# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำมันดีเซล คือ น้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล เป็นส่วนหนึ่งของน้ำมันดิบที่ได้จากโรงกลั่นน้ำมัน มีองค์ประกอบของสารหลายชนิด ซึ่งองค์ประกอบหลักของน้ำมันดีเซลนั้นประกอบด้วยส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว ประมาณ 80% และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนประมาณ 20% โดยเฉพาะสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันดีเซลผลจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์หรือการรั่วไหลจากเครื่องยนต์หรือแหล่งกักเก็บ อาจก่อให้เกิดมลพิษในอากาศ ดิน และน้ำ ปัญหาที่ตามมาคือด้านสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งนั้น รวมถึงปัญหาด้านสุขภาพของมนุษย์ เช่น โรคเกี่ยวกับระบบเลือดของหัวใจหรือปอด เป็นต้น (Blomberg และคณะ, 2005)

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ และอากาศ PAHs เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 2 หรือมากกว่า โดยมีการเรียงตัวเป็น มุมงอหรือเส้นตรง เป็นสารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากมีสมบัติก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือก่อมะเร็ง การปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมมักเกิดจากการกระทำของมนุษย์ เช่น จากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ อุตสาหกรรมผลิตสารเคลือบเนื้อไม้ โรงงานถ่านหิน หรือ จากการผลิตน้ำมันปิโตรเลียม หรือ ได้จากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ เช่น การเผาไม้ การเผาไหม้เชื้อเพลิงของเครื่องจักรกล หรือของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (Labana และคณะ, 2007)

วิธีการในการที่จะบำบัด น้ำมันดีเซลและPAHs ในสิ่งแวดล้อมนั้นสามารถทำได้โดยใช้วิธีการทางกายภาพ เช่น การดูดซับ การระเหย การสลายตัวโดยแสง หรือการใช้วิธีทางเคมี โดยการใช้สารเคมี (Lehto และคณะ, 2003) วิธีที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดวิธีหนึ่งคือ การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สิ่งมีชีวิตมาช่วยย่อยสลาย PAHs ในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานในการเจริญเติบโตได้ (Labana และคณะ, 2007) ในการใช้แบคทีเรียเพื่อบำบัดสารพิษนั้น จำเป็นต้องมีการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่จะใช้ในการบำบัด ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวจะต้องมีการเพาะเลี้ยงสดใหม่ทุกครั้ง ซึ่งไม่สะดวกในทางปฏิบัติจริง

ทำให้เสียเวลาในการเตรียมหัวเชื้อ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเชื้อหลายๆครั้งต่อเนื่องกัน อาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมดั้งเดิมของแบคทีเรีย (Kim และคณะ, 2002) ดังนั้นจึงควรมีวิธีการเก็บรักษาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารพิษไว้ใช้สำหรับการบำบัดสิ่งแวดล้อม เพื่อรักษาเชื้อให้มีสมบัติในการย่อยสลายสารต่างๆและอยู่รอดได้นานมากขึ้น วิธีที่นิยมใช้คือ ไลโอฟิไลเซชัน (Lyophilization) (Morgan และคณะ, 2006) โดยเก็บจุลินทรีย์ผสมกับสารป้องกันความเย็น (cryoprotectant) และนำไปแช่เยือกแข็ง หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยที่แข็งเข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง เพื่อระเหิดน้ำออกในสภาพสุญญากาศ วิธีดังกล่าวสามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้นานและยังมีสมบัติในการย่อยสลายสารต่างๆที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ (Tran และคณะ, 2007)

มีรายงานที่ใช้วิธีไลโอฟิไลเซชันโดยเลือกใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆในการเก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ รวมถึงเก็บรักษาเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ดังเช่น Norman และคณะ (1970) ได้ทดลองเก็บ *Mycoplasma* strains โดยเก็บในไนโตรเจนเหลวและวิธีไลโอฟิไลเซชัน ซึ่งใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น ทำให้มีการรอดชีวิตได้ดี เช่น *M. pneumonia* strain Mac มีการรอดชีวิต 100% เมื่อเก็บในไนโตรเจนเหลวและ 90% เมื่อเก็บโดยวิธีไลโอฟิไลเซชัน

Weekers และคณะ (1998) ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันดีเซลได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันดีเซลจำนวน 10 สายพันธุ์ ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชันทันที พบว่าสามารถเจริญได้โดยใช้ 1% น้ำมันดีเซล (หรือสารไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ) แบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชันยังคงความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้และเจริญได้ดี เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน

รายงานการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่ผ่านการไลโอฟิไลเซชัน เพื่อการบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม ยกตัวอย่างเช่น

Juhasz และคณะ (2005) บำบัดดินที่มีการปนเปื้อนสารเคลือบเนื้อไม้ที่มีความเข้มข้นของ PAHs สูงถึง 7767 ± 1286 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของ PAHs ทั้ง 16 ชนิดที่กำหนดโดย U.S.EPA โดยวิธีการเติมไนเตรตและฟอสเฟตเทียบกับการใช้ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ 1B ที่สามารถย่อย PAHs ได้ ที่เตรียมสดหรือผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง พบว่าหลังจาก 182 วันพบการลดลงจาก 7767 ± 1286 เหลือ 5579 ± 321 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2250 ± 71 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2050 ± 354 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 1950 ± 70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของชุดที่ไม่เติมอาหารและแบคทีเรีย ชุดที่เติมไนเตรต ชุดที่เติมแบคทีเรียที่เตรียมสด และชุดที่เติมแบคทีเรียที่ทำแห้งเยือกแข็ง ตามลำดับ และพบการย่อย

สลายของ PAHs ที่มวลโมเลกุลต่ำ 82% - 99% ส่วน PAHs ที่มวลโมเลกุลสูงมีการย่อยสลาย 33% - 81%.

Rojas และคณะ (2006) ทดลองเก็บรักษา *Pseudomonas putida* KT2440 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารที่เป็นมลพิษได้ โดยใช้ ทรีฮาโลส มอลโตส และ แลคโตส เป็นสารป้องกันความเย็น โดยใช้เซลล์ที่มีการเจริญอยู่ในช่วง stationary

กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากใบจามจุรี ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตรได้หมดภายในเวลา 14 วัน (จีรทีปฆ์ แสนรัก, 2547) และกลุ่มแบคทีเรีย PDE4 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เหลือเพียง 10.47% ในเวลา 14 วัน (ภัทราพร กวีสุทธิกุล, 2550)

ประภัสสร ปานมีทรัพย์ (2550) ได้ศึกษาการทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 พบว่าเมื่อทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จะรอดชีวิตมากถึง 99.54% และยังคงประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 0.05 กรัมต่อลิตรได้หมดในระยะเวลา 7 วันของการทดลอง และสามารถเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสได้นาน 6 เดือนและมีชีวิตรอด 83.38%

ในงานวิจัยครั้งนี้ จะทำไลโอฟิไลเซชันของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ PDE4 โดยใช้12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น จากนั้นจะใช้กลุ่มแบคทีเรียแบคทีเรีย RRM-V3 และ PDE4 ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชันเพื่อบำบัดไพรีน/ฟีแนนทรีน และน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดิน

### 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ PDE4 ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชันในการบำบัดทางชีวภาพดินที่ปนเปื้อนไพรีน/ฟีแนนทรีนและน้ำมันดีเซล

### 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ PDE4 ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชัน และยังคงประสิทธิภาพสูงในการบำบัดไพรีน/ฟีแนนทรีนและน้ำมันดีเซลในดิน