การสร้างกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เพื่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ

นายปัญจพล ชิโนดม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-053-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 3 ก.ย. 2545
I19498925

CONSTRUCTION OF MICROBIAL CONSORTIUM FOR CRUDE OIL DEGRADATION

Mr. Punjapon Chinodom

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 2000

ISBN 974-346-053-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เพื่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ

โดย นายปัญจพล ชิโนดม

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โมษิตานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โมษิตานนท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ปัญจพล ชิโนดม : การสร้างกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เพื่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ (CONSTRUCTION OF MICROBIAL CONSORTIUM FOR CRUDE OIL DEGRADATION) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ; 174 หน้า. ISBN 974-346-053-5

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนบางชนิดที่มีอยู่ในน้ำมันดิบสายพันธุ์ B3-1 C1-2 และ D2-1 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันและกากตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสีย ผลการจำแนกชนิดพบว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 C1-2 และ D2-1 จัดอยู่ในสกุล *Bacillus circulans Pseudomonas alkaligenes* และ *Yarrowia* sp. ตามลำดับ และยืนยันผลการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของ *Bacillus* sp. B3-1 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rRNA จุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยที่ *Yarrowia* sp. สายพันธุ์ D2-1 จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีกว่าจุลินทรีย์อีก 2 สายพันธุ์ รวมทั้งมี dioxygenase activity ด้วย การย่อยสลายนอร์มอล-เตตระเดกเคน พริสเทนและฟีแนนทรีน ในอาหารเหลว BH ที่มีไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิด 4 มก./มล. ภายในเวลา 7 วันพบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 สามารถลดปริมาณพริสเทนได้ 66.4% *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C1-2 สามารถลดปริมาณนอร์มอล- เตตระเดกเคนได้ 88.5% ส่วน *Yarrowia* sp. สายพันธุ์ D2-1 สามารถลดปริมาณฟีแนนทรีนได้ 90% ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 สามารถลดปริมาณไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้ 35% ภายในเวลา 1 วันและ 55 % เมื่อครบ 7 วัน เมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ระหว่าง 6-7 พบว่า ปริมาณไฮโดรคาร์บอนถูกย่อยสลายได้มากขึ้นเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C1-2 และ *Yarrowia* sp. สายพันธุ์ D2-1 ในภาวะที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันได้ 80% และ 82% ตามลำดับ ในภาวะเดียวกันเชื้อผสมย่อยสลายน้ำมันได้ดีกว่าเชื้อเพียงชนิดเดียว เมื่อทำการปรับภาวะในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อผสมย่อยน้ำมันดิบได้ดีที่สุดได้ค่าต่างๆ ดังนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 อุณหภูมิ 20°ซ ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาทีและอัตราส่วนระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น 2:1 ตามลำดับ พบว่า ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดลดลงประมาณ 90% ภายในเวลา 3 วัน

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4072309023 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : Microbial consortium / Biodegradation / Crude oil

PUNJAPON CHINODOM : CONSTRUCTION OF MICROBIAL CONSORTIUM FOR CRUDE OIL DEGRADATION. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. CHARNWIT KHOSITANONTH, Ph.D. 174 pp.
ISBN 974-346-053-5

Three crude oil degrading microorganisms were isolated from oil contaminated soil and waste water sludge from an oil refinery factory. They were identified as *Bacillus circulans* *Pseudomonas alkaligenes* and *Yarrowia* sp. respectively. *Bacillus* identification was confirmed by base comparison of 16S rRNA. *Yarrowia* could reduce media surface tension much more than the others and showed dioxygenase activity. With BH medium contain 4 mg/ml hydrocarbon *Bacillus* sp. reduced pristane by 66% while *Pseudomonas* sp. reduced n-tetradecane 88.5% and *Yarrowia* sp. reduced phenanthrene by 90% within 7 days.

Bacillus sp. degrading crude oil 35% in the first day and increase to 55% at 7^{th} day in unbuffered medium. With buffered medium crude oil degradation of *Bacillus* sp. was increased to 75% while *Pseudomonas* sp. and *Yarrowia* sp. was found to degrade crude oil at 80 and 82% respectively.

Mixed culture of the three isolates was better than each pure culture in oil degradation under the same conditions. At the optimal condition pH 8.0 20^{0}C 250 rpm and 2:1 (biosurfactant producer : mixed culture) total hydrccarbon in crude oil was reduced by 90% within 3 days.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนกำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดเวลาขณะที่ศึกษาและดำเนินงานวิจัย ซึ่งผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบและความช่วยเหลือต่างๆ ที่ผู้วิจัยได้รับตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด และอาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบ และให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนการศึกษาในการทำวิทยานิพนธ์เป็นเงิน 13,950 บาท และทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมพิเศษเป็นเวลา 1 ปีการศึกษา

ขอขอบพระคุณบริษัท ไทยแมกซ์เวล จำกัด ที่ให้ทุนในการทำวิจัยครั้งนี้เป็นเงิน 85,000 บาท

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. อรรถวุฒิ อิ่มพูลทรัพย์ และ คุณประไพพิศ เทพารส ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ เกี่ยวกับงานทางด้านพันธุศาสตร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณอิศรา สระมาลา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในงานด้านอณูพันธุศาสตร์ในบางส่วน

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคนที่ได้ให้การสนับสนุนให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตลอดมา

สารบัญ

เรื่อง หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญรูป.....ฌ

สัญลักษณ์และคำย่อ.....ฒ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. การตรวจเอกสาร.....4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....40
4. ผลการทดลอง.....63
5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....132

รายการอ้างอิง.....140

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. 154

ภาคผนวก ข. 158

ภาคผนวก ค. 162

ภาคผนวก ง. 164

ภาคผนวก จ. 172

ประวัติผู้เขียน.....174

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ธาตุที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบ..... 4
2.2 ค่าความหนืดของไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ 11
2.3 แบคทีเรียและราซึ่งย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนได้ จากรายงานการวิจัยต่างๆ..... 32
3.1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างดินและน้ำที่คาดว่าจะมีการปนปื้อนของน้ำมันดิบ..... 47
3.2 ส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆ ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ..... 55
4.1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งแยกและคัดเลือกจากตัวอย่างดิน , น้ำ, ตะกอนและสลัดจ์ที่ปนเปื้อนน้ำมัน (การคัดแยกขั้นแรก) พร้อมทั้งลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์..... 64
4.2 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ Tapis เมื่อทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากขั้นแรก ที่ภาวะในการทดลองความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 5 วัน..... 66
4.3 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ B3-1 69
4.4 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ B3-1 70
4.5 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ C1-2 72
4.6 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ C1-2..... 72
4.7 ลักษณะการเจริญ ทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของจุลินทรีย์สายพันธุ์ D2-1 74
4.8 คุณลักษณะทางชีวเคมีบางประการของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน 76
4.9 Retention time ของนอร์มอล-อัลเคนในน้ำมันดิบ Tapis เมื่อวิเคราะห์ด้วยแคพิลารี่ก๊าซโครมาโตกราฟี..... 95
4.10 Retention time ของนอร์มอล-อัลเคนมาตรฐาน ซึ่งใช้ในการจำแนกชนิดของไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ Tapis..... 96
4.11 ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่เหลือจากการย่อยสลายทางกายภาพของ 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ Tapis ในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ในระยะเวลาต่างๆ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์..... 97

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.12 Retention time ของนอร์มอล-เตตระเดกเคน พริสเทน ฟีแนนทรีนและสารมาตรฐานภายใน (1-อีโคซีน) เมื่อวิเคราะห์ด้วยแคพิลารี่ก๊าซโครมาโตกราฟี..... 99

4.13 ผลการศึกษาคุณสมบัติที่สำคัญบางประการของจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้..... 111

4.14 ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 และเชื้อผสมทั้ง 3 สายพันธุ์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ และมีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วยการเติมบัฟเฟอร์..... 114

4.15 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น 172

4.16 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น..... 172

4.17 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น..... 173

4.19 ผลของอัตราที่เหมาะสมระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น..... 173

4.20 ผลของการเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20°ซ ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที และอัตราส่วนระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นเท่ากับ 2:1) ต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น..... 130

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ตัวอย่างของแนฟทีน..... 5
2.2 ตัวอย่างของสารพวกอะโรมาติค..... 6
2.3 ประเภทของสารประกอบกำมะถันที่พบในน้ำมันดิบ..... 7
2.4 สารประกอบของออกซิเจนที่พบในน้ำมันดิบ..... 8
2.5 สารประกอบไนโตรเจนที่พบในน้ำมันดิบ..... 9
2.6 ลักษณะโครมาโตแกรมก๊าซโครมาโตกราฟีของน้ำมันดิบจากแหล่งต่างๆ..... 12
2.7 แสดงการกระจายตัวของน้ำมันดิบสู่สิ่งแวดล้อมทางบก..... 14
2.8 ลักษณะการกระจายตัวของน้ำมันลงสู่สิ่งแวดล้อมทางน้ำ..... 16
3.1 การควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอเพื่อต้องการวิเคราะห์ลำดับเบส..... 54
3.2 การควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์16S rRNA..... 56
3.3 แสดงลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทริปโตเฟน..... 57
4.1 อัตราการเจริญเติบโตและค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) ของจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่ผสม 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°ซ ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที..... 68
4.3 ลักษณะรูปร่างของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 เมื่อย้อมสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)..... 71
4.3 ลักษณะรูปร่างของจุลินทรีย์สายพันธุ์ C1-2 เมื่อย้อมสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)..... 73
4.4 ลักษณะรูปร่างของจุลินทรีย์สายพันธุ์ D2-1 เมื่อย้อมด้วยแลคโตฟีนอล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า)..... 74
4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ต่างๆที่มีลักษณะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกัน กับลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 ด้วยโปรแกรม ClustalX และบริเวณที่ออกแบบไพร์มเมอร์..... 79

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.6 ขนาดชิ้นยีนของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 80

4.7 ลักษณะรูปร่างของพาราสปอรอล – คริสตัล ซึ่งพบใน *Bacillus thuringiensis* เพียงสายพันธุ์เดียว เมื่อเปรียบเทียบกับ *Bacillus* sp. B3-1 โดยการย้อมด้วยวิธีเดียวกัน ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า 80

4.8 ค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อบ่มเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นเวลา 24 ชม. โดยเก็บตัวอย่างทุก 3 ชม. (แนวโน้มการลดลงของค่าแรงตึงผิวของอาหารเหลว)..... 83

4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่หลังจากการย่อยสลายของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 และการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ..... 86

4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. C1-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ..... 90

4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเจริญของเชื้อ *Yarrowia* sp. C1-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ..... 92

4.12 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีขององค์ประกอบที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ Tapis ซึ่งใช้ ในงานวิจัยนี้..... 94

4.13 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของไฮโดรคาร์บอนมาตรฐานต่างๆ (C6-C32)..... 94

4.14 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของไฮโดรคาร์บอนในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ (การย่อยสลายทางกายภาพ) ที่ระยะเวลาต่างๆ กันในอาหารเหลว BH ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ Tapis ในภาวะความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ..... 98

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.15 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์กาซโครมาโตกราฟีของนอร์มอล-เตตระเดกเคน พริสเทน และฟีแนนทรีน ซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้..... 100

4.16 ปริมาณของนอร์มอล-เตตระเดกเคนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ กันเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์..... 102

4.17 กราฟแสดงอัตราการเจริญของ *Bacillus* sp.B3-1 *Pseudomonas* sp.C1-2 และ *Yarrowia* sp.D2-1 โดยการใช้นอร์มอล-เตตระเดกเคนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... 103

4.18 ปริมาณของพริสเทนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ กันเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์..... 105

4.19 กราฟแสดงอัตราการของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 โดยการใช้พริสเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... 106

4.20 ปริมาณของฟีแนนทรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ กันเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์..... 108

4.21 กราฟแสดงอัตราการของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 โดยการใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... 109

4.22 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของเชื้อผสม ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเจริญของเชื้อผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ..... 113

4.23 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของปริมาณน้ำมันที่เหลือจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์และจุลินทรีย์ผสม เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ..... 116

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.24 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ 118

4.25 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที, อุณหภูมิ 30°ซ 119

4.26 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที..... 121

4.27 ผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที 122

4.28 ผลของความเร็วรอบการเขย่าที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20°ซ..... 124

4.29 ผลของความเร็วรอบการเขย่าที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความ เป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20°ซ..... 125

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.30 ผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดยใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20^{0}ซ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที..... 127

4.31 ผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดยใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20^{0}ซ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที..... 128

4.32 ผลของการเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20^{0}ซ ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที และอัตราส่วนระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นเท่ากับ 4:1) ต่ออัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นและประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น..... 131

คำย่อ

^{0}ซ	=	องศาเซลเซียส
ชม.	=	ชั่วโมง
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
%	=	เปอร์เซ็นต์
v/v	=	ปริมาตรต่อปริมาตร
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร
cm^2	=	ตารางเซนติเมตร
mN/m	=	มิลลินิวตันต่อเมตร
mg/l	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
M	=	โมลาร์