



## โครงการ

### การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ตรึงบน aquaporous gel ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ  
Crude oil removal efficiency of *Sphingobium* sp. MO2-4 and *Bacillus megaterium* TL01-2 immobilized on aquaporous gel under various environmental conditions

**ชื่อนิสิต** นางสาวปริญญาพร วิเสสสาระกุล **เลขประจำตัว** 5832334023

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2561

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการที่ขึ้นทะเบียนในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการ

ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ตรึงบน aquaporous gel ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ

โดย

นางสาวปริญญาพร วิเสสสาระกุล รหัสประจำตัวนิสิต 5832334023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.อรุทัย ภิญญาคง

ปีการศึกษา

2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

 หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ

 อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุทัย ภิญญาคง)

 กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวิธ ลือพร้อมชัย)

 กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

## โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ตรึงบน aquaporous gel ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ชื่อนิสิต นางสาวปริญญาพร วิเสสสารกุล รหัสประจำตัวนิสิต 5832334023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.อรุทัย ภิญญาคง

### บทคัดย่อ

การปนเปื้อนน้ำมันดิบในทะเลเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ และ สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อภาคเศรษฐกิจอีกด้วย งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการกำจัดน้ำมันดิบด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้แบคทีเรียเลี้ยงร่วมระหว่าง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ที่แยกได้จากฟองน้ำบริเวณอ่าวไทย วัตถุประสงค์ของงานคือ ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ที่ตรึงบน aquaporous gel ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน ซึ่งงานวิจัยนี้ให้ความสนใจต่อสถานะการเติมสารอาหารให้แก่แบคทีเรีย และสภาวะที่มีการใช้สารกระจายคราบน้ำมัน เนื่องจากสารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้นการเติมสารอาหารมีแนวโน้มที่จะเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบได้ ส่วนสารกระจายคราบน้ำมันนั้นมีส่วนช่วยในการแตกตัวน้ำมันให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งช่วยให้แบคทีเรียมีการเข้าถึงน้ำมันดิบได้มากขึ้น มีแนวโน้มในการกำจัดน้ำมันดิบที่ดีขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาถึงปัจจัยเสริมทั้งสองนี้ที่มีผลต่อ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ที่ตรึงบน aquaporous gel ในการกำจัดน้ำมันดิบ และแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบ

**Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University**

Project title The crude oil removal efficiency of *Sphingobium* sp. MO2-4 and *Bacillus megaterium* TL01-2 immobilized on aquaporous gel under various environmental conditions

Student Miss Prinyaporn Wisetsarakun ID 5832334023

Advisor Assoc. Prof. Dr. Onruthai Pinyakong

---

**Abstract**

Crude oil contamination in marine is a problem that can affect human health, animals, environment and economic damage. This research focuses on bioremediation by co-culture between *Sphingobium* sp. MO2-4 and *Bacillus megaterium* TL01-2 isolated from sponges in the Gulf of Thailand to remove crude oil. In this study, the purpose aims to determine the efficiency of crude oil removal by *Sphingobium* sp. MO2-4 and *Bacillus megaterium* TL01-2 immobilized on aquaporous gel under various conditions (adding nutrients and dispersant). Nutrients are essential to the bacterial growth. Therefore, adding nutrients is likely to increase amount of bacteria and the efficiency of crude oil removal. The dispersant is the tool for break down the oil into small sizes so it trends to enhance the bacterial efficiency for remove crude oil. Therefore, this research is interested in thow conditions that affect *Sphingobium* sp. MO2-4 and *Bacillus megaterium* TL01-2 immobilized on the aquaporous gel for crude oil removal and tendency to in the remediation of crude oil contaminated site.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยการได้รับความช่วยเหลือและการสนับสนุนจาก รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการและต่อผู้วิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ถ่ายทอดความรู้ต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโครงการวิจัย “การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ทนโลหะหนักจากฟองน้ำทะเล บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และการพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อม” ที่ช่วยสนับสนุนการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวชนกภรณ์ เมืองจินดา, นายอดิสรณ์ รัชชิรัญรัตน์ และสมาชิกห้อง 1704/15 ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆในการดำเนินการทดลอง ตลอดจนการเขียนเล่มโครงการงานวิจัยครั้งนี้

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และสารเคมี	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	16
บทที่ 5 สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	31
ภาคผนวก ข	33
ภาคผนวก ค	43

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ปัญหาการรั่วไหลของน้ำมันดิบและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนลงสู่ทะเล ในปี พ.ศ. 2556-2560	1
1.2 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย	4
1.3 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของจุลินทรีย์เมื่อมีการเติมสารอาหาร	6
4.1 ปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุตั้งที่เขย่าด้วยความเร็วต่างๆ	16
ข-1 ข้อมูลดิบปริมาณเชื้อในการทดลองประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ของวัสดุตั้งที่แปรผันความเร็ว ในการเขย่า	33
ข-2 ข้อมูลดิบปริมาณเชื้อในการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ	34
ข-3 ข้อมูลดิบปริมาณเชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติม สารอาหาร	37
ข-4 ข้อมูลดิบปริมาณเชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติม สารกระจายคราบน้ำมัน	40
ค-1 ข้อมูลดิบพื้นที่ได้กราฟการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ	44
ค-2 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรีย	44
ค-3 ข้อมูลดิบพื้นที่ได้กราฟการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติม สารอาหาร	46
ค-4 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรียภายใต้สภาวะการเติมสารอาหาร	47
ค-5 ข้อมูลดิบพื้นที่ได้กราฟการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติม สารกระจายคราบน้ำมัน	48
ค-6 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรียภายใต้สภาวะการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน	49

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
4.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ NSM ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุม วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 วันที่ 0 (ข), ชุดทดลองที่มี <i>B. megaterium</i> TL01-2 วันที่ 0 (ค), ชุดควบคุม วันที่ 7 (ง), ชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 วันที่ 7 (จ) และชุดทดลองที่มี <i>B. megaterium</i> TL01-2 วันที่ 7 (ฉ)	17
4.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ NSM ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุม วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 0 (ข), ชุดควบคุม วันที่ 7 (ค), ชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 7 (ง), ชุดควบคุมที่มีวัสดุตรึง วันที่ 0 (จ), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตรึง <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 วันที่ 0 (ฉ), ชุดควบคุมที่มีวัสดุตรึง วันที่ 7 (ช) และชุดทดลองที่มีเซลล์ตรึง <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 วันที่ 7 (ซ)	18
4.3 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของน้ำทะเลกรองที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุม วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 0 (ข), ชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ที่มีการเติมสารอาหาร ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 0 (ค), ชุดควบคุม วันที่ 7 (ง), ชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 7 (จ) และชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ที่มีการเติมสารอาหาร ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 7 (ฉ)	20
4.4 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของน้ำทะเลกรองที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุมที่มีวัสดุตรึง วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตรึง <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 วันที่ 0 (ข), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตรึง <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ที่มีการเติมสารอาหาร วันที่ 0 (ค), ชุดควบคุมที่มีวัสดุตรึง วันที่ 7 (ง), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตรึง <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 วันที่ 7 (จ) และชุดทดลองที่มีเซลล์ตรึง <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ที่มีการเติมสารอาหาร วันที่ 7 (ฉ)	21
4.5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ NSM ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุม วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 0 (ข), ชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 0 (ค), ชุดควบคุม วันที่ 7 (ง), ชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 7 (จ) และชุดทดลองที่มี <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 7 (ฉ)	23



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
4.6 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ NSM ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุมที่มีวัสดุตั้ง วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 วันที่ 0 (ข), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน วันที่ 0 (ค), ชุดควบคุมที่มีวัสดุตั้ง วันที่ 7 (ง), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 วันที่ 7 (จ) และชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>B. megaterium</i> TL01-2 ที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน วันที่ 7 (ฉ)	24
ข-1 กราฟแสดงปริมาณของเชื้อ <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในวันที่ 0 และวันที่ 7 ของการทดลอง	36
ข-2 กราฟแสดงปริมาณเชื้อของการทดลองการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารอาหาร ในวันที่ 0 และวันที่ 7	39
ข-3 กราฟแสดงปริมาณเชื้อของการทดลองการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน ในวันที่ 0 และวันที่ 7	42
ค-1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นน้ำมันดิบ	43
ค-2 กราฟแสดงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของเชื้อ <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 และ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 หลังจากทำการทดลอง 7 วัน	45
ค-3 กราฟแสดงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารอาหาร หลังจากทำการทดลอง 7 วัน	47
ค-4 กราฟแสดงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน หลังจากทำการทดลอง 7 วัน	49

## บทที่ 1 บทนำ

น้ำมันดิบจัดเป็นกลุ่มปิโตรเลียมเหลวที่ประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด เช่น กลุ่มอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกันเป็นสาย กลุ่มสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งสารเหล่านี้มีความเป็นพิษ สามารถสะสมในสิ่งมีชีวิต มีฤทธิ์เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ และสารก่อมะเร็ง (Varjani และ Upasani, 2016) อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำมันดิบไปผ่านกระบวนการกลั่นจะได้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ และนำมาใช้ประโยชน์เป็นแหล่งพลังงาน เช่น ก๊าซหุงต้ม น้ำมันดีเซล น้ำมันก๊าด เป็นต้น จึงทำให้น้ำมันดิบเป็นที่นิยมและถูกขุดเจาะมาใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งการขุดเจาะอาจก่อให้เกิดปัญหาการรั่วไหลของน้ำมันดิบปนเปื้อนลงสู่ทะเล นอกจากนี้ปัญหาการลักลอบทิ้งน้ำมันดิบก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันในทะเล ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้น โดยน้ำมันดิบจะไปปิดผิวหน้า น้ำ ทำให้ออกซิเจนในน้ำลดลง ซึ่งเป็นเหตุให้พืชและสัตว์ตายได้ รวมถึงยังเป็นพิษต่อนก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือสัตว์ทะเลอื่นๆอีกด้วย อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อระบบห่วงโซ่อาหาร และนำมาสู่ผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ ไม่ว่าจะเป็ด ไต ตับ หรือปอด (Xue และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังทำให้ชายหาดและทัศนียภาพทางทะเลเสียหายอีกด้วย ซึ่งสาเหตุการปนเปื้อนส่วนใหญ่มักมาจากการรั่วไหลของน้ำมันดิบในระหว่างการขุดเจาะ การขนส่ง และการลักลอบทิ้งน้ำมันดิบลงสู่ทะเล ดังตัวอย่างตารางที่ 1.1 ซึ่งแสดงถึงปัญหาน้ำมันรั่วไหลลงสู่ทะเลในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2560 พร้อมทั้งวิธีการดำเนินการแก้ปัญหา

**ตารางที่ 1.1** ปัญหาการรั่วไหลของน้ำมันดิบและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนลงสู่ทะเลในปี พ.ศ. 2556-2560

วัน เดือน ปี	น้ำมันที่รั่วไหล (ปริมาณ)	สถานที่	สาเหตุ	การดำเนินงาน	อ้างอิง
27 กรกฎาคม 2556	น้ำมันดิบ (ประมาณ 50 ตัน)	บริเวณท่ารับน้ำมันดิบกลางทะเลพื้นที่จังหวัดระยอง	รั่วไหลจากท่อรับน้ำมันดิบรั่วบริเวณท่า SPM บริษัท PTTGC	- วางทุ่นกักคราบน้ำมันแบบบาน (Curtain Boom) และใช้เครื่องเก็บคราบน้ำมันแบบทำนบ (Wier Skimmer) - ฉีดพ่นสารเคมีขจัดคราบน้ำมัน (Dispersant)	กรมเจ้าท่า. (2556)
15 มีนาคม 2557	คราบน้ำมันสีดำ (ลักษณะของเหลวและก้อนน้ำมัน)	บริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี	สันนิษฐานเกิดจากการลักลอบทิ้งจากเรือ	ถูงดำ รถแบ็คโฮ รถบรรทุกเก็บรวบรวมวัตถุเปื้อนคราบน้ำมัน และกำจัด	กรมเจ้าท่า. (2557)
26 มีนาคม 2557	น้ำมันเตา	เขตท่าเรือศรีราชา จังหวัดชลบุรี	ไม่ทราบ	ฉีดพ่นสารเคมีขจัดคราบน้ำมัน (Dispersant)	กรมเจ้าท่า. (2557)

ตารางที่ 1.1 ปัญหาการรั่วไหลของน้ำมันดิบและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนลงสู่ทะเลในปี พ.ศ. 2556-2560 (ต่อ)

วัน เดือน ปี	น้ำมันที่รั่วไหล (ปริมาณ)	สถานที่	สาเหตุ	การดำเนินงาน	อ้างอิง
27 ตุลาคม 2558	น้ำมันเตา	บริเวณชายหาดหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	ลักลอบทิ้ง	ทำความสะอาดชายฝั่งด้วยกำลังคนพร้อมด้วยวัสดุดูดซับคราบน้ำมัน (Absorbent material)	กรมเจ้าท่า. (2558)
26 กุมภาพันธ์ 2559	น้ำมันหล่อลื่นสีดํา (ไม่เกิน 3,000 ลิตร)	เขตท่าเรือแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี	เรือโดยสาร OCEAN DREAM สัญชาติโตโกจม	- วางทุ่นกักคราบน้ำมันแบบม่าน (Curtain Boom) - ฉีดพ่นสารขจัดคราบน้ำมัน (Dispersant)	กรมเจ้าท่า. (2559)
26 กันยายน 2559	คราบน้ำมันสีดําและขยะเปื้อนคราบน้ำมัน	ชายฝั่งท่าหนักกรมหลวงชุมพรเขตอุดมศักดิ์ จังหวัดสมุทรสาคร	ลักลอบทิ้ง	- ใช้สารเคมีขจัดคราบน้ำมัน - ขยะเปื้อนคราบน้ำมันเก็บใส่ถุงดำชนิดหนา และนำไปกำจัด	กรมเจ้าท่า. (2559)
30 มกราคม 2560	High Fuel Oil คราบน้ำสีดํา (เป็นแนวยาวประมาณ 100 เมตร)	ท่าเรือแหลมฉบัง C1	รั่วไหลจากเรือบรรทุกสินค้าชื่อ AKARI สัญชาติไลบีเรีย	- กักและเก็บคราบน้ำมันด้วยทุ่นกักน้ำมัน (Boom) และเครื่องเก็บคราบน้ำมัน (Skimmer) - ฉีดพ่นสารเคมีขจัดคราบน้ำมันทางเรือ	กรมเจ้าท่า. (2560)

ในปัจจุบันมีวิธีการกำจัดน้ำมันดิบที่รั่วไหลได้หลากหลายวิธี เช่น วิธีทางกายภาพ ได้แก่ การใช้ทุ่นกักน้ำมัน การเผาทำลาย การใช้เครื่องจักรหรือใช้แรงงาน และการใช้วัสดุดูดซับ วิธีทางเคมี ได้แก่ การใช้เจล การใช้เครื่องปั่นแยกน้ำมัน การใช้สารลดแรงตึงผิว หรือสารกระจายคราบน้ำมัน และวิธีทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดน้ำมันดิบ ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัย และไม่ส่งผลทำลายสิ่งแวดล้อม (Varjani, 2017)

โดยทั่วไปเมื่อเกิดการรั่วไหลของน้ำมันดิบ ขั้นแรกในการกำจัดน้ำมันดิบมักใช้วิธีทางกายภาพ จากนั้นจึงใช้วิธีการกำจัดด้วยวิธีทางเคมีเป็นลำดับถัดมา หรืออาจใช้ควบคู่กันไป แต่การกำจัดน้ำมันดิบด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมีอาจเกิดได้อย่างไม่สมบูรณ์ จึงต้องมีการกำจัดน้ำมันดิบด้วยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งการกำจัดน้ำมันดิบหรือการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1) Biostimulation เป็นการเติมสารอาหารให้แก่จุลินทรีย์ช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสาร

2) Bio attenuation หรือ Natural attenuation เป็นกระบวนการบำบัดโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ แล้วติดตามประสิทธิภาพการบำบัด

3) Bioaugmentation เป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารพิษที่ต้องการบำบัด ข้อดีของการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ

1. เป็นกระบวนการธรรมชาติ
2. ในกระบวนการบำบัด ไม่ก่อให้เกิดปัญหาการขนส่ง หรือส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม
3. ประหยัด ค่าใช้จ่ายน้อย
4. การกำจัดในกระบวนการบำบัด อาจเกิดการกำจัดได้อย่างสมบูรณ์ เปลี่ยนสารมลพิษให้เป็นสารที่ไม่อันตราย ไม่เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม
5. ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีที่อันตราย
6. เป็นวิธีที่สะดวก การดำเนินการบำบัดง่าย
7. เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม
8. เป็นวิธีที่มีส่วนช่วยในการรักษาระบบนิเวศตามธรรมชาติ

ข้อเสียของการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ

1. ไม่ทุกชนิดของสารมลพิษหรือสารประกอบที่สามารถกำจัดได้ บางชนิดไม่ไวต่อการกำจัด หรืออาจเกิดการกำจัดที่ไม่สมบูรณ์
2. สารผลิตภัณฑ์ที่ได้บางชนิดอาจเป็นพิษ
3. สภาพในการเกิดกระบวนการกำจัดมีความจำเพาะสูง
4. ใช้เวลานานในการกำจัด หรือการบำบัด

(Abatenh และคณะ, 2017)

การศึกษาวิธีการกำจัดน้ำมันดิบโดยวิธีทางชีวภาพนั้นถูกให้ความสนใจ โดยพบว่าแบคทีเรียมากมายที่มีความสามารถในการกำจัดน้ำมันดิบ ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Hassanshahian และคณะ (2014) ได้คัดแยก *Corynebacterium variabile* PG-Z จากอ่าวเปอร์เซีย และนำมาทดสอบความสามารถในการกำจัดน้ำมันดิบ พบว่าสามารถกำจัดน้ำมันดิบความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ได้ 82 เปอร์เซ็นต์ ใน 1 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้แบคทีเรียผสมมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์อาจช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบได้ เนื่องจากมีกิจกรรมต่างๆ ของเอนไซม์ที่หลากหลาย หรือการทำงานที่ต่างรูปแบบของแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งอาจมีส่วนช่วยเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Li และคณะ (2016) พบว่า *Ochrobactrum* sp. TCOB-1 *Brevundimonas* sp. TCOB-2 *Brevundimonas* sp. TCOB-3 *Bacillus* sp. TCOB-4 และ *Castellaniella* sp. TCOB-5 ที่คัดแยกได้จากทะเลบัวไห้ ประเทศจีน มีความสามารถในการกำจัดน้ำมันดิบ โดย *Bacillus* sp. TCOB-4 สามารถกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิมัลชัน (*n*-alkane) สายกลาง (C17-C23) และสายยาว (C31-C36) ได้ *Castellaniella* sp. TCOB-5 สามารถกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิมัลชัน (*n*-alkane) สาย C24-C30 และอะโรมาติกได้ และเมื่อนำ *Bacillus* sp. TCOB-4 และ *Castellaniella* sp. TCOB-5 มากำจัดน้ำมันดิบร่วมกัน พบว่า สามารถกำจัดน้ำมันดิบความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ 51.87 เปอร์เซ็นต์ ใน 1 สัปดาห์ และงานวิจัยของ Chen และคณะ (2017) พบว่ากลุ่มแบคทีเรียผสม *Exiguobacterium* sp. ASW-1 *Pseudomonas aeruginosa*

ASW-2 *Alcaligenes* sp. ASW-3 *Alcaligenes* sp. ASS-1 และ *Bacillus* sp. ASS-2 สามารถกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ประสิทธิภาพสูงถึง 75.1 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 7 วัน

นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้แบคทีเรียในรูปของเซลล์ตรึง ซึ่งเป็นการนำแบคทีเรียมาตรึงบนวัสดุตรึง สามารถช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะแวดล้อมภายนอก (Shen และคณะ, 2015) และยังสามารถส่งผลให้มีแบคทีเรียใน ปริมาณที่มากขึ้น และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดได้สูงกว่าการใช้แบคทีเรียในรูปเซลล์อิสระ แสดงดัง ตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	ที่มาของ แบคทีเรีย	รูปแบบของ กลุ่มแบคทีเรีย	ประสิทธิภาพ การย่อย	ซับสเตรตที่ย่อย	สภาพควบคุม	อ้างอิง
แบคทีเรียผสมระหว่าง - <i>Ochrobactrum</i> sp. N1 - <i>Brevibacillus parabrevis</i> N2 - <i>Brevibacillus parabrevis</i> N3 - <i>Brevibacillus parabrevis</i> N4	น้ำทะเล และโคลน ปนเปื้อน บีโตร์เลียม จาก Qingdao port. ประเทศ จีน	กลุ่มเซลล์ อิสระ	79 เปอร์เซ็นต์	0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร น้ำมันดิบ	เป็นเวลา 14 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์	Bao และ คณะ (2012)
			13-60 เปอร์เซ็นต์	สารประกอบ แอลเคน C13-C24		
			31.3-36.3 เปอร์เซ็นต์	C37-C38		
			36.2-96.7 เปอร์เซ็นต์	หมู่แอลคิลของ แนฟทาลีน		
			38-55.9 เปอร์เซ็นต์	อะซีแนฟทาลีน และ อะซีแนฟ ทิน		
แบคทีเรียผสมระหว่าง - <i>Exiguobacterium</i> sp. ASW-1 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ASW-2 - <i>Alcaligenes</i> sp. ASW-3 - <i>Alcaligenes</i> sp. ASS-1 - <i>Bacillus</i> sp. ASS-2	น้ำทะเล ปนเปื้อน น้ำมันดิบ จาก Zhejiang coast ประเทศ จีน	กลุ่มเซลล์ อิสระ	61.8 เปอร์เซ็นต์	2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร น้ำมันดิบ	เป็นเวลา 7 วัน อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส pH 7.5	Chen และ คณะ (2017)
		กลุ่มเซลล์ตรึง (วัสดุตรึง Calcium alginate-activated carbon)	64 เปอร์เซ็นต์	2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร น้ำมันดิบ	เป็นเวลา 7 วัน อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส pH 7.5	

ตารางที่ 1.2 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย (ต่อ)

แบคทีเรีย	ที่มาของแบคทีเรีย	รูปแบบของกลุ่มแบคทีเรีย	ประสิทธิภาพการย่อย	ข้อสเตรตที่ย่อย	สภาพควบคุม	อ้างอิง
แบคทีเรียผสมระหว่าง - <i>Pseudomonas</i> sp.PH-1 - <i>Bacillus</i> sp. PH-2 - <i>Ochrobactrum</i> sp. PH-3 - <i>Pseudomonas</i> sp. PH-4	กากตะกอนจาก Shengli oil field	กลุ่มเซลล์อิสระ	26 เปอร์เซ็นต์	3 กรัมต่อลิตรน้ำมันดิบ	เป็นเวลา 5 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 20 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ pH 7	Shen และคณะ (2015)
		กลุ่มเซลล์ตรึง (วัสดุตรึง semi-coke)	47 เปอร์เซ็นต์	3 กรัมต่อลิตรน้ำมันดิบ	เป็นเวลา 5 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 20 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ pH 7	

งานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิคการตรึงเซลล์มาทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบเปรียบเทียบกับแบคทีเรียในรูปเซลล์อิสระ โดยการตรึงเซลล์ควรเลือกวัสดุตรึงที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม มีความจุชีวมวลได้ในปริมาณที่สูง ไม่เป็นพิษต่อเซลล์หรือระบบเอนไซม์ มีความเสถียรและคงทน ทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี ราคาถูก หาง่าย ใช้สะดวก การเตรียมไม่ยุ่งยาก สามารถใช้ซ้ำเซลล์ตรึงได้ และสามารถกำจัดได้ง่ายหลังจากการใช้เสร็จ (Bayat และคณะ, 2015) ซึ่งงานวิจัยนี้เลือกใช้ aquaporous gel เป็นวัสดุตรึงเนื่องจาก aquaporous gel เป็นวัสดุที่ราคาถูก มีรูพรุนและพื้นที่ผิวมาก แบคทีเรียสามารถยึดเกาะได้ดี มีความทนทาน และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Nisshinbo Chemical Inc. ประเทศญี่ปุ่น)

ความสามารถในการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มักมีประสิทธิภาพการกำจัดที่แตกต่างกันไป โดยอาจแปรผันตามปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น หากสภาพแวดล้อมบริเวณนั้นมีค่า pH ที่เหมาะสม อาจส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียให้ดีขึ้น เพิ่มปริมาณมากขึ้น จึงอาจเสริมประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบได้สูงขึ้น หรืออุณหภูมิก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่อาจส่งผลต่อกิจกรรมของแบคทีเรีย รวมถึงอาจมีผลต่อคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันดิบ (Chen และคณะ, 2017) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเข้มข้นของน้ำมันดิบหรือความเค็มของน้ำทะเล ที่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรีย ทั้งนี้ความสำคัญของการศึกษาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันไป เพื่อที่จะนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ และพัฒนาต่อ ซึ่งอาจขยายการใช้งานแบคทีเรียสำหรับการกำจัดน้ำมันดิบในแต่ละบริเวณพื้นที่ที่มีสภาวะแวดล้อมต่างกันได้กว้างขวางมากขึ้น

นอกจากนี้การเติมสารอาหารให้แก่แบคทีเรีย เช่น กลุ่มธาตุไนโตรเจน หรือฟอสฟอรัส ซึ่งในทะเลอาจมีไม่เพียงพอต่อความต้องการของแบคทีเรีย อาจช่วยส่งเสริมให้การกำจัดน้ำมันดิบมีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้มากขึ้น โดยธาตุไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เป็นกลุ่มธาตุที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีน (อาทิ กรดอะมิโน ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ) และพลังงานแก่แบคทีเรีย (อาทิ ATP ซึ่งมีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ) โดยมีงานวิจัยที่มีการทดสอบโดยเติมไนโตรเจนจากแหล่งต่างๆ พบว่า

ไนโตรเจนมีส่วนช่วยในการเจริญของ *Bacillus* sp. 28A และ *Bacillus* sp. 61B และส่งเสริมประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบอีกด้วย (Ijah และคณะ, 1992) ตัวอย่างงานวิจัยที่แสดงผลของการเติมสารอาหารต่อการกำจัดน้ำมันดิบ แสดงดังตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของจุลินทรีย์เมื่อมีการเติมสารอาหาร

สารอาหาร (Fertilizer)	อัตราส่วน / ปริมาณที่ใช้ และ สภาวะการเลี้ยงเชื้อ	จุลินทรีย์	ผลการกำจัด	อ้างอิง
Guono (ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส : โพแทสเซียม อัตราส่วน 14 : 8 : 2)	Guono 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ใน sterile artificial seawater (SAS) 200 มิลลิลิตร ที่มี น้ำมันดิบ 5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	<i>Alcanivorax</i> sp. OK2	การใส่ Guono เสริม ทำให้ ประสิทธิภาพการกำจัด น้ำมันดิบของจุลินทรีย์เพิ่ม มากขึ้น สามารถย่อยได้ $68 \pm 3$ เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ สามารถย่อยได้เพียง $11 \pm 4$ เปอร์เซ็นต์	Knezevich และคณะ (2006)
Inipol EAP 22® (ส่วนประกอบ : - Oleic acid (Hydrophobic phase) - Lauryl Phosphate (Phosphorus source, Surfactant) - 2-Butoxy-1-Ethanol (Co-surfactant, Emulsion stabilizer) - Urea (Nitrogen source) - Water (Solvent))	Inipol EAP 22® 10 เปอร์เซ็นต์โดย ปริมาตรต่อ ปริมาตร ในน้ำ ทะเล 500 มิลลิลิตร ที่มี น้ำมันดิบ 5 มิลลิตร บ่มเขย่า 350 รอบต่อนาที ที่ 4, 10 และ 25 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 12 สัปดาห์	Hydrocarbon-degrading microorganisms	การใส่ Inipol EAP 22® เป็น สารอาหาร เป็นผลให้มีการ เพิ่มขึ้นของปริมาณจุลินทรีย์ และอัตราการกำจัดน้ำมันดิบ ที่สูงขึ้น	Rodríguez-Blanco และคณะ (2010), Glaser และ คณะ (1991)

ตารางที่ 1.3 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของจุลินทรีย์เมื่อมีการเติมสารอาหาร (ต่อ)

สารอาหาร (Fertilizer)	อัตราส่วน / ปริมาณที่ใช้ และ สภาวะการเลี้ยงเชื้อ	จุลินทรีย์	ผลการกำจัด	อ้างอิง
Urea และ $K_2HPO_4$ (1:1 เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	Urea และ $K_2HPO_4$ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนักต่อปริมาตร ใน mineral salt medium 100 มิลลิลิตร ที่มี น้ำมันดิบ 2 เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนักต่อปริมาตร	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Corynebacterium kutscheri</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ความเข้มข้นของสารอาหาร 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร สามารถเสริม ประสิทธิภาพการกำจัด น้ำมันดิบของแบคทีเรียที่ใช้ได้ ดีที่สุด โดยอัตราการกำจัด น้ำมันดิบของ <i>Bacillus megaterium</i> และ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> คือประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วน <i>Corynebacterium kutscheri</i> คือเกือบ 80 เปอร์เซ็นต์	Thavasi และคณะ (2011)

การใช้สารกระจายคราบน้ำมันเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมการกำจัดน้ำมัน โดยสารกระจายคราบ น้ำมันจะช่วยให้น้ำมันเกิดการกระจายตัวเป็นหยดน้ำมันเล็กๆ บริเวณผิวน้ำทะเล ซึ่งสารกระจายคราบ น้ำมัน มีส่วนประกอบหลักคือสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) และสารชะล้าง (Detergent) โดยสารกระจาย คราบน้ำมันที่ได้รับความสนใจและนิยมใช้มีหลากหลายชนิด เช่น Corexit 9500 และ Slickgone NS อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าสารกระจายคราบน้ำมัน Corexit 9500 มีผลการยับยั้งต่อการเจริญของ *Daphnia magna* ซึ่งเป็นกลุ่มแพลงก์ตอนขนาดเล็ก ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิตในทะเล (Toyota และคณะ, 2017) ในขณะที่สารกระจายคราบน้ำมัน Slickgone NS ไม่ส่งผลกระทบต่อหรือลดจำนวนแบคทีเรีย และมีส่วนส่งเสริมการกำจัดน้ำมันดิบอีกด้วย (Brakstad และคณะ, 2018) งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ Slickgone NS ในการทดลอง โดยสารกระจายคราบน้ำมัน Slickgone NS มีองค์ประกอบหลัก 2 สาร ได้แก่ สาร Kerosene ทำหน้าที่เป็นตัวทำละลาย และสาร Sodium Dioctylsulphosuccinate ทำหน้าที่ เป็นสารลดแรงตึงผิว โดยสาร Kerosene ถูกกำจัดได้ตามธรรมชาติ และส่วนที่ระเหยได้ของสารจะถูกกำจัดโดย ปฏิกิริยาโฟโตออกซิเดชันได้รวดเร็วในอากาศ ส่วนสาร Sodium Dioctylsulphosuccinate สามารถถูก กำจัดได้ง่ายตามธรรมชาติ เนื่องจากมีโครงสร้างที่ไม่มีหมู่เบนซีน (พิสุทธ์ และคณะ, 2013)

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Sphingobium* sp. MO2-4 (MSCU\_0843) และ *Bacillus megaterium* TL01-2 (MSCU\_0853) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการกำจัดไฮโดรคาร์บอนได้ มีการเจริญเติบโตที่เร็ว ไม่เป็นเชื้อก่อโรค แบคทีเรียกลุ่มนี้คัดแยกได้จากฟองน้ำทะเล โดย *Sphingobium* sp. MO2-4 แยกได้จาก *Chalinula* sp. ที่เกาะมัน จังหวัดระยอง ส่วน *Bacillus megaterium* TL01-2 แยกได้จาก *Clathria reinwardti* ที่เกาะทะเล จันทบุรี จากงานวิจัยของนายอดิสรณ์ รัชชิทธิรัตน์ (ข้อมูลยังไม่เผยแพร่) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถในการทนต่อกลุ่มธาตุโลหะหนักได้ และมีแนวโน้มใน



การสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากนี้ *Bacillus megaterium* TL01-2 ยังสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้อีกด้วย เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบด้วยของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 พบว่าสามารถกำจัดน้ำมันดิบความเข้มข้นน้ำมันดิบ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน เมื่อนำแบคทีเรียทั้งสองชนิดมาเลี้ยงร่วมกัน พบว่าสามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาตรึงบนวัสดุตรึง aquaporous gel พบว่ามีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบสูงขึ้นถึง 70 เปอร์เซ็นต์ โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ในรูปแบบเซลล์อิสระ และรูปแบบเซลล์ตรึงที่ตรึงบน aquaporous gel ในสภาวะที่มีการเติมสารอาหาร และการใช้สารกระจายคราบน้ำมัน Slickgone NS

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของเซลล์ตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 บน aquaporous gel และเซลล์อิสระ ภายใต้ปัจจัยการเติมสารอาหาร และการใช้สารกระจายคราบน้ำมัน

### สมมติฐานของโครงการ

- เซลล์ตรึงมีความสามารถในการอยู่รอดและมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบได้ดีกว่าเซลล์อิสระ
- การเติมสารอาหารและสารกระจายคราบน้ำมันร่วมกับการเลี้ยงเซลล์ สามารถช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบ

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์จากโครงการ

- ทราบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบเมื่อการเติมสารอาหารแก่แบคทีเรีย และการใช้สารกระจายคราบน้ำมันร่วมกับแบคทีเรียจริง
- สามารถประยุกต์และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดน้ำมันดิบในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

ประโยชน์ต่อตัวเอง

- ได้พัฒนาทักษะปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์
- พัฒนาการคิด วิเคราะห์อย่างมีเหตุผล และรู้จักแก้ปัญหาเชิงวิทยาศาสตร์

## บทที่ 2 อุปกรณ์และสารเคมี

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, USA
2. เครื่องกำเนิดคลื่นเสียง (Sonicator bath) รุ่น D-150 บริษัท Delta, Taiwan
3. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography - Flame Ionization Detector, GC-FID) บริษัท Agilent Technologies, USA
4. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น New Brunswick™ Innova ® 2300 บริษัท Eppendorf
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Kakusa, Japan
6. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น Gene2 บริษัท Scientific Industries, USA
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
9. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
10. ตู้เขี่ยเชื้อ (ISSCO laminar flow) รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific Supply, USA
11. ตู้อบแห้ง (Oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
12. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 20 ไมโครลิตร, 200 ไมโครลิตร, 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร บริษัท Gilson, France
13. ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tips) บริษัท Axygen, USA
14. วัสดุตรึง Aquaporous gel บริษัท Nisshinbo co., Japan
15. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
16. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, USA
17. หลอดทดลองพลาสติก (Eppendorf tube) ขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท นิโปร (ประเทศไทย) จำกัด
18. หลอดหยด (Pasteur pipette)
19. หัวกรอง PTFE (PTFE filter) ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Chrom Tech, USA

**สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

1. กลีเซอรอล ( $C_3H_8O_3$ ) บริษัท Research Organics, USA
2. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
3. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
4. น้ำกลั่น (DDW)
5. น้ำทะเล (Seawater)
6. น้ำมันดิบ (Crude oil) บริษัท PPT group co.th., Thailand
7. ปุ๋ยเคมีอินทรีย์ (Organic fertilizer) ตรา Golden Flowers บริษัท นครไทย เซ็นทรัล จำกัด
8. ผงวุ้นสำหรับทำอาหารแข็ง (Agar)
9. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco, USA
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
11. เฟอร์ริกซิเตรท (Ferric citrate) บริษัท Merck, Germany
12. เมทานอล ( $CH_3OH$ ) บริษัท Merck, Germany
13. แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) บริษัท Merck, Germany
14. ยูเรีย ( $CH_4N_2O$ ) บริษัท Merck, Germany
15. สารกระจายคราบน้ำมัน (Slickgone NS dispersant)
16. อาหารเหลว Zobell Marine (Zobell Marine broth) บริษัท Himedia, India
17. แอมโมเนียมไนเตรท ( $NH_4NO_3$ ) บริษัท Merck, Germany
18. เฮกเซน (Hexane) บริษัท RCI Labscan, Thailand



## วิธีการทดลอง

### 3.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

นำ *Sphingobium* sp. MO2-4 (MSCU\_0843) และ *Bacillus megaterium* TL01-2 (MSCU\_0853) มาเลี้ยงแยกกันในอาหาร 0.25 เท่า Zobell Marine broth ปริมาตร 125 มิลลิลิตร บ่มเป็น 24 ชั่วโมง ที่ความเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วแขวนลอยเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และทำ Viable plate count ด้วยวิธีการ Drop plate เพื่อนับจำนวนหัวเชื้อให้ได้  $10^9$  CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมหัวเชื้อ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร เลี้ยงร่วมกัน สำหรับทำการทดลองต่อไป

### 3.2 ตรึงเซลล์และการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย

#### 3.2.1 ตรึงเซลล์บนวัสดุตรึง Aquaporous gel

นำหัวเชื้อแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร ที่เตรียมโดยวิธีที่ระบุในข้อ 1 5 มิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกันในอาหาร 0.25 เท่า Marine broth 45 มิลลิลิตร ที่ใส่วัสดุตรึง aquaporous gel ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว น้ำหนัก 0.75 กรัม นำไปเขย่าที่ความเร็วที่มีประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ได้สูงที่สุดซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.2.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

#### 3.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ที่แปรผันความเร็วรอบในการเขย่า

ตรึงแบคทีเรียตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.1 จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ คือ 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุตรึงด้วยวิธีดังข้อ 3.2.3

#### 3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ

สุ่มตัวอย่างวัสดุตรึงในแต่ละชุดการทดลองมา 3 ชิ้น ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย PUM buffer 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปผ่านคลื่นความถี่สูง (Sonicate) 2 นาที จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ทำให้เซลล์ตรึงหลุดออก 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายไปเจือจาง และทำ Viable plate count ด้วยวิธีการ Spread plate บนอาหาร 0.25 เท่า Marine agar เพื่อเป็นการติดตามปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และนำวัสดุตรึงไประเหยให้แห้ง นำมาชั่งน้ำหนัก แล้วจึงคำนวณหาปริมาณเซลล์แบคทีเรียต่อน้ำหนักวัสดุตรึง

#### 3.2.4 วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ทำการทดสอบในแต่ละชุดการทดลองมาทำการเจือจาง และทำ Viable plate count ด้วยวิธีการ Spread plate บนอาหาร 0.25 เท่า Marine agar เพื่อเป็นการติดตามปริมาณเชื้อแบคทีเรีย แล้วจึงคำนวณหาปริมาณเซลล์แบคทีเรียในหน่วย CFU ต่อมิลลิลิตร

### 3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ

#### 3.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระ

นำหัวเชื้อแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร ที่เตรียมโดยวิธีที่ระบุในข้อ 1 5 มิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกันในอาหารเหลว Nutrient Seawater Medium (NSM) 45 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันดิบ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยทำการทดลองคู่กับชุดควบคุม คือ อาหารเหลว NSM ที่มีน้ำมันดิบ แต่ไม่มีการใส่หัวเชื้อ แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.4.2 และตรวจติดตามปริมาณแบคทีเรียตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.4 โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ชุดการทดลอง

#### 3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรียแบบเซลล์ตรึง

นำเซลล์ตรึงที่ได้จากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว NSM 45 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันดิบ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยทำการทดลองคู่กับชุดควบคุม คือ อาหารเหลว NSM ที่มีวัสดุตรึง aquaporous gel และน้ำมันดิบ แต่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.4.2 และตรวจติดตามปริมาณแบคทีเรียตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.3 โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ชุดการทดลอง

### 3.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography–Flame Ionization Detector, (GC-FID))

#### 3.4.1 สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ (Standard curve)

เตรียมน้ำมันดิบที่ความเข้มข้น 500; 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปละลายด้วยเฮกเซนอย่างละ 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นฉีดสารละลายน้ำมันดิบใส่ขวดสำหรับวิเคราะห์ ผ่านหัวกรอง PTFE แล้วนำไปเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography–Flame Ionization Detector, GC-FID) จากนั้นบันทึกค่าพื้นที่ใต้กราฟแล้วนำค่าที่ได้ไปทำกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นน้ำมันดิบกับค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละความเข้มข้น

#### 3.4.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือ

นำชุดการทดลองมาใส่เฮกเซน 1 เท่าตัว เพื่อละลายน้ำมันดิบ ผสมเข้าด้วยกันเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นแยกนำเอาส่วนชั้นเฮกเซน มาตั้งระเหยให้แห้ง เหลือแต่น้ำมันดิบ นำมาละลายด้วยเฮกเซนอย่างละ 10 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นฉีดสารละลายน้ำมันดิบ 1 มิลลิลิตรใส่ขวดสำหรับวิเคราะห์ ผ่านหัวกรอง PTFE แล้วนำไปเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography–Flame Ionization Detector, GC-FID) โดยสภาวะการวิเคราะห์ของระบบคือ คอลัมน์ HP-N5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ภายใน เคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซน 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 160 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 25 องศาเซลเซียส/นาที หยุดเป็นเวลา 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 220 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที หยุดเป็นเวลา 2 นาที และเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 300 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียส/นาที หยุดเป็นเวลา 7 นาที แก๊สตัวพา คือ ฮีเลียม อัตราเร็วของแก๊สตัวพา 2.1 มิลลิลิตร/นาที โดยปริมาตรสารที่ฉีดวิเคราะห์ คือ 1 ไมโครลิตร

คำนวณประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ ดังสมการ  
 เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ =  $100 \times (\text{พื้นที่ใต้กราฟส่วนประกอบน้ำมันของชุดควบคุม} - \text{พื้นที่ใต้กราฟส่วนประกอบน้ำมันของชุดทดสอบ}) / \text{พื้นที่ใต้กราฟชุดควบคุม}$

คำนวณความเข้มข้นของน้ำมันดิบที่เหลือ ดังสมการ  
 ความเข้มข้นของน้ำมันดิบที่เหลือ =  $\text{พื้นที่ใต้กราฟส่วนประกอบน้ำมัน} / \text{ค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐาน}$

### 3.5 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบในสถานะที่แตกต่างกัน

นำกลุ่มเซลล์แบคทีเรียผสมในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง ซึ่งเตรียมโดยวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 มาเลี้ยงทดสอบ โดยปรับสถานะต่างกัน ดังนี้

#### 3.5.1 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบในสถานะที่เติมสารอาหาร

การเติมสารอาหาร จะเลี้ยงแบคทีเรียโดยเปลี่ยนอาหารจาก NSM เป็นน้ำทะเลกรอง (เนื่องจากส่วนประกอบของอาหาร NSM มีความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหารมากกว่า เมื่อมีการเติมสารอาหารเพิ่มไป อาจทำให้ไม่เห็นผลที่ชัดเจน) และมีการใส่ปุ๋ย ตรา Golden Flowers ที่มีส่วนประกอบของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งการทดลองมีชุดควบคุม 2 ชุด คือชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย และไม่มีการเติมสารอาหาร กับชุดควบคุมที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีการเติมสารอาหาร โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ในวันที่ 0 และ 7 ของการทดลอง

#### 3.5.2 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบในสถานะที่เติมสารกระจายคราบน้ำมัน

การใช้สารกระจายคราบน้ำมันร่วม โดยมีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน Slickgone NS อัตราส่วน 1 : 25 DOR (Dispersant-to-oil-ratios) ซึ่งมีชุดควบคุม 2 ชุด คือชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย และไม่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน กับชุดควบคุมที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ในวันที่ 0 และ 7 ของการทดลอง



## บทที่ 4 ผลการทดลอง

### 4.1 ประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ของวัสดุตรึงที่แปรผันความเร็วในการเขย่า

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึง aquaporous gel แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วการเขย่าต่างๆ เมื่อนำมาทำการตรวจนับปริมาณ พบว่าแบคทีเรียที่สามารถเกาะบนวัสดุตรึง มีปริมาณที่ใกล้เคียงกันในแต่ละความเร็วการเขย่าต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เขย่าด้วยความเร็วต่างๆ

ปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุตรึง (CFU ต่อกรัมวัสดุ)	ความเร็วในการเขย่า (รอบต่อนาที)		
	100	150	200
MO2-4	$1.88 \pm 0.60 \times 10^9$	$2.43 \pm 0.38 \times 10^9$	$2.14 \pm 0.46 \times 10^9$
TL01-2	$1.10 \pm 0.35 \times 10^9$	$1.15 \pm 0.26 \times 10^9$	$1.13 \pm 0.36 \times 10^9$
รวม	$2.98 \pm 0.70 \times 10^9$	$3.58 \pm 0.43 \times 10^9$	$3.27 \pm 0.65 \times 10^9$

### 4.2 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ

#### 4.2.1 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรียแต่ละชนิด

จากการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 7 วัน ของแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหาร Nutrient Seawater Medium (NSM) ที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อของแต่ละชุดการทดลอง แสดงในรูปที่ 4.1 โดยในชุดควบคุมสามารถสังเกตเห็นคราบน้ำมันบนผิวหน้าอาหาร ในขณะที่ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 ยังคงพบคราบน้ำมัน มีลักษณะเป็นหยดขนาดเล็ก ส่วนชุดทดลองที่มี *Bacillus megaterium* TL01-2 หยดน้ำมันมีลักษณะรวมตัวกันเป็นก้อน

เมื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียโดยการทำให้ Variable plate count ด้วยวิธี Drop plate พบว่าจำนวน *Sphingobium* sp. MO2-4 มีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จาก 8.92 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 9.16 log CFU ต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับ *Bacillus megaterium* TL01-2 มีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จาก 8.18 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 8.83 log CFU ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข; ตาราง ข-2 รูปที่ ข-1)

ผลการทดลองเบื้องต้นของการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ แบคทีเรียทั้งสองมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบไม่ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค; ตาราง ค-2 รูปที่ ค-2) อย่างไรก็ตามพบว่ามีชุดควบคุมมีการหายไปของน้ำมันค่อนข้างสูง ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความคลาดเคลื่อนสูง ซึ่งอาจเกิดจากเทคนิคในการสกัดน้ำมันหรือการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย



**รูปที่ 4.1** การเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ NSM ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุม วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 วันที่ 0 (ข), ชุดทดลองที่มี *B. megaterium* TL01-2 วันที่ 0 (ค), ชุดควบคุม วันที่ 7 (ง), ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 วันที่ 7 (จ) และชุดทดลองที่มี *B. megaterium* TL01-2 วันที่ 7 (ฉ)

#### 4.2.2 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของเซลล์ตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2

จากการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 7 วัน ของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ที่เลี้ยงร่วมกันในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในชุดควบคุมสามารถสังเกตเห็นคราบน้ำมันดิบบริเวณผิวหน้าอาหาร ในขณะที่ชุดทดลองที่มีแบคทีเรียทั้งสองชนิดในรูปแบบเซลล์อิสระ พบหยดน้ำมันมีลักษณะรวมตัวกันเป็นก้อน ไม่กระจาย และเมื่อตรึงแบคทีเรียบนวัสดุตรึงและนำมาทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ พบว่าในวันที่ 0 วัสดุตรึงยังไม่ค่อยดูดซับน้ำมัน น้ำมันดิบกระจายทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร ส่วนในวันที่ 7 พบว่าวัสดุตรึงมีการดูดซับน้ำมันดิบและพบน้ำมันดิบหยดเล็กๆกระจายทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารน้อยกว่าวันที่ 0 ดังแสดงในรูปที่ 4.2



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)



(ช)



(ซ)

**รูปที่ 4.2** การเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ NSM ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุม วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 0 (ข), ชุดควบคุม วันที่ 7 (ค), ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 7 (ง), ชุดควบคุมที่มีไวรัสตุตริง วันที่ 0 (จ), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตุตริง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 วันที่ 0 (ฉ), ชุดควบคุมที่มีไวรัสตุตริง วันที่ 7 (ช) และชุดทดลองที่มีเซลล์ตุตริง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 วันที่ 7 (ซ)

เมื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโดยการทำให้ Variable plate count ด้วยวิธี Spread plate เปรียบเทียบระหว่างวันที่ 0 และวันที่ 7 ของการทดลอง พบว่า แบคทีเรียที่เลี้ยงร่วมกันในรูปของเซลล์อิสระ จำนวนแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ คือ จำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 เท่ากับ 8.55 log CFU ต่อมิลลิลิตร และวันที่ 7 เท่ากับ 8.81 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในส่วนของการเลี้ยงเชื้อพร้อมในลักษณะเซลล์ตรึง พบว่าในวันที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 8.87 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง และวันที่ 7 มีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 9.01 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง ตามลำดับ (ภาคผนวก ข; ตาราง ข-2 รูปที่ ข-1)

ผลการทดลองเบื้องต้นของการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ที่เลี้ยงเชื้อพร้อมกันในรูปแบบของเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึง สามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ไม่ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่าในชุดควบคุมมีการหายไปของน้ำมันค่อนข้างสูง ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความคลาดเคลื่อนสูง ซึ่งอาจเกิดจากเทคนิคในการสกัดน้ำมันหรือการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ค; ตาราง ค-2 รูปที่ ค-2)

#### 4.3 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

##### 4.3.1 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารอาหาร

จากการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 7 วัน ของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ที่เลี้ยงร่วมกันในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร โดยมีการเติมสารอาหารซึ่งได้แก่ปุ๋ยตรา Golden flowers ที่มีส่วนประกอบของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในชุดควบคุม และชุดทดลองที่มีแบคทีเรียทั้งสองชนิดในรูปแบบเซลล์อิสระ สามารถสังเกตเห็นคราบน้ำมันดิบบริเวณผิวหน้าอาหารลักษณะน้ำมันเป็นหยดขนาดเล็ก และเมื่อตรึงแบคทีเรียบนวัสดุตรึงและนำมาทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ พบว่าในวันที่ 0 วัสดุตรึงยังไม่ค่อยดูดซับน้ำมัน น้ำมันดิบกระจายทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร ส่วนในวันที่ 7 พบว่าวัสดุตรึงมีการดูดซับน้ำมันดิบและพบน้ำมันดิบหยดเล็กๆกระจายทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารน้อยกว่าวันที่ 0 ดังแสดงในรูปที่ 4.3-4.4

เมื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโดยการทำให้ Variable plate count ด้วยวิธี Spread plate เปรียบเทียบระหว่างวันที่ 0 และวันที่ 7 ของการทดลอง พบว่า แบคทีเรียที่เลี้ยงร่วมกันในรูปของเซลล์อิสระมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อย และเมื่อเทียบการเจริญระหว่างชุดทดลองที่มีแต่แบคทีเรียกับชุดทดลองที่มีการเติมสารอาหารพบว่าปริมาณเชื้อมีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ จำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 ของชุดทดลองที่มีแต่แบคทีเรียเลี้ยงร่วม เท่ากับ 8.88 log CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดทดลองที่มีแบคทีเรียเลี้ยงร่วมที่มีการเติมสารอาหาร เท่ากับ 8.83 log CFU ต่อมิลลิลิตร และในวันที่ 7 จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่มีแต่แบคทีเรียเลี้ยงร่วม เท่ากับ 9.76 log CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดทดลองที่มีแบคทีเรียเลี้ยงร่วมที่มีการเติมสารอาหาร เท่ากับ 9.67 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในส่วนของการเลี้ยงเชื้อพร้อมในลักษณะเซลล์ตรึง พบว่าจำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 ของชุดทดลองที่มีแต่แบคทีเรียเลี้ยงร่วม เท่ากับ 7.81 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง ชุดทดลองที่มีแบคทีเรียเลี้ยงร่วมที่มีการเติมสารอาหาร เท่ากับ 7.75 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง และในวันที่ 7 จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่มีแต่แบคทีเรียเลี้ยงร่วม เท่ากับ 8.75 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง ชุดทดลองที่มีแบคทีเรียเลี้ยงร่วมที่มีการเติมสารอาหาร เท่ากับ 8.74 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง ตามลำดับ (ภาคผนวก ข; ตาราง ข-3 รูปที่ ข-2)

ผลการทดลองเบื้องต้นของการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ที่เลี้ยงเชื้อร่วมกันในรูปของเซลล์อิสระ มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเติมสารอาหารให้แก่แบคทีเรีย ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบไม่แตกต่างกัน ในขณะที่เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อมีการเติมสารอาหารให้แก่แบคทีเรีย พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามพบว่าในชุดควบคุมมีการหายไปของน้ำมันค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเกิดจากเทคนิคในการสกัดน้ำมันหรือการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ค; ตาราง ค-4 รูปที่ ค-3)



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

**รูปที่ 4.3** การเปลี่ยนแปลงลักษณะของน้ำทะเลกรองที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุม วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 0 (ข), ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ที่มีการเติมสารอาหาร ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 0 (ค), ชุดควบคุม วันที่ 7 (ง), ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 7 (จ) และชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ที่มีการเติมสารอาหาร ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 7 (ฉ)



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

**รูปที่ 4.4** การเปลี่ยนแปลงลักษณะของน้ำทะเลกรองที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุมที่มีวัสดุตั้ง วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 วันที่ 0 (ข), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ที่มีการเติมสารอาหาร วันที่ 0 (ค), ชุดควบคุมที่มีวัสดุตั้ง วันที่ 7 (ง), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 วันที่ 7 (จ) และชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ที่มีการเติมสารอาหาร วันที่ 7 (ฉ)

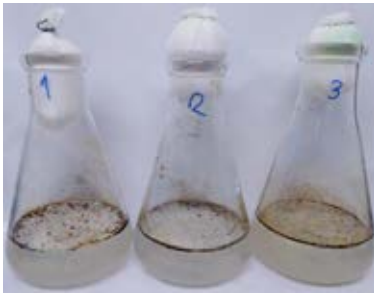


#### 4.3.2 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน

จากการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 7 วัน ของเชื้อที่เลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ในอัตราส่วน 2 : 1 โดยปริมาตร ที่เติมสารกระจายคราบน้ำมัน Slickgone NS พบว่าในชุดควบคุม และชุดทดลองที่มีแบคทีเรียทั้งสองชนิดในรูปแบบเซลล์อิสระ สามารถสังเกตเห็นคราบน้ำมันดิบบริเวณผิวหน้าอาหาร ลักษณะน้ำมันเป็นหยดขนาดเล็ก ในขณะที่ชุดทดลองที่มีแบคทีเรียและมีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน ในรูปแบบเซลล์อิสระ พบหยดน้ำมันขนาดใหญ่บริเวณผิวหน้าอาหาร และเมื่อตรึงแบคทีเรียบนวัสดุตรึงและนำมาทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ พบว่าในวันที่ 0 วัสดุตรึงยังไม่ค่อยดูดซับน้ำมัน น้ำมันดิบกระจายทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร ส่วนในวันที่ 7 พบว่าวัสดุตรึงมีการดูดซับน้ำมันดิบและพบน้ำมันดิบหยดเล็กๆกระจายตัวบริเวณผิวหน้าอาหารน้อยกว่าวันที่ 0 ดังแสดงในรูปที่ 4.5 - 4.6

เมื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโดยการทำให้ Variable plate count ด้วยวิธี Spread plate เปรียบเทียบระหว่างวันที่ 0 และวันที่ 7 ของการทดลอง พบว่า แบคทีเรียที่เลี้ยงร่วมกันในรูปแบบของเซลล์อิสระมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อย และเมื่อเทียบการเจริญระหว่างชุดทดลองที่มีแต่แบคทีเรียกับชุดทดลองที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมันพบว่าปริมาณเชื้อมีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ จำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 ของชุดทดลองที่มีแต่แบคทีเรียเลี้ยงร่วม เท่ากับ 8.84 log CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดทดลองที่มีแบคทีเรียเลี้ยงร่วมที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน เท่ากับ 8.83 log CFU ต่อมิลลิลิตร และในวันที่ 7 จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่มีแต่แบคทีเรียเลี้ยงร่วม เท่ากับ 9.74 log CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดทดลองที่มีแบคทีเรียเลี้ยงร่วมที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน เท่ากับ 9.71 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในส่วนของการเลี้ยงเชื้อร่วมในลักษณะเซลล์ตรึง พบว่าจำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 ของชุดทดลองที่มีแต่แบคทีเรียเลี้ยงร่วม เท่ากับ 7.51 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง ชุดทดลองที่มีแบคทีเรียเลี้ยงร่วมที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน เท่ากับ 7.72 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง และในวันที่ 7 จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่มีแต่แบคทีเรียเลี้ยงร่วม เท่ากับ 8.97 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง ชุดทดลองที่มีแบคทีเรียเลี้ยงร่วมที่มีการเติมกระจายคราบน้ำมัน เท่ากับ 8.79 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง ตามลำดับ (ภาคผนวก ข; ตาราง ข-4 รูปที่ ข-3)

ผลการทดลองเบื้องต้นของการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ที่เลี้ยงเชื้อร่วมกันในรูปแบบของเซลล์อิสระ มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเติมสารกระจายคราบน้ำมันร่วมด้วย ก็พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบอยู่ที่มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน ในขณะที่เชื้อเลี้ยงร่วมในลักษณะเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อมีการเติมสารกระจายคราบน้ำมันร่วมด้วย ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบสูงขึ้นเกือบถึง 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่าในชุดควบคุมมีการหายไปของน้ำมันค่อนข้างสูง ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความคลาดเคลื่อนสูง ซึ่งอาจเกิดจากเทคนิคในการสกัดน้ำมันหรือการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ค; ตาราง ค-6 รูปที่ ค-4)



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

**รูปที่ 4.5** การเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ NSM ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุม วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 0 (ข), ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 0 (ค), ชุดควบคุม วันที่ 7 (ง), ชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 7 (จ) และชุดทดลองที่มี *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน ในรูปเซลล์อิสระ วันที่ 7 (ฉ)





(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

**รูปที่ 4.6** การเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ NSM ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุมที่มีวัสดุตั้ง วันที่ 0 (ก), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 วันที่ 0 (ข), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน วันที่ 0 (ค), ชุดควบคุมที่มีวัสดุตั้ง วันที่ 7 (ง), ชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 วันที่ 7 (จ) และชุดทดลองที่มีเซลล์ตั้ง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *B. megaterium* TL01-2 ที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน วันที่ 7 (ฉ)

## บทที่ 5

### สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

น้ำมันดิบนับเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในปัจจุบัน ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลากหลายอย่างทั้งในระดับครัวเรือนไปจนถึงระดับอุตสาหกรรม ทำให้ความต้องการน้ำมันดิบที่มากขึ้นนี้เอง นำมาสู่การขุดเจาะและหาแหล่งน้ำมันดิบที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งการขุดเจาะหาแหล่งน้ำมันนี้อาจนำมาสู่การปนเปื้อนน้ำมันดิบจากการรั่วไหลหลังการขุดเจาะน้ำมัน หรือจากการขนส่งคมนาคม นอกจากนี้ยังรวมถึงปัญหาการลักลอบทิ้งน้ำมันดิบด้วย ซึ่งน้ำมันดิบจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการกำจัดน้ำมันดิบ บำบัดและฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งสำคัญ ในงานวิจัยนี้ได้เห็นถึงความสำคัญในการกำจัดน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในทะเลด้วยวิธีการบำบัดทางธรรมชาติ (Bioremediation) โดยใช้แบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ที่มีความสามารถในการกำจัดน้ำมันดิบในทะเลได้ โดยศึกษาถึงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้ที่ตรึงด้วยวัสดุตรึง aquaporous gel ในสภาพที่มีการกำหนดปัจจัยต่างกัน คือการเติมสารอาหารให้แก่แบคทีเรีย และการใช้สารกระจายครบน้ำมันร่วมกับแบคทีเรียในการกำจัดน้ำมันดิบ

การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึง aquaporous gel โดยมีการกำหนดปัจจัยที่แปรผันค่าความเร็วการเขย่าต่างๆ ในช่วง 100-200 รอบต่อวินาที พบว่าแบคทีเรียที่เกาะบนวัสดุตรึงมีปริมาณแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเลือกใช้ความเร็วการเขย่าจึงไม่มีผลต่อการตรึงเซลล์ของวัสดุตรึง aquaporous gel ในงานทดลองนี้จึงเลือกใช้ความเร็วในการเขย่าที่ 200 รอบต่อวินาที เพื่อความสะดวกในการทำการทดลองส่วนอื่นๆต่อไป

การกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรียที่มีการเลี้ยงร่วมกันนั้น แบคทีเรียแต่ละชนิดอาจมีปฏิสัมพันธ์ที่ส่งเสริมซึ่งกันและกันในการกำจัดน้ำมันดิบ โดยแบคทีเรียเลี้ยงร่วมกัน แบคทีเรียแต่ละชนิดอาจมีความสามารถในการกำจัดโครงสร้างสารประกอบในน้ำมันดิบที่แตกต่างกัน ส่งผลให้สามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ดีกว่าสายพันธุ์เดี่ยว ที่อาจกำจัดสารประกอบในน้ำมันดิบได้อย่างมีขีดจำกัด (Tao และคณะ, 2017) ด้วยเหตุผลนี้การเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกันจึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ในการบำบัดการกำจัดที่ดีกว่าใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว ในงานศึกษานี้ได้ใช้เชื้อ 2 ชนิด เลี้ยงร่วมกันในอัตราส่วน 2 : 1 โดยปริมาตรของ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 เนื่องจากการทดลองก่อนหน้าของนายอดิสรณ์ รัชชีหิรัญรัตน์ (ข้อมูลยังไม่เผยแพร่) พบว่า *Sphingobium* sp. MO2-4 มีอัตราการกำจัดที่สูงกว่า และเจริญช้ากว่า *Bacillus megaterium* TL01-2 ในขณะที่ *Bacillus megaterium* TL01-2 มีแนวโน้มในการสร้างไบโอฟิล์ม จึงนำมาเลี้ยงรวมเพื่อช่วยในการการยึดเกาะต่อวัสดุตรึง aquaporous gel ของแบคทีเรียในการทดลองนี้ โดยการทดลองนี้ได้มีการใช้เทคนิคการตรึงเซลล์เข้ามารวมด้วยในการทดลอง โดยเลือกใช้ aquaporous gel เป็นวัสดุตรึง โดยการตรึงเซลล์จะช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียให้มีความคงทน และเสถียรมากขึ้น เพิ่มชีวมวล (Bayat และคณะ, 2015) นอกจากนี้วัสดุตรึงก็มีส่วนช่วยในการดูดซับน้ำมันเอาไว้ด้วย ทำให้แนวโน้มของประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบสูงขึ้นอีกด้วย ตัวอย่างงานวิจัยของ Quek และคณะในปี 2006 ที่ใช้เชื้อ *Rhodococcus* sp. F92 ที่ตรึงบน Polyurethane foam ในการกำจัดน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม ให้ผลการกำจัดน้ำมันในรูปของเซลล์อิสระอยู่ที่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เซลล์ตรึงสามารถกำจัดน้ำมันได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 7 วัน

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังให้ความสนใจต่อปัจจัยการให้สารอาหารแก่แบคทีเรีย เนื่องจากในทะเลเป็นสถานที่เปิดกว้าง ซึ่งแหล่งของสารอาหารสำคัญสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย อย่างไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส จึงอาจไม่เพียงพอต่อแบคทีเรีย ดังนั้นการเสริมสารอาหารให้แก่แบคทีเรียจึงมีความน่าสนใจต่อการศึกษา โดยหากมีการเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้ อาจส่งผลต่อการกำจัดน้ำมันดิบให้สูงขึ้นได้ ดังงานวิจัยของ Thavasi และคณะ ในปี 2011 ที่มีการเสริม Urea และ  $K_2HPO_4$  ให้แก่ *Bacillus megaterium* *Corynebacterium kutscheri* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบที่สูงขึ้น และอีกปัจจัยที่ให้ความสนใจในงานทดลองนี้ คือการใช้สารกระจายคราบน้ำมันร่วมกับแบคทีเรีย โดยสารกระจายคราบน้ำมันจะช่วยให้น้ำมันแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ ซึ่งง่ายต่อการเข้าถึงและย่อยสลายโดยแบคทีเรีย ดังงานวิจัยของ Tao และคณะ ในปี 2018 ที่ใช้สารกระจายคราบน้ำมันร่วมด้วยในการกำจัดเบนซีน องค์ประกอบน้ำมันปิโตรเลียม พบว่าสารกระจายคราบน้ำมันสามารถช่วยให้ประสิทธิภาพการกำจัดสารองค์ประกอบในน้ำมันปิโตรเลียมสูงขึ้น

งานวิจัยนี้ผลการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบนั้นให้ผลการทดลองที่ไม่น่าเชื่อถือ เนื่องจาก การทดลองมีความคลาดเคลื่อนสูง อีกทั้งการทดลองต่างๆ ในชุดควบคุมก็มีแนวโน้มที่ไม่น่าเชื่อถือ โดยประสิทธิภาพการย่อยสลายของแบคทีเรียแต่ละชนิดให้ผลการกำจัดน้ำมันดิบอยู่ที่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่างานวิจัยก่อนหน้าของนายอดิสรณ์ รัชชิทธิรัตน์ (ข้อมูลยังไม่เผยแพร่) ที่มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเกิดมาจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้ อาจสูญเสียประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบในบางส่วนไปก่อนเริ่มทำการทดลอง เมื่อเริ่มการทดลองไม่ได้นำแบคทีเรียมาปรับสภาพฟื้นฟูประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบ (Bioenhancement) ทำให้ผลการทดลองที่ได้ มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรียที่ต่ำ และเมื่อนำมาทำการทดลองต่อไป ผลการทดลองที่ได้จึงไม่มีความน่าเชื่อถือ อีกทั้งการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบโดยเมื่อเทียบกับชุดควบคุมในแต่ละชุดการทดลอง ก็พบว่าชุดควบคุมมีประสิทธิภาพที่คลาดเคลื่อนสูงในแต่ละชุดการทดลอง ทั้งนี้อาจเกิดข้อผิดพลาดในระหว่างทำการทดลอง ผลที่ได้ค่าความเข้มข้นของน้ำมันดิบจึงมีปริมาณที่น้อยกว่าความเป็นจริง โดยข้อผิดพลาดในระหว่างทำการทดลองนี้ อาจเกิดจากขั้นตอนสกัดน้ำมันดิบที่ละลายด้วยสารละลายเฮกเซน อาจมีการสกัดไม่ดี มีการละลายน้ำมันดิบด้วยสารละลายเฮกเซนที่ไม่กระจายทั่วถึง ทำให้น้ำมันดิบที่ได้มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง หรือในขั้นตอนการตั้งระเหยสารละลายเฮกเซนหลังจากสกัดน้ำมันดิบแล้ว เมื่อระเหยสารละลายเฮกเซนหมดไม่ได้มีการเก็บน้ำมันดิบหลังการระเหยในทันที จึงอาจทำให้น้ำมันดิบบางส่วนมีการระเหยออกไป และการเก็บตัวอย่างที่ระเหยเสร็จแล้วนานเกินไปก่อนการฉีควิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID ทำให้อาจมีน้ำมันดิบบางส่วนระเหยไป

การทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบโดยมีปัจจัยควบคุม 2 ปัจจัย ได้แก่สารอาหารเสริมที่ให้แก่แบคทีเรีย และสารกระจายคราบน้ำมันนั้น จากการทดลองพบว่า การให้สารอาหารเสริมไม่ช่วยเสริมให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่เดียวกันเมื่อเทียบปริมาณของเชื้อ จะพบว่า สารอาหารเสริมก็ไม่ส่งผลเสริมการเจริญของแบคทีเรียเช่นกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากสารอาหารที่ใช้ เป็นปุ๋ยเคมีอินทรีย์ที่ใช้กับพืช เมื่อนำมาทดสอบใช้กับแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันดิบ แบคทีเรียอาจไม่สามารถนำสารอาหารมาใช้ได้อย่างเต็มที่ สารอาหารจึงไม่มีส่วนในการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรีย

อีกปัจจัยในการวิจัยครั้งนี้คือการใช้สารกระจายคราบน้ำมัน โดยงานวิจัยนี้ให้ผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีสารกระจายคราบน้ำมัน Slickgone NS ร่วมด้วยนั้น ส่งผลต่อการกำจัดน้ำมันดิบของเชื้อแบคทีเรียที่สูงขึ้น และสารกระจายคราบน้ำมันประเภทนี้ไม่ก่อให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรีย

งานวิจัยนี้ ผลการทดลองที่ได้ยังไม่มีที่น่าเชื่อถือที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์แนวโน้มการเลือกใช้แบคทีเรียเลี้ยงร่วมระหว่าง *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ที่ตรึงบน aquaporous gel ในการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพได้ โดยควรมีการปรับปรุงและพัฒนาการทำการทดลองให้มีความน่าเชื่อถือที่มากขึ้น จึงจะมีความน่าสนใจที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปศึกษา มีแนวโน้มในการนำไปประยุกต์ใช้งานจริงในอนาคตต่อ

#### ข้อเสนอแนะ

1. ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบควรมีการเตรียมเชื้อให้พร้อมต่อการทดสอบ
2. การทดสอบควรมีการตรวจสอบสถานะของการทำการทดสอบที่ละเอียด อาทิเช่น การวัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนและหลังการทำการทดลอง
3. ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันที่ปัจจัยแตกต่างกันมากขึ้น อาทิเช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ค่าความเค็ม ค่าความเข้มข้นน้ำมันดิบ
4. ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันโดยช่วงเก็บผลมีระยะเวลาที่นานขึ้น
5. ทดสอบประสิทธิภาพหรือการย่อยสลายของวัสดุตรึง รวมถึงทดสอบการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึง
6. ทดสอบการกำจัดน้ำมันดิบของเชื้อร่วมกับสารอาหารหรือสารกระจายคราบน้ำมันที่หลากหลายชนิดมากขึ้น
7. ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบในน้ำทะเลจริง

## อ้างอิง

## ภาษาไทย

กรมเจ้าท่า. สถิติน้ำมันรั่วไหล ปี 2556. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.md.go.th/md/index.php/2014-01-19-05-02-28/2014-01-19-05-20-44/-oil-spill/266--2556-19/file>.

ค้นเมื่อ 18 พฤษภาคม 2561

กรมเจ้าท่า. สถิติน้ำมันรั่วไหล ปี 2557. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.md.go.th/md/index.php/2014-01-19-05-02-28/2016-07-25-03-15-33/2016-11-23-07-40-37/1605--2557-35/file>.

ค้นเมื่อ 18 พฤษภาคม 2561

กรมเจ้าท่า. สถิติน้ำมันรั่วไหล ปี 2558. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.md.go.th/md/index.php/2014-01-19-05-02-28/2016-07-25-03-15-33/2016-11-23-07-40-37/2195-13-2558/file>.

ค้นเมื่อ 18 พฤษภาคม 2561

กรมเจ้าท่า. สถิติน้ำมันรั่วไหล ปี 2559. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.md.go.th/md/index.php/2014-01-19-05-02-28/2016-07-25-03-15-33/2016-11-23-07-40-37/2982--2559-35/file>.

ค้นเมื่อ 18 พฤษภาคม 2561

กรมเจ้าท่า. สถิติน้ำมันรั่วไหล ปี 2560. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.md.go.th/md/index.php/2014-01-19-05-02-28/2016-07-25-03-15-33/2016-11-23-07-40-37/3342-15-2560/file>.

ค้นเมื่อ 18 พฤษภาคม 2561

นำชัย ชิววิวรรณ. (2556). 10 วิธีแก้ปัญหาน้ำมันดิบรั่วไหลสู่ท้องทะเล. สาระวิทย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://www.nstda.or.th/sci2pub/sarawit/Sarawit-Issue05.pdf>.

ค้นเมื่อ 18 พฤษภาคม 2561

พิสุทธิ์ เพ็ชรมนกุล, ปฎิภาณ ปัญญาพลกุล. (2013). ภาพรวมของสารเคมีที่มีการประยุกต์ใช้ งานในภาชนะน้ำมันรั่วไหล (Oil spill) ลงสู่ทะเล. บทความวิชาการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://www.eng.chula.ac.th/th/18178>

ค้นเมื่อ 20 กุมภาพันธ์ 2562

วารสารณ์ ฉุยฉาย. (2554). การแพร่กระจายและความเป็นพิษต่อพืชของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Distribution and Phytotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนครเหนือ ปีที่ 5. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://repository.rmutp.ac.th/bitstream/handle/123456789/770/Distribution%20and%20Phytotoxicity%20of%20Polycyclic%20Aromatic%20Hydrocarbons.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

ค้นเมื่อ 17 สิงหาคม 2561

## ภาษาอังกฤษ

Abatenh E, Gizaw B, Tsegaye Z, Wassie M. (2017). Application of microorganisms in bioremediation-review. *Journal of Environmental Microbiology*; 1(1):02-09

Bao MT, Wang LN, Sun PY, Cao LX, Zou J, Li YM. (2012). Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. *Mar Pollut Bull*; 64(6):1177-1185.

- Bao MT, Chen Q, Gong Y, Li Y, Wang H, Jiang G. (2013). Removal efficiency of heavy oil by free and immobilised microorganisms on laboratory-scale. *Can J Chem Eng*; 91(1):1-8
- Bayat Z, Hassanshahian M, Cappello S. (2015). Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: a mini review. *The open microbiology journals*; 9: 48-54.
- Brakstad OG, Ribicic D, Winkler A, Netzer R. (2018). Biodegradation of dispersed oil in seawater is not inhibited by a commercial oil spill dispersant. *Mar Pollut Bull*; 129(2):555-561.
- Chen Q, Li J, Liu M, Sun H, Bao M. (2017). Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. *PLoS One*; 12(3).
- Hassanshahian M, Zeynalipour MS, Musa FH. (2014). Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Mar Pollut Bull*; 82(1-2):39-44.
- Ijah U. J. J, Ukpe L. I. (1992). Biodegradation of crude oil by *Bacillus* strains 28A and 61B isolated from oil spilled soil. *Waste Management*; 12:55-60
- Knezevich V, Koren O, Ron EZ, Rosenberg E. (2006). Petroleum bioremediation in seawater using guano as the fertilizer. *Bioremediation Journal*; 10:3, 83-91.
- Li X, Zhao L, Adam M. (2016). Biodegradation of marine crude oil pollution using a salt-tolerant bacterial consortium isolated from Bohai Bay, China. *Mar Pollut Bull*; 15;105(1):43-50.
- Quek E, Ting YP, Tan HM. (2006). *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. *Bioresour Technol*; 97(1):32-8.
- Rodríguez-Blanco A, Antoine V, Pelletier E, Delille D, Ghiglione JF. (2010). Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea. *Environ Pollut*; 158(3):663-673.
- Shen T, Pi Y, Bao M, Xu N, Li Y, Lu J. (2015). Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. *Environ Sci Process Impacts*; 17(12):2022-2033.
- Tao K, Liu X, Chen X, Hu X, Cao L, Yuan X. (2017). Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. *Bioresour Technol*; 224:327-332.
- Tao R, Olivera-Irazabal M, Yu K. (2018). Effect of temperature and dispersant (COREXIT® EC 9500A) on aerobic biodegradation of benzene in a coastal salt marsh sediment. *Chemosphere*; 204:22-27
- Techtmann SM, Zhuang M, Campo P, Holder E, Elk M, Hazen TC, Conmy R, Santo Domingo JW. (2017). Corexit 9500 enhances oil biodegradation and changes active bacterial

- community structure of oil-enriched microcosms. *Appl. Environ. Microbiol*; 83(10):1-14.
- Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM. (2011). Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Bioresour Technol*; 102(3):3366-72.
- Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM. (2011). Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresour Technol*; 102(2):772-778.
- Toyota, K., McNabb, N.A., Spyropoulos, D.D., Igushi, T., Kohno, S. (2017). Toxic effects of chemical dispersant Corexit 9500 on water flea *Daphnia magna*. *Journal of applied toxicology*; 37:201-206.
- Varjani SJ. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour Technol*; 223: 277-286.
- Varjani SJ, Upasani VN. (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresour Technol*; 222:195-201
- Xue J, Yu Y, Bai Y, Wang L, Wu Y. (2015). Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: A review. *Curr Microbiol*; 71(2):220-228.

**ภาคผนวก ก**  
**สูตร และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลายที่ใช้ในโครงการวิจัย**

**อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย**

**อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Seawater Medium (NSM)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02	กรัม
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	กรัม
Ferric citrate	0.02	กรัม
Yeast extract	0.50	กรัม
น้ำทะเลกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายและผสมสารทั้งหมดในน้ำทะเลกรอง จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**อาหารเลี้ยงเชื้อ Zobell Marine broth 0.25 เท่า**

ผง Zobell Marine broth 2216	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายและผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**อาหารเลี้ยงเชื้อ Zobell Marine agar 0.25 เท่า**

ผง Zobell Marine broth 2216	10	กรัม
ผง Agar (2% agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายและผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์**

โซเดียมคลอไรด์	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายและผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



สารละลายบัฟเฟอร์ PUM (Phosphate-urea-magnesium sulfate)

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

ละลายและผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข  
ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ

ตารางที่ ข-1 ข้อมูลดิบปริมาณเชื้อในการทดลองประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ของวัสดุที่แปรผันความเร็วในการเขย่า

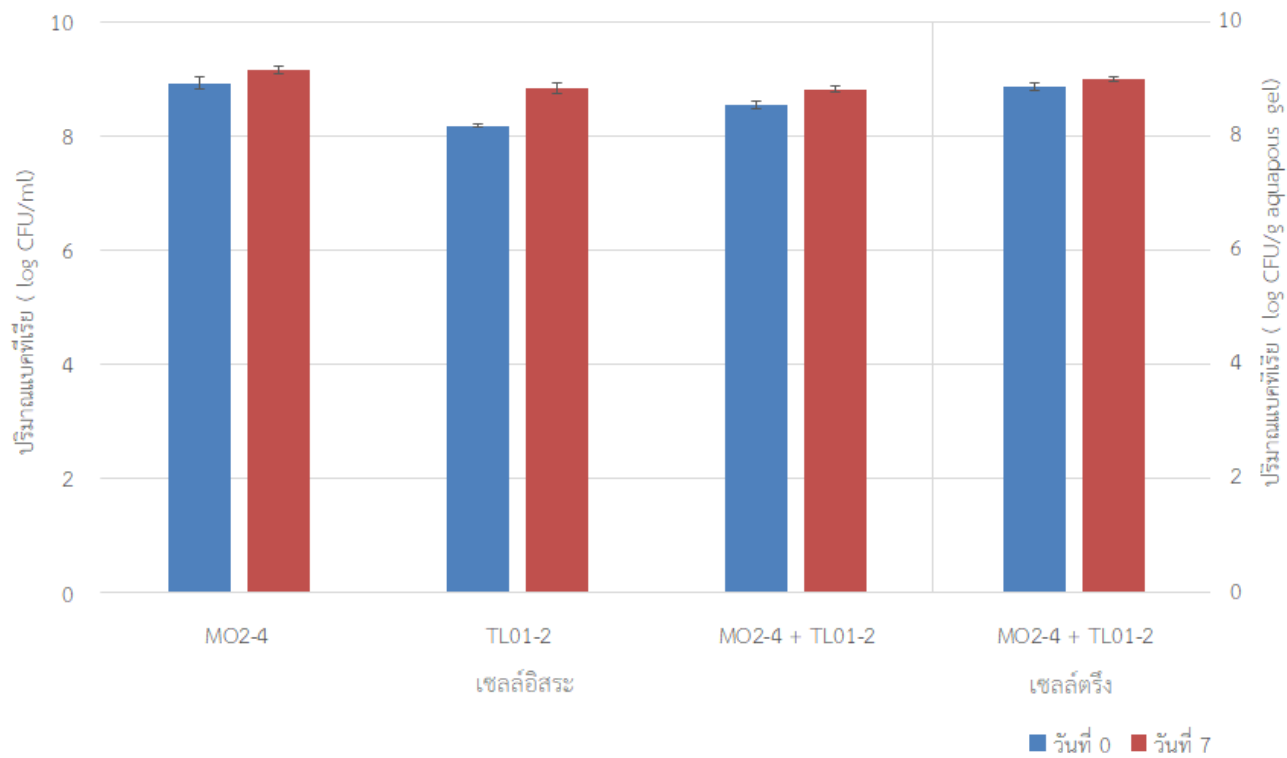
ความเร็วในการเขย่า	ชุดการทดลองซ้ำที่ 1			ชุดการทดลองซ้ำที่ 2			ชุดการทดลองซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
100 rpm										
เชื้อร่วม	$3.53 \times 10^9$	$3.33 \times 10^9$	$3.33 \times 10^9$	$2.67 \times 10^9$	$2.33 \times 10^9$	$1.33 \times 10^9$	$3.33 \times 10^9$	$3.27 \times 10^9$	$3.67 \times 10^9$	$2.98 \pm 0.70 \times 10^9$
MO2-4	$2.60 \times 10^9$	$2.40 \times 10^9$	$2.20 \times 10^9$	$1.53 \times 10^9$	$8.00 \times 10^8$	$1.07 \times 10^9$	$2.07 \times 10^9$	$1.80 \times 10^9$	$2.47 \times 10^9$	$1.88 \pm 0.56 \times 10^9$
TL01-2	$9.33 \times 10^8$	$9.33 \times 10^8$	$1.13 \times 10^9$	$1.13 \times 10^9$	$1.53 \times 10^9$	$2.67 \times 10^8$	$1.27 \times 10^9$	$1.47 \times 10^9$	$1.20 \times 10^9$	$1.10 \pm 0.35 \times 10^9$
150 rpm										
เชื้อร่วม	$3.13 \times 10^9$	$3.13 \times 10^9$	$2.80 \times 10^9$	$4.07 \times 10^9$	$3.73 \times 10^9$	$4.13 \times 10^9$	$3.80 \times 10^9$	$3.80 \times 10^9$	$3.60 \times 10^9$	$3.58 \pm 0.43 \times 10^9$
MO2-4	$2.33 \times 10^9$	$1.53 \times 10^9$	$2.13 \times 10^9$	$2.73 \times 10^9$	$2.47 \times 10^9$	$2.87 \times 10^9$	$2.60 \times 10^9$	$2.67 \times 10^9$	$2.53 \times 10^9$	$2.43 \pm 0.38 \times 10^9$
TL01-2	$8.00 \times 10^8$	$1.60 \times 10^9$	$6.67 \times 10^8$	$1.33 \times 10^9$	$1.27 \times 10^9$	$1.27 \times 10^9$	$1.13 \times 10^9$	$1.13 \times 10^9$	$1.07 \times 10^9$	$1.15 \pm 0.26 \times 10^9$
200 rpm										
เชื้อร่วม	$2.07 \times 10^9$	$2.47 \times 10^9$	$2.80 \times 10^9$	$3.60 \times 10^9$	$3.40 \times 10^9$	$3.60 \times 10^9$	$3.73 \times 10^9$	$4.27 \times 10^9$	$3.53 \times 10^9$	$3.27 \pm 0.65 \times 10^9$
MO2-4	$1.40 \times 10^9$	$2.00 \times 10^9$	$1.53 \times 10^9$	$2.33 \times 10^9$	$1.80 \times 10^9$	$2.73 \times 10^9$	$2.40 \times 10^9$	$2.73 \times 10^9$	$2.33 \times 10^9$	$2.14 \pm 0.46 \times 10^9$
TL01-2	$6.67 \times 10^8$	$4.67 \times 10^8$	$1.27 \times 10^9$	$1.27 \times 10^9$	$1.60 \times 10^9$	$8.67 \times 10^8$	$1.33 \times 10^9$	$1.53 \times 10^9$	$1.20 \times 10^9$	$1.13 \pm 0.36 \times 10^9$

ตารางที่ ข-2 ข้อมูลดิบปริมาณเชื้อในการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ

	ชุดการทดลองซ้ำที่ 1			ชุดการทดลองซ้ำที่ 2			ชุดการทดลองซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย ± ค่า คลาดเคลื่อน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
MO2-4 วันที่ 0	$9.00 \times 10^8$	$7.00 \times 10^8$	$5.00 \times 10^8$	$8.00 \times 10^8$	$8.00 \times 10^8$	$8.00 \times 10^8$	$9.00 \times 10^8$	$1.00 \times 10^9$	$1.30 \times 10^9$	$8.56 \pm 2.06 \times 10^8$
TL01-2 วันที่ 0	$1.50 \times 10^8$	$1.50 \times 10^8$	$1.60 \times 10^8$	$1.60 \times 10^8$	$1.60 \times 10^8$	$1.40 \times 10^8$	$1.30 \times 10^8$	$1.50 \times 10^8$	$1.60 \times 10^8$	$1.51 \pm 0.10 \times 10^8$
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์อิสระ) วันที่ 0	$3.70 \times 10^8$	$3.10 \times 10^8$	$4.10 \times 10^8$	$4.30 \times 10^8$	$3.70 \times 10^8$	$4.10 \times 10^8$	$3.00 \times 10^8$	$3.70 \times 10^8$	$2.60 \times 10^8$	$3.59 \pm 0.54 \times 10^8$
MO2-4	$2.30 \times 10^8$	$1.80 \times 10^8$	$2.60 \times 10^8$	$3.00 \times 10^8$	$2.60 \times 10^8$	$2.70 \times 10^8$	$1.90 \times 10^8$	$2.20 \times 10^8$	$1.80 \times 10^8$	$2.32 \pm 0.41 \times 10^8$
TL01-2	$1.40 \times 10^8$	$1.30 \times 10^8$	$1.50 \times 10^8$	$1.30 \times 10^8$	$1.10 \times 10^8$	$1.40 \times 10^8$	$1.10 \times 10^8$	$1.50 \times 10^8$	$8.00 \times 10^7$	$1.27 \pm 0.22 \times 10^8$
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์ตรึง) วันที่ 0	$9.29 \times 10^8$	$8.43 \times 10^8$	$7.14 \times 10^8$	$7.64 \times 10^8$	$5.97 \times 10^8$	$7.78 \times 10^8$	$6.62 \times 10^8$	$7.70 \times 10^8$	$6.08 \times 10^8$	$7.41 \pm 1.02 \times 10^8$
MO2-4	$6.14 \times 10^8$	$5.86 \times 10^8$	$5.00 \times 10^8$	$5.00 \times 10^8$	$3.89 \times 10^8$	$5.69 \times 10^8$	$4.46 \times 10^8$	$5.41 \times 10^8$	$3.92 \times 10^8$	$5.04 \pm 0.77 \times 10^8$
TL01-2	$3.14 \times 10^8$	$2.57 \times 10^8$	$2.64 \times 10^8$	$2.64 \times 10^8$	$2.08 \times 10^8$	$2.08 \times 10^8$	$2.16 \times 10^8$	$2.30 \times 10^8$	$2.16 \times 10^8$	$2.36 \pm 0.34 \times 10^8$

ตารางที่ ข-2 ข้อมูลปริมาณเชื้อในการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ (ต่อ)

	ชุดการทดลองซ้ำที่ 1			ชุดการทดลองซ้ำที่ 2			ชุดการทดลองซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
MO2-4 วันที่ 7	$1.20 \times 10^9$	$1.70 \times 10^9$	$1.50 \times 10^9$	$1.30 \times 10^9$	$1.50 \times 10^9$	$1.10 \times 10^9$	$1.40 \times 10^9$	$1.60 \times 10^9$	$1.90 \times 10^9$	$1.47 \pm 0.26 \times 10^9$
TL01-2 วันที่ 7	$5.00 \times 10^8$	$6.00 \times 10^8$	$5.00 \times 10^8$	$8.00 \times 10^8$	$7.00 \times 10^8$	$8.00 \times 10^8$	$7.00 \times 10^8$	$9.00 \times 10^8$	$7.00 \times 10^8$	$6.89 \pm 1.29 \times 10^8$
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์อิสระ) วันที่ 7	$7.60 \times 10^8$	$7.30 \times 10^8$	$7.30 \times 10^8$	$6.10 \times 10^8$	$6.00 \times 10^8$	$7.80 \times 10^8$	$5.60 \times 10^8$	$5.40 \times 10^8$	$6.10 \times 10^8$	$6.58 \pm 0.87 \times 10^8$
MO2-4	$5.20 \times 10^8$	$4.90 \times 10^8$	$5.10 \times 10^8$	$4.20 \times 10^8$	$3.90 \times 10^8$	$5.10 \times 10^8$	$3.60 \times 10^8$	$3.90 \times 10^8$	$4.30 \times 10^8$	$4.47 \pm 0.58 \times 10^8$
TL01-2	$2.40 \times 10^8$	$2.40 \times 10^8$	$2.20 \times 10^8$	$1.90 \times 10^8$	$2.10 \times 10^8$	$2.70 \times 10^8$	$2.00 \times 10^8$	$1.50 \times 10^8$	$1.80 \times 10^8$	$2.11 \pm 0.34 \times 10^8$
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์ตรึง) วันที่ 7	$1.11 \times 10^9$	$1.22 \times 10^9$	$1.02 \times 10^9$	$9.17 \times 10^8$	$9.58 \times 10^8$	$8.96 \times 10^8$	$1.00 \times 10^9$	$1.05 \times 10^9$	$9.76 \times 10^8$	$1.02 \pm 0.10 \times 10^9$
MO2-4	$6.89 \times 10^8$	$8.22 \times 10^8$	$7.11 \times 10^8$	$6.04 \times 10^8$	$6.46 \times 10^8$	$5.63 \times 10^8$	$6.59 \times 10^8$	$6.34 \times 10^8$	$6.59 \times 10^8$	$6.65 \pm 0.69 \times 10^8$
TL01-2	$4.22 \times 10^8$	$4.00 \times 10^8$	$3.11 \times 10^8$	$3.13 \times 10^8$	$3.13 \times 10^8$	$3.33 \times 10^8$	$3.41 \times 10^8$	$4.15 \times 10^8$	$3.17 \times 10^8$	$3.52 \pm 0.44 \times 10^8$



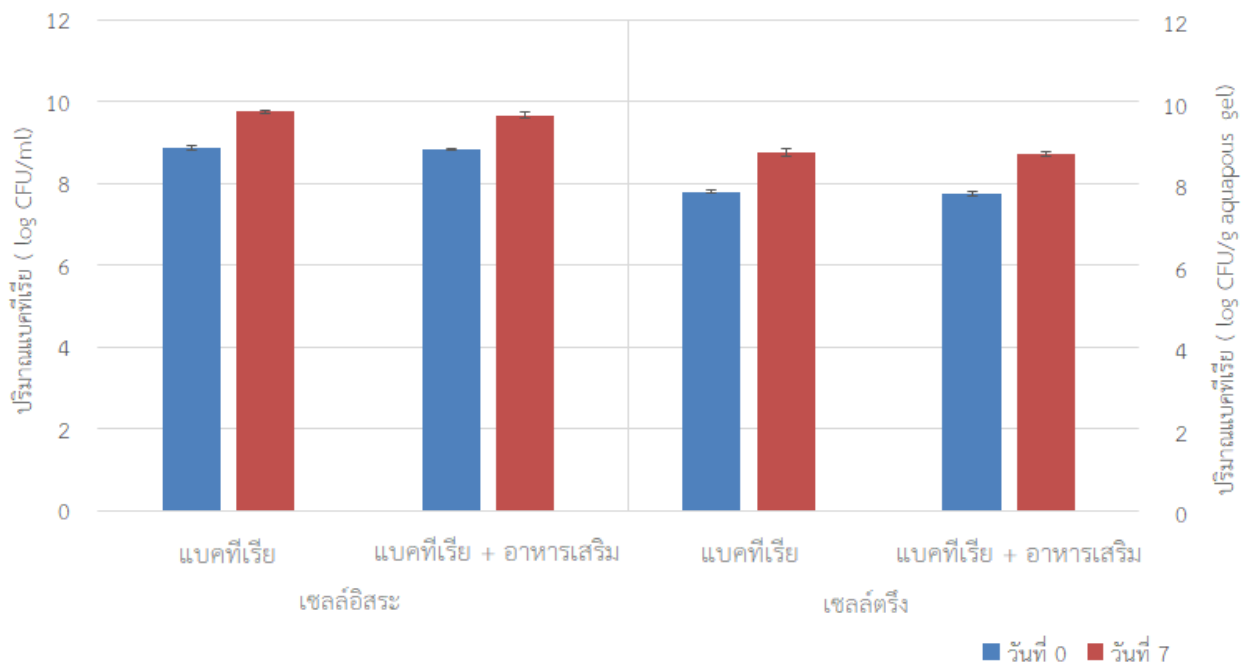
รูปที่ ข-1 กราฟแสดงปริมาณของเชื้อ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2  
ในวันที่ 0 และวันที่ 7 ของการทดลอง

ตารางที่ ข-3 ข้อมูลดิบปริมาณเชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารอาหาร

	ชุดการทดลองซ้ำที่ 1			ชุดการทดลองซ้ำที่ 2			ชุดการทดลองซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์อิสระ) วันที่ 0	$8.00 \times 10^8$	$6.60 \times 10^8$	$6.90 \times 10^8$	$9.10 \times 10^8$	$8.30 \times 10^8$	$7.10 \times 10^8$	$8.10 \times 10^8$	$7.90 \times 10^8$	$6.70 \times 10^8$	$7.63 \pm 0.80 \times 10^8$
MO2-4	$5.20 \times 10^8$	$4.60 \times 10^8$	$4.80 \times 10^8$	$6.20 \times 10^8$	$5.30 \times 10^8$	$4.70 \times 10^8$	$5.60 \times 10^8$	$5.40 \times 10^8$	$4.90 \times 10^8$	$5.19 \pm 0.48 \times 10^8$
TL01-2	$2.80 \times 10^8$	$2.00 \times 10^8$	$2.10 \times 10^8$	$2.90 \times 10^8$	$3.00 \times 10^8$	$2.40 \times 10^8$	$2.50 \times 10^8$	$2.50 \times 10^8$	$1.80 \times 10^8$	$2.44 \pm 0.39 \times 10^8$
เชื้อเลี้ยงรวม มีสารอาหาร (เซลล์อิสระ) วันที่ 0	$7.00 \times 10^8$	$6.70 \times 10^8$	$7.40 \times 10^8$	$6.20 \times 10^8$	$7.70 \times 10^8$	$6.80 \times 10^8$	$6.60 \times 10^8$	$6.10 \times 10^8$	$7.20 \times 10^8$	$6.86 \pm 0.50 \times 10^8$
MO2-4	$4.80 \times 10^8$	$4.50 \times 10^8$	$5.10 \times 10^8$	$4.30 \times 10^8$	$5.20 \times 10^8$	$4.70 \times 10^8$	$4.60 \times 10^8$	$4.30 \times 10^8$	$4.50 \times 10^8$	$4.67 \pm 0.30 \times 10^8$
TL01-2	$2.20 \times 10^8$	$2.20 \times 10^8$	$2.30 \times 10^8$	$1.90 \times 10^8$	$2.50 \times 10^8$	$2.10 \times 10^8$	$2.00 \times 10^8$	$1.80 \times 10^8$	$2.70 \times 10^8$	$2.19 \pm 0.27 \times 10^8$
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์ตรึง) วันที่ 0	$7.40 \times 10^7$	$6.64 \times 10^7$	$6.95 \times 10^7$	$5.74 \times 10^7$	$6.05 \times 10^7$	$5.74 \times 10^7$	$6.69 \times 10^7$	$6.18 \times 10^7$	$6.62 \times 10^7$	$6.44 \pm 0.53 \times 10^7$
MO2-4	$4.96 \times 10^7$	$4.35 \times 10^7$	$4.58 \times 10^7$	$3.80 \times 10^7$	$3.95 \times 10^7$	$3.95 \times 10^7$	$4.63 \times 10^7$	$3.97 \times 10^7$	$4.34 \times 10^7$	$4.28 \pm 0.37 \times 10^7$
TL01-2	$2.44 \times 10^7$	$2.29 \times 10^7$	$2.37 \times 10^7$	$1.94 \times 10^7$	$2.09 \times 10^7$	$1.78 \times 10^7$	$2.06 \times 10^7$	$2.21 \times 10^7$	$2.28 \times 10^7$	$2.16 \pm 0.20 \times 10^7$
เชื้อเลี้ยงรวม มีสารอาหาร (เซลล์ตรึง) วันที่ 0	$5.54 \times 10^7$	$7.00 \times 10^7$	$5.54 \times 10^7$	$5.24 \times 10^7$	$4.60 \times 10^7$	$6.11 \times 10^7$	$5.69 \times 10^7$	$6.38 \times 10^7$	$5.09 \times 10^7$	$5.69 \pm 0.68 \times 10^7$
MO2-4	$3.77 \times 10^7$	$4.54 \times 10^7$	$3.62 \times 10^7$	$3.57 \times 10^7$	$3.10 \times 10^7$	$4.05 \times 10^7$	$3.71 \times 10^7$	$4.14 \times 10^7$	$3.53 \times 10^7$	$3.78 \pm 0.40 \times 10^7$
TL01-2	$1.77 \times 10^7$	$2.46 \times 10^7$	$1.92 \times 10^7$	$1.67 \times 10^7$	$1.51 \times 10^7$	$2.06 \times 10^7$	$1.98 \times 10^7$	$2.24 \times 10^7$	$1.55 \times 10^7$	$1.91 \pm 0.30 \times 10^7$

ตารางที่ ข-3 ข้อมูลดิบปริมาณเชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารอาหาร (ต่อ)

	ชุดการทดลองซ้ำที่ 1			ชุดการทดลองซ้ำที่ 2			ชุดการทดลองซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย ± ค่า คลาดเคลื่อน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์อิสระ) วันที่ 7	$5.60 \times 10^9$	$6.20 \times 10^9$	$5.80 \times 10^9$	$5.70 \times 10^9$	$5.70 \times 10^9$	$5.80 \times 10^9$	$6.80 \times 10^9$	$4.70 \times 10^9$	$5.30 \times 10^9$	$5.73 \pm 0.54 \times 10^9$
MO2-4	$3.60 \times 10^9$	$4.20 \times 10^9$	$4.00 \times 10^9$	$4.10 \times 10^9$	$3.70 \times 10^9$	$3.90 \times 10^9$	$4.50 \times 10^9$	$3.40 \times 10^9$	$3.70 \times 10^9$	$3.90 \pm 0.32 \times 10^9$
TL01-2	$2.00 \times 10^9$	$2.00 \times 10^9$	$1.80 \times 10^9$	$1.60 \times 10^9$	$2.00 \times 10^9$	$1.90 \times 10^9$	$2.30 \times 10^9$	$1.30 \times 10^9$	$1.60 \times 10^9$	$1.83 \pm 0.28 \times 10^9$
เชื้อเลี้ยงรวม มีสารอาหาร (เซลล์อิสระ) วันที่ 7	$3.80 \times 10^9$	$5.00 \times 10^9$	$4.60 \times 10^9$	$4.90 \times 10^9$	$4.20 \times 10^9$	$5.10 \times 10^9$	$6.50 \times 10^9$	$3.80 \times 10^9$	$5.20 \times 10^9$	$4.79 \pm 0.79 \times 10^9$
MO2-4	$2.50 \times 10^9$	$3.20 \times 10^9$	$3.50 \times 10^9$	$2.90 \times 10^9$	$2.70 \times 10^9$	$3.30 \times 10^9$	$4.60 \times 10^9$	$2.80 \times 10^9$	$3.20 \times 10^9$	$3.19 \pm 0.58 \times 10^9$
TL01-2	$1.30 \times 10^9$	$1.80 \times 10^9$	$1.10 \times 10^9$	$2.00 \times 10^9$	$1.50 \times 10^9$	$1.80 \times 10^9$	$1.90 \times 10^9$	$1.00 \times 10^9$	$2.00 \times 10^9$	$1.60 \pm 0.37 \times 10^9$
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์ตรึง) วันที่ 7	$4.74 \times 10^8$	$5.48 \times 10^8$	$5.33 \times 10^8$	$7.48 \times 10^8$	$5.05 \times 10^8$	$6.22 \times 10^8$	$3.75 \times 10^8$	$6.42 \times 10^8$	$7.25 \times 10^8$	$5.75 \pm 1.14 \times 10^8$
MO2-4	$3.33 \times 10^8$	$4.00 \times 10^8$	$3.63 \times 10^8$	$4.77 \times 10^8$	$3.42 \times 10^8$	$4.23 \times 10^8$	$2.42 \times 10^8$	$4.42 \times 10^8$	$4.75 \times 10^8$	$3.89 \pm 0.72 \times 10^8$
TL01-2	$1.41 \times 10^8$	$1.48 \times 10^8$	$1.70 \times 10^8$	$2.70 \times 10^8$	$1.62 \times 10^8$	$1.98 \times 10^8$	$1.33 \times 10^8$	$2.00 \times 10^8$	$2.50 \times 10^8$	$1.86 \pm 0.46 \times 10^8$
เชื้อเลี้ยงรวม มีสารอาหาร (เซลล์ตรึง) วันที่ 7	$4.19 \times 10^8$	$5.38 \times 10^8$	$5.30 \times 10^8$	$6.67 \times 10^8$	$5.61 \times 10^8$	$6.02 \times 10^8$	$5.50 \times 10^8$	$4.81 \times 10^8$	$6.12 \times 10^8$	$5.51 \pm 0.70 \times 10^8$
MO2-4	$2.99 \times 10^8$	$3.68 \times 10^8$	$3.93 \times 10^8$	$4.39 \times 10^8$	$3.66 \times 10^8$	$4.07 \times 10^8$	$3.26 \times 10^8$	$3.64 \times 10^8$	$4.11 \times 10^8$	$3.75 \pm 0.41 \times 10^8$
TL01-2	$1.20 \times 10^8$	$1.71 \times 10^8$	$1.37 \times 10^8$	$2.28 \times 10^8$	$1.95 \times 10^8$	$1.95 \times 10^8$	$2.25 \times 10^8$	$1.16 \times 10^8$	$2.02 \times 10^8$	$1.76 \pm 0.41 \times 10^8$



รูปที่ ข-2 กราฟแสดงปริมาณเชื้อของการทดลองการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารอาหาร ในวันที่ 0 และวันที่ 7

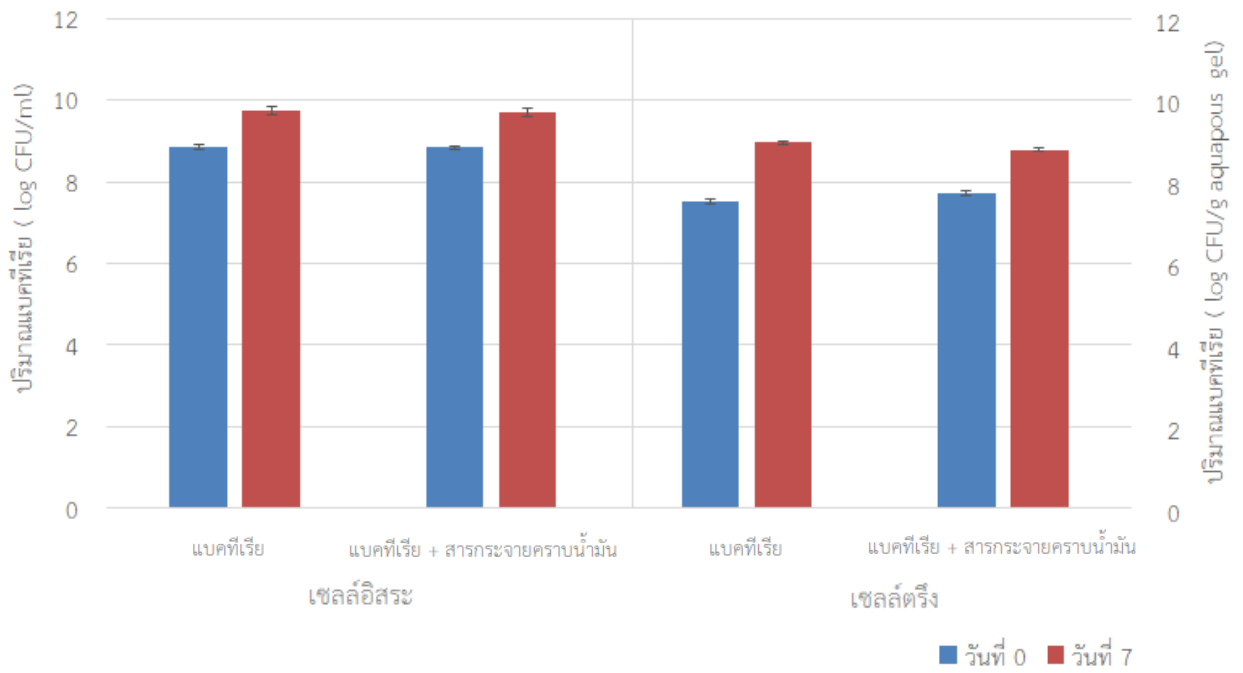


ตารางที่ ข-4 ข้อมูลดิบปริมาณเชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน

	ชุดการทดลองซ้ำที่ 1			ชุดการทดลองซ้ำที่ 2			ชุดการทดลองซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย ± ค่า คลาดเคลื่อน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์อิสระ) วันที่ 0	$7.80 \times 10^8$	$6.80 \times 10^8$	$6.80 \times 10^8$	$5.80 \times 10^8$	$6.10 \times 10^8$	$7.10 \times 10^8$	$9.20 \times 10^8$	$6.40 \times 10^8$	$7.90 \times 10^8$	$7.10 \pm 0.99 \times 10^8$
MO2-4	$5.10 \times 10^8$	$4.90 \times 10^8$	$4.30 \times 10^8$	$3.80 \times 10^8$	$4.20 \times 10^8$	$4.70 \times 10^8$	$6.40 \times 10^8$	$4.80 \times 10^8$	$4.90 \times 10^8$	$4.79 \pm 0.69 \times 10^8$
TL01-2	$2.70 \times 10^8$	$1.90 \times 10^8$	$2.50 \times 10^8$	$2.00 \times 10^8$	$1.90 \times 10^8$	$2.40 \times 10^8$	$2.80 \times 10^8$	$1.60 \times 10^8$	$3.00 \times 10^8$	$2.31 \pm 0.45 \times 10^8$
เชื้อเลี้ยงรวม มีสาร กระจายคราบน้ำมัน (เซลล์อิสระ) วันที่ 0	$6.70 \times 10^8$	$6.80 \times 10^8$	$7.30 \times 10^8$	$6.70 \times 10^8$	$6.80 \times 10^8$	$7.10 \times 10^8$	$5.80 \times 10^8$	$6.40 \times 10^8$	$8.00 \times 10^8$	$6.84 \pm 0.57 \times 10^8$
MO2-4	$4.70 \times 10^8$	$4.60 \times 10^8$	$5.00 \times 10^8$	$4.90 \times 10^8$	$4.30 \times 10^8$	$4.80 \times 10^8$	$4.30 \times 10^8$	$4.20 \times 10^8$	$5.20 \times 10^8$	$4.67 \pm 0.33 \times 10^8$
TL01-2	$2.00 \times 10^8$	$2.20 \times 10^8$	$2.30 \times 10^8$	$1.80 \times 10^8$	$2.50 \times 10^8$	$2.30 \times 10^8$	$1.50 \times 10^8$	$2.20 \times 10^8$	$2.80 \times 10^8$	$2.18 \pm 0.36 \times 10^8$
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์ตรึง) วันที่ 0	$3.09 \times 10^7$	$3.17 \times 10^7$	$3.67 \times 10^7$	$2.77 \times 10^7$	$3.35 \times 10^7$	$2.72 \times 10^7$	$3.15 \times 10^7$	$4.02 \times 10^7$	$3.54 \times 10^7$	$3.28 \pm 0.40 \times 10^7$
MO2-4	$1.94 \times 10^7$	$1.65 \times 10^7$	$2.23 \times 10^7$	$1.68 \times 10^7$	$2.31 \times 10^7$	$1.85 \times 10^7$	$2.28 \times 10^7$	$2.20 \times 10^7$	$2.36 \times 10^7$	$2.06 \pm 0.26 \times 10^7$
TL01-2	$1.15 \times 10^7$	$1.51 \times 10^7$	$1.44 \times 10^7$	$1.10 \times 10^7$	$1.04 \times 10^7$	$8.67 \times 10^6$	$8.66 \times 10^6$	$1.81 \times 10^7$	$1.18 \times 10^7$	$1.22 \pm 0.30 \times 10^7$
เชื้อเลี้ยงรวม มีสาร กระจายคราบน้ำมัน (เซลล์ตรึง) วันที่ 0	$5.90 \times 10^7$	$5.81 \times 10^7$	$4.79 \times 10^7$	$5.00 \times 10^7$	$7.02 \times 10^7$	$5.16 \times 10^7$	$4.37 \times 10^7$	$4.62 \times 10^7$	$5.13 \times 10^7$	$5.31 \pm 0.77 \times 10^7$
MO2-4	$3.76 \times 10^7$	$3.93 \times 10^7$	$3.25 \times 10^7$	$2.98 \times 10^7$	$4.11 \times 10^7$	$3.39 \times 10^7$	$3.11 \times 10^7$	$3.03 \times 10^7$	$3.36 \times 10^7$	$3.44 \pm 0.39 \times 10^7$
TL01-2	$2.14 \times 10^7$	$1.88 \times 10^7$	$1.54 \times 10^7$	$2.02 \times 10^7$	$2.90 \times 10^7$	$1.77 \times 10^7$	$1.26 \times 10^7$	$1.60 \times 10^7$	$1.76 \times 10^7$	$1.87 \pm 0.44 \times 10^7$

ตารางที่ ข-4 ข้อมูลดิบปริมาณเชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน (ต่อ)

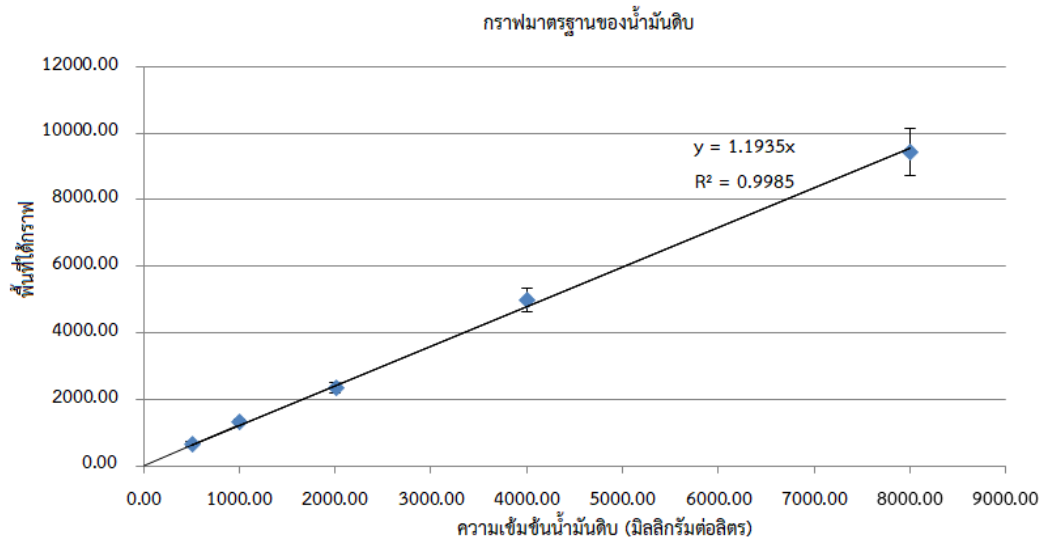
	ชุดการทดลองซ้ำที่ 1			ชุดการทดลองซ้ำที่ 2			ชุดการทดลองซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย ± ค่า คลาดเคลื่อน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์อิสระ) วันที่ 7	$8.30 \times 10^9$	$5.00 \times 10^9$	$7.30 \times 10^9$	$4.80 \times 10^9$	$5.70 \times 10^9$	$5.80 \times 10^9$	$4.80 \times 10^9$	$5.50 \times 10^9$	$3.80 \times 10^9$	$5.67 \pm 1.29 \times 10^9$
MO2-4	$5.80 \times 10^9$	$3.60 \times 10^9$	$4.30 \times 10^9$	$3.10 \times 10^9$	$3.90 \times 10^9$	$4.00 \times 10^9$	$3.30 \times 10^9$	$3.60 \times 10^9$	$3.10 \times 10^9$	$3.86 \pm 0.79 \times 10^9$
TL01-2	$2.50 \times 10^9$	$1.40 \times 10^9$	$3.00 \times 10^9$	$1.70 \times 10^9$	$1.80 \times 10^9$	$1.80 \times 10^9$	$1.50 \times 10^9$	$1.90 \times 10^9$	$7.00 \times 10^8$	$1.81 \pm 0.62 \times 10^9$
เชื้อเลี้ยงรวม มีสาร กระจายคราบน้ำมัน (เซลล์อิสระ) วันที่ 7	$7.20 \times 10^9$	$6.10 \times 10^9$	$6.00 \times 10^9$	$4.90 \times 10^9$	$5.20 \times 10^9$	$4.70 \times 10^9$	$3.20 \times 10^9$	$4.50 \times 10^9$	$5.50 \times 10^9$	$5.26 \pm 1.07 \times 10^9$
MO2-4	$4.70 \times 10^9$	$3.90 \times 10^9$	$4.20 \times 10^9$	$3.50 \times 10^9$	$3.60 \times 10^9$	$3.10 \times 10^9$	$2.30 \times 10^9$	$2.80 \times 10^9$	$3.50 \times 10^9$	$3.51 \pm 0.68 \times 10^9$
TL01-2	$2.50 \times 10^9$	$2.20 \times 10^9$	$1.80 \times 10^9$	$1.40 \times 10^9$	$1.60 \times 10^9$	$1.60 \times 10^9$	$9.00 \times 10^8$	$1.70 \times 10^9$	$2.00 \times 10^9$	$1.74 \pm 0.44 \times 10^9$
เชื้อเลี้ยงรวม (เซลล์ตรึง) วันที่ 7	$1.01 \times 10^9$	$9.50 \times 10^8$	$1.00 \times 10^9$	$1.02 \times 10^9$	$8.00 \times 10^8$	$8.45 \times 10^8$	$9.81 \times 10^8$	$9.26 \times 10^8$	$8.33 \times 10^8$	$9.29 \pm 0.78 \times 10^8$
MO2-4	$6.58 \times 10^8$	$6.33 \times 10^8$	$6.75 \times 10^8$	$6.82 \times 10^8$	$5.82 \times 10^8$	$6.18 \times 10^8$	$6.11 \times 10^8$	$6.57 \times 10^8$	$5.46 \times 10^8$	$6.29 \pm 0.42 \times 10^8$
TL01-2	$3.50 \times 10^8$	$3.17 \times 10^8$	$3.25 \times 10^8$	$3.36 \times 10^8$	$2.18 \times 10^8$	$2.27 \times 10^8$	$2.27 \times 10^8$	$2.69 \times 10^8$	$2.87 \times 10^8$	$3.00 \pm 0.50 \times 10^8$
เชื้อเลี้ยงรวม มีสาร กระจายคราบน้ำมัน (เซลล์ตรึง) วันที่ 7	$5.33 \times 10^8$	$5.33 \times 10^8$	$5.94 \times 10^8$	$7.45 \times 10^8$	$5.75 \times 10^8$	$7.06 \times 10^8$	$6.26 \times 10^8$	$6.67 \times 10^8$	$5.44 \times 10^8$	$6.14 \pm 0.73 \times 10^8$
MO2-4	$3.78 \times 10^8$	$3.50 \times 10^8$	$3.83 \times 10^8$	$4.71 \times 10^8$	$4.18 \times 10^8$	$4.64 \times 10^8$	$4.42 \times 10^8$	$4.69 \times 10^8$	$3.27 \times 10^8$	$4.11 \pm 0.51 \times 10^8$
TL01-2	$1.56 \times 10^8$	$1.83 \times 10^8$	$2.11 \times 10^8$	$2.75 \times 10^8$	$1.57 \times 10^8$	$2.42 \times 10^8$	$1.84 \times 10^8$	$1.97 \times 10^8$	$2.18 \times 10^8$	$2.02 \pm 0.37 \times 10^8$



รูปที่ ข-3 กราฟแสดงปริมาณเชื้อของการทดลองการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน ในวันที่ 0 และวันที่ 7

ภาคผนวก ค  
ข้อมูลดิบของน้ำมันดิบในการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ

กราฟมาตรฐาน



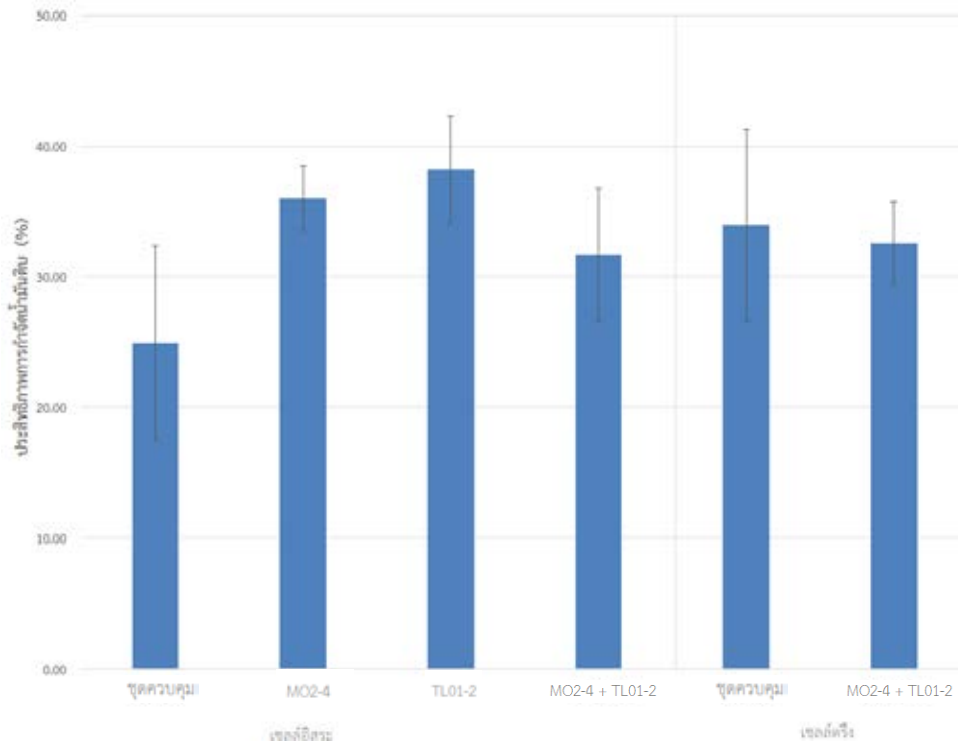
รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นน้ำมันดิบ

ตารางที่ ค-1 ข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ

	พื้นที่ใต้กราฟรวม			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าคลาดเคลื่อน
ชุดควบคุมของเซลล์อิสระ วันที่ 0	10149.3	8664.7	10900.4	9904.8 $\pm$ 928.9
ชุดทดสอบ MO2-4 วันที่ 0	6542.7	7655.7	6563.8	6920.7 $\pm$ 519.8
ชุดทดสอบ TL01-2 วันที่ 0	7374.3	8319.6	8568.6	8087.5 $\pm$ 514.5
ชุดทดสอบเฉลี่ยร่วม MO2-4 และ TL01-2 วันที่ 0	7926.2	7018.8	7133.9	7359.6 $\pm$ 403.3
ชุดควบคุมของเซลล์ตรึง วันที่ 0	6614.6	6356.9	6295.5	6422.3 $\pm$ 524.0
ชุดทดสอบเฉลี่ยร่วม MO2-4 และ TL01-2 ตรึงเซลล์ วันที่ 0	6145.3	6086.3	6149.3	6127.0 $\pm$ 192.9
ชุดควบคุมของเซลล์อิสระ วันที่ 7	8360.3	7390.1	6553.6	7434.7 $\pm$ 738.3
ชุดทดสอบ MO2-4 วันที่ 7	6108.9	6230.3	6679.6	6339.6 $\pm$ 245.5
ชุดทดสอบ TL01-2 วันที่ 7	5599.9	6594.4	6179.7	6124.7 $\pm$ 407.9
ชุดทดสอบเฉลี่ยร่วม MO2-4 และ TL01-2 วันที่ 7	6144.9	7390.6	6771.2	6768.9 $\pm$ 508.6
ชุดควบคุมของเซลล์ตรึง วันที่ 7	4898.3	3796.5	4039.2	4244.7 $\pm$ 617.3
ชุดทดสอบเฉลี่ยร่วม MO2-4 และ TL01-2 ตรึงเซลล์ วันที่ 7	4055.3	4548.6	4393.2	4332.4 $\pm$ 709.8

ตารางที่ ค-2 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	24.94 $\pm$ 7.45
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4	35.99 $\pm$ 2.48
<i>Bacillus megaterium</i> TL01-2	38.16 $\pm$ 4.12
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ที่เฉลี่ยร่วมกับ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ	31.66 $\pm$ 5.13
ชุดควบคุม ในรูปเซลล์ตรึง	33.91 $\pm$ 7.36
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ที่เฉลี่ยร่วมกับ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์ตรึง	32.54 $\pm$ 3.21



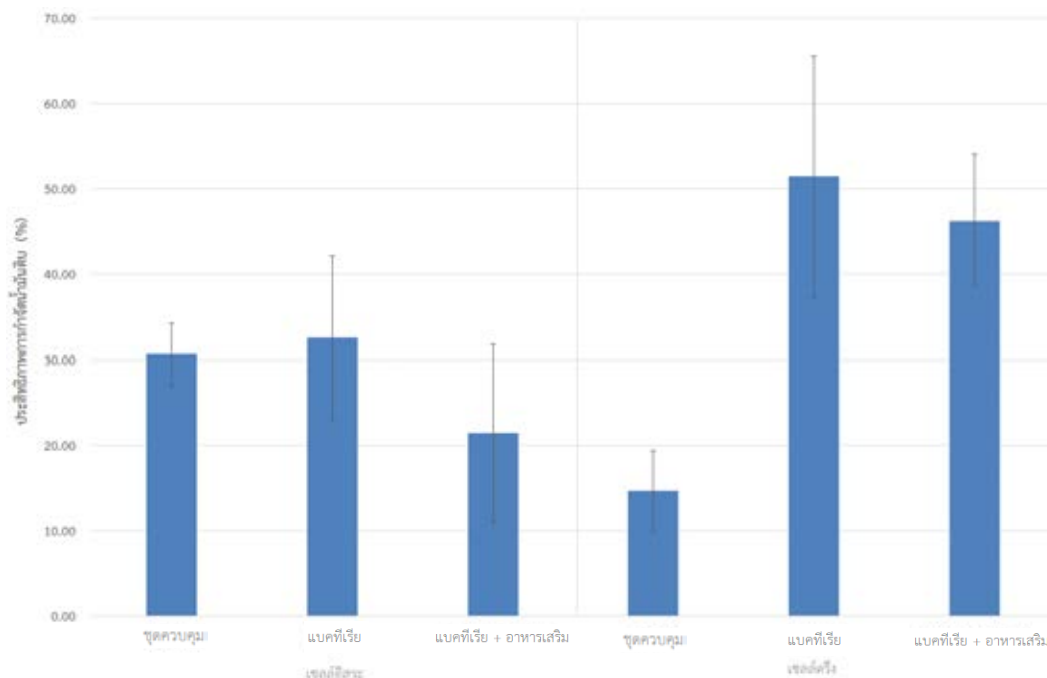
รูปที่ ค-2 กราฟแสดงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของเชื้อ *Sphingobium* sp. MO2-4 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 หลังจากทำการทดลอง 7 วัน

ตารางที่ ค-3 ข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารอาหาร

	พื้นที่ใต้กราฟรวม			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่า คลาดเคลื่อน
ชุดควบคุมของเซลล์อิสระ วันที่ 0	6795.2	5862.5	6291.1	6316.3 $\pm$ 381.2
ชุดทดสอบแบคทีเรีย วันที่ 0	4034.4	5074.9	5234.3	4781.2 $\pm$ 532.1
ชุดทดสอบแบคทีเรียเติมสารอาหาร วันที่ 0	9729.8	3251.5	3974.0	5651.8 $\pm$ 2898.7
ชุดควบคุมของเซลล์ตรึง วันที่ 0	3783.3	3598.6	4300.6	3894.1 $\pm$ 297.1
ชุดทดสอบแบคทีเรีย เซลล์ตรึง วันที่ 0	3294.9	3600.3	3098.3	3331.2 $\pm$ 293.3
ชุดทดสอบแบคทีเรียเติมสารอาหาร เซลล์ตรึง วันที่ 0	5348.7	4193.2	3513.8	4351.9 $\pm$ 687.4
ชุดควบคุมของเซลล์อิสระ วันที่ 7	4535.6	4558.6	4059.7	4384.6 $\pm$ 230.0
ชุดทดสอบแบคทีเรีย วันที่ 7	3605.5	5066.3	4111.6	4261.1 $\pm$ 605.7
ชุดทดสอบแบคทีเรียเติมสารอาหาร วันที่ 7	5887.7	4625.3	4383.1	4965.4 $\pm$ 659.6
ชุดควบคุมของเซลล์ตรึง วันที่ 7	3486.6	3421.5	3064.7	3324.3 $\pm$ 192.1
ชุดทดสอบแบคทีเรีย เซลล์ตรึง วันที่ 7	1549.1	1456.9	2668.8	1891.6 $\pm$ 439.3
ชุดทดสอบแบคทีเรียเติมสารอาหาร เซลล์ตรึง วันที่ 7	2293.7	2320.1	1667.3	2093.7 $\pm$ 229.0

ตารางที่ ค-4 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรียภายใต้สภาวะการเติมสารอาหาร

แบคทีเรีย	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม ในรูปเซลล์อิสระ	30.58 ± 3.64
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ที่เลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ ที่ไม่มีการเติมสารอาหาร	32.54 ± 9.59
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ที่เลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ ที่มีการเติมสารอาหาร	21.39 ± 10.44
ชุดควบคุม ในรูปเซลล์ตรึง	14.63 ± 4.76
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ที่เลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์ตรึง ที่ไม่มีการเติมสารอาหาร	51.42 ± 14.15
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ที่เลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์ตรึง ที่มีการเติมสารอาหาร	46.23 ± 7.75



รูปที่ ค-3 กราฟแสดงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารอาหาร หลังจากทำการทดลอง 7 วัน

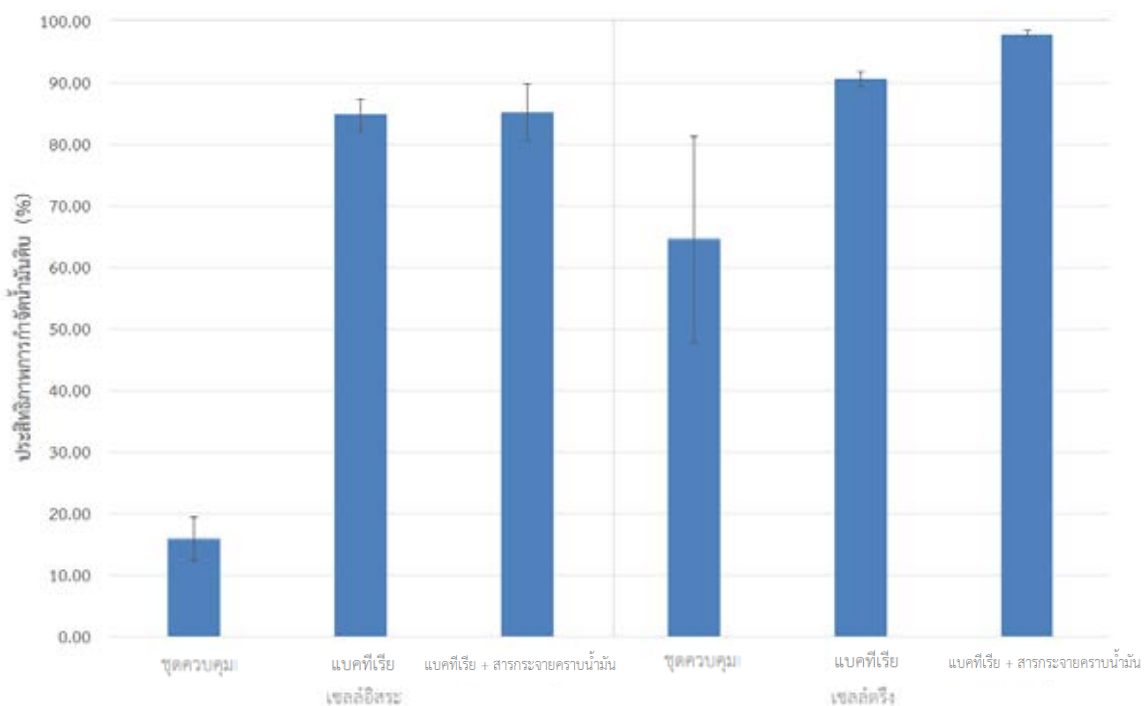


ตารางที่ ค-5 ข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน

	พื้นที่ใต้กราฟรวม			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าคลาดเคลื่อน
ชุดควบคุมของเซลล์อิสระ วันที่ 0	6145.1	6731.2	5719.6	6198.6 $\pm$ 414.7
ชุดทดสอบแบคทีเรีย วันที่ 0	5597.4	5521.7	6157.6	5758.9 $\pm$ 283.6
ชุดทดสอบแบคทีเรียเติมสารอาหาร วันที่ 0	4911.9	4626.5	5249.9	4929.4 $\pm$ 254.8
ชุดควบคุมของเซลล์ตรึง วันที่ 0	5008.3	5934.7	6357.8	5766.9 $\pm$ 2821.5
ชุดทดสอบแบคทีเรีย เซลล์ตรึง วันที่ 0	4614.4	4888.3	3963.6	4488.8 $\pm$ 386.5
ชุดทดสอบแบคทีเรียเติมสารกระจายคราบน้ำมัน เซลล์ตรึง วันที่ 0	4089.5	4476.1	4675.1	4413.6 $\pm$ 236.1
ชุดควบคุมของเซลล์อิสระ วันที่ 7	5516.1	4984.5	5139.3	5213.3 $\pm$ 223.2
ชุดทดสอบแบคทีเรีย วันที่ 7	803.4	1173.0	871.1	949.4 $\pm$ 160.6
ชุดทดสอบแบคทีเรียเติมสารอาหาร วันที่ 7	1315.6	622.2	827.6	921.8 $\pm$ 290.8
ชุดควบคุมของเซลล์ตรึง วันที่ 7	3247.0	1998.1	888.8	2044.6 $\pm$ 887.1
ชุดทดสอบแบคทีเรีย เซลล์ตรึง วันที่ 7	455.3	559.5	634.3	549.7 $\pm$ 52.4
ชุดทดสอบแบคทีเรียเติมสารกระจายคราบน้ำมัน เซลล์ตรึง วันที่ 7	102.8	160.9	98.9	120.9 $\pm$ 21.4

ตารางที่ ค-6 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของแบคทีเรียภายใต้สภาวะการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน

แบคทีเรีย	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม ในรูปเซลล์อิสระ	15.90 ± 3.60
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ที่เลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ ที่ไม่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน	84.68 ± 2.59
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ที่เลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์อิสระ ที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน	85.13 ± 4.69
ชุดควบคุม ในรูปเซลล์ตรึง	64.55 ± 16.70
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ที่เลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์ตรึง ที่ไม่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน	90.47 ± 1.27
<i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ที่เลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus megaterium</i> TL01-2 ในรูปเซลล์ตรึง ที่มีการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน	97.90 ± 0.49



รูปที่ ค-4 กราฟแสดงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการเติมสารกระจายคราบน้ำมัน  
หลังจากทำการทดลอง 7 วัน