

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นจากน้ำเสีย  
สถานีบริการน้ำมัน



นางสาวนฤมล นันทกิจโกศล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CONSORTIUM CAPABLE OF  
DEGRADING LUBRICANT OIL FROM GAS STATION WASTEWATER

Miss Narumol Nantakitkosol

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

**522309**



นฤมล นันทกิจโกศล: การคัดแยกและลักษณะสมบัติของกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นจากน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน. (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CONSORTIUM CAPABLE OF DEGRADING LUBRICANT OIL FROM GAS STATION WASTEWATER) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน, อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง, 109 หน้า.

งานวิจัยนี้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย เพื่อนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน กลุ่มแบคทีเรียคัดแยกได้จากน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันสวนลุมพินี ให้ชื่อว่า กลุ่มแบคทีเรีย SL ประกอบด้วยแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ SLY SL15 SL17 และ SL27 เมื่อจำแนกชนิดด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ พบว่าแบคทีเรียทั้งสี่เป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingobium* sp. *Acinetobacter* sp. *Ochrobactrum* sp. และ *Alcaligenes* sp. ตามลำดับ โดยที่กลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้คงเหลือ 34% เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำมันเริ่มต้น 100 มก.ต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สำหรับส่วนเซททูเรท และส่วนอะโรมาติก พบว่า สามารถย่อยสลายได้คงเหลือ 35 และ 32% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาแบคทีเรียบริสุทธิ์พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันและองค์ประกอบต่างๆ ได้เช่นกัน โดยแบคทีเรีย SLY ย่อยสลายได้ใกล้เคียงกับกลุ่มแบคทีเรียที่เหมาะสมในการย่อยสลายเมื่อทดสอบในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน คือ ที่ปริมาณน้ำมัน 50 มก.ต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 10 มก.ต่อลิตร ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 1 มก.ต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 และ อุณหภูมิ 35 °ซ หากเปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำมันของกลุ่มแบคทีเรีย SL และแบคทีเรีย SLY ที่เหมาะสม พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SL ย่อยสลายน้ำมันได้คงเหลือ 31% ในขณะที่แบคทีเรีย SLY ให้ผลการย่อยที่ลดลง เมื่อศึกษาการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นในน้ำเสียจริงด้วยระบบจำลองแบบต่างๆ พบว่า เมื่อผ่านไป 7 วัน การเติมกลุ่มแบคทีเรีย SL ไม่ได้เพิ่มผลการย่อยให้ดีขึ้น แต่หากปรับภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมแล้วจะสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ดีกว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้ เมื่อติดตามพลวัตประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย SL พบว่า ประชากรภายในกลุ่มสามารถเจริญได้ตลอดระยะเวลาที่ทดลอง และเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นเมื่อเจริญในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน

ภาควิชา..... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย..... ลายมือชื่อนิสิต..... นฤมล นันทกิจโกศล.....

สาขาวิชา..... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา..... 2552..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 4972334423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: BIODEGRADATION / BACTERIAL CONSORTIUM / LUBRICANT OIL / WASTEWATER

NARUMOL NANTAKITKOSOL : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CONSORTIUM CAPABLE OF DEGRADING LUBRICANT OIL FROM GAS STATION WASTEWATER. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D., 109 pp.

The main objective of this study aims to isolate bacterial consortium capable of degrading lubricant oil in gas station wastewater. Consortium SL was isolated from Suan Lumpini gas station's wastewater comprised of four bacteria SLY, SL15, SL17 and SL27. Base on their 16S rDNA sequences along with morphological and biochemical characteristics these strains were identified as members belongs to the genus of *Sphingobium* sp. *Acinetobacter* sp. *Ochrobactrum* sp. and *Alcaligenes* sp., respectively. As for their abilities in the biodegradation of oil, when such consortium was incubated in synthetic oil/water emulsion at initial oil concentration of 100 mg/L for 7 days at room temperature, the oil level was reduced down to 34% while 35 and 32% were also observed in case of saturate and aromatic fractions. It was also found that strain SLY individually can also degraded lubricant oil as well as the other two fractions. The optimal condition for biodegradation were initial oil concentration of 50 mg/L, nitrogen content of 10 mg/L and phosphorus content of 1 mg/L at pH 7.5 and 35 °C. The consortium SL reduced lubricant oil at the optimal condition to 31% whereas strain SLY failed to enhance the effect. Microcosms experiment was carried out to study its degrading ability in gas station wastewater by adjusting initial oil concentration to 50 mg/L. After 7 days, the system supplemented with consortium SL showed higher degradation than natural attenuation. Result from DGGE revealed dynamic of bacterial population in this consortium and confirmed the present of consortium SL with more dominance than indigenous microorganisms throughout the entire period of study.

Department : ..... Microbiology ..... Student's signature *Narumol Nantakitkosol* .....

Field of Study : Industrial Microbiology ..... Advisor's signature *Suthep Thaniyavarn* .....

Academic Year : ..... 2009 ..... Co-advisor's signature *Onruthai Pinyakong* .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนการอบรมสั่งสอนด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย และดร. อัญชญา พัฒนสุพงษ์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย ที่ให้ความช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ ตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่น่ารัก และสมาชิกห้องวิจัย 448 ทุกคนที่เอาใจใส่ ให้กำลังใจ และช่วยเหลือผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา ทำให้ผู้วิจัยรู้สึกประทับใจ และมีช่วงเวลาที่ดีตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง ที่เป็นแรงบันดาลใจ รวมถึงคอยสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2. ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	3
2.1 น้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน.....	3
2.2 น้ำมันหล่อลื่น.....	11
2.3 วิธีการบำบัดน้ำเสีย.....	15
2.4 การบำบัดโดยกระบวนการทางชีวภาพ.....	17
2.5 การย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์.....	21
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	27
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	27
เคมีภัณฑ์.....	28
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	31
3.1 การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย น้ำมันหล่อลื่น.....	31
3.2 การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำเสียตัวอย่าง.....	33
3.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่ม แบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์.....	34

3.4 การจำแนกอนุกรมวิธานของแบคทีเรียบริสุทธิ์จากกลุ่มแบคทีเรีย ที่คัดแยกได้.....	37
3.5 การหาภาวะเหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่ม แบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์.....	38
3.6 การหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่ม แบคทีเรียในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน.....	40
3.7 ติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.....	42
4. ผลการทดลอง.....	47
4.1 ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียสถานี บริการน้ำมัน.....	47
4.2 การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย น้ำมันหล่อลื่น.....	48
4.3 การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียบริสุทธิ์จากกลุ่ม แบคทีเรีย SL.....	49
4.4 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่ม แบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	53
4.5 ผลการหาภาวะเหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่ม แบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์.....	58
4.6 การหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย ในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน.....	64
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	71
รายการอ้างอิง.....	80
ภาคผนวก.....	88
ภาคผนวก ก.....	89
ภาคผนวก ข.....	91
ภาคผนวก ค.....	97
ภาคผนวก ง.....	100



บทที่	หน้า
ภาคผนวก จ.....	108
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	109

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า	
2.1	แสดงสารมลพิษที่เกิดจากกิจกรรมเกี่ยวกับรถของสถานีบริการน้ำมัน.....	4
2.2	มาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากสถานีบริการน้ำมันเชื้อเพลิง .....	8
2.3	ความเข้มข้นของสารมลพิษจากน้ำเสียจากการล้างรถ และกิจกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	9
2.4	ความเข้มข้นของสารมลพิษในน้ำเสียจากเครื่องล้างรถอัตโนมัติในประเทศสวีเดน.....	10
2.5	ประเภทของสารเติมแต่งในน้ำมันหล่อลื่น.....	14
2.6	ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้.....	21
3.1	ตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้เพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้	31
3.2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA เพื่อนำไปติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis .....	46
4.1	ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน.....	47
4.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียบริสุทธิ์ของกลุ่มแบคทีเรีย SL.....	49
4.3	สมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียบริสุทธิ์ของกลุ่มแบคทีเรีย SL.....	51
5.1	ปริมาณน้ำมันหล่อลื่น และปริมาณไฮโดรคาร์บอนแต่ละส่วนจากการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย SL และแบคทีเรียบริสุทธิ์ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	73
5.2	ภาวะเหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	75
5.3	ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นคงเหลือจากการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน.....	78

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบที่พบในสารหล่อลื่นพื้นฐาน.....	12
2.2 วิธีการย่อยสลายสารอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย.....	22
2.3 วิธีการย่อยสลายสารกลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย.....	23
4.1 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยกลุ่มจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำเสียจากสถานีบริการน้ำมัน .....	48
4.2 ลักษณะโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.	50
4.3 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	53
4.4 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยแบคทีเรีย SL15 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	54
4.5 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยแบคทีเรีย SL17 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	55
4.6 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยแบคทีเรีย SL27 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	56
4.7 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยแบคทีเรีย SLY ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	57
4.8 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	58
4.9 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเมื่อใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่แตกต่างกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	59
4.10 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเมื่อใช้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	61
4.11 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	62
4.12 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่อุณหภูมิแตกต่างกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	63
4.13 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นโดยกลุ่มแบคทีเรีย SL กับแบคทีเรีย SLY ในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่มีการปรับภาวะแวดล้อมแล้ว.....	65
4.14 DGGE analysis ของ 16S rDNA แสดงพลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย SL ในน้ำเสียสังเคราะห์เปรียบเทียบกับ แบคทีเรีย SLY ในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20-70% denaturant.....	66

ภาพที่	หน้า
4.15	67
4.16	69
4.17	70
ค.1	97
ค.2	98
ค.3	99
ง.1	100
ง.2	102
ง.3	104
ง.4	106
จ.1	108

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
ซม.	=	เซนติเมตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
:	=	อัตราส่วนต่อ
bp	=	base pair
x	=	เท่าทวีคูณ
CFCs	=	สารคลอโรฟลูออโรคาร์บอน
CFU	=	colony forming unit
PAHS	=	พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน