

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้

##### 4.1.1 การแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างที่เก็บได้

จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากบริเวณที่เคยมีการปนเปื้อนของน้ำมันส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ดี (Braddock และคณะ , 1995 ; Williams และคณะ , 1998) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงดำเนินการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน น้ำ ตะกอนและสลัดจ์ ซึ่งมีการปนเปื้อนของน้ำมันจำนวน 11 ตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียงมาทำการคัดแยกจุลินทรีย์ด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ (Enrichment Technique) (Venkateswaran และ Harayama , 1995) พบว่าได้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ 29 สายพันธุ์ จากการคัดแยกในขั้นแรก (primary screening) ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งแยกและคัดเลือกรจากตัวอย่างดิน , น้ำ , ตะกอนและสลัดจ์ที่ปนเปื้อนน้ำมัน ( การคัดแยกขั้นแรก ) พร้อมทั้งลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์

ลำดับที่	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ โคโลนีของจุลินทรีย์	รหัสจุลินทรีย์		
1	A1	โคโลนีสีส้ม กลม ขนาดเล็ก เป็นมัน	A1-1		
		โคโลนีสีเหลือง กลม เป็นมัน	A1-2		
	A2	โคโลนีกลมเล็ก สีขาวใส โปร่งแสง ขอบเรียบ	A2-1		
		โคโลนีกลมใหญ่ สีขาวเหลือง ขอบเรียบ	A2-2		
		โคโลนีกลมเล็ก สีเหลืองทึบแสง ขอบเรียบ	A2-3		
		โคโลนีสีส้ม ขอบหยัก ทึบแสง	A2-4		
2	B1	โคโลนีกลมเป็นจุด ใสส่องแสงเป็นสีฟ้าขอบเรียบ	B1-1		
		โคโลนีสีขาวขุ่น ขนาดใหญ่ เป็นมันวาว	B1-2		
		โคโลนีสีครีม ขอบเรียบ แบน	B1-3		
	B2	โคโลนีสีเหลืองส้ม เป็นมันใส	B2-1		
	B3	โคโลนีสีขาวขุ่น ข้นย่น ทึบแสง	B3-1		
		โคโลนีสีครีม ตรงกลางเป็นสีเหลือง นูน	B3-2		
		โคโลนีสีขาวนวล ขนาดเล็ก นูน	B3-3		
		โคโลนีสีแดงอ่อน ขนาดเล็ก เป็นมัน	B3-4		
		โคโลนีสีเหลืองครีม ขอบเรียบ เป็นมันวาว	B3-5		
		โคโลนีสีส้มอ่อน ขนาดเล็ก นูน	B3-6		
		3	C1	โคโลนีสีเหลือง ครีม เป็นมันวาว	C1-1
				โคโลนีกลม สีขาวครีม เป็นเมือก มันวาว	C1-2
	C2		โคโลนีขนาดใหญ่สีขาว ข้นย่น ทึบแสง	C2-1	

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ โคลนินของจุลินทรีย์	รหัสจุลินทรีย์
4	D1	โคลนินสีขาวขุ่น ขอบใส	D1-1
		โคลนินสีน้ำตาลเหลือง กลม เป็นมัน	D1-2
	D2	โคลนินสีขาวขุ่น ขนาดใหญ่ เป็นมัน	D2-1
		โคลนินกลม สีเหลืองส้ม ขอบเรียบ	D2-2
		โคลนินสีครีม นูน ขอบเรียบ	D2-3
5	E1	โคลนินสีขาวขุ่น ยับย่น ขนาดเล็ก	E1-1
		โคลนินสีน้ำตาลเหลือง กลม เป็นมัน	E1-2
	E2	โคลนินสีขาวใส เป็นมันวาว ขนาดเล็ก	E2-1
		โคลนินสีส้มใส ขนาดเล็ก เป็นมันวาว	E2-2
		โคลนินสีเหลืองส้ม เป็นมันใส	E2-3

#### 4.1.2 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ

นำจุลินทรีย์จากข้อ 4.1.1 ทั้ง 29 สายพันธุ์ มาบ่มเลี้ยงในอาหารเหลว BH ปริมาตร 50 มล. ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ เพื่อยืนยันว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากชั้นแรกสามารถเจริญในอาหารเหลว BH โดยใช้ น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ (Dagher และคณะ , 1997) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันคิน Tapis เมื่อทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากชั้นแรก ที่ภาวะในการทดลองความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 วัน

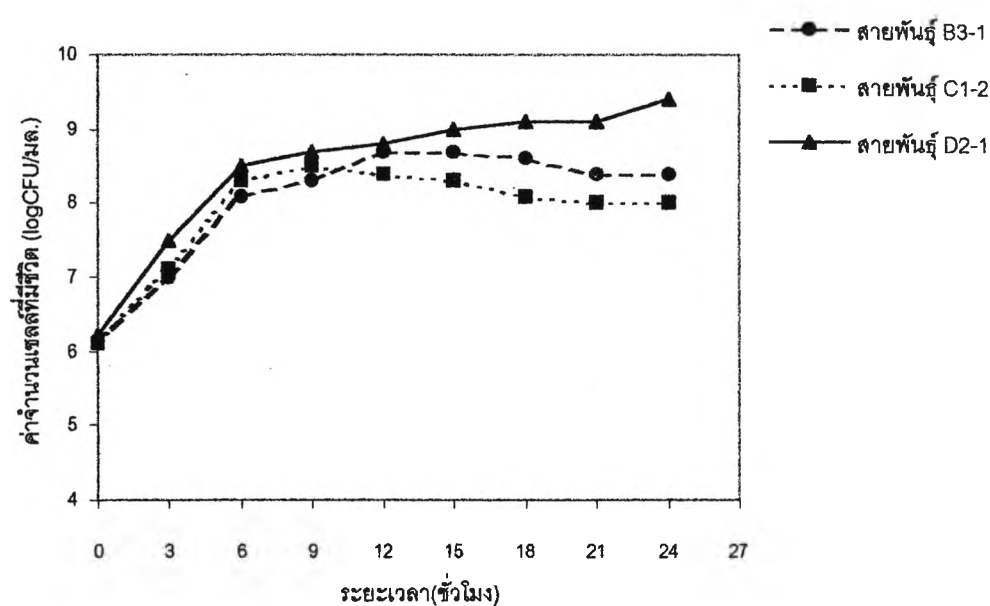
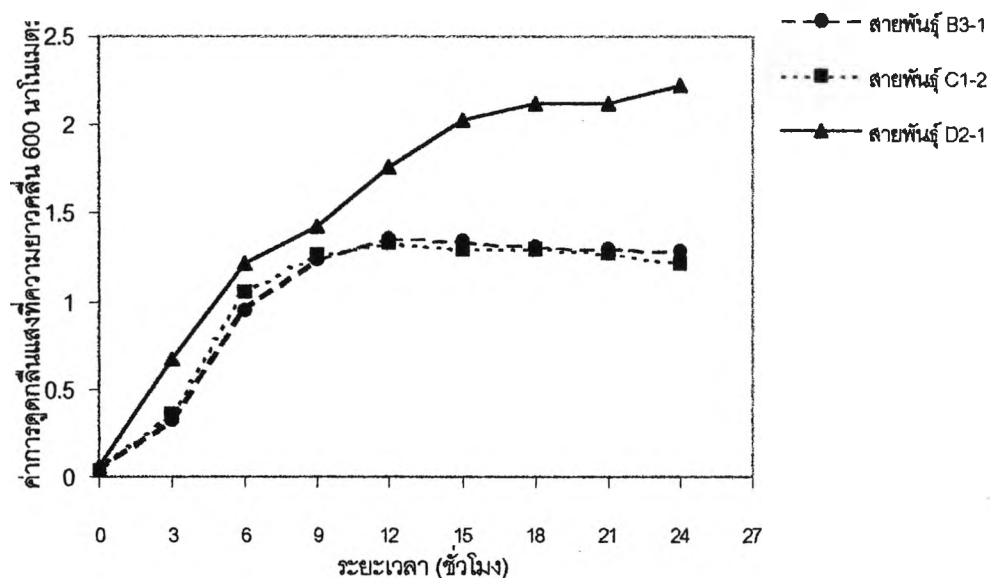
สายพันธุ์	ค่าการดูดกลืนแสง (OD <sub>600</sub> )	สายพันธุ์	ค่าการดูดกลืนแสง (OD <sub>600</sub> )
A1-1	0.313	C1-1	0.080
A1-2	0.188	C1-2	1.396
A2-1	0.515	C2-1	0.277
A2-2	0.067	D1-1	0.718
A2-3	0.165	D1-2	1.128
A2-4	0.126	D2-1	2.334
B1-1	0.315	D2-2	0.289
B1-2	0.297	D2-3	1.053
B1-3	0.065	E1-1	0.514
B2-1	0.140	E1-2	0.066
B3-1	1.455	E2-1	0.361
B3-2	0.117	E2-2	0.742
B3-3	0.129	E2-3	0.266
B3-4	0.088		
B3-5	0.021		
B3-6	0.104		

จากค่าการดูดกลืนแสงในตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่า เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แต่ละสายพันธุ์มาทำการเลี้ยงแยกกัน ความสามารถในการเจริญและย่อยสลายน้ำมันคินเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ไม่เท่ากัน อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ใดย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโมเลกุลใหญ่ที่มีอยู่ในน้ำมันคินได้ก็จะเจริญได้ดี ค่าการดูดกลืนแสงมาก ขณะที่จุลินทรีย์ที่ไม่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโมเลกุลใหญ่ได้ก็จะเจริญได้น้อย ค่าการดูดกลืนแสงน้อย แตกต่างจากภาวะที่ใช้ในการคัดเลือกชั้นแรกซึ่งมีจุลินทรีย์เจริญอยู่เป็นจำนวนมากทำให้มีการส่งเสริมซึ่งกันและกัน โดยจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถย่อยสลาย

ไฮโดรคาร์บอนโมเลกุลใหญ่ได้ ก็อาจใช้ไฮโดรคาร์บอนที่ถูกย่อยสลายให้มีขนาดเล็กลงจาก จุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นได้ จากข้อมูลดังกล่าวอาจทำให้ทราบแนวโน้มว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ใด เจริญได้ในช่วงแรก สายพันธุ์ใดเจริญได้ในช่วงต่อมา

#### 4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

นำจุลินทรีย์ทั้งหมด 29 สายพันธุ์ที่ได้ดำเนินการคัดเลือกในขั้นแรก มาทำการคัดเลือก อีกครั้งด้วยวิธีการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) ในอาหารเหลว BH เพื่อหากลุ่มเชื้อ (mixed culture) ที่มีความสามารถในการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันที่ดีที่สุด โดยการเพาะ เลี้ยงตามวิธีข้อ 2.4 ซึ่งอาศัยหลักการคัดเลือกตามธรรมชาติคือ จุลินทรีย์กลุ่มใดเจริญได้รวดเร็ว กว่า จะสามารถใช้น้ำมันดิบซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญได้เร็วกว่า ทำให้จุลินทรีย์ที่ เจริญช้าไม่สามารถใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และถูกกำจัดออกไปในที่สุด (Venkateswaran และ Harayama , 1995) และเมื่อได้เชื้อผสมกลุ่มสุดท้ายแล้วจึงนำมาเกลี่ยบน อาหารแข็งนิวเทรียนท์ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่เหลือจากการคัดเลือกตามวิธี ดังกล่าว พบว่าได้จุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมัน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้และเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงรวมทั้งคงอยู่ในระบบได้นานกว่าจุลินทรีย์ สายพันธุ์อื่นๆ ที่คัดแยกได้จากขั้นแรก ทั้งนี้เพราะเป็นจุลินทรีย์ผสมกลุ่มสุดท้ายที่เหลืออยู่จาก การคัดเลือกตามธรรมชาติ แสดงว่าน่าจะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่เจริญและใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่ง คาร์บอนได้เร็วที่สุด (Ijab , 1998) ดังนั้นจึงเลือกจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์คือ B3-1 , C1-2 และ D2-1 มาศึกษารายละเอียดในการย่อยสลายน้ำมันดิบต่อไป



รูปที่ 4.1 อัตราการเจริญเติบโตและค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable Cell Count) ของจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่ผสม 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

#### 4.3 ผลการจำแนกสกุลของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 C1-2 และ D2-1 ทางอนุกรมวิธาน

จากการตรวจสอบจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 พบว่า ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง นิเวศที่ยีสต์มีสีครีมขาว เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 มีรูปร่างเป็นท่อนต่อกันเป็นสาย คิคสีน้ำเงินของแกรมบวก ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ส่วนลักษณะต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกสกุลทางอนุกรมวิธาน คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลักษณะที่รายงานไว้ใน Bergey's manual of systematic bacteriology ซึ่งรวบรวมไว้โดย Sneath (1984) เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จัดอยู่ในสกุลของ *Bacillus* sp.

ตารางที่ 4.3 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ B3-1

ลักษณะที่ทดสอบ	รายละเอียด
โคโลนีบนอาหาร นิเวศที่ยีสต์	สีครีมขาว ผิวด้าน ไม่มันวาว ขอบหยักเล็กน้อย
ลักษณะของเซลล์: รูปร่าง	เป็นท่อนพอมเส้นสั้นๆ
: การคิคสีแกรม	แกรมบวก
: การเรียงตัว	ต่อกันเป็นสาย
: ขนาดความกว้างxยาว	1-2 x 4 ไมโครเมตร
เอนโดสปอร์	
: รูปร่าง	รูปร่างรี
: ตำแหน่ง	กึ่งกลางเซลล์
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่
การข้อมดูแคปซูล	มีแคปซูล

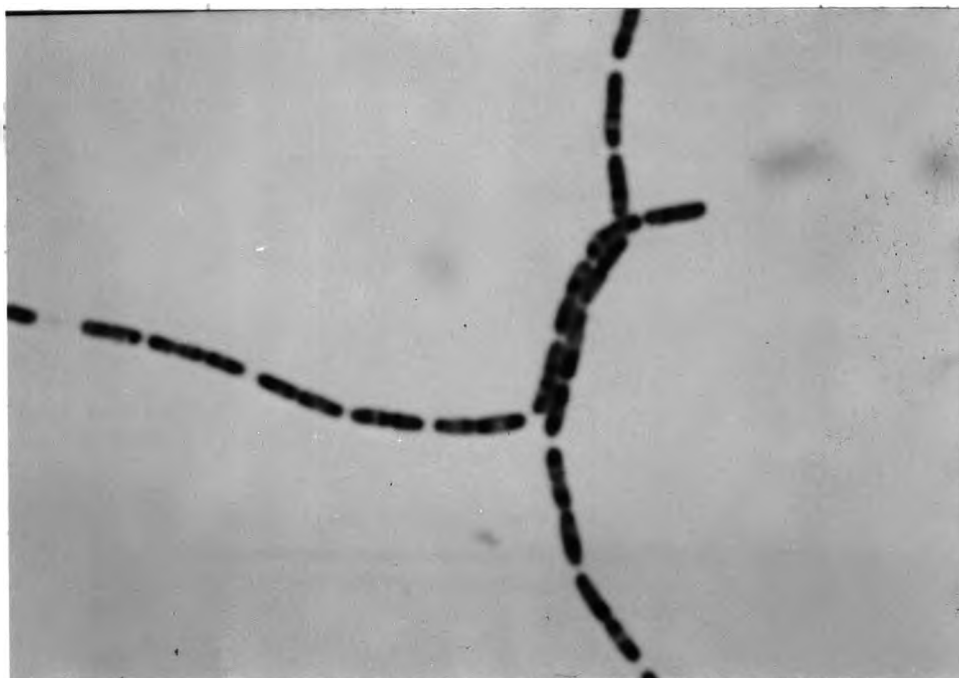
ตารางที่ 4.4 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ B3-1

ลักษณะที่ทดสอบ	สายพันธุ์ B3-1	<i>B. circulans</i> *
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase test)	+	+
การทดสอบ Voges-Proskauer	-	-
การผลิตกรด		
ดี - กลูโคส (D - glucose)	+	+
ดี - แมนนิทอล (D - mannitol)	-	-
ดี - ไซโลส (D - Xylose)	+	+
แอล - อะราบิโนส (L - arabinose)	+	+
การผลิตก๊าซจากกลูโคส	no gas	no gas
การเจริญในภาวะไร้อากาศ	-	-
การย่อยสลาย :		
เคซีน	+	+
เจลาติน	+	+
แป้ง	-	-
การผลิตอินโดล (Indole production)	-	-
การผลิต โพลี-เบตา-ไฮดรอกซีบิวทิเลต	-	-

\* ข้อมูลจาก Bergey 's Manual of Systematics Bacteriology (Holt และคณะ , 1994 ;  
Sneath , 1984)

หมายเหตุ - หมายถึง ให้ผลลบในการทดสอบ  
+ หมายถึง ให้ผลบวกในการทดสอบ





รูปที่ 4.2 ลักษณะรูปร่างของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 เมื่อย้อมสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เมื่อทำการตรวจสอบจุลินทรีย์สายพันธุ์ C1-2 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์อีกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้เช่นกัน พบว่าลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเทรียนที่มีสีขาวเป็นมันวาว แบบ (Filiiform) ผิวเป็นมันวาว และขอบโคโลนีเรียบ เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ C1-2 มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ดิคสี่แดงของแกรมลบ จะเรียงตัวต่อกันสองตัวหรืออยู่เดี่ยวๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ส่วนลักษณะต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกสกุลของจุลินทรีย์สายพันธุ์ C1-2 ทางอนุกรมวิธาน คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.5 และ ตารางที่ 4.6 ตามลำดับ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.5 และ 4.6 เมื่อพิจารณาและเปรียบเทียบกับลักษณะที่รายงานไว้ใน Bergey's manual of systematic bacteriology ซึ่งรวบรวมไว้โดย Sneath (1984) พบว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้จัดอยู่ในสกุลของ *Pseudomonas* sp.

ตารางที่ 4.5 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์สายพันธุ์ C1-2

ลักษณะที่ทดสอบ	รายละเอียด
โคโลนีบนอาหารวุ้นนิเวศรีนทร์	สีขาว แบบ (Filiform) ผิวเป็นมันวาวขอบเรียบ
เซลล์ : รูปร่าง	เป็นแท่งสั้นๆ
: สีแกรม	ติดสีแดง
: ขนาดความยาว	2.3 ไมโครเมตร
เอนโคสปอร์	ไม่มีเอนโคสปอร์
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่

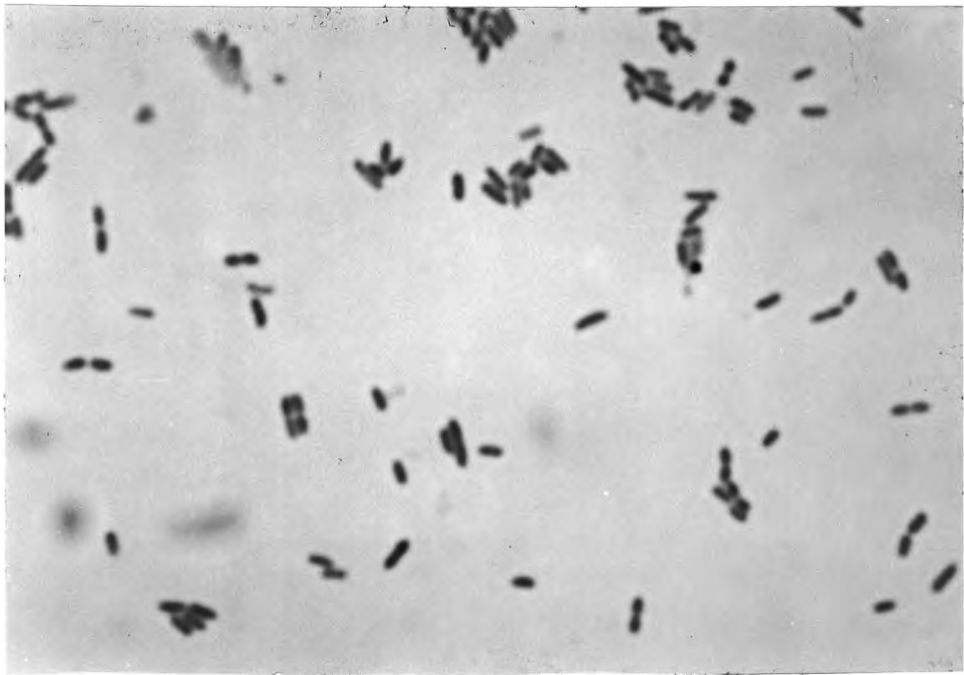
ตารางที่ 4.6 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของจุลินทรีย์สายพันธุ์ C1-2

ลักษณะที่ทดสอบ	สายพันธุ์ C1-2	<i>Ps. Alcaligenes</i> *
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase test)	+	+
การผลิตกรด		
ดี-กลูโคส	-	-
ดี-แมนนิทอล	-	-
ดี-แลคโทส	-	-
การเจริญในภาวะไร้อากาศ	-	-
การสลาย		
เคซีน	+	+
เจลาติน	+	+
แป้ง	-	-
การสร้างพอลิ-เบตา-ไฮดรอกซีบิวริเลต	-	-
การสร้างสีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent pigment)	-	-

- \* ข้อมูลจาก Bergey 's Manual of Systematics Bacteriology (Holt และคณะ , 1994 ;  
Sneath , 1984)

หมายเหตุ - หมายถึง ให้ผลลบในการทดสอบ

+ หมายถึง ให้ผลบวกในการทดสอบ



รูปที่ 4.3 ลักษณะรูปร่างของจุลินทรีย์สายพันธุ์ C1-2 เมื่อย้อมสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)

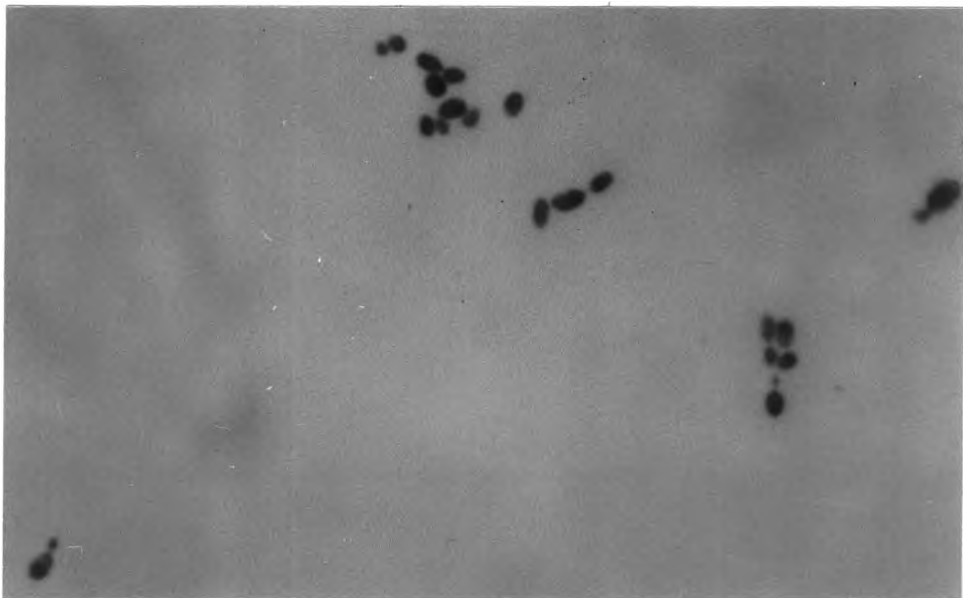
จากการตรวจสอบจุลินทรีย์สายพันธุ์ D2-1 ซึ่งก็เป็นจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้อีกสายพันธุ์หนึ่งที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบสูง ด้วยการย้อมสี และการวัดขนาดเซลล์ พบว่าไม่ใช่แบคทีเรีย แต่เป็นยีสต์เนื่องจากการแตกหน่อ (Budding) และเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี ขนาดและรูปร่างของเซลล์ รวมทั้งเมื่อย้อมด้วยแลคโตฟีโนล (Lactophenol) ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบ

เทียบกับลักษณะที่รายงานไว้โดย Barnett และ Pankhurst (1974) และ Lodder (1972) จะได้ว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์ D2-1 จัดอยู่ในสกุล *Yarrowia* sp.

ตารางที่ 4.7 ลักษณะการเจริญ ทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์สายพันธุ์ D2-1

ลักษณะที่ทดสอบ	สายพันธุ์ D2-1	<i>Yarrowia</i> sp.*
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีสีครีม	โคโลนีสีครีม
เซลล์ : รูปร่าง	กลมรีเป็นรูปไข่	กลมรีเป็นรูปไข่หรือยาว
: ขนาด	2.5 x 4.0 ไมโครเมตร	(2-4.5)x(4-22)ไมโครเมตร
ลักษณะการแตกหน่อ	มีการแตกหน่อด้านกว้าง,ยาว	มีการแตกหน่อด้านกว้าง,ยาว
ลักษณะของสปอร์	ascospore , hat-shape	ascospore , hat-shape
การเจริญใน		
ดี - ไซโลส	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
ดี - อะราบิโนส	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
ดี - แมนนิทอล	เจริญได้	เจริญได้
นอร์มอล-เฮกซะเดคเคน	เจริญได้	เจริญได้

\* ข้อมูลจาก Barnett และ Pankhurst (1974) และ Lodder (1972)



รูปที่ 4.4 ลักษณะรูปร่างของจุลินทรีย์สายพันธุ์ D2-1 เมื่อย้อมด้วยแลคโตฟีโนล ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

จากการจำแนกสกุลของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 ทางอนุกรมวิธาน พบว่า จัดอยู่ในสกุลของ *Bacillus* sp. ซึ่งผลการทดสอบของจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ได้ผลใกล้เคียงกับสายพันธุ์เทียบเคียงคือ *Bacillus circulans* ตามหลักการจำแนกอ้างอิงตาม Bergey 's Manual of Systematics Bacteriology (Holt และคณะ , 1994 ; Sneath , 1984) จากข้อมูลการจำแนกสกุลของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 ทางอนุกรมวิธาน พบว่า *Bacillus circulans* *Bacillus cereus* และ *Bacillus thuringiensis* มีความใกล้เคียงกันทางอนุกรมวิธาน แตกต่างกันเพียงลักษณะทางชีวเคมีบางประการ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจหาลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA เพื่อยืนยันผลการจำแนกสกุลทางอนุกรมวิธาน โดยการออกแบบไพร้มเมอร์ (primers) โดยใช้ข้อมูลของลำดับเบสที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่มีลักษณะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกัน อ้างอิงตาม Bergey 's Manual of Systematics Bacteriology (Sneath , 1984 ; Holt และคณะ , 1994) จาก GenBank มาใช้ในการออกแบบไพร้มเมอร์ แต่เนื่องจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ มีลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ที่ใกล้เคียงกันมาก (Conserve sequence) ดังนั้นจึงต้องออกแบบไพร้มเมอร์โดยให้ครอบคลุมช่วงที่มีความแตกต่างกันสูงสุด (Hypervariable regions) ของลำดับเบสที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. ซึ่งอยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 800-1350 ดังแสดงในรูปที่ 4.5 โดยเปรียบเทียบกับผลการตรวจหาลำดับเบสที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 (รูปที่ 4.5) และทำการข้อมล็ดูพาราสปอโรด – คริสตัล ซึ่งเป็นลักษณะที่พบใน *Bacillus thuringiensis* เพียงสายพันธุ์เดียว พบว่า *Bacillus* sp. B3-1 ไม่มีพาราสปอโรด – คริสตัล ดังรูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.8 ลักษณะทางชีวเคมีบางประการของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	สายพันธุ์ B3-1	<i>B.circulans</i> *	<i>B.cereus</i> *	<i>B.thuringiensis</i> *
Voges-Proskauer Test (VP Test)	-	-	+	D
การผลิตกรดจาก				
ดี-กลูโคส	+	+	+	+
ดี-อะราบิโนส	+	+	-	-
ดี-ไซโรส	+	+	-	-
ดี-แมนนิทอล	+	+	-	-
Parasporal crystals	-	-	-	+

หมายเหตุ \* ข้อมูลจาก Bergey 's Manual of Systematics Bacteriology (Sneath , 1984 ; Holt และคณะ , 1994)

+ หมายถึง ให้ผลในการทดสอบ

- หมายถึง ไม่ให้ผลในการทดสอบ

D หมายถึง ให้ผลในการทดสอบตั้งแต่ 18-89%



700 \* 720 \* 740 \*  
 B.cereus : : 733  
 B.thuringi : : 734  
 B.circulan : : 749  
 B.sp. B3-1 : ----- : -

760 \* 780 \* 800 \*  
 B.cereus : : 791  
 B.thuringi : : 792  
 B.circulan : : 807  
 B.sp. B3-1 : ----- : -

FORWARD PRIMER -> GATACCTGGTAGTCCACG

820 \* 840 \* 860 \*  
 B.cereus : : 849  
 B.thuringi : : 850  
 B.circulan : : 865  
 B.sp. B3-1 : : 56  
 C

880 \* 900 \* 920  
 B.cereus : : 907  
 B.thuringi : : 908  
 B.circulan : : 923  
 B.sp. B3-1 : : 114

\* 940 \* 960 \* 980  
 B.cereus : : 961  
 B.thuringi : : 962  
 B.circulan : : 976  
 B.sp. B3-1 : : 172

\* 1000 \* 1020 \* 1040  
 B.cereus : : 1019  
 B.thuringi : : 1020  
 B.circulan : : 1032  
 B.sp. B3-1 : : 230

\* 1060 \* 1080 \* 1100  
 B.cereus : : 1077  
 B.thuringi : : 1078  
 B.circulan : : 1090  
 B.sp. B3-1 : : 288

\* 1120 \* 1140 \* 1160  
 B.cereus : : 1135  
 B.thuringi : : 1136  
 B.circulan : : 1148  
 B.sp. B3-1 : : 346

\* 1180 \* 1200 \* 12  
 B.cereus : : 1193  
 B.thuringi : : 1194  
 B.circulan : : 1206  
 B.sp. B3-1 : : 404

20 \* 1240 \* 1260 \*  
 B.cereus : : 1251  
 B.thuringi : : 1252  
 B.circulan : : 1264  
 B.sp. B3-1 : : 462

1280 \* 1300 \* 1320 \*  
 B.cereus : : 1309  
 B.thuringi : : 1310  
 B.circulan : : 1322  
 B.sp. B3-1 : : 520

1340 \* 1360 \* 1380 \*  
 B.cereus : : 1367  
 B.thuringi : : 1368  
 B.circulan : : 1380  
 B.sp. B3-1 : : 545

GATCAGCATGCCGCGGTGAA <- REVERSE PRIMER



```

          1400      *      1420      *      1440      *
B.cereus  : -----GAAGTCGGTGGG : 1425
B.thuringi : -----GAAGTCGGTGGG : 1426
B.circulan : ----- : 1426
B.sp. B3-1 : ----- : -

          1460      *      1480      *      1500
B.cereus  : GTAAACCTTTT-GGAGCCAGCCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAA : 1482
B.thuringi : GTAAACCTTTTGGAGCCAGCCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAA : 1484
B.circulan : ----- : -
B.sp. B3-1 : ----- : -

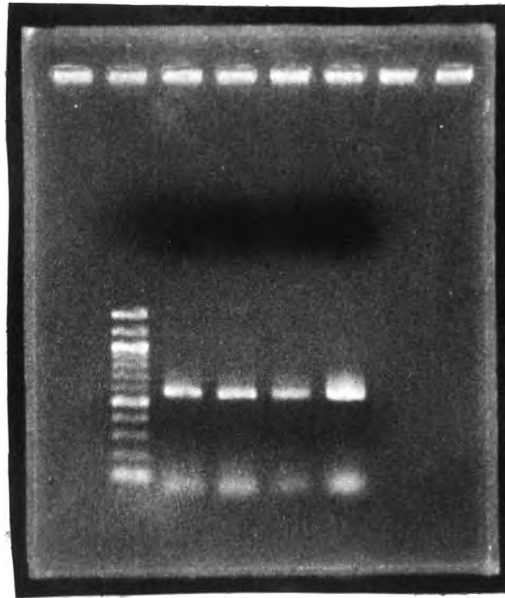
          *      1520
B.cereus  : CAA----- : 1485
B.thuringi : CAAGGTATCCGT : 1496
B.circulan : ----- : -
B.sp. B3-1 : ----- : -

```

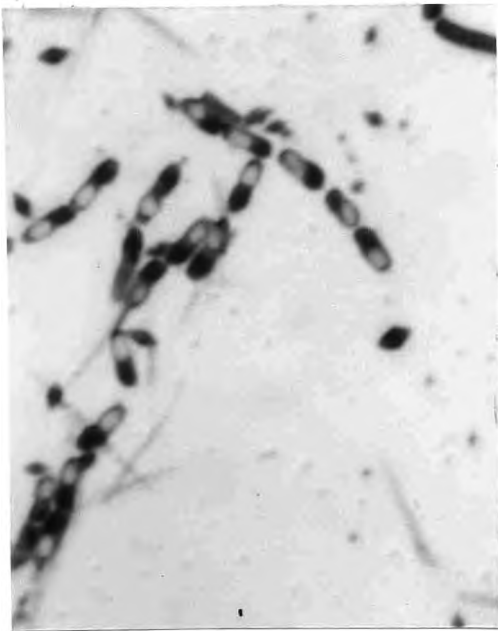
รูปที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีลักษณะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกัน กับลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 ด้วยโปรแกรม ClustalX และบริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์

จากรูปที่ 4.5 บริเวณแถบสีดำ แสดงถึง บริเวณที่มีข้อมูลของลำดับเบสที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ที่เหมือนกันทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยที่บริเวณแถบสีเทาและสีขาวจะแสดงถึง บริเวณที่มีข้อมูลของลำดับเบสที่เหมือนกันน้อยกว่าบริเวณที่มีแถบสีดำ ตามลำดับ โดยจะใช้เป็นแนวทางในการออกแบบไพรเมอร์

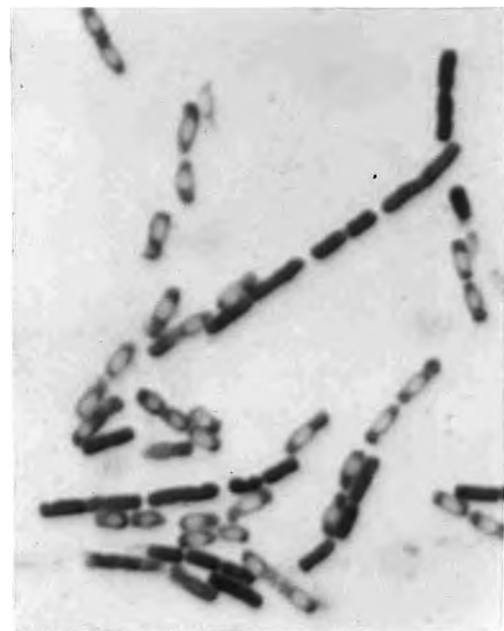
จากผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. B3-1 พบว่า ยีนยีนที่ต้องการมีขนาดประมาณ 540 เบส โดยการเปรียบเทียบกับ marker ดังแสดงขนาดของยีนจिनในรูปที่ 4.6 และแสดงลำดับเบสของ 16S rRNA ที่วิเคราะห์ได้ของ *Bacillus* sp. B3-1 โดยนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.6 ขนาดชั้นจิ้นของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์



*Bacillus thuringiensis*



*Bacillus* sp. B3-1

รูปที่ 4.7 ลักษณะรูปร่างของพาราสปอโรด - คริสตัล ซึ่งพบใน *Bacillus thuringiensis* เพียงสายพันธุ์เดียว เมื่อเปรียบเทียบกับ *Bacillus* sp. B3-1 โดยย้อมด้วย amido black และ safranin O ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

หลังจากนำลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่นที่มีบันทึกและรวบรวมไว้ในโปรแกรม Blast alignment พบว่า ลำดับเบสของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Bacillus circulans* สายพันธุ์ BAC16SRRD โดยมีความคล้ายคลึง (%homology) เท่ากับ 91% ดังนั้นจากผลการทดสอบทาง สรีรวิทยาและทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA จึง จัดว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ B3-1 จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp. โดยมีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Bacillus circulans*

#### 4.4 ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. B3-1

*Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ที่คาดว่าจะมีส่วนช่วยในการย่อยสลายน้ำมัน

##### 4.4.1 การทดสอบ dioxygenase activity โดยวิธีของ Ensley และคณะ (1983)

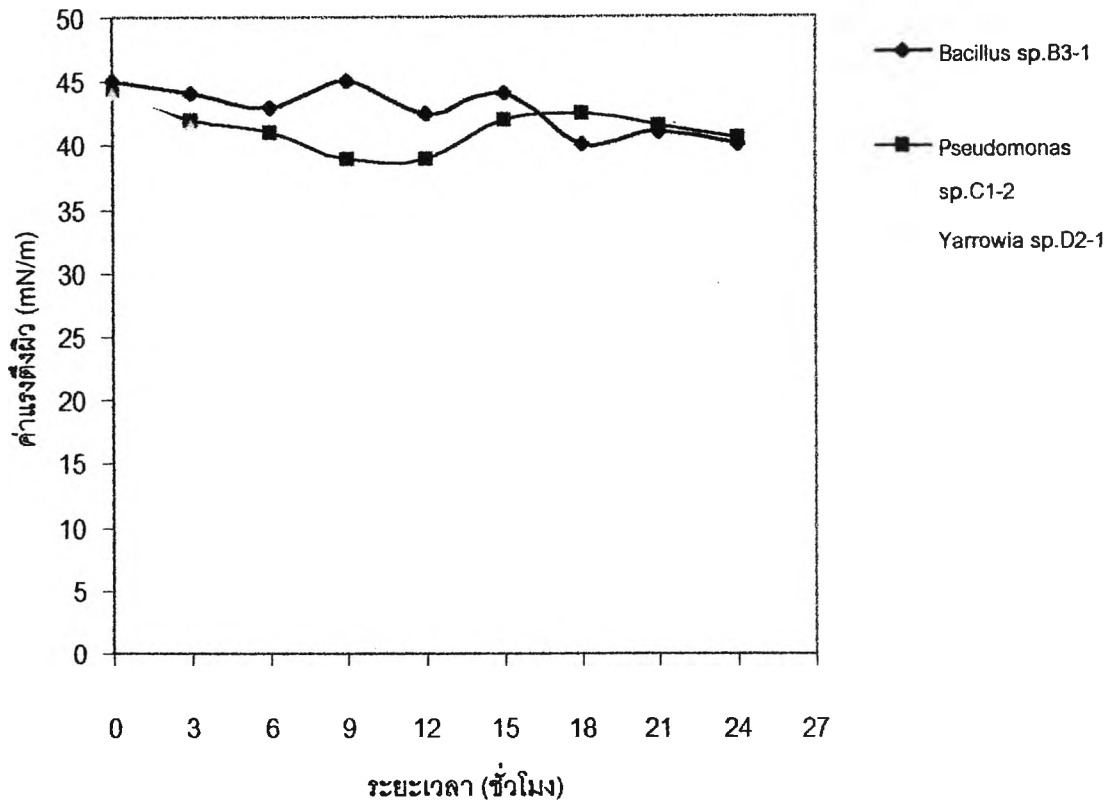
การมี dioxygenase activity ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์มี ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันสูงขึ้น เนื่องจากองค์ประกอบในน้ำมันส่วนใหญ่จะมีวง อะโรมาติก โดยที่เอนไซม์ตัวนี้เข้าไปทำลายพันธะของวงอะโรมาติก โดยการเติมออกซิเจนเข้าไป (Ensley และคณะ , 1983 ; Harayama และคณะ , 1989) โดยนำจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ มาเลี้ยงบนอาหารทริปโตเฟน ถ้าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้จะสังเกตเห็นสีน้ำเงิน ( blue pigment) บริเวณรอบๆ โคลโลนี (clear zone) ซึ่งเกิดจากเอนไซม์นี้เปลี่ยน indole ไปเป็น indigo โดยที่จุลินทรีย์นั้นควรจะมีเอนไซม์ tryptophanase เพื่อเปลี่ยน tryptophan ให้เป็น indole ก่อนเพื่อที่จะให้เอนไซม์ dioxygenase ทำงานต่อได้

จากการทดสอบเมื่อทำการปลูกเชื้อ *Bacillus* sp.B3-1 , *Pseudomonas* sp.C1-2 และ *Yarrowia* sp.D2-1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทริปโตเฟน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ในที่มืด เป็นเวลา ประมาณ 48-72 ชั่วโมง พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นบริเวณรอบๆ โคลโลนีของ *Yarrowia* sp.D2-1 โดยสังเกตเห็นสีน้ำเงินบริเวณรอบๆ โคลโลนี แสดงว่า *Yarrowia* sp.D2-1 สามารถ ผลิตเอนไซม์ dioxygenase ได้ รวมทั้งผลิตเอนไซม์ tryptophanase ด้วย (Harayama และคณะ , 1989) เนื่องจากเชื้อจะต้องใช้เอนไซม์ tryptophanase เพื่อเปลี่ยน tryptophan ไปเป็น indole ก่อน จากนั้น เอนไซม์ dioxygenase จึงเปลี่ยน indole ไปเป็น indigo ซึ่งให้สีน้ำเงิน ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp.B3-1 และ *Pseudomonas* sp. C1-2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น อาจเป็นไปได้ว่า

เชื้อทั้งสองตัวนี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ tryptophanase ได้ จึงไม่สามารถเปลี่ยน tryptophan ให้เป็น indole ซึ่งจะถูกลดเปลี่ยนต่อไปเป็น indigo ได้ หรือ เชื้อทั้งสองอาจมี tryptophanase แต่ไม่มีเอนไซม์ dioxygenase จึงไม่สามารถเปลี่ยน indole ไปเป็น indigo ได้

#### 4.4.2 การศึกษาความสามารถในการลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ในอาหารเหลว BH

นำจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อตรวจสอบความสามารถในการลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. เปรียบเทียบความสามารถในการลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1.2 พบว่า เชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 สามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำกว่า 35 mN/m ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 และ *Pseudomonas* sp. C1-2 จะมีค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 40-45 mN/m ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 ค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อบ่มเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง (แนวโน้มการลดลงของค่าแรงตึงผิวของอาหารเหลว)

จากรูปที่ 4.8 จะเห็นว่าแนวโน้มของค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าลดลง แบ่งเป็น 2 ช่วงคือ ในช่วงชั่วโมงที่ 0-9 กับชั่วโมงที่ 9-24 โดยเฉพาะเชื้อ *Yarrowia* sp.D2-1 ที่ค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 9 ชม.แรกลดลงอย่างรวดเร็วในอัตราเฉลี่ย 1.67 mN/m/ ชม. ในขณะที่ค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Pseudomonas* sp. C1-2 มีค่าลดลงในอัตราเฉลี่ย 0.67 mN/m / ชม. ในช่วง 9 ชม.แรก แต่หลังจากนั้นค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Yarrowia* sp. D2-1 และ *Pseudomonas* sp. C1-2 จะมีค่าค่อนข้างคงที่ โดยที่เชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 มีอัตราการลดลงของค่าแรงตึงผิวเฉลี่ยเท่ากับ 15 mN/m/ 24 ชม. ส่วนเชื้อ *Pseudomonas* sp. C1-2 มีอัตราการลดลงของค่าแรงตึงผิวเฉลี่ย 5 mN/m/ 24 ชม. สาเหตุที่ค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าค่อนข้างคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 9 อาจเป็นเพราะในช่วง 9 ชม.แรกยังมีน้ำมันลอยอยู่มาก เชื้อต้องการแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญจึงต้องพยายามสร้างสารลดแรงตึงผิว เพื่อให้

น้ำมันลงมาเป็นอิมัลชันจะได้ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ง่ายขึ้น (Deziel และคณะ , 1996 ; Jain และคณะ , 1991) แต่หลังจากนั้นอาจมีคาร์บอนเพียงพอแล้วจึงไม่สร้างต่ออีก หรือ สารลดแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นไม่เสถียร (Babu และคณะ , 1994) ส่วนค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus* sp. B3-1 จะมีค่าลดลงช้าๆ อย่างต่อเนื่อง โดยมีอัตราการลดลงเฉลี่ย 4.5 mN/m/ 24 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ จุลินทรีย์ทั้งสามสายพันธุ์ พบว่าค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Yarrowia* sp. D2-1 มีค่าต่ำกว่าจุลินทรีย์อีกสองสายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อสร้างขึ้นมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้ดี (Cooper , 1986) เห็นได้จากค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าต่ำกว่า 35 mN/m ดังนั้นเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันสูงขึ้นจึงควรมี การเติมจุลินทรีย์ตัวอื่นที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพเพิ่มลงไป เพื่อช่วยลดค่าแรงตึงผิวระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อกับน้ำมันให้มีค่าต่ำกว่าเดิม ( 45 mN/m) ทำให้น้ำมันสามารถลงไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้น (suspension)

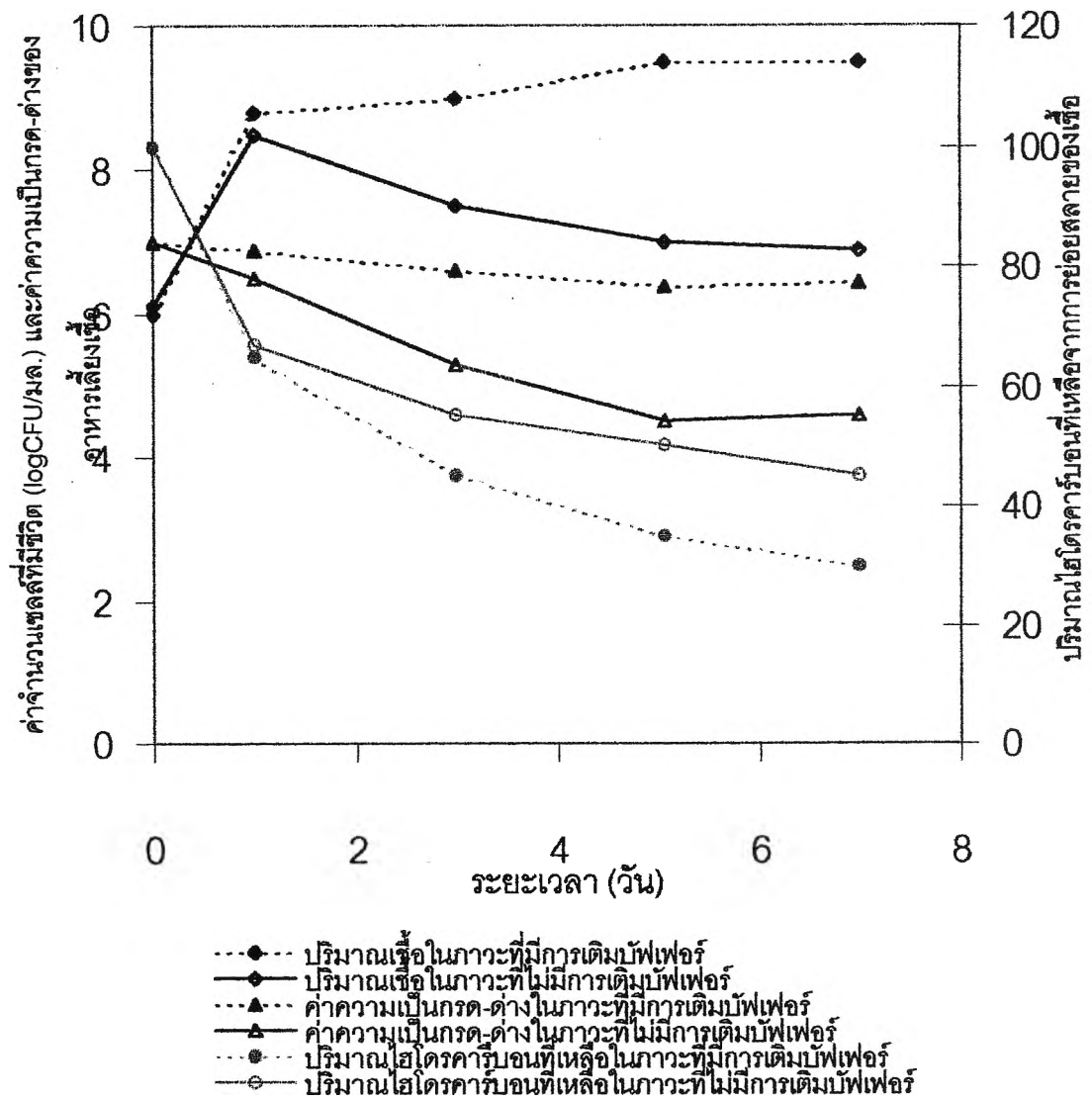
#### 4.5 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันคิบ Tapis ของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1

จากการทดลองพบ การเปลี่ยนแปลงของน้ำมันคิบ Tapis ในพลาสติกที่มีการเจริญของ จุลินทรีย์เกิดขึ้น โดยเมื่อจุลินทรีย์เจริญขึ้นในอาหารเหลว BH จะสังเกตเห็นน้ำมันมีลักษณะ เป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ (suspension) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ทำให้เกิดอิมัลชัน สอดคล้องกับที่รายงานไว้โดย Rosenberg และ Rosenberg (1985) ขณะเดียวกันน้ำมันที่ติดอยู่บริเวณด้านข้างของพลาสติกก็จะหายไปด้วยซึ่ง เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ประมาณวันที่ 1 ของการเลี้ยงเชื้อด้วยเหตุนี้ ทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสที่จะสัมผัสน้ำมันได้มากขึ้น ช่วยให้เกิดการย่อยสลายได้สูงขึ้นตาม ซึ่ง แตกต่างจากพลาสติกควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ซึ่งจะพบน้ำมันติดอยู่บริเวณด้านข้างของ พลาสติกส่วนชั้นของน้ำมันก็จะลอยแยกชั้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 4.5.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 ที่คัดแยกได้

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 ในอาหารเหลว BH 50 มล. ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันดิบ บ่มเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C พบอัตราการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 ดังแสดงในรูปที่ 4.9 จำนวนของเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 คือ เพิ่มขึ้นจาก  $1.5 \times 10^6$  CFU/มล. เป็น  $3.5 \times 10^8$  CFU/มล. หลังจากนั้นจะลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีจำนวนเชื้อเท่ากับ  $1.8 \times 10^6$  CFU/มล. ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว สังเกตจากค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟี พบว่าเชื้อสามารถลดปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดได้ค่อนข้างเร็วในวันแรกเหลือ 65 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจะสามารถลดปริมาณไฮโดรคาร์บอนได้ช้าลงเหลือ 55 50 และ 45 เปอร์เซ็นต์ในวันสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ แสดงในรูปที่ 4.9

จากผลการทดลอง การที่เชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันได้ในวันแรก แต่ประสิทธิภาพลดลงในวันต่อมา อาจเกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อซึ่งเจริญได้สูงในวันที่ 1 และมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 การเจริญและความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว อาจเป็นผลจากค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งลดลงจาก 7.0 เป็น 6.5 และ 5.3 จากนั้นคงที่ที่ 4.5 ในวันต่อมา จึงอาจทำให้ภาวะนั้นไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ



รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่หลังจากการย่อยสลายของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 และ การเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ



#### 4.5.2 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1

เนื่องจากการทดลองในข้อ 4.5.1 แสดงให้เห็นว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงอาจเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 ในสองภาวะ คือ ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง และ ภาวะที่พยายามควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 6-7 โดยการเติม 0.007 M  $K_2HPO_4$  เพื่อทำให้เกิดบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการทดลองพบว่า ภาวะที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (พิจารณาจากรูปที่ 4.9 ค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกับเวลา) จะมีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่าภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงค่าของความเป็นกรด-ด่างมากกว่า สังเกตได้จากความชันของเส้นกราฟในภาวะที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างจะมีความชันน้อยกว่าเส้นกราฟของภาวะที่ไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง และยังพบว่าในภาวะที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างยังสามารถทำให้เชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้มากกว่า โดยมีปริมาณเชื้อสูงกว่า และมีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันสูงกว่าภาวะที่ไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งไม่พบลักษณะการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อ นอกจากนั้นปริมาณเชื้อสูงสุดยังพบเพียง  $6.5 \times 10^7$  CFU/มล. เท่านั้น ในขณะที่ภาวะที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นสูงถึง  $3.5 \times 10^9$  CFU/มล. ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเชื้อที่ภาวะควบคุมความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าภาวะที่ไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.9

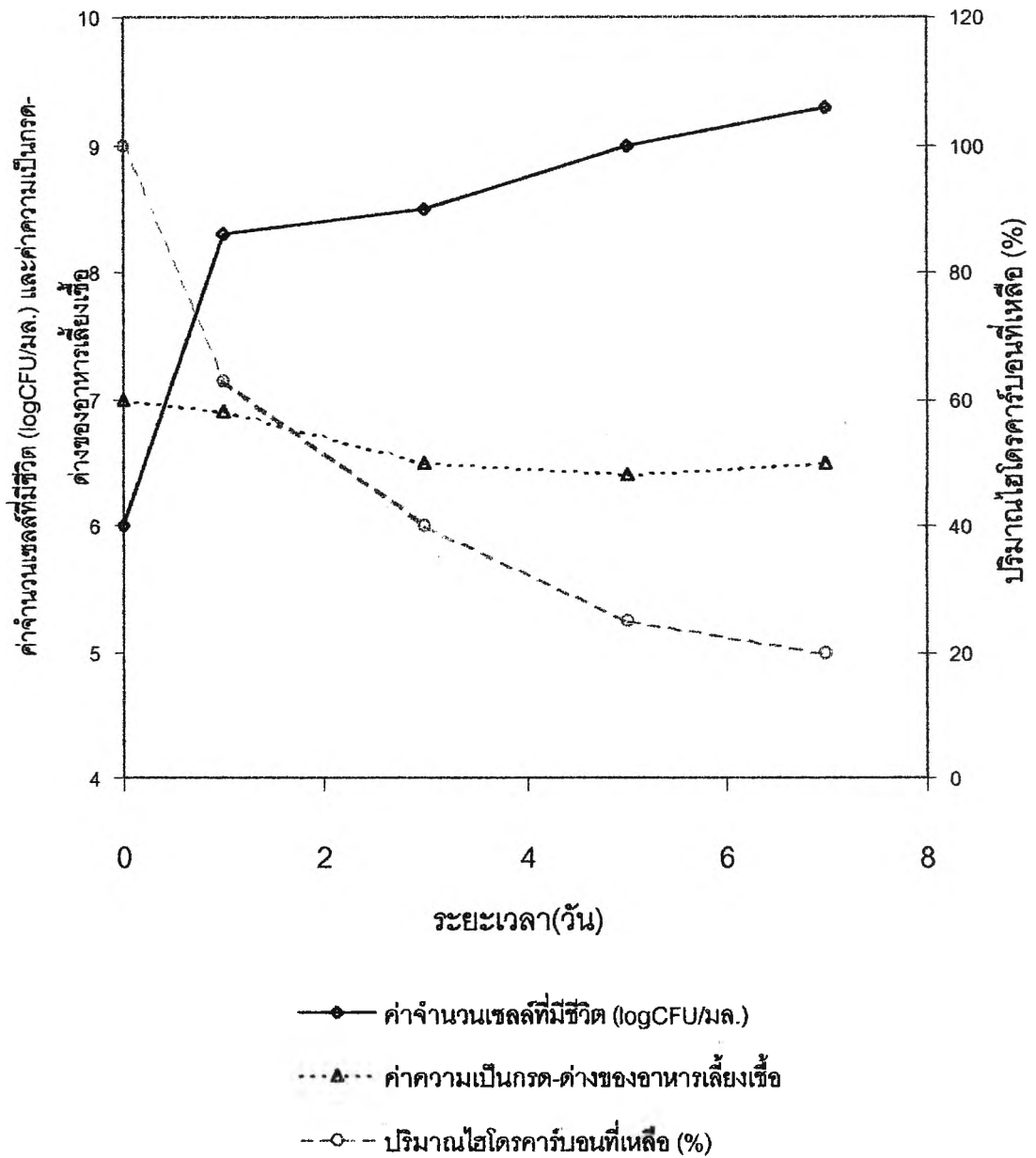
จากผลการทดลอง พบว่า ประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 ในภาวะที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเชื้อในภาวะที่ไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง สังเกตได้จากปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือในภาวะควบคุมความเป็นกรด-ด่างมีค่าเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือในภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างคือ 45 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกันระหว่าง 2 ภาวะต่างกันอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากในภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างมีปริมาณของเชื้อสูงกว่าในภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง จึงทำให้ภาวะที่ทำการควบคุมความเป็นกรด-ด่างมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงกว่า

เมื่อพิจารณาโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของปริมาณน้ำมันที่เหลือหลังจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 ในรูปที่ 4.23 พบว่า ไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่หลังจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 มีค่าอยู่ในช่วง C11-C27 แต่มีปริมาณลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ โดยเฉพาะพีคของพริสเทนลดลงถึง 75 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับคอนเริ่มต้น จากผลการวิเคราะห์แสดงว่า อัลเคนไฮโดรคาร์บอน C10 และ C28 หายไป ส่วนอัลเคนไฮโดรคาร์บอน C11-C27 มีปริมาณลดลง

#### 4.5.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C1-2

จากการทดลองในข้อ 4.5.2 แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นการทดลองในข้อนี้จึงทำการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.5.2 ซึ่งผลการศึกษาพบว่า เชื้อ *Pseudomonas* sp. C1-2 มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 โดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. C1-2 จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการเลี้ยงเชื้อ คือ มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจาก  $1.0 \times 10^6$  CFU/มล. เป็น  $2.1 \times 10^8$  CFU/มล. และมีปริมาณเชื้อสูงสุดเท่ากับ  $2.0 \times 10^9$  CFU/มล. ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ส่วนปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือหลังจากการย่อยสลายของเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 จาก 100 เปอร์เซ็นต์ในคอนเริ่มต้นเหลือ 63 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลืออยู่เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยคืออยู่ในช่วง 6.5 – 7.0 และมีค่าเท่ากับ 6.5 ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 4.10) ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 มีปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือหลังจากการย่อยสลายของเชื้อเป็นเวลา 7 วันเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกันกับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองที่มีแนวโน้มใกล้เคียงกันด้วย โดยเมื่อพิจารณาโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของปริมาณน้ำมันที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Pseudomonas* sp. C1-2 ในรูปที่ 4.23 พบว่า ไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของ *Pseudomonas* sp. C1-2 มีค่าอยู่ในช่วง C11-C27 แต่มีปริมาณลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์และต่ำกว่าปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือของ *Bacillus* sp. B3-1 โดยเฉพาะพีคของอัลเคนไฮโดรคาร์บอน C11 และ C27 ส่วนพีคของพริสเทนลดลง 62.5

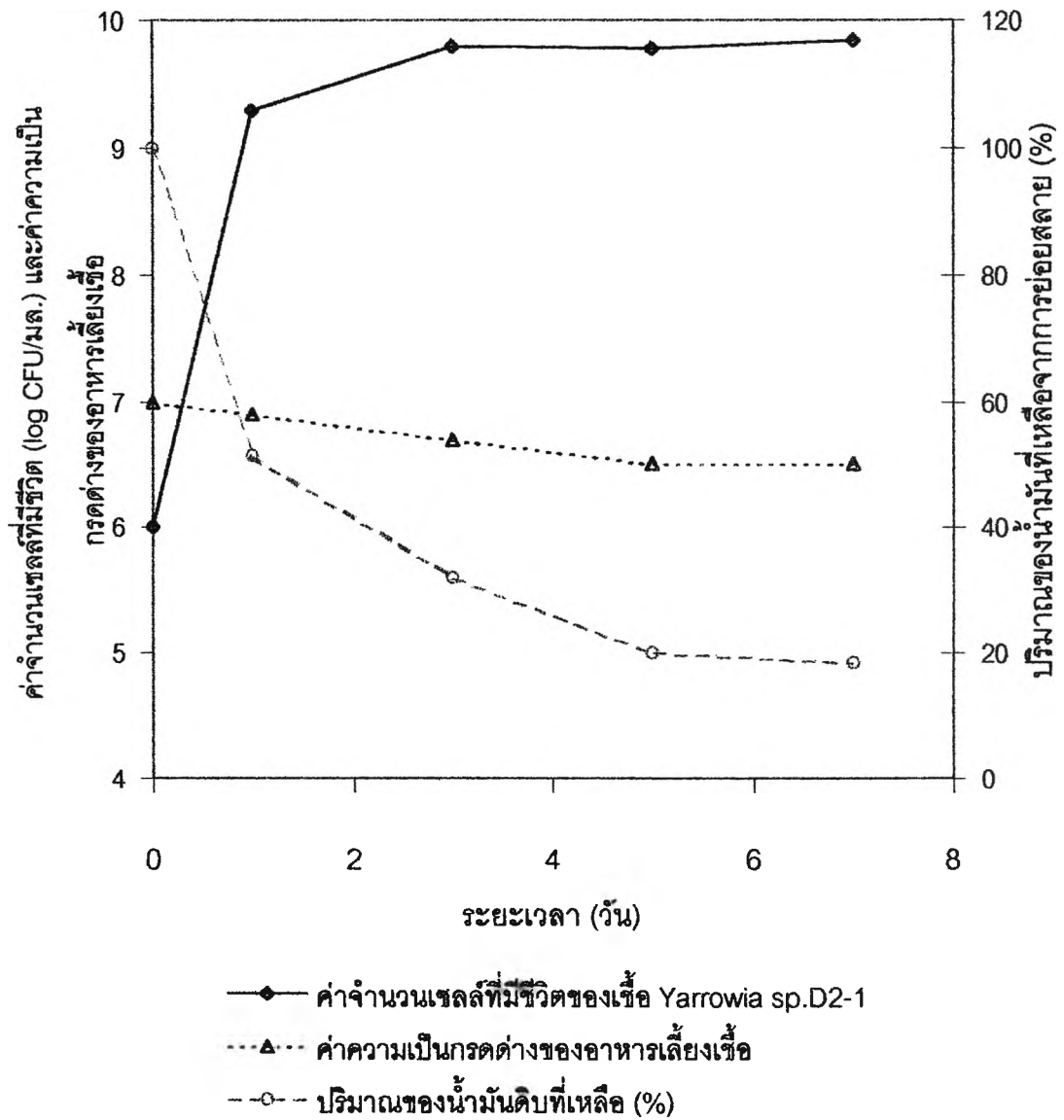
เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตอนเริ่มต้นซึ่งมีค่าสูงกว่าพีคของพีเอสเทนที่เหลือจากการย่อยของ *Bacillus* sp. B3-1 จากผลการวิเคราะห์แสดงว่า อัลเคนไฮโดรคาร์บอน C10 และ C28 หายไป ส่วนอัลเคนไฮโดรคาร์บอน C11-C27 มีปริมาณลดลงต่ำกว่าปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่จากการย่อยของ *Bacillus* sp. B3-1



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

#### 4.5.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อ *Yarrowia* sp. สายพันธุ์ D2-1

จากการทดลองในข้อ 4.5.2 แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อ ดังนั้นการทดลองในข้อนี้จึงทำการควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.5.2 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 มีการเจริญเติบโตและปริมาณเชื้อสูงกว่าเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 และ *Pseudomonas* sp. C1-2 โดยที่เชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 จะเริ่มเข้าสู่ภาวะ late log phase ในวันที่ 1 โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $2.1 \times 10^9$  CFU/มล. และมีปริมาณเชื้อสูงสุดเมื่อวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ  $7.8 \times 10^9$  CFU/มล. จากนั้นจะเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ ขณะที่ในวันที่ 1 ของการทดลองเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 และ *Pseudomonas* sp. C1-2 มีปริมาณของเชื้อเท่ากับ  $6.5 \times 10^8$  CFU/มล. และ  $2.1 \times 10^8$  CFU/มล. ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพของเชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบสูงกว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือหลังจากการย่อยสลายของเชื้อ พบว่า ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือในวันที่ 1 ของการทดลอง เท่ากับ 51.5 เปอร์เซ็นต์ซึ่งต่ำกว่าปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือหลังจากการย่อยสลายของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 และ *Pseudomonas* sp. C1-2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 65 และ 63 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงเชื้อจนครบ 7 วันจะมีปริมาณน้ำมันดิบเหลืออยู่เท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่หลังจากการย่อยสลายของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 และ *Pseudomonas* sp. C1-2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 30 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือ ในรูปที่ 4.23 พบว่า มีพีคของพริสเทนเหลืออยู่ในปริมาณที่สูงเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับคอนเริ่มต้นเพียงพีคเดียว อาจเนื่องจากเชื้อไม่สามารถย่อยสลายได้ ส่วนพีคของอัลเคนไฮโดรคาร์บอน C11-C19 ลดลงต่ำกว่าไฮโดรคาร์บอนที่เหลือจากการย่อยของ *Bacillus* sp. B3-1 และ *Pseudomonas* sp. C1-2 โดยเฉพาะอัลเคนไฮโดรคาร์บอน C11-C16 เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 6.5 – 7.0 ดังแสดงในรูปที่ 4.11

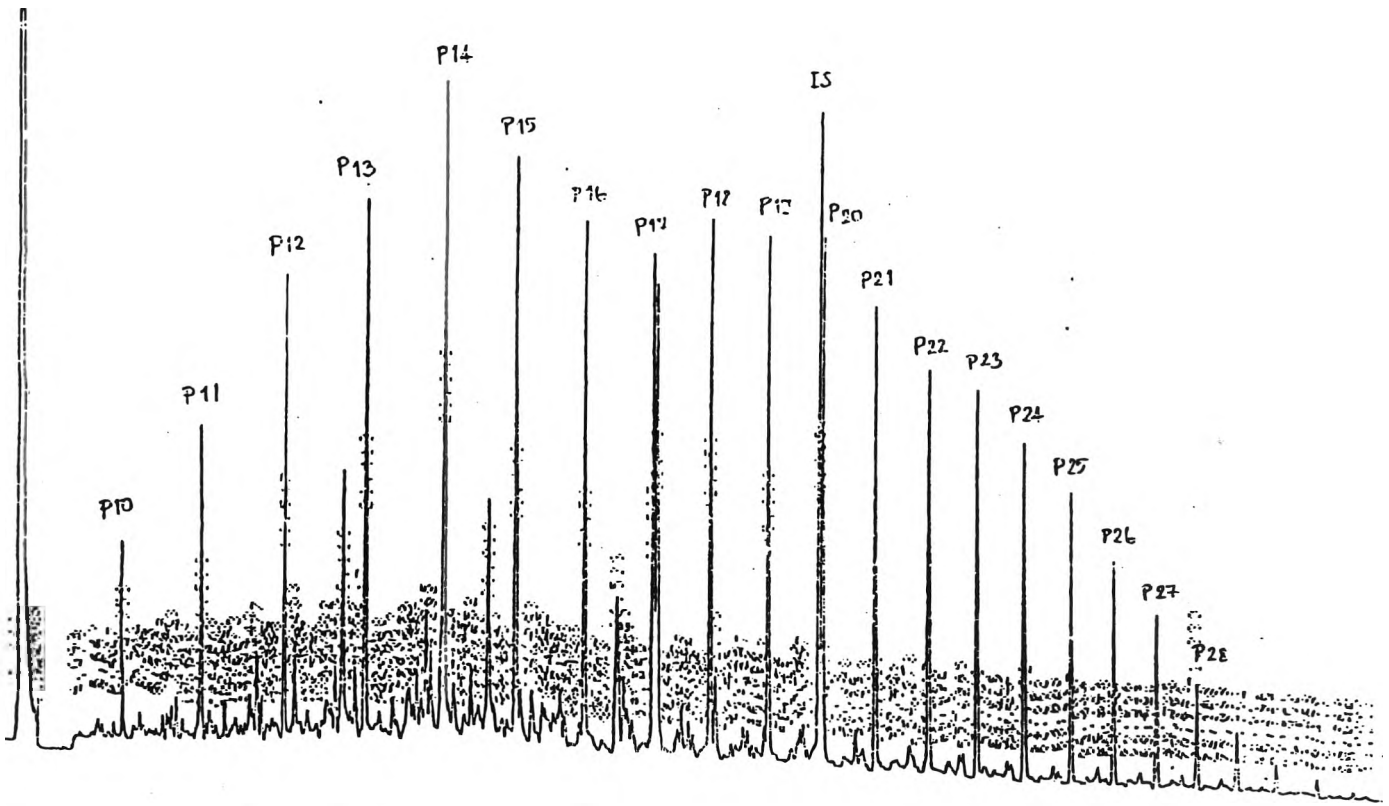


รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของเชื้อค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเจริญของเชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ

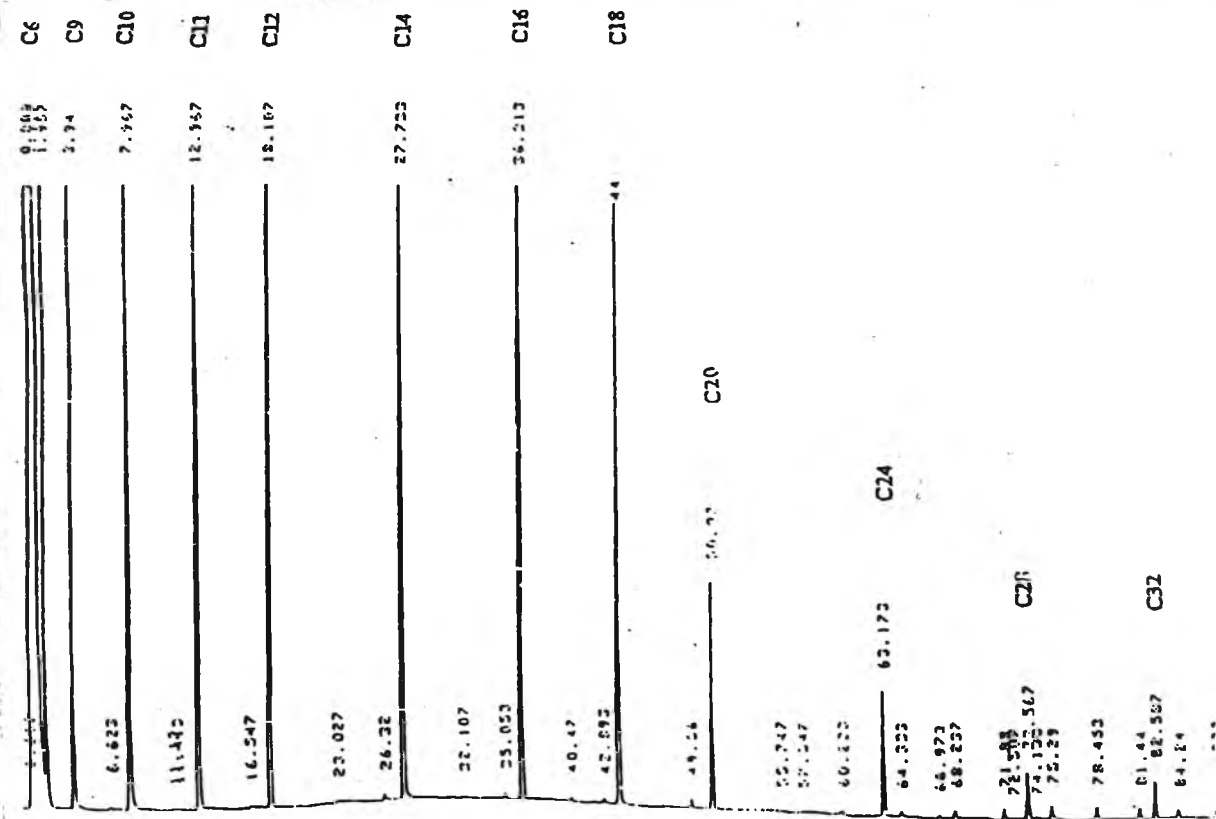
จากการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ จะเห็นว่า จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันได้แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำมันมีองค์ประกอบที่ซับซ้อน นอกจากนี้น้ำมันในแต่ละแหล่งก็จะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน (Atlas , 1995) ในการทดลองต่อไปจึงทำการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ Tapis ซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้ โดยวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี และจำแนกชนิดของไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ Tapis โดยการใช้ค่า Retention time ของอัลเคนมาตรฐาน

#### 4.6 องค์ประกอบที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ Tapis ซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้ โดยวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (Capillary Gas Chromatography)

จากรูปที่ 4.12 แสดงโครมาโตแกรมการวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟีของลำดับส่วนในน้ำมันดิบซึ่งละลายในตัวทำละลายเฮกเซน พบว่า มีมากกว่า 160 พีค (peaks) เมื่อวิเคราะห์ด้วยภาวะที่ใช้ในการวิจัยนี้ (วิธีการทดลองข้อ 1.) ไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสายตรง (alkane saturated hydrocarbon) สามารถที่จะจำแนกชนิดโดยการใช้ค่า  $R_t$  (retention time) ของอัลเคนมาตรฐานที่มีค่าสอดคล้องกันคือ นอร์มอล - เฮกเซน ( $C_6$ ) จนถึง Dotriacontane ( $C_{32}$ ) ดังรูปที่ 4.13 โดยกำหนดให้พีคที่คาดว่าจะเป็อัลเคนในโครมาโตแกรมน้ำมันดิบ Tapis มีสัญลักษณ์เป็น P เริ่มต้นจาก P10 ที่มี retention time ใกล้เคียงกับ นอร์มอล - เดคเคน (n - Decane) ไปจนถึง P28 ที่มี retention time ใกล้เคียงกับ นอร์มอล - ออกตะโคเซน (n - octacosane) ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และทำการคำนวณปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด (Total Hydrocarbons) โดยการรวมปริมาณของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่มีอยู่ในโครมาโตแกรม ดังแสดงในภาคผนวก



รูปที่ 4.12 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีขององค์ประกอบที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ Tapis ซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 4.13 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครโตกราฟีของไฮโดรคาร์บอนมาตรฐานต่างๆ (C<sub>6</sub> - C<sub>32</sub>)



ตารางที่ 4.9 Retention time ของ นอร์มอล – อัลเคน ในน้ำมันดิบ Tapis เมื่อวิเคราะห์ด้วย แก๊สโครมาโตกราฟี

นอร์มอล – อัลเคน ในน้ำมันดิบ Tapis	Retention time (นาที) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ตัวทำละลาย(นอร์มอล-เฮกเซน)	0.8224 $\pm$ 0.006
P10	6.933 $\pm$ 0.025
P11	11.551 $\pm$ 0.027
P12	16.522 $\pm$ 0.020
P13	21.395 $\pm$ 0.014
P14	26.044 $\pm$ 0.007
P15	30.439 $\pm$ 0.009
P16	34.594 $\pm$ 0.019
P17	38.540 $\pm$ 0.019
P18	42.270 $\pm$ 0.023
P19	45.824 $\pm$ 0.032
สารมาตรฐานภายใน (IS)	48.988 $\pm$ 0.035
P20	49.195 $\pm$ 0.028
P21	52.445 $\pm$ 0.033
P22	55.541 $\pm$ 0.044
P23	58.503 $\pm$ 0.037
P24	61.338 $\pm$ 0.036
P25	64.076 $\pm$ 0.038
P26	66.693 $\pm$ 0.041
P27	69.218 $\pm$ 0.048
P28	71.661 $\pm$ 0.046

ตารางที่ 4.10 Retention time ของ นอร์มอล – อัลเคน มาตรฐานซึ่งใช้ในการจำแนกชนิดของไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ Tapis

อัลเคนมาตรฐานที่ใช้	Retention time (นาที) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
C6 (n – Hexane)	0.803 $\pm$ 0.004
C9 (n – Nonane)	3.940 $\pm$ 0.019
C10 (n – Decane)	7.967 $\pm$ 0.028
C11 (n – Undecane)	12.967 $\pm$ 0.014
C12 (n – Dodecane)	13.107 $\pm$ 0.020
C14 (n – Tetradecane)	27.733 $\pm$ 0.007
C16 (n – Hexadecane)	36.313 $\pm$ 0.028
C18 (n – Octadecane)	44.000 $\pm$ 0.033
C20 (n – Eicosene) สารมาตรฐานภายใน	50.970 $\pm$ 0.026
C24 (n – Tetracosane)	63.173 $\pm$ 0.041
C28 (n – Octacosane)	73.567 $\pm$ 0.048
C32 (n – Dotriacontane)	82.537 $\pm$ 0.037

จากการวิเคราะห์ห้วงค์ประกอบของน้ำมันดิบ Tapis พบว่า น้ำมันที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนในช่วง  $C_{13}$  –  $C_{20}$  สูง โดยไฮโดรคาร์บอนที่มีปริมาณสูงสุดคือ  $C_{14}$  ซึ่งมี retention time เท่ากับ  $26.044 \pm 0.007$  คิดเป็น  $6.96 \pm 1.51$  เปอร์เซ็นต์ของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ Tapis ส่วน นอร์มอล – เฮกเซน ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายในงานวิจัยนี้เป็นพีคที่มีขนาดใหญ่มี retention time เท่ากับ  $0.8224 \pm 0.006$  และ retention time ของสารมาตรฐานภายใน (Internal Standard) ซึ่งใช้ 1 – อีโคซีน (1 – Eicosene) คือ  $48.988 \pm 0.035$

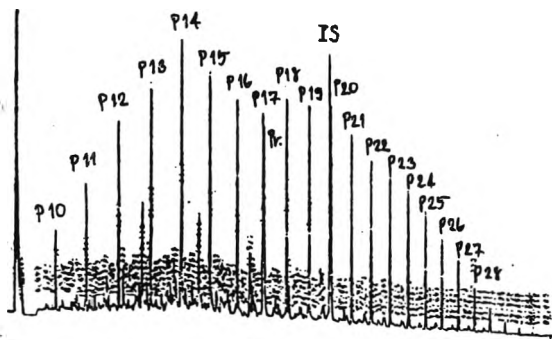
#### 4.7 การย่อยสลายทางกายภาพ (Abiotic loss) ของน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ Tapis ในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ (control)

การย่อยสลายทางกายภาพของไฮโดรคาร์บอนใน 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ Tapis ในภาวะ 50 มล. อาหารเหลว BH broth อุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยไม่มีการเติมจุลินทรีย์ ทำการเก็บตัวอย่างทุก 0 , 1 , 3 , 5 และ 7 วัน พบว่า ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ Tapis ลดลงตามลำดับ ดังตารางที่ 4.11 โดยปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันดิบที่มี retention time ต่ำ คือ P9 – P12 จะลดลงเร็วกว่าไฮโดรคาร์บอนตัวอื่นๆ ที่มี retention time สูงกว่า และลักษณะการลดลงของไฮโดรคาร์บอนในระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ภาวะข้างต้นแสดงในรูปที่ 4.14

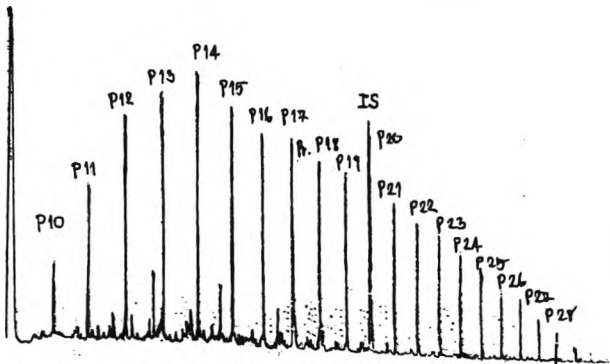
ตารางที่ 4.11 ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่เหลือจากการย่อยสลายทางกายภาพของน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ Tapis ในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ในระยะเวลาต่างๆ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาในการทดลอง (วัน)	ปริมาณของไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ (คิดเป็น เปอร์เซ็นต์)
0	100
1	73.17 ± 9.01
3	71.07 ± 8.60
5	67.84 ± 6.80
7	66.65 ± 7.90

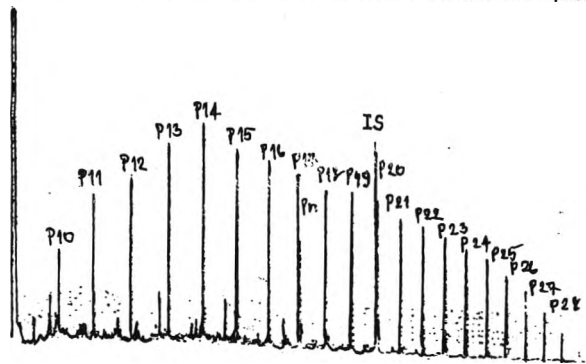
วันที่ 0



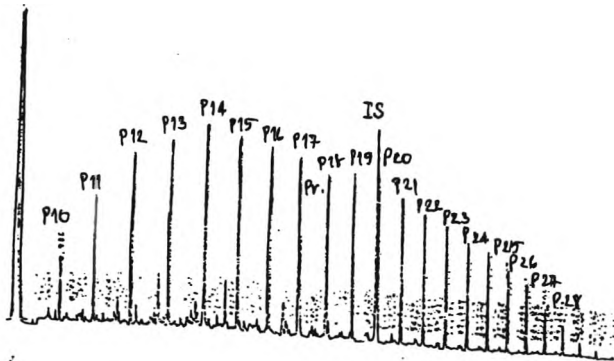
วันที่ 1



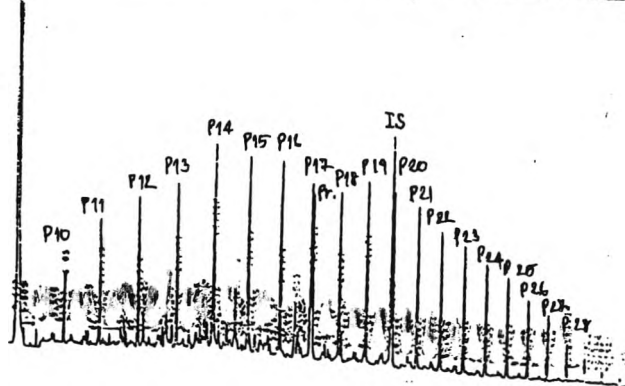
วันที่ 3



วันที่ 5



วันที่ 7



รูปที่ 4.14 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของไฮโดรคาร์บอนในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ (การย่อยสลายทางกายภาพ) ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ Tapis ในภาวะความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C

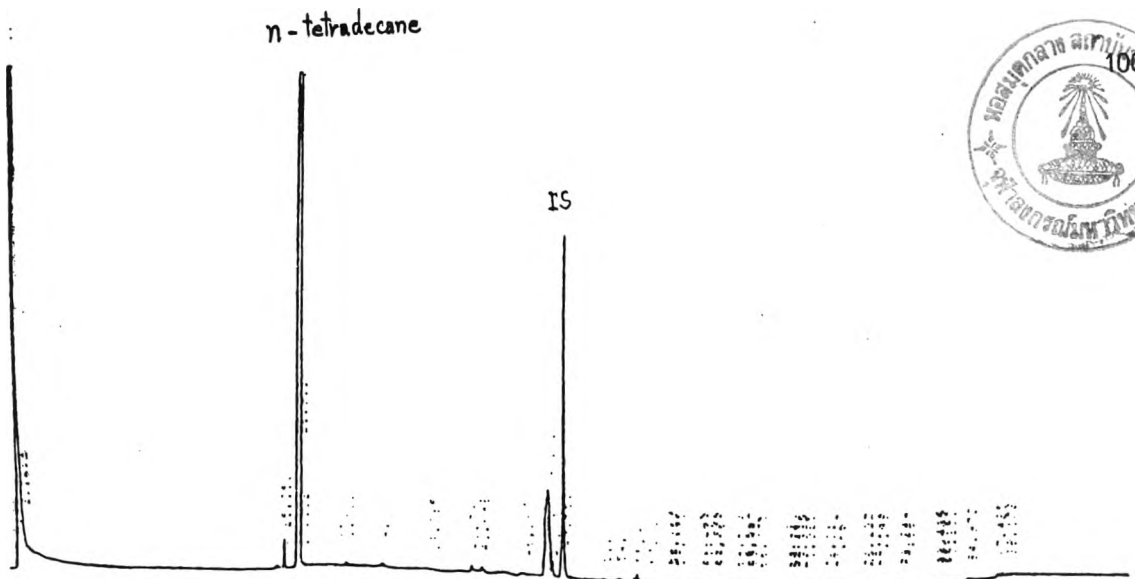
#### 4.8 ผลการตรวจสอบสารประกอบไฮโดรคาร์บอนบางชนิดในน้ำมันดิบ Tapis ซึ่งนำมาใช้ใน งานวิจัยนี้โดยวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี (capillary gas chromatography)

นอร์มอล – เตตระเดเคน พริสเทนและฟีแนนทริน จัดเป็นกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่พบในน้ำมันดิบ มีรายงานว่า พริสเทนและฟีแนนทรินเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ย่อยสลายได้ช้า (Jobson และคณะ , 1972 ; Nakamura และคณะ , 1996 ; April และคณะ , 1998 ; Ijah , 1998) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้ นอร์มอล – เตตระเดเคน พริสเทน และฟีแนนทริน เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ

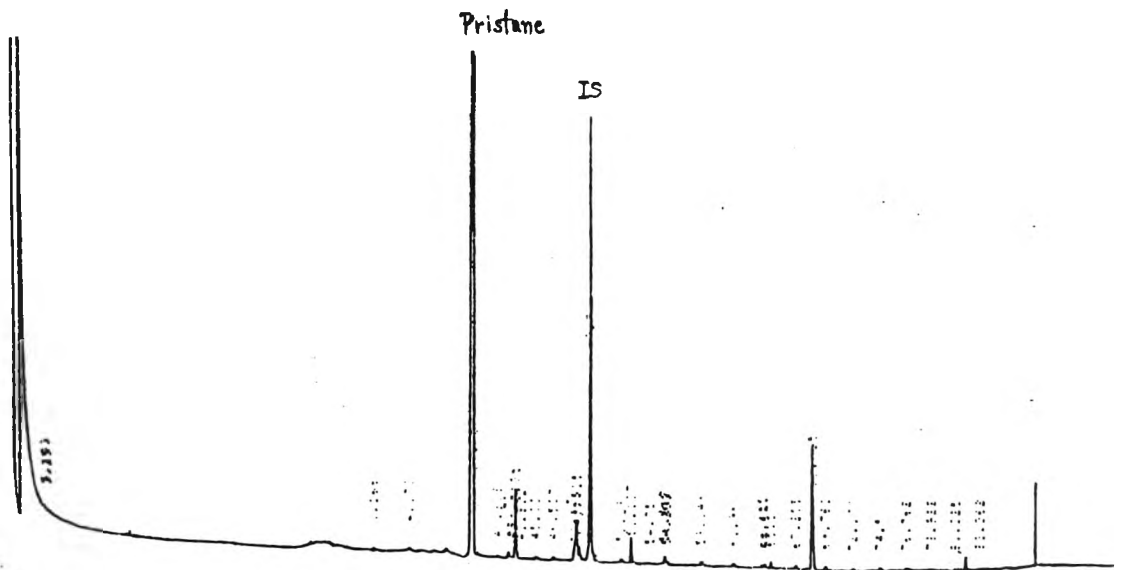
จากรูปที่ 4.15 แสดงโครมาโตแกรมการวิเคราะห์แก๊สโครมาโตกราฟีของ นอร์มอล – เตตระเดเคน พริสเทน และฟีแนนทริน ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบในน้ำมันดิบ พบว่า นอร์มอล – เตตระเดเคน พริสเทน และฟีแนนทรินมีค่า  $R_t$  (Retention time) แตกต่างกันดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 Retention time ของ นอร์มอล – เตตระเดเคน พริสเทน ฟีแนนทริน และ สารมาตรฐานภายใน (1 – อีโคซีน) เมื่อวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี

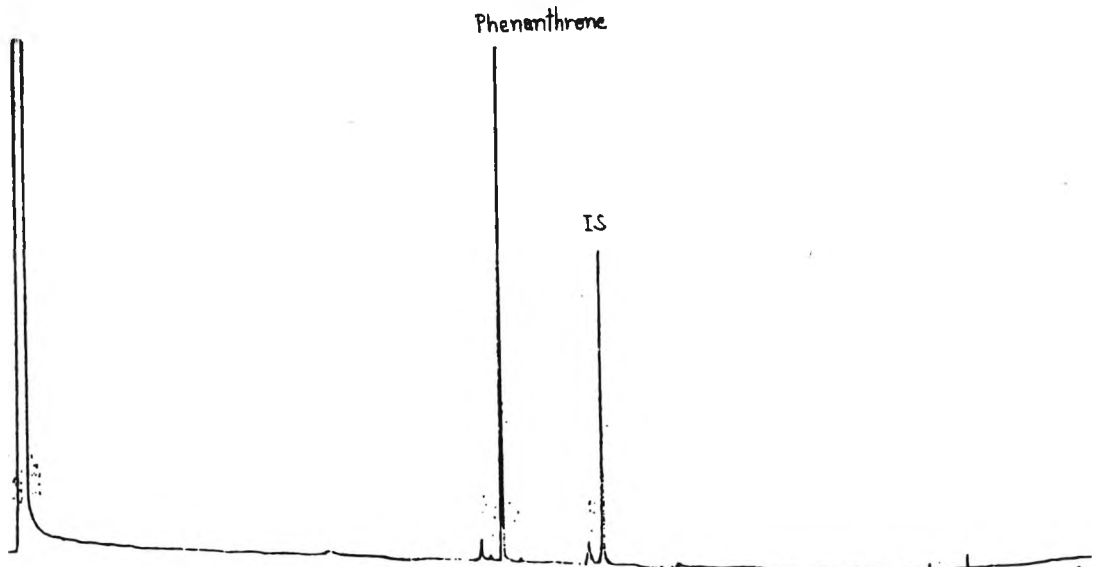
สารประกอบไฮโดรคาร์บอน	Retention time (นาที) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
นอร์มอล – เตตระเดเคน ( $C_{14}H_{30}$ )	$26.819 \pm 0.075$
พริสเทน ( $C_{19}H_{40}$ )	$39.695 \pm 0.099$
ฟีแนนทริน ( $C_{14}H_{10}$ )	$41.272 \pm 0.031$
สารมาตรฐานภายใน (1 – อีโคซีน)	$49.699 \pm 0.085$



นอร์มอล - เตตระเดเคน (n-tetradecane)



พริสเทน (pristane)



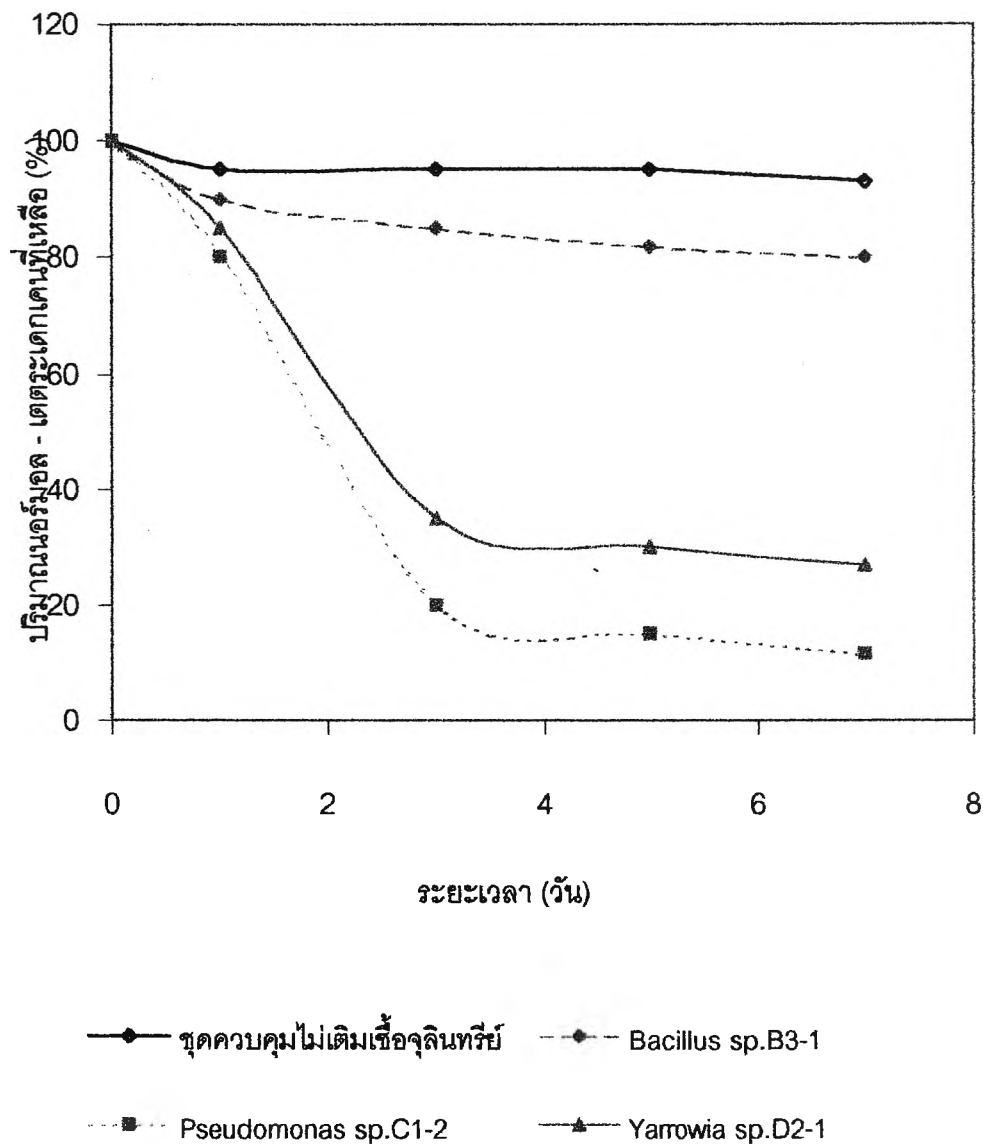
ฟีนแอนทริน (phenanthrene)

รูปที่ 4.15 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของ นอร์มอล - เตตระเดเคน พริสเทน และฟีนแอนทริน ซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้

#### 4.9 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายอนุพันธ์บางชนิดในน้ำมันดิบ Tapis ของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้

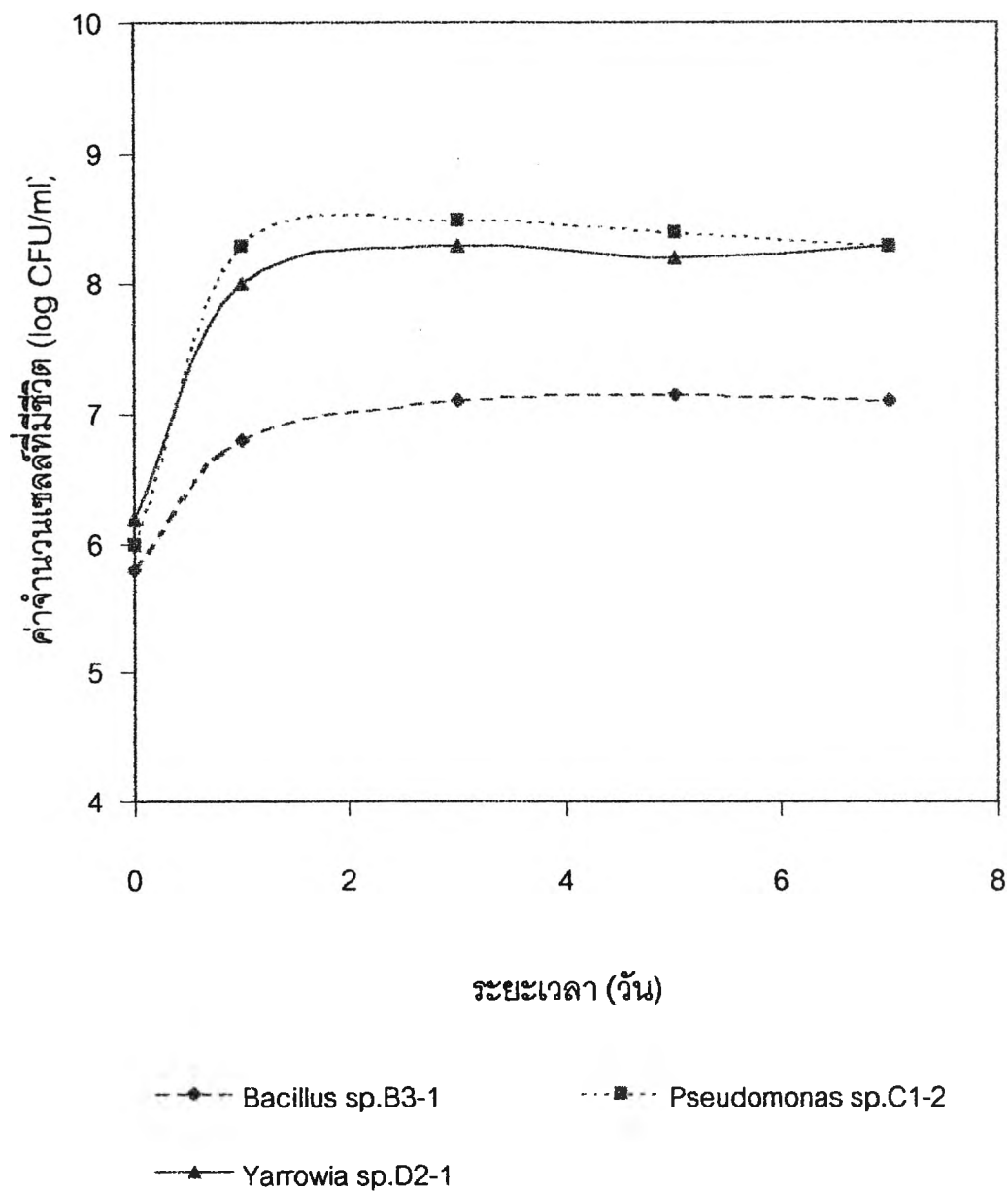
จากการศึกษาความสามารถของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 , *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ในการย่อยสลายอนุพันธ์บางชนิดที่พบในน้ำมันดิบ Tapis ซึ่งได้แก่นอร์มอล – เตตระเคเคน ทริสเทนและพีแนนทริน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ โดยการนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว BH ปริมาตร 50 มล. ที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 4 มก./มล. ทำการติดตามการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 และวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิดที่เหลืออยู่เป็นเวลา 0 1 3 5 และ 7 วันตามลำดับ พบว่าได้ผลการทดลองดังนี้

#### 4.9.1 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายนอร์มอล - เตตระเดกเคน 4 มก./มล. ของ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้



รูปที่ 4.16 ปริมาณของนอร์มอล - เตตระเดกเคนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์

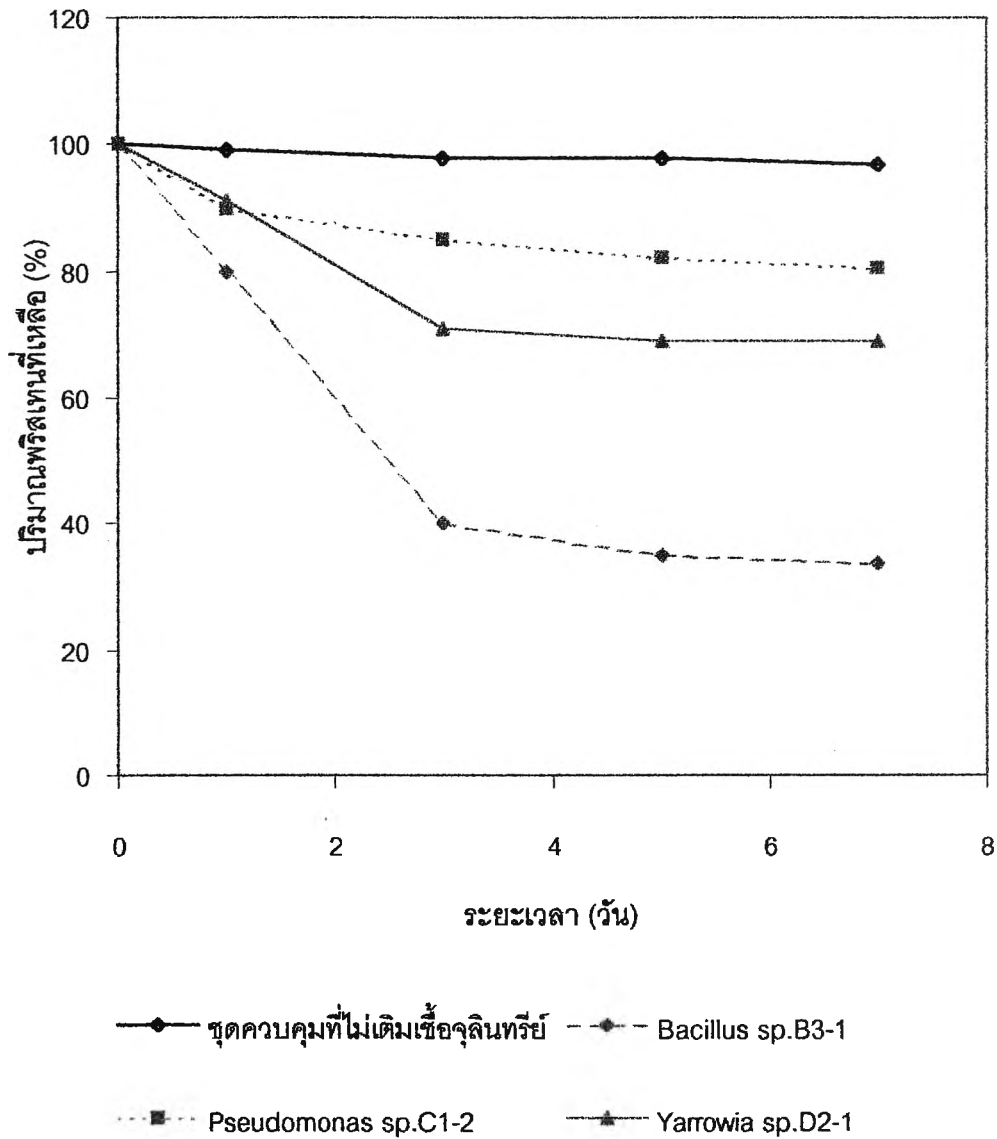




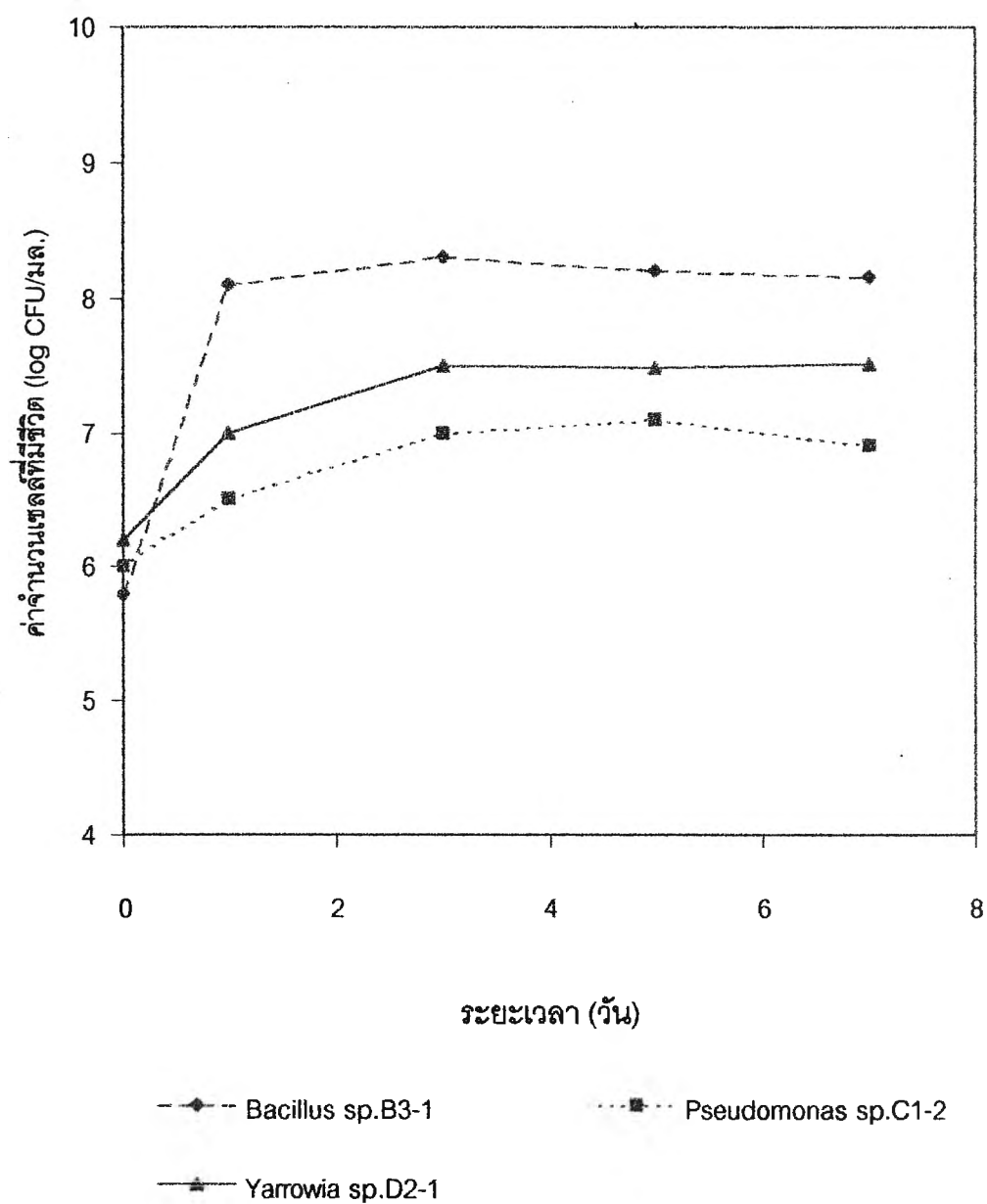
รูปที่ 4.17 กราฟแสดงอัตราการเจริญของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 โดยการใช้อร์มอด – เติบโตบนแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Pseudomonas* sp.C1-2 และ *Yarrowia* sp.D2-1 สามารถย่อยสลายนอร์มอล – เติตระเคกเคนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ดีกว่า เชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 โดยสังเกตได้จากการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 อย่างรวดเร็วควบคู่ไปกับการลดลงอย่างรวดเร็วของนอร์มอล – เติตระเคกเคนในอาหารเหลว BH เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ โดยปริมาณของเชื้อ *Pseudomonas* sp. C1-2 เพิ่มจำนวนจาก  $9.5 \times 10^5$  CFU/มล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น  $3.7 \times 10^8$  CFU/มล. ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อจากนั้นจะคงที่ สอดคล้องกับปริมาณนอร์มอล – เติตระเคกเคนที่ลดลงอย่างรวดเร็วจาก 100 เปอร์เซ็นต์ในตอนเริ่มต้นไปเหลือ 20 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนเชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก  $8.5 \times 10^5$  CFU/มล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น  $1.1 \times 10^8$  CFU/มล. ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับปริมาณของนอร์มอล – เติตระเคกเคนที่ลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์เหลือ 35 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ส่วนในกรณีของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายนอร์มอล – เติตระเคกเคนต่ำกว่าเชื้อจุลินทรีย์อีกสองสายพันธุ์ จากรูปที่ 4.16 จะเห็นได้ว่าปริมาณของนอร์มอล – เติตระเคกเคนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ อาจเนื่องมาจากเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 สามารถใช้นอร์มอล - เติตระเคกเคนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญได้ไม่ดี ทำให้อัตราการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 ไม่ติดตามไปด้วย โดยมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อจาก  $6.5 \times 10^5$  CFU/มล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น  $1.1 \times 10^7$  CFU/มล. ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนปริมาณของนอร์มอล – เติตระเคกเคนจะลดลงเพียงเล็กน้อยจาก 100 เปอร์เซ็นต์ในตอนเริ่มต้นเหลือ 85 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการทดลอง และเมื่อทำการ เลี้ยงเชื้อต่อไปจนครบ 7 วัน พบว่า ปริมาณของนอร์มอล – เติตระเคกเคนที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 , *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 มีค่าเท่ากับ 80 , 11.5 และ 26.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

#### 4.9.2 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายพริสเทนเข้มข้น 4 มก./มล. ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้



รูปที่ 4.18 ปริมาณของพริสเทนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์

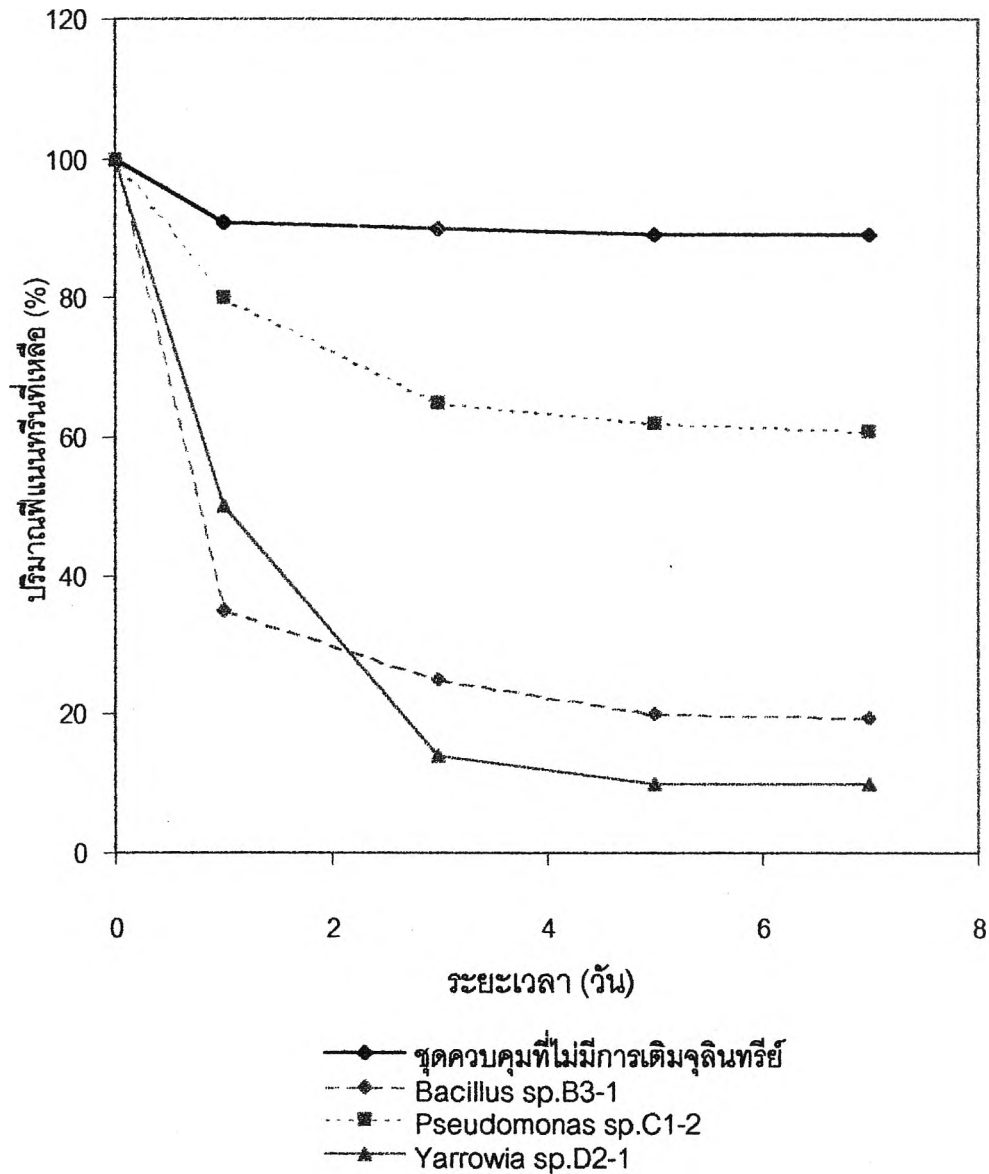


รูปที่ 4.19 กราฟแสดงอัตราการเจริญของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 โดยการใช้ฟริสเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

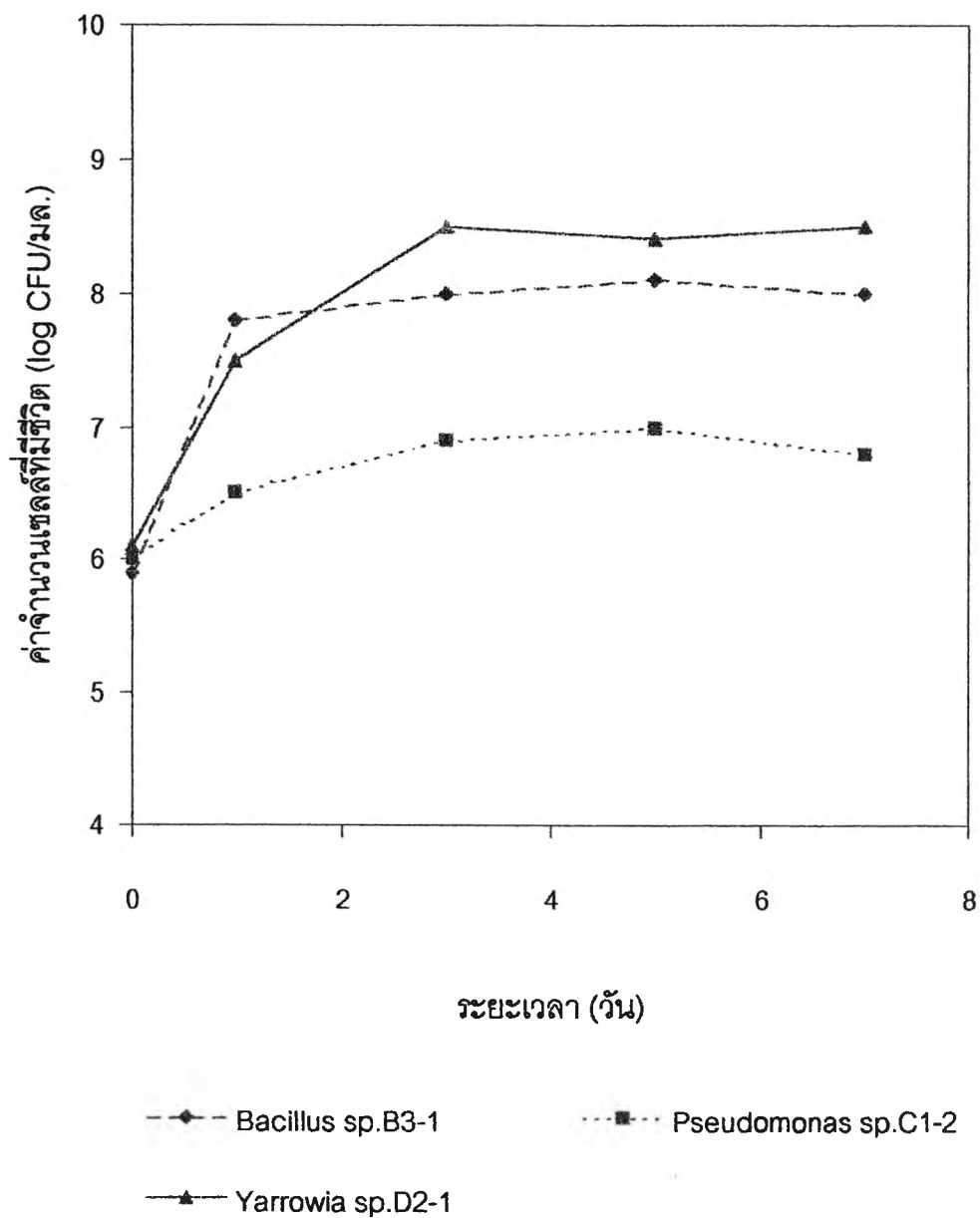
จากรูปที่ 4.18 จะเห็นว่า การย่อยสลายของพริสเทนทางกายภาพเกิดขึ้นน้อยมาก ดังนั้น การหายไปของพริสเทนน่าจะเกิดจากการย่อยสลายของเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดลองพบว่า *Bacillus* sp. B3-1 สามารถย่อยสลายพริสเทนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ คิดว่า *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติม จุลินทรีย์ และสังเกตได้จากลักษณะการเจริญของ *Bacillus* sp. B3-1 ซึ่งจะมีการเพิ่มจำนวน อย่างรวดเร็วจาก  $7.5 \times 10^5$  CFU/มล. ไปเป็น  $1.5 \times 10^8$  CFU/มล. ในวันที่ 1 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจำนวนเชื้อจะเริ่มคงที่ โดยที่ปริมาณของพริสเทนจะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ในตอน เริ่มต้นเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 1 และลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 41 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของ การเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 สามารถนำพริสเทนไปใช้ในการเจริญได้ เมื่อทำ การเลี้ยงต่อไปจนครบ 7 วัน พบว่า มีปริมาณพริสเทนเหลืออยู่เท่ากับ 33.6 เปอร์เซ็นต์

ในขณะที่เดียวกันพบว่า *Yarrowia* sp. D2-1 มีความสามารถในการย่อยสลายพริสเทน เพื่อใช้ในการเจริญได้ รองลงมาจากเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 โดยปริมาณของพริสเทนที่เหลือจาก การย่อยสลายของเชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์เหลือ 91 เปอร์เซ็นต์ 71 เปอร์เซ็นต์ 69 เปอร์เซ็นต์ และ 68.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน และมี ลักษณะการเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อไม่มากนัก คือเพิ่มขึ้นจาก  $1.8 \times 10^6$  CFU/มล. ไปเป็น  $1.1 \times 10^7$  CFU/มล. ในวันที่ 1 และเพิ่มเป็น  $3.4 \times 10^7$  CFU/มล. ในวันที่ 3 จากนั้นก็จะเริ่มคงที่ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากเชื้อสามารถย่อยสลายพริสเทนเพื่อนำมาใช้ในการเจริญได้เพียงบางส่วนเพราะ พริสเทนเป็นอัลเคนที่มีโครงสร้างที่เป็นกิ่ง (branched alkane) (Walwer และ Colwell , 1974) เมื่อไม่สามารถย่อยสลายต่อไปได้ก็ไม่มีแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญ ทำให้ อัตราการเจริญเริ่มคงที่ ในส่วนของ *Pseudomonas* sp. C1-2 ซึ่งพบว่า มีความสามารถในการ ย่อยสลายพริสเทนได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับอีกสองสายพันธุ์และจากการที่ *Pseudomonas* sp. C1-2 มีความสามารถในการย่อยสลายพริสเทนได้ดี ทำให้อัตราการเจริญของเชื้อต่ำไปด้วย เห็นได้ จากมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อจากตอนเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยคือ เพิ่มขึ้นจาก  $1.0 \times 10^6$  CFU/มล. ไป เป็น  $3.3 \times 10^6$  CFU/มล. ในวันที่ 1 และเพิ่มเป็น  $1.1 \times 10^7$  CFU/มล. ในวันที่ 3 จากนั้นก็จะเริ่ม คงที่ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 4.18 พบว่า ปริมาณของพริสเทนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Pseudomonas* sp. C1-2 มีค่าสูงคือ 80.5 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ มีการเติมจุลินทรีย์ หลังการเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน แสดงให้เห็นว่า *Pseudomonas* sp. C1-2 มี ความสามารถในการย่อยสลายพริสเทนเพื่อนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการ เจริญได้ดี

### 4.9.3 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟิแนนทรีนเข้มข้น 4 มก./มล. ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้



รูปที่ 4.20 ปริมาณของฟิแนนทรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์



รูปที่ 4.21 กราฟแสดงอัตราการเจริญของ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 โดยการใช้ฟิโนเนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 สามารถที่จะย่อยสลายฟิแนทรีนได้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออีกสองสายพันธุ์และชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ จากรูปที่ 4.20 จะเห็นว่า ปริมาณของฟิแนทรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 มีปริมาณต่ำสุดคือ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออีกสองสายพันธุ์ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับอัตราการเจริญของเชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 ที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 1 คือ เพิ่มจาก  $1.4 \times 10^6$  CFU/มล. เป็น  $3.8 \times 10^7$  CFU/มล. และเพิ่มเป็น  $3.2 \times 10^8$  CFU/มล. ในวันที่ 3 จากนั้นก็จะเริ่มคงที่จนครบ 7 วัน แสดงว่าเชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 สามารถที่จะย่อยสลายฟิแนทรีนเพื่อนำไปใช้ในการเจริญได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับที่ Harayama และคณะ (1989) รายงานว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่มี dioxygenase activity จะมีความสามารถในการย่อยสลายอนุพันธ์ของน้ำมันดิบได้ดี และจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า *Yarrowia* sp. D2-1 มีสมบัติดังกล่าว ในขณะที่เดียวกันพบว่า *Bacillus* sp. B3-1 ก็มีความสามารถในการย่อยสลายฟิแนทรีนได้เช่นเดียวกัน ดังจะเห็นได้จากปริมาณของฟิแนทรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน มีค่าเท่ากับ 19.5 เปอร์เซ็นต์ โดยที่อัตราการเจริญของ *Bacillus* sp. B3-1 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 คือ เพิ่มขึ้นจาก  $8.2 \times 10^5$  CFU/มล. เป็น  $6.8 \times 10^7$  CFU/มล. จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในวันที่ 3 คือ เพิ่มเป็น  $1.0 \times 10^8$  CFU/มล. และเริ่มคงที่จนครบ 7 วัน สาเหตุที่ในช่วงแรก *Bacillus* sp. B3-1 มีอัตราการเจริญสูง อาจเนื่องมาจากเชื้อสามารถใช้คาร์บอนที่เกิดจากการย่อยสลายของฟิแนทรีนด้วยวิธีทางกายภาพ ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4.20 จะมีการลดลงของปริมาณฟิแนทรีนในวันที่ 1 หรือ *Bacillus* sp. B3-1 อาจมีเอนไซม์ dioxygenase แต่ไม่มีเอนไซม์ tryptophanase ที่จะเปลี่ยน tryptophan เป็น indole

ส่วน *Pseudomonas* sp. C1-2 ซึ่งจากการทดลองพบว่า มีความสามารถในการย่อยสลายฟิแนทรีนต่ำกว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ จากรูปที่ 4.20 จะเห็นว่าปริมาณของฟิแนทรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Pseudomonas* sp. C1-2 มีค่าค่อนข้างสูง คือ 60.8 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจาก *Pseudomonas* sp. C1-2 มีความสามารถในการใช้ฟิแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญได้ต่ำ ทำให้อัตราการเจริญของ *Pseudomonas* sp. C1-2 ต่ำด้วย โดยมีการเพิ่มจำนวนจาก  $1.0 \times 10^6$  CFU/มล. เป็น  $3.3 \times 10^6$  CFU/มล. ในวันที่ 1 และเพิ่มเป็น  $9.0 \times 10^6$  CFU/มล. ในวันที่ 3 จากนั้นเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปจนครบ 7 วัน พบว่า ปริมาณของฟิแนทรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Pseudomonas* sp. C1-2 จะมีการเปลี่ยนแปลงโดยค่อยๆ ลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 80 65 62 และ 60.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



สรุปลักษณะต่างๆ ของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์เท่าที่ทดสอบได้ ผลดังแสดงในตารางที่ 4.13

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

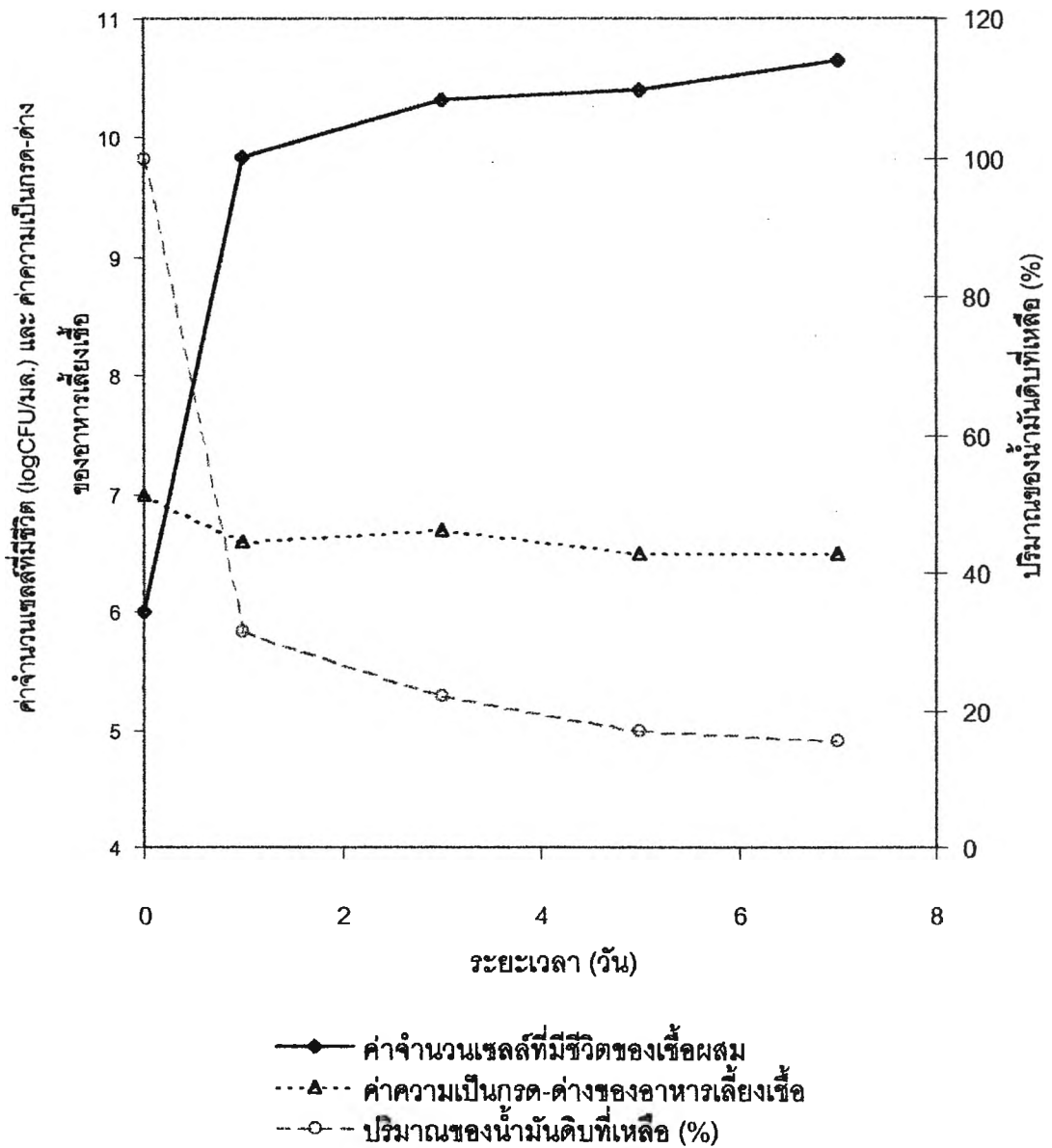
คุณสมบัติที่ทดสอบ	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ B3-1	<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ C1-2	<i>Yarrowia</i> sp. สายพันธุ์ D2-1
1. ความสามารถในการลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ	+	+	++
2. การมี dioxygenase activity	-	-	+
3. ความสามารถในการย่อยสลาย เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์)			
: นอร์มอล – เติตระเดกเคน	20	88.58	73.18
: พรอสเทน	66.4	19.5	31.06
: ฟีนานทริน	80.5	39.2	90
: น้ำมันดิบ	70	80	82

หมายเหตุ + หมายถึง ให้ผลบวกในการทดสอบ

- หมายถึง ให้ผลลบในการทดสอบ

#### 4.10 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ (microbial population)

จากการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายอนุพันธ์บางชนิดซึ่งย่อยสลายได้ยากที่พบในน้ำมันดิบและประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ จะเห็นว่า จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมัน ได้แตกต่างกัน และไม่มีจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายทุกองค์ประกอบของน้ำมันได้ สอดคล้องกับ Nakamura และคณะ (1996) และ Aislabie และคณะ (1998) และ Korda และคณะ (1997) ได้รายงานไว้ว่า กลุ่มประชากรจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงกว่าจุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียว ดังนั้นการศึกษาในข้อนี้จึงได้นำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มาเลี้ยงร่วมกัน เมื่อศึกษาการเจริญพบว่า เชื้อผสมจะมีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วภายในวันที่ 1 โดยจะมีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $7.0 \times 10^9$  CFU/มล. และเพิ่มขึ้นเป็น  $2.2 \times 10^{10}$  CFU/มล. ในวันที่ 3 แล้วมีปริมาณเชื้อสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง เท่ากับ  $4.5 \times 10^{10}$  CFU/มล. ซึ่งสูงกว่าปริมาณของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์เพียงชนิดเดียว ดังนั้นน่าจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันสูงตามไปด้วย จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 จาก 100 เปอร์เซ็นต์ในตอนเริ่มต้นเหลือ 31.5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.22 ซึ่งต่ำกว่าปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 3 สายพันธุ์เพียงชนิดเดียว ที่มีค่าเท่ากับ 65 63 และ 51.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายในวันที่ 1 เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นการทำงานร่วมกันของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ และสอดคล้องกับอัตราการเจริญของเชื้อผสมซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการทดลองเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.22 หลังจากนั้นปริมาณของน้ำมันที่เหลือจะลดลงอย่างช้าๆ เหลือ 22 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 เหลือ 17 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 5 และเหลือ 15.5 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่า เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้เร็วกว่าเชื้อบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว



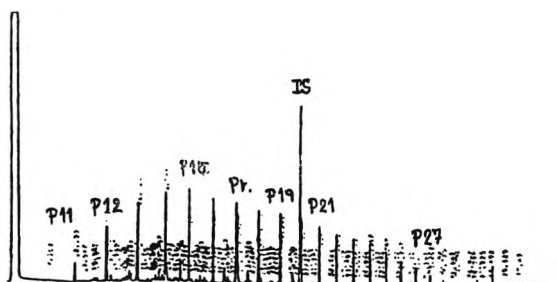
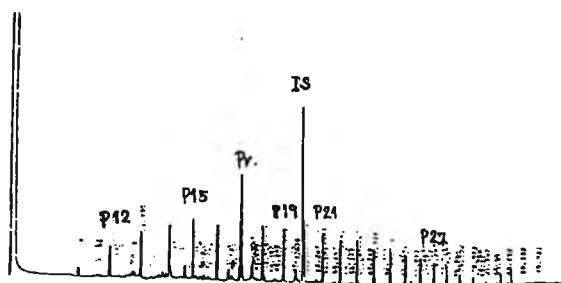
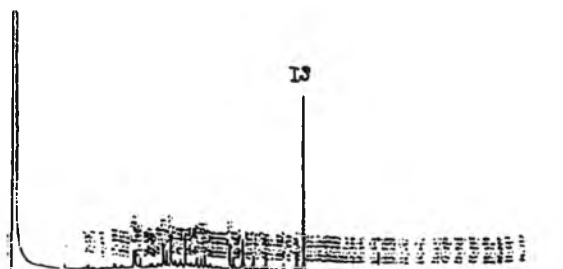
รูปที่ 4.22 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อผสม ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเจริญของเชื้อผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ

ตารางที่ 4.14 ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเลี้ยง *Bacillus* sp. B3-1 *Pseudomonas* sp. C1-2 *Yarrowia* sp. D2-1 และเชื้อผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C และมีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วยการเติมบัฟเฟอร์

ระยะเวลา ที่ใช้ใน การเลี้ยง เชื้อ (วัน)	ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อลักษณะต่างๆ ที่มีการเติมบัฟเฟอร์				
	การย่อยสลาย โดยไม่มีการ เติมจุลินทรีย์	การย่อย สลายจาก <i>Bacillus</i> sp. B3-1	การย่อยสลาย จาก <i>Pseudomonas</i> sp. C1-2	การย่อย สลายจาก <i>Yarrowia</i> sp. D2-1	การย่อยสลาย จากเชื้อผสม ทั้ง 3 สายพันธุ์
0	100	100	100	100	100
1	73.2	65.3	65.1	51.5	31.5
3	71.1	45.7	40.6	32.0	22.4
5	67.8	35.3	25.8	20.6	17.0
7	66.7	30.0	20.5	18.5	15.5

จากการเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายที่ภาวะต่างๆ โดยที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่า ในวันที่ 1 ของการเลี้ยงเชื้อปริมาณของน้ำมันที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อผสมมีค่าต่ำสุดคือ 31.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อจุลินทรีย์เพียงตัวเดียว รองลงมาคือปริมาณของน้ำมันที่เหลือจากการย่อยของเชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 51.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณของน้ำมันที่เหลือจากการย่อยของเชื้อ *Bacillus* sp. B3-1 และ *Pseudomonas* sp. C1-2 มีค่าใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่า การใช้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว

เมื่อเปรียบเทียบ โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลือจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์และจุลินทรีย์ผสมด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี ดังรูปที่ 4.23 พบว่า การใช้กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันมีประสิทธิภาพสูงกว่าจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว ดังจะเห็นได้จากปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ จากรูปที่ 4.23 แสดงให้เห็นว่า ไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของเชื้อผสมมีค่าต่ำกว่าคือเท่ากับ 15.5 เปอร์เซ็นต์ โดยอัลเคนไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในช่วง C11-C20 หายไปเหลือเพียงสารมัธยันต์ (Intermediated) บางชนิด ซึ่งอาจเป็นสารประกอบคาร์บอนที่มีขนาดเล็กลง (Atlas , 1981) โดยเฉพาะฟิคของทริสเทนซึ่งเป็นไฮโดรคาร์บอนที่ย่อยสลายได้ยากเหลืออยู่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับตอนเริ่มต้นต่ำกว่าการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว ส่วนอัลเคนไฮโดรคาร์บอนในช่วง C21-C27 ถูกย่อยสลายหมดไป

*Bacillus* sp. B3-1*Pseudomonas* sp. C1-2*Yarrowia* sp. D2-1

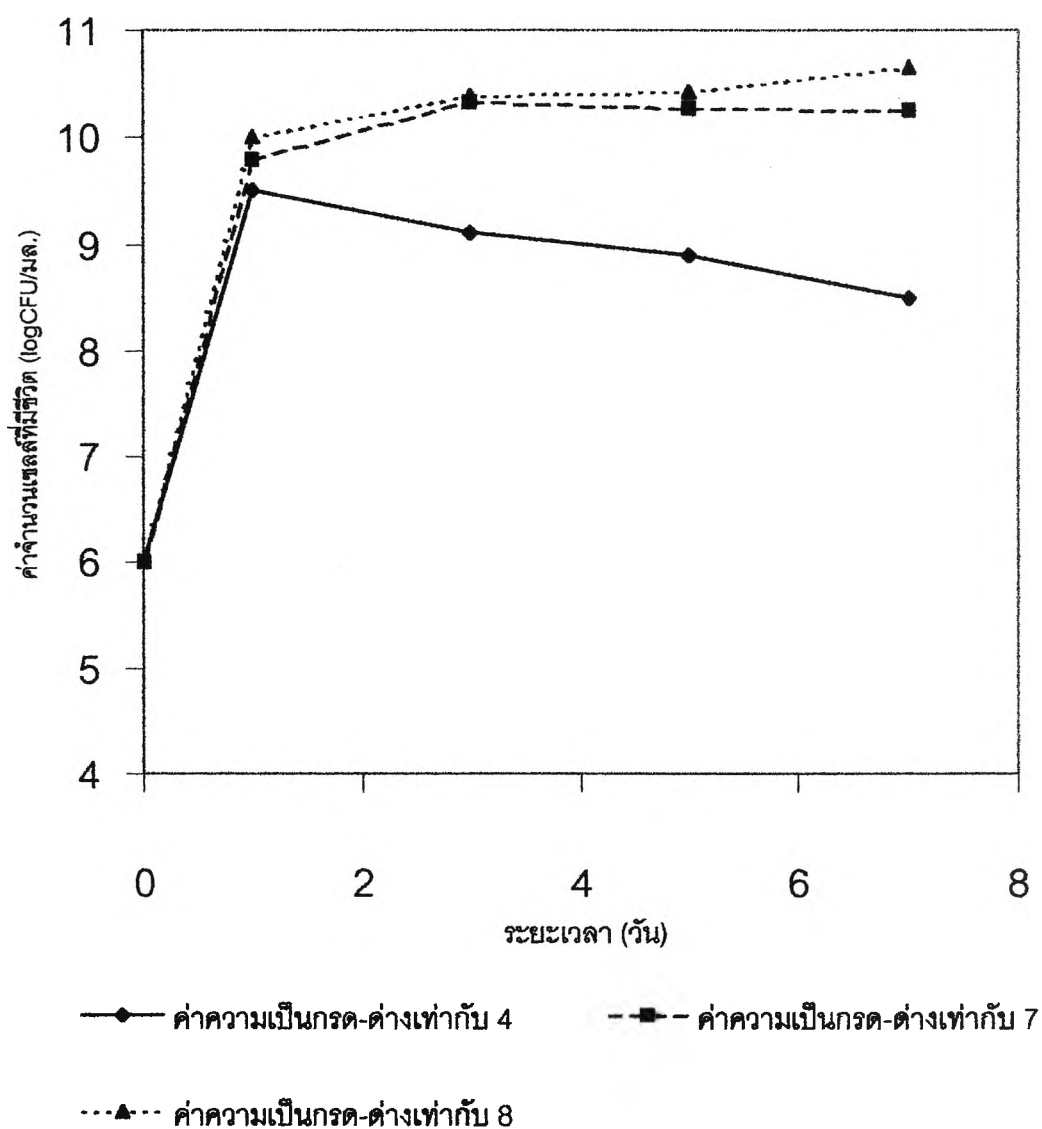
Mixed culture

รูปที่ 4.23 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของปริมาณน้ำมันที่เหลือจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์และจุลินทรีย์ผสม เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์

#### 4.11 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด

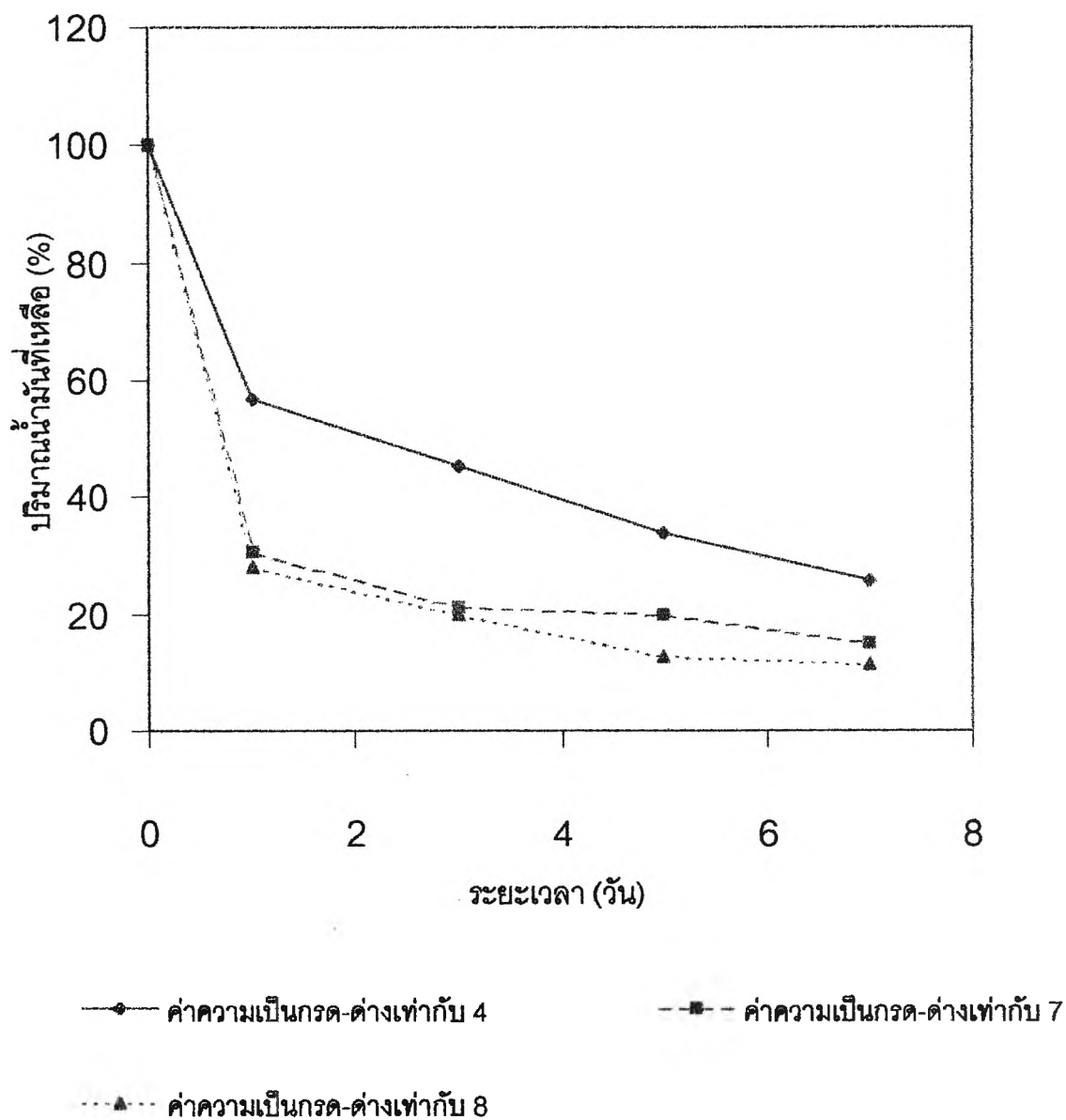
##### 4.11.1 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

จากการทดลองในข้อ 4.5.2 แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อ ดังนั้นการทดลองในข้อนี้จึงทำการควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.5.2 จากการศึกษาเพื่อหาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นในขวดเขย่า โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าต่างๆ คือ 4.0 , 7.0 และ 8.0 เก็บตัวอย่างพร้อมกันทุก 1 3 5 และ 7 วัน พบว่า กลุ่มจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.0 โดยที่การเจริญเติบโตของเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และ 8.0 มีรูปแบบการเจริญลักษณะเดียวกัน โดยที่ปริมาณของเชื้อที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 เท่ากับ  $4.6 \times 10^{10}$  CFU/มล. และเท่ากับ  $1.75 \times 10^{10}$  CFU/มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ส่วนปริมาณของเชื้อผสมที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4.0 มีค่าต่ำกว่าคือเท่ากับ  $3.3 \times 10^8$  CFU/มล. ดังรูปที่ 4.24 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณของ น้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นพบว่า เชื้อผสมสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 มีปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่เท่ากับ 11.43 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อผสมที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 และ 7.0 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 25.7 และ 15.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.15 ในภาคผนวก จ ส่วนรูปแบบการลดลงของน้ำมันดิบในการย่อยสลายของเชื้อผสมที่ความเป็นกรด-ด่างต่างๆ กัน ดังแสดงในรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.24 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ

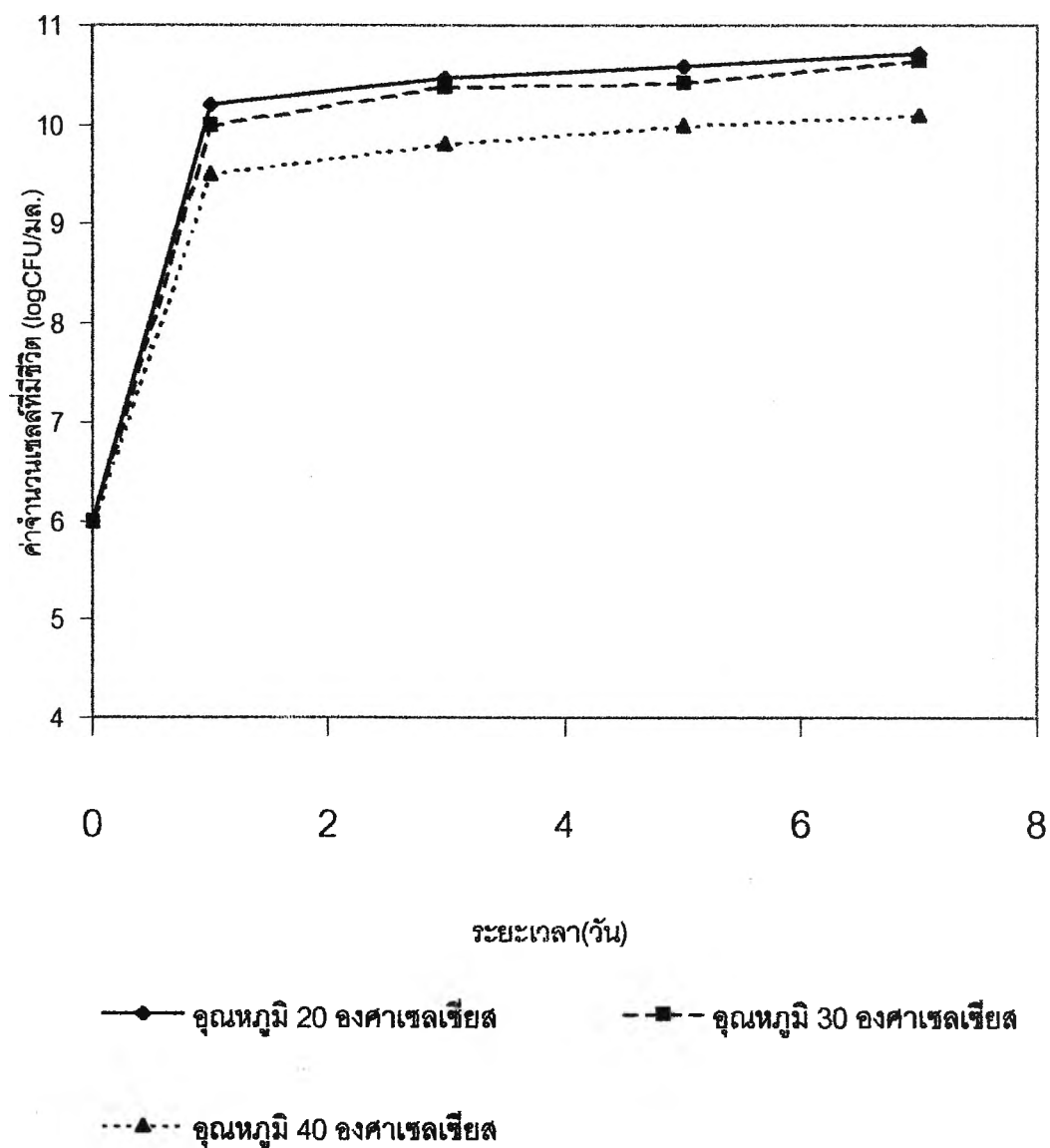




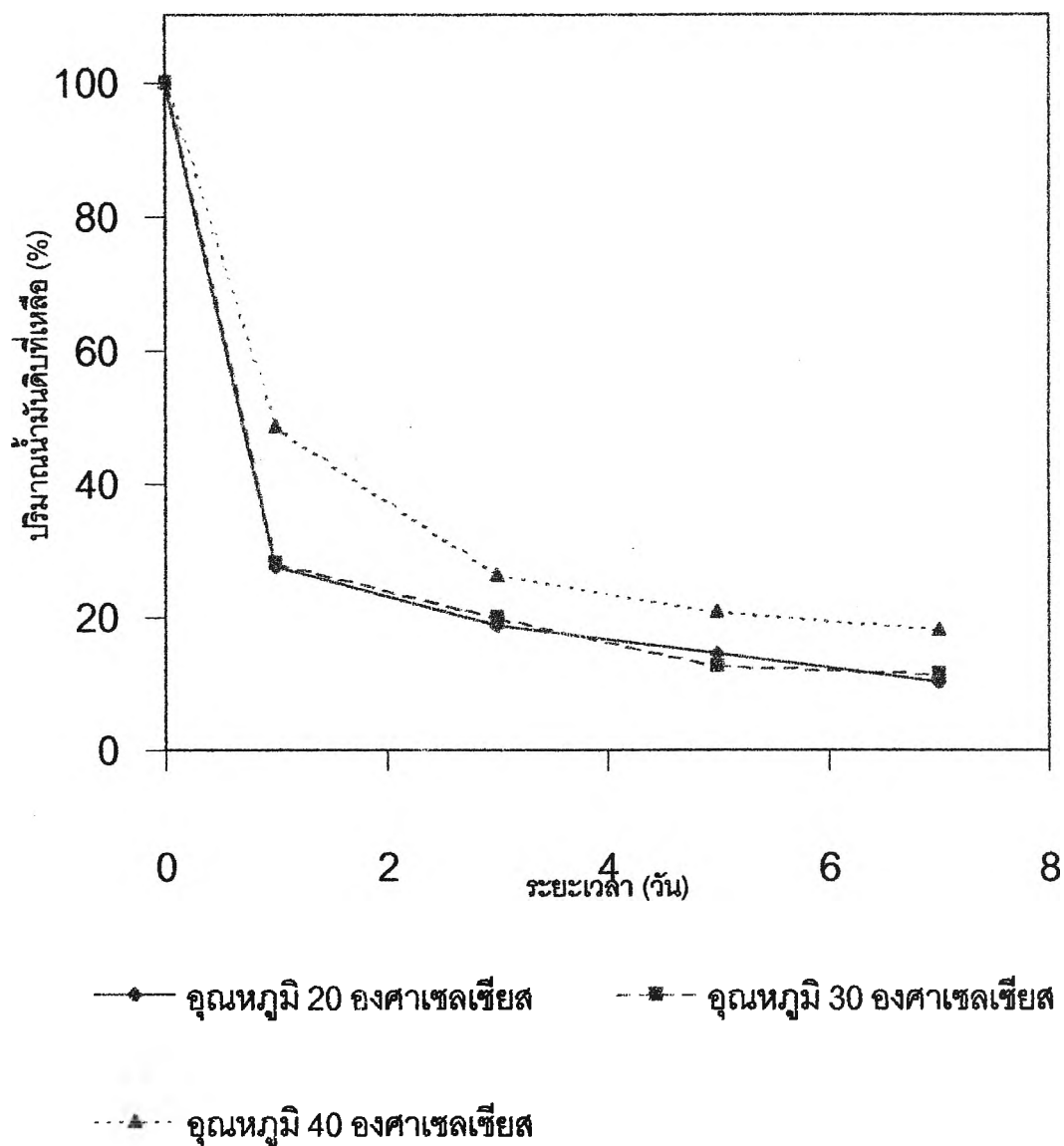
รูปที่ 4.25 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C

#### 4.11.2 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

จากการทดลองในข้อ 4.5.2 แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อ ดังนั้นการทดลองในข้อนี้จึงทำการควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.5.2 จากการศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นในขวดเย้า โดยแปรผันอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อในช่วง 20-40 °ซ โดยเก็บตัวอย่างพร้อมกันทุก 1 3 5 และ 7 วัน พบว่า กลุ่มจุลินทรีย์ผสมสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่ทดลองคือ 20-40 °ซ ดังแสดงในรูปที่ 4.26 โดยที่อุณหภูมิ 20 ° และ 30 °ซ ปริมาณของเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 เท่ากับ  $1.65 \times 10^{10}$ CFU/มล. และ  $1.1 \times 10^{10}$ CFU/มล. ตามลำดับ จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนมีปริมาณเชื้อสูงสุดเท่ากับ  $5.3 \times 10^{10}$ CFU/มล. และ  $4.5 \times 10^{10}$ CFU/มล. ตามลำดับ ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่อุณหภูมิ 40 °ซ กลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นก็สามารถเจริญเติบโตได้แต่มีปริมาณเชื้อต่ำกว่าคือเท่ากับ  $3.25 \times 10^9$ CFU/มล. ในวันที่ 1 และ  $1.4 \times 10^{10}$ CFU/มล. ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.26 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นมีเชื้อ *Yarrowia* sp. D2-1 ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ โดยปกติจะเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิช่วง 20 °-25 °ซ (Lodder, 1972) ทำให้อัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่อุณหภูมิ 20 °ซ สูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ และ 40 °ซ และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสมพบว่า การย่อยสลายน้ำมันทั้ง 3 ภาวะมีแนวโน้มเหมือนกันคือ มีการลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 °ซ ปริมาณของน้ำมันที่เหลืออยู่หลังจากการเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำสุดคือลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์เหลือ 27.51 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจะลดลงอย่างช้าๆ จนเหลือ 10.2 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนปริมาณของน้ำมันที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °ซ จะมีค่าสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ คือ ลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์เหลือ 48.7 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 1 และลดลงอย่างช้าๆ จนเหลือ 18.1 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 ในขณะที่ปริมาณน้ำมันที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เท่ากับ 28.2 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 1 และ 11.43 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 ของการทดลอง ดังตารางที่ 4.16 (ภาคผนวก จ) และลักษณะการลดลงของน้ำมันดังรูปที่ 4.27



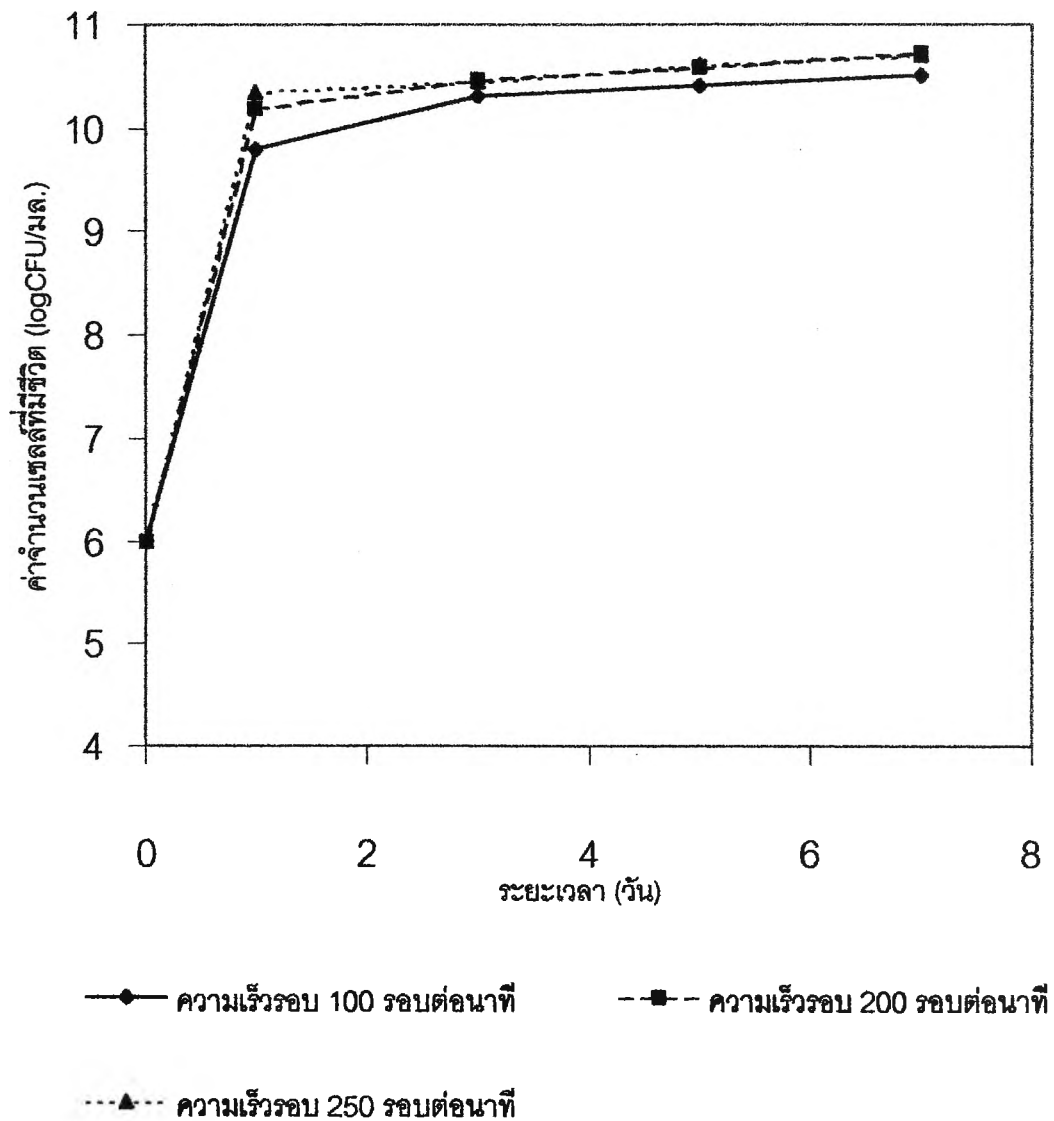
รูปที่ 4.26 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันคิป ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหาร เลี้ยงเชื้อ 8.0 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที



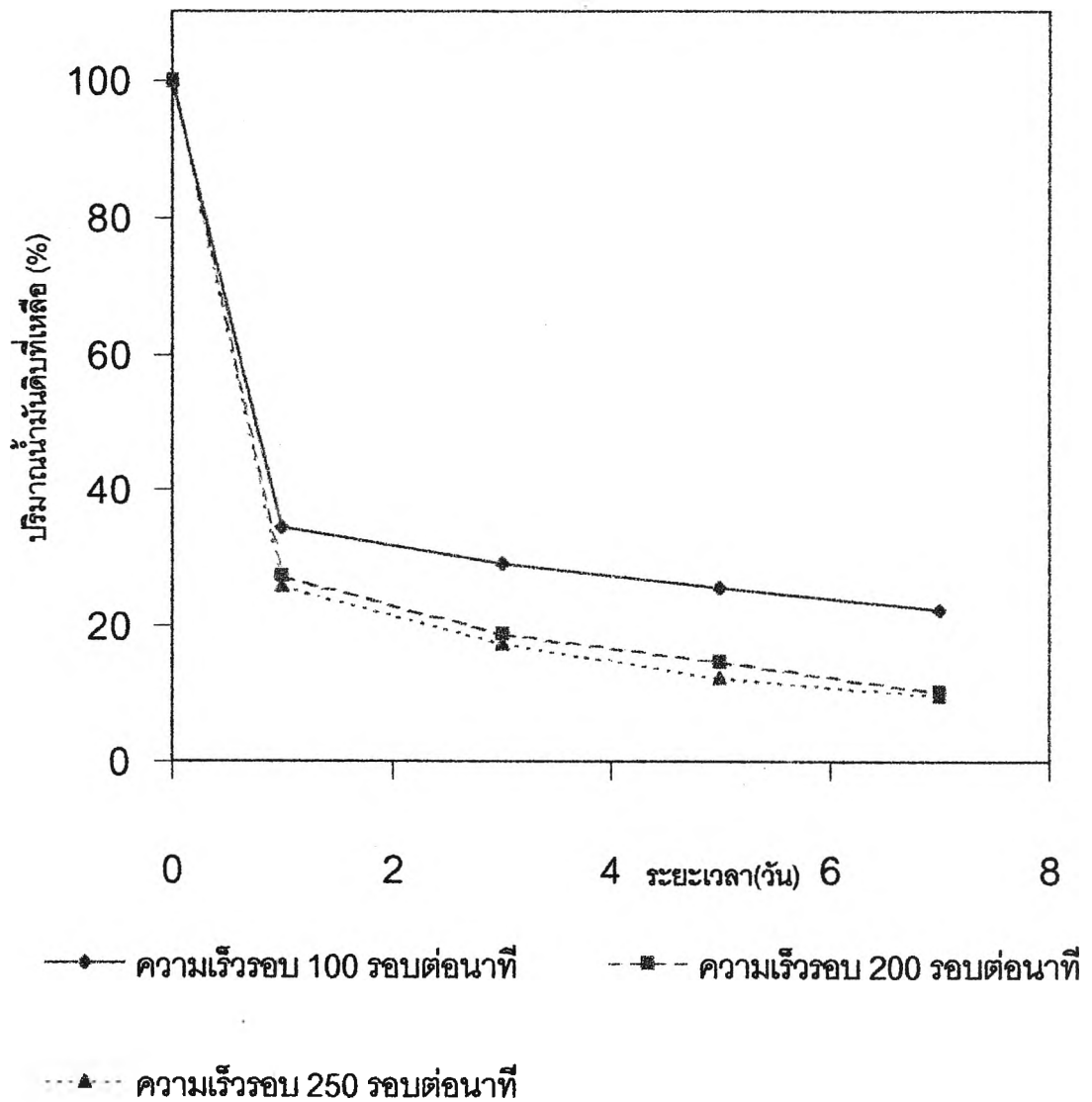
รูปที่ 4.27 ผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที

#### 4.11.3 ผลของความเร็รรอบในการเขย่าที่เหมาะสม

จากการทดลองในข้อ 4.5.2 แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อ ดังนั้นการทดลองในข้อนี้จึงทำการควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.5.2 จากการศึกษาเพื่อหาความเร็รรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นในขวดเขย่า โดยแปรผันความเร็รรอบในการเขย่าที่ 100 , 200 และ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างพร้อมกันทุก 1 3 5 และ 7 วัน พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อผสมมีแนวโน้มเดียวกันคือ มีปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 โดยปริมาณเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความเร็รรอบในการเขย่า 100 , 200 และ 250 รอบต่อนาทีมีค่าเท่ากับ  $6.5 \times 10^9$  CFU/มล. ,  $1.75 \times 10^{10}$  CFU/มล. และ  $2.25 \times 10^{10}$  CFU/มล. ตามลำดับ (รูปที่ 4.28) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลืออยู่หลังจากการเลี้ยงเชื้อซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.6 27.51 และ 26.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อจนครบ 7 วัน พบว่า ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ผสมเมื่อเลี้ยงที่ความเร็รรอบของการเขย่า 200 และ 250 รอบต่อนาที มีค่าเท่ากันคือ  $5.3 \times 10^{10}$  CFU/มล. โดยที่ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความเร็รรอบการเขย่า 250 รอบต่อนาทีมีค่าเท่ากับ 9.8 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่า เมื่อเลี้ยงที่ความเร็รรอบ 200 รอบต่อนาทีซึ่งมีค่าเท่ากับ 10.2 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.29) ในขณะเดียวกันพบว่า ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ผสมเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความเร็รรอบ 100 รอบต่อนาทีมีค่าเท่ากับ  $3.2 \times 10^{10}$  CFU/มล. และมีปริมาณของน้ำมันที่เหลืออยู่เท่ากับ 22.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าภาวะอื่นๆ ดังตารางที่ 4.17 (ภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.28 ผลของความเร็วยรอบการเขย่าที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20<sup>o</sup>ซ

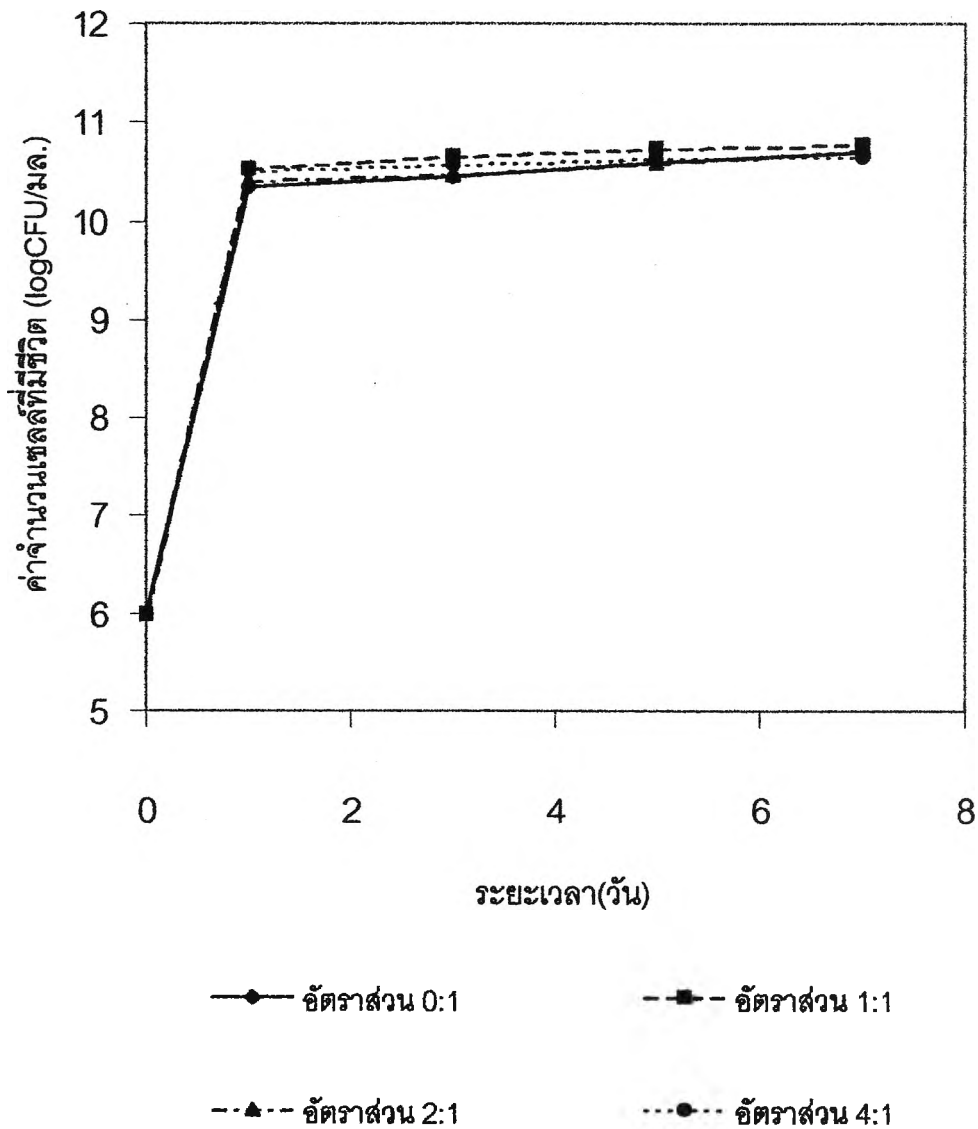


รูปที่ 4.29 ผลของความเร็วรอบการเขย่าที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20°C

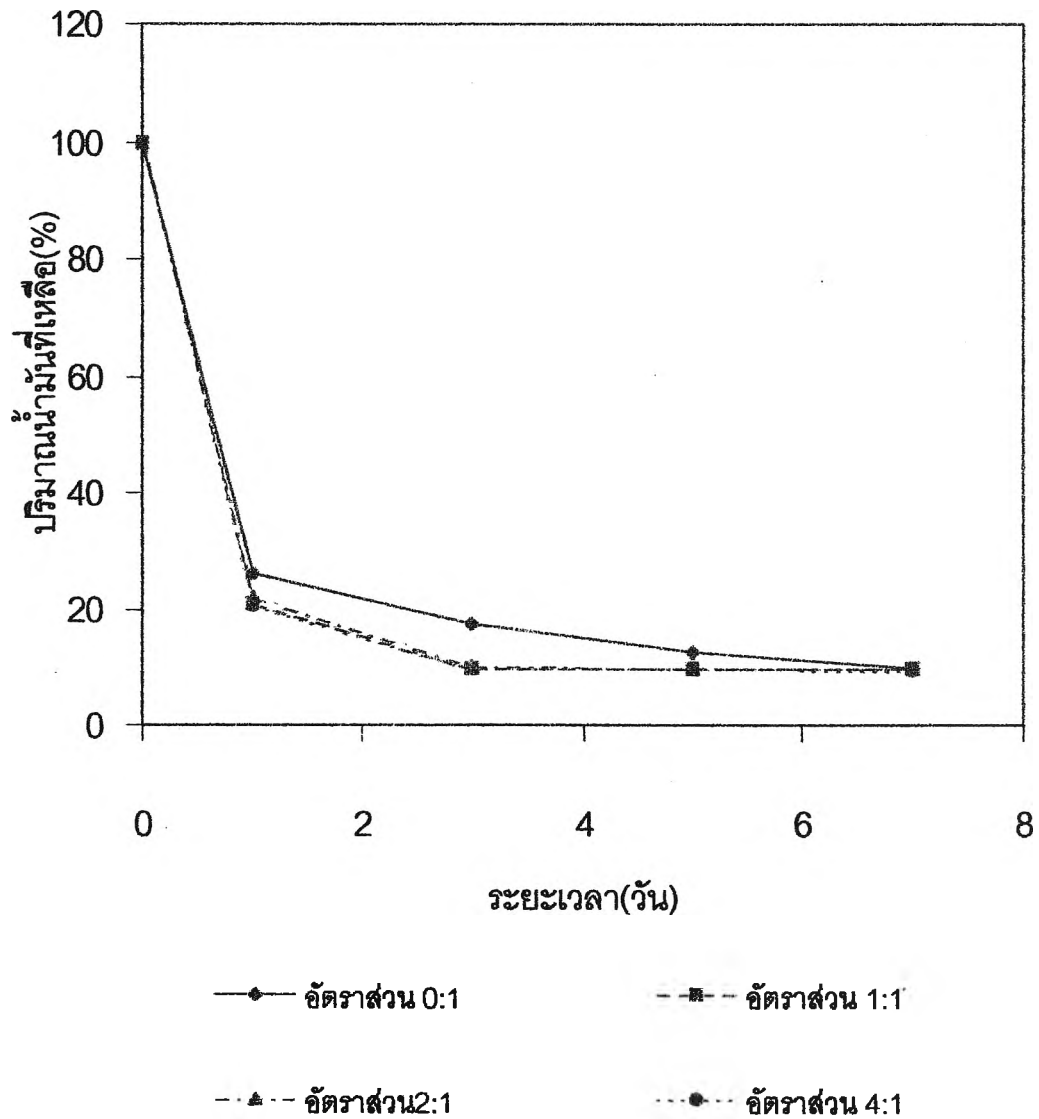
#### 4.11.4 ผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ( biosurfactant ) กับกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น

จากการทดลองในข้อ 4.5.2 แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อ ดังนั้นการทดลองในข้อนี้จึงทำการควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.5.2 จากการศึกษาเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ( biosurfactant ) กับกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นในขวดเขย่า โดยใช้ *Acinetobacter calcoaceticus* TISTR 360 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ (Rocha และคณะ , 1997) และแปรผันอัตราส่วนระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นเท่ากับ 0 ต่อ 1 , 1 ต่อ 1 , 2 ต่อ 1 และ 4 ต่อ 1 ทำการเก็บตัวอย่างพร้อมกันทุก 1 3 5 และ 7 วัน จากรูปที่ 4.32 พบว่า ในช่วงวันที่ 1-7 การเจริญเติบโตของเชื้อผสมที่ภาวะอัตราส่วน 1:1 และ 2:1 มีแนวโน้มสูงกว่า 4:1 แม้ว่าจะมีค่าใกล้เคียงกันก็ตาม คือ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเข้าสู่ภาวะคงที่ ในวันที่ 1 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยภาวะที่มีอัตราส่วน 4:1 จะมีปริมาณของเชื้อเท่ากับ  $3.2 \times 10^{10}$  CFU/มล. ส่วนภาวะที่มีอัตราส่วน 2:1 และ 1:1 มีค่าเท่ากับ  $2.9 \times 10^{10}$  CFU/มล. และ  $3.35 \times 10^{10}$  CFU/มล. ตามลำดับ และจากรูปที่ 4.31 เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อผสมที่ภาวะต่างๆ ดังกล่าว พบว่า ที่ภาวะอัตราส่วน 2:1 และ 4:1 ปริมาณน้ำมันที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 วัน มีปริมาณลดลงเร็วกว่าที่ภาวะอัตราส่วน 1:1 เพียงเล็กน้อยประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ คือ มีค่าเท่ากับ 21.8 และ 20.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ภาวะอัตราส่วน 1:1 มีค่าเท่ากับ 20.8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นอัตราการลดลงของปริมาณน้ำมันที่ทุกภาวะช้าลง แต่ที่ภาวะอัตราส่วน 1:1 , 2:1 และ 4:1 ก็ยังมีอัตราการลดลงเร็วกว่า 0:1 เล็กน้อย หลังจากการทดลองวันที่ 3 ที่ภาวะอัตราส่วน 0:1 ยังคงลดลงอีกขณะที่ 1:1 2:1 และ 4:1 ลดลงน้อยมาก อย่างไรก็ตามในวันที่ 7 ถือว่าทุกอัตราส่วนมีปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่เท่ากันๆ คือ 9.5-9.8 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า อัตราการเจริญของเชื้อผสมกับอัตราการลดลงของน้ำมันหลังวันที่ 1 ไม่สอดคล้องกัน เพราะฉะนั้นหากต้องการกำจัดน้ำมันให้มีประสิทธิภาพควรเลี้ยงเชื้อที่ภาวะอัตราส่วน 2:1 เป็นเวลา 3 วันก็เพียงพอเพราะ หลังจากนั้นปริมาณน้ำมันเกือบจะไม่ลดลงหรือลดลงน้อยมาก (Deziel และคณะ , 1996 ; Jain และคณะ , 1991 ; Rocha และคณะ , 1998 ; Rosenburg และคณะ , 1981)





รูปที่ 4.30 ผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น โดยใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการผลิตไบโอดีเซลของจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20°C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.31 ผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น โดยใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20°C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

#### 4.11.5 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (Optimum conditions) และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุด

จากการทดลองพบว่า อัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20°C ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที และอัตราส่วนระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นเท่ากับ 2:1 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก  $1.0 \times 10^6$  CFU/มล. เป็น  $2.9 \times 10^{10}$  CFU/มล. และเข้าสู่ภาวะคงที่ (stationary phase) ภายใน 1 วัน หลังจากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจนครบ 7 วัน ในขณะที่อัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะเดิม (ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.0 อุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที และไม่มีการเติมเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไป) (Ijah , 1998 ; Mueller และคณะ , 1992) พบว่า มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นช้ากว่า คือ เพิ่มขึ้นจาก  $1.0 \times 10^6$  CFU/มล. เป็น  $7.0 \times 10^6$  CFU/มล. ในเวลา 1 วัน และเป็น  $2.8 \times 10^{10}$  CFU/มล. ในเวลา 5 วัน แสดงให้เห็นว่า อัตราการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นเมื่อเลี้ยงที่ภาวะเหมาะสมมีค่าสูงกว่าเมื่อเลี้ยงที่ภาวะเดิม โดยจะเจริญเข้าสู่ภาวะคงที่ภายในระยะเวลา 1 วัน

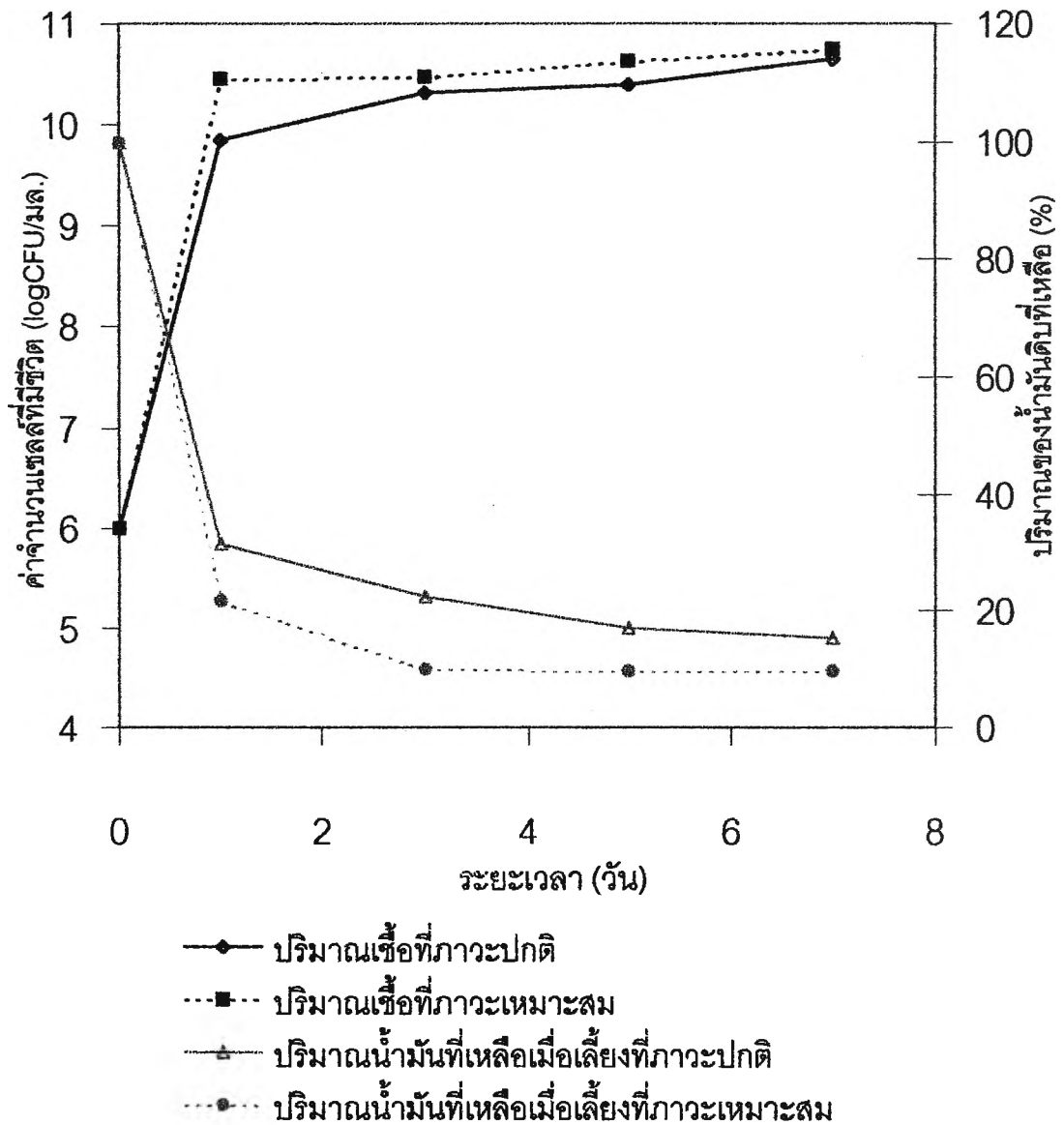
เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.32 พบว่า ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 3 วัน มีค่าเท่ากับ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่า ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะปกติเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 15.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในภาวะเดิม ดังจะเห็นได้จากปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือ 10.0 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 3 วัน และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปพบว่า ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสมมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยคือ เหลือ 9.7 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 5 และเหลือ 9.6 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 4.32) ดังนั้น เมื่อทำการเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นในภาวะที่เหมาะสม จะทำให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันสูงขึ้น โดยใช้เวลาในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหลือ 9.7 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 5 วัน

ตารางที่ 4.19 ผลของการเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20<sup>o</sup>ซ ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที และอัตราส่วนระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นเท่ากับ 2:1) ต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น

ภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อผสม (%)				
	0 วัน	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
ภาวะเดิม*	100	31.5	22.4	17.0	15.5
ภาวะที่เหมาะสม	100	21.8	10.0	9.7	9.6

หมายเหตุ \* ภาวะเดิม หมายถึง ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.0 อุณหภูมิ 30<sup>o</sup>ซ ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที และไม่มีการเติมเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไป อ้างอิงตาม Ijah (1998) และ Mueller และคณะ (1992)

จากตารางที่ 4.19 แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุดคือ 7 วัน ซึ่งมีปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลืออยู่เท่ากับ 9.6 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลืออยู่หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน และ 5 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 10.0 และ 9.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุดจึงใช้ระยะเวลา 3 วัน เพื่อความรวดเร็วในการดำเนินการกำจัดน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 4.32 ผลของการเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 อุณหภูมิ 20°C ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที และอัตราส่วนระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นเท่ากับ 2:1) ต่ออัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นและประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น