

การตรึง *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์เพื่อบำบัดน้ำปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

นางสาวชาลิณี คำชื่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

IMMOBILIZATION OF *Serratia* sp. W4-01 IN CHITOSAN - ACTIVATED CARBON BEADS
FOR DIESEL-CONTAMINATED WATER TREATMENT

Miss Chalinee Chamcheun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรึง <i>Serratia</i> sp. W4-01 ในเม็ดไคโตซาน-คาร์บอน กัมมันต์เพื่อบำบัดน้ำปนเปื้อนน้ำมันดีเซล
โดย	นางสาวชาลิณี จุ๋จิ้น
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิณฑูมาคง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หรรหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ฐนีย์วัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิณฑูมาคง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดิ์)

ชาลินี คำชื่น : การตรึง *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์เพื่อบำบัดน้ำปนเปื้อนน้ำมันดีเซล. (IMMOBILIZATION OF *Serratia* sp. W4-01 IN CHITOSAN-ACTIVATED CARBON BEADS FOR DIESEL-CONTAMINATED WATER TREATMENT) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร. อรุณทัย ภิญญาคง, 100 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรึงแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลในเม็ดไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ และตรวจสอบความสามารถของเซลล์ตรึงในการบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล โดยวัสดุตรึงไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์มีแนวโน้มจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซล เนื่องจากคาร์บอนกัมมันต์ช่วยดูดซับน้ำมันดีเซลไว้บางส่วน ในศึกษานี้ แบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ที่ซึ่งถูกคัดแยกก่อนหน้าจากดินหรือน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมถูกคัดกรองโดยการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล การผลิตสารลดแรงตึงผิว การเข้าถึงน้ำมันดีเซล และการมีเอ็นที่เกี่ยวข้อในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ผลการทดลองพบว่า *Serratia* sp. W4-01 แสดงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลและสามารถเกิดไฮโดรโฟบิกกับดีเซลได้สูงสุดที่สุด คือ 66 เปอร์เซ็นต์ และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ *Serratia* sp. W4-01 จึงถูกเลือกสำหรับใช้ในการตรึงต่อไป โดยเซลล์ตรึงซึ่งถูกเตรียมด้วยการผสมไคโตซานจากแกนหมึกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนกัมมันต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีการขึ้นรูปที่ดีที่สุดเมื่อพิจารณาจากลักษณะและความแข็งแรงของเม็ดเซลล์ตรึง เซลล์ตรึงของ *Serratia* sp. W4-01 แสดงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันได้เทียบเท่าเซลล์อิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ตรึงของ *Serratia* sp. W4-01 ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระดับความเข้มข้นน้ำมันเริ่มต้น 100 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 7 วัน รวมทั้งเซลล์ตรึงนี้สามารถนำมาใช้ซ้ำได้ถึง 12 รอบ แสดงให้เห็นว่า *Serratia* sp. W4-01 ที่ถูกตรึงในเม็ดไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ มีแนวโน้มที่จะประยุกต์ใช้กำจัดน้ำมันดีเซลในระบบบำบัดทางชีวภาพอย่างต่อเนื่องได้

ภาควิชาจุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....

ปีการศึกษา 2554.....

5272278623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : ACTIVATED CARBON / BIOREMEDIATION / CHITOSAN / DIESEL / IMMOBILIZATION

CHALINEE CHAMCHEUN : IMMOBILIZATION OF *Serratia* sp. W4-01 IN CHITOSAN-ACTIVATED CARBON BEADS FOR DIESEL-CONTAMINATED WATER TREATMENT. ADVISOR : ASST.PROF.ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D., 100 pp.

This study aimed to immobilize diesel-degrading bacteria in chitosan-activated carbon (AC) beads and examine the ability of immobilized cells for diesel-contaminated water treatment. The chitosan-AC beads tend to enhance the efficiency of the diesel removal since activated carbon can absorb some diesel. In this study, seven bacteria which were previously isolated from petroleum-contaminated soils and water were screened for their efficiency in diesel degradation, biosurfactant production, adhesion of cells to diesel and the presence of gene involving diesel degradation. As a result, *Serratia* sp. W4-01 showed the maximum efficiency of diesel degradation and adhesion of cells to diesel at approximately 66 and 81%, respectively thus *Serratia* sp. W4-01 was then selected for further immobilization. As of immobilization, the immobilized cells which were prepared by mixing of 2% of chitosan from squid pen and 1% of activated carbon showed the best gel-forming in term of bead shape and strength. The chitosan-AC immobilized cells of W4-01 showed comparable efficacy to degrade diesel to that of free cells. Furthermore, the chitosan-AC immobilized cells of W4-01 with bead's diameter of 3 mm could degrade more than 50% of initial diesel concentration between 100-400 mg/L within 7 days. Moreover, this immobilized cells could be reused for 12 cycles. These results indicated that the chitosan-AC immobilized cells of W4-01 showed tendency of using for continuous bioremediation system.

Department :Microbiology..... Student's Signature

Field of Study :Industrial Microbiology... Advisor's Signature

Academic Year : 2011.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณชัย ภิญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัยและการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน สมบูรณ์ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และรองศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดี เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย และหน่วยปฏิบัติการวิจัยบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆในงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำ ต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ร่วมรุ่นทุกคน และพี่ๆ น้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณปู่ คุณย่า คุณตาและคุณยาย รวมทั้งญาติพี่น้องทุกคนที่เป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมา รวมถึงคอยสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฏ
คำอธิบายลักษณะคำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ปริทรรศน์วรรณกรรม.....	5
2.1 น้ำมันดีเซลและการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม.....	5
2.2 ผลกระทบจากมลพิษและอันตรายจากน้ำมัน.....	6
2.3 การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยทางชีวภาพ.....	6
2.3.1 การเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน.....	7
2.3.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดย วิธีทางชีวภาพ.....	8
2.4 จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	8
2.4.1 ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	9
2.5 กระบวนการย่อยสลาย.....	10
2.5.1 วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย.....	10
2.5.2 วิธีการย่อยสลายไซโคลอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนโดย แบคทีเรีย.....	12
2.5.3 วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย.....	13
2.6 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน.....	15
2.7 การใช้เซลล์ตรึงเพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน.....	17
2.7.1 วิธีการตรึงเซลล์.....	18
2.7.2 วัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์.....	19
2.8 ไคโตซาน.....	22

สารบัญ

	หน้า
2.9 คาร์บอนกัมมันต์.....	23
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	24
อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
เคมีภัณฑ์.....	26
โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย.....	29
แบบที่เรียที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	32
3.1 คัดกรองแบบที่เรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	32
3.1.1 ทดสอบความสามารถการกำจัดน้ำมันดีเซลของแบบที่เรีย.....	32
3.1.2 ตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวของ แบบที่เรียเบื้องต้น.....	32
3.1.3 ตรวจสอบความสามารถในการเกิดไฮโดรโฟบิกของแบบที่เรีย.....	33
3.1.4 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการกำจัดน้ำมันดีเซลในแบบที่เรีย.....	34
3.2 ตรึงเซลล์แบบที่เรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	39
3.2.1 ขึ้นรูปเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์โดยแปรผันความเข้มข้น ของโคโคซานและชนิดโคโคซาน.....	39
3.2.2 ทดสอบความแข็งแรงของวัสดุตรึง.....	40
3.3 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงและการใช้ซ้ำในการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	39
3.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างของ องค์ประกอบภายในเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	39
3.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างของ ความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ในการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	39
3.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างของ ขนาดเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	39
3.3.4 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	40
3.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่มี การแปรผันความเข้มข้นของน้ำมัน.....	40

สารบัญ

	หน้า
3.3.6 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการใช้ซ้ำสำหรับการกำจัด น้ำมันดีเซล.....	41
3.4 สกัดน้ำมันและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค TLC-FID	41
3.4.1 สกัดน้ำมันจากตัวอย่าง.....	41
3.4.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลือโดยวิธี TLC-FLD	42
3.5 ตรวจสอบการมีอยู่ของเชื้อในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ โดยใช้ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM).....	42
3.6 ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ด้วยแสงเลเซอร์ (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM).....	42
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	44
4.1 การคัดกรองแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	44
4.1.1 ความสามารถการกำจัดน้ำมันดีเซลของแบคทีเรีย แต่ละสายพันธุ์.....	44
4.1.2 ความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวเบื้องต้นของ แบคทีเรีย.....	45
4.1.3 ลักษณะสมบัติการเกิดไฮโดรโฟบิกของแบคทีเรียแต่ละ สายพันธุ์.....	47
4.1.4 การมีอยู่ของยีนที่เกี่ยวข้องในการกำจัดน้ำมันดีเซลของ แบคทีเรีย.....	48
4.2 การตรึงเซลล์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	55
4.2.1 ลักษณะเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์โดยแปรผัน ความเข้มข้นของโคโคซานและชนิดโคโคซาน.....	55
4.2.2 ทดสอบความแข็งแรงของวัสดุตรึง.....	57

สารบัญ

	หน้า
4.3 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงและการใช้ซ้ำในการกำจัดน้ำมัน.....	59
4.3.1 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างขององค์ประกอบ ภายในเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	58
4.3.2 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างของความเข้มข้น คาร์บอนกัมมันต์ในการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	60
4.3.3 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างของขนาดเซลล์ตรึงใน การกำจัดน้ำมันดีเซล.....	61
4.3.4 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซล	62
4.3.5 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่แปรผัน ความเข้มข้นของน้ำมัน.....	64
4.3.6 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการใช้ซ้ำสำหรับการกำจัด น้ำมันดีเซล.....	65
4.4 การตรวจวิเคราะห์ <i>Serratia</i> sp. W4-01 ในเม็ดโคโตซาน- คาร์บอนกัมมันต์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	67
4.5 การมีชีวิตรอดของ <i>Serratia</i> sp. W4-01 ในเม็ดโคโตซาน- คาร์บอนกัมมันต์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์.....	68
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	70
บทที่ 6 ข้อเสนอแนะในงานวิจัย.....	78
รายการอ้างอิง.....	80
ภาคผนวก.....	90
ภาคผนวก ก.....	91
ภาคผนวก ข.....	93
ภาคผนวก ค.....	97
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	100

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ความเป็นพิษของไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิด.....	6
2.2	ตัวอย่างแบคทีเรียและประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	9
2.3	ตัวอย่างยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายแอลเคนในขั้นตอนแรก.....	16
2.4	ตัวอย่างเซลล์ตรึงที่มีการประยุกต์ใช้ในการกำจัดน้ำมัน.....	21
3.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rDNA.....	29
3.2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ยีนที่ประมวลรหัสแอลเคนไฮดรอกซิเลส.....	29
3.3	แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
4.1	ปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซล.....	45
4.2	ค่าแรงดึงผิวของอาหารเหลว CFMM ที่มีน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน หลังผ่านการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย นาน 7 วัน.....	46
4.3	ค่าการเกิดไฮโดรโฟบิกระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียกับเฮกซะเดคเคนและ น้ำมันดีเซล.....	47
4.4	การเพิ่มปริมาณยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลส.....	54
4.5	ลักษณะเม็ดและภาพเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ เมื่อแปรผันชนิดและ ความเข้มข้นของโคโคซาน.....	56
4.6	ความทนทานของเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ที่แปรผันชนิดและ ความเข้มข้นของโคโคซานต่อแรงกดโดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส.....	58

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	วิธีการย่อยสลายแอลเคนโดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน.....	11
2.2	วิธีการย่อยสลายไซโคลอะลิฟาติก (ไซโคลพาราฟิน).....	12
2.3	วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกโดยเอนไซม์ไดออกซีจีเนส.....	13
2.4	วิธีการย่อยสลายสารมัธยันตร์ (เคติคอล) ที่ได้จากอะโรมาติก ผ่านทางการแตกวงของออโธ (ortho) หรือ เมต้า (meta).....	14
2.5	วิธีการตรึงเซลล์.....	19
2.6	โครงสร้างทางเคมีของโคโคซาน.....	22
4.1	ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	44
4.2	ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ ALK2 ที่จำเพาะกับยีน <i>alkM</i>	49
4.3	ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ <i>alkB-1</i> ที่จำเพาะกับยีน <i>alkB</i>	50
4.4	ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ CYP153 ที่จำเพาะกับยีน CYP153.....	51
4.5	ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ <i>almA</i> ที่จำเพาะกับยีน <i>almA</i>	52
4.6	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงปริมาณ 3 กรัม ในอาหารเหลว CFMM เป็นเวลา 5 วัน.....	59
4.7	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อ ลิตรของเซลล์ตรึงที่มีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่แตกต่างกัน ปริมาณ 3 กรัม ในอาหารเหลว CFMM เป็นเวลา 5 วัน.....	61
4.8	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 200 และ 500 มิลลิกรัม ต่อลิตร ของเซลล์ตรึงที่มีขนาดเซลล์ตรึงแตกต่างกัน ปริมาณ 3 กรัม ในอาหารเหลว CFMM เป็นเวลา 5 วัน.....	62

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.9	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง ปริมาณ 5 กรัม ในอาหารเหลว CFMM ที่มีการเติมดีเซล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน.....	63
4.10	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง ปริมาณ 5 กรัม ในอาหารเหลว CFMM ที่มีความเข้มข้นน้ำมันดีเซล 600 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน.....	64
4.11	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง ปริมาณ 5 กรัม ในอาหารเหลว CFMM ที่มีความเข้มข้นน้ำมันดีเซลที่แปรผันความเข้มข้น บ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน.....	65
4.12	ประสิทธิภาพการใช้ซ้ำในการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง ปริมาณ 5 กรัม ในอาหารเหลว CFMM ที่มีความเข้มข้นน้ำมันดีเซลที่ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 วัน.....	66
4.13	น้ำหมักเซลล์ตรึงที่ใช้ในการกำจัดน้ำมันดีเซลในแต่ละรอบการใช้ซ้ำ.....	66
4.14	<i>Serratia</i> sp. W4-01 ที่ถูกตรึงในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ โดยใช้กล่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	67
4.15	การมีชีวิตของ <i>Serratia</i> sp. W4-01 ในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์.....	68

คำอธิบายลักษณะคำย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์
bp	=	base pairs
CFMM	=	Carbon Free Mineral Medium
CFU	=	colony forming unit
LB	=	Luria-Bertani
mN/M	=	มิลลินิวตันต่อเมตร
OD	=	Optical Density
TLC-FID	=	Thin Layer Chromatography with Flame Ionization Detection
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/volume

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันมีน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมันลงสู่แหล่งน้ำเป็นจำนวนมาก เนื่องจากน้ำมันถูกนำมาใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมและระบบคมนาคมขนส่ง ซึ่งกำลังมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องตามความเจริญของประเทศ โดยน้ำมันที่พบที่มีการปนเปื้อนมากได้แก่ น้ำมันดีเซล (กรมเจ้าท่า, 2552) โดยน้ำมันดีเซลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนอะตอม 10-25 อะตอม (Tobias และคณะ, 2001) ซึ่งประกอบด้วย แอลเคน 71.7% และอะโรแมติก 28.3% (Vendeuvre และคณะ, 2005) องค์ประกอบของน้ำมันดีเซลเหล่านี้ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมโดยก่อให้เกิดความเป็นพิษแก่ระบบอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ระบบประสาท ปอด หัวใจ ทางเดินอาหาร ตับ ไตและระบบทางโลหิตวิทยา (Levine, 2009) จากความเป็นพิษของน้ำมันดังกล่าวมาทำให้กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม (2539) ได้กำหนดค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของโรงงานหรือนิคมอุตสาหกรรมไม่ให้มีน้ำมันและไขมันเกิน 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นโรงงานอุตสาหกรรมที่มีน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมัน เช่น โรงงานเกี่ยวกับโลหะ โรงกลั่นน้ำมัน หรือโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ (วิวัฒน์ เอกบูรณะวัฒน์, 2553) รวมทั้งสถานบริการน้ำมันที่มีน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมัน (Panpanit และคณะ, 2001) จำเป็นต้องบำบัดน้ำมันเหล่านั้นให้ต่ำกว่ามาตรฐานที่กำหนดก่อนปล่อยทิ้งสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

วิธีการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันที่น่าสนใจได้แก่ การใช้วิธีการทางชีวภาพ ซึ่งเป็นการใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารพิษ และเปลี่ยนสารพิษนั้นให้มีความเป็นพิษน้อยลง ทั้งนี้การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดสารพิษมีประสิทธิภาพสูง มีความปลอดภัยสูง ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม และมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำ (Chatterjee และคณะ, 2008)

คุณสมบัติที่ดีของจุลินทรีย์ที่ช่วยเพิ่มการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน ได้แก่ ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิว การเกิดอิมัลชัน การเกิดไฮโดรโฟบิกกับน้ำมัน เป็นต้น (Ron และ Rosenberg, 2002) เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวจะช่วยเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ในการนำน้ำมันไปใช้ และช่วยก่อให้เกิดอิมัลชันบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นน้ำกับน้ำมันซึ่งจะช่วยเพิ่มพื้นที่การสัมผัสระหว่างน้ำมันกับจุลินทรีย์ ส่วนการเกิดไฮโดรโฟบิกระหว่างผนังเซลล์กับน้ำมัน จะช่วยเพิ่มความสามารถในการนำน้ำมันเข้าใกล้จุลินทรีย์ได้ดี (Rosenberg และ Ron, 2001; Aparna และคณะ, 2011) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสามารถเกิดไฮโดรโฟบิกได้ดีเพื่อช่วยส่งเสริมความสามารถในการย่อยสลาย

น้ำมันให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ตัวอย่างงานวิจัยของ Ganesh และ Lin (2009) ได้รายงานถึงแบคทีเรียแกรมบวก *Paenibacillus* sp. ที่มีความสามารถในการก่อเกิดอิมัลชันสูงซึ่งช่วยให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1% (v/v) ได้ประมาณ 75% ภายใน 20 วัน

แบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมได้โดยขั้นแรกเป็นการย่อยสลายแอลเคนซึ่งจะถูกย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ตำแหน่งปลาย จากนั้นจะถูกออกซิไดซ์ต่อจนในที่สุดจะได้เป็นกรดไขมันแล้วเข้าสู่วัฏจักรเบตาออกซิเดชัน (β – oxidation cycle) (Beilen และคณะ, 2003) จากปฏิกิริยาดังกล่าวมีเอนไซม์ที่สำคัญคือ แอลเคนไฮดรอกซิเลส ซึ่งมีเอนไซม์ที่ประมวลรหัสการสร้างเอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลสหลายกลุ่ม ได้แก่ ยีน *alkB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 5 – 16 อะตอม (Smith และคณะ, 2002) ยีน *alkB1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีกิ่งสาขา ยีน *alkM* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 12 อะตอมขึ้นไป (Kohno และคณะ, 2002) ยีน CYP153 เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 8 – 16 อะตอม และยีน *almA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 22-36 อะตอม (Liu และคณะ, 2011) ซึ่งข้อมูลของยีนเหล่านี้มีประโยชน์ในหลายด้าน เช่น สามารถใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการตรวจติดตามแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายแอลเคนได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sei และคณะ 2003 ที่มีรายงานการใช้ยีน *alk* ในการตรวจติดตามจำนวนประชากรของแบคทีเรียในระหว่างการย่อยสลายแอลเคน

การใช้เซลล์อิสระเพื่อบำบัดสารพิษมีประสิทธิภาพดี แต่เนื่องจากการใช้เซลล์อิสระมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น จุลินทรีย์ถูกยับยั้งจากความเป็นพิษของสภาวะที่บำบัด รวมทั้งไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ วิธีการแก้ปัญหาดังกล่าว ทำได้โดยการตรึงเซลล์ ซึ่งจะช่วยเพิ่มความทนทานของเซลล์ ป้องกันไม่ให้เซลล์รั่วไหลออกจากระบบ และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง (Atsuo และ Takuo, 1999) การตรึงเซลล์เป็นการนำแบคทีเรียมายึดตรึงไว้กับวัสดุวิธีหนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายคือ การกักขัง (Entrapment) เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถตรึงเซลล์ให้อยู่ได้อย่างอิสระแต่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่เท่านั้น ทำให้แบคทีเรียยังคงมีประสิทธิภาพที่ดี (Song และคณะ, 2005) สำหรับวัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์มีหลายชนิดที่น่าสนใจคือ ไคโตซาน เนื่องจากเป็นวัสดุธรรมชาติที่ได้จากของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และราคาไม่แพง รวมทั้งสามารถเกิดเจลได้เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะกรด (Barreto และคณะ, 2010) นอกจากนี้ยังมีคาร์บอนกัมมันต์ที่นิยมใช้เป็นตัวร่วมในการตรึงแบคทีเรียเพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษ เนื่องจากมีคุณสมบัติคือ สามารถดูดซับสารพิษได้ รวมทั้งการที่มีรูพรุนและพื้นที่

ผิวมากทำให้สามารถดูดซับสารพิษได้มากด้วย (Zhao และคณะ, 2008) แต่การเติมคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วมในปริมาณที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้โครงสร้างของเซลล์ตรึงถูกทำลาย ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการใช้คาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วมในการตรึงแบคทีเรียของ Kwon และคณะ (2009) พบว่ามีการใช้คาร์บอนกัมมันต์ 1% (w/v) ร่วมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และแซนแทนกัมในการตรึงเซลล์ *Pseudomonas fluorescence* 417 เพื่อใช้บำบัดน้ำที่ปนเปื้อนฟีนอลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 300 ppm ได้ภายในระยะเวลา 110 ชั่วโมง ซึ่งรวดเร็วกว่าเซลล์ตรึงที่ปราศจากการใช้คาร์บอนกัมมันต์ร่วมในการตรึง อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นปริมาณคาร์บอนกัมมันต์เป็น 3% (w/v) จะทำให้ความแข็งแรงของเม็ดเซลล์ตรึงลดลง นอกจากนี้ขนาดเซลล์ตรึงซึ่งมีผลต่อพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเซลล์ตรึงกับสารที่ต้องการบำบัด อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการบำบัดสารนั้น (Sarma และคณะ, 2011)

งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะตรึงเซลล์ในเม็ดโคโคโตซานที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วม ซึ่งคัดกรองแบคทีเรียโดยใช้คุณสมบัติที่ได้กล่าวข้างต้นมาพิจารณา เพื่อผลิตเซลล์ตรึงที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำมันดีเซล โดยคัดกรองแบคทีเรียที่คัดแยกได้ก่อนหน้านี้ ได้แก่ *Acinetobacter* sp. R2 ที่มีความสามารถในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นได้ 78 % จากความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ppm ภายใน 18 ชั่วโมง และยังตรวจพบยีน *alkM* ด้วย (สิทธิ ทาทอง, 2550) *Rhodococcus* sp. W2-01 และ *Serratia* sp. W4-01 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม (วัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศรี, 2553) และเนื่องจากองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลมีอะโรแมติกอยู่มาก จึงคาดว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรแมติกไฮโดรคาร์บอนได้ น่าจะมีแนวโน้มที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ด้วย ดังนั้นจึงสนใจคัดกรองแบคทีเรียดังต่อไปนี้เพื่อดูความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ได้แก่ *Sphingobium* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003) *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 (Klankeo และคณะ, 2009) และ *Novosphingobium* sp. PCY (พรหมจักร เจริญพัฒน์, 2551) ซึ่งสามารถย่อยสลายพีแนทรีน ไพรีน และฟลูออแรนธิน นอกจากนี้ยังมี *Sphingomonas* sp. A4 ซึ่งสามารถย่อยอะซีแนพรีนและอะซีแนพรีนได้ (Komatsu, 1993 และ Pinyakong และคณะ, 2004) โดยเมื่อคัดกรองแบคทีเรียได้ 1 สายพันธุ์แล้ว งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการตรึงเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลดังกล่าว ไว้ในเม็ดโคโคโตซานที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วม โดยแปรผันชนิดและความเข้มข้นของโคโคโตซาน นอกจากนี้ยังแปรผันปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนกัมมันต์ที่ใช้เป็นตัวร่วมในวัสดุตรึง ขนาดเซลล์ตรึง และความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซล รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงด้วย

วัตถุประสงค์

ตั้งแบบคที่เรียในเม็ดไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์และทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัด
น้ำปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบบคที่เรียที่ถูกตั้งในเม็ดไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์และทราบประสิทธิภาพเซลล์ตั้ง
ในการบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 น้ำมันดีเซลและการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันประเทศที่มีการพัฒนาระบบอุตสาหกรรมและระบบคมนาคมขนส่งอย่างต่อเนื่อง มีความจำเป็นต้องใช้พลังงานเชื้อเพลิงขับเคลื่อนระบบเหล่านี้ พลังงานเชื้อเพลิงที่นิยมใช้คือ น้ำมันดีเซล น้ำมันดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์เชื้อเพลิงที่ได้จากการกลั่นลำดับส่วนของน้ำมันดิบโดยให้ความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 150 – 400 องศาเซลเซียส (Vendeuvre และคณะ, 2005) น้ำมันดีเซลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนอะตอม 10-25 อะตอม (Tobias และคณะ, 2001) ซึ่งประกอบด้วย แอลเคน ได้แก่ อะลิฟาติกแอลเคน (พาราฟิน) และไซโคล แอลเคน (แนฟทีน) ประมาณ 71.7% และอะโรแมติกประมาณ 28.3% (Vendeuvre และคณะ, 2005) น้ำมันดีเซลที่ใช้ในการขับเคลื่อนเครื่องยนต์และให้ความร้อนแก่เครื่องจักรสำหรับโรงงานอุตสาหกรรม สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทคือ น้ำมันดีเซลหมุนเร็ว (Automotive Diesel oil หรือ Gas Oil) จำพวกน้ำมันโซล่า และน้ำมันดีเซลหมุนช้า (Industrial Diesel Oil) หรือน้ำมันซีดี ซึ่งทั้งสองประเภทมีคุณภาพแตกต่างกัน ดังนั้นต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องยนต์ดีเซล ซึ่งเครื่องยนต์มีหลายขนาด (ปราโมทย์ ปราโมชย์ ไชยเวท และนุรักษ์ กฤษดานุรักษ์, 2543) อาจแบ่งได้เป็น

- ชนิดรอบต่ำ คือน้อยกว่า 300 รอบต่อนาที ใช้สำหรับงานหนักต่อเนื่องโดยมีรอบคงที่ เช่น การขับเคลื่อนเรือเดินทะเล การผลิตไฟฟ้า เป็นต้น
- ชนิดรอบปานกลาง คือระหว่าง 300- 1,000 รอบต่อนาที ใช้สำหรับงานที่ค่อนข้างหนัก และรอบค่อนข้างคงที่ เช่น สถานีผลิตไฟฟ้า สถานีสูบน้ำ เป็นต้น
- ชนิดรอบสูง คือตั้งแต่ 1,000 รอบต่อนาทีขึ้นไป ใช้สำหรับงานที่มีความเปลี่ยนแปลงบ่อยๆ และความเร็วเปลี่ยนแปลงไปมา เช่น รถขนส่ง รถบรรทุก และรถไฟ

เนื่องจากเครื่องยนต์ดีเซลมีประสิทธิภาพมากกว่าเครื่องยนต์เบนซิน และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณที่ต่ำกว่า รวมทั้งมีราคาถูกกว่าเครื่องยนต์เบนซิน ทำให้มีความนิยมใช้เครื่องยนต์ดีเซลมากกว่าเครื่องยนต์เบนซิน (Song, 2000) ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซลสู่สิ่งแวดล้อมได้มากกว่าโรงงานที่ใช้เครื่องยนต์ดีเซล เช่น สถานีสูบน้ำ สถานีผลิตไฟฟ้า โรงงานเกี่ยวกับโลหะ โรงกลั่นน้ำมัน หรือโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ (วิวัฒน์ เอกบูรณะวัฒน์, 2553) รวมทั้งสถานีบริการน้ำมันที่ใช้น้ำเสียปนเปื้อนน้ำมัน (Panpanit และคณะ, 2001)

2.2 ผลกระทบจากมลพิษและอันตรายจากน้ำมัน

ระดับความอันตรายของมลพิษจากน้ำมันขึ้นอยู่กับ ชนิดและของน้ำมันที่ปนเปื้อน การแพร่กระจายของคราบน้ำมัน การตกตะกอนของน้ำมัน และระยะเวลาที่น้ำมันตกค้างความเป็นพิษ แบ่งได้เป็นทั้งพิษเฉียบพลัน (Acute Effect) หมายถึง ความเป็นพิษภายในระยะเวลาอันสั้นหรือพิษเรื้อรัง (Chronic Effect) หมายถึง ความเป็นพิษสะสมที่ละน้อยในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ทำให้ชีวิตสั้นลง (สุวัจน์ ธีภทรส, 2549) เนื่องจากน้ำมันดีเซลเป็นสารประกอบของไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด ซึ่งไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิดมีความเป็นพิษแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 คือ ตารางที่ 2.1 ความเป็นพิษของไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิด

ชนิดของไฮโดรคาร์บอน	ความเป็นพิษ
ไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว : ออกเทน เพนเทน เป็นต้น	ทำให้ระคายเคืองเยื่อจมูก ผิวหนัง ตา
ไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัว : เอทิลีน โพรพิลีน เป็นต้น	ไม่มีพิษเฉียบพลันหากได้รับต่ำกว่า 31,000 rpm แต่มีพิษเรื้อรังคือ กดระบบประสาทส่วนกลาง ทำลายตับไต และเลือด
อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน : เบนซีน, โทลูอีน เป็นต้น	ทำให้ระคายเคืองระบบหายใจ ตาและผิวหนัง มีผลต่อหัวใจ ทำให้เบื่ออาหาร คลื่นไส้ โลหิตจาง เลือดจับตัวเป็นก้อน เส้นโลหิตแตก รวมทั้งยังเป็นสารก่อมะเร็ง
พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ● น้ำหนักโมเลกุลต่ำได้แก่ แนฟทาลีน ● น้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ ไพรีน	เป็นพิษเฉียบพลันทำให้ระคายเคืองผิวหนัง ตา เมื่อสูดดมเจ็บคอ ไอ ปวดศีรษะ แต่ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง เป็นพิษเรื้อรังคือ สามารถก่อมะเร็งแก่อวัยวะได้

ที่มา: ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์, กรมควบคุมมลพิษ

2.3 การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยทางชีวภาพ

เนื่องจากผลกระทบความเป็นพิษและความอันตรายของน้ำมันในสิ่งแวดล้อมดังที่กล่าวข้างต้น ทำให้มีการบัญญัติเป็นพระราชบัญญัติกฎหมายและมาตรฐานเกี่ยวกับการควบคุมมลพิษ กำหนดให้ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของโรงงานหรือนิคมอุตสาหกรรมไม่ให้มีน้ำมันและไขมันเกิน 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การบำบัดน้ำมันทางชีวภาพ เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (Natural attenuation) แต่อาจเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และมีการย่อยสลายต่ำ (อลิสซา วังโน, 2550) ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมัน ลักษณะการแพร่กระจาย สภาพสิ่งแวดล้อมที่ถูกปนเปื้อนด้วยน้ำมันแต่จากความ เป็นพิษของน้ำมันที่ส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมทำให้จึงต้องมีการกำจัดน้ำมันออกจากธรรมชาติอย่าง เร่งด่วนเพื่อให้ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมน้อยที่สุด

2.3.1 การเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน

สามารถทำได้ 2 วิธีการหลัก (Venosa และ Zhu, 2003) คือ

2.3.1.1 การบำบัดน้ำมันโดยการกระตุ้นทางชีวภาพ (Biostimulation) เป็นการเพิ่ม สารอาหารที่เหมาะสม เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม สารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ และ การปรับสภาพให้มีความเหมาะสมอาจรวมถึงการให้อากาศ เป็นต้น เพื่อเร่งกระบวนการย่อย สลายสารให้เกิดได้รวดเร็วขึ้น

Singh และ Lin (2009) รายงานการศึกษาการบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล ความเข้มข้น 10% พบว่าดินที่มีการเติมปุ๋ยจะช่วยกระตุ้นอัตราการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของจุลินทรีย์ท้องถิ่น ได้ดีกว่าดินที่ปราศจากการเติมปุ๋ย ทั้งนี้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลยังขึ้นอยู่กับชนิด ของดิน สารอาหาร และประชากรจุลินทรีย์บริเวณที่มีการปนเปื้อน

2.3.1.2 การเติมจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำมัน (Bioaugmentation) เป็นการเติมสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ลงไปยังบริเวณที่ต้องการบำบัดสารนั้น การที่เติมจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย น้ำมันเป็นการช่วยเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์ไปยังบริเวณที่มีการปนเปื้อน ทำให้การย่อยสลาย เกิดได้รวดเร็วขึ้น

จากรายงานการวิจัยของ Das และ Mukherjee (2006) พบว่า ภายใน 120 วัน ชุดการ ทดลองที่มีการเติม *Bacillus subtilis* DM-04 มีปริมาณน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนลดลงจาก 84 กรัมต่อกิโลกรัมของดิน เหลือ 21 กรัมต่อกิโลกรัมของดิน ซึ่งลดลงมากกว่าชุดควบคุมที่ ปราศจากการเติมแบคทีเรียที่ยังคงเหลือน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอยู่ 80 กรัมต่อกิโลกรัม ของดิน

2.3.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีทางชีวภาพ

การกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับปัจจัย ในการบำบัด (Okoh, 2006; Chatterjee และคณะ, 2008) ได้แก่

- องค์ประกอบของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ขึ้นอยู่กับโครงสร้าง ปริมาณความเข้มข้น ความสามารถในการละลายน้ำ และความเป็นพิษของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน
- ปฏิกริยาทางกายภาพ เช่น การกวน การดูดซับ และการแพร่กระจายของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน
- สภาพอากาศ เช่น อุณหภูมิซึ่งส่งผลต่อการระเหยของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน
- สารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือเหล็ก เป็นต้น
- จุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยสลาย จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และความสามารถในการผลิตสารเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ เช่น การผลิตสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น

2.4 จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซล

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ มีหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Marchal และคณะ, 2003) แต่เนื่องจากแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้มากและมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายชั้นปฐมภูมิในการย่อยสลายน้ำมัน (Das และ Chandran, 2011) ทำให้แบคทีเรียจึงเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมเพื่อใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตัวอย่างรายงานการวิจัยการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลโดยวิธีทางชีวภาพ เช่น Wongsu และคณะ (2004) รายงานการแยกเชื้อจากบริเวณเกาะฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งสามารถแยกได้ 2 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas aeruginosa* WatG และ *Serratia marcescens* HokM ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันก๊าด และน้ำมันหล่อลื่น พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* WatG สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ได้มากที่สุดคือ 95 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2 สัปดาห์

รายงานการวิจัยของ Kalme และคณะ (2008) พบว่า *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 112 และ *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386 สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 10% (v/v) ได้ 95 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 สัปดาห์

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างแบคทีเรียและประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

แบคทีเรีย	ปริมาณสารตั้งต้น	อัตรา การย่อยสลาย	อ้างอิง
<i>Pseudomonas desmolyticum</i> NCIM 2112 และ	น้ำมันดีเซล 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v)	95 เปอร์เซ็นต์ ใน 7 สัปดาห์	Kalme และคณะ, 2008
<i>Nocardia hydrocarbonoxydans</i> NCIM 2386		98 เปอร์เซ็นต์ ใน 7 สัปดาห์	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WatG	น้ำมันดีเซล 10 กรัมต่อลิตร	90 เปอร์เซ็นต์ ใน 2 สัปดาห์	Wongsa และคณะ, 2004
<i>Serratia marcescens</i> HokM		67 เปอร์เซ็นต์ ใน 2 สัปดาห์	
<i>Bacillus pumilus</i> JLB	น้ำมันดีเซล 10 เปอร์เซ็นต์ (v/w)	85 เปอร์เซ็นต์ ใน 65 วัน	Singh และคณะ, 2010
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> LT1		79 เปอร์เซ็นต์ ใน 65 วัน	
<i>Rhodococcus erythropolis</i> T7-2	น้ำมันดีเซล 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v)	75 เปอร์เซ็นต์ ใน 7 วัน	Huang และคณะ, 2008

2.4.1 ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมัน

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ จำเป็นต้องมีลักษณะพิเศษบางประการเพื่อช่วยสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรีย โดยทำให้แบคทีเรียสัมผัสน้ำมันได้มากขึ้น แบคทีเรียจึงสามารถนำน้ำมันไปใช้ในการเจริญได้ (Ron และ Rosenberg, 2002) ลักษณะสมบัติพิเศษของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมัน ได้แก่

2.4.1.1 การสร้างสารลดแรงตึงผิว (biosurfactant) สามารถช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างชั้นน้ำกับน้ำมัน เพิ่มการละลายน้ำของน้ำมัน นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังก่อให้เกิดอิมัลชันบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นน้ำกับน้ำมัน ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของแบคทีเรียกับน้ำมัน ทำให้ช่วยเพิ่มความสามารถของแบคทีเรียในการนำน้ำมันไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้มากขึ้น (Rosenberg และ Ron, 2001; Das และ Chandran, 2011)

ตัวอย่างงานวิจัยของ Aparna และคณะ (2011) ได้รายงานถึง *Pseudomonas* sps. ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวและสามารถเกิดอิมัลชันได้ นอกจากนี้เมื่อนำสารลดแรง

ตั้งผิวที่ผลิตได้เพิ่มไปในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 1% (v/v) พบว่า ภายใน 21 วัน ชุดการทดลองที่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas* sps. สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 87 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดการทดลองที่เติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์คือ โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (SDS) ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 42 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้

2.4.1.2 การเกิดไฮโดรโฟบิกกับน้ำมัน (hydrophobicity) เซลล์ที่เกิดไฮโดรโฟบิกได้สูงจะสามารถเข้าถึงน้ำมันได้ดี ซึ่งทำให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันได้ดี นอกจากนี้การเกิดไฮโดรโฟบิกยังช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์และการก่อไบโอฟิล์ม (Panagoda และคณะ, 2001)

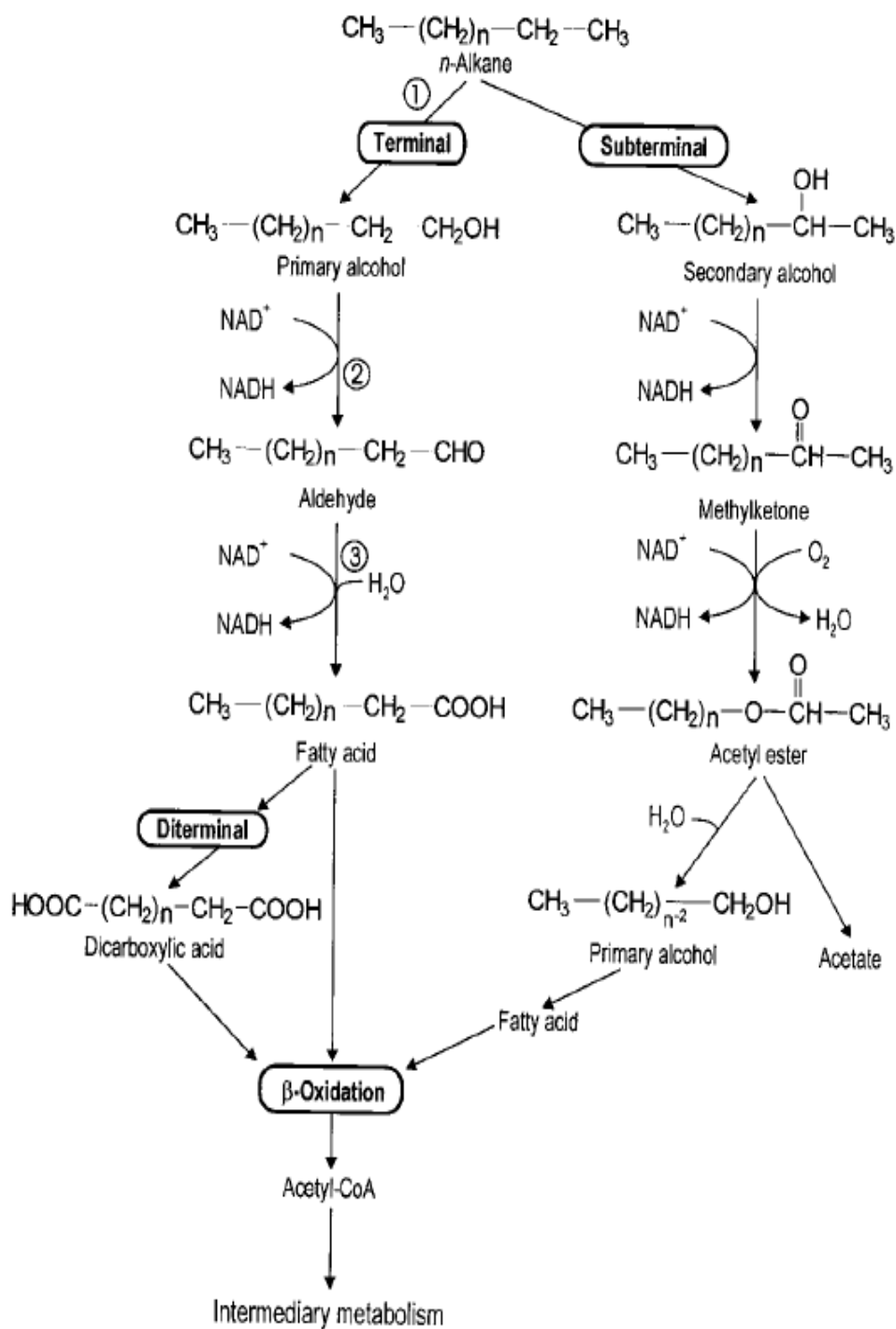
จากรายงานการวิจัยของ Vyas และ Dave (2011) พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 28 วัน *Nocardia otitidiscaviarum* 6471 สามารถเกิดไฮโดรโฟบิกกับน้ำมันดิบได้สูงสุดคือ 83 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบได้สูงที่สุดด้วย เมื่อเทียบกับระยะเวลาอื่น แสดงว่าการเกิดไฮโดรโฟบิกที่สูงขึ้นสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการที่เซลล์สามารถเข้าถึงน้ำมันดิบได้มากขึ้น

2.5 กระบวนการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

น้ำมันดีเซลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งประกอบด้วย อะลิฟาติก ไซโคลอะลิฟาติก และอะโรมาติกทั้งที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กและมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ วิธีการย่อยสลายจึงมีความแตกต่างกัน (Fritsche และ Hofrichiter, 2000) ดังนี้

2.5.1 วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย

แอลเคนสายสั้นหรือพวกที่มีโครงสร้างน้อยกว่า C_9 จะสามารถระเหยออกไปได้ส่วนแอลเคนสายยาว ($C_{10} - C_{24}$) เกิดการย่อยสลายได้ 2 ทางคือ ที่ตำแหน่งปลาย (terminal) และตำแหน่งถัดจากปลาย (subterminal) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยเอนไซม์แอลเคนโมโนออกซิจีเนส ซึ่งการย่อยที่ตำแหน่งปลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ จากนั้นแอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนสมาออกซิไดซ์ได้แอลดีไฮด์ แล้วถูกออกซิไดซ์ต่อด้วยแอลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส ได้เป็นกรดไขมันแล้วเข้าสู่ปฏิกิริยาเบต้า-ออกซิเดชัน ส่วนการย่อยสลายที่ตำแหน่งถัดจากปลายเริ่มจากแอลเคนถูกออกซิไดซ์ได้เป็นแอลกอฮอล์ทุติยภูมิซึ่งถูกออกซิไดซ์ต่อเป็นเมทิลคีโตน และอะซิทิล เอสเทอร์ตามลำดับ จากนั้นจะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์เอสเทอร์เรสได้สาร 2 ชนิด คือแอลกอฮอล์ปฐมภูมิและอะซิเตท ดังรูปที่ 2.1

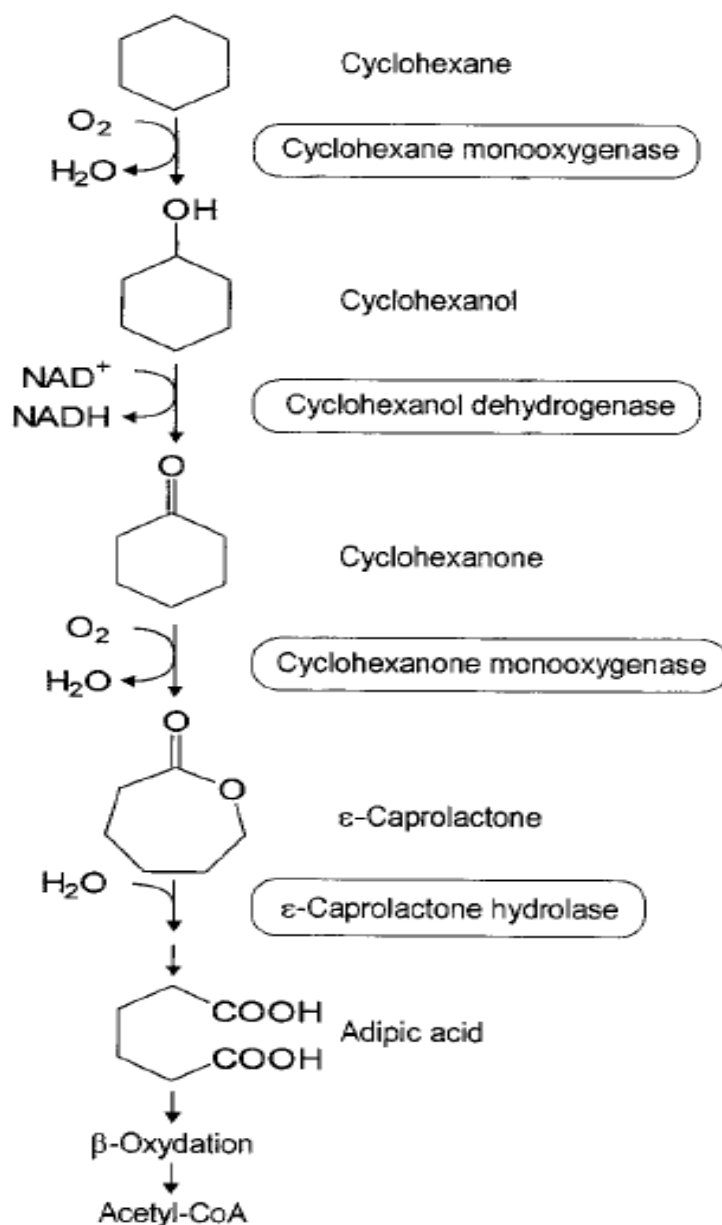


รูปที่ 2.1 วิธีกราย่อยสลายแอลเคนโดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Fritsche และ Hofrichter, 2000)

① แอลเคนโมโนออกซิเจเนส, ② แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และ ③ แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส

2.5.2 วิธีการย่อยสลายไซโคลอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย

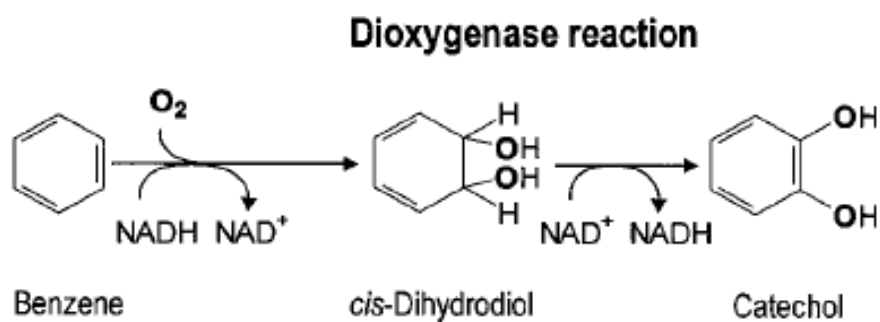
เริ่มจากไซโคลเฮกเซนถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ไซโคลเฮกเซนโมโนออกซิจีเนสได้เป็นไซโคลเฮกซานอล จากนั้นเอนไซม์ไซโคลเฮกซานอลดีไฮโดรจีเนสมาเปลี่ยนเป็นไซโคลเฮกซาโนนซึ่งเอนไซม์ไซโคลเฮกซาโนนโมโนออกซิจีเนสมาเปลี่ยนได้เป็นคาโพรแลคโตน และถูกไฮโดรไลซ์ด้วยคาโพรแลคโตนไฮโดรเลสได้เป็นกรดอะดิคิกเข้าสู่ปฏิกิริยาเบต้า-ออกซิเดชัน ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วิธีการย่อยสลายไซโคลอะลิฟาติก (ไซโคลพาราฟิน) (Fritsche และ Hofrichiter, 2000)

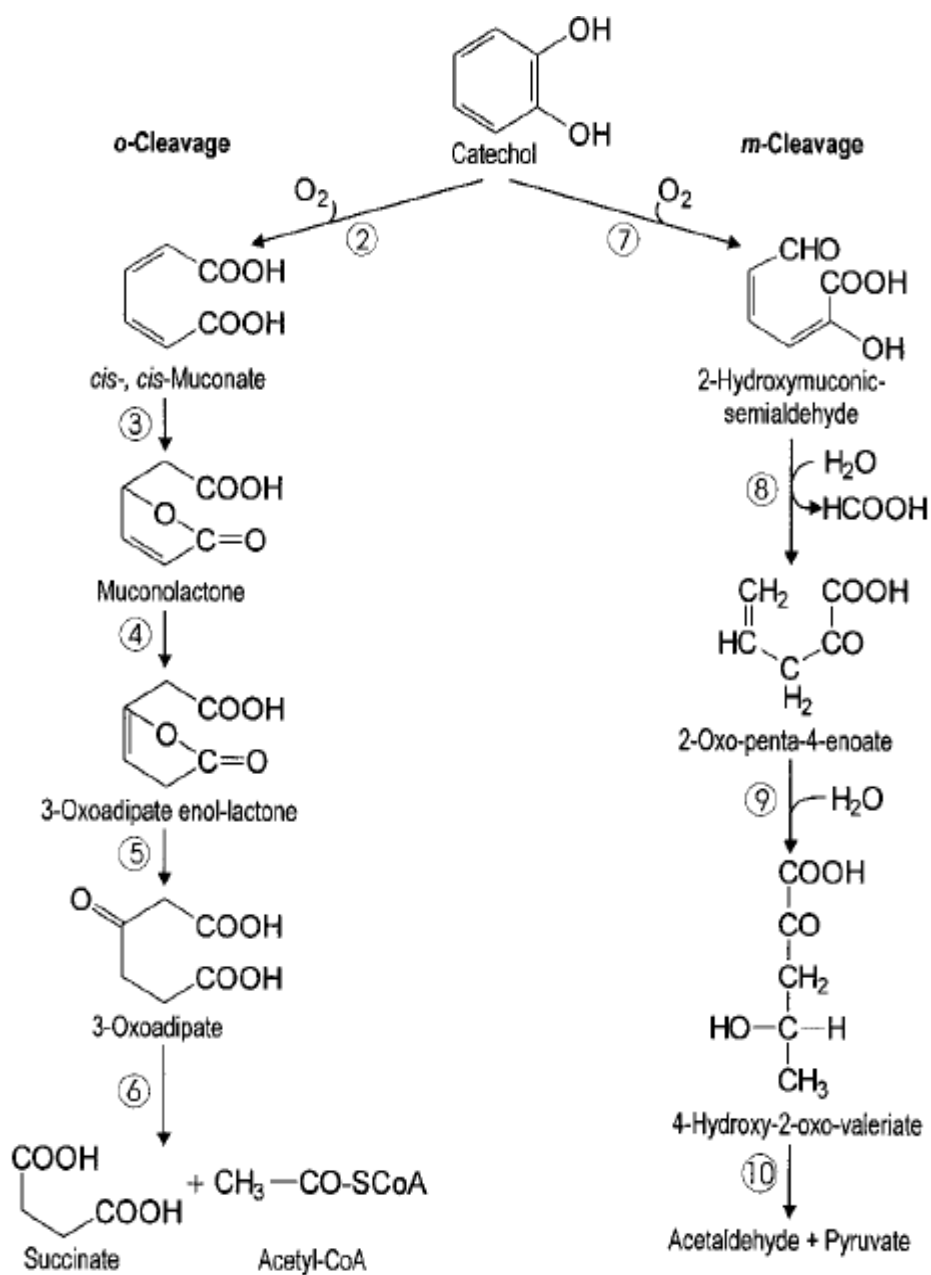
2.5.3 วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย

ขั้นแรกเริ่มจากการออกซิไดซ์สารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส ได้เป็นซิส-ไดไฮโดรไดคอล จากนั้นเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสมาเปลี่ยนเป็นแคตคอลล ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกโดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (Fritsche และ Hofrichter, 2000)

จากนั้นแคตคอลล (catechol) เข้าสู่กระบวนการแตกวงของอะโรมาติกผ่าน 2 ทางคือ ออโธ (ortho) หรือ เมต้า (meta) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 วิธีการย่อยสลายสารมัธยันตร์ (เคตคอลล) ที่ได้จากอะโรมาติก ผ่านทางการแตกวงของ
 ออโธ (ortho) หรือ เมต้า (meta) 1 = phenol monooxygenase, 2 = catechol 1,2-dioxygenase,
 3 = muconate lactonizing enzyme, 4 = muconolactone isomerase, 5 = oxoadipate
 enol-lactone hydrolase, 6 = oxoadipate succinyl-CoA transferase, 7 = catechol 2,3-
 dioxygenase, 8 = hydroxymuconic semialdehyde hydrolase, 9 = 2-oxopent-4-enoic acid
 hydrolase และ 10 = 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase

2.6 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน

วิธีการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนนี้จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์เกี่ยวข้องกับหลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ แอลเคนไฮดรอกซิเลส หรือแอลเคนโมโนออกซิจีเนส ซึ่งมียีนที่ประมวลรหัสการสร้างเอนไซม์ แอลเคนไฮดรอกซิเลสหลายกลุ่ม ได้แก่ ยีน *alkB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 5 – 16 อะตอม (Smith และคณะ, 2002) ยีน *alkM* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอนมากกว่า 12 อะตอม (Kohno และคณะ, 2002) ส่วนยีน *almA* ซึ่งเป็นยีนที่ประมวลรหัส การสังเคราะห์เอนไซม์ flavin-binding monooxygenase ช่วยในการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 22 – 36 อะตอม (Lui และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังมียีน CYP153 ซึ่งสังเคราะห์ ไฮโดรโครม พี450 แอลเคนไฮดรอกซิเลส (cytochrome P450 alkane hydroxylase) เกี่ยวข้องใน การย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 8 – 16 อะตอม (Beilen และคณะ, 2006) สรุปได้ดังตารางที่

2.3

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายแอลเคนในขั้นตอนแรก

ยีน	เอนไซม์	จำเพาะกับแอลเคน ที่มีจำนวนคาร์บอน (อะตอม)	ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถตรวจพบยีน	อ้างอิง
<i>alkB: alkB</i>		5 - 16	<i>Pseudomonas putida</i> GPo1	Kohno และคณะ, 2002
<i>alkB1</i>	แอลเคน โมโนออกซิจีเนส	12 - 26 และ แบบสายโซ่กิ่ง	<i>Rhodococcus</i> sp และ <i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5	Whyte และคณะ (2002); Lui และคณะ, 2011
<i>alkB2</i>		12 - 26		
<i>alkM</i>	แอลเคน โมโนออกซิจีเนส	≥ 12	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	Kohno และคณะ, 2002
CYP153	ไซโตโครม พี450 แอลเคนไฮดรอกซิเลส	8 - 16	<i>Acinetobacter</i> sp. strain EB104 และ <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> Saro_178	Beilen และคณะ, 2006
<i>almA</i>	flavin-binding monooxygenase	22 - 36	<i>Acinetobacter</i> sp. DSM 17874	Lui และคณะ, 2011

Kohno และคณะ (2002) รายงานการพบยีน *alkM* ซึ่งเกี่ยวข้องกับกรย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 12 อะตอมขึ้นไป ใน *Acinetobacter* sp. 2769A, *Acinetobacter* sp. ADP1 และ *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250 เป็นต้น

Whyte และคณะ (2002) ศึกษาความโดดเด่นของยีนแอลเคน โมโนออกซิจีเนสในดินที่มีการปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอน บริเวณทวีปอาร์กติกและทวีปแอนตาร์กติกา โดยตรวจสอบทั้งแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้และเพาะเลี้ยงไม่ได้ พบว่ามียีนของเอนไซม์แอลเคนโมโนออกซิจีเนส 4 ชนิด ที่มีความโดดเด่น ได้แก่ ยีน *alkB*, ยีน *alkB1*, ยีน *alkB2* และยีน *alkM* นอกจากนี้ยังคาดการณ์ว่า *Pseudomonas* spp. และ *Rhodococcus* spp. อาจจะกลายมาเป็นกลุ่มประชากรเด่นบริเวณดินที่มีการปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอนของทั่วโลก เนื่องจากพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสจำนวนมาก เมื่อใช้คู่มือที่ออกแบบจากยีนแอลเคนโมโนออกซิจีเนสของ *Pseudomonas putida* GPo1 และ *Rhodococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีข้อมูลว่ายีนแอลเคนโมโนออกซิจีเนสอยู่ใน Genbank

Wang และคณะ (2010) ศึกษาความหลากหลายของเอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลสในแบคทีเรียย่อยน้ำมันที่แยกได้จากมหาสมุทรแอตแลนติก พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลและน้ำมันดิบ ได้แก่ *Acinetobacter junii* LMG998, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* DSM 50188, *Alcanivorax dieselolei* B-5, *Castellaniella ginsengisoli* DCY36, *Solimonas soli* A.slu-03 เป็นต้น มียีน *alkB* นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรีย ได้แก่ *Novosphingobium pentaromativorans* US6, *Ochrobactrum anthropi* LMG 3331, *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1, *Salinisphaera shabanense* E1L3A, *Solimonas soli* A.slu-03, *Sphingobium estrogenivorans* CYH, *Spingopyxis macrogoltabida* IFO 15033T และ *Tistrella mobilis* IAM 14872 เป็นต้น ที่พบยีน CYP153A อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่สามารถตรวจพบได้ทั้ง ยีน *alkB* และ ยีน CYP153A ได้แก่ *Solimonas soli* A.slu-03, *Leifsonia kafniensis* KFC-22, *Brachy bacterium paraconglomeratum* LMG19861 และ *Alcanivorax borkumensis* SK2 เป็นต้น

2.7 การใช้เซลล์ตรึงเพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน

การนำเซลล์อิสระของจุลินทรีย์มาใช้บำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันนั้นมีประสิทธิภาพดี แต่อย่างไรก็ตามเซลล์อิสระมักพบปัญหาเซลล์หลุดออกจากระบบบำบัด เซลล์สูญเสียความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม วิธีแก้ปัญหานี้วิธีหนึ่งคือ การตรึงเซลล์ (Atsuo tanaka และ Takuo kawamoto, 1999)

การตรึงเซลล์ (Immobilization) หมายถึง การนำเซลล์มาตรึงไว้บนวัสดุใดๆ โดยใช้วิธีทางกายภาพหรือเคมี ซึ่งเซลล์นั้นยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษ (Cassidy และคณะ, 1996) การตรึงเซลล์มีข้อดีหลายประการ เช่น ทำให้เซลล์สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน สามารถแยกเซลล์ตรึงนี้ออกมาจากระบบบำบัดได้ง่าย และนำเซลล์ตรึงนี้กลับมาใช้ซ้ำได้ทั้งที่ยังคงมีประสิทธิภาพดี (Lan และคณะ, 2009) ซึ่งเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในระบบบำบัดน้ำเสีย ตัวอย่างเซลล์ตรึงที่ใช้ในการกำจัดน้ำมัน ดังแสดงในตารางที่ 2.4 จากเหตุผลที่กล่าวมาทำให้การตรึงเซลล์เป็นวิธีที่น่าสนใจในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน

2.7.1 วิธีการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์สามารถประยุกต์ใช้กับจุลินทรีย์และวัสดุตรึงได้หลากหลายชนิด จึงมีวิธีการตรึงเซลล์ได้หลายแบบตามความเหมาะสมต่อจุลินทรีย์ โดยสามารถจำแนกวิธีการตรึงเซลล์ได้ 5 วิธี (Bickerstaff, 1997) ได้แก่

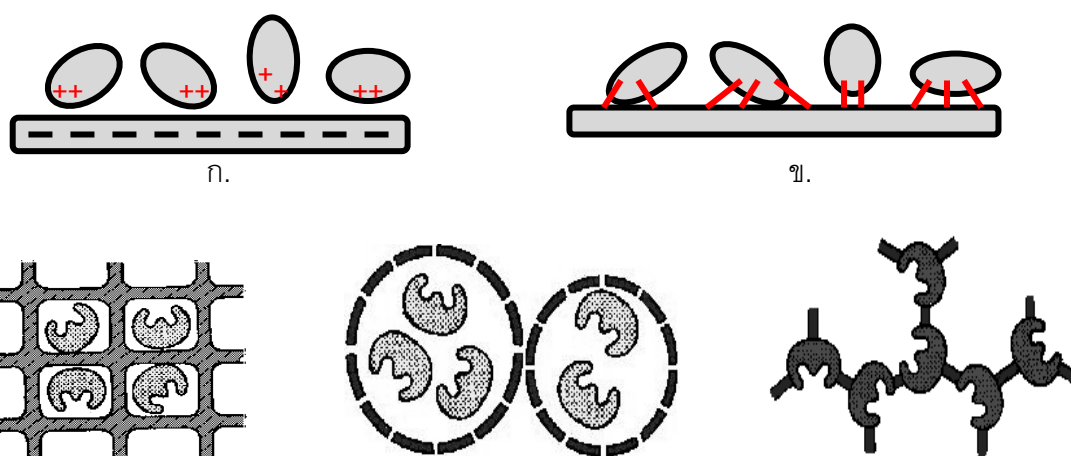
2.7.1.1 การดูดซับ (Adsorption) เป็นการที่เซลล์ยึดเกาะกับพื้นผิวของวัสดุตรึง โดยใช้แรงจากไฟฟ้าสถิตย์, แรงแวนเดอร์วาล, พันธะไฮโดรเจน, พันธะไฮโดรโฟบิก หรือพันธะไฮโดรโฟบิก ซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย เซลล์ถูกทำลายน้อย และมีราคาถูก (รูปที่ 2.5 ก)

2.7.1.2 การสร้างพันธะโควาเลนต์ (Covalent Binding) เป็นการที่เซลล์เกิดเกาะติดกับวัสดุตรึงโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของเซลล์กับหมู่ไฮดรอกซิลของวัสดุตรึง วิธีนี้เป็นการยึดเกาะระหว่างเซลล์กับวัสดุตรึงโดยตรงทำให้เซลล์สามารถเกิดปฏิกิริยากับสับสเตรทได้ง่าย และมีความคงตัวสูง (รูปที่ 2.5 ข)

2.7.1.3 การกักขัง (Entrapment) เป็นการที่เซลล์อยู่อย่างอิสระแต่ถูกจำกัดให้อยู่ในโครงสร้างการเคลื่อนที่ในเจลที่มีลักษณะโครงร่างตาข่าย ซึ่งต้องควบคุมขนาดรูพรุนของเจล เพื่อป้องกันเซลล์หลุดออกจากวัสดุตรึง โดยวิธีนี้สามารถทำได้หลายวิธีคือ การเกิดเจลจากความต่างของประจุไอออน การเกิดเจลจากการเหนี่ยวนำของอุณหภูมิ การเกิดพอลิเมอร์จากปฏิกิริยาทางเคมี และการใช้ตัวทำละลายที่ไม่เข้ากัน (รูปที่ 2.5 ค)

2.7.1.4 การห่อหุ้มด้วยแคปซูล (Encapsulation) เป็นการที่เซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) เซลล์จะเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระในพื้นที่จำกัด ซึ่งสับสเตรทขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านได้ ยกเว้นแต่สับสเตรทขนาดเล็กสามารถผ่านเยื่อเลือกผ่านนั้นได้ โดยวิธีนี้จะช่วยลดการรั่วไหลของเซลล์ได้ (รูปที่ 2.5 ง)

2.7.1.5 การเชื่อมกัน (Crosslinking) เป็นการทำเซลล์มีการเชื่อมต่อกันเองโดยปราศจากวัสดุตรึง ด้วยวิธีทางกายภาพหรือเคมีเกิดเป็นโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อน 3 มิติโดยวิธีทางกายภาพ คือการจับกลุ่มของเซลล์ (flocculation) ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์สูง ส่วนวิธีทางเคมี คือการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์กับเซลล์ โดยใช้สารเคมีจำพวก bi-, multifunctional reagents เช่น กลูตาออลดีไฮด์ เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้เป็นวิธีร่วมในการตรึงเซลล์ (รูปที่ 2.5 จ)



รูปที่ 2.5 วิธีการตรึงเซลล์ (Bickerstaff, 1997)

2.7.2 วัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์

ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับการตรึงเซลล์นอกจากวิธีการตรึงเซลล์คือ วัสดุที่ใช้สำหรับการตรึงเซลล์ หลักการพิจารณาวัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์ ได้แก่ สมบัติทางกลไก เช่น ความคงตัว สมบัติทางฟิสิกส์ เช่น ลักษณะเป็นเม็ดหรือแผ่น ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ความชอบน้ำ ราคาและการยอมรับ เป็นต้น (Leenen และคณะ, 1996) โดยวัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ วัสดุตรึงที่เป็นสารอินทรีย์ได้แก่ สารจำพวก พอลิแซคคาไรด์ โปรตีน และพอลิเมอร์สังเคราะห์ ตัวอย่างวัสดุตรึงที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น ฝุ่น อัลจิเนต คาราจีแนน ไคโตซาน เซลลูโลส เจลาติน พอลิอะคริลาไมด์ และพอลิยูรีเทน เป็นต้น ส่วนวัสดุตรึงที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น ซิลิกา เซรามิก แก้ว และอะลูมินา เป็นต้น (Bickerstaff, 1997)

ตัวอย่างรายงานการวิจัยการใช้เซลล์ตรึงที่ใช้ในการกำจัดน้ำมัน เช่น

Lan และคณะ (2009) ศึกษาการกำจัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของ *Yarrowia lipolytica* W29 พบว่า *Yarrowia lipolytica* W29 ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจิเนตซึ่งเป็นการตรึงแบบการกักขังนั้น มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับเซลล์อิสระ ซึ่งช่วงอุณหภูมิที่มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันได้ดีคือ 25-30 องศา

เซลเซียส และเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงความเข้มข้นน้ำมัน 1,000 – 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้เซลล์ตรึงสามารถให้ซ้ำได้ 12 รอบ โดยมีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันอยู่ในช่วงระหว่าง 60-80 เปอร์เซ็นต์

Lee และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acinetobacter* sp., *Gordonia* sp., and *Rhodococcus* sp. มาตรึงในวัสดุผสม ได้แก่ พีทมอส เบนโทไนท์ และอัลจิเนต พบว่า เซลล์ตรึงนี้สามารถกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ได้ 59 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน

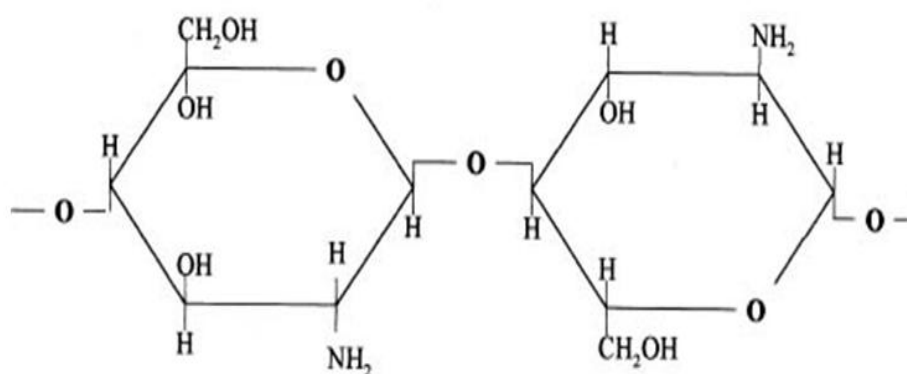
Chandran และ Das (2011) รายงานการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ของ *Candida tropicalis* ที่ถูกตรึงบนวัสดุตรึงที่นิยมใช้ ได้แก่ ไคโตซาน, โซเดียม-อัลจิเนต และ คาร์บอกซิลเมทิล เซลลูโลส และวัสดุตรึงที่เป็นของเสียทางการเกษตร ได้แก่ รำข้าวสาลี เปลือกถั่ว และขี้เลื่อย พบว่าเซลล์ตรึงที่ใช้รำข้าวสาลีเป็นวัสดุตรึงมีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือ 98 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน และในส่วนของประเภทวัสดุตรึงที่นิยมใช้ พบว่า เซลล์ตรึงที่ใช้ไคโตซานเป็นวัสดุตรึงมีประสิทธิภาพสูงที่สุดการกำจัดน้ำมันคือ 78 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างเซลล์ที่รีงที่มีการประยุกต์ใช้ในการกำจัดน้ำมัน

วัสดุที่รีง	วิธีการที่รีง	จุลินทรีย์	ชนิดน้ำมัน	ความเข้มข้นน้ำมันเริ่มต้น	อัตราการย่อยสลาย	อ้างอิง
โฟมพอลิยูรีเทน	แบบดูดซับ	<i>Rhodococcus</i> sp. F92	ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	0.5 เปอร์เซ็นต์	90 เปอร์เซ็นต์ภายใน 1 สัปดาห์	Quek และคณะ, 2006
เม็ดแคลเซียมอัลจิเนต	แบบกักขัง	<i>Yarrowia lipolytica</i> W29	น้ำมันปรุงอาหาร	2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	80 เปอร์เซ็นต์ภายใน 50 ชั่วโมง	Lan และคณะ, 2009
พีทมอส เบนโทไนท์ และอัลจิเนต	แบบดูดซับและแบบกักขัง	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Gordonia</i> sp., and <i>Rhodococcus</i> sp.	น้ำมันดีเซล	10 กรัมต่อลิตร	59 เปอร์เซ็นต์ภายใน 7 วัน	Lee และคณะ, 2010
รำข้าวสาลี	แบบดูดซับ	<i>Candida tropicalis</i>	น้ำมันดีเซล	2 เปอร์เซ็นต์	98 เปอร์เซ็นต์ภายใน 7 วัน	Chandran และ Das, 2011
ไคโตซาน	แบบกักขัง				78 เปอร์เซ็นต์ภายใน 7 วัน	

2.8 ไคโตซาน

ไคโตซาน หรือ β (1,4) 2-amino-2-deoxy-D-glucose เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ได้จากไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในเปลือกของสัตว์จำพวกกุ้ง ปู แมลงและเชื้อรา โดยไคตินจะเกิดปฏิกิริยา deacetylation เป็นการตัดหมู่ acetyl ของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ออก (Kas, 1997) มีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน (Ponce-jimenez และคณะ, 2002)

ไคโตซานเป็นวัสดุชีวภาพที่ได้จากของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล ซึ่งมีลักษณะสมบัติคือ เป็นวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทนความร้อน สามารถยึดเกาะกับเซลล์จุลินทรีย์ได้ (Dutta และคณะ, 2004) นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถละลายได้ในกรดและเกิดปฏิกิริยากับพวกสารละลายต่าง เกิดเป็นเจลได้ (Kumar, 2000) ซึ่งลักษณะสมบัติเหล่านี้มีความเหมาะสมในการใช้เป็นวัสดุสำหรับตรึงเซลล์

รายงานการวิจัยของ Chen และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลและไตรคลอโรเอเททิลีน โดยนำ *Pseudomonas putida* BCRC 14349 ตรึงไว้ในเม็ดไคโตซานเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่า การตรึงเซลล์โดยใช้ไคโตซานเป็นวัสดุตรึงจะช่วยปกป้องเซลล์จากความเข้มข้นของไตรคลอโรเอเททิลีนที่สูงได้

Barreto และคณะ (2010) ศึกษาการตรึงสปอร์ของ *Bacillus subtilis* LAMI008 ไว้ในเม็ดไคโตซานที่มีการเชื่อมด้วยกลูตาออลดีไฮด์ พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายเฮกซะเดคเคนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีประสิทธิภาพการย่อยสลายได้เทียบเท่ากับเซลล์อิสระ

2.9 คาร์บอนกัมมันต์

คาร์บอนกัมมันต์หรือถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) ได้จากการนำวัตถุดิบที่มีคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ มาผ่านกระบวนการก่อกัมมันต์ วัตถุดิบที่นำมาผลิตได้แก่ ถ่านหิน วัตถุดิบจากสัตว์ และเซลลูโลสที่ได้จากพืช เช่น กะลามะพร้าว ชี้เลื่อย ซานอ้อย เป็นต้น วิธีการผลิตคาร์บอนกัมมันต์มีหลายวิธี ได้แก่ การกระตุ้นทางกายภาพ เช่น การให้อุณหภูมิสูงในช่วง 600 – 900 องศาเซลเซียส การกระตุ้นโดยใช้สารเคมี เช่น สังกะสีคลอไรด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดฟอสฟอริก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการกระตุ้นด้วยไออนที่ร้อน (Ioannidou และ Zabaniotou, 2006) ซึ่งจากกระบวนการก่อกัมมันต์นี้ทำให้ได้คาร์บอนกัมมันต์ที่มีโครงสร้างเป็นรูพรุน มีพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้น มีลักษณะสมบัติคือ ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถดูดซับสารต่างๆ ได้ดี เนื่องจากเกิดแรงแวนเดอร์วาลส์ยึดเกาะระหว่างสารกับคาร์บอนกัมมันต์ (Zhao และคณะ, 2008) จากลักษณะสมบัติที่เป็นประโยชน์สำหรับการดูดซับสารเหล่านี้ ทำให้มีการนำคาร์บอนกัมมันต์มาประยุกต์ใช้ในการกำจัดสารพิษ

Namasivayam และ Kavitha (2002) รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนสีย้อม Congo red โดยการใช้คาร์บอนกัมมันต์ที่เตรียมได้จากแก่นมะพร้าว พบว่ามีความสามารถในการดูดซับสีย้อมได้ 6.7 มิลลิกรัมของสีย้อมต่อกรัมของตัวดูดซับ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสภาวะเป็นกรดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับสีย้อม Congo red ของคาร์บอนกัมมันต์ด้วย

ตัวอย่างงานวิจัยของ Schreiber และคณะ (2006) ศึกษาการใช้คาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวดูดซับแอนทราซีนที่ปนเปื้อนในน้ำ พบว่าคาร์บอนกัมมันต์มีประสิทธิภาพในการดูดซับแอนทราซีนได้สูงที่สุด ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้คาร์บอนกัมมันต์เป็นวัสดุร่วมในการตรึงเซลล์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างงานวิจัยของ Kwon และคณะ (2009) ศึกษาการกำจัดฟีนอลโดยใช้เซลล์ตรึงของ *Pseudomonas fluorescence* KNU417 พบว่าการตรึงเซลล์โดยใช้พอลิไวนิล แอลกอฮอล์และแซนแทนกัมโดยมีคาร์บอนกัมมันต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นตัวร่วม สามารถกำจัดฟีนอลความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 120 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าเซลล์ตรึงที่ปราศจากการใช้คาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วมที่ไม่สามารถกำจัดฟีนอล ภายในระยะเวลาที่เท่ากัน

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 1) กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท Nippo, Thailand
- 2) ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, USA
- 3) เครื่อง Thin-layer Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัดชนิด Flame ionization detector รุ่น IntroskanTM MK-6/65 บริษัท Mitsubishi Kagaku Iatron, INC., Japan
- 4) เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น D1100 บริษัท Labnet International, Inc., USA
- 5) เครื่องชั่ง P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- 6) เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kakusa, Japan
- 7) เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
- 8) เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
- 9) เครื่องระเหยสุญญากาศ (evaporator) บริษัท Eyela, Japan
- 10) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
- 11) ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific Supply, Japan
- 12) ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°C รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
- 13) ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°C รุ่น ULT1786 บริษัท Forma, USA

- 14) ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รุ่น BE 800 บริษัท Memmert, Germany
- 15) ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
- 16) แท่ง Chromarod บริษัท Mitsubishi Kagaku Iatron, INC., Japan
- 17) ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000, 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
- 18) หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, USA
- 19) ชุดหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร บริษัท ChromTech, USA
- 20) เครื่องวัดแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น DCAT 11 บริษัท Data Physics, Germany
- 21) เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer) รุ่น TA.XT.Icon บริษัท Charpa Techcenter, UK
- 22) เครื่อง Scanning Electron Microscopy (SEM) รุ่น JSM-5410LV บริษัท JEOL, Japan
- 23) เครื่อง Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) ยี่ห้อ Nikon, Germany
- 24) เครื่อง Surface Area Analyzer รุ่น BelsorpII mini บริษัท Bel, Japan
- 25) เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น MIKRO20 บริษัท Hettich, Germany
- 26) เครื่องตรวจเอกสารเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000TM บริษัท Bio-Rad, USA
- 27) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA และ รุ่น MJ MiniTM Personal Thermal Cycler บริษัท Kakusa, Japan
- 28) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA

เคมีภัณฑ์

- 1) 100 base pair DNA ladder บริษัท Bio-Rad, USA
- 2) 1-octadecanol บริษัท sigma, Japan
- 3) Lambda *Hind*III บริษัท Bio-Rad, USA
- 4) Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), (C₄H₁₁NO₃) บริษัท Sigma, USA
- 5) กรดอะซิติกเข้มข้น 7 น้ำ (glacial CH₃COOH) บริษัท Merck, Germany
- 6) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
- 7) คลอโรฟอร์ม (chloroform) บริษัท RCI Labscan, Thailand
- 8) คาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon) บริษัท Carbokarn, Thailand
- 9) แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต (CaCl₂·2H₂O) บริษัท Merck, Germany
- 10) ไคโตซาน บริษัท Eland Corporation, Thailand
- 11) ซูดเอนไซม์ Taq DNA polymerase บริษัท New England Biolabs, USA
- 12) ชุด FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit บริษัท Invitrogen, USA
- 13) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
- 14) โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na₂SO₄) บริษัท Merck, Germany
- 15) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS), (C₁₂H₂₅OSO₃) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
- 16) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
- 17) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) บริษัท Merck, Germany

- 18) ไดโพรแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
- 19) ไดเมทิลฟอร์มามาไมด์ (dimethyl formamide, DMF) บริษัท Biobasic, INC., USA
- 20) ไดเอทิลอีเทอร์ ($(C_2H_5)_2O$) บริษัท Merck, Germany
- 21) ทริปโตเน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
- 22) นอร์มัลเฮกเซน (*n*-hexane) บริษัท Merck, Germany
- 23) แบคโตอะการ์ (bacto agar) บริษัท Difco, USA
- 24) โปรตีนเนสเค (Proteinase K) บริษัท US Biological, USA
- 25) ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
- 26) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
- 27) ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
- 28) ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma, USA
- 29) เฟอรัลคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) บริษัท Merck, Germany
- 30) เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
- 31) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) บริษัท Merck, Germany
- 32) แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo, ERBA, France
- 33) สารละลาย dNTP ได้แก่ dATP dCTP dGTP และ dTTP บริษัท Fermentas, Canada
- 34) ยูเรีย (Urea) บริษัท Merck, Germany
- 35) ไรโบนิวคลีเอสเอ (Rnase A) บริษัท Promega, USA
- 36) อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUAI, Japan

- 37) เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิก (ethylenediaminetetraacetic acid. EDTA),
($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Sigma, USA
- 38) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท Merck, Germany
- 39) ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany
- 40) เฮกซะเดคเคน ($CH_3(CH_2)_{14}CH_3$) บริษัท Sigma-aldrich, Germany

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	ขนาดคาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
350F	TAC GGG AGG CAG CAG	170	Muyzer และคณะ 1993
520R	ACC GCG GCT GCT GGC		

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสแอลเคนไฮดรอกซิเลส

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	ยีน	ขนาดคาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
ALK-1F	CAT AAT AAA GGG CAT CAC CGT	<i>alkB</i>	185	Kohno และคณะ, 2002
ALK-1R	GAT TTC ATT CTC GAA ACT CCA AAC			
ALK-2F	GAG ACA AAT CGT CTA AAA CGT AA	<i>alkM</i>	271	
ALK-2R	TTG TTA TTA TTC CAA CTA TGC TC			
ALK-3F	TCG AGC ACA TCC GCG GCC ACC A	<i>alkB1</i>	330	
ALK-3R	CCG TAG TGC TCG ACG TAG TT			

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสแอลเคนไฮดรอกซิเลส (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	ยีน	ขนาดคาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
alkB-1F alkB-1R	AA Y ACN GCN CAY GAR CTN GGN CAY AA GCR TGR TGR TCN GAR TGN CGY TG	<i>alkB</i>	550	Kloos และคณะ, 2006
alkB1-F alkB1-R	ATC TGG GCG CGT TGG GAT TTG AGC G CGC ATG GTG ATC GCT GTG CCG CTG C	<i>alkB1</i>	629	Whyte และคณะ, 2002
alkB2-F alkB2-R	ACT CTG GCG CAG TCG TTT TAC GGC C CCC ACT GGG CAG GTT GGG CGC ACC G	<i>alkB2</i>	552	
CYP153-F1 CYP153-R2	ATG TTY ATY GCN ATG GAY CCN GCG RTT VCC CAT RCA RCG RTG	CYP153	820	Wang และคณะ, 2011
P450F P450R	TGT CGG TTG AAA TGT TCA TYG CNM TGG AYC C TGC AGT TCG GCA AGG CGG TTD CCS RYR CAV CKR TG	CYP153	800	Wang และคณะ, 2010
almAwf almAwr	GGN GGN ACN TGG GAY CTN TT ATR TCN GCY TTN AGN GTC C	<i>almA</i>	1131	Liu และคณะ, 2011

ตารางที่ 3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

ชนิดแบคทีเรีย	รหัสเชื้อที่ฝากเก็บ	แหล่งที่มา	เอกสารอ้างอิง
<i>Acinetobacter</i> sp. R2	TISTR 2004	น้ำเสียปนเปื้อนน้ำมัน จ.กรุงเทพฯ	สิทธิ ทาทอง, 2550
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	TISTR 2007	ดินตะกอนป่าชายเลนบริเวณศูนย์อนุรักษ์และศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน จ.เพชรบุรี	พรหมฉัตร เจริญพัฒน์, 2551
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN402	TISTR 2059	ดินบริเวณรางรถไฟ จ.นครราชสีมา	Klankeo และคณะ, 2009
<i>Rhodococcus</i> sp. W2-01	TISTR 2060	ดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม จ.กรุงเทพฯ	วัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศิริ, 2551
<i>Serratia</i> sp. W4-01	TISTR 2061		
<i>Sphingobium</i> sp. P2	TISTR 2006	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องบริเวณอู่ซ่อมรถยนต์ จ.ปราจีนบุรี	Pinyakong และคณะ, 2003
<i>Sphingomonas</i> sp. A4	TISTR 2042	ดินปนเปื้อนบริเวณที่ทับถมของเสียจากอุตสาหกรรม	Komatsu และคณะ, 1993

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 คัดกรองแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดน้ำมันดีเซล

3.1.1 ทดสอบความสามารถการกำจัดน้ำมันดีเซลของแบคทีเรีย

3.1.1.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ทดสอบความสามารถการกำจัดน้ำมันดีเซล โดยแบคทีเรียที่ใช้ต้องผ่านการกระตุ้นแอคติวิตีของแบคทีเรีย ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่เจือจาง 10 เท่า (ภาคผนวก ก) ที่มีน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นตัวกระตุ้น จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียจากอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) ลงในอาหารเหลว LB ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 50 มิลลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 – 72 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ล้างเซลล์ในสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โซเดียมคลอไรด์ ทำซ้ำขั้นตอนดังกล่าว 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โซเดียมคลอไรด์

3.1.1.2 ศึกษาความสามารถในการกำจัดน้ำมันดีเซลของแบคทีเรีย โดยเติมหัวเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิตร ซึ่งเติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันแต่ไม่เติมหัวเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นสกัดน้ำมันที่เหลืออยู่และวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เทคนิค TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4 และนำตัวอย่างมานับจำนวนแบคทีเรีย ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.1.3

3.1.1.3 นับจำนวนแบคทีเรีย โดยนำตัวอย่างจากข้อ 3.1.1.2 มานับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธีการ drop plate บนอาหารแข็ง LB และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนี เพื่อคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร

3.1.2 ตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียเบื้องต้น

3.1.2.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.3) เพื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวเบื้องต้นของแบคทีเรีย ทำโดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงวิธีมาจาก Abouseoud และคณะ (2007) โดยเติมหัวเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิตร ที่มีน้ำมันดีเซล 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

จากนั้นปั่นแยกเซลล์และน้ำมันด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการวิเคราะห์ค่าแรงตึงผิว ข้อ 3.1.2.2 และค่าครรชนีของอิมัลชันข้อ 3.1.2.3

3.1.2.2 วิเคราะห์ค่าแรงตึงผิว โดยนำส่วนน้ำใสที่ได้จากข้อ 3.1.2.1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร มาวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Tensiometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันแต่ไม่เติมหัวเชื้อ

3.1.2.3 วิเคราะห์ค่าครรชนีของอิมัลชัน (Emulsion Index, E_{24}) ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Barreto และคณะ (2010) โดยนำส่วนน้ำใสจากข้อ 3.1.2.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมในน้ำมันดีเซล ที่มีปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดฝาเกลียว ปั่นที่ความเร็วสูง เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ หาค่าเปอร์เซ็นต์ครรชนีของอิมัลชัน ดังสมการ

$$E_{24} \text{ (เปอร์เซ็นต์)} = (\text{ส่วนสูงของชั้นอิมัลชัน} / \text{ส่วนสูงทั้งหมดของของเหลว}) \times 100$$

3.1.3 ตรวจสอบความสามารถในการเกิดไฮโดรโฟบิกของแบคทีเรีย

ตรวจสอบการเกิดไฮโดรโฟบิกตามวิธีของ Costa และคณะ (2010) โดยเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.2) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง และแขวนลอยเซลล์ด้วย ฟอสเฟต ยูเรีย แมกนีเซียมซัลเฟต บัฟเฟอร์, pH 7.1 (ภาคผนวก ข) นำเซลล์ที่แขวนลอยไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่าเท่ากับ 1.0 จากนั้นนำเซลล์ที่แขวนลอยที่เตรียมไว้ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมกับเฮกซะเดคเคน (hexadecane) หรือดีเซล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด จากนั้นเขย่าอย่างแรง เป็นเวลา 1 นาที หลังจากผสมให้เข้ากันแล้ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น เมื่อครบเวลาชั้นน้ำจะถูกนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณการเกิดไฮโดรโฟบิก ดังสมการ

$$\text{การเกิดไฮโดรฟอบิก (เปอร์เซ็นต์)} = (1 - \frac{\text{ค่า OD}_{400} \text{ หลังจากผสมไฮโดรคาร์บอน}}{\text{ค่า OD}_{400} \text{ เริ่มต้น}}) \times 100$$

3.1.4 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการกำจัดน้ำมันดีเซลในแบคทีเรีย

3.1.4.1 สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดย เชื้อโคไลนีเดียวของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองไมโครพิวจ์ ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงระดับ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง แขนงลอยเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 517 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม เอนไซม์ไลโซไซม์ ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate:SDS) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมา เติมเอนไซม์โปรตีนเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl ปริมาตร 250 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม คอลโรฟอร์ม ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรงๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองไมโครพิวจ์ อันใหม่ เติมฟีนอล/คอลโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองไมโครพิวจ์อันใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายไอโซโพรพานอลใน ปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรสุดท้ายของส่วนใสผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมา เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้าง ตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระเหยเอทานอลจนตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้ว เติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

และเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.1.4.2 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ข) เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ เมื่ออะกาโรสแข็งตัว วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทปไฟเบอร์ให้ท่วมอะกาโรสเจล ผสมผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสกับสีย้อม จากนั้นหยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งที่ 1 จะหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII (ภาคผนวก ข) ที่ผสมกับสีย้อมแล้ว ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่เหมาะสม ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

3.1.4.3 ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.1.4.1 ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสโดยใช้คู่อิเล็กโตรคลีโอไทด์ไพรเมอร์ดังตารางที่ 3.1 โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา ดังนี้

ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข) สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1xTaq DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีในข้อ 3.1.3.1 ปริมาณ 1 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะดังนี้

- | | | | |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1) | Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2) | Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3) | Annealing | ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4) | Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | | |
| 5) | Final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 7 นาที |

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

3.1.4.4 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการกำจัดการนำมันดีเซล นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ

3.1.3.1 ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3.2 โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา ดังนี้

ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1xTaq DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีในข้อ 3.1.3.1 ปริมาณ 1 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ ดังนี้

ไพรเมอร์ ALK-1F และ ALK-1R, ALK-2F และ ALK-2, ALK-3F และ ALK-3R ใช้สภาวะ

- | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1) Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2) Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3) Annealing | ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4) Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 5) Final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |

ไพรเมอร์ alkB-1F และ alkB-1R ใช้สภาวะ

- | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1) Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2) Denaturation | ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3) Annealing | ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4) Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ | | |
| 5) Final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |

ไพรเมอร์ alkB1-F และ alkB1-R, alkB2-F และ alkB2-R ใช้สภาวะ

- | | | | |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------|
| 1) | Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2) | Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3) | Annealing | ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4) | Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | | |
| 5) | Final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 3 นาที |

ไพรเมอร์ CYP153-F1 และ CYP153-R2 ใช้สภาวะ

- | | | | |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1) | Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2) | Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 45 วินาที |
| 3) | Annealing | ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4) | Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ | | | |
| 5) | Final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 10 นาที |

ไพรเมอร์ P450F และ P450R ใช้สภาวะ

- | | | | |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1) | Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 4 นาที |
| 2) | Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3) | Annealing | ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4) | Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 32 รอบ | | | |
| 5) | Final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 10 นาที |

ไพรเมอร์ almAwf และ almAwr ใช้สภาวะ

- | | | | |
|----|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1) | Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2) | Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3) | Annealing | ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |

- 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ
- 5) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

ตรวจสอบผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

เมื่อทดสอบความสามารถการกำจัดน้ำมันดีเซล การสร้างสารลดแรงตึงผิว การเกิดอิมัลชัน การเกิดไฮโดรโฟบิก และการมีอยู่ของยีนที่เกี่ยวข้องในการกำจัดน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ แล้วเลือกมา 1 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากความสามารถในการกำจัดน้ำมันดีเซลเป็นหลัก นอกจากนี้ยังพิจารณาคุณสมบัติในการสร้างสารลดแรงตึงผิว การเกิดไฮโดรโฟบิกกับดีเซล และการมีอยู่ของยีนที่เกี่ยวข้องในการกำจัดน้ำมันดีเซล เพื่อนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป คือ การตรึงเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการกำจัดน้ำมันดีเซล

3.2 ตรึงเซลล์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซล

3.2.1 ขึ้นรูปเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์โดยแปรผันความเข้มข้นของโคโคซานและชนิดโคโคซาน

ขึ้นรูปเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ โดยใช้สารละลายโคโคซานจากกระดองปู เปลือกกุ้ง หรือแกนหมึก จากบริษัท อีแลนด์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด ที่ความเข้มข้น 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยนำโคโคซานละลายใน 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กรดแอสติค เติมผงคาร์บอนกัมมันต์ที่มีขนาดผง 325 mesh จากบริษัท คาร์โบกาญจน์ จำกัด ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หยดส่วนผสมลงใน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเม็ด 3 มิลลิเมตร จากนั้นกวนต่ออีก 10 นาที แล้วล้างวัสดุตรึงด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 (ภาคผนวก ข) นาน 20 นาที 2 ครั้ง ซึ่งดัดแปลงวิธีมาจาก Kwon และคณะ (2009) จากนั้นคัดเลือกโคโคซานและความเข้มข้นของโคโคซาน โดยพิจารณาจากการขึ้นรูป รูปทรงและความแข็งแรงของวัสดุตรึง (ข้อ 3.2.2) เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.2 ทดสอบความแข็งแรงของวัสดุตรึง

นำวัสดุตรึงจากข้อ 3.2.1 มาทดสอบความแข็งแรงของวัสดุตรึงโดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyzer) ที่มีหัวอะลูมิเนียม ทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ค่าความเร็ว 0.1 มิลลิเมตรต่อวินาที

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงและการใช้ซ้ำในการกำจัดน้ำมันดีเซล

3.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างขององค์ประกอบภายในเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซล

เตรียมเซลล์ตรึงตามวิธีข้อ 3.2.1 โดยใช้โคโคซานและความเข้มข้นของโคโคซานที่ได้รับเลือกจากข้อ 3.2.1 และเติมหัวเชื้อที่ได้รับเลือกจากข้อ 3.1 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ $OD_{600} \sim 1.8$ ลงในสารละลายโคโคซาน ซึ่งมีชุดการทดลองทั้งหมด 5 ชุด ได้แก่ 1) ชุดการทดลองที่เติมเม็ดเจลโคโคซาน 2) ชุดการทดลองที่เติมเม็ดเจลโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ 3) ชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงโคโคซาน 4) ชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ และ 5) ชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ที่เชื่อมผ่านการฆ่าเชื้อโดยนำเชื้อไปนั่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยมีชุดควบคุมคือชุดการทดลองที่ปราศจากการเติมแบคทีเรียและเม็ดเจลโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง โดยเติมเซลล์ตรึง ปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค TLC-FID ตามข้อ 3.4

3.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ในการกำจัดน้ำมันดีเซล

เตรียมเซลล์ตรึงตามวิธีข้อ 3.3.1 ที่ซึ่งมีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่แตกต่างกันคือ 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง โดยเติมเซลล์ตรึง ปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค TLC-FID ตามข้อ 3.4 มีชุดควบคุมคือ ชุดที่ปราศจากเซลล์ตรึง ต่อจากนั้นเลือกความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่ให้ผลประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลดีที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างของขนาดเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซล

เตรียมเซลล์ตรึงตามวิธีข้อ 3.3.1 ที่ซึ่งใช้ความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่ทำให้ผลการกำจัดน้ำมันดีเซลดีที่สุดจากข้อ 3.3.2 โดยเซลล์ตรึงมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแตกต่างกัน คือ 3, 5 และ

10 มิลลิเมตร จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงตาม ข้อ 3.3.2 ต่อจากนั้นเลือกเซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ให้ผลประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลดีที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.4 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซล

ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง แบ่งการทดลองเป็น 2 วิธี คือ การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงที่มีการเติมน้ำมันดีเซลทุก 2 วัน (ข้อ 3.3.4.1) และการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงที่มีการเติมน้ำมันดีเซลคงที่ คือ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อ 3.3.4.2)

3.3.4.1 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงที่มีการเติมน้ำมันดีเซลทุก 2 วัน ทำได้โดยเตรียมเซลล์ตรึงตามวิธีข้อ 3.3.1 ที่ซึ่งใช้ความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่ทำให้ผลการกำจัดน้ำมันดีเซลดีที่สุดจากข้อ 3.3.2 และใช้เซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ทำให้ผลการกำจัดน้ำมันดีเซลดีที่สุดจากข้อ 3.3.3 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และเก็บตัวอย่าง ทุก 2 วัน จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลองคือ 14 วัน มีชุดควบคุมคือชุดการทดลองที่เติมน้ำมันในน้ำปราศจากเซลล์ตรึง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค TLC-FID ตามข้อ 3.4

3.3.4.2 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงที่มีการเติมน้ำมันดีเซลคงที่ คือ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำตามวิธีในข้อ 3.3.4.1 แต่ใช้ความเข้มข้นน้ำมันดีเซลเริ่มต้นเป็น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ต้องเติมเพิ่มอีกจนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง

3.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลแตกต่างกัน

เตรียมเซลล์ตรึงตามวิธีข้อ 3.3.1 ที่ซึ่งใช้ความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่ทำให้ผลการกำจัดน้ำมันดีเซลดีที่สุดจากข้อ 3.3.2 และใช้เซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ทำให้ผลการกำจัดน้ำมันดีเซลดีที่สุดจากข้อ 3.3.3 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เติมนลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน และที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 800 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 14 วันด้วย โดยมีชุดควบคุมคือชุดการทดลองที่เติมน้ำมันในน้ำ

ปราศจากเซลล์ตรึง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค TLC-FID ตามข้อ 3.4

3.3.6 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการใช้ซ้ำสำหรับการกำจัดน้ำมันดีเซล

เตรียมเซลล์ตรึงตามวิธีข้อ 3.3.1 ที่ซึ่งใช้ความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่ทำให้ผลการกำจัดน้ำมันดีเซลดีที่สุดจากข้อ 3.3.2 และใช้เซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ทำให้ผลการกำจัดน้ำมันดีเซลดีที่สุดจากข้อ 3.3.3 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เติมนลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน หลังจากการกำจัดน้ำปนเปื้อนน้ำมันดีเซลรอบแรก ล้างเซลล์ตรึงด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 จากนั้นจึงถ่ายไปยังน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลในขวดใหม่ ใช้ซ้ำทั้งหมดอย่างน้อย 10 รอบ ตามวิธีดัดแปลงของ Lan และคณะ (2009) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค TLC-FID ตามข้อ 3.4 และชั่งน้ำหนักเม็ดเจลโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ในแต่ละรอบ มีชุดควบคุม คือชุดการทดลองที่เติมน้ำมันในน้ำปราศจากเซลล์ตรึงทำการทดลอง 3 ซ้ำ นอกจากนี้เก็บตัวอย่างเซลล์ตรึงในรอบที่ 0, 6 และ 12 เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของเซลล์ในวัสดุตรึง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.5 และเก็บตัวอย่างเซลล์ตรึงในรอบที่ 0 และ 12 เพื่อตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.6

3.4 สกัดน้ำมันและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค TLC-FID

3.4.1 สกัดน้ำมันจากตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาสกัดน้ำมันด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Oh และคณะ (2000) โดยเติมไฮเดียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.25 โมลาร์ ลงในตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสเตียริลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) แล้วเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดชั้นล่างที่เป็นส่วนของคลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมสเตียริลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบปั่นเหวี่ยง จนปริมาตรของสารละลายเหลือ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลือโดยวิธี TLC-FLD

นำสารละลายที่สกัดได้จำนวน 1 ไมโครลิตร หยดลงบนแท่งโครมาทอด จากนั้นวางแช่ในภาชนะที่อิมตัวด้วยไอของเฮกเซน (*n*-hexane) จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 10 เซนติเมตร (ประมาณ 25 นาที) จากนั้นนำไปวางในภาชนะที่อิมตัวด้วยไอของไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) 2 ครั้ง ครั้งแรกให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 6.5 เซนติเมตร และครั้งที่สอง 4 เซนติเมตร (ประมาณ 12 นาที และ 5 นาทีตามลำดับ) และไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล (dichloromethane/methanol) อัตราส่วน 95 : 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 1 เซนติเมตร (ประมาณ 1 นาที) โดยแต่ละครั้งของการเปลี่ยนตัวทำละลาย จะนำแท่งโครมาทอดระเหยแห้งในเครื่องอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบปริมาณไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ flame ionization detector (FID) ที่มีอัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของอากาศเป็น 2000 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราเร็วของการสแกนคือ 30 วินาที/โครมาทอด (Maruyama และคณะ, 2003) นำข้อมูลที่ได้เพื่อใช้คำนวณประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซล (เปอร์เซ็นต์) ดังสมการ

$$\text{ปริมาณน้ำมันที่ถูกกำจัด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำมันที่ถูกกำจัดในชุดการทดลองเริ่มต้น-วันสุดท้าย} \times 100}{\text{ปริมาณน้ำมันที่ถูกกำจัดในชุดทดลองเริ่มต้น}}$$

3.5 ตรวจสอบเชื้อในเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

เซลล์ที่เลี้ยงในรอบที่ 0, 6 และ 12 ถูกตรวจสอบการมีอยู่ของเชื้อในเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ ซึ่งตัวอย่างจะถูกแช่ในกลูตาแอลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นาน 1 – 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยเอทานอล (30, 50, 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นละ 10 นาที จากนั้นล้างด้วยเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทำตัวอย่างให้แห้งแล้วจึงเคลือบตัวอย่างด้วยทอง ตรวจสอบการมีอยู่ของเชื้อในเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

3.6 ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสง

เลเซอร์ (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM)

เซลล์ที่เลี้ยงในรอบที่ 0 และ 12 ถูกตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อ โดยใช้ชุด FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit (MolecularProbes, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ ทำได้โดยบดเซลล์ที่เลี้ยง 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยผ้า

ขาวบาง นำส่วนใดย้อมด้วย ชุด FilmTracer™ ป้อนาน 20 นาที ในที่มีด ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ (CLSM) ใช้ความยาวคลื่น 448 นาโนเมตร (สีเขียว) และ 543 นาโนเมตร (สีแดง)

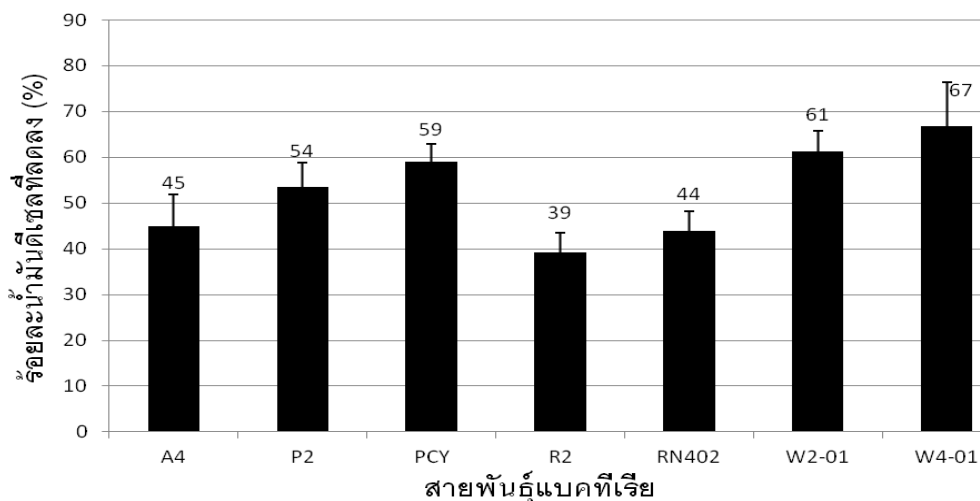
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดกรองแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดน้ำมันดีเซล

4.1.1 ความสามารถการกำจัดน้ำมันดีเซลของแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว CFMM ของแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.3) เมื่อบ่มนาน 5 วัน พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดอยู่ในช่วง 39 – 67 เปอร์เซ็นต์ โดย *Serratia* sp.W4-01 มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงสุดคือ 67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ *Rhodococcus* sp. W2-01, *Novosphingobium* sp. PCY, *Sphingobium* sp. P2, *Sphingomonas* sp. A4, *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 และ *Acinetobacter* sp. R2 ซึ่งมีประสิทธิภาพการกำจัด 61, 59, 54, 45, 44 และ 39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.1 โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันแต่ไม่เติมหัวเชื้อ ซึ่งผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นค่าที่ได้หักลบผลที่ได้จากชุดควบคุมแล้ว



รูปที่ 4.1 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ *Sphingomonas* sp. A4, *Sphingobium* sp. P2, *Novosphingobium* sp. PCY, *Acinetobacter* sp. R2, *Pseudoxanthomonas* sp. RN402, *Rhodococcus* sp. W2-01 และ *Serratia* sp.W4-01 ในอาหารเหลว CFMM เป็นเวลา 5 วัน

การนับจำนวนแบคทีเรียในวันเริ่มต้นและสุดท้ายของการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลการโดยวิธีการ drop plate ได้ผลดังตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่า *Serratia* sp. W4-01 สามารถเจริญได้ดี

ตารางที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซล

แบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM ที่มีน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (CFU ml ⁻¹)	
	วันที่ 0	วันที่ 5
<i>Sphingomonas</i> sp. A4	$7.7 \pm 0.6 \times 10^7$	$8.7 \pm 0.6 \times 10^7$
<i>Sphingobium</i> sp. P2	$9.0 \pm 0.6 \times 10^7$	$7.7 \pm 0.6 \times 10^6$
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	$9.7 \pm 0.6 \times 10^7$	$8.7 \pm 0.6 \times 10^6$
<i>Acinetobacter</i> sp. R2	$9.3 \pm 0.6 \times 10^7$	$8.0 \pm 1.0 \times 10^6$
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN 402	$7.0 \pm 1.0 \times 10^7$	$8.3 \pm 1.1 \times 10^7$
<i>Rhodococcus</i> sp. W2-01	$2.7 \pm 1.1 \times 10^7$	$4.0 \pm 1.0 \times 10^7$
<i>Serratia</i> sp. W4-01	$4.3 \pm 1.5 \times 10^7$	$5.3 \pm 0.6 \times 10^9$

4.1.2 ความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวเบื้องต้นของแบคทีเรีย

ในการทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวเบื้องต้นของแบคทีเรียเมื่อนำน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถวิเคราะห์ค่าแรงตึงผิว และวิเคราะห์ค่าดัชนีของอิมัลชัน ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าแรงตึงผิวของอาหารเหลว CFMM ที่มีน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน หลังผ่านการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย นาน 7 วัน

แบคทีเรีย	แรงตึงผิว (mN/M) น้ำมันดีเซล = แหล่งคาร์บอน
<i>Sphingomonas</i> sp. A4	46.0 ± 4.3
<i>Sphingobium</i> sp. P2	39.3 ± 1.1
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	42.0 ± 2.6
<i>Acinetobacter</i> sp. R2	52.3 ± 0.6
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN 402	49.0 ± 2.6
<i>Rhodococcus</i> sp. W2-01	52.3 ± 3.5
<i>Serratia</i> sp. W4-01	56.3 ± 1.5
Control	59.0 ± 0.0

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวของอาหาร CFMM ที่มีน้ำมันดีเซล 3 เปอร์เซ็นต์ เรียงจากมากไปหาน้อย ได้แก่ *Sphingobium* sp. P2, *Novosphingobium* sp. PCY, *Sphingomonas* sp. A4, *Pseudoxanthomonas* sp. RN 402, *Acinetobacter* sp. R2, *Rhodococcus* sp. W2-01 และ *Serratia* sp. W4-01 โดย *Sphingobium* sp. P2 สามารถลดแรงตึงผิวของอาหาร CFMM ที่มีน้ำมันดีเซล 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ได้มากที่สุดคือ ลดจาก 59 mN/M เหลือ 39 mN/M ส่วนผลการทดสอบค่าดรชนีอิมัลชัน ไม่พบการเกิดอิมัลชันระหว่างน้ำเลี้ยงเชื้อกับน้ำมันดีเซลในทั้ง 7 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

4.1.3 ลักษณะสมบัติการเกิดไฮโดรโฟบิกของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

ลักษณะสมบัติการเกิดไฮโดรโฟบิกของแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.3) ที่เกิดกับเฮกซะเดคเคนและน้ำมันดีเซล สามารถคำนวณค่าประสิทธิภาพการเกิดไฮโดรโฟบิก (ข้อ 3.1.2.3) ได้ผลดังแสดงตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าการเกิดไฮโดรโฟบิกระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียที่เรียกว่าเฮกซะเดคเคนและน้ำมันดีเซล

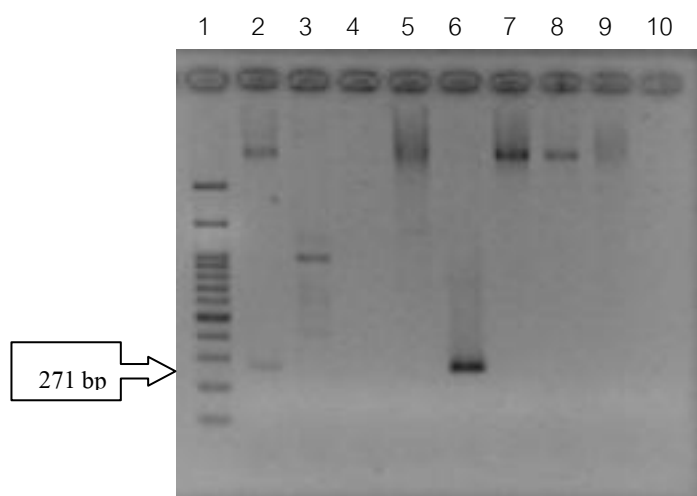
แบคทีเรีย	การเกิดไฮโดรโฟบิกกับไฮโดรคาร์บอน (เปอร์เซ็นต์)	
	เฮกซะเดคเคน	น้ำมันดีเซล
<i>Sphingomonas</i> sp. A4	64.3 ± 5.1	71.4 ± 3.7
<i>Sphingobium</i> sp. P2	0.8 ± 0.6	0.1 ± 0.3
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	22.4 ± 1.3	12.3 ± 1.3
<i>Acinetobacter</i> sp. R2	20.7 ± 2.6	16.5 ± 2.2
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN 402	10.3 ± 3.1	2.0 ± 1.4
<i>Rhodococcus</i> sp. W2-01	40.5 ± 5.2	36.3 ± 0.2
<i>Serratia</i> sp. W4-01	94.3 ± 2.3	81.1 ± 3.8

พบว่า *Serratia* sp. W4-01 สามารถเกิดไฮโดรโฟบิกทั้งกับเฮกซะเดคเคนและดีเซลได้มากที่สุด คือ 94 เปอร์เซ็นต์ และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการเกิดไฮโดรโฟบิกจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการเข้าถึงน้ำมันได้มากขึ้นจึงช่วยกำจัดน้ำมันได้ ดังนั้นการเกิดไฮโดรโฟบิกจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการใช้คัดกรองแบคทีเรียที่จะถูกนำไปตรึงในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์เพื่อกำจัดน้ำมันดีเซล

4.1.4 การมีอยู่ของยีนที่เกี่ยวข้องในการกำจัดน้ำมันดีเซลของแบคทีเรีย

เมื่อสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ ตามวิธีข้อ 3.1.4.1 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการกำจัดน้ำมันคือ เอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลส

ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เมื่อใช้ไพรเมอร์ ALK2-F และ ALK2-R (Kohno และคณะ, 2002) โดยออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่จำเพาะต่อยีน *alkM* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลส ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอนมากกว่า 12 อะตอม (Kohno และคณะ, 2002) ตามขนาดที่คาดหวังคือ 271 bp เมื่อใช้ดีเอ็นเอของ *Acinetobacter* sp. R2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ไพรเมอร์ ALK2 ที่จำเพาะกับยีน *alkM*

ช่องวิ่งที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของดีเอ็นเอจาก *Acinetobacter* sp. R2 (positive control จากสิทธิ ทาทอง, 2550)

ช่องวิ่งที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของดีเอ็นเอจาก *Sphingomonas* sp. A4

ช่องวิ่งที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของดีเอ็นเอจาก *Sphingobium* sp. P2

ช่องวิ่งที่ 5 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของดีเอ็นเอจาก *Novosphingobium* sp.

PCY

ช่องวิ่งที่ 6 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของดีเอ็นเอจาก *Acinetobacter* sp. R2

ช่องวิ่งที่ 7 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของดีเอ็นเอจาก *Pseudoxanthomonas* sp.

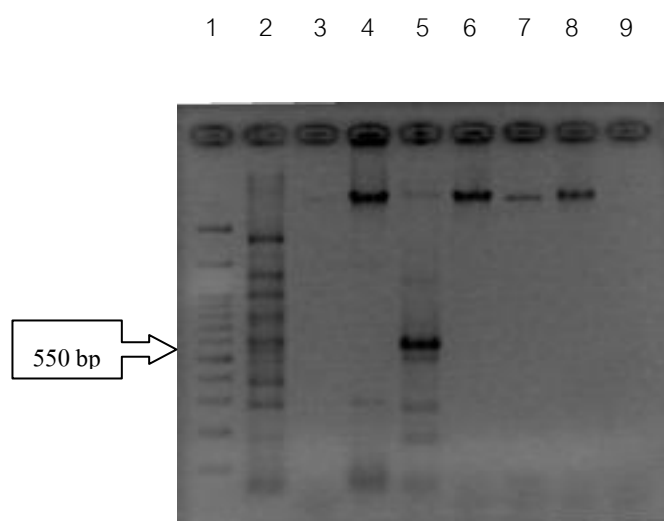
RN402

ช่องวิ่งที่ 8 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของดีเอ็นเอจาก *Rhodococcus* sp. W2-01

ช่องวิ่งที่ 9 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของดีเอ็นเอจาก *Serratia* sp. W4-01

ช่องวิ่งที่ 10 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ไม่เติมดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ใด

เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *alkB*-1F และ *alkB*-1R (Kloos และคณะ, 2006) ที่ซึ่งออกแบบจากลำดับกรดอะมิโน โดยคู่ไพรเมอร์นี้จำเพาะต่อยีน *alkB* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ Integral membrane non-heme iron monooxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 5 – 16 อะตอม ผลปรากฏว่าพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ตามขนาดที่คาดหวังคือ 550 bp เมื่อใช้ดีเอ็นเอ ของ *Acinetobacter* sp. R2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ อย่างไรก็ตามยังพบแถบดีเอ็นเอแบบที่ไม่จำเพาะเจาะจงบนช่องว่างจากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสที่ใช้ดีเอ็นเอจาก *Sphingomonas* sp. A4 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบอยู่มาก ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ *alkB*-1 ที่จำเพาะกับยีน *alkB*

ช่องว่างที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder

ช่องว่างที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Sphingomonas* sp. A4

ช่องว่างที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Sphingobium* sp. P2

ช่องว่างที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Novosphingobium* sp.

PCY

ช่องว่างที่ 5 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Acinetobacter* sp. R2

ช่องว่างที่ 6 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Pseudoxanthomonas* sp.

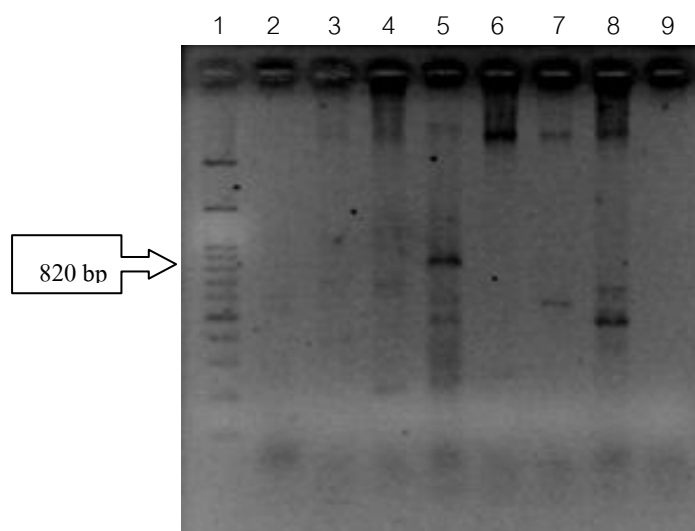
RN402

ช่องว่างที่ 7 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Rhodococcus* sp. W2-01

ช่องว่างที่ 8 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Serratia* sp. W4-01

ช่องว่างที่ 9 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสที่ไม่เติมดีเอ็นเอของแบบที่เรียสหายพันธุ์ใด

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ CYP153-F1 และ CYP153-R2 (Wang และคณะ, 2011) ที่ซึ่งออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์พี 450 ไซโตโครม โมโนออกซิจีเนส (P450 cytochrome monooxygenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 8 – 16 อะตอม (Beilen และคณะ, 2006) ผลปรากฏว่าพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ตามขนาดที่คาดหวังคือ 820 bp เมื่อใช้ดีเอ็นเอของ *Acinetobacter* sp. R2 เป็นแม่แบบ ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ CYP153 ที่จำเพาะกับยีน CYP153

ช่องวิ่งที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Sphingomonas* sp. A4

ช่องวิ่งที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Sphingobium* sp. P2

ช่องวิ่งที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Novosphingobium* sp. PCY

ช่องวิ่งที่ 5 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Acinetobacter* sp. R2

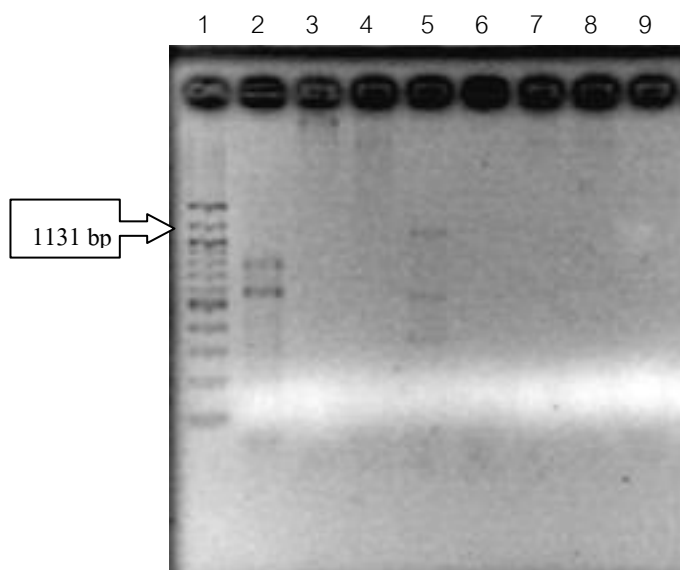
ช่องวิ่งที่ 6 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Pseudoxanthomonas* sp. RN402

ช่องวิ่งที่ 7 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Rhodococcus* sp. W2-01

ช่องวิ่งที่ 8 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Serratia* sp. W4-01

ช่องวิ่งที่ 9 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสที่ไม่ได้มีดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ใด

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เมื่อใช้ไพรเมอร์ *almA* wf และ *almA* wr (Liu และคณะ, 2011) ซึ่งจำเพาะต่อยีน *almA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ Flavin-binding monoxygenase ซึ่งเกี่ยวข้องในการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 22 – 36 อะตอม (Liu และคณะ, 2011) พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส ตามขนาดที่คาดหวังคือ 1131 bp เมื่อใช้ดีเอ็นเอของ *Acinetobacter* sp. R2 เป็นแม่แบบดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ *almA* ที่จำเพาะกับยีน *almA*

ช่องวิ่งที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Spingomonas* sp. A4

ช่องวิ่งที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Spingobium* sp. P2

ช่องวิ่งที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Novosphingobium* sp. PCY

ช่องวิ่งที่ 5 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Acinetobacter* sp. R2

ช่องวิ่งที่ 6 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Pseudoxanthomonas* sp. RN402

ช่องวิ่งที่ 7 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Rhodococcus* sp. W2-01

ช่องวิ่งที่ 8 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอจาก *Serratia* sp. W4-01

ช่องวิ่งที่ 9 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสที่ไม่ได้มีดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ใด

นอกจากนี้เมื่อใช้คูไพรเมอร์ ALK1-F และ ALK1-R; ALK3-F และ ALK3-R (Kohno และคณะ, 2002) ที่ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยมีความจำเพาะต่อยีน *alkB* และ *alkB1* ตามลำดับ โดยยีน *alkB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 5 – 16 อะตอม (Smith และคณะ, 2002) และ *alkB1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 12 – 26 และแบบสายโซ่กิ่ง (Whyte และคณะ 2002; Liu และคณะ, 2011) และเมื่อใช้คูไพรเมอร์ *alkB1-F* และ *alkB1-R*; *alkB2-F* และ *alkB2-R* (Whyte และคณะ, 2002) โดยออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อยีน *alkB1* และ *alkB2* ตามลำดับ ซึ่งยีน *alkB2* มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 12 – 26 อะตอม พบว่าไม่ปรากฏผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสตามขนาดที่คาดหวัง รวมทั้งผลจากคูไพรเมอร์ P450 F และ P450R (Wang และคณะ, 2010) ซึ่งออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลส ก็ไม่ปรากฏผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสตามขนาดที่คาดหวังเช่นกัน

จากตารางที่ 4.4 แสดงการเพิ่มปริมาณยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลส แต่คูไพรเมอร์ พบว่าเมื่อใช้คูไพรเมอร์ ALK2-F และ ALK2-R, *alkB-1F* และ *alkB-1R*, CYP153-F1 และ CYP153-R2 และ *almA wf* และ *almA wr* ปรากฏว่าพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส ตามขนาดที่คาดหวัง เมื่อใช้ดีเอ็นเอของ *Acinetobacter* sp. R2 เป็นแม่แบบตั้งรายละเอียดที่กล่าวข้างต้น

ตารางที่ 4.4 การเพิ่มปริมาณยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลส

ไพรเมอร์ แบคทีเรีย	ALK-1F/ ALK-1R (ยีน <i>alkB</i>)	ALK-2F/ ALK-2R (ยีน <i>alkM</i>)	ALK-3F/ ALK-3R (ยีน <i>alkB1</i>)	alkB-1F/ alkB-1R (ยีน <i>alkB</i>)	alkB1-F/ alkB1-R (ยีน <i>alkB1</i>)	alkB2-F/ alkB2-R (ยีน <i>alkB2</i>)	CYP153-F1/ CYP153-R2 (ยีน CYP153)	P450F/ P450R (ยีน CYP153)	almAwf/ almAwr (ยีน <i>almA</i>)
<i>Sphingomonas</i> sp. A4	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-
<i>Sphingobium</i> sp. P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp. R2	-	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN402	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus</i> sp. W2-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp. W4-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวัง

- หมายถึง ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวัง

-/+ หมายถึง พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวังและพบว่ามีการเกิดดีเอ็นเอแบบที่ไม่จำเพาะเจาะจง

การคัดกรองแบคทีเรียเพื่อใช้ผลิตเซลล์ตรึงที่มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซล

การคัดกรองแบคทีเรียเพื่อใช้ผลิตเซลล์ตรึงในงานวิจัยนี้ โดยพิจารณาความสามารถในการกำจัดน้ำมันดีเซลเป็นหลัก พบว่า *Serratia* sp. W4-01 สามารถกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สูงสุดคือ 66 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ *Serratia* sp. W4-01 สามารถเกิดไฮโดรโฟบิกกับดีเซลได้ 81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ถูกรวบรวมร่วมกัน ดังนั้นจึงคัดเลือก *Serratia* sp. W4-01 เพื่อนำมาตรึงในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ในขั้นตอนต่อไป ถึงแม้ว่า *Sphingobium* sp. P2 สามารถลดแรงตึงผิวของอาหาร CFMM ที่มีน้ำมันดีเซล 3 เปอร์เซ็นต์ ได้มากที่สุด และ *Acinetobacter* sp. R2 สามารถตรวจพบยีนประมวลรหัสที่เกี่ยวข้องในการกำจัดน้ำมัน แต่แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลและการเกิดไฮโดรโฟบิกกับดีเซลนั้นต่ำกว่า *Serratia* sp. W4-01 จึงไม่ได้ถูกเลือกใช้

4.2 การตรึงเซลล์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซล

การผลิตเซลล์ตรึงที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซล เมื่อได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลจากข้างต้น จากนั้นจึงต้องหาส่วนผสมในการขึ้นรูปวัสดุตรึงโดยแปรผันความเข้มข้นและชนิดแหล่งที่มาของโคโคซาน เพื่อให้ได้ส่วนผสมที่เหมาะสมสำหรับผลิตเซลล์ตรึง ซึ่งพิจารณาจากลักษณะและความแข็งแรงของวัสดุตรึง

4.2.1 ลักษณะเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์โดยแปรผันความเข้มข้นของโคโคซานและชนิดโคโคซาน

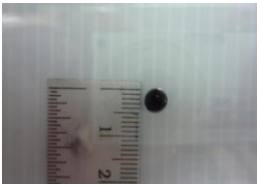
การขึ้นรูปเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ ซึ่งเตรียมโดยใช้โคโคซานจากกระดองปู เปลือกกุ้ง และแกนหมึก ที่ความเข้มข้น 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายโคโคซาน โดยนำโคโคซานละลายใน 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กรดแอสติค เติมคาร์บอนกัมมันต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หยดส่วนผสมลงใน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์โดยให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเม็ด 3 มิลลิเมตร พบว่าส่วนผสมที่ทำให้เม็ดเจลมีลักษณะที่สมบูรณ์คือ มีลักษณะกลม ขนาดสม่ำเสมอ ไม่แตกง่าย ได้แก่ เม็ดเจลที่ขึ้นรูปจากโคโคซานจากแกนหมึก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ลักษณะเม็ดและภาพเม็ดไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ เมื่อแปรผันชนิดและความเข้มข้นของไคโตซาน

ไคโตซานจากกระดองปู

ความเข้มข้นไคโตซาน (เปอร์เซ็นต์)	ภาพเม็ดเจล ไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์	ลักษณะเม็ดเจล
2		เม็ดเจลไม่ได้รูป แดง่าย ยุ่ย
3		เม็ดเจลกลม ขนาดสม่ำเสมอ นิ่ม มีแตกบ้างเล็กน้อย
4		เม็ดไม่กลม นิ่ม ไม่แตกแต่ไม่ สามารถก่อรูปขนาดเล็กได้

ไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

ความเข้มข้นไคโตซาน (เปอร์เซ็นต์)	ภาพเม็ดเจล ไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์	ลักษณะเม็ดเจล
2		เม็ดเจลกลม แต่อ่อนนิ่มมาก แตกง่าย อาจเป็นเพราะเนื้อ เจลเป็นฟองอากาศภายใน
3	-	ไม่สามารถก่อรูปได้ เนื้อเจล เหนียวมาก ไม่ค่อยละลาย
4		

ไคโตซานจากแกนหมึก

ความเข้มข้นไคโตซาน (เปอร์เซ็นต์)	ภาพเม็ดเจล ไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์	ลักษณะเม็ดเจล
2		เม็ดเจลกกลม ขนาดสม่ำเสมอ ค่อนข้างนิ่ม
3		เม็ดเจลค่อนข้างกลม แต่มีหาง
4		เม็ดเจลไม่ได้รูป หางยาว เม็ดเจลแข็งขึ้น

4.2.2 ความแข็งแรงของวัสดุตั้ง

เมื่อขึ้นรูปวัสดุตั้งโดยใช้ไคโตซานทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ไคโตซานจากกระดองปู เปลือกกุ้ง และแกนหมึก ซึ่งแปรผันความเข้มข้นไคโตซาน จากนั้นจึงนำวัสดุตั้งที่มีลักษณะที่สามารถเป็นวัสดุตั้งได้มาทดสอบความแข็งแรงของวัสดุตั้งโดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyzer) ที่มีหัวทรงกระบอกขนาด 6 มิลลิเมตร ค่าความเร็ว 0.1 มิลลิเมตรต่อวินาที ได้ผลคือเม็ดเจลที่ขึ้นรูปโดยใช้ไคโตซานจากแกนหมึกที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สามารถทนต่อแรงกดได้ดีที่สุด คือ 11.8 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความทนทานของเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ที่แปรผันชนิดและความเข้มข้นของโคโตซานต่อแรงกดโดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส

ชนิดโคโตซาน	ความเข้มข้นโคโตซาน (เปอร์เซ็นต์)	ความทนทานของเม็ดเจลต่อแรงกด (กรัม)
ปู	3	10.1 ± 1.1
กุ่ม	2	10.2 ± 1.5
หมึก	2	11.8 ± 0.9
	3	10.7 ± 0.8

ผลการทดลองพบว่าเม็ดเจลที่ขึ้นรูปโดยใช้โคโตซานจากแกนหมึกที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สามารถขึ้นรูปได้เม็ดเจลที่มีลักษณะที่ดี คือกลม มีขนาดสม่ำเสมอ และยืดหยุ่นได้เล็กน้อย จากนั้นนำไปทดสอบความแข็งแรงของวัสดุตรงพบว่า สามารถทนต่อแรงกดได้ดีที่สุดคือ 11.8 กรัม ดังนั้นจึงได้เลือกใช้โคโตซานจากแกนหมึกที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อใช้ขึ้นรูปวัสดุตรง

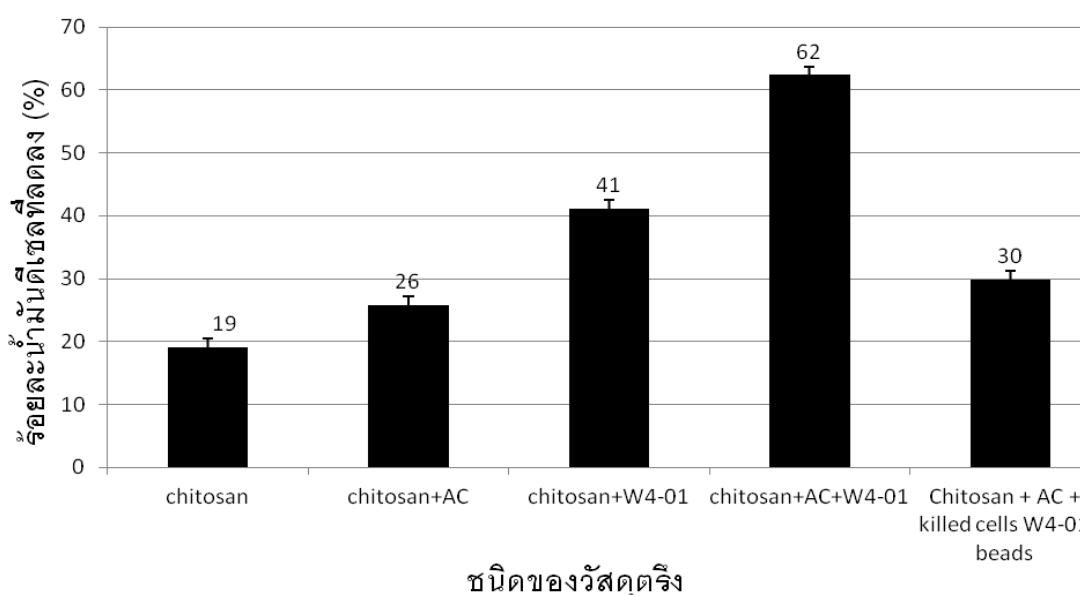
เมื่อได้ส่วนผสมของวัสดุตรงที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 4.2 จึงนำแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกคือ *Serratia* sp. W4-01 ตรงในเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ ซึ่งใช้วิธีตามข้อ 3.2.1 โดยนำ *Serratia* sp. W4-01 แชนวอลอยใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ $OD_{600} \sim 1.8$ ใน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายโคโตซานจากแกนหมึก ซึ่งละลายใน 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กรดอะซิติก เติมคาร์บอนกัมมันต์โดยให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หยดส่วนผสมลงใน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร จากนั้นนำเซลล์ตรงที่ผลิตได้ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรงซึ่งให้ผลการทดลองดังแสดงในข้อต่อไป

4.3 ประสิทธิภาพเซลล์ตรงและการใช้ซ้ำในการกำจัดน้ำมัน

4.3.1 ประสิทธิภาพเซลล์ตรงที่มีความแตกต่างขององค์ประกอบภายในเซลล์ตรงในการกำจัดน้ำมันดีเซล

การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรงในที่มีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พบว่า

ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำมันดีเซลของชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงสุดคือ 62 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงไคโตซาน ชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ชุดการทดลองที่เติมเม็ดเจลไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ และชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงไคโตซาน คือ 41, 30, 26 และ 19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6



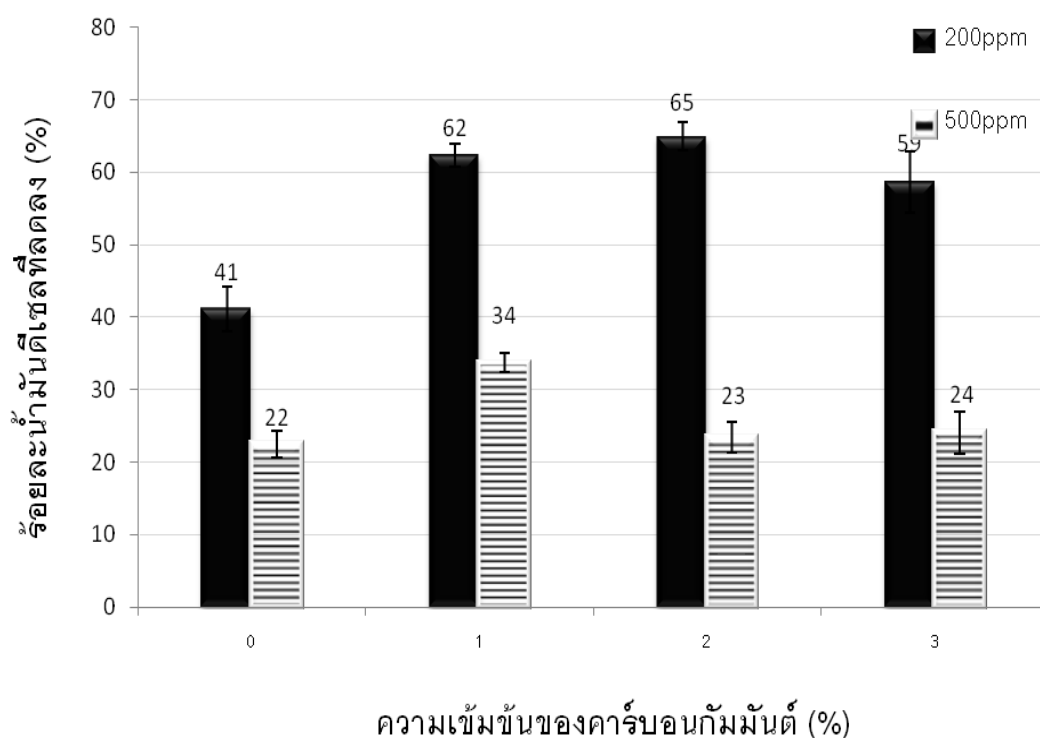
รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรของเซลล์ตรึงปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในอาหารเหลว CFMM เป็นเวลา 5 วัน

จากผลการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลโดยเซลล์ตรึงไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์มีประสิทธิภาพสูงกว่าชุดการทดลองอื่น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รวมทั้งเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมวัสดุตรึงไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ที่ปราศจากเชื้อ แสดงว่าน้ำมันดีเซลที่ลดลงส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของ *Serratia* sp. W4-01 ที่ถูกตรึง และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองเซลล์ตรึงไคโตซานที่ปราศจากคาร์บอนกัมมันต์ แสดงว่าคาร์บอนกัมมันต์ช่วยดูดซับน้ำมันดีเซลเข้ามาซึ่งทำให้ *Serratia* sp. W4-01 กำจัดน้ำมันดีเซลได้มากขึ้น นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองที่เติมวัสดุตรึงไคโตซานกับชุดการทดลองที่เติมวัสดุตรึงไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ พบว่าสามารถดูดซับน้ำมันดีเซลได้บางส่วน โดยชุดการทดลองที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วมสามารถดูดซับน้ำมันดีเซลได้มากกว่าชุดการทดลองที่เติมวัสดุตรึงไคโตซาน อย่างไรก็ตามทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันได้น้อยที่สุด

4.3.2 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ในการกำจัดน้ำมันดีเซล

การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงโดยเติมเซลล์ตรึงซึ่งใช้เม็ดไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ ที่มีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่แตกต่างกันคือ 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เม็ดเจลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงที่มีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงสุดคือ 67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเซลล์ตรึงที่มีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ 2, 3 และ 0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) คือ 62, 59 และ 41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงที่มีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ 34 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เซลล์ตรึงที่มีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ 3, 2 และ 0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลคือ 24, 23 และ 22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7

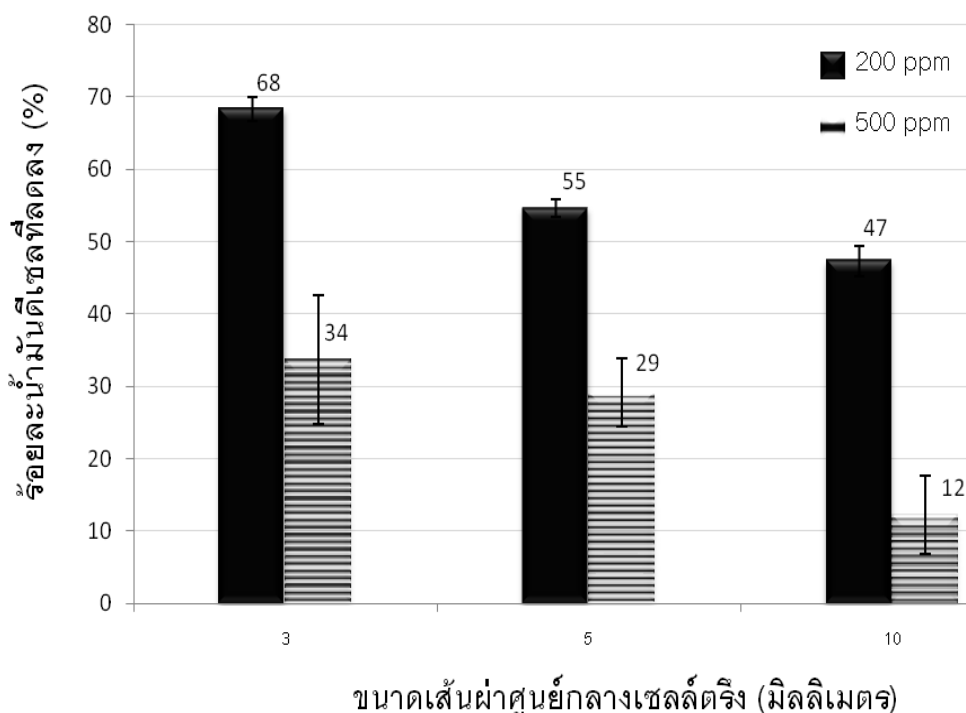
การใช้คาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วมในการตรึงเซลล์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลแต่โครงสร้างเซลล์ตรึงที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วมความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จะต่ำกว่าที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) อย่างไรก็ตามการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ระหว่างเซลล์ตรึงที่มีคาร์บอนกัมมันต์ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงที่มีคาร์บอนกัมมันต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพสูงกว่าเซลล์ตรึงที่มีคาร์บอนกัมมันต์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ดังนั้นจึงได้เลือกที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนกัมมันต์ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นตัวร่วมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.7 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรของเซลล์ตรึงที่มีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่แตกต่างกันปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในอาหารเหลว CFMM เป็นเวลา 5 วัน

4.3.3 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างของขนาดเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซล

การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงโดยเติมเซลล์ตรึงที่มีความแตกต่างของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3, 5 และ 10 มิลลิเมตร ปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ 68 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ เซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ 34 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ เซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.8



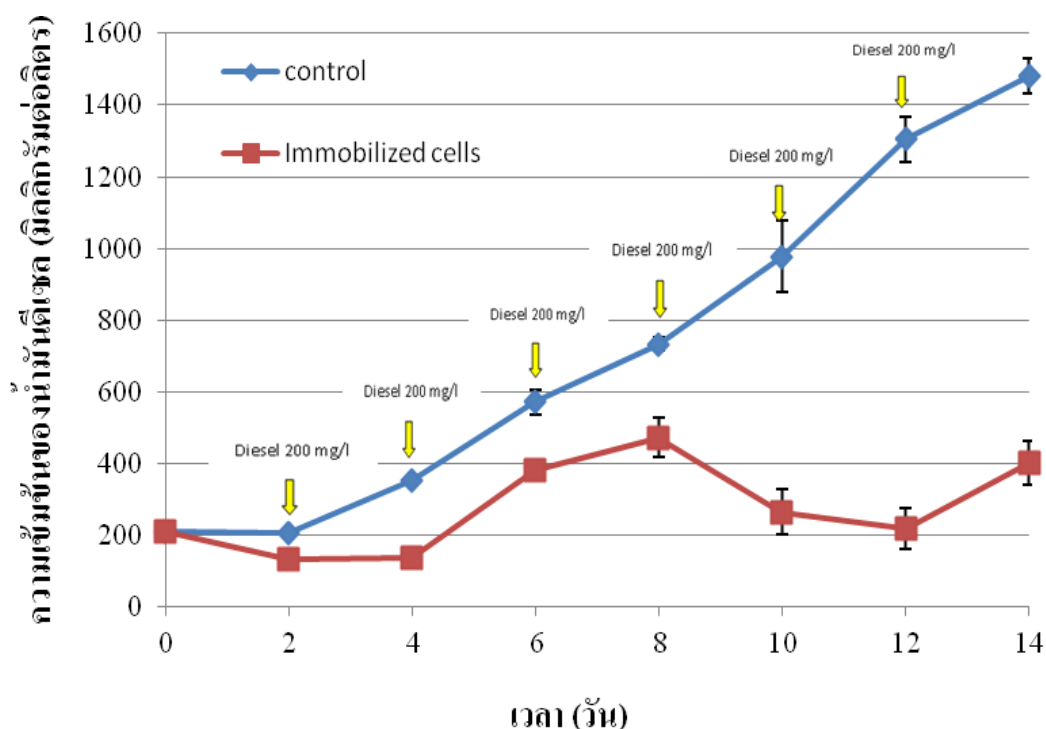
รูปที่ 4.8 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรของเชลล์ตรงที่มีขนาดเชลล์ตรงแตกต่างกัน ปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในอาหารเหลว CFMM เป็นเวลา 5 วัน

จากผลการทดลอง พบว่าเชลล์ตรงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงกว่าเชลล์ตรงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 10 มิลลิเมตร อาจเนื่องจากเชลล์ตรงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับน้ำมันดีเซลมากกว่าเชลล์ตรงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 10 มิลลิเมตร จึงทำให้น้ำมันดีเซลมีโอกาสถูกกำจัดได้มากขึ้น ดังนั้นจึงได้เลือกเชลล์ตรงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป นอกจากนี้ยังมีการปรับปริมาณเชลล์ตรงเริ่มต้นจาก 3 มิลลิกรัม เพิ่มขึ้นเป็น 5 มิลลิกรัม เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลในการทดลองขั้นตอนอื่น

4.3.4 ประสิทธิภาพเชลล์ตรงในการกำจัดน้ำมันดีเซล

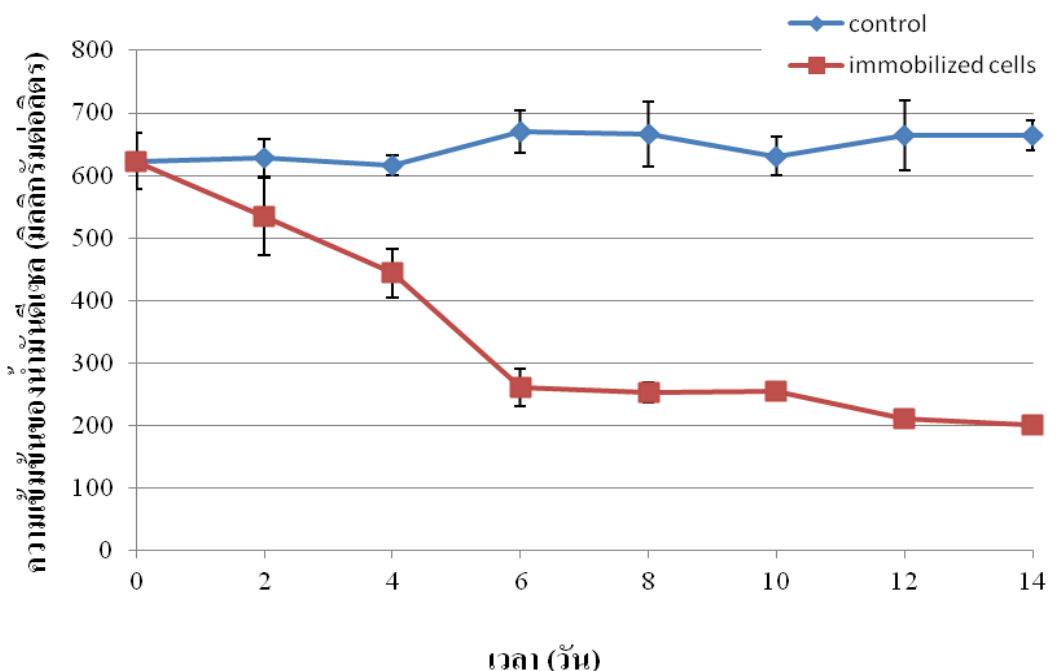
การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเชลล์ตรงโดยเติมเชลล์ตรงซึ่งใช้เม็ดเจลที่มีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีการเติมน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุก 2 วัน จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลองคือ 14 วัน พบว่าชุดที่ปราศจากเชลล์ตรงมีปริมาณน้ำมันดีเซลเพิ่มขึ้นเมื่อเติมน้ำมันดีเซล ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีเชลล์ตรงมีปริมาณน้ำมันเหลือน้อยกว่าในชุดควบคุมตลอดการทดลอง โดยชุดควบคุมคือ ชุดที่ปราศจากเชลล์ตรง

จากรูปที่ 4.9 เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ถูกเพิ่มตลอดจนสิ้นการทดลอง และพบว่าหลังจากวันที่ 4 ปริมาณน้ำมันดีเซลในชุดการทดลองเพิ่มขึ้นใกล้เคียงปริมาณที่เติมลงไป แต่เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณน้ำมันดีเซลสามารถลดลงได้อีก ซึ่งคาดว่าเนื่องจากน้ำมันดีเซลในเซลล์ตรึงถูกกำจัดโดย *Serratia* sp. W4-01 จึงทำให้เซลล์ตรึงสามารถดูดซับน้ำมันดีเซลเข้าสู่ภายในเซลล์ตรึงได้อีก



รูปที่ 4.9 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในอาหารเหลว CFMM ที่มีการเติมดีเซล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน

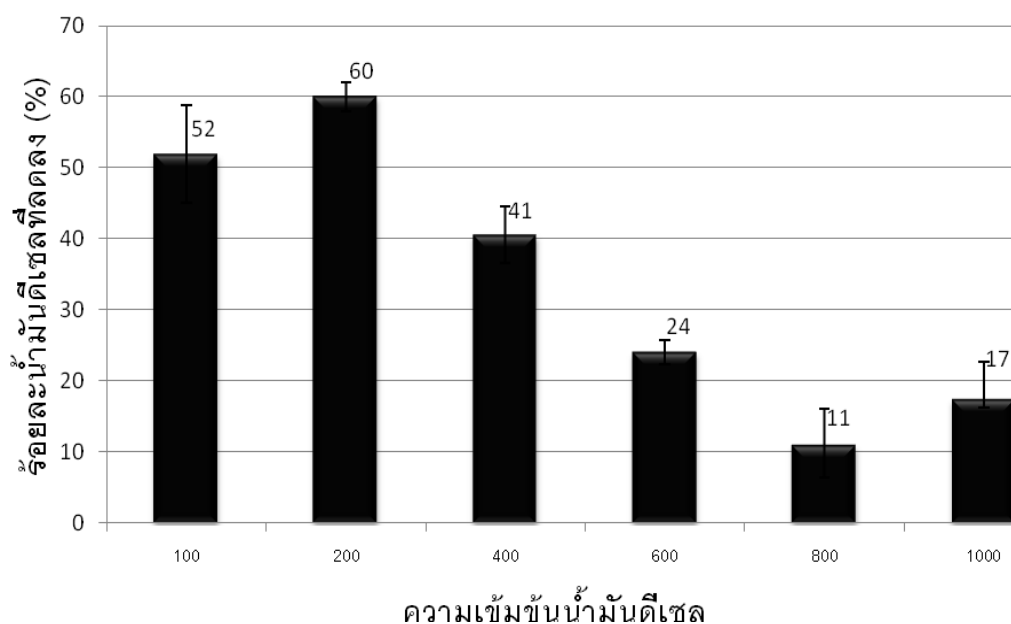
ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงโดยเติมเซลล์ตรึงปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่เติมเพิ่มอีกจนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง พบว่าชุดควบคุมที่ปราศจากเซลล์ตรึงมีปริมาณน้ำมันคงที่ประมาณ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในชุดการทดลองพบว่า ปริมาณน้ำมันลดลงจาก 600 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือประมาณ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบเป็นประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 6 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในอาหารเหลว CFMM ที่มีความเข้มข้นน้ำมันดีเซล 600 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน

4.3.5 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำมัน

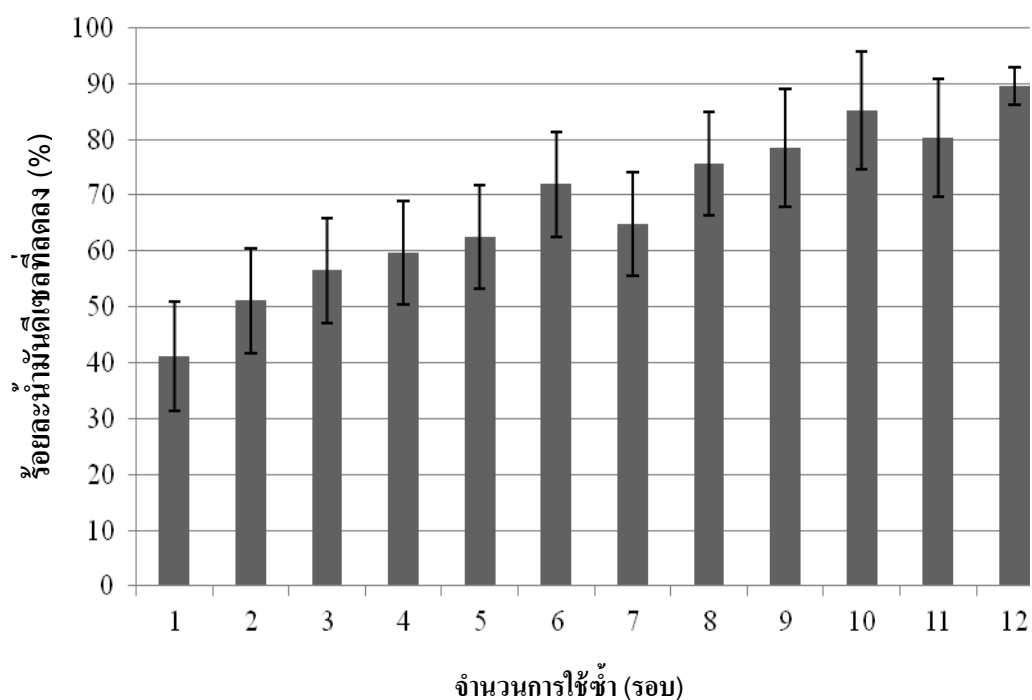
การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงโดยเติมเซลล์ตรึง ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพสามารถกำจัดน้ำมันดีเซลได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระดับความเข้มข้นน้ำมันดีเซล 100 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพสามารถกำจัดน้ำมันดีเซลได้ดีที่สุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 100, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 นอกจากนี้เซลล์ตรึงสามารถกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 800 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 36 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายใน 14 วัน



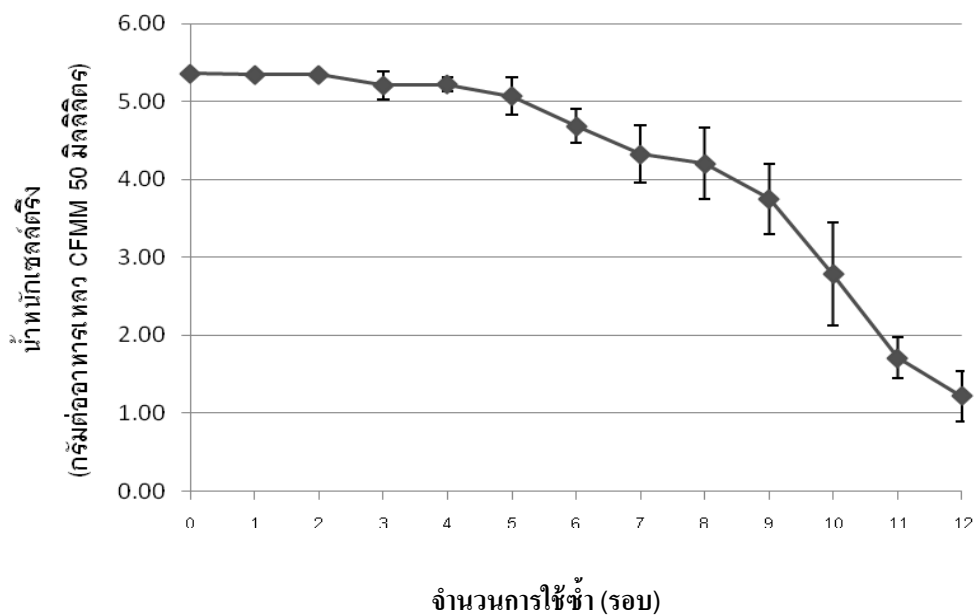
รูปที่ 4.11 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในอาหารเหลว CFMM ที่มีความเข้มข้นน้ำมันดีเซลที่แปรผันความเข้มข้น ปมเป็นระยะเวลา 7 วัน

4.3.6 ประสิทธิภาพเซลล์ตรึงในการใช้ซ้ำสำหรับการกำจัดน้ำมันดีเซล

การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงในการใช้ซ้ำ โดยเติมเซลล์ตรึง ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 วัน จำนวน 12 รอบ ซึ่งเป็นเวลารวม 48 วัน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.12 ซึ่งพบว่าเซลล์ตรึง มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลเพิ่มขึ้นจนถึงจำนวนรอบที่ 12 ซึ่งมีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลอยู่ในช่วง 41 - 90 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากเซลล์ตรึงมีน้ำหนักลดลงอย่างมากจึงได้หยุดการทดลองไว้ที่จำนวนรอบที่ 12 ดังแสดงในรูปที่ 4.13



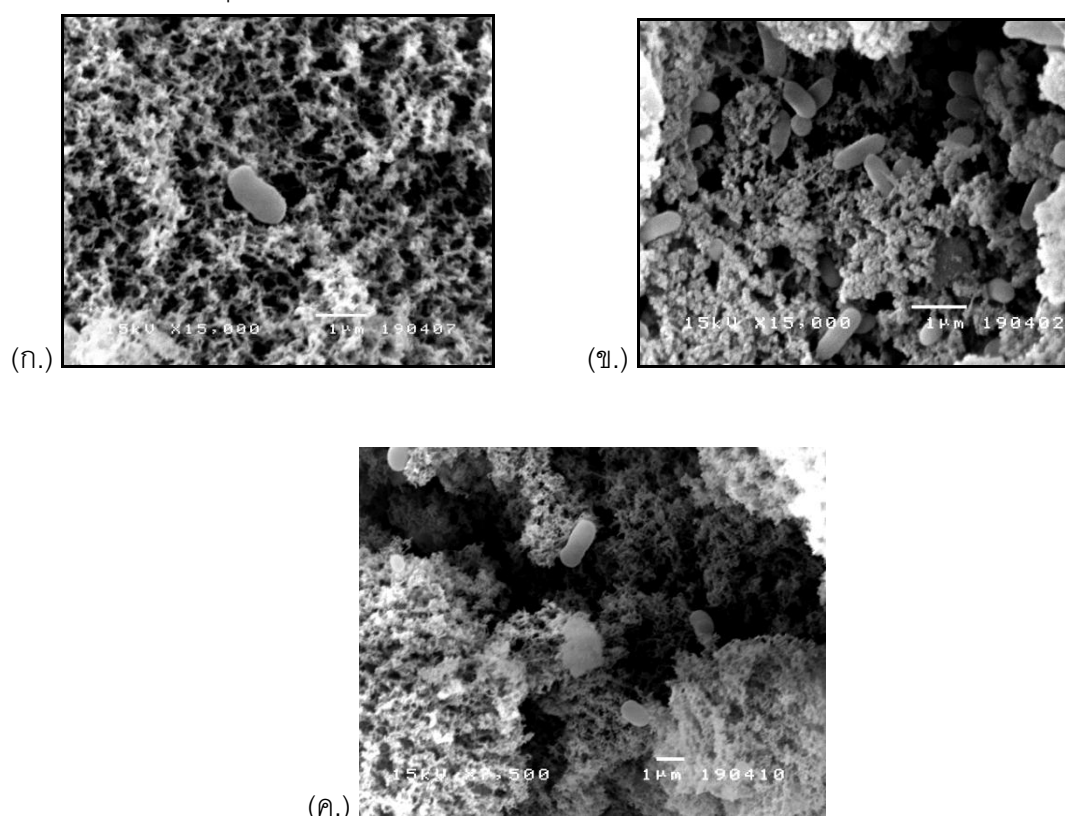
รูปที่ 4.12 ประสิทธิภาพการใช้น้ำมันดีเซลในการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึง ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในอาหารเหลว CFMM ที่มีความเข้มข้นน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 4.13 น้ำหนักเซลล์ตรึงที่ใช้ในการกำจัดน้ำมันดีเซลในแต่ละรอบการใช้ซ้ำ

4.4 การตรวจวิเคราะห์ *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

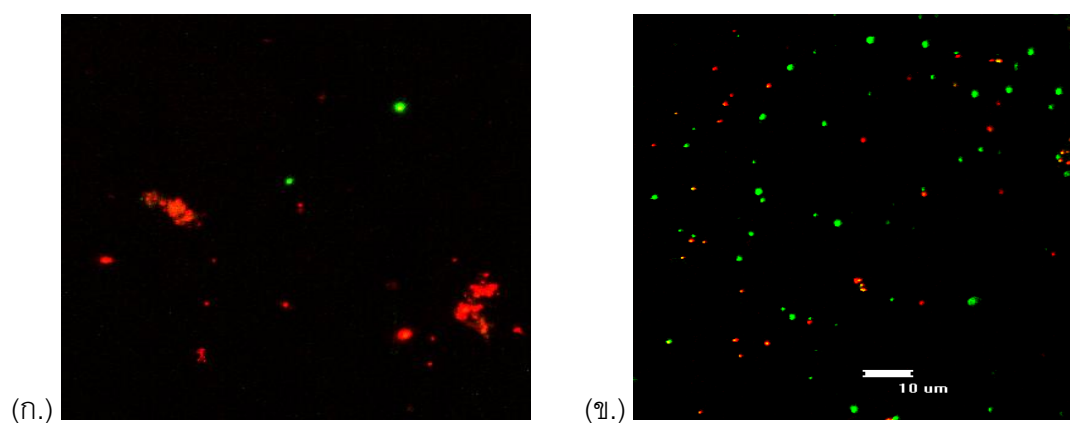
เมื่อนำเซลล์ตรึงก่อนการทดสอบ และหลังการทดสอบรอบที่ 6 และ 12 ตรวจวิเคราะห์ *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ปรากฏว่าเซลล์ตรึงก่อนการทดสอบ (รูปที่ 4.14 (ก.)) ตรวจพบเซลล์ได้น้อย แต่หลังจากผ่านการใช้งาน 6 รอบ (รูปที่ 4.14 (ข.)) พบว่ามีปริมาณเซลล์ที่ตรวจพบได้มากขึ้น แสดงว่าเมื่อผ่านการใช้งาน *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ สามารถเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว CFMM ที่มีน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ในรอบที่ 12 (รูปที่ 4.14 (ค.)) ปรากฏว่าพบ *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์น้อยกว่าในรอบที่ 6 อาจเนื่องจากโครงสร้างภายในของเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์แตกออก ทำให้ *Serratia* sp. W4-01 บางส่วนหลุดออกจากเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์



รูปที่ 4.14 *Serratia* sp. W4-01 ที่ถูกตรึงในเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก.) เซลล์ตรึงก่อนการทดสอบ (ข.) เซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งาน 6 รอบ และ (ค.) เซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งาน 12 รอบ

4.5 การมีชีวิตรอดของ *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

จากการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของ *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ของเซลล์ตรึงก่อนการทดสอบ และหลังการทดสอบรอบที่ 12 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.15 ซึ่งจุดสีเขียวที่ปรากฏคือ เชื้อที่ยังคงมีชีวิต และจุดสีแดงคือ เชื้อที่ไม่มีชีวิต พบว่าเซลล์ตรึงก่อนการทดสอบ (รูปที่ 4.15 (ก.)) ปรากฏจุดสีเขียวน้อย และเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งาน 12 รอบ (รูปที่ 4.15 (ข.)) ปรากฏจุดสีเขียวเพิ่มขึ้นมากกว่าเซลล์ตรึงก่อนการทดสอบ จากผลดังกล่าวแสดงว่ามีเซลล์ที่มีชีวิตรอดหลังผ่านกระบวนการตรึงน้อย แต่เมื่อผ่านการใช้งาน 12 รอบพบว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นจึงปรากฏว่ามีเซลล์ที่มีชีวิตรอดมากขึ้น



รูปที่ 4.15 การมีชีวิตของ *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ (ก.) เซลล์ตรึงก่อนการทดสอบ และ (ข.) เซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งาน 12 รอบ

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้เกี่ยวข้องกับการคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดน้ำมันดีเซล รวมทั้งพิจารณาลักษณะสมบัติบางประการที่เป็นประโยชน์ต่อการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เช่น ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิว การเกิดไฮโดรโฟบิกของเซลล์ต่อน้ำมันและพิจารณาการมีเอ็นที่เกี่ยวกับการกำจัดน้ำมันดีเซลเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ตรวจติดตามประชากรแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลได้ในอนาคต นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังมุ่งเน้นศึกษาการตรึงเซลล์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลไว้ในเม็ดโคโนซานที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วม เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลและสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้

การคัดกรองแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Sphingomonas* sp. A4, *Sphingobium* sp. P2, *Novosphingobium* sp. PCY, *Acinetobacter* sp. R2, *Pseudoxanthomonas* sp. RN402, *Rhodococcus* sp. W2-01 และ *Serratia* sp. W4-01 เพื่อคัดเลือกเพียง 1 สายพันธุ์ สำหรับใช้ผลิตเซลล์ตรึงที่มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซล โดยมีเกณฑ์ในการพิจารณาคือ ความสามารถในการกำจัดน้ำมันดีเซล ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิว ความสามารถในการเกิดไฮโดร-โฟบิกของเซลล์ต่อน้ำมันดีเซล และการมีเอ็นที่เกี่ยวกับการกำจัดน้ำมันดีเซล

ความสามารถในการกำจัดน้ำมันดีเซล พบว่า *Serratia* sp. W4-01 สามารถกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว CFMM ได้ 67 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 5 วัน ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kalme และคณะ (2008) ที่ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ของ *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 และ *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386 พบว่าในระยะเวลา 49 วัน จุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และภายในระยะเวลา 7 วัน พบว่า *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 และ *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซล ประมาณ 45 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์มีปริมาณมากขึ้นแปรผันตามความสามารถในการกำจัดน้ำมันดีเซล เช่นเดียวกับผลการเจริญที่เพิ่มขึ้นของ *Serratia* sp. W4-01 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แต่เนื่องจากการใช้ความเข้มข้นน้ำมันดีเซลที่สูง จึงทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของ *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 และ *Nocardia*

hydrocarbonoxydans NCIM 2386 ต่ำกว่า *Serratia* sp.W4-01 นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการเติม TritonX-100 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวจะมีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลได้มากกว่าชุดที่ปราศจากการเติมสารลดแรงตึงผิว ซึ่งแสดงว่าสารลดแรงตึงผิวมีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Whang และคณะ (2008) พบว่าการเติมสารลดแรงตึงชีวภาพ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลเป็น 94 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับชุดการทดลองที่ปราศจากการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่ามีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยนี้จึงได้ใช้ความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวเป็นหนึ่งในเกณฑ์พิจารณาการคัดกรองแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบอีกด้วย

ด้านการผลิตสารลดแรงตึงผิว พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวของอาหาร CFMM ที่มีน้ำมันดีเซล 3 เปอร์เซ็นต์ เรียงจากมากไปหาน้อย ได้แก่ *Sphingobium* sp. P2, *Novosphingobium* sp. PCY, *Sphingomonas* sp. A4, *Pseudoxanthomonas* sp. RN 402, *Acinetobacter* sp. R2, *Rhodococcus* sp. W2-01 และ *Serratia* sp. W4-01 และจากผลการทดสอบค่าดรขหนี้อิมัลชันของทั้ง 7 สายพันธุ์ ไม่พบการเกิดอิมัลชันในทุกสายพันธุ์ จากผลการทดลองพบว่า *Sphingobium* sp. P2 ที่มีความสามารถลดแรงตึงผิวได้มากที่สุด ซึ่งเป็นลักษณะสมบัติหนึ่งที่เป็นประโยชน์ต่อความสามารถในการกำจัดน้ำมันดีเซล (Rosenberg และ Ron, 2001) แต่กลับพบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลของ *Sphingobium* sp. P2 มีเพียง 54 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่านอกเหนือจากความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิว แบคทีเรียยังมีความสามารถอื่นที่เอื้อประโยชน์ในการกำจัดน้ำมันดีเซล จากงานวิจัยของ Lin และคณะ (2009) พบว่านอกจากความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวและการก่ออิมัลชัน ความสามารถในการเกิดไฮโดรโฟบิกเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สนับสนุนให้แบคทีเรียสามารถกำจัดน้ำมันดีเซลได้เพิ่มขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบความสามารถในการเกิดไฮโดรโฟบิกพบว่า *Serratia* sp. W4-01 ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลได้สูงที่สุดในงานวิจัยนี้ ยังมีความสามารถในการเกิดไฮโดรโฟบิกกับน้ำมันดีเซลได้สูงที่สุดอีกด้วย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Vyas และ Dave (2011) ได้รายงานว่ามีเวลาผ่านไป *Nocardia otitidiscaviarum* 6471 สามารถเกิดไฮโดรโฟบิกได้เพิ่มขึ้น และสามารถกำจัดน้ำมันดีเซลได้มากขึ้นด้วย ซึ่งสมบัติการเกิดไฮโดรโฟบิกของแบคทีเรียอาจจะช่วยให้ไขมันดิบเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีไขมันจะเปลี่ยนผนังเซลล์ให้เป็นแบบไม่ชอบน้ำทำให้สามารถนำไขมันซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น

อีกปัจจัยหนึ่งที่ใช้ในการพิจารณาเลือกแบคทีเรียที่จะนำไปผลิตเซลล์ตรึงก็คือ การตรวจสอบการมียีนที่สังเคราะห์เอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลส ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการกำจัดน้ำมันดีเซล ได้แก่ ยีน *alkB*, *alkB1*, *alkB2*, *alkM*, *CYP153* และ *almA* (Kohno และคณะ, 2002; Smith และคณะ, 2002; Beilen และคณะ, 2006; Lui และคณะ, 2011) พบว่ามีเพียง *Acinetobacter* sp. R2 เท่านั้น ที่ตรวจพบยีน *alkM*, *CYP153* และ *almA* อย่างไรก็ตาม *Serratia* sp. W4-01 ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดน้ำมันดีเซลได้สูงที่สุดในงานวิจัยนี้ กลับตรวจสอบไม่พบยีนที่มีความสัมพันธ์กับการกำจัดน้ำมันดีเซลจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ทั้ง 9 คู่ไพรเมอร์ ซึ่งคาดว่าทั้ง 9 คู่ไพรเมอร์ มีความครอบคลุมยีนที่เกี่ยวข้องในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่มีรายงานอยู่ในปัจจุบัน และจากการที่ Wang และคณะ (2010) กล่าวว่าการศึกษาสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในที่ที่มีน้ำมันแต่ไม่สามารถตรวจพบยีน *alkB* ได้ อาจเนื่องจากมีเอนไซม์แอลเคนโมโนออกซิจีเนสอื่นที่ย่อยสลายน้ำมันแทนเอนไซม์ที่สังเคราะห์จากยีน *alkB* หรืออาจเกิดจากความจำเพาะกับไพรเมอร์ ซึ่งยังไม่มีครอบคลุมกับยีนที่เกี่ยวข้องในการกำจัดน้ำมันดีเซลของ *Serratia* sp. W4-01 ดังเช่นการทดลองของ Kohno และคณะ (2002) ที่มีความจำเป็นในการออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่สำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสำหรับตรวจสอบยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลส เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบกับแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอลเคนทั้งที่รู้จักและสายพันธุ์ใหม่

จากการพิจารณาคัดเลือกแบคทีเรียเพียง 1 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการผลิตเซลล์ตรึง โดยพิจารณาจากข้อมูลที่กำลังกล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้เลือก *Serratia* sp. W4-01 เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้สูงที่สุดในงานวิจัยนี้ โดยความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลถูกใช้เป็นเกณฑ์หลักในการพิจารณาคัดเลือกแบคทีเรีย รวมทั้ง *Serratia* sp. W4-01 ยังมีความสามารถในการเกิดไฮโดรโฟบิกกับน้ำมันดีเซลได้สูงที่สุดด้วย

งานวิจัยนี้สนใจการตรึงเซลล์ในเม็ดโคโคโตซานที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วม เนื่องจากโคโคโตซานเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถยึดเกาะกับเซลล์จุลินทรีย์ได้ และขึ้นรูปเม็ดเจลได้ (Dutta และคณะ, 2004) ซึ่งเป็นลักษณะสมบัติที่ดีของวัสดุตรึง นอกจากนี้คาร์บอนกัมมันต์ซึ่งมีโครงสร้างมีรูพรุนและมีพื้นที่ผิวมาก ทำให้สามารถดูดซับสารต่างๆ ได้ดี (Zhao และคณะ, 2008) ซึ่งส่วนผสมของวัสดุตรึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับการตรึงเซลล์ ดังนั้นจึงได้คำนึงถึงชนิดของโคโคโตซานที่จำแนกตามแหล่งที่มาในการผลิต ได้แก่ โคโคโตซานจากกระดองปู แกนหมึก และเปลือกกุ้ง ซึ่งมีโครงสร้างในการจัดเรียงตัวของสายโมเลกุลแตกต่างกัน จึงอาจทำให้มีสมบัติต่างกัน (Shepherd และ Falshaw, 1997) รวมทั้งคำนึงถึงความเข้มข้นของโคโคโตซานในการขึ้นรูปเม็ดวัสดุ

ตริง พบว่าการขึ้นรูปเม็ดโคโตซานจากแกนหมึก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่มีคาร์บอนกัมมันต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร เม็ดเจลมีลักษณะกลม มีขนาดสม่ำเสมอ และยึดหยุ่นได้เล็กน้อย นอกจากนี้ผลการทดสอบความแข็งแรงของวัสดุตริงชนิดนี้ ยังพบว่าสามารถทนแรงกดได้ดีที่สุด ซึ่งลักษณะดังกล่าวทั้งหมดนี้ เป็นลักษณะสมบัติที่ดีของการเป็นวัสดุตริง จึงได้เลือกใช้โคโตซานจากแกนหมึกที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อใช้ขึ้นรูปวัสดุตริง

เมื่อได้สูตรที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเม็ดโคโตซานที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วม จึงได้ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตริงที่มีความแตกต่างขององค์ประกอบภายในเซลล์ตริงในการกำจัดน้ำมันดีเซล ได้แก่ เซลล์ตริงโคโตซาน เซลล์ตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ เซลล์ตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ที่เชื่อมผ่านการฆ่าเชื้อ วัสดุตริงโคโตซาน และวัสดุตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดวัสดุตริงโคโตซาน และวัสดุตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ พบว่าชุดวัสดุตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันมากกว่าชุดที่ปราศจากคาร์บอนกัมมันต์ เช่นเดียวกับในชุดการทดลองของเซลล์ตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าชุดเซลล์ตริงที่ปราศจากคาร์บอนกัมมันต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2008) กล่าวว่าวัสดุผสมระหว่างคาร์บอนกัมมันต์กับโพลีเอทิลีนโคโตซานที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วมจะมีความสามารถในการดูดซับเพิ่มขึ้น นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดวัสดุตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์กับเซลล์ตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ พบว่าชุดเซลล์ตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงกว่าวัสดุตริงที่ปราศจากเซลล์ แสดงว่านอกจากการดูดซับน้ำมันดีเซลโดยวัสดุตริงแล้ว ยังเกิดจากการย่อยสลายของ *Serratia* sp. W4-01 อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันถึงความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลจาก *Serratia* sp. W4-01 ที่ถูกตรึงภายในเซลล์ตริง งานวิจัยนี้จึงได้เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์กับเซลล์ตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ที่เชื่อมผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าเซลล์ตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ที่เชื่อมผ่านการฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเซลล์ตริงที่โคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ แต่มีประสิทธิภาพสูงกว่าชุดวัสดุตริงโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ เนื่องจากผิวเซลล์มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกจึงสามารถเพิ่มการดูดซับน้ำมันได้มากขึ้น (Lin และคณะ, 2009)

จากการทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตริงที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ในการกำจัดน้ำมัน พบว่าเซลล์ตริงที่มีคาร์บอนกัมมันต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรสูงที่สุด และพบว่าเซลล์ตริงที่มีคาร์บอนกัมมันต์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีโครงสร้างที่แตกง่ายกว่า ดังนั้นความเข้มข้นของ

ส่วนผสมในวัสดุตั้งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อความแข็งแรงของวัสดุตั้ง (Bickerstaff, 1997) และประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kwon และคณะ (2009) พบว่าเซลล์ตั้งที่ใช้คาร์บอนกัมมันต์ 1% (w/v) ร่วมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และ แชนแทนกัมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอล แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นปริมาณคาร์บอนกัมมันต์จะทำให้ความแข็งแรงของเม็ดเซลล์ตั้งลดลง

นอกจากปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนกัมมันต์ที่ถูกรวบรวม งานวิจัยนี้ยังตรวจสอบ ประสิทธิภาพเซลล์ตั้งที่มีความแตกต่างของขนาดเซลล์ตั้งในการกำจัดน้ำมันดีเซล ซึ่งพบว่าเซลล์ตั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลได้สูงสุด ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่มีพื้นที่ผิวสัมผัสของเซลล์ตั้งสามารถสัมผัสน้ำมันได้มากกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sarma และคณะ (2011) ที่รายงานประสิทธิภาพของการใช้เซลล์ตั้ง *Mycobacterium frederiksbergense* ในเม็ดอัลจิเนตเพื่อย่อยสลายของไฟรีน พบว่าเซลล์ตั้งที่มีขนาดใหญ่จะมีประสิทธิภาพการย่อยสลายต่ำกว่าเซลล์ตั้งขนาดเล็ก เนื่องจากพื้นที่ผิวลดลงทำให้การถ่ายเทมวลของไฟรีนต่ำลง ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงลักษณะรูปร่างที่สมบูรณ์ของเซลล์ตั้ง ซึ่งรูปร่างที่สมบูรณ์จะมีประสิทธิภาพดีกว่าเซลล์ตั้งที่ไม่สมบูรณ์

เมื่อได้เซลล์ตั้งที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดน้ำมันดีเซลคือ การตั้ง *Serratia* sp. W4-01 ใวกายในเม็ดโคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ ซึ่งมีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร หลังจากผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลแบบที่มีการเติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน พบว่าชุดการทดลองมีปริมาณน้ำมันเหลืออยู่น้อยกว่าชุดควบคุม แสดงว่าเซลล์ตั้งมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลได้อย่างต่อเนื่อง ทั้งที่มีการเติมน้ำมันเพิ่มขึ้นทุกสองวัน เนื่องจากวัสดุตั้งจะดูดซับน้ำมันดีเซลใวกายในวัสดุตั้ง จากนั้นแบคทีเรียที่ถูกตั้งจะย่อยสลายน้ำมัน ส่งผลให้วัสดุตั้งสามารถดูดซับน้ำมันดีเซลได้อีก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Luan และคณะ, 2006 ที่สรุปว่าเริ่มแรกในการกำจัดไทรบิวทิลทินของ *Chlorella vulgaris* ที่ถูกตั้งใวกายในเม็ดอัลจิเนต จะกำจัดไทรบิวทิลทินโดยใช้กระบวนการดูดซับเข้าสู่วัสดุตั้งและบางส่วนเข้าสู่ผนังเซลล์ จากนั้นเซลล์จึงย่อยสลายสารดังกล่าว นอกจากนี้ยังได้ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลแบบที่มีการเติมปริมาณน้ำมันคงที่ประมาณ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่เติมเพิ่มอีก จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณน้ำมันดีเซลในชุดการทดลองที่มีการเติมเซลล์ตั้งมีปริมาณลดลง แต่ในชุดที่ปราศจากเซลล์ตั้งยังคงมีน้ำมันดีเซลค่อนข้างคงที่ แสดงว่าเซลล์ตั้งสามารถกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้แต่อาจต้องใช้

ระยะเวลาเพิ่มขึ้นเพื่อให้ *Serratia* sp. W4-01 ย่อยสลายน้ำมันที่ถูกดูดซับ จากนั้นวัสดุที่จริงจะดูดซับน้ำมันดีเซลเข้าสู่เซลล์ที่จริงแต่เนื่องจากความเข้มข้นน้ำมันดีเซลที่สูงจึงทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลลดต่ำลง ซึ่งสามารถศึกษาได้จากงานวิจัยนี้ในชั้นถัดไป คือการศึกษาประสิทธิภาพเซลล์ที่จริงในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำมัน

การศึกษาประสิทธิภาพเซลล์ที่จริงในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำมันที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ที่จริงมีประสิทธิภาพสามารถกำจัดน้ำมันดีเซลได้สูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเมื่อความเข้มข้นน้ำมันดีเซลสูงกว่า 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพของเซลล์ที่จริงในการกำจัดน้ำมันดีเซลลดลง ซึ่งเป็นเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Zahed และคณะ (2010) ได้รายงานไว้ในระยะเวลาเท่ากัน ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่ำ จะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นสูง แต่อย่างไรก็ตามรายงานของ Margesin และ Schinner (1998) ได้อ้างถึงองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลที่มีความเป็นพิษ จึงทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเหตุนี้หากมีการกำจัดน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นต่ำเกินความเหมาะสมที่จุลินทรีย์ย่อยได้ ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลจะไม่เพิ่มมากขึ้นไปกว่าที่จะกำจัดได้ แต่เมื่อมีการเติมน้ำมันดีเซลปริมาณมากขึ้น จุลินทรีย์ก็จะย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้มากขึ้นด้วย ทำให้มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลเพิ่มขึ้น ในกรณีของเซลล์ที่จริงการที่ความเข้มข้นน้ำมันดีเซล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่ามีความเข้มข้นน้อย อาจทำให้น้ำมันดีเซลไม่สามารถผ่านเข้าไปถึงเซลล์ จึงทำให้ประสิทธิภาพของเซลล์ที่จริงในการกำจัดน้ำมันดีเซลต่ำกว่าที่ระดับความเข้มข้นน้ำมันดีเซล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามก็จากความสามารถในการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ที่จริงที่ยังมีประสิทธิภาพดีในช่วง 100 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากโรงงาน เช่นจากข้อมูลจากโรงกลั่นน้ำมันบริษัท ไทยออยล์ จำกัด (มหาชน) (2554) น้ำเสียของโรงงานมีน้ำมันปนเปื้อนอยู่ประมาณ 256 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงอาจเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เซลล์ที่จริงชนิดนี้ในการบำบัดน้ำเสียดังกล่าวหรืออุตสาหกรรมอื่นในชั้นของกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเพื่อให้ปริมาณความเข้มข้นน้ำมันอยู่ในช่วงมาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของโรงงานหรือนิคมอุตสาหกรรมที่กำหนด

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพเซลล์ที่จริงในการใช้ซ้ำสำหรับการกำจัดน้ำมันดีเซล ซึ่งเป็นข้อดีของเซลล์ที่จริงอย่างหนึ่ง (Karabika และคณะ, 2009) *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโคทราซาน-คาร์บอนกัมมันต์ มีประสิทธิภาพการใช้ซ้ำทั้ง 12 รอบ รอบละนาน 4 วัน เซลล์ที่จริงมีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มขึ้นจากรอบ

แรก อยู่ในช่วง 41 - 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์ตริงพบว่าในรอบที่ 10 น้ำหนักเซลล์ตริงลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลยังคงอยู่ งานวิจัยของ Lan และคณะ, 2009 พบว่า *Yarrowia lipolytica* W29 ที่ถูกตรึงในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตสามารถใช้ซ้ำได้ 12 รอบ โดยมีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันประมาณ 77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบางรอบของการใช้ซ้ำจะมีประสิทธิภาพลดลงเหลือต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์

เมื่อผ่านการใช้ซ้ำประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตริงที่เพิ่มขึ้นในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการปรากฏจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น ในรอบการใช้ซ้ำที่ 6 ซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แต่ในรอบที่ 12 ปริมาณเซลล์ที่พบในเซลล์ตริงลดลงอาจเนื่องจากการรั่วไหลของเซลล์จากวัสดุตริง (Lan และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตามภายในวัสดุตริงยังคงมีเซลล์เหลืออยู่มากกว่าปริมาณเซลล์ก่อนการทดสอบ เช่นเดียวกับผลการทดลองในการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของ *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ของเซลล์ตริงหลังการทดสอบใช้ซ้ำในรอบที่ 12 พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดมากขึ้นกว่าก่อนการใช้ซ้ำจากการที่ *Serratia* sp. W4-01 สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ตริงโดยใช้น้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลสูงขึ้นด้วย

ผลจากการทดลองทั้งหมดดังที่กล่าวมา สามารถสรุปได้ว่า *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลได้ดีกว่าเซลล์ตริงจากโคโคซานที่ปราศจากคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วม แสดงว่าคาร์บอนกัมมันต์มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซล และพบว่า *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ ซึ่งมีความเข้มข้นคาร์บอนกัมมันต์ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลความเข้มข้นในช่วง 100 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นน้ำมันที่พบได้ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้เมื่อเซลล์ตริงผ่านการใช้ซ้ำจะมีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเซลล์ตริงสูญเสียสภาพโครงสร้างเม็ดเจล ดังนั้นเซลล์ตริงโคโคซานที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วมนี้ มีแนวโน้มจะประยุกต์ใช้ในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพอย่างต่อเนื่องสำหรับบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซลได้ดังเช่นการทดลองของ Khondee และคณะ (2012) ที่มีการประยุกต์ใช้ *Sphingobium* sp. P2 ที่ถูกตรึงบนโคโคซานเพื่อใช้บำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันปนเปื้อนจากร้านล้างรถ ในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกหมุนวนภายใน

ดังนั้นการประยุกต์ใช้วัสดุตริงโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ซึ่งเป็นการผสมระหว่างวิธีการตรึงเซลล์แบบการกักขังไว้ในโครงสร้างของโคโคซานและการดูดซับบนพื้นผิวของคาร์บอนกัมมันต์

รวมทั้งคาร์บอนกัมมันต์จะช่วยดูดซับน้ำมันบางส่วนไว้ จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลของเซลล์ตรึงได้ อีกทั้งวิธีการตรึงเซลล์แบบผสมนี้ยังมีการศึกษาและวิจัยไม่มากนัก จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น เซลล์ตรึงโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์นับเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซล ซึ่งน่าจะมีแนวโน้มที่จะสามารถประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซลได้

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

1. จากกระบวนการเตรียมเซลล์ตรึงที่เซลล์ต้องผ่านทั้งสภาวะกรดและด่าง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตายจำนวนมาก ส่งผลให้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีปริมาณน้อย ดังนั้นในการตรึงเซลล์อาจต้องใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่านี้เพื่อให้เซลล์ตรึงมีแบคทีเรียมีชีวิตรอดมากขึ้น นอกจากนี้อาจปรับวิธีการละลายส่วนผสมของวัสดุตรึง โดยผสมระหว่างคาร์บอนกัมมันต์กับเชื้อก่อน เพื่อให้เชื้อเข้าไปแทรกตัวหรือดูดซับอยู่ภายในรูพรุนของคาร์บอนกัมมันต์เพื่อเพิ่มการมีชีวิตรอด จากนั้นจึงละลายกับไคโตซาน แล้วหยดในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2% (w/v) เพื่อก่อรูปเป็นเม็ดเจล

2. ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลของ *Serratia* sp. W4-01 พบว่าไม่ดีนัก ซึ่งอาจเนื่องมาจาก *Serratia* sp. W4-01 ถูกคัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม แต่มีการใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นสารตั้งต้นในการแยกเชื้อบนอาหารแข็ง CFMM เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว แต่ในงานวิจัยนี้ใช้น้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ *Serratia* sp. W4-01 ไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดีเซลของ *Serratia* sp. W4-01 จึงไม่มากนัก ดังนั้นหากแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้น้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยตรง อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลให้สูงขึ้น (Wongsa และคณะ, 2004)

3. แบคทีเรียที่นำมาตรึงในเม็ดไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ ควรผ่านการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไคโตซานเนส เพื่อป้องกันการย่อยสลายเม็ดไคโตซาน (Barreto และคณะ, 2010) ซึ่งถูกใช้เป็นวัสดุตรึงจากเอนไซม์ดังกล่าว

4. เมื่อนำเซลล์ตรึงไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์มาใช้ซ้ำ พบว่าโครงสร้างเซลล์ตรึงเริ่มหลุดออกซึ่งสาเหตุเหล่านี้อาจแก้ไขได้โดยการใช้กอลลูตาอัลดีไฮด์ เชื่อมขวางโครงสร้างของไคโตซานเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของเซลล์ตรึง (Goncalves และคณะ, 2005)

5. ก่อนการใช้งานเซลล์ตรึง ควรมีการกระตุ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพก่อนการใช้เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล คือ การนำเซลล์ตรึงไปเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีน้ำมันดีเซลเป็น

แหล่งคาร์บอน ซึ่งผลจากการใช้ซ้ำพบว่ารอบที่ 5 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดีเซลมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอาจกระตุ้นก่อนนาน 5 รอบ แล้วจึงนำเซลล์ตรังนั้นไปใช้งานเพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลจริง

6. ประยุกต์ใช้เซลล์ตรัง *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโตซานที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วม นี้ใช้ในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพอย่างต่อเนื่องสำหรับบำบัดน้ำเสียจริงที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

7. ประยุกต์ใช้วัสดุตรังโคโตซานที่มีคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวร่วม เพื่อตรึงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษชนิดอื่นได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ควบคุมมลพิษ, กรม. ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา:

<http://msds.pcd.go.th/index.asp> [8 กรกฎาคม 2553]

เจ้าท่า, กรม. สถิติน้ำมันรั่วไหล. [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา:

http://www.md.go.th/safety_environment/04_4.php [12 มิถุนายน 2553]

ไทยออยล์, บริษัท. ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสียบริษัท ไทยออยล์ จำกัด (มหาชน), 2554.

ปราโมชย์ ไชยเวท และนุรักษ์ กฤษดานุรักษ์. ปิโตรเลียมเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543.

พรหมจักร เจริญพัฒน์. การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียจากตะกอนดินป่าชายเลนที่

สามารถย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต,
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551.

วัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศรี. การคัดแยกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถใช้ไขมัน น้ำมัน

หรือกลีเซอรอล เป็นสารตั้งต้น. หน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดย

ชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2553. (เอกสารไม่
ตีพิมพ์)

วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, กระทรวง. มาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและ

นิคมอุตสาหกรรม ฉบับที่ 3. [ออนไลน์]. 2539. แหล่งที่มา:

http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water04.html [8 กรกฎาคม 2553]

วิวัฒน์ เอกบูรณะวัฒน์. น้ำหล่อเย็น. สมาคมโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อมแห่ง

ประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา:

http://www.anamai.moph.go.th/occmed/indexarticle_mwf.htm. [15 กรกฎาคม 2553].

สิทธิ ทาทอง. การประเมินความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำเสียจากสถานีบริการน้ำมันทางชีววิธี.

วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา) บัณฑิต
วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.

สุวัจน์ ธีญรส. มลพิษทางทะเลและชายฝั่ง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2549.

อลิสสา วั่งไณ. การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.

ภาษาอังกฤษ

Abouseoud, M., Macchi., R. and Amrane, A. 2007. Biosurfactant Production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology 1: 340-347.

Aparna, A., Srinikethan, G. and Hegde, S. 2011. Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* sps. on biodegradation of crude oil. The 2nd International Conference on Environmental Science and Technology 6:71-75.

Atsuo, T. and Takuo, K. Cell and enzyme immobilization. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Washington, D.C. : ASM Press. 1999.

Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.

Barreto, R. V. G., Hissa, D. C., Paes, F. A., Grangeiro, T. B., Nascimento, R. F., Rebelo L. M., Craveiro, A. A. and Melo, V. M. M. 2010. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. Bioresource Technology 101: 2121–2125.

Beilen, V. J. B., Funhoff, E. G., Loon, V. A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Rothlisberger, M., Li, Z. and Witholt, B. 2006. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. Applied and Environmental Microbiology 72(1): 59–65.

- Beilen, V. J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M. and Witholt, B. 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP 58(4): 427-440.
- Bickerstaff, G. F. Immobilization of enzymes and cells. [online]. 1997. Available from: http://books.google.co.th/books?id=2m4VUS8AakC&printsec=frontcover&hl=th&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false [2010, June 20]
- Cassidy, M.B., Lee, H., and Trevors, J.T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. Industrial Microbiology 16: 79-101.
- Chatterjee, S., Chattopadhyay, P., Roy, S. and Sen.K. S. 2008. Bioremediation: a tool for cleaning polluted environments. Journal of Applied Biosciences 11:594 - 601.
- Chen, Y. M., Lin, T. F., Huang, C., Lin, J. C. and Hsieh, F. M. 2007. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. Journal of Hazardous Materials 148: 660–670.
- Das, K. and Mukherjee, K. 2006. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology 1-7.
- Das, N. and Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnology Research International 2011: 1-13.
- Dutta, P. K., Dutta, J. and Tripathi, V. S. 2004. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. Journal of Scientific and Industrial Research 63: 20-31.
- Fritsche, W. and Hofrichter, M. 2000. Aerobic degradation by microorganisms. Principles of Bacterial Degradation 2:145-155.
- Ganesh, A. and Lin, J. 2009. Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. African Journal of Biotechnology 8 (21): 5847-5854.

- Goncalves, V. L., Laranjeira, M. C. M. and Favere, V. T. 2005. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. Polimeros: Ciencia e Tecnologia 15 (1): 6-12.
- Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F., Liu, R. and Li, G. 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. Marine pollution Bulletin 56: 1714-1718.
- Ioannidou O. and Zabaniotou, A. 2006. Agricultural residues as precursors for activated carbon production: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 11: 1966-2005.
- Kalme, S., Parshetti, G., Gomare, S. and Govindwar, S. 2008. Diesel and Kerosene Degradation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386. Current Microbiol 56: 581–586.
- Karabika, E., Kallimanis, A., Dados, A., Pillidis, G., Drinas, C. and Koukkou, A. 2009. Taxonomic identification and use of free and entrapped cells of a new *Mycobacterium* sp., strain Spyr1 for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Applied Biochemistry and Biotechnology 159(1): 155-67.
- Kas, H. S. 1997 Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems: review. Journal of Microencapsulation 14(6): 689-711.
- Khondee, N., Tathong, S., Pinyakong, O., Powtongsook, S., Chatchupong, T., Ruangchainikom, C. and Luepromchai, E. 2012. Airlift bioreactor containing chitosan-immobilized *Sphingobium* sp. P2 for treatment of lubricants in wastewater. Journal of Hazardous Materials 213: 466-473.
- Klankeo, P., Nopcharoenkul, W., Pinyakong, O. 2009. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil. Journal of Bioscience and Bioengineering 108(6): 488-95.

- Kloos, K., Munch, J. C. and Schloter, M. 2006. A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. Journal of Microbiological Methods 66:486–496.
- Kohno, T., Sugimoto, Y., Sei, K., and Mori, K. 2002. Design of PCR primers and gene probes for extensive detection of alkane-degrading bacteria. Microbes Environments 17: 114–121.
- Komatsu, T., Omori, T. and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 57(5): 864 – 865.
- Kumar, M.N.V. 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Function Polymers 46: 1-27.
- Kwon, K. H., Jung, K. Y., Yeom, S. H. 2009. Comparison between entrapment methods for phenol removal and operation of bioreactor packed with co-entrapped activated carbon and *Pseudomonas fluorescens* KNU417. Bioprocess and Biosystems Engineering 32: 249–256.
- Lan, W., Gang, G. and Jinbao, W. 2009. Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. Journal of Environmental Sciences 21: 237–242.
- Lee, Y. C., Shinb, H. J., Ahnc, Y., Shind, M. C., Lee, M. and Yang J. W. 2010. Biodegradation of diesel by mixed bacteria immobilized onto a hybrid support of peat moss and additives: A batch experiment. Journal of Hazardous Materials 183: 940–944.
- Leenen, E. J.T.M., Santos, V. A. D., Grolle, K. C. F., Tramper, J. and Wijffels, R. 1996. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. Water Research 30(12): 2985-2996.

- Levine, D. M. Hydrocarbons [online]. 2009. Available from:
<http://emedicine.medscape.com/article/821143-overview>. [2010, June 10]
- Lin, T. C., Shen, F. T., Chang, J. S., Young, C. C., Arun, A. B., Lin S. Y. and Chen, T. L. 2009. Hydrocarbon degrading potential of bacteria isolated from oil-contaminated soil. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 40: 580–582.
- Liu, C., Wang, W., Wu, Y., Zhou, Z., Lai, Q. and Shao, Z. 2011. Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5 . Environmental Microbiology 13(5): 1168–1178.
- Luan, T. G., Lin, J., Chan, S. M. N., Wong, Y. S. and Tam, N. F. Y. 2006. Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. Process Biochemistry 41(7): 1560-1565.
- Marchal, R., Penet, S., Solano-Serena, F., and Beilendecastele, J. P. 2003. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. Oil & Gas Science and Technology 58: 441-448.
- Margesin, R. and Schinner, F. 1998. Oil biodegradation potential in alpine habitats. Arctic and Alpine Research 41(3): 243-254.
- Maruyama, A., Ishiwata, H., Kitamura, K., Sunamura, M., Fujita, T., Matsuo, M. & Higashihara, T. 2003. Dynamics of microbial populations and strong selection for *Cycloclasticus pugetii* following the nakhodka oil spill. Microbial Ecology 46: 442-453.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. Applied and environmental microbiology 59: 695-700.
- Namasivayam C. and Kavitha D. 2002. Removal of Congo Red from water by adsorption onto activated carbon prepared from coir pith, an agricultural solid waste. Dyes and Pigments 54: 47–58.

- Oh, Y.S., Maeng, J., and Kim, S.J. 2000. Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. Applied Microbiology and Biotechnology 58: 853-9.
- Okoh, A. I. 2006. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. Biotechnology and Molecular Biology Review 1 (2): 38-50.
- Panagoda, G. J., Ellepola, A. N. B. and Samaranyake. 2001. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. Mycoses 44: 29-35.
- Panpanit, S. Oily wastewater treatment by coupling membrane filtration and ozonation. Ph.D. dissertation, Asian Institute of Technology School of Environment, Resources and development, Thailand, 2001.
- Pinyakong, O., Habe, H., Yoshida, T., Nojiri, H. and Omori, T. 2003. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2. Biochemical and Biophysical Research Communications 301(2): 350-357.
- Ponce-jimenez, M. P., Toral, F. A. L. D. and Fornue, E. D. 2002. Antifungal protection and sizing of paper with chitosan salts and cellulose ether. Part 1, physical effects. Journal of the American Institute for Conservation 41(3): 243-254.
- Quek, E., Ting, Y. P. and Tan, H. M. 2006. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. Bioresource Technology 97: 32–38.
- Ron, E. and Rosenberg, E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. Environmental biotechnology 13:249–252.
- Rosenberg, E. and Ron, Z., E. 2001. Natural roles of biosurfactants. Environmental Microbiology 3(4): 229-236.

- Sarma, S. J., Pakshirajan, K. and Saamrat, K. B. G. 2011. Pyrene biodegradation by free and immobilized cells of *Mycobacterium frederiksbergense* using a solvent encapsulated system. Indian Journal of Biotechnology 10:496-501.
- Schreiber, B., Wald, D., Schamlz, V. and Worch, E. 2006. Removal of dissolved organic compounds by granular activated carbon. Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats 1: 397–400.
- Sei, K., Sugimoto, Y., Mori, K., Maki, H. and Kohno, T. 2003. Monitoring of alkane-degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes. Environmental Microbiology 5(6):517–522.
- Shepherd, R., Reader, S. and Falshaw, A. 1997. Chitosan functional properties. Glycoconjugate Journal 14: 535-542.
- Singh, C. and Lin, J. 2009. Evaluation of nutrient addition to diesel biodegradation in contaminated soils. African Journal of Biotechnology 8 (14): 3286-3293.
- Smith, T.H.M., Balada, S.B., Witholt, B., and Beilen, J.B. 2002. Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria. Journal of Bacteriology 184:1733-1742.
- Song, S. H., Choi, S. S., Park, K. and Yoo, Y. J. 2005. Novel hybrid immobilization of microorganisms and its applications to biological denitrification. Enzyme and Microbial Technology 37:567–573.
- Tobias, H. J., Beving, D. and Ziemann, P. J. 2001. Chemical analysis of diesel engine nanoparticles using a nano-DMA/ thermal desorption particle beam mass spectrometer. Environmental science and technology 35: 2233-2243.
- Vendeuvre, C., Guerrero, R. R., Bertoncini, F., Duval, L., Thiébaud, D. and Hennion, M. C. 2005. Characterisation of middle-distillates by comprehensive two-dimensional

- gas chromatography (GC×GC): A powerful alternative for performing various standard analysis of middle-distillates. Journal of Chromatography 1086: 21–28.
- Venosa, A. D. and Zhu, X. 2003. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. Spill science & Technology bulletin 8(2): 163-178.
- Vyas, T. K. and Dave, B. P. 2011. Production of biosurfactant by *Nocardia otitidiscaviarum* and its role in biodegradation of crude oil. Int. International Journal of Environmental Science and Technology 8(2): 425-432.
- Wang, L., Wang, W., Lai, Q. and Shao, Z. 2010. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the atlantic ocean. Environmental Microbiology 12(5):1230–1242.
- Whang, L. M., Liu, P. W. G., Ma, C. C. and Cheng, S. S. 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. Journal of Hazardous Materials 151: 155–163.
- Whyte, L.G., Schultz, A., Beile, J.B., Luz, A.P., Pellizari, V., Labbe, D. and Greer, C. W. 2002. Prevalence of alkane monooxygenase genes in arctic and antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. FEMS Microbiology Ecology 41:141-150.
- Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I. and Okuyama, H. 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating Oil. Current Microbiology 49: 415–422.
- Zahed, M. A., Aziz, H A., Isa, M. H. and Mohajeri, L. 2010. Effect of Initial Oil Concentration and Dispersant on Crude Oil Biodegradation in Contaminated Seawater. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 84: 438–442.

Zhao, L., Luo, F., Zhai, M., Mitomo, H. and Yoshii, F. 2008. Study on CM-chitosan-activated carbon hybrid gel films formed with EB irradiation. Radiation Physics and Chemistry 77: 622–629.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
ทริปโตเนน (Tryptone)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายสารละลายทั้งสามชนิดในน้ำกลั่นปรับความเป็นกรด-ด่าง จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งละลายวุ้นผงหรือแบคทีโอราการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) เจือจาง 10 เท่า

นำอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งละลายวุ้นผงหรือแบคทีโอราการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน (Carbon Free Mineral Medium, CFMM)

สารละลายส่วนที่ 1

แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3)	3	กรัม
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.8	กรัม

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายวุ้นผงหรือแบคไตอาการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สารละลายส่วนที่ 2

เฟอร์ริสคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม/มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร ผสมสารละลายส่วนที่ 2 ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ต่อสารละลายส่วนที่ 1 1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เอทานอล 70%

เอทานอล 99%	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)

Sodium lauryl sulfate	20	กรัม
-----------------------	----	------

ค่อยๆ ละลาย SDS ในน้ำปลอดประจุ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมด เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

20% สารละลายโปรตีนเนสเค (Proteinase K)

โปรตีนเนสเค (Proteinase K)	20	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	มิลลิลิตร

สารละลาย Tris-HCL, pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$)	1.2	กรัม
---------------------------------	-----	------

ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำปลอดประจุจนได้ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์

EDTA ($C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์คนให้เข้ากัน รอให้เย็นแล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl, pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	10	มิลลิลิตร
EDTA, pH 8.0 เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์	0.2	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

0.85% สารละลายโซเดียมคลอไรด์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5	กรัม
-----------------------	-----	------

ละลายในน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	292	กรัม
-----------------------	-----	------

ละลายในน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 800 มิลลิลิตร คนให้ละลายจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	4	กรัม
--------------------------	---	------

ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย CTAB/NaCl

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1	กรัม
CTAB	10	กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า

Tris-HCl	242	กรัม
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9%

อะกาโรส	0.9	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการให้ความร้อน

อะกาโรสเจลเข้มข้น 2%

อะกาโรส	2	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการให้ความร้อน

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์	0.1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันเก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือเนื่องจากเอธิเดียม โบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง)

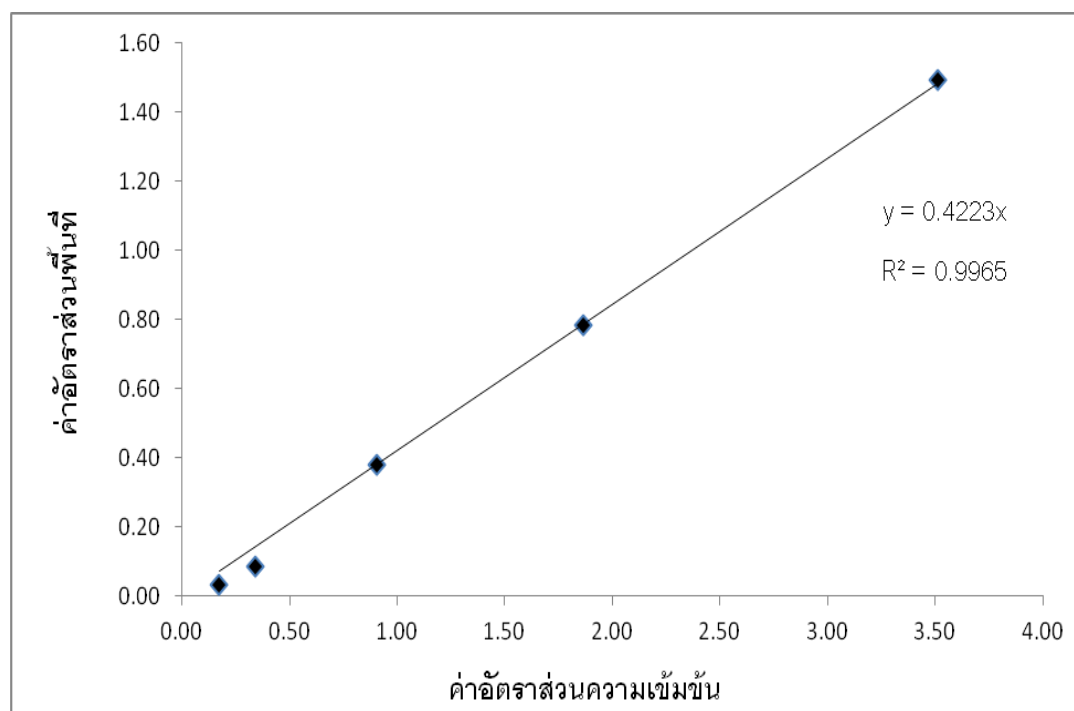
สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

ผสมสารละลายฟีนอลที่อิมิตัวในบัฟเฟอร์ Tris-HCl ให้เข้ากับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) โดยผสมด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานของน้ำมันดีเซล



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าอัตราส่วนพื้นที่และค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล

กราฟมาตรฐานของน้ำมันดีเซลสร้างจากค่าอัตราส่วนพื้นที่ (พื้นที่ที่ได้กราฟของน้ำมันดีเซล/พื้นที่ที่ได้กราฟของสเตียริลแอลกอฮอล์) และค่าอัตราส่วนความเข้มข้น (ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล/ความเข้มข้นของสเตียริลแอลกอฮอล์)

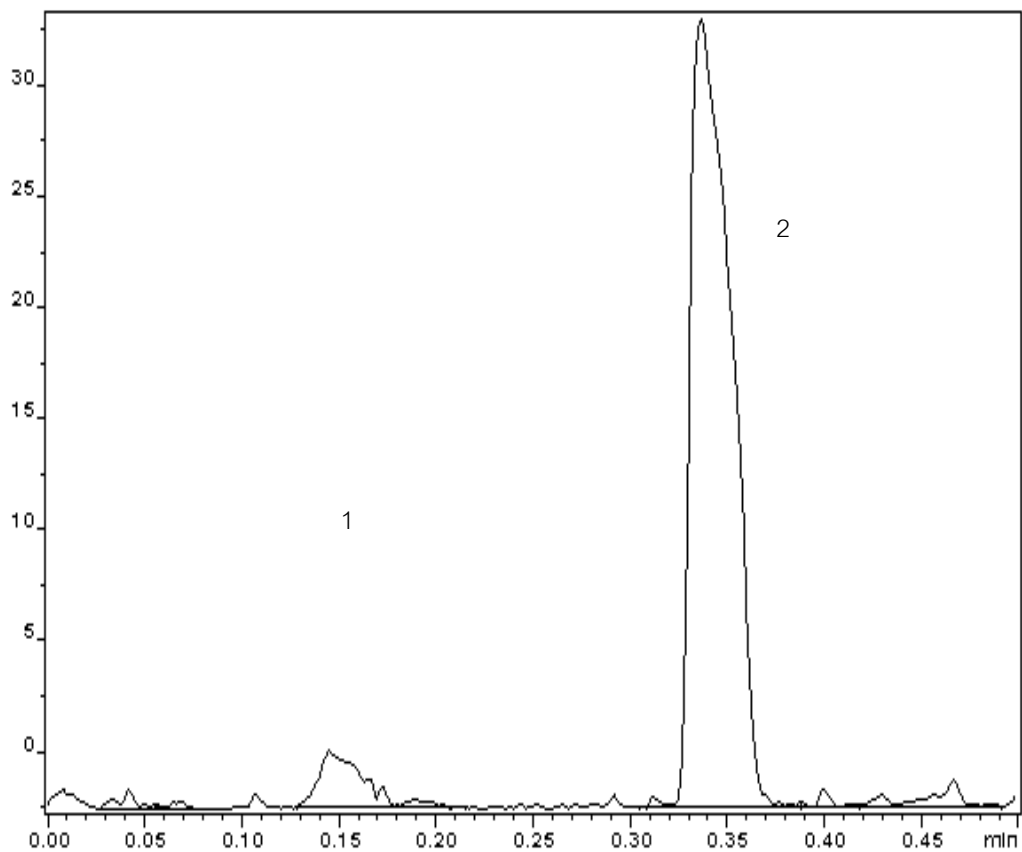
หาปริมาณน้ำมันดีเซลโดยการนำค่าพื้นที่ที่ได้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID มาหาอัตราส่วนพื้นที่ แล้วแทนค่าในสมการ

$$\text{อัตราส่วนพื้นที่ (y)} = 0.4223 \text{ อัตราส่วนความเข้มข้น (x)}$$

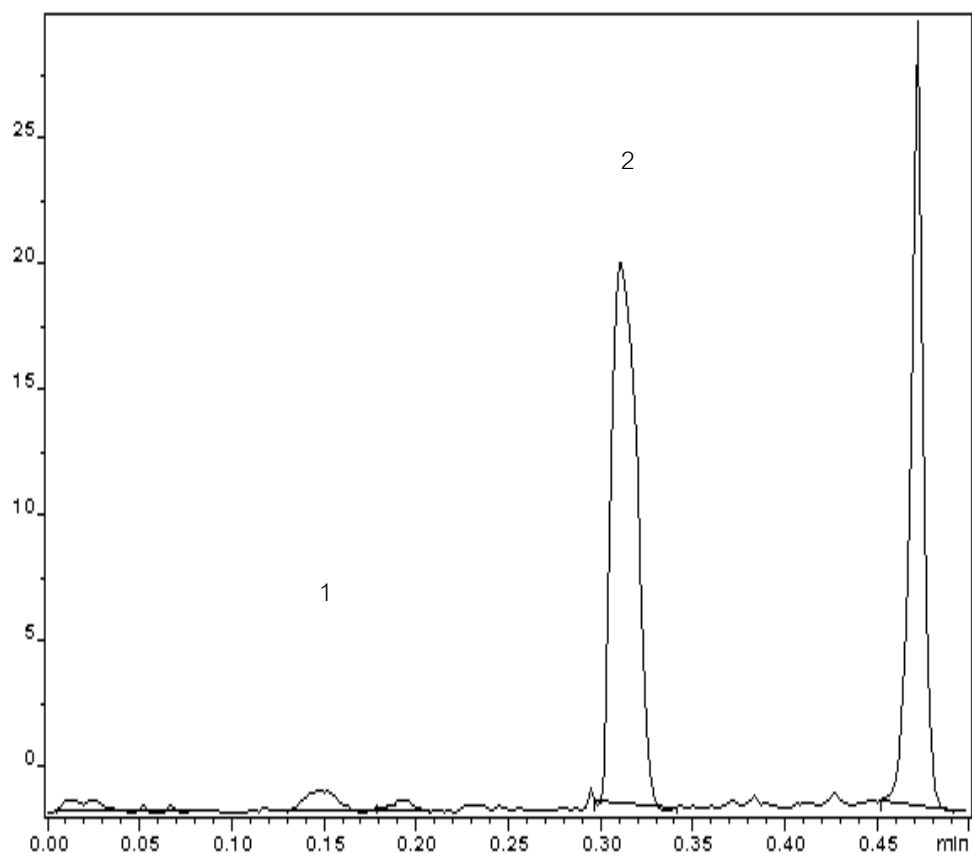
จากนั้นหาค่าปริมาณน้ำมันดีเซลด้วยการแทนค่าอัตราส่วนความเข้มข้นในสมการ

ปริมาณของน้ำมันดีเซล (มิลลิกรัม) = อัตราส่วนความเข้มข้น x ปริมาณของสเตียริลแอลกอฮอล์ (มิลลิกรัม)

โครมาโตแกรมของน้ำมันดีเซลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FLD

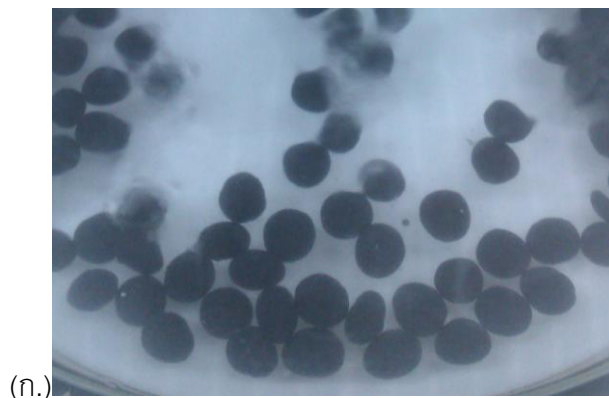


รูปที่ ค.2 TLC-FID โครมาโตแกรมของน้ำมันดีเซลในชุดควบคุม 0 วัน ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พีคที่ 1 และ 2 คือแซททูเรทเต็ดไฮริล แอลกอฮอล์ ตามลำดับ



รูปที่ ค.3 TLC-FID โคโรมาโตแกรมของน้ำมันดีเซลในชุดทดลองเซลล์ตรึง *Serratia* sp. W4-01 ในเม็ดโคโคซาน-คาร์บอนกัมมันต์ 4 วัน ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พีคที่ 1 และ 2 คือแซททูเรทเต็ดไฮดรอลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ

ลักษณะเม็ดเจลไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์



รูปที่ ค.4 เม็ดเจลไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ (ก.)ก่อนการใช้ซ้ำ และ(ข.)หลังผ่านการใช้ซ้ำรอบที่12

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชาลิณี น้าชื่น เกิดเมื่อวันที่ 15 เมษายน พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ในปีการศึกษา 2550 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

- 1) Chalinee Chamcheun and Onruthai Pinyakong. OPTIMIZATION OF IMMOBILIZATION OF *Serratia* sp. W4-01 IN CHITOSAN-ACTIVATED CARBON BEADS FOR DIESEL-CONTAMINATED WATER TREATMENT. The 4th AUN/SEED-Net Regional Conference of Biotechnology. January 26-27, 2012, Montien Surawongse Hotel, Thailand. (poster presentation-proceeding)
- 2) Chalinee Chamcheun and Onruthai Pinyakong. IMMOBILIZATION OF *Serratia* sp. W4-01 IN CHITOSAN-ACTIVATED CARBON BEADS FOR DIESEL-CONTAMINATED WATER TREATMENT. The 15th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering. February 21-24, 2012, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Center, Suntec, Singapore. (poster presentation-extended abstract)