ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรายทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน

เรือเอก นภดล สว่างนาวิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-2108-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF SURFACTANTS ON CRUDE-OIL DEGRADATION BY MICROORGANISMS ISOLATED FROM PETROLEUM-CONTAMINATED MARINE SAND

Lieutenant Nopbhadol Sawarngnavin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-53-2108-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรายทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน
โดย	เรือเอกนภดล สว่างนาวิน
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีรุ้ง ปรีชานนท์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นภดล สว่างนาวิน, เรือเอก : ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรายทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน (EFFECTS OF SURFACTANTS ON CRUDE-OIL DEGRADATION BY MICROORGANISMS ISOLATED FROM PETROLEUM-CONTAMINATED MARINE SAND)
อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน
167 หน้า ISBN 974-53-2108-7

ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 2 ชนิด (แรมโนลิพิด ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และเซอร์แฟคติน ผลิตจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK1) และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ 2 ชนิด (ไตรตอนเอ็กซ์-100 และสารเคมีขจัดคราบน้ำมันเคมเทค 307) ต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบเมอร์บานชนิดเบา โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากทรายทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันบริเวณชายหาดหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และชายหาดพัทยา จังหวัดชลบุรี พบไอโซเลต HU2 จากชายหาดหัวหิน มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ จำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานด้วยการวิเคราะห์ 16S rDNA ของไอโซเลต HU2 เป็นแบคทีเรียสกุล *Brevundimonas* ด้วยความคล้ายคลึง 99.3% และให้ชื่อว่า *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 มีลักษณะรูปร่างท่อนสั้นโค้ง ติดสีแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ ทนเค็มได้10% ไม่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ การทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนสามารถย่อยสลายอัลเคนที่เป็นโซ่ตรงสายยาว และน้ำมันหลายชนิดได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนและสารลดแรงตึงผิวได้ ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ ในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำทะเลและทรายทะเลปลอดเชื้อ ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 1 % ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. นับจำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้น และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่โดยใช้ FTIR และ GC-FID พบว่า ภายในเวลา 8 วัน ปริมาณน้ำมันดิบถูกย่อยสลายเหลือ 10.41 % เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำมันดิบที่ย่อยสลายทางกายภาพเหลืออยู่ 77.83 % ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิว 4 ชนิดลงไปในการเลี้ยงเชื้อพบว่า ที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่เท่ากัน (78.6 ตร.ซม.) ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่า CMC แรมโนลิพิด เซอร์แฟคติน และเคมเทค 307 สามารถเพิ่มการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อได้เร็วขึ้นกว่าไม่มีการเติม โดยไม่พบปริมาณน้ำมันดิบในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนไตรตอนเอ็กซ์-100 และ การเติมแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ไม่พบปริมาณน้ำมันดิบในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับการย่อยสลายทางกายภาพเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวในวันที่ 4 ถูกย่อยสลายไปเหลือ 53.39-61.09 % เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นเท่ากับหรือน้อยกว่าค่า CMC (และที่ความเข้มข้นเท่ากัน 0.01 %) การเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบจะเกิดขึ้นได้ แต่ช้ากว่าที่ความเข้มข้นสูงกว่าค่า CMC นอกจากนี้ยังพบว่า ธาตุอาหารในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ด้วย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572331123 : MAJOR INDUSTRAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS : BIOSURFACTANTS / CRUDE-OIL / *Brevundimonas* sp. / BIODEGRADATION / CMC

NOPBHADOL SAWARNGNAVIN, LT: EFEFCTS OF SURFACTANTS ON CRUDE-OIL DEGRADATION BY MICROORGANISMS ISOLATED FROM PETROLEUM-CONTAMINATED MARINE SAND. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. JIRAPORN THANIYAVARN., THESIS COADVISOR : ASST.PROF.SUTHEP THANIVAVARN, Ph.D. 167 pp. ISBN 974-53-2108-7

A study was conducted to persue the effects of two biosurfactants (rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain A41, and surfactin produced by *Bacillus subtilis* strain BBK1) and two synthetic surfactants (triton X-100, and oil-spill dispersant Chemtec 307) on Murban light crude-oil biodegradation by microorganisms isolated from petroleum-contaminated sand from Hua-Hin beach, Prachuabkhirikhan province and Pattaya beach, Chonburi province, Gulf of Thailand. It was found that bacterial isolate HU2 from Hua-Hin beach sand had the highest activity of crude-oil degradation. On the taxonomic indentification by 16S rDNA sequcnce analysis, isolate HU2 has 99.3% homology with the bacterium in the genus *Brevundimonas* and was therefore designated as *Brevundimonas* sp. strain HU2. Morphological and biochemical studies revealed a thin- bended and short rod-shaped organism, Gram negative, non-motility, 10% halotolerance, and non-biosurfactant - producer. This strain is able to utilize long straight chain *n*-alkane and various petroleum products, but failed to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and surfactants. Investigation of crude-oil biodegradation by the present strain was performed in BH broth supplemented with 1 % crude-oil and both sterile seawater and marine sand, pH 7.5 at 200 rpm agitation, 30°C, while bacterial growth was determined by viable plate count and residual oil were analysed by FTIR and GC-FID. After 8 days of biodegradation, the starting oil content was decreased down to 10.41 %, while that of abiotic degradation was found to be 77.83 %. Enhancement of biodegradation by the addition of 4 surfactants at a concentration equivalent to activity of oil displacement 78.6 cm^2 and above their respective CMCs, rhamnolipid, surfactin, and Chemtec 307 enhanced the bacterial populations and completely oil degraded within 2 days, triton X -100 on the other hand achieved in 3 days. Augmentation of biosurfactant-producers (*P.aeruginosa* strain A41 and *B.subtilis* strain BBK1) also took 3 days to achieved the same result. As of abiotic control with surfactants addition after 4 days a 53.39-61.39 % of oil still. In addition, if surfactants were added at a concentration equal to or below the CMC (and at 0.01% concentration), an even slower rate of degradation was observed. It is also observed the present of nutrients in seawater and cultivation medium gave positive effects toward crude-oil biodegradation.

Department Microbiology Student's signature.....

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature.....

Academic year 2004 Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้วิชาการความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญาที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบและขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาฯ ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำ ทำให้ผู้วิจัยเกิดภูมิปัญญาในการดำเนินการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณครูพลเรือตรีหญิงกัลยา อำนวย และพลเรือเอก ศาสตราจารย์ ดร. อุดมสวัสดิ์ เอกภูม ผู้ริเริ่มโครงการวิจัยการนำแบคทีเรียทะเลไปใช้ย่อยสลายคราบน้ำมันในทะเล ที่ได้กรุณาสนับสนุนให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสเข้ารับการศึกษาที่สูงขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณกุลธิดา สว่างนาวิน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือพิมพ์วิทยานิพนธ์ และนาวาเอกศิวะคเณศ สว่างนาวิน ที่กรุณารวบรวมและให้ข้อมูลการกำจัดคราบน้ำมันในทะเล

ขอขอบคุณ เรือโทอนิวัตร ปัสสาโก ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR คุณบุษยมาศ บุญสนิท ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID SIMDIST คุณบังอร วัฒนาอำไพ ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM คุณขนิษฐา วงษ์นิกร และ คุณสิริภัทร พฤกษ์ไพบูลย์ ในการวิเคราะห์ 16S rDNA และคุณพิเชษฐ์ กล่อมปัญญา ในการช่วยจัดทำ Power Point

ขอขอบคุณ บริษัท ไทยออยส์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำมันดิบเมอร์บานเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของทรายทะเล และหน่วยบริการชีวภาพ ที่ให้ความอนุเคราะห์สำหรับ DNA sequencing

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมี วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี และศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ

ขอขอบคุณ กองทัพเรือ ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยลาราชการไปศึกษาต่อ และกรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือที่ให้การสนับสนุนสารเคมี และการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานวิจัยและพัฒนาการทหารกลาโหม ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนในการช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่เจริญศรี สว่างนาวิน คุณพี่กุลธิดา สว่างนาวิน และคุณพี่นาวาเอกศิวะคเณศ สว่างนาวิน ที่กรุณาให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือ ตลอดจนเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง .... ญ

สารบัญรูป .... ฎ

สัญลักษณ์ และคำย่อ .... ณ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 3

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่ 2 ปริทรรศน์วรรณกรรม..... 6

2.1 น้ำมันดิบ..... 6

2.2 กระบวนการแปรสภาพของน้ำมันดิบในสิ่งแวดล้อมทางทะเล.....14

2.3 ผลกระทบของน้ำมันดิบต่อสิ่งแวดล้อมทางทะเล.....19

2.4 กฎหมายควบคุมภาวะมลพิษจากคราบน้ำมันในประเทศไทย..... 22

2.5 วิธีการขจัดคราบน้ำมันในทะเล..... 23

2.6 หลักการขจัดคราบน้ำมัน 26

2.7 สารเคมีขจัดคราบน้ำมัน..... 29

2.8 สารลดแรงตึงผิว..... 33

2.9 กระบวนการย่อยสลายอัลเคนโดยแบคทีเรีย..... 49

2.10 การวิเคราะห์ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ..... 53

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย..... 57

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย..... 57

เคมีภัณฑ์..... 59

วิธีดำเนินการวิจัย..... 63

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์จากทรายทะเลที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ..... 63
3.2 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของทรายทะเล และน้ำทะเล และน้ำมันดิบ ที่นำมาใช้ในการวิจัย..... 64
3.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลต ที่คัดเลือกไว้..... 69
3.4 การจำแนกทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้..... 73
3.5 การศึกษาสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการวิจัย..... 79
3.6 การศึกษาผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลาย น้ำมันดิบของไอโซเลตที่คัดแยกได้..... 85
3.7 การศึกษาผลของการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถใน การย่อยสลายน้ำมันดิบของไอโซเลตที่คัดแยกได้..... 87
3.8 การศึกษาผลของธาตุอาหารในอาหาร BH และน้ำทะเลต่อความสามารถใน การย่อยสลายน้ำมันดิบของไอโซเลตที่คัดแยกได้เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิว ลงไป..... 87
บทที่ 4 ผลการวิจัย 88
4.1 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์จากทรายทะเลที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ..... 88
4.2 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของทราย ทะเล น้ำทะเลและน้ำมันดิบที่นำมาใช้ในการวิจัย..... 91
4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของไอโซเลตที่คัดเลือกได้.... 96
4.4 ผลการจำแนกทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....108
4.5 ผลการศึกษาสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการวิจัย.....120
4.6 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันโดย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2.....128
4.7 ผลของการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อย สลายน้ำมันดิบโดย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์HU2 130
4.8 ผลการศึกษาผลของธาตุในอาหาร BH และน้ำทะเล ต่อความสามารถในการ ย่อยสลายน้ำมันดิบโดย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2.....138

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย 140
5.1 อภิปรายผลการวิจัย.....140
5.2 สรุปผลการวิจัย.....146
รายการอ้างอิง 148
ภาคผนวก 157
ภาคผนวก ก 158
ภาคผนวก ข 162
ภาคผนวก ค 165
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 167

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ปริมาณน้ำมันดิบ น้ำมันสำเร็จรูปและสินค้าเชื้อเพลิงนำเข้าในปี พ.ศ.2544-2547	2
2.1	ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่แยกจากน้ำมันดิบ	7
2.2	แสดงสูตรโมเลกุลและชื่อของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน	13
2.3	เปรียบเทียบการระเหยของน้ำมันชนิดต่างๆ	15
2.4	อุบัติเหตุน้ำมันรั่วไหลลงสู่น่านน้ำทะเลที่สำคัญในประเทศไทย	28
2.5	ค่าแรงตึงผิวของของเหลวชนิดต่างๆ	35
2.6	เปรียบเทียบสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์	45
2.7	เปรียบเทียบความเป็นพิษ (Toxicity) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์	46
2.8	จุลินทรีย์ที่สามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและไฮโดรคาร์บอนในแหล่งน้ำ	50
2.9	แบคทีเรียทะเลที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	51
2.10	แสดงวิธีที่ใช้วิเคราะห์ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในแหล่งน้ำ	56
3.1	สถานที่เก็บตัวอย่างทรายทะเล เพื่อนำมาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความ สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ	63
3.2	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มจำนวน 16Sr DNA	75
4.1	ผลสรุปการคัดเลือกจุลินทรีย์จากทรายทะเลที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ	89
4.2	ผลสรุปลักษณะไอโซเลตที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบที่คัดเลือกได้	90
4.3	ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของทรายทะเลและน้ำทะเลที่นำมาใช้ในการวิจัย	91
4.4	ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไอโซเลต HU2 (1,425 bp) และสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีอยู่ใน Gene Bank ด้วยโปรแกรม BlastN	112
4.5	แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2.	117
4.6	ผลการทดสอบการใช้ไฮโดรคาร์บอน น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว ชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2	118
4.7	ผลการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนจำนวน 95 ชนิด เป็นแหล่งพลังงานของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 โดยใช้ชุดพิสูจน์แบคทีเรีย GN2 Microplate.	119

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.8 เปรียบเทียบสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้..... 120

4.9 สรุปสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการวิจัย..... 124

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของสารไฮโดรคาร์บอน และไม่ใช่ไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันดิบ	12
2.2	พฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงของน้ำมันเมื่อรั่วไหลลงสู่ทะเล	16
2.3	การฉีดพ่นสารเคมีขจัดคราบน้ำมันจากเรือ	27
2.4	ลักษณะโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว	33
2.5	ลักษณะไมเซลล์ (micelles) ของสารลดแรงตึงผิว	33
2.6	แสดงการหาค่าแรงตึงผิวของของเหลว	34
2.7	การหาค่าความเข้มข้นของจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration, CMC	37
2.8	กระบวนการย่อยสลายอัลเคนโดยแบคทีเรีย	49
2.9	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายอัลเคนโดยแบคทีเรีย	52
3.1	ทรายทะเล บริเวณชายหาดหัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ ชายหาดพัทยา จ.ชลบุรี ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้	66
3.2	น้ำมันดิบเมอร์บานชนิดเบา (Murban light crude-oil) จาก บริษัทไทยออยส์ จำกัด ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้	68
3.3	สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้	81
3.4	การหาค่า CMC หรือค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ ของสารลดแรงตึงผิว ตามวิธีของ Duvnjak, Cooper, and Kosaric (1982)	83
3.5	แสดงวิธีการวัดการกระจายตัวของน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ(1993)	84
4.1	ลักษณะไอโซเลตที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบที่คัดเลือกได้จากบริเวณชายหาดหัวหิน และชายหาดพัทยา บนอาหารแข็ง BH ที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบ	90
4.2	ปริมาณธาตุอาหารสำคัญ ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของทรายทะเล และน้ำทะเล ที่นำมาใช้ในการวิจัย	92
4.3	แสดงผลอินฟราเรดสเปกตรัมของน้ำมันดิบ ก) แสดงผลเป็นค่า %Transmittance ข) แสดงผลเป็นค่า Absorbance	94
4.4	แสดงผลแก๊สโครมาโตแกรมของน้ำมันดิบ	95
4.5	การเจริญของไอโซเลต HU1, HU2 และ HU3 ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร	99

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.6 การเจริญของไอโซเลต PA214, PA226 และ PA415 ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร..... 100

4.7 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย HU และ กลุ่มแบคทีเรีย PA ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร..... 101

4.8 การเจริญของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร..... 102

4.9 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของไอโซเลต และกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับ แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว และชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย..... 103

4.10 แสดงผลอินฟราเรดสเปกตรัม ของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย..... 105

4.11 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลว BH sea ที่มีฟีนอลเรด และเติมน้ำมันดิบจากการเจริญ และการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียที่แยกได้ ที่เวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย และแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว..... 106

4.12 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลว BH sea ที่มีฟีนอลเรด และเติมน้ำมันดิบจากการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียไอโซเลต HU2 ที่เวลา 0,2,4,6 และ 8 วัน..... 107

4.13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,425 bp ของ 16S rDNA ของไอโซเลต HU2 เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS..... 109

4.14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไอโซเลต HU2 เปรียบเทียบกับข้อมูลและเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Brevundimonas vesicularis* สายพันธุ์ LMG 2350 ที่มีอยู่ใน Gene Bank ด้วยโปรแกรม BlastN.... 110

4.15 ลักษณะโคโลนีของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 บนอาหารแข็ง NA sea ที่เวลา 7 วัน โดยวิธี pour plate..... 114

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.16	ลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมลบ ของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	115
4.17	ลักษณะโครงสร้างภายนอก ขนาด รูปร่าง และลักษณะพื้นผิวของ *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 15,000 เท่า	116
4.18	แสดงผลอินฟราเรดสเปกตรัมของสารเคมีขจัดคราบน้ำมัน เคมเทค 307	122
4.19	แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการวิจัย	123
4.20	แสดงค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์	125
4.21	แสดงค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้	126
4.22	แสดงค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement) ของสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นต่างๆ	127
4.23	ผลของชนิดสารลดแรงตึงผิว ที่ความเข้มข้นที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่เท่ากันในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร ต่อการเจริญ และการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Brevundimonas* sp.HU2 เป็นเวลา 4 วัน เปรียบเทียบกับการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว	132
4.24	ผลของชนิดสารลดแรงตึงผิว ที่ความเข้มข้นที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่เท่ากันต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Brevundimonas* sp. HU2 ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร เป็น เวลา 4 วัน เปรียบเทียบกับการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวและ ชุดควบคุมที่เติมสารลดแรงตึงผิวแต่ไม่เติม *Brevundimonas* sp.HU2	133
4.25	ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น เท่ากับค่า CMC และน้อยกว่าค่า CMC ต่อการเจริญ และการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Brevundimonas* sp. HU2 เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% เป็นเวลา 4 วัน	134
4.26	แสดงผลอินฟราเรดสเปกตรัมของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น จากการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% ต่อการเจริญของ *Brevundimonas* sp.HU2 ที่เวลา 1 และ 2 วัน	135

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.27	แสดงผลแก๊สโครมาโตแกรมของชนิดและปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ในน้ำมันดิบ จากการเจริญของ *Brevundimonas* sp. HU2 และชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร ที่เวลา 2 วัน.....	136
4.28	แสดงชนิดและปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ในน้ำมันดิบ จากการเจริญของ *Brevundimonas* sp.HU2 และชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแบคทีเรีย ในอาหาร BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร ที่เวลา 2 วัน.....	137
4.29	ผลของอาหาร BH และ น้ำทะเล ที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร และเติมสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิพิด ที่ความเข้มข้น เท่ากับค่า CMC ต่อการเจริญ และการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Brevundimonas* sp. HU2 เป็นเวลา 4 วัน	139
ค.1	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันดิบกับค่าการดูดกลืนแสงอินฟาเรดที่ความถี่ 2,936-2,916 ต่อซม.....	165
ค.2	เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	166

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์
:	=	อัตราส่วนต่อ
^{o}ซ.	=	องศาเซลเซียส
ชม.	=	ชั่วโมง
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
µg	=	ไมโครกรัม
pg	=	พิโคกรัม
bp	=	base pair
x	=	เท่าทวีคูณ
ซม.	=	เซนติเมตร
ตร.ซม.	=	ตารางเซนติเมตร
CMC	=	Critical Micelle Concentration (ค่าจุดวิกฤตของความเข้มข้นในการเกิดไมเซลล์)
ppm	=	part per million (หนึ่งส่วนในล้านส่วน)
mN/m	=	มิลลินิวตันต่อเมตร
CFU/g	=	Colony Forming Unit per gram
CFU/ml	=	Colony forming Umit per millilitre
IC_{50}	=	median inhibition concentration (ความเข้มข้นที่ยับยั้งไม่ให้จุลินทรีย์เจริญได้ครึ่งหนึ่ง)
LD_{50}	=	Median Lethal dose. (ปริมาณที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง)
µV	=	micro Volt
U	=	ยูนิตของเอนไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย