บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างดิน น้ำ ตะกอนและสลัดจ์ซึ่งมีการปนเปื้อนของน้ำมันในเขตกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง พบจุลินทรีย์จำนวน 29 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ เช่นเดียวกับที่ Atlas (1981) รายงานว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในบริเวณที่เคยมีการปนเปื้อนของน้ำมันจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ และเมื่อทำการคัดเลือกต่อไปโดยอาศัยหลักการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมัน โดยจุลินทรีย์กลุ่มใดเจริญได้เร็วกว่าก็จะสามารถใช้น้ำมันดิบซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวได้เร็วกว่า ทำให้จุลินทรีย์ที่เจริญช้าไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ และถูกกำจัดออกไปในที่สุด (Ijah , 1998 ; Venkateswaran และ Harayama , 1995) พบกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้เร็วในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและมีปริมาณเชื้อสูงสุดจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในขั้นแรก 29 สายพันธุ์ ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์นี้ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ B3-1 C1-2 และ D2-1

เมื่อทำการจัดจำแนกสกุลของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 C1-2 และD2-1 ทางอนุกรมวิธานตามเกณฑ์การจัดจำแนกแบคทีเรียใน Bergey 's Mannual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ , 1994) และการจัดจำแนกยีสต์ (Barnett และ Pankhurst , 1974 ; Lodder , 1972) พบว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 แสดงลักษณะใกล้เคียงกับ *Bacillus circulans* และเมื่อยืนยันผลการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานด้วยการตรวจสอบลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA พบว่าลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* โดยมีความเหมือนกับ *Bacillus circulans* สายพันธุ์ BAC16SRRD คิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำข้อมูลลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus circulans* 2 สายพันธุ์จาก GenBank มาเทียบกันเองด้วยโปรแกรม Blast alignment ก็พบว่า มีความเหมือนกัน 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า แม้ว่าจะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus circulans* เหมือนกันก็อาจมีความแตกต่างกันในลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA จึงสรุปได้ว่า *Bacillus* sp.สายพันธุ์ B3-1 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. ส่วนจุลินทรีย์สายพันธุ์ C1-2 พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* ซึ่งจากผลการทดสอบมีลักษณะตรง

กับ *Pseudomonas alkaligenes* ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากรายงานว่า แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ (Mueller และคณะ , 1992 ; Venkateswaran และ Harayama , 1995 ; Nakamura และคณะ , 1996 ; Ijah , 1998) และสอดคล้องกับ Tongpubesra (1998) ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ M14-01 และ Sukhumavasi (1997) ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TISTR 984 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ดี พบว่า สามารถคัดแยก *Pseudomonas* sp. โดยใช้ไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน (Yamamoto และคณะ , 1995 ; Dagher และคณะ , 1997) และในส่วนของ จุลินทรีย์สายพันธุ์ D2-1 พบว่า เป็นยีสต์ในสกุล *Yarrowia* จากผลการทดสอบมีลักษณะใกล้เคียงกับ *Yarrowia lipolytica* ซึ่ง Venkateswaran และ Harayama (1995) รายงานว่า เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ จึงสรุปได้ว่า จุลินทรีย์ สายพันธุ์ D2-1 จัดอยู่ในสกุล *Yarrowia* sp.

น้ำมันดิบ Tapis ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีค่าความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) เท่ากับ 46.7 API สูงกว่า 45.3 API จึงจัดเป็นน้ำมันดิบชนิดเบา (light crude oil) ซึ่งประกอบไปด้วยอัลเคนไฮโดรคาร์บอนตั้งแต่ C10 - C30 ประมาณ 59.15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากข้อมูลน้ำมันดิบ Tapis ของบริษัทบางจาก (1990) แสดงให้เห็นว่า น้ำมันดิบ Tapis จะมีองค์ประกอบที่มีจุดเดือด (boiling point) ต่ำกว่า 149 ^{0}ซ ประมาณ 25.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งส่วนใหญ่องค์ประกอบในส่วนนี้ (C5 - C10) จะพบได้ในผลิตภัณฑ์น้ำมันเบนซิน ซึ่งจะระเหยไปได้ง่ายภายในระยะเวลาไม่นานเมื่อมีการเขย่า อันเป็นผลมาจากกระบวนการบางอย่าง ตัวอย่างเช่น ออกซิเดชันด้วยแสง (photooxidation) หลังจากนั้นองค์ประกอบส่วนที่เหลือจะเป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จุดเดือดสูง จำเป็นจะต้องกำจัดด้วยวิธีการอื่นๆ ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันส่วนที่เหลือ (biodegradation) ก็เป็นกระบวนการที่สำคัญกระบวนการหนึ่ง มีรายงานการทดลองของ Atlas (1981) และ Leathy และ Colwell (1990) และ Atlas และ Bartha (1992) พบว่า จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายอัลเคนไฮโดรคาร์บอน C10 – C26 และอะโรมาติคที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ตัวอย่างเช่น เบนซีน โทลูอีนและไซลีนได้ ส่วนไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อน (โครงสร้างที่มีกิ่ง , วง) ซึ่งย่อยสลายได้ยาก แต่ก็มีรายงานว่า จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายได้ (Wilson และ Bradley , 1996)

เนื่องจาก *Bacillus* sp. B3-1 สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเหลวลดลงอย่างช้าๆ แต่ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดยังมีค่าสูงกว่า 35 mN/m แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นมี

ประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้ไม่ดี (Cooper , 1986) และจากการทดลองพบว่า *Bacillus* sp. B3-1 สามารถย่อยสลายพริสเทน ซึ่งเป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันดิบได้ โดยพริสเทนจะถูกย่อยสลายไปได้ 60 เปอร์เซ็นต์ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานว่า *Bacillus* sp. ที่คัดแยกจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ โดยเฉพาะการย่อยสลายพริสเทน (Bossert และ Bartha , 1984 ; Sorkhoh และคณะ , 1993 ; Banat , 1995) และเมื่อทำการเลี้ยงต่อไปจนครบ 7 วัน พบว่าพริสเทนถูกย่อยสลายได้อีกเพียง 7 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า พริสเทนเป็นไฮโดรคาร์บอนที่ย่อยสลายได้ยาก เช่นเดียวกับที่ Atlas และ Cerniglia (1995) และ April และคณะ (1998) และ Ijah (1998) รายงานไว้ว่า พริสเทนเป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบที่ย่อยสลายได้ยาก

ความสามารถของ *Pseudomonas* sp. C1-2 ในการลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสังเกตจากค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้ไม่ดีนัก โดยค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงในช่วง 9 ชั่วโมงแรกหลังจากนั้นจะมีค่าสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังกล่าวมีความเสถียรต่ำ (Babu และคณะ , 1994 ; Cooper , 1986) หรืออาจเนื่องมาจากในช่วง 9 ชั่วโมงแรกเชื้อต้องการน้ำมันเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญจึงทำให้ต้องผลิตสารลดแรงตึงผิวเพื่อให้น้ำมันที่ลอยอยู่ลงมาเป็นอีมัลชั่น (emulsion) ทำให้ใช้ได้ง่ายขึ้น แต่เมื่อมีปริมาณคาร์บอนเพียงพอแล้วจึงหยุดผลิตสารลดแรงตึงผิว (Mattei และ Bertrand , 1985 ; Bruheim และคณะ , 1997) นอกจากนั้น *Pseudomonas* sp. C1-2 มีความสามารถในการย่อยสลายนอร์มอล – เตตระเดกเคนซึ่งจัดเป็นอัลเคนไฮโดรคาร์บอนที่พบอยู่ในน้ำมันดิบได้ด้วย (Walker และ Colwell , 1974 ; Nakamura และคณะ , 1996) จากการทดลองพบว่าปริมาณของนอร์มอล – เตตระเดกเคนถูกย่อยสลายได้ 80 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการทดลอง

ส่วน *Yarrowia* sp. D2-1 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ dioxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติค ตัวอย่างเช่น ฟีแนนทรีน (Harayama และคณะ , 1989 ; Dagher และคณะ , 1997) สอดคล้องกับผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า *Yarrowia* sp. D2-1 สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ โดยปริมาณของฟีแนนทรีนจะถูกย่อยสลายไปได้ 86 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ และ *Yarrowia* sp. D2-1 ยังมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำกว่า 35 mN/m ซึ่งจัดว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดี

(Cooper , 1986) การที่จุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ จะมีส่วนช่วยให้น้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอนผสมลงมาเป็นอีมัลชั่นได้มากขึ้น แต่ไม่จำเป็นว่าจุลินทรีย์ตัวนั้นจะต้องย่อยสลายน้ำมันได้ดีตามไปด้วย ดังนั้นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีส่วนช่วยให้การย่อยสลายดีขึ้น เมื่อเชื้อนั้นย่อยสลายน้ำมันได้ดี หรือ อาจช่วยให้เชื้อตัวอื่นที่อยู่ในระบบใช้น้ำมันได้ง่ายขึ้น เป็นการส่งเสริมกัน (synergism)

จากผลการทดลองและรายงานการวิจัยต่างๆ ข้างต้น แสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดิบได้แตกต่างกัน (Deziel และคณะ , 1996 ; Hanson และคณะ , 1997 ; Sugiura และคณะ , 1997) และเมื่อพิจารณาผลการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์พบว่า เมื่อทำการเลี้ยง *Bacillus* sp. C3-1 ในอาหารเหลวที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ เชื้อเจริญเติบโตได้รวดเร็วในวันที่ 1 หลังจากนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงจาก 7.0 เป็น 5.30 เป็นเหตุให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง เช่นเดียวกับการเจริญของ *Arthrobacter* sp. RAG-1 ที่ทำการศึกษาโดย Reisfeld และคณะ (1972) และสอดคล้องกับ Dibble และ Bartha (1979) และ Atlas (1984) ซึ่งรายงานว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญและย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.8 การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง เนื่องมาจากมีการผลิตกรดเกิดขึ้น (Wrenn และคณะ , 1994) จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียม (NH_4^+) ทำให้ปริมาณของแอมโมเนียมสูง ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง โดยแอมโมเนียมที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องโดยตรงกับกลไกการใช้แอมโมเนีย (NH_3) และปฏิกิริยา nitrification ซึ่งผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยานี้จะยับยั้งอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ (Zobell , 1946) ดังนั้นจึงพยายามควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการเติมบัฟเฟอร์ จากการทดลองที่ทำการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างพบว่า ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันของ *Bacillus* sp. C3-1 สูงกว่าภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง เนื่องจากเชื้อมีอัตราการเจริญสูงกว่า สอดคล้องกับ Tongpubesra (1998) รายงานว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าภาวะที่ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณของน้ำมันถูกย่อยสลายไปเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า *Bacillus* sp. B3-1 มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ และจากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อีกสองสายพันธุ์ จะเห็นว่า พีคของพริสเทนที่เหลืออยู่หลังจากการย่อยสลายของ *Bacillus* sp. B3-1 จะมีค่าต่ำกว่าจุลินทรีย์อีกสองสายพันธุ์ แสดงว่า *Bacillus* sp. B3-1 สามารถย่อยสลายพริสเทนได้ดีกว่าจุลินทรีย์อีกสองสายพันธุ์ที่คัดแยกได้เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4.7.2 *Pseudomonas* sp. C1-2 เป็นจุลินทรีย์อีกสายพันธุ์หนึ่งที่คัดแยกได้ ซึ่งจากผลการทดลอง

จะเห็นได้ว่า *Pseudomonas* sp. C1-2 มีความสามารถในการย่อยสลายนอร์มอล - เตตระเดกเคน ซึ่งเป็นอัลเคนไฮโดรคาร์บอนที่พบในน้ำมัน โดยปริมาณของนอร์มอล - เตตระเดกเคนจะลดลงอย่างรวดเร็วจนเหลือ 20 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 เช่นเดียวกับที่ Sorkhoh และคณะ (1995) รายงานว่า *Pseudomonas* spp. เจริญได้ดีในอัลเคนช่วง C14-C36 และเมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันพบว่า มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันได้ดีโดยปริมาณน้ำมันจะถูกย่อยสลายไปได้ 80 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่งานวิจัยของ Venkateswaran และ Harayama (1995) พบว่า *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้จากบริเวณที่มีน้ำมันปนเปื้อนสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและอะโรมาติคไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้ 50 เปอร์เซ็นต์ภายใน 7 วัน นอกจากนั้นยังมีรายงานการวิจัยของ Stone และคณะ (1942) และ Komukai และคณะ (1996) ที่พบว่า *Pseudomonas sp.* ที่คัดแยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนจะมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและ/หรือองค์ประกอบของน้ำมันได้ การที่ *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้อาจเนื่องจากมีเอนไซม์ออกซิเดชั่น (oxidation enzyme) เช่น เอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ในภาวะที่มีออกซิเจน หรือดีไฮโดรจิเนส (dehydrogenase) ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยจะเปลี่ยนอัลเคนเป็นกรดไขมัน (fatty acid) ขณะเดียวกันสามารถผลิต extracellular emulsifying activity ซึ่งช่วยให้น้ำมันกระจายตัวได้ดีขึ้น (Berg และคณะ , 1990)

Yarrowia sp. D2-1 ก็เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ เมื่อพิจารณาความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันพบว่า *Yarrowia* sp. D2-1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายนอร์มอล – เตตระเดกเคน พริสเทนและฟีแนนทรีนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบทั้งสิ้น (Rossini , 1960 ; Jobson และคณะ , 1972 ; Wilson และ Bradley , 1996) โดยเฉพาะฟีแนนทรีนซึ่งเป็นไฮโดรคาร์บอนที่ย่อยสลายได้ช้า (Nakamura และคณะ , 1996 ; April และคณะ , 1998) จากผลการทดลองที่ 4.4.1 และ 4.9.3 แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้อาจใช้กระบวนการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไดออกซีจีเนส (Mueller และคณะ , 1992) ส่วนประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ พบว่า *Yarrowia* sp. D2-1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันสูงกว่าจุลินทรีย์อีกสองสายพันธุ์ที่กล่าวข้างต้น โดยปริมาณน้ำมันที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วันมีค่าเท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *Yarrowia* sp. D2-1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของอาหารเหลว (ผลการทดลองข้อ 4.4.2) ทำให้น้ำมันกระจายตัวได้ดีขึ้นจุลินทรีย์จึงสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญได้ง่ายขึ้น และยังทำให้มีอัตรา

การเจริญสูงด้วย สอดคล้องกับประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่รายงานในจุลินทรีย์สกุล *Yarrowia* sp. เช่น การย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Yarrowia lipolytica* (Munk และคณะ , 1969 ; Pareilleux , 1979) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระหว่างการเจริญของ *Yarrowia lipolytica* ที่มีไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (Roy และคณะ , 1979) การย่อยสลายน้ำมันดิบโดย *Yarrowia lipolytica* ที่คัดแยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันดิบ (Venkateswaran และ Harayama , 1995)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ผสมกัน พบว่า มีอัตราการเจริญเติบโตและมีปริมาณเชื้อสูงกว่าจุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียว และปริมาณน้ำมันที่เหลือหลังจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ผสมมีค่าต่ำกว่าปริมาณน้ำมันที่เหลือหลังจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้ง 3 เพียงชนิดเดียว โดยมีค่าเท่ากับ 15.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้เร็วกว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว ทั้งนี้เพราะน้ำมันดิบประกอบไปด้วยองค์ประกอบหลายชนิด (Atlas , 1981) โดยจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ก็มีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันบางชนิดและน้ำมันดิบได้แตกต่างกัน และมีขีดจำกัดในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในขณะที่จุลินทรีย์ผสมมีความสามารถของเอนไซม์ต่างๆ ในช่วงกว้างที่จะใช้ในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่มีความซับซ้อนได้ (Leathy และคณะ , 1990) อีกทั้งยังผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ เพื่อช่วยให้น้ำมันกระจายตัวได้ดียิ่งขึ้น ทำให้จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญได้สะดวกและรวดเร็วขึ้นด้วย นอกจากนั้นการนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนได้แตกต่างกันมาผสมกันจะทำให้ความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนกว้างขึ้น (Lai และ Khanna , 1996) จากข้อมูลข้างต้นอาจกล่าวได้ว่า จุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายน้ำมันทำให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ผสมสูงกว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ สอดคล้องกับรายงานวิจัยหลายฉบับที่รายงานว่า กลุ่มประชากรจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงกว่าจุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียว (Nakamura และคณะ , 1996 ; Korda และคณะ , 1997 ; Aislabie และคณะ , 1998)

จุลินทรีย์ผสม ซึ่งประกอบไปด้วย *Bacillus* sp. B3-1 , *Pseudomonas* sp. C1-2 และ *Yarrowia* sp. D2-1 สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-

ด่าง 4.0 ถึง 8.0 โดยค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 8.0 เพราะจากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณของน้ำมันที่เหลือจากการย่อยสลายที่ค่าความเป็นกรด-ด่างท่ากับ 8.0 มีค่าต่ำสุดภายในระยะเวลา 5 วัน Dibble และ Bartha (1979) รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนอยู่ในดินมีค่าเท่ากับ 7.8 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญและการย่อยสลายแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันดิบ (Mulkins-Phillips และ Stewart , 1974 ; Atlas , 1975 ; Leathy และ Colwell , 1990) จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับงานวิจัยนี้คือ 20^{0}ซ ซึ่งจะทำให้อัตราการเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงขึ้น สาเหตุที่อัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 20^{0}ซ มีค่าสูงอาจเนื่องจากจุลินทรีย์ผสมมี *Yarrowia* sp. D2-1 *ซึ่งเป็นยีสต์*รวมอยู่ด้วย โดย Lodder (1972) และ Roy และคณะ (1979) รายงานว่า *Yarrowia* sp. เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20^{0}ซ ส่วนที่อุณหภูมิ 40 ^{0}ซ ปริมาณน้ำมันที่เหลือหลังจากการย่อยสลายจะมีค่าสูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความสามารถของจุลินทรีย์ต่ำลง เนื่องจากงานวิจัยนี้ทำการคัดแยกเชื้อที่ 30 ^{0}ซ แม้ว่าไฮโดรคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลต่ำๆ อาจระเหยไปได้ที่อุณหภูมิดังกล่าว แต่การทดลองโดยการเขย่าก็อาจทำให้น้ำมันระเหยไปได้เช่นเดียวกันกับผลของอุณหภูมิ (Sorkhoh และคณะ , 1993) ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมในงานวิจัยครั้งนี้คือ 250 รอบต่อนาที อาจเกี่ยวข้องกับปริมาณของออกซิเจน ซึ่ง Jobson และคณะ (1972) รายงานว่า ออกซิเจนมีส่วนสำคัญในปฏิกิริยาออกซิเดชันอะลิฟาติก (aliphatic) ไซคลิค (cyclic) และอะโรมาติค (aromatic) ไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ที่ใช้เอนไซม์ออกซีจีเนส (Cerniglia และคณะ , 1984 ; Singer และ Finnerty , 1984) Widdel (1988) รายงานว่า ปริมาณของออกซิเจนจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อน ดังนั้นปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีขึ้นเช่นกัน

ส่วนอัตราส่วนระหว่างจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวกับจุลินทรีย์ผสมที่เหมาะสมสำหรับงานวิจัยนี้ เมื่อพิจารณาปริมาณของน้ำมันที่เหลือหลังจากการย่อยสลายที่ภาวะดังกล่าว พบว่า ที่อัตราส่วน 4 ต่อ 1 มีค่าต่ำสุด แต่ก็ใกล้เคียงกับที่อัตราส่วน 2 ต่อ 1 (จึงเลือกอัตราส่วน 2 ต่อ 1 เพื่อลดปริมาณในการเตรียมหัวเชื้อให้น้อยลง) แสดงให้เห็นว่า การเติมจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปช่วยทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ผสมในงานวิจัยนี้สูงขึ้น อาจเป็นเพราะสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตขึ้นช่วยให้น้ำมันกระจายตัวผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เร็วและดีกว่าเดิมที่มีเพียงแต่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ผสมเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจุลินทรีย์ผสมจึงสามารถสัมผัสและใช้น้ำมันเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน

และพลังงานสำหรับการเจริญได้สูงสุด เช่นเดียวกับที่มีรายงานว่า การเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหรือการเติมจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันได้ดีขึ้น (Banat , 1995 ; Fu และ Alexander , 1995 ; Bruheim และคณะ , 1997 ; Rocha และ Infante , 1997)

การเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสมคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 อุณหภูมิ 20°ซ ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที และอัตราส่วนระหว่างจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ผสมที่สร้างขึ้นเท่ากับ 2:1 พบว่าจุลินทรีย์สามารถลดปริมาณของน้ำมันดิบให้เหลือ 10.0 เปอร์เซ็นต์ได้ภายใน 3 วัน ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่ามีความแตกต่างจากภาวะเดิม (ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 อุณหภูมิ 30°ซ ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที) ซึ่งมีปริมาณน้ำมันจะถูกย่อยสลายไปได้เท่ากับ 77.6 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน โดยผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญและการย่อยสลายดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

สำหรับการนำจุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้ในสิ่งแวดล้อมจริงอาจประสบปัญหาอันเนื่องมาจากปัจจัยบางประการ เช่น ปริมาณน้ำที่มาจากฝนทำให้เชื้อเจือจาง อุณหภูมิของน้ำที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากแสงแดด อาจจำเป็นจะต้องตรึงจุลินทรีย์ (Imobilized cell) เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถสัมผัสและอยู่ในบริเวณที่ปนเปื้อนให้ได้มากที่สุด (Omar และ Rehm , 1988 ; Omar และคณะ , 1990) ดังนั้นในการนำจุลินทรีย์ไปใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียขนาดใหญ่ หรือ บริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน จำเป็นจะต้องศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการนำไปใช้และช่วยให้สิ่งแวดล้อมดีขึ้น