่ายที่ย่อยสลายน้ำมันได้ รวมกันเท่ากับ 500 สายพันธุ์ เนื่องจากแบคทีเรียมีวิธีการย่อยน้ำมันหลายชนิดที่ไม่พบในรา ทำให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ มีรายงานการคัดแยกและศึกษากลุ่มแบคทีเรียต่างๆ จากพื้นที่ปนเปื้อนน้ำมันหลายแห่งในหลายภาวะและในระยะเวลาที่ต่างกัน โดยใช้ culture-independent technique และเทคนิคการคัดแยก ซึ่งได้ผลการศึกษาในลักษณะเดียวกันว่า แบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโปรติโอแบคทีเรีย (proteobacteria) เช่น *Pseudomonas Alcanivorax* และแบคทีเรียกลุ่ม CFB (*Cytophaga Flavobacterium Bacteroides*) มักเป็นแบคทีเรียชนิดเด่นที่เพิ่มจำนวนขึ้นภายหลังการเติมน้ำมันในระบบจำลอง (oil spill simulation) (MacNughton และคณะ, 1999; Quatrini และคณะ, 2008) และในพื้นที่บำบัดภายหลังการเติมสารอาหาร (Roling และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามพบว่ามีแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดที่มีปริมาณจี-ซี (G-C) ในองค์ประกอบของ DNA ในปริมาณสูง ซึ่งสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนชนิดสายยาว (C_{10} - C_{18}) ได้อย่างรวดเร็ว แต่มีแบคทีเรียจำนวนน้อยชนิดที่สามารถย่อยสลายอัลเคนสายสั้น (C_2 - C_8) ได้ เพราะโครงสร้างดังกล่าวนี้ถูกนำเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายจึงมีความเป็นพิษสูง มีตัวอย่างงานวิจัยที่พบว่ากลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกมีความสำคัญมากในการย่อยสลายสารเคมีในสิ่งแวดล้อม เช่น Quatrini และคณะ (2008) รายงานว่าแบคทีเรียแกรมบวกสามารถย่อยสลายสารพิษได้มากชนิด ทนความเข้มข้นของสารพิษได้สูง สามารถอยู่รอดได้นาน และสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายน้ำมันได้ดี

เมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานการค้นพบแบคทีเรียทะเลกลุ่มใหม่ที่เจริญโดยใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น (Obligate oil-degrading marine bacteria; OCHB) และแบคทีเรียกลุ่มนี้มีบทบาทอย่างมากในการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเล โดยมีชนิดของแบคทีเรียไม่มากนักจัดอยู่ในกลุ่ม OCHB ได้แก่ *Alcanivorax Marinobacter Thallassolitus Cycloclasticus Oleispira Planomicrobium Oleiphilus* ซึ่งในภาวะปกติจะมีจำนวนน้อยหรือไม่สามารถตรวจพบได้ แต่เชื่อกันว่ากลุ่มนี้จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วภายหลังมีน้ำมันปนเปื้อนในน้ำทะเล จากจำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรียกลุ่ม OCHB ที่รายงานโดย Yakimov และคณะ (2007) พบว่าเป็นสายพันธุ์ของ *Alcanivorax* ถึง 56% เช่น *A. borkumensis* SK2 เป็นต้น ที่มีการศึกษาแผนที่พันธุกรรม (genome

sequence) ของเชื้อ SK2 อย่างสมบูรณ์แล้ว (de Loren, 2006) และพบว่าปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ได้แก่ ละติจูด อุณหภูมิ ความเค็ม รีดอกซ์ และปัจจัยทางฟิสิกส์-เคมีอื่นๆ มีผลโดยตรงต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม OCHB ในน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมัน (Yakimov และคณะ, 2007) ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวกับการย่อยสลายน้ำมันโดยแบคทีเรียกลุ่ม OCHB เช่น Cui และคณะ (2010) รายงานการนำเชื้อผสมของ *Marinobacter* sp. PY97S ที่ย่อย PAHs กับ *Alcanivorax* sp. 22-CO-6 และ *Alcanivorax* sp. JZ9B มาทดสอบการย่อยน้ำมันพบว่า PY97S+22-CO-6 มีประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันเป็น 64.03 % ในขณะที่กลุ่มเชื้อ PY97S+ JZ9B สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ 86.89% โดยกลุ่มเชื้อดังกล่าวสามารถย่อยองค์ประกอบของน้ำมันที่เป็นอัลเคนและอะโรมาติกได้ในเวลาเดียวกัน รวมถึงสามารถย่อย PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเช่น ไครซีน (chrysene) ได้

2.2.4 วิธีการย่อยสลายอัลเคนสายยาว (long chain *n*-alkanes) และอะโรมาติก

ไฮโดรคาร์บอน

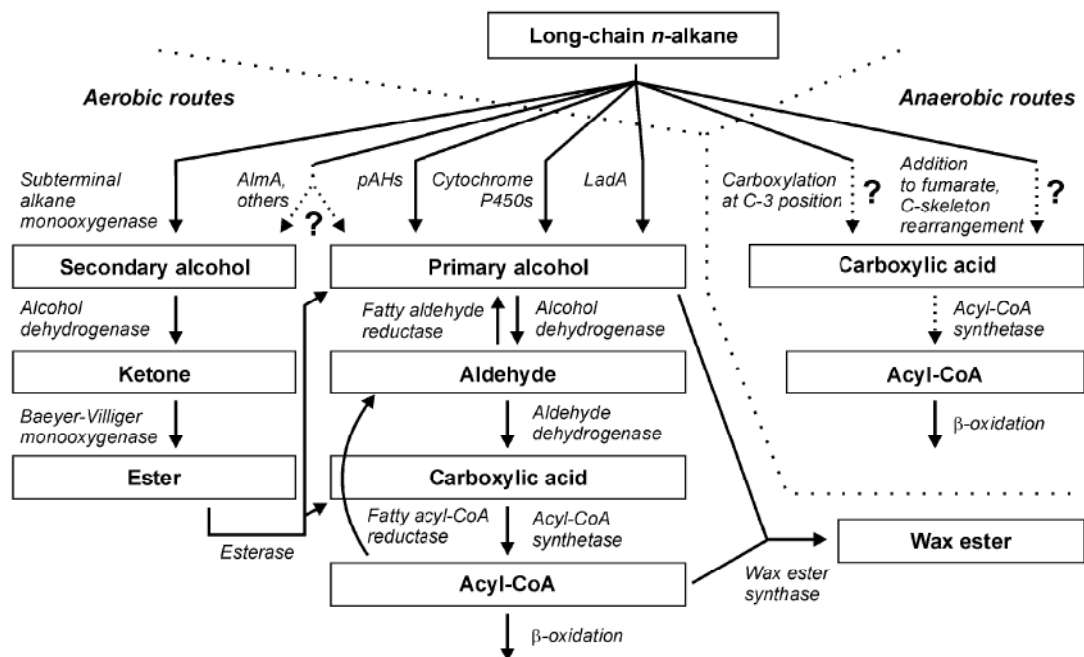
เนื่องจากองค์ประกอบหลักของน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้งานแล้วที่พบปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือ ได้แก่ อัลเคนที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนมาก และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนวงเบนซีนหลายวง รวมทั้งมีโลหะ เช่น ตะกั่ว รวมทั้ง สังกะสี แคลเซียม โคโรเนียม อาซีนิก และแบเรียม ในปริมาณเล็กน้อย ดังนั้นน้ำมันชนิดนี้จึงตกค้างได้นานในสิ่งแวดล้อม (Tong และคณะ, 1999) อัลเคนเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของน้ำมันพื้นฐาน (mineral oils) หลายชนิด มีโครงสร้างเป็นสายตรง (*n*-alkanes) เป็นวง (cycloalkanes) และเป็นกิ่งก้านสาขา (*iso*-alkanes) มีสมบัติไม่ละลายน้ำ และไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นจึงตกค้างอยู่ได้นานในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อน อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีระบบเอนไซม์และวิธีการย่อยสลายแบบจำเพาะ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ทำให้สามารถใช้ *n*-alkanes เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญได้ ดังนั้นจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของอัลเคนไปเป็นสารตัวกลางที่ย่อยสลายได้ง่าย แบคทีเรียหลายชนิดยังสามารถย่อยสลายอัลเคนสายยาว (มีจำนวนอะตอมคาร์บอน ≥ 10) ได้แก่ *Acinetobacter* *Alcaligenes* *Alcanivorax* *Arthrobacter* *Bacillus* *Brachy bacterium* *Burkholderia* *Desulfatibacillum* *Dietzia* *Geobacillus* *Gordonia* *Marinobacter* *Mycobacterium* *Paracoccus* *Planococcus* *Pseudomonas* *Rhodococcus* *Thalassolitus* *Thermooleophilum* *Thermus* *Weeksella* และ *Xylella* (Wentzel และคณะ, 2007) และมีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอัลเคนสายยาวที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล เช่น *Alcanivorax borkumensis* ซึ่งสามารถย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนสูงถึง C₃₂ (Kasai

และคณะ, 2002) และ *Thalassolituus oleivorans* ที่สามารถย่อยอัลเคนที่มี C_{20} (Yakimov และคณะ, 2004)

การย่อยสลายน้ำมันในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic conditions) เกิดขึ้นได้รวดเร็วและอาจนำไปสู่การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของน้ำมัน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ ออกซิจีเนส (oxygenase) (Das และ Chandran, 2011) แบคทีเรียที่ย่อยสลายอัลเคนสายยาวจะอาศัยกลไก หรือการสัมผัสโดยตรงระหว่างเซลล์ที่มีสมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์สูงและอัลเคน หรือการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำให้อัลเคนอยู่ในรูป emulsified hydrocarbons ที่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย (Bouchez-Naitali และคณะ, 1999) วิธีการย่อยสลาย *n*-alkanes ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน หรือในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.3

สำหรับการย่อยอัลเคนในภาวะที่มีออกซิเจน เกิดโดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้ผลิตภัณฑ์เริ่มต้น 2 ชนิด คือ แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (primary alcohol) และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ (secondary alcohol) ซึ่งแอลกอฮอล์ปฐมภูมิถูกย่อยได้ผลิตภัณฑ์เป็น อัลดีไฮด์ (aldehyde) กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) และ เอซิล-โคเอ (Acyl-CoA) ตามลำดับ ซึ่งเอซิล-โคเอจะถูกย่อยต่อโดยวิถีเบต้า-ออกซิเดชัน (*beta*-oxidation) หรือถูกเปลี่ยนโดย wax ester synthase ได้เป็นเอสเทอร์ของไข (wax ester) ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่จุลินทรีย์ย่อยน้ำมันให้เปลี่ยนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มากเกินไปเป็นสารสะสมพลังงานของเซลล์ โดย Manilla-Perez และคณะ (2010) รายงานว่าในภาวะไม่สมดุลของสารอาหาร (C:N:P) เนื่องจากมีน้ำมันปนเปื้อนในน้ำทะเลปริมาณสูง แบคทีเรียย่อยไฮโดรคาร์บอนบางสายพันธุ์ จะเปลี่ยนคาร์บอนที่มีมากเกินไปสะสมไว้ในเซลล์ในรูปสารประกอบไขมัน (storage lipid compounds) เช่น polyhydroxyalkanoates (PHAs) triacylglycerols (TAGs) หรือ wax esters (WEs) โดยในวิธีการย่อยอัลเคนในรูปที่ 2.3 แสดงว่าอาจมีการสะสมเอสเทอร์ของไขได้โดยตรงจากการเปลี่ยนโครงสร้างของแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ สำหรับแบคทีเรียบางชนิดที่มีเอนไซม์ alkane monooxygenase จะย่อยอัลเคนที่คาร์บอนก่อนตำแหน่งสุดท้าย (sub-terminal) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ ซึ่งจะถูกลดต่อไปเป็น คีโตน และเอสเทอร์ ตามลำดับ และเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) จะเปลี่ยนเอสเทอร์เป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ หรือ กรดคาร์บอกซิลิก

สำหรับการย่อยสลายอัลเคนในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จะเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นกรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งจะถูกลดต่อไปโดยเอนไซม์เอซิล-โคเอ ซินทีเทส (Acyl-CoA synthetase) ได้เป็น เอซิล-โคเอ (Acyl-CoA) ที่จะถูกลดต่อไปโดยวิถีเบต้า-ออกซิเดชัน



รูปที่ 2.3 วิธีการย่อยสลายอัลเคนสายยาวโดยแบคทีเรียในภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (Wentzel และคณะ, 2007)

การย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย เกิดจากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของอะโรมาติกหรือตัดหมู่แทนที่ในโครงสร้างออกไปตามวิถี peripheral ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารมัธยันตร์อะโรมาติกบางชนิด (central aromatic intermediates) หลังจากนั้นเอนไซม์ไดออกซิจีเนส จะเติมออกซิเจน 2 อะตอม ให้กับวงอะโรมาติกที่ตำแหน่งพันธะคู่ ทำให้เกิดการแตกวงได้ผลิตภัณฑ์เป็นทรานส์-ไดไฮโดรไดออล (*trans*-dihydrodiol) ซึ่งจะถูกลอกซิไดส์ไปเป็นสารอนุพันธ์ประเภทไดไฮดรอกซิล (dihydroxyl products) ได้แก่ แคทเธคอล (catechol) โปรโตแคทเธคูเอท (protocatechuate) และ เจนทิเสท (gentsate) สารทั้ง 3 ชนิดนี้ จะเกิดการย่อยสลายต่อไปเป็นสารมัธยันตร์ชนิดต่างๆ ในวิถีการสร้างพลังงานของเซลล์ (central metabolic pathway) (Atlas และ Bartha, 1998)

2.2.5 การบำบัดเชิงชีวภาพของน้ำขังใต้ท้องเรือที่ปนเปื้อนน้ำมัน

เนื่องจากน้ำขังใต้ท้องเรือประกอบด้วยน้ำทะเล น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันเชื้อเพลิง เช่น น้ำมันดีเซล และน้ำมันเตา จาระบี สารชะล้าง และสารลดแรงตึงผิว จึงทำให้ยากต่อการบำบัด นอกจากนี้องค์ประกอบของน้ำมันและสารต่างๆ ที่พบในน้ำมันจากท้องเรือมีสัดส่วนต่างกันขึ้นกับสภาพเครื่องยนต์และกิจกรรมของเจ้าของเรือ จากรายงานต่างๆ พบว่าวิธีที่ใช้บำบัดน้ำเสียท้องเรือมีหลายวิธี เช่น การกรองแบบละเอียดพิเศษ (ultrafiltration; UF) การเกิดออกซิเดชันของอากาศแบบเปียก (wet air oxidation) การทำให้สารจับตัวเป็นก้อนด้วยกระแสไฟฟ้า (electrocoagulation) ยูเอฟ/โฟโตคะตะไลติก ออกซิเดชัน (UF/photocatalytic oxidation) รวมถึงวิธีทางชีวภาพ (Korbahti และ Artut, 2010) โดยทั่วไปเรือขนาดใหญ่มักติดตั้งเครื่องแยกน้ำมันไว้ในเรือ เพื่อให้แยกน้ำมันที่ปนเปื้อนอยู่กับน้ำใต้ท้องเรือก่อนสูบน้ำออกสู่ภายนอกตัวเรือ (Aichele, 2008) นอกจากนี้ห้่องปฏิบัติการแห่งชาติ Lawrence Livermore ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้พัฒนาสารเคมีเพื่อใช้ดูดซับน้ำมัน (hydrophobic aerogels) ซึ่งเป็นสารไม่ชอบน้ำที่สามารถดูดซับน้ำมันได้ถึง 4 - 16 เท่าของน้ำหนักเจล นำมาใช้ซ้ำได้ดี และมีสถานะเป็นของแข็งทำให้ง่ายแก่การดักเก็บจากผิวน้ำ (Chemical and Engineering News, 2003) อย่างไรก็ตามการใช้วิธีทางกายภาพและทางเคมีเพื่อบำบัดคราบน้ำมันในน้ำเสียจากท้องเรือ ไม่สามารถขจัดน้ำมันได้อย่างสมบูรณ์ จึงควรใช้วิธีการทางชีวภาพในขั้นสุดท้าย เพื่อลดปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำเสียท้องเรือให้น้อยกว่า 15 มก./ล. ก่อนสูบน้ำออกนอกตัวเรือ ตามข้อบังคับของอนุสัญญา MARPOL

Olivera และคณะ (2003) รายงานว่าองค์ประกอบของน้ำมันจากท้องเรือประกอบด้วย *นอร์มัล-อัลเคน* ที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนในช่วง C_{11} - C_{30} และยังพบ *พริสเทิน ไอโซพรีนอยด์* (pristine isoprenoids) *ไฟเทน ไอโซพรีนอยด์* (phytane isoprenoids) และ *ไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย (unresolved complex mixture; UCM)* นอกจากนี้ น้ำมันจากท้องเรือยังประกอบด้วย PAHs ที่มีวงเบนซีน 2-4 วง โดยเฉพาะอะโรมาติกที่มีหมู่เมทิลแทนที่ตำแหน่งอะตอมคาร์บอน (methyl substituted) เป็นส่วนประกอบหลัก ได้แก่ (1) 2,3,5-ไตรเมทิล แนพทาลีน (2,3,5-trimethyl naphthalene) (2) ฟลูออรีน (fluorene) (3) ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) (4) แอนทราซีน (anthracene) (5) 3-เมทิล ฟีนแอนทรีน (3-methyl phenanthrene) (6) 2-เมทิล ฟีนแอนทรีน (2-methyl phenanthrene) (7) 9-เมทิล ฟีนแอนทรีน (9-methyl phenanthrene) (8) 1-เมทิล ฟีนแอนทรีน (1-methyl phenanthrene) (9) 2,7-ไดเมทิล ฟีนแอนทรีน (2,7-dimethyl phenanthrene) (10) ไพรีน (pyrene) และ (11) ไครซีน ส่วนอะโรมาติกของ bilge oil ประกอบด้วยสารไฮโดรคาร์บอนอันตรายที่เป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม จากรายงานต่างๆ

จะเห็นได้ว่าปัญหาน้ำเสียท้องเรือปนเปื้อนน้ำมันเป็นแหล่งกำเนิดสำคัญของมลพิษน้ำมันในทะเล ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีทางชีวภาพเพื่อลดปริมาณน้ำมันเสียที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำใต้ท้องเรือ ซึ่งควรเป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพ ประหยัดค่าใช้จ่ายและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

อย่างไรก็ดีการเติมจุลินทรีย์อิสระเพื่อย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในพื้นที่ซึ่งมีปัญหามลพิษน้ำมันอย่างต่อเนื่อง หรือมีน้ำมันปนเปื้อนในปริมาณมาก กลับพบว่าเชื้อมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว (Quek และคณะ, 2006) นอกจากนี้การเติมจุลินทรีย์อิสระในสิ่งแวดล้อมยังมีความยุ่งยากในการเตรียมและนำหัวเชื้อไปยังพื้นที่ปนเปื้อน (Gentry และคณะ, 2004) และในกรณีที่บริเวณน้ำทะเลที่ต้องการบำบัดคราบน้ำมันเป็นระบบน้ำนิ่ง เช่น บริเวณอ่าวปิดซึ่งคลื่นลมไม่แรง จะมีผลทำให้แบคทีเรียที่เติมลงไปใต้น้ำทะเลเกิดการตกตะกอน ไม่ลอยอยู่ที่ผิวน้ำน้ำทะเลซึ่งมีน้ำมันปนเปื้อน จึงทำให้การย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันเกิดได้ช้า (Lin และคณะ, 2005) จากข้อจำกัดของการใช้เซลล์อิสระเพื่อบำบัดคราบน้ำมันในน้ำทะเลดังกล่าว ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเติมจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในน้ำทะเลโดยการตรึงเซลล์ โดยเทคโนโลยีการผลิตเซลล์ตรึงของเชื้อย่อยน้ำมันที่พัฒนาขึ้นนี้ จะต้องสามารถลดปัจจัยจำกัดเนื่องจากการใช้เซลล์อิสระได้ และมีประสิทธิภาพดีในการลดปริมาณคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล

2.2.6 ผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมัน (Oil spill cleanup products)

ผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมัน หมายถึง สารเคมี สารอื่น หรือวัสดุที่ใช้ในการกำจัด หรือการกระจาย หรือการทำความสะอาดเมื่อมีน้ำมันรั่วไหลลงสู่แหล่งน้ำ เช่น แม่น้ำ ทะเล และสิ่งแวดล้อมอื่นๆ (กระทรวงอุตสาหกรรม, สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2548) การใช้ผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาความเสียหายเนื่องจากมลพิษน้ำมัน เพื่อให้การใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีเกณฑ์มาตรฐานเดียวกัน ได้คุณภาพและเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม กระทรวงอุตสาหกรรม สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2548) จึงได้กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมัน มาตรฐานเลขที่ มอก.2244-2548 ขึ้น โดยแบ่งผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมัน ดังนี้ (1) ผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันประเภทกระจายคราบน้ำมัน (dispersing agent, dispersant) (2) ผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันประเภทชะล้างคราบน้ำมัน (surface washing agent) (3) ผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันประเภทรวบรวมคราบน้ำมัน (surface collecting agent) และ (4) ผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันทางชีวภาพ (bioremediation agent หรือ bioremediant)

ผลิตภัณฑ์บำบัดน้ำมันทางชีวภาพ หมายถึง ผลิตภัณฑ์บำบัดน้ำมันประเภทที่มีจุลินทรีย์ หรือ เอนไซม์ช่วยย่อยสลายคราบน้ำมัน ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ หรือมีสารอาหารช่วยเร่งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติให้สามารถย่อยสลายคราบน้ำมันได้ หรืออาจประกอบกันทั้งสองอย่าง (กระทรวงอุตสาหกรรม, สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2548) ซึ่งสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental Protection Agency; USEPA) แบ่งประเภทของผลิตภัณฑ์บำบัดน้ำมันทางชีวภาพ ออกเป็น 1) bioaugmentation agents และ 2) biostimulation agents ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ประเภท เติมจุลินทรีย์ (MC) เติมสารอาหาร (NA) หรือ เติมเอนไซม์ (EA) ตามประกาศของ USEPA (2011) มีผลิตภัณฑ์บำบัดน้ำมันประเภท MC ทั้งหมด 12 ชนิด ประเภท EA 1 ชนิด และประเภท NA 5 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 รายชื่อผลิตภัณฑ์บำบัดน้ำมันตามประกาศของ USEPA (2011)

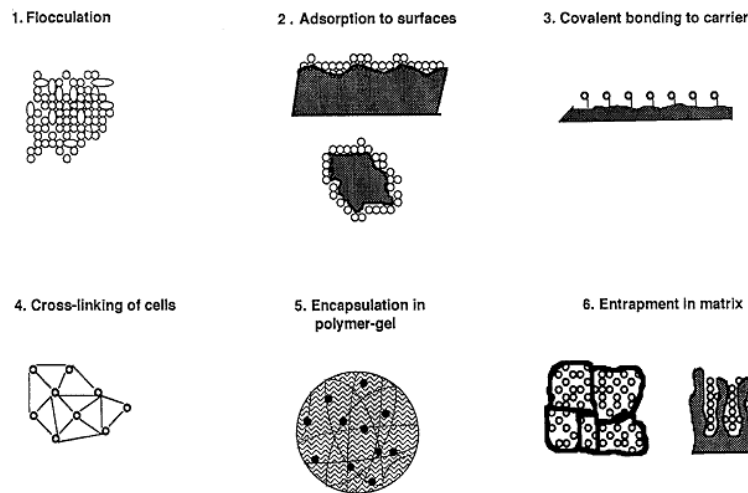
ผลิตภัณฑ์บำบัดน้ำมัน	ชนิด
SPILLREMEDIATION (MARINE)®	MC
OIL SPILL EATER II (OSE II)	EA
JE1058BS	NA
BIOWORLD BIOREMEDIATION HYDROCARBON TREATMENT PRODUCTS (BioWorld BHTP)	MC
MICRO-BLAZE®	MC
OPPENHEIMER FORMULA	MC
S-200 (aka, S-200C, SHEENCLEAN, BILGE CLEAR)	NA
STEP ONE (aka, B&S INDUSTRIAL)	MC
SYSTEM E.T. 20	MC
VB591™, VB997™, BINUTRIX®	NA
WMI-2000	MC
SOIL RX (aka, BIOREGEN HYDROCARBON)	MC/NA
PRO-ACT (aka, OILCLEAN w/ACTIVATOR)	MC/NA
BIOREM-2000 OIL DIGESTER™ (aka, BIOREM-2000 SC)	MC
DRYLET™ MB BIOREMEDIATION	MC
MUNOX SR®	MC

สำหรับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันที่มีใช้ในประเทศไทย มักเป็นชนิดที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ เช่น EmTec HC ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของสหรัฐอเมริกา มีส่วนผสมของแบคทีเรียจากธรรมชาติ สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้หลายชนิด ทั้งน้ำมันดิบ และน้ำมันที่กลั่นแล้ว เช่น แก๊สโซลีน ดีเซล น้ำมันเครื่อง (EmTec Management Ltd., 2009) อย่างไรก็ตามการนำผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันทางชีวภาพจากต่างประเทศมาใช้ภายในประเทศไทยอาจไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร เนื่องจากเชื้อหรือเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวถูกคัดแยกมาจากพื้นที่ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศต่างจากประเทศไทย จึงอาจทำงานได้ไม่ดีในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย ดังจะเห็นได้จากข้อเสนอของ Hosokawa และคณะ (2009) ซึ่งกล่าวถึงผลสำเร็จของการใช้จุลินทรีย์ประจำถิ่นมาใช้บำบัดมลพิษในพื้นที่เดิม (Autochthonous Bioaugmentation, ABA) ด้วยเหตุนี้จึงควรมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่สามารถย่อยน้ำมันได้จากระบบนิเวศทางทะเลที่มีปัญหามลพิษน้ำมันของประเทศไทย และนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันในสิ่งแวดล้อมทางทะเลของไทย ซึ่งนอกจากจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการบำบัดเชิงชีวภาพของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในระบบนิเวศทางทะเลของประเทศไทยแล้ว ยังประหยัดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันที่มีราคาแพงจากต่างประเทศอีกด้วย

2.3 การใช้เซลล์ตรึงเพื่อบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล

2.3.1 ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงและตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เซลล์ตรึงย่อยสลายน้ำมันในน้ำทะเล

การตรึงเซลล์ หมายถึง การเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุซึ่งเกิดโดยสมบัติเฉพาะของเซลล์ เช่น การสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ทำให้เซลล์รวมตัวกันเป็นก้อน และการทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงอยู่บนวัสดุ (Cohen, 2001) นอกจากนี้การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ยังมีความหมายรวมถึง “การจำกัดที่อยู่ของเซลล์ให้อยู่ในวัสดุที่เหมาะสม โดยที่เซลล์นั้นยังคงมีกิจกรรมหรือมีประสิทธิภาพตามที่ต้องการ” (Nedovic และคณะ, 2008) วิธีการตรึงเซลล์หมายถึงรูปแบบต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเซลล์ หรือการทำให้เซลล์ติดอยู่ในวัสดุ ซึ่ง Cassidy และคณะ (1996) แบ่งวิธีการตรึงเซลล์ดังนี้ (1) การจับกลุ่มของเซลล์ (2) การดูดซับของเซลล์บนผิววัสดุ (3) การสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์กับวัสดุตรึง (4) การเชื่อมกันของเซลล์ (5) การบรรจุเซลล์ในพอลิเมอร์ และ (6) การทำให้เซลล์ติดอยู่ในเมทริกซ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 วิธีการตรึงเซลล์ (Cassidy และคณะ, 1996)

จากปัญหาของการเติมจุลินทรีย์อิสระเพื่อบำบัดคราบไขมันในน้ำทะเล ทำให้มีการศึกษาวิธีการตรึงจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบนวัสดุ โดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้บำบัดน้ำมันมีข้อดีหลายประการ เช่น วัสดุตรึงจะเป็นแหล่งคุ้มกัน (protective niche) ให้กับเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในน้ำทะเล นอกจากนี้การมีเซลล์ปริมาณมากเกาะอยู่บนวัสดุตรึงจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายน้ำมันทางชีวภาพของน้ำมัน (Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001; Monohar และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังสามารถแยกเซลล์ตรึงออกจากระบบทดสอบและนำกลับมาใช้ซ้ำ (reusability) ได้ง่าย โดยที่ยังคงมีประสิทธิภาพดีในการกำจัดน้ำมัน (Das และ Chandran, 2011) และข้อดีด้านเศรษฐศาสตร์ของเทคโนโลยีการตรึงเซลล์ คือ ความคุ้มทุน เนื่องจากสามารถผลิตเซลล์ตรึงได้ปริมาณมากในคราวเดียวกันด้วยวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก และที่สำคัญคือเพิ่มความสะดวกในการนำเซลล์ตรึงไปใช้บำบัดคราบไขมันในพื้นที่ปนเปื้อน

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการบำบัดเชิงชีวภาพของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลโดยเซลล์ตรึงของจุลินทรีย์ เช่น Wilson และ Bradley (1997) ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของเซลล์อิสระ *Pseudomonas* sp. เปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงของเชื้อดังกล่าว และพบว่าการตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มโอกาสที่เชื้อสัมผัสกับหยดน้ำมันได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์แรมโนลิปิด (rhamnolipid) ของเซลล์อีกด้วย โดยแรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้ก้อนน้ำมันแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ ในน้ำและลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำมันและน้ำ ทำให้เชื้อที่เกาะบนวัสดุตรึงย่อยสลายน้ำมันได้มากขึ้น Diaz และคณะ (2002) พบว่าเซลล์ตรึงของกลุ่มแบคทีเรียทนเค็ม MPD-

M ที่เกาะอยู่บนเส้นใยพอลิโพรพิลีน (polypropylene) จะมีประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันดิบดีกว่าเซลล์อิสระจากการทดสอบในน้ำทะเลที่มีระดับความเค็มต่างๆ นอกจากนี้พบว่า การย่อยน้ำมันของเซลล์ตรึงสามารถทดสอบได้ทั้งในระบบปิด (batch) หรือระบบต่อเนื่อง (continuous) ซึ่งมักนิยมใช้ถังหมักแบบ packed bed เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันในระบบต่อเนื่อง ซึ่ง Cunningham และคณะ (2004) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงโดยใช้ไครโอเจล (cryogel) ของพอลิไวนิล แอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol; PVA) เป็นวัสดุกักขัง (entrapment) และสร้างระบบทดสอบแบบ biopiles เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันระหว่าง (1) เซลล์ตรึงที่เติมลงในระบบทดสอบ (2) เซลล์อิสระที่เติมลงในระบบ และ (3) การเติมสารอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญของเชื้อประจำถิ่นในน้ำทะเล และพบว่าระบบที่ 1 ซึ่งเติมเซลล์ตรึง สามารถกำจัดน้ำมันดีเซลได้สูงสุดภายหลังการทดสอบนาน 32 วัน นอกจากนี้ Rahman และคณะ (2006) ได้ทดสอบประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของแบคทีเรียที่ตรึงบนอัลจิเนต (alginate) และพบว่าความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของเซลล์ตรึงมีค่าคงเดิมตลอดการทดลองนาน 30 วัน และจากงานวิจัยของ Gentili และคณะ (2006) ที่ได้ทดสอบศักยภาพของการใช้ผงไคตินและผงไคโตซาน เป็นวัสดุตรึงเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ย่อยน้ำมันได้โดยใช้ระบบจำลองที่เติมน้ำทะเล ผลการทดลองปรากฏว่าเซลล์ตรึงมีความสามารถในการลดปริมาณน้ำมันดิบได้มากกว่าเซลล์อิสระ ในการทดลองนาน 15 วัน โดยเซลล์ที่เกาะอยู่บนวัสดุตรึงยังคงมีชีวิตและคงกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันได้ดี จากตัวอย่างรายงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าเซลล์ตรึงของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันชนิดต่างๆ มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันในระบบทดสอบ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่ในงานวิจัยนี้จะพัฒนาเทคโนโลยีการตรึงเซลล์ของจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้กำจัดคราบน้ำมันในน้ำทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับบำบัดน้ำขังใต้ท้องเรือที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันหล่อลื่นก่อนปล่อยลงสู่ทะเล

2.3.2 ลักษณะของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับการตรึงบนวัสดุ

มีงานวิจัยที่ศึกษาการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ บนวัสดุดูดซับ เพื่อใช้ย่อยสลายคราบน้ำมันในน้ำทะเล เช่น Quek และคณะ (2006) พบว่าเซลล์ตรึงของ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ F92 ที่ตรึงบนบนโพลีเอทิลีน สามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์บนผิวเซลล์จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และผู้วิจัยคาดว่าสารพอลิเมอร์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ของ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ F92 น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการเกาะติดของเชื้อ ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 2 ชนิด ได้แก่ Arabian light และ Al-Shaheen รวมทั้งน้ำมันดีเซล และน้ำมันที่เก็บจากพื้นที่ปนเปื้อน (oil slop) ซึ่ง

เติมผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมแต่ละชนิด 0.5% ลงในระบบทดสอบ พบว่าเซลล์ทั้งสองรูปแบบของ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ F92 สามารถย่อยสลาย นอร์มัล-อัลเคน ในผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมทั้ง 4 ชนิด ได้ประมาณ 90% ในเวลา 1 สัปดาห์ ทั้งนี้พอลิแซ็กคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลที่เซลล์หลั่งออกมาออกเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ ทำให้เซลล์เกาะติดกับวัสดุต่างๆ ได้ดีขึ้น และสะสมสารอาหาร นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ โดยโครงสร้างของไบโอฟิล์มประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด พอลิเมอร์ พอลิแซ็กคาไรด์ สารมัธยันตรชนิดต่างๆ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของเชื้อ และสารอื่นๆ อีกหลายชนิด การสร้างไบโอฟิล์มจะทำให้เชื้อสามารถปรับตัวเพื่อการอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Singh และคณะ, 2006)

Obuekwe และ Al-Muttawa (2001) รายงานว่าแบคทีเรียย่อยสารไฮโดรคาร์บอน 2 สายพันธุ์ คือ *Arthrobacter* sp. และแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน ที่คัดแยกจากทะเลสาบปนเปื้อนน้ำมันในคูเวต ซึ่งให้ผลบวกในการทดสอบสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์ และสามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณมากออกมานอกเซลล์เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีสารอาหารจำกัด จึงสามารถเกาะแน่นอยู่บนวัสดุตรึง (ซีลือย เศษโฟม รำข้าวสาลี) เซลล์ตรึงของทั้งสองเชื้อยังคงมีชีวิตอยู่ภายหลังจากเก็บเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 45°C และยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมัน

Maneerat และ Dikit (2006) รายงานถึงความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันดิบของเซลล์แขวนลอยและส่วนใสจากการเลี้ยง *Myroides* sp. SM1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณทะเลสาบสงขลาที่มีน้ำมันลอยปกคลุมอยู่ เมื่อเลี้ยงเชื้อใน Marine broth ที่เติมน้ำมันดิบ พบว่าน้ำมันดิบถูกอิมัลซิไฟด์อย่างสมบูรณ์ภายใน 6 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยสังเกตจากการเกาะติดของเซลล์ในอนุภาคน้ำมันดิบ ซึ่ง Hafenburg และคณะ (1986) พบว่าจุลินทรีย์ที่ย่อยน้ำมันมีการปรับสรีรวิทยาของเซลล์เพื่อนำอัลเคนเข้าสู่เซลล์ โดยการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งทำให้น้ำมันแตกตัวเป็นอิมัลชัน ทำให้จุลินทรีย์นำหยदन้ำมันเข้าเซลล์ได้มากขึ้น

สมบัติของเซลล์ในการสร้าง EPS และอิมัลซิไฟเออร์ รวมถึงความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์ มีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันในน้ำเสียท้องเรือ เช่น Olivera และคณะ (2003) ได้คัดแยกเชื้อประจำถิ่นจำนวน 14 ไอโซเลท จาก bilge wastes ซึ่งเชื้อทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบในจิ้นัส *Pseudomonas* พบว่าเชื้อบริสุทธิ์หรือกลุ่มเชื้อที่แยกจากน้ำเสียท้องเรือไม่สามารถสร้าง EPS ได้ ดังนั้นจึงเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มลงไปในระบบทดสอบ (น้ำทะเล + bilge oil + bilge waste) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มโอกาสที่เชื้อจะสัมผัสน้ำมัน และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน อย่างไรก็ตามพบว่าไอโซเลท 74, 80 และ 85 มีสมบัติความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์สูง ทำให้เชื้อกลุ่มนี้เกาะติดกับหยदन้ำมันได้ดี นอกจากนี้ Moran และคณะ (2000) ได้ทดลองเพิ่ม

ประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพของของเสียไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon waste) โดยการเติมเซอร์แฟคติน (surfactin) ปริมาณ 80 มก./ล. ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* 09 ลงในพลาสติกที่บรรจุ ship bilge waste ปริมาณ 6 มล./ล. และเติมหัวเชื้อ 10 มล./ล. ผลการทดลองพบว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ความเข้มข้นเหนือค่า CMC มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์ และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันจาก 20.9 เป็น 35.5% ประสิทธิภาพการย่อยอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเพิ่มจาก 0 เป็น 41% ซึ่ง Rosenberg และ Ron (1999) อธิบายว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ระดับความเข้มข้นเหนือค่า CMC จะทำให้เกิดโครงสร้างเป็นไมเซลล์ (micelle) และหยดน้ำมันจะเข้าไปแทรกอยู่ในส่วนกลางของไมเซลล์ ซึ่งช่วยเพิ่มโอกาสที่เชื้อจะนำหยดน้ำมันเข้าเซลล์ ดังนั้นในการบำบัดคราบน้ำมันในน้ำขังใต้ท้องเรือจึงควรเติมเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปด้วยเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย อย่างไรก็ตามเชื้อที่เติมลงไปจะต้องสามารถปรับตัวให้สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในพื้นที่บำบัด (Moran และคณะ, 2000)

จากรายงานวิจัยข้างต้นจะพบว่าจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่เกาะอยู่บนวัสดุตรึง ควรจะมีสมบัติต่างๆ ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกาะติดและการย่อยน้ำมันของเซลล์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันซึ่งมีสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปเกาะติดบนวัสดุตรึง โดยชนิดของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันต้องมีสมบัติดังนี้ (1) มีสมบัติความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์ (2) มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ (3) มีความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และ (4) มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายของเสียน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียท้องเรือ ซึ่งในระบบที่ศึกษานี้ชนิดของของเสียน้ำมันคือ น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ซึ่ง Rosenberg และคณะ (1992) สรุปว่าสมบัติความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์มีความสำคัญในการยึดติดแบบผันกลับไม่ได้ของเซลล์บนผิววัสดุ และบนหยดน้ำมัน เซลล์ที่มีสมบัติในความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์สูงจะยึดติดบนผิววัสดุได้มากขึ้น Southam และคณะ (2001) รายงานว่าการยึดเกาะระหว่างเชื้อย่อยน้ำมันกับหยดน้ำมันเป็นสิ่งจำเป็น เพราะน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ความสามารถในการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ของเซลล์ ก็มีความเกี่ยวข้องกับการรวมกลุ่มเซลล์บนผิววัสดุตรึง (Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001) ผู้วิจัยจะเลือกชนิดจุลินทรีย์สำหรับการตรึงบนวัสดุตรึงจากสมบัติที่เหมาะสมทั้งหมดที่กล่าวข้างต้น ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างงานวิจัยอื่นๆ ในด้านเชื้อที่ใช้ในการผลิตเซลล์ตรึงสำหรับบำบัดคราบน้ำมันในน้ำทะเลมีสมบัติไม่ครอบคลุมทั้งสี่ประเด็นตามที่สรุปข้างต้น ยิ่งไปกว่านั้นยังเป็นงานวิจัยแรกที่พัฒนาเทคโนโลยีการตรึงเซลล์ของเชื้อย่อยน้ำมันสำหรับลดการปนเปื้อนของน้ำมันในน้ำทะเล โดยมีกรณีศึกษา เป็นคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือของ

เรือประมงขนาดเล็ก

2.3.3 ลักษณะของวัสดุที่ตรงที่เหมาะสมสำหรับใช้ในน้ำทะเล

ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียมเซลล์ที่ตรงที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน ได้แก่ ชนิดของวัสดุที่ตรง โดยทั่วไปวัสดุที่ถูกนำมาใช้สำหรับการเกาะติดของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ได้แก่ วัสดุธรรมชาติ (natural matrices) เช่น อัลจิเนท วุ้น (agar) แคลปโป-คาราจีแนน (K-carragenan) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้วัสดุสังเคราะห์ที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ ได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) โฟมพอลิยูรีเทน และพอลิโพรพิลีน (Wilson และ Bradley, 1997; Jerábková และคณะ, 1997; Rahman และคณะ, 2006; Ueno และคณะ, 2008) ตัวอย่างรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกชนิดของวัสดุที่ตรงเซลล์ ได้แก่ Monohar และคณะ (2001) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* sp. NGK1 ในการย่อยสลายเนฟทาไลน์ ความเข้มข้น 25 mM ในถังหมักระบบแบทช์ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเนฟทาไลน์ของเซลล์ที่เกาะติดอยู่บนวัสดุที่ตรง 4 ชนิด ได้แก่ อัลจิเนท วุ้น พอลิอะคริลาไมด์ และ PUF รวมทั้งศึกษาจำนวนครั้งที่นำเซลล์ที่ตรงกลับมาใช้ใหม่ ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ตรงอยู่บน PUF มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยสามารถย่อยสลายเนฟทาไลน์ได้อย่างสมบูรณ์ในการนำเซลล์ที่ตรงกลับมาใช้ซ้ำ 40 ครั้ง นอกจากนี้ Oh และคณะ (2000) ได้ใช้วัสดุที่สามารถดูดซับน้ำมันได้สูง คือ PUF ซึ่งเตรียมจากปฏิกิริยาการพอลิเมอไรซ์ของสารผสม poly-ether polyol และ carbodimide-modified D-methyl diisocyanate ในอัตราส่วน 10:2 โดยน้ำหนัก และมีการเติมปุ๋ยอินทรีย์ (slow-release fertilizer, SRF) และยีสต์ *Yarrowia lipolytica* 180 ลงไปในขั้นตอนการเตรียมโฟมชนิดนี้ เพื่อให้เกิดการกำจัดฟิล์มน้ำมันบนผิวน้ำ โดยวิธีนี้จึงเป็นการบำบัดฟิล์มน้ำมันโดยกระบวนการดูดซับและการย่อยสลายทางชีวภาพ จากผลทดสอบที่ได้ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการดูดซับและการย่อยน้ำมันของเซลล์ที่ตรงอยู่บน PUF ทำให้วิธีนี้มีศักยภาพในการนำไปใช้กำจัดฟิล์มน้ำมันบนผิวน้ำ ตัวอย่างเพิ่มเติมเกี่ยวกับการคัดเลือกชนิดของวัสดุที่ตรงเซลล์ ได้แก่ งานวิจัยของ Tallur และคณะ (2009) ได้ทดลองเตรียมเซลล์ *Bacillus* sp. PHN 1 ที่สามารถย่อยสลายพารา-ครีซอล (*p*-cresol) บนวัสดุชนิดต่างๆ ได้แก่ PUF พอลิอะคริลาไมด์ อัลจิเนท และวุ้น จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายพารา-ครีซอล (20 และ 40 mM) ของเซลล์ที่ตรงบนวัสดุทดสอบทั้ง 4 ชนิด และเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ตรงบน PUF สามารถย่อยสลายทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ตรงบนวัสดุอื่น ๆ และเทียบกับเซลล์อิสระ

เทคนิคการตรึงเซลล์ที่นิยมใช้มาก คือ การกักขังเซลล์ (entrapment) หรือการให้เซลล์เกาะติดบนวัสดุที่ตรง (adsorption) ชนิดของวัสดุที่ตรงที่นำมาใช้ ได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ อะกาโรส (agarose)

อัลจิเนท คาราจีแนน ดินเหนียว ผงคาร์บอนกัมมันต์ (granular activated carbon) และ PUF อย่างไรก็ตามก็จากรายงานการใช้วัสดุตั้งเซลล์ชนิดต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพของ น้ำมันที่ปนเปื้อนในระบบนิเวศทะเล พบว่า PUF มีความเหมาะสมในการนำมาใช้กับงานในน้ำทะเล เนื่องจากลอยตัวได้ดีในน้ำทะเล ดูดซับน้ำมันได้มาก มีความเสถียรและยืดหยุ่นสูง มีรูพรุนมาก ($\approx 97\%$) ทำให้มีพื้นที่ผิวสำหรับการเกาะติดของเซลล์สูง นอกจากนี้ยังมีราคาไม่แพง (Oh และคณะ, 2000) การเลือกใช้โฟมชนิดนี้เป็นวัสดุตั้งเซลล์ยังคงเป็นที่นิยมใช้ โดย Ueno และคณะ (2008) รายงานถึงการใช้ PUF สำหรับการเกาะติดของสาหร่ายขนาดเล็ก *Prototheca zopfii* RND16 ซึ่งสามารถย่อยสลาย นอร์มัล-อัลเคนในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม PUF เป็นวัสดุสังเคราะห์ย่อยสลายได้ช้าตามธรรมชาติ เมื่อมีการใช้ไประยะหนึ่งจะต้องเก็บ PUF นั้นมาสกัดน้ำมัน ออก ซึ่งอาจนำกลับไปใช้ซ้ำอีก แต่ถ้าเป็นโฟมที่เสื่อมประสิทธิภาพแล้วจะต้องกำจัดโดยการเผา (Oh และคณะ, 2000) จากข้อจำกัดนี้ทำให้ผู้วิจัยสนใจทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุตั้งเซลล์ชนิดที่เป็นพลาสติกชีวภาพ โดยเทียบสมบัติด้านต่างๆ กับ PUF เพื่อให้เหมาะต่อการนำมาใช้บำบัดน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือ ซึ่งจะไม่ทำให้เกิดผลเสียกับสิ่งแวดล้อมทางทะเล โดยชนิดของพลาสติกชีวภาพที่เลือกใช้จะต้องมีในปริมาณมาก ราคาถูก ไม่ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เกิดการย่อยสลายได้ในธรรมชาติ และจะต้องเกาะติดกับเซลล์ของเชื้อย่อยน้ำมันได้ดี (Podorozhko และคณะ, 2008) ในงานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกพลาสติกชีวภาพที่มีการผลิตและจำหน่ายในประเทศไทย เพื่อนำมาใช้ศึกษาการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมัน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเซลล์ที่ตรึงบน PUF และคัดเลือกชนิดของวัสดุตั้งเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับทดสอบการเกาะติดของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน และศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงชนิดใช้แล้ว ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในพื้นที่จริง (*in situ*) ทั้งนี้เพื่อลดปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำท้องเรือก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งจะเป็นการรักษาระบบนิเวศทางทะเลที่มีคุณค่าของประเทศไทยต่อไป

บทที่ 3

การคัดแยกและศึกษาจุลินทรีย์จากระบบนิเวศทะเลที่สามารถย่อย น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง

3.1 บทนำ

ปัญหามลพิษน้ำมันที่เกิดขึ้นอย่างเรื้อรังในระบบนิเวศทางทะเล มีแหล่งกำเนิดสำคัญจากการทิ้งน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว โดย Lin และคณะ (2007) รายงานว่าเรือประมงที่ไม่ได้ติดตั้งเครื่องแยกน้ำมันไว้มักจะปล่อยน้ำเสียทิ้งเรือปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่น ทั้งชนิดที่ยังไม่ได้ใช้งาน และชนิดที่ใช้งานแล้วออกสู่ภายนอก นอกจากนี้กิจกรรมต่างๆ ของเรือ ก็ทำให้เกิดการลักลอบทิ้งน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วปริมาณมากลงสู่ทะเล (Hampton และคณะ, 2003; Wiese และ Ryan, 2003) ดังนั้นจึงควรศึกษาการใช้วิธีชีวภาพเพื่อบำบัดน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่น ซึ่งมีรายงานว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทะเลหลายชนิด สามารถเจริญโดยใช้ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น *Alcanivorax* *Candida* *Cycloclasticus* *Gordonia* *Marinobacter* *Pseudomonas* *Rhodococcus* *Sphingomonas* และ *Yarrowia* เป็นต้น (Okoh, 2006 และคณะ; Brooijmans และคณะ, 2009) ดังนั้นจึงอาจนำจุลินทรีย์เหล่านี้ไปใช้ขจัดคราบน้ำมันในน้ำทะเลได้ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการใช้จุลินทรีย์ย่อยน้ำมันมีความแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ เช่น จุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่คัดแยกจากพื้นที่หนึ่ง อาจนำไปใช้งานไม่ได้ผลในอีกพื้นที่หนึ่ง เนื่องจากเชื้อไม่สามารถปรับตัวให้เจริญในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันได้ ดังนั้น Hosokawa และคณะ (2009) จึงเสนอเทคโนโลยีชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดสารพิษ โดยการนำเชื้อประจำถิ่นที่สามารถย่อยสารปนเปื้อนได้ กลับมาใช้บำบัดสารในพื้นที่ซึ่งได้คัดแยกเชื้อนั้น เนื่องจากเชื้อประจำถิ่นที่เดิมลงไปจะสามารถปรับตัวให้อยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ดี จึงสามารถกำจัดสารพิษได้ปริมาณมาก ด้วยเหตุดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง จากระบบนิเวศชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย ที่มีปัญหาน้ำมันรั่วไหลอย่างต่อเนื่อง

โดยทั่วไปการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นเกิดขึ้นได้ยาก เนื่องจากน้ำมันหล่อลื่นมีองค์ประกอบเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาว และยังมีสารเติมแต่งอีกหลายชนิดที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (Koma และคณะ 2001; Wang และคณะ, 2010) แต่มีรายงานว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดินสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ใช้งาน และชนิดที่ใช้งานแล้วได้ เช่น Jain และคณะ (2010) พบว่า *Enterobacter* sp. ซึ่งเลี้ยงในอาหาร minimal salt ที่เติมน้ำมันหล่อลื่น

2T (2T engine oil) ปริมาตร 2% (v/v) สามารถย่อยนอร์มัล-อัลเคน และ PAHs ได้ $75 \pm 3\%$ และ $32 \pm 5\%$ ตามลำดับ ภายหลังจากทดลองนาน 10 วัน Abioye และคณะ (2009) รายงานว่าการเติมเมล็ดธัญพืชใช้แล้วจากโรงงานผลิตเหล้า (Brewery spent grain, BSG) ลงไปในดินปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (10% w/w) สามารถทำให้เกิดการย่อยสลายน้ำมันได้ 68.73% ภายใน 84 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมสารอินทรีย์ใดๆ มีการลดลงของน้ำมัน 42.05% ซึ่งชนิดของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่คัดแยกจากดินผสม BSG ได้แก่ *Acinetobacter* *Nocardia* *Pseudomonas* *Micrococcus* และ *Bacillus* นอกจากนี้ Adesodun และ Mbagwu (2008) แสดงผลการทดลองที่สรุปได้ว่า สารอินทรีย์จากมูลสัตว์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการขจัดน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่ปนเปื้อนในดิน อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยจำนวนไม่มากที่ศึกษาการบำบัดน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วในระบบนิเวศทางทะเล โดยรายงานส่วนใหญ่จะศึกษาเฉพาะการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันดิบที่มักเกิดการรั่วไหลในน้ำทะเลเท่านั้น ทั้งนี้ที่กิจกรรมต่างๆ ของเรือทำให้เกิดการปล่อยน้ำมันเสีย (oily residue) เช่น น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว และ น้ำเสียทิ้งเรือลงสู่ทะเลในปริมาณสูงกว่าการรั่วไหลของน้ำมันดิบจากอุบัติเหตุเรืออัปปาง (Hampton และคณะ, 2003) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดน้ำเสียทิ้งเรือโดยใช้จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยใช้ตัวอย่างทรายทะเลและน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมันจากจังหวัดจันทบุรี และจังหวัดชลบุรี หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง สมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (cellular hydrophobicity) ความสามารถในการสร้าง EPS และการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชัน Obuekwe และคณะ (2009) รายงานว่าการใช้เชื้อย่อยน้ำมันที่มีค่าความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์สูง มีความสำคัญในการกำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเชื้อดังกล่าวมีการเกาะติดบนหยดน้ำมัน (hydrophobic oil) ได้ดี และสมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ ยังทำให้เชื้อย่อยน้ำมันสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขจัดน้ำมันได้ นอกจากนี้สาร EPS ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมีผลทำให้ก้อนน้ำมันแตกตัว จึงเพิ่มโอกาสที่เชื้อจะนำหยดน้ำมันเล็กๆ เข้าสู่เซลล์ ทำให้สามารถกำจัดน้ำมันได้มากขึ้น (Chang และคณะ, 2009; Satpute และคณะ, 2010) ในงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมงชนิดที่ใช้งานแล้วและชนิดยังไม่ได้ใช้งาน จากท่าเรือประมง 2 แห่ง ในจังหวัดจันทบุรี และจังหวัดตราด สำหรับทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของเชื้อ ทั้งนี้เพื่อคัดแยกเฉพาะจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำเสียทิ้งเรือได้โดยตรง ซึ่งจะช่วยเพิ่ม

ประสิทธิภาพของการนำไปใช้ในระบบจริง เพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำซึ่งได้ทิ้งเรือประมงขนาดเล็กก่อนปล่อยออกสู่ภายนอก ซึ่งเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อบำบัดคราบน้ำมันในน้ำซึ่งได้ทิ้งเรือที่ได้พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ จะช่วยลดปัญหามลพิษน้ำมันที่เกิดขึ้นแบบเรื้อรังในระบบนิเวศทางทะเลของไทย และอาจนำไปประยุกต์ใช้กำจัดคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำทะเลของประเทศเพื่อนบ้าน ที่มีสภาพแวดล้อมคล้ายคลึงกับประเทศไทยได้อีกด้วย

3.2 ขั้นตอนงานวิจัย

3.2.1 การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน

- (1) ตัวอย่าง: น้ำทะเล และทรายทะเลปนเปื้อนน้ำมัน
- (2) สถานที่เก็บตัวอย่าง: จ. จันทบุรี (ท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ ชายหาดแหลมสิงห์) และจ.ชลบุรี (อ่าวอุดม ท่าเรือแหลมฉบัง เกาะสีชัง)
- (3) ชนิดของน้ำมัน: น้ำมันดิบ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง

3.2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันจากสมบัติต่างๆ ของเซลล์ ดังนี้

- (1) ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นให้แล้ว
- (2) การเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Sea Water (NSW) ที่มีเททระเดเคน (tetradecane) และพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน
- (3) สมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์
- (4) ความสามารถในการสร้าง EPS
- (5) ความสามารถในการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชันของสารก่ออิมัลชันชีวภาพ
- (6) ทดสอบการลดแรงตึงผิวของน้ำของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมงของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

- (1) ชนิดน้ำมัน: น้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงชนิดใช้แล้ว และชนิดที่ยังไม่ได้ใช้งาน ได้จากท่าเรือประมง 2 แห่ง คือ ท่าเรือแหลมฉบัง จ.ตราด และท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี ที่ความเข้มข้น 200 มก./ล.
- (2) ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้น้ำมันทดสอบเป็นแหล่งคาร์บอน

3.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ความเข้มข้น 1,000 มก./ล.ของจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 3.2.3

- (1) ชนิดน้ำมัน: น้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงขนาดเล็ก
(ชนิดใช้แล้ว และชนิดที่ยังไม่ได้ใช้)

3.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

แหล่งที่มาและองค์ประกอบของน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แสดงอยู่ในตารางที่ 3.1 ซึ่งตัวอย่างน้ำมันหล่อลื่นทุกชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน (mineral based lubricants) ที่ใช้สำหรับเครื่องยนต์ดีเซล 4 จังหวะ (4-strokes diesel engines) ของเรือประมง จึงมีส่วนประกอบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งผลิตและประโยชน์การใช้งาน ในขั้นต้นของงานวิจัยใช้น้ำมันดิบเมอร์บาน (วัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตน้ำมันหล่อลื่น) เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนด้วยเทคนิคการเพิ่มจำนวนเชื้อ (crude oil enrichment technique) หลังจากนั้นจึงใช้น้ำมันหล่อลื่น (ชนิดที่ใช้งานแล้ว และชนิดที่ยังไม่ได้ใช้งาน) เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยน้ำมัน โดยน้ำมันตัวอย่างทุกชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ถูกทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนิ่งด้วยความดันไอน้ำ (121°C 15 นาที) ก่อนนำมาใช้ทดสอบ สำหรับชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดแยกและทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันคือ Nutrient Sea Water ตามรายงานของ Higashihara และคณะ (1978) (สูตรอาหารต่อลิตร ประกอบด้วย NH_4NO_3 1 กรัม K_2HPO_4 0.02 กรัม เฟอริกซิเตรท (ferric citrate) 0.02 กรัม สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 0.5 กรัม น้ำทะเล 800 มล. น้ำกลั่น 200 มล. pH 7.8) แต่ในงานวิจัยนี้มีการปรับสูตรอาหาร NSW โดยเปลี่ยนมาใช้ น้ำทะเลเข้มข้นจากภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีค่าความเค็ม 17 ‰ ปริมาตร 200 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 800 มล. ทำให้อาหาร NSW ที่ใช้ในการทดลองนี้มีค่าความเค็มเป็น 3.4 ‰ เช่นเดียวกับค่าความเค็มทั่วไปในน้ำทะเลของประเทศไทย และพบว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์ 0.05% (w/v) จะช่วยเพิ่มการเจริญของเชื้อย่อยน้ำมัน (Higashihara และคณะ, 1978) สำหรับอาหารที่ใช้เตรียมหัวเชื้อและนับจำนวนเชื้อ คือ อาหารเหลว Luria-Bertani (LB) (Difco) และอาหารแข็ง LB ที่มีความเข้มข้นเป็น 0.25 เท่า (0.25% strength) ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของน้ำมันแต่ละชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ชนิด/ตัวอย่าง	ตัวแทนจำหน่าย/ แหล่งผลิต	ส่วนประกอบของน้ำมัน (% w/w)*		
		Saturates	Aromatics	Polars
Lubricants^a				
Fresh No.1 (Trane Super HD)	บริษัทพีเอ็มเอ ลูบริแคนท์ จำกัด	45.9 ± 1.6	41.5 ± 5.4	12.9 ± 3.3
Fresh No.2 (States Super HD)	บริษัทน้ำมัน ปิโตรเลียมไทย จำกัด	47.0 ± 2.2	51.5 ± 1.6	1.5 ± 0.2
Waste No.1 (unknown)	ท่าเรือประมงสิงห์ อำนวยการ จ.จันทบุรี	57.6 ± 3.2	17.9 ± 3.8	24.5 ± 6.6
Waste No.2 (Trane Super HD)	ท่าเรือประมงแหลมงอบ จ.ตราด	64.6 ± 2.6	23.1 ± 3.7	12.3 ± 4.3
Waste No.3 (States Super HD)	ท่าเรือประมงสิงห์ อำนวยการ จ.จันทบุรี	48.9 ± 0.3	40.3 ± 0.6	10.8 ± 1.1
Waste No.4 (unknown)	ท่าเรือประมงแหลมงอบ จ.ตราด	62.1 ± 1.2	29.4 ± 0.6	9.8 ± 4.0
Crude oil				
Murban Light	บริษัทไทยออยล์ จำกัด	50.2 ± 1.6	35.0 ± 4.7	15.0 ± 2.3

*ข้อมูลจากการวิเคราะห์ TLC/FID โดยเทียบน้ำหนักจากกราฟมาตรฐานของน้ำมันแต่ละชนิด และกำหนดให้น้ำหนักรวมของ saturates+aromatics+polars เป็น 100%

^aน้ำมันหล่อลื่นทุกชนิดที่นำมาทดสอบในงานวิจัยนี้ ใช้สำหรับเครื่องยนต์ดีเซลของเรือประมงขนาดเล็ก

-Waste lubricant No. 1 นำมาใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ตั้งแต่วันที่ 1 ก.พ. 2551

-Fresh lubricant No. 1 และ Waste lubricant No. 2 นำมาใช้ทดสอบเมื่อวันที่ 15 ม.ค. 2552

-Fresh lubricant No.2 และ Waste lubricant No.3 นำมาใช้ทดสอบเมื่อวันที่ 17 ก.ย. 2553

-Waste lubricant No.4 นำมาใช้ทดสอบเมื่อวันที่ 4 ธ.ค. 2553

3.3.2 การตัดแยก เพิ่มปริมาณเชื้อ และการเลี้ยงเชื้อยอยน้ำมัน

การตัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน โดยนำตัวอย่างทรายทะเลที่เก็บตัวอย่างลึกจากผิวหน้าประมาณ 10 ซม. ปริมาณ 10 กรัม หรือน้ำทะเลที่เก็บจากบริเวณผิวหน้า (surface seawater) ปริมาตร 10 มล. ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว NSW ปริมาตร 100 มล. เติมน้ำมันดิบเข้มข้น 5,000 มก./ล. นำไปเขย่าเป็นเวลา 7 วัน ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้มีปริมาณมากขึ้นโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ 3 ครั้ง จนสังเกตพบว่าเชื้อมีความขุ่นเพิ่มมากขึ้น จึงแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NSW ที่เกลี่ยด้วยน้ำมันดิบปลอดเชื้อปริมาตร 100 μ l บนผิวหน้าอาหารแข็ง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จนสังเกตพบการเจริญของโคโลนี คัดเลือกโคโลนีเดียวที่มีลักษณะแตกต่างกันไปเลี้ยงในอาหารเหลว NSW ปริมาตร 10 มล. ที่เติมน้ำมันดิบเข้มข้น 5,000 มก./ล. บ่มเชื้อที่ภาวะเดิม คัดเลือกไอโซเลทที่สามารถเจริญโดยใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยสังเกตความขุ่นและการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ และทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยการฉีดเชื้อบนอาหารแข็ง LB เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง NSW ที่มีน้ำมันดิบปกคลุม สำหรับการเตรียมหัวเชื้อทำดังนี้ เชื้อโคโลนีเดียวของแต่ละไอโซเลทที่เจริญบนอาหารแข็ง NSW ที่มีน้ำมันดิบปกคลุม ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มล. หลังจากนั้นบ่มเชื้อที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 48 ชม. ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) และนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.3 การย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันทดสอบ

ทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมัน ในอาหารเหลว NSW ปริมาตร 50 มล. ที่เติมหัวเชื้อ และน้ำมันทดสอบ สำหรับการทดลองที่ใช้ น้ำมันเข้มข้น 200 มก./ล. เติมหหัวเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ในอาหารทดสอบเป็น OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 และเมื่อใช้น้ำมันทดสอบความเข้มข้น 1,000 มก./ล. จึงเติมหหัวเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ในอาหารทดสอบเป็น OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 ทุกชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า (Innova 2100 Platform Shaker, New Brunswick Scientific, Japan) ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างชุดละ 3 ซ้ำ ทุกๆ 24 ชม. เพื่อวัดการเจริญของเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ โดยมีชุดที่ไม่เติมเชื้อ (uninoculated sample) เป็นชุดควบคุมการลดลงของน้ำมันเนื่องจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ด้วย TLC-FID (Thin Layer Chromatography - Flame Ionization Detection) ตามวิธีของ Maruyama และ

คณะ (2003) โดยสกัดน้ำมันออกจากอาหารเหลว NSW ปริมาตร 50 มล. ด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 24 มล. และเติมสารละลายมาตรฐาน stearyl alcohol (1-Octadecanol, 99%, Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 6.25 มก./มล.คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 มล. ก่อนสกัดน้ำมัน เขย่ากรวย แยก (separatory funnel) อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกน้ำมันออกจากชั้นน้ำ ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้นเป็นเวลา 1 นาที แยกชั้นคลอโรฟอร์มที่มีน้ำมันละลายอยู่ใส่ในขวดทดลองใหม่ สกัดน้ำมันที่คงเหลืออยู่ในชั้นน้ำอีก 1 ครั้งรวมใช้คลอโรฟอร์มในการสกัดน้ำมันทั้งหมด ปริมาตร 50 มล. รวมคลอโรฟอร์มที่สกัดได้ทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (Centrifugal vaporize, EYELA, CVE-200D, Japan) จนกระทั่งมีปริมาณคลอโรฟอร์มเหลืออยู่ประมาณ 5 มล. วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมัน โดยหยดสาร ปริมาตร 1 μ l ด้วยเข็มฉีดยา (microdispenser) ลงบนแท่งโครมาโรด (chromarod) ที่มีลักษณะเป็นแท่งควอตซ์เคลือบด้วย silica gel (Chromarod-S III, Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Japan) และแยกส่วนประกอบของน้ำมัน (saturates aromatics polars) ผ่านระบบตัวทำละลายดังนี้ (1) *n*-Hexane (Merck) โดยมีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย 10 ซม. (\approx 25 นาที) (2) dichloromethane (DCM) (Merck) โดยมีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย 6.5 ซม. (\approx 12 นาที) และ 4 ซม. (\approx 5 นาที) และ (3) DCM/methanol (95/5, v/v) โดยมีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย 1 ซม. (\approx 1 นาที) หลังจากผ่านระบบตัวทำละลายแต่ละครั้ง จะต้องนำตะแกรงโครมาโรด (ประกอบด้วยโครมาโรด 10 แท่ง) ไปอบที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 1 นาที (rod dryer TK-8, Iatron) หลังจากนั้นนำตะแกรงโครมาโรดไปวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันด้วยเครื่อง IatroscanTM MK-6/6S (Mitsubishi Kogaku Iatron, INC., Japan) ด้วยอัตราเร็ว 30 วินาที/scan (normal scan) และมีเครื่องตรวจวัดชนิด flame ionization detector (FID) ที่มีอัตราเร็วของก๊าซ ไฮโดรเจนเท่ากับ 160 มล./นาที ประมวลผลข้อมูลจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Chromatocoder (Iatron) วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำมันแต่ละชนิด (ภาคผนวก ก) หรือคำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อตามสูตร: Oil removal (%) = 100 x [Oil component (T_0) - Oil component (T_x)] / Oil component (T_0) โดย T_0 หมายถึงส่วนประกอบน้ำมันในชุดทดลองในวันที่ 0 และ T_x หมายถึงส่วนประกอบน้ำมันในชุดทดลอง ณ วันที่ต้องการวิเคราะห์ เช่น ต้องการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันจากการย่อยสลายทางชีวภาพของเชื้อในวันที่ 5 ของการทดลอง ในกรณีนี้ T_x คือ T_5 (Jirasripongpun, 2002)

วิเคราะห์ส่วนประกอบอัลเคนในน้ำมันตัวอย่างที่สกัดได้ โดยกรองตัวอย่างผ่านคอลัมน์ anhydrous Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำออก (anhydrous Na_2SO_4 ซึ่งผ่านการอบที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$ C 12 ชม.) วิเคราะห์สารโดยใช้ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น Hewlett-Packard 6890 (Agilent Technologies) ที่มีเครื่องตรวจวัดชนิด FID Det Temp 320 $^{\circ}$ C และมีคอลัมน์ชนิด J&W DB-5,

5% Phenyl, 30m x 0.53mm ID วิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้ Oven Prog: 40C (2 min) to 320C (0 min) @ 10C/min, Inj Vol=0.5 µl, Inj Temp = 250 C, Splitless, Purge on @ 2.0 min เปรียบเทียบโครมาโตแกรมจากแก๊สโครมาโทกราฟีของอัลเคนในน้ำมันตัวอย่างกับตัวอย่างมาตรฐาน DRH-008S-R1 (AccuStandard, USA)

3.3.4 การเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่มี เทตระเดกเคน หรือ ฟิแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน

ทดสอบความสามารถในการเจริญโดยใช้สารไฮโดรคาร์บอนบริสุทธิ์ของเชื้อแต่ละไอโซเลท ซึ่งชนิดของสารไฮโดรคาร์บอนที่ใช้ทดสอบคือ เทตระเดกเคน (Fluka, purity $\geq 99\%$ GC) และฟิแนนทรีน (Fluka, purity $\geq 97\%$ HPLC) ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของส่วนประกอบอัลเคน และอะโรมาติกที่พบในน้ำมันตามลำดับ ทดสอบโดยเติมหัวเชื้อของแต่ละไอโซเลท (ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ในอาหารทดสอบเป็น OD₆₀₀ เท่ากับ 0.05) ในอาหารเหลว NSW ปริมาตร 10 มล. ที่มีเทตระเดกเคน (0.01% v/v) หรือฟิแนนทรีน (100 มก./ล.) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า (200 รอบ/นาที) ที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์การเจริญของเชื้อภายหลังการทดลอง 24 ชม. โดยใช้เทคนิคหยดเชื้อ (drop plate) บนอาหารแข็ง LB ชุดควบคุมสำหรับการทดลองนี้คืออาหารเหลว NSW ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน

3.3.5 การศึกษาสมบัติต่างๆ ของจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน

นำจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทมาศึกษาสมบัติต่างๆ ของเซลล์ ได้แก่ ความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ ความสามารถในการสร้าง EPS การทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชัน และสมบัติในการลดแรงตึงผิวของสารก่ออิมัลชันชีวภาพ สำหรับการทดสอบสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์แต่ละชนิดใช้วิธีของ Lin และคณะ (2005) ที่มีการดัดแปลงบางส่วน เตรียมเซลล์แขวนลอยโดยใช้ PUM buffer (สูตรอาหารต่อลิตร ประกอบด้วย K₂HPO₄·3H₂O 22.2 กรัม KH₂PO₄ 7.26 กรัม ยูเรีย 1.8 กรัม MgSO₄·7H₂O 0.2 กรัม) ให้มีปริมาตรสุดท้าย 1.2 มล. (OD₄₀₀ = 9.0 ± 1.0) เติมน้ำมันดีเซล ปริมาตร 0.2 มล. หลังจากนั้นบ่มหลอดทดสอบ ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นผสมสารละลายเชื้อและน้ำมันดีเซลเป็นเวลา 2 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของเซลล์ในชั้นน้ำและน้ำมันดีเซล นำชั้นน้ำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร และคำนวณสมบัติความไม่ชอบน้ำของเซลล์ ดังสูตร: ความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ (%) = 100 × [1 - (OD₄₀₀ ของเซลล์ในชั้นน้ำหลังจากปั่นผสมกับไฮโดรคาร์บอน/OD₄₀₀ ของเซลล์ก่อนเติมไฮโดรคาร์บอน)]

ทดสอบความสามารถในการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์ย่อน้ำมันแต่ละชนิด ตามวิธีดัดแปลงจาก Obuekwe และ Al-Muttawa (2001) โดยเติมหัวเชื้อของแต่ละไอโซเลทลงในอาหารเหลว Mineral Salts ปริมาตร 4 มล. (สูตรอาหารต่อลิตร ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.5 กรัม Na_2SO_4 2.0 กรัม NH_4Cl 1.0 กรัม $CaCl_2 \cdot 7H_2O$ 0.15 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 กรัม ปรับ pH เป็น 7.2) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์เป็น $OD_{600} = 1.0$ บรรจุทรายทะเลปลอดเชื้อ (sea sand, Merck) 2 กรัม ลงไปในแต่ละหลอดทดลองเพื่อกระตุ้นการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ของเซลล์ บ่มเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง ทดสอบการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์โดยเติมสีย้อม Alcian Blue ปริมาตร 50 μl ลงไปในแต่ละหลอดทดลอง ตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 606 nm คำนวณเปอร์เซ็นต์การสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของชุดทดลองกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ ทุกชุดทดลองทำ 3 ซ้ำ

ทดสอบความสามารถในการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชัน (Emulsifying activity; E_{24}) ของเชื้อแต่ละไอโซเลท ตามวิธีดัดแปลงจาก Lin และคณะ (2005) โดยเพาะเชื้อในอาหารเหลว NSW ปริมาตร 500 มล. ที่มีน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว เบอร์ 2 ความเข้มข้น 200 มก./ล. เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า (200 รอบ/นาที) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 8 นาที ทำให้เซลล์แตกโดยวางสารละลายเซลล์ในเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Bandelin Sonorex RK100, Germany) ความถี่ 35 KHz นาน 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปแขวนลอยเซลล์ วัดค่า Emulsion index (E_{24}) โดยเติมตัวอย่าง [สารละลายของตะกอนเซลล์ (cell residues) ($OD_{600} = 4.0$) หรือ ส่วนน้ำใสที่ได้จากการตกตะกอนเซลล์ (supernatant)] ปริมาตร 4 มล. ลงไปในหลอดทดลองฝาเกลียวที่มีน้ำมันดีเซล 6 มล. เขย่าหลอดทดสอบอย่างแรงด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries USA) นาน 2 นาที ตั้งหลอดทดสอบทิ้งไว้ 24 ชม. เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำ อิมัลชัน และน้ำมัน คำนวณค่า Emulsion index จากสูตร [$E_{24} (\%) = (\text{ส่วนสูงของชั้นอิมัลชัน/ส่วนสูงทั้งหมด}) \times 100$] นอกจากนี้ นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการตกตะกอนเซลล์ไปวิเคราะห์ความสามารถในการลดแรงตึงผิว (surface tension) ด้วยเครื่องวัดมาตรฐานความตึง (tensiometer, DAtaphysics, Germany)

จัดจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์ย่อน้ำมัน โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซม โดยสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1990) เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGTACCTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-GGCTACCTGTTACGACTT-3') (Martin-Laurent และคณะ, 2001) และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed

spacer ใน 18S rDNA ของยีสต์โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Mirhendi และคณะ, 2005) หลังจากนั้น ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR) ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler, Biorad, USA)

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย ตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 96 ^o ซ เวลา 2 นาที	} 30 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 96 ^o ซ เวลา 30 วินาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 55 ^o ซ เวลา 30 วินาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72 ^o ซ เวลา 1 นาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 ^o ซ เวลา 6 นาที	

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 18S rDNA ของยีสต์ ตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 96 ^o ซ เวลา 2 นาที	} 30 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 96 ^o ซ เวลา 30 วินาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 48 ^o ซ เวลา 30 วินาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72 ^o ซ เวลา 1 นาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 ^o ซ เวลา 6 นาที	

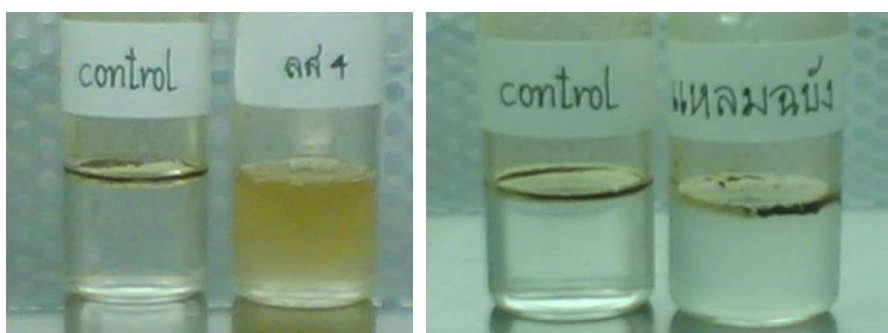
และนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ หลังจากนั้นโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ และทรานสฟอร์ม รีคอมบิแนนท์พลาสมิด (recombinant plasmid) เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 และคัดเลือกทรานฟอร์มแนนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) และสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ ระบุในคู่มือ หลังจากนั้นตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*EcoRI*) เพื่อ ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part เมื่อได้ข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและจัดจำแนกชนิดของ จุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

ยืนยันผลการจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันด้วยผลทดสอบทางชีวเคมีที่ วิเคราะห์โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (ผลทดสอบแสดงในภาคผนวก ค)

3.4 ผลการทดลอง

3.4.1 การคัดแยกและจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน

ในงานวิจัยนี้คัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน โดยเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและทรายทะเล จากท่าเรือประมงสิงห์อำนวย ชายหาดแหลมสิงห์ จ.จันทบุรี และท่าเรือแหลมฉบัง อ่าวอุดม เกาะสีชัง จ. ชลบุรี ซึ่งตั้งอยู่ในเขตชายฝั่งภาคตะวันออก ที่มีปัญหามลพิษน้ำมันอย่างต่อเนื่อง หลังจากเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหาร NSW ที่มีน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 21 วัน สามารถแยกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันบนอาหารแข็ง NSW ที่มีน้ำมันดิบ ปกติได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลท อย่างไรก็ตามจากการนำเชื้อทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลว NSW ที่เติมน้ำมันดิบความเข้มข้น 5,000 มก./ล. พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลท เท่านั้นที่เจริญได้ดี โดยสังเกตจากลักษณะความขุ่นและการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะเชื้อย่อยน้ำมันจำนวน 10 ไอโซเลท ไว้ศึกษาในขั้นต่อไป ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ 4 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากน้ำทะเล ส่วนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันอีก 6 สายพันธุ์ คัดแยกมาจากทรายทะเล (ตารางที่ 3.2) และได้นำจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์ นี้ไปฝากเก็บไว้ยังศูนย์จุลินทรีย์ (Microbiological Resources Center) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research; TISTR) ซึ่งมีแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Gordonia* sp. JC11 (TISTR 1944) และ JC8 (TISTR 1941) *Microbacterium* sp. JC9 (TISTR 1942) และ *Enterococcus* sp. JC2 (TISTR 1935) จำนวนแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Brucella* sp. JC7 (TISTR 1940) และ JC12 (TISTR 1945) *Acinetobacter* sp. JC5 (TISTR 1938) และ *Pseudomonas* sp. JC6 (TISTR 1939) รวมทั้งยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Candida* sp. JC4 (TISTR 1937) และ JC1 (TISTR 1934)



รูปที่ 3.1 ลักษณะความขุ่นและการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ในอาหาร NSW ที่เติมน้ำมันดิบความเข้มข้น 5,000 มก./ล. บ่มเชื้อที่ 200 รอบ/นาที่ อุณหภูมิห้อง 7 วัน เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ

ตารางที่ 3.2 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันที่คัดแยกจากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Strain	Source	16S rDNA identity	Standard strain	Reference
JC11	น้ำทะเลจากท่าเรือประมง	1423/1425 (99%)	<i>Gordonia</i> sp. CC-MJ-33a	Shen และคณะ, 2008
JC9	ทรายทะเล	1469/1498 (98%)	<i>Microbacterium</i> sp. YK18	lida และคณะ, 2001
JC4	ทรายทะเล	509/511 (99%)	<i>Candida</i> sp. MCCF-101	Poulose และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
JC2	ทรายทะเล	1518/1527 (99%)	<i>Enterococcus gallinarum</i> LMG 13129	Behr และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
JC5	น้ำทะเล	1502/1509 (99%)	<i>Acinetobacter</i> sp. HB-1	Su และ Lui, ไม่ตีพิมพ์
JC1	ทรายทะเล	471/473 (99%)	<i>Candida viswanathii</i> SN40	Chang และ Lui, ไม่ตีพิมพ์
JC6	น้ำทะเล	1495/1503 (99%)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	Diep และคณะ, 2009
JC12	น้ำทะเลจากท่าเรือประมง	1463/1470 (99%)	<i>Brucella</i> sp. DMA	Moosvi และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
JC7	ทรายทะเล	1443/1448 (99%)	<i>Brucella melitensis</i> AUH2	Rajamanickam และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
JC8	ทรายทะเล	1479/1489 (99%)	<i>Gordonia</i> sp. CC-MJ-6b	Shen และคณะ, 2008

3.4.2 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว และการเจริญเพิ่มจำนวนโดยใช้ไฮโดรคาร์บอนบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน

ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของเชื้อแต่ละไอโซเลท ทำการทดลองโดยบ่มเชื้อในอาหารเหลว NSW ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 1 (1,000 มก./ล.) และบ่มเชื้อ 5 วัน โดยการเขย่าให้อากาศ (200 รอบ/นาที) ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อแต่ละไอโซเลทอยู่ในช่วง 7.5 - 55.5% (ตารางที่ 3.3) โดย *Gordonia* sp. JC11 และ *Microbacterium* sp. JC9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย waste lubricant No.1 ได้ดีที่สุด เท่ากับ $55.5 \pm 8.3\%$ และ $41.3 \pm 5.3\%$ ตามลำดับ ผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกับความสามารถของเชื้อทั้งสองไอโซเลท ในการเจริญโดยใช้เทตระเดคเคน และพีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 3.3) เพราะจำนวนเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 ในอาหาร NSW ที่เติมเทตระเดคเคน (1.33×10^9 CFU/มล.) หรือพีแนนทรีน (1.70×10^9 CFU/มล.) มีค่าสูงกว่าจำนวนเซลล์ในอาหาร NSW ที่ไม่เติมสารทดสอบ (0.23×10^9 CFU/มล.) ในกรณีเดียวกันพบว่าจำนวนเซลล์ของ *Microbacterium* sp. JC9 ในอาหาร NSW ที่เติมเทตระเดคเคน (1.63×10^9 CFU/มล.) หรือพีแนนทรีน (2.47×10^9 CFU/มล.) ก็มีค่าสูงกว่าจำนวนเซลล์ในอาหาร NSW ที่ไม่เติมสารทดสอบ (0.15×10^9 CFU/มล.) สำหรับประสิทธิภาพการย่อยสลาย waste lubricant No.1 ของยีสต์ พบว่า *Candida* sp. JC4 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้สูงกว่า *Candida* sp. JC1 แต่ประสิทธิภาพการย่อยสลายต่ำกว่า *Gordonia* sp. JC11 และ *Microbacterium* sp. JC9 (ตารางที่ 3.3) ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจาก *Candida* sp. JC4 ใช้เทตระเดคเคนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ แต่ไม่สามารถใช้พีแนนทรีนได้

ตารางที่ 3.3 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว และการเจริญในอาหาร NSW ที่เติม เทตระเดเคน 0.1% หรือฟีนแอนทรีน 100 มก./ล.

Strain	Removal of Waste lubricant (%) ^a	Cell numbers after 24 h (x 10 ⁹) ^b		
		NSW	Tetradecane	Phenanthrene
<i>Gordonia</i> sp. JC11	55.5 ± 8.3	0.23	1.33	1.70
<i>Microbacterium</i> sp. JC9	41.3 ± 5.3	0.15	1.63	2.47
<i>Candida</i> sp. JC4	37.4 ± 8.4	1.13	1.63	0.87
<i>Enterococcus</i> sp. JC2	36.4 ± 2.6	0.83	1.43	1.03
<i>Acinetobacter</i> sp. JC5	33.4 ± 4.6	1.57	1.00	0.83
<i>Candida</i> sp. JC1	33.3 ± 10.8	0.83	0.90	1.03
<i>Pseudomonas</i> sp. JC6	31.9 ± 1.9	0.70	0.93	1.43
<i>Brucella</i> sp. JC12	16.4 ± 8.5	0.15	0.53	0.80
<i>Brucella</i> sp. JC7	10.8 ± 4.6	0.77	1.33	1.10
<i>Gordonia</i> sp. JC8	7.5 ± 1.6	0.05	0.01	0.01

^a ทำการทดลองโดยเติมหัวเชื้อในอาหารเหลว NSW (1.0 OD₆₀₀) ที่มี waste lubricant No. 1 (1,000 มก./ล.) บ่มเชื้อ 5 วัน คำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันโดยนำปริมาณน้ำมันที่คงเหลือในวันที่ 5 เทียบกับวันที่ 0 ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอรัลดลง 7.8 ± 1.8%

^b หน่วย CFU/มล. ปริมาณเริ่มต้นของเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 0.1 OD₆₀₀ และประกอบด้วย การทดลอง 3 ชุด คือ อาหาร NSW อย่างเดียว NSW+เทตระเดเคน และ NSW+ฟีนแอนทรีน

3.4.3 สมบัติต่างๆ ของจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันที่คัดแยกได้จากระบบนิเวศทะเล

การศึกษาความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ และความสามารถในการสร้าง EPS ของจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันแต่ละไอโซเลท แสดงผลในตารางที่ 3.4 พบว่า *Gordonia* sp. JC11 และ *Candida* sp. JC4 มีสมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์สูงที่สุด (~80%) ในขณะที่เชื้ออื่นๆ มีสมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ค่อนข้างต่ำ (1 - 30%) และยังพบว่าเชื้อย่อยน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์สามารถสังเคราะห์ EPS ได้ (24.7-93.2%) โดย *Candida* sp. JC4 และ *Microbacterium* sp. JC9 สามารถสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด (~90%)

ตารางที่ 3.4 สมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ และการสร้าง EPS ของจุลินทรีย์ย่อน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์

Strain	Hydrophobicity (%)	EPS synthesis (%)
<i>Gordonia</i> sp. JC11	80.0 ± 0.8	53.7 ± 3.5
<i>Microbacterium</i> sp. JC9	17.7 ± 1.8	90.8 ± 0.9
<i>Candida</i> sp. JC4	83.6 ± 5.2	93.2 ± 0.7
<i>Enterococcus</i> sp. JC2	5.4 ± 1.2	86.3 ± 3.9
<i>Acinetobacter</i> sp. JC5	5.4 ± 2.5	68.4 ± 5.6
<i>Candida</i> sp. JC1	9.5 ± 1.8	79.8 ± 9.4
<i>Pseudomonas</i> sp. JC6	2.0 ± 1.2	54.6 ± 8.4
<i>Brucella</i> sp. JC12	7.7 ± 0.6	59.0 ± 12.7
<i>Brucella</i> sp. JC7	1.3 ± 0.5	73.4 ± 6.4
<i>Gordonia</i> sp. JC8	29.0 ± 1.2	24.7 ± 1.6

สำหรับความสามารถในการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชัน และการสร้างสารลดแรงตึงผิวของ เชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท แสดงผลอยู่ในตารางที่ 3.5 พบว่าตะกอนเซลล์ของเชื้อทั้ง 10 สายพันธุ์ ทำให้น้ำมันดีเซลเกิดอิมัลชันได้ โดยมีค่า E_{24} ในช่วง 5.2 - 31.8% แต่มีเฉพาะส่วนน้ำใสที่ได้จากการ ตกตะกอนเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 *Microbacterium* sp. JC9 *Candida* sp. JC4 และ *Pseudomonas* sp. JC6 เท่านั้นที่มีสมบัติทำให้น้ำมันดีเซลเกิดอิมัลชัน โดยมีค่า E_{24} ในช่วง 6.2-40.0% นอกจากนี้ได้นำ culture supernatant ของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทนี้ ไปทดสอบความสามารถ ในการลดแรงตึงผิวของน้ำ และพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าว สร้างสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพหรือสารก่อกอิมัลชันชีวภาพ (biosurfactants/bioemulsifiers) ที่มีผลลดแรงตึงผิวของน้ำได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Candida* sp. JC4 ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวของน้ำได้ต่ำกว่า 40 mN m^{-1} จาก ผลการทดสอบสมบัติต่างๆ ของเซลล์จุลินทรีย์ย่อน้ำมัน จึงคัดเลือก *Candida* sp. JC4 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Gordonia* sp. JC11 ไว้สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป เพราะเชื้อ ทั้ง 3 สายพันธุ์ นี้ สามารถย่อน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีสมบัติต่างๆ ของเซลล์ที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อ เช่น ความไม่ชอบน้ำของผิว เซลล์ การสร้าง EPS และการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชัน

ตารางที่ 3.5 ความสามารถในการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชันของส่วนตะกอนเซลล์ และส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์

Strain	Emulsification index (E_{24} , %)		Surface tension (mN m^{-1})*
	Cell residues	Supernatant	
<i>Gordonia</i> sp. JC11	31.8 ± 8.0	20.0 ± 0.0	56.6 ± 0.02
<i>Microbacterium</i> sp. JC9	26.2 ± 0.8	33.3 ± 0.0	53.5 ± 0.03
<i>Candida</i> sp. JC4	10.5 ± 0.8	40.0 ± 0.0	33.9 ± 0.03
<i>Enterococcus</i> sp. JC2	5.2 ± 0.8	0.0 ± 0.0	ND
<i>Acinetobacter</i> sp. JC5	11.9 ± 0.8	0.0 ± 0.0	ND
<i>Candida</i> sp. JC1	7.6 ± 0.8	0.0 ± 0.0	ND
<i>Pseudomonas</i> sp. JC6	10.0 ± 1.4	6.2 ± 0.8	68.7 ± 0.03
<i>Brucella</i> sp. JC12	4.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0	ND
<i>Brucella</i> sp. JC7	16.2 ± 2.2	0.0 ± 0.0	ND
<i>Gordonia</i> sp. JC8	18.1 ± 0.8	0.0 ± 0.0	ND

* นำเฉพาะส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชันได้ ไปวัด surface tension

ND: Not determined

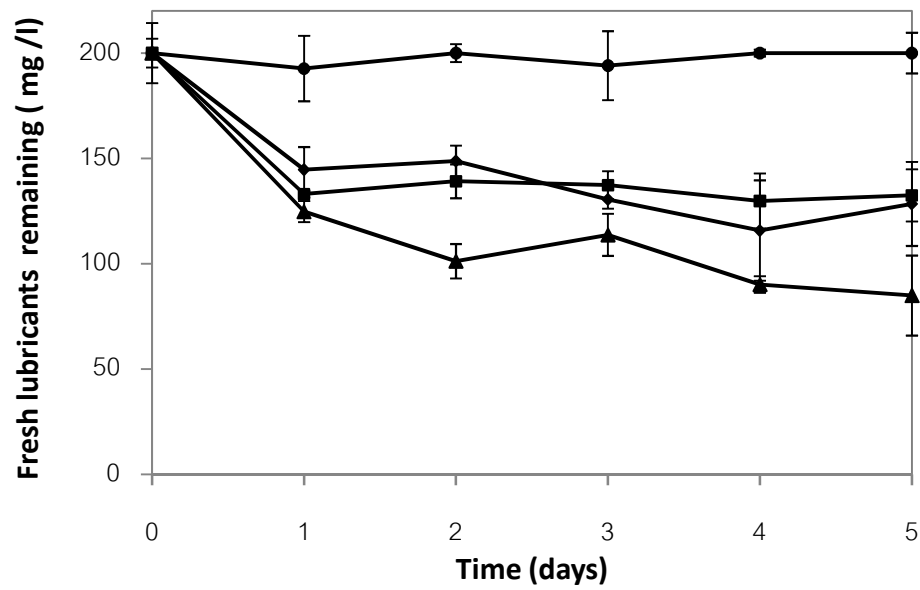
3.4.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานและน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วของ *Candida* sp. JC4 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Gordonia* sp. JC11

เนื่องจากน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งาน (fresh lubricant) และน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (waste lubricant) มีส่วนประกอบแตกต่างกัน (ตารางที่ 3.1) การทดลองในหัวข้อนี้จึงเปรียบเทียบความสามารถของ *Candida* sp. JC4 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Gordonia* sp. JC11 ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานเบอร์ 1 (fresh lubricant No. 1) และน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 (waste lubricant No. 2) โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NSW ที่เติมน้ำมันทดสอบ (รูปที่ 3.2 และ 3.3) จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมงที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ พบว่าน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานมีส่วนประกอบที่เป็นไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว (saturates) และอะโรมาติกใกล้เคียงกันในช่วง 40 - 50% ของน้ำหนักทั้งหมด แต่ส่วนประกอบของไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวในน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วมีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าอะโรมาติก (ตารางที่ 3.1) จากการทดลองพบว่าน้ำมันที่ทดสอบทั้งสองชนิดมีการสลายตัวโดยปัจจัยทางกายภาพ (abiotic factors) น้อยมาก โดยความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานเบอร์ 1 และน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลองนาน 5 วัน

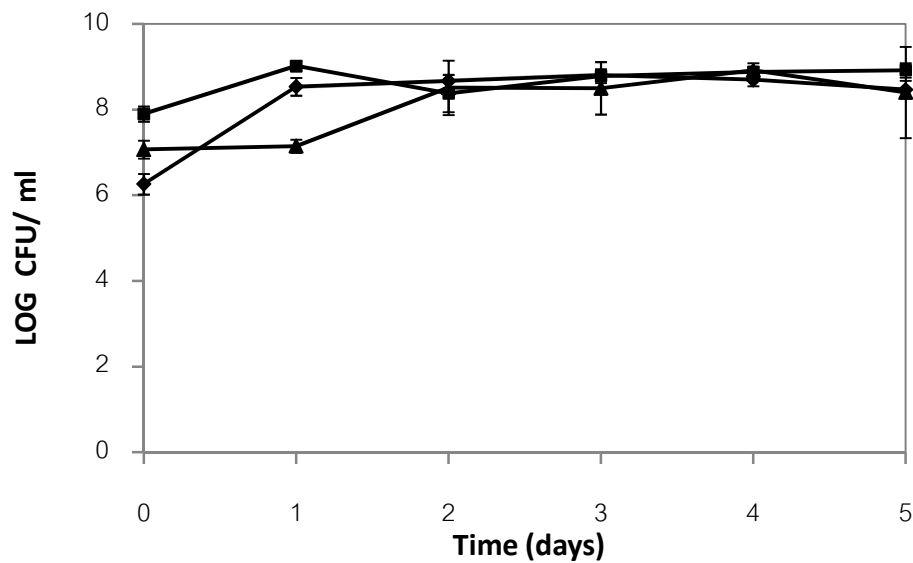
ในทางตรงกันข้ามการเติมเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีผลเพิ่มอัตราการย่อยสลายของน้ำมันทดสอบทั้ง 2 ชนิด ซึ่งน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานเบอร์ 1 ถูกย่อยสลายได้ดีกว่าน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 และเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันอีก 2 สายพันธุ์ ที่นำมาทดสอบในขั้นตอนนี้พบว่า *Gordonia* sp. JC11 ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด โดยทำให้ความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานเบอร์ 1 ลดลงจาก 200 เป็น 101 มก./ล. ภายใน 2 วัน และมีปริมาณน้ำมันคงเหลือ 85 มก./ล. ในวันที่ 5 ของการทดลอง ค่าความประสิทธิผลการย่อยสลายได้ 57% (รูปที่ 3.2 ก) สอดคล้องกับจำนวนเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 ที่เพิ่มขึ้นจาก 7.0 เป็น 8.5 log CFU/มล. ในช่วง 2 วันแรกของการทดลอง (รูปที่ 3.2 ข)

นอกจากนี้ *Gordonia* sp. JC11 ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 ทำให้มีปริมาณลดลงจาก 200 เป็น 121 มก./ล. ในวันที่ 5 ของการทดลอง ซึ่งมีประสิทธิภาพการย่อยสลายเป็น 40% (รูปที่ 3.3 ก) และมีรูปแบบการเจริญของเชื้อคล้ายกับในภาวะที่เติมน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานเบอร์ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 3.3 ข) ในทางตรงข้ามพบว่าประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเบอร์ 1 โดย *Candida* sp. JC4 มีค่าใกล้เคียงกับ *Microbacterium* sp. JC9 อย่างไรก็ตาม *Microbacterium* sp. JC9 ย่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 ได้ดีกว่า *Candida* sp. JC4 ซึ่งเชื้อ JC4 มีอัตราการเจริญต่ำเมื่อใช้น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 3.3 ข) เมื่อเทียบกับการเจริญของเชื้อในภาวะที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเบอร์ 1 (รูปที่ 3.2 ก)

(ก)

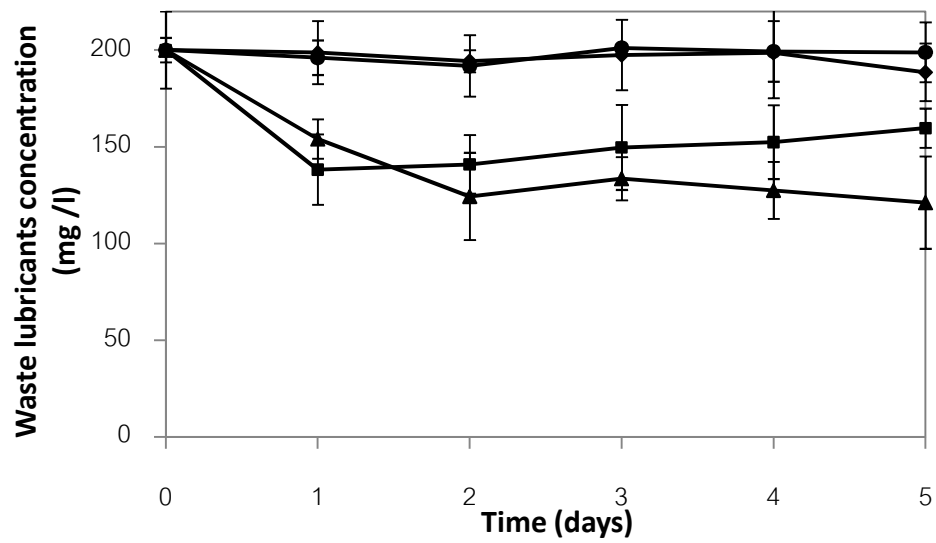


(ข)

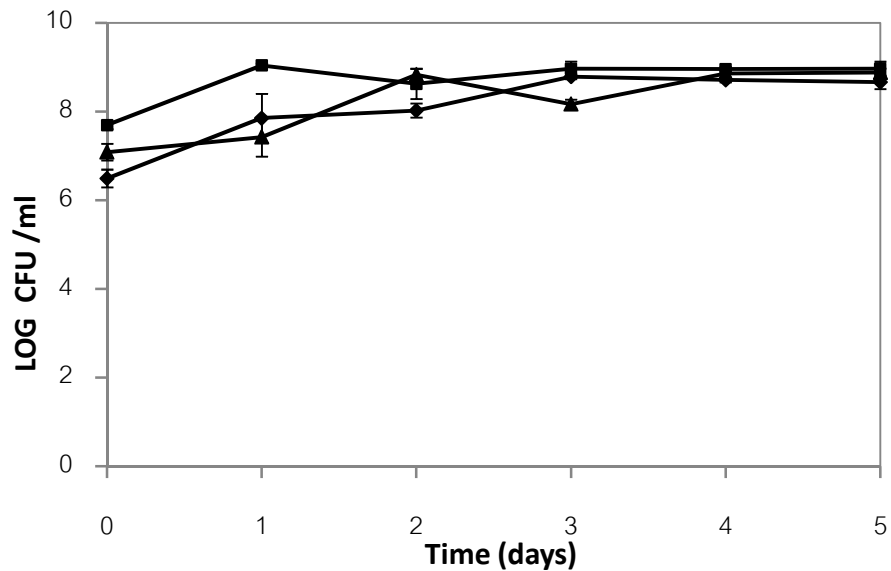


รูปที่ 3.2 ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นเบอร์ 1 (ก) และจำนวนเซลล์ (ข) ของ *Candida* sp. JC 4 (◆), *Microbacterium* sp. JC9 (■) และ *Gordonia* sp. JC11 (▲) ที่เลี้ยงในอาหาร NSW เทียบกับ ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ (●) โดยมีปริมาณน้ำมันเริ่มต้น 200 มก./ล. และมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.1 OD₆₀₀ ข้อมูลที่แสดงเป็นแบบ mean ± SD

(ก)



(ข)



รูปที่ 3.3 ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว เบอร์ 2 (ก) และจำนวนเซลล์ (ข) ของ *Candida* sp. JC 4 (◆), *Microbacterium* sp. JC9 (■) และ *Gordonia* sp. JC11 (▲) ที่เลี้ยงในอาหาร NSW ต่อเวลา เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ (●) โดยมีปริมาณน้ำมันเริ่มต้นคือ 200 มก./ล. และปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 OD₆₀₀ ข้อมูลที่แสดงเป็นแบบ mean ± SD

3.4.5 ความสามารถของ *Gordonia* sp. JC11 ในการย่อยสลายน้ำมันทดสอบชนิดต่างๆ

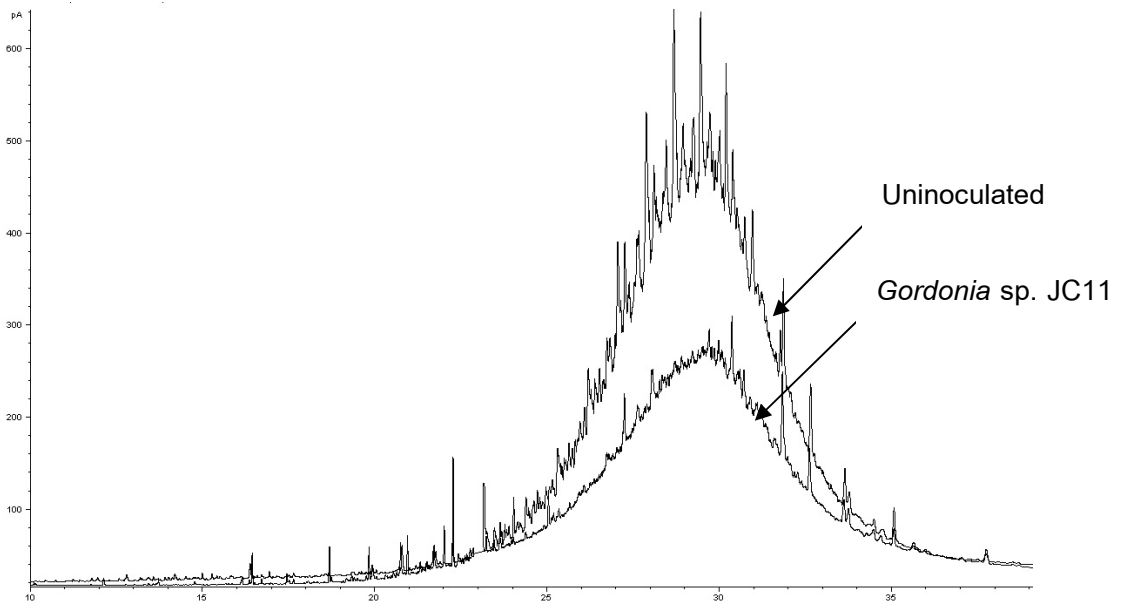
งานวิจัยในขั้นนี้คัดเลือกเฉพาะ *Gordonia* sp. JC11 ซึ่งมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานเบอร์ 1 และน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 จากผลการทดลองในข้อ 3.4.4 มาทดสอบการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสูง (1,000 มก./ล.) พบว่า ส่วนประกอบที่เป็นปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด (total petroleum hydrocarbon; TPH) ของน้ำมันทดสอบชนิดต่างๆ มีการระเหยเพียง 0 - 15% ตลอดระยะเวลา 5 วัน (ตารางที่ 3.6) ในทางตรงกันข้าม *Gordonia* sp. JC11 ย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดของน้ำมันหล่อลื่นทุกชนิดได้ประมาณ 25 - 55% (ตารางที่ 3.6) โดยย่อยไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวได้ 30 - 60% และย่อยสลายอะโรมาติกได้ 30 - 55% นอกจากนี้พบว่าเชื้อ JC11 สามารถย่อยสลายส่วนประกอบที่มีขั้ว (polars) ของน้ำมันหล่อลื่นได้หลายชนิด ยกเว้นส่วนประกอบที่มีขั้วของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 1 เท่านั้นที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ซึ่งปริมาณสารที่เพิ่มขึ้นนี้อาจจะเป็นสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายของไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติก เพราะ *Gordonia* sp. JC11 สามารถย่อยสลายองค์ประกอบทั้งสองชนิดดังกล่าวของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 1 ได้ปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำมันหล่อลื่นชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 3.6)

ตารางที่ 3.6 ประสิทธิภาพของ *Gordonia* sp. JC11 ในการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ

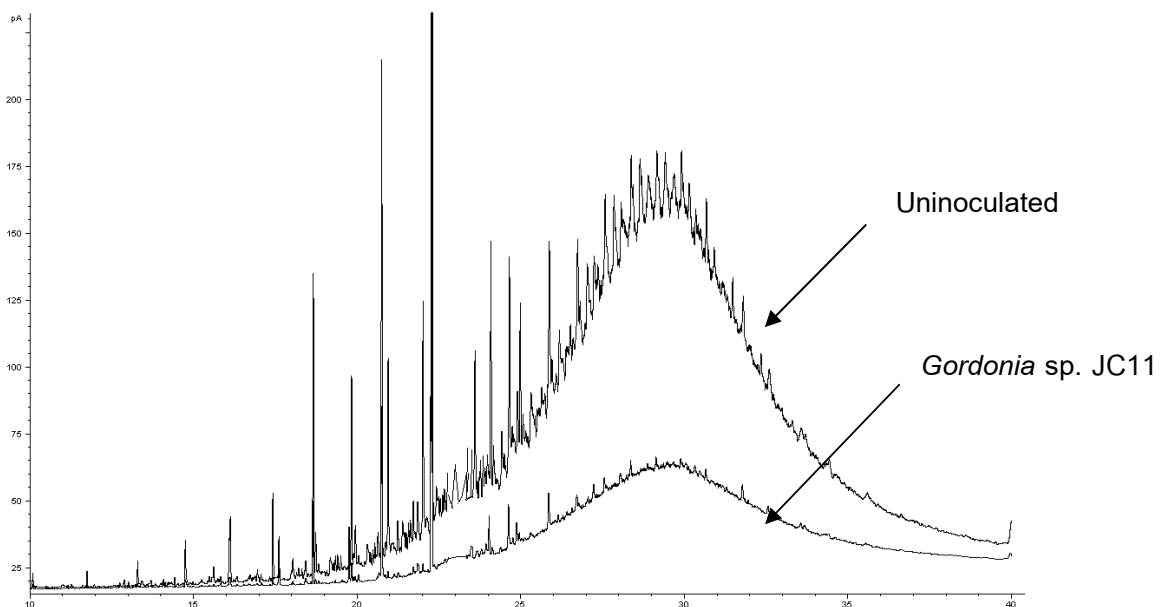
Oil sample	Oil removal (%)*			
	<i>Gordonia</i> sp. JC11			
	Total	Saturates	Aromatics	Polars
Fresh lube No.1	25.1 ± 3.1	31.7 ± 4.8	28.1 ± 2.8	16.7 ± 3.9
Fresh lube No.2	41.3 ± 4.7	38.7 ± 4.2	43.5 ± 9.2	17.7 ± 3.8
Waste lube No.1	55.5 ± 8.3	59.4 ± 6.0	55.1 ± 11.5	-49.7 ± 4.4
Waste lube No.2	45.7 ± 2.9	48.5 ± 0.8	43.5 ± 6.2	53.4 ± 1.7
Waste lube No.3	43.1 ± 3.5	40.2 ± 2.4	45.3 ± 3.1	70.7 ± 4.3
Waste lube No.4	30.4 ± 6.4	37.3 ± 7.6	43.2 ± 3.7	3.4 ± 0.8
Crude oil	20.8 ± 2.8	46.9 ± 6.8	39.8 ± 10.8	12.9 ± 5.3
Oil sample	Abiotic Control			
Fresh lube No.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Fresh lube No.2	3.6 ± 0.8	7.3 ± 1.1	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.2
Waste lube No.1	7.8 ± 1.8	5.5 ± 1.4	8.9 ± 0.6	-5.9 ± 9.3
Waste lube No.2	15.4 ± 4.0	14.3 ± 4.8	15.2 ± 2.9	14.6 ± 1.4
Waste lube No.3	13.7 ± 1.5	12.8 ± 4.3	6.6 ± 1.1	20.3 ± 4.8
Waste lube No.4	6.9 ± 0.5	5.7 ± 0.3	13.9 ± 0.6	0.0 ± 0.0
Crude oil	17.2 ± 5.7	30.8 ± 7.8	29.3 ± 6.7	2.9 ± 0.7

*ทำการทดสอบโดยบ่มเชื้อ *Gordonia* sp. JC11 (1.0 OD_{600}) ในอาหารเหลว NSW ที่เติมน้ำมันทดสอบชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,000 มก./ล. เป็นเวลา 5 วัน เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันคำนวณจากปริมาณน้ำมันคงเหลือในวันที่ 5 เทียบกับวันที่ 0

และจากผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบอัลเคนในน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 และ เบอร์ 4 โดย GC-FID พบว่า *Gordonia* sp. JC11 สามารถย่อยสลายอัลเคนสายยาว (long-chain alkanes) ได้ประมาณ 40-50% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (abiotic control) (รูปที่ 3.4) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายทางชีวภาพของอัลเคนจากการวิเคราะห์ด้วย GC-FID นี้มีค่าใกล้เคียงกับการลดลงของไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว (saturates) จากการวิเคราะห์ด้วย TLC-FID (ตารางที่ 3.6) นอกจากนี้โครมาโตแกรมจีซีซิงยังแสดงให้เห็นว่า น้ำมันหล่อลื่นแต่ละชนิดมีส่วนประกอบอัลเคนแตกต่างกัน ซึ่งมีผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายของ *Gordonia* sp. JC11 เช่น จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเบอร์ 1 โดย *Gordonia* sp. JC11 ที่ 200 และ 1,000 มก./ล. พบว่าความเข้มข้นสูงของน้ำมันหล่อลื่นเบอร์ 1 มีผลยับยั้งการย่อยสลายโดย *Gordonia* sp. JC11 เพราะน้ำมันชนิดนี้ถูกย่อยสลายเพียง 25% ที่ 1,000 มก./ล. ในขณะที่น้ำมันชนิดเดียวกันนี้ ถูกย่อยสลายถึง 57% ที่ความเข้มข้น 200 มก./ล. (รูปที่ 3.2ก และตารางที่ 3.6) ในทางตรงกันข้ามที่ระดับความเข้มข้นต่างกันของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 กลับพบว่าเชื้อ JC11 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายใกล้เคียงกัน ซึ่ง *Gordonia* sp. JC11 ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 ที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 1,000 มก./ล. ได้ 40% และ 46% ตามลำดับ (รูปที่ 3.3 ก และตารางที่ 3.6) ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายของ *Gordonia* sp. JC11 ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันหล่อลื่น นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติกที่เป็นส่วนประกอบของน้ำมันดิบได้ แต่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายต่ำ (ตารางที่ 3.6)



(ก) น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2



(ข) น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 4

รูปที่ 3.4 จีซีโครมาโตแกรมของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 (ก) และเบอร์ 4 (ข) ในวันที่ 5 ของการทดลอง เติม *Gordonia* sp. JC11 (1.0 OD_{600}) ในอาหาร NSW ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (1,000 มก./ล.) และบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ชุดควบคุมสำหรับการทดลองนี้ ได้แก่ ชุดที่ไม่เติมเชื้อ (uninoculated)

3.5 อภิปรายผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบนิเวศทางทะเล เขตชายฝั่งทะเลตะวันออก จำนวน 10 ไอโซเลท โดยวิธีเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารที่มีน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าประกอบด้วย จีโนส (จำนวนสายพันธุ์) *Gordonia* (2) *Candida* (2) *Brucella* (2) *Microbacterium* (1) *Enterococcus* (1) *Pseudomonas* (1) และ *Acinetobacter* (1) ซึ่งมีหลายรายงานวิจัยที่จัดชนิดจุลินทรีย์เหล่านี้ในกลุ่มเชื้อย่อยสลายน้ำมัน เช่น งานวิจัยของ Muthukumar และคณะ (2003) Chaerun และคณะ (2004) Al-Awadhi และคณะ (2007) Quatrini และคณะ (2008) ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันทั้ง 10 ไอโซเลท จะสามารถเจริญบนอาหารแข็ง NSW ที่มีน้ำมันดิบปกคลุมได้ แต่พบว่ามีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 1 ซึ่งการที่จุลินทรีย์ย่อยน้ำมันส่วนใหญ่ที่คัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ อาจเนื่องมาจากในน้ำมันหล่อลื่นมีส่วนประกอบที่เป็นอัลเคนสายยาว และมีสารเพิ่มคุณภาพหลายชนิดที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่ได้จากการเผาไหม้ของน้ำมัน ที่ยากต่อการถูกย่อยสลาย (Wentzel และคณะ 2007; Thompson และคณะ 2007) ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการกำจัดน้ำมันหล่อลื่นโดยวิธีทางชีวภาพ จะต้องใช้จุลินทรีย์กลุ่มที่ต่างจากจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันดิบ นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบสมบัติต่างๆ ของจุลินทรีย์ทั้ง 10 ไอโซเลท เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น สมบัติต่างๆ ที่ทดสอบได้แก่ การเจริญโดยใช้เทระเดเคนหรือพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ ความสามารถในการสร้าง EPS การทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชัน และค่า surface tension ผลการทดสอบพบว่า *Gordonia* sp. JC11 และ *Microbacterium* sp. JC9 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีเมื่อใช้เทระเดเคนหรือพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับการทดลองของ Medhi และ Giti (2008) ที่พบว่า *Pseudomonas* sp. BC ที่เจริญเพิ่มจำนวนได้ดีโดยมีไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) ออกเทน (octane) เฮกซะเดเคน (hexadecane) ออกทอะเดเคน (octadecane) เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถทำให้เกิดการย่อยสลายของน้ำมันดิบ (2.5%) ได้ถึง 83% จะเห็นได้ว่าการที่เชื้อสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีโดยใช้ไฮโดรคาร์บอนน้ำหนักโมเลกุลสูงเป็นแหล่งคาร์บอน จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อดังกล่าวในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น

ตะกอนเซลล์ของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้ สามารถทำให้น้ำมันดีเซลเกิดอิมัลชันได้ ซึ่งโดยทั่วไปกลไกแรกในการย่อยสลายน้ำมัน เกี่ยวข้องกับการเข้าทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ออกซิจีเนสที่เยื่อหุ้มเซลล์ การผลิตสารก่ออิมัลชันชีวภาพที่ตำแหน่งเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อย่อยน้ำมัน จึงช่วยเพิ่มความสามารถของเซลล์ในการนำน้ำมันเข้าเซลล์ (Vasileva-

Tonkova และคณะ, 2008) นอกจากนี้ตะกอนเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 และ *Microbacterium* sp. JC9 ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้มีค่า E_{24} สูง รวมทั้งส่วนน้ำใสที่ได้จากการตกตะกอนเซลล์ของ *Microbacterium* sp. JC9 *Gordonia* sp. JC11 และ *Candida* sp. JC4 สามารถทำให้น้ำมันดีเซลเกิดอิมัลชันและลดแรงตึงผิวของน้ำได้ ซึ่งสมบัติในการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชันของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ ช่วยเพิ่มการแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ และเพิ่มการละลายของน้ำมันหล่อลื่น นอกจากนี้ปัจจัยอื่นที่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นของจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งช่วยเพิ่มการเกาะติดแน่นของเซลล์บนหยดน้ำมัน ทำให้เขื่อนำหยดน้ำมันเข้าเซลล์ได้มากขึ้น (Deng และคณะ, 2010) ผลการทดลองพบว่า *Gordonia* sp. JC11 และ *Candida* sp. JC4 ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้มีค่าความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์สูง โดยเฉพาะ *Gordonia* sp. JC11 ที่ให้ค่า E_{24} ใกล้เคียงกับ *Gordonia* sp. CC-JG39 (85% ต่อ kerosene; 93% ต่อ diesel) (Lin และคณะ, 2005) ซึ่ง Obuekwe และคณะ (2009) รายงานว่า 74% ของจุลินทรีย์ย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด 46 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยน้ำมันดิบได้มากกว่า 40% เป็นเชื้อที่มีสมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์สูง นอกจากนี้ Masuoka และ Hazen (2004) รายงานว่าความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ *Candida* เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเส้นใยแมนโนโปรตีน (mannoprotein fibrils) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ยิ่งไปกว่านั้นในงานวิจัยนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันส่วนใหญ่สามารถผลิต EPS ได้ดี ยกเว้น *Gordonia* sp. JC8 ($24.7 \pm 1.6\%$) ที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 1 ได้เพียง $7.5 \pm 1.6\%$ เช่นเดียวกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ H ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและไบโอฟิล์มได้ดีที่สุด ทำให้เกิดการย่อยสลายน้ำมันดิบ (1%) ได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียย่อยน้ำมันดิบที่คัดแยกจากสิ่งแวดล้อมทางทะเลอีก 3 สายพันธุ์ (Mehdi และ Giti, 2008) ซึ่ง Perfumo และคณะ (2010) รายงานว่า EPS มีความสำคัญต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ (microbial interaction) และเกี่ยวข้องกับการเกิดอิมัลชันของสารไม่ชอบน้ำหลายชนิด และ EPS ยังจำเป็นต่อการเกาะแน่นของเซลล์บนพื้นผิววัสดุจริง (Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเชื้อย่อยน้ำมันที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ ไปผลิตเซลล์จริงสำหรับบำบัดคราบน้ำมันในพื้นที่ปนเปื้อน

การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งาน และน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ที่ความเข้มข้น 200 มก./ล. ของ *Gordonia* sp. JC11 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Candida* sp. JC4 พบว่า *Gordonia* sp. JC11 สามารถย่อยสลายน้ำมันทั้งสองชนิดได้สูงสุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเชื้อสายพันธุ์นี้มีค่าความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์สูง โดยที่ความสามารถในการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ มีความเกี่ยวข้องอย่างมากกับสมบัติความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์ของเชื้อ (Obuekwe และคณะ, 2009) นอกจากนี้เชื้อ JC11 สามารถผลิตสารก่อ

อิมัลชันชีวภาพได้สูงกว่า *Microbacterium* sp. JC9 สอดคล้องกับข้อสรุปที่ว่าสมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นปัจจัยที่บ่งชี้ถึงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ (Cameotra และ Singh, 2008) ในทางตรงกันข้าม *Candida* sp. JC4 มีประสิทธิภาพต่ำในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ซึ่งอาจเป็นเพราะในน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วมีสารประกอบที่เป็นพิษต่อการเจริญของยีสต์ เช่น ไฮโดรคาร์บอนสายยาว หรือสารที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของน้ำมันภายหลังการใช้งาน (Jirasripongpun, 2002) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มจำนวนได้ในอาหาร NSW ที่เติมน้ำมันทดสอบ ซึ่งแสดงถึงความสามารถของเซลล์ในการใช้น้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานหรือน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน นอกจากนี้เมื่อทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นที่ความเข้มข้นต่ำ (200 มก./ล.) พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานได้รวดเร็วกว่าน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ซึ่งอาจเป็นเพราะน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่ย่อยสลายได้ยาก ที่เกิดขึ้นระหว่างการเผาไหม้เครื่องยนต์ (Thompson และคณะ, 2007) สอดคล้องกับรายงานของ Jirasripongpun (2002) ที่พบว่าจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันทั้ง 23 สายพันธุ์ ที่คัดแยกจากดินปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่น สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานได้ดีกว่าน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ภายหลังการทดลองนาน 30 วัน

Gordonia sp. JC11 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงทุกชนิดที่นำมาทดสอบในงานวิจัยนี้ทั้งชนิดที่ยังไม่ใช้งาน และชนิดใช้งานแล้ว โดยมีประสิทธิภาพการย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำมันหล่อลื่น (1,000 มก./ล.) ได้ 25 - 50% ภายหลังการทดลองนาน 5 วัน แม้ว่าความสามารถในการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ขึ้นกับชนิดของน้ำมันหล่อลื่นที่นำมาทดสอบ แต่ *Gordonia* sp. JC11 ก็มีประสิทธิภาพย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ได้สูงกว่าในรายงานวิจัยอื่น เช่น จุลินทรีย์ที่คัดแยกจากป่าชายเลนสามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานสำหรับเครื่องยนต์ 4 จังหวะ (4-stroke mineral-derived lubricants) ที่ความเข้มข้น 1,000 มก./ล. ได้ 22% ภายหลังการทดสอบนาน 7 วัน (Mercurio และคณะ, 2004) และ *Gordonia* sp. NDKY76A ที่คัดแยกจากตัวอย่างดินสามารถย่อย car engine base oil (1%) ได้ 27% ภายหลังการทดลอง 5 วัน (Koma และคณะ, 2003) นอกจากนี้ *Gordonia* sp. JC11 สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว (saturates) และอะโรมาติก ที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันหล่อลื่นแต่ละชนิดได้ 30 - 60% และ 30 - 50% ตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าว สอดคล้องกับความสามารถในการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อสายพันธุ์นี้ ในอาหารที่เติมเทอร์อะเคนหรือพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ย่อย polars ที่เป็นส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือได้เพียงเล็กน้อย แต่เพิ่มปริมาณ polars ที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 1 ซึ่ง Lee และคณะ (2007) รายงานว่าโดยทั่วไป

องค์ประกอบของน้ำมันที่เป็นไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติกถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า องค์ประกอบที่เป็นสารมีขั้ว นอกจากนี้ส่วนประกอบมีขั้วของน้ำมันอาจมีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องจากการสะสมของสารมัธยันตร์ ที่เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว หรืออะโรมาติก

มีรายงานว่าแบคทีเรียในจีนัส *Gordonia* ได้ถูกคัดแยกจากพื้นที่ปนเปื้อนปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอนหลายแหล่ง รวมทั้งน้ำทะเล (Arenskotter และคณะ, 2004; Brioto และคณะ, 2006; Shen และคณะ, 2008; Quatrini และคณะ, 2008) และรายงานวิจัยก่อนหน้านั้นแสดงให้เห็นว่า *Gordonia* สามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ รวมทั้งมีลักษณะ พิเศษทางสรีรวิทยาของเซลล์ที่ช่วยเสริมประสิทธิภาพการย่อยสลายสารของเชื้อในจีนัสนี้ ได้แก่ ความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีค่าสูง ความสามารถในการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชัน และการ สร้าง EPS ซึ่งช่วยเพิ่มการนำสารที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำเข้าสู่เซลล์ (Arenskotter และคณะ, 2004; Fusconi และคณะ, 2006; Franzetti และคณะ, 2009; Fusconi และคณะ, 2010) และผลการ ทดลองจากรายงานวิจัยของ Medhi และ Giti (2008) สรุปได้ว่าความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ และความสามารถในการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชันของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ การย่อยสลายน้ำมันของเชื้อ สอดคล้องกับข้อมูลในรายงานวิจัยนี้ที่พบว่า *Gordonia* sp. JC11 มี ลักษณะต่างๆ ของเซลล์ดังที่กล่าวมา ทำให้เชื่อนี้มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์เรือประมง

บทที่ 4

การพัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ สำหรับย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง

4.1 บทนำ

มลพิษน้ำมันในเขตชายฝั่งทะเลของประเทศไทยเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง เห็นได้จากการตรวจพบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเล เช่น สุริยา มากจันทร์ และกัลยา วัฒนากร (2554) รายงานว่าบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยามีปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำสูง 0.32 ± 0.02 ไมโครกรัม/ลิตร ในเดือนกรกฎาคม และ 0.21 ± 0.06 ไมโครกรัม/ลิตร ในเดือนพฤศจิกายน 2553 ในเขตชายฝั่งทะเลของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณอ่าวไทยตอนบนเป็นที่ตั้งของโรงงานอุตสาหกรรม โรงกลั่นน้ำมัน ท่าเทียบเรือประมง และท่าเทียบเรือสินค้า ทำให้มีเรือสินค้าขนาดใหญ่ และเรือบรรทุกน้ำมันจำนวนมาก จึงเกิดปัญหาอุบัติเหตุการรั่วไหลและการลักลอบปล่อยน้ำมันเกิดขึ้นบ่อยครั้ง นอกจากนี้กิจกรรมของเรือขนาดเล็ก เช่น เรือประมงมักจะปล่อยน้ำเสียจากห้องเรือลงสู่ทะเลโดยตรง ทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล โดยมีรายงานการใช้ Segregated Ballast Tanks (SBTs) เพื่อบำบัดน้ำอับเฉาเรือปนเปื้อนน้ำมัน (Hampton และคณะ, 2003) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่เหมาะสมการใช้งานในเรือประมงขนาดเล็ก เนื่องจากมีพื้นที่จำกัด

การใช้วิธีชีวภาพในการบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เพราะเสียค่าใช้จ่ายต่ำและมีประสิทธิภาพดี (Okoh, 2006) ซึ่งการเติมจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันลงในน้ำทะเลที่ปนเปื้อนโดยตรง เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในกรณีที่น้ำทะเลมีจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันจำนวนน้อย อย่างไรก็ตามก็อาจเกิดปัญหาบางประการ เช่น เชื้อมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว หรือการตายของเชื้อที่เติมลงไป เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่ไม่เหมาะสม ภาวะทางกายภาพที่มีผลลดจำนวนเชื้อที่เติมลงไปในพื้นที่ปนเปื้อน เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำ ปริมาณสารอาหารต่ำ หรือมีปริมาณน้ำมันสูงเกินไป หรือปัจจัยจำกัดเนื่องจากอินเทอร์เฟซของน้ำและน้ำมัน สำหรับปัจจัยทางชีวภาพที่มีผลต่อจุลินทรีย์อิสระที่เติมลงไปบำบัดคราบน้ำมันในน้ำทะเล เช่น เกิดการแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นเพื่อแย่งสารอาหารที่มีอยู่จำกัด ได้รับสารปฏิชีวนะที่เชื้ออื่นสร้างขึ้น ถูกทำลายโดยโปรโตซัวหรือ แบคทีริโอฟาจ (bacteriophage) สาเหตุเหล่านี้ทำให้อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันในน้ำทะเลเกิดได้ช้า (Gentry และคณะ, 2004; Lin และคณะ, 2005; Gentili และคณะ, 2006) ซึ่งอาจแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้โดยใช้จุลินทรีย์ตรึง โดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุเพื่อ

ผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน (Liu และคณะ, 2009)

หัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ (ready-to-use inoculum) หรือ ผลิตภัณฑ์กำจัดสารปนเปื้อนทางชีวภาพ มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากถูกผลิตขึ้นโดยวิธีชีวภาพ สามารถนำไปใช้งานได้อย่างสะดวก รวดเร็ว โดยไม่ต้องใช้ผู้ชำนาญการ และไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง ตัวอย่างรายงานการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ เช่น Saeki และคณะ (2009) รายงานการพัฒนาผลิตภัณฑ์กำจัดคราบน้ำมัน JE1058BS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Gordonia* sp. JE-1058 สำหรับใช้กำจัดคราบน้ำมันในทะเลและชายฝั่ง นอกจากนี้ Podorozhko และคณะ (2008) ทดลองใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ขี้เลื่อยที่มีการเพิ่มสมบัติความไม่ชอบน้ำ (hydrophobised sawdust) เป็นวัสดุสำหรับตรึงเซลล์ *Rhodococcus ruber* ที่สามารถย่อยไฮโดรคาร์บอนได้ และ Quek และคณะ (2006) รายงานว่า *Rhodococcus* sp. F92 ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน สามารถย่อยสลายผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมได้หลายชนิดที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล นอกจากนี้ Gentili และคณะ (2006) ยังพบด้วยว่าเซลล์ของแบคทีเรียย่อยไฮโดรคาร์บอนที่ตรึงอยู่บนผงไคตินและไคโตซานสามารถย่อยน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ Obuekwe และ Al-Muttawa (2001) ได้ผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ซึ่งคงประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 45 °ซ นาน 6 สัปดาห์ จากรายงานทั้งหมดที่กล่าวมานี้จะเห็นได้ว่าการนำหัวเชื้อพร้อมใช้ไปบำบัดคราบน้ำมันในพื้นที่จริง มีประสิทธิภาพสูงและสามารถใช้ได้โดยสะดวก

อย่างไรก็ดี ยังไม่มีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ สำหรับกำจัดคราบน้ำมันหล่อลื่นในน้ำทะเล งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ สำหรับย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง โดยตรึงเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Brucella* sp. JC12 บนวัสดุต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น และมีสมบัติทางสรีรวิทยาของเซลล์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุตรึง (บทที่ 3) จึงคาดว่าจะสามารถเพิ่มความสะดวกในการเตรียมและพัฒนาเซลล์ตรึงเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดคราบน้ำมันเพื่อนำไปใช้ในน้ำทะเลปนเปื้อน นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อประจำถิ่นที่คัดแยกมาจากบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนวย จ.จันทบุรี ซึ่งจะใช้เป็นพื้นที่สำหรับทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ การนำจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่คัดแยกมาจากพื้นที่ปนเปื้อนกลับไปใช้บำบัดน้ำมันในพื้นที่เดิม อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน (Hosokawa และคณะ, 2009) สำหรับการเลือกชนิดของวัสดุตรึง มักจะดูจากสมบัติทางกายภาพของวัสดุ เช่น ลอยตัวได้ในน้ำทะเล มีความเสถียร และไม่สลายตัวเร็วในน้ำทะเล ในงานวิจัยนี้

เลือกโพลีเอทิลีน มาทดสอบประสิทธิภาพการใช้เป็นวัสดุตั้งเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากวัสดุตั้งชนิดนี้ไม่สลายตัวเร็วในน้ำทะเล มีรูพรุนสูง มีพื้นผิวมาก จึงเหมาะต่อการเกาะติดของเชื้อยอยน้ำมัน และมีราคาถูก (Romaskovic และคณะ, 2006; Ueno และคณะ, 2008) แต่เนื่องจาก PUF มีความเสถียรสูงจึงอาจก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติเพิ่มเติม เช่น พลาสติกชีวภาพ โดยเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพด้านต่างๆ กับ PUF เพื่อคัดเลือกชนิดของวัสดุตั้งที่เหมาะสม และสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของแบคทีเรีย หลังจากนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียและวัสดุตั้งที่มีประสิทธิภาพสูงไปพัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ แล้วทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมงในน้ำทะเลที่เก็บจากพื้นที่จริง ในระบบจำลองระดับห้องปฏิบัติการที่ไม่เติมสารอาหาร เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการนำหัวเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตขึ้นไปใช้บำบัดคราบน้ำมันในพื้นที่จริง

4.2 ขั้นตอนงานวิจัย

4.2.1 การคัดเลือกวัสดุตั้งและชนิดแบคทีเรียที่เหมาะสม

- (1) ชนิดของวัสดุตั้ง ได้แก่ PUF และพลาสติกชีวภาพ (บรรจุภัณฑ์ KU-GREEN และ BIO)
- (2) ชนิดของแบคทีเรีย ได้แก่ *Gordonia* sp. JC11 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Brucella* sp. JC12
- (3) การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตั้งเทียบกับเซลล์อิสระ

4.2.2. การพัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง

- (1) การทดลองตั้งเซลล์แบคทีเรียในภาวะที่คล้ายกับการนำไปใช้งานในพื้นที่จริง เพื่อคงประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้
- (2) การทดสอบอายุการเก็บเซลล์ตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0-8 สัปดาห์

4.2.3 การศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้

- (1) การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตขึ้น ในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเรือประมงชนิดใช้แล้วที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มก./ล.

- (2) การย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลที่ไม่เติมสารอาหาร ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้หัวเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตขึ้น

4.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

4.3.1 การคัดเลือกวัสดุที่ตรงที่เหมาะสม

ชนิดของวัสดุที่เลือกใช้ทดสอบ ได้แก่ PUF (บริษัท Thai Products Foam) และผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ (bioplastic) 2 ชนิด คือ KU-GREEN (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) และบรรจภัณฑ์เพื่อสิ่งแวดล้อม BIO (บริษัท Biodegradable Packaging for Environment) โดย KU-GREEN ผลิตจากแป้งมันสำปะหลังและอัดขึ้นรูปด้วยความร้อน ส่วน BIO เป็นภาชนะใส่อาหารผลิตจากขานอ้อย วัสดุทั้ง 3 ชนิด ได้ซื้อจากผู้ผลิตหรือตัวแทนจำหน่าย การเตรียมวัสดุทำโดยล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (เฉพาะ PUF) ตัดวัสดุทั้ง 3 ชนิด ให้มีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดเล็กที่ลอยน้ำได้ (strip) ขนาด 0.5 cm x 1 cm x 2 cm แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งด้วยความดันไอน้ำ (121°C 15 นาที) ซึ่ง Oh และคณะ (2000) รายงานว่าการใช้วัสดุรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดเล็ก ทำให้มีค่าพื้นที่ผิว/น้ำหนัก สูงที่สุด จึงดูดซับน้ำมันได้มากที่สุด

ทดสอบประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำมันของวัสดุที่ตรงตามวิธีดัดแปลงจาก ASTM F726-81 (1986) โดยเติมวัสดุที่ตรงน้ำหนัก 300 มก. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มล. ที่บรรจุน้ำทะเลสังเคราะห์ปริมาตร 25 มล. วางขวดทดลองบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชม. เติมน้ำมันดิบปริมาตร 20 μ l (เทียบเท่าประมาณ 20 มก.) ในขวดทดลอง รีบนำขวดทดลองไปเขย่า เป็นเวลาอีก 1 ชม. แล้วเติมน้ำมันดิบเพิ่มลงในขวดทดลอง และเขย่าอีกครั้ง ทำเช่นนี้ต่อไปจนกระทั่งสังเกตเห็นคราบน้ำมันลอยอยู่บนผิวน้ำทะเลสังเคราะห์ภายหลังการเขย่า คำนวณค่าการดูดซับน้ำมันของวัสดุที่ตรงแต่ละชนิดมีหน่วยเป็น กรัมของน้ำมัน/กรัมของวัสดุที่ตรง จากสูตรค่าการดูดซับน้ำมันของวัสดุที่ตรง = ปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับ / น้ำหนักวัสดุที่ตรง

4.3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์

การทดลองในขั้นนี้ใช้วัสดุที่ตรงชนิดที่ได้คัดเลือกจากข้อ 4.3.1 ส่วนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่นำมาทดสอบมี 3 สายพันธุ์ คือ *Gordonia* sp. JC11 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Brucella* sp. JC12 ซึ่งใช้ทั้งในรูปแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมของ JC11+JC9+JC12 ในการทดลองนี้เตรียมหัวเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.2 และแขวนลอยเซลล์ในสารละลายไฮเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium-phosphate buffer) (สูตรกรัมต่อลิตร ประกอบด้วย Na_2HPO_4 , 3.53; KH_2PO_4 , 3.39) ดัดแปลงวิธีตรึงเซลล์จากรายงานวิจัยของ Podorozhko และคณะ (2008) โดยเติมสารละลายเซลล์ปริมาตร 50 มล. ($\text{OD}_{600} = 1.0$) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีวัสดุที่ตรงปลอดเชื้อ 250

มก. บรรจุอยู่ หลังจากนั้นนำขวดรูปชมพู่ไปวางบนเครื่องเขย่า (130 รอบ/นาที) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทุกๆ 24 ชม. นำขวดตัวอย่างจำนวน 3 ข้าง มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุตั้ง โดยเทสารแขวนลอยเซลล์ที่คงเหลือจากการเกาะติดบนวัสดุตั้งออกจากขวดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยง และเติมเฉพาะส่วนตะกอนเซลล์ลงในอลูมิเนียมฟอยด์ ซึ่งน้ำหนักทั้งหมด และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 24 ชม. นำภาชนะทดลองไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งจนกระทั่งมีน้ำหนักคงที่ จึงคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง จากค่าที่แตกต่างกันระหว่างน้ำหนักที่ได้จากการชั่งครั้งแรก และค่าที่มีน้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักที่ได้มาใช้คำนวณประสิทธิภาพการเกาะติดของเซลล์ในหน่วย มก.ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/กรัมของวัสดุตั้ง ตามสูตร

$$C = (C_{init} - C_{res}) \times V / m$$

C = ความจุในการดูดซับของวัสดุตั้ง (มก.ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/กรัมของวัสดุตั้ง)

C_{init} = ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ก่อนการตั้งเซลล์ (มก.ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/ มล.)

C_{res} = ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์หลังการตั้งเซลล์ (มก.ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/มล.)

V = ปริมาตรของสารแขวนลอยเซลล์ (มล.)

m = น้ำหนักของวัสดุตั้ง (กรัม)

วิเคราะห์ลักษณะการเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิววัสดุตั้ง ด้วยกล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของเซลล์ตั้งเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ

การทดลองในขั้นนี้ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากการทดลองของ Oh และคณะ (2000) ร่วมกับการทดลองของ Rahman และคณะ (2006) โดยเติมแบคทีเรียที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระ หรือเซลล์ตั้ง (เตรียมตามวิธีข้อ 4.3.2 บ่มฟอสก์ที่ 130 รอบ/นาที 5 วัน ล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดบนวัสดุตั้ง 2 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ หลังจากนั้นตากเซลล์ตั้งให้แห้งภายในตู้ปลอดเชื้อ นาน 12 ชม. ก่อนนำไปใช้งาน) ลงในฟอสก์ที่บรรจุอาหารเหลว NSW ปริมาตร 50 มล. และเติมน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 ที่ความเข้มข้น 1,000 มก./ล. ซึ่งตัวอย่างน้ำมันนี้ได้ผ่านการใช้งานในเครื่องยนต์เรือประมง และมีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.1 งานวิจัยในบทที่ 4 นี้ ใช้น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 ตลอดจนงานวิจัย เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของการแปรผลการทดลองหากใช้น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วต่างชนิดกัน การทดลองในขั้นนี้ประกอบด้วย 4 ชุดทดลอง คือ (A) PUF-immobilized cells ซึ่งเติมหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ 250 มก. (B) Free cells โดยเติมเซลล์ที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับปริมาณเซลล์ที่เกาะติดบนวัสดุตั้ง (C) ชุดควบคุมการลดลงของน้ำมัน

สำหรับเซลล์ตรึง โดยเติม PUF ปลอดภัย 250 มก. และ (D) ชุดควบคุมการลดลงของน้ำมัน สำหรับเซลล์อิสระ ทุกชุดทดลองทำ 3 ซ้ำ และบ่มเชื้อ 5 วัน บนเครื่องเขย่า (200 รอบ/นาที) ที่ อุณหภูมิห้อง สกัดน้ำมัน ตามวิธีข้อ 3.3.3 วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันด้วย TLC-FID และ คำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันทดลองงานวิจัยนี้ ตามสูตร: $Oil\ removal\ (\%) = 100 \times [Oil\ component\ (T_0) - Oil\ component\ (T_x)] / Oil\ component\ (T_0)$ โดย T_0 หมายถึง องค์ประกอบน้ำมันในชุดทดลองวันที่ 0 และ T_x หมายถึงองค์ประกอบน้ำมันในชุดทดลอง ณ วันที่ ต้องการวิเคราะห์

4.3.4 การทดลองตรึงเซลล์แบคทีเรียในภาวะที่คล้ายกับการนำไปใช้งานในพื้นที่จริง

ชนิดของเซลล์ตรึงที่ใช้สำหรับการทดลองในหัวข้อนี้ได้จากการคัดเลือกในข้อ 4.3.3 โดยพิจารณาจากความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว การทดลองนี้ได้ปรับวิธีผลิต หัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ โดยตรึงเซลล์ในภาวะที่คล้ายกับเมื่อนำไปใช้งานในพื้นที่จริงซึ่งเป็นน้ำทะเลที่มีคราบน้ำมันปนเปื้อน เพื่อให้แบคทีเรียมีความคุ้นเคยกับภาวะจริงและคงประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันได้ ขั้นตอนการตรึงเซลล์ทำโดยเติมหัวเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์เป็น $OD_{600} = 0.1$ ในพลาสติกขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเหลว NSW ปริมาตร 50 มล. และน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (100 มก./ล.) (รูปที่ 4.1) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 130 รอบ/นาที เพื่อให้เซลล์เกาะบนวัสดุตรึงได้ดี เป็นเวลา 7 วัน ทุกๆ 24 ชม. เก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ เพื่อหา ระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ โดยพิจารณาจาก 1) มีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่บนวัสดุตรึง น้อยที่สุด เพื่อให้มีผลน้อยที่สุดในการเพิ่มปริมาณน้ำมันเริ่มต้นในน้ำทะเล เมื่อนำหัวเชื้อแบคทีเรีย พร้อมใช้ไปย่อยน้ำมัน 2) มีปริมาณเซลล์มีชีวิตเกาะอยู่บนวัสดุตรึงมากที่สุด เพื่อเพิ่ม ความสามารถในการย่อยน้ำมันของเซลล์ตรึง และ 3) หัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้มีประสิทธิภาพสูง ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นทำโดยนำ เซลล์ที่ตรึงในระยะเวลาตั้งแต่ 0-7 วัน ปริมาณ 250 มก. บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มล. ที่มีอาหาร เหลว NSW ปริมาตร 50 มล. และเติมน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ความเข้มข้น 1,000 มก./ล. บ่มบน เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 5 วัน ทุกชุดทดลองทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันคงเหลือโดยสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยใช้วิธีสกัดตามข้อ 3.3.3 และ วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันด้วย TLC/FID หลังจากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย น้ำมันตามสูตรในข้อ 4.3.3



รูปที่ 4.1 การเตรียมเซลล์ตรึงโดยเติมหัวเชื้อ *Gordonia* sp. JC11 ลงในพลาสติกบรรจุอาหาร NSW ที่มีวัสดุตรึง PUF ปลอดเชื้อ (ก) และเซลล์ตรึงพร้อมใช้ที่ได้จากการตรึงเซลล์ 3 วัน (ข)

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุตรึง ได้ใช้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เกาะอยู่บนวัสดุตรึง เพื่อให้แปรผลค่าประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของเซลล์ตรึงได้ถูกต้องมากกว่าการใช้น้ำหนักเซลล์ทั้งหมดบนวัสดุตรึง ซึ่งเป็นค่ารวมของเซลล์ทั้งหมดที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิตที่เกาะอยู่บนวัสดุตรึงในหน่วยน้ำหนักแห้งของเซลล์ตรึง/กรัมของวัสดุตรึง ดังเช่นที่ใช้ในการตรึงเซลล์ข้อ 4.3.2 การคำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อกรัมของวัสดุตรึง (log CFU/g PUF) ทำโดยบรรจุเซลล์ตรึงที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อปริมาณ 12.5 มก. ในหลอดทดลองขนาด 22 มล. เติมสารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 12.5 มล. หลังจากนั้นนำหลอดทดสอบไปวางในเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่ 35 KHz นาน 5 นาที และปั่นผสมนาน 2 นาที เพื่อให้เซลล์ที่เกาะบนวัสดุตรึงหลุดออก แล้วจึงนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้มานับจำนวนเชื้อบนอาหารแข็ง 0.25% LB โดยเทคนิค drop plate

4.3.5 การทดสอบอายุการเก็บเซลล์ตรึงที่อุณหภูมิ 4°C ที่ระยะเวลา 0-8 สัปดาห์

ทดสอบอายุการเก็บเซลล์ตรึงที่ใช้วิธีตรึงเซลล์ตามข้อ 4.3.4 โดยเก็บเซลล์ตรึงในตู้เย็น (ยี่ห้อ Sharp, Japan) อุณหภูมิ 4°C ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ แล้วนำเซลล์ตรึงที่เก็บมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน โดยเติมเซลล์ตรึง 250 มก. ในพลาสติกขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว NSW ปริมาตร 50 มล. และน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (100 มก./ล.) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า (130 รอบ/นาที) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันคงเหลือในขวดทดสอบโดยสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันด้วย TLC/FID และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เกาะอยู่บนวัสดุตรึง

4.3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเรือประมงชนิดใช้แล้วที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มก./ล. โดยเติมเซลล์ตรึง 250 มก. ลงในพลาสติกที่บรรจุอาหารเหลว NSW ปริมาตร 50 มล. และเติมน้ำมันทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มเช็บบนเครื่องเขย่า (130 รอบ/นาที) อุณหภูมิห้อง นาน 5 วัน วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันคงเหลือในขวดทดสอบโดยสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันด้วย TLC/FID นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เกาะบนวัสดุตรึง

4.3.7 การศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นในน้ำทะเลจริงที่ไม่เติมสารอาหารในระดับขวดเขย่า

(1) การเก็บน้ำทะเลจากพื้นที่จริง และการเตรียมชุดทดลอง

ตรวจสอบคุณภาพน้ำทะเลในพื้นที่จริง โดยเก็บตัวอย่างที่ผิวหน้าน้ำทะเลซึ่งมีระดับความลึกประมาณ 60 ซม. บริเวณท่าเรือประมงสิงห์อานวย จังหวัดจันทบุรี ระหว่าง 27 กุมภาพันธ์ 2552 ถึง 21 มกราคม 2553 บริเวณชายฝั่ง จังหวัดจันทบุรี วัดค่าความเค็มของน้ำทะเลด้วย Salinity Hand Refractometer รุ่น 508-II 0-10% (Nippon Optical Work Co., Ltd., Japan) และค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย pH Meter (INDEX รุ่น ID1000, USA) นอกจากนี้ ในวันที่ 21 มกราคม 2553 ได้เก็บตัวอย่างน้ำทะเลเพื่อนำมาทดสอบการย่อยน้ำมันของเซลล์ตรึงในระดับขวดเขย่า โดยเก็บที่ผิวหน้าน้ำทะเลจากบริเวณโดยรอบท่าเรือ 3 จุด และนำน้ำทะเลรวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง เก็บรักษาตัวอย่างน้ำทะเลให้คงสภาพเดิมโดยแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งตลอดเวลา และทำการทดลองทันทีที่ถึงห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ได้ส่งตัวอย่างน้ำทะเลข้างต้นไปวิเคราะห์ค่าบีโอดี ปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทั้งหมด ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด รวมทั้งค่าน้ำมันและไขมัน ที่บริษัท เพทโร-อินสตรูเมนต์ จำกัด (Petro-Instruments Corp., Ltd.) การส่งตัวอย่างน้ำทะเลเพื่อวิเคราะห์ค่าบีโอดี จะใส่น้ำให้เต็มขวด เพื่อป้องกันการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำ ตัวอย่าง การรักษาสภาพตัวอย่างน้ำทะเลก่อนการวิเคราะห์พารามิเตอร์อื่นๆ ให้เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มล. ต่อตัวอย่าง 1,000 มล. แล้วเขย่าให้เข้ากัน

ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในระบบจำลอง โดยเติมน้ำทะเลปริมาตร 50 มล. ลงในพลาสติกขนาด 250 มล. และน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (100 มก./ล.) ในการทดลองนี้ประกอบด้วย 2 ชุดทดลอง คือ (A) bioaugmentation โดยเติมเซลล์ตรึง 250 มก. และ (B) natural attenuation ซึ่งจะมีเฉพาะน้ำทะเล เพื่อศึกษาการลดลงของน้ำมันโดยวิธีทางกายภาพและโดยจุลินทรีย์ท้องถิ่นของน้ำทะเล ทุกชุดทดลองทำ 3 ซ้ำ นำพลาสติกไปวางบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 130 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 ชม. ทุกๆ 12 ชม. เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

ทั้งหมด (ตามวิธีข้อ 3.3.3) และวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันโดยวิธี MPN ซึ่งสะดวกสำหรับกรณีที่มีตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จำนวนมาก

(2) การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธี MPN

วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำทะเลและบนวัสดุตั้ง โดยใช้วิธี MPN (3 ซ้ำ ต่อการวิเคราะห์แต่ละค่าการเจือจาง) ตามวิธีการทดลองของ Haines และคณะ (1996) โดยเติมอาหารเหลว Marine broth (Difco) ปริมาตร 180 μ l ลงในแก้วที่ 1-8 ในแต่ละหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) ชนิดกันแบน (บริษัท Corning, USA) แล้วเติมตัวอย่างน้ำทะเลหรือสารละลายเซลล์ที่หลุดจากการเกาะบนวัสดุตั้งที่ยังไม่เจือจางปริมาตร 20 μ l ลงในแก้วแรกผสมตัวอย่างด้วยไมโครปิเปตต์ชนิด 8 หัวจ่าย ขนาด 200 μ l (รุ่น BPE-200 บริษัท Labnet International Inc., USA) จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ในไมโครไตเตอร์เพลทแก้วที่ 1 ปริมาตร 20 μ l ไปยังแต่ละหลุมที่อยู่ในแก้วที่สองของไมโครไตเตอร์เพลท ผสมตัวอย่าง และปิเปตตัวอย่างโดยวิธีเดิมไปยังแต่ละหลุมที่อยู่ในแก้วที่สาม เพื่อเจือจางตัวอย่างจนกระทั่งถึงแก้วที่เจ็ด ซึ่งได้ทั้งหมด 7 ค่าการเจือจาง ส่วนในแก้วที่แปดจะใช้เป็นชุดควบคุม (uninoculated control) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน จึงนำไปวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ โดยนำไปอ่านผลด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงสำหรับไมโครไตเตอร์เพลท (Microplate reader รุ่น EL₈₀₀ บริษัท Biotek-Instruments, Inc., USA) ที่ความยาวคลื่น 540 nm นับจำนวนหลุมที่ให้ผลบวกในการทดสอบ คือ มีค่าการดูดกลืนแสง (ความขุ่น) สูงกว่าชุดควบคุม เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์ แล้วจึงนำไปเทียบค่ากับตาราง MPN (3-tube MPN Table)

(3) การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันโดยวิธี MPN

สำหรับการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในน้ำทะเลและบนวัสดุตั้ง จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันตามวิธีเตรียมที่ดัดแปลงจาก Jonhsen และคณะ (2002) โดยปิเปตสารละลายของน้ำมันที่ละลายใน *n*-Hexane (5 มก./มล.) ปริมาตร 20 μ l ลงในไมโครไตเตอร์เพลทแต่ละหลุมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 มก./หลุม ระวัง *n*-Hexane ในตู้ดูดควันไอระเหยและสารเคมี (รุ่น ESCO บริษัทกิบไทย) นาน 2 ชม. จึงนำไมโครไตเตอร์เพลทมาเติมอาหารเหลว NSW ปริมาตร 180 μ l และเติมตัวอย่างน้ำทะเลหรือสารละลายเซลล์ที่หลุดจากการเกาะบนวัสดุตั้งปริมาตร 20 μ l แล้วเจือจางตัวอย่างจุลินทรีย์ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด บ่มไมโครไตเตอร์เพลท ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน และวิเคราะห์ผลการเจริญของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน โดยเติมสารละลาย Iodonitrotetrazolium chloride (INT dye) ปลอดภัย (ผลิตภัณฑ์ของ AMRESCO, 98% purity) ความเข้มข้น 3 กรัม/ลิตร DDW ปริมาตร 50 μ l ลงในไมโครไตเตอร์เพลทแต่ละหลุม ผสมสารโดยนำไปวางบนเครื่องเขย่าสำหรับไมโครไตเตอร์เพลท (Microplate shaker) (รุ่น PSU-2T บริษัท Biosan Ltd., Latvia) เป็นเวลา 5 ชม. สังเกตตะกอนสี

ส้มหรือสีชมพูของสารฟอร์มาซาน (formazan) ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ INT แสดงว่าผลทดสอบเป็นบวก นับจำนวนหลุมที่ให้ผลบวกในการทดสอบ นำไปเทียบค่ากับตาราง MPN

4.4 ผลการทดลอง

4.4.1 การคัดเลือกวัสดุตั้งและชนิดแบคทีเรียที่เหมาะสม

(1) การคัดเลือกวัสดุตั้งที่เหมาะสม

เนื่องจากจะนำเซลล์ตั้งไปใช้บำบัดควบน้ำมันบนผิวหน้าน้ำทะเล ดังนั้นวัสดุตั้งที่นำมาทดสอบในงานวิจัยนี้จึงต้องเป็นชนิดที่สามารถลอยน้ำได้ จึงศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง PUF และพลาสติกชีวภาพ 2 ชนิด คือบรรจุภัณฑ์ KU-GREEN และ BIO ที่ผลิตจากแป้งมันสำปะหลังและชานอ้อย ผลการทดสอบสมบัติในการดูดซับน้ำมัน การลอยตัว และความคงทนของวัสดุตั้งทั้ง 3 ชนิด แสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่าพลาสติกชีวภาพทั้งสองชนิดดูดซับน้ำมันได้ต่ำ (~0.1%) และสลายตัวเร็วในน้ำทะเล โดยสังเกตเห็นการสลายตัวของพลาสติกชีวภาพทั้งสองชนิดภายหลังการทดสอบเพียง 2 วัน ในทางตรงกันข้าม PUF สามารถดูดซับน้ำมันได้สูงสุด (~8 g oil/g PUF) ลอยตัวได้ดีในอาหารเหลว NSW และมีความคงตัวสูง (100%) โดยไม่สลายตัวภายหลังการทดสอบนาน 5 วัน ดังนั้นจึงเลือก PUF สำหรับใช้เป็นวัสดุตั้งเซลล์ของแบคทีเรียย่อยน้ำมันต่อไป

ตารางที่ 4.1 สมบัติทางกายภาพของวัสดุตั้งเซลล์ชนิดต่างๆ

Type/Carriers	Oil Absorbency ^a (g/g carriers)	Floatability ^b	Stability ^c (%)
Synthetic carriers			
PUF	8.06	ดี	100
Bioplastics			
KU-GREEN	0.15	ไม่ดี	49
BIO	0.12	ปานกลาง	38

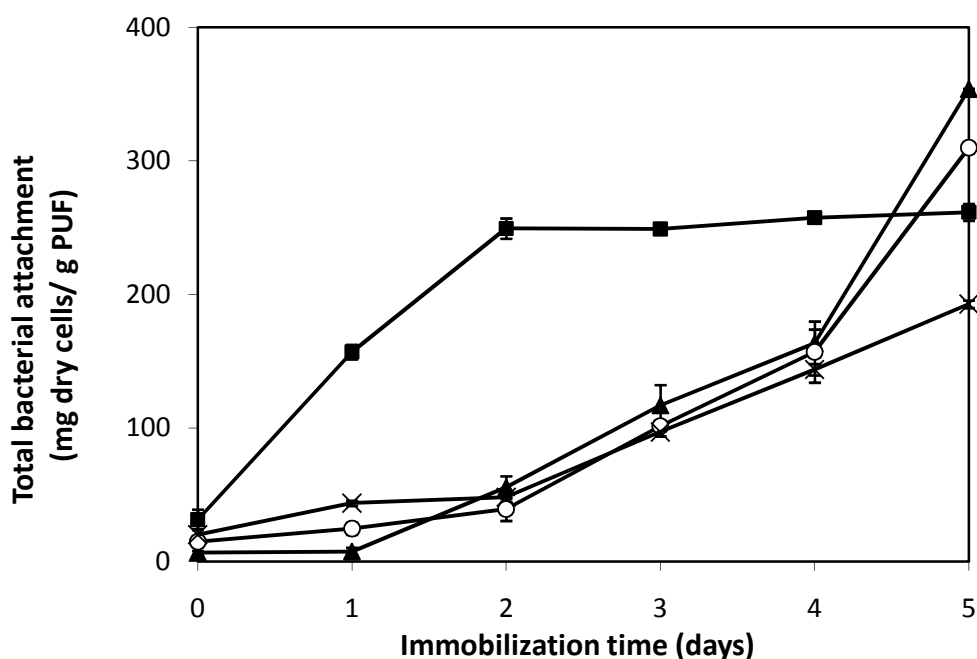
^a ใช้วิธีทดสอบตาม ASTM- F726-81 method (1986)

^b ใช้วิธีสังเกตหลังจากนำวัสดุตั้ง 250 มก. เติมนลงในพลาสติกบรรจุอาหารเหลว NSW ปริมาตร 50 มล. และนำไปวางบนเครื่องเขย่า 130 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง 5 วัน

^c ชั่งน้ำหนักแห้งของวัสดุตั้ง 250 มก. หลังจากทดสอบการลอยตัวในอาหาร NSW เป็นเวลา 5 วัน %Stability = (น้ำหนักแห้งของวัสดุตั้งวันที่ 0 - น้ำหนักแห้งของวัสดุตั้งวันที่ 5) / น้ำหนักแห้งของวัสดุตั้งวันที่ 0) x 100

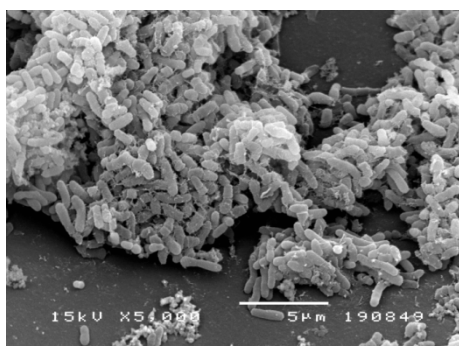
(2) การคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์

การทดลองในขั้นนี้เปรียบเทียบแบคทีเรียย่อยน้ำมัน 3 สายพันธุ์ คือ *Gordonia* sp. JC11 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Brucella* sp. JC12 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกจากน้ำทะเลบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดบน PUF ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียทุกชนิดสามารถเกาะติดบน PUF ได้ดี โดยมีมวลเซลล์เท่ากับ 261.6-353.8 มก.น้ำหนักเซลล์แห้ง/กรัม PUF อย่างไรก็ตามพบว่าการเกาะติดของเชื้อ JC11 สามารถเกาะติดบน PUF ได้เร็วกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น โดยมีมวลเซลล์เท่ากับ 249.4 มก.น้ำหนักเซลล์แห้ง/กรัม PUF ในวันที่ 2 ของการตรึงเซลล์ (รูปที่ 4.2) หลังจากนั้นมวลเซลล์ที่เกาะบน PUF ของเชื้อ JC11 มีค่าคงที่ในช่วง 249.4-261.6 มก.น้ำหนักเซลล์แห้ง/กรัม PUF แสดงว่า *Gordonia* sp. JC11 มีประสิทธิภาพในการเกาะติดสูงสุด (Attachment Efficiency, AE) ตั้งแต่วันที่ 2 ของการตรึงเซลล์ ซึ่งการเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียย่อยน้ำมันที่สามารถเกาะติดได้รวดเร็ว และมีค่า AE คงที่ จะทำให้เกิดความสะดวก ในการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้เพื่อย่อยน้ำมัน

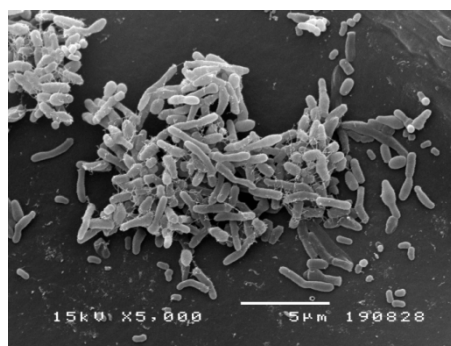


รูปที่ 4.2 การเกาะติดของแบคทีเรียทั้งหมดบนพื้นผิว PUF ของ (■) *Gordonia* sp. JC11 (▲) *Microbacterium* sp. JC9 (○) *Brucella* sp. JC12 และ (x) เชื้อผสมของ JC11+JC9+JC12 แสดงผลในรูป mean \pm SD

ศึกษาลักษณะการเกาะติดของแบคทีเรียแต่ละชนิดบนพื้นผิว PUF ที่มีขนาดรูประมาณ 500 μ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM, $\times 5,000$) ดังแสดงอยู่ในรูปที่ 4.3 ซึ่งพบการเกาะติดของเชื้อเดี่ยว 3 สายพันธุ์ บนพื้นผิว PUF ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่มีขนาดรูปร่าง และสมบัติทางสรีรวิทยาของเซลล์แตกต่างกัน คือ *Gordonia* sp. JC11 มีรูปร่างแบบแท่งสั้น (short rod) (รูปที่ 4.3 ก) *Microbacterium* sp. JC9 มีรูปร่างเป็นแท่งยาว (long rod) (รูปที่ 4.3 ข) และ *Brucella* sp. JC12 มีรูปร่างเป็นแท่งยาว (bacilli) และมีขนาดเซลล์ใหญ่กว่าแบคทีเรียชนิดอื่น (รูปที่ 4.3 ค) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเกาะติดของแบคทีเรียแต่ละชนิดบน PUF จะเห็นว่า มีกลุ่มเซลล์ *Gordonia* sp. JC11 ปริมาณมากกว่า *Microbacterium* sp. JC9 และ *Brucella* sp. JC12 ตามลำดับ สอดคล้องกับการที่ *Gordonia* sp. JC11 มีขนาดเซลล์เล็กที่สุด ในทางตรงกันข้ามพบว่าเชื้อผสมของ JC11+JC9+JC12 มีปริมาณเซลล์ที่เกาะอยู่บน PUF น้อยกว่าเซลล์ของเชื้อเดี่ยว (รูปที่ 4.3 ง) ทั้งนี้อาจเกิดจากเซลล์ของ *Brucella* sp. JC12 ที่มีขนาดเซลล์ใหญ่ที่สุด จึงมีผลกีดขวางการเกาะ (cellular hindrance effect) ของเซลล์ *Gordonia* sp. JC11 และ *Microbacterium* sp. JC9 ที่มีขนาดเซลล์เล็กกว่า



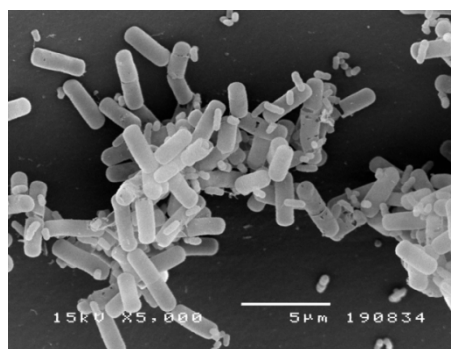
(ก)



(ข)



(ค)

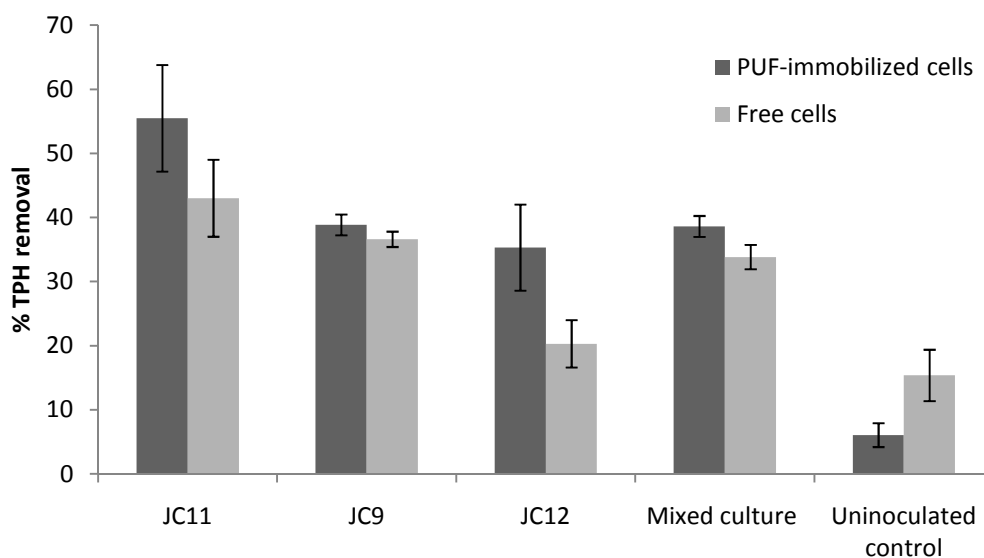


(ง)

รูปที่ 4.3 รูปจากกล้อง SEM ($\times 5000$) แสดงกลุ่มเซลล์ของแบคทีเรียย่อยน้ำมันสายพันธุ์ต่างๆ ที่เกาะอยู่บน PUF ภายหลังจากตรึงเซลล์บนเครื่องเขย่า (130 รอบ/นาที) อุณหภูมิห้อง 5 วัน (ก) *Gordonia* sp. JC11 (ข) *Microbacterium* sp. JC9 (ค) *Brucella* sp. JC12 และ (ง) เชื้อผสมของ JC11+JC9+JC12

(3) ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ

ผลการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของแบคทีเรียแต่ละชนิด เมื่อเตรียมในรูปแบบ PUF-immobilized cells และเซลล์อิสระ แสดงอยู่ในรูปที่ 4.4 เมื่อเปรียบเทียบในชุดเซลล์อิสระพบว่า *Gordonia* sp. JC11 สามารถย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดได้มากที่สุดเท่ากับ 43% และเมื่อเปรียบเทียบในชุดเซลล์ตรึง พบว่า *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บนโพรพอลิยูรีเทนสามารถย่อยน้ำมันได้สูงกว่าเซลล์ตรึงชนิดอื่น และมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระ (55%) ในขณะที่การลดลงของน้ำมันในชุดควบคุมที่ไม่เติมเซลล์เท่ากับ 15% และการลดลงของน้ำมันในชุดควบคุมที่เติมวัสดุตรึงปลอดเชื้อเท่ากับ 6% ทั้งนี้คาดว่าเพราะน้ำมันส่วนใหญ่ถูกดูดซับอยู่บน PUF ที่มีลักษณะเป็นรูพรุนในขณะที่มีการเขย่าให้อากาศ จึงทำให้น้ำมันมีการระเหยได้น้อยกว่าน้ำมันที่อยู่อย่างอิสระในชุดควบคุมที่ไม่เติมเซลล์



รูปที่ 4.4 ผลการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของแบคทีเรียแต่ละชนิด เมื่อเตรียมในรูปแบบ PUF-immobilized cells และเซลล์อิสระ บ่มที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง 5 วัน แสดงผลในรูป mean \pm SD

เมื่อศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นที่ลดลง พบว่าเซลล์ตรึงของสายพันธุ์ JC11, JC9 และ JC12 และเชื้อผสมของ JC11+JC9+JC12 สามารถย่อยไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว และอะโรมาติกที่เป็นส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ และชุดควบคุมที่ไม่เติมเซลล์ (ตารางที่ 4.2) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโพรพอลิยูรีเทนสามารถย่อยไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติก ได้สูงที่สุด เท่ากับ 59 และ 55% ตามลำดับ

ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรีย *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโพรพอลิยูรีเทน สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.2 การย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติกที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ของเซลล์ตรึงเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ หลังจากบ่ม 5 วัน

Inoculum	Waste-lubricating oil removal efficiency (%) after 5-day incubation			
	PUF-immobilized cells		Free cells	
	Saturates	Aromatics	Saturates	Aromatics
JC11	59.3 ± 6.0	55.1 ± 11.4	46.0 ± 3.1	44.7 ± 4.7
JC9	37.3 ± 2.7	39.8 ± 2.8	35.9 ± 1.8	39.6 ± 7.7
JC12	32.0 ± 5.8	28.7 ± 4.0	24.3 ± 5.5	32.8 ± 6.0
Mixed culture (JC9+JC11+JC12)	31.6 ± 4.1	26.8 ± 3.8	23.6 ± 2.6	55.4 ± 4.0
None	7.0 ± 1.5 ^a	10.6 ± 3.1 ^a	14.3 ± 4.8 ^b	15.2 ± 2.9 ^b

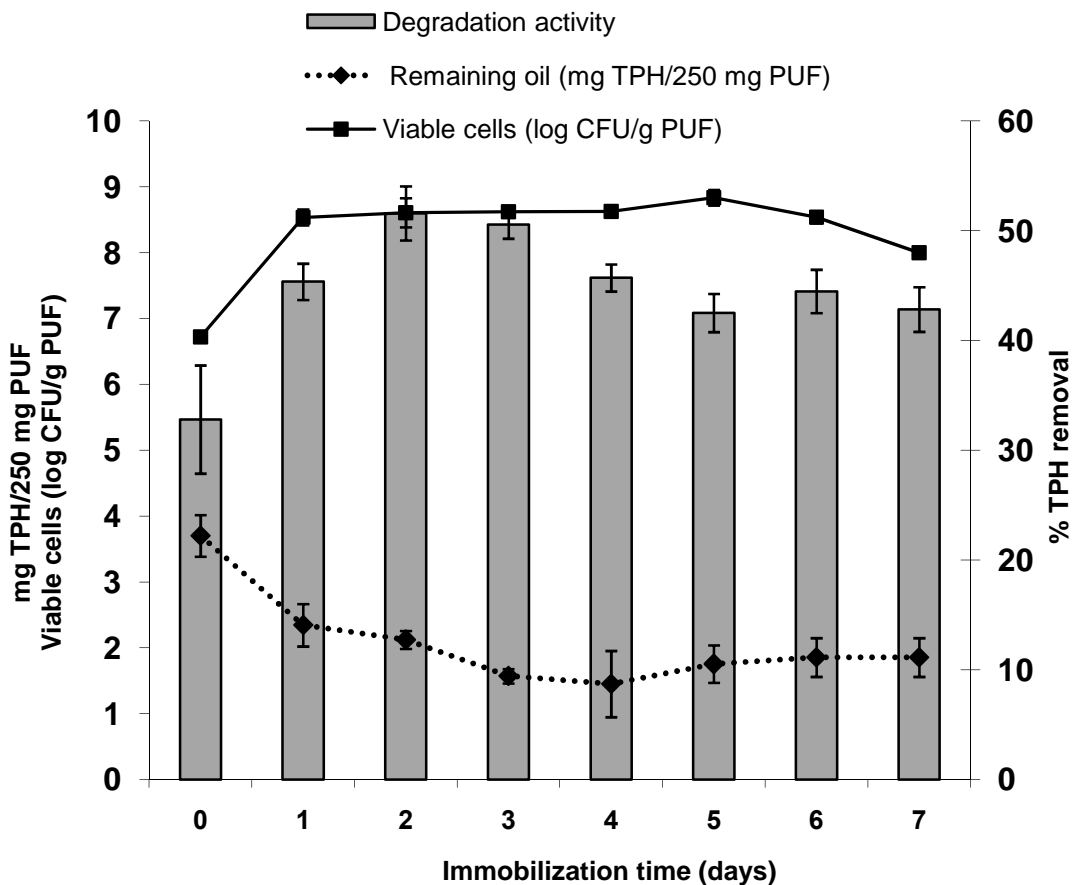
^a Uninoculated control ที่เติมวัสดุตรึงตลอดเชื้อ

^b Uninoculated control

4.4.2. การพัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง

(1) การทดลองตรึงเซลล์แบคทีเรียในภาวะที่คล้ายกับการนำไปใช้งานในพื้นที่จริง เนื่องจากในงานวิจัยนี้ ต้องการนำหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ไปบำบัดคราบน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วในน้ำทะเล ดังนั้นจึงทดลองตรึงเซลล์ในอาหาร NSW ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (100 มก./ล.) ผลการศึกษาแสดงอยู่ในรูปที่ 4.5 พบว่าปริมาณเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 ที่เกาะติดบน PUF เพิ่มขึ้นจาก 6.7 log CFU/g PUF ในวันที่ 0 เป็น 8.5 log CFU/g PUF ในวันที่ 1 หลังจากนั้นมีความคงที่ในช่วง 8.6- 8.8 log CFU/g PUF จนถึงวันที่ 5 ของการทดลอง แสดงว่าการเตรียมเซลล์ตรึงโดยวิธีนี้ทำให้เชื้อ JC11 สามารถเจริญเพิ่มจำนวนและเกาะติดบน PUF ได้ดีเช่นเดียวกับวิธีเตรียมเซลล์ตรึงแบบเดิม (รูปที่ 4.2) นอกจากนี้พบว่าเซลล์ตรึงที่เตรียมโดยใช้เวลาตรึง 2 และ 3 วัน สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ที่ความเข้มข้น 1,000 มก./ล. ได้สูงสุดคือ 51.6 และ 50.5% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของเซลล์ตรึงที่เตรียมโดยวิธีเดิม (~50%) สำหรับเซลล์ตรึงที่เตรียมโดยใช้เวลาตรึง 4 ถึง 7 วัน มีประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน

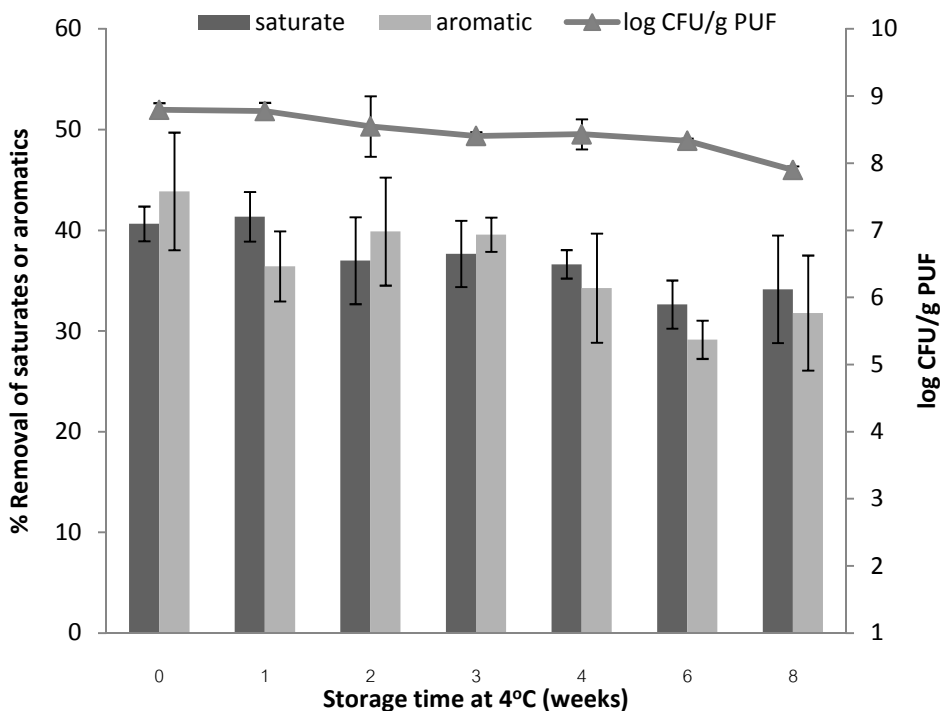
ลดลงเล็กน้อย (42-45%) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นที่คงเหลือบนเซลล์ตรึง พบว่าเซลล์ตรึงที่เตรียมโดยใช้เวลาตรึง 3 วัน มีปริมาณน้ำมันคงเหลือบน PUF น้อยที่สุด (~1.5 มก. หรือปริมาณน้ำมันลดลง 59%) ด้วยเหตุนี้จึงเลือกเตรียมเซลล์ตรึงเป็นระยะเวลา 3 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้มีการเกาะติดของเซลล์บน PUF $8.6 \log \text{CFU/g PUF}$ และเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยน้ำมันหล่อลื่น ซึ่งใกล้เคียงกับเซลล์ที่ตรึงแบบวิธีเดิม ที่สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1,000 มก./ล. ได้ ~51% (รูปที่ 4.4) ซึ่งการตรึงเซลล์วิธีใหม่นี้ช่วยเพิ่มความสะดวก รวดเร็ว ในการเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เพียง 0.1 OD_{600} เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีตรึงเซลล์ในข้อ 4.3.4 ที่ใช้หัวเชื้อปริมาณมากถึง 1.0 OD_{600} จึงจะใช้วิธีเตรียมเซลล์ตรึงแบบใหม่นี้ในงานวิจัยขั้นต่อไป



รูปที่ 4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ ซึ่งผลิตโดยการตรึงเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน มาวิเคราะห์ 1) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ JC11 บน PUF 2) ปริมาณน้ำมันคงเหลือบน PUF 3) ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วความเข้มข้น 1,000 มก./ล. บ่มที่ 200 รอบ/นาที นาน 5 วัน แสดงผลในรูปแบบ mean \pm SD

(2) อายุการเก็บ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน ที่อุณหภูมิ 4°C
ระยะเวลา 0-8 สัปดาห์

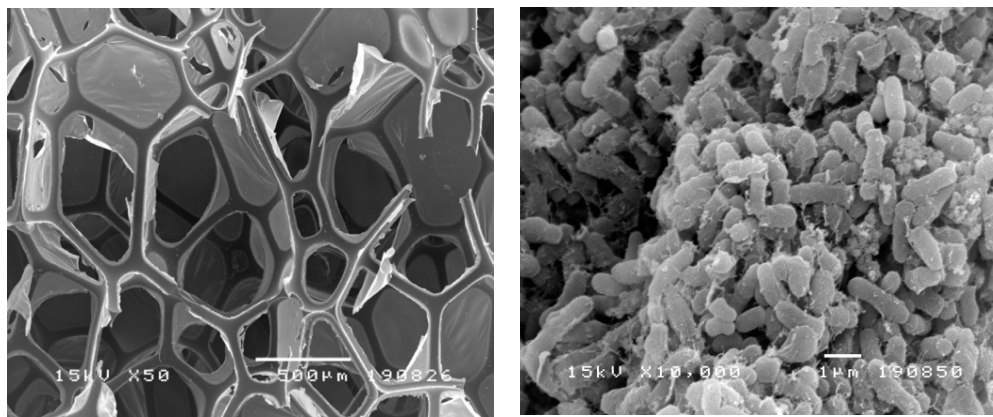
เมื่อนำเซลล์ตรึงของ *Gordonia* sp. JC11 ที่เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ความเข้มข้น 100 มก./ล. ควบคู่ไปกับการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตที่อยู่บน PUF พบว่า *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน สามารถคงประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันได้ 8 สัปดาห์ (รูปที่ 4.6) โดยที่ความสามารถในการย่อยไฮโดรคาร์บอนอิมิตัวและอะโรมาติก มีค่าในช่วง 34-40% และ 32-43% ตามลำดับ โดยเปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันในชุดควบคุมของไฮโดรคาร์บอนอิมิตัวและอะโรมาติกมีค่าเป็น $1.4 \pm 0.2\%$ และ $2.12 \pm 0.4\%$ ตามลำดับ และข้อมูลในตารางที่ 4.3 พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด ในน้ำมันหล่อลื่น ในช่วง 34-44% ตลอดระยะเวลาการทดสอบ ประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของเซลล์ตรึงที่เก็บเป็นเวลา 8 สัปดาห์ คิดเป็น 24% ที่ลดลงเทียบจากเตรียมใหม่ ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตบน PUF ซึ่งมีจำนวนเซลล์ 7.90-8.40 log CUF/g PUF ตลอดระยะเวลาการเก็บ 8 สัปดาห์ นอกจากนี้ในการนำเซลล์ตรึงของ *Gordonia* sp. JC11 ที่เก็บนาน 8 สัปดาห์ ไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบกลุ่มเซลล์ที่มีรูปร่างสมบูรณ์ของ *Gordonia* sp. JC11 ปริมาณมากบนโครงสร้างของ PUF (รูปที่ 4.7 ข) ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (รูปที่ 4.7 ก) และพบว่ามีโครงสร้างเส้นใยที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของกลุ่มเซลล์ *Gordonia* sp. JC11 บนพื้นผิวของ PUF (รูปที่ 4.7 ข) ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้แสดงว่าการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียแบบเซลล์ตรึง จะช่วยให้มีความสะดวกในการจัดเก็บ และขนส่งไปใช้กำจัดคราบน้ำมันในพื้นที่ปนเปื้อน



รูปที่ 4.6 การย่อยองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วความเข้มข้น 100 มก./ล. เป็นเวลา 24 ชม. ของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน และปริมาณเซลล์มีชีวิตที่อยู่บนเซลล์ตรึงหลังจากเก็บเซลล์ตรึงที่ 4°C เป็นเวลา 0-8 สัปดาห์ แสดงผลในรูป mean ± SD

ตารางที่ 4.3 การย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วความเข้มข้น 100 มก./ล. ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบน PUF ซึ่งเก็บที่ระยะเวลาต่างๆ

Storage time at 4°C (week)	Waste lubricating oil removal (%TPH)
0	44.1 ± 3.3
1	40.2 ± 2.6
2	38.8 ± 3.7
3	37.4 ± 1.5
4	36.3 ± 6.8
6	28.6 ± 6.1
8	33.6 ± 2.6
Uninoculated control	1.2 ± 0.3



(ก)

(ข)

รูปที่ 4.7 โครงสร้างของ PUF ที่มีรูพรุนปริมาณมาก (SEM, x50) (ก) และเซลล์ตรงที่ผ่านการเก็บที่ 4°C นาน 8 สัปดาห์ พบกลุ่มเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 จำนวนมาก เกาะหรือฝังตัวอยู่ในรูพรุนของ PUF (SEM, x10000) (ข)

4.4.3 การศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมไขมัน

(1) ประสิทธิภาพของ PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 ในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเรือประมงชนิดใช้แล้วที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เนื่องจากน้ำทะเลมีโอกาสปนเปื้อนด้วยน้ำมันหล่อลื่นที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่น ในน้ำขังใต้ท้องเรือมีค่าเฉลี่ยน้ำมันปนเปื้อน 342 มก./ล. โดยมีค่าสูงสุด 976 มก./ล. (บทที่ 5) ดังนั้นจึงวิเคราะห์ประสิทธิภาพการใช้งานของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมไขมัน ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ที่ความเข้มข้น 100 - 1,000 มก./ล. ในอาหาร NSW ซึ่งพบว่าผลการย่อยสลายน้ำมันที่ความเข้มข้น 100 200 400 และ 600 มก./ล. มีค่า 42-48% และเพิ่มขึ้นเป็น 53-56% ที่ความเข้มข้น 800 และ 1,000 มก./ล. ส่วนชุดควบคุมมีการลดลงของน้ำมันในช่วง 3 -10% และพบการเจริญของ *Gordonia* sp. JC11 บน PUF จาก 2.0×10^8 CFU/g PUF เป็น 3.8×10^9 - 5.1×10^9 CFU/g PUF เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 การย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโพลีเอทิลีน

Oil concentration (mg/l)	Waste lubricating oil removal (%)		Viable cells (CFU/g PUF) (x 10 ⁹) ^a
	Ready-to-use inoculums*	None*	
100	42 ± 3	2.7 ± 0.9	3.8
200	48 ± 12	2.9 ± 0.9	4.0
400	47 ± 8	5.4 ± 2.9	5.1
600	42 ± 1	6.7 ± 1.6	4.7
800	56 ± 8	9.8 ± 2.8	5.0
1000	53 ± 8	9.5 ± 1.5	4.0

* บ่มขวดทดลองที่ความเร็ว 130 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

^a ปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีค่า 2.0 x 10⁸ CFU/g PUF

(2) การย่อยน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลที่ไม่เติมสารอาหาร ในระดับห้องปฏิบัติการ โดย *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโพลีเอทิลีน

การทดลองในขั้นนี้ใช้ตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บจากท่าเรือประมงสิงห์อานวย จ. จันทบุรี เพื่อวิเคราะห์การเจริญและประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ ในภาวะที่แตกต่างจากการทดสอบในอาหาร NSW ก่อนที่จะนำเซลล์ตรึงไปบำบัดคราบน้ำมันในพื้นที่ชายฝั่งทะเลต่อไป จากการวิเคราะห์ปัจจัยทางกายภาพในน้ำทะเลที่เก็บบริเวณผิวน้ำ บริเวณท่าเรือประมงสิงห์อานวย จ. จันทบุรี ในช่วง 27 ก.พ. 2552 ถึง 21 ม.ค. 2553 (รูปที่ 4.8) แล้ววัดพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเค็ม และปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด พบว่าน้ำทะเลบริเวณดังกล่าวมีอุณหภูมิแปรผันในช่วง 25 - 33 °C ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.3 - 7.9 ความเค็มมีค่า 2.4 - 3.5 ‰ และมีปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด 36-85 มก./ล. (ตารางที่ 4.5) ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่า TPH ในมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลชายฝั่งที่กำหนดให้มีค่า TPH ไม่เกิน 5 ไมโครกรัม/ลิตร



รูปที่ 4.8 การเก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ. จันทบุรี

ตารางที่ 4.5 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของผิวน้ำทะเล ณ ท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี ระหว่าง 27 กุมภาพันธ์ 2552 ถึง 21 มกราคม 2553

วันที่	พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์			
	อุณหภูมิ (°ซ)	pH	ความเค็ม (‰)	TPH ^a (มก./ล.)
21 ม.ค. 2553*	25	7.4	3.5	57*
23 ต.ค. 2552				
จุด 1	31	7.4	3.0	60
จุด 2	30	7.6	2.4	85
จุด 3	31	7.9	3.2	40
13 เม.ย. 2552				
จุด 1	32	7.3	3.2	36*
จุด 2	33	7.4	3.2	
จุด 3	33	7.3	3.0	
27 ก.พ. 2552				
จุด 1	29	7.6	3.4	57*
จุด 2	32	7.9	3.5	
จุด 3	31	7.9	3.4	

*วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันทั้งหมดในตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บมาจาก 3 จุด และรวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง (composite sample) โดยค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลชายฝั่ง กำหนดให้มีค่าปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนไม่เกิน 5 ไมโครกรัม/ลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, สำนักจัดการคุณภาพน้ำ, 2553)

^a เก็บตัวอย่างน้ำทะเลครั้งละ 500 มล. และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง ก่อนนำมา 50 มล. จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อสกัดน้ำมันด้วยคลอโรฟอร์ม

นอกจากนี้ได้เก็บตัวอย่างที่ผิวน้ำทะเล จากบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ. จันทบุรี เพื่อส่งวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง (กรมควบคุมมลพิษ, ส่วนแหล่งน้ำทะเล, 2551) ครั้งที่ 1 วันที่ 23 ตุลาคม 2553 โดยเก็บตัวอย่างจากจุดต่างๆ บริเวณโดยรอบท่าเรือ 3 จุด (ตัวอย่างที่ 2-4) พบว่ามีค่าบีโอดี 2.1-2.5 มก./ล. ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด <2.5 - 12 มก./ล. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด < 0.1 - 1.1 มก./ล. ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด <0.03 - 0.89 มก./ล. ปริมาณน้ำมันและไขมันที่วิเคราะห์โดยวิธี Soxhlet extraction มีค่า <0.1มก./ล. (ตารางที่ 4.6) จะเห็นได้ว่าพารามิเตอร์ต่างๆ เหล่านี้มีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง

ตารางที่ 4.6 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำทะเลที่เก็บจากผิวน้ำ บริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี

	หน่วย	มาตรฐาน*	น้ำทะเล			
			ตย.1 ^a	ตย.2 ^b	ตย.3 ^b	ตย.4 ^b
ค่าบีโอดี ^c	มก./ล.	≤ 200	2.2	2.5	2.3	2.1
ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด	มก./ล.	≤ 200	<2.5	12.0	9.0	9.5
ไนโตรเจนทั้งหมด	มก.ไนโตรเจน/ล.	≤ 250	1.1	1.0	< 0.1	0.6
ฟอสฟอรัสทั้งหมด	มก.ฟอสฟอรัส/ล.	ND	< 0.03	0.89	0.22	0.45
น้ำมันและไขมัน	มก./ล.	≤ 20	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1

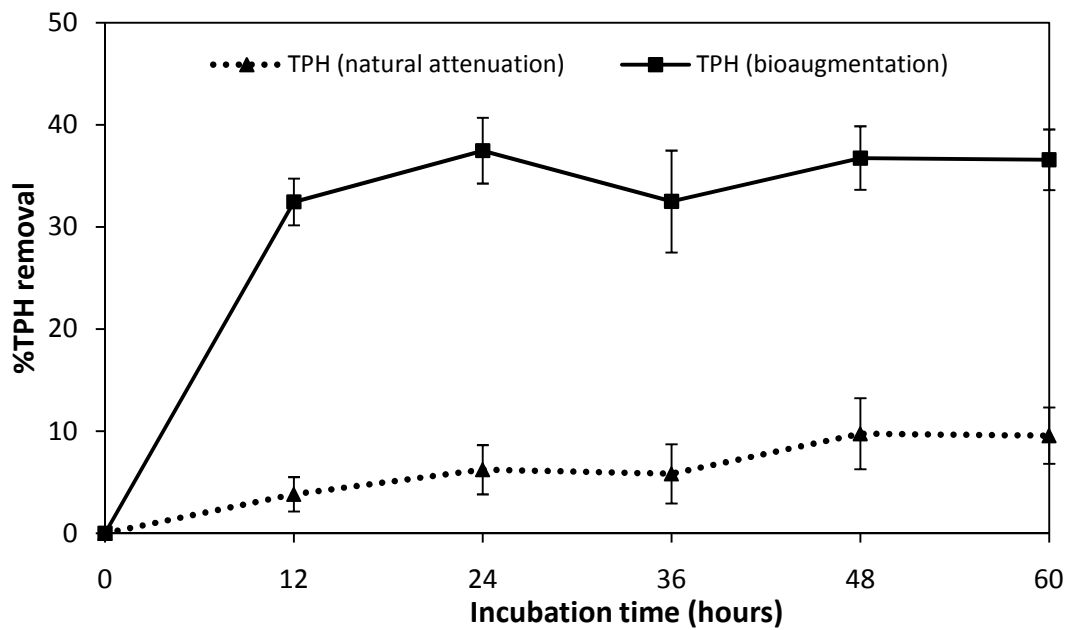
*มาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง (กรมควบคุมมลพิษ, 2549)

^a ตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บแบบน้ำ 3 ตัวอย่าง มารวมกัน เก็บเมื่อวันที่ 21 ม.ค. 2553 ตัวอย่างมีลักษณะใส มีตะกอนและมีกลิ่นเล็กน้อย

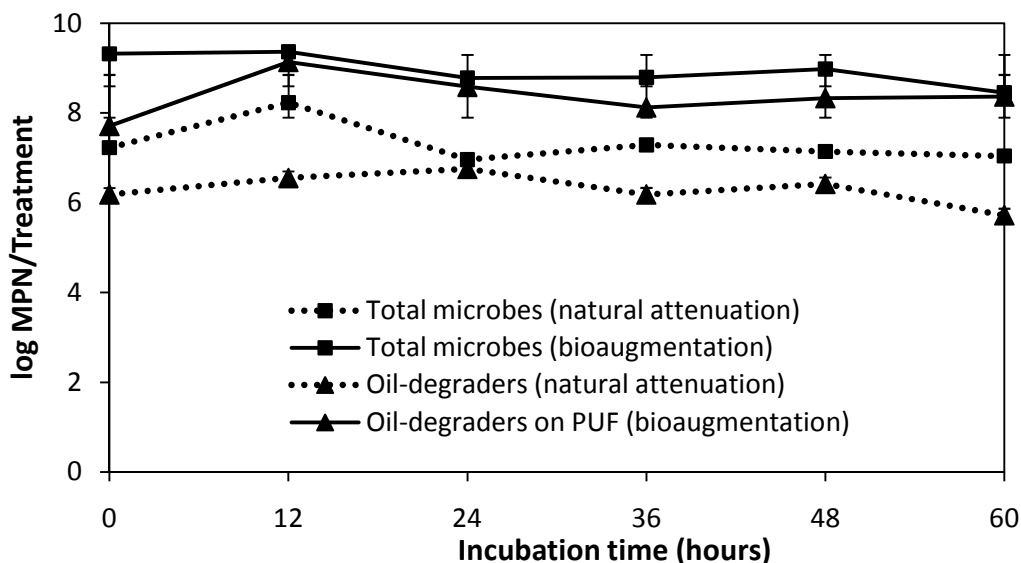
^b วิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ในน้ำทะเลจุดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ในตัวอย่างที่เก็บเมื่อวันที่ 23 ต.ค. 2552 ซึ่งมีลักษณะใส มีตะกอนเล็กน้อย และไม่มีการปนเปื้อน

ในการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตขึ้น ได้ทำการทดลองโดยเติมน้ำทะเลปริมาตร 50 มล. ในพลาสติกขนาด 250 มล. แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นชนิดที่ใช้แล้ว สำหรับเครื่องยนต์ 4 จังหวะของเรือประมง ความเข้มข้น 100 มก./ล. เพื่อให้ครอบคลุมค่าบีโอดีไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลที่รายงานในตารางที่ 4.5 ทั้งนี้ไม่เติมสารอาหารเพิ่มเพื่อเลียนแบบภาวะจริง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าเซลล์ตรึงของ *Gordonia* sp. JC11 สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้ 32% ภายใน 12 ชม. หลังจากนั้นประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันมี

ค่าคงที่ในช่วง 32-37% และมีค่าเท่ากับ 36% ในช่วงเวลาที่ 60 (รูปที่ 4.9) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบน PUF (รูปที่ 4.10) ที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 7.7 เป็น 9.3 log MPN/ชุดทดลอง ภายใน 12 ชม. ในทางตรงกันข้ามในรูปที่ 4.9 พบการลดลงของน้ำมันตามธรรมชาติเพียง 3-9% ในช่วงเวลาที่ 12-60 สอดคล้องกับการตรวจพบว่าในน้ำทะเลมีปริมาณจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันเพียง 6.6 log MPN/ชุดทดลอง ในช่วงเวลาที่ 12 หลังจากนั้นปริมาณเซลล์มีค่าคงที่ และลดลงเท่ากับ 5.7 log MPN/ชุดทดลอง ในช่วงเวลาที่ 60



รูปที่ 4.9 ผลการย่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่ความเข้มข้น 100 มก./ล. ของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบน PUF (bioaugmentation) และการลดลงของน้ำมันตามธรรมชาติ (natural attenuation) ในการบ่มเชื้อที่ความเร็ว 130 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 ชม. แสดงค่าในรูป mean \pm SD



รูปที่ 4.10 การเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ทั้งหมด และจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ในชุดทดลอง natural attenuation เปรียบเทียบกับ bioaugmentation ในน้ำทะเลไม่เต็มสารอาหาร ที่เติมน้ำมัน 100 มก./ล. บ่มเชื้อที่ความเร็ว 130 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 ชม. แสดงผลในรูปแบบ mean \pm SD

4.5 อภิปรายผลการทดลอง

4.5.1 การคัดเลือกวัสดุตั้งและชนิดแบคทีเรียที่เหมาะสม

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีผลิตและเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง ในขั้นแรกได้คัดเลือกชนิดของวัสดุตั้งที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้บำบัดคราบน้ำมันในน้ำทะเล ผลการทดสอบพบว่า PUF มีสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งานมากกว่าพลาสติกชีวภาพ 2 ชนิด คือบรจักษ์ KU-GREEN และ BIO โดยมีความคงตัว ลอยตัวในน้ำทะเลได้ดี และดูดซับน้ำมันได้เท่ากับ 8 กรัมของน้ำมัน/กรัม PUF (ตารางที่ 4.1) สอดคล้องกับ Oh และคณะ (2000) ที่รายงานว่า PUF สามารถดูดซับน้ำมันได้ 7-9 กรัมของน้ำมัน/กรัม PUF โดย PUF สามารถลอยตัวได้ดี (> 6 เดือนในน้ำทะเล) และดูดซับน้ำมันได้ดีกว่าน้ำ และเมื่อปล่อยโฟมไว้ในระบบมากกว่า 10 วัน พบว่ามีการรั่วไหลของน้ำมันที่ถูกดูดซับไว้ไม่ต่ำกว่า 5% นอกจากนี้พบว่าโครงสร้างภายในของ PUF (รูปที่ 4.7 ก) มีลักษณะเป็นรูพรุน สอดคล้องกับข้อมูลที่รายงานโดย de Ory และคณะ (2004) ที่ว่า PUF มีโครงสร้างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกันสูง (high homogeneity) และมีรูพรุนมากกว่า 97% ทำให้แบคทีเรียเกาะติดบนโครงสร้างดังกล่าวได้ดี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ PUF เป็นวัสดุสำหรับตั้งเซลล์

ในการคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับผลิตเซลล์ตั้งบน PUF ได้เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Gordonia* sp. JC11 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Brucella* sp.

JC12 ซึ่งมีสมบัติทางสรีรวิทยาของเซลล์ครอบคลุมประเด็นที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิววัสดุจริง ตามที่สรุปในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ของ Rosenberg และคณะ (1992), Southam และคณะ (2001) และ Obuekwe และ Al-Muttawa (2001) สมบัติดังกล่าวได้แก่ (1) ความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งพบจากเชื้อ JC11 (2) ความสามารถในการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งพบจากเชื้อ JC9 (3) ความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งพบจากเชื้อ JC11 และ JC9 รวมทั้ง (4) มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ซึ่งพบจากเชื้อ JC11 และ JC9 และประเด็นที่พิจารณาเพิ่มเติมในงานวิจัยนี้คือ (5) เป็นเชื้อประจำถิ่นซึ่งเชื้อ JC11 JC9 และ JC12 ได้คัดแยกจากพื้นที่ปนเปื้อน จึงเหมาะสำหรับการเตรียมเป็นเซลล์ตรึงสำหรับนำไปทดลองบำบัดคราบน้ำมันในพื้นที่เดิม จากเหตุผลดังกล่าวทำให้งานวิจัยนี้มีลักษณะเด่นที่แตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ

ผลการคัดเลือกชนิดของเซลล์ตรึง พบว่าเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 มีศักยภาพสูงสุดในการเกาะติดบน PUF โดยมีปริมาณการเกาะติด 249.4 มก.น้ำหนักเซลล์แห้ง/กรัม PUF และมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต 10^8 CFU/g PUF ภายหลังจากตรึงเซลล์ 2 วัน (รูปที่ 4.2 และ 4.5) ปริมาณเซลล์ของเชื้อ JC11 ที่เกาะติดบน PUF มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ de Ory และคณะ ในปี 2004 ที่มีปริมาณเซลล์ 10^7 CFU/g PUF ภายใน 300 ชม. นอกจากนี้ Quek และคณะ (2006) พบว่าเซลล์ตรึงของ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ F92 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมากที่สุด (10^9 cells/ชม³ PUF) และมีประสิทธิภาพในการเกาะติดสูงสุด (90% AE) บน PUF ที่มีความหนาแน่น 14 กก./ม³ สาเหตุที่เซลล์ *Gordonia* sp. JC11 สามารถยึดเกาะบน PUF ได้เร็วกว่า (รูปที่ 4.2) และมีปริมาณกลุ่มเซลล์มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 4.3) อาจเป็นเพราะเชื้อ JC11 มีค่าความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์สูง (80% MATH assay, บทที่ 3) และมีค่า emulsification index ของตะกอนเซลล์สูงที่สุด (31.8%) ซึ่งสมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์และความสามารถในการสร้าง EPS เป็นประเด็นสำคัญที่ใช้คัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ในการผลิตเซลล์ตรึง (Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001; Cameotra และ Singh, 2008) นอกจากนี้เซลล์ที่มีความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์สูง จะสามารถนำน้ำมันเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น (Ron และ Rosenberg, 2002; Obuekwe และคณะ, 2009)

ในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของเซลล์ตรึง เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าเชื้อเดี่ยวของ *Gordonia* sp. JC11 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Brucella* sp. JC12 และเชื้อผสมของ JC11+JC9+JC12 ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (รูปที่ 4.4) อาจเป็นเพราะ PUF สามารถดูดซับน้ำมันหล่อลื่นที่ลอยอยู่บนผิวน้ำได้ดี ทำให้มีน้ำมันปริมาณมากยึดเกาะอยู่บนพื้นผิวโฟม ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสที่น้ำมันจะสัมผัสกับเซลล์ของเชื้อย่อยน้ำมันที่ตรึงอยู่บนโฟม (bioavailability)

ตรงกับข้อสรุปของ Enkiri และคณะ (1995) ที่ว่าโคมพอลิยูรีเทนมีสมบัติความไม่ชอบน้ำสูง จึงสามารถดูดซับสารพิษที่ปนเปื้อนในน้ำได้ดี นอกจากนี้โคมพอลิยูรีเทนอาจทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากภาวะที่มีน้ำมันความเข้มข้นสูง ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (1,000 มก./ล.) ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Tallur และคณะ (2009) สรุปว่าเซลล์ *Bacillus* sp. PHN 1 ที่ตรึงบน PUF สามารถย่อยสลายพารา-ครีซอล (*p*-cresol) ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ และสามารถนำเซลล์ที่ตรึงบน PUF มาใช้ซ้ำได้มากกว่า 35 ครั้ง โดยที่ยังคงประสิทธิภาพดีเช่นเดิม งานวิจัยนี้ยังพบว่า *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโคมพอลิยูรีเทนสามารถย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดของน้ำมัน โดยเฉพาะไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติกที่เป็นส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วสำหรับเครื่องยนต์เรือประมง ได้ดีกว่าเซลล์ตรึงอื่นๆ และเซลล์อิสระทุกชนิดที่นำมาทดสอบ รวมถึงชุดควบคุมการลดลงของน้ำมัน ดังนั้นจึงคัดเลือกเซลล์ตรึงชนิดนี้ไว้สำหรับการทดสอบในขั้นต่อไป

4.5.2. การพัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง

Hosokawa และคณะ (2009) เสนอว่าการตรึงเซลล์ในภาวะที่จำลองการนำเซลล์ตรึงไปใช้งานในพื้นที่จริง จะเป็นการคงประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของเซลล์ตรึง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทดลองตรึงเซลล์ในภาวะที่ใกล้เคียงกับการนำไปใช้งาน โดยใช้อาหาร NSW ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเข้มข้น 100 มก./ล. เพื่อเลียนแบบภาวะได้ห้องเรือที่มีคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำห้องเรือ และทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *Gordonia* sp. JC11 บน PUF ซึ่งพบว่าระยะเวลาตรึงเซลล์ 3 วัน ทำให้มีปริมาณการเกาะติดของเซลล์บน PUF สูงถึง 8.6 log CFU/g PUF มีปริมาณน้ำมันคงเหลือบน PUF น้อยที่สุด (~1.5 มก. หรือปริมาณน้ำมันลดลง 59%) และเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยน้ำมันหล่อลื่น (รูปที่ 4.6) ดังนั้นวิธีเตรียมเซลล์ตรึงที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ นอกจากจะมีข้อดีในแง่ของการใช้ภาวะในการตรึงที่คล้ายคลึงกับการนำไปใช้งาน เพื่อคงประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของเชื้อ และเพิ่มความสะดวกในการนำหัวเชื้อไปยังพื้นที่บำบัด ยังคาดหวังได้ว่าสายพันธุ์ของเชื้อประจำถิ่นคือ *Gordonia* sp. JC11 ที่นำมาใช้ตรึงเซลล์ น่าจะสามารถปรับตัวให้เพิ่มจำนวนในพื้นที่ชายฝั่งทะเลได้

Gordonia sp. JC11 ที่ตรึงบนโคมพอลิยูรีเทน ยังสามารถเก็บรักษาได้นาน 8 สัปดาห์ โดยยังคงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และคงประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันได้ ซึ่งประสิทธิภาพนี้ใกล้เคียงหรือดีกว่าเซลล์ตรึงชนิดอื่นๆ เช่น Oh และคณะ (2000) รายงานว่า *Yarrowia lipolytica* 180 ที่เกาะบน chitin-immobilized PUF และเก็บนาน 8 สัปดาห์ สามารถคงประสิทธิภาพการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวได้ 77% ของประสิทธิภาพเริ่มต้น Usha และ

คณะ (2010) สรุปว่าเซลล์ที่ตรึงบน PUF มีอายุการเก็บและคงประสิทธิภาพการย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ดีว่าเซลล์ที่ตรึงในแคลเซียม-อัลจิเนท นอกจากนี้ Obuekwe และ Al-Muttawa (2001) รายงานว่าเซลล์ของแบคทีเรียไฮโซเลท 11 ที่ตรึงบนซีลีเยอ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($25 \pm 2^{\circ}$ C) นาน 6 สัปดาห์ ยังคงมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตปริมาณสูง และมีประสิทธิภาพคงเดิมในการย่อยสลายเฮกซะเดคเคน (80 มก./100 มล.) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (74 มก./100 มล.) อย่างไรก็ตามผลจากงานวิจัยนี้ดีกว่า Wilson และ Bradley (1997) ซึ่งรายงานเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ที่ตรึงอยู่บนวัสดุตรึงที่มีชื่อทางการค้าว่า Drizit มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.48×10^7 CFU/100 มก. หลังจากนั้นทดลองเก็บเซลล์ตรึงที่อุณหภูมิห้อง 1 สัปดาห์ พบว่ามีจำนวนเซลล์ลดลงเป็น 1×10^2 CFU/100 มก. และในงานวิจัยนี้ยังพบด้วยว่ามีเซลล์ของเชื้อ JC11 ปริมาณมากเกาะติดอยู่บน PUF ภายหลังจากเก็บ 8 สัปดาห์ โดยสังเกตพบเส้นใย (fibres) ปริมาณมากอยู่บนพื้นผิว PUF (รูปที่ 4.7 ข) สอดคล้องกับรายงานของ Quek และคณะ (2006) ที่สรุปว่าประสิทธิภาพการยึดติดของ *Rhodococcus* sp. F92 บน PUF อาจเกี่ยวข้องกับการมีเส้นใยปริมาณมากถูกหลั่งออกมาออกเซลล์ และสามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยเส้นใยของเซลล์ที่พบนี้ถูกจัดจำแนกเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกหลั่งออกมาออกเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดการยึดติดของเซลล์แบบถาวรบนพื้นผิววัสดุตรึง ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ยืนยันถึงความสะดวกในการผลิต และเก็บ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบน PUF และการนำผลิตภัณฑ์กำจัดคราบน้ำมันชนิดนี้ไปใช้งานในพื้นที่ปนเปื้อน

4.5.3 การศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้

ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบน PUF ในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเรือประมงชนิดใช้แล้วที่ความเข้มข้น 100-1,000 มก./ล. พบว่ามีค่าในช่วง 42-56% ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของ *Gordonia* sp. JC11 ที่เพิ่มขึ้นจาก $\sim 10^0$ เป็น $\sim 10^9$ CFU/g PUF แสดงว่าสามารถนำหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ชนิดดังกล่าวไปใช้บำบัดคราบน้ำมันในน้ำขังใต้ท้องเรือที่มีความเข้มข้นน้ำมันในช่วง 100-1,000 มก./ล. ในบทที่ 5 ได้ และจากการวิเคราะห์ปัจจัยทางกายภาพในน้ำทะเล บริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ. จันทบุรี ในช่วง 27 ก.พ. 2552 ถึง 21 ม.ค. 2553 ในตารางที่ 4.5 พบว่าน้ำทะเลบริเวณดังกล่าวมีค่าพารามิเตอร์ที่แปรผันเล็กน้อย ขึ้นกับฤดูกาล และสภาพภูมิอากาศขณะทำการวิเคราะห์ในพื้นที่ อย่างไรก็ตามการแปรผันของค่าพารามิเตอร์เหล่านี้ มีความสอดคล้องกับภาวะที่ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งใช้อุณหภูมิห้อง และอาหาร NSW ที่มีค่า pH 7.8 และค่าความเค็ม 3.4% ซึ่ง Tazaki และ Chaerun (2008) รายงานว่าแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจะเจริญเพิ่มจำนวนและมีประสิทธิภาพการบำบัดน้ำมันได้ดีเมื่อเจริญในภาวะที่มีค่า pH 7-7.8 ซึ่งตรงกับค่าความเป็น

กรด-ต่าง 7.3-7.9 ของน้ำทะเลในพื้นที่จริง ดังนั้น *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บนโพลีฟอสฟอริเทรน จึงน่าจะเพิ่มจำนวน และย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลในระดับขูดเซย่า และในพื้นที่จริงได้ และพบว่าในน้ำทะเลมีปริมาณสารอาหารต่ำกว่าในอาหาร NSW ที่มีปริมาณไนโตรเจน 200 มก./ล. และฟอสฟอรัส 19.75 มก./ล. (ธีรยุทธ วงษ์จิตรพิมล, 2553) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่ได้เติมสารอาหารเพิ่มลงไปในพื้นที่จริง เนื่องจากต้องการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของเซลล์ตรึงในน้ำทะเลที่ไม่เติมสารอาหาร เพื่อเพิ่มความสะดวก และประหยัดค่าใช้จ่าย เมื่อนำหัวเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวไปทดสอบในระบบจริง นอกจากนั้นการเติมสารอาหาร เช่น ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสลงไปในพื้นที่จริง อาจทำให้มีปริมาณสารอาหารสูงเกินไป จึงอาจทำให้เกิดภาวะ eutrophication ที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำทะเล (Tazaki และ Chaerun, 2008) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำทะเล ช่วง 27 ก.พ. 2552 ถึง 21 ม.ค. 2553 มีค่า 36-85 มก./ล. (ตารางที่ 4.5) ซึ่งเกินค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลชายฝั่ง ที่กำหนดให้มีค่าปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนไม่เกิน 5 ไมโครกรัม/ลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, สำนักจัดการคุณภาพน้ำ, 2553) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องบำบัดน้ำทะเลบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนวย จ.จันทบุรี โดยในการทดลองต่อไปจะมุ่งไปที่การลดปริมาณน้ำมันปนเปื้อนในน้ำซึ่งได้ทั้งเรือประมงขนาดเล็กที่ถูกปล่อยจากเรือลงสู่ทะเล ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลบริเวณดังกล่าว

ในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของ *Gordonia* sp. JC11 (bioaugmentation) ที่ตรึงอยู่บน PUF เปรียบเทียบกับการลดปริมาณน้ำมันตามธรรมชาติ (natural attenuation) พบว่าเซลล์ตรึงของเชื้อ JC11 มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้ดีกว่า (รูปที่ 4.9) ตรงกับผลการทดลองของธีรยุทธ วงษ์จิตรพิมล (2553) ที่พบว่าในการเติมน้ำมันหล่อลื่นความเข้มข้น 200 มก./ล. ลงในน้ำอับเฉาเรือ และบ่ม 5 วัน ชุดทดลอง bioaugmentation ที่เติม *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงบน PUF และปรับปริมาณสารอาหารเป็น 100/7.5/1 ทำให้เกิดการลดลงของ saturates ได้ 67% ในขณะที่ชุดการทดลองของน้ำมันตามธรรมชาติที่เติมเฉพาะน้ำอับเฉาเรือ และ PUF ทำให้เกิดการลดลงของ saturates เพียง 15% ผลการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียตรึงในงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับผลการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อย่อยน้ำมันบน PUF (รูปที่ 4.10) แสดงว่าเชื้อที่เกาะบน PUF สามารถใช้น้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บน PUF เป็นแหล่งคาร์บอนได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์ตรึงของเชื้อ JC11 ที่เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในอาหาร NSW สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วความเข้มข้น 100 มก./ล. ได้ $44 \pm 3\%$ ซึ่งมีค่าสูงกว่าประสิทธิภาพการย่อยของหัวเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เก็บจากพื้นที่จริง ($37 \pm 3\%$) ทั้งนี้ น่าจะเกิดจากในน้ำทะเลมีปริมาณสารอาหารต่ำกว่าใน NSW คือ มีปริมาณไนโตรเจน 1.1 มก./ล. และมีปริมาณฟอสฟอรัส < 0.03 มก./ล. (ตารางที่ 4.6) โดยจุลินทรีย์จะไม่

สามารถย่อยคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถ้ามีปริมาณไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสต่ำเกินไป (Ruberto และคณะ, 2009)

ในงานวิจัยนี้พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในชุดทดลอง bioaugmentation มีค่าใกล้เคียงกับจำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบน PUF ในช่วงเวลาที่ 12-60 แสดงว่าจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบน PUF เป็นประชาคมจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่อยู่ในชุดทดลอง bioaugmentation ที่สามารถเกาะอยู่บนวัสดุตรึงได้ดี สอดคล้องกับผลการทดลองของ Zahed และคณะ (2010) พบว่าการลดลงของน้ำมันดิบความเข้มข้น 1,000 มก./ล. โดยเชื้อประจำถิ่นในน้ำทะเล ตลอดระยะเวลาการทดสอบ 45 วัน มีค่า 26.4% ในขณะที่การลดลงของน้ำมันดิบเนื่องจากผลของ bioaugmentation มีค่า 48.8% และ Bento และคณะ (2005) พบว่าชุดทดลอง bioaugmentation มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดิน กล่าวคือย่อย $C_{12}-C_{23}$ ได้ 72.7% และ $C_{23}-C_{40}$ ได้ 75.2% เมื่อเปรียบเทียบกับ natural attenuation และ biostimulation ผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า จุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในน้ำทะเลมีปริมาณต่ำ (~ 5.7-6.1 log MPN/ชุดทดลอง) (รูปที่ 4.10) ดังนั้นจึงควรเติมเซลล์ตรึงของเชื้อ JC11 เพื่อให้สามารถบำบัดคราบน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่ง Vieira และคณะ (2009) รายงานว่าปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมการย่อยน้ำมันได้สูง เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายสารปนเปื้อน และควรเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ที่มีเชื้อเริ่มต้นปริมาณสูง ลงไปในพื้นที่ซึ่งมีเชื้อย่อยน้ำมันปริมาณต่ำประมาณ 10^5 CFU/ml (Providenti และคณะ, 1993) หรือในพื้นที่ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นไม่สามารถย่อยไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ตรึงของเชื้อ JC11 สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติก ที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วสำหรับเครื่องยนต์เรือได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งมีสมบัติตรงกับแบคทีเรียทะเลบางชนิด เช่น *Pseudomonas* sp. PS-I และ *Rhodococcus* spp. แต่ต่างจากแบคทีเรียทะเลบางสายพันธุ์ เช่น *Alcanivorax* spp. และ *Oleibacter marinus* ที่ย่อยได้เฉพาะส่วนประกอบที่เป็นไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว หรือ *Cycloclasticus* spp. ที่จะย่อยสลายเฉพาะอะโรมาติก (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการย่อยไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติกของ *Gordonia* sp. JC11 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียทะเลบางสายพันธุ์

Isolate	Saturates	Aromatics	Reference
<i>Gordonia</i> sp. JC11	+	+	งานวิจัยนี้
<i>Pseudomonas</i> sp. PS-I	+	+	Mittal และ Singh, 2009
<i>Rhodococcus</i> spp.	+	+	Andreoni และ Gianfreda, 2007
<i>Alcanivorax</i> spp.	+	-	Singh และคณะ, 2011
<i>Cycloclasticus</i> spp.	-	+	Harayama และคณะ, 2004
<i>Oleibacter marinus</i> gen. nov., sp. nov.	+	-	Teromoto และคณะ, 2011

+ หมายถึง สามารถย่อยสลายได้ - หมายถึง ไม่สามารถย่อยสลายได้

จากการเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยน้ำมันของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตั้งรับบนโพลีโพลีเอธิลีนกับรายงานวิจัยอื่น พบว่าเซลล์ตรึงของเชื้อ JC11 ย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลโดยใช้ระยะเวลาสั้นกว่าจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบางสายพันธุ์ เช่น Brakstad และ Bonaunet (2006) รายงานว่า กลุ่มแบคทีเรียย่อยน้ำมันที่คัดแยกจากน้ำทะเลใช้เวลาประมาณ 8 สัปดาห์ ในการกำจัด นอร์มัล-เฮกซะเดคเคน ความเข้มข้น 500 ppmv รวมทั้ง Michaud และคณะ (2004) พบว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrotrophic bacteria) 2 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากทะเลแอนตาร์กติก (Antarctic) ใช้เวลากว่า 8 สัปดาห์ ในการย่อยน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 500 ppmv ได้ 85% ดังนั้นจึงถือเป็นข้อได้เปรียบของการบำบัดคราบน้ำมันโดยเซลล์ตรึงของ *Gordonia* sp. JC11 ซึ่งในการทดลองต่อไปจะนำ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตั้งรับบนโพลีโพลีเอธิลีนไปบำบัดคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือ

บทที่ 5

การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำซังใต้ท้องเรือโดย *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโพลีพอลิยูรีเทน: การศึกษาระดับห้องปฏิบัติการ และในพื้นที่จริง

5.1 บทนำ

น้ำมันปนเปื้อนในน้ำซังใต้ท้องเรือ (waste oils) ที่เกิดจากเครื่องยนต์เรือ และส่วนต่างๆ ของเรือ แบ่งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (waste lubricating oil) น้ำมันที่พบใน ส่วนล่างสุดของตัวเรือ (bilge oil) และ กากน้ำมัน (oil sludge) ในขณะที่ bilge water เป็นส่วนผสมของน้ำมันและน้ำทะเลที่ซังอยู่ใต้ท้องเรือ ซึ่งมาจากห้องเครื่องยนต์เรือ ส่วนของเรือที่บรรทุก ผลิตภัณฑ์ประมง (fishing cargo) และส่วนอื่นๆ ของเรือ น้ำมันที่พบในห้องเครื่องยนต์เรือประมงมักเกิดจากการหยดในขณะที่เครื่องยนต์ทำงาน หรือการรั่วไหลขณะซ่อมบำรุงเครื่องยนต์ แต่ส่วนของเรือที่บรรทุกอาหารทะเลมักจะมีส่วนผสมเป็นไขมันปลาและน้ำแข็งที่ หลอมละลาย ในขณะที่น้ำมันผสมน้ำทะเลจากส่วนอื่นๆ ของเรือมักปนเปื้อนด้วยจาระบี (Lin และคณะ, 2007) ซึ่งในที่สุด bilge water จากส่วนต่างๆ จะผสมรวมกันอยู่ในล่างสุดของท้องเรือ และนับเป็นแหล่งกำเนิดสำคัญของมลพิษน้ำมันในทะเล ในปัจจุบันทั่วโลกต่างตระหนักถึง ความสำคัญของปัญหาดังกล่าว จึงได้จัดทำอนุสัญญาระหว่างประเทศว่าด้วยการป้องกันมลพิษ จากเรือ (MARPOL) (Sun และคณะ, 2009) เพื่อดูแลป้องกันสิ่งแวดล้อมทางทะเล โดยประเทศไทยให้สัตยาบันในการเข้าเป็นภาคีอนุสัญญา MARPOL ต่อบอร์ดการทางทะเลระหว่างประเทศเมื่อวันที่ 15 ตุลาคม 2550 และมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2551 ครอบคลุมกฎระเบียบที่มุ่ง ป้องกันและลดมลภาวะจากเรือ (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2554) ตามอนุสัญญา MARPOL 73/78 กำหนดให้เรือที่มีน้ำหนักเกิน 400 ตันกรอส จะต้องปล่อยน้ำเสียที่มีปริมาณ น้ำมันปนเปื้อนไม่เกิน 15 มก./ล. (Sun และคณะ, 2009) ดังนั้นประเทศไทยจำเป็นต้องพัฒนา เทคโนโลยีการบำบัดของเสียน้ำมันจากท้องเรือก่อนปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันวิธีการการปนเปื้อนของน้ำมันในน้ำซังใต้ท้องเรือ สามารถทำได้โดยการติดตั้ง เครื่องแยกน้ำมัน (oily water separator) ไว้ในเรือ เพื่อใช้แยกน้ำมันที่ปนเปื้อนอยู่กับน้ำใต้ท้อง เรือก่อนสูบน้ำออกสู่ภายนอกตัวเรือ (Aichele, 2008) หรือการใช้ถุงดูดซับน้ำมันจากน้ำใต้ท้อง เรือ (bilge socks) โดยถุงซับน้ำมันนี้ประกอบไปด้วยสารไฮโดรคาร์บอนและสารพอลิเมอร์ที่มี คุณสมบัติดูดซับของเหลวได้ถึง 0.625 แกลลอน ต่อ 1 ถุง (Coastal service, 2002) อย่างไรก็ตามการใช้วิธีทางกายภาพและทางเคมีเพื่อบำบัดคราบน้ำมันในน้ำเสียจากท้องเรือ เสียค่าใช้จ่าย

สูง และอาจไม่สามารถขจัดน้ำมันได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยวิธีการทางชีวภาพ โดยจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันจะเปลี่ยนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ มีตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีทางชีวภาพในการลดปริมาณน้ำมันปนเปื้อนในน้ำเสียจากท้องเรือ เช่น Nievas และคณะ (2006) ทดสอบการย่อยสลายของน้ำเสียจากท้องเรือ (Bilge Waste Oily Phase, BWOP) ในระดับถังหมักภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม โดยกลุ่มเชื้อย่อยปิโตรเลียม ดีเซล และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน สามารถย่อยสลาย BWOP (1% v/v) ได้ดี โดยย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนส่วนที่สกัดได้ด้วยเฮกเซน (hexane extractable material) ได้ 70% ย่อยไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดได้ 68% และย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดได้สูงถึง 90% ในการทดลองนาน 14 วัน นอกจากนี้ Sun และคณะ (2010) ได้พัฒนาเทคโนโลยี biofilm-MBR เพื่อใช้บำบัดน้ำเสียท้องเรือทุกชนิด (black water, grey water, bilge water) ซึ่งประกอบด้วยเครื่องปฏิกรณ์ไบโอฟิล์ม (biofilm reactor) และเครื่องปฏิกรณ์เยื่อ (membrane reactor) โดยสารอินทรีย์ในน้ำเสียจากท้องเรือจะถูกกำจัดโดยจุลินทรีย์ที่เจริญเป็นไบโอฟิล์มอยู่บนวัสดุตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ไบโอฟิล์ม (biofilm reactor) หลังจากนั้นถ่ายน้ำขังได้ท้องเรือที่ผ่านการบำบัดในขั้นแรกไปยังถังปฏิกรณ์เยื่อ (membrane reactor) เพื่อแยกมวลชีวภาพ อนุภาค และคอลลอยด์ และถ่ายน้ำท้องเรือที่ออกจากถังปฏิกรณ์เยื่อ กลับไปบำบัดที่ถังปฏิกรณ์ไบโอฟิล์มอีกครั้ง การใช้เทคโนโลยีนี้มีผลเพิ่มการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมัน และเพิ่มการจับกลุ่มเป็นก้อนของสารแขวนลอย (biofloculation) ในน้ำเสียท้องเรือ นอกจากนี้ยังมีรายงานที่ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยของน้ำเสียจากใต้ท้องเรือ โดยเชื้อจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ในระบบที่มี 1% BWOP และ 50% sea mineral medium ซึ่งปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นกลาง เพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ พบว่าปริมาณไฮโดรคาร์บอนลดลงถึง 97% ภายหลังจากทดลอง 10 วัน (Nievas และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มียานวิจัยเกี่ยวกับการบำบัดน้ำเสียจากเรือประมงขนาดเล็ก ซึ่งมีพื้นที่แคบไม่สามารถติดตั้งเครื่องแยกน้ำมันหรือถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ จึงควรมีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีทางชีวภาพที่ใช้งานง่ายและราคาถูก เพื่อลดปริมาณน้ำมันเสียที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำใต้ท้องเรือก่อนที่จะปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม

น้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันในเรือประมง (Ship's bilge seawater) จะถูกสูบน้ำออกจากท้องเรือเมื่อปริมาณน้ำสูงถึงระดับที่ตั้งไว้ ในปัจจุบันเรือประมงของไทยโดยเฉพาะเรือประมงขนาดเล็กมักปล่อยน้ำเสียจากท้องเรือลงสู่ทะเลโดยตรง โดยอัตราการปล่อยน้ำเสียขึ้นกับขนาด และอายุการใช้งานของเรือ ในปี พ.ศ. 2553 กรมเจ้าท่ารายงานว่า มีเรือประมงทั่วประเทศที่ขึ้นทะเบียนในปี พ.ศ. 2553 ทั้งหมด 26,024 ลำ ในจำนวนนี้เป็นเรือประมงขนาดเล็ก ถึง 14,314 ลำ คิดเป็น 55% ของจำนวนเรือประมงทั้งหมด โดยเรือประมงขนาดเล็กมักจะไม่มียานบำบัดน้ำมันเสียที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือก่อนปล่อยลงสู่ทะเล จึงเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญ

ของมลพิษน้ำมันบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีทางชีวภาพสำหรับบำบัดน้ำมันหล่อลื่นที่พบปนเปื้อนอยู่ในน้ำขังใต้ท้องเรือ โดยใช้แบคทีเรีย *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโพรพอลดิยูรีเทน ซึ่งได้คัดแยกแบคทีเรียนี้จากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมันบริเวณท่าเทียบเรือประมงสิงห์อำนาจ จังหวัดจันทบุรี (บทที่ 3) และพบว่าเชื้อ JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นความเข้มข้น 1,000 มก./ล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient seawater ได้สูงกว่าเซลล์อิสระ (free cells) และสามารถคงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นาน 4 สัปดาห์ รวมทั้งสามารถเจริญเพิ่มจำนวนในน้ำทะเลจากจังหวัดจันทบุรี และย่อยน้ำมันที่ปนเปื้อนได้ 37% ใน 24 ชม. (บทที่ 4) ในรายงานนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของแบคทีเรียตรึง หลังจากเติมลงไปใต้น้ำเสียจากท้องเรือ (bioaugmentation) เปรียบเทียบกับการสลายตัวตามธรรมชาติ (natural attenuation) ทั้งในระดับปฏิบัติการและในพื้นที่จริง คือ บริเวณห้องเครื่องยนต์ของเรือประมงขนาดเล็ก ใน จ.จันทบุรี

5.2 ขั้นตอนงานวิจัย

5.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF ในน้ำขังใต้ท้องเรือ (bioaugmentation) เปรียบเทียบกับการลดลงของน้ำมันตามธรรมชาติ (natural attenuation) ในระดับห้องปฏิบัติการ

- (1) ครั้งที่ 1 เก็บน้ำขังใต้ท้องเรือ จากเรือประมงขนาดเล็กบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี จำนวน 3 ลำ และนำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง เมื่อวันที่ 21 มกราคม 2553
- (2) ครั้งที่ 2 เก็บน้ำขังใต้ท้องเรือ จากเรือประมงขนาดเล็กบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี จำนวน 1 ลำ แต่จากบริเวณที่แตกต่างกัน 3 จุด ภายในห้องเครื่องยนต์เรือ และนำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง เมื่อวันที่ 12 สิงหาคม 2553

5.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF ในพื้นที่จริง (*in situ* bioaugmentation) ภายในห้องเครื่องยนต์เรือประมงขนาดเล็ก เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นใต้น้ำเสียท้องเรือ (natural attenuation)

- (1) ครั้งที่ 1: Natural attenuation: วันที่ 23-28 กันยายน 2553 ระยะเวลาศึกษา 120 ชม.

(2) ครั้งที่ 2: *In situ* Bioaugmentation: วันที่ 1-6 พฤศจิกายน 2553 ระยะเวลา
ศึกษา 120 ชม.

(3) ครั้งที่ 3: *In situ* Bioaugmentation เปรียบเทียบกับ Natural attenuation:
วันที่ 12-19 ธันวาคม 2553 ระยะเวลาศึกษา 168 ชม.

5.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

5.3.1 การวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำขังใต้ท้องเรือ

วิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำขังใต้ท้องเรือ ระหว่าง 24 ตุลาคม 2552 ถึง 8 พฤศจิกายน 2553 โดยพารามิเตอร์ที่ตรวจวัดในพื้นที่จริง ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ความเค็ม และเก็บตัวอย่างน้ำเสียท้องเรือเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัส โดยเก็บตัวอย่างน้ำขังใต้ท้องเรือครั้งละ 1,000 มล. และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มล. เขย่าให้เข้ากันเพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง ก่อนส่งวิเคราะห์ที่บริษัท เพทโทร-อินสตรูเมนต์ จำกัด ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Macro-Kjeldahl and Colorimetric และวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดด้วยวิธี Ascorbic acid รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันทั้งหมดในตัวอย่างน้ำเสียท้องเรือ ที่เก็บตัวอย่างระหว่างวันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2552 - 8 พฤศจิกายน 2553 โดยสกัดด้วยคลอโรฟอร์มตามวิธีข้อ 3.3.3 และวิเคราะห์ด้วย TLC-FID

5.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF ในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงชนิดที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริง ในระดับห้องปฏิบัติการ

น้ำมันที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นน้ำมันหล่อลื่นชนิดที่ใช้แล้ว สำหรับเครื่องยนต์ 4 จังหวะของเรือประมง (บทที่ 3) มีลักษณะเหนียว สีดำเข้ม ส่วนน้ำเสียท้องเรือที่ใช้ในการทดลองนี้ลักษณะใส สีเหลืองอ่อน มีตะกอน และคราบน้ำมันลอยบนผิวหน้า โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็ก ในท่าเรือประมง สิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี ตามวิธีที่รายงานโดยกรมควบคุมมลพิษ (2547) คือ จุ่มภาชนะเก็บลงในน้ำใต้ท้องเรือที่มีระดับน้ำลึกประมาณ 30 ซม. และถ่ายตัวอย่างน้ำลงในขวดเก็บตัวอย่าง โดยกั้วขวดเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง ก่อนเติมน้ำขังใต้ท้องเรือ และเก็บขวดตัวอย่างทั้งหมดลงในถังบรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2552 โดยเก็บจากเรือจำนวน 3 ลำ และนำน้ำทะเลมาผสมกันเป็น 1 ตัวอย่าง ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 12 สิงหาคม 2553 โดยเก็บน้ำเสียท้องเรือจากเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ของนายจวน ผาหนองถึง จากบริเวณที่แตกต่างกัน 3 จุด ในห้องเครื่องยนต์เรือ และนำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง

ทำการทดสอบโดยเติมน้ำเสียจากห้องเรือปริมาตร 50 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมน้ำมันเพิ่มให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,000 มก./ล. (ใกล้เคียงกับค่า 976 มก./ล. ซึ่งเป็นปริมาณน้ำมันสูงสุดที่ตรวจพบในน้ำเสียจากใต้ห้องเรือ) การทดลองในขั้นนี้ประกอบด้วย (A) bioaugmentation โดยเติมแบคทีเรียตรึง 250 มก. น้ำซังใต้ห้องเรือ และน้ำมัน และ (B) natural attenuation โดยเติมน้ำซังใต้ห้องเรือ และน้ำมัน ทุกชุดทดลองทำ 3 ซ้ำ บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันด้วย TLC/FID โดยสกัดน้ำมันตามวิธีข้อ 3.3.3 และคำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันตลอดงานวิจัยนี้ ตามสูตร: $Oil\ removal\ (\%) = 100 \times [Oil\ component\ (T_0) - Oil\ component\ (T_x)] / Oil\ component\ (T_0)$ โดย T_0 หมายถึง ส่วนประกอบน้ำมันในชุดทดลองในวันที่ 0 และ T_x หมายถึงส่วนประกอบน้ำมันในชุดทดลอง ณ วันที่ต้องการวิเคราะห์

วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ในน้ำซังใต้ห้องเรือ และที่เกาะติดบน PUF ตามวิธีทดลองข้อ 4.3.7 และวิเคราะห์การเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิววัสดุตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM ก่อนใช้งาน และหลังการเติมลงไปในระบบจำลองน้ำซังใต้ห้องเรือ โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันของ *Gordonia* sp. JC 11 ที่ตรึงอยู่บน PUF ในน้ำซังใต้ห้องเรือประมงขนาดเล็ก (*in situ* bioaugmentation)

การทดลองในพื้นที่จริง ได้ใช้บริเวณห้องเครื่องยนต์ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ของนายจวน ผาหนองสิง เป็นกรณีศึกษา รูปที่ 5.1 แสดงลักษณะภายในห้องเครื่องยนต์เรือ ที่เติมตัวอย่าง PUF-packages ที่มีพื้นที่ผิวขนาด 40 ซม.²/ชิ้น บริเวณวางตัวอย่างอยู่ใต้ฐานเครื่องยนต์ มีความยาว 400 ซม. ขณะที่น้ำขึ้นสูงสุด มีความกว้าง 67.5 ซม. ระดับน้ำลึก 45 ซม. และขณะที่น้ำลงต่ำสุดมีความกว้าง 47.5 ซม. ระดับน้ำลึก 30 ซม. เนื่องจากเรือโชคเพิ่มทรัพย์เป็นเรือเก่าที่มีอายุการใช้งานตั้งแต่ปีพ.ศ. 2543 ทำให้ส่วนเนื้อไม้ใต้ห้องเรือมีรูรั่วจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีน้ำทะเลปริมาณมากซึมเข้ามาในห้องเครื่องยนต์เรือ ทำให้ต้องสูบน้ำทะเลออกนอกตัวเรือ โดยปั๊มสูบน้ำที่ต่อสวิตช์อยู่กับลูกลอยที่ส่วนท้ายเรือทุกๆ 15 นาที ปริมาตรน้ำซังใต้ห้องเรือขณะที่มีน้ำขึ้นสูงสุด 1,215 ลิตร (67.5 x 400 x 45 ซม.) หรือมีพื้นที่ผิว 27,000 ซม.² และปริมาตรน้ำซังใต้ห้องเรือขณะที่มีน้ำลงต่ำสุดเท่ากับ 570 ลิตร (47.5 x 400 x 30 ซม.) หรือมีพื้นที่ผิว 19,000 ซม.² ซึ่ง PUF-packages แต่ละชิ้นที่เติมลงไป จะลอยอยู่บนผิวน้ำน้ำทะเลที่ซังอยู่ใต้ห้องเรือ และเคลื่อนไปตามการเคลื่อนที่ของน้ำทะเลใต้ห้องเรือ และเมื่อโฟมพอลิยูรีเทนดูดซับน้ำมันจนถึงจุดอิ่มตัว ชิ้นโฟมจะจมลง



(ก)



(ข)

รูปที่ 5.1 ลักษณะภายในห้องเครื่องยนต์เรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องยนต์ดีเซลอยู่ตรงกลางของห้องเครื่องยนต์เรือ (ก) และเติมตัวอย่าง PUF-packages ลงบนผิวหน้าของน้ำขังใต้ท้องเรือ บริเวณใต้ฐานเครื่องยนต์ (ข)

โดยทำการทดสอบในพื้นที่จริง ทั้งหมด 3 ครั้ง ดังนี้

(1) การทดสอบชุด natural attenuation ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ระหว่างวันที่ 23-28

กันยายน 2553

การทดลองในขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการย่อยสลายคราบน้ำมันของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำขังใต้ท้องเรือของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ทำการทดลองระหว่างวันที่ 23-28 กันยายน 2553 ระยะเวลา 120 ชม. โดยเติม Uninoculated PUF packages (250 มก./package) ที่มีพื้นที่ผิวขนาด 40 ซม.²/ ชิ้น (รูปที่ 5.2) จำนวน 33 ชิ้น ลงไปในส่วนล่างสุดของเรือ ทำให้เมื่อเริ่มต้นทดลอง มีพื้นที่ผิวของ Uninoculated PUF packages 1,320 ซม.² (40 ซม.²/ ชิ้น x 33 ชิ้น) หรือคิดเป็นอัตราส่วนพื้นที่ผิวตัวอย่างต่อผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือ 1 ต่อ 20.45 เท่า ขณะที่มือน้ำขึ้นสูงสุด (1,320: 27,000) และ 1 ต่อ 14.39 เท่า (1,320: 19,000) ขณะที่มือน้ำลงต่ำสุด ทุกๆ 12 ชม. เก็บ Uninoculated PUF packages จำนวน 3 ชิ้น มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บนชิ้นโฟมแต่ละชิ้น ตามวิธีข้อ 3.3.3 คำนวณปริมาณน้ำมันในหน่วย มก.น้ำมัน/ กรัม PUF โดยเทียบมิลลิกรัมของน้ำมัน จากกราฟมาตรฐานของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 3 ซึ่งเป็นน้ำมันชนิดที่ได้มาจากเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ (ภาคผนวก ก)



รูปที่ 5.2 Uninoculated PUF packages ที่มีพื้นที่ผิวขนาด 40 ซม.²/ ชิ้น ที่เติมลงไปบนผิวหน้า น้ำขังใต้ท้องเรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์

(2) การทดสอบประสิทธิภาพของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF (bioaugmentation) ในการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือ ระหว่างวันที่ 1-6 พฤศจิกายน 2553

การทดลองในขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นไปได้ ของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน ในการย่อยสลายคราบน้ำมันในน้ำเสียท้องเรือของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ โดยทำการทดลองระหว่างวันที่ 1-6 พฤศจิกายน 2553 ระยะเวลา 120 ชม. โดยตรึงเซลล์ตามวิธีข้อ 4.3.4 และเติม PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages (250 มก./package) ที่มีพื้นที่ผิวขนาด 40 ซม.²/ ชิ้น (รูปที่ 5.3) จำนวน 33 ชิ้น ลงไปใต้ท้องเรือ ที่เวลาเริ่มต้นทดลองมีอัตราส่วนพื้นที่ผิวทั้งหมดของตัวอย่างต่อพื้นที่ผิวทั้งหมดของน้ำขังใต้ท้องเรือเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 5.3.3 (1) ทุกๆ 12 ชม. เก็บ PUF-packages จำนวน 3 ชิ้น เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน วิเคราะห์ส่วนประกอบอัลเคนในน้ำมันตัวอย่างโดย GC/FID (วิธีวิเคราะห์ข้อ 3.3.3) นอกจากนี้ก่อนและหลังจากเติม PUF-packages เก็บตัวอย่างน้ำขังใต้ท้องเรือจากท่อที่ส่งน้ำออกนอกตัวเรือ (รูปที่ 5.5) เพื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ตามมาตรฐานน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมงก่อนลงตัวอย่างเซลล์ตรึงในพื้นที่ (ครั้งที่ 1 วันที่ 1 พฤศจิกายน 2553, ครั้งที่ 2 วันที่ 12 ธันวาคม 2553) เปรียบเทียบกับคุณภาพน้ำหลังลงตัวอย่างเซลล์ตรึงในพื้นที่ (ครั้งที่ 1 วันที่ 6 พฤศจิกายน 2553, ครั้งที่ 2 วันที่ 19 ธันวาคม 2553) โดยน้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บจากจุดดังกล่าวเป็นเหมือนจุด effluent ของถังปฏิกรณ์ (reactor)



รูปที่ 5.3 PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ที่มีพื้นที่ผิวขนาด 40 ซม.²/ ชิ้น ซึ่งจะสังเกตพบว่าชิ้นโฟมมีสีส้มตามสีของเชื้อ JC11(ก) และที่เติมลงไปในห้องเครื่องยนต์เรือ (ข)

(3) การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น ภายในห้องเครื่องยนต์เรือประมง ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม 2553

(3.1) การเตรียม และเติม PUF-package ในพื้นที่ทดสอบ

การทดลองในขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายคราบน้ำมันของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน (immobilized bioaugmentation) กับ จุลินทรีย์ประจำถิ่น (natural attenuation) ในน้ำซังใต้ท้องเรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ในช่วงเวลาเดียวกัน โดยทำการทดลองระหว่างวันที่ 13-19 ธันวาคม 2553 ระยะเวลา 168 ชม. นอกจากนี้มีการเติมชิ้นโฟมที่มีพื้นที่ผิวเท่าเดิมกลับลงไปพื้นที่บ่อบัดต่างๆ 12 ชั่วโมงที่เก็บชิ้นตัวอย่างมาวิเคราะห์ เพื่อรักษาอัตราส่วนพื้นที่ผิวของ PUF ต่อพื้นที่ผิวของน้ำซังใต้ท้องเรือให้มีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง และลดปัจจัยที่ทำให้ชิ้นโฟมมีค่าการดูดซับน้ำมันสูงเกินไป ในขณะเดียวกันเพิ่มการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ที่เกาะอยู่บน PUF และในน้ำซังใต้ท้องเรือ เพื่อให้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันและปริมาณจุลินทรีย์ได้ และเพิ่มการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในน้ำซังใต้ท้องเรือ นอกจากนี้ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์บนตัวอย่าง PUF-packages โดยวิธี DGGE โดยตั้งเซลล์ตามวิธีข้อ 4.3.4 และเตรียมตัวอย่างโดยนำ PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ที่มีพื้นที่ผิว 20 ซม.² (125 มก./package) ผูกติดกับ Uninoculated PUF packages ขนาด 125 มก./package ที่มีพื้นที่ผิว 20 ซม.² โดยมีหุ่นลอยติด

ไว้ตรงกลาง เพื่อให้เป็นจุดสังเกตขณะเก็บตัวอย่าง ทำให้ชั้น PUF-packages มีพื้นที่ผิวทั้งหมด 40 ซม.²/ชั้น (รูปที่ 5.4) แต่ PUF-packages ไว้ในถังน้ำแข็งตลอดเวลา ก่อนการทดลอง

ทำการทดลองโดยเติมตัวอย่างจำนวน 69 ชั้น ลงไปให้กระจายเต็มพื้นที่ส่วนล่างสุดของเรือ คิดเป็นพื้นที่ผิวทั้งหมด 2,760 ซม.² (40 ซม.²/ชั้น x 69 ชั้น) หรืออัตราส่วนพื้นที่ผิว PUF-packages ต่อผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือ ขณะที่เมื่อน้ำขึ้นสูงสุด เท่ากับ 1 : 9.78 และขณะที่มีน้ำลงต่ำสุด เท่ากับ 1 : 6.88 ซึ่งมีค่าคงที่ตลอดการทดลอง เนื่องจากการทดลองนี้มีการเติมโฟมที่มีพื้นที่ผิวเท่ากันแทนชั้นโฟมที่เก็บขึ้นมารีเคราะห์ ทุกๆ 12 ชม. ปฏิบัติดังนี้ 1) เก็บ PUF-packages เฉพาะตัวอย่างที่ติดหุ่นลอย จำนวน 3 ชั้น และเก็บไว้ในถังน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างขณะขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ 2) เติมตัวอย่าง PUF-packages ใหม่ที่ใช้แทนโฟมแทนหุ่นลอย เพื่อเป็นจุดสังเกตอายุของตัวอย่าง และ 3) เก็บตัวอย่างน้ำทะเล ปริมาณ 50 มล. จำนวน 3 ขวด จากท่อที่ส่งน้ำออกนอกตัวเรือ (รูปที่ 5.5) เก็บรักษาตัวอย่างทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิต่ำตลอดเวลา ก่อนนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการ



(ก)

(ข)

รูปที่ 5.4 ตัวอย่าง PUF- packages พื้นที่ผิว 40 ซม.²/ชั้น ที่ประกอบด้วย PUF-immobilized JC11 packages และ Uninoculated PUF packages ที่เติมลงในพื้นที่ทดสอบ โดยมีหุ่นลอยติดไว้ตรงกลาง เพื่อให้ตัวอย่างลอยอยู่บนผิวน้ำทะเล (ก) และตัวอย่าง PUF-packages ที่ติดแทนโฟม เพื่อให้ต่างจาก PUF- packages แบบแรก และใช้สำหรับเติมลงในพื้นที่ทดสอบในภายหลัง (ข)

จุดเก็บตัวอย่างน้ำขังใต้ท้องเรือ
ก่อนถูกปล่อยลงสู่ทะเล



รูปที่ 5.5 จุดเก็บตัวอย่างน้ำขังใต้ท้องเรือที่ปล่อยออกจากเรือประมง ก่อนและหลังเติม PUF-packages ในห้องเครื่องยนต์เรือ

สกัดน้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บนชั้นโพลีเอทิลีน หลังจากแยกตัวอย่าง PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ออกจากส่วนของตัวอย่าง Uninoculated PUF packages นอกจากนี้วิเคราะห์ส่วนประกอบอัลเคนในน้ำมันตัวอย่างที่สกัดได้โดย GC/FID และสกัดน้ำมันในน้ำขังใต้ท้องเรือ ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.3.3 วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ของตัวอย่างน้ำทะเล ตัวอย่าง PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages และ Uninoculated PUF packages โดยวิธี MPN ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 4.3.7

(3.2) ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์บนตัวอย่าง PUF-packages โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

(3.2.1) สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง PUF-packages

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ได้แก่ PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages จำนวน 4 ตัวอย่าง (ชั่วโมงที่ 0, 0.5, 96 และ 168) และ Uninoculated PUF packages จำนวน 3 ตัวอย่าง (ชั่วโมงที่ 0.5, 96 และ 168) โดยใส่ตัวอย่าง 1,000 มก. ในพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 500 มล. เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อปริมาตร 50 มล. และ เติม Triton[®]X-100 (Ultrapure, USB corporation, USA) ปริมาตร 50 μ l ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ช่วยเพิ่มการหลุดของเซลล์จากผิววัสดุจริง ทำให้เซลล์ที่เกาะบนวัสดุจริงหลุดออก โดยนำพลาสติกไปวางในเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่ 35 KHz นาน 5 นาที หลังจากนั้นเพิ่มการหลุดของเซลล์จริงโดยนำพลาสติกไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชม. และ ตกตะกอนเซลล์ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที (Refrigerated centrifuge, รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan) และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Fast DNA spin kit (BIO

101 kit, Qbiogene, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

(3.2.2) ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

เตรียมอะกาโรสเจมเข้มข้น 0.9% (ภาคผนวก ข) ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ และปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 20 นาที จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) โดยวางชิ้นเจลในแชมเบอร์ (chamber) และเทบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมเหนือชิ้นเจลประมาณ 2-3 มม. ผสมสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 3.3.1 กับสีติดตาม (loading dye) แล้วหยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งแรกหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน *Lamda HindIII* ที่ผสมสีติดตามปริมาตร 2 μl จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที นำไปดูภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system, รุ่น Gel DOC 2000TM บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA) หลังจากนั้นตัดส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากเจล และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยนำเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge) ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ

คำนวณค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ จากสมการ *ดีเอ็นเอสายคู่* (g/ml) = $A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$ หลังจากนั้นเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') ซึ่งมี GC clamp (5'CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3') เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ 520R (5'-ACCGCGGCTGCTGG-3') (Muyzer และคณะ, 1993) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 200 bp โดยใช้ชุด Go-Taq[®] Green Master Mix (Promega, USA) สำหรับทำ PCR ซึ่งเติม reaction mixtures ในหลอด PCR ที่วางอยู่ในน้ำแข็ง ดังนี้

Go-Taq [®] Green Master Mix, 2X	15	μl
ไพรเมอร์ 341F (20 พิโคโมล)	1	μl
ไพรเมอร์ 520 R (20 พิโคโมล)	1	μl
DNA-template (25 ng)	4	μl
Nuclease-Free Water to	9	μl

รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 30 μ l ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ และดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 94 ^o ซ เวลา 3 นาที	} 35 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 94 ^o ซ เวลา 30 วินาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 53 ^o ซ เวลา 30 วินาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72 ^o ซ เวลา 30 วินาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 ^o ซ เวลา 10 นาที	

ตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

(3.2.3) วิเคราะห์ DGGE

วิเคราะห์ DGGE โดยใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ (gradient) ของสารละลาย 30-70% (ภาคผนวก ข) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ และเสียบหัวลงไประหว่างกระจกแซนวิช ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปลดปล่อยพอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว หลังจากนั้นนำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแทมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 7 ลิตร ซึ่งผ่านการให้ความร้อนจนได้อุณหภูมิประมาณ 60^oซ ผสม loading dye ปริมาตร 5 μ l ลงในหลอดไมโครพิพเจอร์บรรจุผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 25 μ l หยอดผลิตภัณฑ์ PCR ลงในช่องวิ่ง และทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่ 60^oซ นาน 5 ชม. หลังจากนั้นย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 μ g/ml (ภาคผนวก ข) นาน 20 นาที จึงนำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสง UV

5.4 ผลการทดลอง

5.4.1 การวิเคราะห์ปัจจัยทางกายภาพในน้ำขังใต้ท้องเรือ ท่าเรือประมงสิงห์ อำนาจ จ. จันทบุรี ในช่วง 24 ตุลาคม 2552 ถึง 8 พฤศจิกายน 2553

ในช่วงวันที่ 25 กรกฎาคม 2553 ถึง 8 พฤศจิกายน 2553 ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ปัจจัยทางกายภาพต่างๆ ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ณ ท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี ทั้งหมด 6 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 5.1 พบว่ามีอุณหภูมิแปรผันในช่วง 27-30^oซ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.70-7.44 ค่า

ความเค็ม 2.2-4.0 % ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.50-4.00 มก./ล. และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด <0.03-1.59 มก./ล.

ตารางที่ 5.1 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ตรวจวิเคราะห์ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ณ ท่าเรือประมงสิงห์ อำเภอยะนิง จังหวัดปัตตานี ระหว่าง 24 ตุลาคม 2552 ถึง 8 พฤศจิกายน 2553

วันที่	พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์*				
	อุณหภูมิ (°ซ)	pH ^a	ความเค็ม ^b (%)	ปริมาณ ไนโตรเจน ทั้งหมด (มก./ล.)	ปริมาณ ฟอสฟอรัส ทั้งหมด (มก./ล.)
8 พ.ย. 2553	27	6.80	3.0	0.90	<0.03
1 พ.ย. 2553	27	6.80	3.0	0.50	<0.03
23 ต.ค. 2553	28	6.70	4.0	4.00	0.17
22 ส.ค. 2553	29	7.30	3.6	0.65	0.44
12 ส.ค. 2553	29	7.39	2.2	1.63	1.59
25 ก.ค. 2553	30	7.44	2.2	0.82	0.75

*วิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์

^a วัดค่าความเป็นกรด-ด่างในพื้นที่ด้วย pH Meter INDEX (รุ่น ID1000, USA)

^b วัดค่าความเค็มของน้ำทะเลในพื้นที่ด้วย Salinity Hand Refractometer (รุ่น 508-II 0-10%, Nippon Optical Work Co., Ltd., Japan)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนทั้งหมดในน้ำขังใต้ท้องเรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ระหว่างวันที่ 25 กรกฎาคม 2553 ถึง 8 พฤศจิกายน 2553 พบว่าปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนทั้งหมดมีค่าเฉลี่ย 389 มก./ล. โดยมีค่าต่ำสุด 80 มก./ล. และค่าสูงสุด 976 มก./ล. (ตารางที่ 5.2) ส่วนปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนทั้งหมดในน้ำขังใต้ท้องเรือซึ่งวิเคราะห์ระหว่างวันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2552 ถึง 9 กรกฎาคม 2553 พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนทั้งหมด 339 มก./ล. โดยมีค่าต่ำสุด 129 มก./ล. และมีค่าสูงสุด 882 มก./ล.

ตารางที่ 5.2 ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่ตรวจวัดในน้ำขังใต้ท้องเรือ ณ ท่าเรือ ประมงสิงห์อำนวยการ จ.จันทบุรี ระหว่างวันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2552 ถึง 8 พฤศจิกายน 2553

วันที่	ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด (มก./ล.)*
8 พ.ย. 2553 ^a	134
1 พ.ย. 2553 ^a	976
23 ต.ค. 2553 ^a	93
22 ส.ค. 2553 ^a	492
12 ส.ค. 2553 ^a	80
25 ก.ค. 2553 ^a	557
9 ก.ค. 2553 ^b	150
24 ต.ค. 2552 ^b	194
5 ก.ค. 2552 ^b	882
27 ก.พ. 2552 ^b	129

*เก็บตัวอย่างน้ำขังใต้ท้องเรือครั้งละ 500 มล. และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง ก่อนนำมา 50 มล. เพื่อสกัดน้ำมันโดยสกัดด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 50 มล. จำนวน 3 ครั้ง

^aเก็บตัวอย่างน้ำขังใต้ท้องเรือ จากเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ โดยเก็บจากตำแหน่งที่ต่างกัน 3 จุด และนำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง

^bเก็บตัวอย่างน้ำขังใต้ท้องเรือ จากเรือประมง จำนวน 3 ลำ และนำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง

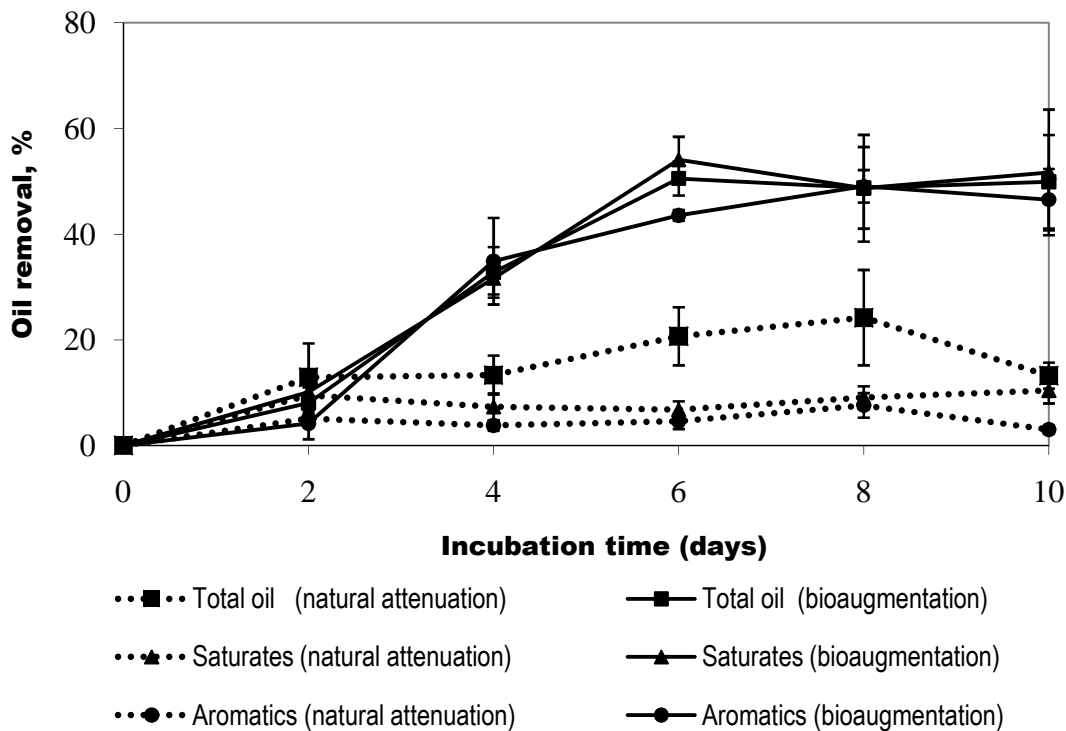
5.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในการย่อยน้ำมันหล่อลื่น สำหรับเครื่องยนต์เรือประมงชนิดที่ใช้แล้วในน้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริง เมื่อวันที่ 21 มกราคม 2553 ในระดับห้องปฏิบัติการ

ในการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากใต้ท้องเรือประมง จ.จันทบุรี เมื่อวันที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2553 เวลา 7.00-8.00 น. ซึ่งเป็นช่วงที่น้ำทะเลขึ้น สภาพอากาศขึ้น เนื่องจากมีฝนตก อุณหภูมิที่ผิวน้ำทะเล 25°C พบว่าน้ำเสียจากท้องเรือมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.97 ค่าความเค็ม 4.0% ค่าบีโอดี 50.8 มก./ล. ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด 7.3 มก./ล. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.7 มก./ล. ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 0.51 มก./ล. ค่าน้ำมันและไขมัน 14.3 มก./ล. และค่าปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 57.8 มก./ล. (ตารางที่ 5.3)

ตารางที่ 5.3 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของตัวอย่างน้ำขังใต้ท้องเรือ ที่เก็บจากท่าเรือประมงสิงห์ อำเภอย จ.จันทบุรี เมื่อวันที่ 21 มกราคม 2553

พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์	หน่วย	ค่าที่รายงาน
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส	25
ความเป็นกรด-ด่าง	-	6.97
ความเค็ม	เปอร์เซ็นต์	4.0
บีโอดี	มก./ล.	50.8
ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด	มก./ล.	7.3
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	มก./ล.	1.7
ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด	มก./ล.	0.51
น้ำมันและไขมัน	มก./ล.	14.3
ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด	มก./ล.	57.8

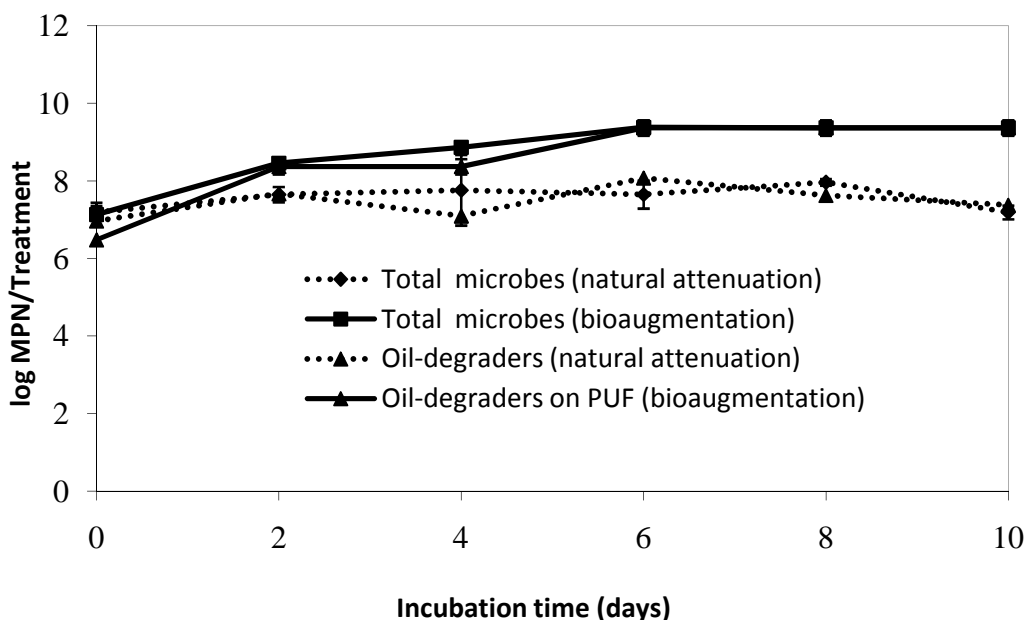
ผลทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริง ระดับห้องปฏิบัติการ แสดงดังรูปที่ 5.6 พบว่าแบคทีเรียตระกูล *Gordonia* sp. JC11 ที่เติมลงในระบบสามารถย่อยน้ำมันทั้งหมด ไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว และอะโรมาติก ได้ $50.0 \pm 8.0\%$ $52.0 \pm 11.0\%$ และ $46.5 \pm 5.8\%$ ของความเริ่มต้น 1,000 มก./ล. ตามลำดับ โดยมีการลดลงของน้ำมันสูงสุด $50.5 \pm 3.2\%$ ในวันที่ 6 ของการทดลอง สอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนเชื้อย่อยน้ำมันบน PUF จาก 7.1 ± 0.1 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 0 เป็น 9.4 ± 0.2 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 10 (รูปที่ 5.7)



รูปที่ 5.6 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว (1,000 มก./ล.) ในน้ำเสียจากห้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริงเมื่อวันที่ 21 มกราคม 2553 ในระดับปฏิบัติการ เมื่อเติมแบคทีเรียตัวจริงของ *Gordonia* sp. JC11 (bioaugmentation) เทียบกับชุด natural attenuation แสดงค่าในรูป mean \pm SD

ในทางตรงกันข้าม พบว่าการลดลงของน้ำมันตามธรรมชาติมีค่าต่ำกว่าชุด bioaugmentation โดยในวันที่ 10 มีการลดลงของอัลเคน และอะโรมาติก เท่ากับ $10.4 \pm 2.5\%$ และ $3.0 \pm 0.7\%$ ตามลำดับ รวมทั้งมีการลดลงของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด $13.2 \pm 2.4\%$ ดังแสดงในรูปที่ 5.6 ในงานวิจัยนี้ไม่ได้เติมโพลีเมอร์ลงไปในการทดลองชุด natural attenuation เนื่องจากผลการทดลองของธีรยุทธ วงษ์จิตรพิมล (2553) พบว่าชุดควบคุมการลดลงของน้ำมันตามธรรมชาติที่เติมขึ้นโพลีเมอร์ลงไปนั้นยังได้ห้องเรือ ซึ่งปมที่ 130 รอบ/นาที นาน 5 วัน มีปริมาณน้ำมันลดลงประมาณ 15% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับในงานวิจัยนี้ที่พบว่า ชุด natural attenuation ที่ไม่เติมขึ้นโพลีเมอร์มีปริมาณน้ำมันลดลง 13% ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนเพียงเล็กน้อยของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่เป็นเชื้อประจำถิ่น จาก 6.9 ± 0.2 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 0 เป็น 7.4 ± 0.2 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 10 (รูปที่ 5.7) และยังพบว่าจำนวนเชื้อทั้งหมดในน้ำเสียมีปริมาณต่ำกว่าในระบบที่เติมแบคทีเรียตัวจริง โดยในวันที่ 10 มีจำนวนเชื้อ 7.2 ± 0.2 log MPN/ชุดทดลอง ในน้ำเสียจากห้องเรือ และ 9.4 ± 0.2 log MPN/ชุดทดลอง ในระบบที่เติม

แบคทีเรียตรึง แสดงว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบ bioaugmentation เจริญในน้ำเสียจากห้องเรือที่มีน้ำมันปนเปื้อนปริมาณสูงได้ดี และมีจำนวนเชื้อส่วนใหญ่เกาะอยู่บน PUF (จำนวนเชื้อในน้ำทะเล 7.2 ± 0.2 และจำนวนเชื้อบน PUF 9.3 ± 0.2 log MPN/ชุดทดลอง)

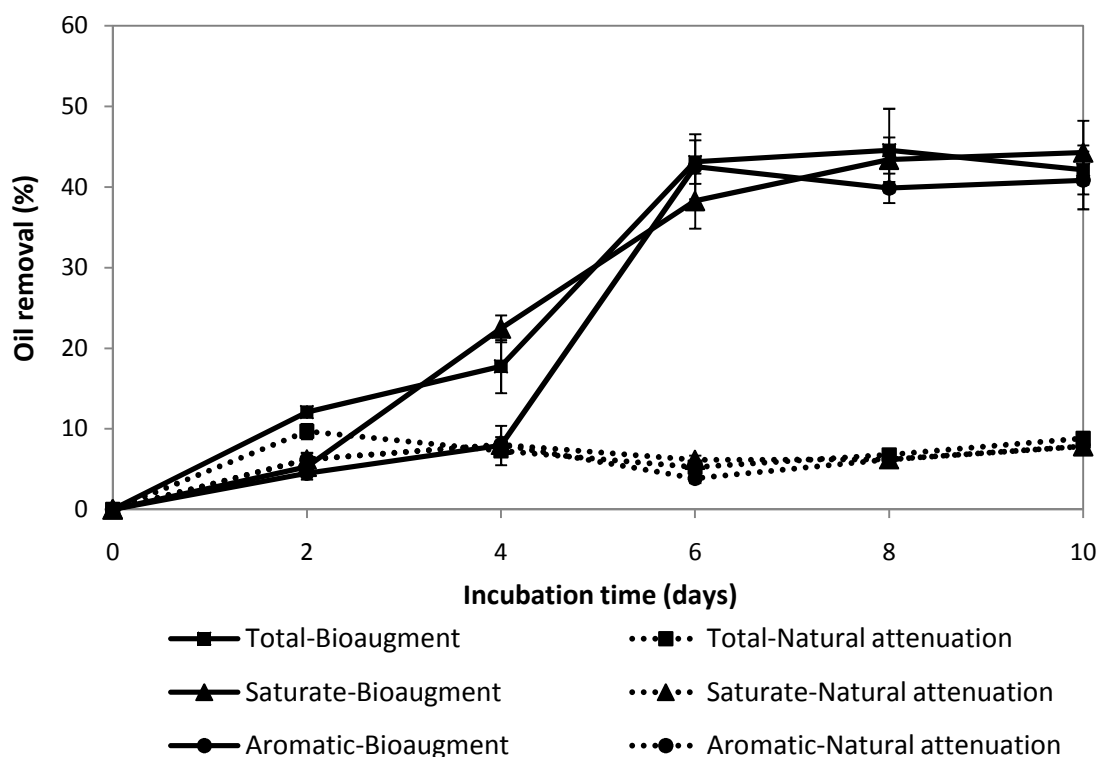


รูปที่ 5.7 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในระบบที่เติมแบคทีเรียตรึงเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำเสียจากห้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริง เมื่อวันที่ 21 มกราคม 2553 แสดงค่าในรูป mean \pm SD

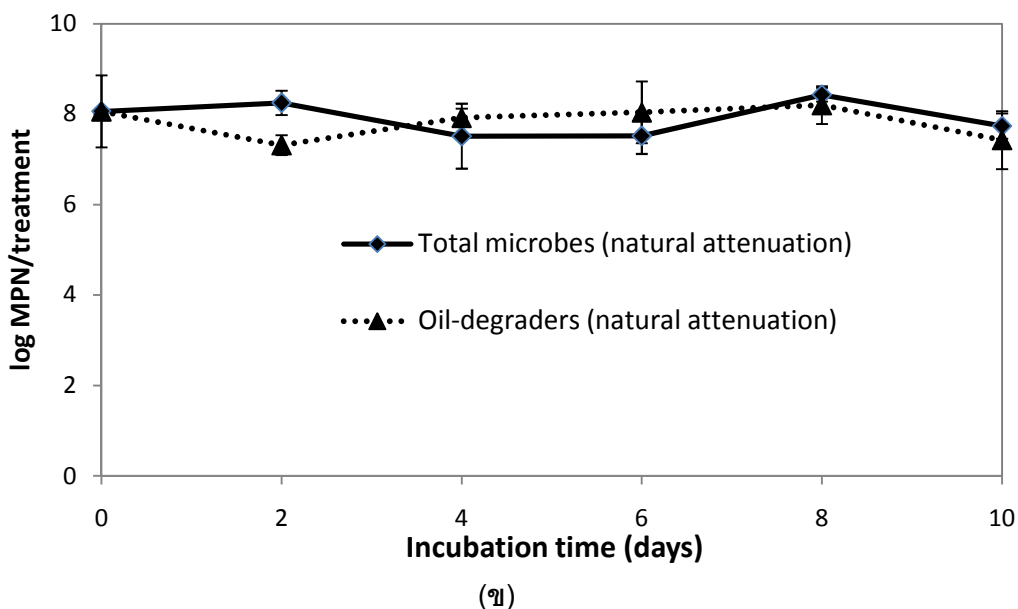
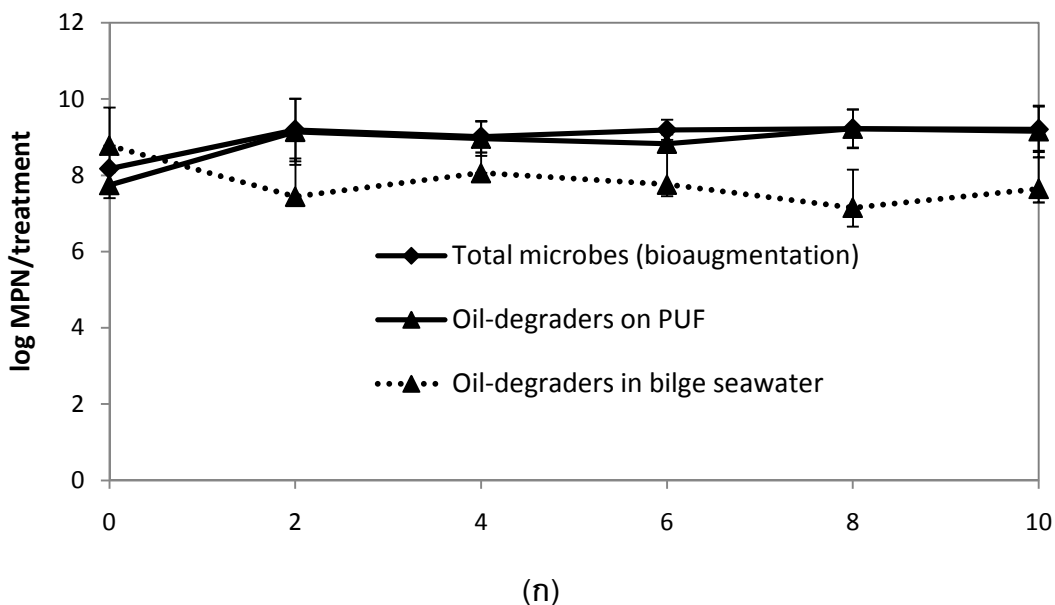
5.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงชนิดที่ใช้แล้วในน้ำขังใต้ห้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริง เมื่อวันที่ 12 สิงหาคม พ.ศ. 2553 ในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการคงประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึง *Gordonia* sp. JC11 ในการย่อยน้ำมันในน้ำเสียห้องเรือที่ไม่เติมสารอาหาร ที่เก็บจากพื้นที่จริง ณ ช่วงเวลาที่มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างจากการทดลองในข้อ 5.4.2 และประเมินความเป็นไปได้ในการนำหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ชนิดนี้ไปใช้งานในพื้นที่จริง โดยเก็บตัวอย่างน้ำขังใต้ห้องเรือ 3 จุด จากหัวเรือ กลางเรือ และท้ายเรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ และนำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง เมื่อวันที่ 12 สิงหาคม 2553 เวลา 19.30-20.00 น. ภายหลังจากที่เจ้าของเรือประมงขนส่งสัตว์น้ำขึ้นท่าเรือเรียบร้อยแล้ว ซึ่งเป็นช่วงที่น้ำลง คุณหมุมิที่ผิวน้ำทะเล 29 องศาเซลเซียส ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียจากห้องเรือและปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด แสดงในตารางที่ 5.1-5.2 ผลทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วจากเครื่องยนต์เรือประมง ที่ความ

เข้มข้นเริ่มต้นเป็น 1,000 มก./ล. แสดงดังรูปที่ 5.8 พบว่าแบคทีเรียที่เรียตริง *Gordonia* sp. JC11 ที่เติมลงในระบบสามารถย่อยน้ำมันทั้งหมด และไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว ได้สูงสุด $44.5 \pm 5.1\%$ และ $43.4 \pm 2.7\%$ ในวันที่ 8 และย่อยอะโรมาติกได้ $42.5 \pm 4.0\%$ ในวันที่ 6 ในทางตรงข้ามพบว่า น้ำมันในชุด natural attenuation ลดลงเพียง $8.8 \pm 0.7\%$ ในวันที่ 10 โดยมีการลดลงของ ไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติกเท่ากัน คือ $7.8 \pm 0.6\%$ ทั้งนี้แบคทีเรียที่เรียตริงมีประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันสูงกว่าเชื้อประจำถิ่น เช่นเดียวกับผลการทดลองในข้อ 5.4.2



รูปที่ 5.8 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (1,000 มก./ล.) ที่ปนเปื้อนในน้ำ ชั่งใต้ท้องเรือ ที่เก็บจากพื้นที่จริงเมื่อวันที่ 12 สิงหาคม 2553 เมื่อเติมแบคทีเรียที่เรียตริงของ *Gordonia* sp. JC11 (bioaugmentation) เทียบกับการย่อยสลายน้ำมันตามธรรมชาติ (natural attenuation) แสดงค่าในรูป mean \pm SD

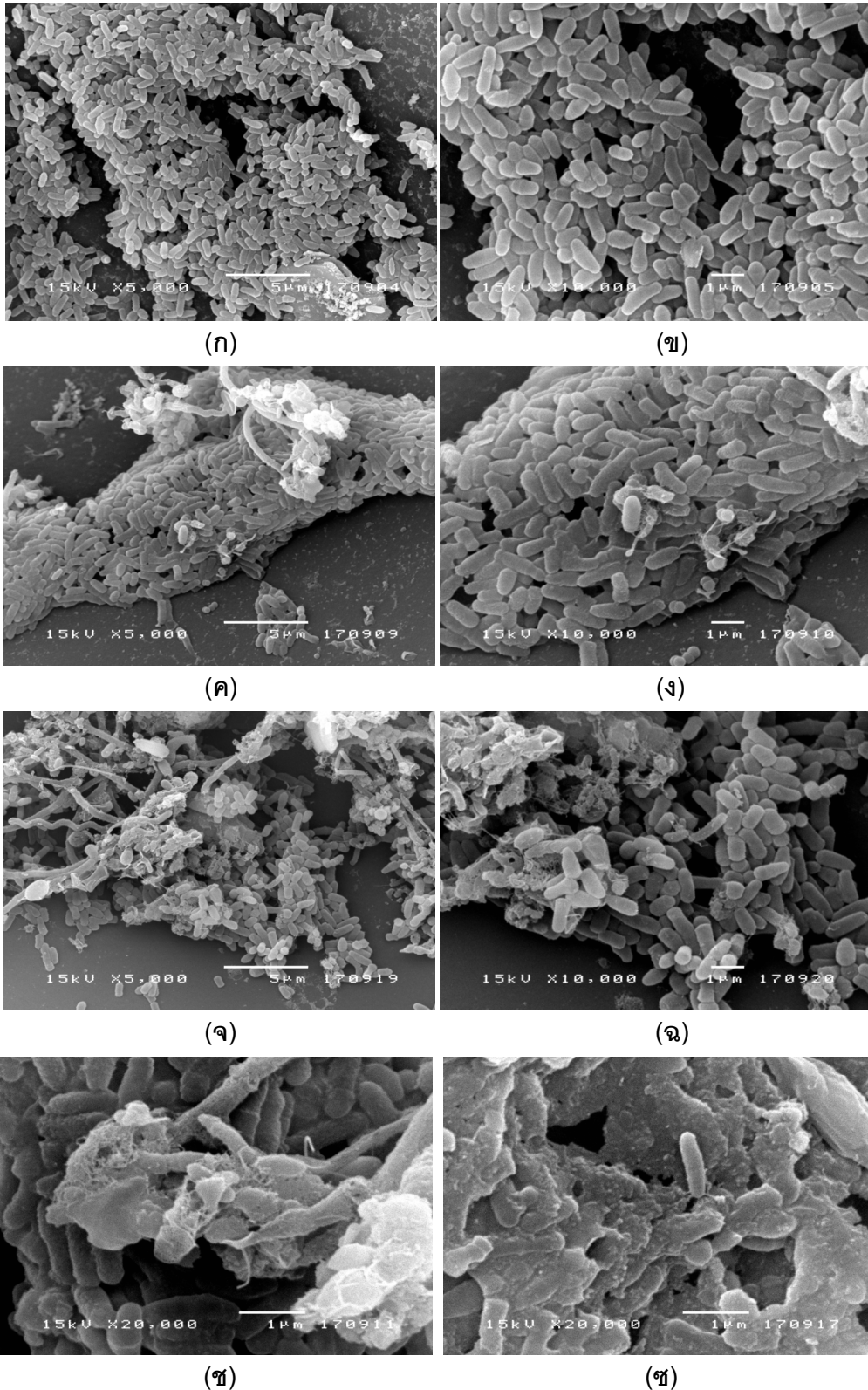


รูปที่ 5.9 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในระบบ bioaugmentation (ก) และ natural attenuation (ข) เมื่อเติมน้ำเสียจากห้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริงเมื่อวันที่ 12 สิงหาคม 2553 แสดงค่าในรูป mean \pm SD

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในน้ำขังใต้ห้องเรือ สอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบน PUF (รูปที่ 5.9 ก) ที่เพิ่มจาก 7.7 ± 0.3 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 0 เป็น 9.1 ± 0.6 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 10 ในทางตรงข้ามจำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่เป็นเชื้ออิสระอยู่ในน้ำเสียห้องเรือ มีค่าลดลงจาก 8.7 ± 0.0 log MPN/ชุดทดลองในวันที่ 0 เป็น 7.4 ± 0.0 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 2 และมีค่าต่ำกว่าจำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบน PUF ตลอด

การทดลอง โดยมีจำนวนเท่ากับ 7.6 ± 0.3 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 10 และในการทดลองนี้ ยังพบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบ bioaugmentation ส่วนใหญ่เกาะบน PUF โดยในวันที่ 10 ของการทดลองมีจำนวนเชื้อทั้งหมดเป็น 9.2 ± 0.6 log MPN/ชุดทดลอง ซึ่งในจำนวนนี้เป็นเชื้อ ย่อยน้ำมันบน PUF 9.1 ± 0.6 log MPN/ชุดทดลอง ในทางตรงข้ามในรูปที่ 5.9 พบว่าจุลินทรีย์ ประจำถิ่นในระบบ natural attenuation มีการเพิ่มจำนวนเล็กน้อยจาก 8.1 ± 0.8 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 0 เป็น 8.2 ± 0.4 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 8 และมีจำนวนลดลงเป็น 7.4 ± 0.6 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 10 และพบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่ในน้ำขังใต้ห้องเรือมีการเพิ่มจำนวนเล็กน้อยจาก 8.1 ± 0.0 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 0 เป็น 8.4 ± 0.2 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 8 และมีปริมาณลดลงเป็น 7.7 ± 0.3 log MPN/ชุดทดลอง ในวันที่ 10

เมื่อศึกษาการเกาะติดของเซลล์ *Gordonia* sp. JC11 บนพื้นผิว PUF โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM, $\times 5,000$; $\times 10,000$) ดังแสดงอยู่ในรูปที่ 5.10 พบการเกาะติดของเชื้อ JC11 ปริมาณมากบนพื้นผิว และภายในรูพรุนของ PUF ในวันที่ 0 (รูปที่ 5.10 ก ข) และยังคงมีเซลล์ลักษณะคล้าย *Gordonia* sp. JC11 เป็นแบคทีเรียชนิดเด่นอยู่บน PUF หลังจากการใช้งานแล้ว 4 วัน และ 10 โดยสังเกตจากรูปร่างของเซลล์ที่มีลักษณะเป็นแท่งสั้น (รูปที่ 5.10 ค-ด) สอดคล้องกับการสังเกตพบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ JC11 (SEM, $\times 20,000$) ภายหลังจากใช้งานในระบบทดสอบนาน 4 วัน และ 10 วัน โดยกลุ่มเซลล์ส่วนใหญ่ฝังตัวอยู่ในไบโอฟิล์ม (รูปที่ 5.10 ช-ซ)

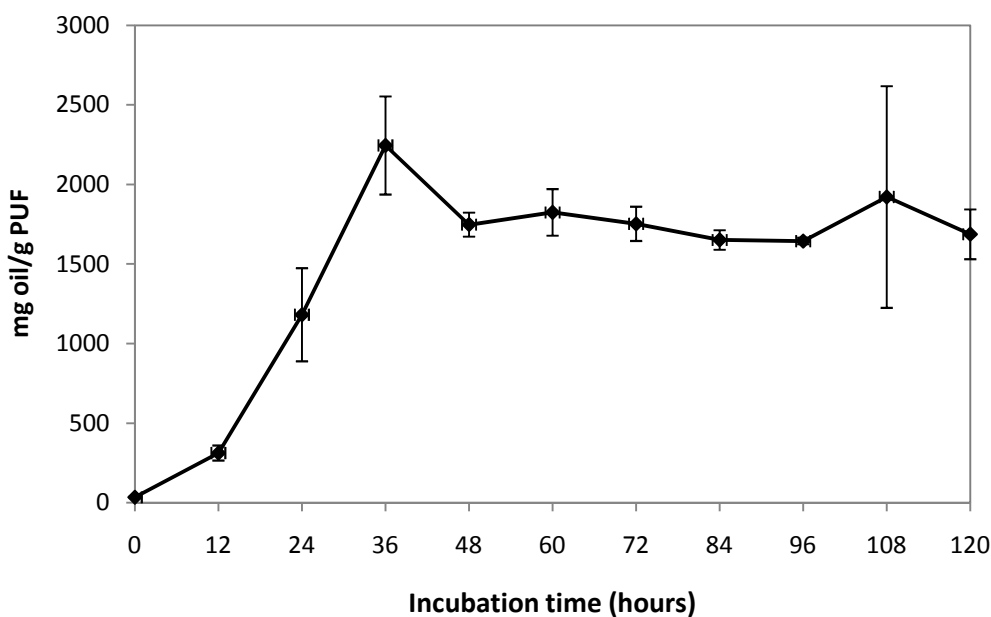


รูปที่ 5.10 รูปจากกล้อง SEM [x5,000 (ก, ค, ฉ); x10,000 (ข, ง, ฉ); x20,000 (ช, ช)] แสดงกลุ่มเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบน PUF ก่อนใช้งาน (ก,ข) และภายหลังจากทดสอบการย่อยน้ำมัน นาน 4 วัน (ค, ง) และ 10 วัน (ฉ, ฉ) ซึ่งพบการสร้างเส้นใยเกาะกลุ่มเซลล์ในวันที่ 4 (ช) และการฝังตัว (encapsulation) ของเซลล์อยู่ภายในไบโอฟิล์ม ในวันที่ 10 (ช)

5.4.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันของ *Gordonia* sp. JC 11 ที่ตรึงอยู่บน PUF ในน้ำขังใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็ก (*in situ* bioaugmentation)

(1) การทดลองชุด natural attenuation ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ของเรือประมง โชคเพิ่มทรัพย์

ระหว่างวันที่ 23-28 กันยายน พ.ศ. 2553 มีลมมรสุม ทำให้ไม่มีการออกเรือ หรือเติมน้ำมันในเครื่องยนต์ หลังจากที่ได้ใส่ PUF-uninoculated packages ลงในห้องเครื่องยนต์ของเรือประมง พบว่าตัวอย่างโพลีมีรีด้าซึมเช่นเดียวกับสีของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว โดยขึ้นโพลีดูดซับน้ำมัน 312 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ภายใน 12 ชั่วโมงแรกที่เติม PUF ลงไป หลังจากนั้นปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 2,244 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ภายใน 36 ชม. หลังจากนั้นปริมาณน้ำมันบนขึ้นโพลีมีรีด้าลดลงเล็กน้อย เท่ากับ 1,747 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในชั่วโมงที่ 48 และมีค่าประมาณ 1,700 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในชั่วโมงที่ 60-120 (รูปที่ 5.11)

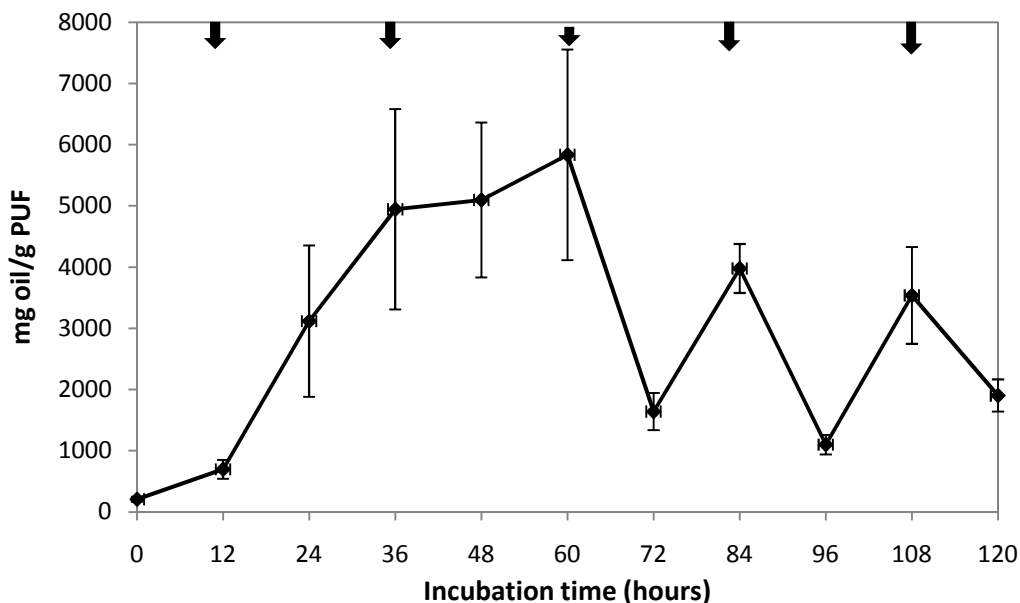


รูปที่ 5.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดเนื่องจากการดูดซับของ Uninoculated PUF packages ที่มีพื้นที่ผิว 40 ซม.²/ชิ้น ซึ่งเติมบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ระหว่างวันที่ 23-28 กันยายน พ.ศ. 2553 โดยมีจำนวนเริ่มต้น 33 ชิ้น และเก็บตัวอย่าง 3 ชิ้นทุกๆ 12 ชม. แสดงค่าในรูปแบบ mean ± SEM

(2) ประสิทธิภาพของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF (immobilized bioaugmentation) ในการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ระหว่างวันที่ 1-6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2553

วันที่ 1-6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2553 เป็นช่วงที่เจ้าของเรือประมงออกเรือทุกวัน จึงเติมน้ำมันดีเซล 100-200 ลิตร/วัน และเติมน้ำมันหล่อลื่น 1-2 ลิตร/วัน ในช่วงเวลาที่ 12, 36, 60, 84 และ 108 ดังแสดงด้วยลูกศรชี้ในรูปที่ 5.12 เมื่อเติมขึ้นโคมบริเวณผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือวันที่ 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2553 เวลา 19.00 น. พบว่าขึ้นโคมสามารถดูดซับน้ำมันได้อย่างรวดเร็วทำให้มีลักษณะสีดำเข้มเช่นเดียวกับสีของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว จากค่าเริ่มต้น 206 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในช่วงเวลาที่ 0 เพิ่มขึ้นเป็น 4,945 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในช่วงเวลาที่ 36 และมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 5,095 และ 5,834 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในช่วงเวลาที่ 48 และ 60 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าสูงสุดในการดูดซับน้ำมันของ PUF หลังจากนั้นปริมาณน้ำมันลดลงเหลือ 1,639 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในช่วงเวลาที่ 72 และเพิ่มขึ้นเป็น 3,977 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในช่วงเวลาที่ 84 หลังจากนั้นลดลงเหลือ 1,100 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในช่วงเวลาที่ 96 และมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 3,537 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในช่วงเวลาที่ 108 และลดลงเหลือ 1,901 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในช่วงเวลาที่ 120 และจากผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบอัลเคนในน้ำมันที่พบปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือ โดย GC-FID ในรูปที่ 5.13 พบว่าในช่วงเวลาที่ 72 และ 96 ปริมาณอัลเคนมีค่าน้อยกว่าปริมาณน้ำมันสูงสุดที่ถูกดูดซับอยู่บนโคมพอลิยูรีเทนในช่วงเวลาที่ 48 ประมาณ 30 และ 70% ตามลำดับ

ในการทดลองนี้ยังได้เก็บน้ำตัวอย่างมาวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ตามมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง โดยเก็บน้ำขังใต้ท้องเรือตรงจุดที่ปล่อยทิ้งลงสู่ทะเล ทั้งก่อนและหลังเติมขึ้นโคม ดังแสดงผลในตารางที่ 5.4 พบว่าค่าบีโอดี ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด มีค่าตามเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้นค่าน้ำมันและไขมันของน้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บมาวิเคราะห์หลังเติม PUF-immobilized cells มีค่า 33 มก./ล. ซึ่งสูงเกินค่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมงที่กำหนดค่าน้ำมันและไขมันไม่เกิน 20 มก./ล. เมื่อเปรียบเทียบกับพารามิเตอร์ของน้ำขังใต้ท้องเรือทั้งก่อนและหลังเติม PUF-immobilized cells พบว่าค่าบีโอดีเพิ่มจาก 26.1 เป็น 40.8 มก./ล. ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงจาก 193 เป็น 132 มก./ล. และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพิ่มจาก 0.5 เป็น 0.9 มก. ไนโตรเจน/ล.



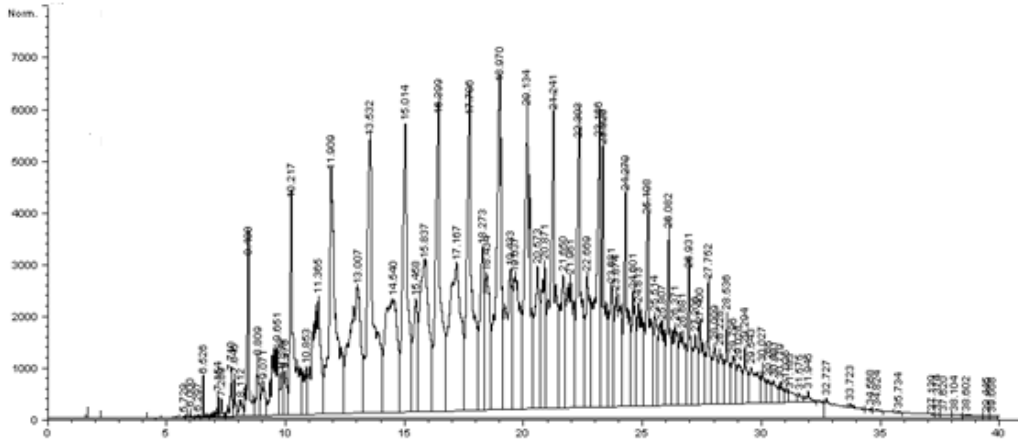
รูปที่ 5.12 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ TPH ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ในพื้นที่จริง เนื่องจากการดูดซับและการย่อยสลายของ PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ซึ่งเติมบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือ ระหว่างวันที่ 1-6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ลูกศรชี้ในชั่วโมงที่ 12, 36, 60, 84 และ 108 แสดงถึงการเติมน้ำมันในเครื่องยนต์เรือก่อนออกทำการประมง แสดงค่าในรูป mean \pm SEM

ตารางที่ 5.4 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำขังใต้ท้องเรือ ที่เก็บจากจุดปล่อยน้ำออกนอกตัวเรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ก่อนและหลังเติม PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages

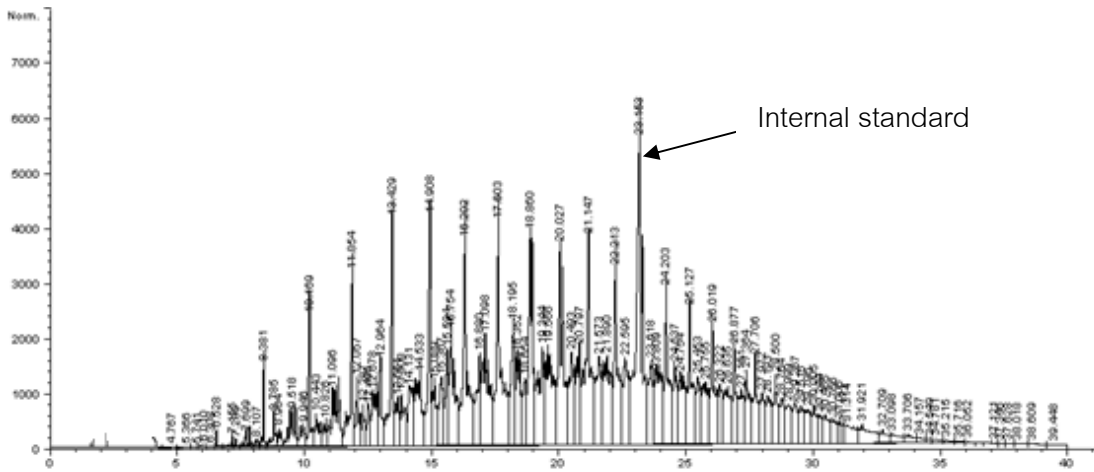
พารามิเตอร์	หน่วย	ช่วงเวลาเก็บน้ำขังใต้ท้องเรือเพื่อนำมาวิเคราะห์	
		ก่อนเติม PUF-immobilized cells ^a	หลังเติม PUF-immobilized cells ^b
ค่าบีโอดี	มก./ล.	26.1	40.8
TSS*	มก./ล.	193	132
ไนโตรเจนทั้งหมด	มก./ล.	0.5	0.9
ฟอสฟอรัสทั้งหมด	มก./ล.	<0.03	<0.03
น้ำมันและไขมัน	มก./ล.	12.8	33.0
TPH**	มก./ล.	84	93

^a เวลา 18.30 น. ของวันที่ 1 พฤศจิกายน พ.ศ.2553 ^b เวลา 19.30 น. วันที่ 6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ชม.ที่ 120 ของการทดลอง *ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด

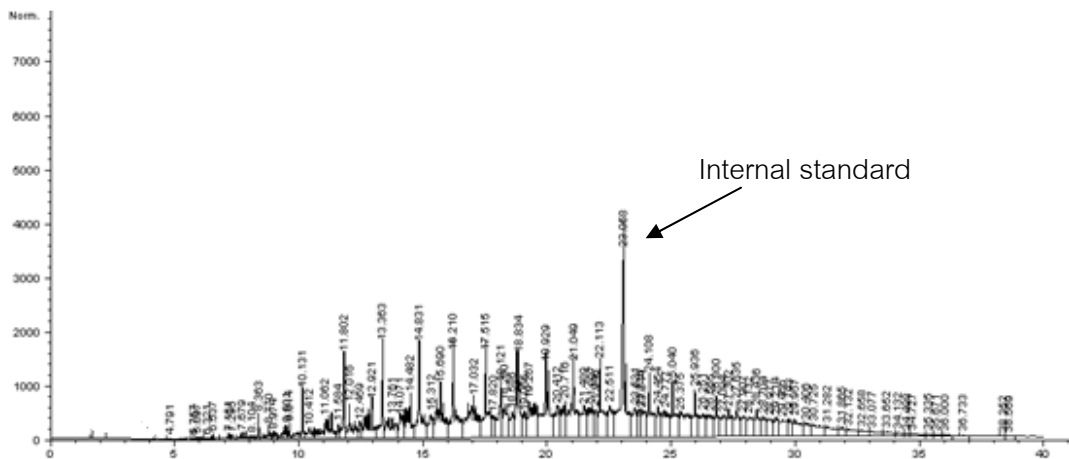
**ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด โดยสกัดน้ำขังใต้ท้องเรือด้วยคลอโรฟอร์ม และวิเคราะห์ด้วย TLC/FID ส่วนพารามิเตอร์อื่นๆ ส่งวิเคราะห์ที่บริษัทเพทโทร-อินสตรูเมนต์ จำกัด



(ก) ชั่วโมงที่ 48



(ข) ชั่วโมงที่ 96

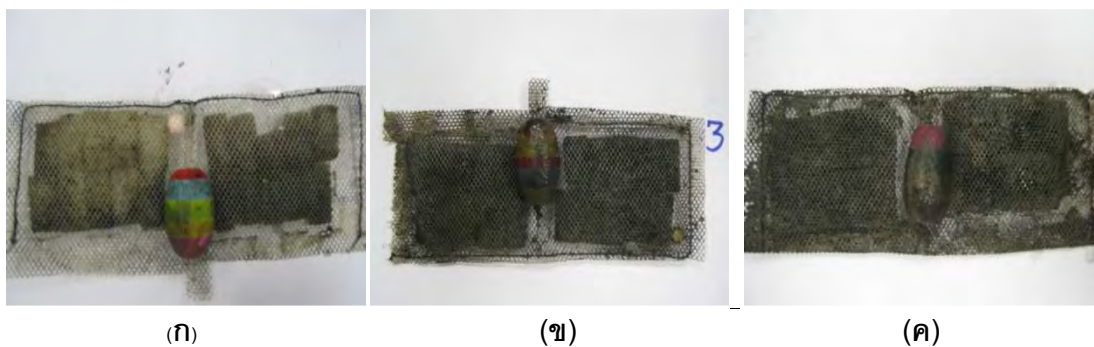


(ค) ชั่วโมงที่ 108

รูปที่ 5.13 จีซีโครมาโตแกรมของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ห้องเรือนในพื้นที่จริงที่ถูกดูดซับโดย โฟมพอลิยูรีเทน ภายหลังเติม PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ก) 96 ชั่วโมง (ข) และ 108 ชั่วโมง (ค)

(3) ประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันในน้ำขังใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็กของชุด bioaugmentation ซึ่งเติม *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF เปรียบเทียบกับชุด natural attenuation ภายในห้องเครื่องยนต์เรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม 2553

การทดลองนี้ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียที่ตรึงกับการลดลงของน้ำมันตามธรรมชาติ ในเวลาและบริเวณเดียวกัน โดยเติม Uninoculated PUF packages ลงในพื้นที่จริงพร้อมกับ PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ที่เวลาเริ่มต้นทดลองมีอุณหภูมิผิวน้ำทะเล 29 °ซ pH 6.3 ความเค็ม 4.0% รูปที่ 5.14 แสดงลักษณะขึ้นโพลีที่เติมลงไปใต้ท้องเรือที่เวลา 0.5 24 และ 168 ชั่วโมง ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าขึ้นโพลีดูดซับน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียท้องเรือภายในเวลาครึ่งชั่วโมงทำให้มีลักษณะสีดำ ซึ่งจะมีสีดำเข้มขึ้นภายในเวลา 24 ชั่วโมง



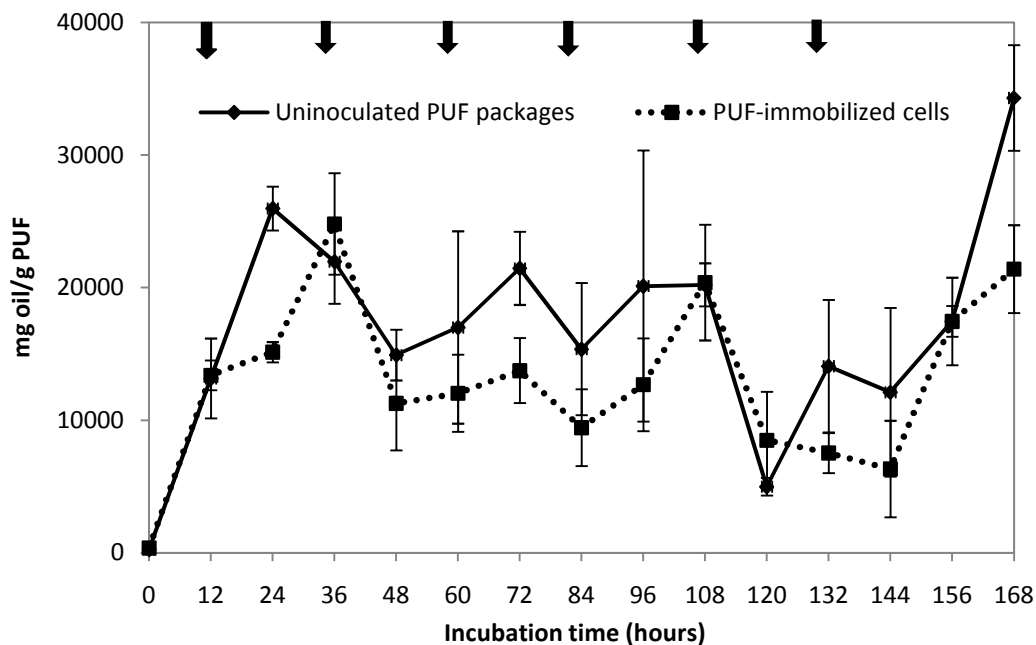
รูปที่ 5.14 ลักษณะของ PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ที่ผูกติดกับ Uninoculated PUF package ที่มีพื้นที่ผิวขนาด 40 ซม.²/ ชิ้น ณ ชั่วโมงที่ 0 (ก) และภายหลังการเติมลงไปใต้น้ำขังใต้ท้องเรือในพื้นที่จริงนาน 24 ชม. (ข) และ 168 ชม. (ค)

ระหว่างวันที่ 13-18 ธันวาคม 2553 เจ้าของได้ออกเรือเพื่อทำประมงทุกวัน แบบไปเข้า-เย็นกลับเข้าฝั่ง โดยช่วงเวลาประมาณ 05.30-6.00 น. มีการเติมน้ำมันดีเซลปริมาณ 100-200 ลิตร และเติมน้ำมันหล่อลื่น 1-2 ลิตร หรือคิดเป็นชั่วโมงที่ 12 36 60 84 108 และ 132 ของการทดลอง ยกเว้นในวันที่ 15 ธันวาคม 2553 ที่ไม่ได้เติมน้ำมันหล่อลื่น และสภาพอากาศทั่วไปในช่วงเวลาดังกล่าว มีการเปลี่ยนแปลง ตั้งแต่ท้องฟ้าแจ่มใส มีลมแรง หรือมีฝนตก ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 5.5

ตารางที่ 5.5 ปริมาณน้ำมันที่เติมลงในเครื่องยนต์เรือ ของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ และสภาพอากาศในระหว่างที่ออกเรือเพื่อทำประมง

วันที่ (ชั่วโมงที่)	ปริมาณน้ำมันที่เติม (ลิตร)		สภาพอากาศ
	น้ำมันดีเซล	น้ำมันหล่อลื่น	
13 ธันวาคม 2553 (12)	150	1	มีแดด ท้องฟ้าแจ่มใส
14 ธันวาคม 2553 (36)	150	1	มีลม ท้องฟ้าหมอง
15 ธันวาคม 2553 (60)	150	-	มีลม ท้องฟ้าหมอง
16 ธันวาคม 2553 (84)	200	2	ท้องฟ้ามีด มีฝนตก
17 ธันวาคม 2553 (108)	100	1	ลมแรง อากาศเย็น
18 ธันวาคม 2553 (132)	150	1	ลมแรง อากาศเย็น
19 ธันวาคม 2553	-	-	ไม่ได้ออกเรือ

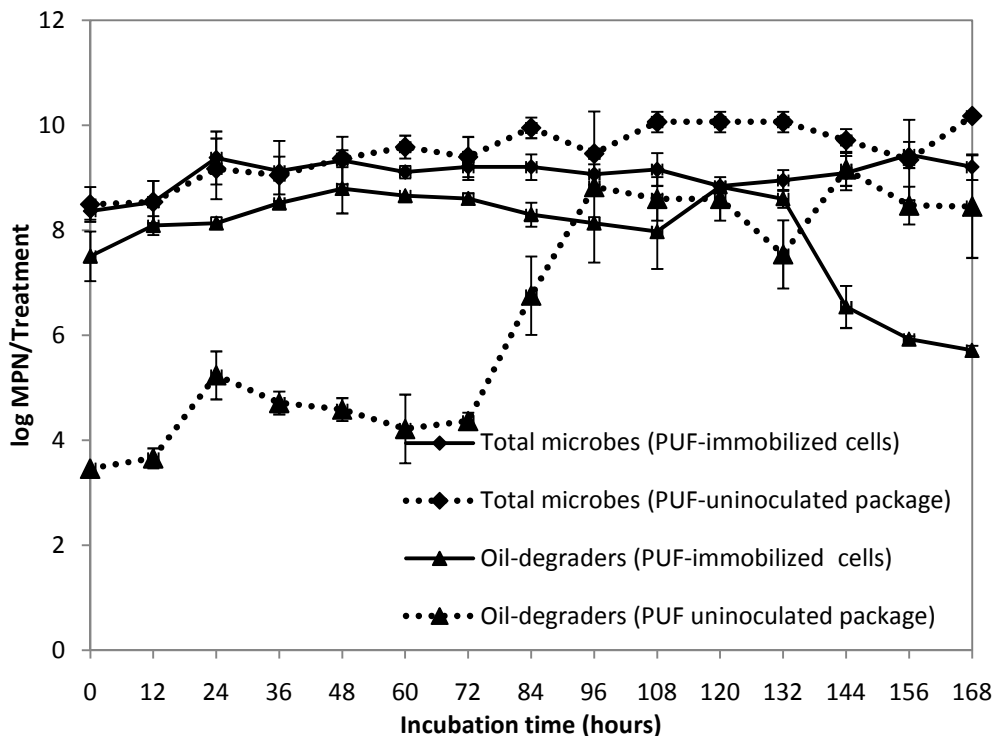
ผลทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดคราบน้ำมันของ PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages แสดงดังรูปที่ 5.15 ภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง Uninoculated PUF packages มีปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บนชั้นโฟมเท่ากับ 25,967 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในทางตรงข้ามปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับบน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ในชั่วโมงที่ 24 มีค่าเพียง 15,127 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ที่เป็นเช่นนี้แสดงว่าน้ำมันส่วนหนึ่งถูกย่อยโดย *Gordonia* sp. JC11 ที่ถูกตรึงอยู่บน PUF และพบด้วยว่าในชั่วโมงที่ 48-96 ปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages มีค่าประมาณ 11,200-11,700 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ซึ่งต่ำกว่าปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับบน Uninoculated PUF packages ที่มีค่าประมาณ 15,000-20,100 มก. น้ำมัน/กรัม PUF



รูปที่ 5.15 การเปลี่ยนแปลงของ TPH ในน้ำขังใต้ท้องเรือในพื้นที่จริง เนื่องจากการดูดซับและการย่อยของ PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ที่ผูกติดกับ Uninoculated PUF packages ที่มีปริมาณ 125 มก./ชุดทดลอง ถูกตรวจในชั่วโมงที่ 12, 36, 60, 84, 108 และ 132 แสดงถึงการเติมน้ำมันในเครื่องยนต์เรือก่อนออกทำการประมง แสดงค่าในรูปแบบ mean \pm SEM

การย่อยสลายน้ำมันของแบคทีเรียที่เรียงสอดคลองกับปริมาณจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ที่แสดงในรูปที่ 5.16 ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 8.40 log MPN/กรัม PUF ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 9.69 log MPN/กรัม PUF ในชั่วโมงที่ 48 และมีค่าคงที่ประมาณ 8.87-9.50 log MPN/กรัม PUF จนถึงชั่วโมงที่ 132 แต่มีปริมาณลดลงหลังจากนั้น ในขณะที่จำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่เกาะบน Uninoculated PUF packages มีปริมาณต่ำในช่วง 72 ชั่วโมงแรก (4.36-5.26 log MPN/กรัม PUF) และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 9.72 log MPN/กรัม PUF ในชั่วโมงที่ 96 และมีปริมาณคงที่ประมาณ 9 log MPN/กรัม PUF จนถึงชั่วโมงที่ 168 สอดคล้องกับการตรวจพบว่าในน้ำขังใต้ท้องเรือมีปริมาณจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันประมาณ 5 log MPN/มล. ในช่วง 84 ชั่วโมงแรก (รูปที่ 5.18) หลังจากนั้นจำนวนลดลงเหลือ 3 log MPN/มล. เป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในน้ำทะเลมาเกาะบน Uninoculated PUF packages เพิ่มมากขึ้น และในรูปที่ 5.16 พบด้วยว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เกาะอยู่บน PUF ทั้งสองแบบมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 8.3-9.3 log MPN/กรัม PUF ในช่วง 72 ชั่วโมงแรก แต่ในชั่วโมงที่ 84-168 กลับพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เกาะบน Uninoculated PUF packages มีค่าสูงกว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เกาะบน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 ซึ่งอาจเป็นเพราะพบการลด

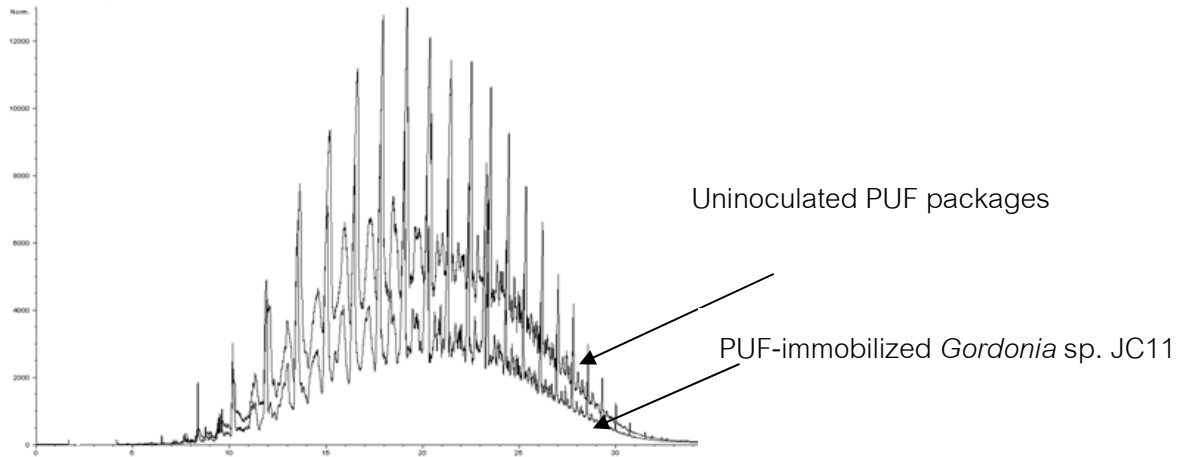
จำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบนเซลล์ตรึง แต่กลับตรวจพบการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบนชิ้นโฟมที่ไม่ได้ตรึงเซลล์ อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากชั่วโมงที่ 96 พบว่าปริมาณน้ำมันบน PUF ทั้งสองแบบมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก (รูปที่ 5.15)



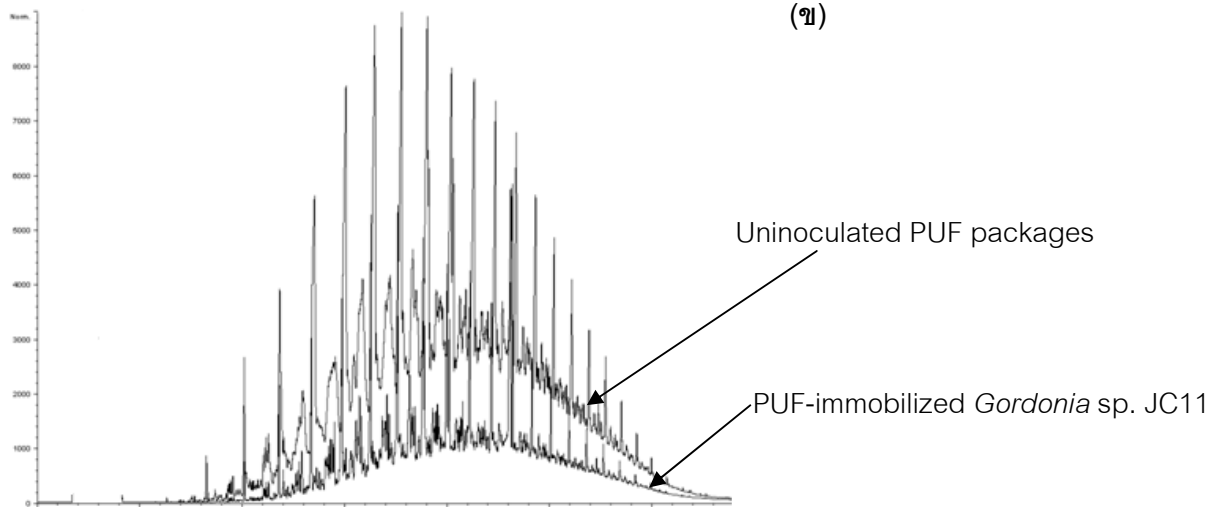
รูปที่ 5.16 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่เกาะอยู่บน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 เทียบกับ Uninoculated PUF packages ที่มีปริมาณ 125 มก./ชุดทดลอง ซึ่งใช้เติมบนผิวน้ำในน้ำขังใต้ท้องเรือของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม พ.ศ. 2553 แสดงค่าในรูป mean \pm SD

จากผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบอัลเคนในน้ำมันที่ถูกดูดซับโดย PUF packages ที่เติมลงไปใต้น้ำขังใต้ท้องเรือ โดย GC-FID (รูปที่ 5.17) ที่เวลา 24, 60 และ 156 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF สามารถย่อยอัลเคนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันได้มากกว่าจุลินทรีย์ที่เกาะบน Uninoculated PUF packages ประมาณ 70% ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 5.15 ที่พบว่าปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บน Uninoculated PUF packages ในชั่วโมงที่ 24, 60 และ 156 มีค่าสูงกว่าปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับบน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages

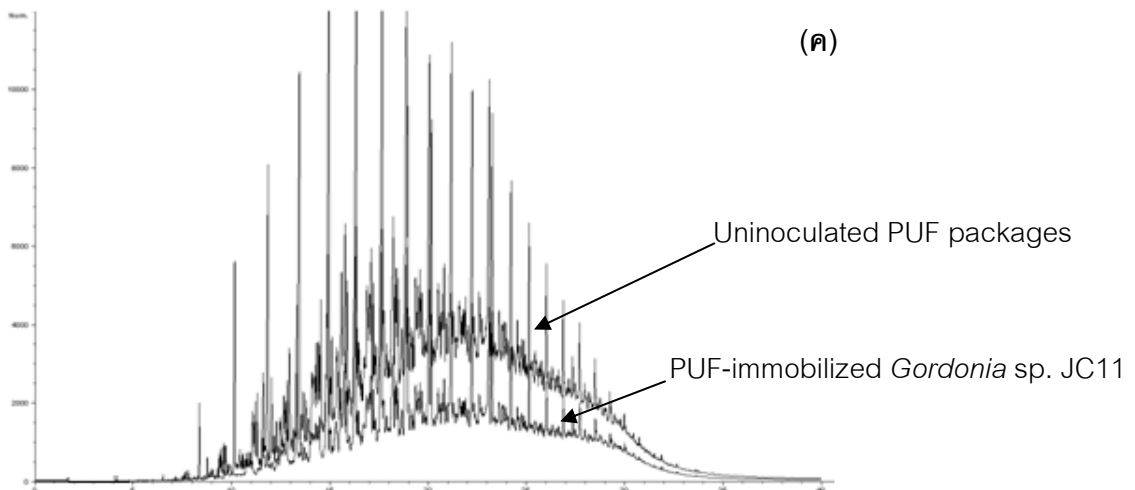
(ก)



(ข)



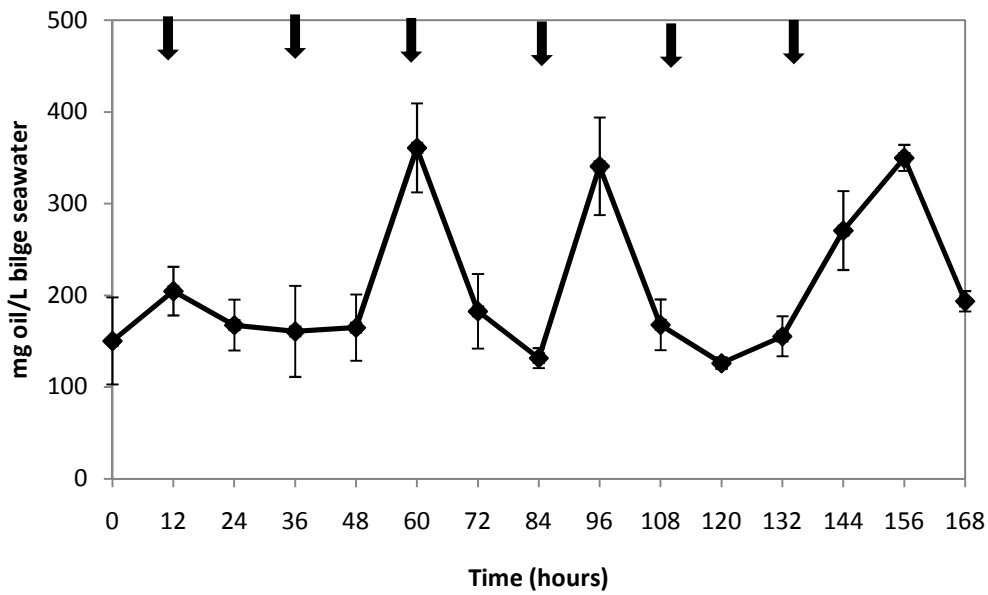
(ค)



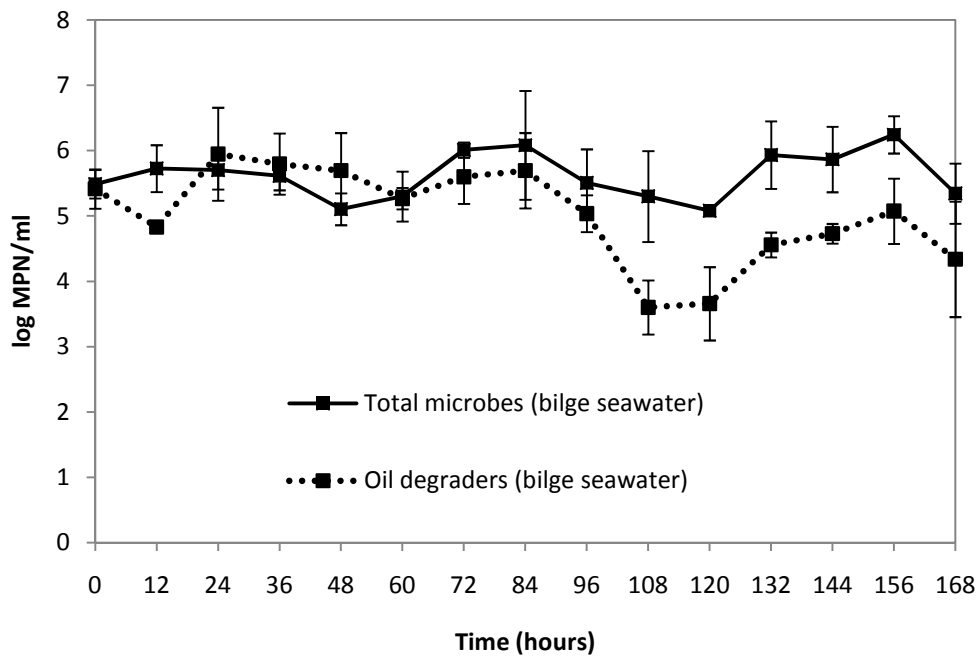
รูปที่ 5.17 จีซีโครมาโตแกรมของน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือในพื้นที่จริงที่ถูกดูดซับโดย PUF ภายหลังจากเติม PUF-packages เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) 60 ชั่วโมง (ข) และ 156 ชั่วโมง (ค)

(3.1) ปริมาณน้ำมันและปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำขังใต้ท้องเรือ

ผลแสดงปริมาณน้ำมันที่ตรวจวัดในน้ำขังใต้ท้องเรือ ซึ่งเก็บจากบริเวณจุดที่ถ่ายน้ำออกนอกตัวเรือ แสดงในรูปที่ 5.18 พบว่าปริมาณน้ำมันในน้ำท้องเรือมีค่าคงที่ประมาณ 150-200 มก./ล. ในช่วง 48 ชั่วโมงแรก ซึ่งน่าจะเป็นเพราะปริมาณน้ำมันที่รั่วไหลในห้องเครื่องยนต์เรือถูกดูดซับโดยขึ้นโฟม ซึ่งมีค่าการดูดซับน้ำมันได้สูงสุดในช่วง 36 ชั่วโมงแรก (รูปที่ 5.15) ในชั่วโมงที่ 60 ปริมาณน้ำมันในน้ำขังใต้ท้องเรือเพิ่มสูงเป็น 360 มก./ล. ซึ่งอาจเป็นเพราะผลของการเติมน้ำมันเข้ามาในระบบ หลังจากนั้นปริมาณน้ำมันในน้ำเสียท้องเรือมีค่าลดลงเป็น 182 และ 131 มก./ล. ในชั่วโมงที่ 72 และ 84 ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เนื่องจากสอดคล้องกับช่วงเวลาที่ปริมาณจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันเจริญเพิ่มขึ้นทั้งในน้ำขังใต้ท้องเรือ และบน Uninoculated PUF packages (รูปที่ 5.19 และ 5.16) ส่วนปริมาณน้ำมันที่ลดลงอีกช่วงหนึ่งในชั่วโมงที่ 96-120 น่าจะเกิดจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม เพราะเป็นช่วงที่มีฝนตก ลมแรง (ตารางที่ 5.5) และปริมาณน้ำมันที่เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 120-156 น่าจะเป็นผลของการเติมน้ำมันเข้ามาในระบบ เพราะลักษณะการเพิ่มดังกล่าวมีความสอดคล้องกับปริมาณน้ำมันบน Uninoculated PUF packages ในรูปที่ 5.15 ที่มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำมันในน้ำขังใต้ท้องเรือมีค่าลดลงจาก 349 มก./ล. ในชั่วโมงที่ 156 เป็น 193 มก./ล. ในชั่วโมงที่ 168 ซึ่งอาจจะเกิดเนื่องจากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เนื่องจากพบเช่นเดียวกันว่าในช่วงเวลาดังกล่าวปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages มีค่าต่ำกว่าปริมาณน้ำมันบน Uninoculated PUF packages (รูปที่ 5.15) ส่วนปริมาณจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันมีจำนวนลดลงในชั่วโมงที่ 96-168 ในขณะที่ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำเสียท้องเรือมีปริมาณคงที่ประมาณ 5 log MPN/มล. ตลอดการทดลอง (รูปที่ 5.19)



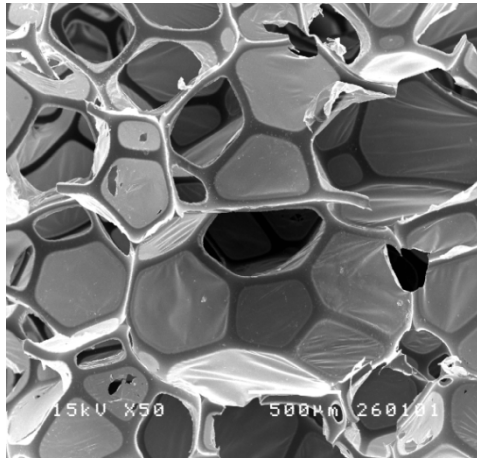
รูปที่ 5.18 การเปลี่ยนแปลงของ TPH ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม พ.ศ. 2553 ถูกครีซีในชั่วโมงที่ 12, 36, 60, 84, 108 และ 132 แสดงถึงการเติมน้ำมันในเครื่องยนต์เรือ แสดงค่าในรูปแบบ mean \pm SEM



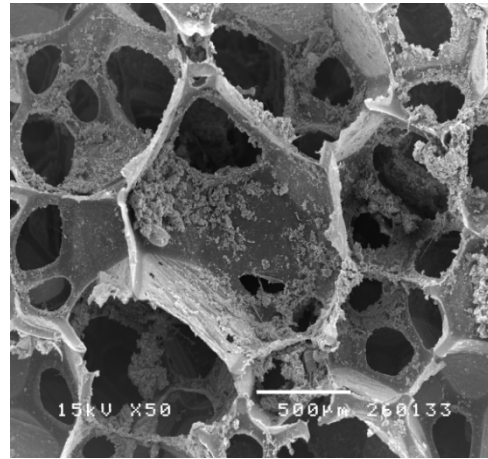
รูปที่ 5.19 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน ในน้ำขังใต้ท้องเรือซึ่งทดลองในพื้นที่จริง ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม 2553 แสดงค่าในรูปแบบ mean \pm SD

(3.2) การเกาะติดของเซลล์ด้วย SEM

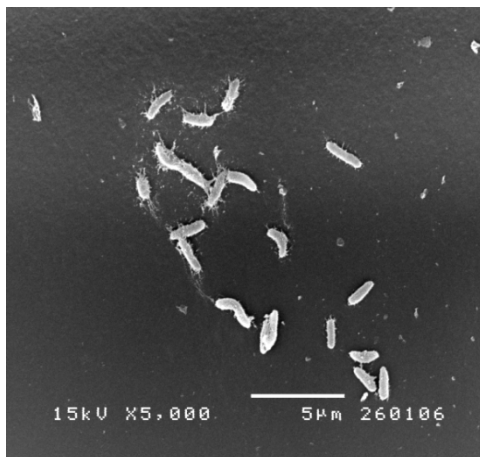
รูปจากกล้อง SEM ของ Uninoculated PUF packages ภายหลังจากการใช้งานเป็นเวลา 168 ชั่วโมง (รูปที่ 5.20 ข) แสดงให้เห็นว่ารูพรุนของ PUF มีการฉีกขาด และมีตะกอนปริมาณมาก เกาะอยู่ภายในรูพรุนของ PUF ซึ่งจำนวนเซลล์ที่เกาะอยู่บน Uninoculated PUF packages มีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามลำดับเวลาที่ 0 และ 96 ชั่วโมง (รูปที่ 5.20 ค-จ) แต่เพิ่มมากขึ้นใน ชั่วโมงที่ 168 (รูปที่ 5.20 ฉ) ซึ่งบางเซลล์มีลักษณะคล้าย *Gordonia* sp. JC11 ที่มีรูปร่างเซลล์ เป็นแท่งสั้น เป็นไปได้ว่าเชื้อ JC11 จำนวนหนึ่งหลุดจาก PUF-immobilized cells มาเกาะอยู่บน Uninoculated PUF packages ที่ผูกติดอยู่ด้วยกัน อย่างไรก็ตามในรูปที่ 5.21 ก-ค ณ ชั่วโมงที่ 0 และ 96 ชั่วโมง บน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages มีปริมาณเซลล์ที่เกาะอยู่บน โฟมพอลิยูรีเทนมากกว่า และตรงกับผลในรูปที่ 5.16 ที่พบว่าในช่วง 72 ชั่วโมงแรก มีจำนวน จุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบน PUF มากกว่าบน Uninoculated PUF packages จึงช่วยอธิบายได้ถึง การเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันที่ถูกดูดซับบน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ในช่วง 96 ชั่วโมงแรกของการใช้งาน แต่ปริมาณเซลล์ที่เกาะบนชั้นโฟมของ เซลล์ตรึงมีปริมาณลดลงในชั่วโมงที่ 168 (รูปที่ 5.21 ง) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณเซลล์บน Uninoculated PUF packages ที่แสดงในรูปที่ 5.16 จึงอธิบายถึงการลดประสิทธิภาพการบำบัด คราบน้ำมันของแบคทีเรียตรึงภายหลัง 96 ชั่วโมง



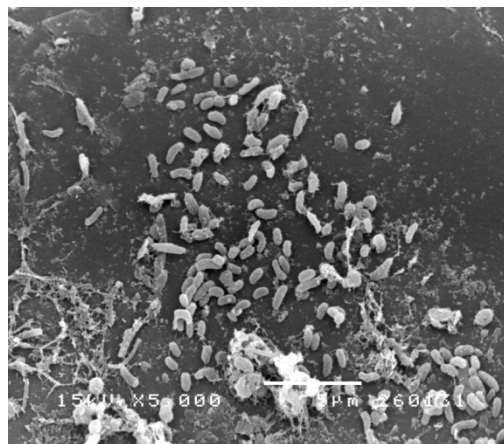
(ก)



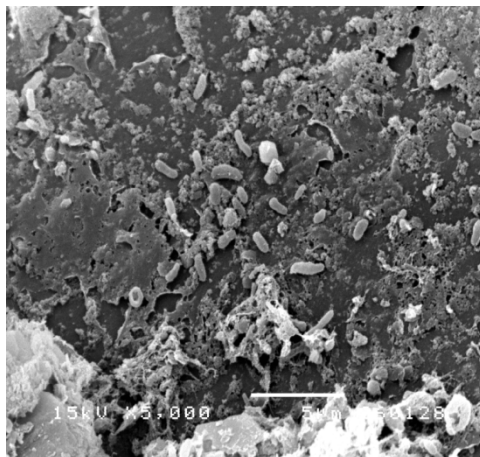
(ข)



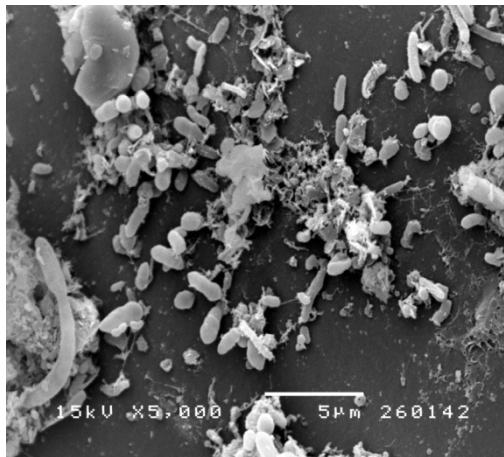
(ค)



(ง)

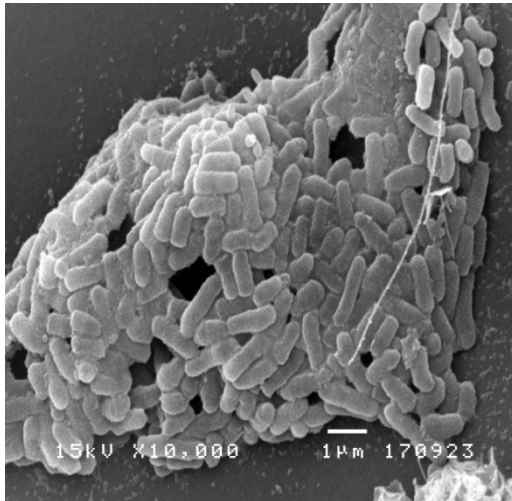


(จ)

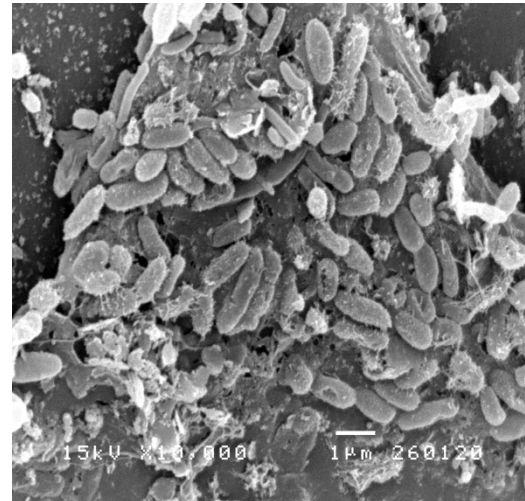


(ฉ)

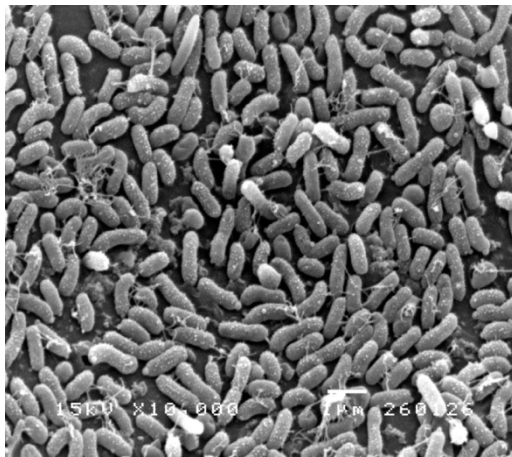
รูปที่ 5.20 รูปจากกล้อง SEM (x50) แสดงโครงสร้างของ Uninoculated PUF packages ก่อนนำไปใช้บำบัดคราบน้ำมัน (ก) และภายหลังจากนำไปใช้ในพื้นที่จริงนาน 168 ชั่วโมง (ข) และ SEM (x5,000) แสดงลักษณะการเกาะติดของจุลินทรีย์ บน Uninoculated PUF packages ที่เวลา 0 ชั่วโมง (ค) และภายหลังจากการนำไปเติมในน้ำเสียห้องเรือในพื้นที่จริงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ง,จ) และ 168 ชั่วโมง (ฉ)



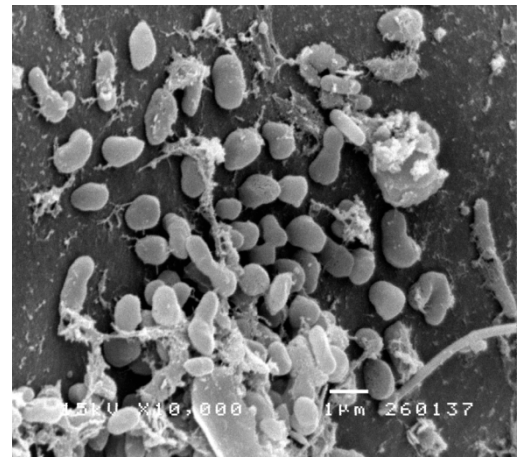
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 5.21 กล้องจุลทรรศน์ SEM (x10,000) แสดงลักษณะการเกาะติดของ *Gordonia* sp. JC11 บน PUF ที่เวลา 0 ชั่วโมง (ก) และภายหลังจากนำไปใช้บำบัดคราบน้ำมันในน้ำเสียห้องเรือในพื้นที่จริงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ข,ค) และ 168 ชั่วโมง (ง)

(3.4) คุณภาพน้ำขังใต้ท้องเรือ

ในการทดลองเติม PUF-packages ที่ประกอบด้วย PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ผูกติดกับ PUF-uninoculated packages ลงไปบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือประมง โชคเพิ่มทรัพย์ ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม พ.ศ.2553 ได้เก็บน้ำตัวอย่างมาวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ตามมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง (ตารางที่ 4.6) โดยเก็บน้ำขังใต้ท้องเรือตรงจุดที่ปล่อยทิ้งลงสู่ทะเลทั้งก่อนและหลังเติมขึ้นโฟม ดังแสดงผลในตารางที่ 5.6 พบว่าค่าบีโอดี ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และค่าน้ำมันและไขมัน มีค่าตามเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อเปรียบเทียบกับพารามิเตอร์ของน้ำขังใต้ท้องเรือทั้งก่อนและหลัง

เติม PUF-package พบว่าค่าบีโอดีเพิ่มจาก 14.8 เป็น 16.5 มก./ล. และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพิ่มจาก 0.6 เป็น 2.0 มก.ไนโตรเจน/ล. และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดเพิ่มจาก 0.04 เป็น 0.05 มก.ฟอสฟอรัส/ล. ซึ่งแสดงว่าคุณภาพน้ำซังใต้ท้องเรือมีแนวโน้มที่ดีขึ้นภายหลังการเติม PUF-package อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณบิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดของน้ำตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งก่อนและหลังเติมซินโฟม ยังคงมีค่าสูงกว่า 15 มก./ล. ตามข้อกำหนดของ MARPOL 73/78

ตารางที่ 5.6 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำซังใต้ท้องเรือ ที่เก็บจากจุดปล่อยน้ำออกนอกตัวเรือของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ก่อนและหลังเติม PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages

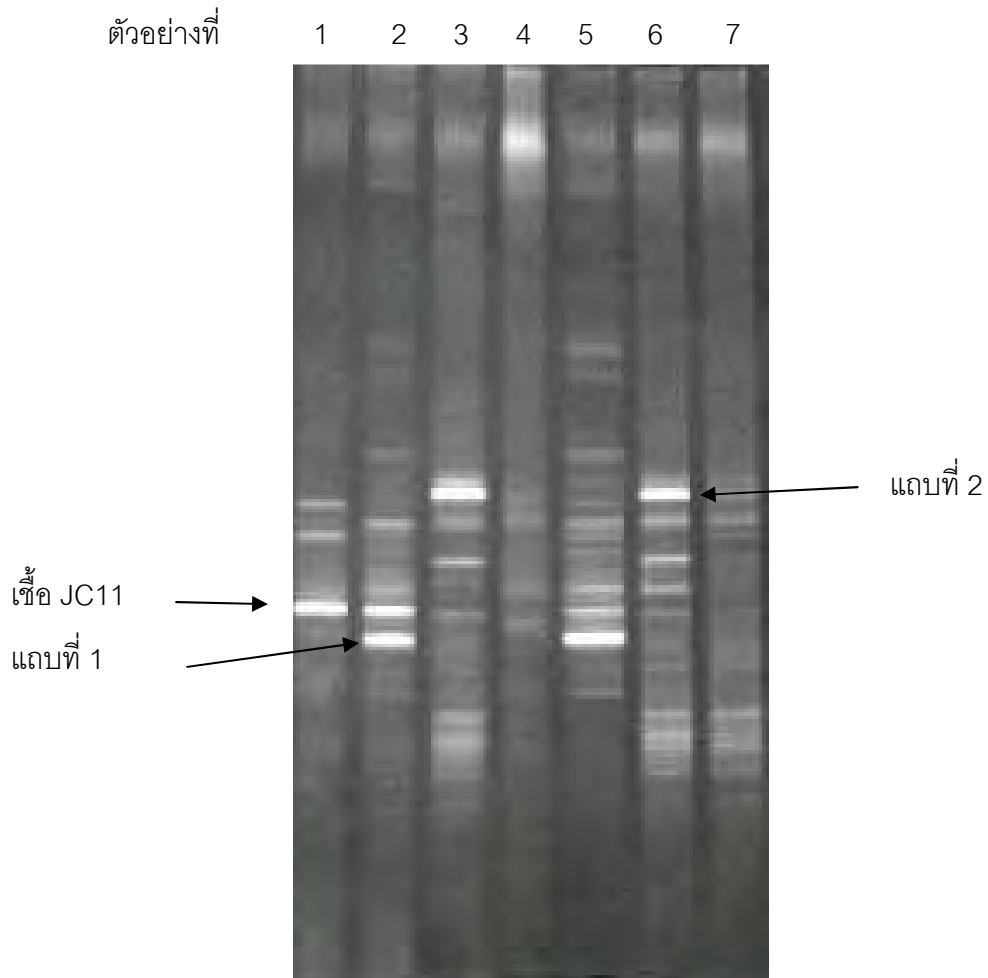
พารามิเตอร์	หน่วย	ช่วงเวลาเก็บน้ำซังใต้ท้องเรือเพื่อนำมาวิเคราะห์	
		ก่อนเติม	หลังเติม
		PUF-immobilized cells ^a	PUF-immobilized cells ^b
ค่าบีโอดี	มก./ล.	14.8	16.5
TSS	มก./ล.	18.4	20.2
ไนโตรเจนทั้งหมด	มก./ล.	0.6	2.0
ฟอสฟอรัสทั้งหมด	มก./ล.	0.04	0.05
น้ำมันและไขมัน	มก./ล.	0.6	1.2
TPH	มก./ล.	150	194

^aเวลา 18.30 น. ของวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ.2553

^bเวลา 19.30 น. วันที่ 19 ธันวาคม พ.ศ. 2553

(3.3) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียที่เกาะบน PUF package ที่เติมลงไปบนผิวน้ำน้ำขังใต้ท้องเรือเป็นเวลา 30 นาที 96 ชั่วโมง และ 168 ชั่วโมง

ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ PCR ของแต่ละตัวอย่างมีความใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 30-70% denaturant ผลการทดลองในรูปที่ 5.22 พบว่า PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages และ Uninoculated PUF packages ที่เติมลงไปในพื้นที่จริงนาน 30 นาที มีโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียคล้ายกัน ในกรณีเดียวกันภายหลังจากใช้งาน 96 ชั่วโมง PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages มีความหลากหลายของรูปแบบแถบดีเอ็นเอของ DGGE คล้ายกับ Uninoculated PUF packages ที่เวลาเดียวกัน เมื่อพิจารณาความเข้มแถบดีเอ็นเอของ *Gordonia* sp. JC11 ที่เกาะบน PUF ก่อนใช้งานเทียบกับที่เวลาเริ่มต้นใช้งาน 30 นาที พบว่าแถบดีเอ็นเอเข้มมาก แต่จางลงตามลำดับเวลาที่อยู่ในระบบนาน 96 และ 168 ชั่วโมง (ตัวอย่างที่ 3 และ 4) และพบว่าการเติม PUF packages บนผิวน้ำน้ำเสียท้องเรือเป็นเวลา 30 นาที ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรีย โดยมีแถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 1 เกิดขึ้นบนตัวอย่างที่ 2 และ 5 ตามลำดับ แต่ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 1 บนชิ้นโฟมที่อยู่ในระบบนาน 96 ชั่วโมง และการเติมตัวอย่างในพื้นที่จริงนาน 96 ชั่วโมง ทำให้มีแถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 2 เกิดขึ้นบนตัวอย่างที่ 3 และ 6 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบแถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 2 เมื่อปล่อยชิ้นโฟมไว้ในระบบนาน 168 ชั่วโมง ส่วนที่ 168 ชั่วโมง พบว่า Uninoculated PUF packages มีความหลากหลายของประชาคมแบคทีเรียสูงกว่า PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages เนื่องจากมีจำนวนและความเข้มของแถบดีเอ็นเอสูงกว่า



รูปที่ 5.22 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA โดยวิธี DGGE ของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 179 bp ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 30-70% denaturant ของ (1) *Gordonia* sp. JC11 (2) PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 ที่เติมลงไปในพื้นที่จริงนาน 30 นาที (3) แบคทีเรียที่เรียงตัวของเชื้อ JC11 ที่เติมลงไปในพื้นที่จริง 96 ชั่วโมง และ (4) 168 ชั่วโมง (5) Uninoculated PUF packages ที่เติมในพื้นที่จริงนาน 30 นาที (6) 96 ชั่วโมง และ (7) 168 ชั่วโมง

(3.4) คุณภาพน้ำขังใต้ท้องเรือ

ในการทดลองเติม PUF-packages ที่ประกอบด้วย PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ผูกติดกับ PUF-unioculated packages ลงไปบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม พ.ศ.2553 ได้เก็บน้ำตัวอย่างมาวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ตามมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง (ตารางที่ 4.6) โดยเก็บน้ำขังใต้ท้องเรือตรงจุดที่ปล่อยทิ้งลงสู่ทะเลทั้งก่อนและหลังเติมขึ้นฟิม ดังแสดงผลในตารางที่ 5.6 พบว่าค่าบีโอดี ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และค่าน้ำมันและไขมัน มีค่าตามเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อเปรียบเทียบบางพารามิเตอร์ของน้ำขังใต้ท้องเรือทั้งก่อนและหลังเติม PUF-package พบว่าค่าบีโอดีเพิ่มจาก 14.8 เป็น 16.5 มก./ล. และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพิ่มจาก 0.6 เป็น 2.0 มก.ไนโตรเจน/ล. และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดเพิ่มจาก 0.04 เป็น 0.05 มก.ฟอสฟอรัส/ล. ซึ่งแสดงว่าคุณภาพน้ำขังใต้ท้องเรือมีแนวโน้มที่ดีขึ้นภายหลังการเติม PUF-package อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณบีโอดีเฉลี่ยไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดของน้ำตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งก่อนและหลังเติมขึ้นฟิม ยังคงมีค่าสูงกว่า 15 มก./ล. ตามข้อกำหนดของ MARPOL 73/78

ตารางที่ 5.6 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำขังใต้ท้องเรือ ที่เก็บจากจุดปล่อยน้ำออกนอกตัวเรือของเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ก่อนและหลังเติม PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages

พารามิเตอร์	หน่วย	ช่วงเวลาเก็บน้ำขังใต้ท้องเรือเพื่อนำมาวิเคราะห์	
		ก่อนเติม	หลังเติม
		PUF-immobilized cells ^a	PUF-immobilized cells ^b
ค่าบีโอดี	มก./ล.	14.8	16.5
TSS	มก./ล.	18.4	20.2
ไนโตรเจนทั้งหมด	มก./ล.	0.6	2.0
ฟอสฟอรัสทั้งหมด	มก./ล.	0.04	0.05
น้ำมันและไขมัน	มก./ล.	0.6	1.2
TPH	มก./ล.	150	194

^a เวลา 18.30 น. ของวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ.2553

^b เวลา 19.30 น. วันที่ 19 ธันวาคม พ.ศ. 2553

5.5 อภิปรายผลการทดลอง

5.5.1 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF ในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์เรือประมงชนิดที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริง ในระดับห้องปฏิบัติการ

ผลการวิเคราะห์ปัจจัยทางกายภาพในน้ำขังใต้ท้องเรือ ท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จังหวัดจันทบุรี ในช่วง 24 ตุลาคม 2552 ถึง 8 พฤศจิกายน 2553 (ตารางที่ 5.1) พบว่าค่าพารามิเตอร์ต่างๆ มีค่าแปรผันเล็กน้อยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ ฤดูกาล และกิจกรรมของเจ้าของเรือ และมีค่าไม่แตกต่างจากสภาวะในห้องปฏิบัติการมากนัก ทำให้สามารถนำน้ำตัวอย่างจากพื้นที่จริงมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในห้องปฏิบัติการได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือ จากบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2553 ใช้เป็นตัวแทนของน้ำตัวอย่างช่วงต้นปี และครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 12 สิงหาคม พ.ศ. 2553 ใช้เป็นตัวแทนของน้ำตัวอย่างช่วงกลางปี ซึ่งเป็นน้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บจากเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์ ที่จะใช้เป็นพื้นที่จริงสำหรับการทดลองในขั้นสุดท้าย เมื่อเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำตัวอย่างที่นำมาทดสอบทั้ง 2 ครั้ง พบว่ามีอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความเค็ม แตกต่างกันเล็กน้อย เช่น ครั้งที่ 2 วัดอุณหภูมิ น้ำขังใต้ท้องเรือได้ 29°C ซึ่งอาจเกิดจากการถ่ายเทความร้อนจากเครื่องยนต์เรือประมงที่ผ่านการใช้งานประมาณ 12 ชั่วโมง ในขณะที่การเก็บน้ำขังใต้ท้องเรือครั้งที่ 1 วัดอุณหภูมิที่ผิวน้ำทะเลได้ 25°C ซึ่งเป็นช่วงเวลาเช้าที่เจ้าของเรือยังมีได้ออกทำประมง นอกจากนี้ พบว่าน้ำเสียท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริงทั้ง 2 ครั้ง มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากันประมาณ 1.7 มก./ล. แต่ น้ำเสียท้องเรือที่เก็บครั้งที่ 2 มีปริมาณฟอสฟอรัสสูงกว่าในครั้งที่ 1 ประมาณ 3 เท่า (1.59 และ 0.51 มก./ล. ตามลำดับ) ปริมาณสารอาหารที่มีค่าไม่เท่ากันนี้อาจเป็นผลจากครั้งที่ 2 เก็บน้ำตัวอย่างหลังจากที่เจ้าของเรือออกทำประมง ทำให้มีปริมาณสารอินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำท้องเรือสูงกว่าในการเก็บครั้งที่ 1 นอกจากนี้พบว่าปริมาณไนโตรเจนและปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดมีค่าต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ถึง 117 และ 38 เท่าตามลำดับ แต่ค่า pH และค่าความเค็มของน้ำเสียจากท้องเรือมีค่าใกล้เคียงกับอาหาร NSW (pH 7.8, ค่าความเค็ม 4.0%) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่ได้เติมสารอาหารเพิ่มลงไปใต้น้ำทะเลที่เก็บจากใต้ท้องเรือ เพราะต้องการทดสอบการเพิ่มจำนวนและการอยู่รอดของแบคทีเรียตรึง JC11 ในน้ำเสียจากท้องเรือในสภาวะที่ใกล้เคียงกับพื้นที่จริงมากที่สุด

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในการทดลองครั้งที่ 1 มีค่าสูงกว่าการทดลองในครั้งที่ 2 เล็กน้อย (รูปที่ 5.6 และ 5.8) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะน้ำตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง มีค่า

ความเค็ม ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณสารอาหารต่างกัน โดยน้ำเสียท้องเรือที่เก็บในครั้งที่ 1 มีค่าความเค็ม 4.0% อัตราส่วน N/P 3/1 (ตารางที่ 5.3) ซึ่งน่าจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Gordonia* sp. JC11 ได้มากกว่าน้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริงในครั้งที่ 2 ซึ่งมีค่าความเค็ม 2.2% อัตราส่วน N/P ประมาณ 1/1 (ตารางที่ 5.1) ซึ่งอัตราส่วน N/P ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน คือ 10/1 (Xia และคณะ, 2007) ผลจากรายงานวิจัยนี้แสดงว่าการเติมแบคทีเรียตรึง เพื่อบำบัดน้ำเสียจากท้องเรือปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นความเข้มข้นสูง (1,000 มก./ล.) มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันได้สูงกว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำขังใต้ท้องเรือ เพราะในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง พบว่าแบคทีเรียตรึงลดปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดได้ 43-50% ภายหลังจากบ่ม 4 วัน ในขณะที่จุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำเสียท้องเรือย่อย TPH ได้เพียง 5-20% (ตารางที่ 5.7) แสดงว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรียตรึงของเชื้อ JC11 บำบัดครบน้ำมันความเข้มข้นสูงในน้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริง ได้ตลอดทั้งปี

ตารางที่ 5.7 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึง *Gordonia* sp. JC11 ในการลดปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดเทียบกับการลดลงของน้ำมันตามธรรมชาติ ในระดับห้องปฏิบัติการ

Total Petroleum Hydrocarbon Removal (%)*			
21 มกราคม 2553		12 สิงหาคม 2553	
Bioaugmentation	Natural attenuation	Bioaugmentation	Natural attenuation
50.5 ± 3.2	20.6 ± 5.4	43.6 ± 2.6	5.2 ± 0.7

*ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว 1,000 มก./ล. บ่มที่ 130 รอบ นาน 4 วัน

ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับผลที่รายงานโดยผู้วิจัยอื่นๆ เช่น Mercurio และคณะ (2004) พบว่าจุลินทรีย์ในดินตะกอนป่าชายเลน (mangrove microbes) ทำให้เกิดการย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์ 4 จังหวะที่ความเข้มข้น 1,000 มก./ล. ได้ 22% ในวันที่ 7 Machin-Ramirez และคณะ (2008) พบว่าเชื้อประจำถิ่นในระบบจำลองดินปนน้ำ (slurry phase) ย่อยสลายน้ำมันได้ต่ำกว่าเชื้อย่อยปิโตรเลียมกลุ่ม MPI ที่เติมลงไปในระบบ (อัตราการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อประจำถิ่น 725.9 มก./กก./วัน, กลุ่มเชื้อ MPI 1453.7 มก./กก./วัน ในการทดลอง 15 วัน) นอกจากนี้ Olivera และคณะ (2003) ได้รายงานการย่อยสลายของเสียน้ำมันในถังหมักขนาด 80 ลิตร โดยการเติมเชื้อประจำถิ่นจากน้ำเสียท้องเรือ (เติมน้ำทะเล 47.5 ลิตร bilge waste 2.5 ลิตร หัวเชื้อ (native waste microbial inoculums) 10 มล./ลิตร) ตลอดระยะเวลาทดลองนาน 17 วัน พบว่าอะซิฟาทิกไฮโดรคาร์บอน ถูกย่อยสลายไป 229.2 ± 7.51 มก./

กรัม bilge waste (83.1%) ในขณะที่อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนถูกย่อยสลายไป 19.6 ± 0.45 มก./กรัม bilge waste (76.2%) ผลการย่อยสลายองค์ประกอบของ bilge oil สอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนของเชื้อประจำถิ่นในถังหมักจาก 2.0×10^6 ในวันที่ 0 เป็น 1.3×10^8 CFU/มล. ภายใน 24 ชม. เช่นเดียวกับในงานวิจัยนี้ที่พบว่า *Gordonia* sp. JC11 สามารถเพิ่มจำนวนบน PUF (รูปที่ 5.7) จาก 10^6 เป็น 10^9 MPN/ชุดทดลอง ภายใน 6 วัน ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อใช้น้ำมันได้มากขึ้นเนื่องจาก PUF มีค่าการดูดซับน้ำมันสูง (8.0 ± 0.5 กรัม น้ำมัน/กรัม PUF, บทที่ 4) และพบว่า PUF ดูดซับน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่มีสีดำเข้มซึ่งอยู่ในอาหารเหลว NSW ได้อย่างรวดเร็วภายหลังการเขย่าให้อากาศ 15 นาที (บทที่ 4) ในงานวิจัยนี้พบว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำขังใต้ท้องเรือส่วนใหญ่แล้วเป็นจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน เนื่องจากจำนวนจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันมีค่าใกล้เคียงกับจำนวนเชื้อทั้งหมดในน้ำขังใต้ท้องเรือ และมีปริมาณเริ่มต้นใกล้เคียงกับ *Gordonia* sp. JC11 ที่เกาะบน PUF คือประมาณ 10^7 - 10^8 MPN/ชุดทดลอง (รูปที่ 5.7 และ 5.9) แต่จุลินทรีย์ย่อยน้ำมันที่เป็นเชื้อประจำถิ่นในน้ำขังใต้ท้องเรือ กลับมีประสิทธิภาพต่ำในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1,000 มก./ล. ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นของน้ำมันที่ปนเปื้อนอยู่มิค่าสูง จึงไปยับยั้งการเจริญของเชื้อประจำถิ่นในน้ำเสียท้องเรือ สอดคล้องกับ Nievas และคณะ (2008) ที่สรุปว่าความเข้มข้นของ bilge oil ในน้ำขังใต้ท้องเรือมีผลต่ออัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมัน นอกจากนี้โครงสร้างของน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นอัลเคนสายยาว (รูปที่ 3.4) จึงยากต่อการย่อยโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำขังใต้ท้องเรือ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องเติมแบคทีเรียตรึงของเชื้อ JC11 เพื่อบำบัดคราบน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูงในน้ำขังใต้ท้องเรือ

การทดสอบระบบ bioaugmentation ในน้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริง ทั้ง 2 ครั้งพบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถอยู่รอด และเพิ่มจำนวนในน้ำท้องเรือที่ไม่เติมสารอาหารได้ (รูปที่ 5.7 และ 5.9 ก) สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลักษณะการเกาะติดของ *Gordonia* sp. JC11 บน PUF ในรูปที่ 5.10 ซึ่งพบว่ายังคงมี *Gordonia* sp. JC11 จำนวนหนึ่งเกาะอยู่บน PUF ภายหลังจากนำเซลล์ตรึงไปใช้บำบัดคราบน้ำมันเป็นเวลา 4 และ 10 วัน และพบการสร้างไบโอฟิล์ม และการฝังตัวของเซลล์ในไบโอฟิล์ม (รูปที่ 5.10 ข-ช) ซึ่งอาจส่งเสริมการอยู่รอดของ *Gordonia* ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ นอกจากนี้ PUF เป็นวัสดุตรึงที่เป็นแหล่งคุ้มกัน (protective niche) ให้กับเซลล์ ทำให้เชื้อ JC11 สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในน้ำทะเล ปัจจัยสำคัญอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดในน้ำขังใต้ท้องเรือปนเปื้อนคราบน้ำมันความเข้มข้นสูง (1,000 มก./ล.) ของเชื้อ JC11 อาจเกี่ยวข้องกับสมบัติทางสรีรวิทยาของเซลล์ คือ *Gordonia* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ จี-ซี (G-C) ในองค์ประกอบของ DNA ในปริมาณสูง มีโครงสร้างผนังเซลล์เป็นกรดมัยโคลิก (mycolic acid) และสร้างรงควัตถุ (pigment) ทำให้เชื้อ JC11 มีโคโลนีสีส้มเข้ม ที่ป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมที่

ไม่เหมาะสม (Arenskötter และคณะ, 2003, Margesin และคณะ, 2003; Quatrini และคณะ, 2008) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมันชนิดนี้ไปบำบัดคราบน้ำมันในน้ำขังใต้ท้องเรือ ในพื้นที่ชายฝั่งทะเลได้

5.5.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันของ *Gordonia* sp. JC 11 ที่ตรึงอยู่บน PUF ในน้ำขังใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็ก (*in situ* bioaugmentation)

ในสภาวะปกติเจ้าของเรือเรือประมงโชคเพิ่มทรัพย์เปิดใช้งานเครื่องยนต์ประมาณ 12 ชั่วโมง/วัน สภาวะในห้องเครื่องยนต์เรือจึงเปรียบได้กับ bioreactor ขนาดใหญ่ ระบบกึ่งต่อเนื่อง ที่มีของเสียน้ำมันปนเปื้อนมาจากการรั่วไหลขณะเติมน้ำมัน หรือการรั่วซึมจากเครื่องยนต์เรือ มีน้ำทะเลซึมเข้ามาในห้องเครื่องยนต์เรือตามรูรั่วของไม้กระดานที่เป็นส่วนท้องเรือ ซึ่งจะสูบน้ำออกทุกๆ 15 นาที แต่ในช่วงกลางคืนที่จอดเรือหรือไม่ได้ทำประมง จะไม่เปิดเครื่องยนต์ดีเซลทำให้ปริมาณน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือ และปริมาณน้ำทะเลที่ซึมเข้าห้องเครื่องยนต์เรือมีน้อยลง โดยเหตุนี้สภาวะการทดลองในพื้นที่จริงจึงขึ้นอยู่กับสภาวะทางสิ่งแวดล้อม ภูมิอากาศ และกิจกรรมของเจ้าของเรือเป็นสำคัญ ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองเติม PUF-packages บนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือ ในพื้นที่จริงทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อประเมินความเป็นไปได้ของการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ในการบำบัดคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือ งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียตรึงในระบบจริง

ในครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 23-28 กันยายน พ.ศ. 2553 ในช่วงที่ทำการทดลองเป็นช่วงที่มีฝนตก ลมแรง เจ้าของเรือไม่ได้ออกเรือเพื่อทำประมง จึงไม่ได้เติมน้ำมันดีเซล หรือน้ำมันหล่อลื่นทำให้ในน้ำขังใต้ท้องเรือมีปริมาณน้ำมันปนเปื้อนน้อยกว่าในสภาวะปกติที่ทำการประมง ทำการทดลองโดยเติม PUF-uninoculated packages ลงไปบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือในวันที่ 23 กันยายน 2553 เวลา 19.00-19.30 น. พบว่าชั้นโฟมดูดซับน้ำมันได้สูงสุดเท่ากับ 2,244 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ภายใน 36 ชม. (รูปที่ 5.11) ปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับได้สูงสุดนี้ คิดเป็น 8.97 เท่าของน้ำหนัก PUF ซึ่งใกล้เคียงค่าที่รายงานในบทที่ 4 (~8 กรัมน้ำมัน/กรัม PUF) ซึ่งปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บนโฟมนี้ เป็นน้ำมันที่ตกค้างอยู่ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ด้วยเหตุที่เป็นเรือเก่าที่มีอายุใช้งานตั้งแต่ปี 2543 จึงสังเกตพบคราบน้ำมันสีดำปริมาณมากอยู่ภายในห้องเครื่องยนต์ หลังจากนั้นปริมาณน้ำมันมีค่าลดลงเล็กน้อยและคงที่ประมาณ 1,700 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ตลอดการทดลอง โดยปริมาณน้ำมันที่ลดลงนี้อาจเป็นผลมาจากปัจจัยทางกายภาพ หรืออาจเป็นผลจากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นจากน้ำขังใต้ท้องเรือ ที่สามารถเกาะบนโฟมได้ ซึ่งผลการทดลองในรูปที่ 5.6 และ 5.8 แสดงว่ากลุ่มเชื้อนี้สามารถย่อยน้ำมันปนเปื้อนความเข้มข้น 1,000 มก./ล. ได้ประมาณ 10-20% ในการทดลองนาน 10 วัน สอดคล้องกับรายงานของ

Olivera และคณะ (2000) ที่พบว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบในของเสียจากท้องเรือ (bilge waste) สามารถย่อยอะโรมาติกและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมัน

การทดลองในพื้นที่จริงครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 1-6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2553 โดยเติม PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ซึ่งช่วงที่ศึกษาเจ้าของเรือประมงออกเรือทุกวัน จึงเติมน้ำมันทุกๆ 24 ชั่วโมง ทำให้ระบบการทดลองมีลักษณะเป็นแบบกึ่งต่อเนื่อง พบว่าชั้นโฟมที่เติมลงไปในพื้นที่จริงสามารถดูดซับน้ำมันได้อย่างรวดเร็วในช่วง 36 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นปริมาณน้ำมันมีค่าคงที่ประมาณ 5,020 มก. น้ำมัน/กรัม PUF ในชั่วโมงที่ 36-48 แสดงว่าปริมาณน้ำมันที่เติมลงในระบบบางส่วนถูกย่อยสลายทางชีวภาพโดยเชื้อ JC11 (รูปที่ 5.12) นอกจากนี้พบว่าปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับบนโฟมในชั่วโมงที่ 60, 84 และ 108 มีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว โดยปริมาณน้ำมันในชั่วโมงที่ 72 และ 96 คิดเป็น 72% ของปริมาณน้ำมันในชั่วโมงที่ 60 และ 84 ตามลำดับ และปริมาณน้ำมันในชั่วโมงที่ 120 คิดเป็น 46% ของปริมาณน้ำมันในชั่วโมงที่ 108 ซึ่งปริมาณน้ำมันที่ลดลงในทั้ง 3 ช่วงเวลานี้ น่าจะเป็นผลจากการย่อยสลายของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทน ร่วมกับปัจจัยทางสภาพแวดล้อม เช่นการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำข้างใต้ท้องเรือ และการเจือจางของน้ำมันเนื่องจากการสูบน้ำออกนอกตัวเรือ หรือการรั่วซึมของน้ำทะเลเข้ามาในห้องเครื่องยนต์เรือ แต่อย่างไรก็ตามคาดว่าผลของการลดปริมาณน้ำมันโดยการย่อยสลายของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บน PUF น่าจะมีมากกว่าปัจจัยอื่นๆ เนื่องจากผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบอัลเคน โดย GC-FID ที่แสดงการลดลงของอัลเคนในชั่วโมงที่ 72 และ 96 เปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 5.13) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วย TLC/FID (รูปที่ 5.12) โดยองค์ประกอบของน้ำมันที่วิเคราะห์จากพื้นที่ปนเปื้อน ประกอบด้วยอัลเคนสายสั้น C_{11} - C_{19} และอัลเคนสายยาว C_{21} - C_{28} ซึ่งอัลเคนสายสั้นที่มี C_{11} - C_{19} อาจจะเป็นส่วนผสมของน้ำมันดีเซลที่ใช้เติมในเรือปริมาณสูงถึง 100-200 ลิตร/วัน ดังนั้นจึงมีโอกาสสูงที่จะรั่วไหลลงสู่น้ำข้างใต้ท้องเรือ ทั้งนี้องค์ประกอบที่เป็นอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนสายสั้นในน้ำมันดีเซล มักจะถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วโดยจุลินทรีย์ (Jirasripongpun, 2002)

การทดลองในพื้นที่จริงครั้งที่ 3 ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม พ.ศ. 2553 โดยเติม PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ที่ยึดติดกับ Uninoculated PUF packages เพื่อให้สามารถยืนยันผลของการใช้แบคทีเรียตรึงของเชื้อ JC11 ในการบำบัดคราบน้ำมันในพื้นที่จริงได้อย่างถูกต้อง เพราะมีชุดควบคุมการลดลงของน้ำมันตามธรรมชาติ (natural attenuation) คู่กับชุดทดลองของแบคทีเรียตรึง (immobilized bioaugmentation) โดยระหว่างทดลองเจ้าของเรือเติมน้ำมันดีเซลโดยเฉลี่ย 150 ลิตร/วัน และเติมน้ำมันหล่อลื่นโดยเฉลี่ย 1.2 ลิตร/วัน (ตารางที่ 5.5) ผลการทดลองพบว่า Uninoculated PUF packages สามารถดูดซับน้ำมันในน้ำ

ซึ่งเร็วได้อย่างรวดเร็วจนถึงค่าสูงสุด ภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง ในทางตรงข้าม ปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับบน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ในชั่วโมงที่ 24 มีค่าต่ำกว่า คิดเป็น 42% ของปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บน Uninoculated PUF packages ณ ชั่วโมงที่ 24 (รูปที่ 5.15) แสดงว่าน้ำมันส่วนหนึ่งถูกย่อยสลายโดยเชื้อ JC11 ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานของธีรยุทธ วงษ์จิตรพิมล (2553) ที่พบว่า *Candida* sp. JC4 ที่ตรึงอยู่บนโพรพอลิยูรีเทน สามารถลดปริมาณน้ำมันทั้งหมดในน้ำขังได้ท้องเรือ จาก 781 มก.น้ำมัน/กรัม PUF ในชั่วโมงที่ 36 เหลือ 250 มก.น้ำมัน/กรัม PUF ในชั่วโมงที่ 48 และในการทดลองนี้พบด้วยว่าในชั่วโมงที่ 48-96 ปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับอยู่บน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages มีค่าต่ำกว่า ปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับบน Uninoculated PUF packages ประมาณ 30-40% แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียตรึงที่มีปริมาณหัวเชื้อย่อยน้ำมันความเข้มข้นสูง (~8 log MPN/g PUF) สามารถย่อยสลายน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังได้ท้องเรือได้ประมาณ 40% ในช่วง 96 ชั่วโมงแรก นอกจากนี้ข้อมูล จากการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำมันส่วนที่เป็นอัลเคนด้วย GC-FID (รูปที่ 5.17) พบว่า ปริมาณอัลเคนที่ถูกดูดซับอยู่บน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages มีค่าต่ำกว่า บนพื้นโพรพอลิยูรีเทนของชุดควบคุม

ข้อมูลการลดลงของน้ำมันใน PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages สอดคล้องกับผลการเพิ่มปริมาณ *Gordonia* sp. JC11 ในช่วง 96 ชั่วโมงแรก (8.87-9.50 log MPN/กรัม PUF) นอกจากนี้การวิเคราะห์การเกาะติดของเซลล์บน PUF ด้วย SEM ยังแสดงว่า PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages มีเซลล์ปริมาณมากกว่า Uninoculated PUF packages ตลอดการทดลอง (รูปที่ 5.20 และ 5.21) และในชั่วโมงที่ 168 ของการทดลอง มีเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเชื้อ JC11 จำนวนหนึ่งเกาะอยู่บน PUF-packages (รูปที่ 5.20 ฉ, รูปที่ 5.21 ง) ซึ่งสังเกตจากรูปร่างเซลล์ที่มีลักษณะเป็น short rod อย่างไรก็ตามพบว่ามีเซลล์ที่มีลักษณะ coccobacillus เพิ่มขึ้น เป็นไปได้ว่าเซลล์ที่มีรูปร่าง coccobacillus นี้ เป็นแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่เป็นเชื้อประจำถิ่นอยู่ในน้ำเสียท้องเรือ หรือเป็นเชื้อ JC11 ที่เปลี่ยนรูปร่างจาก short rod เพราะสภาวะที่ทำการทดลองในน้ำขังได้ท้องเรือ ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เนื่องจากมีน้ำมันความเข้มข้นสูง มีสารอาหารปริมาณต่ำ และมีปริมาณเกลือประมาณ 3-4% (w/v) (ตารางที่ 5.1 และ 5.2) สอดคล้องกับ Fusconi และคณะ (2007) ที่รายงานการทดสอบภาวะการขาดแคลนอาหาร (starvation) ของ *Gordonia polyisoprenivorans* CCT7137 ที่เลี้ยงในสารละลายเกลือฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ (phosphate-buffered saline solution) เป็นเวลา 56 วัน และพบว่าภายหลัง 7 วัน ขนาดโดยเฉลี่ยของเซลล์ทั้งความยาว อัตราส่วนความยาว/ความกว้าง ปริมาตร และพื้นที่ผิวเซลล์ มีค่าลดลง 50 58 40 และ 42% ตามลำดับ อัตราส่วนความยาว/ความกว้าง ที่มีค่าลดลง เป็นผลให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่างจาก rod เป็น coccobacillus ซึ่งสมบัติการอยู่รอดของ *Gordonia* ในภาวะ

สิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะต่อการเจริญนี้ เป็นข้อดีของการนำแบคทีเรียนี้ไปบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม เช่น ในน้ำขังใต้ท้องเรือปนเปื้อนคราบน้ำมันในงานวิจัยนี้

ผลจากการวิเคราะห์ DGGE ในรูปที่ 5.23 พบแถบดีเอ็นเอเข้มของ *Gordonia* sp. JC11 ในช่วงเวลาก่อน 96 ชั่วโมง แต่ต่อมากความเข้มของแถบดีเอ็นเอจางลง แสดงว่าเชื้อ JC11 เป็นประชากรเด่นบนโฝมในช่วงแรก แต่หลังจากการใช้งานพบว่าปริมาณลดลง อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอของเชื้อ JC11 ก็ยังคงอยู่ตลอดการทดลอง 168 ชั่วโมง นอกจากนี้พบแถบดีเอ็นเอเด่นอื่นๆ เพิ่มขึ้นมาในชั่วโมงที่ 96 จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารมัธยันตร์จากการย่อยน้ำมันโดยเชื้อ JC11 ไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นชนิดอื่นๆ ในน้ำขังใต้ท้องเรือ แล้วทำให้เกิดการแก่งแย่งกับ *Gordonia* sp. JC11 เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Gertler และคณะ (2009) ที่เติมวัสดุดูดซับน้ำมัน X-oil[®] ซึ่งมีแบคทีเรียย่อยน้ำมัน *Alcanivorax borkumensis* เกาะติดอยู่ในระบบจำลองน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมันเตาขนาด 500 ลิตร เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนวัสดุดูดซับน้ำมัน ก็พบเช่นเดียวกันว่ามีแถบดีเอ็นเอของ *Alcanivorax borkumensis* อยู่บนวัสดุดูดซับน้ำมัน X-oil[®] ตลอดระยะเวลาการทดลองนาน 56 วัน โดยความเข้มของแถบดีเอ็นเอจางลงตามระยะเวลา และพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย โดยมีแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรียย่อยอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนปรากฏขึ้น นอกจากนี้สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นและน้ำมันที่สะสมบนโฝมมากขึ้น อาจก่อความเป็นพิษสะสมจึงมีผลให้ลดจำนวนของเชื้อ JC11 ภายหลังจากชั่วโมงที่ 96

จากการทดลองเติมแบคทีเรียตรึงในพื้นที่จริงทั้ง 2 ครั้ง พบว่าแบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพดีในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากเติมลงในน้ำขังใต้ท้องเรือ ดังนั้นเพื่อให้สามารถบำบัดน้ำมันได้อย่างต่อเนื่อง ควรเปลี่ยนแบคทีเรียตรึงใหม่ทุก ๆ 96 ชั่วโมง

บทที่ 6

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 ข้อสรุป

ในระบบนิเวศทะเลมักปนเปื้อนด้วยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด ซึ่งมีที่มาจากแหล่งต่างๆ ทั้งนี้ น้ำมันหล่อลื่นจากเครื่องยนต์เรือประมงมักรั่วไหลลงสู่น้ำข้างใต้ท้องเรือ แล้วถูกปล่อยลงสู่ท้องทะเลโดยไม่ผ่านการบำบัด จึงเป็นแหล่งกำเนิดสำคัญของมลพิษน้ำมันในน้ำทะเลชายฝั่งของประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีทางชีวภาพสำหรับบำบัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล ซึ่งประกอบด้วย การคัดแยกเชื้อ *Gordonia* sp. JC11 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นหลายชนิด การผลิตหัวเชื้อพร้อมใช้โดยตรงเซลล์ของเชื้อ JC11 บนโฟมพอลิยูรีเทน (PUF) และการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ในการย่อยสลายของน้ำมันจากเครื่องยนต์เรือประมงที่เป็นส่วนผสมของของเสียไขมัน (oily waste) หลายชนิด ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในพื้นที่จริง ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ดังนี้

6.1.1 การคัดแยกและศึกษาจุลินทรีย์จากระบบนิเวศทะเลที่สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง

ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันดิบจำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย ยีสต์ 2 สายพันธุ์ แบคทีเรียแกรมบวก 4 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแกรมลบ 4 สายพันธุ์ จากระบบนิเวศทะเลในเขตชายฝั่งตะวันออกที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง การเจริญโดยใช้พีแนทรีนและเททระเดกเคนเป็นแหล่งคาร์บอน สมบัติความไม่ชอบน้ำของเยื่อหุ้มเซลล์ และความสามารถในการสร้าง EPS สารก่ออิมัลชันชีวภาพ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่นำสมบัติทางสรีรวิทยาของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน และการเกาะติดของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันบนวัสดุตั้งรูป มาประกอบการคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียสำหรับการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้เพื่อใช้ในการบำบัดทางชีวภาพ ผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันหล่อลื่น และมีสมบัติของเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่ง *Gordonia* sp. JC11 สามารถเจริญเพิ่มจำนวนโดยใช้เททระเดกเคน หรือพีแนทรีน เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ดี สามารถย่อยสลายทั้งไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติกที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมัน และมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมงทั้งชนิดที่ยังไม่ใช้งานและชนิดที่ใช้งานแล้ว โดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีเยื่อหุ้มเซลล์ที่มี

ค่าความไม่ชอบน้ำที่มีค่าสูง และสามารถผลิตสารก่ออิมัลชันชีวภาพได้ปริมาณมาก ซึ่งคาดว่าน่าจะมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยเชื้อดังกล่าว ดังนั้นจึงคัดเลือก *Gordonia* sp. JC11 สำหรับไปผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ เพื่อใช้ขจัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมงบริเวณท่าเรือ ซึ่งในที่สุดจะช่วยลดปัญหามลพิษน้ำมันที่เกิดขึ้นอย่างเรื้อรังในเขตชายฝั่งทะเลของประเทศไทยได้

6.1.2 การพัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ สำหรับย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เรือประมง โดยได้เปรียบเทียบการตรึงเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 *Microbacterium* sp. JC9 และ *Brucella* sp. JC12 บนโฟมพอลิยูรีเทน ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น และมีสมบัติทางสรีรวิทยาของเซลล์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุตรึง (บทที่ 3) นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อประจำถิ่นที่คัดแยกมาจากน้ำทะเลบริเวณท่าเรือประมงสิงห์อำนาจ จ.จันทบุรี ซึ่งจะใช้เป็นพื้นที่สำหรับทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานของหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ จึงถือเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพตามแบบ Autochthonous Bioaugmentation โดยการนำจุลินทรีย์ประจำถิ่นกลับไปใช้บำบัดคราบน้ำมันในพื้นที่เดิม ซึ่งผลการทดลองพบว่า *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงอยู่บนโฟมพอลิยูรีเทนมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงชนิดอื่น โดยสามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นสำหรับเรือประมงชนิดใช้แล้วที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200-1,000 มก./ล. ได้ 42-56% นอกจากนี้วิธีผลิตหัวเชื้อพร้อมใช้ที่พัฒนาขึ้น โดยทำการตรึงเซลล์บนโฟมพอลิยูรีเทนในอาหาร NSW ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเข้มข้น 100 มก./ล. เป็นเวลา 3 วัน ทำให้มีปริมาณเซลล์เกาะบนโฟมสูงประมาณ 10^8 MPN/g PUF และหัวเชื้อนี้สามารถคงจำนวนเซลล์รอดชีวิต และคงประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน ภายหลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อนำหัวเชื้อพร้อมใช้ไปทดสอบในน้ำทะเลที่เก็บจากชายฝั่ง จังหวัดจันทบุรี พบว่าเซลล์ตรึงสามารถเพิ่มจำนวนในน้ำทะเลที่มีปริมาณสารอาหารต่ำกว่าอาหาร NSW และมีประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันสูงกว่าเชื้อประจำถิ่นในน้ำทะเล ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำแบคทีเรียตรึงชนิดนี้ ไปบำบัดคราบน้ำมันในทะเลบริเวณชายฝั่งต่อไป

6.1.3 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือโดย *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโพรพอลิยูรีเทน: ในระดับห้องปฏิบัติการและในพื้นที่จริง

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโพรพอลิยูรีเทน ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วจากเครื่องยนต์เรือประมงในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ น้ำขังใต้ท้องเรือที่เก็บจากพื้นที่จริงในฤดูกาลที่ต่างกัน 2 ครั้ง พบว่าเซลล์ตรึงของเชื้อ JC11 ที่เติมลงไปในช่วงทดลอง (bioaugmentation) สามารถย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดของน้ำมันหล่อลื่นที่ความเข้มข้น 1,000 มก./ล. ได้สูงกว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำขังใต้ท้องเรือ (natural attenuation) ทั้ง 2 ครั้ง สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็กในพื้นที่จริง (*in situ* bioaugmentation) พบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้มีประสิทธิภาพสูงกว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในการบำบัดคราบน้ำมันในน้ำขังใต้ท้องเรือ ในช่วง 96 ชั่วโมงแรก จากการทดสอบนาน 168 ชั่วโมง ทั้งนี้พิจารณาจากการลดลงของปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดจากการวิเคราะห์ด้วย TLC/FID และการลดลงของอัลเคนจากการวิเคราะห์ GC/FID ซึ่งข้อมูลนี้สอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนของเชื้อย่อยน้ำมันบน PUF นอกจากนี้การวิเคราะห์ SEM แสดงให้เห็นว่า *Gordonia* sp. JC11 ที่มีรูปร่างเซลล์แบบ short rod เป็นประชากรเด่นบน PUF ในช่วงเวลาที่ 0.5 - 96 ชั่วโมง ขณะเดียวกันการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมของจุลินทรีย์ที่เกาะติดบน PUF ด้วย DGGE ก็แสดงว่าเชื้อ JC11 เป็นประชากรเด่นบนโพรพอลิยูรีเทนในช่วงแรก แต่หลังจากการใช้งานพบว่าปริมาณลดลง โดยแถบดีเอ็นเอที่สอดคล้องกับ JC11 มีความเข้มลดลงตามเวลาที่ใช้งาน และตรวจพบแถบดีเอ็นเอเด่นของเชื้ออื่นเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งเป็นไปได้ว่า *Gordonia* sp. JC11 ย่อยคราบน้ำมันปนเปื้อนในน้ำขังใต้ท้องเรือไปเป็นสารมัธยันตร์ที่มีผลกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำขังใต้ท้องเรือ แล้วทำให้เกิดการแก่งแย่งกับ *Gordonia* sp. JC11 นอกจากนี้สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอาจมีความเป็นพิษสูงขึ้น จึงมีผลลดจำนวนของเชื้อ JC11 ภายหลังจาก 96 ชั่วโมง ดังนั้นเพื่อให้สามารถลดปริมาณคราบน้ำมันในน้ำขังใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็กได้อย่างต่อเนื่อง จึงควรเปลี่ยนหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ใหม่ทุกๆ 96 ชั่วโมง รายงานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่น่าหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ ไปทดสอบการย่อยสลายคราบน้ำมันในน้ำขังใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็ก จึงไม่สามารถควบคุมปัจจัยจำกัดทั้งทางกายภาพและชีวภาพได้เหมือนกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ทั้งหมดมีความสอดคล้องกัน และแสดงว่าเซลล์ตรึงของ *Gordonia* sp. JC11 สามารถย่อยน้ำมันปนเปื้อนในพื้นที่จริงได้ ทั้งนี้สามารถนำหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้และความรู้ที่ได้รับ ไปปรับใช้สำหรับการบำบัดเชิงชีวภาพของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลเขตอื่นๆ ที่มีสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกัน

6.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจาก *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบนโพลีเอทิลีนสามารถบำบัดคราบน้ำมันในพื้นที่จริงได้อย่างมีประสิทธิภาพในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น จึงต้องเก็บชิ้นโพลีเอทิลีนมาจากใต้ท้องเรือภายหลังใช้งาน ซึ่งอาจจะนำไปกำจัดต่อโดยการเผา (Oh และคณะ, 2000) ดังนั้นเพื่อเพิ่มความสะดวกในการใช้งานหัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ จึงควรทดลองนำวัสดุจากธรรมชาติ เช่น กาบมะพร้าว โยบวบ เปลือกผลไม้ และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดอื่นๆ ที่มีสมบัติลอยน้ำได้ มาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ของ *Gordonia* sp. JC11 โดยอาจต้องมีการปรับโครงสร้างพื้นผิวของวัสดุธรรมชาติเหล่านี้ให้มีสมบัติความไม่ชอบน้ำเพิ่มมากขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเกาะติดของเซลล์

เนื่องจากมีรายงานที่อธิบายว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่าค่า CMC จะทำให้เกิดโครงสร้างเป็นไมเซลล์ (micelle) และหยดน้ำมันจะเข้าไปแทรกอยู่ในส่วนกลางของไมเซลล์ ซึ่งช่วยเพิ่มโอกาสที่จุลินทรีย์จะนำหยดน้ำมันเข้าไปใช้ภายในเซลล์ (Rosenberg และ Ron, 1999) ดังนั้นในการบำบัดคราบน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง เช่น ในน้ำขังใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็ก จึงควรเติมเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปด้วย ซึ่งอาจช่วยเพิ่มระยะเวลาการใช้งานในพื้นที่บำบัดของเซลล์ตรึงของเชื้อ JC11 ให้นานขึ้น อย่างไรก็ตามเชื้อที่เติมลงไปจะต้องสามารถปรับตัวให้สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในพื้นที่บำบัด (Moran และคณะ, 2000)

ตามข้อบังคับของอนุสัญญา MARPOL 73/78 กำหนดให้เรือขนาดใหญ่ที่มีขนาดสูงกว่า 400 ตันกรอส จะต้องติดตั้งเครื่องแยกน้ำมันไว้ เพื่อใช้แยก bilge oil ออกจากน้ำทะเล ก่อนที่จะปล่อยน้ำขังใต้ท้องเรือที่มีปริมาณน้ำมันปนเปื้อนไม่เกิน 15 มก./ล. ลงสู่ทะเล ส่วนของเสียน้ำมันที่เก็บไว้จะต้องถูกขนส่งเพื่อนำไปบำบัดบนชายฝั่ง ดังนั้นจึงควรนำหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ที่ได้พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ ไปพัฒนาเป็นระบบบำบัด bilge oil เพื่อใช้ในเรือ โดยอาจทดลองเปลี่ยนชนิดของวัสดุตรึงให้เหมาะสมกับการใช้งานในระบบ เพิ่มชนิดของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันอื่นๆ ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้ ทดลองเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หรือศึกษาสภาวะการทำงานของระบบที่เหมาะสม

นอกจากนี้ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพของ *Gordonia* sp. JC11 ที่ตรึงบน PUF ในการย่อยน้ำมัน หรือ ของเสียน้ำมันชนิดอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล เพิ่มเติมจากชนิดน้ำมันที่ได้

ทดสอบไปแล้วในงานวิจัยนี้ เช่น น้ำมันเตา น้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์เรือ น้ำมันไฮดรอลิก น้ำมันเกียร์ กากน้ำมัน ฯลฯ โดยใช้ระบบจำลองเสมือนจริงเป็นน้ำทะเลที่ไม่เติมสารอาหาร ดังเช่นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เพื่อช่วยเพิ่มความสะดวกในการนำไปใช้ในพื้นที่จริง ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับการนำหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ที่ได้พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ ไปใช้ในการบำบัดเชิงชีวภาพของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กองบก. ฐานเศรษฐกิจ. เมษายน 2553. “เงินกู้” ล้นกำจัดของเสียจากเรือ. หนังสือพิมพ์ฐานเศรษฐกิจ ฉบับที่ 2.
- การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย [กฟผ.]. ฝ่ายจัดการเชื้อเพลิง, 2554. กระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www2.egat.co.th/fuel/index.php?>[2554, กุมภาพันธ์ 18]
- กัลยา วัฒนากร และ สมภพ รุ่งสุภา. 2552. โครงการ”การปนเปื้อนและผลกระทบของน้ำมันและมลสารอินทรีย์ต่อสภาวะแวดล้อมบริเวณเกาะสีชัง” [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://sichang.freevar.com/sproject_1.htm[2554, กุมภาพันธ์ 14]
- กุลวดี ทองภูเบศร์. 2541. การคัดเลือกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติย่อยน้ำมันดิบในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2554. น้ำมันปตท.เออาร์รั่วลงทะเลระยอง แหล่งหอยแมลงภู [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://newsclip.pcd.go.th/archive.asp>[2554, กุมภาพันธ์ 14]
- ควบคุมมลพิษ, กรม. ฝ่ายมลพิษทางทะเล. 2552. ก้อนน้ำมัน [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://marinepollutionthailand.main-page.com>[2552, มกราคม 9]
- ควบคุมมลพิษ, กรม. ศูนย์ข้อมูลอุบัติการณ์ร้ายและเคมีภัณฑ์. 2553. สถิติอุบัติภัย [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.chemtrack.org/Stat-Accident-Detail.asp?ID=20> [2554, กุมภาพันธ์ 10]
- ควบคุมมลพิษ, กรม. ส่วนแหล่งน้ำทะเล. 2547. คณะทำงานอาเซียนด้านสิ่งแวดล้อมทางทะเล [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.marinepcd.org/cooperation/awgcme.html>[2554, กุมภาพันธ์ 20]
- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2549. ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่องกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากท่าเทียบเรือประมง สะพานปลา และกิจการแพปลา [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.pcd.go.th/download/regulation.cfm?task=s3>[2554, กุมภาพันธ์ 14]

- ควบคุมมลพิษ, กรม. ส่วนแหล่งน้ำทะเล. 2551. ทำเทียบเรือประมง สะพานปลา และแพปลา กับ
แนวทางการจัดการ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.pcd.go.th>[2551, กุมภาพันธ์ 22]
- ควบคุมมลพิษ, กรม. สำนักจัดการคุณภาพน้ำ. 2552. คุณภาพน้ำทะเลชายฝั่ง [ออนไลน์].
 แหล่งที่มา: <http://www.mkh.in.th/index.php/component/content/.../268--2545-2552>[2554, มีนาคม 2]
- ควบคุมมลพิษ, กรม. สำนักจัดการคุณภาพน้ำ. 2553. มาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล [ออนไลน์].
 แหล่งที่มา: http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water02.html[2554, เมษายน 2]
- จวน ผาหนองสิง. 12 สิงหาคม 2553. สัมภาษณ์.
- จันทร์เพ็ญ ขำแก้ว. 2540. สถานภาพและปัญหาน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วในประเทศไทยและการ
ประเมินเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการบำบัด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต.
 สาขาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ. 2546. สถานการณ์ขนส่งทางทะเลใน
ปัจจุบัน [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
http://marinepolicy.trf.or.th/transportation_02.html[2554, กุมภาพันธ์ 14]
- เจ้าท่า, กรม. 2551. สถิติน้ำมันรั่วไหล ปี 2550 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.md.go.th/safety_environment/04_3_pdf/oil_spil2550.pdf[2554, กุมภาพันธ์ 13]
- เจ้าท่า, กรม. 2553. จำนวนเรือทั้งหมด แยกตามประเภทการใช้และขนาดตันกรอส [ออนไลน์].
 แหล่งที่มา: <http://www.md.go.th>[2553, พฤศจิกายน 20]
- เจ้าท่า, กรม. 2554. การบริการจัดเก็บและบำบัดของเสียจากเรือ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
http://www.md.go.th/safety_environment/notice.php[2554, กุมภาพันธ์ 16]
- ทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, กรม. 2554. ความร่วมมือกับต่างประเทศ: IMO [ออนไลน์].
 แหล่งที่มา: <http://www.dmcr.go.th>[2554, มกราคม 20]
- ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กระทรวง. ควบคุมมลพิษ, กรม. 2554. เกร็ดความรู้มลพิษ
ทางทะเล [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
http://www.pcd.go.th/info_serv/water_marine.html[2554, กุมภาพันธ์ 20]
- ธีรยุทธ วงษ์จิตรพิมล. 2553. การบำบัดทางชีวภาพของน้ำอับเฉาเรือที่ปนเปื้อนน้ำมันโดย
Candida sp. JC4 ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขา
 จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิทัศน์ เพราแก้ว. 2541. คุณสมบัติการกำจัดคราบน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้ใน
ประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาเภสัชชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์
 มหาวิทยาลัยมหิดล.

- นิรันดร์ วิชัยสกุล. 2544. การศึกษาปุ๋ยละลายน้ำมันในการกำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล ด้วย กระบวนการทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยี สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- นิอร ภูวรัตน์. 2545. ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบและการพัฒนาของไบโอฟิล์ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาชีววิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- บริษัทโกลบอล ยูทิลิตี้ เซอร์วิส. 2554. โครงการนำร่องการรวบรวมน้ำเสียจากเรือ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.gusco.co.th>[2554, มกราคม 22]
- บริษัทพลูตาหลวงรีไซเคิล จำกัด, 2554. PRODUCTS [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.plutalaungrecycle.com/product_detail.asp?nid=79[2554, กุมภาพันธ์ 2]
- ศรัณย์ เพ็ชรพิรุณ. 2531. ปริมาณสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเล ตะวันออก (พทยา-ตราด). ในกรมประมง, รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2531 กรมประมง, หน้า 416. กรุงเทพฯ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://pikul.lib.ku.ac.th/cgi-bin/agdb1.exe?>[2554, กุมภาพันธ์ 14]
- ศศิวิมล ชัยณรงค์. 2551. สารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนรวมในน้ำทะเล ตะกอนดิน แพลงก์ตอน และหอยนางรม บริเวณชายฝั่งอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สำนักข่าวไทย. 2551. เรือข้ามฟากที่เกาะสมุย ลักลอบปล่อยน้ำมันลงทะเล [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.chemtrack.org/News-Detail.asp?TID=7&ID=275>[2554, เมษายน 2]
- สิริพร แก่นสียา. เมษายน-มิถุนายน 2546. แนวทางการจัดเก็บน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว. วารสารสิ่งแวดล้อม, 7, 26.
- สุริยา มากจันทร์ และ กัลยา วัฒนากร. 2554. ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในบริเวณปากแม่น้ำสายหลักอ่าวไทยตอนในช่วงเดือนก.ค.-พ.ย. 2553. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 19 ประจำปี 2554 "Science-Energy of Creativity" 10th-11th March 2011, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ. กันยายน 2553. เรือโชคถาวร 6 ล่มกลางทะเลอันดามัน [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.thairath.co.th/content/region/109530>[2554, มกราคม 5]
- อภิรดี สุวรรณวงศ์. 2547. การเหนี่ยวนำมิวเตชันในแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมัน *Pseudomonas aeruginosa* 01. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาชีววิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

อุตสาหกรรม, กระทรวง. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2548. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 2244-2548 ผลิตภัณฑ์ขจัดคราบน้ำมัน [ออนไลน์].
แหล่งที่มา: http://natres.psu.ac.th/tender_bids/tis/fulltext/TIS2224-2548.pdf[2554, กุมภาพันธ์ 22]

ภาษาอังกฤษ

- Abioye, O.P., Abudul Aziz, A., and Agamuthu, P. 2009. Stimulated biodegradation of used lubricating oil in soil using organic wastes. Malaysian Journal of Sciences. 28: 127-133.
- Adelowo, O.O., Alagbe, S.O., and Ayandele, A.A. 2006. Time-dependent stability of used engine oil degradation by cultures of *Pseudomonas fragi* and *Achromobacter aerogenes*. African Journal of Biotechnology. 5: 2476-2479.
- Adesodun J.K., and Mbagwu, J.S.C. 2008. Biodegradation of waste-lubricating petroleum oil in a tropical alfisol as mediated by animal droppings. Bioresource Technology. 99: 5659-5665.
- Aichele, R.O. 2008. Biotechnology provides solutions to a wide range of marine pollutants. Journal of the Maritime Industry [Online]. Available from: <http://www.professionalmariner.com>[2011, January 26]
- Al-Awadhi, H., Sulaiman, R.H.D., Mahmoud, H.M., and Radwan, S.S. 2007. Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon-utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf. Environmental Biotechnology. 77: 183-186.
- Al-Thukair, A.A., Abed, R.M.M., and Mohamed, L. 2007. Microbial community of cyanobacteria mats in the intertidal zone of oil-polluted coast of Saudi Arabia. Marine Pollution Bulletin. 54: 173-179.
- Aluyor, E.O., and Ori-jesu, M. 2009. Biodegradation of mineral oils – A review. African Journal of Biotechnology. 8: 915-920.
- American Standard Test Method [ASTM F726-81]. 1986. Standard method of testing sorbent performance of absorbents. Pp. 1262-1267.
- Andreoni, V., and Gianfreda, L. 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. Applied Microbiology Biotechnology. 76: 287-308.

- Arenskotter, M., Broker, D., and Steinbuchel, A. 2004. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. Applied and Environmental Microbiology. 70: 3195–3204.
- Ausubel, F.M., et al. 1990. Current protocol in molecular biology. John Wiley and Sons, New York.
- Atlas, A.M., and Bartha, R. 1998. Fundamentals and Application. In: Microbial Ecology. 4th edition. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California, USA. pp. 523-530.
- Baker, R.J., Best, E.W., and Baehr, A. L. 2002. Used motor oil as a available from of Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE) and gasoloine hydrocarbons in ground water. Ground Water Monitoring and Remediation, 22: 46-51.
- Behr, T., et al. Unpublished. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. Submitted (22-NOV-2000) Ludwig W., TU Muenchen, Lehrstuhl fuer Mikrobiologie, Am Hochanger 4, GERMANY.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., and Frankenberger, W.T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technology. 96: 1049-1055.
- Bouchez-Naitali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y., and Vandecasteele, J.P. 1999. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. Journal of Applied Microbiology. 86: 421-428.
- Brakstad, O.G., and Bonaunet, K. 2006. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0-5°C) and bacterial communities associated with degradation. Biodegradation. 17: 3342-3348.
- Brito, E.M.S., Guyoneaud, R., Goni-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., and Crapez, M.A.C. 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. Research in Microbiology. 157: 752–762.
- Brooijmans, R.J.W., Pastink, M.I., and Siezen, R.J. 2009. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. Microbial Biotechnology. 2: 587-594.

- Cameotra, S.S., and Singh, P. 2008. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. International Biodeterioration & Biodegradation. 62: 247-280.
- Cassidy, M.B., Lee, H., and Trevors, JT. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. Journal of Industrial Microbiology. 16: 79-101.
- Chaerun, S.K., Tazaki, K., Asada, R., and Kogure, K. 2004. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. Environmental International. 30: 911-922.
- Chaillana, F., Flècheba, A., Burya, E., Phantavonga, Y-hui., Saliot, A., and Oudol, J. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Research in Microbiology. 155: 587-595.
- Chandru, K., et al. 2008. Characterization of alkanes, hopanes, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tar-balls collected from the East Coast of Peninsular Malaysia. Marine Pollution Bulletin. 56: 950–962.
- Chang, C.-F., and Lui, S.-M. Unpublished. Molecular identification and characterization of yeasts isolated from sea surface microlayer and underlying water at Keelung on the north-east coast of Taiwan. Submitted (11-Dec-2008) National Taiwan Ocean University, Institute of Marine Biology, 2 Pei-Ning Rd., Keelung, Taiwan.
- Chang, W.-N., Liu, C.-W., and Liu, H.-S. 2009. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*. Process Biochemistry. 44: 955-962.
- Coastal Service. 2002. Bilge socks [Online]. Available from: <http://www.stkc.go.th/redirect.php?id=2866&g=stportal>[2011, January 26]
- Cohen, Y. 2001. Biofiltration-the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. Bioresource Technology. 77: 257-274.
- Cram, S., Poncedeleo, C.A., Fernandez, P., Sommer, I., Rivas, H., and Morales, L.M. 2006. Assesment of trace elements and organic pollutants from a marine oil complex into the coral reef system of Caya Arcas, Mexico. Environmental Monitoring and Assessment. 121: 127-149.

- Cui, Z., et al. 2010. Synergic effect of marine obligate hydrocarbonoclastic bacteria in oil biodegradation. Wei Sheng Wu Xue Ba. 4: 350-359.
- Cunningham, C.J., Ivshina, I.B., Lozinsky, V.I., Kuyukina, M.S., and Philp, J.C. 2004. Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol. International Biodeterioration & Biodegradation. 54: 167 – 174.
- Das, N., and Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnology Research International. Volume 2011, Article ID 941810, 13 pages.
- de Loren, Z. 2006. Blueprint of an oil-degrading bacterium. Nature Biotechnology. 24: 952-953.
- Deng, Y., Zhang, Y., Hesham, A.E., Liu, R., and Yang, M. 2010. Cell surface properties of five polycyclic aromatic compound-degrading yeast strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 86: 1933–1939.
- de Ory, I., Romero, L.E., and Cantero, D. 2004. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*. Process Biochemistry. 39: 547–555.
- Diaz, M.P., Boyd, K.G., Grigson, S.J.W., and Burgess, J.G. 2002. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. Biotechnology and Bioengineering. 79: 145-153.
- Diep, C.N., Cam, P.M., Vung, N.H., Lai, T.T., and My, N.T.X. 2009. Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment. Bioresource Technology. 16: 3787-3791.
- EmTec Management Ltd., 2009. Bioremediation of soil and water[Online]. Available from: http://www.emtec.co.th/product_literatures/EmTec-HC.pdf[2009, February, 22]
- Enkiri, E., Hulen, C., and Legault-Demare, J. 1995. Hydrophobic adsorption of aromatic compounds on polyurethane foam as carbon available from for *Pseudomonas* growth. Applied Microbiology & Biotechnology. 44: 539-545.

- Ferraro, G., et al. 2007. Towards an operational use of space imagery for oil pollution monitoring in the Mediterranean basin: a demonstration in the Adriatic Sea. Marine Pollution Bulletin. 54: 403–422.
- Franzetti, A., et al. 2009. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. Chemosphere. 75: 801–807.
- Fusconi, R., Godinh, M.J.L., Hernandez, I.L.C., and Bossolan, N.R.S. 2006. *Gordonia polyisoprevorans* from groundwater contaminated with landfill leachate in a subtropical area: characterization of the isolate and exopolysaccharide production. Brazilian Journal of Microbiology. 37: 168-174.
- Fusconi, R., Godinho, M.J.L., and Bossolan, N.R.S. 2007. Starvation survival of *Gordonia polyisoprenivorans* CCT7137, isolated from contaminated groundwater in Brazil. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23:1385–1391.
- Fusconi, R., Assuncao, R.M.N., Guimaraes, R.M., Filho, G.R., and Machdo, A.E.H. 2010. Exopolysaccharide produced by *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 in GYM commercial medium and sugarcane molasses alternative medium: FT-IR study and emulsifying activity. Carbohydrate Polymers. 79: 403–408.
- Gentili, A.R., Cubitto, M.R., Ferrero, M., and Rodriguez, M.S. 2006. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. International Biodeterioration & Biodegradation. 57: 222–228.
- Gentry, T.J., Rensing, C., and Pepper, I.L. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 34: 447-494.
- Gertler, C., Gerdtts, G., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N. 2009. Microbial consortia in mesocosm bioremediation trial using oil sorbents, slow-release fertilizer and bioaugmentation. Federation of European Microbiological Societies. 69: 288-300.
- GESAMP. 1993. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. In GESAMP Reports and Studies No. 50. IMO, London, UK. 180 pp.
- GESAMP. 2007. Estimates of oil entering the marine environment from sea-based activities. In GESAMP Reports and Studies No. 75. IMO, London, UK. 96 pp.

- Ghidossi, R., Veyret, D., Scotto, J.L., Jalabert, T., and Moulin, P. 2009. Ferry oily wastewater treatment. Separation and Purification Technology. 64: 296–303.
- Hafenburg, D., Hommel, R., Claus, R., and Kleber, H.P. 1986. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. Advance Biochemical Engineering Biotechnology. 33: 53-93.
- Haines, JR., Wrenn, BA., Holder, EL., Strohmeier, KL., Herrington, RT., and Venosa, AD. 1996. Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populations by a 96-well plate most-probable-number procedure. Journal of Industrial Microbiology. 16: 36-41.
- Hampton, S., Kelly, P. R., and Carter, H. R. 2003. Tank vessel operations, seabirds, and chronic oil pollution in California. Marine Ornithology. 31: 29-34.
- Harayama, S., Kasai, Y., and Hara, A. 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. Current Opinion in Biotechnology. 15: 205-214.
- Head, I. M., Jones, D. M., and Rolling, W. F. M. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. Nature Reviews. 4: 173-182.
- Higashihara, T., Sato, A., and Simidu, U. 1978. An MPN method for the enumeration of marine hydrocarbon degrading bacteria. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 44: 1127-1134.
- Hosokawa, R., Motonori, N., Morikawa, M., and Okuyama, H., 2009. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25: 1519–1528.
- Iida, T., Mukouzaka, Y., Nakamura, K., and Kudo, T. 2001. Isolation and characterization of dibenzofuran-utilizing actinomycetes. RIKEN Review. 42: 27-30.
- Irwin, R.J., VanMouwerik, M., Stevens, L., Seese, M.D., and Basham, W. 1997. Environmental contaminants encyclopedia. National Park Service, Water Resource Division, Fort Collins, Colorado.
- Jain, P.K., Gupta, V.K., Pathak, H., Lowry, M., and Jaroli, D.P. 2010. Characterization of 2T engine oil degrading indigenous bacteria, isolated from high altitude (Mussoorie), India. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 1419-1426.

- Jerabkova, H., Kralova, B., Krejeu, V., Sanchez, J.L.I., and Roig, M.G. 1997. Use of polyurethane foam for the biodegradation of *n*-alkanes by immobilized cells of *Pseudomonas*. Biotechnology technique. 11: 391-394.
- Jirasripongpun, K. 2002. The characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil. Letters in Applied Microbiology. 35: 296-300.
- Jonhsen, A.R., Bendixen, K., and Karlson, U. 2002. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. Applied and Environmental Microbiology. 68: 2683-2689.
- Kaczorek, E., Chrzanowski, L., Pijanowska, A., and Olszanowski, A., 2008. Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: rhamnolipids and saponins. Bioresource Technology. 99: 4285-4291.
- Kasai, Y., Kishira, H., Sasaki, T., Syutsubo, K., Watanabe, K., and Harayama, S. 2002. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. Environmental Microbiology. 4: 141-147.
- Kawakami, Y., and Nishimura, H. 1981. Degradation of lubricating oils by marine bacteria observed by quantitative mass spectrometry. Journal of the Oceanographical Society of Japan. 37: 1-8.
- Kirk, P.W., and Gordon, A.S. 1988. Hydrocarbon degradation by filamentous marine higher fungi. Mycologia. 80: 776-782.
- Kirk, P.W., Dyer, B.J., and Noe, J. 1991. Hydrocarbon utilization by higher marine fungi from diverse habitats and localities. Mycologia. 83: 227-230.
- Koma, D., Hasumi F., Yamamoto, E., Ohta, T., Chung, S.-Y., and Kubo, M. 2001. Biodegradation of long-chain *n*-paraffins from waste oil car engine by *Acinetobacter* sp. Journal of Bioscience and Bioengineering. 91: 94-96.
- Koma, D., et al. 2003. Degradation of car engine base oil by *Rhodococcus* sp. NDKK48 and *Gordonia* sp. NDKY76A. Bioscience Biotechnology and Biotechnology. 67: 1590-1593.
- Korbahti, B.K., and Artut, K. 2010. Electrochemical oil/water demulsification and purification of bilge water using Pt/Ir electrodes. Desalination. 258: 219–228.

- Lee, K., and Merlin, F.X. 1999. Bioremediation of oil on shoreline environments: development of technique and guidelines. Pure and Applied Chemistry. 71: 161-171.
- Lee, S.-H., Lee, S., Kim, D.-Y., and Kim, J. 2007. Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. Journal of Hazardous Materials. 143: 65-72.
- Lin, T.-C., et al. 2005. Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. Journal of Bioscience and Bioengineering. 99: 466-472.
- Lin, B., Lin, C.-Y., and Jong, T.-C., 2007. Investigation of strategies to improve the recycling effectiveness of waste oil from fishing vessels. Marine Policy. 31: 415-420.
- Lin, X., Yang, B., Shen, J., and Du, N. 2009. Biodegradation of crude oil by an Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. P29. Current Microbiology. 59: 341-345.
- Liu, Y.J., Zhang, A.N., and Wang, X.C. 2009. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. Biochemical Engineering Journal. 44: 187-192.
- Machin-Ramirez, C., et al. 2008. Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. Chemosphere. 70: 737-744.
- MacNaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J., and White, D.C. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Applied Environmental Microbiology. 65: 3566-3574.
- Mandri, T., and Lin, J. 2007. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. American Journal of Biotechnology. 6: 023-027.
- Maneerat, S., and Dikit, P. 2006. Characterization of cell-associated bioemulsifier from *Myroides* sp. SM1, a marine bacterium. Songklanakarin Journal Science Technology. 29: 769-779.
- Manilla-Perez, E., Lange, A.B., Hetzler, S., and Steinbuchel, A. 2010. Occurrence, production, and export of lipophilic compounds by hydrocarbonoclastic marine

- bacteria and their potential use to produce bulk chemicals from hydrocarbons. Applied Microbiology and Biotechnology. 86: 1693–1706.
- Margesin, R., Labbe, D., Schinner, F., Greer, C.W., and Whyte, L.G. 2003. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. Applied Environmental Microbiology. 69: 3085-3092.
- Martin-Laurent, F., et al. 2001. DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. Applied Environmental Microbiology. 67: 2354-2359.
- Maruyama, A., et al. 2003. Dynamics of microbial populations and strong selection for *Cycloclasticus pugetti* following the Nakhoda oil spill. Microbial Ecology. 46: 442-443.
- Masuoka, J., and Hazen, K.C. 2004. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains. Infection and Immunity. 72: 6230–6236.
- Mazzella, N., et al. 2005. Effects of crude oil on phospholipid fatty acid compositions of marine hydrocarbon degraders: examination of the bacterial membrane fluidity. Environmental Research. 97: 300–311.
- Mehdi, H., and Giti, E. 2008. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. International Biodeterioration & Biodegradation. 62: 170–178.
- Mercurio, P., Burns, K.A., and Negri, A. 2004. Testing the ecotoxicology of vegetable versus mineral based lubricating oils: Degradation rates using tropical marine microbes. Environmental Pollution. 12: 165-173.
- Michaud, L., Lo Giudice, A., Saitta, M., De Domenico, M., and Bruni, V. 2004. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. Marine Pollution Bulletin. 49: 405-409.
- Mirhendi, H., Makimura, K., Zomorodian, K., and Yamaguchi, H. 2005. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single PCR-restriction enzyme. Japanese Journal of Infectious Diseases. 58: 235-57.

- Mittal, A., and Singh, P. 2009. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. Indian Journal of Experimental Biology. 47: 760-765.
- Moosvi, S., Parikh, R., Shouche, Y., and Madamwar, D. Unpublished. Isolation of a novel bacterial consortium for the treatment of common effluent treatment plant wastewater. Submitted (24-APR-2006) Department of Biosciences, Vallabh Vidyanagar, Anand, Gujarat 388120, India.
- Monohar, s., Kim, C.K., and Karegoudar, T.B. 2001. Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas* sp. strain NGK1 in polyurethane foam. Applied Microbiology Biotechnology. 55: 311-316.
- Moran, A.C., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J.L., and Sineriz, F. 2000. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. Biodegradation. 11: 65–71.
- Muthukumar, N., Mohanan, S., Maruthamuthu, S., Subramanian, P., Palaniswamy, N., and Raghavan, M. 2003. Role of *Brucella* and *Gallionella* sp. in oil degradation and corrosion. Electrochemistry Communications. 5: 421-425.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. 1993. Population of complex microbial population by DGGE analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16s rDNA. Applied Environmental Microbiology. 62: 2676-2680.
- Nakamura, S., et al. 2007. Characterization of two oil-degrading bacterial groups in the Nakhodka oil spill. International Biodeterioration & Biodegradation. 60: 202-207.
- Nedovic, V.A., Leskosek-Cukalovic, I., and Vunjak-Novakovic, G. 2008. Immobilized cell technology (ICT) in beer fermentation-a possibility for environmentally sustainable and cost effective process [Online]. Available from: <http://www.meura.com>[2008, October 15]
- Nievas, M.L., Commendatore, M.G., Olivera, N.L., Esteves, J.L., and Bucalaá, V. 2005. Effect of pH modification on bilge waste biodegradation by a native microbial community. International Biodeterioration & Biodegradation. 56: 151–157.
- Nievas, M.L., et al. 2006. Biodegradation of bilge waste from Patagonia with an indigenous microbial community. Bioresource Technology. 97: 2280–2290.

- Nievas, M.L., Commendatore, M.G., Esteves, J.L., and Bucala, V. 2008. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. Journal of Hazardous Materials. 154: 96–104.
- Obuekwe, C.O., Al-Jadi, Z.K., and Al-Saleh, E.S. 2009. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. International Biodeterioration & Biodegradation. 63: 273-279.
- Obuekwe, C.O., and Al-Muttawa, E.M. 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. Biotechnology Letters. 23: 1025-1032.
- Oh, Y.-S., Maeng, J., and Kim, S.-J. 2000. Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. Applied Microbiology Biotechnology. 54: 418-423.
- Okoh, A. I. 2006. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. Biotechnology and Molecular Biology Review. 1: 38-50.
- Oliver, N., Commendatore, M.B., Moran, A.C., and Esteves, J.L. 2000. Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 25: 70-73.
- Olivera, N.L., Commendatore, M.G., Delgado, O., and Esteves, J.L. 2003. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 30: 542–548.
- Pavitrnan, S., Jagtap, C.B., Bala Subramanian, S., Titus, S., Kumar, P., and Deb, P.C. 2006. Microbial Bioremediation of fuel oil hydrocarbons in marine environment. Defence Science Journal. 56: 209-224.
- Perfumo, A., Smyth, T.J.P., Marchant, R., and Banat, I.M. 2010. Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In: Timmis, K. N. (Ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, UK, pp. 1501–1512.
- Podorozhko, E.A., et al. 2008. Hydrophobised sawdust as a carrier for immobilization of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Rhodococcus rubber*. Bioresource Technology. 99: 2001-2008.

- Poulouse, S., Sarlin, P.J., Sajeevan, T.P., Phikip, R., and Bright Singh, I.S. Unpublished. Optimization of culture conditions, mass production and assessment of nutritional value of *Candida* MCCF 101 as shrimp feed supplement. Submitted (21-JAN-2009) National Centre for Aquatic Animal Health, Cochin University of Science and Technology, Fine Arts Avenue, Cochin, Kerala 682016, India
- Provedenti, M.A., Lee, H., and Trevors, J.T. 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. Journal of Industrial Microbiology. 12: 379-395.
- Quatrini, P., Scaglione, G., De Pasquale, C., Riela, S., and Puglia, A.M. 2008. Isolation of gram-positive *n*-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. Journal of Applied Microbiology. 104: 251-259.
- Quek, E., Ting, Y.-P., and Tan, H.M. 2006. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. Bioresource Technology. 97: 32-38.
- Radwan, S.S., Al-Hasan, R.H., Alawadhi, H., Salamah, S., Abdullah, H.M. 1999. Higher oil biodegradation potential at the Arabian Gulf Coast than in the water body. Marine Biology. 135: 741-745.
- Radwan, S.S., Al-Hasan, R.H., Salamah, S., and Al-Dabbous, S. 2002. Bioremediation of oily seawater by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae. International Biodeterioration & Biodegradation. 50: 55-59.
- Rahman, R.N.Z.Abd., Ghazali, F.M., Selleh, Abu B., and Basri, M. 2006. Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells. Journal of Microbiology. 44: 354-359.
- Rajamanickam, A.L.S., Thambidurai, G.B., and Shunmugiah, K.P. Unpublished Molecular identification of hydrocarbon degrading bacteria. Submitted (14-DEC-2006) Biotechnology, Alagappa University, Alagappa Nagar, Karaikudi, Tamil Nadu 630 003, India.
- Roling, W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., Fratepietro, F., Swannell, R.P., and Daniel, F. 2004. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. Applied Environmental Microbiology. 70: 2603-2613.

- Romaskevicius, T., Budriene, S., Pielichowski K., and Pielichowski, J. 2006. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. CHEMIJA. 17: 74–89.
- Ron, E.Z., and Rosenberg, E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. Current Opinion in Biotechnology. 13: 249-252.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Alder, E., and Ron, E.Z. 1992. Petroleum bioremediation – a multiphase problem. Biodegradation. 3: 337-350.
- Rosenberg, E., and Ron, E. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied Microbiology Biotechnology. 52: 154–162.
- Ruberto, L., Dias, R., Lo Balbo, A., Vazquez, S.C., Hernandez, E.A., and Mac Cormack, W.P. 2009. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. Journal of Applied Microbiology. 106 :1101–1110.
- Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A., and Matsuda, H. 2009. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. Bioresource Technology. 100: 572-577.
- Sambrook, J., and Russel, D.W. 2001. Plasmids and their usefulness in molecular cloning. In: Molecular Cloning, a Laboratory Manual, third ed., Cold Spring Harbar Laboratory Press, NY, USA, pp. 1.1–1.170.
- Satpute, S.K., Banat, I.M., Dhakephalkar, P.K., Banpurkar, A.G., and Chopade, B.A. 2010. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. Biotechnology Advances. 28: 436-450.
- Shen, F.-T., Ho, M.-J., Huang, H.-R., Arun, A.B., Rekha, P.D., and Young, C.-C. 2008. Molecular detection and phylogenetic characterization of *Gordonia* species in heavily oil-contaminated soils. Research in Microbiology. 159: 522-529.
- Singh, A.K., Sherry, A., Gray, N.D., Jones, M.D., Rolling, W.F.M., and Head, I.M. 2011. How specific microbial communities benefit the oil industry: dynamics of *Alcanivorax* spp. In oil-contaminated intertidal beach sediments undergoing bioremediation. Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems. pp. 199-209. Doi: 10: 1007/978-90-481-9252-6-24.

- Singh, R., Paul, D., and Jain, R.K. 2006. Biofilms-mediated bioremediation. Trends in Microbiology. 14: 389-397.
- Southam, G., Whitney, M., and Knickerbocker, C. 2001. Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria-oil interface: implications for bioremediation. International Biodeterioration & Biodegradation. 47: 197-201.
- Spence, J.M., Bottrell, S.H., Thornton, S.F., Richnow, H.H., and Spence, K.H. 2005. Hydrochemical and isotopic effects associated with petroleum fuel biodegradation pathways in a chalk aquifer. Journal of Contaminant Hydrology. 79: 67-83.
- Su, Y., and Liu, Z. Unpublished. The isolation and characterization of marine oil-degrading bacteria. Submitted (24-APR-2007) College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, 6 TongWei Road, Nanjing, Jiangsu 210095, China.
- Sun, C., Leiknes, T., Weitzenbock J., and Thorstensen, B. 2009. The effect of bilge water on a Biofilm-MBR process in an integrated shipboard wastewater treatment system. Desalination. 236: 56-64.
- Sun, C., Leiknes, T., Weitzenbock, J., and Thorstensen, B.. 2010. Development of a biofilm-MBR for shipboard wastewater treatment: The effect of process configuration. Desalination. 250: 745-750.
- Tallur, P.N., Megadi, V.B., and Ninnekar, H.Z. 2009. Biodegradation of *p*-cresol by immobilized cells of *Bacillus* sp. strain PHN1. Biodegradation. 20:79-83.
- Tazaki, K., and Chaerun, S.K. 2008. Life in oil: Hydrocarbon-degrading bacterial mineralization in oil spill-polluted marine environment. Frontiers of Material Science in China. 2: 120-133.
- Teramoto, M., et al. 2011. *Oleibacter marinus* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades petroleum aliphatic hydrocarbons in a tropical marine environment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 61: 375-380.
- Teramoto, M., Suzuki, M., Hatmanti, A., and Harayama, S. 2010. The potential of *Cycloclasticus* and *Altererythrobacter* strains for use in bioremediation of petroleum-aromatic-contaminated tropical marine environments. Journal of Bioscience and Bioengineering. 110: 48-52.

- Thompson, B.A.W., Goldsworthy, P.M., Riddle, M.J., Snape, I., and Stark, J.S. 2007. Contamination effects by a 'conventional' and a 'biodegradable' lubricant oil on infaunal recruitment to Antarctic. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 340: 213–226.
- Tong, S.L., Goh, S.H. Rani Abdulah, A., Tahir, N.M., and Wang, C.W. 1999. Asian marine water quality criteria for oil and grease. Marine Environment Division, Water Quality Management Bureau, Pollution Control Department.
- Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., and de Carvalho, C.C.C.R. 2010. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation process. Biodegradation. Doi 10.1007/s10532-010-9394-4.
- Ueno, R., Wada, S., and Urano, N. 2008. Repeated batch cultivation of the hydrocarbon-degrading, micro-algal strain *Prototheca zopfii* RND16 immobilized in polyurethane foam. Canadian Journal Microbiology. 54: 66-70.
- USEPA, 2011. Environmental protection agency national contingency plan product schedule March 2011 (3/29/2011). [Online]. Available from: www.epa.gov/oem/docs/oil/ncp/schedule.pdf [2011, March 15]
- Usha, M.S., Sanjay, M.K., Gaddad, S.M., and Shivannavar, C.T. 2010. Degradation of h-acid by free and immobilized cells of *Alcaligenes latus*. Brazilian Journal of Microbiology. 41: 931-945.
- van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H., and Witholt, B. 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil & Gas Science and Technology. 58:427–440.
- Vasileva-Tonkova, E., Galabova, D., Stoimenova, E., and Lalchev, Z. 2008. Characterization of bacterial isolates from industrial wastewater according to probable modes of hexadecane uptake. Microbiological Research. 163: 481-486.
- Vieira, P.A., Faria, S., Vieira, R.B., De Franc, F.P., and Cardoso, V.L. 2009. Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculums concentration for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. World Journal Microbiology Biotechnology. 25:427–438.
- Wang, H., Xu, R., Li, F., Qiao, J., and Zhang, B. 2010. Efficient degradation of lube oil by a mixed bacterial consortium. Journal of Environmental Science. 22: 381-388.

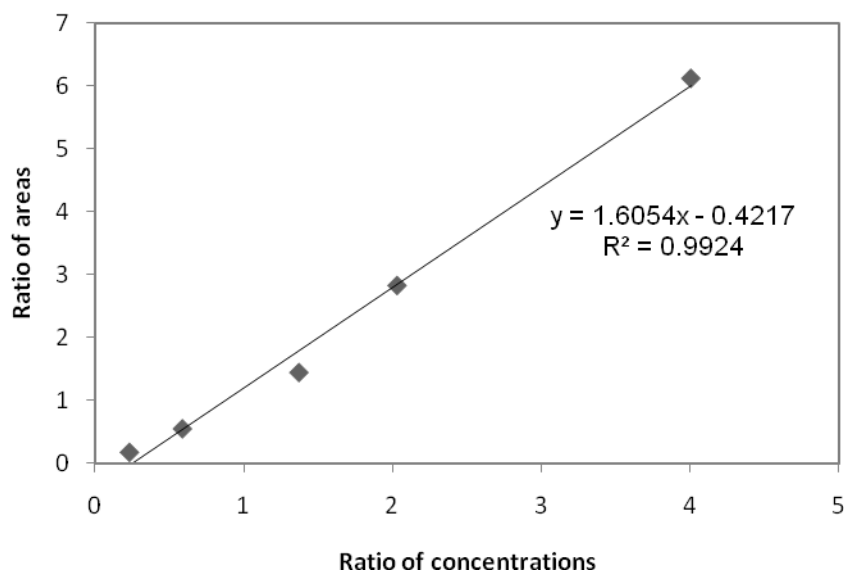
- Wattayakorn, G., King, B., Wolanski, E., and Suthanaruk, P. 1998. Seasonal dispersion of petroleum contaminants in the gulf of Thailand. Continental Shelf Research. 18: 641-659.
- Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H.-K., Zotchev, S.B., and Throne-Holst, M. 2007. Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes. Applied Microbiology and Biotechnology. 76: 1209-1221.
- Wilson, N.G., and Bradley, G. 1997. A study of a bacterial immobilization substratum for use in the bioremediation of crude oil in a saltwater system. Journal of Applied Microbiology. 83: 524-530.
- Wiese, F.K., and Ryan, P.C. 2003. The extent of chronic marine oil pollution in southeastern Newfoundland waters assessed through beached bird surveys 1984–1999. Marine Pollution Bulletin. 46: 1090-1101.
- Xia, W.X., Li, J.C., Song, Z.W., and Sun, Y.W. 2007. Effects of nitrate concentration in interstitial water on the bioremediation of simulated oil-polluted shorelines. Journal of Environmental Science. 19: 1491-1495.
- Yakimov, M.M., et al. 2004. *Thalassolituus oleivorans* gen.nov., sp. nov., a novel bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54: 141-148.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N. 2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. Current Opinion in Biotechnology. 18: 257–266.
- Zahed, M.A., Aziz, H.A., Isa, M.H., and Mohajeri, L. 2010. Effect of initial oil concentration and dispersant on crude oil biodegradation in contaminated seawater. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 84:438–442.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

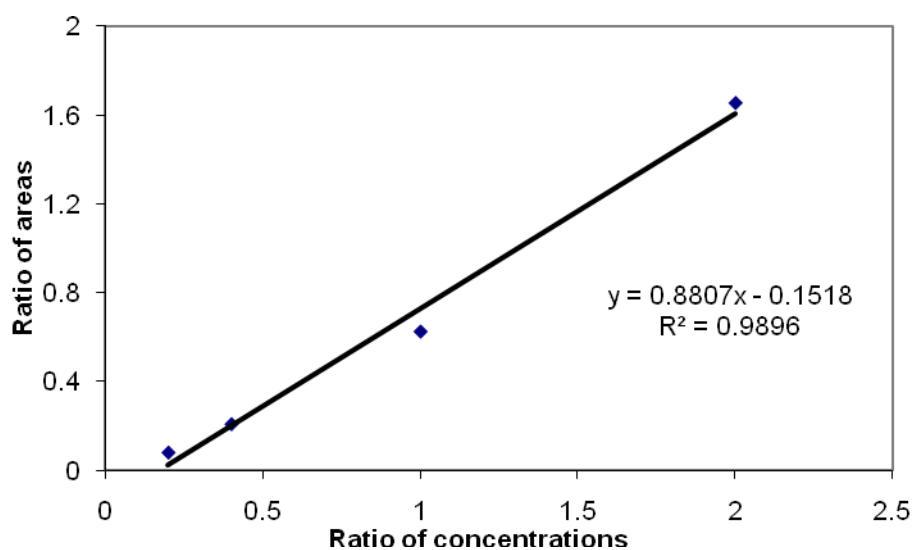
กราฟมาตรฐานของน้ำมันชนิดต่างๆ

ก.1 กราฟมาตรฐานของน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้งานเบอร์ 1



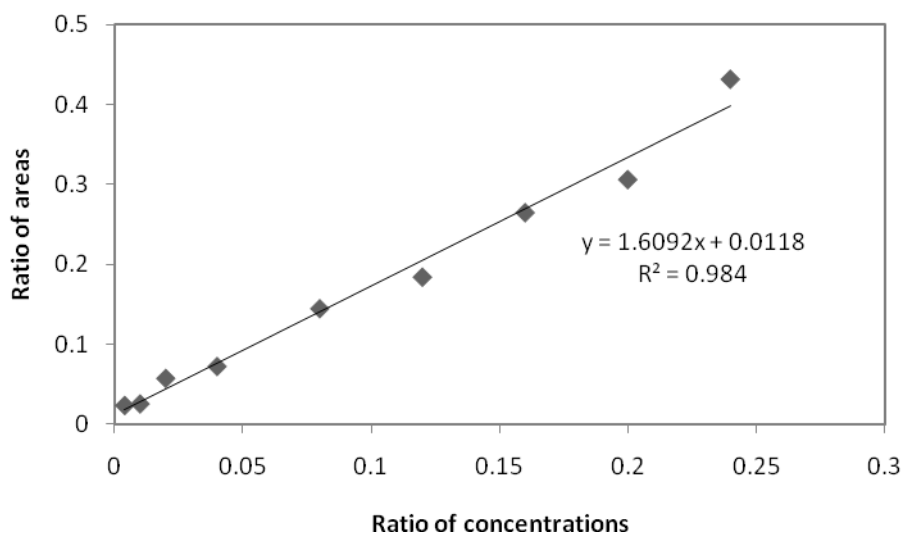
รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ใช้งานเบอร์ 1 โดย TLC/FID แต่ละจุดมาจากการเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ก.2 กราฟมาตรฐานของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 1



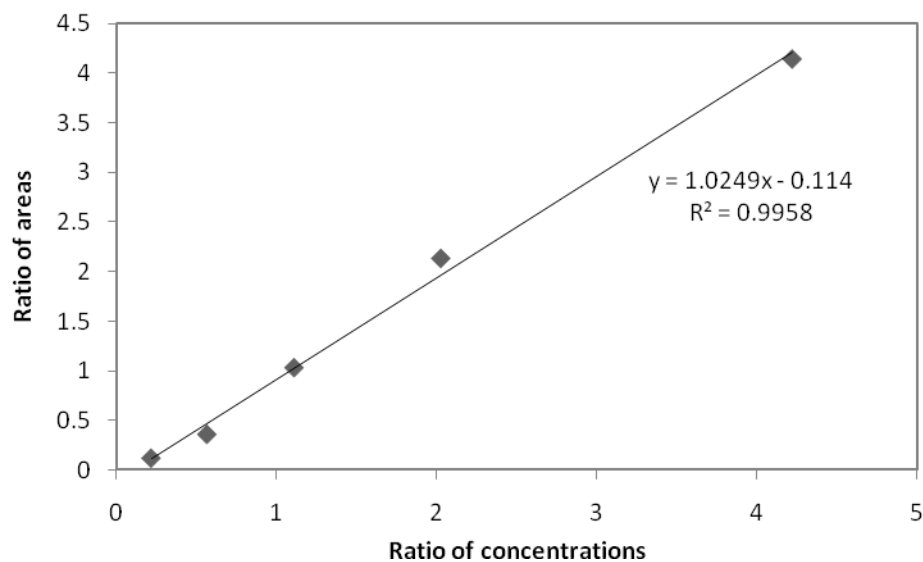
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 1 โดย TLC/FID แต่ละจุดมาจากการเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ก.3 กราฟมาตรฐานของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2



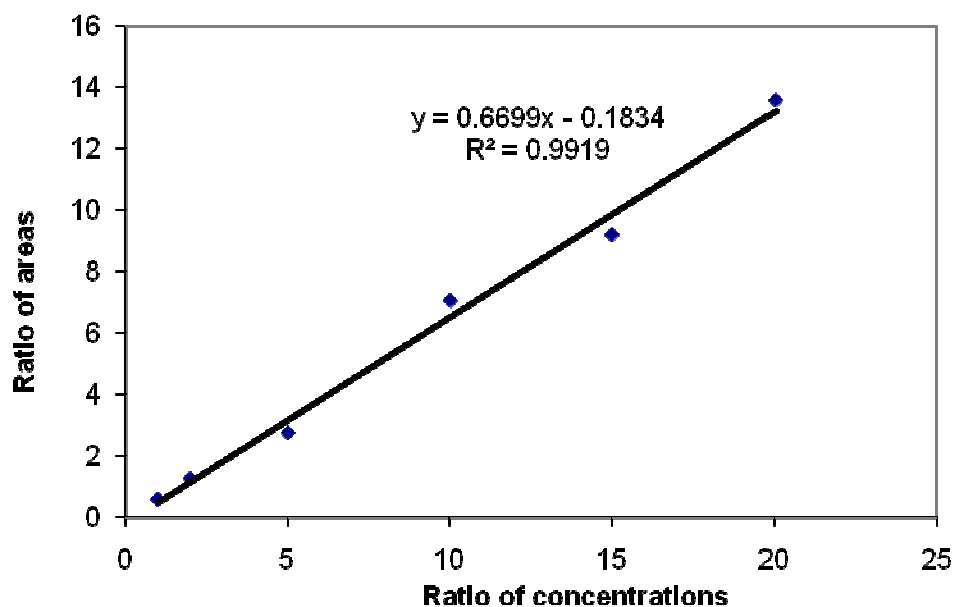
รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 โดย TLC/FID แต่ละจุดมาจากการเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ก.4 กราฟมาตรฐานของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 3



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 3 โดย TLC/FID แต่ละจุดมาจากการเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ก.5 กราฟมาตรฐานของน้ำมันดิบเมอร์บาน ไลท์



รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของน้ำมันดิบเมอร์บาน ไลท์ โดย TLC/FID แต่ละจุดมาจากการเฉลี่ย 3 ซ้ำ

วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานของน้ำมัน

ชั่งน้ำมันหนัก 100 50 25 10 และ 5 มก. และเติมคลอโรฟอร์มลงไปละลายน้ำมัน เติมสารละลายมาตรฐาน stearyl alcohol (หรือ 1-octadecanol) ที่มีความเข้มข้น 25 มก./มล. ปริมาตร 1 มล. ลงในสารละลายน้ำมัน จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มล. โดยใช้ขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มล. แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หองค์ประกอบของน้ำมันด้วย TLC/FID

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 M

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

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากัน รอให้เย็นลง แล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 เติมน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มล. ปล่อยให้ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ $121^{\circ}C$ 15 นาที

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า

Tris-HCl	242	กรัม
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 M	100	มล.
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตร 1,000 มล. ปล่อยให้ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ $121^{\circ}C$ 15 นาที

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	20	มล.
น้ำกลั่น	980	มล.

อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9%

อะกาโรสเจล	0.9	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มล.

หลอมให้เข้ากันโดยการต้มให้ความร้อน

อะกาโรสเจลเข้มข้น 2.0%

อะกาโรสเจล	2.0	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มล.

หลอมให้เข้ากันโดยการต้มให้ความร้อน

บัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 mM	10	มล.
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.1 mM	0.2	มล.

เติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 µg/ml

เอธิเดียมโบรไมด์	0.1	มก.
น้ำกลั่น	10	มล.

ละลายให้เข้ากัน และเก็บในภาชนะปิดสนิท ในที่มืด

20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	20	กรัม
----------------------	----	------

ค่อยๆ ละลาย SDS ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้ออุณหภูมิ 60 °ซ ปริมาตร 80 มล. เมื่อสารละลายหมด เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

20% สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K)

โปรตีนเนสเค	20	มก.
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	มล.

สารละลาย Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 mM

Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$) 1.2 กรัม

ละลายสารในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 1,000 มล. ปล่อยให้เย็นด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

สารละลาย CTAB/NaCl

CTAB 10 กรัม

NaCl 4.1 กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 65 °ซ ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติม NaCl เข้มข้น 0.7 M เมื่อสารละลายหมด เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 100 มล. นำไปปล่อยให้เย็นด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

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

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

เตรียมสารละลายฟีนอลอิมิตัวในบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยละลายฟีนอลในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68 °ซ และเติมผง hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้น 0.1% (w/w) จากนั้นเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 1 เท่า คนสารละลายเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น และดูดชั้นน้ำส่วนบนออก เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 1 เท่า ผสมด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก ทำซ้ำนี้ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จนค่า pH ของฟีนอลมากกว่า 7.8 ขั้นสุดท้ายเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 0.1 M ที่ผสม β -mercaptoethanol (0.2 % w/v) ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายฟีนอลที่เตรียมได้ เก็บสารละลายฟีนอลในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ ผสมสารละลายฟีนอลที่เตรียมได้กับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin)

แอมพิซิลลิน	100	มก.
น้ำปลอดประจุ	1	มล.

ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm

2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal)

X-gal	20	มก.
Dimethylformamide (DMF)	1	มล.

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกรอง 0.2 μm

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 1 M

IPTG	238	มก.
น้ำปลอดประจุ	1	มล.

ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm

สารละลาย TfbI

โพแทสเซียมอะซิเตท (CH_3COOK)	0.295	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรท ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.148	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)	0.99	กรัม
กลีเซอรอล	15	มล.

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มล. ปรับค่า pH ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 M จนได้ค่า pH เท่ากับ 5.8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm

สารละลาย TfbII

2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES)	0.29	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	0.121	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรท ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.103	กรัม
กลีเซอรอล	15	มล.

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มล. เมื่อสารละลายหมด ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ DGGE

0% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์/บิส (acrylamide/bis)	20	มล.
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มล.
น้ำปลอดประจุ	78	มล.

100% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์/บิส	20	มล.
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มล.
ฟอร์มามาไมด์ (formamide)	40	มล.
ยูเรีย (urea)	42	กรัม
เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 100 มล.		

70% denaturing solution

100% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล	11.2	มล.
0% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล	4.8	มล.

30% denaturing solution

100% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล	4.8	มล.
0% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล	11.2	มล.

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammoniumpersulfate) เข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มล.

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$

เอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 มก./มล.	10	μl
น้ำกลั่น	200	มล.

ภาคผนวก ค

ผลทดสอบทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน

ตารางที่ค.1 ผลทดสอบทางชีวเคมีของ *Candida* sp. JC4 และ JC1

Characteristics	<i>Candida</i> sp. JC4	<i>Candida</i> sp. JC1
GERM TUBE	Negative	Negative
UREASE	Negative	Negative
Colony on CHROMagar <i>Candida</i>	Pale green	Pale green
PHENOLOXIDASE	Negative	Negative
CARBON ASSIMILATION	+	+
DEXTROSE	+	+
MALTOSE		
SUCROSE	+	+
LACTOSE	-	-
GALACTOSE	+	+
MELIBIOSE	-	-
CELLOBIOSE	+	+
INOSITOL	-	-
XYLOSE	+	+
RAFFINOSE	-	-
TREHALOSE	+	+
DULCITOL	-	-

ตารางที่ ค.2 ผลทดสอบทางชีวเคมีของ *Gordonia* sp. JC11 และ *Microbacterium* sp. JC9

Characteristics	<i>Gordonia</i> sp. JC11	<i>Microbacterium</i> sp. JC9
Haemolysis	Gamma	Gamma
TSI	K/N	A/A
CATALASE	+	+
OXIDASE	-	-
MOTILITY	-	-
CITRATE	-	-
UREASE	-	-
NITRATE	-	-
ESCULIN	-	+
VP	-	-
GELATINASE	-	-
GLUCOSE/GAS	-	+
LACTOSE	-	-
MALTOSE	-	+
MANNITOL	-	+
D-XYLOSE	-	-
RHAMMONSE	-	ND
SUCROSE	-	+
INOSITOL	-	ND
SORBITAL	-	ND
FRUCTOSE	ND	+
ARGININE	NC	-
ALKALINE PHOS..	+	+
CAMP Test	-	-
METABOLISM	OXIDATIVE	OXIDATIVE

ตารางที่ 3 ผลทดสอบทางชีวเคมีของ *Acinetobacter* sp. JC5 และ *Pseudomonas* sp. JC6

Characteristics	<i>Acinetobacter</i> sp. JC5	<i>Pseudomonas</i> sp. JC6
Flagella	peri	polar
Heamolysis	-	-
TSI	K/N	K/N
H ₂ S	-	-
OXIDASE	-	+
MOTILITY	+	-
INDOLE	-	-
CITRATE	-	-
UREASE	+	+
NITRATE	+	+
N ₂ GAS	-	-
ESCULIN	-	-
42°C (Growth)	-	+
ACETATE	+	+
GELATINASE	-	-
METABOLISM	Oxidative	Oxidative
GLUCOSE/GAS	-	+
LACTOSE	-	-
MALTOSE	+	+
MANNITOL	-	-
D-XYLOSE	+	+
SUCROSE	+	+
ADONITOL	+	+
FRUCTOSE	+	+
LYSINE	-	-
ARGININE	+	+

ORNITHINE + -

ตารางที่ ค.4 ผลทดสอบทางชีวเคมีของ *Enterococcus* sp. JC2 และ *Gordonia* sp. JC8

Characteristics	<i>Enterococcus</i> sp. JC2	<i>Gordonia</i> sp. JC8
HEAMOLYSIS	Gamma	Gamma
TSI	ND	K/N
CATALASE	-	+
OXIDASE	+	-
MOTILITY	-	-
CITRATE	ND	-
UREASE	-	+
NITRATE	ND	-
ESCULIN	+	+
GELATINASE	-	-
GLUCOSE/GAS	-	-
LACTOSE	-	-
MALTOSE	-	-
MANNITOL	+	-
D-XYLOSE	-	-
RHAMNOSE	-	-
SUCROSE	ND	-
INOSITOL	ND	-
SORBITOL	ND	-
TELLURITE	+	ND
ARGININE	ND	NC
ALKALINE PHOS.	ND	+
CAMP TEST	ND	-
45 ^o C (Growth)	+	ND
6.5% NaCl (Growth)	+	ND
pH 9.6 (Growth)	+	ND

METABOLISM	FERMENTATIVE	OXIDATIVE
------------	--------------	-----------

ตารางที่ ค.5 ผลทดสอบทางชีวเคมีของ *Brucella* sp. JC7 และ JC12

Characteristics	<i>Brucella</i> sp. JC7	<i>Brucella</i> sp. JC12
Flagella	multi	multi
Heamolysis	-	-
TSI	-	K/N
H ₂ S	-	-
OXIDASE	+	+
CATALASE	+	+
MOTILITY	-	-
INDOLE	-	-
CITRATE	-	-
UREASE	+	+
NITRATE	+	+
N ₂ GAS	-	-
ESCULIN	+	+
42°C (Growth)	-	-
ACETATE	+	+
GELATINASE	-	-
METABOLISM	Oxidative	Oxidative
DNase	+	+
BASE	OF	OF
GLUCOSE/GAS	+	-
LACTOSE	-	-
MALTOSE	+	+
MANNITOL	-	-
D-XYLOSE	+	+
SUCROSE	+	+
ADONITOL	-	-

FRUCTOSE	+	+
LYSINE	-	-

ตารางที่ ค.5 (ต่อ)

Characteristics	<i>Brucella</i> sp. JC7	<i>Brucella</i> sp. JC12
STARCH	+	+
ORNITHINE	-	-
ARGININE	-	-
MR	-	-
VP	-	-

หมายเหตุ:

- + หมายถึงจุลินทรีย์สามารถย่อยสารตั้งต้น หรือให้ผลบวกในปฏิกิริยาทดสอบ
 - หมายถึงจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสารตั้งต้น หรือให้ผลลบในปฏิกิริยาทดสอบ
- ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ (Not determined)

ภาคผนวก ง

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ง.1 ส่วนประกอบของน้ำมันแต่ละชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้

Oil type	Saturates (%w/w)			AVG (%)	SD
	Sample No.				
	1	2	3		
Lurbricants*					
Fresh No.1	44.29	47.57	45.83	45.90	1.60
Fresh No.2	46.69	47.36	48.66	47.57	1.00
Waste No.1	55.11	59.60	58.34	57.68	1.89
Waste No.2	65.95	66.19	61.23	64.59	2.56
Waste No.3	48.56	49.05	49.06	48.89	0.29
Waste No.4	60.89	63.37	62.79	62.35	1.29
Crude oil					
Murban light	51.75	50.25	48.52	50.17	1.61
Aromatics(%w/w)					
Lurbricants*					
Fresh No.1	44.29	47.57	32.63	41.5	7.8
Fresh No.2	54.17	51.62	49.94	51.58	1.67
Waste No.1	18.64	20.18	14.77	17.86	2.78
Waste No.2	26.38	23.70	19.13	23.08	3.67
Waste No.3	39.96	41.08	39.99	40.34	0.63
Waste No.4	28.68	29.85	29.58	29.37	0.61
Crude oil					
Murban light	30.51	36.27	40.75	38.54	5.13

ตารางที่ ง.1 (ต่อ)

Oil type	Polars (%w/w)			AVG (%)	SD
	Sample No.				
	1	2	3		
Lurbricants*					
Fresh No.1	9.17	15.74	13.78	12.90	3.37
Fresh No.2	2.34	1.67	0.72	1.59	0.80
Waste No.1	29.94	20.20	23.34	24.50	2.78
Waste No.2	11.65	10.09	15.23	12.33	4.10
Waste No.3	11.47	9.33	10.55	10.45	1.07
Waste No.4	8.12	10.41	7.61	8.72	1.49
Crude oil					
Murban light	17.73	13.47	17.01	16.07	2.28

ตารางที่ ง.2 สมบัติความไม่ชอบน้ำของเชื้อหุ้มเซลล์ (MATH assay) ของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน
ทั้ง 10 สายพันธุ์

Strain	Hydrophobicity (%)			AVG	SD
	Sample No.				
	1	2	3		
<i>Gordonia</i> sp. JC11	79.91	81.34	81.15	80.80	0.77
<i>Microbacterium</i> sp. JC9	16.66	16.66	19.78	17.70	1.79
<i>Candida</i> sp. JC4	85.79	87.28	77.60	83.56	5.21
<i>Enterococcus</i> sp. JC2	6.71	4.34	5.21	5.42	1.19
<i>Acinetobacter</i> sp. JC5	3.82	8.36	4.15	5.44	2.52
<i>Candida</i> sp. JC1	7.40	10.33	10.64	9.46	1.78
<i>Pseudomonas</i> sp. JC6	2.60	0.64	2.80	2.01	1.19
<i>Brucella</i> sp. JC12	10.61	6.79	5.57	7.66	2.62
<i>Brucella</i> sp. JC7	0.96	1.85	0.93	1.25	0.52
<i>Gordonia</i> sp. JC8	27.72	29.26	30.08	29.02	1.19

ตารางที่ ง.3 การสร้าง EPS ของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์

Strain	EPS Synthesis (%)			AVG	SD
	Sample No.				
	1	2	3		
<i>Gordonia</i> sp. JC11	34.74	51.20	56.14	53.67	3.48
<i>Microbacterium</i> sp. JC9	89.83	91.42	91.22	90.82	0.86
<i>Candida</i> sp. JC4	93.50	93.56	92.39	93.15	0.65
<i>Enterococcus</i> sp. JC2	84.74	83.37	90.64	86.25	3.86
<i>Acinetobacter</i> sp. JC5	65.81	64.61	74.85	68.42	5.59
<i>Candida</i> sp. JC1	78.53	71.04	89.76	79.78	9.42
<i>Pseudomonas</i> sp. JC6	49.71	64.34	49.70	54.58	8.44
<i>Brucella</i> sp. JC12	67.79	64.87	44.44	59.04	12.72
<i>Brucella</i> sp. JC7	77.96	76.13	66.08	73.39	6.39
<i>Gordonia</i> sp. JC8	23.72	23.86	26.60	24.73	1.62

ตารางที่ ง.4 การเจริญของจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันในอาหาร NSW และเทพระเดกเคน 0.1% (w/v) หรือ พีแนนทริน 100 มก./ล.

Strain	Cell Number after 24 h (x 10 ⁹)*			AVG	SD
	Sample No.				
	1	2	3		
NSW					
<i>Gordonia</i> sp. JC11	0.24	0.22	0.22	0.23	0.01
<i>Microbacterium</i> sp. JC9	0.11	0.17	0.18	0.15	0.03
<i>Candida</i> sp. JC4	1.20	1.30	0.09	1.13	0.20
<i>Enterococcus</i> sp. JC2	0.60	1.10	0.80	0.83	0.30
<i>Acinetobacter</i> sp. JC5	1.50	1.70	1.50	1.57	0.10
<i>Candida</i> sp. JC1	0.60	1.10	0.80	0.83	0.20
<i>Pseudomonas</i> sp. JC6	1.00	0.60	0.50	0.70	0.20
<i>Brucella</i> sp. JC12	0.12	0.15	0.19	0.15	0.04
<i>Brucella</i> sp. JC7	0.90	1.10	0.30	0.77	0.40
<i>Gordonia</i> sp. JC8	0.06	0.06	0.03	0.05	0.01
NSW+tetradecane					
<i>Gordonia</i> sp. JC11	1.50	1.20	1.30	1.33	0.15
<i>Microbacterium</i> sp. JC9	1.60	1.50	1.80	1.63	0.15
<i>Candida</i> sp. JC4	1.30	1.70	1.90	1.63	0.30
<i>Enterococcus</i> sp. JC2	1.50	1.70	1.10	1.43	0.30
<i>Acinetobacter</i> sp. JC5	1.10	1.30	0.60	1.00	0.30
<i>Candida</i> sp. JC1	0.90	1.00	0.80	0.89	0.10
<i>Pseudomonas</i> sp. JC6	0.90	1.10	0.80	0.93	0.15
<i>Brucella</i> sp. JC12	0.70	0.40	0.50	0.53	0.15
<i>Brucella</i> sp. JC7	1.60	1.50	0.90	1.30	0.37
<i>Gordonia</i> sp. JC8	0.10	0.11	0.09	0.10	0.01

*หน่วย CFU/ml

ตารางที่ ง.4 (ต่อ)

Strain	Cell Number after 24 h ($\times 10^9$)*			AVG	SD
	Sample No.				
	1	2	3		
NSW+phenanthrene					
<i>Gordonia</i> sp. JC11	1.90	1.70	1.50	1.70	0.20
<i>Microbacterium</i> sp. JC9	2.60	2.70	2.10	2.47	0.32
<i>Candida</i> sp. JC4	0.70	1.00	0.90	0.86	0.10
<i>Enterococcus</i> sp. JC2	1.10	1.20	0.80	1.00	0.20
<i>Acinetobacter</i> sp. JC5	0.70	1.00	0.80	0.83	0.15
<i>Candida</i> sp. JC1	1.10	1.20	0.80	1.03	0.20
<i>Pseudomonas</i> sp. JC6	1.50	1.80	1.00	1.43	0.40
<i>Brucella</i> sp. JC12	0.50	0.80	1.10	0.80	0.30
<i>Brucella</i> sp. JC7	1.00	1.30	1.00	1.10	0.17
<i>Gordonia</i> sp. JC8	0.60	0.60	0.40	0.53	0.11

*หน่วย CFU/ml

ตารางที่ ง.5 ประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเบอร์ 1 ของ *Candida* sp. JC 4

Microbacterium sp. JC9 และ *Gordonia* sp. JC11 ที่เลี้ยงในอาหาร NSW เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ โดยมีปริมาณน้ำมันเริ่มต้น 200 มก./ล.

Incubation time (d)	Fresh Lubricating oil No. 1 Content (mg)			AVG	SD
	Sample No.				
	1	2	3		
<i>Candida</i> sp. JC 4					
0	9.807402118	9.296065455	8.393917509	9.165795027	0.715690207
1	6.755821844	7.809983362	7.141196753	7.23566732	0.533392578
2	7.407045398	7.819407237	7.083188053	7.436546896	0.368995156
3	6.753813289	6.679758922	6.628453885	6.687342032	0.063022795
4	6.045980604	4.221540327	5.465473366	5.244331432	0.932106966
5	6.176730358	7.414186127	5.438920453	6.343278979	0.998109439
<i>Microbacterium</i> sp. JC9					
0	8.847098787	8.962644588	8.80501932	8.871587565	0.081616214
1	6.723814629	6.671006136	6.563866498	6.652895754	0.081497488
2	7.292731219	7.068055627	6.510569594	6.957118813	0.40270887
3	7.019946344	7.090365221	6.486969118	6.865760228	0.32992686
4	6.825577049	5.733087214	6.907678493	6.488780919	0.655736146
5	7.324552474	6.394385199	6.150425668	6.623121114	0.61958335

ตารางที่ ๓.5 (ต่อ)

Incubation time (d)	Fresh Lubricating oil No. 1 Content (mg)				
	Sample No.			AVG	SD
	1	2	3		
<i>Gordonia</i> sp. JC11					
0	10.12244126	9.443029138	9.800278894	9.788583097	0.339857031
1	7.259474896	7.614068255	3.833867018	6.23580339	2.087680019
2	5.50753952	4.958543899	4.711056074	5.059046498	0.40764206
3	5.880910136	6.053454584	5.11605532	5.683473347	0.49891413
4	3.215263436	5.288302777	5.010997001	4.504854404	1.125392498
5	5.733190693	4.389837397	2.607256174	4.243428088	1.568101852
Uninoculated Control					
0	10.72462255	10.85995056	10.60370725	10.72942679	0.128189188
1	9.083115177	10.18124191	9.45879154	9.632178546	0.776492862
2	10.18303781	10.18544287	10.55040439	10.30629502	0.211408333
3	8.806780291	10.41052495	9.892273779	9.703193005	0.81842097
4	10.70191117	10.63668488	10.53228375	10.6236266	0.085564328
5	10.48183173	10.6983205	9.77530026	10.31848416	0.482704268

ตารางที่ ง.6 ประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเบอร์ 2 ของ *Candida* sp. JC 4
Microbacterium sp. JC9 และ *Gordonia* sp. JC11 ที่เลี้ยงในอาหาร NSW เทียบกับชุดควบคุม
 ที่ไม่เติมเชื้อ โดยมีปริมาณน้ำมันเริ่มต้น 200 มก./ล.

Incubation time (d)	Waste Lubricating oil No. 2 Content (mg)			AVG	SD
	Sample No.				
	1	2	3		
<i>Candida</i> sp. JC 4					
0	9.703338667	9.5860805	11.50863526	10.26601814	1.077733892
1	11.26425561	11.29929979	10.59523362	11.05292967	0.396763507
2	12.36345573	10.89388947	9.915016492	11.0574539	1.232387385
3	9.875041785	11.57564899	10.16390736	10.53819938	0.909992912
4	10.40139292	11.44808654	7.945923928	9.93180113	1.797685479
5	9.242742502	8.190168869	10.84399522	9.425635532	1.336333034
<i>Microbacterium</i> sp. JC9					
0	10.63291987	10.96676388	10.33668259	10.64545545	0.315227634
1	7.670268327	5.900887998	7.157669802	6.909608709	0.910399592
2	7.46912037	6.169999059	7.495121999	7.044747143	0.757665611
3	8.286600018	7.92776189	6.230644545	7.481668818	1.098174621
4	6.547571682	7.937789007	8.374468487	7.619943058	0.95402176
5	8.260757408	7.396861369	8.284322379	7.980647052	0.50571051

ตารางที่ ๓.6 (ต่อ)

Incubation time (d)	Waste Lubricating oil No. 2 Content (mg)				
	Sample No.			AVG	SD
	1	2	3		
<i>Gordonia</i> sp. JC11					
0	10.05760626	10.14690539	9.987043481	10.06385171	0.080113741
1	7.418502597	7.395628312	8.287014071	7.70038166	0.508167293
2	7.468773514	5.896746372	5.28162539	6.215715092	1.127922875
3	6.660070054	7.241873682	6.123330578	6.675091438	0.559422828
4	7.181695874	6.192364774	5.744433446	6.372831365	0.735429782
5	7.857757764	7.059790771	7.070258893	7.329269143	0.457714499
Uninoculated Control					
0	10.74783744	10.36097359	9.723240738	10.27735059	0.517391733
1	10.21102484	9.870681547	9.326209834	9.802638739	0.446314648
2	10.15118743	9.029379761	8.86737266	9.349313284	0.699151762
3	8.176034727	10.08392798	10.0276037	9.429188803	1.085628601
4	9.294378076	10.82945918	9.774432631	9.966089964	0.785282053
5	9.157092048	10.7047538	9.960548378	9.940798076	0.774019884

ตารางที่ ง.7 ปริมาณ TPH ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ในพื้นที่จริง เนื่องจากการดูดซับและการย่อยสลายของ PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ซึ่งเติมบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือ ระหว่างวันที่ 1-6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2553

Incubation time (h)	Total Petroleum Hydrocarbon (mg oil/g PUF)			AVG	SEM*
	Sample No.				
	1	2	3		
0	207.01	275.11	136.34	206.15	40.06
12	993.17	475.46	620.83	696.48	154.16
24	5318.62	1041.16	2990.83	3116.88	1236.41
36	8205.53	3045.03	3585.71	4945.42	1637.50
48	2681.56	6952.85	5652.00	5095.47	1264.02
60	9164.23	4295.16	3412.92	5834.10	1731.33
72	1531.49	1174.52	2212.46	1639.49	304.45
84	4708.28	3893.65	3330.21	3977.38	400.01
96	1129.36	811.43	1359.46	1100.08	158.87
108	5042.74	3205.13	2363.31	3357.06	791.09
120	2253.80	1387.11	2064.68	1901.70	263.10

*SEM = Standard Error of Mean

ตารางที่ ง. 8 การเปลี่ยนแปลงของ TPH ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ในพื้นที่จริง เนื่องจากการดูดซับของ Uninoculated PUF packages ที่มีปริมาณ 125 มก./ชุดทดลอง ซึ่งเติมบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือ ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม พ.ศ. 2553

Incubation time (h)	Total Petroleum Hydrocarbon (mg oil/g PUF)			AVG	SEM*
	Sample No.				
	1	2	3		
0	175.60	326.66	216.12	239.46	45.142
12	8210.27	18607.44	12625.76	13147.82	3012.73
24	23860.42	29225.330	24817.99	25967.91	1652.00
36	15793.84	23694.19	26396.28	21961.4	3180.91
48	14789.96	11661.04	18285.16	14912.06	1913.19
60	30848.94	6327.63	13806.75	16994.44	7255.91
72	17410.64	20234.42	26724.03	21456.36	2757.09
84	6824.332	24082.23	15177.94	15361.5	4982.77
96	6262.092	14011.03	40084.52	20119.22	10230.21
108	22190.39	21460.53	16994.97	20215.3	1623.88
120	4629.68	6271.76	4052.67	4984.70	664.73
132	21226.06	16556.93	4431.00	14071.31	5005.06
144	7821.53	24627.01	3873.25	12107.27	6362.78
156	19671.89	15792.38	16889.16	17451.14	1154.63
168	27533.65	41332.71	34050.49	34305.62	3985.48

ตารางที่ ง. 9 การเปลี่ยนแปลงของ TPH ในน้ำขังใต้ท้องเรือ ในพื้นที่จริง เนื่องจากการดูดซับและการย่อยของ PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11 packages ที่มีปริมาณ 125 มก./ชุด ทดลอง ซึ่งเติมบนผิวหน้าน้ำขังใต้ท้องเรือ ระหว่างวันที่ 12-19 ธันวาคม พ.ศ. 2553

Incubation time (h)	Total Petroleum Hydrocarbon (mg oil/g PUF)			AVG	SEM*
	Sample No.				
	1	2	3		
0	322.58	608.52	128.15	353.08	139.50
12	13651.34	11330.24	15171.21	13384.26	1116.80
24	15643.79	13618.77	16119.58	15127.38	766.70
36	18243.10	24652.75	31519.14	24804.99	3833.21
48	18246.69	8883.57	6663.91	11264.73	3549.30
60	6667.37	16652.79	12765.37	12028.51	2905.99
72	17448.43	14669.35	9103.77	13740.52	2453.25
84	14985.47	8096.78	5224.31	9435.52	2896.21
96	13305.21	18408.87	6327.32	12680.47	3501.60
108	23767.34	11719.83	25656.29	20381.15	4364.85
120	12843.10	11403.66	1200.68	8482.48	3664.53
132	4578.10	8339.14	9644.19	7520.48	1518.66
144	2318.79	3034.95	13583.33	6312.36	3641.35
156	20340.82	10862.40	21149.37	17450.86	3302.48
168	18650.61	27989.04	17553.62	21397.76	3310.82

หมายเหตุ ผลที่แสดงในตารางที่ ง.7-ง.9 บางตัวอย่างมีค่า SEM ค่อนข้างสูง เนื่องจากเป็นการทดลองในพื้นที่จริงซึ่งไม่สามารถควบคุมปัจจัยทางสภาพแวดล้อมได้ ถึงแม้ว่าในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะเก็บจากบริเวณเดียวกัน แต่ในช่วงการทดลอง PUF- packages แต่ละชิ้นกระจายอยู่บนผิวหน้าน้ำขังใต้ห้องเรือ และเคลื่อนที่ไปอย่างอิสระในห้องเครื่องยนต์เรือประมง ตามแรงคลื่น การสูบน้ำใต้ห้องเรือ และขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเจ้าของเรือ ดังนั้นโฟมแต่ละชิ้นจึงดูดซับปริมาณน้ำมันไม่เท่ากัน เช่น ถ้าชิ้นโฟมอยู่บริเวณใต้ฐานเครื่องยนต์เรือซึ่งเป็นบริเวณที่มีน้ำมันรั่วไหล โฟมชิ้นนั้นก็จะดูดซับน้ำมันปริมาณมาก หรือถ้าอยู่ตรงท่อส่งน้ำออกนอกตัวเรือ ปริมาณน้ำมันที่ถูกดูดซับบนชิ้นโฟมจะมีค่าน้อย เนื่องจากถูกเจือจางเพราะแรงสูบน้ำ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจิรภัทร จันทมาลี เกิดเมื่อวันที่ 26 เมษายน 2518 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี (เกียรตินิยมอันดับ 2) ปริญญาโท และระดับปริญญาเอก จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2540 2543 และ 2554 ตามลำดับ ปัจจุบันทำงานในตำแหน่ง ข้าราชการพลเรือนในสถาบันอุดมศึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี

การเผยแพร่ผลงานวิชาการ

1. **Chanthamalee, J. and Luepromchai, E.** 2011. "Biodegradation of lubricating oil contaminated in bilge seawater by Polyurethane Foam-immobilized *Gordonia* sp. JC11". Oral Presentation. EEAT's 10th National Conference on Environment No.10. BP Samila Beach Hotel & Resort, Songkhla, Thailand, 23-25 March 2011.
2. **Chanthamalee, J. and Luepromchai, E.** 2010. "Biodegradation of waste-lubricating oil in seawater by bacteria immobilized on polyurethane foam". Poster Presentation. American Society for Microbiology 110th General Meeting. San Diego, CA, USA, 23-27 May 2010.
3. **Chanthamalee, J. and Luepromchai, E.** 2009. "Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons Contaminated in Seawater by Immobilized Microorganisms". Poster Presentation. Commission on Higher Education Congress II. Dusit Thani Hotel, Pattaya, Chonburi, Thailand, 27-29 August 2009.
4. **Chanthamalee, J. and Luepromchai, E.** 2008. "Biodegradation of Oil in Seawater by Immobilized Bacterial Cells. Poster Presentation". Commission on Higher Education Congress I. Ambassador City Jomtien Hotel, Chonburi, Thailand, 5-7 September 2008.
5. **Chanthamalee, J., Thaniyavarn, S. and Luepromchai, E.** 2008. "Isolation and Characterization of Oil-degrading Bacteria from Coastal Areas". Oral Presentation. Sustainable Development to Save the Earth: Technologies and Strategies Vision 2050. 11 – 13 December 2008, Millennium Hilton Bangkok Hotel, Bangkok, Thailand.