รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ทนโลหะหนักจากฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และการพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อม

Isolation and characterization of petroleum hydrocarbon-degrading bacteria capable of resistant to heavy metal from marine sponge in the eastern coast of the gulf of Thailand and development of ready-to-use bacteria for bioremediation

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

รองศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๑๗๗๓๒๕
สัญญาเลขที่ ๑๖๖ /๒๕๕๘

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ทนโลหะหนักจากฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และการพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อม

Isolation and characterization of petroleum hydrocarbon-degrading bacteria capable of resistant to heavy metal from marine sponge in the eastern coast of the gulf of Thailand and development of ready-to-use bacteria for bioremediation

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

รองศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กันยายน พ.ศ. ๒๕๕๙

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ และเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมจากตัวอย่างฟองน้ำทะเล จากบริเวณทะเลจังหวัดชลบุรี และชุมพรโดยจากการศึกษาเมตาจีโนมของฟองน้ำในเบื้องต้นพบว่าในตัวอย่างฟองน้ำทะเลมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่หลากหลายแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอยู่ในฟองน้ำ จากนั้นเมื่อเพิ่มกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าว พบว่าสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 13 กลุ่มแบคทีเรียจาก 41 ตัวอย่างฟองน้ำ โดยคัดแยกได้จากตัวอย่างฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีน้ำตาลเหลือง ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง ฟองน้ำต้นไม้สีดำ สาหร่ายสีน้ำตาล ฟองน้ำสีน้ำเงิน ฟองน้ำไฟ ฟองน้ำเคลือบสีเหลือง ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ ฟองน้ำเชือก และฟองน้ำสีน้ำตาล ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ได้60 – 92% ในเวลา 7 วัน และที่สำคัญยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 27สายพันธุ์จาก 13 กลุ่มแบคทีเรีย โดยพบว่า 19 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ได้แก่แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* 6 สายพันธุ์, *Acinetobacter* 1 สายพันธุ์ ,*Brevibacterium* 2 สายพันธุ์ *Aeromonas* 1 สายพันธุ์,*Enterobacter* 2 สายพันธุ์,*Bacillus* 4 สายพันธุ์ ,*Sphingobium*sp. 1 สายพันธุ์,*Methylobacterium*sp. 1 สายพันธุ์ และ *Microbacterium* 1 สายพันธุ์งานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบจากฟองน้ำทะเล ซึ่งสามารถวิจัยต่อยอดเพื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนต่อไปได้

Abstract

Petroleum hydrocarbon contamination in marine environment is of major concern since it can have impacts to ecosystem and economic system. This research therefore aims to obtain bacteria capable of degrading petroleum oil isolated from marine sponge samples. Preliminarily metagenomic analysis revealed the presence of genes involved in petroleum oil degradation indicating that marine sponges possessed petroleum hydrocarbon-degrading bacteria. The enrichment was then carried out and 13 bacterial consortia having ability to degrade crude oil were achieved from 41 marine sponge samples. The bacterial consortia were enriched from *Xestospongia testudinara*, *Pseudoceratinapurpurea*, *Iotrochotabaculifera*, *Pachastrissanux*, *Padina*sp., *Neopetrosia*sp., *Biemnafortis*, *Axinyssa*sp., *Hyrtios erectus*, *Clathira* (*Thalysias*) *reinwardti* and *Chondrillaaustraliensis*. They could degrade 60 – 92% of 0.25% v/v crude oil in liquid cultivation within 7 days. Interestingly, among 27 bacterial strains isolated from those 13 bacterial consortia, 19 strains exhibited crude oil degrading ability. The sequencing analysis of 16S rDNA demonstrated that they belong to genera*Pseudomonas* 6strains, *Acinetobacter* 1strain,*Brevibacterium* 2 strains,*Aeromonas* 1 strain, *Enterobacter* 2 strains, *Bacillus* 4strains,*Sphingobium*sp. 1 strain,*Methylobacterium*sp. 1 strain and*Microbacterium* 1 strain. This is the first report on isolation ofcrude oil-degrading bacteria from marine sponges. The isolated bacteria from this work can be further studied for application in bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated area.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๑๖๖ /๒๕๕๘

Acknowledgement

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 166/2558)

สารบัญ

รายการ	**หน้า**
1. บทนำ	1
2. การดำเนินการวิจัย	13
2.1 วิธีดำเนินการวิจัย	13
2.2 ผลการวิจัย	16
3. อภิปรายผลการวิจัย	28
4. สรุป	31
5. ข้อเสนอแนะ	32
6. ผลผลิต	32
บรรณานุกรม	33
ภาคผนวก	40
ประวัติคณะผู้วิจัย	43

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	สรุปตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ระหว่างปีพ.ศ. 2540-2558	6
2.	ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ	9
3.	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและ PAHs	15
4.	ชนิดของฟองน้ำและพื้นที่เก็บตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบได้	17
5.	แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ	19
6.	จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น (%) และปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลง (%) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% เป็นเวลา 7 วัน	24
7.	ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและ PAHs	27

สารบัญภาพ

รูปที่ **หน้า**

1. ตัวอย่างองค์ประกอบของน้ำมันดิบ 5
2. การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและการสลายตัวของคราบน้ำมันของกลุ่มแบคทีเรีย โดย flask ซ้ายคือชุดควบคุม และflask ขวาคือชุดทดลอง 16
3. ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำทะเล 18
4. ปริมาณน้ำมันดิบของแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 19 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% v/v ที่เวลา 0 และ 7 วัน 25
5. จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 19 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% v/vที่เวลา 0 และ 7 วัน 26

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

สัญลักษณ์และคำย่อ	คำเต็ม
%	เปอร์เซ็นต์
มล.	มิลลิลิตร
CFU	Colony forming unit
COD	Chemical oxygen demand
GC-FID	Gas chromatography - flame ionization detector
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PCR	Polymerase chain reaction
TLC-FID	Thin layer chromatography - flame ionization detector
v/v	Volume/volume

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันประเทศไทยมีการพัฒนาและการขยายตัวทางเศรษฐกิจอย่างรวดเร็ว รวมทั้งการเพิ่มจำนวนของประชากร ทำให้มีปริมาณการใช้ทรัพยากรธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของประเทศ ตัวอย่างปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ น้ำมันดิบ ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน เป็นต้น จากเหตุผลดังกล่าวทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและโลหะหนักชนิดต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เนื่องด้วยเป็นเขตที่มีอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ รวมทั้งมีท่าเรือน้ำลึก และท่าเรือสินค้า

ทั้งนี้มีรายงานการสำรวจสารปนเปื้อนสารมลพิษต่างๆ บริเวณดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง อาทิ การตรวจสารอินทรีย์ในดินตะกอนบริเวณอ่าวไทยตอนบน ใกล้เกาะสีชัง และพบการปนเปื้อน PAHs ในบริเวณดังกล่าว (Boonyatumanond และคณะ 2006; 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบการสะสมปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสัตว์ทะเล เช่น ไส้เดือนทะเล ส่วนในหอยตลับลาย ปลาเห็ดโคน ปลาทรายแดง และปลาทรายขาว บริเวณอ่าวเพ จังหวัดระยองในช่วงเดือนมิถุนายนและกันยายน 2543 (จุมพล สงวนสิน และคณะ, 2543) ซึ่งการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในธรรมชาติ และการสะสมในสัตว์ เหล่านี้ มีความสำคัญและก่อให้เกิดผลกระทบต่อมนุษย์ เนื่องจากความเกี่ยวข้องกับห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิต สำหรับรายงานการตรวจพบโลหะหนักในบริเวณอ่าวไทย เช่น Censi และคณะ (2006) รายงานการกระจายตัวและความเข้มข้นของโลหะหนัก ได้แก่ วาเนเดียม (V) โครเมียม (Cr) โคบอลต์ (Co) นิกเกิล (Ni) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) และยูเรเนียม (U) ในบริเวณดังกล่าว นอกจากนี้ Ei Tun และคณะ (2009) ยังรายงานการตรวจพบแคดเมียม (Cd) ในดินตะกอนที่เก็บจากบริเวณอ่าวไทยตอนบนอีกด้วย

การปนเปื้อนสารมลพิษดังกล่าวก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม โดยปัญหาที่สำคัญคือ สารมลพิษสามารถเข้าไปอยู่ในสายใยอาหารได้ (Mitra และคณะ, 2012) และแม้มีความเข้มข้นต่ำก็เป็นพิษต่อมนุษย์สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้ โดยโลหะหนักสามารถทำลายระบบประสาท ตับ กระดูก รวมถึงขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ (Urani และคณะ, 2005) และน้ำมันปิโตรเลียม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมัน เป็นสารประกอบที่ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตโดยอาจชักนำให้เกิดมะเร็งและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต (Cachot และคณะ, 2006) ซึ่ง The United State Environment Protection Agency (U.S. EPA) จัดให้ PAHs อยู่ในกลุ่มของสารก่อมลพิษที่ต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน

การบำบัดการปนเปื้อนสารพิษในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) ซึ่งเป็นการอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายหรือลดปริมาณสารพิษในสิ่งแวดล้อมและเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และ PAHs เนื่องจากมีต้นทุนต่ำและ

ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Haritash และ kaushik, 2009) กระบวนการย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรียในสภาวะที่มีอากาศ เริ่มต้นจากการเติมหมู่ออกซิเจนแก่วงแอโรแมติกซึ่งเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) จากนั้นผ่านการเปลี่ยนรูปอีกหลายขั้นตอนจนได้สารตั้งต้นที่คล้ายแคทีคอล ซึ่งจะถูกย่อยสลายด้วยเอกซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) ผ่านทางวิถีการแตกวงแอโรแมติกแบบ *เมตา* เป็นส่วนใหญ่ หรือย่อยสลายด้วยอินตราไดออลไดออกซิจีเนส (intradiol dioxygenase) ผ่านทางวิถีการแตกวงแอโรแมติกแบบ *ออโธ* เพื่อเข้าสู่วัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Peng และคณะ, 2008)

สำหรับวิธีการบำบัดน้ำปนเปื้อนโลหะหนักก็มีหลากหลายวิธี วิธีที่เป็นทางเลือกที่น่าสนใจได้แก่การดูดซับทางชีวภาพ โดยอาศัยมวลชีวภาพต่างๆ เช่น วัสดุทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ใยมะพร้าว เป็นต้น นอกจากนี้มวลชีวภาพของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่ายทะเล ได้มีการทดสอบว่าสามารถดูดซับโลหะหนักได้เป็นอย่างดีอีกด้วย (Aulluri และคณะ, 2007)

ทั้งนี้การใช้แบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารมลพิษจำเป็นต้องมีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสาร และสามารถคงทนในสิ่งแวดล้อมได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งแวดล้อมที่มีโอกาสปนเปื้อนสารมลพิษหลายชนิด แบคทีเรียที่เลือกใช้จึงจำเป็นต้องมีประสิทธิภาพหลายด้าน อาทิ สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง องค์ประกอบที่มีความเป็นพิษสูง ได้แก่ PAHs และยังสามารถทนต่อโลหะหนักหรือสามารถดูดซับโลหะหนักได้อีกด้วย และหากจะนำไปใช้บำบัดในน้ำทะเล ก็จำเป็นต้องเลือกใช้แบคทีเรียที่มีความทนเค็มได้ นอกจากนี้เมื่อได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพและคงทนแล้ว ยังจำเป็นต้องเตรียมแบคทีเรียให้อยู่ในรูปแบบของแบคทีเรียพร้อมใช้ให้เหมาะสมกับสภาพการใช้งาน และให้สามารถเก็บรักษาได้นาน รวมทั้งเพื่อความสะดวกในการนำไปประยุกต์ใช้

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ในปีที่ 1 มีเป้าหมายในการคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ และศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย ทั้งนี้จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างจากแหล่งที่มีโอกาสพบการปนเปื้อนของสารมลพิษ และเป็นแหล่งที่มีความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรีย ซึ่งโครงการนี้สนใจเก็บตัวอย่างได้แก่ ฟองน้ำ (sponge) ชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี และจังหวัดชุมพร ทั้งนี้เนื่องจาก เป็นบริเวณที่มีรายงานการปนเปื้อนสารมลพิษ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าฟองน้ำเป็นตัวกรองทั้งแบคทีเรีย และสารต่างๆ รวมถึงสารมลพิษในทะเลอีกด้วย และพบว่ากว่า 50% ของมวลชีวภาพของฟองน้ำประกอบไปด้วยแบคทีเรีย (Webster และ Bourne, 2007) จึงคาดว่าฟองน้ำ ในบริเวณดังกล่าว น่าจะเป็นแหล่งที่จะสามารถพบแบคทีเรียที่น่าสนใจที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารมลพิษ และมีสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปอีกด้วย

และโครงการในวิจัยในปีที่ 2 จะมุ่งเน้นการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม และ PAHs หลากหลายชนิด และความทนต่อโลหะหนักชนิดต่างๆ รวมทั้งความสามารถการดูดซับโลหะหนักของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ รวมทั้งศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมโดยวิธีเมตาจีโนมิกอีกด้วย และโครงการวิจัยในปีที่ 3 มุ่งเน้นการเตรียมแบคทีเรียในรูปแบบแบคทีเรียพร้อมใช้ ได้แก่ การตรึงแบคทีเรียในวัสดุตรึงที่เหมาะสม เพื่อสามารถนำไป

ประยุกต์ใช้ได้ในการบำบัดน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากวัสดุตรึงทำหน้าที่เป็นตัวช่วยดูดซับ และเป็นวัสดุป้องกันเซลล์ รวมถึงสามารถใช้ซ้ำได้ในระบบบำบัดแบบต่อเนื่อง (Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001 และ Rahman และคณะ, 2006)

โดยรายงานวิจัยฉบับนี้เป็นรายงานวิจัยฉบัยสมบูรณ์ ของโครงการวิจัยในปีที่ 1 ซึ่งได้รายงานผลการเก็บตัวอย่างฟองน้ำจากบริเวณชายฝั่งทะเล การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ การคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียแบบกลุ่ม และขนิดเดี่ยว และรายงานผลการศึกษาความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมของแบคทีเรียในฟองน้ำในเบื้องต้นอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกและศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากฟองน้ำ (ปีที่ 1)
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และความสามารถในการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (ปีที่ 2)
3. เพื่อพัฒนาการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน สำหรับการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพ (ปีที่ 3)

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ปีที่ 1

1. การคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน จะคัดแยกจากฟองน้ำ ที่เก็บจากบริเวณแหล่งตัวอย่างคือ บริเวณชายฝั่งทะเล จังหวัดชลบุรี และจังหวัดชุมพร เพื่อให้ได้แบคทีเรียหรือกลุ่มแบคทีเรียอย่างน้อย 10 สายพันธุ์หรือกลุ่ม

ปีที่ 2

2. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ทำโดยวิเคราะห์ข้อมูลชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ และข้อมูลจากการศึกษาจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อมระดับโมเลกุล ได้แก่การใช้เทคนิคเมตาจีโนมิกส์ เพื่อตรวจหาชนิดของแบคทีเรียโดยตรงจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้จะตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

3. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และความสามารถในการทนต่อโลหะหนัก ได้แก่ การศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ได้แก่ องค์ประกอบสำคัญในน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน คือ อัลเคน และ PAHs ชนิดต่างๆ โดยศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย หรือความทนต่อสารตั้งต้น เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น การใช้สารตั้งต้นแบบผสม รวมถึงศึกษาความสามารถการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียที่ย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ปีที่ 3

4. การพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารพิษโดยวิธีชีวภาพ โดยการตรึงแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม ซึ่งศึกษาเริ่มจากการคัดเลือกวัสดุตรึง เช่น ไคโตซาน คาร์บอนกัมมันต์ หรือวัสดุการเกษตร เป็นต้น และหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ หาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลาย และการดูดซับสารมลพิษ รวมถึงประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของวัสดุตรึง ในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้คัดแยกและศึกษาความหลากหลายและประสิทธิภาพของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และทนต่อโลหะหนัก จากฟองน้ำ บริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี และชุมพร รวมถึงการพัฒนาเป็นแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับการบำบัดทางชีวภาพ โดยโครงการวิจัยมีกรอบแนวคิดการวิจัยดังนี้

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และทนต่อโลหะหนัก จากสิ่งแวดล้อมที่พบการปนเปื้อนของสารมลพิษดังกล่าว โดยเฉพาะฟองน้ำซึ่งเป็นตัวกรองทั้งแบคทีเรียและสารมลพิษในทะเล จะทำให้มีโอกาสสูงที่จะได้แบคทีเรียหลากหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพดีเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารมลพิษ และการคัดแยกแบคทีเรีย สิ่งแวดล้อมที่ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียสูง โดยวิธีการ enrichment ซึ่งเป็นการกระตุ้นในแบคทีเรียต่างๆ จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมนั้นใช้สารมลพิษ ก็จะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะทำให้ได้แบคทีเรียที่น่าสนใจที่มีประสิทธิภาพสูง

นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อมระดับโมเลกุล ได้แก่การใช้เทคนิคเมตาจีโนมิกส์เพื่อตรวจหาชนิดของแบคทีเรียโดยตรงจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม และตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม จะทำให้ได้ข้อมูลความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

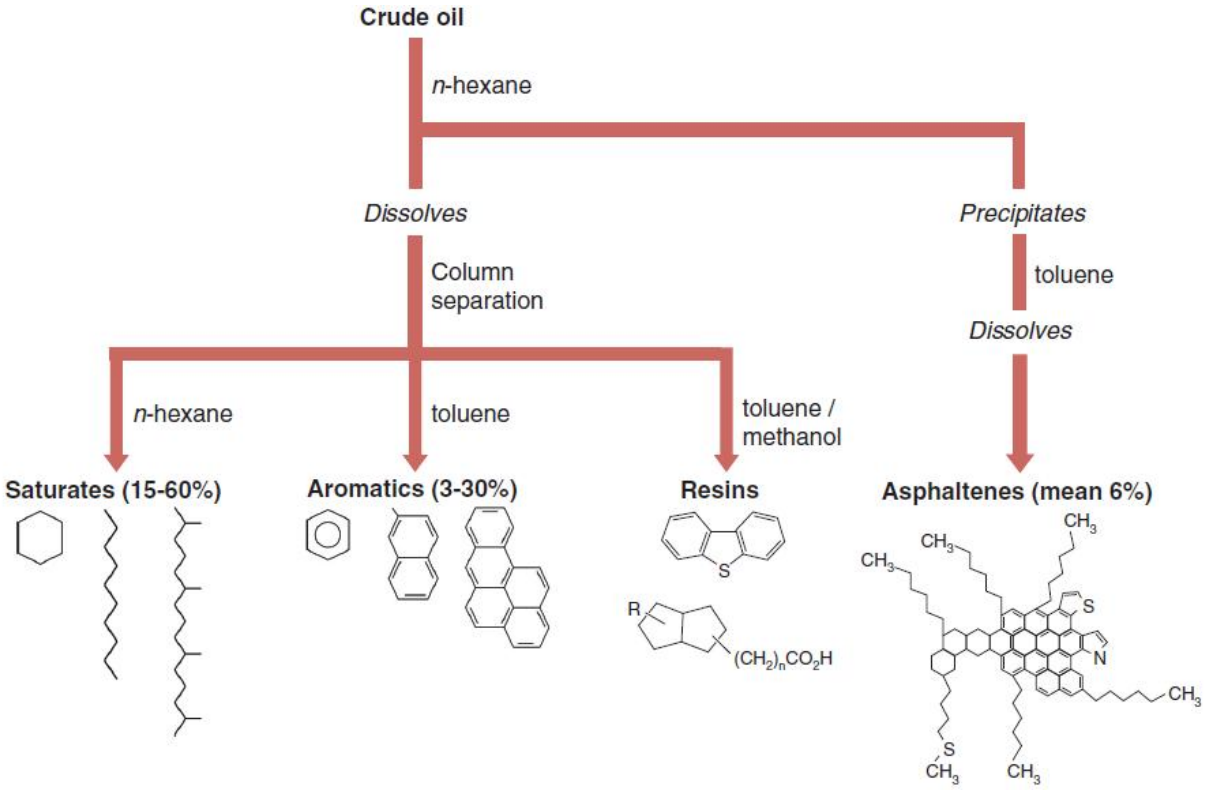
และสำหรับการพัฒนาการเตรียมแบคทีเรียพร้อมใช้ การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสมจะช่วยเป็นแหล่งคุ้มกัน ทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เช่น ปริมาณน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง หรือสารอาหารที่มีปริมาณต่ำในน้ำเสีย ทำให้อัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำแบคทีเรียที่ถูกตรึงนี้กลับมาใช้ซ้ำได้ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการบำบัดน้ำเสียในระยะยาวต่ำ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ จากการดำเนินการวิจัยครบ 3 ปี

1. ผลงานวิจัยจะนำไปตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ระดับนานาชาติ อย่างน้อย 2 เรื่อง
2. ผลงานวิจัยที่ได้เป็นต้นแบบให้หน่วยงานต่างๆ นำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น กรมควบคุมมลพิษ กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงอุตสาหกรรม โรงงานอุตสาหกรรมที่มีน้ำเสีย หรือมีการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และ/หรือโลหะหนักในพื้นที่ของโรงงาน

1.6 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันพบปัญหาการปนเปื้อนสารมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้น อาทิ การปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยเฉพาะ PAHs และโลหะหนัก เช่น สารหนู แคดเมียม โครเมียม ทองแดง ตะกั่ว ปรอท สังกะสี ในน้ำทะเลโดยเฉพาะบริเวณแหล่งอุตสาหกรรม เช่น นิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด และแหลมฉบัง รวมถึงบริเวณชายฝั่งทะเล และแม่น้ำ (Boonyatumanond และคณะ, 2006; 2007) ตัวอย่างองค์ประกอบองค์ประกอบของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (น้ำมันดิบ) แสดงในรูปที่ 1 องค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ PAHs ซึ่งมีความเป็นพิษ และเป็นสารเหนี่ยวนำกอให้เกิดการกลายพันธุ์ มะเร็งและความผิดปกติของทารกในครรภ์ (Peng และคณะ, 2008)



รูปที่ 1 ตัวอย่างองค์ประกอบของน้ำมันดิบ (Mcgenity, 2014)

เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลในประเทศไทย พบว่าจากสถิติของกรมเจ้าท่าระหว่างปี พ.ศ. 2540-2558 มีเหตุการณ์การรั่วไหลของน้ำมันทั้งในทะเล และบริเวณชายฝั่ง รวมทั้งไปถึงท่าเทียบเรือ อันเนื่องมาจากอุบัติเหตุระหว่างการขนถ่ายน้ำมันบริเวณท่าเทียบและอุบัติเหตุอื่นๆ ดังสรุปตัวอย่างในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สรุปตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ระหว่างปีพ.ศ. 2540-2558

ลำดับที่	วัน/เดือน/ปี	ชนิดของน้ำมัน	สาเหตุ	สถานที่	ปริมาณ
1	22 พฤษภาคม 2544	น้ำมันดิบ	Brakeaway Coupling ที่กำลังขนถ่ายจากเรือหลุดออกจากกัน	ท่าเรือมาบตาพุด จ.ระยอง	30,000 ลิตร
2	15 มกราคม 2545	น้ำมันเตา	เรือชนกับหินฉลาม	นอกฝั่ง อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี	234,000 ลิตร
3	17 ธันวาคม 2545	น้ำมันเตา	เรือชนกัน	ทางเข้าท่าเรือแหลม-ฉบัง จ.ชลบุรี	210,000 ลิตร
4	20 พฤศจิกายน 2548	น้ำมันดิบ	ท่อเชื่อมต่อหลุดขณะส่งถ่ายน้ำมัน	บริเวณทุ่นผูกเรือ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี	20,000 ลิตร
5	4 พฤษภาคม 2549	น้ำมันเตา	รั่วไหลจากรอยรั่วที่ระวางของเรือบรรทุกน้ำมัน	บริเวณท่าเทียบเรือ อ.มาบตาพุต จ.ระยอง	20,000 ลิตร
6	6 ตุลาคม 2550	Saraline 185V	รั่วไหลจากถังเก็บน้ำมัน	บริเวณแท่นขุดเจาะน้ำมัน	34,000 ลิตร
7	9 ธันวาคม 2550	น้ำมันดีเซลและน้ำมันเตา	เรือบรรทุกแก๊สอับปาง	ในทะเลห่างชายฝั่ง อ.สทิงพระ จ.สงขลา ประมาณ 6 ไมล์ทะเล	20,000 ลิตร
8	15 มิถุนายน 2551	น้ำมันเตา	รั่วไหลจากเรือบรรทุกสินค้า	บริเวณอู่เรือ อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ	40,000 ลิตร

ที่มา: กรมเจ้าท่า (2558)

ตารางที่ 1 สรุปตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ระหว่างปีพ.ศ. 2540-2558 (ต่อ)

ลำดับที่	วัน/เดือน/ปี	ชนิดของน้ำมัน	สาเหตุ	สถานที่	ปริมาณ
9	4 กันยายน 2554	น้ำมันดีเซล (B5)	เรือบรรทุกน้ำมันอับปาง	ห่างจากเกาะราชา-ใหญ่ ทางตะวันออกประมาณ 4 ไมล์ทะเล จ.ภูเก็ต	40,000 ลิตร
10	27 กรกฎาคม 2556	น้ำมันดิบ	รั่วไหลจากท่อรับน้ำมันดิบ	บริเวณทุ่นรับน้ำมันกลางทะเล จ.ระยอง	50,000 ลิตร
11	26 มีนาคม 2557	น้ำมันเตา	ไม่ทราบ	ในเขตท่าเรือศรีราชา จ.ชลบุรี	ไม่ทราบ
12	7 เมษายน 2557	น้ำมันเครื่องใช้แล้วกากน้ำมันเตาน้ำท้องเรือ	เรือชื่อ “นภสินธุ์”จม	ใกล้ปากแม่น้ำท่าจีน อ.เมือง จ.สมุทรสาคร	10,000 ลิตร
13	8 ตุลาคม 2558	น้ำมันเตา	ท่อระบายอากาศของเรือ HEIKE P ที่เชื่อมผ่านไปยังถังน้ำมันแตกหัก	ท่าเทียบเรือแหลมฉบัง C1	5,000 ลิตร
14	29 พฤศจิกายน 2558	ก้อนน้ำมันสีดำ (Tar ball)	ไม่ทราบ	ชายหาดบริเวณปากน้ำหลังสวน-หาดบางมะพร้าว จ.ชุมพร	ไม่ทราบ (เป็นแนวยาวประมาณ 10 กิโลเมตร)
15	17 ธันวาคม 2558	ก้อนน้ำมันสีดำ (Tar ball)	ไม่ทราบ	ชายหาดบริเวณหมู่ 9 ต.เกาะเพชร อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช	ไม่ทราบ (เป็นแนวยาวประมาณ 3 กิโลเมตร)

ที่มา: กรมเจ้าท่า (2558)

การปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อม ทำให้มีผลกระทบทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อม สุขภาพ และเศรษฐกิจ จึงจำเป็นต้องมีการจัดการปัญหามลพิษดังกล่าวอย่างถูกต้อง และเป็นการแก้ปัญหาอย่างยั่งยืน

การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารพิษโดยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารพิษ โดยจุลินทรีย์สามารถนำสารเคมีนั้นๆไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานหรืออาจเปลี่ยนโครงสร้างของสารพิษบางส่วน ทำให้ความเป็นพิษหมดไปหรือลดลง ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำ (Johnsen และคณะ, 2005; Peng และคณะ, 2008) ทั้งนี้การบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธีจำเป็นต้องมีจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ และทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ต้องการบำบัดได้

มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม ทั้งใน ดินปนเปื้อนสารมลพิษ และน้ำเสีย น้ำทะเล และดินตะกอน เช่น แบคทีเรียที่ย่อยสลาย n-อัลเคน ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter Alcanivorax Burkhoderia Pseudomonas Mycobacterium* และ *Rhodococcus* (van Beilen และ Funhoff, 2007) แบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs เช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* (Zhang และคณะ, 2004) สกุล *Sphingomonas* (Pinyakong และคณะ, 2003) สกุล *Mycobacterium* (Heitkamp และคณะ, 1988; Bastiaens และคณะ, 2000) และในงานวิจัยก่อนหน้านี้กลุ่มผู้วิจัยสามารถคัดแยกแบคทีเรียจากธรรมชาติ ได้แก่ จากดินและน้ำเสียในประเทศไทยที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม แบคทีเรียที่แยกได้เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายสารในกลุ่มปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่พวกพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) เช่น *Diaphorobacter* sp. และ *Pseudoxanthomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายไพรีน ฟีแนนทรีน (Klankeo และคณะ, 2009) *Sphingomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน (Saiphet และคณะ, 2006) ซึ่งต่อมาก็พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ นอกจากนี้ยังได้คัดแยก *Acenitobacter* sp. ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ (Tathong, 2007) เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษากลไกการย่อยสลาย และการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ เช่น ยีนประมวลรหัสอัลเคนไฮดรอกซิเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคน (Wang และคณะ, 2010) ได้แก่ยีน *alk* ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง ที่ 2

ตารางที่ 2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ

ยีน	หน้าที่	อ้างอิง
alkB	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C_6-C_{12}	Kohno และคณะ, 2002
alkM	จำเพาะกับอัลเคนสายยาว C_{12} ขึ้นไป	Kohno และคณะ, 2002
alkB$_1$	ไม่จำเพาะเจาะจง	Kohno และคณะ, 2002
alkB-1	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C_{13}-C_{23}	Kloos และคณะ, 2006
alkB1	จำเพาะกับอัลเคนสายกลางถึงอัลเคนสายยาว C_{12}-C_{26} และอัลเคนที่เป็นโซ่กิ่ง	Whyte และคณะ, 2002
alkB2	จำเพาะกับอัลเคนสายกลางถึงอัลเคนสายยาว C_{12}-C_{26}	Whyte และคณะ, 2002
CYP 153	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C_6-C_{16}	Wang และคณะ, 2011
CYP 153	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C_8-C_{15}	Wang และคณะ, 2010
almA	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C_8-C_{16} และอัลเคนสายยาว C_{22}-C_{36}	Liu และคณะ, 2011
CYP 153	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C_8-C_{16}	van Beilen และคณะ, 2006

นอกจากนี้ Peng, และคณะ (2008) รายงานสรุปการศึกษายีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น ยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 ยีน *ndo* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 ยีน *dox* ของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18 ยีน *pah* ของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1 ยีน *phn* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ยีน *arh* ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 และยีน *nid* ของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 เป็นต้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะทำให้สามารถนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปประยุกต์ใช้ได้อย่างเหมาะสม

อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพและน่าสนใจอีกเป็นจำนวนมากในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย ที่ยังไม่ได้ถูกคัดแยกและศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างจากธรรมชาติที่น่าสนใจที่จะเป็นแหล่งของแบคทีเรียย่อยสลายสารมลพิษ เช่น ฟองน้ำ น้ำทะเล และดินตะกอน ที่ปนเปื้อนสารมลพิษ เนื่องจากมีรายงานพบว่าฟองน้ำสามารถทำหน้าที่เป็นตัวกรองทั้งแบคทีเรีย และสารต่างๆ รวมถึงสารมลพิษในทะเล เช่น มีรายงานว่าฟองน้ำทะเล *Halichondria panacea* สะสมโลหะหนัก ได้แก่ คอปเปอร์

สังกะสี และแคดเมียม ในปริมาณที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของโลหะหนักที่ละลายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง จึงแนะนำว่าสามารถใช้ฟองน้ำทะเลสปีชีส์นี้เป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพได้อีกด้วย (Hansen และคณะ, 1995) และยังพบว่ากว่า 50% ของมวลชีวภาพของฟองน้ำประกอบไปด้วยแบคทีเรีย (Webster และ Bourne, 2007) และยังมีรายงานที่ศึกษาการใช้แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับฟองน้ำเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนสารอินทรีย์ (Kefalas และคณะ, 2003) รวมถึงรายงานการศึกษาแบคทีเรียได้แก่ *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Coliforms*, *Salmonella* และ *Shigella* จากน้ำทะเล และดินตะกอนจากอ่าวเบงกอล ที่สามารถทนต่อโลหะหนักได้หลายชนิด ได้แก่ นิกเกิล โครเมียม คอปเปอร์ โคบอลต์ ตะกั่ว และปรอท Ni, Cr, Cu, Co, Pb and Hg (50 mM) ได้ (Santhiya และคณะ, 2011) จึงคาดว่าทั้งฟองน้ำ น้ำทะเล และดินตะกอนน่าจะเป็นแหล่งที่จะสามารถพบแบคทีเรียที่น่าสนใจที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารมลพิษ และมีสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

นอกจากนี้ในปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินกว่าร้อยละ 99 ตามธรรมชาติไม่สามารถถูกเพาะเลี้ยงได้ในสภาวะที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ หรือเพาะเลี้ยงได้ยาก จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ยังขาดข้อมูลของจุลินทรีย์ ยีนและเอนไซม์ที่สำคัญอีกมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคใหม่ทางชีวโมเลกุลในการศึกษาแบคทีเรียและยีนในสิ่งแวดล้อมโดยตรง เช่น การศึกษาประชากรแบคทีเรียโดยเทคนิค PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), Fluorescent in situ hybridization (FISH), การโคลน 16S rDNA, การโคลนยีนเป้าหมายอื่นๆ เช่น ยีนไดออกซิจีเนส, DNA barcode, การคัดแยกยีนจากห้องสมุดเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรง, การศึกษาด้วย phyloarray, microarray, real-time PCR, metaproteomics, metatranscriptomics, metabolomics เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้ทำให้สามารถค้นพบแบคทีเรีย ยีนและเอนไซม์ที่มีประโยชน์จากสิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องคัดแยกเชื้อก่อน รวมถึงหลายวิธีการทำให้เข้าใจบทบาทหน้าที่ของแบคทีเรียและยีนเหล่านั้นในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Liang และคณะ, 2009; Santos และคณะ, 2009; Spiegelman และคณะ, 2005) ซึ่งจะทำให้จัดการสิ่งแวดล้อมได้อย่างถูกวิธี และสามารถหาวิธีนำแบคทีเรียและยีนใหม่ๆ ไปใช้ประโยชน์ได้อีกด้วย ทั้งนี้มีงานวิจัยที่รายงานการพบแบคทีเรียหลากหลายชนิดและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมและ PAHs จากดินตะกอนและน้ำทะเลในต่างประเทศ เช่น Long และคณะ ใช้วิธี PCR-DGGE และโคลน 16S rDNA ทำให้พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Proteobacteria* และ *Actinobacteria* มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายฟีแนนทรีน และแอนทราซีนในดินตะกอนปากแม่น้ำบริสตอล ประเทศอังกฤษ (Long และคณะ, 2009) และ Niepceron และคณะ ใช้วิธีการทำระบบนิเวศจำลองน้ำทะเลปนเปื้อน PAHs, PCR-DGGE, RT-PCR, โคลน 16S rDNA และ real-time PCR แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียหลายสปีชีส์ในกลุ่ม *Cycloclasticus* และ *Pseudomonas* มีบทบาทสำคัญในการย่อยสสลาย PAHs ในน้ำทะเล ประเทศฝรั่งเศส (Niepceron และคณะ, 2010) ในปีเดียวกัน Marcos และคณะได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก และใช้ในการตรวจหายีนดังกล่าวในระบบนิเวศน้ำทะเล บริเวณซับ-แอนตาร์คติก (Marcos และคณะ, 2009) นอกจากนี้ Wang และคณะ ในปี 2010 ก็ได้ศึกษาความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีย่อย

สลายน้ำมันปิโตรเลียม และยีนอัลเคนไฮดรอกซีเลส (*alkB*) ในน้ำทะเลบริเวณเกาะเซียะเหมิน ประเทศจีน และสามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายได้น้ำมันได้ 16 สายพันธุ์ และตรวจพบยีน *alkB* ในทุกสายพันธุ์โดยใช้วิธี PCR รวมทั้งยังสามารถพบ *alkB* จาก DNA ของเมตาจีโนมด้วย และเมื่อใช้วิธี real-time PCR ก็ทำให้ทราบความอุดมสมบูรณ์ของยีน *alkB* ในบริเวณดังกล่าวอีกด้วย

สำหรับวิธีการบำบัดน้ำปนเปื้อนโลหะหนักมีหลากหลายวิธี ได้แก่วิธีทางกายภาพ ทางเคมี ซึ่งวิธีที่เป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ได้แก่ การดูดซับทางชีวภาพ โดยอาศัยมวลชีวภาพต่างๆ เช่น วัสดุทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ใยมะพร้าว เป็นต้น นอกจากนี้มวลชีวภาพของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่ายทะเล ได้มีการทดสอบว่าสามารถดูดซับโลหะหนักได้เป็นอย่างดีอีกด้วย เช่น พบว่า *Bacillus polymyxa* สามารถดูดซับทองแดงได้ และ *Pseudomonas* sp. สามารถดูดซับ โครเมียม ทองแดง แคดเมียม นิกเกิล ได้ เป็นต้น (Aulluri และคณะ, 2007)

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลของโลหะหนักต่อการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น Zukauskaite และคณะ (2008) พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเพิ่มขึ้น 11-15% เมื่อมีการเติมทองแดง และแมงกานีสลงในดิน และประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดำเพิ่มขึ้น 29% เมื่อมีการเติมแมงกานีสและทองแดง Al-Mailem และคณะ (2011) รายงานว่าอาเคียร์ทนเค็มที่สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้สามารถทนต่อเมอคิวรี่ได้ในสภาวะที่มีความเค็มสูง และ Al-Saleh และ Obuekwe (2009) รายงานถึงผลของนิกเกิลต่อการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดินประเทศคูเวต โดยพบว่านิกเกิลมีผลทำให้ลดจำนวนจุลินทรีย์ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในดิน โดยผลดังกล่าวเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณนิกเกิล สำหรับการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายพบว่าขึ้นอยู่กับชนิดของสาร เช่น ปริมาณนิกเกิลไม่มีผลกระทบต่อการย่อย น้ำมันดิบและเฮกซะเดกเคน แต่มีผลยับยั้งการย่อยแนพธาลีน

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียสามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม จะช่วยเป็นแหล่งคุ้มกัน อีกทั้งยังทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เช่น ปริมาณน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง หรือสารอาหารที่มีปริมาณต่ำในน้ำเสีย ทำให้อัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ (Gentry และคณะ, 2004; Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001) นอกจากนี้ยังสามารถนำแบคทีเรียที่ถูกตรึงนี้กลับมาใช้ซ้ำได้ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการบำบัดน้ำเสียในระยะยาวต่ำ การตรึงเซลล์ทำได้หลายรูปแบบ เช่น การจับกลุ่มของเซลล์ การดูดซับบนผิววัสดุตรึง การสร้างพันธะโควาเลนท์ระหว่างเซลล์กับวัสดุตรึง การเชื่อมกันของเซลล์ การบรรจุเซลล์ในวัสดุตรึง และการทำให้เซลล์ติดอยู่ในเมทริกซ์ (Cassidy และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่ามีวัสดุตรึงหลากหลายชนิด เช่น ไคติน ไคโตซาน พอลิยูรีเทน อัลจิเนต คาร์บอนกัมมันต์ เป็นต้น

รายงานการใช้เซลล์ตรึงในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ Rahman และคณะ (2006) ใช้แบคทีเรียตรึงในอัลจิเนตเพื่อการบำบัดน้ำทะเลสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนปิโตรเลียม

ไฮโดรคาร์บอน พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการถูกใช้ซ้ำได้มากกว่า 150 วันโดยไม่ลดความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

Gentili และคณะ (2006) นำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนตรึงบนไคตินและไคโตซานจากกุ้งและใช้ในการบำบัดน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบในระบบบำบัดระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าการตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ และเพิ่มการอยู่รอดของแบคทีเรียในระบบบำบัด

นอกจากนี้ Lan และคณะ (2009) ได้ศึกษาความสามารถของเซลล์ตรึงบนแคลเซียมอัลจิเนตในการย่อยสลายน้ำมันและการลดค่า COD ซึ่งพบว่าการตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มความเสถียรของเซลล์ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง และเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง และช่วยลด COD ได้ดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ และพบว่าเซลล์ตรึงมีความเสถียรเมื่อถูกเก็บที่ 4 องศาเซลลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และถูกนำกลับมาใช้ได้ 12 ครั้ง

2. การดำเนินการวิจัย

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

1. คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

1.1 เก็บตัวอย่างฟองน้ำ

เก็บตัวอย่างฟองน้ำจากบริเวณชายฝั่งทะเล จังหวัดชลบุรี และจังหวัดชุมพร โดยใช้ตัวอย่างที่เก็บร่วมกันกับโครงงานอื่นๆ และใช้ข้อมูลพื้นฐานคุณภาพน้ำในพื้นที่

1.2 เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างฟองน้ำ

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างฟองน้ำด้วยเทคนิค enrichment ทำโดยตัดตัวอย่างฟองน้ำ 5 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Natural sea water (NSW) 45 มล. ที่มีน้ำมันดิบ 0.1 % ปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ใหม่ที่มีน้ำมันดิบ 0.1% v/v บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ทำซ้ำเป็นจำนวน 5 ครั้ง แล้วเพิ่มปริมาตรน้ำมันเป็น 0.25% v/v บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน

1.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยกลุ่มแบคทีเรีย

เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียโดยเติมกลุ่มแบคทีเรียจากข้อ 1.2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB) เจือจาง 10 เท่า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ทำซ้ำอีก 1 รอบ และแขวนลอยเซลล์ในน้ำเกลือ 0.85% จากนั้นนำไปปรับค่า Optical density (OD) ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 1.00 แล้วนำไปนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

นำหัวเชื้อเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^7 CFU/มล. เติมหัวเชื้อปริมาตร 0.5 มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW 4.5 มล. ที่มีน้ำมันดิบ 0.25% v/v ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันโดยเก็บตัวอย่างที่วันที่ 0 และ 7 เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง Gas chromatography - flame ionization detector (GC-FID) และศึกษาลักษณะโคโลนีและการเจริญของเชื้อด้วยการทำ Viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

1.3 คัดแยกแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม

เลือกลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันจากการทำ Viable plate count ในข้อ 1.2 มาขีดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน และย้อมสีแกรมเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และการติดสีแกรม และตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบในเบื้องต้น โดยนำแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ปริมาณ 2 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลว NSW 45 มล. ที่มีน้ำมันดิบ

0.1% v/v บ่มเป็นเวลา 7 วัน ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลงความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการสลายตัวของคราบน้ำมัน ถ่ายเชื้อที่มีการเปลี่ยนความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อและการสลายตัวของคราบน้ำมันลงในอาหารเหลว NSW 45 มล. ใหม่ที่มีน้ำมันดิบ 0.25% v/v บ่มเป็นเวลา 7 วัน ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการเปลี่ยนความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการสลายตัวของคราบน้ำมัน

1.4 ทดสอบความสามารถการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% v/v ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 1.3 และแสดงการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการสลายตัวของคราบน้ำมันในเบื้องต้น โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ความเจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 50 มล. จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยในน้ำเกลือ 0.85% แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อให้แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ประมาณ 8 Log CFU/มล. และเติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ 10% v/v ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% v/v บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์การอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยวิธี Thin layer chromatography - flame ionization detector (TLC-FID) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.5 จำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

จำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยการวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank

2. ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยตรง

2.1 สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างฟองน้ำ

สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียในฟองน้ำโดยตรง โดยใช้ตัวอย่างฟองน้ำทะเล 5 กรัม สกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ PowerSoil® DNA Isolation Kit บริษัท MO BIO Laboratories ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของ 3 ซ้ำมารวมกัน

2.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA และบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนบริเวณดังกล่าวตามตารางที่ 3 และใช้ดีเอ็นที่สกัดได้จากข้อ 2.1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

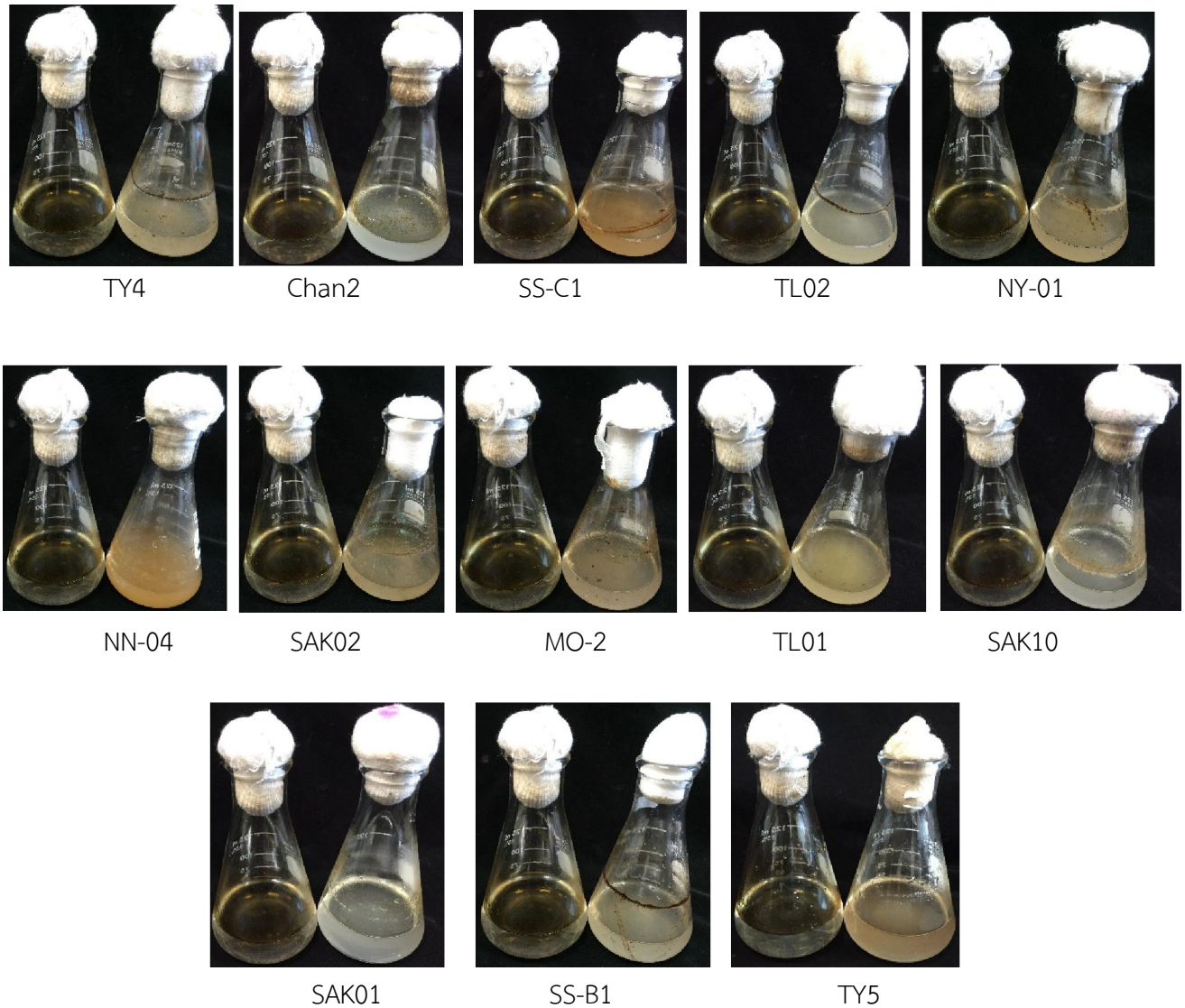
ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและ PAHs

Primers	Oligonucleotide (5'-3')	Sizes (bp)	Gene	Reference
alk1	-CATAATAAAGGGCATCACCGT- (F) -GATTTCATTCTCGAAACTCCAAAC-(R)	185	*alkB*	Kohno และคณะ, 2002
alk2	-GAGACAAATCGTCTAAAACGTAA-(F) -TTGTTATTATTCCAACTATGCTC-(R)	271	*alkM*	
alk3	-TCGAGCACATCCGCGGCCACCA-(F) -CCGTAGTGCTCGACGTAGTT-(R)	330	*alkB1*	
alkB-1	-AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAYAA-(F) -GCRTGRTGRTCNGARTGNCGYTG-(R)	550	*alkB-1*	Kloos และคณะ, 2006
alkB1	-ATCTGGGCGCGTTGGGATTTGAGCG-(F) -CGCATGGTGATCGCTGTGCCGCTGC -(R)	629	*alkB1*	Whyte และคณะ, 2002
alkB2	-ACTCTGGCGCAGTCGTTTTACGGCC-(F) -CCCACTGGGCAGGTTGGGCGCACCG-(R)	552	*alkB2*	Whyte และคณะ, 2002
CYP 153	-ATGTTYATYGCNATGGAYCCN -(F) -GCGRTTVCCCATRCARCGRTG -(R)	820	*CYP 153*	Wang และคณะ, 2011
P450	-TGTCGGTTGAAATGTTCATYGCNMTGGAYCC -(F) -TGCAGTTCGGCAAGGCGGTTDCCSRYRCAVCKRTG- (R)	800	CYP *153*	Wang และคณะ, 2010a
almAw	-GGNGGNACNTGGGAYCTNTT- (F) -ATRTCNGCYTTNAGNGTCC -(R)	1131	*almA*	Liu และคณะ, 2011
P450 fw1 & rv3	-GTSGGCGGCAACGACACSAC -(F) -GCASCGGTGGATGCCGAAGCCRAA -(R)	339	CYP *153*	Beilen และคณะ, 2006
GN	-GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA-(F) -AGCTGTTGTTCGGGAAGAYWGTGCMGTT-(R)	306	*PAH-RHD*□ ของแบคทีเรียแกรมลบ	Cébron และคณะ, 2008
GP	-CGGCGCCGACAAYTTYGTNGG-(F) -GGGGAACACGGTGCCRTGDATRAA-(R)	292	*PAH-RHD*□ ของแบคทีเรียแกรมลบ	

2.2 ผลการวิจัย

1. การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างฟองน้ำ

จากตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บได้ทั้งหมด 41 ตัวอย่าง นำมาเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยการถ่ายเชื้อกลุ่มแบคทีเรียจากตัวอย่างฟองน้ำทะเลใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW 45 มล. ที่มีน้ำมันดิบ 0.25% v/v เป็นจำนวน 10 ครั้ง สามารถสังเกตเห็นการสลายตัวของคราบน้ำมันดิบเทียบกับชุดควบคุมได้ในกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมด 13 กลุ่ม จากฟองน้ำ 13 ตัวอย่าง ได้แก่ TY4, Chan2, SS-B1, SS-C1, SAK02, TL01, TL02, NN-04, NY-01, TY5, SAK01, SAK10 และ MO-2 แสดงในรูปที่ 2 โดยชนิดของฟองน้ำแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นจึงนำกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 13 กลุ่ม ไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ต่อไป



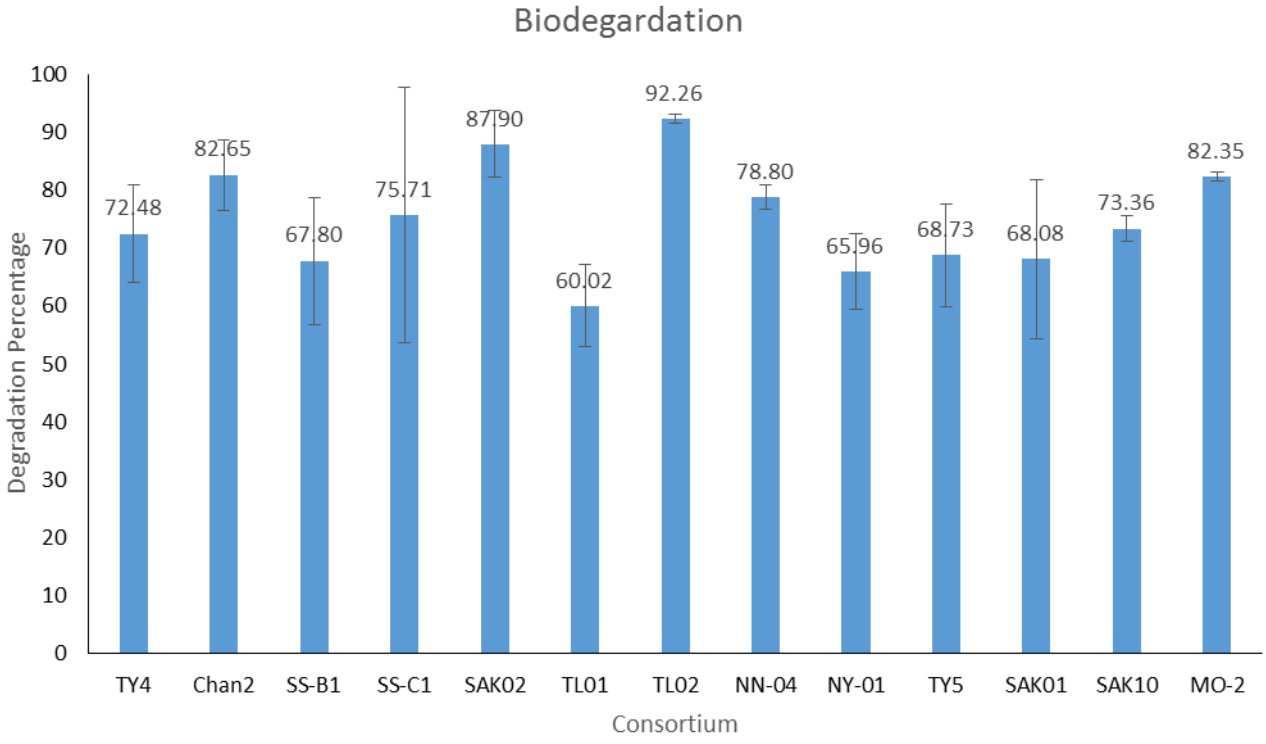
รูปที่ 2 การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและการสลายตัวของคราบน้ำมันของกลุ่มแบคทีเรีย โดย flask ซ้ายคือชุดควบคุม และ flask ขวาคือชุดทดลอง

ตารางที่ 4 ชนิดของฟองน้ำและพื้นที่เก็บตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบได้

รหัส	ชื่อสามัญไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	พื้นที่เก็บตัวอย่าง
SS - B-01	ฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง	*Xestospongia testudinaria*	หมู่เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี
SS - C-01	ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีน้ำตาลเหลือง	*Pseudoceratina purpurea*	หมู่เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี
SS - CH-02	ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง	*Iotrochota baculifera*	หมู่เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี
SS – TY04	ฟองน้ำต้นไม้สีดำ	*Pachastrissa nux*	หาดเตยงาม จ.ชลบุรี
SS– TY05	สาหร่ายสีน้ำตาล	*Padina* sp.	หาดเตยงาม จ.ชลบุรี
SAK- 01	ฟองน้ำสีน้ำเงิน	*Neopetrosia* sp. "blue"	หมู่เกาะชุมพร จ.ชุมพร
SAK- 02	ฟองน้ำไฟ	*Biemna fortis*	หมู่เกาะชุมพร จ.ชุมพร
NN- 04	ฟองน้ำเคลือบสีเหลือง	*Axinyssa* sp. "yellow"	หมู่เกาะชุมพร จ.ชุมพร
NY- 01	ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ	*Hyrtios erectus*	หมู่เกาะชุมพร จ.ชุมพร
TL-01	ฟองน้ำเชือก	*Clathria (Thalysias) reinwardti*	หมู่เกาะชุมพร จ.ชุมพร
TL-02	ฟองน้ำหนังสีน้ำตาล	*Chondrilla australiensis*	หมู่เกาะชุมพร จ.ชุมพร

2. ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำ

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ในอาหารเหลว NSW ของกลุ่มแบคทีเรีย หลังจากการบ่ม 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องพบว่า ทั้ง 13 กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ได้สูงกว่า 60% ดังแสดงในรูปที่ 3

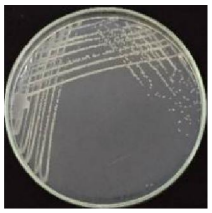
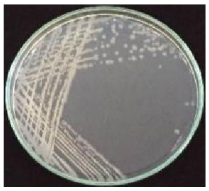


รูปที่ 3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำทะเล

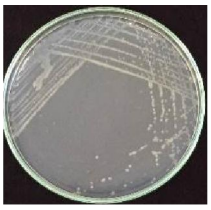
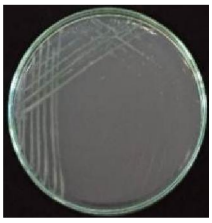
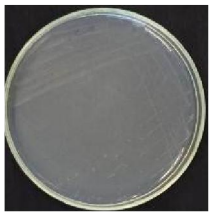
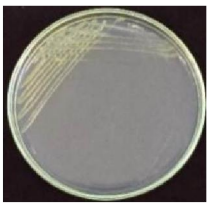
3. แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ

จากการนำกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และคัดแยกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 27 สายพันธุ์จากกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมด 13 กลุ่มแสดงดังตารางที่ 5 โดยระบุชนิดของแบคทีเรีย 19 ที่แสดงแนวโน้มการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยสังเกตจากความขุ่นและลักษณะของน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบเบื้องต้น ระบุชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Pseudomonas* 6 สายพันธุ์, *Acinetobacter* 1 สายพันธุ์, *Brevibacterium* 2 สายพันธุ์, *Aeromonas* 1 สายพันธุ์, *Enterobacter* 2 สายพันธุ์, *Bacillus* 4 สายพันธุ์, *Sphingobium* sp. 1 สายพันธุ์, *Methylobacterium* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Microbacterium* 1 สายพันธุ์ จากนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 19 สายพันธุ์ต่อไป

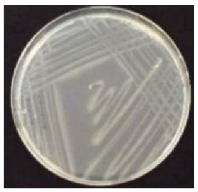
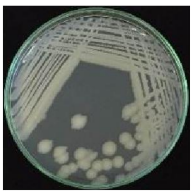
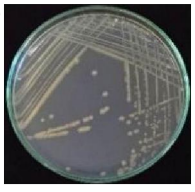
ตารางที่ 5 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

รูปแบคทีเรีย	สัณฐานวิทยา	ติดสีแกรม	Strain	ชนิดแบคทีเรีย	%Similarity	Acession no.
1 	กลม, นูน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีครีม	ลบ	SS-C1-1	*Acinetobacter* sp.	99	EU841482
2	กลม, นูน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีขาว	บวก	NY-1-3	*Brevibacterium casei*	99	KF306365
3	กลม, แบน, ชอบหยัก, ผิวเรียบ, สีครีม	ลบ	Chan2-2	*Pseudomonas taiwanensis*	99	NR_116172
4 	กลม, นูน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีครีม	ลบ	SS-B1-1	*Aeromonas hydrophila*	99	JQ034596

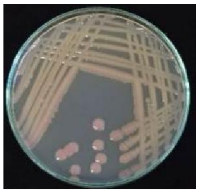
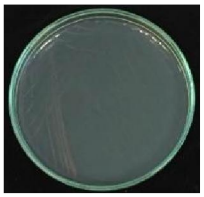
ตารางที่ 5 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ (ต่อ)

รูปแบคทีเรีย	สัณฐานวิทยา	ติดสีแกรม	Strain	ชนิดแบคทีเรีย	%Similarity	Acession no.
5 	กลม, แบน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีครีมนวล	ลบ	SS-C1-2	*Pseudomonas putida*	99	EF552365
6 	รูปร่างไม่แน่นอน, แบน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีเขียวเข้ม	ลบ	TY4-1	*Pseudomonas aeruginosa*	99	EU302863
7 	กลม, แบน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีส้มในบางสภาวะ	ลบ	SS-B1-5 NN-4-2 NY-1-2	*Enterobacter cloacae*	100	CP003678
8 	กลม, นูน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีเหลือง	บวก	TL02-3	*Microbacterium esteraromaticum*	99	EU714337
9	รูปล่างไม่แน่นอน, แบนตรงกลาง, ขอบหยัก, ผิวขรุขระ, สีเหลือง	บวก	TL01-2	*Bacillus megaterium*	99	AY030338
10	กลม, แบน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีครีมนวล	ลบ	TY5-1	*Enterobacter cloacae*	99	CP001918

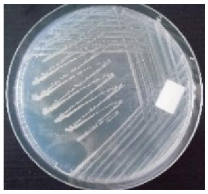
ตารางที่ 5 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ (ต่อ)

รูปแบคทีเรีย	สัณฐานวิทยา	ติดสีแกรม	Strain	ชนิดแบคทีเรีย	%Similarity	Acession no.
11 	กลม, แบน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีครีม	ลบ	TY5-3	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	99	EU440977
12	รูปร่างไม่แน่นอน, แบน, ขอบเรียบ, ผิวด้าน, สีครีม	บวก	SS-B1-2 NY1-1	-	-	-
13	กลม, นูน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีครีม	ลบ	TY5-2	*Pseudomonas* sp.	99	NR_121767
14 	กลม, แบน, ขอบเรียบ, ผิวด้าน, สีขาว	บวก	TL01-3	-	-	-
15 	รูปร่างไม่แน่นอน, แบน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีครีม	บวก	TL01-4	-	-	-
16	กลม, นูน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีครีม	ลบ	TL01-1	-	-	-

ตารางที่ 5 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ (ต่อ)

รูปแบคทีเรีย	สัณฐานวิทยา	ติดสีแกรม	Strain	ชนิดแบคทีเรีย	%Similarity	Acession no.
17 	กลม, นูน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีชมพู	ลบ	NY1-4	-	-	-
18	กลม, แบน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีขาว	บวก	MO2-1	*Bacillus* sp.	99	CP014179
19	กลม, นูน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบมัน, สีเหลือง	ลบ	MO2-4	*Sphingobium* sp.	98	NR_112079
20	กลม, แบน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบด้าน, สีขาว	บวก	MO2-5	*Bacillus* sp.	99	CP015727
21 	กลม, ขนาดเล็ก, โตช้า, นูน, ผิวเรียบ, ขอบเรียบ, สีแดง	ลบ	TL02-4	*Methylobacterium* sp.	99	AY468363
22	กลม, แบน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีขาว	บวก	NN4-1	*Bacillus* sp.	99	CP015727

ตารางที่ 5 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ (ต่อ

รูปแบคทีเรีย	**สัณฐานวิทยา**	**ติดสีแกรม**	**Strain**	**ชนิดแบคทีเรีย**	**%Similarity**	**Acession no.**
23 	กลม, นูน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีครีม	ลบ	SAK2-2	*Pseudomonas* sp.	99	CP007511
24	กลม, นูน, ขอบเรียบ, ผิวเรียบ, สีขาว	บวก	NY1-5	*Brevibacterium* sp.	99	AY468375

4. ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

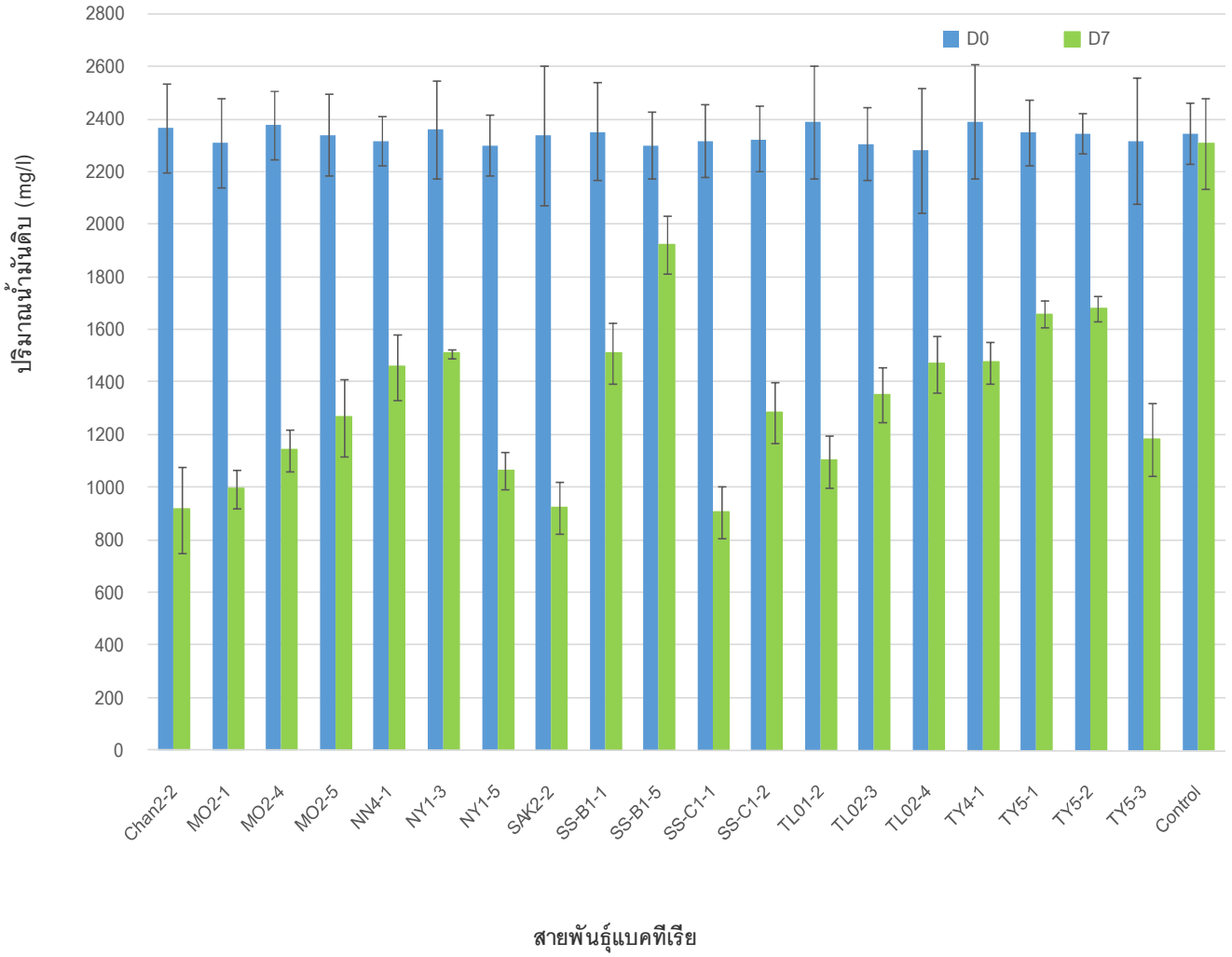
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ 19 สายพันธุ์ ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ พบว่ามีแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% v/v ได้มากกว่า 50% ในเวลา 7 วัน ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ Chan2-2, MO2-1, MO2-4, NY1-5, SAK2-2, SS-C1-1 และ TL01-2 (ตารางที่ 6 และรูปที่ 4) ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบในส่วน Saturated และ Aromatic ได้เกือบหมด อย่างไรก็ตามแบคทีเรียย่อยสลายส่วน Resin และ Asphaltene ได้เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 5)

ตารางที่ 6 จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น (%) และปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลง (%) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% เป็นเวลา 7 วัน

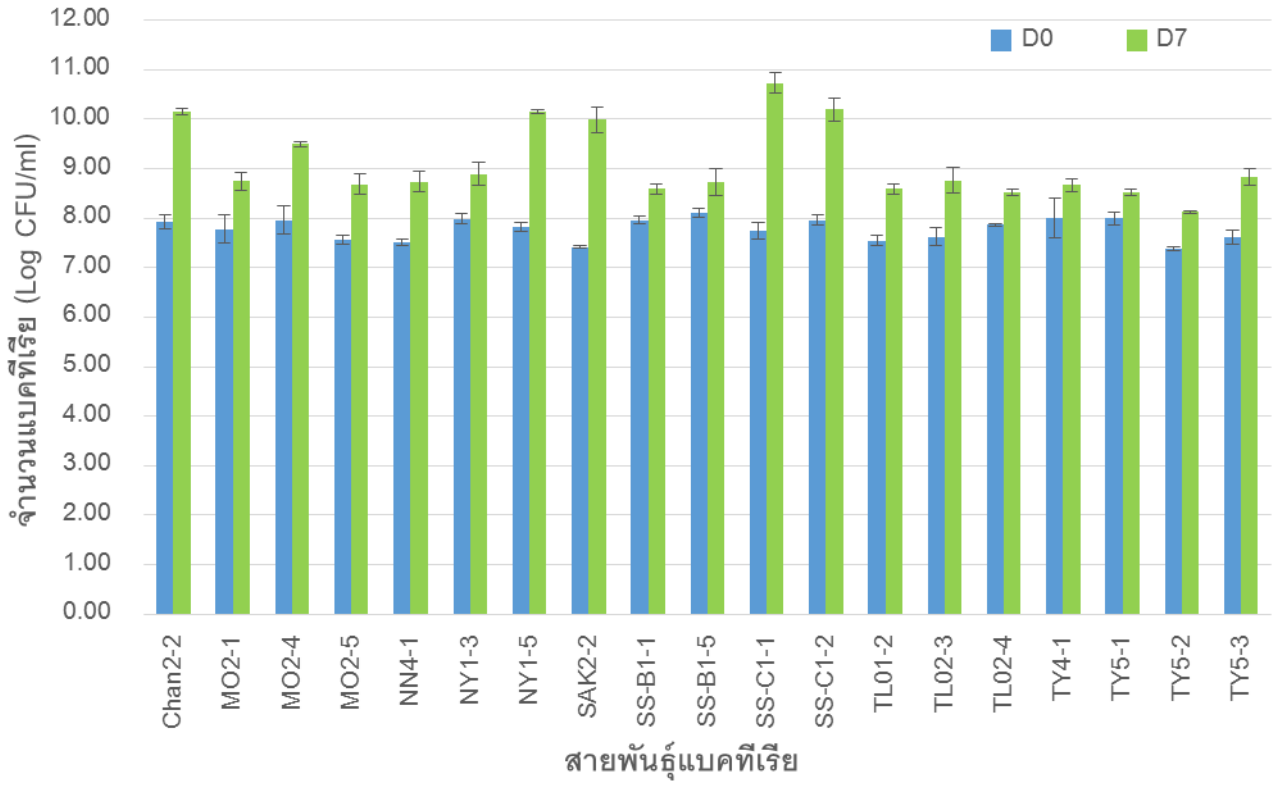
Strain	**ชนิดแบคทีเรีย**	**จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น (%)**	**ปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลง (%)**
Chan2-2	*Pseudomonas taiwanensis*	28.04	59.96±4.80
MO2-1	*Bacillus* sp.	12.45	56.90±1.11
MO2-4	*Sphingobium* sp.	19.28	50.53±1.03
MO2-5	*Bacillus* sp.	15.00	45.23±2.87
NN4-1	*Bacillus* sp.	16.26	36.92±1.08
NY1-3	*Brevibacterium casei*	11.32	34.99±3.11
NY1-5	*Brevibacterium* sp.	29.95	50.84±5.19
SAK2-2	*Pseudomonas* sp.	34.73	60.12±1.71
SS-B1-1	*Aeromonas hydrophila*	7.91	33.46±1.65
SS-B1-5	*Enterobacter cloacae*	7.54	16.26±2.92
SS-C1-1	*Acinetobacter* sp.	38.68	59.42±1.58
SS-C1-2	*Pseudomonas putida*	28.07	44.40±1.27
TL01-2	*Bacillus megaterium*	13.76	52.30±2.19
TL02-3	*Microbacterium esteraromaticum*	15.03	40.46±1.08
TL02-4	*Methylobacterium* sp.	8.32	36.37±2.00
TY4-1	*Pseudomonas aeruginosa*	8.40	33.81±3.88
TY5-1	*Enterobacter cloacae*	6.50	26.71±4.11
TY5-2	*Pseudomonas* sp.	9.97	26.25±3.32
TY5-3	*P. pseudoalcaligenes*	15.86	48.72±4.31

หมายเหตุ ปริมาณน้ำมันที่ลดลงของแบคทีเรียคิดเทียบกับชุดควบคุม

ที่เวลา 0 และ 7 วัน



รูปที่ 4 ปริมาณน้ำมันดิบของแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 19 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% v/v ที่เวลา 0 และ 7 วัน



รูปที่ 5 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 19 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% v/v ที่เวลา 0 และ 7 วัน

5. ความหลากหลายของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยตรง

จากตัวอย่างฟองน้ำ 41 ตัวอย่าง สามารถสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ในฟองน้ำได้จาก 25 ตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากสารบางอย่างจากฟองน้ำอาจรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นจึงใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นแม่แบบในการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและ PAHs โดยวิธี PCR ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 7 โดยในเบื้องต้นพบว่าสามารถพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนหลากหลายยีน ในตัวอย่างฟองน้ำส่วนใหญ่ (16 ตัวอย่างจาก 25 ตัวอย่าง) อย่างไรก็ตามมีเพียง 3 ตัวอย่างที่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ได้แก่ตัวอย่าง SS3, SB2 และ NN5 นอกจากนี้มีตัวอย่าง SS1, SS2, NN8, TL01 และ SAK01 ที่ไม่สามารถตรวจพบยีนใดๆ ได้ ทั้งนี้ยังจำเป็นต้องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ตรวจพบ เพื่อยืนยันและศึกษาความหลากหลายของยีนรวมทั้งแบคทีเรียในฟองน้ำเหล่านี้ต่อไป

ตารางที่ 7 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและ PAHs

Sample	Alk1	Alk2	Alk3	AlkB1	AlkB2	AlkB-1	almAw	CYP153	P450	P450fw	GN	GP
1.SS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.SS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.SS3	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
4.C1	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
5.SB1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
6.SB2	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
7.NN1	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
8.NN3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
9.NN4	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
10.NN5	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
11.NN6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
12NN7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
13.NN8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.NY4	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
15.TL01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.TL02	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
17.TL03	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
18.SAK01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.SAK02	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
20.SAK06	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
21.SAK09	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
22.SAK10	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
23.SAK11	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
24.LAVA 1	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
25.LAVA 2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + คือ พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง

- คือ ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง

3. อภิปรายผลการการวิจัย

กิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะ สิ่งแวดล้อมทางทะล ซึ่งมีสาเหตุมาจาก การขนส่ง การท่องเที่ยว คมนาคม อุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงการเกิดอุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมัน ด้วยสมบัติความเป็นพิษของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ก่อให้เกิดความเสียทางต่อระบบนิเวศทางทะเล และมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย และแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากฟองน้ำทะเล โดยฟองน้ำทะเลเป็นสิ่งมีชีวิตที่รับสารอาหารจากการสูบน้ำทะเลเข้าทางช่องออสเทียผ่านระบบทางเดินน้ำภายในก่อนปลายให้น้ำทะเลออกทางช่องออสคูลัม ซึ่งทำให้มีโอกาสเกิดการสะสมของสารปนเปื้อนที่พบในสิ่งแวดล้อมทางทะเลในเนื้อเยื่อของฟองน้ำทะเล นอกจากนี้ในชั้นมีโซฟิลล์ของฟองน้ำทะเลยังเป็นแหล่งของสารอาหารที่สมบูรณ์สำหรับแบคทีเรียมากกว่าสภาพแวดล้อมภายนอก (Kennedy และคณะ, 2007) ดังนั้นฟองน้ำทะเลจึงเป็นแหล่งสำคัญที่สามารถพบแบคทีเรียที่คงทนต่อสารปนเปื้อน และสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ โดยงานวิจัยนี้ในปีที่ 1 สามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากฟองน้ำทะเลได้ทั้งหมด 13 กลุ่ม แบคทีเรียจาก 41 ตัวอย่างฟองน้ำทะเล ซึ่งเก็บจากทะเลบริเวณจังหวัดชลบุรี และระยอง และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ของทั้ง 13 กลุ่มแบคทีเรีย พบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ได้มากกว่า 60% ทุกกลุ่ม ซึ่งส่วนใหญ่มีความสอดคล้องกับผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และ PAHs ที่สามารถพบยีนหลากหลายได้ในตัวอย่างฟองน้ำทะเลที่ยังไม่ผ่านการ enrichment ทั้งนี้มีรายงานว่าฟองน้ำทะเลสามารถสะสมสารมลพิษต่างๆ ได้หลายประเภท (Rao และคณะ, 2006; Selvin และคณะ, 2009) ด้วยสมบัติดังกล่าวทำให้แบคทีเรียในฟองน้ำทะเลบางชนิดสามารถทน และย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ จึงมีโอกาสที่จะพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และ PAHs ได้จากการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากฟองน้ำทะเล นอกจากนี้รายงานของ Sipkema และคณะ (2015) เกี่ยวกับความหลากหลายของแบคทีเรียในฟองน้ำ และความจำเพาะของชนิดแบคทีเรียกับชนิดฟองน้ำ ที่มีการถ่ายทอดแบบ Vertical และ Horizontal ทำให้ฟองน้ำทะลมีความน่าสนใจในแง่ของการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารมลพิษ

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 13 กลุ่ม โดยสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 27 สายพันธุ์ และระบุชนิดของแบคทีเรีย 19 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ โดยจัดอยู่ในสกุลต่างๆ ดังนี้ สกุล *Pseudomonas* 6 สายพันธุ์, *Acinetobacter* 1 สายพันธุ์, *Brevibacterium* 2 สายพันธุ์ *Aeromonas* 1 สายพันธุ์ *Enterobacter* 2 สายพันธุ์ *Bacillus* 4 สายพันธุ์ *Sphingobium* sp. 1 สายพันธุ์ *Methylobacterium* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Microbacterium* 1 สายพันธุ์ โดยจากแบคทีเรียทั้ง 19 สายพันธุ์ มี 7 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% ได้มากกว่า 50% ใน 7 วัน ได้แก่

Pseudomonas taiwanensis Chan2-2, *Bacillus* sp. MO2-1, *Sphingobium* sp. MO2-4, *Brevibacterium* sp. NY1-5, *Pseudomonas* sp. SAK2-2, *Acinetobacter* sp. SS-C1-1 และ *Bacillus megaterium* TL01-2 ทั้งนี้เคยมีรายงานการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียในสกุลดังกล่าวจากแหล่งตัวอย่างที่แตกต่างกัน และมีประสิทธิภาพการย่อยสลายที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในแฟมิลี Pseudomonadaceae เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุดที่มีรายงานการย่อยสลายน้ำมันดิบ เช่น ในงานวิจัยของ Obayori และคณะ (2009) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 1% v/v ของ *Pseudomonas putida* P11 และ WL2 และ *Pseudomonas aeruginosa* BB3 และ MVL1 และพบว่า *Pseudomonas* ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากกว่า 60% ในเวลา 18 วัน

แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในแฟมิลี Moraxellaceae เป็นอีกกลุ่มแบคทีเรียหลักที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม โดยยกตัวอย่างรายงานการย่อยสลายน้ำมันดิบ เช่น ในงานวิจัยของ Liu และคณะ (2016) ที่ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Acinetobacter* sp. HC8-3S พบว่า *Acinetobacter* sp. HC8-3S พบว่าสามารถย่อยสลายส่วนสารประกอบอิ่มตัวของน้ำมันดิบ 0.5% v/v ได้ 94% ในเวลา 5 วัน และงานวิจัยของ Liu และคณะ (2014) รายงานว่า *Acinetobacter* sp. LS-1 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 70.3% ในเวลา 7 วัน

แบคทีเรียสกุล *Sphingobium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในแฟมิลี Shingomonaceae แบคทีเรียกลุ่มนี้มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย PAHs (Stolz, 2009) ในขณะที่ยังมีรายงานการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมของแบคทีเรียกลุ่มนี้น้อยมาก เช่น Zhang และคณะ (2014) สามารถคัดแยก *Sphinomonas* sp. ที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้

แบคทีเรียสกุล *Aeromonas* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในแฟมิลี Aeromonadaceae ในรายงานของ Ilori และคณะ (2005) *Aeromonas* spp. สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีเมื่อใช้น้ำมันดิบ 0.5% v/v เป็นแหล่งคาร์บอน

แบคทีเรียสกุล *Enterobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในแฟมิลี Enterobacteriaceae มีรายงานการย่อยสลายน้ำมันดิบ เช่น ในงานวิจัยของ Darvishi และคณะ (2011) รายงานว่า *Enterobacter cloacea* ERCPPI-1 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25 % v/v ได้ 76.3% ในเวลา 21 วัน และ Toledo และคณะ (2006) สามารถคัดแยก *Enterobacter* sp. ได้จากตัวอย่างปนเปื้อนน้ำมันดิบและสามารถย่อยสลายแนพธาลีนได้

แบคทีเรียสกุล *Brevibacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในแฟมิลี Brevibacteriaceae ในงานวิจัยของ Chaillan และคณะ (2004) ได้คัดแยก *Brevibacterium* sp. ได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันดิบ และในงานวิจัยของ Ferhat และคกณะ (2011) สามารถคัดแยก *Brevibacterium* sp. ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันดิบ และในงานของ Kiran และคณะ, 2010 สามารถคัดแยก *Brevibacterium casei* MSA19 ที่มีความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผลชีวภาพได้จากฟองน้ำทะเล

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในแฟมิลี Bacillaceae และมีรายงานการย่อยสลายน้ำมันดิบ เช่น Sakthipriya และคณะ (2015) รายงานว่า *Bacillus subtilis* YB7 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ และน้ำมันดิบสังเคราะห์ 2% v/v ได้ 96% ในเวลา 10 วัน และ Thavasi และคณะ (2011) ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 2% v/v ของ *Bacillus megaterium* ที่คัดแยกจากน้ำทะเล พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 70% ในเวลา 7 วัน และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดไกลโคลิปิด (glycolipid) ได้โดยใช้น้ำมันดิบเป็นสารตั้งต้น

แบคทีเรียสกุล *Microbacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในแฟมิลี Microbacteriaceae โดยมีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวจากตัวอย่างปนเปื้อนน้ำมันดิบ เช่น ในงานวิจัยของ Wang และคณะ (2014) สามารถคัดแยก *Microbacterium petrolearium* ได้จากตัวอย่างน้ำปนเปื้อนน้ำมันดิบ และในงานวิจัยของ Schippers และคณะ (2005) ได้คัดแยก *Microbacterium oleivorans* จากบริเวณกักเก็บน้ำมันและ *Microbacterium hydrocarbonoxydans* จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมัน นอกจากนี้ Wicke และคณะ (2000) สามารถคัดแยก *Microbacterium* sp. ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงชีวภาพจากฟองน้ำได้

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในแฟมิลี Methylobacteriaceae และเป็นกลุ่มแบคทีเรียทางทะเลที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมได้ (Salam และคณะ, 2015)

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มต่างๆ ดังนั้นบางชนิดมีรายงานว่าสามารถคัดแยกได้จากฟองน้ำ อย่างไรก็ตามรายงานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่แสดงให้เห็นประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบจากแบคทีเรียจากฟองน้ำ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมชนิดอื่นๆ รวมทั้งการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อต่อยอดพัฒนาเป็นแบคทีเรียสำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมต่อไป

4. สรุป

ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อมทางทะเล ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ และเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย และแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างฟองน้ำทะเล ที่เก็บจากทะเลจังหวัดชลบุรี และจังหวัดชุมพร โดยในเบื้องต้นพบว่าในตัวอย่างฟองน้ำทะเลมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่หลากหลาย แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอยู่ในฟองน้ำ จากนั้นเมื่อเพิ่มกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าว พบว่าสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ทั้งหมด 13 กลุ่มแบคทีเรีย จากตัวอย่างฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีน้ำตาลเหลือง ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง ฟองน้ำต้นไม้สีดำ สาหร่ายสีน้ำตาล ฟองน้ำสีน้ำเงิน ฟองน้ำไฟ ฟองน้ำเคลือบสีเหลือง ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ ฟองน้ำเชือก และฟองน้ำสีน้ำตาล ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ได้ 60 – 92% ในเวลา 7 วัน และยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 27 สายพันธุ์จาก 13 กลุ่มแบคทีเรีย โดยพบว่า 19 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* 6 สายพันธุ์, *Acinetobacter* 1 สายพันธุ์, *Brevibacterium* 2 สายพันธุ์ *Aeromonas* 1 สายพันธุ์ *Enterobacter* 2 สายพันธุ์ *Bacillus* 4 สายพันธุ์ *Sphingobium* sp. 1 สายพันธุ์ *Methylobacterium* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Microbacterium* 1 สายพันธุ์ งานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบจากฟองน้ำทะเล ซึ่งสามารถวิจัยต่อยอดเพื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนต่อไปได้

5. ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยพบว่ามีแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 19 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ อย่างไรก็ตามน้ำมันปิโตรเลียมมีหลายประเภท และมีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน อีกทั้งประสิทธิภาพการย่อยสลายยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำมันอีกด้วย ดังนั้นเพื่อให้ทราบขอบเขตประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียจึงควรศึกษาการย่อยสลายน้ำมันชนิดอื่นๆ เช่น น้ำมันดีเซล และน้ำมันเตา ซึ่งมักพบเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมได้เช่นเดียวกัน และควรศึกษาผลของการแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันต่อประสิทธิภาพการย่อยสลาย นอกจากนี้ควรศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายส่วนประกอบสำคัญของน้ำมันปิโตรเลียม ได้แก่ อัลเคนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่พบมากในน้ำมันปิโตรเลียม และ PAHs ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีความเป็นพิษสูงในน้ำมันปิโตรเลียม และความสามารถในการทนต่อโลหะหนักเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียดังกล่าว และการศึกษาต่อยอดเป็นแบคทีเรียตรึงจะสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพการใช้แบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อมได้ รวมทั้งควรศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากฟองน้ำให้สมบูรณ์ เพื่อสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับประโยชน์จากแบคทีเรียในฟองน้ำ ซึ่งข้อเสนอแนะทั้งหมดนี้จะนำไปศึกษาต่อใน ปีที่ 2 และ 3 ของโครงการ

6. ผลผลิต

1. งานวิจัยปีที่ 1 ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากฟองน้ำ และได้แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมที่คัดแยกจากฟองน้ำ 13 กลุ่มแบคทีเรีย และ 19 สายพันธุ์บริสุทธิ์
2. มีแผนจะนำผลการวิจัยในปีที่ 1 รวมกับผลการวิจัยปีที่ 2 บางส่วน เตรียมเป็น manuscript สำหรับตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับชาติ/นานาชาติ

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กรมเจ้าท่า http://www.md.go.th/ เข้าถึงเมื่อวันที่ 1 มิถุนายน 2559

จุมพล สงวนสิน สุธิดา กาญจน์อติเรกลาภ ศุภวัตร กาญจนอติเรกลาภ และ สมพงศ์ บันติวิวัฒน์กุล, 2543. วารสารการประมง ปีที่ 58 ฉบับที่ 3 เดือนพฤษภาคม-มิถุนายน หน้า 263.

ภาษาอังกฤษ

Alloway, T. M., and Ayres, D. J. 1993. Organic pollutants. In: Chemical Principles of Environmental Pollutants. 1st edition. Chapman and Hall, India, Publishers, p.201.

Alluri, H. K., Ronda, S. R., Settalluri, V. S., Bondili, J. S., Suryanarayana, V. and Venkateshwar, P. 2007. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. A review. Afr J Biotechnol. 6: 2924-2931

Al-Mailem, D. M, Al-Awadh, H., Sorkhoh, N. A., Eliyas, M., and Radwan, S. S. 2011.Mercury resistance and volatilization by oil utilizing haloarchaea under hypersalin e conditions. 15: 39-44.

Al-Saleh, E. S., and Obuekwe, C. 2009. Effect of nickel on the mineralization of hydrocarbons by indigenous microbiota in Kuwait soils. J Basic Microbiol. 49: 256-263.

Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert, H., and Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. Appl Environ Microbiol. 66: 1834-1843.

Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A., and Takada, H. 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediment in Thailand. Mar Pollut Bull. 52: 942-256.

Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Amano, A., Inouchi Y, and Takada H. 2007. Reconstruction of pollution history of organic contaminants in the upper Gulf of Thailand by using sediment cores: first report from Tropical Asia Core (TACO) project. Mar Pollut Bull. 5: 554-565.

Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M. H., Pottier, D., and Budzinski, H. 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). Aquat Toxicol. 79: 257-267.

Cassidy, M. B., Lee, H., and Trevors, J. T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. J Ind Microbiol. 16: 79-101.

Cebron, A., Norini, M. P., Beguiristain, T. and Leyval, C. 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDalpha) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. Microbiology Methods. 73: 148-159.

Censi, P., Spoto, S. E., Saiano, F., Sprovieri, M., Mazzola, S., Nardone, G., Di Geronimo, S. I., Punturo, R. and Ottonello, D. 2006. Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. Chemosphere. 64: 1167-1176.

Chaillan, F., Flèche, A. L., Bury, E., Phanyavong, Y., Grimont, P., Saliot, A. and Oudot J. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Res in Microbiol. 155: 587-595.

Darvishi P., Mowla, D., Ayatollahi, S. and Niazi, A. 2011. Biodegradation of heavy crude oil in wastewater by an efficient strain, ERCPPI-1. Desalination and Water Treatment. 28: 46-54.

Ei Tun, Z. H., Parkpian, P., Delaune, R. D., Gambrell, R. P., and Jugsujinda, A. 2009. Cadmium concentration in sea bottom sediment and its potential risk in the upper Gulf of Thailand. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. 44: 244-248.

Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M., and Rodriguez, M. S. 2006. Bioremediaiton of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrding bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. Int Biodeter Biodegr. 57: 222-228.

Gentry, T. J., Rensing, C., and Pepper, I. L. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. Cri Rev Env Sci Tech. 34: 447-494.

Hansen, V., Weeks, J. M., and Depledge, M. H. 1995. Accumulation of copper, zinc, cadmium and chromium by the marine sponge *Halichoria panicea* pallas and the implications for biomonitoring. Mar Pollut Bull. 31: 133-138.

Haritash, A. K., and Kaushik, C. P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. J Hazard Mater. 169: 1-15.

Heitkamp, M. A., Franklin, W., and Cerniglia, C. E. 1988. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Isolation and characterization of a pyrene degrading bacterium. Appl Microbiol Biotechnol. 54: 2549-2555.

Johnsen, A. R., Wick, L. Y., and Harm, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environ. Pollut. 133: 71-84.

Ilori M. O., Amobi, C. J. and Odocha A. C. 2005. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. Chemosphere. 61: 985-992

Kefalas, E., Castritsi-Catharios, J., and Miliou, H. 2003. Bacteria associated with the sponge *Spongia officinalis* as indicators of contamination. Ecol Indic. 2: 339-343.

Kiran, G.S., Sabarathnam, B. and Selvin, J. 2010. Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 59: 432-438.

Klankeo, P., Nopcharoenkul, W., and Pinyakong, O. 2009. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil. J Biosci Bioeng. 108: 488-495.

Kohno, T., Sugimoto, Y., Sei, K. and Mori, K. 2002. Design of PCR primers and gene probes for general detection alkane-degrading bacteria. Environmental Microbiology. 17: 114-212.

Lan, W. U., Gang, G. E., and Jinbao, W. 2009. Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. J Environ Sci. 21: 237-242.

Liang, Y., Li, G., Van Nostrand, J. D., He, Z, Wu, L., Deng, Y., Zhang, X., and Zhou, J. 2009. Microarray-based analysis of microbial functional diversity along an oil contamination gradient in oil field. FEMS Microbiol Ecol. 70: 168-177.

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: 1168-1178.

Liu, Y., Hu, X. and Liu, H. 2016. Industrial-scale culturing of the crude oil-degrading marine *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S. International Biodeterioration & Biodegradation. 107: 56-61.

Liu, H., Yao, J., Yuan, Z., Shang, Y., Chen, H., Wang, F., Masakorala, K., Yu, C., Cai, M., Blake, R. E. and Choi, M. M. F. 2014. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China. International Biodeterioration & Biodegradation. 87: 52-59.

Long, R. M., Lappin-Scott, H. M., and Stevens, J. R. 2009. Enrichment and identification of polycyclic aromatic compound-degrading bacteria enriched from sediment samples. Biodegradation 20: 521-531.

Marcos, M. S., Lozada, M., and Dionisi, H. M. 2009. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. Lett Appl Microbiol. 49: 602-608.

McGenity, T. J. 2014. Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. Curr Opin Biotechnol. 27: 46–54.

Mitra, A., Chowdhury, R., and Banerjee, K. 2012. Concentrations of some heavy metals in commercially important finfish and shellfish of the River Ganga. Environ Monit Assess**.** 184: 2219-2230.

Niepceron, M., Portet-Koltalo, F., Merlin, C., Motelay-Massei, A., Barray, S., and Bodilis, J. 2010. Both *Cycloclasticus* spp. and *Pseudomonas* spp. as PAH-degrading bacteria in the Seine estuary (France). FEMS Microbiol Ecol. 71: 137-147.

Obayori, O. S., Adebusoye, S. A., Adewale, A. O., Oyetibo, G. O., Oluyemi, O. O., Amokun, R. A. and Ilori, M. O. 2009. Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strains. Journal of Environmental Sciences. 21: 243-248.

Obuekwe, C. O. and Al-Muttawa, E. M. 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. Biotech Letters. 23: 1025-1032.

Peng, R. H, Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S., and Yao, Q. H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol. Rev. 32: 927-955.

Pinyakong, O**.,** Habe, H**.**, and Omori, T**.** 2003. The unique aromatic catabolic genes in *Sphingomonads* degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). J. Gen. Appl. Microbiol. 49: 1-19.

Rahman, R. N., Ghaza, F. M., Salleh, A. B., and Basri, M. 2006. Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells. J Microbiol. 44: 354-359.

Rao, V. J., Kavitha, P., Reddy, N. C. and Rao, T. G. 2006. *Petrosia testudinaria* as a biomarker for metal contamination at Gulf of Mannar, southeast coast of India. Chemosphere. 65: 634-638.

Sakthipriya, N., Doble, M. and Sangwai, J. S. 2015. Fast degradation and viscosity reduction of waxy crude oil and model waxy crude oil using *Bacillus subtilis*. Journal of Petroleum Science and Engineering. 134: 158-166.

Saiphet, A., Juntongjin, K., Pattarakulwanich, K., Pinphanichakarn, P., and Thaniyavarna, S. 2006. Novel acenaphthene degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain SP2. J. Sci. Res. Chula. Univ. 31: 83-94.

Salam, L. B., Obayori, O. S. and Raji, S. A. 2015. Biodegradation of used engine oil by a methylotrophic bacterium, Methylobacterium mesophilicum isolated from tropical hydrocarbon-contaminated soil. Petroleum Science and Technology. 33: 186-195.

Santhiya, G., Lakshumanan, C., Selvin, J., and Asha, D. 2011. Microbiological analysis of seawater and sediments in urban shorelines: Occurrence of heavy metals resistance bacteria on Chennai beaches, Bay of Bengal. Microchem J. doi:10.1016/j.microc.2011.05.004.

Santos, A. L., Peixoto, R., Rosado, A. S. 2009. New approaches to understanding microbial diversity in wastewater, landfills and leachate treatment. Oecol Bras. 13: 631-648.

Schipper, A., Bosecker, K., Sproer, C. and Schumann, P. 2005. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 655-660.

Selvin, J., Priya, S. S., Kiran, G. S., Thangavelu, T. and Bai, N. S. 2009. Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. Microbiological Research. 164: 352-363.

Sipkema, D., Caralt, S. D., Morillo, J. A., Soud, W. A. A., Sørensen, S. J., Smidt, H. and Uriz, M. J. 2015. Similar sponge-associated bacteria can be acquired via both vertical and horizontal transmission. Environmental Microbiology. 17: 3807-3821.

Spiegelman, D., Whissell, G., and Greer, C. W. 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. Can J Microbiol. 51: 355-386.

Stolz A. 2009. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. Applied Microbiology and Biotechnology. 81: 793–811.

Tathong, S. 2007. Assessment of bioremediation potential of wastewater from petrol station. Master thesis. Program in Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University.

Thavasi, R., Jayalakshima, S. and Banat, I. M. 2011. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*, Bioresource Technology. 102: 772-778.

Toledo, F. L., Calvo, C., Rodelas, B. and Lo´pez, J. G. 2006. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. Systematic and Applied Microbiology. 29: 244-252.

Urani,C., Melchioretto,P., Canevali, C., and Crosta, G.F. 2005. Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 cells exposed to cadmi um. Toxicol In Vitro. 19: 887-892.

van Beilen, J. B. and Funhoff, E. G. 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. Appl Microbiol Biotechnol. 74: 13-21.

Wang H., Xiang, T., Wang, Y., Song, J., Zhai, Y., Chen, X., Li, Y., Zhao, B., Zhao, B. and Ruan, Z. 2005. *Microbacterium petrolearium* sp. nov., isolated from an oil-contaminated water sample. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64: 4168-4172.

Wang, L., Wang, W., Lai, Q. and Shao, Z. 2010a. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. Environmental Microbiology. 12: 1230-1242.

Wang, W., Wang, L., and Shao, Z. 2010b. Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes in the subtropical seawater of Xiamen island. Microb Ecol. DOI 10.1007/s00248-010-9724-4.

Wang, Y., Guan, S., Acharya, P., Koop, D. R., Liu, Y., Liao, M., Burlingame, A. L. and Correia, M. 2011. Ubiquitin-dependent proteasomal degradation of human liver cytochrome P450 2E1: identification of sites targeted for phosphorylation and ubiquitination. Biology Chemistry. 286: 9443-9456.

Webster, N. S. and Bourne, D. 2007. Bacterial community structure associated with the Antarctic sort coral, *Alcyonium antarcicum*. FEMS Microbioal Ecol. 59: 81-94.

Whyte, L. G., Smits, T. H. M., Labbe, D., Witholt, B., Greer, C. W. and Van Beilen, J. B. 2002. Cloning and character-ization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* spp. strains Q15 and 16531. Applied Environment Microbiology. 12: 5933-5942.

Wicke, C., Huners, M., Wary, V., Nimtz, M., Bilitewski, U. and Lang, S. 2000. Production and structure elucidation of glycoglycerolipids from a marine sponge-associated *Microbacterium* species. Journal of Natural Products. 63: 621-626.

Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A. I., Drainas, C. 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. Appl Microbiol Biotechnol. 65: 124-131.

Zhang, Q., Wangm D., Li, M., Xiang, W.-N. and Achal, V. 2014. Isolation and characterization of diesel degrading bacteria, Sphingomonas sp. and Acinetobacter junii from petroleum contaminated soil. Front Earth Sci 8: 58-63.

Zukauskaite, A., Jakubauskaite, V., Belous, O., Ambrazaitiene, D., and Stasiskiene, Z. 2008. Impact of heavy metals on the oil products biodegradation process. Waste Manag Res. 26: 500-507.

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

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

ละลายสารทั้ง 3 ชนิดในน้ำกลั่นปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 5 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้นหรือแบคโตอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Natural sea water (NSW)

น้ำทะเล (Sea water)	200	มิลลิลิตร
น้ำปรอบประจุ	800	มิลลิลิตร
NH4NO3	1	กรัม
K2HPO4	0.02	กรัม
Ferric citrate	0.02	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.5	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบของน้ำมันดิบ

Arab Extra Light (AXL)

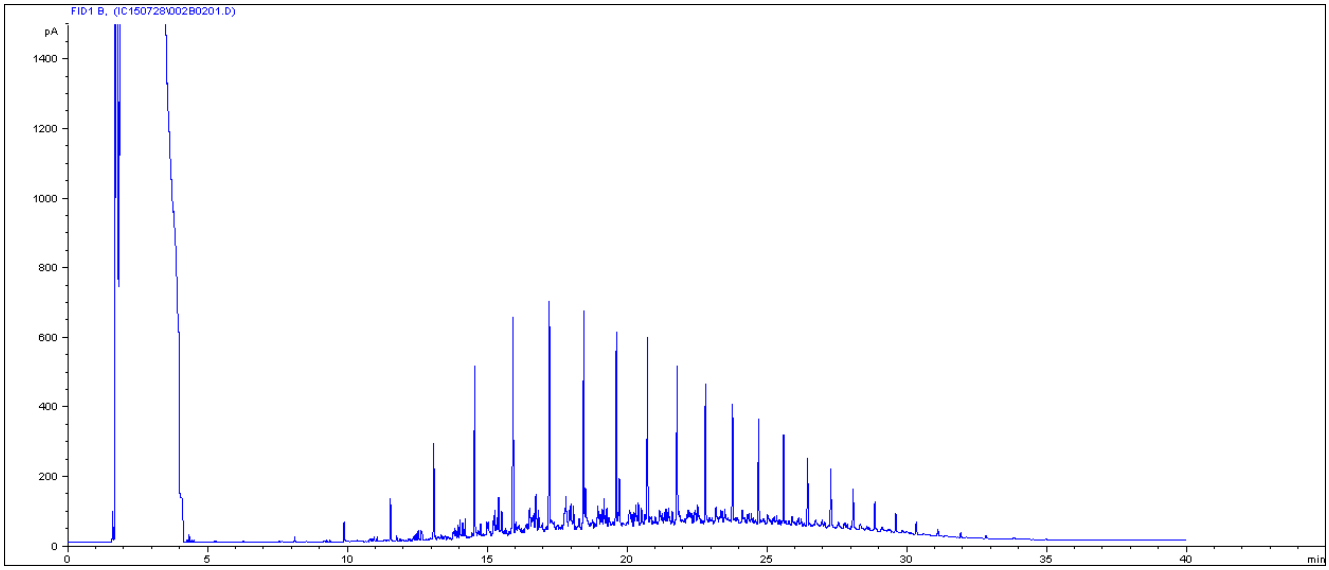
LPG	1.64	%
TOPS (C5-C85)	9.18	%
Naphtha (C85-C150)	14.08	%
Kerosene (C150-C270)	24.06	%
Gasoil (C270-C370)	18.39	%
Waxy (C370-C570)	24.06	%
SR (C570+)	8.59	%

Arab Light (ARL)

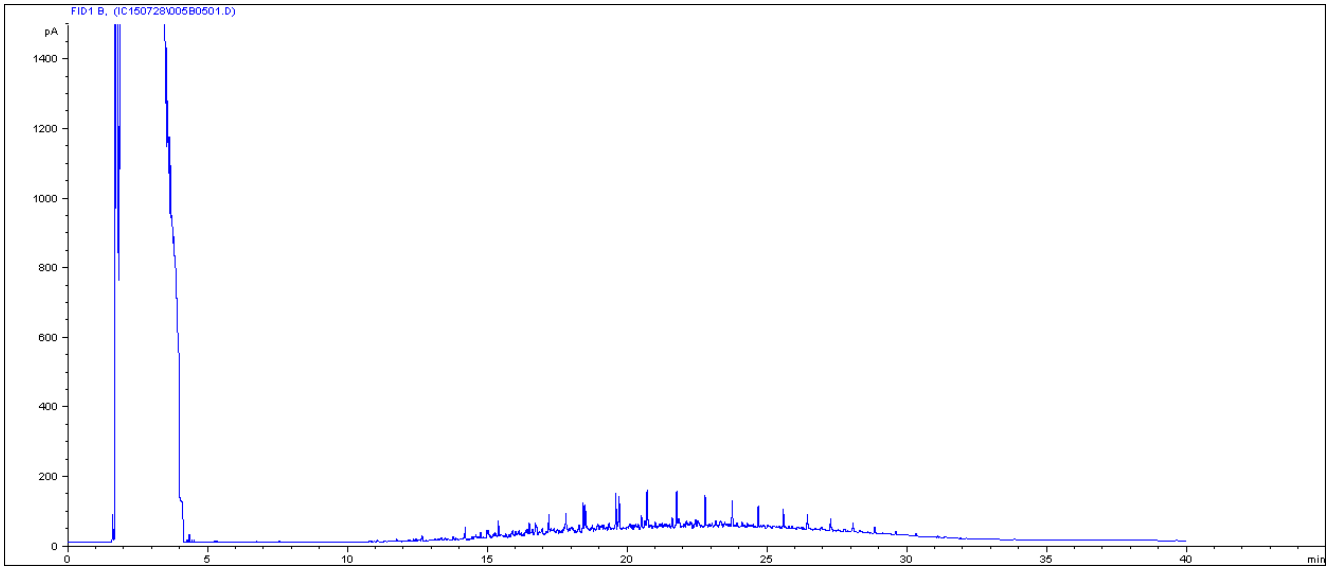
LPG	2.22	%
TOPS (C5-C85)	5.45	%
Naphtha (C85-C150)	10.18	%
Kerosene (C150-C270)	19.54	%
Gasoil (C270-C370)	18.30	%
Waxy (C370-C570)	28.62	%
SR (C570+)	15.70	%

<u>ตัวอย่าง Chromatogram</u>

โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียกลุ่ม TY4 ในเวลา 7 วัน ก). ชุดควบคุม ข).ชุดทดลอง



ก).



รูปที่ 18 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ของ TY4 ในเวลา 7 วัน
ก). ชุดควบคุม ข).ชุดทดลอง

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว ชุติวรรณ นามสกุล เดชสกุลวัฒนา
(ภาษาอังกฤษ) Miss Chutiwan Dechsakulwatana
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1009-02499-42-8
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ หัวหน้างานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล
เงินเดือน 64,800 บาท
เวลาที่ใช้ทำวิจัย 15 ชั่วโมง : สัปดาห์ (ปกติปฏิบัติงาน สัปดาห์ละ 6 วัน ๆ ละ 9 ชั่วโมง)

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล
มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131
โทรศัพท์ (038) 391671-3 โทรสาร (038) 391674
E-mail: chutiwan@buu.ac.th, chutiwan@bims.buu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

- วท. บ. (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน, 2526
- M.Sc. (Fishery Science)	The University of Tokyo, 1991
- Ph.D. (Fishery Science)	The University of Tokyo, 1994

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
- เทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแบคทีเรียทะเล
- จุลชีววิทยาทางทะเล
- นิเวศนวิทยาทางจุลชีววิทยาในน้ำเค็ม

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย “สารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่จากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของไทย” (2548-2550)
ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย โครงการถ่ายทอดความรู้การคัดแยก การเพาะขยายพันธุ์ และการเก็บรักษา สายพันธุ์จุลินทรีย์ แพลงก์ตอน และสัตว์หน้าดิน เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตวน้ำ (2546)

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
- หัวหน้าโครงการการวิจัย ลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายของจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล ภายใต้แผนงานวิจัย ทรัพยากรชีวภาพทางทะเลกับการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน กรณีศึกษาหาดนางรอง เกาะจระเข้และกลุ่มเกาะจวง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (2551)
- หัวหน้าโครงการการวิจัย “แบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำไทย : แหล่งใหม่ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร” ภายใต้แผนงานวิจัย “สารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่จากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของไทย” (2548-2550)

- หัวหน้าโครงการการวิจัยร่วมไทย-ญี่ปุ่น “การยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง *Balanus amphitrite* โดยแบคทีเรียจากทะเล” (พ.ศ. 2534 - 2537) ทุนการศึกษารัฐบาลญี่ปุ่น

- ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัยร่วมไทย-ญี่ปุ่น “การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมีและชีววิทยาในบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง” (พ.ศ. 2537 - 2539) โดยทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและองค์การส่งเสริมความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์แห่งประเทศญี่ปุ่น (JSPS)

- หัวหน้าโครงการวิจัยร่วมไทย-ญี่ปุ่น “การศึกษาไบโอแอกทีฟ เมตตาบอไลต์ จากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในประเทศไทย” (พ.ศ. 2538 - 2540) โดยทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและองค์การส่งเสริมความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์แห่งประเทศญี่ปุ่น (JSPS)

- หัวหน้าโครงการวิจัย “การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด” (พ.ศ. 2539 - 2541) โดยทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

- ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย”การติดตามตรวจสอบคุณภาพสิ่งแวดล้อมของแม่น้ำระยองและแม่น้ำประแสร์” (พ.ศ. 2539-มี.ค.2540) โดยทุนสนับสนุนจากสำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม.

- ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย”การติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก(ต.ค.พ.ศ. 2543-ก.ย.2544) ทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

ปิยะเนตร พึ่งพา**,** ชูตา บุญภักดี และ ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, 2554. การบ่งชี้แบคทีเรีย 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล 8 ชนิด ด้วยลาดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA*. การประชุ มวิชาการ ทรัพยากรไทย : ก้าวสู่โลกกว้างอย่างมั่ นใจ, มหาวิทยาลัยราชมงคลเทคโนโลยีอีสาน จ.นครราชสีมา วันที่ ๑-๗ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๕๔. (ภาคบรรยาย หน้า101-109)

Thawornwiriyanun, Patcharee., Somboon Tanasupawat, **Dechsakulwatana, Chutiwan**, Somkiet Techkarnjanaruk, and Worapot Suntornsuk. 2012. Identification of Newly Zeaxanthin-Producing Bacteria Isolated from Sponges in the Gulf of Thailand and their Zeaxanthin Production. Appl Biochem Biotechnol., June 2012, 12 pp.

Patcharee Thawornwiriyanun, Somboon Tanasupawat, **Chutiwan Dechsakulwatana**, Somkiet Techkarnjanaruk, and Worapot Suntornsuk. 2012. Identification of Newly Zeaxanthin-Producing Bacteria Isolated from Sponges in the Gulf of Thailand and their Zeaxanthin Production. Appl Biochem Biotechnol., June 2012, 12 pp.

Thawornwiriyanun, Patcharee., **Dechsakulwatana, Chutiwan**, Sunthornsuk, Leena, and Suntornsuk, Worapot. 2009. Carotenoid Production from Sponge-associated Bacteria Isolated in the Gulf of Thailand. *J. Science, Technology, and Humanities*. 7:11-18.

Janjarus Watanachote, Suriyan Tunkijjanukij, **and Chutiwan Dechsakulwatana.** 2008. Antibacterial proteins in the serum hemolymph and hemocyte lysate supernatant of the banana prawn, *Penease merguiensis*. Journal of Science, Technology, and Humanities. Vol. 6(1):5-17.

Wimolpun Rungprom., Lynette K Lambert., **Chutiwan Dechsakulwatana**., Michael C. Barden., Warinthorn Chavasiri., Udom Kokpol., and Mary Garson. 2008. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria

associated with the seaweed *Diginea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*. ***Tetrahedron***. 64(14):3147-3152.

Janjarus Watanachote, **Chutiwan Dechsakulwatana**, Sunanta Ratanapo, Supawadee Poompuang **and** Suriyan Tunkijjanukij 2007. Partial purification of lectin from hemolymph of *Peneaus meguiensis* with antibacterial activity and bacterial clearance activity**..** ournal of Science, Technology, and Humanities. Vol. 5(1): 3-16.

Piyawan Srivilas, Chutiwan Dechsakulwatana and Kanpitcha Jaidee. Screening of Bacterial Associated with marine sponges for essential fatty acids. การประชุมวิชาการ จับกระแสการรักษาและยาใหม่ Natural sources &Active compound discovery 24-25 เมษายน 2551 โรงแรมเอเซีย กรุงเทพฯ.

Piyawan Srivilas, Chutiwan Dechsakulwatana and Kanpitcha Jaidee**.** Fatty acid compositions in bacteria associated with marine sponges from eastern coast of Thailand. การประชุมวิชาการ เพื่อการนำเสนอผลงานวิจัย ม.บูรพา 2551. 7 กรกฎาคม 2551 หอประชุมธำรงบัวศรี มหาวิทยาลัยบูรพา.

Dechsakulwatana, Chutiwan., Fukami, Kimio., Pinkaew, Khwanruan, and Wongsudawan, Wanchai. 2006. Isolation and killing algicidal bacteria on a diatom *Skeletonema* sp. and a Dinoflagellate *Noctiluca scintillans* in Thailand**.** Coastal Marine Science. 30(1): 100-103.

A.A. Bordalo, Ratiwan. Onrassami, and **Chutiwan Dechsakulwatana**. 2002. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (bangpakong river thailand). **Journal of Applied Microbiology**. 93:864-871.

Dechsakulwatana, C., P. Ra-ngubpit, and S. Putchakarn. 2002. Inhibiton of Larval Attachment by Isolated Bacteria from Sponges and Soft Corals Collected from Chang Islands, Thailand. Proceeding of the 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "biotechnology for Better Living in the New Economy" 12-15 November 2002, Khon Kaen, Thailand. P. O-IBO2/1-5

Piyawan Srivilas, Chutiwan Dechsakulwatana and Kanpitcha Jaidee. Screening of Bacterial Associated with marine sponges for essential fatty acids. การประชุมวิชาการ จับกระแสการรักษาและยาใหม่ Natural sources &Active compound discovery 24-25 เมษายน 2551 โรงแรมเอเซีย กรุงเทพฯ.

Piyawan Srivilas, Chutiwan Dechsakulwatana and Kanpitcha Jaidee**.** Fatty acid compositions in bacteria associated with marine sponges from eastern coast of Thailand. การประชุมวิชาการ เพื่อการนำเสนอผลงานวิจัย ม.บูรพา 2551. 7 กรกฎาคม 2551 หอประชุมธำรงบัวศรี มหาวิทยาลัยบูรพา.

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, สุวดี ประคองภักดิ์, จิรภัทร จันทมาลี 2551. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากบริเวณหินขาว หมู่เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง การประชุมวิชาการ 7 กรกฎาคม 2551. ณ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี.

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา และ สุเมตต์ ปุจฉาการ. 2551. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากเกาะหมาก จังหวัดตราด. การประชุมวิทยาศาสตร์ทางทะเลแห่งประเทศไทย. 25-27 สิงหาคม 2551. ณ โรงแรมภูเก็ต จ.ภูเก็ต

Presentation

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, สุวดี ประคองภักดิ์, จิรภัทร จันทมาลี 2551. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากบริเวณหินขาว หมู่เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง การประชุมวิชาการ 7 กรกฎาคม 2551. ณ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี.

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา และ สุเมตต์ ปุจฉาการ. 2551. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากเกาะหมาก จังหวัดตราด. การประชุมวิทยาศาสตร์ทางทะเลแห่งประเทศไทย. 25-27 สิงหาคม 2551. ณ โรงแรมภูเก็ต จ.ภูเก็ต

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, สุวดี ประคองภักดิ์, จิรภัทร จันทมาลี (in preparation). ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากบริเวณหินขาว หมู่เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง การประชุมวิชาการ 7 กรกฎาคม 2551. ณ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี.

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา และ สุเมตต์ ปุจฉาการ. (in preparation). ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากเกาะหมาก จังหวัดตราด. การประชุมวิทยาศาสตร์ทางทะเลแห่งประเทศไทย. 25-27 สิงหาคม 2551. ณ โรงแรมภูเก็ต จ.ภูเก็ต

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ สุริยัน ตันกิจจานุกิต และ **ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา** สมบัติทางชีวเคมีของเลคตินจากน้ำเลือดกุ้งแชบ้วย. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 วันที่ 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10 หน้า.

Piyawan Srivilas, **Chutiwan Dechsakulwatana** and Kanpitcha Jaidee. Screening of Bacterial Associated with marine sponges for essential fatty acids. การประชุมวิชาการ จับกระแสการรักษาและยาใหม่ Natural sources &Active compound discovery 24-25 เมษายน 2551 โรงแรมเอเซีย กรุงเทพฯ.

Piyawan Srivilas, **Chutiwan Dechsakulwatana** and Kanpitcha Jaidee**.** Fatty acid compositions in bacteria associated with marine sponges from eastern coast of Thailand. 2007. การประชุมวิชาการเพื่อการนำเสนอผลงานวิจัย ม.บูรพา 2551. 7 กรกฎาคม 2551 หอประชุมธำรงบัวศรี มหาวิทยาลัยบูรพา.

Dechsakulwatana, Chutiwan., Chutiwan Dechsakulwatana, Pawinee Piyachaturawat, Vichai Reutrakul (in preparation). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Sponge-Associated Bacteria Collected from the Gulf of Thailand. 2nd East Asian Marine Biosience Symposium. at Conference Hall, Hokkaido University, Sapporo, Japan. December 4, 2007.

Dechsakulwatana, Chutiwan., Wimolpun Rungprom, and Pawinee Piyachaturawat 2007. Antimicrobial and Biological Activity of Sponge-associated Marine Bacteria Collected from Thailand. Workshop and Seminar on Chemistry, Biological Activity and Biodiversity of Marine Organisms, November 6-8, 2007. Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi.

Patcharee Thawornwiriyanun, Chutiwan Dechsakulwatana, Leena Sunthornsuk, and Worapot Sunthornsuk. 2007. Workshop and Seminar on Chemistry, Biological Activity and Biodiversity of Marine Organisms, November 6-8, 2007. Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi.

Dechsakulwatana, Chutiwan., Wimolpun Rungprom., Rawiwan Watanadilok., Preecha Phuwapraisirisarn. And Mary Garson. 2007. Natural Compounds from the Marine Organisms and their Associated Bacteria Collected from the Gulf of Thailand PERCH-CIC Congress V, Theme:Chemistry for Innovation, May 6-9, 2007, Pataya, Chonburi, Thailand.

Nipha Keawngarm**, Chutiwan Dechsakulwaatana ,** and Daungta Julsirikul. 2007. Screening of antimicrobial activity of marine bacteria associated with some sponges collected from Krok Island, Chonburi Province. Workshop and Seminar on Chemistry, Biological Activity and Biodiversity of Marine Organisms, November 6-8, 2007. Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi.

Sirichom Thungkao , Chutivan Dechsakulwatana, Kunagon Cheusuwon˙ 2007. Effect of pH, agitation and aeration on growth and antimicrobial agents production of CDF04, a bacterial isolated from sponge**.** Workshop and Seminar on Chemistry, Biological Activity and Biodiversity of Marine Organisms, November 6-8, 2007. Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi.

Janjarus Watanachote, Maywarin Chaichareon, **Chutiwan Dechsakulwatana**, and Suriyan Tunkijjanukij. (in preparation). Preliminary Characterization of Leatins in Marine Sponges from Chonburi Province.

Janjarus Watanachote, **Chutiwan Dechsakulwatana**, and Suriyan Tunkijjanukij. 2008. Antibacterial proteins in the serum hemolymph and hemocyte lysate supernatant of the Banana Prawn, *Peneaus meguiensis*. Journal of Science, Technology, and Humanities: 2008, Vol. 6(1): 5-17.

Dechsakulwatana, Chutiwan., Chutiwan Dechsakulwatana, Pawinee Piyachaturawat, Vichai Reutrakul 2007. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Sponge-Associated Bacteria Collected from the Gulf of Thailand. 2nd East Asian Marine Biosience Symposium. at Conference Hall, Hokkaido University, Sapporo, Japan. December 4, 2007.

Dechsakulwatana, Chutiwan., Wimolpun Rungprom, and Pawinee Piyachaturawat 2007. Antimicrobial and Biological Activity of Sponge-associated Marine Bacteria Collected from Thailand. Workshop and Seminar on Chemistry, Biological Activity and Biodiversity of Marine Organisms, November 6-8, 2007. Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi.

Dechsakulwatana, Chutiwan., Wimolpun Rungprom., Rawiwan Watanadilok., Preecha Phuwapraisirisarn. And Mary Garson. 2007. Natural Compounds from the Marine Organisms and their Associated Bacteria Collected from the Gulf of Thailand PERCH-CIC Congress V, Theme:Chemistry for Innovation, May 6-9, 2007, Pataya, Chonburi, Thailand.

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา. 2550. สารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ จากบริเวณชายฝั่งทะเลในอ่าวไทย. เคมีเพื่อนวัตกรรมช จากงานวิจัยสู่เชิงพาณิชย์. 7 พฤษภาคม 2550 โรงแรมจอมเทียนปาล์มบีช. พัทยา. ชลบุรี.

Dechsakulwatana, Chutiwan., Rungprom, Wimolpun., Kokpol, Udom., Garson, Mary., Chavasiri, Warinthorn., and Putchakarn, Sumaitt.. 2005. Antimicrobial Substance of Marine Bacteriaum, *Pseudoalteromonas* sp. associated with Sponges, *Halisurca ectofibrosa* Collected from the

Gulf of Thailand. International Marine Biotechnology Conference 2005, June 7-12, 2005, St. John' Newfoundland& Labrador, Canada.

.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย

- ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย "สารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย" โดยทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (ปี 2548- 2550)

- หัวหน้าโครงการวิจัย "แบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำไทย: แหล่งใหม่ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร" โดยทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (ปี 2548- 2550)

8. งานสนับสนุนการเรียนการสอน

- อาจารย์พิเศษ สอนปริญญาตรี และปริญญาโท ประจำภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
- อาจารย์พิเศษ ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. **ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)** นางสาวอรฤทัย ภิญญาคง
   ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Onruthai Pinyakong
2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3 9699 00206 65 3
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** รองศาสตราจารย์
   เงินเดือน 52,000 บาท
   เวลาที่ใช้ทำวิจัย 15 ชั่วโมง : สัปดาห์
4. **หน่วยงาน** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   สถานที่ติดต่อ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 02-2185070 **โทรสาร** 02-2527576
   E-mail onruthai@gmail.com, onruthai.p@chula.ac.th
5. **ประวัติการศึกษา**

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	จุลชีววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2540
วท.ม.	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2543
Ph.D	Biotechnology	The University of Tokyo	2546

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ แบคทีเรียวิทยา พันธุศาสตร์ของแบคทีเรีย จุลชีววิทยาทางสิ่งแวดล้อม และเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนมลพิษ

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย:

7.1.1 การแยกและลักษณะสมบัติของยีนประมวลรหัสพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโครคาร์บอนไดออกซิจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 ซึ่งย่อยสลายอะซีแนพธีน และอะซีแนพธิลีน (พ.ศ.2546-2548)

7.1.2 Monitoring of survival of phenanthrene utilizing *Sphingobium* sp. P2 in soil microcosms by using green fluorescent protein as a marker (พ.ศ.2546)

7.1.3 การคัดแยกและลักษณะสมบัติของยีนประมวลรหัสอะซีแนพธีนไดออกซิจีเนสใน *Sphingomonas* sp. SP2 (พ.ศ.2549)

7.1.4 การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนและการบำบัดดินปนเปื้อนโดยชีววิธี (พ.ศ.2550)

7.1.5 Biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil under acidic condition (พ.ศ.2550)

7.1.6 การเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำสำหรับย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อมและการเก็บรักษาในระยะยาว (พ.ศ. 2551)

7.1.7 การคัดแยกและลักษณะสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากเมตาจีโนมดิน (พ.ศ.2552)

7.1.8 การคัดแยกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถใช้ไขมัน น้ำมัน หรือกลีเซอรอล เป็นสารตั้งต้น (พ.ศ.2553)การผลิตและประยุกต์ใช้แบคทีเรียสูตรน้ำสำหรับบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (พ.ศ.2553)

7.1.9 การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายไขมันสำหรับระบบบำบัดน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันเชื้อเพลิง (พ.ศ. 2554)

7.1.10 การผลิตและการประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียแบบอัดเม็ดสำหรับย่อยสลายไขมันในระบบบำบัดน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันเชื้อเพลิง (พ.ศ.2555-2556)

7.1.11 ความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนหรือไพรีนในดินตะกอนบริเวณเกาะสีชัง (พ.ศ.2556-2557)

7.1.12 การเพิ่มศักยภาพของแบคทีเรียอัดเม็ดในการย่อยสลายไขมันในบ่อดักไขมัน (พ.ศ.2557-2558)

7.1.13 Developing the granular bacteria from *Novosphingobium* sp. PCY for pyrene-contaminated soil bioremediation (พ.ศ.2557-2558)

7.1.14 Genome analysis and polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic network in bacterial consortium PCY (พ.ศ.2557-2559)

7.1.15 การกำจัดน้ำมันดีเซลโดยแบคทีเรียในเม็ดไคโตซาน-คาร์บอนกัมมันต์ (พ.ศ.2557-2558)

7.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

7.2.1 การบำบัดน้ำทิ้งสถานีบริการน้ำมันเชื้อเพลิงด้วยวิธีชีวภาพ (พ.ศ.2551-2553)

7.2.2 การผลิตและประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสำหรับอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (พ.ศ.2557-2558)

7.2.3 Assessment of microbial community structures and capability on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in flood affected river sediment for bioremediation (พ.ศ.2555)

7.2.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ของเสียกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นและการพัฒนาวิธีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (พ.ศ.2555-2556)

7.2.5 การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสำหรับกำจัดคราบสกปรก กระจายคราบน้ำมัน และบำบัดของเสียจากการขุดเจาะน้ำมันดิบ (พ.ศ.2557-2558)

7.2.6 การปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากคลังน้ำมันพระโขนงด้วยกระบวนการทางชีวภาพด้วยจุลชีพ (พ.ศ.2557-2558)

7.3 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

7.3.1 Khongkhaem, P., Suttinun, O., Intasiri, A., **Pinyakong, O.**, and Luepromchai, E. (2016) Degradation of phenolic compounds in palm oil mill effluent by silica-immobilized bacteria in internal loop airlift bioreactors. CLEAN - Soil, Air, Water. 44: 383-392.

7.3.2 Muangchinda, C., Chavanich, S., Viyakarn, V., Watanabe, K., Imura, S., Vangnai, A.S., and **Pinyakong, O.** (2015) Abundance and diversity of functional genes involved in the degradation of aromatic hydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station. Environmental Science and Pollution Research 22: 4725-4735.

7.3.3 Khondee, N., Tathong, S., **Pinyakong, O.**, Müller, R., Soonglerdsongpha, S., Ruangchainikom, C., Tongcumpou, C., and Luepromchai., E. (2015) Lipopeptide biosurfactant production by chitosan-immobilized *Bacillus* sp. GY19 and their recovery by foam fractionation. Biochemical Engineering Journal 93:47-54.

7.3.4 Tachaboonyakiat, W., Sukpaiboon, E., and **Pinyakong, O.** (2014) Development of antibacterial chitin betainate wound dressing. Polymer Journal. 46:505-510

7.3.5 Wongwongsee, W., Chareanpat, P., and **Pinyakong O.** (2013) Abilities and genes for PAH degradation of bacteria isolated from mangrove sediments from a central of Thailand. Marine Pollution Bulletin 74: 95-104.

7.3.6 Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W., and **Pinyakong O.** (2013) Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samut Songkram Province, Thailand. Journal of Applied Microbiology 114:1311-1324

7.3.7 Nopcharoenkul, W., Netsakunee, P., and **Pinyakong, O.** (2013) Diesel oil removal by immobilized *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. Biodegradation 24:387-397.

7.3.8 Khondee, N., Tathong, S., **Pinyakong, P.**, Powtongsook, S., Chatchupong, T., Ruangchainikom, C., and Luepromchai, E. (2012) Airlift bioreactor containing chitosan-

immobilized *Sphiongobium* sp. P2 for treatment of lubricants in wastewater. Journal of Hazardous Materials 213-214:466-73.

7.3.9 Juckpech**,** K., **Pinyakong, O.**, and Rerngsamran, P. (2012) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by newly isolated *Curvularia* sp. F18, *Lentinus* sp. S5 and *Phanerochaete* sp. T20. ScienceAsia 38:147-156.

7.3.10 **Pinyakong, O.,** Tiangda, K. Iwata, K., and Omori, T. (2012) Isolation of novel phenanthrene-degrading bacteria from seawater and the influence of its physical factors on the degradation of phenanthrene. ScienceAsia 38:36-43.

7.3.11 Nopcharoenkul, W., Pinphanichakarn, P. and **Pinyakong, O.** (2011) The development of a liquid formulation of *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 and its application in the treatment of pyrene-contaminated soil. Journal of Applied Microbiology 111:36-47.

7.3.12 Kengpipat, N., Iwata, K., Omori, T., and **Pinyakong O.** (2010) Monitoring survival of phenanthrene-utilizing *Sphingobium* sp. P2 in soil microcosms using green fluorescent protein as a marker. ScienceAsia 36:76-80.

7.3.13 Płaza, G. A., Nałęcz-Jawecki, G., **Pinyakong, O.**, Illmer, P., and Margesin, R. (2010) Ecotoxicological and microbiological characterization of soils from heavy metal and hydrocarbon contaminated sites. Environmental Monitoring and Assessment 163: 477-488.

7.3.14 Klankeo, P., Nopcharoenkul, W., and **Pinyakong, O.** (2009) Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil. Journal of Bioscience and Bioengineering 108:488-495.

7.3.15 Waight, K., **Pinyakong, O.**, and Luepromchai, E. (2007) Enhanced reduction of phenanthrene deposited on plant leaves by phyllosphere bacteria. The Journal of General and Applied Microbiology 53:265-272.

7.3.16 Kouzuma, A., **Pinyakong, O.**, Nojiri, H., Omori, T., Yamane, H., and Habe, H. (2006) Structural and transcriptional analyses of initial oxygenase genes for acenaphthene degradation from *Sphingomonas* sp. strain A4. Microbiology 152:2455-2467.

7.3.17 **Pinyakong, O.** (2006) Genetic insights into biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons J. Sci. Res. Chula. Univ. 31 special issue 2 (NRC-EHWM), 17-26. (Impact Factor 0.071) (review paper)

7.3.18 **Pinyakong, O.**, Habe, H., Kouzuma, A., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T. (2004) Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. FEMS Microbiology. Letters 238:297-305.

7.3.19 **Pinyakong, O.**, Habe, H., and Omori, T. (2003) The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The Journal of General and Applied Microbiology 49:1-19.

7.3.20 **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 301:350-357.

การยื่นขอจดสิทธิบัตร

1. Suthep Thaniyavarn, Ekawan Luepromchai, and Onruthai Pinyakong (2010) Material for treatment of oil in water emulsion and production thereof. **Patent application number 1001001138**. 23 July 2010.
2. Suwat Soonglerdsongpha, Chalermchai Ruangchainikom, Onruthai Pinyakong and Ekawan Luepromchai (2014) Biosurfactant production process from glycerol waste and composition of product. **Patent application number 1401005292.** 11 September 2014.
3. Chalermchai Ruangchainikom, Gamgarn Thummadetsak, Onruthai Pinyakong and Ekawan Luepromchai (2014) Tablet formulation of bacteria for oil-containing wastewater treatment. **Patent application number 1401006073.** 8 October 2014.
4. Ekawan Luepromchai, Onruthai Pinyakong, Suwat Soonglerdsongpha and Komkrit Suttiponparnit (2016) Petroleum oil dispersant containing lipopeptide as it composition. **Patent application number 1601001283.** 7 March 2016.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	เป็นหัวหน้า/ผู้ร่วมวิจัย	สถานภาพการทำวิจัย (ทำวิจัยลุล่วงแล้วเป็นร้อยละ)
1. Genome analysis and polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic network in bacterium consortium PCY	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (NRCT-JSPS) ปีที่ 2	หัวหน้า	30

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้าดร.ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา และรศ.ดร.อรฤทัย ภิญญาคง ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) “การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ทนโลหะหนักจากฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และการพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อม” (ภาษาอังกฤษ) “Isolation and characterization of petroleum hydrocarbon-degrading bacteria capable of resistant to heavy metal from marine sponge in the eastern coast of the gulf of Thailand and development of ready-to-use bacteria for bioremediation”

รหัสโครงการ ๑๗๗๓๒๕ สัญญาเลขที่ ๑๖๖ / ๒๕๕๘ ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น ๑,๖๐๐,๐๐๐ บาท (หนึ่งล้านหกแสนบาทถ้วน)
ระยะเวลาดำเนินงาน ๑ ปี ๑๐ เดือน (ระหว่างวันที่ ๑ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๕๗ – ๓๑ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๙)

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ และเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมจากตัวอย่างฟองน้ำทะเล จากบริเวณทะเลจังหวัดชลบุรี และชุมพรโดยจากการศึกษาเมตาจีโนมของฟองน้ำในเบื้องต้นพบว่า ในตัวอย่างฟองน้ำทะเลมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่หลากหลายแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอยู่ในฟองน้ำ จากนั้นเมื่อเพิ่มกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าว พบว่าสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 13 กลุ่มแบคทีเรีย จาก 41 ตัวอย่างฟองน้ำ โดยคัดแยกได้จากตัวอย่างฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีน้ำตาลเหลือง ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง ฟองน้ำต้นไม้สีดำ สาหร่ายสีน้ำตาล ฟองน้ำสีน้ำเงิน ฟองน้ำไฟ ฟองน้ำเคลือบสีเหลือง ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ ฟองน้ำเชือก และฟองน้ำสีน้ำตาล ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25% v/v ได้60 – 92% ในเวลา 7 วัน และที่สำคัญยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 27สายพันธุ์จาก 13 กลุ่มแบคทีเรีย โดยพบว่า 19 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพ

ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ได้แก่แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* 6 สายพันธุ์, *Acinetobacter* 1 สายพันธุ์, *Brevibacterium* 2 สายพันธุ์ *Aeromonas* 1 สายพันธุ์, *Enterobacter* 2 สายพันธุ์, *Bacillus* 4 สายพันธุ์, *Sphingobium*sp. 1 สายพันธุ์, *Methylobacterium* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Microbacterium* 1 สายพันธุ์ งานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบจากฟองน้ำทะเล ซึ่งสามารถวิจัยต่อยอดเพื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนต่อไปได้

Output/outcome

1. งานวิจัยปีที่ 1 ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากฟองน้ำ และได้แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมที่คัดแยกจากฟองน้ำ 13 กลุ่มแบคทีเรีย และ 19 สายพันธุ์บริสุทธิ์
2. มีแผนจะนำผลการวิจัยในปีที่ 1 รวมกับผลการวิจัยปีที่ 2 บางส่วน เตรียมเป็น manuscript สำหรับตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับชาติ/นานาชาติ

ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยพบว่ามีแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 19 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ อย่างไรก็ตามน้ำมันปิโตรเลียมมีหลายประเภท และมีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน อีกทั้งประสิทธิภาพการย่อยสลายยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำมันอีกด้วย ดังนั้นเพื่อให้ทราบขอบเขตประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียจึงควรศึกษาการย่อยสลายน้ำมันชนิดอื่นๆ เช่น น้ำมันดีเซล และน้ำมันเตา ซึ่งมักพบเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมได้เช่นเดียวกัน และควรศึกษาผลของการแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันต่อประสิทธิภาพการย่อยสลาย นอกจากนี้ควรศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายส่วนประกอบสำคัญของน้ำมันปิโตรเลียม ได้แก่ อัลเคนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่พบมากในน้ำมันปิโตรเลียม และ PAHs ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีความเป็นพิษสูงในน้ำมันปิโตรเลียม และความสามารถในการทนต่อโลหะหนักเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียดังกล่าว และเมื่อทราบขอบเขตการทำงานแล้ว การศึกษาต่อยอดเป็นแบคทีเรียตรึงจะสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพการใช้แบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อมได้ซึ่งข้อเสนอแนะทั้งหมดนี้จะนำไปศึกษาต่อใน ปีที่ 2 และ 3 ของโครงการ

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 2558A10802306 สัญญาเลขที่ 166 /2558

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการวิจัยเรื่อง การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ทนโลหะหนักจากฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และการพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อม

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (~~อ.~~/ดร. /~~ผศ./ รศ./ศ~~) ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1 ตุลาคม พ.ศ.2557 ถึงวันที่(วัน/เดือน/ปี) 13 กันยายน พ.ศ.2559

ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี ตั้งแต่วันที่(วัน/เดือน/ปี) 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	800,000 บาท	เมื่อ วันที่ 3 ธันวาคม 2557
งวดที่ 2 (40%)	640,000 บาท	เมื่อ วันที่ 2 มิถุนายน 2558
งวดที่ 3 (10%)	160,000 บาท	เมื่อ วันที่ รอการเบิกจ่าย

รวม 1,600,000 บาท (หนึ่งล้านหกแสนบาทถ้วน)

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ
1. ค่าตอบแทน	339,000	272,000	66,400
2. ค่าจ้าง	216,000	0	216,000
3. ค่าวัสดุ	402,160	378,000	24,160
4. ค่าใช้สอย	462,840	453,000	9,840
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ สาธารณูปโภค	20,000	20,000	20,000
รวม	**1,440,000**	**1,123,600**	**316,400**

<u>หมายเหตุ</u> งบประมาณที่เหลือค่าตอบแทนนักวิจัย และค่าใช้จ่ายในการเผยแพร่ผลงานวิจัยยังไม่ได้เบิกจ่าย ค่าวัสดุ-ใช้สอยรอการเรียกเก็บจากบริษัท

(ดร.ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน