



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม  
ปิโตรเลียมและการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี  
(Development of biosurfactant producing bacteria for application of  
petroleum industry and bioremediation of petroleum materials)

สุภัณฑิต นิมรัตน์  
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802096  
สัญญาเลขที่ 119/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม  
ปิโตรเลียมและการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี  
(Development of biosurfactant producing bacteria for application of  
petroleum industry and bioremediation of petroleum materials)

สุภัณฑิต นิ่มรัตน์<sup>1</sup>  
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

<sup>2</sup>ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2560

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 119/2560

## บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี ในปีนี้ 2 นี้จะแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ทำการคัดแยกและศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารปิโตรเลียม ผลการศึกษาพบว่าจากแบคทีเรียทั้งหมด 30 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารอิมัลซิไฟเออร์ โดยมีแบคทีเรียที่มีศักยภาพมากที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารอิมัลซิไฟเออร์ คือ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 และรองลงมา คือ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ซึ่งไม่เป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ สัตว์และพืชและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำพวกไลโปเปปไทด์ ต่อมาพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยสามารถเจริญและย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนดีกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากภาพรวมพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและน้ำมันดิบมากกว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ต่อมา ขั้นตอนที่ 2 ทำการศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในดิน ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถช่วยเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ณ ความเข้มข้น 0.5%, 1.0% และ 1.5% รวมทั้งสามารถย่อยสลายสารตัวกลางได้ดีกว่าการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ด้วยจุลินทรีย์ในดิน ดังนั้นแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 จึงเป็นแบคทีเรีย Bioaugmentator เพื่อช่วยฟื้นฟูดินที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วต่อไป และขั้นตอนสุดท้ายทำการศึกษาถึงการเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ที่ปนเปื้อนในดินด้วยการเติมสารอาหาร (สารอาหารกลุ่มไนโตรเจน, Yeast extract 1.0%; คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย, น้ำตาลกลูโคส 1.0% และฟอสฟอรัส,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) และ 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  เพื่อส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมัน 1% ทั้ง 4 ชนิด ที่ปนเปื้อนในดิน โดยเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่มีการเติมสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน (Yeast extract 1%), คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย (น้ำตาลกลูโคส 1%), ฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) และ 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  สามารถเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันความเข้มข้น 1% 4 ชนิดได้ดีที่สุด และพบว่าส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันเบนซินดีที่สุดในน้ำมันดีเซล, น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ร่วมกับจุลินทรีย์ในดิน ตามลำดับ ดังนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ร่วมกับสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน (Yeast extract 1%), คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย (น้ำตาลกลูโคส 1%), ฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) และ 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  น่าจะเป็นกระบวนการที่ดีในการฟื้นฟูสภาพดินหรือสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันดีเซล, เบนซิน, น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและน้ำมันดิบ

**คำสำคัญ:** แบคทีเรีย, สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, การฟื้นฟูสภาพ

## ABSTRACT

Research entitled “Development of biosurfactant producing bacteria for application of petroleum industry and bioremediation of petroleum materials” in the second year was studied. The experiment was divided into 3 parts. The first phase, isolation and study on the ability of biosurfactant producing bacteria for bioremediation of petroleum contaminated environments were investigated. Results showed that among 30 isolates of biosurfactant and bioemulsifying producing bacteria, the strongest producers was *Bacillus subtilis* strain SE1 and the second place producer was *B. subtilis* strain SD4. Both of them are not human, animal and plant pathogenic bacteria. They produce lipopeptide biosurfactant. These bacteria demonstrated the capability of gasoline, diesel, used lubricated oil and crude oil biodegradation under aerobic and anaerobic condition. They better grew and biodegraded four tested oils under aerobic condition than under anaerobic condition. Totally, *B. subtilis* strain SE1 showed the higher efficiency for four tested oils than *B. subtilis* strain SD4. Then the ability for biodegradation of 4 tested oils contaminated soils by *B. subtilis* strain SE1 was studied. Results concluded that *B. subtilis* strain SE1 enhanced the efficiency for 0.5%, 1.0% and 1.5% of 4 tested-oil biodegradation. This bacterium and soil microorganisms can better biodegrade oil metabolites than the natural soil microorganisms only. Therefore, *B. subtilis* strain SE1 can act as bioaugmentator for bioremediation contaminated soils with gasoline, diesel, used lubricated oil and crude oil. Finally, the nutritional supplementation (nitrogen source, yeast extract 1%; readily carbon source, glucose 1%, phosphorus source,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) and 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for enhancing biodegradation of the gasoline, diesel, used lubricated oil and crude oil contaminated in soil by *B. subtilis* strain SE1 were assayed. Results demonstrated that addition of nitrogen source, yeast extract 1%; readily carbon source, glucose 1%, phosphorus source,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) and 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  showed the best performance for 1% of 4 tested oils biodegradation which enhanced the biodegradation of 1% gasoline the most, followed by diesel, used lubricated oil and crude oil by *B. subtilis* strain SE1 and soil microorganisms, respectively. Therefore, the application of *B. subtilis* strain SE1 combined with nitrogen source, yeast extract 1%; readily carbon source, glucose 1%, phosphorus source,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) and 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  should be the promising process for bioremediation of soil and the other environments contaminated with gasoline, diesel, used lubricated oil and crude oil.

**Keywords:** Bacteria, Biosurfactant, Bioremediation

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	I
บทคัดย่อ.....	II
Abstract.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	V
สารบัญภาพ.....	XI
บทที่	
1    บทนำ.....	1
2    เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
3    วิธีดำเนินงานวิจัย.....	26
4    ผลการทดลอง.....	35
5    สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	155
เอกสารอ้างอิง.....	164
ผลผลิต (Output).....	176
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	177

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.....	11
2	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 (OD <sub>580</sub> ) ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้ สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	35
3	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซลในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	37
4	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจน.....	39
5	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน.....	40
6	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	41
7	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 (OD <sub>580</sub> ) ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้ สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	42
8	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	43
9	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจน.....	45
10	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน.....	46
11	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	47
12	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 (OD <sub>580</sub> ) ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	48
13	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	49
14	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้ แล้วของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจน.....	51
15	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้ แล้วของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน.....	52
16	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	53
17	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 (OD <sub>580</sub> ) ในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้ สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	54

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดิบในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	55
19	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจน.....	57
20	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน.....	58
21	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	59
22	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 (OD <sub>580</sub> ) ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	60
23	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซลในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	61
24	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจน.....	63
25	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน.....	64
26	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	65
27	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 (OD <sub>580</sub> ) ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	66
28	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	67
29	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจน.....	69
30	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน .....	70
31	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	71
32	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 (OD <sub>580</sub> ) ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	72
33	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	73



## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
34	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจน.....	75
35	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน.....	76
36	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	77
37	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 (OD <sub>580</sub> ) ในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	78
38	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดิบในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	79
39	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจน.....	81
40	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน.....	82
41	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	83
42	ค่าความเป็นกรด-ด่างของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	85
43	ค่าความเป็นกรด-ด่างของการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	86
44	ค่าความเป็นกรด-ด่างของการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	87
45	ค่าความเป็นกรด-ด่างของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	88
46	ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำมัน 4 ชนิด.....	89
47	ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ใช้ละลายดิน.....	89
48	ค่าความชื้นสีของดินในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	91
49	ค่าความชื้นสีของดินในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	92
50	ค่าความชื้นสีของดินในการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	93

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
51	ค่าความเข้มข้นของดินในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	94
52	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	96
53	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	98
54	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	100
55	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	102
56	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	104
57	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	106
58	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	108
59	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	110
60	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	112
61	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	114
62	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	116
63	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	118
64	ปริมาณซีไอดีจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	121
65	ปริมาณซีไอดีจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	122
66	ปริมาณซีไอดีจากการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	123

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
67	ปริมาณซีไอดีจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	124
68	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความเป็นกรด-ต่างในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	126
69	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความเป็นกรด-ต่างในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน.....	127
70	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความเป็นกรด-ต่างในการย่อยสลายน้ำมันดิบ.....	128
71	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความเป็นกรด-ต่างในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.....	129
72	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความชื้นสีของดินในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	130
73	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความชื้นสีของดินในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน.....	131
74	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความชื้นสีของดินในการย่อยสลายน้ำมันดิบ.....	132
75	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความชื้นสีของดินในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.....	133
76	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	136
77	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน.....	137
78	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ.....	138
79	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.....	139
80	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	141
81	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน.....	142
82	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันดิบ.....	142

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
83	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.....	144
84	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	146
85	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน.....	147
86	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบ.....	148
87	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.....	149
88	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณซีไอดีในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	151
89	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณซีไอดีในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน.....	152
90	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณซีไอดีในการย่อยสลายน้ำมันดิบ.....	153
91	ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณซีไอดีในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.....	154

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวที่เชื่อมต่อระหว่างของเหลวและอากาศ.....	7
2	โครงสร้างทางเคมีของแรมโนลิปิด.....	8
3	โครงสร้างของวงลิโปเปปไทด์ (ก.) และโครงสร้างของเซอแฟกติน (ข.).....	9
4	โครงสร้างของแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
5	โครงสร้างของทรีฮาโลสลิปิด.....	12
6	โครงสร้างของเซอแฟกตินที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> .....	12
7	โครงสร้างของโซโฟโรลิปิด.....	12
8	โครงสร้างของอิมัลชัน.....	13
9	ปฏิกิริยานินไฮดริน.....	15
10	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	36
11	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดีเซลในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	37
12	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน.....	42
13	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	44
14	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.....	48
15	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	50
16	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันดิบ.....	54
17	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดิบในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	56
18	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล.....	60
19	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดีเซลในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	62
20	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน.....	66
21	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	68

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.....	72
23	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	74
24	ปริมาณ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันดิบ.....	78
25	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดิบในการย่อยสลายด้วย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน.....	80

## บทที่ 1 บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารลดแรงตึงผิวเป็นคำสั้น ๆ ของ "สารที่ใช้งานกับพื้นผิว" (Surface-active-agents) ซึ่งคือสารเคมีทั่วไปที่ลดแรงตึงผิวของของเหลวหรือลดแรงตึงระหว่างของเหลวสองชนิดหรือระหว่างของเหลวและของแข็ง สารลดแรงตึงผิวโดยทั่วไปเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) ในธรรมชาติซึ่งมีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำและส่วนที่ชอบน้ำ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (ไม่มีขั้ว) เป็นส่วนที่ไม่ละลายในน้ำและอาจจะมีกรดไขมันที่เป็นห่วงโซ่ยาว (Long-chain of fatty acids) กรดไขมันไฮดรอกซิล (Hydroxyl fatty acids) หรือแอลฟา-อัลคิล-เบต้า-กรดไขมันไฮดรอกซิล ( $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy fatty acids) ด้านปลายที่ชอบน้ำ (มีขั้ว) พบว่าเป็นคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน วงเปปไทด์ ฟอสเฟต กรดคาร์บอกซิลิกหรือแอลกอฮอล์ (Van Ginkel, 1989; Jaysree et al., 2011)

สารลดแรงตึงผิวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมันเพื่อช่วยในการทำความสะดวกการรื้อไหลของน้ำมัน ตลอดจนการเพิ่มปริมาณน้ำมันในกระบวนการขุดน้ำมันจากบ่อน้ำมัน โดยสารเหล่านี้ไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ และมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Jayrees et al., 2011) ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ และเป็นสารที่ขับออกมาภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์ (Chen et al., 2007; Jayrees et al., 2011) สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจและการยอมรับมากกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เนื่องจากมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในเชิงการค้าเพื่อทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ รวมทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติหลายประการ ได้แก่ คุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวและทำให้เกิดอิมัลชันได้ดี มีความเสถียรแม้จะอยู่ภายใต้สภาวะทางกายภาพและเคมีที่รุนแรง สามารถเพิ่มพื้นที่ผิวและทำให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ สามารถจับโลหะ สร้างไบโอฟิล์ม มีความเป็นพิษต่ำ สร้างความระคายเคืองน้อย ไม่เป็นอันตรายต่อผิวหนังมนุษย์ ทั้งนี้ยังมีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพสูง เป็นมิตรต่อระบบนิเวศ และสามารถผลิตได้จากสารตั้งต้นที่มีราคาถูกและสารตั้งต้นชนิดใหม่ ๆ ได้ (Banat et al., 2000a; Costa et al., 2006; Mohan et al., 2006) ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีศักยภาพที่หลากหลายในการนำไปใช้งานด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมน้ำมัน เกษตรกรรม ยารักษาโรค อาหารและเครื่องสำอาง (Banat et al., 2000b)

จากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารประกอบจากผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ซึ่งสามารถถูกย่อยสลายได้ง่าย จึงมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้งานด้านเกษตรกรรม ยารักษาโรค อาหารและเครื่องสำอาง (Banat et al., 2000b) การใช้เป็นสารซักฟอก สารที่ทำให้เกิดความชื้น (Wetting agents) สารป้องกันการแยกตัวของน้ำและน้ำมัน (Emulsifiers) สารที่ทำให้เกิดฟองและสารช่วยกระจายตัว (Dispersants) (Makkar and Cameotra, 2002) ทั้งยังใช้เป็นสารหลักในอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เพื่อทำให้การได้น้ำมันกลับคืนมาเพิ่มขึ้นและฟื้นฟูสภาพของ

สารกลุ่มไฮโดรคาร์บอน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพ เช่น การกำจัด การปนเปื้อนทั้งในดินและในน้ำ (Ron and Rosenberg, 2002; Franzetti et al., 2009) การเพิ่มการกระจายตัวของน้ำมันที่เกิดจากการรั่วไหลของน้ำมัน (Mohan et al., 2006) และได้มีการนำไปใช้ในกระบวนการทางเคมีและกายภาพในการออกแบบเพื่อฟื้นฟูสภาพแวดล้อมในแหล่งที่มีการปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือโลหะหนัก เช่น การนำสารลดแรงตึงผิวมาบำบัดดินในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนจริงและการนำดินจากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนออกมาบำบัดนอกพื้นที่นั้นหรือการสูบน้ำเพื่อบำบัดชั้นดินอุ้มน้ำ (Mulligan, 2005; Franzetti et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพควรคำนึงถึงประเภทของสารลดแรงตึงผิว ปริมาณและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว รวมถึงสภาวะอื่น ๆ ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการทำงาน ทั้งนี้เพื่อให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดและไม่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา (วิสาขา ภูจินดา, 2548)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีที่สุดเป็นสารประเภทไกลโคลิปิด (Glycolipids) เช่น แรมโนลิปิด ที่ผลิตโดย *Pseudomonas*, โซโฟโรลิปิด (Sopborolipids) ที่ผลิตโดย *Candida* หลายสปีชีส์, Cell-bound trehalose lipids ที่ผลิตโดย *Rhodococcus* และ *Actinomycetes* และลิโปเปปไทด์ (Lipopeptides) ที่มีลักษณะโครงสร้างที่หลากหลายผลิตโดย *Bacillus* หลายสปีชีส์ (Lang and Philp, 1998; Cubitto et al., 2004; Van Hamme et al., 2006) โดยแรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวหลักที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งประกอบด้วยโมโน- และได-แรมโนลิปิด ซึ่งมีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก (Benincasa et al., 2002) *P. aeruginosa* มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนจากสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมันพืช (Costa et al., 2006) ไฮโดรคาร์บอน (Santa-Anna et al., 2002; Rashedi et al., 2005) และแหล่งคาร์บอนที่แตกที่เรี่ยนำมาใช้ได้ง่าย เช่น น้ำตาลกลูโคส (Bodour et al., 2003) น้ำตาลแมนนิทอล (De'ziel et al., 1999) หรือกลีเซอรอล (Das et al., 2009) ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด สารตั้งต้นประเภทคาร์บอนเป็นสารที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับการรายงานว่ามีผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารลดแรงตึงผิว (Panilaitis et al., 2007; Abouseouda et al., 2008) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เครื่อง Mass spectrometry แสดงให้เห็นชัดเจนว่าแหล่งคาร์บอนไม่ได้มีผลต่อปริมาณเท่านั้น แต่ยังมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวด้วย (Perfumo et al., 2006) โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ต่างสกุลกันจะสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวที่มีโครงสร้างต่างกัน ในทางตรงกันข้ามจุลินทรีย์สายพันธุ์หรือสปีชีส์เดียวกันจะผลิตสารลดแรงตึงผิวที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามความแตกต่างเพียงเล็กน้อยในโครงสร้างโมเลกุลมีผลกระทบอย่างมากต่อหน้าที่การทำงานและการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (Bodour et al., 2003)

ในโลกปัจจุบันสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ปิโตรเลียมและน้ำมันดิบ เป็นสารที่มีความสำคัญอย่างมากต่อประชากรโลก แต่สารดังกล่าวเป็นของเหลวที่เกิดขึ้นใต้เปลือกโลก โดยปิโตรเลียมเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นหลัก มีโมเลกุลของสารหลายชนิดที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ในปิโตรเลียม กระบวนการเกิดปิโตรเลียมนี้เป็นกระบวนการตามธรรมชาติที่เกิดจากการสลายตัวของอินทรีย์สารจำนวนมากที่



ทับถมกันลึกลงไปในชั้นหินใต้พื้นผิวโลก ซึ่งมีความร้อนและความดันมหาศาล การใช้ประโยชน์จากปิโตรเลียมจำเป็นต้องนำมาผ่านกระบวนการกลั่นได้เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทต่าง ๆ เช่น ก๊าซหุงต้ม น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล ยางมะตอย รวมทั้งเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ปุ๋ยเคมี ยาปราบศัตรูพืช พลาสติก และยางสังเคราะห์ เป็นต้น (ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ, 2554) ส่วนน้ำมันดิบ คือ ปิโตรเลียมที่มีสถานะเป็นของเหลวในธรรมชาติ มีลักษณะสีดำหรือน้ำตาล มีกลิ่นคล้ายน้ำมันเชื้อเพลิงสำเร็จรูป มีลักษณะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ปะปนกันอยู่และอาจมีสารอื่น ๆ ประกอบอยู่ด้วย เช่น กำมะถัน คาร์บอน ไฮโดรเจนและไนโตรเจน เป็นต้น คุณสมบัติของน้ำมันดิบจะแตกต่างกันไปตามองค์ประกอบของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่รวมอยู่ ด้วยเหตุนี้ น้ำมันดิบที่ขุดขึ้นจึงไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที ดังนั้นน้ำมันดิบที่ได้จะต้องนำมาแยกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ ออกเป็นกลุ่ม ๆ ก่อนจึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ตามชนิดได้ โดยวิธีการแยกสารที่ปนอยู่ในน้ำมันดิบออกจากกันนี้เรียกว่าการกลั่นน้ำมันดิบ (ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ, 2554) และกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบนั้นประกอบด้วยขั้นตอนการกลั่นสำหรับแยกส่วนต่าง ๆ ของน้ำมันปิโตรเลียม ที่ต้องอาศัยสารลดแรงตึงผิวเพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีมูลค่ามหาศาล (Kister, 1992; Nur Asshifa, 2009) และปัจจุบันมีการศึกษาการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติทั่วไปเช่นเดียวกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ แต่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำและย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติเมื่อเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Burgos-Díaz et al., 2012)

จากคุณสมบัติดังกล่าวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ปิโตรเลียมและน้ำมันดิบ เนื่องจากต้องมีการขนส่งสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ปิโตรเลียมและน้ำมันดิบทั่วโลก และเกิดการรั่วไหลและหกทั่วโลก โดยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ปิโตรเลียมและน้ำมันดิบ เป็นสารพิษทำให้เกิดการระคายเคืองตามผิวหนัง เป็นผื่นคัน แสบร้อน เกิดแผลและติดเชื้อได้ รวมถึงเมื่อสารพิษซึมเข้าสู่ผิวหนังทำให้เกิดอันตรายอย่างต่อเนื่องในระยะยาว เช่น มะเร็งผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้ถ้าสูดดมกลิ่นของน้ำมันจะทำให้ปอดได้รับสารพิษ เกิดอาการปอดอักเสบ เกิดโรกระบบทางเดินหายใจ การรับสารพิษโดยการดูดซึมทางร่างกายอาจทำให้สารพิษไปสะสมในไตจนเกิดภาวะไตเสื่อมและไตวายได้ และหากได้รับสารพิษเป็นระยะเวลานานและในระยะยาวอาจเกิดอันตรายถึงขั้นสารพิษทำลายระบบประสาทการควบคุมการเคลื่อนไหวทำให้ไม่สามารถทรงตัวและไม่สามารถเดินได้เป็นปกติและอาจรุนแรงถึงขั้นเป็นมะเร็งในที่สุด (สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 16, 2556)

จากช่วงทศวรรษที่ 1930 ถึง 1990 มีงานวิจัยพิสูจน์ให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความสำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันปิโตรเลียม แบคทีเรียจำนวนมากมีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานตามธรรมชาติ (Hua et al., 2004; Korda et al., 1997; Rahman et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Chaerun et al., 2004; Ilori et al., 2006) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวบนผิว และลดแรงตึงผิวระหว่างของแข็งกับของเหลวหรือของเหลวกับของเหลว (Interfacial tension) ที่เกิดจากการรวมของเหลวที่ผสมกันไม่ได้ (Immiscible fluids) หรือของเหลวกับของแข็งซึ่งทำให้เพิ่มพื้นผิวของสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ส่งผลให้เพิ่มการ

เคลื่อนที่และความสามารถในการนำมาใช้โดยจุลินทรีย์หลังจากที่มีการย่อยสลายทางชีวภาพและการเกิด Emulsification (Ron and Rosenberg, 2001; Vasileva-Tonkova and Gesheva, 2007) หน้าที่ทางชีวภาพของสารลดแรงตึงผิวมีความเกี่ยวข้องกับการดูดซึมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นสารที่ถูกผลิตและปล่อยออกมาอย่างอัตโนมัติ ถ้ามีสารตั้งต้นเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Guerra-Santos et al., 1984; Makkar and Cameotra, 1998; Singh et al., 2006) แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* และ *Mycobacterium* (Ilori et al., 2005; Kosaric, 1993) และเป็นที่น่าทึ่งว่าความสามารถของแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. aeruginosa* สามารถย่อยสลาย Heavy oil และ Aliphatic hydrocarbons ภายใต้สภาวะที่มีการใช้ออกซิเจนและสามารถหลังสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในปริมาณสูงขณะเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารไฮโดรคาร์บอนในปริมาณสูง (Hommel, 1990; Chayabutra and Ju, 2000)

จากข้อความที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยจุลินทรีย์เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพและมีประโยชน์หลายประการทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และนำมาศึกษาชนิดและองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีที่สุด เพื่อพัฒนาแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี สำหรับใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์และเพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ตั้งแต่ในระดับห้องปฏิบัติการจนถึงระดับเชิงพาณิชย์ต่อไป

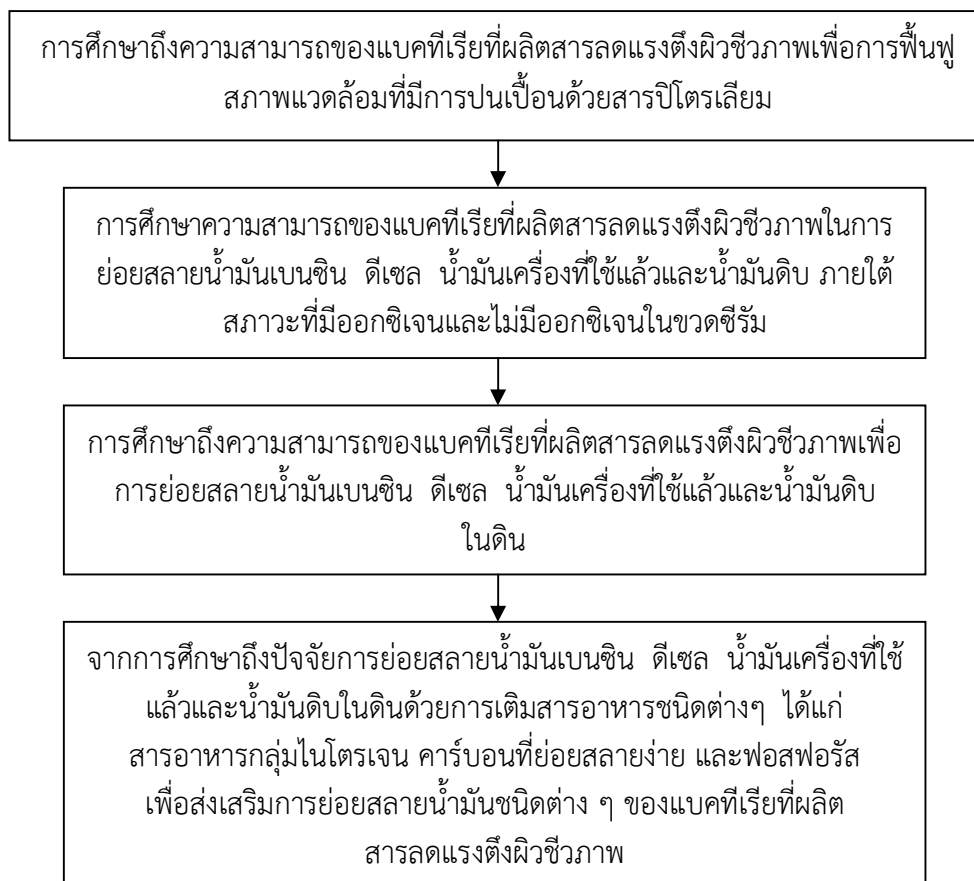
### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่จากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี

### ขอบเขตของการวิจัย

ทำการศึกษถึงการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารปิโตรเลียม โดยการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการกำจัดน้ำมันเบนซิน ดีเซล น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและน้ำมันดิบ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในขวดซีรัม และศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน ดีเซล น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและน้ำมันดิบในดิน รวมทั้งการศึกษาถึงปัจจัยการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน ดีเซล น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมสารอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ สารอาหารกลุ่มไนโตรเจน คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย และฟอสฟอรัส เพื่อส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด รวมทั้งยังช่วยทดแทนการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน และเพื่อให้มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

## วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางการคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย



### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้มีแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่หลากหลายชนิดเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี
2. สามารถจำแนกถึงชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพชนิดใหม่ ๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารปิโตรเลียม

## บทที่ 2

### เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

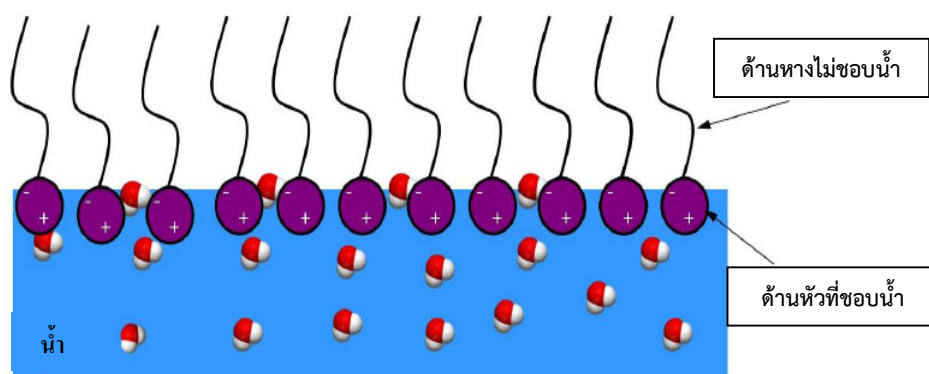
1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
2. วิธีการตรวจสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์
3. วิธีการตรวจสอบการสร้างสารอิมัลซิฟายเออร์
4. การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

#### 1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

##### 1.1 ความหมายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactants) หมายถึง สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตออกมาจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น ยีสต์ แบคทีเรียและรา (Priya and Usharani, 2009) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มักจะเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) คือในโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน (Chioma et al., 2013) โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือส่วนที่ไม่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น เป็นส่วนที่ไม่สามารถละลายในน้ำได้ เนื่องจากเป็นโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นห่วงโซ่ยาว (Long-chain of fatty acids) กรดไขมันไฮดรอกซิล (Hydroxyl fatty acids) หรือแอลฟา-อัลคิล-เบต้า-กรดไขมันไฮดรอกซิล ( $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy fatty acids) ส่วนด้านปลายที่ชอบน้ำหรือส่วนที่มีขั้วพบว่าเป็นคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน วงเปปไทด์ ฟอสเฟต กรดคาร์บอกซิลิกหรือแอลกอฮอล์ (Jaysree et al, 2011)

โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะเกิดการรวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (Micells) เมื่อสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นอยู่ในตัวทำละลาย เช่น น้ำ โดยสารลดแรงตึงผิวจะหันเอาส่วนที่ชอบน้ำไว้ด้านนอก และส่วนที่ชอบไขมันไว้ด้านใน ซึ่งทำให้สามารถแสดงคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวของของเหลวหรือลดแรงตึงระหว่างของเหลวสองชนิดหรือระหว่างของเหลวและของแข็งได้ ซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวเกิดเป็นไมเซลล์เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดเรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า Critical micelle concentration (CMC)



ภาพที่ 1 ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวที่เชื่อมต่อระหว่างของเหลวและอากาศ  
(ดัดแปลงจาก Pacwa-Plociniczak et al., 2011)

## 1.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ตามน้ำหนักโมเลกุล (Jaysree et al, 2011; Pacwa-Plociniczak et al., 2011) โดยมีรายละเอียดดังนี้

### 1.2.1 สารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

เป็นกลุ่มที่มีพื้นที่ผิวและแรงตึงระหว่างผิวที่ต่ำ มีหน้าที่หลักในการลดแรงตึงผิว (Surface tension) และแรงระหว่างผิว (Interfacial tension) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไกลโคลิปิด (Glycolipids) ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) และลิโปเปปไทด์ (Lipopeptides) เป็นต้น

### 1.2.2 สารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

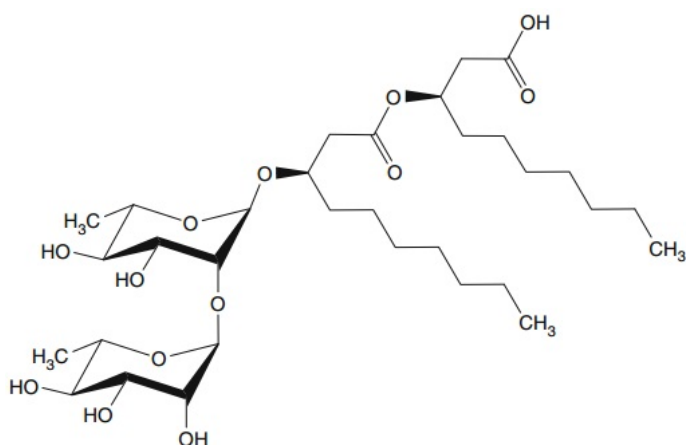
เป็นกลุ่มที่จะเกาะติดแน่นกับพื้นผิว มีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับความคงตัวของสารอิมัลชัน ทำให้แบคทีเรียติดอยู่กับพื้นผิวที่เป็นส่วนที่ชอบน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งทำให้สามารถย่อยสลายสารชีวภาพได้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ พอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) โปรตีน (Proteins) ลิโปลิพอลิแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharides) ลิโปโปรตีน (Lipoproteins) หรือสารประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังกล่าว เป็นต้น

## 1.3 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

### 1.3.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไกลโคลิปิด

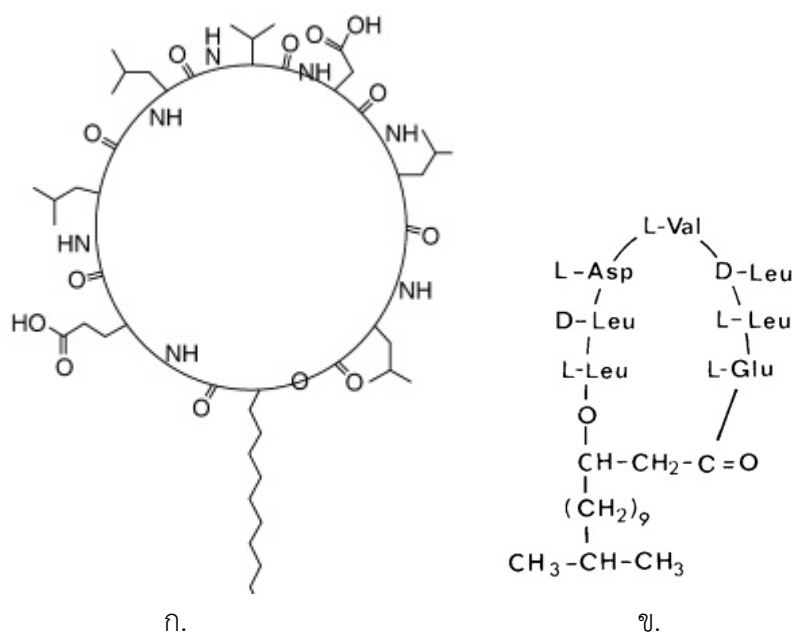
ไกลโคลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่พบมากที่สุดชนิดหนึ่ง ประกอบด้วย โมโน-ได- ไตร- และเตตระแซคคาไรด์ รวมทั้งกลูโคส กาแลคโตส กรดกลูคูโรนิก แรมโนส และกาแลคโตส ซัลเฟต รวมทั้งประกอบด้วยกรดไขมันซึ่งมีองค์ประกอบคล้ายกับฟอสโฟลิปิดของจุลินทรีย์ สามารถแบ่งได้เป็นทรีฮาโลสลิปิด (Trehalose lipid) โซโฟโรลิปิด (Sophorolipid) และแรมโนลิปิด (Rhamnolipids) (Shaw, 1970) ตัวอย่างโครงสร้างของแรมโนลิปิด ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของแรมโนลิปิด  
(Abdel-Mawgoud et al., 2011)

### 1.3.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์

ลิโปเปปไทด์ ประกอบด้วยส่วนหางที่เป็นกรดไขมันเชื่อมต่อกับโพลิโกเปปไทด์สายสั้นซึ่งอยู่ในรูปวงกลม (Raaijmakers et al., 2006) โดยพบว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิตวงลิโปเปปไทด์ (Cyclic lipopeptide) เรียกว่าเซอแฟกติน (Surfactin) หรือซับทิลิซิน (Subtilisin) (Arima et al., 1968; Bernheimer and Avigad, 1970) ซึ่งเซอแฟกตินมีค่า CMC ในน้ำเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้ถึง 27 มิลลินิวตันต่อเมตร (Cooper et al., 1981) โครงสร้างของ Cyclic lipopeptide และ Surfactin ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างของวงลิโปเปปไทด์ (ก.) และโครงสร้างของเซอแฟกติน (ข.)  
(Rosenberg and Ron, 1999; Smyth, et al., 2010)

### 1.3.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มฟอสโฟลิปิดและกรดไขมัน

(1) ฟอสโฟลิปิด เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยพบว่าแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรืออีสต์ที่เจริญบนอาหารที่มีแอลเคนเป็นแหล่งของคาร์บอนจะพบปริมาณของฟอสโฟลิปิดเพิ่มขึ้นอย่างมาก ยกตัวอย่างเช่น ในกรณีของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HO1-N ที่เจริญบนเฮกซะเดคเคน (Hexadecane) พบว่าถุงเวสิเคิล (Vesicles) ที่แบคทีเรียปล่อยออกมาออกเซลล์อุดมไปด้วยฟอสโฟลิปิด (Kaeppli and Finnerty, 1979)

(2) กรดไขมัน กรดไขมันที่ได้มาจากแอลเคนได้รับความสนใจอย่างมากในฐานะที่เป็นสารลดแรงตึงผิว Rehm and Rei (1981) ได้อธิบายถึงรายละเอียดของกรดไขมันที่เกิดจากการออกซิเดชันของแอลเคนโดยจุลินทรีย์ สมดุลระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำและส่วนที่ชอบน้ำของกรดไขมันมีส่วนเกี่ยวข้องกับความยาวของห่วงโซ่ไฮโดรคาร์บอน สำหรับกรดไขมันที่นิยมนำมาเป็นสารลดแรงตึงผิวจะอยู่ในช่วง  $C_{12} - C_{14}$  นอกจากกรดไขมันโซ่ตรง จุลินทรีย์ยังสามารถผลิตกรดไขมันที่มีความซับซ้อนโดยประกอบด้วยไฮดรอกซิลและกิ่งก้านแอลคิล ยกตัวอย่างเช่น โครีโนไมโคลิกแอซิด (Corynomycolic acid) ซึ่งมีศักยภาพในการเป็นสารลดแรงตึงผิว (MacDonald et al., 1981)

#### 1.3.4. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มพอลิเมอร์ริก (Polymeric surfactant)

สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ริกเป็นสารลดแรงตึงผิวที่จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตได้ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ โปรตีน ลิโปพอลิแซคคาไรด์ หรือลิโปโปรตีน และในบางกรณีพบว่าประกอบด้วยโมเลกุลที่ซับซ้อนของพอลิเมอร์ชีวภาพที่รวมตัวกัน ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ผลิตสารในกลุ่มนี้ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* (Rosenberg and Ron, 1998)

#### 1.3.5 สารลดแรงตึงผิวกลุ่มพาร์ติคูลาท (Particulate surfactants)

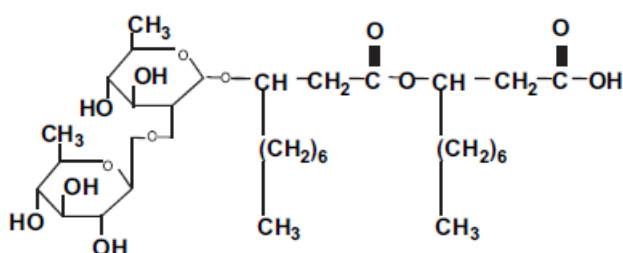
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพาร์ติคูลาท เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บรรจุอยู่ในถุงเวสิเคิลที่ห่อออกมาจากเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น *Acinetobacter* sp. H01-N ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฮกซะเดเคน (Hexadecane) เป็นองค์ประกอบ แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. H01-N จะหลั่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มพาร์ติคูลาทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 20-50 มิลลิเมตร และค่าความหนาแน่นของการลอยตัวเท่ากับ 1.158 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ถุงภายนอกนี้จะมีบทบาทสำคัญในการดูดซึมเฮกซะเดเคนเข้าไปภายในเซลล์ของ *Acinetobacter* sp. H01-N (Karanth et al., n.d.)

ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดที่สร้างโดยจุลินทรีย์ แสดงดังตารางที่ 1 และภาพที่ 4-8

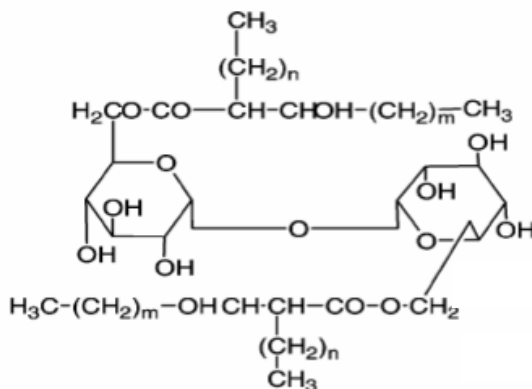


ตารางที่ 1 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Pacwa-Plociniczak et al., 2011)

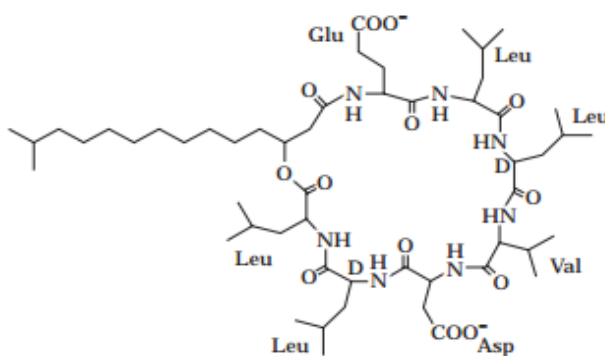
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ		จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต
กลุ่ม	ชนิด	
ไกลโคลิปิด	แรมโนลิปิด (Rhamnolipid)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
	ทรีฮาโลสลิปิด (Trehalolipid)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.
	โซโฟโรลิปิด (Sophorolipid)	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Torulopsis apicola</i>
กรดไขมัน ฟอสโฟลิปิด และ นิวทรัลลิปิด	โครีโนไมโคลิก แอซิด (Corynomycolic acid)	<i>Corynebacterium lepus</i>
	สไปคูลิสปอริก แอซิด (Spiculisporic acid)	<i>Penicillium spiculisporum</i>
	ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (Phosphatidylethanolamine)	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i>
ลิโปเปปไทด์	เซอแฟกติน (Surfactin)	<i>Bacillus subtilis</i>
	ไลเคนไนซิน (Lichenysin)	<i>Bacillus licheniformis</i>
สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ ชนิดพอลิเมอร์ริก	อิมัลแซน (Emulsan)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	อะลาแซน (Alasan)	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53
	ไบโอดีสเพิซแซน (Biodispersan)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2
	ไลโปแซน (Liposan)	<i>Candida lipolytica</i>
	แมนโนโปรตีน (Mannoprotein)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>



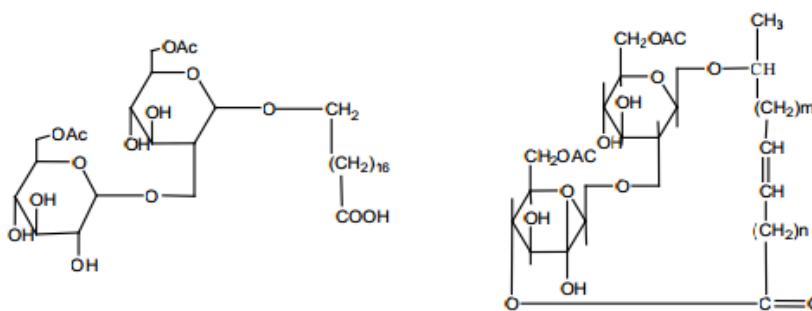
ภาพที่ 4 โครงสร้างของแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* (Mulligan, 2005)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของทรีฮาโลสลิปิด  
(Chakrabarti, n.d)



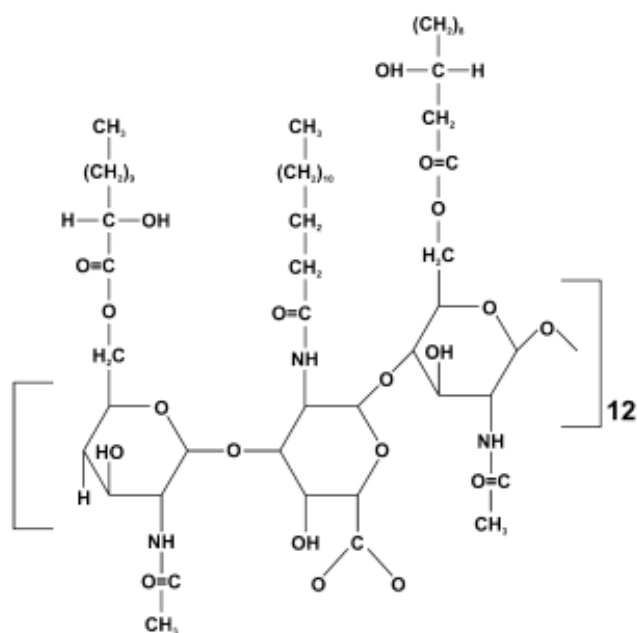
ภาพที่ 6 โครงสร้างของเซอแฟกตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis*  
(Vollenbroich et al., 1997)



**Sophorolipid (GL-A)**

**Sophorolipid lactone**

ภาพที่ 7 โครงสร้างของไซโฟโรลิปิด  
(Bhardwaj et al., 2013)



ภาพที่ 8 โครงสร้างของอิมัลแซน

(Edwards et al., 2003)

## 2. การตรวจสอบการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์

### 2.1 วิธีการตรวจสอบการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### 2.1.1 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Blood hemolysis test)

การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เป็นการคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น (Schulz et al., 1991; Plaza et al., 2006; Youssef et al., 2004) โดยสารลดแรงตึงผิวจะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดเกิดการแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ส่งผลให้สารละลายภายนอกเซลล์มีความดันออสโมติกต่ำกว่าความดันออสโมติกในเซลล์เรียกว่า ไฮโปโทนิก (Hypotonic) ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (Noudeh et al., 2010) ซึ่งทำให้สามารถใช้ในการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงการคัดกรองแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้จะเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ  $\beta$ -hemolysis

#### 2.1.2 Oil displacement test

Oil displacement test เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน ซึ่งเป็นวิธีการคัดกรองที่มีประสิทธิภาพ น่าเชื่อถือ สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว รวมทั้งสามารถบอกปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ (Youssef et al., 2004) วิธีการนี้ทำได้โดยนำน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร เติมน้ำมันในจานเพาะเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร เติมน้ำมัน 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวของน้ำ จากนั้นเติมน้ำส่วนของเซลล์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนพื้นผิวของน้ำมัน ทิ้งไว้ 30 วินาที (Jaysree et al., 2011) ถ้าส่วนของเซลล์มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวได้

น้ำมันจะกระจายตัวออกและเกิดเป็นโซนใส เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า Oil displacement activity (Morikawa et al., 2000)

### 2.1.3 Drop collapsing test

Drop collapsing test เป็นวิธีการทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย และได้ผลดีในการตรวจหาแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หลักการของวิธีการทดสอบนี้อาศัยการคงตัวของของเหลวบนพื้นผิวของโมเลกุลที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น น้ำมัน เมื่อหยดน้ำลงบนผิวของน้ำมัน น้ำจะยังคงเป็นหยดอยู่เช่นเดิม เนื่องจากน้ำซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขั้วจะมีความคงตัวของน้ำมัน ในขณะที่สารหรือของเหลวที่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวได้ เมื่อหยดลงบนผิวหน้าของน้ำมัน หยดของสารหรือของเหลวเหล่านี้จะแผ่ออกหรือยุบตัว เนื่องจากแรงตึงผิวระหว่างสารหรือของเหลวกับน้ำมันนั้นลดลง (Saravanan and Vijayakumar, 2012) วิธีการนี้ทำได้โดยนำน้ำมันปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้นนำส่วนของเซลล์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์ที่มีสารไฮโดรคาร์บอนอยู่แล้ว ทิ้งไว้ 1 นาที หลังจากนั้นดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น สังเกตเห็นว่าหยดของส่วนของเซลล์ที่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีลักษณะยุบตัวลงหรือแผ่กระจาย ส่วนส่วนของเซลล์ที่ไม่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น (Nur Asshifa et al., 2012)

### 2.1.4 Tilting glass slide test

Tilting glass slide test เป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพในการคัดกรองจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งอาศัยการคงตัวของของเหลวบนพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำ เช่น สไลด์ เนื่องจากน้ำซึ่งมีขั้วจะมีความคงตัวของพื้นผิวดังกล่าวและยังคงเป็นหยดอยู่เช่นเดิม เมื่อนำโคโลนีของแบคทีเรียที่มีศักยภาพผลิตสารลดแรงตึงผิวซึ่งคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวได้ ซึ่งเมื่อนำโคโลนีของแบคทีเรียดังกล่าวมาเกลี่ยลงบนหยดของ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ แล้วเอียงสไลด์หยดของ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมจะไหลไปอีกด้านของสไลด์ เนื่องจากแรงตึงผิวระหว่างของเหลวกับน้ำมันนั้นลดลง (Persson and Molin, 1987)

## 2.2 การตรวจสอบถึงชนิดของสารลดแรงตึงผิว

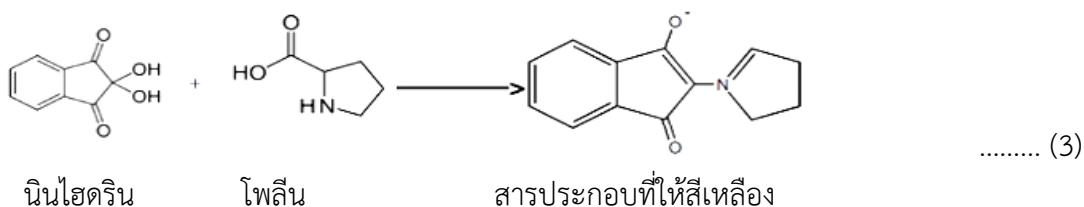
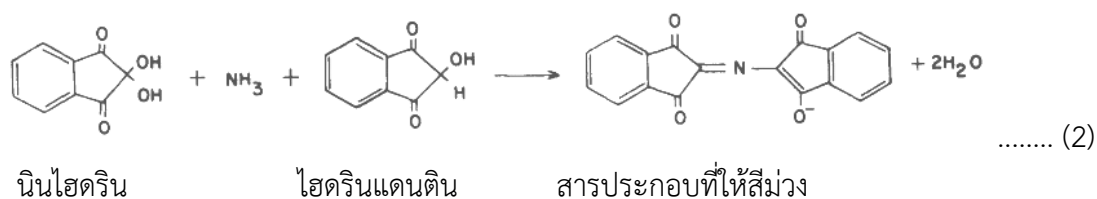
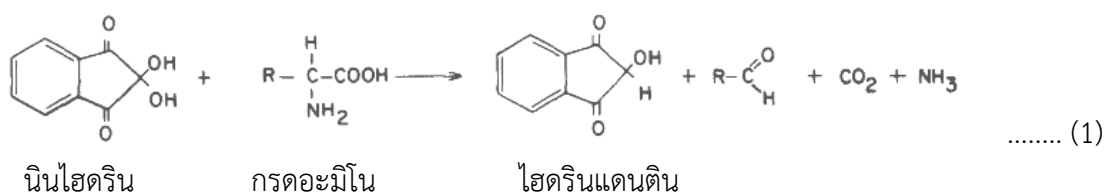
### 2.2.1 Blue agar method เพื่อตรวจหาสารลดแรงตึงผิวกลุ่มไกลโคลิปิดและสารลดแรงตึงผิวประจุลบกลุ่มอื่น

Blue agar method เป็นการทดสอบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ในการตรวจหาสารลดแรงตึงผิวกลุ่มไกลโคลิปิด และสารลดแรงตึงผิวประจุลบกลุ่มอื่น ๆ โดยใช้ CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) – Methylene blue agar plate ในการทดสอบซึ่งประกอบด้วย CTAB-Methylene blue และ Mineral salt medium ซึ่งอาศัยคุณสมบัติการมีประจุของสารลดแรงตึงผิว ในการทดสอบ โดยไอออนลบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไกลโคลิปิด และสารลดแรงตึงผิวประจุลบกลุ่มอื่น ๆ จะจับคู่กับไอออนบวกของ Methylene blue และ CTAB เป็นไอออนเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (Siegmond and Wagner, 1991) Blue agar method เป็นวิธีการทดสอบที่สะดวกแต่เป็นการ

ทดสอบที่จำเพาะกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประจุลบ ซึ่งถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดกรองที่หลากหลาย (Tuleva et al., 2005; Christova et al., 2004; Gunther et al., 2005; Tuleva et al., 2002; Tahzibi et al., 2004) แต่ข้อเสียคือ CTAB เป็นอันตรายและยับยั้งการเจริญในจุลินทรีย์บางชนิด Siegmund and Wagner (1991) ได้แนะนำให้ใช้สารลดแรงตึงผิวประจุบวกชนิดอื่นแทน CTAB

### 2.2.2 ปฏิกิริยานินไฮดริน (Ninhydrin reaction) เพื่อตรวจหาสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิโปเปปไทด์ (Lipopeptide)

ปฏิกิริยานินไฮดรินใช้สำหรับการทดสอบสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิโปเปปไทด์ (Lipopeptide) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน โดยกรดอะมิโนภายในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์จะเกิดปฏิกิริยากับนินไฮดริน แบ่งออกเป็น 2 ปฏิกิริยา ได้แก่ ปฏิกิริยาแรกกรดอะมิโนจะทำปฏิกิริยากับนินไฮดรินได้สารประกอบไฮดรินแดนติน (Hydrindantin) อัลดีไฮด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนียขึ้น (สมการ 1) ปฏิกิริยาที่ 2 นินไฮดรินและไฮดรินแดนตินทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียจนได้สารประกอบที่ให้สีน้ำเงินม่วง (สมการ 2) ส่วนโพรินหรือไฮดรอกซีโพลินเมื่อทำปฏิกิริยากับนินไฮดรินจะให้สารประกอบที่มีสีเหลือง (สมการ 3) (Bottom et al., 2010)



ภาพที่ 9 ปฏิกิริยานินไฮดริน  
(Bottom et al., 2010)

### 3. วิธีการตรวจสอบการสร้างสารอิมัลชันโดยวิธี Emulsifying capacity ( $E_{24}$ )

Emulsifying capacity ( $E_{24}$ ) เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ วิธีการนี้ทำได้โดยนำสารไฮโดรคาร์บอนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และส่วนใสของเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่นผสม (Vortex) เป็นระยะเวลา 2 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดความสูงของชั้นอิมัลชันและความสูงของชั้นสารละลายทั้งหมดเพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์  $E_{24}$  ดังสมการต่อไปนี้ (Cooper and Goldenberg, 1987; Jaysree et al., 2011)

$$\%E_{24} = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของชั้นสารละลายทั้งหมด}} \times 100$$

### 4. การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน่าเป็นทางเลือกที่ดีกว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนอกจากจะมีคุณสมบัติทั่วไปเช่นเดียวกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์แล้ว สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำกว่าและย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Burgos-Díaz et al., 2012) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกันอย่างแพร่หลายในด้านต่าง ๆ ได้แก่ ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อมและด้านปิโตรเลียม (Fakruddin, 2012; Gharaei-Fathabad, 2011) โดยมีรายละเอียดดังนี้

#### 4.1 ด้านอุตสาหกรรมอาหาร

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกนำมาใช้สำหรับการแปรรูปผลิตอาหารต่าง ๆ หลากหลายชนิด โดยใช้เป็นส่วนประกอบที่เติมลงในสูตรอาหาร โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะส่งเสริมการสร้างและการรักษาเสถียรภาพของอิมัลชัน เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการลดพื้นผิวสัมผัสและความตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกใช้เป็นสารต้านการยึดเกาะของไบโอฟิล์มที่มีอยู่ในพื้นที่อุตสาหกรรมอาหารที่เป็นแหล่งของการปนเปื้อนซึ่งอาจนำไปสู่การเน่าเสียของอาหารและการส่งผ่านของเชื้อโรค (Okoliegbe and Agarry, 2012)

#### 4.2 ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติเฉพาะที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมการดูแลสุขภาพและเครื่องสำอาง โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน สารที่ทำให้เกิดฟอง สารช่วยละลาย สารที่ทำให้เปียกชื้น เป็นน้ำยาทำความสะอาด เป็นยาต้านจุลชีพ สารชักนำการทำงานของเอนไซม์ สารไล่แมลง ยาลดกรด ผลิตภัณฑ์อาบน้ำ แผ่นป้องกันผิว ผลิตภัณฑ์

ป้องกันรังแค ผลิตภัณฑ์สำหรับเด็ก มาสคาร่า ลิปสติก ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปากและยาสระผม เป็นต้น (Gharaei-Fathabad, 2011)

#### 4.3 ด้านการแพทย์

การประยุกต์ใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านการแพทย์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา โดยมีการศึกษาและนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มาประยุกต์ใช้ในการผลิตยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส อีกทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถนำมาใช้ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เป็นสารต้านการยึดเกาะกับเซลล์ของจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นสารเสริมฤทธิ์ (Adjuvants) ของระบบภูมิคุ้มกันและเป็นสารส่งมอบยีน เป็นต้น (Rodrigues et al., 2006; Okoliegbe and Agarry, 2012; Fakruddin, 2012)

#### 4.4 ด้านสิ่งแวดล้อม

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการทำให้สารไฮโดรคาร์บอนประเภทต่าง ๆ เช่น น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล เกิดการรวมตัวกับน้ำได้ดียิ่งขึ้นจากปกติที่ไม่สามารถเข้ากันได้กับน้ำ ซึ่งจากคุณสมบัติข้อนี้ทำให้การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปช่วยในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่มีการปนเปื้อนหรือรั่วไหลในพื้นที่ต่าง ๆ ทั้งในดิน น้ำจืด และน้ำทะเล (Rodrigues et al., 2006)

#### 4.5 ปิโตรเลียมและผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียม

ปิโตรเลียม เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นหลัก โดยมีโมเลกุลของสารหลายชนิดที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ภายในปิโตรเลียม กระบวนการเกิดปิโตรเลียมนี้เป็นกระบวนการตามธรรมชาติที่เกิดจากการสลายตัวของอินทรีย์สารจำนวนมากที่ทับถมกันลึกกลงไปในชั้นหินใต้พื้นผิวโลก ซึ่งมีความร้อนและความดันมหาศาล การใช้ประโยชน์จากปิโตรเลียมจำเป็นต้องนำมาผ่านกระบวนการกลั่นได้เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทต่าง ๆ เช่น ก๊าซหุงต้ม น้ำมันเบนซิน น้ำมันก๊าด น้ำมันดีเซล น้ำมันเตา ยางมะตอย รวมทั้งเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ปุ๋ยเคมี ยาปราบศัตรูพืช พลาสติกและยางสังเคราะห์ เป็นต้น (ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ, 2554)

##### (1) น้ำมันดิบ

น้ำมันดิบ คือ ปิโตรเลียมที่มีสถานะเป็นของเหลวในธรรมชาติ มีลักษณะสีดำหรือน้ำตาล มีกลิ่นคล้ายน้ำมันเชื้อเพลิงสำเร็จรูป มีลักษณะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ปะปนกันอยู่และอาจมีสารอื่น ๆ ประกอบอยู่ด้วยเช่น กำมะถัน (S), คาร์บอน (C), ไฮโดรเจน (H) และไนโตรเจน (N) เป็นต้น คุณสมบัติของน้ำมันดิบจะแตกต่างกันไปตามองค์ประกอบของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่รวมอยู่ ด้วยเหตุนี้ น้ำมันดิบที่ขุดขึ้นจึงไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที ดังนั้นน้ำมันดิบที่ได้จะต้องนำมาแยกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ ออกเป็นกลุ่ม ๆ ก่อนจึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ตามชนิดได้โดยวิธีการแยกสารที่ปนอยู่ในน้ำมันดิบออกจากกันนี้ เรียกว่า การกลั่นน้ำมันดิบ (ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ, 2554)

## (2) น้ำมันดีเซล

น้ำมันดีเซล (Diesel fuel) คือ น้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล เป็นส่วนหนึ่งของผลิตภัณฑ์น้ำมันดิบที่ได้จากการกลั่นปิโตรเลียม ซึ่งเป็นน้ำมันที่เรียกว่าน้ำมันใสหรือ Distillate fuel มีช่วงจุดเดือดประมาณ 180-370 องศาเซลเซียส น้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล ซึ่งเป็นเครื่องยนต์แรงอัดสูง (High compression) และจุดระเบิดเอง (Self ignition engine) ซึ่งการจุดระเบิดของเชื้อเพลิงเกิดขึ้นจากความร้อนจากแรงอัดสูงของอากาศในกระบอกสูบโดยไม่ต้องใช้หัวเทียน น้ำมันดีเซลที่มีจำหน่ายในปัจจุบันนี้ แบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ

(2.1) น้ำมันดีเซลหมุนเร็ว (HSD; High speed diesel oil) ซึ่งเป็นน้ำมันดีเซลสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลรอบหมุนเร็วที่ใช้กับยานยนต์ (Automotive diesel oil หรือ Gas oil) เช่น รถยนต์ รถบรรทุก เรือประมง เรือโดยสาร รถแทรกเตอร์และเครื่องจักรกลหนักทุกชนิดที่มีรอบหมุนเร็วเกิน 1,000 รอบต่อนาที เครื่องยนต์ประเภทนี้ จำเป็นต้องใช้น้ำมันที่มีค่าซีเทนสูงและมีการระเหยเร็ว โดยน้ำมันดีเซลหมุนเร็วนี้ที่รู้จักกันทั่วไปในชื่อของน้ำมันโซล่าและหากใช้กับเรือเดินสมุทรจะเรียกว่า Marine gas oil

(2.2) น้ำมันดีเซลหมุนช้า (LSD; Low speed diesel oil) ซึ่งเป็นน้ำมันดีเซลสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลรอบหมุนปานกลางหรือหมุนช้า (Industrial diesel oil) เช่น เครื่องยนต์ดีเซลขับเคลื่อนกำลัง ติดตั้งอยู่กับที่ตามโรงงานต่าง ๆ ซึ่งมีรอบการทำงานต่ำ ประมาณ 500-1,000 รอบต่อนาที เครื่องยนต์ประเภทนี้ไม่ต้องการน้ำมันดีเซลที่มีค่าซีเทนสูงมากนัก และการระเหยอาจช้ากว่าได้ ซึ่งในตลาดเป็นที่รู้จักกันว่า น้ำมันซีโล่ หากใช้กับเรือเดินสมุทรจะเรียกว่า Marine diesel oil (ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ, 2554)

## (3) น้ำมันเบนซิน

น้ำมันเบนซิน เป็นน้ำมันที่ได้จากการปรุงแต่งคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการกลั่นน้ำมันโดยตรง และอาจได้จากการแยกก๊าซธรรมชาติเหลวหรือแก๊สโซลีนธรรมชาติ น้ำมันเบนซินจะผสมสารเพิ่มคุณภาพเพื่อให้เหมาะกับการใช้งาน เช่น สารเพิ่มค่าออกเทน สารต้านการรวมตัวกับอากาศ สารเคมีสำหรับป้องกันสนิม ป้องกันการกัดกร่อนในถังน้ำมันและท่อทางน้ำมัน รวมทั้งสารเคมีที่ช่วยทำความสะอาดคาร์บูเรเตอร์ จึงเหมาะที่จะใช้กับยานพาหนะ เช่น รถยนต์ รถจักรยานยนต์ หรือเครื่องยนต์ทั่วไป เช่น เครื่องสูบน้ำ เครื่องปั่นไฟขนาดเล็ก

## (4) น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ (Lubricating oil) เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทหนึ่งที่ได้จากการกลั่นปิโตรเลียม ทำหน้าที่หล่อลื่นอยู่ระหว่างผิวโลหะที่เสียดสีกันเพื่อลดความฝืด และลดการสึกหรอของชิ้นส่วนของเครื่องยนต์และเครื่องจักรกลที่มีลักษณะปิด น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์มีองค์ประกอบของคาร์บอนในโมเลกุลตั้งแต่  $C_{18}$ - $C_{25}$  อยู่หลายชนิด โดยองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นมี Aliphatic รวมทั้ง Alkanes และ Cycloalkanes อยู่ร้อยละ 73 - 80 ของน้ำหนักทั้งหมด มี Monoaromatic hydrocarbons อยู่ประมาณร้อยละ 11-15 ของน้ำหนักทั้งหมด มี Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) อยู่ประมาณร้อยละ 2-5 และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีขั้ว (Polar fraction) อยู่ประมาณ



ร้อยละ 4 - 8 โดยส่วนที่มีขั้วนี้เกิดจาก Aromatic compounds ซึ่งมีซัลเฟอร์ไนโตรเจนหรือออกซิเจนประกอบอยู่ (จิตติมา แก้วเรือง, 2551)

## 5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Youssef et al. (2004) ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของวิธีที่ใช้สำหรับตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์จำนวน 3 วิธี ได้แก่ Drop collapsing test, Oil displacement test และ Hemolysis โดยนำแบคทีเรียจำนวน 205 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากสิ่งแวดล้อมที่มีสายวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน มาทำการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการทดสอบทั้ง 3 วิธีดังกล่าว ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าวิธีที่ใช้ทดสอบ 3 วิธีข้างต้นให้ผลการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบจำนวน 205 สายพันธุ์ชัดเจน โดยพบว่าแบคทีเรีย 16 เปอร์เซ็นต์ ที่ให้ผลบวกในการทดสอบ ด้วยวิธี Hemolysis แต่ให้ผลลบในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับอีก 2 วิธี และ 38 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง แต่ให้ผลบวกสำหรับการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยอีก 2 วิธี จากผลศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการทดสอบด้วยวิธี Oil displacement test สามารถคาดการณ์การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีกว่าวิธี Drop collapsing test และ Hemolysis ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความเชื่อถือต่ำในการตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Abouseouda et al. (2008) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ Migula 1895-DSMZ โดยทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกันเพื่อเพิ่มผลผลิตในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการศึกษาพบว่า การใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมไนเตรดเป็นแหล่งไนโตรเจน ร่วมกับการใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 มีความเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *P. fluorescens* สายพันธุ์ Migula 1895-DSMZ โดยการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรียและจลนศาสตร์ของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้สามารถลดแรงตึงผิวลงได้ต่ำกว่า 32 ดายน์ต่อเซนติเมตร และมีค่าดัชนี  $E_{24}$  เท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 36-48 ชั่วโมง และจากการตรวจสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยอะซิโตน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบคทีเรียดังกล่าวผลิตได้เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิด โดยผลการทดสอบจากการให้ผลบวกกับ Rhamnose assay นอกจากนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ยังแสดงคุณสมบัติเป็นสารที่เกิดฟองและเป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ชีวภาพ รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความเค็มเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นกรด - ด่างที่กว้าง

Cheng et al. (2008) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการเกิดอิมัลชันของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งแยกได้จากบริเวณพื้นที่สามเหลี่ยมปากแม่น้ำเหลืองที่ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนน้ำมัน ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ L1, L2 และ L3 โดยใช้การวัด Emulsification activity (EA) และ Emulsification stability (ES) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้

ค่า EA และ ES ที่ดีกว่าอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิด (SDS และ Triton X-100) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Li et al. (2008) ได้ศึกษาโครงสร้างและลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ KO9 ที่คัดแยกจากดินใน Karamay oil filed ประเทศจีน ที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากสายพันธุ์นี้สามารถลดแรงตึงผิวได้ถึง 28 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีค่า  $E_{24}$  สูงเท่ากับ 81 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า Critical micelle concentration (CMC) ประมาณ 85.82 มิลลิกรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถูกอบแห้งเป็นผงสีเหลืองอ่อนและปริมาณผลผลิตที่ได้คือ 1.0866 กรัมต่อลิตร และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่าองค์ประกอบหลักเป็นไกลโคไลปิดที่ประกอบด้วยไขมันและคาร์โบไฮเดรต ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหยาบมีความเสถียรค่อนข้างสูงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้างและที่ความเข้มข้นของเกลือสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางการค้าที่ใช้ทดสอบครั้งนี้ คือ SDS และ CTAB ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ KO9 น่าจะมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรม

Nasr et al. (2009) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินที่มีการปนเปื้อนและดินที่ไม่มีการปนเปื้อนด้วยปิโตรเลียม โดยทำการตรวจคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธี Hemolysis, Oil displacement test และ Drop collapsing test แบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่ให้ผลบวกอย่างน้อยหนึ่งในสามของวิธีที่ใช้ทดสอบทั้งหมด จะนำไปทำการวัดค่าแรงตึงผิวและทดสอบ Emulsification capacity จากผลการศึกษาพบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยสามารถลดแรงตึงผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นอิมัลชันที่มีความเสถียร ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA จัดจำแนกได้เป็น *B. subtilis* และ *B. cereus*

Priya and Usharani (2009) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* ที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน 4 แหล่งในเมือง Mayiladuthurai จังหวัดทมิฬนาฑู ประเทศอินเดีย ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี Oil displacement test และ Emulsification stability พบว่าจากการศึกษาโดยน้ำมันพืช น้ำมันก๊าด น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* ได้ถูกนำมาจำแนกชนิดโดยใช้วิธี Thin layer chromatography (TLC) จากการศึกษาเมื่อใช้น้ำมันทั้ง 4 ชนิด พบว่าน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งใน *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* แต่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. aeruginosa* มีกิจกรรมสูงกว่า *B. subtilis*

Arutchelvi and Doble (2010) ได้ทำการศึกษาลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคไลปิดที่ผลิตโดย *P. aeruginosa* CPCL ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่ง *P. aeruginosa* CPCL (GenBank accession number GQ241355) เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแอมโฟฟิลิกได้ โดยจากการศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายกรด พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 เหลือเท่ากับ 44 มิลลินิวตันต่อเมตร และมี CMC เท่ากับ  $11.27 \pm 1.85$  มิลลิกรัมต่อ

ลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก ราสาย และแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ  $\leq 30 \leq 50$  และ  $\leq 125$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยไม่มีความเป็นพิษรุนแรงต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง ( $HC_{50} = 38 \pm 8.22$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีโซ่ไฮโดรคาร์บอน หมู่ไฮดรอกซิล เอสเทอร์และพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งจากการวิเคราะห์ชนิดของสารลดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Liquid chromatography และ Mass spectrometry ร่วมกับ Electrospray ionization พบว่ามี Rhamnolipid ถึง 19 ชนิด ที่มีกรดไขมันอิ่มตัว และความยาวของสายที่แตกต่างกัน จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพกับ Phytopathogens (*Fusarium proliferatum* สายพันธุ์ NCIM 1105 และ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ NCIM 596) และไม่เหมาะสมสำหรับการใช้งานทางการแพทย์

Thavasi et al. (2010) ได้ทำการศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยแบคทีเรียทางทะเลที่คัดแยกได้จากท่าเรือ Tuticorin ประเทศอินเดีย โดยทำการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง Bacterial Adherence To Hydrocarbons (BATH) การเกิดอิมัลชันกับน้ำมันดิบ และการทดสอบ Drop collapse test จากผลการศึกษาพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ ที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* และ *Pseudomonas aeruginosa* และจากการศึกษาศักยภาพในผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการทดสอบพบว่า น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและกากน้ำมันถั่วลิสงเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและเหมาะสมต่อการใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากนี้จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. megaterium*, *C. kutscheri* และ *P. aeruginosa* พบว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไกลโคลิปิด (Glycolipid) ไกลโคลิโปเปปไทด์ (Glycolipopeptide) และลิโปเปปไทด์ (Lipopeptide) ตามลำดับ

Aparna et al. (2011) ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนด้วยสารไฮโดรคาร์บอน เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งจากแบคทีเรียทั้งหมด 16 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้ พบว่าแบคทีเรีย 2B เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ *Pseudomonas* sp. จากการวิเคราะห์ของลำดับเบส 16S rRNA และลักษณะทางชีวเคมี อีกทั้งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระหว่างการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำมันดิบ ซึ่งประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้เท่ากับ 27 มิลลินิวตันต่อเมตร และจัดเป็นอิมัลชันที่มีความเสถียรภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพปริมาตร 50 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ Basal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันดิบ 1% สามารถเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ จากผลการศึกษาสามารถบ่งชี้ได้ว่า *Pseudomonas* sp. สามารถใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนได้และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถูกผลิตโดยแบคทีเรียชนิดนี้น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพได้

Jaysree et al. (2011) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนและน้ำที่ไม่มีการปนเปื้อน และได้ศึกษาแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้วิธีมาตรฐาน 2 วิธี คือ Oil displacement test และ Emulsification capacity ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจัดจำแนกได้เป็น *B. subtilis* และ *B. cereus* ซึ่งถูกคัดแยกได้จากน้ำและดิน ตามลำดับ ซึ่งจากการทดสอบศักยภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด โดยใช้น้ำมันดีเซลและเครื่องยนต์ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. subtilis* จะมีค่า %E<sub>24</sub> สำหรับน้ำมันดีเซลและเครื่องยนต์เท่ากับ 20% และ 15% ตามลำดับ และ *B. cereus* มีค่า %E<sub>24</sub> สำหรับน้ำมันดีเซลและเครื่องยนต์เท่ากับ 30% และ 20% ตามลำดับ จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า *B. subtilis* และ *B. cereus* มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันต่อไปได้

Nur Asshifa et al. (2012) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการกลั่นน้ำมันดิบ โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* USM-AR2 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบ Batch ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งให้ชีวมวลเท่ากับ 9.4 กรัมต่อลิตร และให้สารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 2.4 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (แรมโนลิปิด) ถูกตรวจพบด้วยวิธี Orcinol, Emulsification capacity และ Drop collapsing test จากการศึกษาการปรับสภาพ (Pretreatment) น้ำมันดิบ TK-1 และ AG-2 ด้วยแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* USM-AR2 ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการกลั่นน้ำมันโดยลดระยะเวลาแต่ไม่ลดคุณภาพของน้ำมันปิโตรเลียมที่กลั่นได้ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการลดระยะเวลาของกระบวนการกลั่นน้ำมันอย่างน้อย 2 ถึง 3 เท่า อีกทั้งยังพบว่าองค์ประกอบของน้ำมันดิบที่กลั่นจากแบบที่มีการปรับสภาพไม่แตกต่างจากองค์ประกอบในน้ำมันดิบที่ได้จากกระบวนการกลั่นแบบไม่ปรับสภาพจากการวิเคราะห์โดยเครื่อง Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) นอกจากนั้นจากการทดสอบด้วยวิธี Calorimetric แสดงให้เห็นว่าค่าพลังงานของน้ำมันที่กลั่นจากกระบวนการกลั่นแบบการปรับสภาพและที่ไม่ปรับสภาพมีค่าเท่ากัน ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าคุณภาพของน้ำมันที่กลั่นได้ไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพจากการปรับสภาพ และแรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *P. aeruginosa* USM-AR2 เป็นปัจจัยหลักในการเพิ่มประสิทธิภาพในการกลั่นน้ำมันดิบ

Nadhern (2012) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ NH22 ที่คัดแยกได้จากไรโซสเฟียร์ (Rhizosphere) ของดินในสวน ซึ่งพบว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์ NH22 เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารอิมัลชันที่ดี โดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารอิมัลชันกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าสารอิมัลชันที่แบคทีเรียดังกล่าวผลิตได้ประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโมโนแรมโนลิปิด และไดแรมโนลิปิด ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.82 และ 0.32 ตามลำดับ จากการศึกษาประสิทธิภาพของแรมโนลิปิดในการต้านเชื้อรา โดยการวัดเปอร์เซ็นต์การลดลงของรัศมีของเชื้อรา น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (Laccase) ของเชื้อรา ซึ่งผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ามี การลดลงของรัศมีการเจริญของเชื้อราสูงสุด 76 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักสดและแห้งลดลงเมื่อได้รับแรมโนลิปิดที่ระดับ

ความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมทั้งพบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิดความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีค่าสูงสุดเหลือเพียง 0.921 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอีก 21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของแรมโนลิปิด เป็น 1,500 ไมโครกรัมต่อลิตร และจากการศึกษาซึ่งพบว่าค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มีค่าประมาณ 200 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถลดแรงตึงผิวได้ถึง 34 มิลลินิวตันต่อเมตร

Onwosi and Odibo (2012) ทำการศึกษาศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด โดย *Pseudomonas nitroreducens* ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม โดยทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ Mineral salt medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับการทดสอบ รวมทั้งทำการศึกษาค้นคว้าถึงคุณสมบัติที่เรียกว่า การลดแรงตึงผิว (Tensio-active) และค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวที่แบคทีเรียผลิตขึ้น จากการศึกษาพบว่าแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เอื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดได้ดีที่สุดคือ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 5.28 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไนเตรดความเข้มข้นเท่ากับ 4.38 กรัมต่อลิตร โดยที่อัตราส่วนของน้ำตาลกลูโคสและโซเดียมไนเตรดเท่ากับ 22 สามารถทำให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดได้สูงสุดเท่ากับ 5.46 กรัมต่อลิตร และสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงเหลือประมาณ 37 มิลลินิวตันต่อเมตร รวมทั้งสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดมีค่า CMC ประมาณ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจากรายงานการศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก *P. nitroreducens* สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพต่าง ๆ ยกตัวอย่าง เช่น เพื่อทำให้การได้น้ำมันดิบกลับคืนมาเพิ่มขึ้นและเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม

Saravanan and Vijayakumar (2012) ได้ทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน โดยใช้วิธี Hemolysis, Drop collapsing test, Emulsification capacity และ Methylene blue agar plate จากการศึกษาพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* มีประสิทธิภาพสูงที่สุด และเมื่อทำการศึกษาลักษณะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง FT-IR พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. aeruginosa* คือ แรมโนลิปิด

Chioma et al. (2013) ได้ทำการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันในบริเวณอู่ซ่อมรถยนต์ในรัฐ Owerri Imo สหพันธ์สาธารณรัฐไนจีเรีย จำนวน 4 แหล่ง ซึ่งนำมาทำการเพิ่มปริมาณ (Enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar และทำการคัดแยกแบคทีเรียด้วยเทคนิค Pour plate พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท (X1 - X9) จากตัวอย่างดินทั้ง 4 ตัวอย่าง (A, B, C, D) จากนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้ถูกนำมาคัดกรองการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการทดสอบด้วยวิธี Hemolysis และ Oil displacement test และพบว่า X4 และ X8 เป็นเชื้อที่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวดีที่สุด ซึ่งจัดจำแนกได้เป็น *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* ตามลำดับ

Gomathy and Senthilkumar (2013) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิดจาก *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียทางทะเลที่คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณท่าเรือ เมือง Cuddalore โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 9 และความเค็ม 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และ *P. aeruginosa* มีการเจริญสูงสุดใช้ระยะเวลาในการบ่ม 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า *P. aeruginosa* มีศักยภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เท่ากับ 1.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า และสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ และจากการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพข้างต้นเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิด

Hošková et al. (2013) ได้ทำการศึกษาลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค 2 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter calcoaceticus* และ *Enterobacter asburiae* และโดยทำการเปรียบเทียบกับลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งสารในกลุ่มแรมโนลิปิดที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทำการแยกมาจากส่วนใสและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Thin layer chromatography ร่วมกับชุด Negative electrospray ionization ซึ่งพบว่าสารแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ในครั้งนี้มีความแตกต่างกันที่ความยาวโซ่และความอึดตัวของสาร และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Tandem mass spectrometry พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิดเป็นโมโนแรมโนลิปิด และไดแรมโนลิปิด ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของกรดไขมัน 3-hydroxy จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล และได้ทำการศึกษาศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดโดยใช้สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (น้ำมันดอกทานตะวัน กลีเซอรอลและโซเดียมซิเตรต) แหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมไอออนและไนเตรต) และแหล่งฟอสฟอรัส ที่แตกต่างกันในการเจริญ จากผลการศึกษาพบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดสามารถผลิตได้ดีที่สุดเท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ในเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน อีกทั้งยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเกิด Emulsification ได้ดีกับสารในกลุ่มอะโรมาติกและอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน และน้ำมันพืชอีกหลายชนิด รวมทั้ง *Acinetobacter* และ *Enterobacter* ทั้งสองสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคกับมนุษย์แตกต่างจาก *P. aeruginosa* ที่ก่อโรคในมนุษย์

Janek et al. (2013) ได้ทำการจัดจำแนกและศึกษาลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ BD2 ที่แยกได้จากดินในทวีปอาร์คติก บนหมู่เกาะ Svalbard Archipelago จากการศึกษาพบว่า *P. putida* สายพันธุ์ BD2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 2 ชนิด คือ ฟอสฟาติลเอทานอลามีน (Phosphatidylethanolamine) และแรมโนลิปิด เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว จากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometer (UPLC-MS) ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดจากส่วนใสของ *P. putida* สายพันธุ์ BD2 ด้วยเอทิลเอซิเตรต พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วย Rhamnolipid Rha-Rha-C10-C10 และฟอสฟาติลเอทานอลามีน ที่มีโครงสร้าง

คล้ายกันจำนวน 2 ชนิด ซึ่ง Rhamnolipid Rha-Rha-C10-C10 สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้เท่ากับ 31 มิลลินิวตันต่อเมตร และมีค่า CMC เท่ากับ 0.130 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้ง Rhamnolipid Rha-Rha-C10-C10 มีศักยภาพที่จะสร้างมวลรวมที่มีความเสถียร (80-121 นาโนเมตร) จากการปรับสภาพพื้นผิวของโพลิสไตรีน (Polystyrene) โดยใช้แรมโนลิปิด ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียได้ 43-79 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการก่อโรคของเชื้อราสายพันธุ์ *C. albicans* ได้ 89-90 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าในความเข้มข้นเดียวกันของฟอสฟาติดีลเอทานอลามีนสามารถยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียระหว่าง 23-72 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้ง *C. albicans* ระหว่าง 96-98 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาที่ผ่านมาถือเป็นรายงานครั้งแรกที่พบว่า *P. putida* สายพันธุ์ BD2 ที่แยกจากดินในทวีปอาร์คติกสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดจำนวน 1 ชนิด และฟอสฟาติดีลเอทานอลามีนที่มีโครงสร้างคล้ายกันจำนวน 2 ชนิด

Nalini and Parthasarathi (2013) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Serratia rubidaea* สายพันธุ์ SNAU02 ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจากตำบล Cuddalore เมือง Tamilnadu ประเทศอินเดีย ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *S. rubidaea* สายพันธุ์ SNAU02 สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium เหลือเท่ากับ 34.3 มิลลินิวตันต่อเมตร และจากการศึกษาลักษณะของสารลดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง FTIR และเครื่อง GC-MS พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไตรแรมโนลิปิด มากกว่าโมโนแรมโนลิปิด และในขั้นตอนการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้วิธี Response surface methodology (RSM) - Central composite design (CCD) พบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วย แมนนิทอลเท่ากับ 29.31 กรัมต่อลิตร Yeast extract เท่ากับ 2.06 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.97 และปริมาณโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 5.69 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้มีค่าดัชนี Emulsification สูงที่สุดนอกจากนั้นพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *S. rubidaea* สามารถกักเก็บน้ำมันเครื่องที่ดูดซับกับตัวอย่างทรายได้สูงสุด 92 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *S. rubidaea* สายพันธุ์ SNAU02 น่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในการกักเก็บน้ำมันโดยจุลินทรีย์และการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพ

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

#### วัสดุอุปกรณ์

##### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 1.1 Phosphate Buffer Saline
- 1.2 Trypticase Soy Broth
- 1.3 Yeast extract
- 1.4 Mineral salt medium (ประกอบด้วย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$  และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  และธาตุอาหารรอง ประกอบด้วย  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  และ  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 1.5 น้ำตาลกลูโคส
- 1.6 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
- 1.7 COD Kit (บริษัท Hach company)
- 1.8 น้ำมันดิบ
- 1.9 น้ำมันดีเซล
- 1.10 น้ำมันเบนซิน
- 1.11 น้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว
- 1.12 Folin-Ciocalteu reagent

##### 2. วัสดุอุปกรณ์

- 2.1 ตัวอย่างดิน
- 2.2 จานเพาะเชื้อ
- 2.3 ขวดซีรัม
- 2.4 ขวดรูปخمพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 2.5 ขวดปากกว้าง

##### 3. เครื่องมือ

- 3.1 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) (ยี่ห้อ Tomy autoclave รุ่น SS-325 เมืองโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.2 เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Rotary shaker) (ยี่ห้อ JSR รุ่น JSSI-100C เมือง Cheongju ประเทศเกาหลี)
- 3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น Centrifuge 5804R เมือง Hamburg สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)



3.4 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) (ยี่ห้อ Vortex genie 2 รุ่น G-560E เมือง Bohemia ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.5 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (ยี่ห้อ Denver instrument รุ่น UB-10 กรุงเทพฯ ประเทศไทย)

3.6 COD Reactor (ยี่ห้อ Hach รุ่น DBR200 ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.7 เครื่องวัดค่าซีโอดี (ยี่ห้อ Hach รุ่น DR900 ประเทศสหรัฐอเมริกา)

### วิธีดำเนินการทดลอง

**การศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียเพื่อการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารปิโตรเลียม**

จากผลการศึกษาในปฏิกิริยาปริมาณที่ผ่านมาจะทำให้ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำนวนหนึ่ง ดังนั้นในการศึกษารั้งนี้จะนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาทดสอบถึงการประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารปิโตรเลียม ดังต่อไปนี้

### 1. การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมัน (สุดท้ายชล หอมทอง และคณะ, 2556)

#### 1.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดเลือกไว้ ได้แก่ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SD4 มาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำมาเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย ต่อมานำเซลล์แขวนลอย (Cell suspension) ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม Phosphate Buffer Saline (PBS) ลงในหลอด Centrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทำเช่นนั้นจนครบ 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเซลล์ และนำเซลล์ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร (ใช้สารละลาย PBS เป็น Blank) ให้ได้ 1.5 A.U. หรือเทียบกับสารละลาย McFarland No.4 เพื่อใช้เป็นเซลล์แขวนลอยที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ  $10^{10}$  CFU/ml

#### 1.2 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium ที่ประกอบด้วย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (3.6),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1.0),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.0),  $\text{MgSO}_4$  (1.0),  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$  (0.01) และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.0) มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม 10 มิลลิลิตรต่อลิตรของธาตุอาหารรองที่ประกอบด้วย  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10.0),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (3.0),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1.0),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2.0),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3.0),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (30.0) และ  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.0) มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย

น้ำมันดีเซล (Khehra et al., 2005) โดยนำขวดซีรัมขนาด 180 มิลลิลิตร จำนวน 16 ขวด มาเตรียมชุดการทดลองดังต่อไปนี้

### 1.2.1 การย่อยสลายภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

(1) ชุดการย่อยสลายด้วยแบคทีเรีย (ชุด Active) จำนวน 3 ชุด เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium ปริมาตร 89 มิลลิลิตร ลงในขวดซีรัม เติม Cell suspension ของแบคทีเรียทดสอบ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำมันลงไป 1 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดซีรัมด้วยจุกยาง และฟาลูมิเนียม นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 35 วัน

(2) ชุด Sterile จำนวน 3 ชุด เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium ปริมาตร 89 มิลลิลิตร ลงในขวดซีรัม เติม Cell suspension ของแบคทีเรียทดสอบ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฝาขวดซีรัมด้วยจุกยางและฟาลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน หลังจากนั้นเติมน้ำมันลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 35 วัน

(3) ชุด Background จำนวน 2 ชุด เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium ปริมาตร 89 มิลลิลิตร ลงในขวดซีรัม เติมสารละลาย Phosphate Buffer Saline ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดซีรัมด้วยจุกยางและฟาลูมิเนียมโดยไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเติมน้ำมันลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 35 วัน

### 1.2.2 การย่อยสลายภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

เตรียมชุดการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2.1 แต่ปรับปริมาตรสารที่เติมลงในแต่ละชุดการทดลอง ดังนี้คือ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium ปริมาตร 160 มิลลิลิตร เติม Cell suspension ของแบคทีเรียทดสอบ ปริมาตร 18 มิลลิลิตร และเติมน้ำมัน 1.8 มิลลิลิตร

### 1.3 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2 แต่เปลี่ยนจากน้ำมันดีเซลเป็นน้ำมันเบนซิน

### 1.4 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2 แต่เปลี่ยนจากน้ำมันดีเซลเป็นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

### 1.5 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2 แต่เปลี่ยนจากน้ำมันดีเซลเป็นน้ำมันดิบ

จากนั้นเก็บตัวอย่างจากแต่ละชุดการทดลองมาศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันด้วยตาเปล่า ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน และศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมด ในวันที่ 0, 3, 7, 10, 14, 21, 28 และ 35 ของการทดลอง ดังวิธีการทดลองต่อไปนี้

1) การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย (ดัดแปลงมาจาก Dagorn et al., 2013) เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อตรวจวัดปริมาณแบคทีเรีย

2) การสังเกตลักษณะทางกายภาพของน้ำมันด้วยตาเปล่า (ภரியพร เปรมประเสริฐ และคณะ, 2549)

สังเกตลักษณะทางกายภาพของน้ำมันในทุกชุดการทดลอง ดังนี้

5+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันไม่รวมตัวกับน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน

4+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่าง

ชัดเจน

3+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้า

อาหาร

2+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์ม

บาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร

1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงคราบน้ำมันบาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม ลักษณะทั่วไป

แทบไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ใส่น้ำมันมากนัก

0 หมายถึง ไม่พบน้ำมัน

### 3) การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน

เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 g เป็นระยะเวลา 4 นาที เก็บส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 220-400 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader เพื่อประเมินประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน

### 4) การวิเคราะห์ปริมาณก๊าซทั้งหมด

ทำโดยการใช้เข็มฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร เจาะเข้าไปในขวดซีรัมในแนวตั้งฉากกับปากขวด และค่อย ๆ ปล่อยนิ้วมือซ้าย ๆ เพื่อให้ก๊าซที่อยู่ภายในขวดซีรัมดันก้านสูบของเข็มฉีดยาขึ้นมาและอ่านปริมาตรของก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น หลังจากนั้นดันก๊าซทั้งหมดกลับลงไปขวด แล้วค่อย ๆ ดึงเข็มฉีดยาออกมาในแนวตรง เพื่อป้องกันการรั่วไหลของก๊าซภายในขวดซีรัม

## 2. การศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียเพื่อการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่าง ๆ ในดินที่มีการปนเปื้อนด้วยสารปิโตรเลียม

จากผลการศึกษาจากข้อ 1 ทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่าง ๆ สูงที่สุด เพื่อนำมาทำการศึกษาต่อเนื่องดังต่อไปนี้

## 2.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำมาเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย ต่อมานำเซลล์แขวนลอย (Cell suspension) ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม Phosphate Buffer Saline (PBS) ลงในหลอด Centrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง (ทำ 3 ครั้ง) เพื่อเป็นการล้างเซลล์ และนำเซลล์ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร (ใช้ PBS เป็น Blank) ให้ได้ 1.5 A.U. เพื่อใช้เป็นเซลล์แขวนลอยที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ  $10^8$ - $10^9$  CFU/mL

## 2.2 การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่าง ๆ ในดินด้วยการเติมแบคทีเรียเพื่อการฟื้นฟูสภาพแวดล้อม (ดัดแปลงมาจาก Abioye et al., 2012)

### 2.2.1 การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 (ดัดแปลงมาจาก Abioye et al., 2012)

นำดินจำนวน 300 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมแต่ละชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 0.5 % w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.0 % w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.5 % w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 0.5 % w/w + แบคทีเรีย

*B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.0 % w/w + แบคทีเรีย

*B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.5 % w/w + แบคทีเรีย

*B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

จากนั้นปิดขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลี แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และทำการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง, การเปลี่ยนแปลงความชื้นสีของดินด้วยตาเปล่า, ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด, ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำที่หลงเหลือจากการย่อยสลาย และประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน ในวันที่ 0, 3, 7, 10, 14, 21, 28 และ 35 ของการทดลอง และวัดปริมาณซีไอดี ในวันที่ 0 และ 35 ของการทดลอง

## 2.2.2 การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 (ดัดแปลงมาจาก Abioye et al., 2012)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่เปลี่ยนจากน้ำมันดีเซลเป็นน้ำมันเบนซิน

## 2.2.3 การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 (ดัดแปลงมาจาก Abioye et al., 2012)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่เปลี่ยนจากน้ำมันดีเซลเป็นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

## 2.2.4 การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 (ดัดแปลงมาจาก Abioye et al., 2012)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่เปลี่ยนจากน้ำมันดีเซลเป็นน้ำมันดิบ

จากการศึกษาในข้อ 2.2 ทำให้ทราบถึงความสามารถของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ที่ได้คัดเลือกมาเพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถช่วยเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ณ ความเข้มข้น 0.5%, 1.0% และ 1.5% รวมทั้งสามารถย่อยสลายสารตัวกลางได้ดีกว่าการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ด้วยจุลินทรีย์ในดิน ดังนั้นจึงไม่ต้องทำการศึกษาเปรียบเทียบการฟื้นฟูสภาพดินที่ปนเปื้อนน้ำมันด้วยแบคทีเรียเดี่ยวและแบคทีเรียผสม ดังนั้นในขั้นตอนต่อมาจะทำการศึกษาถึงการเติมสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน คาร์บอนที่ย่อยสลายง่ายและฟอสฟอรัส เพื่อส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่าง ๆ ดังนี้

## 2.3 การศึกษาปัจจัยการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ในดินด้วยการเติมสารอาหารชนิดต่างๆ (ดัดแปลงมาจาก Vyas and Dave, 2010 และ Popoviciu and Bercu, 2014)

### (1) การศึกษาปัจจัยการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมสารอาหารชนิดต่าง ๆ

ทำการศึกษาถึงการเติมสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน คาร์บอนที่ย่อยสลายง่ายและฟอสฟอรัส เพื่อส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยทำการเตรียมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำการเตรียมดิน โดยนำดินจำนวน 300 กรัม ใส่ในขวดปากกว้าง จากนั้นเตรียมแต่ละชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดควบคุมที่ 1 (C1) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน ความเข้มข้น 1.0 %

ชุดควบคุมที่ 3 (C3) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน ความเข้มข้น 1.0 % + *B. subtilis*

สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน ความเข้มข้น 1.0 % + *B.*

*subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0 %

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมดิน + น้ำมันเบนซิน ความเข้มข้น 1.0 % + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0 % + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0 %

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมดิน + น้ำมันเบนซิน ความเข้มข้น 1.0 % + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0 % + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5 %

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมดิน + น้ำมันเบนซิน ความเข้มข้น 1.0 % + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0 % + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5 % +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และทำการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง, การเปลี่ยนแปลงความชื้นสีของดินด้วยตาเปล่า, ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด, ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำที่หลงเหลือจากการย่อยสลาย และประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน ในวันที่ 0, 3 และ 7 ของการทดลอง และวัดปริมาณซีโอดี ในวันที่ 0 และ 7 ของการทดลอง

## (2) การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมสารอาหารชนิดต่าง ๆ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4 (1) แต่เปลี่ยนจากน้ำมันเบนซินเป็นน้ำมันดีเซล

## (3) การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมสารอาหารชนิดต่าง ๆ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4 (2) แต่เปลี่ยนจากน้ำมันเบนซินเป็นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

## (4) การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมสารอาหารชนิดต่าง ๆ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4 (1) แต่เปลี่ยนจากน้ำมันเบนซินเป็นน้ำมันดิบ และทำการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

### 1) การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน (Thomas, 1996; ทศนีย์ อุตตะนันท์ และจรงค์ จันทร์เจริญสุข, 2542)

ทำการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) โดยก่อนวัดค่าความเป็นกรด-ด่างทำการ Standardize ด้วย pH buffer solution ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0, 7.0 และ 10.0 ตามลำดับ จากนั้นชั่งดิน 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ (ทำ 3 ซ้ำ) และตั้งทิ้งไว้นาน 20 นาที โดยมีการคนเป็นครั้งคราว หลังจากนั้นวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่างและบันทึกผล

## 2) การสังเกตการเปลี่ยนแปลงความชื้นสีของดินด้วยตาเปล่า (สับบัติต นิมร์ตัน และคณะ, 2559)

สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของดินด้วยตาเปล่าในแต่ละชุดการทดลองและจดบันทึกลักษณะที่สังเกตได้ โดยกำหนดให้

- + หมายถึง สีของดินมีความเข้มน้อยสุด
- ++ หมายถึง สีของดินมีความเข้มปานกลาง
- +++ หมายถึง สีของดินมีความเข้มมากที่สุด

## 3) การศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (สับบัติต นิมร์ตัน และคณะ, 2559)

นำตัวอย่างดินมาเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการด้วยสารละลาย 0.85% NaCl จากนั้นถ่ายตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar จากนั้นใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อเกลี่ยเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คำนวณและบันทึกผลในหน่วย Colony forming unit ต่อกรัม (CFU/mL)

## 4) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำที่หลงเหลือจากการย่อยสลาย

การวัดปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอล (Phenolic compounds) ตามวิธีของ Box (1983) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ทำการเติมสารละลาย 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำที่หลงเหลือจากการย่อยสลาย โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน

## 5) การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน

เก็บตัวอย่างสารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 g เป็นระยะเวลา 4 นาที เก็บส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 220-400 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader เพื่อประเมินประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน

## 6) การวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดี

ทำการวัดซีโอดีด้วยชุด COD Kit ของบริษัท Hach company โดยทำการอุ่นเครื่อง COD Reactor ปรับอุณหภูมิที่ 150 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมหลอดซีโอดีและเลือกช่วงซีโอดีที่ต้องการวัดตัวอย่าง คือ 0 – 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเอียงหลอดซีโอดี ประมาณ 45 องศา และ

ปิเปตตัวอย่างลงในหลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้สนิท ล้างด้วยน้ำ Deionize (DI) และ เช็ดให้แห้ง กลับหลอดขึ้นลงให้สารละลายผสมกันให้ทั่วและนำไปให้ความร้อนในเครื่อง COD Reactor นาน 2 ชั่วโมง (เตรียมแบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่าง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร) เมื่อให้ความร้อนครบ 2 ชั่วโมง ปิดเครื่องและรอประมาณ 20 นาที เพื่อให้อุณหภูมิลดลงเป็น 120 องศาเซลเซียส หรือน้อยกว่านั้น กลับหลอดขึ้นลงขณะที่หลอดยังอุ่นอยู่ และวางทิ้งไว้รอให้เย็นถึง อุณหภูมิห้อง เลือกช่วงและวิธีในการวัดซีไอดีคือ Colorimetric method 0-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ของซีไอดี จากนั้นทำการวัดค่าซีไอดีโดยใช้ Program 435 ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร บันทึก ผลในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรของซีไอดี



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารปิโตรเลียม ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

#### 1. การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมัน

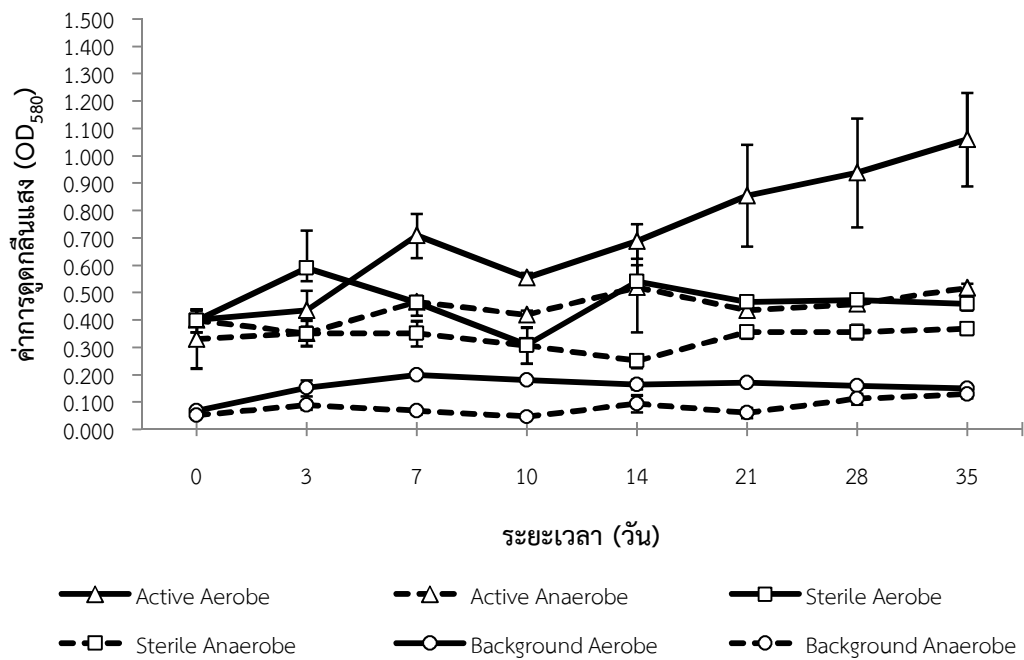
1.1 การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

1.1.1 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีการเจริญโดยใช้น้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 0-7 ของการทดลอง และลดลงในวันที่ 10 ของการทดลอง หลังจากนั้นมีการเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 14 ของการทดลองไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองในทั้ง 2 สภาวะ แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจน *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถเจริญได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 10

ตารางที่ 2 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ( $OD_{580}$ ) ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{580}$ ) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สภาวะมีออกซิเจน			สภาวะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0.400±0.020	0.397±0.041	0.062±0.008	0.330±0.106	0.397±0.041	0.051±0.006
3	0.434±0.072	0.589±0.139	0.152±0.029	0.352±0.047	0.352±0.047	0.088±0.016
7	0.708±0.080	0.462±0.027	0.200±0.004	0.466±0.005	0.350±0.046	0.068±0.011
10	0.554±0.019	0.308±0.012	0.181±0.012	0.419±0.016	0.307±0.066	0.048±0.006
14	0.687±0.064	0.540±0.061	0.165±0.018	0.519±0.162	0.250±0.025	0.094±0.031
21	0.855±0.185	0.466±0.014	0.170±0.014	0.435±0.014	0.356±0.024	0.062±0.019
28	0.938±0.199	0.473±0.015	0.159±0.008	0.459±0.014	0.356±0.026	0.112±0.020
35	1.060±0.171	0.457±0.024	0.151±0.002	0.517±0.017	0.367±0.021	0.129±0.013



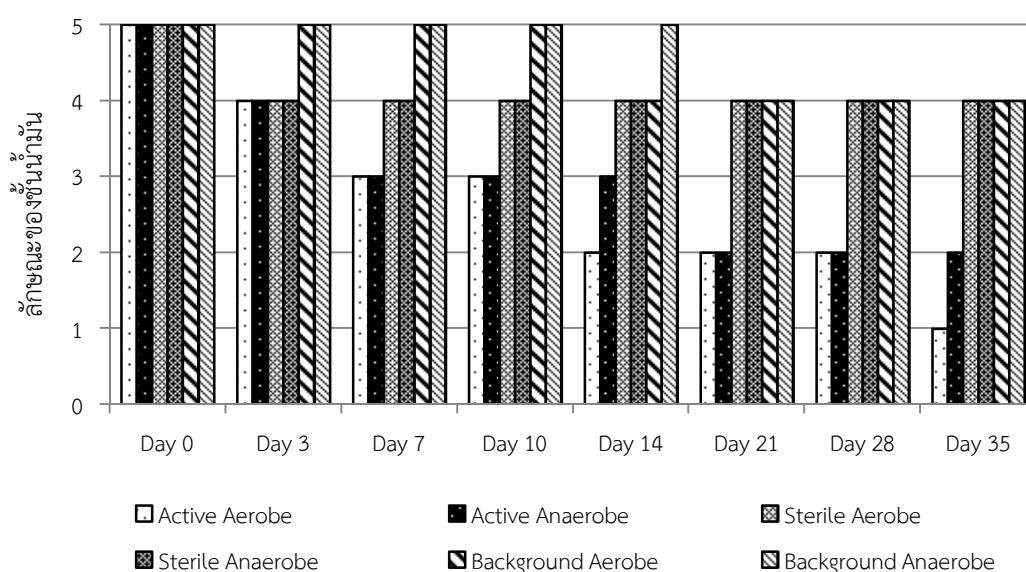
ภาพที่ 10 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

### 1.1.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดีเซลในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซลที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่าลักษณะของชั้นน้ำมันดีเซลลดลงเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลองไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง โดยในสภาวะที่มีออกซิเจน ลักษณะของชั้นน้ำมันดีเซลลดลง สังเกตพบเพียงคราบไขมันดีเซลจาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 11

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซลในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซล					
	สถานะที่มีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	5+	5+	5+	5+	5+	5+
3	4+	4+	5+	4+	4+	5+
7	3+	4+	5+	3+	4+	5+
10	3+	4+	5+	3+	4+	5+
14	2+	4+	4+	3+	4+	5+
21	2+	4+	4+	2+	4+	4+
28	2+	4+	4+	2+	4+	4+
35	1+	4+	4+	2+	4+	4+



ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดีเซลในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

หมายเหตุ 5+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันไม่รวมตัวกับน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน

4+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน

3+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร

2+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร

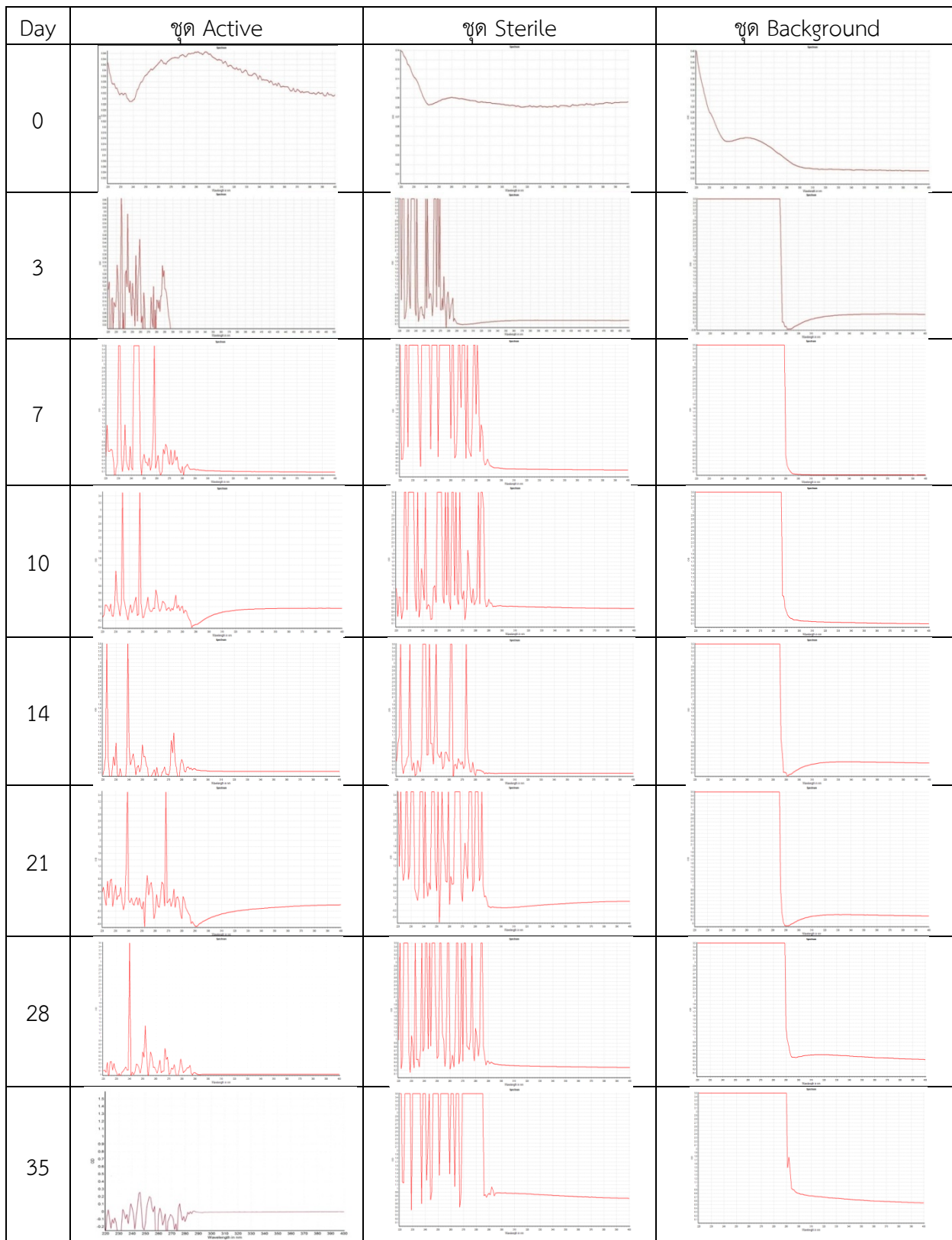
1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงครบน้ำมันจาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม

0 หมายถึง ไม่พบน้ำมัน

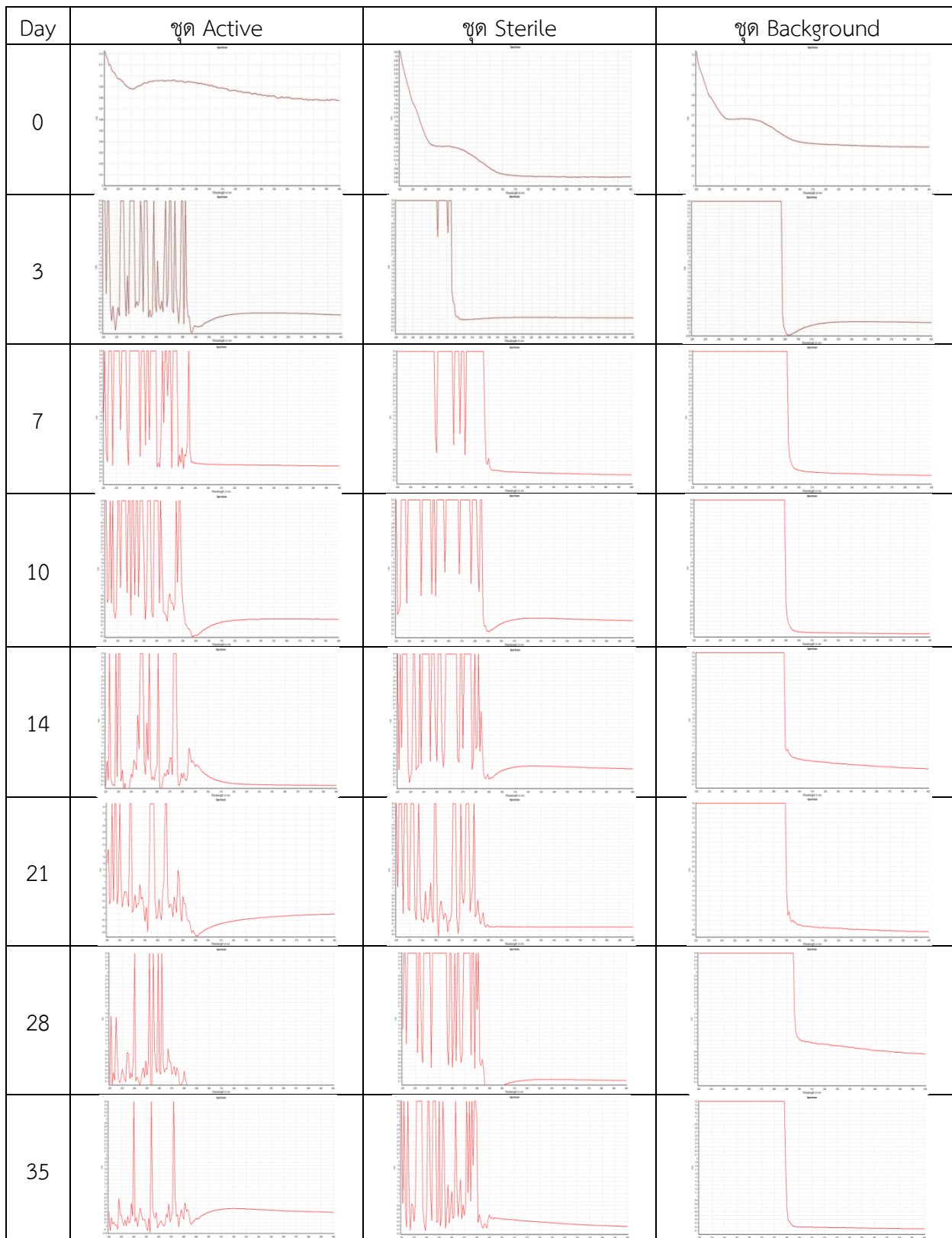
### 1.1.3 ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลมากกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และเริ่มพบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง และพบว่าน้ำมันดีเซลถูกย่อยสลายจนไม่สามารถตรวจพบฟิเคได้ในวันที่ 35 ของการทดลอง ส่วนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง และในวันที่ 35 ของการทดลอง ยังสามารถตรวจพบฟิเคจำนวน 3 ฟิเค ที่ค่าความยาวคลื่น 240, 255 และ 275 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจน



ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน



### 1.1.4 การศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน พบว่าทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนไม่สามารถตรวจพบก๊าซทั้งหมดได้ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น (มิลลิลิตร) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สภาวะมีออกซิเจน			สภาวะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
3	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
7	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
10	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
14	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
21	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
28	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
35	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

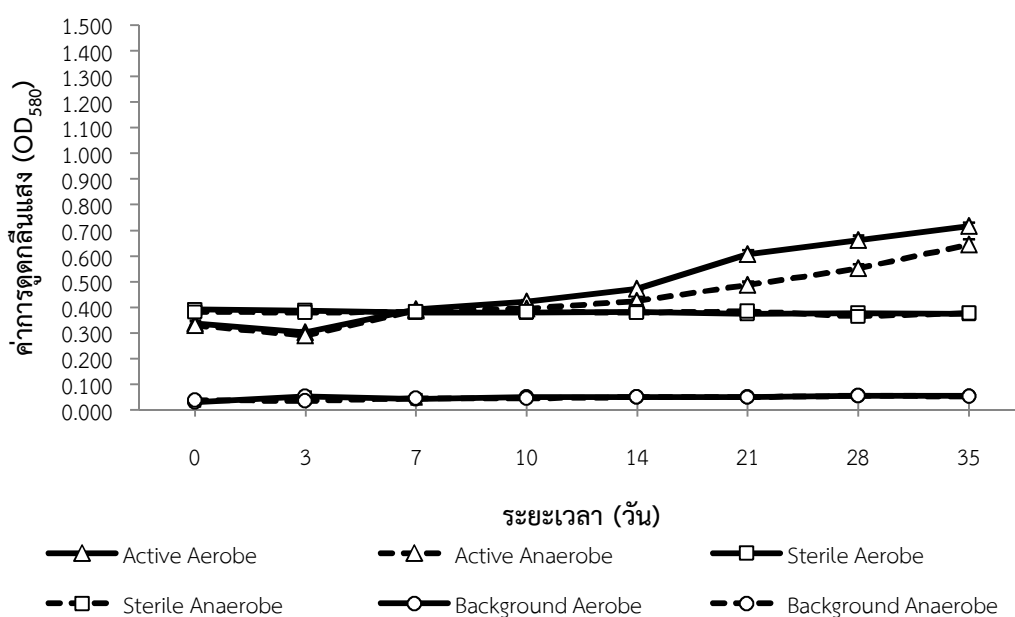
## 2. การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

### 2.1 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีการเจริญโดยใช้น้ำมันเบนซินเป็นแหล่งคาร์บอนลดลงเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลอง และเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 ของการทดลองและมีการเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ ตลอดการทดลองจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองในทั้ง 2 สภาวะ แต่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 12

ตารางที่ 7 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (OD<sub>580</sub>) ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD <sub>580</sub> ) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สภาวะมีออกซิเจน			สภาวะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0.339±0.011	0.401±0.014	0.031±0.013	0.330±0.002	0.384±0.001	0.039±0.008
3	0.304±0.009	0.387±0.010	0.054±0.020	0.291±0.005	0.381±0.004	0.036±0.008
7	0.394±0.006	0.380±0.009	0.044±0.019	0.388±0.004	0.382±0.003	0.046±0.006
10	0.422±0.007	0.381±0.002	0.051±0.011	0.397±0.003	0.383±0.003	0.046±0.003
14	0.473±0.006	0.382±0.006	0.050±0.003	0.425±0.009	0.381±0.005	0.052±0.002
21	0.607±0.018	0.377±0.007	0.051±0.001	0.488±0.014	0.385±0.006	0.052±0.004
28	0.661±0.020	0.379±0.007	0.056±0.001	0.553±0.018	0.367±0.022	0.055±0.004
35	0.718±0.015	0.375±0.005	0.057±0.004	0.646±0.022	0.378±0.006	0.053±0.006



ภาพที่ 12 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน

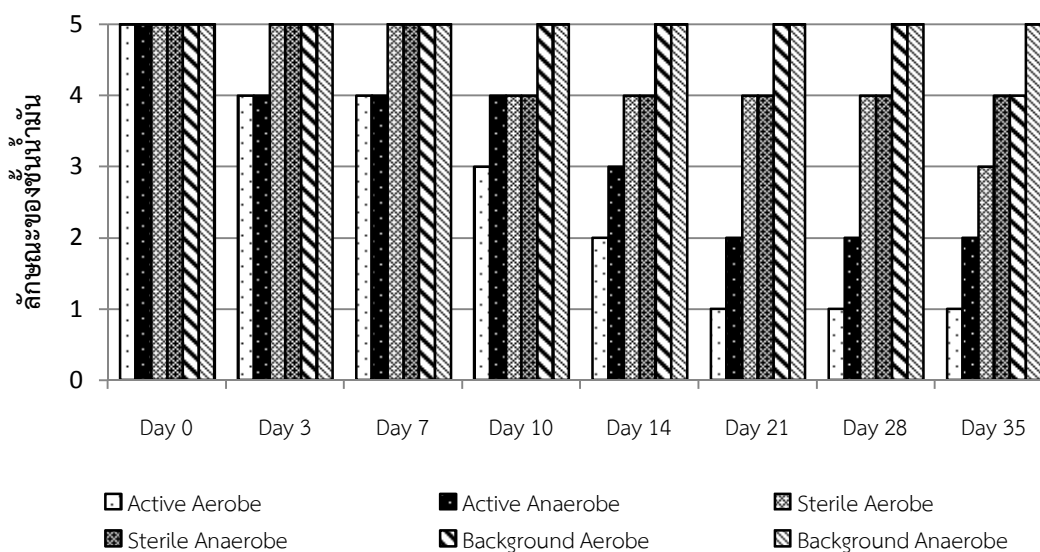


### 1.2.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเบนซินที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลการทดลองพบว่าลักษณะของชั้นน้ำมันเบนซินลดลงเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลองไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง โดยในสถานะที่มีออกซิเจน ลักษณะของชั้นน้ำมันเบนซินลดลงสังเกตพบเพียงคราบน้ำมันเบนซินจาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม ส่วนในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน พบลักษณะของชั้นน้ำมันเบนซินลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 13

#### ตารางที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเบนซิน					
	สถานะที่มีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	5+	5+	5+	5+	5+	5+
3	4+	5+	5+	4+	5+	5+
7	4+	5+	5+	4+	5+	5+
10	3+	4+	5+	4+	4+	5+
14	2+	4+	5+	3+	4+	5+
21	1+	4+	5+	2+	4+	5+
28	1+	4+	5+	2+	4+	5+
35	1+	3+	4+	2+	4+	5+



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis*

สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

หมายเหตุ 5+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันไม่รวมตัวกับน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน

4+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน

3+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร

2+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร

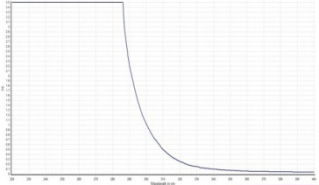
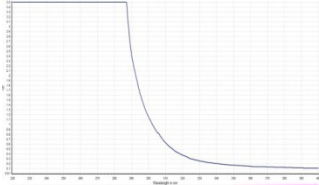
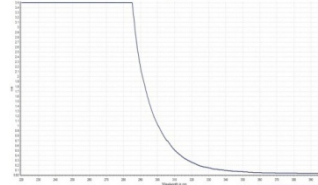
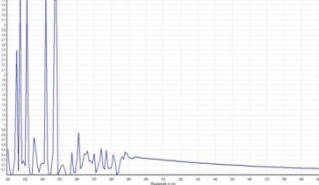
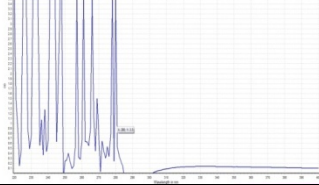
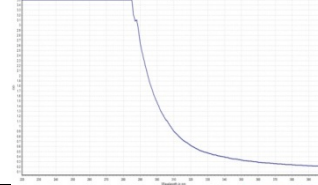
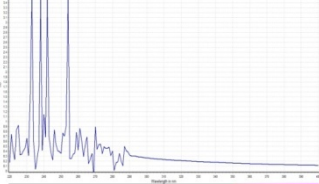
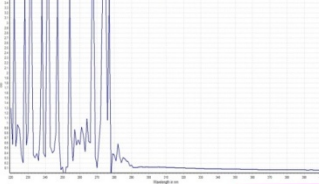
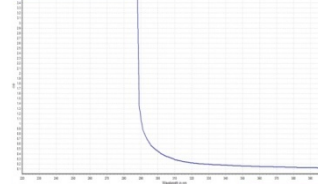
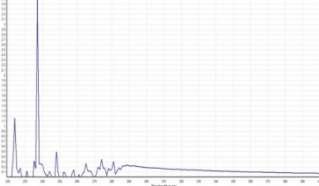
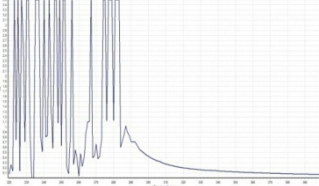
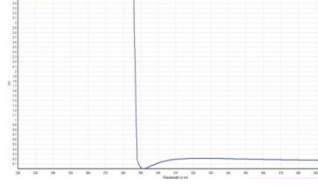
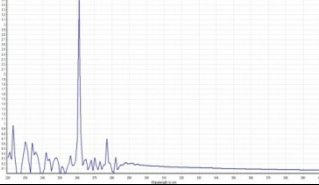
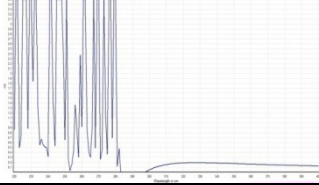
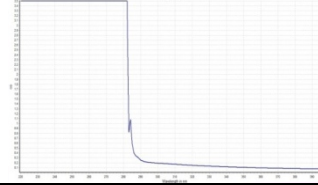
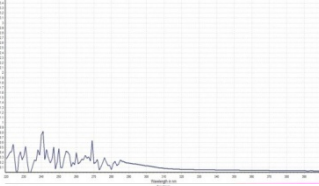
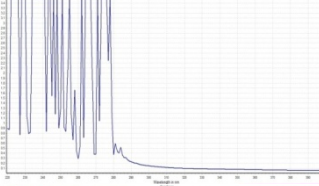
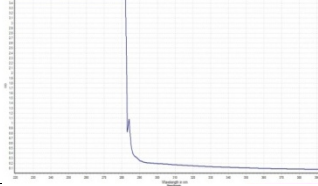
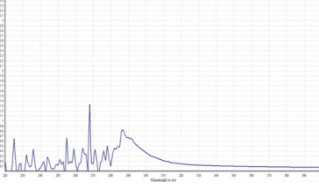
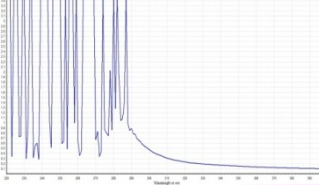
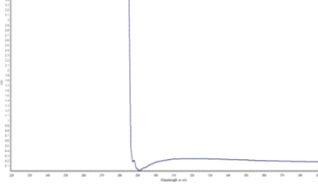
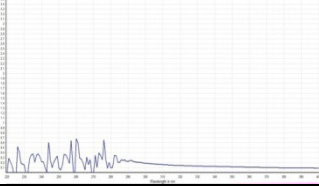
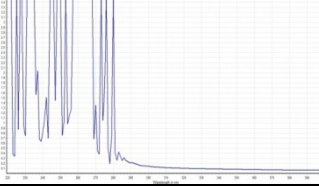
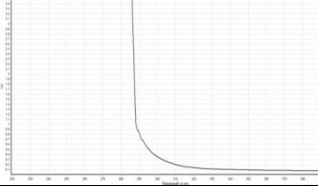
1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงครบน้ำมันจาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม

0 หมายถึง ไม่พบน้ำมัน

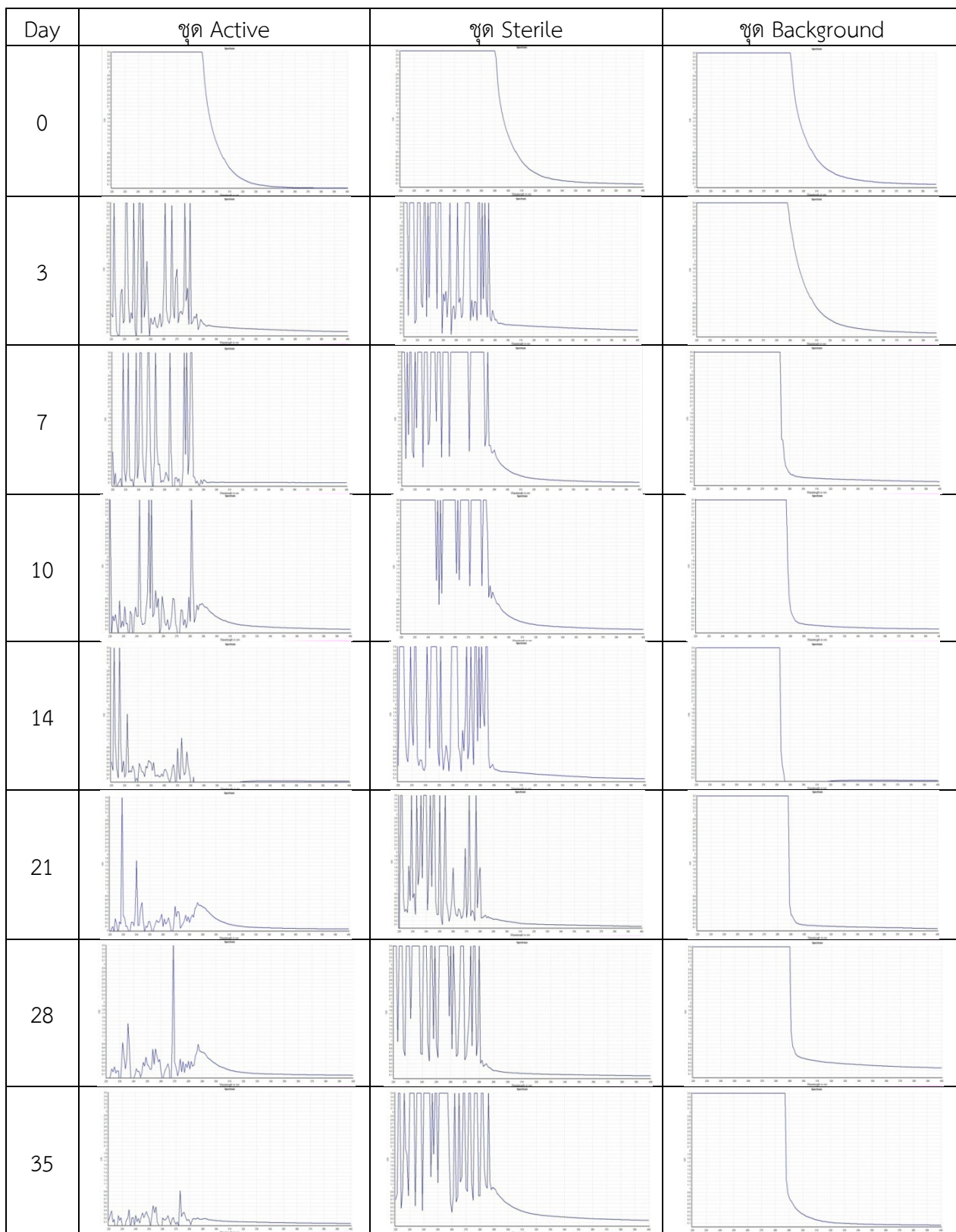
### 2.3 ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันเบนซินมากกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และเริ่มพบการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง และพบว่าน้ำมันเบนซินถูกย่อยสลายจนไม่สามารถตรวจพบฟิเคได้ในวันที่ 21 ของการทดลอง ส่วนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันเบนซินตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง และในวันที่ 35 ของการทดลอง พบว่าน้ำมันเบนซินถูกย่อยสลายจนไม่สามารถตรวจพบฟิเคได้ ดังแสดงในตารางที่ 9-

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน



### 1.2.4 การศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่าทั้งในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนไม่สามารถตรวจพบก๊าซทั้งหมดได้ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น (มิลลิลิตร) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สถานะมีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
3	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
7	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
10	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
14	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
21	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
28	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
35	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

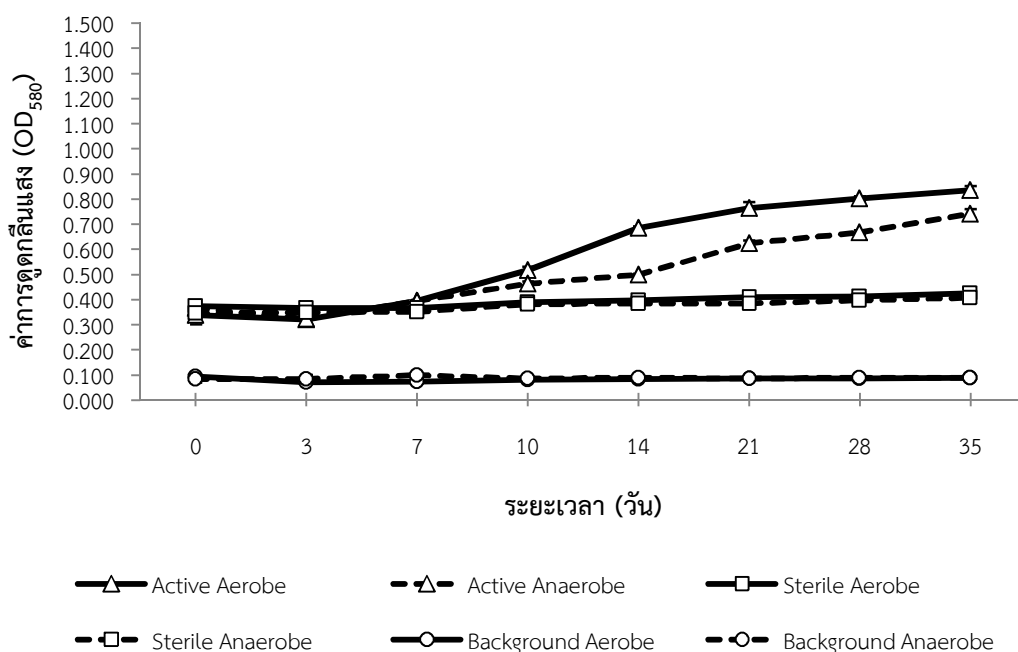
### 1.3 การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

#### 1.3.1 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีการเจริญโดยใช้น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนลดลงเล็กน้อยในวันที่ 0-3 ของการทดลอง และเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 10 ไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองในทั้ง 2 สถานะ แต่ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถเจริญในสถานะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสถานะที่ไม่มีออกซิเจน ดังแสดงในตารางที่ 12 และภาพที่ 14

ตารางที่ 12 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ( $OD_{580}$ ) ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{580}$ ) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สภาวะมีออกซิเจน			สภาวะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0.337±0.036	0.375±0.015	0.093±0.006	0.366±0.035	0.345±0.018	0.084±0.014
3	0.320±0.001	0.366±0.007	0.072±0.008	0.322±0.023	0.349±0.017	0.083±0.018
7	0.394±0.005	0.365±0.010	0.074±0.007	0.393±0.006	0.351±0.007	0.099±0.001
10	0.517±0.014	0.388±0.005	0.081±0.001	0.464±0.008	0.381±0.003	0.086±0.001
14	0.684±0.007	0.397±0.004	0.084±0.002	0.498±0.004	0.383±0.007	0.088±0.002
21	0.763±0.025	0.409±0.009	0.086±0.006	0.623±0.013	0.384±0.009	0.086±0.003
28	0.802±0.009	0.413±0.006	0.085±0.001	0.666±0.009	0.396±0.006	0.089±0.002
35	0.836±0.016	0.425±0.006	0.089±0.001	0.741±0.018	0.407±0.009	0.088±0.001



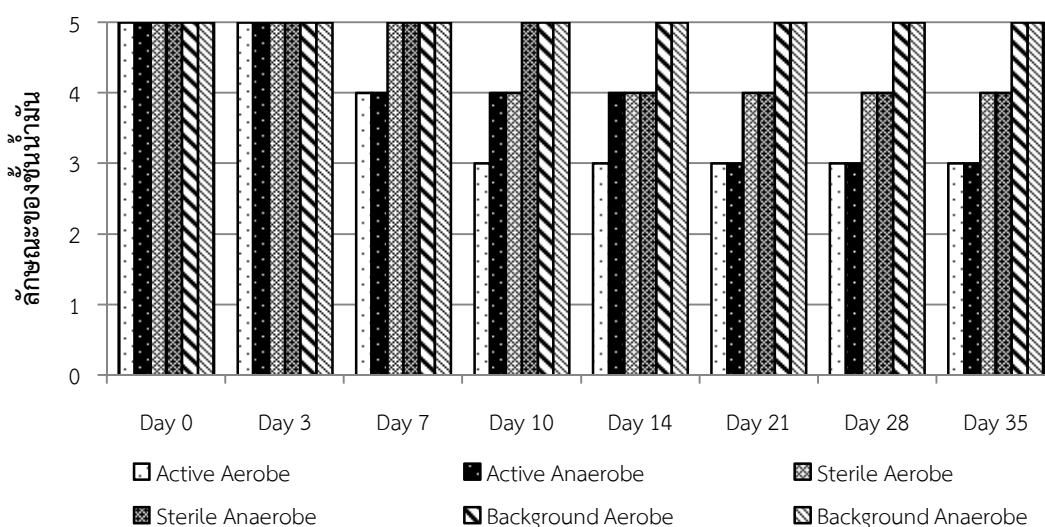
ภาพที่ 14 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

### 1.3.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลการทดลองพบว่าลักษณะของชั้นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วลดลงเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลองไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง โดยในวันสุดท้ายของการทดลองทั้ง 2 สถานะ พบลักษณะของชั้นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร แต่ในสถานะที่มีออกซิเจน พบว่าลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร ตั้งแต่วันที่ 10 ของการทดลอง ซึ่งลดลงได้เร็วกว่าสถานะที่ไม่มีออกซิเจนที่พบการลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหารในวันที่ 21 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 13 และภาพที่ 15

**ตารางที่ 13** ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว					
	สถานะที่มีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	5+	5+	5+	5+	5+	5+
3	5+	5+	5+	5+	5+	5+
7	4+	5+	5+	4+	5+	5+
10	3+	4+	5+	4+	5+	5+
14	3+	4+	5+	4+	4+	5+
21	3+	4+	5+	3+	4+	5+
28	3+	4+	5+	3+	4+	5+
35	3+	4+	5+	3+	4+	5+



**ภาพที่ 15** การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

- หมายเหตุ** 5+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันไม่รวมตัวกับน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 4+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 3+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 2+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงคราบน้ำมันจาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม  
 0 หมายถึง ไม่พบน้ำมัน

### 3.3 ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

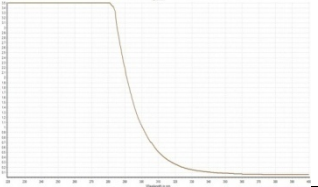
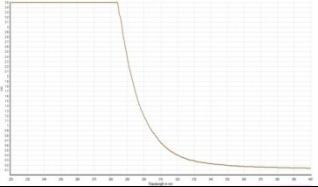
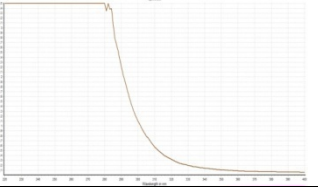
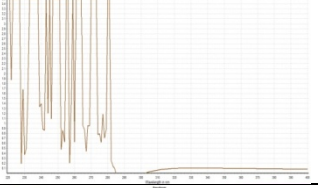
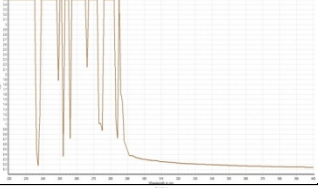
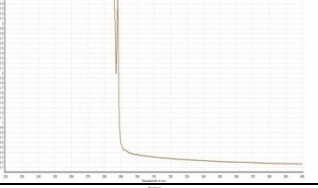
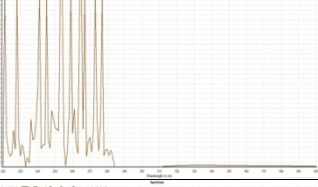
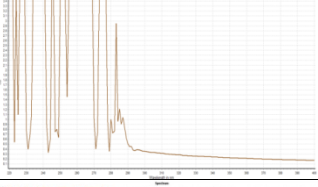
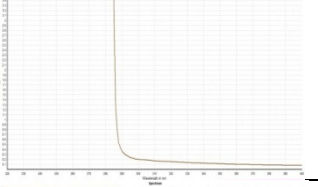
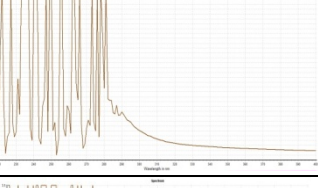
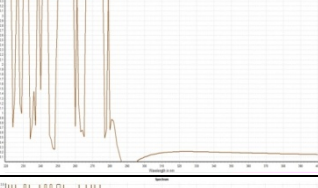
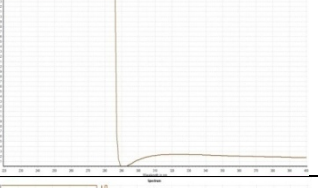
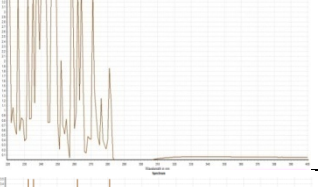
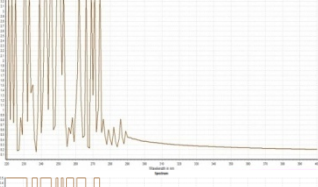
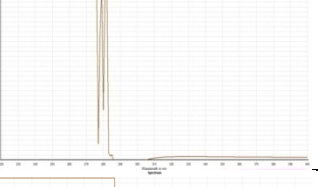
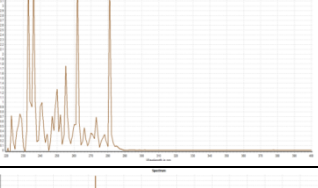
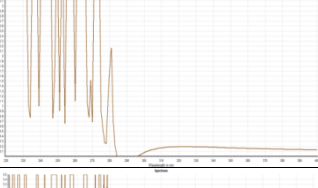
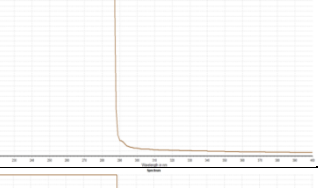
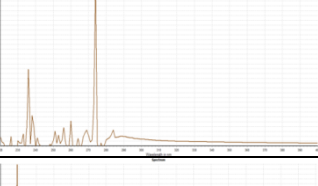
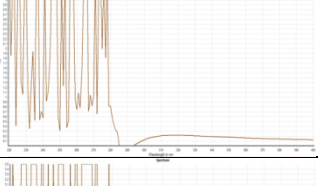
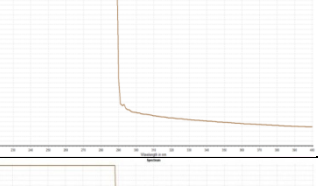
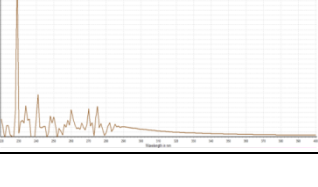
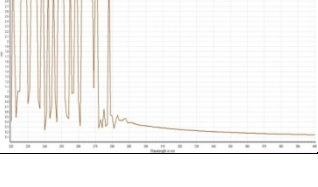
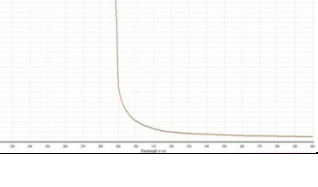
จากการศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วมากกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งเริ่มพบการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง และพบว่าน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วถูกย่อยสลายจนไม่สามารถตรวจพบฟิเคได้ในวันที่ 28 ของการทดลอง ส่วนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง และในวันที่ 35 ของการทดลองยังสามารถตรวจพบฟิเคจำนวน 1 ฟิเค ที่ค่าความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 14-15



ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

### 1.3.4 การศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่าทั้งในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนไม่สามารถตรวจพบก๊าซทั้งหมดได้ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น (มิลลิลิตร) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สถานะมีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
3	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
7	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
10	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
14	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
21	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
28	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
35	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

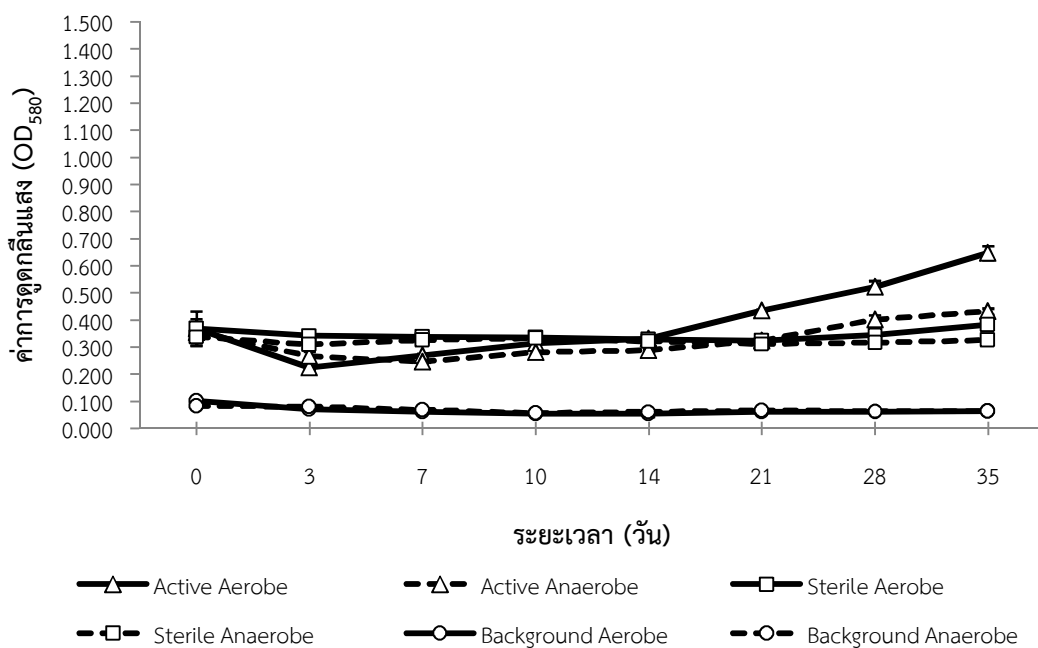
### 1.4 การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

#### 1.4.1 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถเจริญโดยใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในสถานะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสถานะที่ไม่มีออกซิเจน โดยพบว่ามีปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลดลงเล็กน้อยในวันที่ 0-3 ของการทดลอง และเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 10 ไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองในทั้ง 2 สถานะ ดังแสดงในตารางที่ 17 และภาพที่

ตารางที่ 17 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ( $OD_{580}$ ) ในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{580}$ ) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สภาวะมีออกซิเจน			สภาวะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0.370±0.063	0.369±0.036	0.103±0.008	0.362±0.025	0.340±0.031	0.084±0.008
3	0.226±0.008	0.341±0.023	0.073±0.005	0.267±0.017	0.310±0.012	0.082±0.009
7	0.270±0.007	0.338±0.018	0.063±0.008	0.247±0.008	0.326±0.008	0.070±0.004
10	0.316±0.007	0.330±0.012	0.056±0.006	0.282±0.006	0.335±0.008	0.059±0.006
14	0.332±0.012	0.330±0.012	0.056±0.011	0.288±0.006	0.323±0.011	0.064±0.005
21	0.435±0.005	0.324±0.005	0.064±0.009	0.324±0.007	0.314±0.003	0.068±0.004
28	0.522±0.024	0.347±0.015	0.063±0.006	0.402±0.017	0.316±0.007	0.066±0.003
35	0.648±0.026	0.384±0.015	0.065±0.001	0.432±0.012	0.327±0.004	0.065±0.003



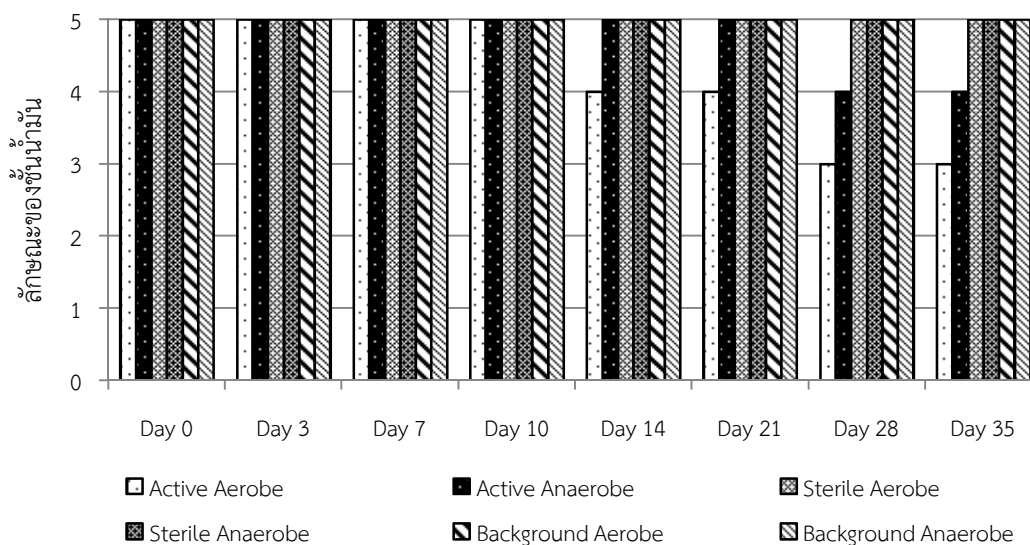
ภาพที่ 16 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

#### 1.4.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดิบในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดิบที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลการทดลองพบว่า ในสถานะที่มีออกซิเจนลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 14 ของการทดลอง และลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหารตั้งแต่วันที่ 28 ของการทดลอง ส่วนในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 28 ของการทดลองไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 18 และภาพที่ 17

**ตารางที่ 18** ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดิบในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว					
	สถานะที่มีออกซิเจน			สถานะที่ไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	5+	5+	5+	5+	5+	5+
3	5+	5+	5+	5+	5+	5+
7	5+	5+	5+	5+	5+	5+
10	5+	5+	5+	5+	5+	5+
14	4+	5+	5+	5+	5+	5+
21	4+	5+	5+	5+	5+	5+
28	3+	5+	5+	4+	5+	5+
35	3+	5+	5+	4+	5+	5+



**ภาพที่ 17** การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดิบในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

**หมายเหตุ** 5+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันไม่รวมตัวกับน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 4+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 3+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 2+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงคราบน้ำมันจาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม  
 0 หมายถึง ไม่พบน้ำมัน

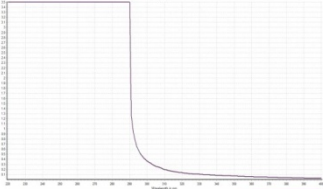
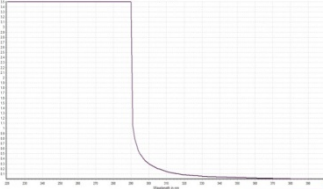
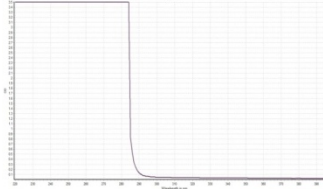
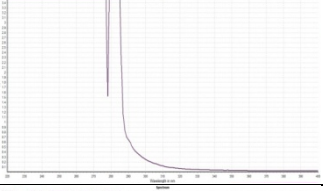
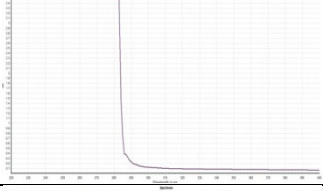
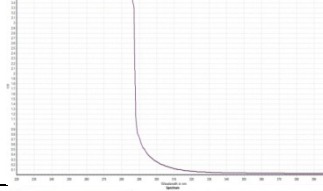
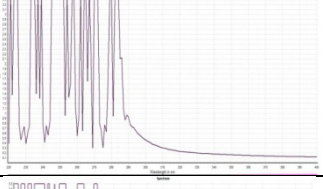
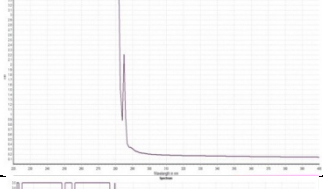
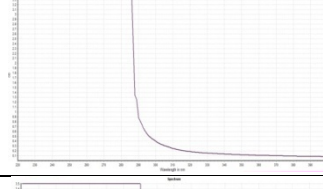
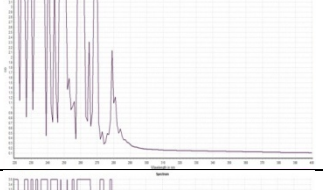
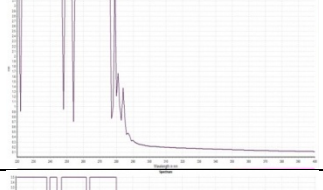
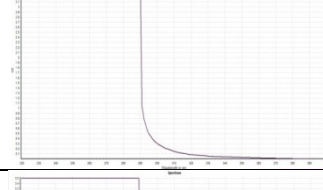
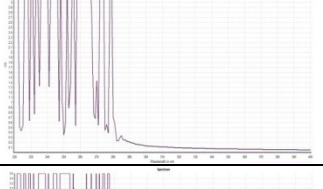
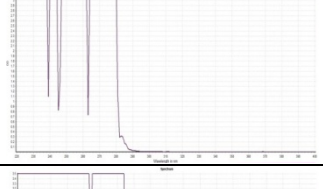
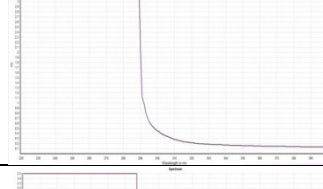
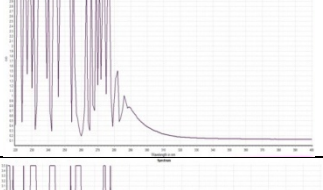
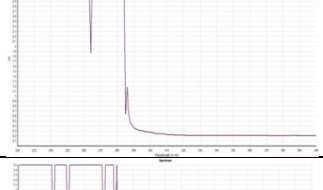
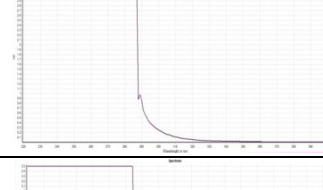
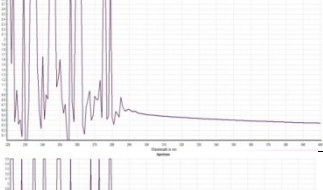
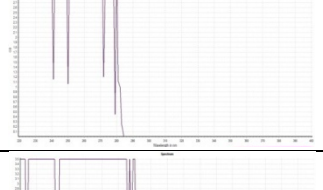
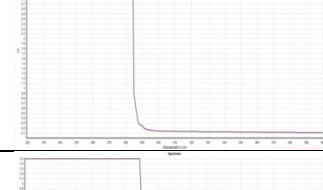
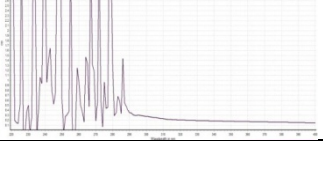
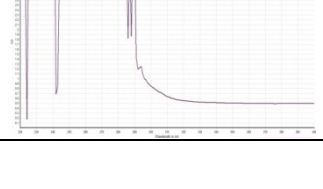

#### 1.4.3 ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันดิบมากกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และเริ่มพบการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง ส่วนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันดิบตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง และทั้ง 2 สภาวะ พบการย่อยสลายน้อยไปเรื่อย ๆ จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 19-20

ตารางที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสภาวะที่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

ตารางที่ 20 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			



#### 1.4.4 การศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่าในสถานะที่มีออกซิเจนสามารถตรวจพบก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นได้เล็กน้อยในช่วงวันที่ 7-14 ของการทดลองในชุด Active ส่วนสถานะที่ไม่มีออกซิเจนสามารถตรวจพบก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นได้เล็กน้อยในช่วงวันที่ 10-14 ของการทดลองในชุด Active ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น (มิลลิลิตร) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สถานะมีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
3	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
7	3±1	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
10	2±1	0±0	0±0	2±1	0±0	0±0
14	2±1	0±0	0±0	2±1	0±0	0±0
21	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
28	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
35	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

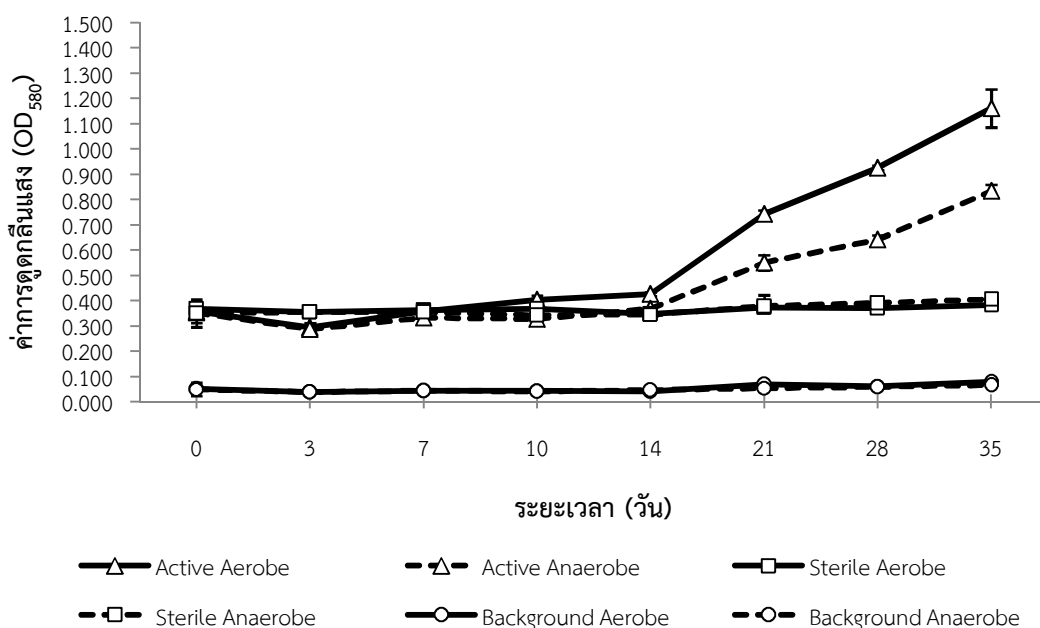
#### 1.5 การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

##### 1.5.1 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่าในสถานะที่มีออกซิเจน *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 มีการเจริญโดยใช้น้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 10 ของการทดลอง และมีการเจริญเพิ่มเรื่อย ๆ ไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ส่วนสถานะที่ไม่มีออกซิเจนแบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 21 ของการทดลองไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง แต่ในสถานะที่มีออกซิเจน *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 สามารถเจริญได้ดีกว่าสถานะที่ไม่มีออกซิเจน ดังแสดงในตารางที่ 22 และภาพที่ 18

ตารางที่ 22 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ( $OD_{580}$ ) ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{580}$ ) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สภาวะมีออกซิเจน			สภาวะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0.356±0.021	0.366±0.022	0.052±0.006	0.353±0.018	0.350±0.054	0.050±0.026
3	0.294±0.007	0.354±0.020	0.038±0.006	0.287±0.023	0.354±0.020	0.038±0.006
7	0.358±0.009	0.363±0.006	0.043±0.008	0.332±0.018	0.355±0.016	0.044±0.004
10	0.402±0.017	0.366±0.006	0.045±0.002	0.328±0.008	0.342±0.012	0.042±0.002
14	0.425±0.008	0.347±0.023	0.041±0.001	0.366±0.008	0.346±0.004	0.046±0.001
21	0.741±0.017	0.372±0.049	0.069±0.002	0.550±0.031	0.377±0.010	0.055±0.006
28	0.925±0.008	0.370±0.028	0.062±0.001	0.641±0.018	0.391±0.008	0.058±0.003
35	1.160±0.075	0.384±0.017	0.080±0.006	0.834±0.025	0.404±0.014	0.066±0.003



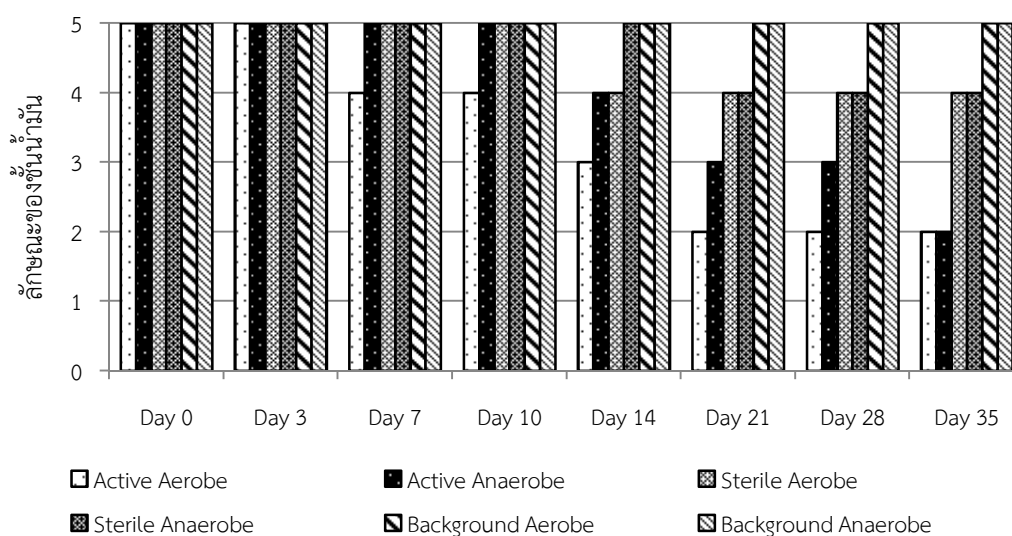
ภาพที่ 18 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

### 1.5.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดีเซลในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซลที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ผลการทดลองพบว่าในสถานะที่มีออกซิเจนลักษณะของชั้นน้ำมันดีเซลลดลงเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง และในวันที่ 21 ไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ลักษณะของชั้นน้ำมันดีเซลลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร ส่วนในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนพบลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร ในวันสุดท้ายของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 23 และภาพที่ 19

**ตารางที่ 23** ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซลในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซล					
	สถานะมีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	5+	5+	5+	5+	5+	5+
3	5+	5+	5+	5+	5+	5+
7	4+	5+	5+	5+	5+	5+
10	4+	5+	5+	5+	5+	5+
14	3+	4+	5+	4+	5+	5+
21	2+	4+	5+	3+	4+	5+
28	2+	4+	5+	3+	4+	5+
35	2+	4+	5+	2+	4+	5+



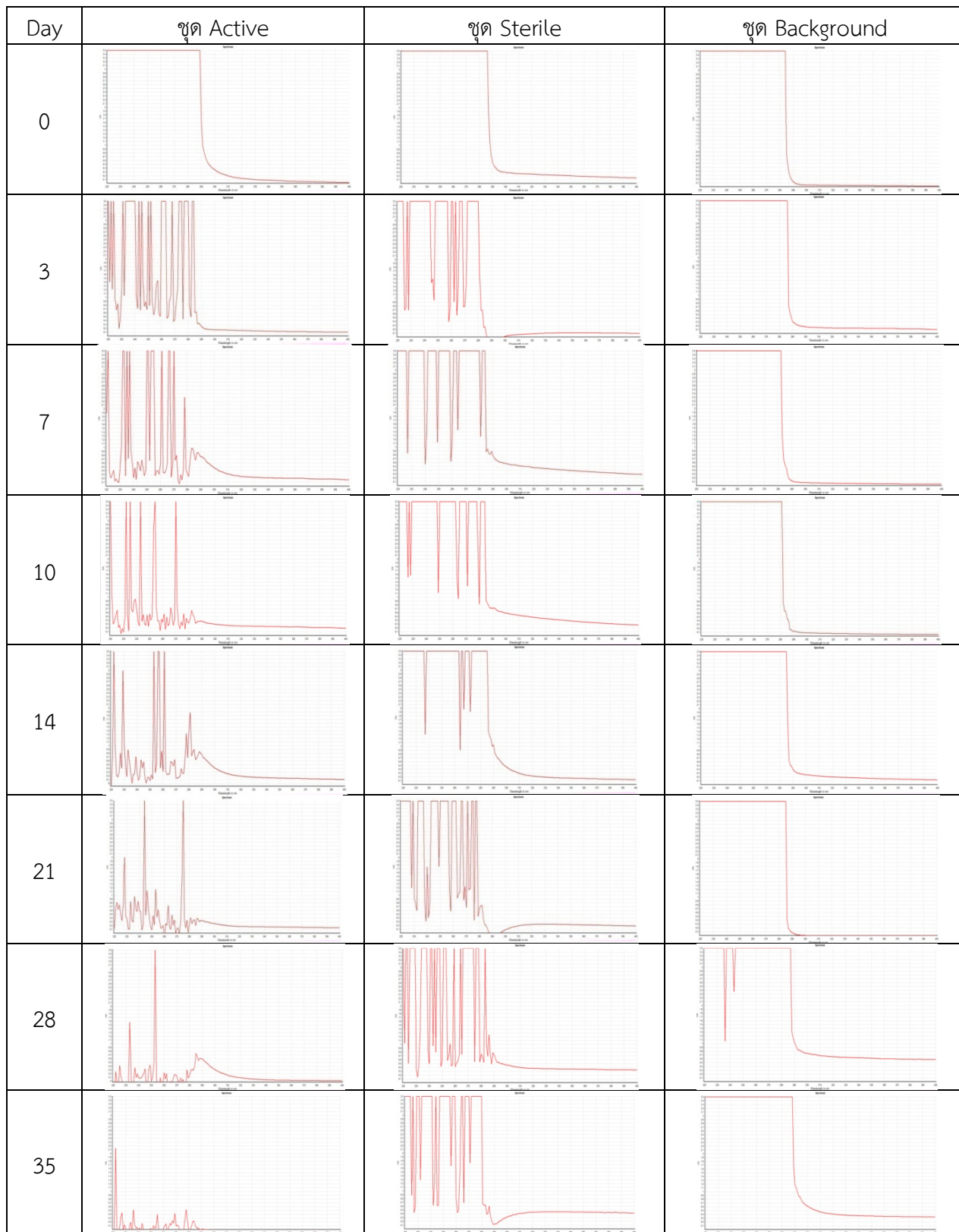
**ภาพที่ 19** การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดีเซลในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

**หมายเหตุ** 5+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันไม่รวมตัวกับน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 4+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 3+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 2+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงคราบน้ำมันจาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม  
 0 หมายถึง ไม่พบน้ำมัน

### 1.5.3 ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลมากกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และเริ่มพบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง และพบว่าน้ำมันดีเซลถูกย่อยสลายจนไม่สามารถตรวจพบฟิเคได้ในวันที่ 35 ของการทดลอง ส่วนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง และในวันที่ 35 ของการทดลอง ยังสามารถตรวจพบฟิเคจำนวน 1 ฟิเค ที่ค่าความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 24-25

ตารางที่ 24 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจน



ตารางที่ 25 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

#### 1.5.4 การศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่าปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นและลดลงเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลองในชุด Active ของทั้ง 2 สถานะ ดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณของก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น (มิลลิลิตร) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สถานะที่มีออกซิเจน			สถานะที่ไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
3	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
7	3±2	0±0	0±0	2±1	0±0	0±0
10	2±2	0±0	0±0	2±0	0±0	0±0
14	2±1	0±0	0±0	2±1	0±0	0±0
21	3±2	0±0	0±0	3±1	0±0	0±0
28	1±1	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
35	1±1	0±0	0±0	1±1	0±0	0±0

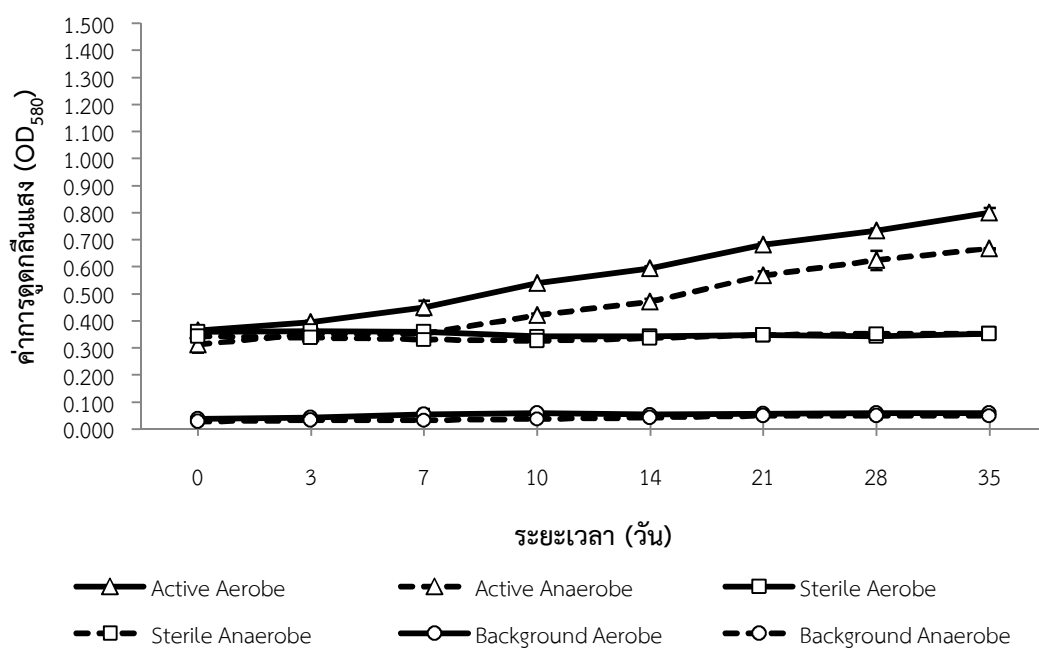
#### 1.6 การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

##### 1.6.1 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 มีการเจริญโดยใช้น้ำมันเบนซินเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยในช่วง 0-3 วันของการทดลอง จะไม่ค่อยพบการเพิ่มจำนวนหรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลองเป็นต้นไป พบการเจริญเพิ่มจำนวนสูงขึ้นจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองในสถานะที่มีออกซิเจน ส่วนในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนพบการเพิ่มจำนวนตั้งแต่วันที่ 10 ไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง แต่สามารถเจริญในสถานะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสถานะที่ไม่มีออกซิเจน ดังแสดงในตารางที่ 27 และภาพที่ 20

ตารางที่ 27 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ( $OD_{580}$ ) ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้ สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{580}$ ) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สภาวะที่มีออกซิเจน			สภาวะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0.364±0.011	0.361±0.008	0.038±0.004	0.313±0.028	0.343±0.009	0.028±0.006
3	0.395±0.008	0.362±0.006	0.043±0.003	0.353±0.006	0.339±0.007	0.033±0.004
7	0.449±0.028	0.360±0.022	0.055±0.021	0.352±0.008	0.333±0.016	0.035±0.006
10	0.540±0.003	0.345±0.019	0.060±0.011	0.423±0.006	0.327±0.008	0.040±0.004
14	0.594±0.009	0.343±0.009	0.056±0.008	0.471±0.013	0.337±0.018	0.044±0.005
21	0.683±0.008	0.349±0.007	0.058±0.001	0.567±0.018	0.348±0.003	0.051±0.004
28	0.735±0.009	0.344±0.010	0.061±0.001	0.624±0.036	0.354±0.004	0.050±0.011
35	0.801±0.018	0.352±0.007	0.060±0.003	0.668±0.003	0.353±0.007	0.052±0.002



ภาพที่ 20 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน

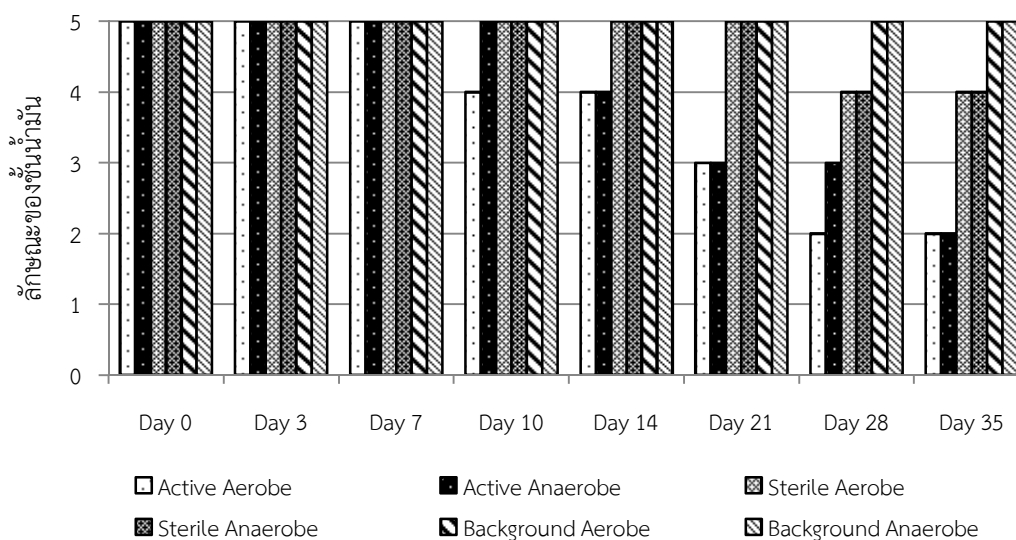


### 1.6.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเบนซินที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ผลการทดลองพบว่าลักษณะของชั้นน้ำมันเบนซินลดลงเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 10 ของการทดลองในสถานะที่มีออกซิเจน และตั้งแต่วันที่ 14 ของการทดลองไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ลักษณะของชั้นน้ำมันเบนซินในทั้ง 2 สถานะลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 28 และภาพที่ 21

**ตารางที่ 28** ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเบนซิน					
	สถานะมีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	5+	5+	5+	5+	5+	5+
3	5+	5+	5+	5+	5+	5+
7	5+	5+	5+	5+	5+	5+
10	4+	5+	5+	5+	5+	5+
14	4+	5+	5+	4+	5+	5+
21	3+	5+	5+	3+	5+	5+
28	2+	4+	5+	3+	4+	5+
35	2+	4+	5+	2+	4+	5+



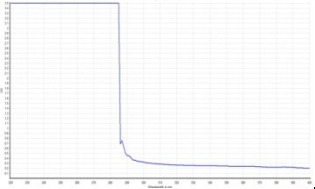
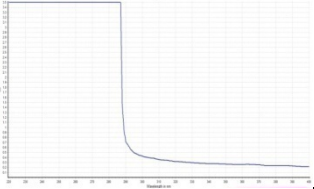
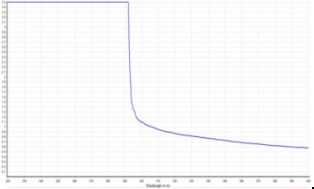
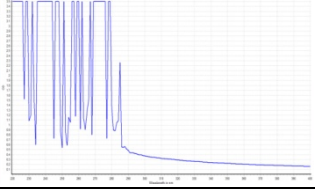
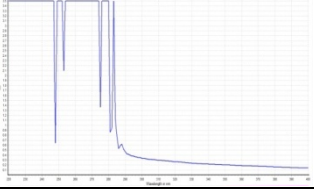
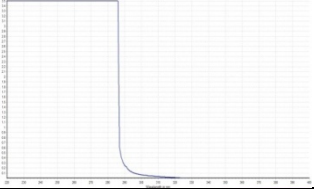
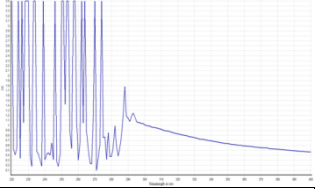
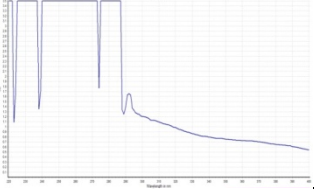
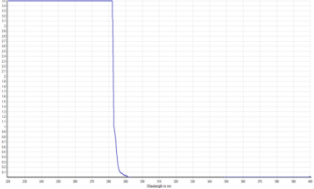
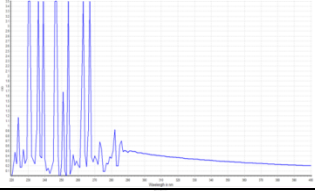
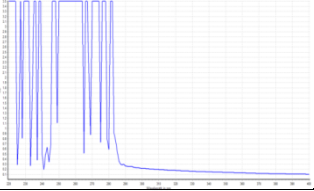
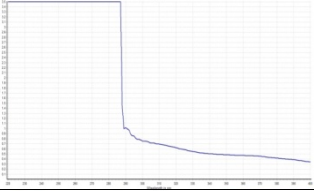
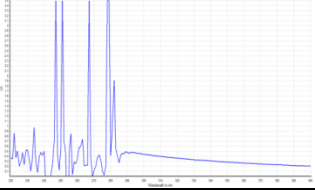
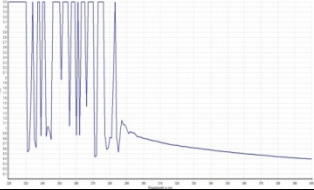
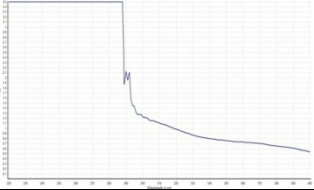
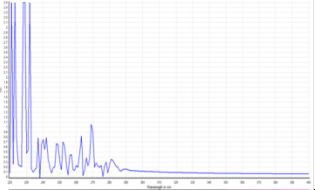
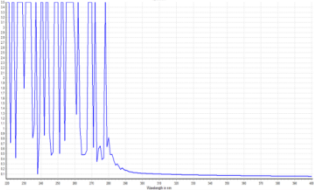
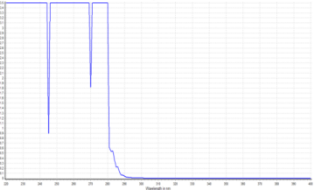

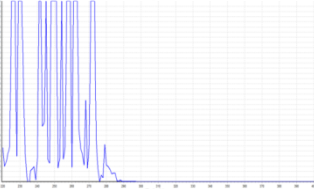
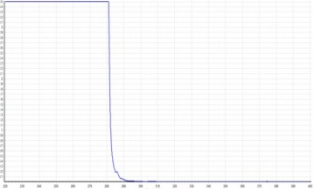
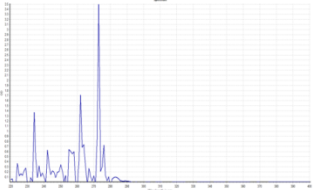
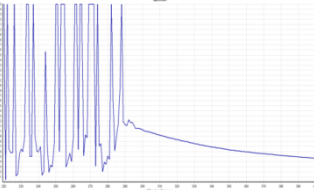
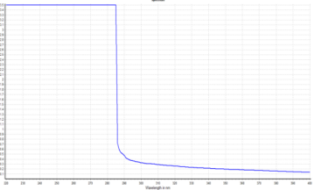
**ภาพที่ 21** การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

**หมายเหตุ** 5+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันไม่รวมตัวกับน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 4+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 3+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 2+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงครบน้ำมันจาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม  
 0 หมายถึง ไม่พบน้ำมัน

### 1.6.3 ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันเบนซินมากกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และเริ่มพบการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง และพบว่าน้ำมันเบนซินถูกย่อยสลายจนในวันสุดท้ายของการทดลองยังคงสามารถตรวจพบฟิเคได้จำนวน 1 ฟิเคที่ค่าความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ในสภาวะที่มีออกซิเจน และในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนสามารถตรวจพบฟิเคทั้งหมด 2 ฟิเคที่ค่าความยาวคลื่น 250 และ 255 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 29-30

ตารางที่ 29 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

ตารางที่ 30 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

#### 1.6.4 การศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่าทั้งในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนสามารถตรวจพบก๊าซที่เกิดขึ้นได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง โดยเพิ่มขึ้นและลดลงเล็กน้อยตลอดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 31

ตารางที่ 31 ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น (มิลลิลิตร) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สถานะที่มีออกซิเจน			สถานะที่ไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
3	3±1	2±1	2±0	2±1	2±0	2±0
7	4±3	2±1	2±0	2±2	2±0	0±0
10	3±2	2±0	1±1	3±1	2±1	0±0
14	2±2	2±1	1±0	2±2	2±0	0±0
21	1±0	0±0	0±0	2±1	1±0	0±0
28	2±1	0±0	0±0	2±0	0±0	0±0
35	1±1	0±0	0±0	1±0	0±0	0±0

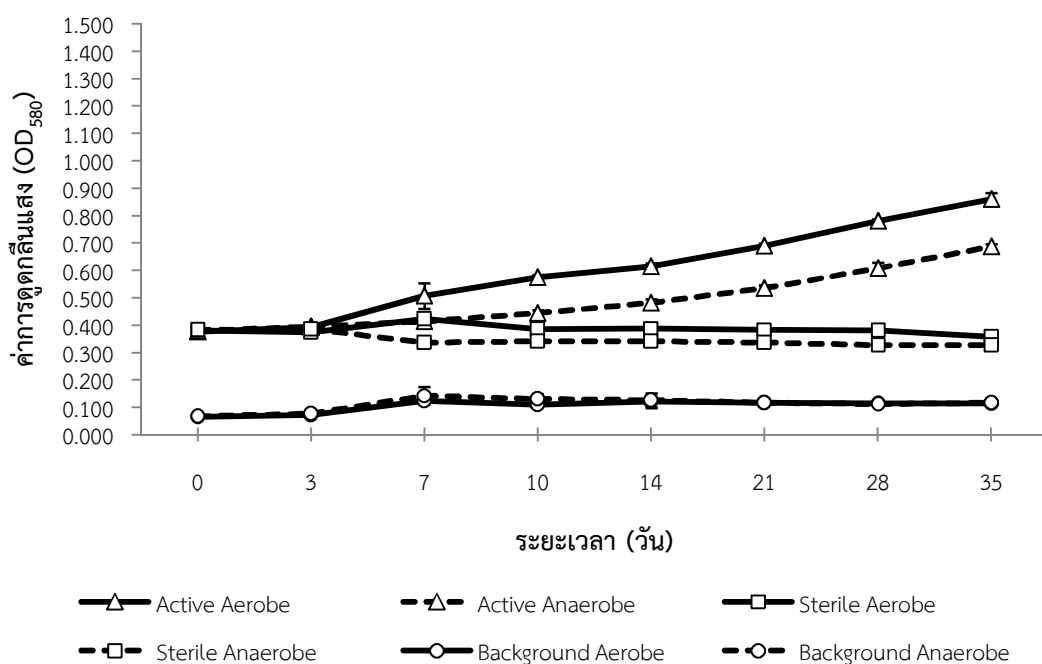
#### 1.7 การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

##### 1.7.1 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 มีการเจริญโดยใช้น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงวันที่ 0-3 ของการทดลอง และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 7 ไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองในทั้ง 2 สภาวะ โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังแสดงในตารางที่ 32 และภาพที่ 22

ตารางที่ 32 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ( $OD_{580}$ ) ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{580}$ ) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สภาวะมีออกซิเจน			สภาวะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0.337±0.006	0.380±0.006	0.066±0.004	0.379±0.005	0.383±0.014	0.068±0.001
3	0.393±0.004	0.374±0.004	0.072±0.002	0.395±0.005	0.386±0.014	0.078±0.004
7	0.507±0.047	0.423±0.019	0.125±0.011	0.413±0.009	0.337±0.021	0.144±0.032
10	0.575±0.008	0.385±0.011	0.111±0.004	0.445±0.011	0.341±0.016	0.131±0.018
14	0.615±0.010	0.397±0.004	0.122±0.003	0.481±0.014	0.341±0.009	0.126±0.026
21	0.690±0.009	0.384±0.011	0.117±0.003	0.534±0.011	0.335±0.016	0.117±0.006
28	0.779±0.008	0.381±0.014	0.114±0.002	0.607±0.023	0.328±0.010	0.113±0.006
35	0.859±0.024	0.356±0.005	0.115±0.001	0.686±0.010	0.327±0.018	0.117±0.002



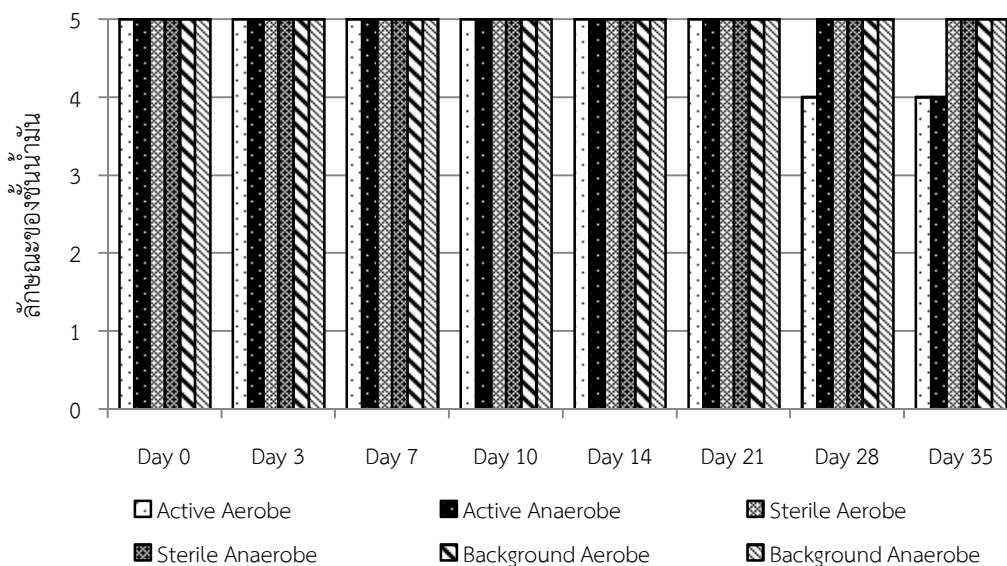
ภาพที่ 22 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

### 1.7.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ผลการทดลองพบว่าลักษณะของชั้นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วลดลงเรื่อย ๆ โดยในสถานะที่มีออกซิเจนพบการลดลงตั้งแต่วันที่ 21 ของการทดลอง และในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนพบการลดลงตั้งแต่วันที่ 28 ของการทดลองไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง โดยในวันสุดท้ายของการทดลองทั้ง 2 สถานะ พบลักษณะของชั้นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในตารางที่ 33 และภาพที่ 23

ตารางที่ 33 ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยสลายด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว					
	สถานะมีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	5+	5+	5+	5+	5+	5+
3	5+	5+	5+	5+	5+	5+
7	5+	5+	5+	5+	5+	5+
10	5+	5+	5+	5+	5+	5+
14	5+	5+	5+	5+	5+	5+
21	4+	5+	5+	5+	5+	5+
28	4+	5+	5+	4+	5+	5+
35	4+	5+	5+	4+	5+	5+



**ภาพที่ 23** การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

**หมายเหตุ** 5+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันไม่รวมตัวกับน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 4+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 3+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 2+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงคราบน้ำมันจาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม  
 0 หมายถึง ไม่พบน้ำมัน

### 1.7.3 ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนพบการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วมากกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และเริ่มพบการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลองไปเรื่อย ๆ จนวันสุดท้ายของการทดลองสามารถตรวจพบฟีดจำนวน 5 ฟีด ที่ค่าความยาวคลื่น 234, 238, 258, 263 และ 273 นาโนเมตร ในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนสามารถตรวจพบฟีดจำนวน 8 ฟีด ที่ค่าความยาวคลื่น 222, 224, 245, 247, 250, 256, 260 และ 262 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 34-35



ตารางที่ 34 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

ตารางที่ 35 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

#### 1.7.4 การศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่าทั้งในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนสามารถตรวจพบก๊าซที่เกิดขึ้นเพิ่มขึ้นและลดลงเล็กน้อยตลอดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 36

ตารางที่ 36 ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น (มิลลิลิตร) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สถานะที่มีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
3	1±0	1±0	1±1	1±0	0±0	0±0
7	4±4	0±0	0±0	3±2	0±0	0±0
10	3±1	1±0	0±0	2±1	1±0	0±0
14	2±2	2±0	0±0	2±2	0±0	0±0
21	1±1	0±0	0±0	1±0	0±0	0±0
28	1±0	0±0	0±0	1±0	0±0	0±0
35	1±0	0±0	0±0	1±0	0±0	0±0

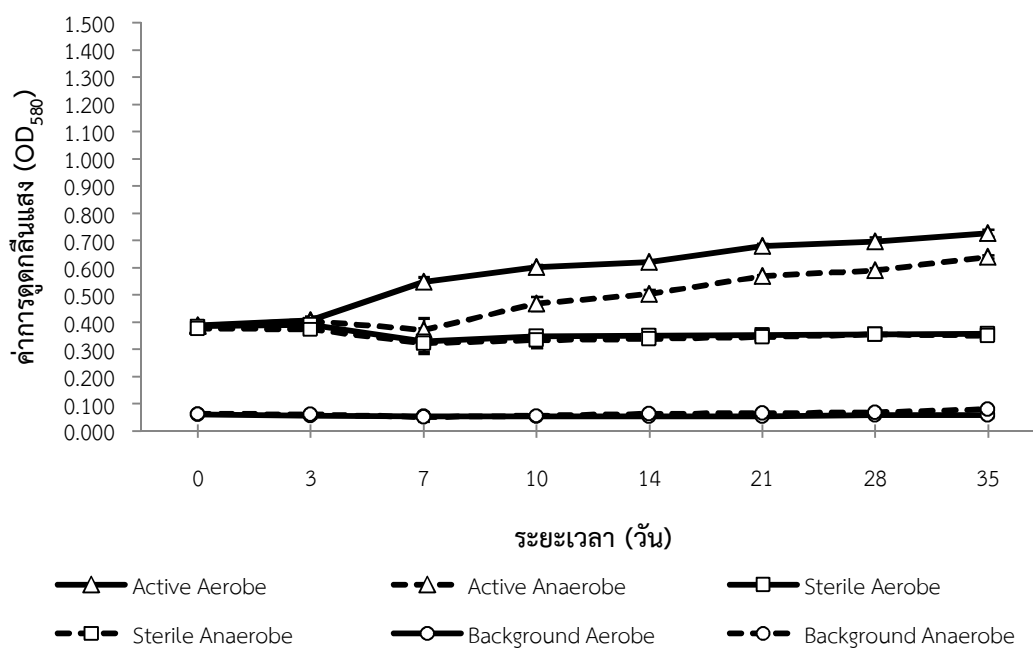
#### 1.8 การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

##### 1.8.1 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 มีการเจริญโดยใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลองจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ในสถานะที่มีออกซิเจน แต่ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนพบการเจริญของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ลดลงในวันที่ 7 ของการทดลอง และเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 10 ไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 สามารถเจริญในสถานะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสถานะที่ไม่มีออกซิเจน ดังแสดงในตารางที่ 37 และภาพที่ 24

ตารางที่ 37 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ( $OD_{580}$ ) ในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{580}$ ) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สภาวะมีออกซิเจน			สภาวะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0.387±0.009	0.387±0.018	0.061±0.002	0.386±0.012	0.377±0.004	0.065±0.003
3	0.407±0.013	0.390±0.007	0.057±0.010	0.405±0.017	0.375±0.003	0.062±0.002
7	0.547±0.018	0.329±0.050	0.054±0.002	0.372±0.043	0.322±0.037	0.053±0.018
10	0.601±0.011	0.349±0.023	0.056±0.006	0.469±0.025	0.335±0.028	0.058±0.006
14	0.622±0.003	0.351±0.017	0.054±0.001	0.504±0.016	0.338±0.012	0.063±0.003
21	0.679±0.009	0.352±0.012	0.050±0.004	0.507±0.004	0.345±0.011	0.067±0.004
28	0.696±0.016	0.355±0.012	0.059±0.005	0.590±0.011	0.355±0.011	0.069±0.009
35	0.727±0.013	0.357±0.006	0.060±0.009	0.640±0.006	0.350±0.002	0.080±0.004



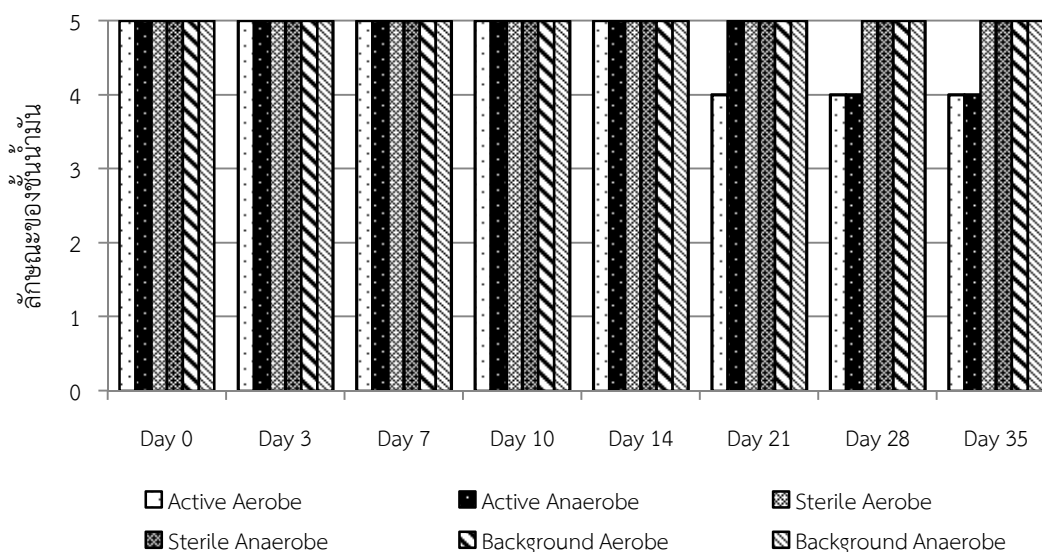
ภาพที่ 24 ปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนในแต่ละชุดการทดลองในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

### 1.8.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดิบในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดิบที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ผลการทดลองพบว่าลักษณะของชั้นน้ำมันดิบลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 21 ของการทดลองในสภาวะที่มีออกซิเจน และตั้งแต่วันที่ 28 ของการทดลองในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังแสดงในตารางที่ 38 และภาพที่ 25

**ตารางที่ 38** ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดิบในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดิบ					
	สภาวะมีออกซิเจน			สภาวะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	5+	5+	5+	5+	5+	5+
3	5+	5+	5+	5+	5+	5+
7	5+	5+	5+	5+	5+	5+
10	5+	5+	5+	5+	5+	5+
14	5+	5+	5+	5+	5+	5+
21	4+	5+	5+	5+	5+	5+
28	4+	5+	5+	4+	5+	5+
35	4+	5+	5+	4+	5+	5+



**ภาพที่ 25** การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันดิบในการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

**หมายเหตุ** 5+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันไม่รวมตัวกับน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 4+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน  
 3+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 2+ หมายถึง ลักษณะของชั้นน้ำมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร  
 1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงครบน้ำมันจาง ๆ บริเวณขอบขวดซีรัม  
 0 หมายถึง ไม่พบน้ำมัน

### 1.8.3 ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใกล้เคียงกัน โดยเริ่มพบการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้ทั้ง 2 สภาวะ ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง และพบการย่อยสลายเล็กน้อยไปเรื่อย ๆ จนวันสุดท้ายของการทดลอง โดยยังคงสามารถตรวจพบฟิเคจำนวนมากอยู่ในทั้ง 2 สภาวะ ดังแสดงในตารางที่ 39-40

ตารางที่ 39 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสภาวะที่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

ตารางที่ 40 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน

Day	ชุด Active	ชุด Sterile	ชุด Background
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			



#### 1.8.4 การศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่าทั้งในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนมีปริมาณก๊าซทั้งหมดเพิ่มขึ้นและลดลงเล็กน้อยตลอดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 41

ตารางที่ 41 ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น (มิลลิลิตร) ( $\bar{X} \pm SD$ )					
	สถานะมีออกซิเจน			สถานะไม่มีออกซิเจน		
	Active	Sterile	Background	Active	Sterile	Background
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
3	1±0	0±0	0±0	1±1	0±0	0±0
7	4±2	0±0	0±0	2±2	0±0	0±0
10	3±1	1±0	0±0	2±1	1±1	0±0
14	2±1	0±0	0±0	2±0	1±0	0±0
21	1±1	0±0	0±0	1±0	0±0	0±0
28	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
35	1±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

## 2. การศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียเพื่อการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่าง ๆ ในดินที่มีการปนเปื้อนด้วยสารปิโตรเลียม

จากการศึกษาการย่อยสลายน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว ในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 เพื่อการฟื้นฟูสภาพแวดล้อม ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

### 2.1 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน

จากการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างในวันที่ 0-35 ของการทดลอง พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างในชุดควบคุมค่อนข้างคงที่ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง  $5.61 \pm 0.06$  -  $5.67 \pm 0.03$  โดยในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซลพบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.42 \pm 0.04$  -  $5.77 \pm 0.05$  ซึ่งในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.42 \pm 0.04$  -  $5.62 \pm 0.01$  และในชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.55 \pm 0.03$  -  $5.77 \pm 0.05$  ดังแสดงในตารางที่ 42

ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซินพบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.54 \pm 0.03$  -  $5.96 \pm 0.02$  ซึ่งในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.54 \pm 0.03$  -  $5.87 \pm 0.02$  และในชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.80 \pm 0.02$  -  $5.96 \pm 0.02$  ดังแสดงในตารางที่ 43

จากการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างในวันที่ 0-35 ของการทดลอง พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างในชุดควบคุมค่อนข้างคงที่ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง  $5.53 \pm 0.01$  -  $5.58 \pm 0.01$  โดยในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบพบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.34 \pm 0.04$  -  $6.09 \pm 0.04$  ซึ่งในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.37 \pm 0.05$  -  $5.67 \pm 0.02$  และในชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.34 \pm 0.04$  -  $6.09 \pm 0.04$  ดังแสดงในตารางที่ 44

ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วพบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.37 \pm 0.03$  -  $6.05 \pm 0.04$  ซึ่งในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.37 \pm 0.04$  -  $5.63 \pm 0.01$  และในชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง  $5.37 \pm 0.03$  -  $6.05 \pm 0.04$  ดังแสดงในตารางที่ 45 ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองของแต่ละชนิดน้ำมันจะมีค่าแตกต่างกันไม่มากนักตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง 35 วัน

ตารางที่ 42 ค่าความเป็นกรด-ด่างของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	5.67±0.02 <sup>a,1</sup>	5.56±0.03 <sup>ab,2</sup>	5.55±0.04 <sup>a,2</sup>	5.59±0.02 <sup>a,2</sup>	5.60±0.02 <sup>c,2</sup>	5.67±0.06 <sup>b,1</sup>	5.71±0.02 <sup>b,1</sup>
วันที่ 3	5.66±0.04 <sup>a,2</sup>	5.57±0.01 <sup>ab,3</sup>	5.60±0.01 <sup>a,3</sup>	5.58±0.04 <sup>a,3</sup>	5.60±0.02 <sup>c,3</sup>	5.70±0.02 <sup>ab,1</sup>	5.71±0.02 <sup>b,1</sup>
วันที่ 7	5.67±0.03 <sup>a,2</sup>	5.55±0.01 <sup>ab,3</sup>	5.59±0.02 <sup>a,3</sup>	5.55±0.02 <sup>ab,3</sup>	5.63±0.02 <sup>bc,2</sup>	5.71±0.02 <sup>ab,1</sup>	5.70±0.03 <sup>b,1</sup>
วันที่ 10	5.61±0.06 <sup>a,2</sup>	5.52±0.04 <sup>b,34</sup>	5.56±0.02 <sup>a,3</sup>	5.46±0.02 <sup>b,4</sup>	5.66±0.03 <sup>b,2</sup>	5.75±0.08 <sup>a,1</sup>	5.58±0.03 <sup>c,3</sup>
วันที่ 14	5.65±0.03 <sup>a,2</sup>	5.54±0.02 <sup>ab,3</sup>	5.55±0.03 <sup>a,3</sup>	5.42±0.04 <sup>b,4</sup>	5.64±0.03 <sup>bc,2</sup>	5.77±0.01 <sup>a,1</sup>	5.55±0.03 <sup>c,3</sup>
วันที่ 21	5.62±0.02 <sup>a,2</sup>	5.59±0.02 <sup>a,23</sup>	5.55±0.07 <sup>a,3</sup>	5.59±0.02 <sup>a,23</sup>	5.77±0.05 <sup>a,1</sup>	5.72±0.01 <sup>ab,1</sup>	5.77±0.04 <sup>a,1</sup>
วันที่ 28	5.66±0.01 <sup>a,2</sup>	5.60±0.02 <sup>a,3</sup>	5.57±0.02 <sup>a,34</sup>	5.54±0.02 <sup>ab,4</sup>	5.75±0.05 <sup>a,1</sup>	5.77±0.02 <sup>a,1</sup>	5.75±0.04 <sup>ab,1</sup>
วันที่ 35	5.64±0.01 <sup>a,2</sup>	5.62±0.01 <sup>a,2</sup>	5.58±0.02 <sup>a,3</sup>	5.57±0.03 <sup>a,3</sup>	5.76±0.02 <sup>a,1</sup>	5.75±0.01 <sup>a,1</sup>	5.76±0.01 <sup>a,1</sup>

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมดินอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมดิน + น้ำมันดีเซล 0.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมดิน + น้ำมันดีเซล 1.0% w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมดิน + น้ำมันดีเซล 1.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมดิน + น้ำมันดีเซล 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมดิน + น้ำมันดีเซล 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมดิน + น้ำมันดีเซล 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตารางที่ 43 ค่าความเป็นกรด-ด่างของการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	5.67±0.02 <sup>a,4</sup>	5.55±0.02 <sup>a,5</sup>	5.63±0.02 <sup>ab,4</sup>	5.73±0.03 <sup>ab,3</sup>	5.81±0.02 <sup>a,2</sup>	5.83±0.03 <sup>a,1</sup>	5.90±0.03 <sup>ab,1</sup>
วันที่ 3	5.66±0.04 <sup>a,2</sup>	5.54±0.03 <sup>a,5</sup>	5.61±0.02 <sup>ab,4</sup>	5.72±0.01 <sup>ab,3</sup>	5.81±0.03 <sup>a,2</sup>	5.86±0.02 <sup>a,1</sup>	5.88±0.03 <sup>ab,1</sup>
วันที่ 7	5.67±0.03 <sup>a,4</sup>	5.55±0.03 <sup>a,5</sup>	5.60±0.04 <sup>ab,4</sup>	5.76±0.04 <sup>ab,3</sup>	5.80±0.02 <sup>a,2</sup>	5.85±0.02 <sup>a,1</sup>	5.89±0.02 <sup>ab,1</sup>
วันที่ 10	5.61±0.06 <sup>a,2</sup>	5.55±0.11 <sup>a,3</sup>	5.67±0.03 <sup>a,2</sup>	5.87±0.02 <sup>a,1</sup>	5.84±0.04 <sup>a,1</sup>	5.91±0.07 <sup>a,1</sup>	5.94±0.02 <sup>a,1</sup>
วันที่ 14	5.65±0.03 <sup>a,2</sup>	5.57±0.03 <sup>a,5</sup>	5.64±0.01 <sup>ab,4</sup>	5.83±0.03 <sup>a,3</sup>	5.82±0.04 <sup>a,3</sup>	5.92±0.14 <sup>a,2</sup>	5.96±0.02 <sup>a,1</sup>
วันที่ 21	5.62±0.02 <sup>a,2</sup>	5.58±0.05 <sup>a,4</sup>	5.62±0.01 <sup>ab,3</sup>	5.75±0.02 <sup>ab,2</sup>	5.84±0.05 <sup>a,1</sup>	5.85±0.04 <sup>a,1</sup>	5.85±0.04 <sup>b,1</sup>
วันที่ 28	5.66±0.01 <sup>a,2</sup>	5.54±0.08 <sup>a,4</sup>	5.60±0.02 <sup>ab,3</sup>	5.73±0.01 <sup>ab,2</sup>	5.82±0.03 <sup>a,1</sup>	5.85±0.02 <sup>a,1</sup>	5.86±0.03 <sup>b,1</sup>
วันที่ 35	5.64±0.01 <sup>a,2</sup>	5.58±0.04 <sup>a,4</sup>	5.59±0.02 <sup>b,4</sup>	5.71±0.02 <sup>b,2</sup>	5.81±0.02 <sup>a,1</sup>	5.84±0.04 <sup>a,1</sup>	5.84±0.03 <sup>b,1</sup>

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมดินอย่างเดียว  
 ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมดิน + น้ำมันเบนซิน 0.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.0% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมดิน + น้ำมันเบนซิน 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL  
 ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$   
 ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตารางที่ 44 ค่าความเป็นกรด-ด่างของการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	5.58±0.01 <sup>a,1</sup>	5.37±0.05 <sup>b,2</sup>	5.42±0.05 <sup>b,12</sup>	5.39±0.02 <sup>b,2</sup>	5.45±0.03 <sup>b,12</sup>	5.40±0.02 <sup>b,12</sup>	5.34±0.04 <sup>b,2</sup>
วันที่ 3	5.56±0.09 <sup>a,1</sup>	5.57±0.02 <sup>a,1</sup>	5.59±0.03 <sup>a,1</sup>	5.60±0.03 <sup>a,1</sup>	5.54±0.02 <sup>b,1</sup>	5.56±0.03 <sup>b,1</sup>	5.60±0.02 <sup>b,1</sup>
วันที่ 7	5.53±0.01 <sup>a,2</sup>	5.54±0.04 <sup>a,2</sup>	5.60±0.04 <sup>a,12</sup>	5.60±0.04 <sup>a,12</sup>	5.62±0.03 <sup>b,12</sup>	5.64±0.04 <sup>b,1</sup>	5.67±0.02 <sup>b,1</sup>
วันที่ 10	5.55±0.03 <sup>a,2</sup>	5.62±0.04 <sup>a,12</sup>	5.58±0.02 <sup>a,2</sup>	5.66±0.02 <sup>a,12</sup>	6.09±0.04 <sup>a,1</sup>	6.07±0.02 <sup>a,1</sup>	6.05±0.02 <sup>a,1</sup>
วันที่ 14	5.53±0.07 <sup>a,2</sup>	5.57±0.01 <sup>a,2</sup>	5.67±0.02 <sup>a,12</sup>	5.59±0.02 <sup>a,2</sup>	5.99±0.04 <sup>a,12</sup>	6.00±0.02 <sup>a,1</sup>	6.00±0.05 <sup>a,1</sup>
วันที่ 21	5.55±0.01 <sup>a,2</sup>	5.58±0.01 <sup>a,2</sup>	5.66±0.02 <sup>a,12</sup>	5.63±0.03 <sup>a,12</sup>	6.00±0.02 <sup>a,1</sup>	6.02±0.02 <sup>a,1</sup>	6.03±0.01 <sup>a,1</sup>
วันที่ 28	5.56±0.01 <sup>a,2</sup>	5.59±0.01 <sup>a,2</sup>	5.65±0.02 <sup>a,12</sup>	5.64±0.03 <sup>a,12</sup>	6.02±0.02 <sup>a,1</sup>	6.03±0.02 <sup>a,1</sup>	6.03±0.01 <sup>a,1</sup>
วันที่ 35	5.55±0.03 <sup>a,2</sup>	5.60±0.02 <sup>a,2</sup>	5.63±0.02 <sup>a,12</sup>	5.64±0.02 <sup>a,12</sup>	6.02±0.03 <sup>a,1</sup>	6.03±0.01 <sup>a,1</sup>	6.02±0.02 <sup>a,1</sup>

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมดินอย่างเดียว  
 ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมดิน + น้ำมันดิบ 0.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมดิน + น้ำมันดิบ 1.0% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมดิน + น้ำมันดิบ 1.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมดิน + น้ำมันดิบ 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมดิน + น้ำมันดิบ 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมดิน + น้ำมันดิบ 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL  
 ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$   
 ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตารางที่ 45 ค่าความเป็นกรด-ด่างของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	5.58±0.01 <sup>a,1</sup>	5.38±0.01 <sup>b,2</sup>	5.37±0.04 <sup>b,2</sup>	5.43±0.03 <sup>b,12</sup>	5.42±0.01 <sup>b,12</sup>	5.37±0.03 <sup>b,2</sup>	5.46±0.01 <sup>b,12</sup>
วันที่ 3	5.56±0.09 <sup>a,1</sup>	5.55±0.03 <sup>a,1</sup>	5.57±0.04 <sup>a,1</sup>	5.57±0.03 <sup>a,1</sup>	5.54±0.02 <sup>b,1</sup>	5.55±0.04 <sup>b,1</sup>	5.54±0.03 <sup>b,1</sup>
วันที่ 7	5.53±0.01 <sup>a,12</sup>	5.46±0.04 <sup>a,2</sup>	5.59±0.06 <sup>a,12</sup>	5.54±0.02 <sup>a,12</sup>	5.59±0.02 <sup>b,12</sup>	5.65±0.03 <sup>b,1</sup>	5.63±0.01 <sup>b,1</sup>
วันที่ 10	5.55±0.03 <sup>a,2</sup>	5.55±0.04 <sup>a,2</sup>	5.57±0.03 <sup>a,2</sup>	5.54±0.04 <sup>a,2</sup>	6.02±0.05 <sup>a,1</sup>	6.03±0.03 <sup>a,1</sup>	6.05±0.04 <sup>a,1</sup>
วันที่ 14	5.53±0.07 <sup>a,2</sup>	5.58±0.01 <sup>a,2</sup>	5.59±0.02 <sup>a,2</sup>	5.61±0.02 <sup>a,2</sup>	5.95±0.02 <sup>a,1</sup>	5.98±0.03 <sup>a,1</sup>	6.04±0.01 <sup>a,1</sup>
วันที่ 21	5.55±0.01 <sup>a,2</sup>	5.59±0.01 <sup>a,12</sup>	5.60±0.03 <sup>a,12</sup>	5.62±0.02 <sup>a,12</sup>	6.00±0.01 <sup>a,1</sup>	6.01±0.01 <sup>a,1</sup>	6.05±0.02 <sup>a,1</sup>
วันที่ 28	5.56±0.01 <sup>a,2</sup>	5.60±0.01 <sup>a,12</sup>	5.61±0.02 <sup>a,12</sup>	5.62±0.02 <sup>a,12</sup>	6.01±0.01 <sup>a,1</sup>	6.02±0.02 <sup>a,1</sup>	6.05±0.02 <sup>a,1</sup>
วันที่ 35	5.55±0.03 <sup>a,2</sup>	5.60±0.01 <sup>a,12</sup>	5.61±0.01 <sup>a,12</sup>	5.63±0.01 <sup>a,12</sup>	6.01±0.02 <sup>a,1</sup>	6.03±0.01 <sup>a,1</sup>	6.04±0.02 <sup>a,1</sup>

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมดินอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0% w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตารางที่ 46 ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำมัน 4 ชนิด

น้ำมัน	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	
	กระดาษวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง	เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง
น้ำมันดีเซลเข้มข้น 100%	5	เครื่องไม่สามารถอ่านค่าได้
น้ำมันเบนซินเข้มข้น 100%	4	เครื่องไม่สามารถอ่านค่าได้
น้ำมันดิบเข้มข้น 100%	5	เครื่องไม่สามารถอ่านค่าได้
น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วเข้มข้น 100%	5	เครื่องไม่สามารถอ่านค่าได้

หมายเหตุ: น้ำมันไม่สามารถเจือจางได้เนื่องจากไม่ผสมกับน้ำ

ตารางที่ 47 ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ใช้ละลายดิน

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	
	กระดาษวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง	เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง
วันที่ 0	7	7.01±0.02
วันที่ 3	7	7.00±0.04
วันที่ 7	7	7.01±0.03
วันที่ 10	7	7.08±0.08
วันที่ 14	7	7.04±0.06
วันที่ 21	7	7.01±0.02
วันที่ 28	7	7.01±0.03
วันที่ 35	7	7.03±0.02

## 2.2 การสังเกตการเปลี่ยนแปลงความชื้นสีของดินด้วยตาเปล่า

จากการศึกษาค่าความชื้นสีของดินตลอดระยะเวลาทำการทดลอง (วันที่ 0-35) พบว่าในชุดควบคุมมีความชื้นสีของดินต่ำสุด (+) ส่วนการทดลองที่เติมน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วพบว่าชุดการทดลอง T3 และ T6 มีความชื้นสีสูงสุด (+++) รองลงมาคือ ชุดการทดลอง T2 และ T5 มีความชื้นสีปานกลาง (++) และชุดการทดลอง T1 และ T4 มีความชื้นสีต่ำสุด (+) และในทุกชุดการทดลองพบว่ามีกลิ่นของน้ำมันแต่ละชนิด อีกทั้งยังพบว่าการเติมน้ำมัน (น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว) และการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของดินตลอดระยะเวลาทำการทดลองตั้งแต่วันที่ 0-35 ดังแสดงในตารางที่ 48-51



ตารางที่ 48 ค่าความชื้นสีของดินในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความชื้นของดิน						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 3	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 7	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 10	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 14	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 21	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 28	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 35	+	+	++	+++	+	++	+++

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมนดินอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 0.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 1.0% w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 1.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

+ คือ ความชื้นสีต่ำสุด, ++ คือ ความชื้นสีปานกลาง, +++ คือ ความชื้นสีมากที่สุด

ตารางที่ 49 ค่าความเข้มข้นของดินในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเข้มข้นของดิน						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 3	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 7	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 10	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 14	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 21	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 28	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 35	+	+	++	+++	+	++	+++

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 0.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.0% w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

+ คือ ความเข้มข้นต่ำสุด, ++ คือ ความเข้มข้นปานกลาง, +++ คือ ความเข้มข้นมากที่สุด

ตารางที่ 50 ค่าความเข้มข้นของดินในการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเข้มข้นของดิน						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 3	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 7	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 10	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 14	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 21	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 28	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 35	+	+	++	+++	+	++	+++

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 0.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.0% w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

+ คือ ความเข้มข้นต่ำสุด, ++ คือ ความเข้มข้นปานกลาง, +++ คือ ความเข้มข้นมากที่สุด

ตารางที่ 51 ค่าความชื้นของดินในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความชื้นของดิน						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 3	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 7	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 10	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 14	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 21	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 28	+	+	++	+++	+	++	+++
วันที่ 35	+	+	++	+++	+	++	+++

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมนดินอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0% w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

+ คือ ความชื้นต่ำสุด, ++ คือ ความชื้นปานกลาง, +++ คือ ความชื้นมากที่สุด

### 2.3 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล พบว่าชุดควบคุมในวันที่ 0-35 ของการทดลองมีค่าเท่ากับ  $1.41 \pm 0.20 \times 10^5$  -  $6.50 \pm 1.73 \times 10^5$  CFU/g โดยในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซลและไม่เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) พบว่าในชุดการทดลอง T1 และ T2 ของวันที่ 0 ของการทดลอง มีปริมาณเท่ากับ  $1.43 \pm 0.69 \times 10^5$  และ  $3.35 \pm 0.64 \times 10^5$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้น (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 3-35 ของการทดลองซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $1.45 \pm 0.24 \times 10^6$  -  $2.93 \pm 0.17 \times 10^6$  CFU/mL และ  $1.43 \pm 0.32 \times 10^6$  -  $3.60 \pm 0.20 \times 10^6$  CFU/g ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลอง T3 พบว่ามีปริมาณค่อนข้างคงที่ในช่วง  $1.93 \pm 0.96 \times 10^5$  -  $5.60 \pm 1.14 \times 10^5$  CFU/g ตั้งแต่วันที่ 0-35 ของการทดลอง

เช่นเดียวกันกับชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซลและเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) พบว่าในชุดการทดลอง T4 และ T5 ของวันที่ 0 ของการทดลอง มีปริมาณเท่ากับ  $1.42 \pm 0.16 \times 10^5$  และ  $1.78 \pm 0.50 \times 10^5$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้น (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 3-7 ของการทดลอง ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $3.33 \pm 0.52 \times 10^6$  -  $7.25 \pm 1.26 \times 10^6$  CFU/g และ  $1.00 \pm 0.14 \times 10^6$  -  $8.18 \pm 0.89 \times 10^6$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอีกครั้ง (ประมาณ 100 เท่า) ในวันที่ 10-35 ของการทดลอง ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $1.20 \pm 0.22 \times 10^7$  -  $1.95 \pm 0.17 \times 10^7$  CFU/g และ  $1.45 \pm 0.21 \times 10^7$  -  $2.28 \pm 0.22 \times 10^7$  CFU/g ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ส่วนในชุดการทดลอง T6 พบว่ามีปริมาณค่อนข้างคงที่ในช่วง  $3.06 \pm 0.73 \times 10^5$  -  $6.00 \pm 2.45 \times 10^5$  CFU/g ตั้งแต่วันที่ 0 - 7 ของการทดลอง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 10-35 ของการทดลอง มีปริมาณอยู่ในช่วง  $1.85 \pm 0.31 \times 10^6$  -  $2.45 \pm 0.37 \times 10^6$  CFU/g ดังแสดงในตารางที่ 52

ตารางที่ 52 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัสในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลาทำการทดลอง	หัวเชื้อที่เตรียม	เชื้อเริ่มต้นที่ใส่ในชุดทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัส (CFU/g)						
			ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	$1.15 \pm 0.01 \times 10^9$	$1.92 \times 10^8$	$2.98 \pm 0.54 \times 10^{5 \text{ b},1}$	$1.43 \pm 0.69 \times 10^{5 \text{ c},1}$	$3.35 \pm 0.64 \times 10^{5 \text{ c},1}$	$2.53 \pm 0.44 \times 10^{5 \text{ a},1}$	$1.42 \pm 0.16 \times 10^{5 \text{ c},1}$	$1.78 \pm 0.50 \times 10^{5 \text{ c},1}$	$3.06 \pm 0.73 \times 10^{5 \text{ c},1}$
วันที่ 3			$6.50 \pm 1.73 \times 10^{5 \text{ a},3}$	$2.73 \pm 0.58 \times 10^{6 \text{ ab},2}$	$1.43 \pm 0.32 \times 10^{6 \text{ b},2}$	$5.60 \pm 1.14 \times 10^{5 \text{ a},3}$	$7.25 \pm 1.26 \times 10^{6 \text{ b},1}$	$1.00 \pm 0.14 \times 10^{6 \text{ b},2}$	$3.75 \pm 1.26 \times 10^{5 \text{ bc},3}$
วันที่ 7			$2.35 \pm 1.36 \times 10^{5 \text{ b},4}$	$1.80 \pm 0.34 \times 10^{6 \text{ ab},3}$	$3.60 \pm 0.20 \times 10^{6 \text{ a},2}$	$3.13 \pm 1.39 \times 10^{5 \text{ a},4}$	$3.33 \pm 0.52 \times 10^{6 \text{ b},2}$	$8.18 \pm 0.89 \times 10^{6 \text{ b},1}$	$6.00 \pm 2.45 \times 10^{5 \text{ b},4}$
วันที่ 10			$2.03 \pm 0.15 \times 10^{5 \text{ b},3}$	$2.93 \pm 0.17 \times 10^{6 \text{ a},2}$	$3.20 \pm 0.26 \times 10^{6 \text{ a},2}$	$4.00 \pm 0.18 \times 10^{5 \text{ a},3}$	$1.22 \pm 0.55 \times 10^{7 \text{ a},1}$	$1.45 \pm 0.21 \times 10^{7 \text{ a},1}$	$2.45 \pm 0.37 \times 10^{6 \text{ a},2}$
วันที่ 14			$1.90 \pm 0.12 \times 10^{5 \text{ b},3}$	$2.34 \pm 0.70 \times 10^{6 \text{ a},2}$	$2.92 \pm 0.29 \times 10^{6 \text{ a},2}$	$4.18 \pm 1.30 \times 10^{5 \text{ a},3}$	$1.75 \pm 0.29 \times 10^{7 \text{ a},1}$	$2.28 \pm 0.22 \times 10^{7 \text{ a},1}$	$2.00 \pm 0.82 \times 10^{6 \text{ a},2}$
วันที่ 21			$1.68 \pm 0.08 \times 10^{5 \text{ b},3}$	$1.78 \pm 0.33 \times 10^{6 \text{ ab},2}$	$2.70 \pm 0.18 \times 10^{6 \text{ ab},2}$	$2.25 \pm 0.96 \times 10^{5 \text{ a},4}$	$1.95 \pm 0.17 \times 10^{7 \text{ a},1}$	$2.15 \pm 0.13 \times 10^{7 \text{ a},1}$	$1.96 \pm 0.33 \times 10^{6 \text{ a},2}$
วันที่ 28			$1.48 \pm 0.25 \times 10^{5 \text{ b},3}$	$1.55 \pm 0.13 \times 10^{6 \text{ ab},2}$	$2.22 \pm 0.17 \times 10^{6 \text{ ab},2}$	$2.07 \pm 0.31 \times 10^{5 \text{ a},3}$	$1.23 \pm 0.68 \times 10^{7 \text{ a},1}$	$1.85 \pm 0.13 \times 10^{7 \text{ a},1}$	$1.92 \pm 0.25 \times 10^{6 \text{ a},2}$
วันที่ 35			$1.41 \pm 0.20 \times 10^{5 \text{ b},3}$	$1.45 \pm 0.24 \times 10^{6 \text{ b},2}$	$2.18 \pm 0.84 \times 10^{6 \text{ ab},2}$	$1.93 \pm 0.96 \times 10^{5 \text{ a},3}$	$1.20 \pm 0.22 \times 10^{7 \text{ a},1}$	$1.70 \pm 0.18 \times 10^{7 \text{ a},1}$	$1.85 \pm 0.31 \times 10^{6 \text{ a},2}$
% การเพิ่มขึ้น			-52.68%	913.99%	550.75%	-23.72%	8,350.70%	9,450.56%	504.58%

หมายเหตุ:

ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 0.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.0% w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซินและไม่เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) พบว่าในชุดการทดลอง T1 และ T2 ของวันที่ 0 ของการทดลอง มีปริมาณเท่ากับ  $2.10 \pm 0.64 \times 10^5$  และ  $1.54 \pm 0.43 \times 10^5$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้น (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 3-35 ของการทดลอง ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $1.80 \pm 0.29 \times 10^6$  -  $3.40 \pm 0.32 \times 10^6$  CFU/g และ  $2.50 \pm 0.58 \times 10^6$  -  $4.96 \pm 0.42 \times 10^6$  CFU/g ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลอง T3 พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง  $1.80 \pm 0.19 \times 10^5$  -  $9.00 \pm 0.82 \times 10^5$  CFU/g ตั้งแต่วันที่ 0 - 35 ของการทดลอง

ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซินและเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) พบว่าในชุดการทดลอง T4 และ T5 ของวันที่ 0 ของการทดลอง มีปริมาณเท่ากับ  $2.32 \pm 0.99 \times 10^5$  และ  $1.46 \pm 0.39 \times 10^5$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้น (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 3-7 ของการทดลอง ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $2.48 \pm 0.71 \times 10^6$  -  $6.00 \pm 3.16 \times 10^6$  CFU/g และ  $1.10 \pm 0.24 \times 10^6$  -  $6.50 \pm 1.21 \times 10^6$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอีกครั้ง (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 10-35 ของการทดลอง ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $1.38 \pm 0.17 \times 10^7$  -  $1.87 \pm 0.83 \times 10^7$  CFU/mL และ  $1.00 \pm 0.16 \times 10^7$  -  $1.13 \pm 0.17 \times 10^7$  CFU/g ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลอง T6 พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง  $1.12 \pm 0.39 \times 10^5$  -  $9.85 \pm 0.83 \times 10^5$  CFU/g ตั้งแต่วันที่ 0 - 35 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 53

ตารางที่ 53 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลาทำการทดลอง	หัวเชื้อที่เตรียม	เชื้อเริ่มต้นที่ใส่ในชุดทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)						
			ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	$1.15 \pm 0.01 \times 10^9$	$1.92 \times 10^8$	$2.98 \pm 0.54 \times 10^5$ <sup>b,1</sup>	$2.10 \pm 0.64 \times 10^5$ <sup>b,2</sup>	$1.54 \pm 0.43 \times 10^5$ <sup>c,3</sup>	$1.80 \pm 0.19 \times 10^5$ <sup>c,2</sup>	$2.32 \pm 0.99 \times 10^5$ <sup>c,2</sup>	$1.46 \pm 0.39 \times 10^5$ <sup>c,3</sup>	$1.12 \pm 0.39 \times 10^5$ <sup>c,3</sup>
วันที่ 3			$6.50 \pm 1.73 \times 10^5$ <sup>a,3</sup>	$2.83 \pm 1.60 \times 10^6$ <sup>a,2</sup>	$3.60 \pm 2.41 \times 10^6$ <sup>ab,2</sup>	$4.80 \pm 0.84 \times 10^5$ <sup>a,3</sup>	$6.00 \pm 3.16 \times 10^6$ <sup>b,1</sup>	$6.50 \pm 1.21 \times 10^6$ <sup>b,1</sup>	$4.25 \pm 1.89 \times 10^5$ <sup>b,3</sup>
วันที่ 7			$2.35 \pm 1.36 \times 10^5$ <sup>b,12</sup>	$2.25 \pm 1.04 \times 10^6$ <sup>a,2</sup>	$2.50 \pm 0.58 \times 10^6$ <sup>b,1</sup>	$4.00 \pm 1.83 \times 10^5$ <sup>b,3</sup>	$2.48 \pm 0.71 \times 10^6$ <sup>b,1</sup>	$1.10 \pm 0.24 \times 10^6$ <sup>b,2</sup>	$2.08 \pm 1.35 \times 10^5$ <sup>bc,3</sup>
วันที่ 10			$2.03 \pm 0.15 \times 10^5$ <sup>b,3</sup>	$3.40 \pm 0.32 \times 10^6$ <sup>a,2</sup>	$4.80 \pm 0.26 \times 10^6$ <sup>a,2</sup>	$5.18 \pm 0.36 \times 10^5$ <sup>b,3</sup>	$1.38 \pm 0.28 \times 10^7$ <sup>a,1</sup>	$1.03 \pm 0.22 \times 10^7$ <sup>a,1</sup>	$9.54 \pm 0.33 \times 10^5$ <sup>a,3</sup>
วันที่ 14			$1.90 \pm 0.12 \times 10^5$ <sup>b,4</sup>	$2.80 \pm 1.60 \times 10^6$ <sup>a,3</sup>	$4.96 \pm 0.42 \times 10^6$ <sup>a,2</sup>	$9.00 \pm 0.82 \times 10^5$ <sup>a,4</sup>	$1.83 \pm 0.21 \times 10^7$ <sup>a,1</sup>	$1.13 \pm 0.17 \times 10^7$ <sup>a,1</sup>	$9.85 \pm 0.83 \times 10^5$ <sup>a,3</sup>
วันที่ 21			$1.68 \pm 0.08 \times 10^5$ <sup>b,4</sup>	$2.38 \pm 0.22 \times 10^6$ <sup>a,2</sup>	$4.73 \pm 0.30 \times 10^6$ <sup>a,2</sup>	$8.75 \pm 0.63 \times 10^5$ <sup>a,3</sup>	$1.87 \pm 0.83 \times 10^7$ <sup>a,1</sup>	$1.00 \pm 0.16 \times 10^7$ <sup>a,1</sup>	$9.23 \pm 0.20 \times 10^5$ <sup>a,2</sup>
วันที่ 28			$1.48 \pm 0.25 \times 10^5$ <sup>b,4</sup>	$1.88 \pm 0.47 \times 10^6$ <sup>a,2</sup>	$3.33 \pm 0.85 \times 10^6$ <sup>ab,2</sup>	$4.75 \pm 0.93 \times 10^5$ <sup>ab,3</sup>	$1.40 \pm 0.12 \times 10^7$ <sup>a,1</sup>	$1.08 \pm 0.13 \times 10^7$ <sup>a,1</sup>	$8.66 \pm 0.21 \times 10^5$ <sup>a,3</sup>
วันที่ 35			$1.41 \pm 0.20 \times 10^5$ <sup>b,4</sup>	$1.80 \pm 0.29 \times 10^6$ <sup>a,2</sup>	$3.02 \pm 0.22 \times 10^6$ <sup>ab,2</sup>	$4.60 \pm 0.89 \times 10^5$ <sup>ab,3</sup>	$1.38 \pm 0.17 \times 10^7$ <sup>a,1</sup>	$1.06 \pm 0.11 \times 10^7$ <sup>a,1</sup>	$8.45 \pm 0.13 \times 10^5$ <sup>a,3</sup>
% การเพิ่มขึ้น					-52.68%	757.14%	1,861.04%	155.56%	5,848.28%

หมายเหตุ:

ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 0.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.0% w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$



จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดพบว่าในชุดควบคุมในวันที่ 0-35 ของการทดลองมีค่าเท่ากับ  $3.35 \pm 0.34 \times 10^5$  -  $3.78 \pm 0.19 \times 10^5$  CFU/g

ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบและไม่เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) พบว่าในชุดการทดลอง T1, T2 และ T3 ของวันที่ 0 ของการทดลอง มีปริมาณเท่ากับ  $2.28 \pm 0.19 \times 10^5$ ,  $2.55 \pm 0.12 \times 10^5$  และ  $2.43 \pm 0.33 \times 10^5$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้น (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 3-35 ของการทดลองซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $3.70 \pm 0.22 \times 10^6$  -  $5.10 \pm 0.14 \times 10^6$ ,  $3.22 \pm 0.28 \times 10^6$  -  $5.08 \pm 0.12 \times 10^6$  และ  $2.88 \pm 0.13 \times 10^6$  -  $4.94 \pm 0.15 \times 10^6$  CFU/g ตามลำดับ

ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบและเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) พบว่าในชุดการทดลอง T4, T5 และ T6 ของวันที่ 0 ของการทดลอง มีปริมาณเท่ากับ  $3.42 \pm 0.16 \times 10^5$ ,  $2.52 \pm 0.08 \times 10^5$  และ  $2.40 \pm 0.13 \times 10^5$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้น (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 3-10 ของการทดลอง ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $4.38 \pm 0.24 \times 10^6$  -  $5.20 \pm 0.14 \times 10^6$ ,  $3.95 \pm 0.10 \times 10^6$  -  $5.12 \pm 0.12 \times 10^6$  และ  $3.80 \pm 0.19 \times 10^6$  -  $5.07 \pm 0.21 \times 10^6$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอีกครั้ง (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 14-35 ของการทดลอง ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $1.30 \pm 0.13 \times 10^7$  -  $1.58 \pm 0.15 \times 10^7$ ,  $1.20 \pm 0.82 \times 10^7$  -  $1.45 \pm 0.12 \times 10^7$  และ  $9.98 \pm 0.47 \times 10^6$  -  $1.34 \pm 0.11 \times 10^7$  CFU/g ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 54

ตารางที่ 54 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัสในการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลาทำการทดลอง	หัวเชื้อที่เตรียม	เชื้อเริ่มต้นที่ใส่ในชุดทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัส (CFU/g)						
			ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	$1.21 \pm 0.03 \times 10^9$	$1.87 \times 10^8$	$3.70 \pm 0.18 \times 10^{5 a,1}$	$2.28 \pm 0.19 \times 10^{5 b,2}$	$2.55 \pm 0.12 \times 10^{5 b,2}$	$2.43 \pm 0.33 \times 10^{5 b,2}$	$3.42 \pm 0.16 \times 10^{5 c,1}$	$2.52 \pm 0.08 \times 10^{5 c,2}$	$2.40 \pm 0.13 \times 10^{5 c,2}$
วันที่ 3			$3.78 \pm 0.19 \times 10^{5 a,3}$	$3.70 \pm 0.22 \times 10^{6 a,1}$	$3.22 \pm 0.28 \times 10^{6 a,12}$	$2.88 \pm 0.13 \times 10^{6 a,2}$	$4.38 \pm 0.24 \times 10^{6 b,1}$	$3.95 \pm 0.10 \times 10^{6 b,1}$	$3.80 \pm 0.19 \times 10^{6 b,1}$
วันที่ 7			$3.35 \pm 0.34 \times 10^{5 a,3}$	$3.83 \pm 0.21 \times 10^{6 a,12}$	$3.42 \pm 0.33 \times 10^{6 a,12}$	$3.38 \pm 0.35 \times 10^{6 a,2}$	$4.53 \pm 0.16 \times 10^{6 b,1}$	$4.37 \pm 0.44 \times 10^{6 b,1}$	$4.20 \pm 0.18 \times 10^{6 b,1}$
วันที่ 10			$3.42 \pm 0.44 \times 10^{5 a,3}$	$3.92 \pm 0.12 \times 10^{6 a,12}$	$3.49 \pm 0.403 \times 10^{6 a,2}$	$3.44 \pm 0.28 \times 10^{6 a,2}$	$5.20 \pm 0.14 \times 10^{6 b,1}$	$5.12 \pm 0.12 \times 10^{6 b,1}$	$5.07 \pm 0.21 \times 10^{6 b,1}$
วันที่ 14			$3.48 \pm 0.21 \times 10^{5 a,3}$	$4.98 \pm 0.18 \times 10^{6 a,2}$	$4.81 \pm 0.16 \times 10^{6 a,2}$	$4.53 \pm 0.17 \times 10^{6 a,2}$	$1.30 \pm 0.13 \times 10^{7 a,1}$	$1.20 \pm 0.82 \times 10^{7 a,1}$	$9.98 \pm 0.47 \times 10^{6 a,1}$
วันที่ 21			$3.53 \pm 0.21 \times 10^{5 a,3}$	$5.03 \pm 0.19 \times 10^{6 a,2}$	$4.89 \pm 0.17 \times 10^{6 a,2}$	$4.91 \pm 0.16 \times 10^{6 a,2}$	$1.38 \pm 0.15 \times 10^{7 a,1}$	$1.23 \pm 0.14 \times 10^{7 a,1}$	$1.20 \pm 0.14 \times 10^{7 a,1}$
วันที่ 28			$3.67 \pm 0.14 \times 10^{5 a,3}$	$5.08 \pm 0.15 \times 10^{6 a,2}$	$4.99 \pm 0.10 \times 10^{6 a,2}$	$4.87 \pm 0.13 \times 10^{6 a,2}$	$1.55 \pm 0.21 \times 10^{7 a,1}$	$1.38 \pm 0.12 \times 10^{7 a,1}$	$1.34 \pm 0.11 \times 10^{7 a,1}$
วันที่ 35			$3.68 \pm 0.18 \times 10^{5 a,3}$	$5.10 \pm 0.14 \times 10^{6 a,2}$	$5.08 \pm 0.12 \times 10^{6 a,2}$	$4.94 \pm 0.15 \times 10^{6 a,2}$	$1.58 \pm 0.15 \times 10^{7 a,1}$	$1.45 \pm 0.13 \times 10^{7 a,1}$	$1.33 \pm 0.13 \times 10^{7 a,1}$
% การเพิ่มขึ้น			-0.54%	2,136.84%	1,892.16%	1,932.92%	4,519.88%	5,653.97%	5,441.67%

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันดิบอย่างเดียว  
 ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 0.5 % w/w  
 ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 1.0% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 1.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL  
 ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$   
 ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดพบว่าชุดควบคุมในวันที่ 0-35 ของการทดลองมีค่าเท่ากับ  $3.35 \pm 0.34 \times 10^5$  -  $3.78 \pm 0.19 \times 10^5$  CFU/g ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและไม่เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) พบว่าในชุดการทดลอง T1, T2 และ T3 ของวันที่ 0 ของการทดลอง มีปริมาณเท่ากับ  $2.13 \pm 0.24 \times 10^5$ ,  $2.16 \pm 0.13 \times 10^5$  และ  $2.00 \pm 0.09 \times 10^5$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้น (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 3-35 ของการทดลองซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $2.22 \pm 0.26 \times 10^6$  -  $3.36 \pm 0.18 \times 10^6$ ,  $2.18 \pm 0.16 \times 10^6$  -  $3.48 \pm 0.15 \times 10^6$  และ  $1.18 \pm 0.21 \times 10^6$  -  $3.38 \pm 0.12 \times 10^6$  CFU/g ตามลำดับ

ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) พบว่าในชุดการทดลอง T4, T5 และ T6 ของวันที่ 0 ของการทดลอง มีปริมาณเท่ากับ  $3.44 \pm 0.21 \times 10^5$ ,  $3.20 \pm 0.42 \times 10^5$  และ  $2.76 \pm 0.15 \times 10^5$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้น (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 3-10 ของการทดลอง ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $3.87 \pm 0.30 \times 10^6$  -  $4.07 \pm 0.27 \times 10^6$ ,  $3.02 \pm 0.22 \times 10^6$  -  $3.73 \pm 0.23 \times 10^6$  และ  $2.98 \pm 0.15 \times 10^6$  -  $3.54 \pm 0.11 \times 10^6$  CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอีกครั้ง (ประมาณ 10 เท่า) ในวันที่ 14-35 ของการทดลอง ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง  $1.64 \pm 0.13 \times 10^7$  -  $2.61 \pm 0.13 \times 10^7$ ,  $1.47 \pm 0.15 \times 10^7$  -  $2.22 \pm 0.14 \times 10^7$  และ  $1.33 \pm 0.14 \times 10^7$  -  $1.92 \pm 0.15 \times 10^7$  ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 55

ตารางที่ 55 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	หัวเชื้อที่เตรียม	เชื้อเริ่มต้นที่ใส่ ในชุดทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)						
			ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	1.21±0.03×10 <sup>9</sup>	1.87×10 <sup>8</sup>	3.70±0.18×10 <sup>5 a,1</sup>	2.13±0.24×10 <sup>5 b,2</sup>	2.16±0.13×10 <sup>5 b,2</sup>	2.00±0.09×10 <sup>5 b,2</sup>	3.44±0.21×10 <sup>5 c,1</sup>	3.20±0.42×10 <sup>5 c,1</sup>	2.76±0.15×10 <sup>5 c,12</sup>
วันที่ 3			3.78±0.19×10 <sup>5 a,3</sup>	2.22±0.26×10 <sup>6 a,2</sup>	2.18±0.16×10 <sup>6 a,2</sup>	1.18±0.21×10 <sup>6 a,2</sup>	3.87±0.30 ×10 <sup>6 b,1</sup>	3.02±0.22×10 <sup>6 b,12</sup>	2.98±0.15×10 <sup>6 b,12</sup>
วันที่ 7			3.35±0.34×10 <sup>5 a,3</sup>	2.32±0.17×10 <sup>6 a,2</sup>	2.52±0.17×10 <sup>6 a,2</sup>	1.67±0.22×10 <sup>6 a,2</sup>	3.88±0.15×10 <sup>6 b,1</sup>	3.50±0.08×10 <sup>6 b,1</sup>	3.38±0.20×10 <sup>6 b,1</sup>
วันที่ 10			3.42±0.44×10 <sup>5 a,3</sup>	2.70±0.24×10 <sup>6 a,12</sup>	3.05±0.15×10 <sup>6 a,1</sup>	1.94±0.15×10 <sup>6 a,2</sup>	4.07±0.27×10 <sup>6 b,1</sup>	3.73±0.23×10 <sup>6 b,1</sup>	3.54±0.11×10 <sup>6 b,1</sup>
วันที่ 14			3.48±0.21×10 <sup>5 a,3</sup>	2.79±0.25×10 <sup>6 a,2</sup>	3.17±0.14×10 <sup>6 a,2</sup>	2.45±0.25×10 <sup>6 a,2</sup>	1.64±0.13×10 <sup>7 a,1</sup>	1.47±0.15×10 <sup>7 a,1</sup>	1.33±0.14×10 <sup>7 a,1</sup>
วันที่ 21			3.53±0.21×10 <sup>5 a,3</sup>	3.23±0.24×10 <sup>6 a,2</sup>	3.30±0.13×10 <sup>6 a,2</sup>	2.70±0.16310 <sup>6 a,2</sup>	2.16±0.14×10 <sup>7 a,1</sup>	1.73±0.12×10 <sup>7 a,1</sup>	1.70±0.13×10 <sup>7 a,1</sup>
วันที่ 28			3.67±0.14×10 <sup>5 a,3</sup>	3.34±0.15×10 <sup>6 a,2</sup>	3.40±0.10×10 <sup>6 a,2</sup>	3.30±0.08×10 <sup>6 a,2</sup>	2.53±0.14×10 <sup>7 a,1</sup>	2.02±0.12×10 <sup>7 a,1</sup>	1.84±0.11×10 <sup>7 a,1</sup>
วันที่ 35			3.68±0.18×10 <sup>5 a,3</sup>	3.36±0.18×10 <sup>6 a,2</sup>	3.48±0.15×10 <sup>6 a,2</sup>	3.38±0.12×10 <sup>6 a,2</sup>	2.61±0.13×10 <sup>7 a,1</sup>	2.22±0.14×10 <sup>7 a,1</sup>	1.92±0.15×10 <sup>7 a,1</sup>
% การเพิ่มขึ้น					-0.54%	1,477.46%	1,511.11%	1,590.00%	7,487.21%

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมนดินอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0% w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ 1.87×10<sup>8</sup> CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ 1.87×10<sup>8</sup> CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ 1.87×10<sup>8</sup> CFU/mL

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

## 2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำที่หลงเหลือจากการย่อยสลาย

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในชุดควบคุมพบว่ามีความคงที่เท่ากับ 754.72 GAE/1 g ตลอดระยะเวลาทำการทดลอง (วันที่ 0 - 35) โดยในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซลและไม่เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ชุดการทดลอง T1, T2 และ T3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ  $3,207.55 \pm 266.83$ ,  $3,396.23 \pm 533.67$  และ  $5,094.34 \pm 266.83$  GAE/1 g ตามลำดับ และมีการลดลงตามระยะเวลาทำการทดลองโดยในวันที่ 35 ของการทดลอง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเหลือเท่ากับ  $2,698.11 \pm 53.37$ ,  $3,006.29 \pm 39.28$  และ  $4,610.06 \pm 207.83$  GAE/1 g ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซลและเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ชุดการทดลอง T4, T5 และ T6 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ  $3,264.15 \pm 210.10$ ,  $3,424.53 \pm 93.39$  และ  $5,188.68 \pm 133.42$  GAE/1 g ตามลำดับ และมีการลดลงตามระยะเวลาทำการทดลองโดยในวันที่ 35 ของการทดลองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเหลือเท่ากับ  $1,386.79 \pm 120.07$ ,  $1,952.83 \pm 93.39$  และ  $4,534.59 \pm 78.55$  GAE/1 g ตามลำดับ โดยมีร้อยละการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในชุดการทดลอง T1, T2 และ T3 ที่เติมน้ำมันดีเซล 0.5%, 1.0% และ 1.5% แบคทีเรียในดินสามารถลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในดินได้เท่ากับ 15.88%, 11.48% และ 9.56% ตามลำดับ แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลอง T4, T5 และ T6 ที่เติมน้ำมันดีเซล 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีความสามารถในการลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่อยู่ในดินได้เพิ่มขึ้นในแต่ละชุดการทดลอง โดยจะลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงที่สุดในชุดการทดลองที่เติมน้ำมัน 0.5% (57.51%) รองลงมาคือ 1% (49.78%) และ 1.5% (12.61%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 56

ตารางที่ 56 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Gallic acid equivalent (GAE)/1 g)						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	754.72±266.83 <sup>a,3</sup>	3,207.55±266.83 <sup>a,2</sup>	3,396.23±533.67 <sup>a,2</sup>	5,094.34±266.83 <sup>a,1</sup>	3,264.15±210.10 <sup>a,2</sup>	3,424.53±93.39 <sup>a,2</sup>	5,188.68±133.42 <sup>a,1</sup>
วันที่ 3	754.72±180.65 <sup>a,4</sup>	3,113.21±133.42 <sup>a,2</sup>	3,113.21±133.42 <sup>ab,2</sup>	4,905.66±266.83 <sup>b,1</sup>	2,547.17±133.42 <sup>b,3</sup>	2,452.83±266.83 <sup>b,3</sup>	5,000.00±133.42 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	754.72±154.06 <sup>a,4</sup>	3,018.87±188.68 <sup>a,2</sup>	3,333.33±288.21 <sup>a,2</sup>	4,896.23±200.12 <sup>b,1</sup>	1,698.11±0.00 <sup>c,3</sup>	2,358.49±133.42 <sup>b,3</sup>	4,811.32±133.42 <sup>ab,1</sup>
วันที่ 10	754.72±26.68 <sup>a,5</sup>	3,081.76±108.93 <sup>a,2</sup>	3,367.92±40.02 <sup>a,2</sup>	4,858.49±93.39 <sup>b,1</sup>	1,650.94±66.71 <sup>c,4</sup>	2,235.85±226.81 <sup>b,3</sup>	4,669.81±66.71 <sup>b,1</sup>
วันที่ 14	754.72±120.07 <sup>a,4</sup>	3,113.21±133.42 <sup>a,2</sup>	3,301.89±133.42 <sup>a,2</sup>	4,849.06±160.10 <sup>b,1</sup>	1,641.51±80.05 <sup>c,4</sup>	2,245.28±26.68 <sup>b,3</sup>	4,641.51±373.57 <sup>b,1</sup>
วันที่ 21	754.72±68.03 <sup>a,5</sup>	3,018.87±53.37 <sup>a,2</sup>	3,194.97±28.82 <sup>ab,2</sup>	4,716.98±53.37 <sup>bc,1</sup>	1,490.57±26.68 <sup>c,4</sup>	2,132.08±114.77 <sup>b,3</sup>	4,622.64±373.57 <sup>b,1</sup>
วันที่ 28	754.72±56.60 <sup>a,5</sup>	3,012.58±28.82 <sup>a,2</sup>	3,125.79±110.56 <sup>ab,2</sup>	4,698.79±53.37 <sup>bc,1</sup>	1,415.09±133.42 <sup>c,4</sup>	2,062.89±170.16 <sup>b,3</sup>	4,566.04±80.05 <sup>b,1</sup>
วันที่ 35	754.72±37.74 <sup>a,5</sup>	2,698.11±53.37 <sup>b,3</sup>	3,006.29±39.28 <sup>b,2</sup>	4,610.06±207.83 <sup>c,1</sup>	1,386.79±120.07 <sup>c,4</sup>	1,952.83±93.39 <sup>c,3</sup>	4,534.59±78.55 <sup>b,1</sup>
% การลดลงของ สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด	0	15.88%	11.48%	9.56%	57.51%	49.78%	12.61%

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เดิมดินอย่างเดียว  
 ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เดิมดิน + น้ำมันดีเซล 0.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เดิมดิน + น้ำมันดีเซล 1.0% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เดิมดิน + น้ำมันดีเซล 1.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เดิมดิน + น้ำมันดีเซล 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เดิมดิน + น้ำมันดีเซล 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เดิมดิน + น้ำมันดีเซล 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL  
 ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$   
 ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซินและไม่เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ชุดการทดลอง T1, T2 และ T3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ  $23,377.36 \pm 75.47$ ,  $3,490.57 \pm 400.25$  และ  $3,584.91 \pm 0.00$  GAE/1 g ตามลำดับ และมีการลดลงตามระยะเวลาทำการทดลองโดยในวันที่ 35 ของการทดลองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเหลือเท่ากับ  $2,371.07 \pm 10.89$ ,  $3,006.29 \pm 76.25$  และ  $3,201.26 \pm 76.25$  GAE/1 g ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซินและเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ชุดการทดลอง T4, T5 และ T6 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ  $3,773.58 \pm 0.00$ ,  $3,584.91 \pm 533.67$  และ  $3,867.92 \pm 133.42$  GAE/1 g ตามลำดับ และมีการลดลงตามระยะเวลาทำการทดลองโดยในวันที่ 35 ของการทดลองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเหลือเท่ากับ  $2,452.83 \pm 133.42$ ,  $2,575.47 \pm 40.02$  และ  $3,251.57 \pm 66.26$  GAE/1 g ตามลำดับ โดยมีร้อยละการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในชุดการทดลอง T1, T2 และ T3 ที่เติมน้ำมันเบนซิน 0.5%, 1.0% และ 1.5% แบคทีเรียในดินสามารถลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในดินได้เท่ากับ 29.80%, 13.87% และ 10.70% ตามลำดับ แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลอง T4, T5 และ T6 ที่เติมน้ำมันเบนซิน 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีความสามารถในการลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่อยู่ในดินได้เพิ่มขึ้นในแต่ละชุดการทดลอง โดยจะลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงที่สุดในชุดการทดลองที่เติมน้ำมัน 0.5% (35.00%) รองลงมาคือ 1.0% (28.16%) และ 1.5% (15.93%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 57

ตารางที่ 57 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Gallic acid equivalent (GAE)/1 g)						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	754.72±266.83 <sup>a,3</sup>	3,377.36±75.47 <sup>a,2</sup>	3,490.57±400.25 <sup>a,2</sup>	3,584.91±0.00 <sup>a,2</sup>	3,773.58±0.00 <sup>a,1</sup>	3,584.91±533.67 <sup>a,2</sup>	3,867.92±133.42 <sup>a,1</sup>
วันที่ 3	754.72±180.65 <sup>a,4</sup>	2,452.83±266.83 <sup>b,3</sup>	3,113.21±133.42 <sup>ab,2</sup>	3,301.89±400.25 <sup>ab,2</sup>	3,207.55±266.83 <sup>b,2</sup>	3,018.87±266.83 <sup>b,2</sup>	3,867.92±400.25 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	754.72±154.06 <sup>a,5</sup>	2,547.17±133.42 <sup>b,4</sup>	3,018.87±266.83 <sup>ab,3</sup>	3,490.57±133.42 <sup>a,2</sup>	3,113.21±133.42 <sup>b,3</sup>	2,924.53±133.42 <sup>b,3</sup>	3,773.58±266.83 <sup>a,1</sup>
วันที่ 10	754.72±26.68 <sup>a,6</sup>	2,509.43±80.05 <sup>b,5</sup>	3,179.25±40.02 <sup>ab,3</sup>	3,358.49±26.68 <sup>ab,2</sup>	2,962.26±80.05 <sup>b,4</sup>	2,820.75±40.02 <sup>bc,4</sup>	3,500.00±146.76 <sup>b,1</sup>
วันที่ 14	754.72±120.07 <sup>a,4</sup>	2,528.30±106.73 <sup>b,3</sup>	3,113.21±133.42 <sup>ab,2</sup>	3,358.49±53.37 <sup>ab,1</sup>	2,981.13±684.81 <sup>b,2</sup>	2,990.57±226.81 <sup>b,2</sup>	3,490.57±400.25 <sup>b,1</sup>
วันที่ 21	754.72±68.03 <sup>a,5</sup>	2,490.57±80.05 <sup>b,4</sup>	3,047.17±93.39 <sup>b,2</sup>	3,235.85±120.07 <sup>b,1</sup>	2,660.38±26.68 <sup>bc,3</sup>	2,745.28±146.76 <sup>bc,3</sup>	3,349.06±66.71 <sup>b,1</sup>
วันที่ 28	754.72±56.60 <sup>a,4</sup>	2,408.81±28.82 <sup>b,3</sup>	3,018.87±80.05 <sup>b,2</sup>	3,220.13±89.17 <sup>b,1</sup>	2,515.72±39.28 <sup>bc,3</sup>	2,632.08±13.34 <sup>c,3</sup>	3,257.86±47.48 <sup>b,1</sup>
วันที่ 35	754.72±37.74 <sup>a,4</sup>	2,371.07±10.89 <sup>b,3</sup>	3,006.29±76.25 <sup>b,2</sup>	3,201.26±76.25 <sup>b,1</sup>	2,452.83±133.42 <sup>c,3</sup>	2,575.47±40.02 <sup>c,3</sup>	3,251.57±66.26 <sup>b,1</sup>
% การลดลงของ สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด	0	29.80%	13.87%	10.70%	35.00%	28.16%	15.93%

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เดิมดินอย่างเดียว  
 ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 0.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.0% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL  
 ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$   
 ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$



ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบและไม่เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ชุดการทดลอง T1, T2 และ T3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ  $2,641.51 \pm 266.83$ ,  $2,924.53 \pm 133.42$  และ  $4,811.32 \pm 133.42$  GAE/1 g ตามลำดับ และมีการลดลงตามระยะเวลาทำการทดลองโดยในวันที่ 35 ของการทดลองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเหลือเท่ากับ  $2,201.26 \pm 28.82$ ,  $2,503.14 \pm 39.28$  และ  $4,257.86 \pm 39.28$  GAE/1 g ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบและเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ชุดการทดลอง T4, T5 และ T6 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ  $2,767.30 \pm 288.21$ ,  $3,270.44 \pm 400.25$  และ  $4,622.64 \pm 133.42$  GAE/1 g ตามลำดับ และมีการลดลงตามระยะเวลาทำการทดลองโดยในวันที่ 35 ของการทดลองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเหลือเท่ากับ  $1,830.19 \pm 37.74$ ,  $2,402.52 \pm 39.28$  และ  $3,943.40 \pm 18.87$  GAE/1 g ตามลำดับ โดยมีร้อยละการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในชุดการทดลอง T1, T2 และ T3 ที่เติมน้ำมันดิบ 0.5%, 1.0% และ 1.5% แบคทีเรียในดินสามารถลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในดินได้เท่ากับ 16.67%, 14.38% และ 11.50% ตามลำดับ แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลอง T4, T5 และ T6 ที่เติมน้ำมันดิบ 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีความสามารถในการลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่อยู่ในดินได้เพิ่มขึ้นในแต่ละชุดการทดลอง โดยจะลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงที่สุดในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบ 0.5% (33.86%) รองลงมาคือ 1.0% (26.53%) และ 1.5% (14.69%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 58

ตารางที่ 58 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Gallic acid equivalent (GAE)/1 g)						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	754.72±266.83 <sup>a,4</sup>	2,641.51±266.83 <sup>a,3</sup>	2,924.53±133.42 <sup>a,23</sup>	4,811.32±133.42 <sup>a,1</sup>	2,767.30±288.21 <sup>a,23</sup>	3,270.44±400.25 <sup>a,2</sup>	4,622.64±133.42 <sup>a,1</sup>
วันที่ 3	754.72±90.32 <sup>a,4</sup>	2,628.93±300.90 <sup>a,3</sup>	2,915.09±93.39 <sup>a,2</sup>	4,748.43±26.68 <sup>a,1</sup>	2,603.77±26.68 <sup>a,3</sup>	3,188.68±53.37 <sup>a,2</sup>	4,358.49±480.30 <sup>b,1</sup>
วันที่ 7	754.72±80.05 <sup>a,4</sup>	2,616.35±324.80 <sup>a,3</sup>	2,842.77±107.29 <sup>a,2</sup>	4,707.55±13.34 <sup>a,1</sup>	2,594.34±13.34 <sup>ab</sup>	3,150.94±53.37 <sup>a,2</sup>	4,254.72±413.59 <sup>b,1</sup>
วันที่ 10	754.72±68.03 <sup>a,5</sup>	2,584.91±49.92 <sup>ab,4</sup>	2,767.30±76.25 <sup>ab,4</sup>	4,584.91±99.84 <sup>ab,1</sup>	2,484.28±57.64 <sup>b,4</sup>	3,012.58±28.82 <sup>a,3</sup>	4,176.10±38.90 <sup>bc,2</sup>
วันที่ 14	754.72±99.84 <sup>a,5</sup>	2,452.83±18.87 <sup>ab,4</sup>	2,650.94±10.89 <sup>ab,34</sup>	4,402.52±39.28 <sup>ab,1</sup>	2,213.84±39.28 <sup>b,4</sup>	2,955.97±47.48 <sup>ab,3</sup>	4,100.63±39.28 <sup>bc,2</sup>
วันที่ 21	754.72±68.03 <sup>a,5</sup>	2,427.67±10.89 <sup>ab,34</sup>	2,616.35±10.89 <sup>ab,3</sup>	4,364.78±28.82 <sup>ab,1</sup>	2,169.81±37.74 <sup>b,4</sup>	2,672.96±28.82 <sup>bc,3</sup>	4,075.47±49.92 <sup>bc,2</sup>
วันที่ 28	754.72±60.65 <sup>a,5</sup>	2,371.07±28.82 <sup>ab,3</sup>	2,603.77±18.87 <sup>ab,3</sup>	4,314.47±28.82 <sup>ab,1</sup>	2,094.34±18.87 <sup>b,4</sup>	2,490.57±18.87 <sup>bc,3</sup>	4,031.45±47.48 <sup>bc,2</sup>
วันที่ 35	754.72±18.87 <sup>a,5</sup>	2,201.26±28.82 <sup>b,3</sup>	2,503.14±39.28 <sup>b,3</sup>	4,257.86±39.28 <sup>b,1</sup>	1,830.19±37.74 <sup>c,4</sup>	2,402.52±39.28 <sup>c,3</sup>	3,943.40±18.87 <sup>c,2</sup>
% การลดลงของ สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด	0	16.67%	14.38%	11.50%	33.86%	26.53%	14.69%

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันดิบอย่างเดียว  
 ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 0.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 1.0% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 1.5% w/w  
 ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL  
 ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบ 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL  
 ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$   
 ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและไม่เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T1, T2 และ T3) พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ชุดการทดลอง T1, T2 และ T3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ  $2,893.08 \pm 288.31$ ,  $3,333.33 \pm 288.21$  และ  $4,213.84 \pm 288.21$  GAE/1 g ตามลำดับ และมีการลดลงตามระยะเวลาทำการทดลองโดยในวันที่ 35 ของการทดลองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเหลือเท่ากับ  $2,389.94 \pm 39.28$ ,  $2,830.19 \pm 18.87$  และ  $3,647.80 \pm 39.28$  GAE/1 g ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (T4, T5 และ T6) พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ชุดการทดลอง T4, T5 และ T6 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ  $3,018.87 \pm 188.68$ ,  $3,867.92 \pm 133.42$  และ  $4,591.29 \pm 217.87$  GAE/1 g ตามลำดับ และมีการลดลงตามระยะเวลาทำการทดลองโดยในวันที่ 35 ของการทดลองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเหลือเท่ากับ  $2,132.08 \pm 53.37$ ,  $3,000.00 \pm 32.68$  และ  $3,754.72 \pm 18.87$  GAE/1 g ตามลำดับ โดยมีร้อยละการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในชุดการทดลอง T1, T2 และ T3 ที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5%, 1.0% และ 1.5% แบคทีเรียในดินสามารถลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในดินได้เท่ากับ 17.39%, 15.09% และ 13.43% ตามลำดับ แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลอง T4, T5 และ T6 ที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีความสามารถในการลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่อยู่ในดินได้เพิ่มขึ้นในแต่ละชุดการทดลอง โดยจะลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงที่สุดในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5% (29.37%) รองลงมาคือ 1.0% (22.44%) และ 1.5% (18.22%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 59

ตารางที่ 59 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Gallic acid equivalent (GAE)/1 g)						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	754.72±266.83 <sup>a,5</sup>	2,893.08±288.31 <sup>a,4</sup>	3,333.33±288.21 <sup>a,23</sup>	4,213.84±288.21 <sup>a,1</sup>	3,018.87±188.68 <sup>a,3</sup>	3,867.92±133.42 <sup>a,2</sup>	4,591.29±217.87 <sup>a,1</sup>
วันที่ 3	754.72±90.32 <sup>a,4</sup>	2,861.64±222.92 <sup>a,3</sup>	3,314.47±247.45 <sup>a,23</sup>	4,138.36±144.11 <sup>a,1</sup>	2,918.24±125.51 <sup>a,3</sup>	3,811.32±132.08 <sup>a,2</sup>	4,540.88±190.87 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	754.72±80.05 <sup>a,5</sup>	2,798.74±240.15 <sup>ab,4</sup>	3,301.89±180.65 <sup>a,34</sup>	4,081.76±71.43 <sup>a,2</sup>	2,830.19±90.32 <sup>ab,4</sup>	3,723.27±39.28 <sup>a,3</sup>	4,515.72±10.89 <sup>a,1</sup>
วันที่ 10	754.72±68.03 <sup>a,5</sup>	2,740.57±71.22 <sup>ab,4</sup>	3,292.45±71.43 <sup>ab,3</sup>	3,981.13±49.92 <sup>ab,2</sup>	2,761.01±28.82 <sup>b,4</sup>	3,534.59±28.82 <sup>ab,3</sup>	4,433.96±75.47 <sup>a,1</sup>
วันที่ 14	754.72±99.84 <sup>a,5</sup>	2,672.96±57.64 <sup>ab,4</sup>	3,138.36±47.48 <sup>ab,3</sup>	3,861.64±76.25 <sup>ab,2</sup>	2,679.25±49.92 <sup>b,4</sup>	3,477.99±10.89 <sup>ab,3</sup>	4,353.77±60.65 <sup>ab,1</sup>
วันที่ 21	754.72±68.03 <sup>a,5</sup>	2,635.22±47.48 <sup>ab,4</sup>	3,018.87±82.24 <sup>ab,3</sup>	3,798.74±60.65 <sup>ab,2</sup>	2,503.14±39.28 <sup>b,4</sup>	3,333.33±39.28 <sup>ab,3</sup>	4,113.21±26.68 <sup>ab,1</sup>
วันที่ 28	754.72±60.65 <sup>a,5</sup>	2,603.77±37.74 <sup>ab,3</sup>	2,874.21±28.82 <sup>ab,23</sup>	3,723.27±39.28 <sup>ab,1</sup>	2,301.89±49.92 <sup>bc,4</sup>	3,144.65±28.82 <sup>b,2</sup>	3,924.53±18.87 <sup>b,1</sup>
วันที่ 35	754.72±18.87 <sup>a,4</sup>	2,389.94±39.28 <sup>b,3</sup>	2,830.19±18.87 <sup>b,2</sup>	3,647.80±39.28 <sup>b,1</sup>	2,132.08±53.37 <sup>c,3</sup>	3,000.00±32.68 <sup>b,2</sup>	3,754.72±18.87 <sup>b,1</sup>
% การลดลงของ สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด	0	17.39%	15.09%	13.43%	29.37%	22.44%	18.22%

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมดินอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0% w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5% w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5% w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

## 2.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย

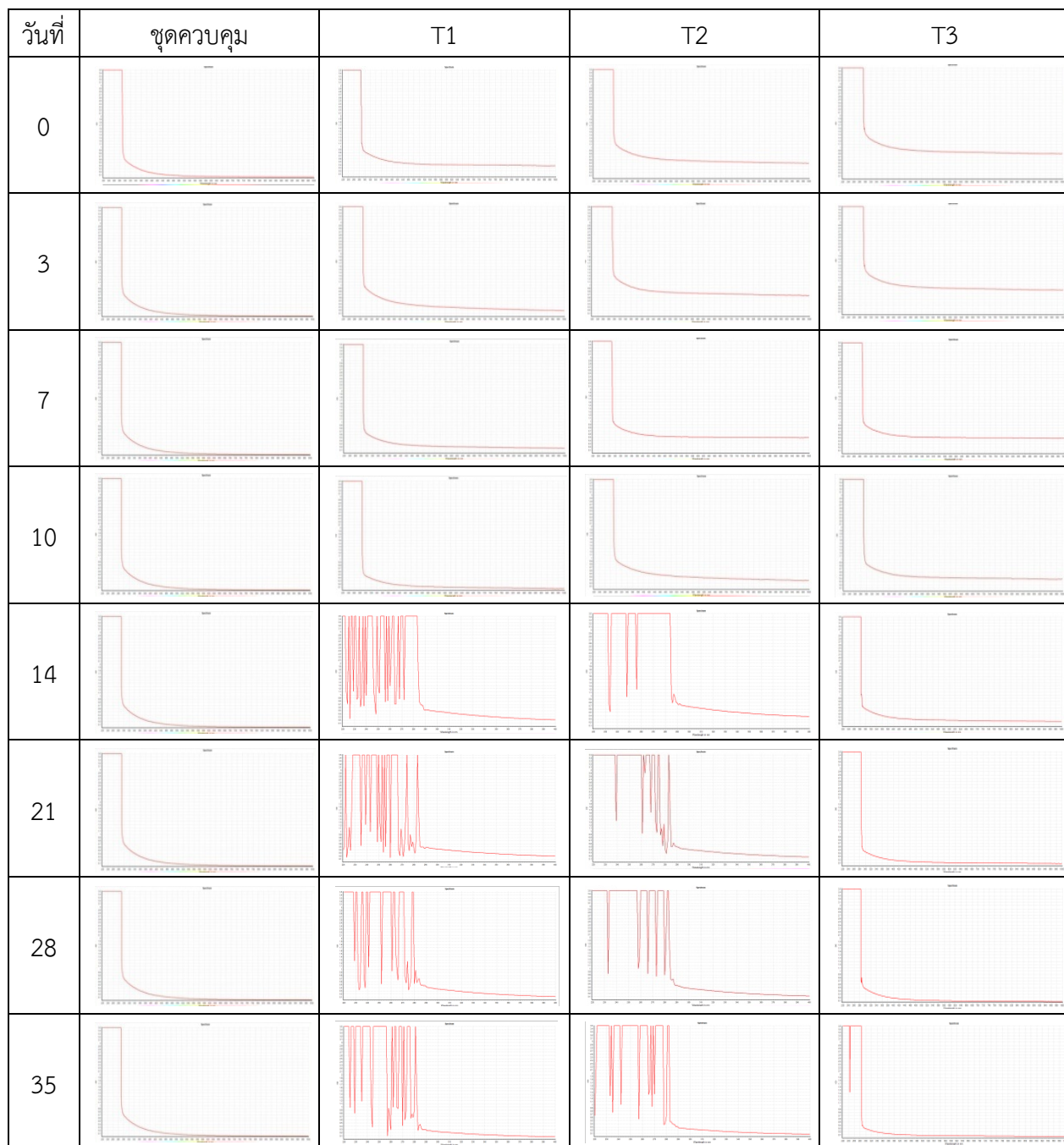
จากการศึกษาน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลาย (Spectrogram) ในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 0.5%, 1.0% และ 1.5% (ชุดการทดลอง T1, T2 และ T3) พบว่าแบคทีเรียในดินสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลในชุดการทดลอง T1 และ T2 ได้ตั้งแต่วันที่ 14 ของการทดลอง แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 0.5%, 1.0% และ 1.5% (ชุดการทดลอง T4, T5 และ T6) พบว่าน้ำมันถูกย่อยสลายได้เร็วขึ้นโดยพบการย่อยสลายได้ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 60

ในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซิน 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าแบคทีเรียในดินสามารถย่อยสลายน้ำมันเบนซินได้ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซิน 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าน้ำมันถูกย่อยสลายได้เร็วขึ้นโดยพบการย่อยสลายได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 61

ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบ 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าแบคทีเรียในดินสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบ 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าน้ำมันถูกย่อยสลายได้เร็วขึ้นโดยพบการย่อยสลายได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 62

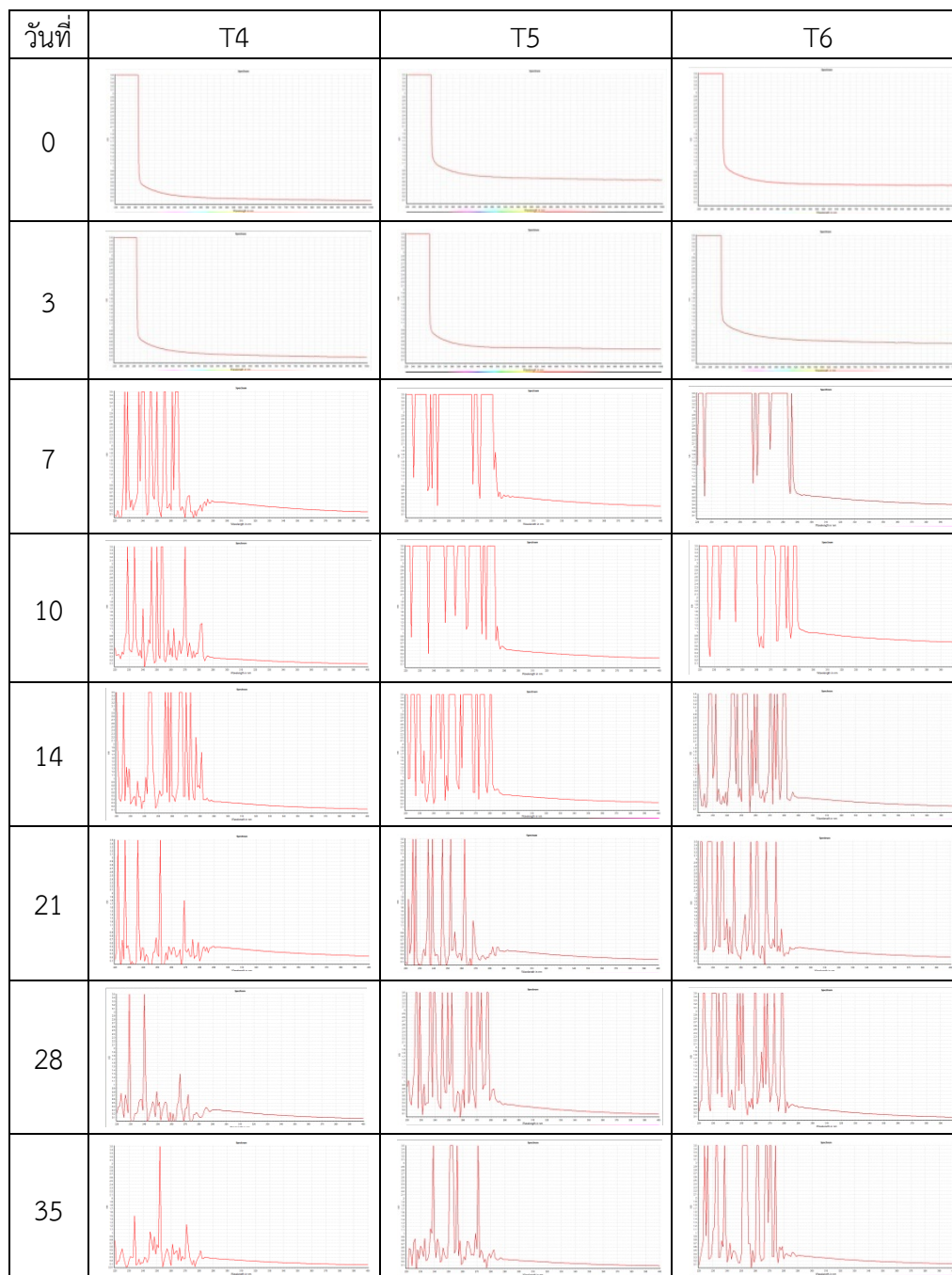
เช่นเดียวกันกับในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าแบคทีเรียในดินสามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วได้ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าน้ำมันถูกย่อยสลายได้เร็วขึ้นโดยพบการย่อยสลายได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 63

ตารางที่ 60 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



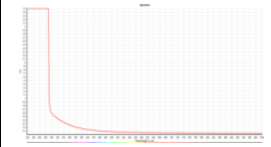
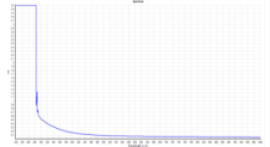
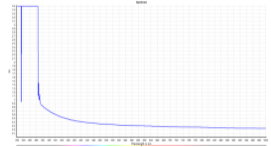
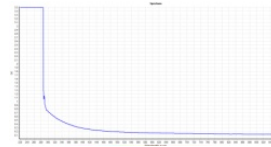
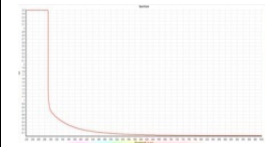
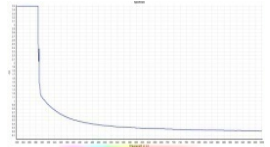
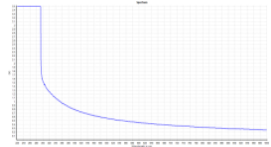
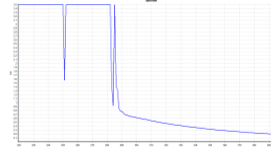
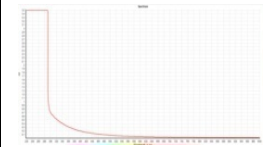
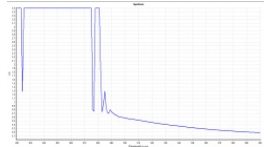
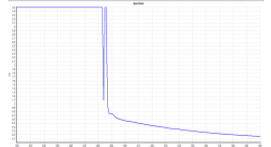
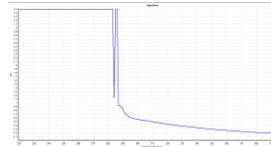
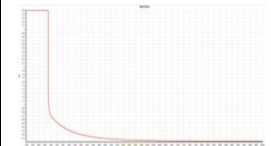
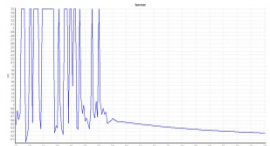
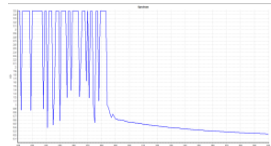
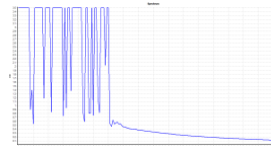

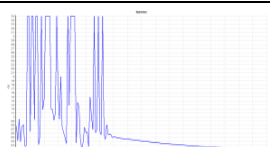
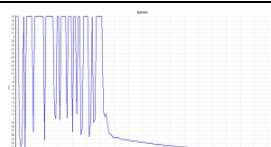
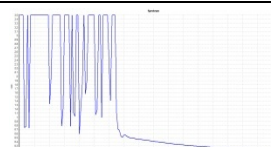
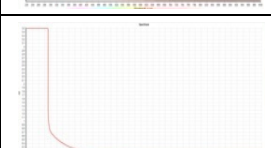
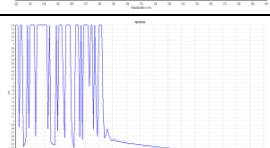
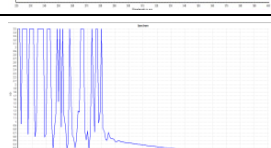
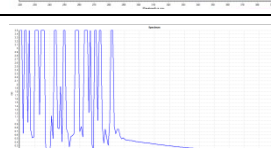

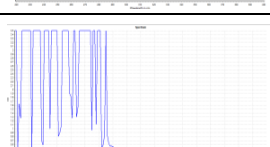
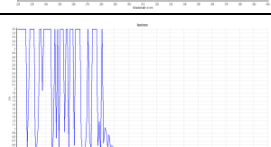
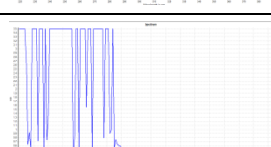

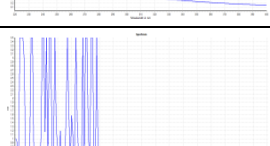
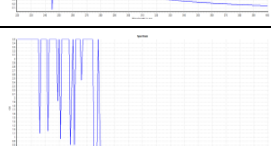
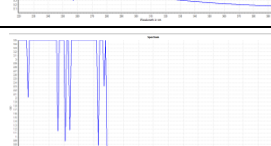
หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมนดินอย่างเดียว, ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 0.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 1.0 % w/w, ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 1.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมนดิน + น้ำมันดีเซล 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ตารางที่ 60 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (ต่อ)



หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว, ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 0.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.0 % w/w, การทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมันดีเซล 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมันดีเซล 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมันดีเซล 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

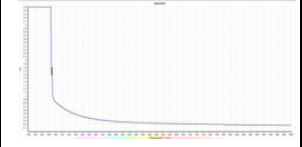
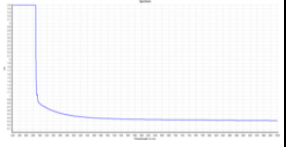
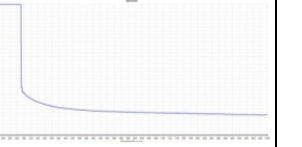
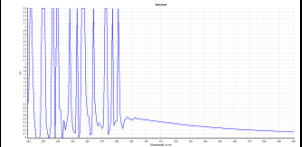
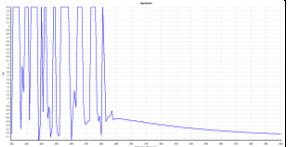
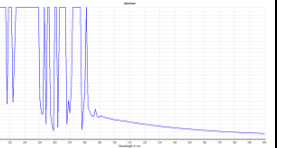
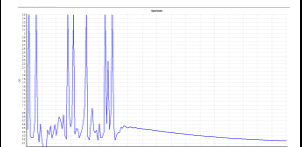
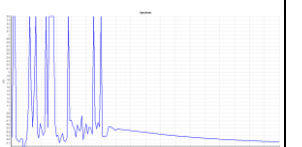

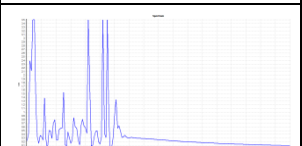
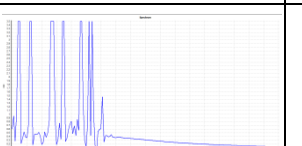
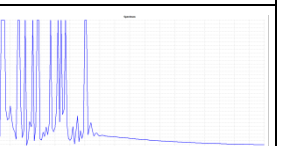
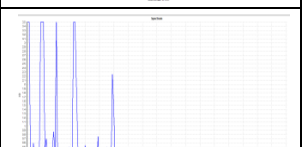
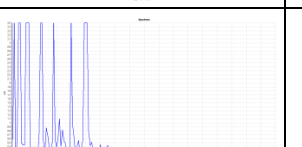
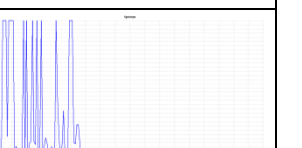
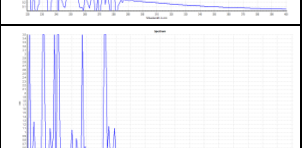
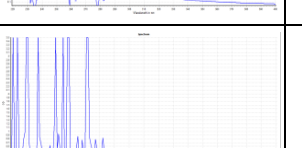
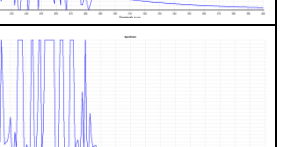
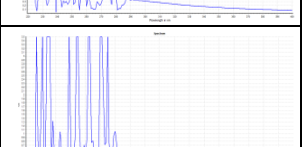
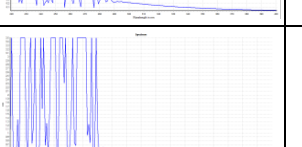
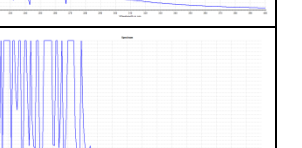
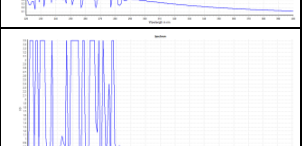
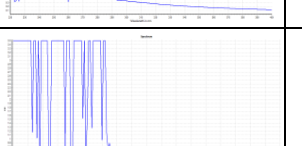
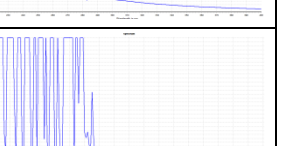
ตารางที่ 61 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

วันที่	ชุดควบคุม	T1	T2	T3
0				
3				
7				
10				
14				
21				
28				
35				

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว, ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 0.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.0 % w/w, ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

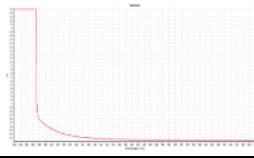
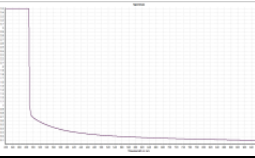
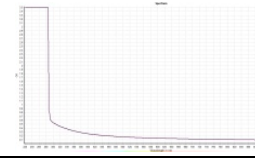
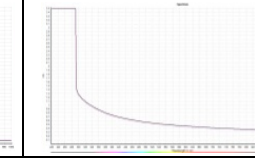
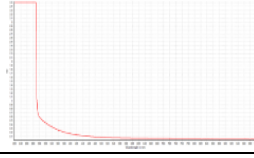
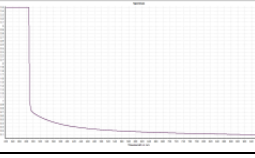
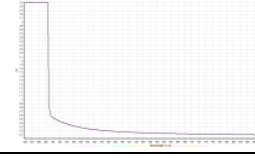
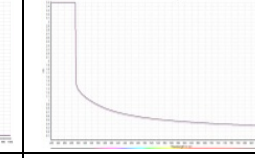
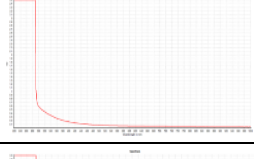
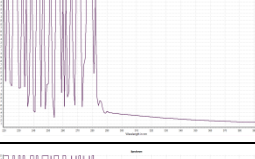
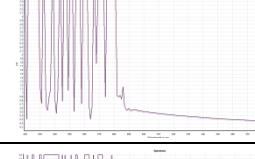
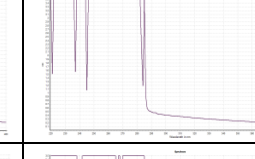
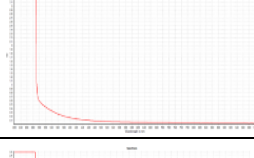
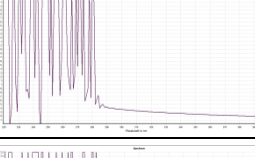
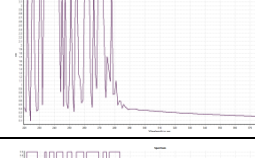
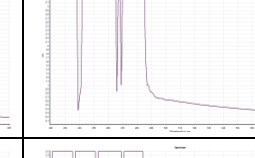
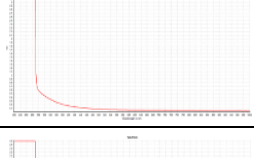
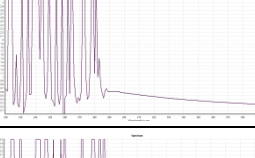
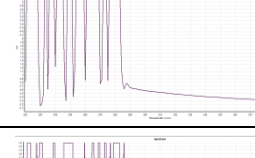
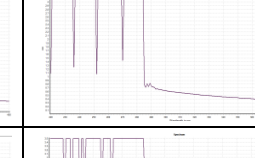
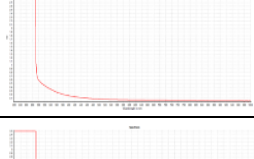
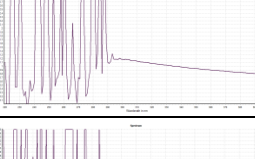
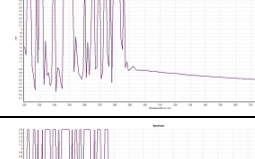
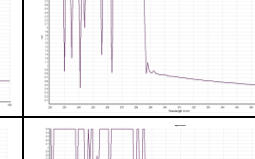
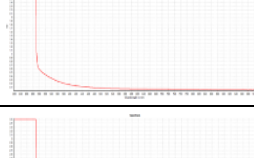
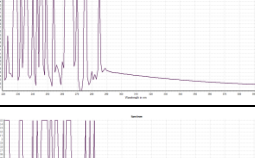
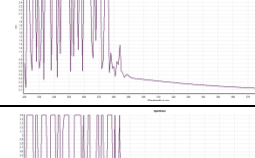
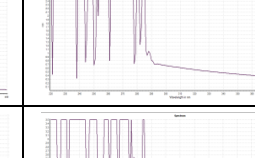
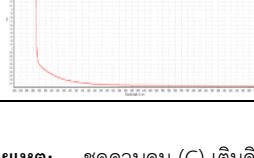
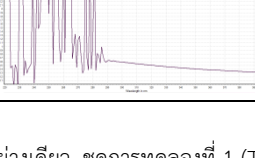
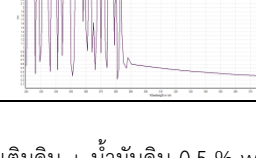
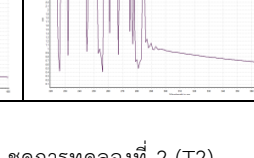


ตารางที่ 61 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (ต่อ)

วันที่	T4	T5	T6
0			
3			
7			
10			
14			
21			
28			
35			

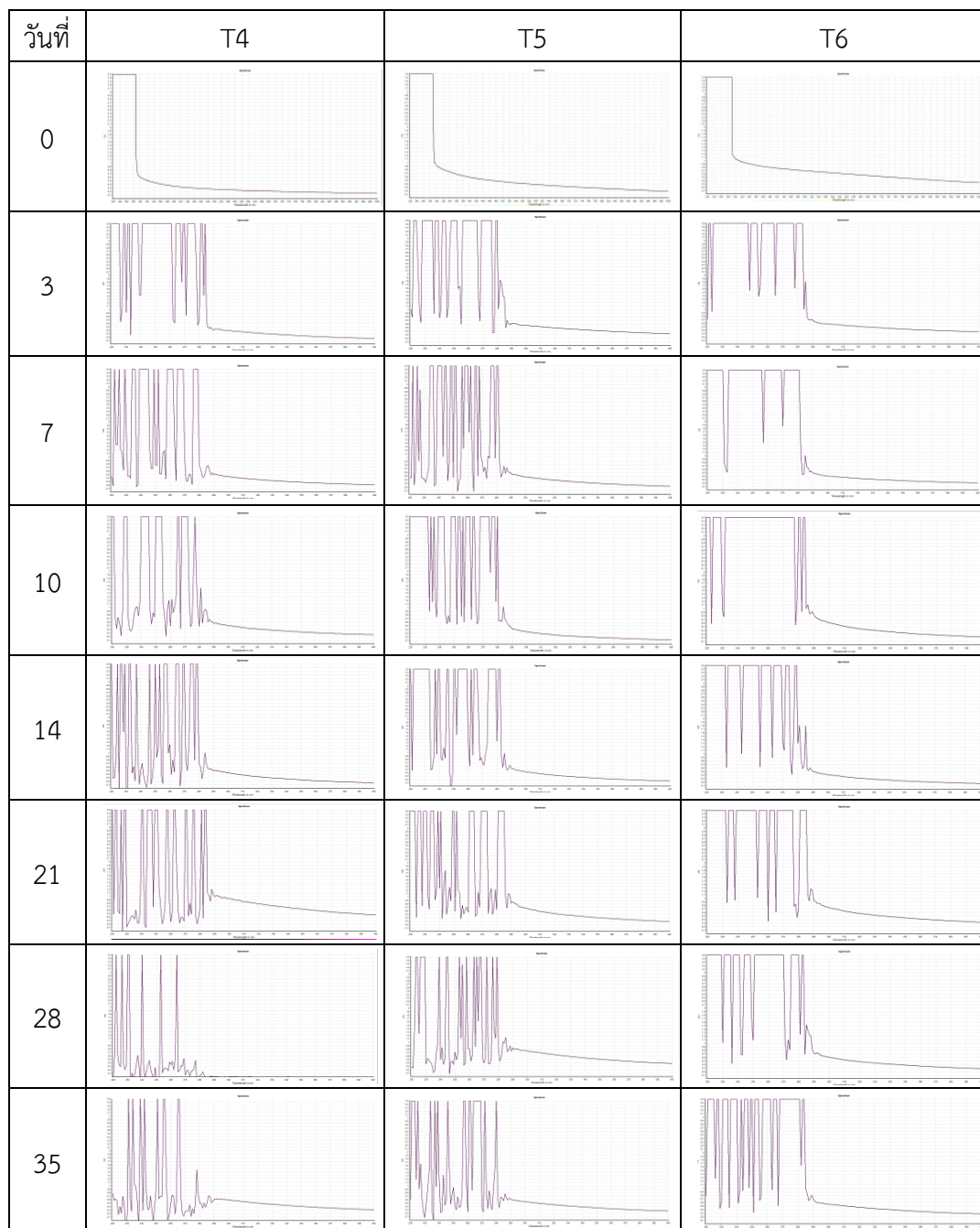
หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เดิมดินอย่างเดียว, ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 0.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.0 % w/w, ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เดิมดิน + น้ำมันเบนซิน 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ตารางที่ 62 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

วันที่	ชุดควบคุม	T1	T2	T3
0				
3				
7				
10				
14				
21				
28				
35				

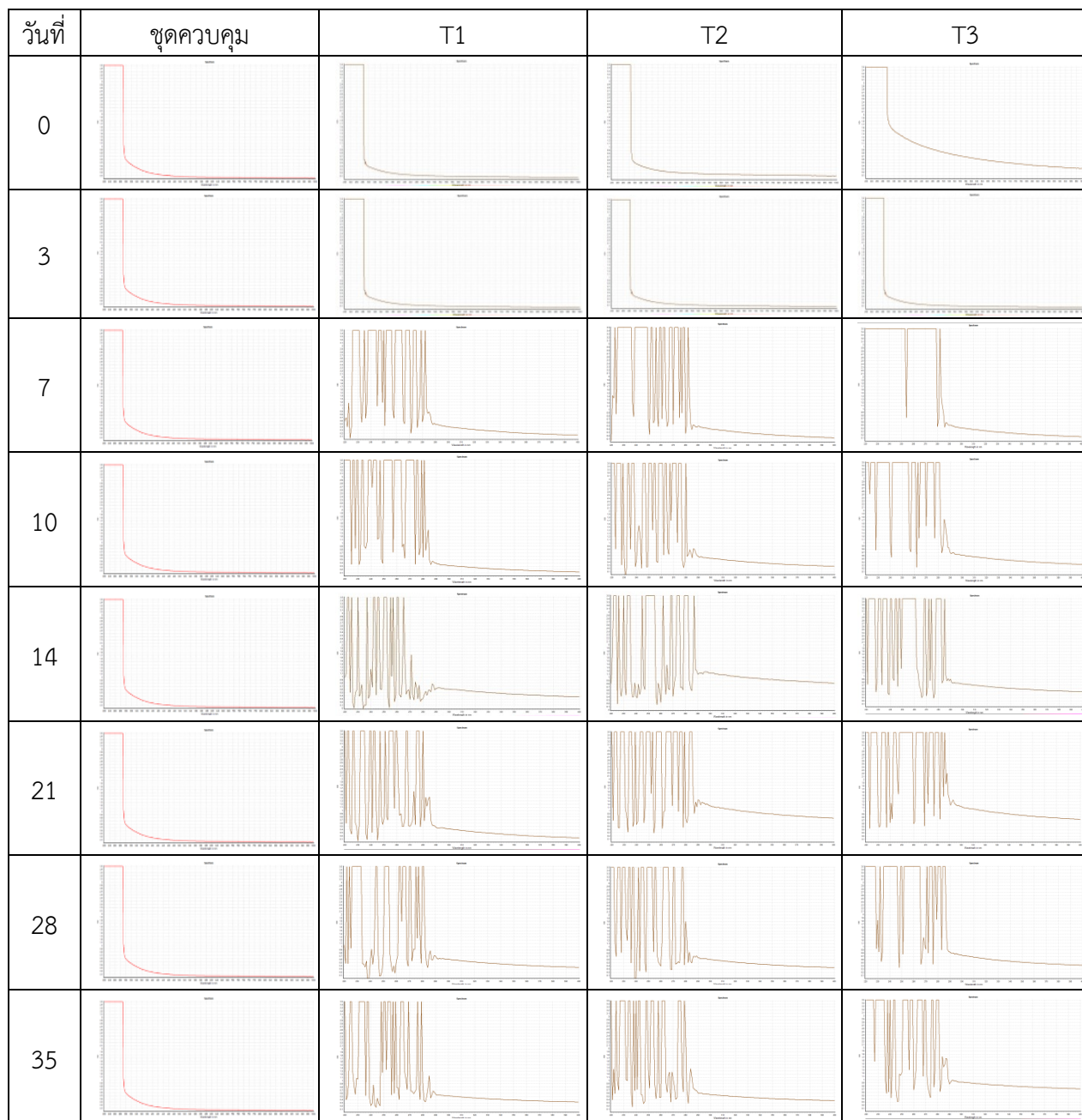
หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว, ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 0.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.0 % w/w, ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ตารางที่ 62 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (ต่อ)



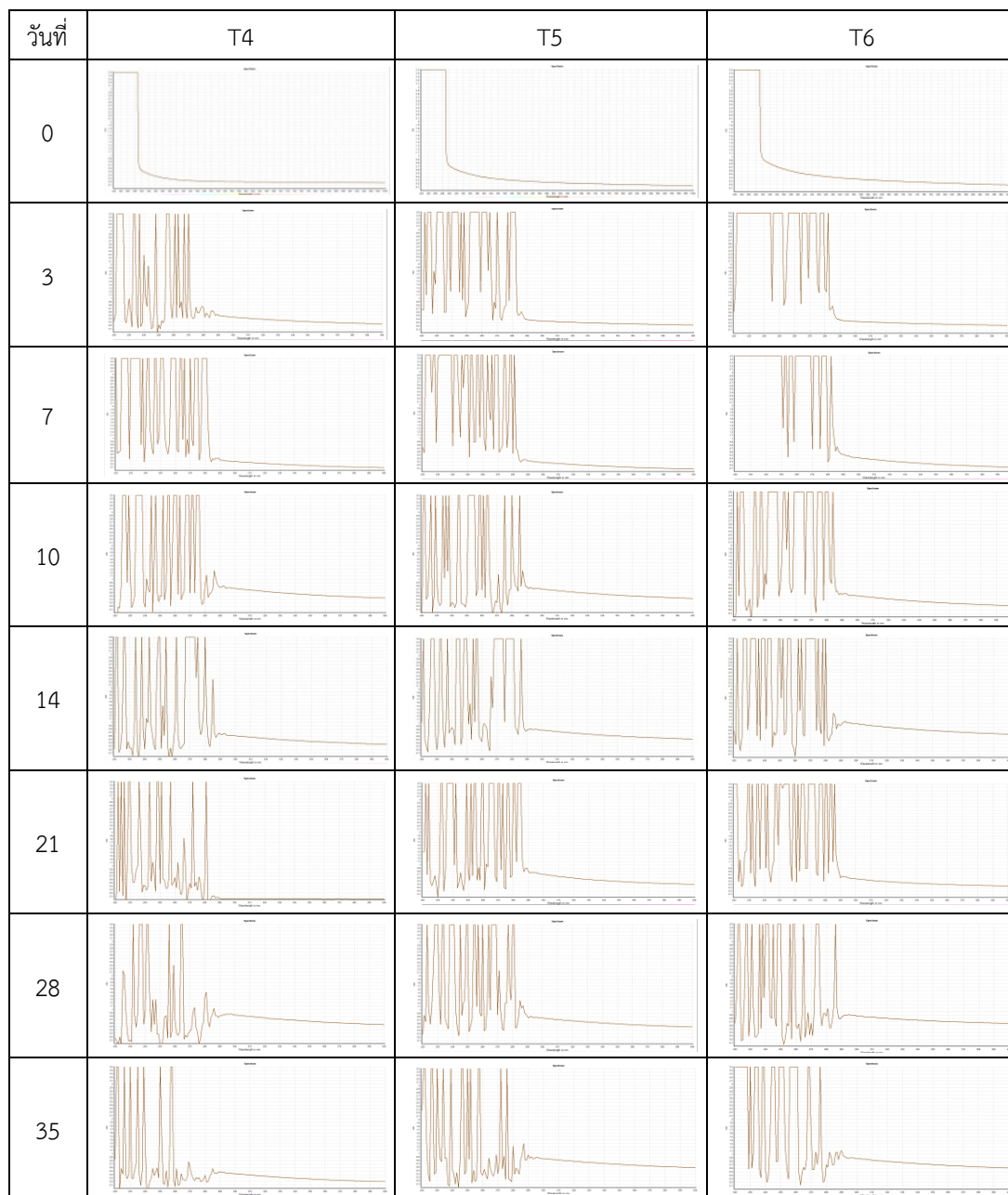
หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เดิมดินอย่างเดียว, ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เดิมดิน + น้ำมันดิบ 0.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เดิมดิน + น้ำมันดิบ 1.0 % w/w, ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เดิมดิน + น้ำมันดิบ 1.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เดิมดิน + น้ำมันดิบ 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เดิมดิน + น้ำมันดิบ 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เดิมดิน + น้ำมันดิบ 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ตารางที่ 63 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมนดินอย่างเดียว, ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0 % w/w, ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ตารางที่ 63 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (ต่อ)



หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมนดินอย่างเดียว, ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0 % w/w, ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5 % w/w, ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL, ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมนดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

## 2.6 การวิเคราะห์ปริมาณซีไอดี

จากการศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลาย น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว ที่ปนเปื้อนในดินโดยทำการวิเคราะห์ ค่าซีไอดี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 64-67 พบว่าเมื่อทำการศึกษาการย่อยสลายน้ำมัน 4 ชนิด ภายในระยะเวลา 35 วัน พบว่าทุกชุดการทดลองมีการลดลงของค่าซีไอดีแตกต่างกันของแต่ละน้ำมัน และแต่ละชุดการทดลอง

ตารางที่ 64 ปริมาณซีไอดีจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	46.75±1.50 <sup>a,7</sup>	10,550.00±57.74 <sup>a,6</sup>	11,025.00±95.74 <sup>a,5</sup>	22,800.00±115.47 <sup>a,3</sup>	12,150.00±100.00 <sup>a,4</sup>	24,200.00±115.47 <sup>a,2</sup>	27,150.00±100.00 <sup>a,1</sup>
วันที่ 35	48.33±0.58 <sup>a,7</sup>	10,366.67±57.74 <sup>b,6</sup>	10,866.67±57.74 <sup>a,5</sup>	22,533.33±57.74 <sup>b,3</sup>	11,700.00±200.00 <sup>b,4</sup>	24,066.67±57.74 <sup>a,2</sup>	26,766.67±57.74 <sup>b,1</sup>
% การเพิ่มขึ้น/ การลดลง	+3.38	-1.27	-1.44	-1.17	-3.70	-0.55	-1.41

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 0.5 % w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.0 % w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.5 % w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซล 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตารางที่ 65 ปริมาณซีไอดีจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซินในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	46.75±1.50 <sup>a,6</sup>	10,066.67±57.74 <sup>b,5</sup>	10,166.67±152.75 <sup>a,5</sup>	25,433.33±57.74 <sup>a,2</sup>	13,433.33±57.74 <sup>a,4</sup>	22,766.67±57.74 <sup>a,3</sup>	26,833.33±57.74 <sup>a,1</sup>
วันที่ 35	48.33±0.58 <sup>a,7</sup>	11,066.67±115.47 <sup>a,5</sup>	10,133.33±57.74 <sup>a,6</sup>	24,933.33±57.74 <sup>b,2</sup>	12,666.67±152.75 <sup>b,4</sup>	21,566.67±152.75 <sup>b,3</sup>	25,800.00±100.00 <sup>b,1</sup>
% การเพิ่มขึ้น/ การลดลง	+3.38	+9.93	-0.33	-1.97	-5.71	-5.27	-3.85

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 0.5 % w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.0 % w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.5 % w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซิน 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.92 \times 10^8$  CFU/mL

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$



ตารางที่ 66 ปริมาณซีไอดีจากการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	46.75±1.50 <sup>a,7</sup>	12,825.00±50.00 <sup>a,6</sup>	13,775.00±150.00 <sup>a,5</sup>	25,225.00±95.74 <sup>a,2</sup>	16,725.00±50.00 <sup>a,4</sup>	23,700.00±141.42 <sup>a,3</sup>	28,825.00±95.74 <sup>a,1</sup>
วันที่ 35	48.33±0.58 <sup>a,7</sup>	12,400.00±100.00 <sup>b,6</sup>	13,466.67±57.74 <sup>b,5</sup>	24,733.33±57.74 <sup>b,2</sup>	16,133.33±57.74 <sup>b,4</sup>	22,866.67±57.74 <sup>b,3</sup>	27,500.00±100.00 <sup>b,1</sup>
% การเพิ่มขึ้น/ การลดลง	+3.38	-3.31	-2.24	-1.95	-3.54	-3.52	-4.60

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 0.5 % w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.0 % w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.5 % w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบ 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตารางที่ 67 ปริมาณซีไอดีจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในดินด้วยการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4	ชุดการทดลอง 5	ชุดการทดลอง 6
วันที่ 0	46.75±1.50 <sup>a,7</sup>	13,250.00±191.49 <sup>a,6</sup>	14,200.00±81.65 <sup>a,5</sup>	24,475.00±189.30 <sup>a,3</sup>	14,625.00±95.74 <sup>a,4</sup>	25,150.00±100.00 <sup>a,2</sup>	27,525.00±50.00 <sup>a,1</sup>
วันที่ 35	48.33±0.58 <sup>a,5</sup>	13,133.33±115.47 <sup>a,4</sup>	13,733.33±208.17 <sup>b,3</sup>	23,500.00±100.00 <sup>b,2</sup>	13,200.00±100.00 <sup>b,4</sup>	23,400.00±100.00 <sup>b,2</sup>	26,133.33±57.74 <sup>b,1</sup>
% การเพิ่มขึ้น/ การลดลง	+3.38	-0.88	-3.29	-3.94	-9.74	-6.96	-5.06

หมายเหตุ: ชุดควบคุม (C) เติมดินอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5 % w/w

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0 % w/w

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5 % w/w

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.0 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ชุดการทดลองที่ 6 (T6) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1.5 % w/w + แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณ  $1.87 \times 10^8$  CFU/mL

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

### 3. การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ในดินด้วยการเติมสารอาหารชนิดต่าง ๆ

การศึกษาถึงการเติมสารอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ สารอาหารกลุ่มไนโตรเจน (Yeast extract 1.0%), คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย (น้ำตาลกลูโคส 1.0%), ฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) และ 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  เพื่อส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมัน 1% ทั้ง 4 ชนิด ที่ปนเปื้อนในดิน โดยเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลการศึกษาแสดงดังต่อไปนี้

#### 3.1 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน

จากการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าดินที่ทำการศึกษา มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ  $5.64 \pm 0.04$  ในชุดการทดลองที่มีการเติมน้ำมันทั้ง 4 ชนิด (ดีเซล 1%, น้ำมันเบนซิน 1%, น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1% และน้ำมันดิบ 1%) พบว่าไม่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง แต่เมื่อมีการเติมทั้งน้ำมันและ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ยกตัวอย่างเช่น ในชุดการทดลองของน้ำมันดีเซล 1% ที่พบว่าเมื่อมีการเติมน้ำมันดีเซล 1% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มจาก  $5.64 \pm 0.04$  (ชุดควบคุม) เป็น  $5.78 \pm 0.07$  และเมื่อมีการเติมสารอาหารตั้งแต่ 1 ชนิดจนถึง 4 ชนิด ผสมกับน้ำมันดีเซล 1% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่าในทุกชุดการทดลองจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น ดังแสดงในชุดการทดลอง T1-1 ถึง T4-1 เท่ากับ  $6.03 \pm 0.02$ ,  $6.13 \pm 0.02$ ,  $6.15 \pm 0.04$  และ  $6.19 \pm 0.01$  ตามลำดับ ต่อมาพบว่าเมื่อทำการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างภายใน 7 วัน ของทุกชุดการทดลองพบว่าทุกชุดการศึกษาในชุดการทดลองที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันดีเซล 1% และน้ำมันเบนซิน 1% มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้นเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 68-69

ส่วนการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบ 1% และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1% พบว่าเมื่อมีการเติมน้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% และ Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% (T2-3) ถึง (T4-3) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีแต่ดินเท่านั้น ( $5.64 \pm 0.04$ ) เท่ากับ  $6.22 \pm 0.05$ ,  $6.30 \pm 0.02$  และ  $6.39 \pm 0.03$  ตามลำดับ ต่อมาทำการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างภายในระยะเวลา 7 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของชุดการทดลองตั้งแต่ชุด C2-3, T2-3, T3-3 และ T4-3 มีค่าลดลงจากวันแรกของการศึกษาเล็กน้อย

ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วพบว่าน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1% มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น รวมทั้งการเติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงมากขึ้นกว่าชุดที่มีการเติมเฉพาะน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1% และนอกจากนั้นพบว่าในชุดที่เติมสารอาหารตั้งแต่ 1 ชนิด (T1-4) ถึงชุด (T4-4) ร่วมกับการเติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ  $6.25 \pm 0.01$ ,  $6.25 \pm 0.05$ ,  $6.36 \pm 0.03$  และ  $6.39 \pm 0.02$  ตามลำดับ โดยในชุดควบคุมมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ  $5.64 \pm 0.04$  แต่เมื่อทำการศึกษาภายใน 7 วันพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างในชุดควบคุม C2-4, C3-4 จนถึงชุดการทดลอง T1-4, T2-4, T3-4 และ T4-4 มีค่าลดลง ดังแสดงในตารางที่ 71

ตารางที่ 68 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	5.64±0.04 <sup>a,4</sup>	5.64±0.01 <sup>b,4</sup>	5.78±0.07 <sup>b,3</sup>	6.03±0.02 <sup>b,2</sup>	6.13±0.02 <sup>a,1</sup>	6.15±0.04 <sup>a,1</sup>	6.19±0.01 <sup>a,1</sup>
วันที่ 3	5.66±0.03 <sup>a,4</sup>	5.80±0.04 <sup>a,3</sup>	5.81±0.05 <sup>b,3</sup>	6.05±0.04 <sup>ab,2</sup>	6.11±0.04 <sup>a,2</sup>	6.19±0.03 <sup>a,1</sup>	6.22±0.05 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	5.72±0.07 <sup>a,6</sup>	5.82±0.06 <sup>a,5</sup>	5.93±0.04 <sup>a,4</sup>	6.09±0.01 <sup>a,3</sup>	6.13±0.04 <sup>a,23</sup>	6.17±0.01 <sup>a,12</sup>	6.22±0.03 <sup>a,1</sup>

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-1) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตารางที่ 69 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	5.64±0.04 <sup>a,5</sup>	5.61±0.02 <sup>b,5</sup>	5.81±0.05 <sup>a,4</sup>	5.99±0.06 <sup>a,3</sup>	6.04±0.07 <sup>a,23</sup>	6.11±0.05 <sup>a,12</sup>	6.17±0.01 <sup>a,1</sup>
วันที่ 3	5.66±0.03 <sup>a,6</sup>	5.72±0.05 <sup>a,5</sup>	5.85±0.05 <sup>a,4</sup>	6.06±0.02 <sup>a,3</sup>	6.09±0.01 <sup>a,23</sup>	6.13±0.03 <sup>a,12</sup>	6.18±0.02 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	5.72±0.07 <sup>a,4</sup>	5.77±0.06 <sup>a,4</sup>	5.90±0.06 <sup>a,3</sup>	6.06±0.03 <sup>a,2</sup>	6.12±0.04 <sup>a,2</sup>	6.14±0.03 <sup>a,12</sup>	6.21±0.03 <sup>a,1</sup>

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-2) เติมน้ำมันเบนซินอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-2) เติมน้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-2) เติมน้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-2) เติมน้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-2) เติมน้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-2) เติมน้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-2) เติมน้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตารางที่ 70 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	5.64±0.04 <sup>a,6</sup>	5.83±0.05 <sup>a,5</sup>	5.92±0.04 <sup>a,4</sup>	6.05±0.03 <sup>a,3</sup>	6.22±0.05 <sup>a,2</sup>	6.30±0.02 <sup>a,1</sup>	6.39±0.03 <sup>a,1</sup>
วันที่ 3	5.66±0.03 <sup>a,6</sup>	5.84±0.05 <sup>a,5</sup>	5.90±0.05 <sup>a,5</sup>	6.01±0.03 <sup>a,4</sup>	6.10±0.03 <sup>b,3</sup>	6.22±0.07 <sup>a,2</sup>	6.32±0.06 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	5.72±0.07 <sup>a,5</sup>	5.79±0.02 <sup>a,5</sup>	5.95±0.02 <sup>a,4</sup>	6.11±0.07 <sup>a,3</sup>	6.18±0.03 <sup>a,3</sup>	6.23±0.06 <sup>a,2</sup>	6.34±0.03 <sup>a,1</sup>

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-3) เติมน้ำมันดิบอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-3) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-3) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-3) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-3) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-3) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-3) เติมน้ำมันดิบ + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตารางที่ 71 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	5.64±0.04 <sup>a,5</sup>	5.87±0.03 <sup>a,4</sup>	5.96±0.05 <sup>a,3</sup>	6.25±0.01 <sup>a,2</sup>	6.25±0.05 <sup>a,2</sup>	6.36±0.03 <sup>a,1</sup>	6.39±0.02 <sup>a,1</sup>
วันที่ 3	5.66±0.03 <sup>a,4</sup>	5.88±0.03 <sup>a,3,4</sup>	5.91±0.04 <sup>a,3,4</sup>	5.74±0.57 <sup>a,3,4</sup>	6.09±0.02 <sup>c,2,3</sup>	6.20±0.03 <sup>b,1,2</sup>	6.37±0.05 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	5.72±0.07 <sup>a,6</sup>	5.86±0.03 <sup>a,5</sup>	5.94±0.03 <sup>a,4</sup>	6.15±0.04 <sup>a,3</sup>	6.17±0.02 <sup>b,2,3</sup>	6.23±0.04 <sup>b,2</sup>	6.35±0.05 <sup>a,1</sup>

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-4) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

### 3.2 การสังเกตการเปลี่ยนแปลงความชื้นสีของดินด้วยตาเปล่า

จากการศึกษาค่าความชื้นสีของดินตลอดระยะเวลาทำการทดลอง (วันที่ 0-7) ของการศึกษาถึงผลของการเติมสารอาหารชนิดต่างๆ ในการย่อยสลายน้ำมัน 4 ชนิดร่วมกับการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 72-75 พบว่าเมื่อมีการเติมน้ำมันทั้ง 4 ชนิด และ/หรือเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ทำให้ความชื้นสีของดินเพิ่มขึ้นจาก + เป็น ++ ส่วนชุดที่มีการเติมสารอาหารตั้งแต่ 1 ชนิดขึ้นไปร่วมกับการเติมน้ำมันทั้ง 4 ชนิด และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่าทำให้ความชื้นสีของดินเพิ่มขึ้นเป็น +++ และเมื่อทำการศึกษาผ่านมาเป็นระยะเวลา 7 วันของการทดลองพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงความชื้นสีของดินในทุกชุดการทดลอง

ตารางที่ 72 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความชื้นสีของดินในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

ระยะเวลาทำการทดลอง	ค่าความชื้นสีของดิน						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	+	++	++	+++	+++	+++	+++
วันที่ 3	+	++	++	+++	+++	+++	+++
วันที่ 7	+	++	++	+++	+++	+++	+++

#### หมายเหตุ:

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-1) เติมดินอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-1) เติมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-1) เติมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-1) เติมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-1) เติมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-1) เติมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-1) เติมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%



ตารางที่ 73 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความชื้นของดินในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน

ระยะเวลา ทำการ ทดลอง	ค่าความชื้นของดิน						
	ชุดควบคุม ที่ 1	ชุดควบคุม ที่ 2	ชุดควบคุม ที่ 3	ชุดการ ทดลอง 1	ชุดการ ทดลอง 2	ชุดการ ทดลอง 3	ชุดการ ทดลอง 4
วันที่ 0	+	++	++	+++	+++	+++	+++
วันที่ 3	+	++	++	+++	+++	+++	+++
วันที่ 7	+	++	++	+++	+++	+++	+++

หมายเหตุ:

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-2) เติมดินอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-2) เติมดิน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-2) เติมดิน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-2) เติมดิน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-2) เติมดิน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-2) เติมดิน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-2) เติมดิน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

ตารางที่ 74 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความชื้นของดินในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ระยะเวลา ทำการ ทดลอง	ค่าความชื้นของดิน						
	ชุดควบคุม ที่ 1	ชุดควบคุม ที่ 2	ชุดควบคุม ที่ 3	ชุดการ ทดลอง 1	ชุดการ ทดลอง 2	ชุดการ ทดลอง 3	ชุดการ ทดลอง 4
วันที่ 0	+	++	++	+++	+++	+++	+++
วันที่ 3	+	++	++	+++	+++	+++	+++
วันที่ 7	+	++	++	+++	+++	+++	+++

หมายเหตุ:

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-3) เติมดินอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-3) เติมดิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-3) เติมดิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-3) เติมดิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-3) เติมดิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-3) เติมดิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-3) เติมดิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

ตารางที่ 75 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าความชื้นสีของดินในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

ระยะเวลา ทำการ ทดลอง	ค่าความชื้นสีของดิน						
	ชุดควบคุม ที่ 1	ชุดควบคุม ที่ 2	ชุดควบคุม ที่ 3	ชุดการ ทดลอง 1	ชุดการ ทดลอง 2	ชุดการ ทดลอง 3	ชุดการ ทดลอง 4
วันที่ 0	+	++	++	+++	+++	+++	+++
วันที่ 3	+	++	++	+++	+++	+++	+++
วันที่ 7	+	++	++	+++	+++	+++	+++

หมายเหตุ:

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-4) เติมดินอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-4) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-4) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-4) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-4) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-4) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-4) เติมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

### 3.3 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

จากการศึกษาผลของการเติมสารอาหารร่วมกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 เพื่อส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมัน 4 ชนิด ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในดิน ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินเริ่มต้นเท่ากับ  $3.75 \pm 0.21 \times 10^5$  CFU/g และพบว่าในชุดการทดลองที่ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 1% และน้ำมันดิบ 1% ให้ผลการทดลองใกล้เคียงกันดังนี้ ภายในระยะเวลา 7 วันของการทดลองพบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมเฉพาะน้ำมันดีเซล 1% (C2-1) หรือ น้ำมันดิบ 1% (C2-3) และในชุดการทดลองที่มีการเติมน้ำมันดีเซล 1% (C3-1) หรือ น้ำมันดิบ 1% (C3-3) ร่วมกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินที่เพิ่มขึ้น 1,296.65%, 1,260.61%, 1,042.86% และ 1,153.97% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% ร่วมกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารในชุด T1-1 และชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบ 1% ร่วมกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารในชุด T1-3 ทำให้มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินในวันที่ 7 ของการทดลองเพิ่มขึ้น 9,148.12% และ 37,537.80% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหาร และชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบ 1% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารในชุด T2-1, T3-1, T2-3 และ T3-3 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินในวันที่ 7 ของการทดลองเพิ่มขึ้น 55,047.06%, 64,122.22%, 48,103.13% และ 57,616.54% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหาร และชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบ 1% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารในชุด T4-1 และ T4-3 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินในวันที่ 7 ของการทดลองเพิ่มขึ้น 69,017.65% และ 69,431.25% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 76 และ 78

ส่วนชุดการทดลองที่ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน 1% ผลการศึกษาพบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมเฉพาะน้ำมันเบนซิน 1% ภายในระยะเวลา 7 วันของการทดลอง มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง และในชุดการทดลองที่มีการเติมน้ำมันเบนซิน 1% ร่วมกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ภายในระยะเวลา 7 วันของการทดลอง พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินเพิ่มขึ้น 877.94% เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซิน 1% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารในชุด T1-2 ทำให้มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินในวันที่ 7 ของการทดลองเพิ่มขึ้น 7,400.00% เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซิน 1% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารในชุด T2-2 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินในวันที่ 7 ของการทดลองเพิ่มขึ้น 7,475.76% เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง และชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซิน 1% และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารในชุด T3-2 และ T4-2 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินในวันที่

7 ของการทดลองเพิ่มขึ้น 8,407.46% และ 8,870.59% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 77

ส่วนชุดการทดลองที่ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1% ผลการศึกษาพบว่าในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1% และชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1% ร่วมกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ภายในระยะเวลา 7 วันของการทดลอง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้น 25.15% และ 655.56% ตามลำดับ และชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1% ร่วมกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารในชุด T1-4 และ T2-4 ทำให้มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินที่เพิ่มขึ้น 42,606.77% และ 53,659.40% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1% ร่วมกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารในชุด T3-4 และ T4-4 มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในดินในวันที่ 7 ของการทดลองเพิ่มขึ้น 68,418.52% และ 69,900.00% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในวันแรกของการทดลอง

ตารางที่ 76 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

ระยะเวลา ทำการ ทดลอง	หัวเชื้อที่เตรียม	เชื้อเริ่มต้นที่ ใส่ในชุด ทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)						
			ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	$1.17 \pm 0.02 \times 10^9$	$1.95 \times 10^8$	$3.75 \pm 0.21 \times 10^{5 a,2}$	$3.58 \pm 0.12 \times 10^{5 b,2}$	$1.33 \pm 0.02 \times 10^{6 b,1}$	$1.33 \pm 0.00 \times 10^{6 c,1}$	$1.36 \pm 0.02 \times 10^{6 c,1}$	$1.35 \pm 0.01 \times 10^{6 c,1}$	$1.36 \pm 0.01 \times 10^{6 c,1}$
วันที่ 3			$4.12 \pm 0.09 \times 10^{5 a,4}$	$4.00 \pm 0.02 \times 10^{6 a,3}$	$1.01 \pm 0.01 \times 10^{7 a,2}$	$1.23 \pm 0.02 \times 10^{7 a,2}$	$1.30 \pm 0.02 \times 10^{7 b,1}$	$1.43 \pm 0.01 \times 10^{7 b,1}$	$1.62 \pm 0.02 \times 10^{7 b,1}$
วันที่ 7			$4.10 \pm 0.15 \times 10^{5 a,4}$	$5.00 \pm 0.14 \times 10^{6 a,3}$	$1.52 \pm 0.02 \times 10^{7 a,2}$	$1.23 \pm 0.02 \times 10^{8 a,2}$	$7.50 \pm 0.23 \times 10^{8 a,1}$	$8.67 \pm 0.22 \times 10^{8 a,1}$	$9.40 \pm 0.20 \times 10^{8 a,1}$
% การ เพิ่มขึ้น			9.33	1,296.65	1,042.86	9,148.12	55,047.06	64,122.22	69,017.65

หมายเหตุ:

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-1) เติมน้ำอย่างเดียวน

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตารางที่ 77 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน

ระยะเวลา ทำการ ทดลอง	หัวเชื้อที่เตรียม	เชื้อเริ่มต้นที่ ใส่ในชุด ทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)						
			ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	$1.17 \pm 0.02 \times 10^9$	$1.95 \times 10^8$	$3.75 \pm 0.21 \times 10^{5 a,2}$	$3.67 \pm 0.12 \times 10^{5 a,2}$	$1.26 \pm 0.02 \times 10^{6 b,1}$	$1.30 \pm 0.02 \times 10^{6 b,1}$	$1.32 \pm 0.02 \times 10^{6 b,1}$	$1.34 \pm 0.02 \times 10^{6 c,1}$	$1.36 \pm 0.02 \times 10^{6 c,1}$
วันที่ 3			$4.12 \pm 0.09 \times 10^{5 a,3}$	$3.70 \pm 0.13 \times 10^{5 a,3}$	$1.25 \pm 0.01 \times 10^{7 b,2}$	$1.34 \pm 0.02 \times 10^{7 b,2}$	$1.35 \pm 0.01 \times 10^{7 b,2}$	$1.40 \pm 0.01 \times 10^{7 b,1}$	$1.48 \pm 0.02 \times 10^{7 b,1}$
วันที่ 7			$4.10 \pm 0.15 \times 10^{5 a,3}$	$3.96 \pm 0.17 \times 10^{5 a,3}$	$1.33 \pm 0.02 \times 10^{7 a,1}$	$9.75 \pm 0.10 \times 10^{7 a,2}$	$1.00 \pm 0.02 \times 10^{8 a,1}$	$1.14 \pm 0.01 \times 10^{8 a,1}$	$1.22 \pm 0.02 \times 10^{8 a,1}$
% การ เพิ่มขึ้น			9.33	7.90	877.94	7,400.00	7,475.76	8,407.46	8,870.59

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-2) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตารางที่ 78 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ระยะเวลา ทำการ ทดลอง	หัวเชื้อที่เตรียม	เชื้อเริ่มต้นที่ ใส่ในชุด ทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)						
			ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	$1.17 \pm 0.02 \times 10^9$	$1.95 \times 10^8$	$3.75 \pm 0.21 \times 10^{5 a,2}$	$3.91 \pm 0.17 \times 10^{5 b,2}$	$1.26 \pm 0.03 \times 10^{6 b,1}$	$1.27 \pm 0.02 \times 10^{6 c,1}$	$1.28 \pm 0.04 \times 10^{6 c,1}$	$1.27 \pm 0.03 \times 10^{6 c,1}$	$1.28 \pm 0.02 \times 10^{6 c,1}$
วันที่ 3			$4.12 \pm 0.09 \times 10^{5 a,3}$	$4.18 \pm 0.26 \times 10^{6 a,3}$	$8.87 \pm 0.10 \times 10^{6 b,2}$	$1.24 \pm 0.19 \times 10^{7 b,2}$	$1.43 \pm 0.14 \times 10^{7 b,2}$	$1.43 \pm 0.14 \times 10^{7 b,2}$	$1.53 \pm 0.16 \times 10^{7 b,1}$
วันที่ 7			$4.10 \pm 0.15 \times 10^{5 a,3}$	$5.32 \pm 0.25 \times 10^{6 a,3}$	$1.58 \pm 0.02 \times 10^{7 a,2}$	$4.78 \pm 0.02 \times 10^{8 a,2}$	$6.17 \pm 0.20 \times 10^{8 a,1}$	$7.33 \pm 0.20 \times 10^{8 a,1}$	$8.90 \pm 0.23 \times 10^{8 a,1}$
% การ เพิ่มขึ้น			9.33	1,260.61	1,153.97	37,537.80	48,103.13	57,616.54	69,431.25

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-3) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$



ตารางที่ 79 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

ระยะเวลา ทำการ ทดลอง	หัวเชื้อที่เตรียม	เชื้อเริ่มต้นที่ ใส่ในชุด ทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)						
			ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	$1.17 \pm 0.02 \times 10^9$	$1.95 \times 10^8$	$3.75 \pm 0.21 \times 10^{5 a,3}$	$3.26 \pm 0.12 \times 10^{5 b,3}$	$1.26 \pm 0.03 \times 10^{6 b,2}$	$1.33 \pm 0.02 \times 10^{6 c,1}$	$1.33 \pm 0.01 \times 10^{6 c,1}$	$1.35 \pm 0.02 \times 10^{6 c,1}$	$1.36 \pm 0.02 \times 10^{6 c,1}$
วันที่ 3			$4.12 \pm 0.09 \times 10^{5 a,4}$	$4.17 \pm 0.12 \times 10^{5 a,4}$	$9.15 \pm 0.50 \times 10^{6 a,3}$	$1.13 \pm 0.02 \times 10^{7 b,3}$	$1.35 \pm 0.02 \times 10^{7 b,2}$	$1.38 \pm 0.02 \times 10^{7 b,2}$	$1.60 \pm 0.01 \times 10^{7 b,1}$
วันที่ 7			$4.10 \pm 0.15 \times 10^{5 a,4}$	$4.08 \pm 0.16 \times 10^{5 a,4}$	$9.52 \pm 0.58 \times 10^{6 a,3}$	$5.68 \pm 0.22 \times 10^{8 a,2}$	$7.15 \pm 0.22 \times 10^{8 a,2}$	$9.25 \pm 0.30 \times 10^{8 a,1}$	$9.52 \pm 0.15 \times 10^{8 a,1}$
% การ เพิ่มขึ้น			9.33	25.15	655.56	42,606.77	53,659.40	68,418.52	69,900.00

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-4) เติมนินอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-4) เติมนิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-4) เติมนิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-4) เติมนิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-4) เติมนิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-4) เติมนิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-4) เติมนิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

### 3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำที่หลงเหลือจากการย่อยสลาย

จากการศึกษาถึงผลของการเติมสารอาหารชนิดต่าง ๆ ต่อการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ร่วมกับแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ผลการศึกษาในทุกชุดการทดลองของทุกชุดการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำลดลงภายในวันที่ 3 และ 7 ของการทดลองทุกชุดการทดลอง ยกเว้นชุดควบคุมที่ 1 ที่มีแต่ดินเท่านั้นที่ไม่มีการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 80-83

ตารางที่ 80 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Gallic acid equivalent (GAE)/1 g)						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	754.72±94.34 <sup>a,5</sup>	3,176.10±71.43 <sup>a,4</sup>	3,327.04±60.65 <sup>a,4</sup>	4,213.84±288.21 <sup>a,3</sup>	4,874.21±57.64 <sup>a,12</sup>	5,018.87±53.37 <sup>a,1</sup>	4,773.58±98.04 <sup>a,2</sup>
วันที่ 3	754.72±49.92 <sup>a,5</sup>	3,081.76±23.74 <sup>ab,4</sup>	3,125.79±53.37 <sup>b,4</sup>	4,088.05±108.93 <sup>ab,3</sup>	4,672.96±23.74 <sup>b,2</sup>	4,842.77±28.82 <sup>b,1</sup>	4,654.09±28.82 <sup>a,2</sup>
วันที่ 7	754.72±56.34 <sup>a,5</sup>	2,987.42±28.82 <sup>b,4</sup>	3,037.74±18.06 <sup>b,4</sup>	3,899.37±28.82 <sup>b,3</sup>	4,465.41±28.30 <sup>b,2</sup>	4,635.22±10.89 <sup>c,1</sup>	4,433.96±18.87 <sup>b,2</sup>
% การลดลงของ ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด	0.00	5.94	8.70	7.46	8.39	7.64	7.11

หมายเหตุ:

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-1) เติมน้ำอย่างเดียวน

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-1) เติมน้ำ + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่ต่างกันแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตารางที่ 81 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Gallic acid equivalent (GAE)/1 g)						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	754.72±94.34 <sup>a,5</sup>	3,150.94±49.92 <sup>a,4</sup>	3,119.50±28.82 <sup>a,4</sup>	4,798.74±78.55 <sup>a,3</sup>	4,974.84±57.64 <sup>a,2</sup>	5,198.11±13.34 <sup>a,1</sup>	5,050.31±66.26 <sup>a,2</sup>
วันที่ 3	754.72±49.92 <sup>a,5</sup>	3,106.92±38.90 <sup>ab,4</sup>	3,056.60±15.41 <sup>b,4</sup>	4,691.82±28.82 <sup>ab,3</sup>	4,811.32±44.91 <sup>b,2</sup>	5,044.03±39.28 <sup>b,1</sup>	4,993.71±66.26 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	754.72±56.34 <sup>a,4</sup>	2,937.11±43.57 <sup>b,3</sup>	2,962.26±18.06 <sup>b,3</sup>	4,465.41±39.28 <sup>b,2</sup>	4,490.57±28.30 <sup>c,2</sup>	4,811.32±18.87 <sup>c,1</sup>	4,861.64±28.82 <sup>b,1</sup>
% การลดลงของ ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด	0.00	6.79	5.04	6.95	9.73	7.44	3.74

หมายเหตุ:

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-2) เติมน้ำอย่างเดียวน

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-2) เติมน้ำ + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-2) เติมน้ำ + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-2) เติมน้ำ + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-2) เติมน้ำ + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-2) เติมน้ำ + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-2) เติมน้ำ + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่ต่างกันแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตารางที่ 82 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Gallic acid equivalent (GAE)/1 g)						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	754.72±94.34 <sup>a,6</sup>	3157.23±47.48 <sup>a,5</sup>	3,136.79±39.28 <sup>a,5</sup>	4,031.45±47.48 <sup>a,4</sup>	4,402.52±39.28 <sup>a,5</sup>	5,144.65±28.82 <sup>a,1</sup>	4,938.68±39.28 <sup>a,2</sup>
วันที่ 3	754.72±49.92 <sup>a,7</sup>	3,125.79±39.28 <sup>a,6</sup>	3,037.74±18.87 <sup>b,5</sup>	3,911.95±23.74 <sup>b,4</sup>	4,306.60±28.30 <sup>b,3</sup>	5,023.58±28.30 <sup>b,1</sup>	4,849.06±15.41 <sup>b,2</sup>
วันที่ 7	754.72±56.34 <sup>a,7</sup>	3,056.60±18.87 <sup>b,5</sup>	2,968.55±21.79 <sup>c,6</sup>	3,666.67±28.82 <sup>c,4</sup>	4,198.11±36.13 <sup>c,3</sup>	4,874.21±10.89 <sup>c,1</sup>	4,783.02±10.89 <sup>c,2</sup>
% การลดลงของ ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด	0.00	3.19	5.51	8.98	4.64	5.26	3.24

หมายเหตุ:

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-3) เติมนินอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-3) เติมนิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-3) เติมนิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-3) เติมนิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-3) เติมนิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-3) เติมนิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-3) เติมนิน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตัวเลขที่ต่างกันแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

ตารางที่ 83 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายน้ำในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Gallic acid equivalent (GAE)/1 g)						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	754.72±94.34 <sup>a,5</sup>	3,113.21±68.03 <sup>a,4</sup>	3,150.94±49.92 <sup>a,4</sup>	4,440.25±85.08 <sup>a,3</sup>	4,874.21±57.64 <sup>a,2</sup>	5,088.05±28.82 <sup>a,1</sup>	5,018.87±49.92 <sup>a,1</sup>
วันที่ 3	754.72±49.92 <sup>a,6</sup>	2,974.84±26.68 <sup>b,5</sup>	3,100.63±18.87 <sup>a,4</sup>	4,402.52±85.08 <sup>a,3</sup>	4,792.45±56.34 <sup>a,2</sup>	4,974.84±10.89 <sup>b,1</sup>	4,937.11±21.79 <sup>b,1</sup>
วันที่ 7	754.72±56.34 <sup>a,6</sup>	2,918.24±28.82 <sup>b,5</sup>	2,987.42±9.43 <sup>b,4</sup>	4,257.86±28.82 <sup>b,3</sup>	4,660.38±18.06 <sup>b,2</sup>	4,849.06±37.74 <sup>c,1</sup>	4,811.32±18.87 <sup>c,1</sup>
% การลดลงของ ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด	0.00	6.26	5.19	4.11	4.39	4.70	4.14

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-4) เดิมดินอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

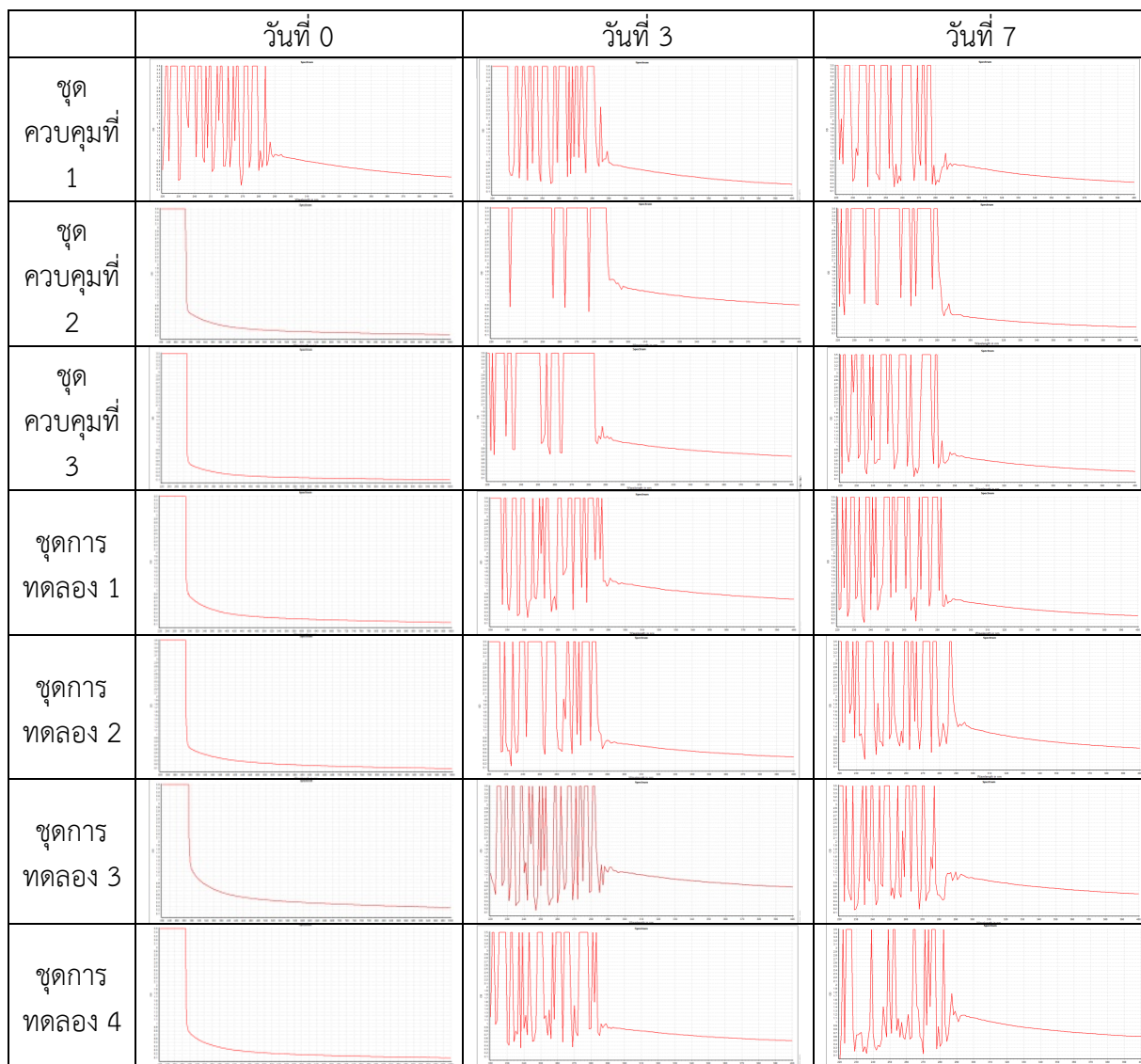
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

### 3.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน

จากการศึกษาเกี่ยวกับผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน 4 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 84-87 พบว่าชุดการทดลองที่ 4 ที่มีการเติมสารอาหาร (สารอาหารกลุ่มไนโตรเจน, Yeast extract 1.0%; คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย, น้ำตาลกลูโคส 1.0% และ ฟอสฟอรัส,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) และ 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  เพิ่มความสามารถในการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมัน 1% ทั้ง 4 ชนิด ที่ปนเปื้อนในดินร่วมกับแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ได้ดีที่สุดจากการดูค่าการดูดกลืนแสง (Spectrogram)

ตารางที่ 84 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซล



หมายเหตุ: ชุดควบคุมที่ 1 (C1-1) เดิมดินอย่างเดียว, ชุดควบคุมที่ 2 (C2-1) เดิมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0%, ชุดควบคุมที่ 3 (C3-1) เดิมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1, ชุดการทดลองที่ 1 (T1-1) เดิมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%, ชุดการทดลองที่ 2 (T2-1) เดิมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%, ชุดการทดลองที่ 3 (T3-1) เดิมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%, ชุดการทดลองที่ 4 (T4-1) เดิมดิน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

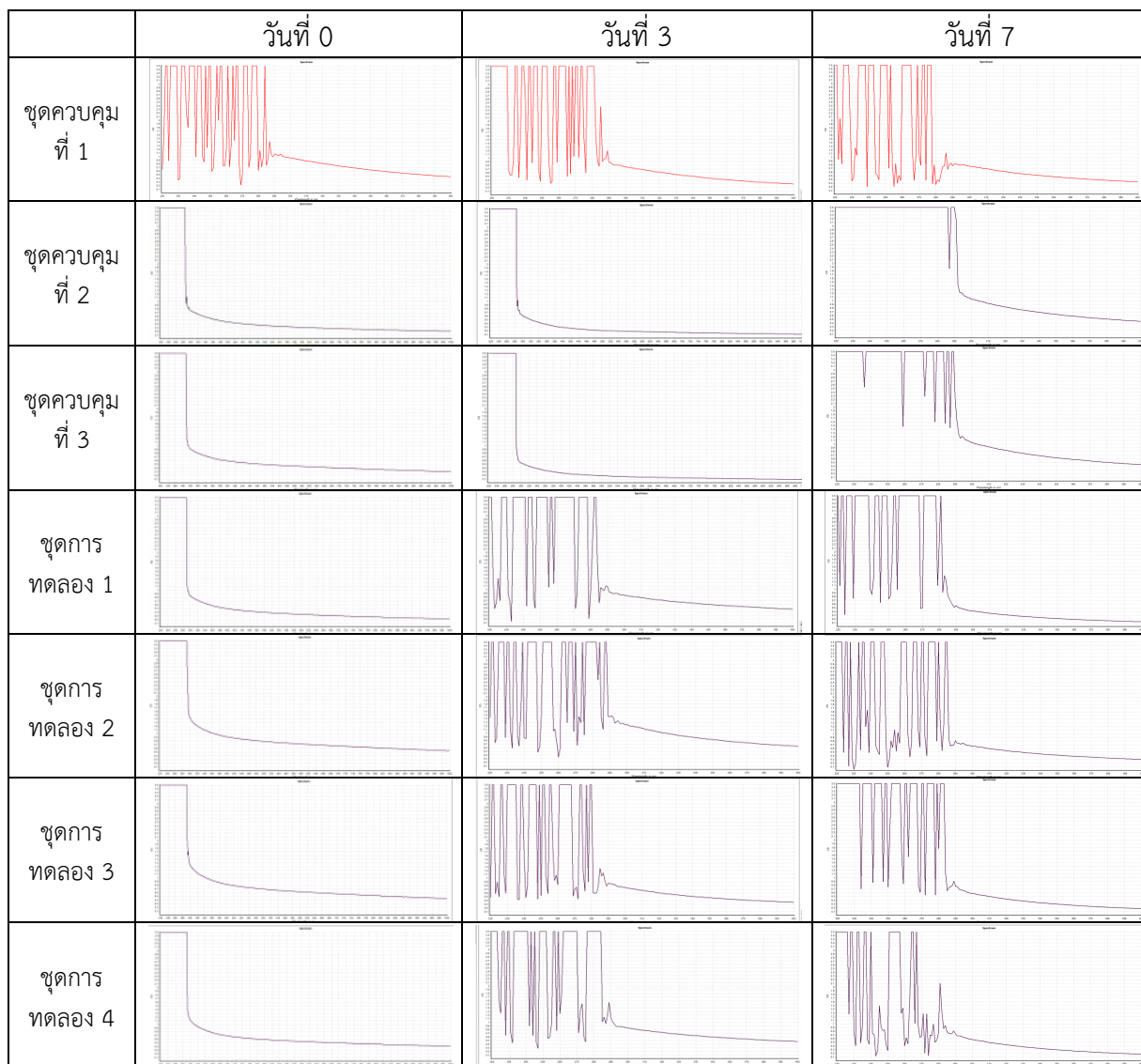


ตารางที่ 85 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน

	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 7
ชุดควบคุมที่ 1			
ชุดควบคุมที่ 2			
ชุดควบคุมที่ 3			
ชุดการทดลอง 1			
ชุดการทดลอง 2			
ชุดการทดลอง 3			
ชุดการทดลอง 4			

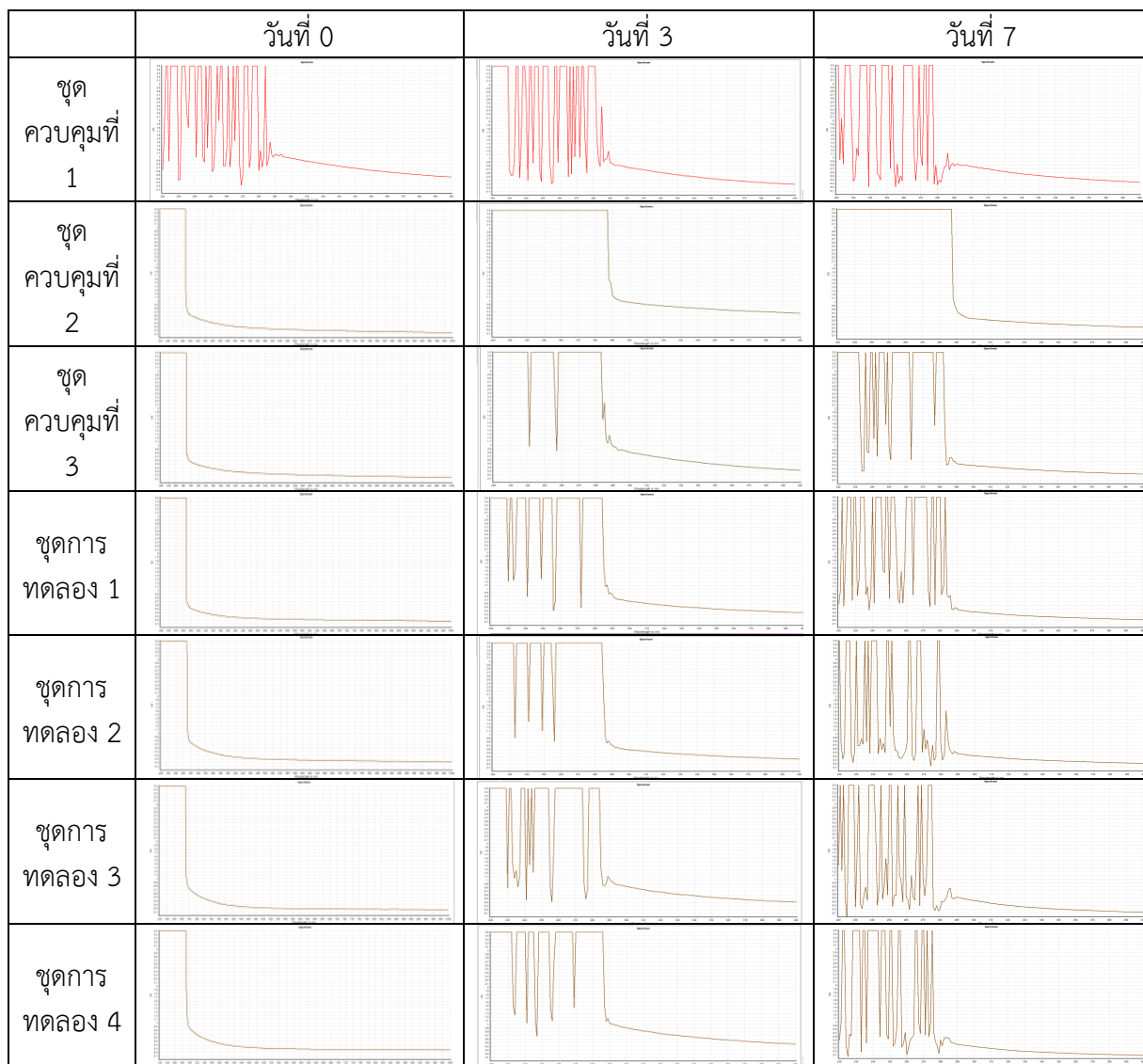
หมายเหตุ: ชุดควบคุมที่ 1 (C1-2) เติบโตอย่างเดียว, ชุดควบคุมที่ 2 (C2-2) เติบโต + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0%, ชุดควบคุมที่ 3 (C3-2) เติบโต + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1, ชุดการทดลองที่ 1 (T1-2) เติบโต + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% , ชุดการทดลองที่ 2 (T2-2) เติบโต + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%, ชุดการทดลองที่ 3 (T3-2) เติบโต + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%, ชุดการทดลองที่ 4 (T4-2) เติบโต + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

ตารางที่ 86 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบ



หมายเหตุ: ชุดควบคุมที่ 1 (C1-3) เติมน้ำมันอย่างเดียว, ชุดควบคุมที่ 2 (C2-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0%, ชุดควบคุมที่ 3 (C3-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1, ชุดการทดลองที่ 1 (T1-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% , ชุดการทดลองที่ 2 (T2-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%, ชุดการทดลองที่ 3 (T3-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%, ชุดการทดลองที่ 4 (T4-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

ตารางที่ 87 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว



หมายเหตุ: ชุดควบคุมที่ 1 (C1-4) เติมน้ำมันอย่างเดียว, ชุดควบคุมที่ 2 (C2-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0%, ชุดควบคุมที่ 3 (C3-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1, ชุดการทดลองที่ 1 (T1-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% , ชุดการทดลองที่ 2 (T2-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%, ชุดการทดลองที่ 3 (T3-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%, ชุดการทดลองที่ 4 (T4-4) เติมน้ำมัน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1%

### 3.6 การวิเคราะห์ค่าซีไอดี

จากการศึกษาถึงผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน 4 ชนิด โดยทำการวิเคราะห์ค่าซีไอดี ดังแสดงในตารางที่ 88-91 พบว่าเมื่อทำการเติมปริมาณสารอาหารจำนวนที่มากขึ้นจะทำให้ค่าซีไอดีเพิ่มขึ้นตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาการย่อยสลายน้ำมัน 4 ชนิด ภายในระยะเวลา 7 วัน พบว่าทุกชุดการทดลองมีการลดลงของค่าซีไอดี

ตารางที่ 88 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณซีโอดีในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	50.75±2.87 <sup>a,7</sup>	10,950.00±57.74 <sup>a,6</sup>	11,466.67±57.74 <sup>a,5</sup>	23,575.00±125.83 <sup>a,4</sup>	24,933.33±152.75 <sup>a,3</sup>	25,400.00±100.00 <sup>a,2</sup>	27,275.00±189.30 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	52.00±2.65 <sup>a,7</sup>	9,866.67±152.75 <sup>b,6</sup>	10,333.33±57.74 <sup>b,5</sup>	20,533.33±57.74 <sup>b,4</sup>	23,766.67±152.75 <sup>b,3</sup>	24,933.33±152.75 <sup>b,2</sup>	26,133.33±152.75 <sup>b,1</sup>
% การเพิ่มขึ้น/ การลดลง	+2.46	-9.89	-9.88	-12.90	-4.68	-1.84	-4.19

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-1) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-1) เติมน้ำมัน + น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตารางที่ 89 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณซีไอดีในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	50.75±2.87 <sup>a,7</sup>	10,166.67±152.75 <sup>a,6</sup>	10,433.33±152.75 <sup>a,5</sup>	20,733.33±57.74 <sup>a,4</sup>	21,900.00±100.00 <sup>a,3</sup>	23,733.33±152.75 <sup>a,2</sup>	25,733.33±152.75 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	52.00±2.65 <sup>a,7</sup>	9,600.00±100.00 <sup>b,6</sup>	9,866.67±57.74 <sup>b,5</sup>	19,833.33±57.74 <sup>b,4</sup>	21,533.33±57.74 <sup>b,3</sup>	22,633.33±57.74 <sup>b,2</sup>	24,666.67±152.75 <sup>b,1</sup>
% การเพิ่มขึ้น/ การลดลง	+2.46	-5.57	-5.43	-4.34	-1.67	-4.63	-4.15

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-2) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-2) เติมน้ำมัน + น้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตารางที่ 90 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณซีไอดีในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	50.75±2.87 <sup>a,6</sup>	13,733.33±150.00 <sup>a,5</sup>	13,625.00±150.00 <sup>a,5</sup>	25,225.00±95.74 <sup>a,4</sup>	27,900.00±141.42 <sup>a,3</sup>	29,325.00±95.74 <sup>a,2</sup>	30,275.00±150.00 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	52.00±2.65 <sup>a,6</sup>	12,866.67±57.74 <sup>b,5</sup>	12,833.33±115.47 <sup>b,5</sup>	24,800.00±100.00 <sup>b,4</sup>	27,566.67±57.74 <sup>b,3</sup>	24,200.00±100.00 <sup>b,2</sup>	29,333.33±57.74 <sup>b,1</sup>
% การเพิ่มขึ้น/ การลดลง	+2.46	-6.31	-5.81	-1.68	-1.19	-17.48	-3.11

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-3) เติมน้ำมันอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-3) เติมน้ำมัน + น้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตารางที่ 91 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และสารอาหารต่อปริมาณซีไอดีในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

ระยะเวลา ทำการทดลอง	ค่าซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	ชุดควบคุมที่ 1	ชุดควบคุมที่ 2	ชุดควบคุมที่ 3	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
วันที่ 0	50.75±2.87 <sup>a,6</sup>	13,475.00±95.74 <sup>a,5</sup>	13,525.00±150.00 <sup>a,5</sup>	24,475.00±125.83 <sup>a,4</sup>	26,525.00±206.16 <sup>a,3</sup>	28,500.00±163.30 <sup>a,2</sup>	29,700.00±141.42 <sup>a,1</sup>
วันที่ 7	52.00±2.65 <sup>a,7</sup>	13,100.00±100.00 <sup>b,6</sup>	12,766.67±57.74 <sup>b,5</sup>	23,166.67±57.74 <sup>b,4</sup>	25,400.00±100.00 <sup>b,3</sup>	27,733.33±152.75 <sup>b,2</sup>	28,566.67±57.74 <sup>b,1</sup>
% การเพิ่มขึ้น/ การลดลง	+2.46	-2.78	-5.61	-5.35	-4.24	-2.69	-3.82

**หมายเหตุ:**

ชุดควบคุมที่ 1 (C1-4) เดิมดินอย่างเดียว

ชุดควบคุมที่ 2 (C2-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0%

ชุดควบคุมที่ 3 (C3-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลองที่ 1 (T1-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 2 (T2-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0%

ชุดการทดลองที่ 3 (T3-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1.0% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5%

ชุดการทดลองที่ 4 (T4-4) เดิมดิน + น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1.0% + *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 + น้ำตาลกลูโคส (แหล่งคาร์บอน) 1% + Yeast extract (แหล่งไนโตรเจน) 1.0% + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (แหล่งของฟอสฟอรัส) 0.5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1%

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05



## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

#### สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารปิโตรเลียม ผลการศึกษาพบว่าจากแบคทีเรียทั้งหมด 30 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารอิมัลซิไฟเออร์ โดยมีแบคทีเรียที่มีศักยภาพมากที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารอิมัลซิไฟเออร์ คือ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 และรองลงมาคือ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ ไม่เป็นเชื้อก่อโรคทั้งในมนุษย์ สัตว์และพืช รวมทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำพวกไลโปเปปไทด์ จากการศึกษาภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนถึงความสามารถในการเจริญ, ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันที่ผ่านการย่อยสลาย, ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลายน้ำมันและปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมัน แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยสามารถเจริญและย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนดีกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและน้ำมันดิบมากที่สุด รองลงมาคือ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ในทั้งสภาวะที่ใช้ออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยกเว้นในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในสภาวะที่มีออกซิเจน *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงกว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

2. ต่อมาทำการศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในดิน ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถช่วยเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ความเข้มข้น 0.5%, 1.0% และ 1.5% รวมทั้งสามารถย่อยสลายสารตัวกลางได้ดีกว่าจุลินทรีย์ในดิน ดังนั้นแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 จึงเป็นแบคทีเรีย Bioaugmentator เพื่อช่วยฟื้นฟูดินที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วต่อไป

3. ต่อมาทำการศึกษาถึงการเติมสารอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ สารอาหารกลุ่มไนโตรเจน (Yeast extract 1%), คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย (น้ำตาลกลูโคส 1%), ฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) และ 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  เพื่อส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมัน 1% ทั้ง 4 ชนิด ที่ปนเปื้อนในดิน และเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่มีการเติมสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน (Yeast extract 1%), คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย (น้ำตาลกลูโคส 1%), ฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) และ 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  สามารถเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันความเข้มข้น 1% 4 ชนิด ได้แก่ ดีเซล, เบนซิน, น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ร่วมกับจุลินทรีย์ในดินได้ดีที่สุด ดังนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ร่วมกับสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน (Yeast extract 1%), คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย (น้ำตาลกลูโคส 1%), ฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%)

และ 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> น่าจะเป็นกระบวนการที่ดีในการฟื้นฟูสภาพดินหรือสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันดีเซล, เบนซิน, น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและน้ำมันดิบ

### อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน 4 ชนิด (น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ) โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่า จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันมักเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำหน้าที่ลดแรงตึงระหว่างผิวของน้ำและน้ำมัน และช่วยในการกระจายตัวของน้ำมันเป็นโมเลกุลเล็กๆ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีสำหรับกระบวนการย่อยสลายน้ำมันและฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำมันด้วย (Banat 1995; Banat et al., 2000b; Kumar et al., 2007) รวมทั้งสอดคล้องกับการรายงานของ Singh and Cameotra (2013) ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ในการกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนจำพวกปิโตรเลียม และโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดิน ผลการศึกษาพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์มีความสามารถในการนำไปใช้ในการกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนจำพวกปิโตรเลียมและโลหะหนัก โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ประกอบด้วย เซอร์แฟคติน (Surfactin) และเฟนจีซิน (fengycin) ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* A21 สามารถทำความสะอาดสารที่ปนเปื้อนกลุ่มสารไฮโดรคาร์บอนด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงถึง 64.5% และทำความสะอาดสารกลุ่มโลหะหนักได้แก่ แคดเมียม โคบอลต์ ตะกั่ว นิกเกิล ทองแดงและสังกะสี เท่ากับ 44.2%, 35.4%, 40.3%, 32.2%, 26.2% และ 32.07% ตามลำดับ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) คือในโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน (Chioma et al., 2013) โดยมีรายงานที่กล่าวว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิตวงลิโปเปปไทด์ (Cyclic lipopeptide) เรียกว่าเซอร์แฟคติน (Surfactin) หรือ ซับทิลิซิน (Subtilisin) (Arima et al., 1968; Bernheimer and Avigad, 1970) ซึ่งแบคทีเรียที่พบในครั้งนี้เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus subtilis* เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบ *Bacillus* ชนิดอื่น ๆ ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น *Bacillus licheniformis* ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ที่มีชื่อเรียกคือ ไลเคนโนซิน (Lichenysin) (Pacwa-Plociniczak et al., 2011)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และสอดคล้องกับรายงานของ Fritsche and Hofrichter (2000) ที่พบว่าการย่อยสลายน้ำมันภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจะมีประสิทธิภาพมากกว่าภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน รวมทั้งมีการกล่าวว่าสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนมีผลต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพสามารถเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพที่ช้ามาก โดยมีตัวรับอิเล็กตรอน ได้แก่ ไนเตรต ซัลเฟต ไอรอน

(3+) แอมกาไนต์ และมีเทน ซึ่งแตกต่างกับในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Burland and Edwards, 1999; Salminen et al., 2004) และในการศึกษาคั้งนี้พบว่าภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถย่อยสลายน้ำมันเบนซินได้ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว น้ำมันดีเซล และน้ำมันดิบ ตามลำดับ

รายละเอียดของการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดทางชีวภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่าลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน และน้ำมันดิบ ในสภาวะที่มีออกซิเจนลดลงได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยกเว้นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วที่มีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกัน ในวันสุดท้ายของการทดลอง และลักษณะชั้นของน้ำมันในวันสุดท้ายของการทดลองเหลือน้อยที่สุดคือ น้ำมันเบนซิน และน้ำมันดีเซล รองลงมาเป็นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ นอกจากนี้จากการดูค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความคลื่น 220 – 400 นาโนเมตร พบว่าน้ำมันเบนซินถูกย่อยสลายได้เร็วที่สุดภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน รองลงมาคือ น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว น้ำมันดีเซล และน้ำมันดิบ ภายในระยะเวลาการศึกษา 35 วัน และน้ำมันเบนซินถูกย่อยสลายจนไม่สามารถสังเกตเห็นฟิสิกได้ตั้งแต่วันที่ 21 ของการทดลอง และในวันที่ 35 น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว ถูกย่อยสลายจนไม่สามารถสังเกตเห็นฟิสิกได้ ส่วนน้ำมันดิบ คงเหลือจำนวน 9 ฟิสิก ที่ค่าความยาวคลื่น 222, 228, 236, 244, 246, 256, 260, 270 และ 273 นาโนเมตร และจำนวนฟิสิกในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่มีค่า O.D. = 3.5 ที่คงเหลือในวันที่ 35 เท่ากับ 0, 1 (ที่ค่าความยาวคลื่น 229 นาโนเมตร), 3 (ที่ค่าความยาวคลื่น 240, 254, 273 นาโนเมตร) และ 9 (ที่ค่าความยาวคลื่น 220, 228, 234, 240, 248, 255, 267, 272 และ 278 นาโนเมตร) ตามลำดับ จากการศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น พบว่ามีเพียงการย่อยสลายน้ำมันดิบในช่วงวันที่ 7-14 ในทั้ง 2 สภาวะที่สามารถตรวจพบการเกิดก๊าซขึ้น ผลการศึกษาพบว่าการย่อยสลายน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซินและน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วทั้ง 2 สภาวะ ไม่พบการสะสมของก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น ส่วนการย่อยสลายน้ำมันดิบพบการสะสมก๊าซทั้งหมดในวันที่ 7-14 ของการทดลองภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าการย่อยสลายทั้งหมดนี้เป็นกระบวนการ Biodegradation หรือ Biotransformation แต่ไม่ใช่การย่อยสลายแบบ Mineralization นั่นเอง

ส่วน *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ได้น้อยกว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ซึ่งทำให้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ถึงแม้ว่าจะเป็น *B. subtilis* แต่เป็นคนละสายพันธุ์และมีความสามารถในการย่อยสลายที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 สามารถเจริญในน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้รวดเร็วกว่าภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยทั้ง 2 สภาวะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันเบนซิน น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ ตามลำดับ ดังนั้นสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีความสำคัญอย่างยิ่ง ถึงแม้จะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกัน จากการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดทางชีวภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ทำให้ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ ในทั้ง 2 สภาวะใกล้เคียงกันในวันสุดท้ายของการทดลอง แต่ในวันที่ 28 ของการทดลอง ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว ในสภาวะที่มีออกซิเจนลดลงได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เช่นเดียวกับรายงานของ Fritsche and Hofrichter (2000) และลักษณะชั้นของน้ำมันในวันสุดท้ายของการ

ทดลองเหลือ้น้อยที่สุดคือ น้ำมันดีเซล และน้ำมันเบนซิน รองลงมาเป็นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ (ลักษณะของชั้นน้ำมันในวันที่ 35 ในสถานะที่มีออกซิเจน = 2+, 2+, 4+, 4+ และในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน = 2+, 2+, 4+, 4+) อาจจะเป็นเนื่องจากส่วนประกอบของน้ำมันดีเซลและเบนซินไม่ค่อยมีความซับซ้อนและมีความหนืดน้อยกว่าน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วและน้ำมันดิบ (Burg et al., 1997; Hussein et al., 2014; Park et al., 2013)

นอกจากนั้น จากการดูค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความคลื่น 220 – 400 นาโนเมตร พบว่า น้ำมันดีเซลถูกย่อยสลายได้เร็วที่สุดภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน รองลงมาคือ น้ำมันเบนซิน น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ ตามลำดับ ภายในระยะเวลาการศึกษา 35 วัน (จำนวนพีคในสภาวะที่มีออกซิเจนที่มีค่า O.D. = 3.5 ที่คงเหลือในวันที่ 35 เท่ากับ 0, 1 (ที่ค่าความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร), 5 (ที่ค่าความยาวคลื่น 234, 238, 257, 263 และ 274 นาโนเมตร) และ 13 (ที่ช่วงความยาวคลื่น 224, 228, 234, 238, 242, 244, 250, 254, 258, 262, 268, 273 และ 282 นาโนเมตร) ตามลำดับ และจำนวนพีคในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่มีค่า O.D. = 3.5 ที่คงเหลือในวันที่ 35 เท่ากับ 1 (ที่ช่วงความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร), 2 (ที่ช่วงความยาวคลื่น 250 และ 254 นาโนเมตร), 7 (ที่ช่วงความยาวคลื่น 222, 244, 246, 250, 256, 260 และ 264 นาโนเมตร) และ 13 (ที่ช่วงความยาวคลื่น 224, 228, 234, 238, 244, 247, 250, 255, 259, 264, 268, 274 และ 275 นาโนเมตร) ตามลำดับ)

จากการศึกษาปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้น พบว่าสามารถตรวจพบปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นเฉลี่ยในทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนมีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยพบว่ามีปริมาณก๊าซทั้งหมดในชุด Active ของน้ำมันดีเซล พบก๊าซในช่วงวันที่ 3-35 ของการทดลอง ส่วนน้ำมันอีก 3 ชนิด จะผลิตก๊าซในช่วงวันที่ 3-35 ของการทดลอง และแตกต่างจากการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 นั้นแสดงว่าการย่อยสลายบางส่วนของน้ำมันทั้ง 4 ชนิดของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 ด้วยกระบวนการ Mineralization มากกว่าการย่อยสลายน้ำมันโดย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 จากการเปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4 โดยการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันและค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วง 220 – 400 นาโนเมตร พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดได้ดีกว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SD4

ดังนั้นจึงนำ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อมาคือ การศึกษาถึงความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดที่ปนเปื้อนในดินต่อไป ผลการศึกษาพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถช่วยเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ณ ความเข้มข้น 0.5%, 1.0% และ 1.5% ได้ดีกว่าการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ในดิน

จากการศึกษาถึงค่าความเป็นกรด-ด่างพบว่าเมื่อมีการเติมน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน 0.5%, 1.0% และ 1.5% ในดินยังคงทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินค่อนข้างใกล้เคียงกันภายในระยะเวลาทำการทดลอง 35 วัน และเมื่อชุดการทดลองที่มีการเติมน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน 0.5%, 1.0% และ 1.5% รวมทั้งเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในดินที่ทำการทดลอง ผลการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของดินค่อนข้างใกล้เคียงกัน จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการเติมน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน 0.5%, 1.0% และ 1.5% รวมทั้งการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis*

สายพันธุ์ SE1 ส่งผลต่อความเป็นกรด-ด่างของดินเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นสามารถคาดการณ์ได้ว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถย่อยสลายสารในน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซินโดยทำให้ความเป็นกรด-ด่างของดินเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไปนี้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ยังคงมีความสามารถในการเจริญและย่อยสลายน้ำมันดีเซลและเบนซินได้ โดยจากการศึกษาของ Sihag et al. (2014) ได้รายงานในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 5.5-8.5 และค่าความเป็นกรด-ด่างที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนได้อยู่ระหว่าง 6.5-8.0 ที่มีการปนเปื้อนด้วยสารไฮโดรคาร์บอนปริมาณ 5-10% ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ปริมาณน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 1.5% และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากดินในชุดการทดลองมีค่าอยู่ประมาณ 5.4-5.9 จึงน่าจะทำให้การเจริญของแบคทีเรียและการย่อยสลายน้ำมันยังคงเกิดขึ้นได้

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าดินที่มีการเติมน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ ทั้งในชุดการทดลองที่เติมหรือไม่เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่าดินที่มีการเติมน้ำมัน 1.5% มีความเข้มข้นที่สุด ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน 1.0% และ 0.5% จะมีสีที่จางลงตามลำดับ และมีความเข้มข้นของดินคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง 35 วัน ดังนั้นการเติมน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซินทั้งในชุดการทดลองที่เติมหรือไม่เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของดิน ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาการย่อยสลายในชุดทดลองที่พบว่าจากการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดทางชีวภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ทำให้ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน และน้ำมันดิบ ในสถานะที่มีออกซิเจนลดลงได้ดีกว่าสถานะที่ไม่มีออกซิเจน ยกเว้นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วที่มีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกันในวันสุดท้ายของการทดลอง และลักษณะชั้นของน้ำมันในวันสุดท้ายของการทดลองเหลือน้อยที่สุด คือ น้ำมันเบนซิน และน้ำมันดีเซล รองลงมาเป็นน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในทั้ง 6 ชุดการทดลอง เพื่อแสดงถึงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ในดินหรือที่เรียกว่าแบคทีเรียประจำถิ่น (Indigenous bacteria) ผลการศึกษาพบว่าในดิน (ชุดควบคุม) มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง  $1.41 \pm 0.20 \times 10^5$  -  $6.50 \pm 1.73 \times 10^5$  CFU/g ซึ่งเป็นจำนวนแบคทีเรียในดินที่อาจจะมีย่อยกว่าแบคทีเรียในดินโดยทั่ว ๆ ไป ที่มักจะมีย่อยกว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในช่วง  $10^6$ - $10^9$  ต่อ 1 กรัมของดิน (Paul and Clark, 1996; สุบัณฑิต นิมรัตน์, 2549) ส่วนดินที่มีการเติมเฉพาะน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน 0.5% และ 1.0% พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดเพิ่มขึ้นภายใน 3 วัน และค่อนข้างคงที่ตลอดการศึกษาแสดงให้เห็นถึงน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน 0.5% และ 1.0% ไม่มีผลต่อแบคทีเรียประจำถิ่น แต่ก็พบว่ามีปริมาณที่เพิ่มขึ้นภายใน 3 วัน และคงที่ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 2 ชนิดเพียงเล็กน้อยในขณะที่ชุดการทดลองมีการเติมทั้งน้ำมัน 0.5% และ 1.0% และเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดสามารถเพิ่มปริมาณขึ้น 10 เท่าในวันที่ 3-10 ของการทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน 0.5% และ 1.0% นั้นนอกจากไม่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดหรือแบคทีเรียประจำถิ่นแล้ว ยังไม่มีพิษต่อแบคทีเรีย *B. subtilis*

สายพันธุ์ SE1 ที่เติมลงไป โดยน้ำมัน 0.5-1.0 % ที่เติมลงไปในดินน่าจะถูกใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสุบัติน นิมรัตน์ และคณะ (2559) ที่ได้ทำการศึกษากำบอดดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลด้วยแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนผสมที่พบการเจริญและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเมื่อเติมน้ำมันเบนซินและดีเซล 5% นอกจากนี้ จากผลการทดลองน่าจะคาดว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในดินที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันทั้ง 4 ชนิด น่าจะมีหลายกลไกที่เกี่ยวข้องได้แก่ การมีอยู่ของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถพิเศษในการย่อยสลายในดิน, การเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมร่วม, การมีปฏิสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างจุลินทรีย์ในดิน และแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยกลไกเหล่านี้จะส่งผลต่อการย่อยสลายน้ำมันที่ย่อยสลายยาก

ส่วนในชุดการทดลองที่เติมเฉพาะน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน 1.5% พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาทำการทดลอง ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงความเป็นพิษของ 1.5% ของน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซินจึงทำให้แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดไม่สามารถเจริญหรือการเจริญถูกยับยั้งได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Babalola et al. (2016) ที่ทำการศึกษากำบอดดินความเป็นพิษของน้ำมันดิบและน้ำมันดีเซลต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิดที่พบว่าแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Erwinia cacticida*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia liquefaciens*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. มีการเจริญลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำมันดิบและน้ำมันดีเซลสูงขึ้น (0.5-1.0%)

ส่วนความเป็นพิษของน้ำมันเบนซินอาจเกิดเนื่องจากไอระเหยของน้ำมันเบนซินเองซึ่งไอระเหยของน้ำมันเบนซินนั้นสามารถยับยั้งการเจริญโดยทำลายส่วนพลาสมาเมมเบรน (Plasma membrane) และความเข้มข้นภายในเซลล์และยีสต์ได้ (Ahearn et al., 1971; Gill and Ratledge, 1972) นอกจากนี้สาเหตุของความเป็นพิษของน้ำมันอาจเนื่องมาจากสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายได้ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Naether et al. (2013) กล่าวว่าแบคทีเรียที่เจริญในแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารกลุ่ม *n*-alkanes เมื่อมีการย่อยสลายและเกิดสารตัวกลาง alkanols ซึ่งเป็นสารกลุ่มแอลกอฮอล์ที่เกิดจากวิธีการย่อยสลายสารกลุ่ม *n*-alkanes ซึ่งสารตัวกลางเหล่านี้มีพิษต่อเซลล์แบคทีเรียโดยเข้าไปสะสมในเซลล์เมมเบรนและทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของการไหลของเยื่อไซโทพลาสซึม (Cytoplasmic) ซึ่งจะนำไปสู่การยับยั้งการเจริญได้ เป็นต้น

ในขณะที่ในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน 1.5% และเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่าไม่มีการเพิ่มจำนวนในช่วงระยะเวลา 3 วันของการทดลอง หลังจากนั้นจะเพิ่มจำนวนประมาณ 10 เท่าตั้งแต่วันที่ 10 ของการทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถย่อยสลายน้ำมันและใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนได้แต่ต้องมีระยะเวลาในการปรับตัว (Acclimation period) เท่ากับ 3 วัน

นอกจากนี้การที่แบคทีเรียเจริญได้ช้าในช่วงต้นของการทดลอง อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียบางชนิดที่อยู่ในดินสามารถย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยไม่นำเอาสารดังกล่าวมาใช้ในการเจริญ แต่เมื่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ถูกย่อยสลายแล้วแบคทีเรียบางชนิดจะใช้เป็นสาร

ตั้งต้น (Substrate) ในการเจริญ ซึ่งจะถูกใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานได้ (Assimilation) เรียกขบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในลักษณะนี้ว่า Co-metabolism และในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติมีแบคทีเรียหลายชนิดอยู่ในบริเวณเดียวกัน แบคทีเรียเหล่านี้อาจมีกิจกรรมการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนอยู่ในบริเวณนั้นร่วมกัน (Synergism) ซึ่งสามารถทำให้ขบวนการย่อยสลายเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ขบวนการดังกล่าวมีความสำคัญต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนหรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (สุบันชิต นิมรัตน์, 2559; Jimenez and Bartha, 1996)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซลและเบนซินจะมีแนวโน้มเช่นเดียวกันคือในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันแต่ละชนิดปริมาณ 1.5% (T3 และ T6) จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เติมน้ำมันปริมาณ 1.0% (T2 และ T5) และ 0.5% (T1 และ T4) เมื่อทำการทดลองเป็นระยะเวลา 35 วัน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในแต่ละชุดการทดลองของแต่ละชนิดน้ำมันจะมีการลดลงตลอดระยะเวลาทำการทดลองตั้งแต่วันที่ 0-35 แต่ในชุดควบคุมพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 754.72 GAE/1 g และมีปริมาณคงที่ตลอดระยะเวลาทดลอง

จากการศึกษาน้ำมันที่คงเหลือหลังจากการย่อยสลาย (Spectrogram) ในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 0.5%, 1.0% และ 1.5% (ชุดการทดลอง T1, T2 และ T3) พบว่าแบคทีเรียในดินสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ตั้งแต่วันที่ 10 ของการทดลอง แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 0.5%, 1.0% และ 1.5% (ชุดการทดลอง T4, T5 และ T6) พบว่าน้ำมันถูกย่อยสลายได้เร็วขึ้นโดยพบการย่อยสลายได้ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซิน 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าแบคทีเรียในดินสามารถย่อยสลายน้ำมันเบนซินได้ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซิน 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าน้ำมันถูกย่อยสลายได้เร็วขึ้นโดยพบการย่อยสลายได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดิบและน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าแบคทีเรียในดินสามารถย่อยสลายน้ำมันเบนซินได้ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง แต่เมื่อมีการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ลงไปในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันเบนซิน 0.5%, 1.0% และ 1.5% พบว่าน้ำมันถูกย่อยสลายได้เร็วขึ้นโดยพบการย่อยสลายได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดในดินได้ โดยจะย่อยสลายน้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วได้เร็วกว่าน้ำมันดีเซล โดยจะเห็นได้จาก Spectrogram ของการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 4 ชนิดได้เร็วกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย

กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพและการฟื้นฟูทางชีวภาพที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ เป็นกระบวนการที่เรียกว่า Bioaugmentation เป็นกระบวนการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแบบเดี่ยวหรือแบบผสมเพื่อบำบัดสารมลพิษ โดยจุลินทรีย์ที่จะเติมลงไปในนั้นอาจจะเติมในแบบการ Enrichment แบบดั้งเดิม หรือการพัฒนาให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี หรือมีการดัดแปลงทางพันธุกรรม เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารมลพิษ (สุบันชิต นิมรัตน์, 2559; Alexander,

1994; Bitton, 2005; Devigny and Chang, 2000; Mishra et al., 2001) ซึ่งจากการศึกษาของ Bento et al. (2003) พบว่าการบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันดีเซลคือวิธี Bioaugmentation เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Biostimulation และ Natural attenuation ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล รวมทั้งจากการรายงานของ Cerqueira et al., 2014; Silva-Castro et al., 2013; Sprocati et al., 2012 ที่กล่าวว่า Biostimulation และ/หรือ Bioaugmentation ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของการฟื้นฟูทางชีวภาพดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันดีเซล ซึ่งในการศึกษาการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน และจากการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสบน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลและเบนซิน โดยมีรายงานการศึกษาหลายฉบับ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Nwaogu et al. (2008) ที่ทำการศึกษถึงการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยใช้ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Trichoderma harzanium* และ *Trichothecium roseum* พบว่า *Bacillus subtilis* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 5% ที่เติมลงในดินได้ดีที่สุด โดยพบอัตราการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในวันที่ 1, 12 และ 27 ของการทดลองได้ถึง  $5.8 \times 10^{-4}$ ,  $1.83 \times 10^{-3}$  และ  $1.05 \times 10^{-3}$  กรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ เป็นต้น

จากข้อมูลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าในการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน 4 ชนิด คือ น้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายทั้งน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน 0.5% และ 1% ได้ โดยสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ภายใน 3 วันแรกของการทดลอง รวมทั้งสามารถลดทั้งปริมาณน้ำมันและสารประกอบฟีนอลิกที่ละลายน้ำทั้งหมดในดินได้

จากการศึกษาถึงการเติมสารอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ สารอาหารกลุ่มไนโตรเจน (Yeast extract 1%), คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย (น้ำตาลกลูโคส 1%), ฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) และ 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  เพื่อส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมัน 1% ทั้ง 4 ชนิด ที่ปนเปื้อนในดิน โดยเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลการศึกษาพบว่าสถานะที่มีการเติมสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน (Yeast extract 1%), คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย (น้ำตาลกลูโคส 1%), ฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) และ 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  สามารถเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันความเข้มข้น 1% จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ดีเซล, เบนซิน, น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ร่วมกับจุลินทรีย์ในดินได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Poppviciu and Bercu (2014) ได้ทำการศึกษาถึงผลของสารอาหารไนเตรตและฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (0.1% v/v) ต่อการย่อยสลาย 2% v/v น้ำมันดีเซลที่เติมลงใน Microcosm ของดินตะกอนประเภทดินทรายในทะเล ผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมไนเตรต 5 mg/L และฟอสเฟต 0.5 mg/L และชุดการทดลองที่มีการเติมไนเตรต 50 mg/L และฟอสเฟต 5 mg/L สามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Hydrocarbon-oxidizing แต่ไม่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ ส่วนการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับสารอาหารไนเตรตและฟอสเฟตพบว่าเพิ่มอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของ 2% v/v น้ำมันดีเซล และจากการศึกษาของ Syafruddin et al. (2010) ได้ทำการศึกษาถึงผลของการเติมปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสและอากาศต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันดิบ 1.33% และ 1.64%



ในดินที่ปนเปื้อนด้วยสารไฮโดรคาร์บอนเป็นเวลานาน 2 ปี พบว่าการเติมปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัส มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ 1.33% และ 1.64% ที่สะสมในดินนาน 2 ปี เพียงเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามการกวนช่วยเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันดิบ 1.33% และ 1.64% ในดินร่วนปนทราย ประมาณ 15% เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการกวน ในขณะที่การกวนไม่มีผลในชุดการทดลองที่เป็นดินทราย ดังนั้นการสะสมของน้ำมันดิบเป็นระยะเวลานานจะทำให้การฟื้นฟูสภาพได้ยุ่งยากมากขึ้น และจากการศึกษาของ Vyas and Dave (2010) ได้ทำการศึกษาถึงผลของการเติมปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันดิบ 0.5% โดยแบคทีเรียทางทะเล ได้แก่ *Marinococcus albus*, *Methylobacterium mesophilicum* และ *Nocardia otitidiscaviarum* ในการฟื้นฟูทางชีวภาพของน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนบริเวณชายฝั่งทะเล Alang ประเทศอินเดีย ผลการทดลองพบว่าการเติมสาร 3 ชนิด คือ สารไนโตรเจน (1%), ฟอสฟอรัส (0.5%) และโพแทสเซียม (0.01%) ร่วมกับ Bacterial consortium ของแบคทีเรีย 3 ชนิด (*Marinococcus albus*, *Methylobacterium mesophilicum* และ *Nocardia otitidiscaviarum*) ทำให้การย่อยสลายทางชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเพิ่มขึ้น 22-32%

ดังนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ร่วมกับสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน (Yeast extract 1%), คาร์บอนที่ย่อยสลายง่าย (น้ำตาลกลูโคส 1%), ฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%) และ 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  น่าจะเป็นกระบวนการที่ดีในการฟื้นฟูสภาพดินหรือสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันดีเซล, เบนซิน, น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว และน้ำมันดิบ รวมทั้งน้ำมันชนิดอื่นหรือสารไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น ๆ เพื่อการบำบัดและฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันหรือสารไฮโดรคาร์บอนต่อไปได้ในอนาคต รวมทั้งน่าจะสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 เนื่องจากพบว่าน้ำและดินที่ปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนประเภทอะโรมาติกเพิ่มขึ้นมากกว่าปีที่ผ่านมา ๆ มาเพราะมีการใช้สารไฮโดรคาร์บอนในอุตสาหกรรมหลาย ๆ ด้าน โดยสารไฮโดรคาร์บอนเป็นสารที่เป็นมลพิษอย่างมาก มีความเป็นพิษ และก่อให้เกิดมะเร็ง และเป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในมนุษย์อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีความกังวลใจเพิ่มขึ้นเป็นสาเหตุมาจากความยากลำบากในการกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนออกจากสิ่งแวดล้อม โดยที่วิธีการในการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนมีหลายวิธีทั้งวิธีทางชีวเคมี กายภาพและชีวภาพ แต่ด้วยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีที่ยั่งยืน ทำให้มีการค้นหาวิธีทางธรรมชาติเพื่อการกำจัดหรือย่อยสลายดินหรือน้ำที่ปนเปื้อนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งหนึ่งในนั้นคือการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ เพื่อช่วยในการทำลายโมเลกุลของสารไฮโดรคาร์บอนโดยการสร้างเป็นไมเซลล์, การเพิ่มการเคลื่อนที่และการเพิ่มการดูดซึมและการเข้าถึงโดยแบคทีเรีย ดังนั้นจึงนิยมนำมาใช้ในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนทางชีวภาพ (Souza et al., 2014)

## เอกสารอ้างอิง

- จิตติมา แก้วเรือง. (2551). การแยกและคัดเลือกรวมจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมัน เครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้ที่ดิน. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และจรงค์ จันทร์เจริญสุข. (2542). การวิเคราะห์ดินและพืช : แบบฝึกหัดและคู่มือปฏิบัติการ (พิมพ์ครั้งที่ 7). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประเสริฐ เทียนนิมิต, ขวัญชัย สันทิพย์สมบูรณ์ และปานเพชร ชินินทร. (2554). เชื้อเพลิงและสารหล่อลื่น. กรุงเทพฯ: วี. พรีน.
- ภரியพร เปรมประเสริฐ, สุภัณฑิต นิมรัตน์ และอภิรดี ปิลันธนาภักย์. (2549). ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของราทะเลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา* 11(1), 47-55.
- วิชาภา ภูจินดา. (2548). การใช้ประโยชน์สารลดแรงตึงผิวในการบำบัดน้ำเสีย. *วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม*, 1(1), 1-15.
- สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 16. (2556). น้ำมันดิบรั่วไหล คราบน้ำมันในทะเล อันตรายต่อสุขภาพ. วันที่ค้นข้อมูล 1 กันยายน พ.ศ. 2557, เข้าถึงได้จาก <http://reo16.mnre.go.th/reo16/knowledge/detail/175>
- สุดสายชล หอมทอง, นเรศ เชื้อสุวรรณ และสุภัณฑิต นิมรัตน์. (2556). การกำจัดสีเมทิลเรดด้วยการดูดซับ/วิธีทางชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 16(2), 63-74.
- สุภัณฑิต นิมรัตน์, ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2559). การบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลด้วยแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนผสม. *วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยเพชรบุรี*, 13(1), 53-62.
- สุภัณฑิต นิมรัตน์. (2549). *จุลชีววิทยาทางดิน*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- สุภัณฑิต นิมรัตน์. (2559). *ตำรา การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation)*. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Abdel-Mawgoud, M. A., Hausmann, R., Lepine, F., Muller, M. M., and Deziel, E. (2011). Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production, In G. Soberon-Chavez (Ed.), *Biosurfactants* (p. 17). New York : Springer Berlin Heidelberg.
- Abioye, O. P., Agamuthu, P., and Abdul Aziz, A. R. (2012). Biodegradation of used motor oil in soil using organic waste amendments. *Biotechnology Research International*, Article ID 587041, 1-8.
- Abouseouda, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., and Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1-3), 143-151.

- Ahearn, D. G., Meyers, S. P., and Standard, P. G. (1971). The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. *Developmental Industry of Microbiology*, 12, 126-134.
- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and bioremediation*. New York: Academic Press.
- Aparna, A., Srinikethan, G., and Hegde, S. (2011). Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. on biodegradation of crude oil. *2nd International Conference on Environmental Science and Technology*, 6, 71-75.
- Arima, K., Kahinuma, A., and Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of brin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31, 488-494.
- Arutchelvi, J., and Doble, M. (2010). Characterization of glycolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* CPCL isolated from petroleum contaminated soil. *Applied Microbiology*, 51, 75-82.
- Babalola, T. A., Antai, S. P., and Tiku, D. R. (2016). Toxicity of crude oil and diesel fuel to some gram positive and gram negative bacterial. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR)*, 2(12), 273-283.
- Banat, I. M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*, 51, 1-12.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (2000a). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*, 51, 1-12.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (2000b). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 495-508.
- Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M. A., and Moreaes, I. O. (2002). Rhampolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 54, 283-288.
- Bento, F. M., de Oliveira Camargo, F. A., Okeke, B., and Frankenberger-Júnior, W. T. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(Suppl.1), 65-68.
- Bernheimer, A. W., and Avigad, L. S. (1970). Nature and properties of acytological agent produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 61, 361-369.

- Bhardwaj, G., Cameotra, S. S., and Chopra, H. K. (2013). Biosurfactants from Fungi: A Review. *Petroleum & Environmental Biotechnology*, 4(6), 1-6.
- Bitton, G. (2005). *Wastewater microbiology* (3<sup>rd</sup> edition). New Jersey: John Wiley and Son.
- Bodour, A. A., Drees, K. P., and Maier, R. M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3280–3287.
- Bottom, C. B., Hanna, S. S., and Siehr, D. J. (2010). Mechanism of the ninhydrin reaction. *Biochemical Education*, 6(1), 4-5.
- Box, J. D., (1983). Investigation of the folin-ciocalteau phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research*, 17(5), 511-525.
- Burg, P., Selves, J-L., and Colin, J-P. (1997). Prediction of kinematic viscosity of crude oil from chromatographic data. *Fuel*, 76(11), 1005-1011.
- Burgos-Díaz, C., Piqué, N., Manresa, A., and Marqués, A. M. (2012). Advances in the research of new biosurfactants and their potential use in the biomedical and pharmaceutical industry. *Transworld Research Network* 37/661, 2, 151-167.
- Burland, S., and Edwards, E. (1999). Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 529-533.
- Cerqueira, V. S., Peralba, M. D. C. R., Camargo, F. A. O., and Bento, F. M., (2014). Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 95 (Part B), 338-345.
- Chaerun, S. K., Tazaki, K., Asada, R., and Kogure, K. (2004). Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*, 30, 911 - 922.
- Chakrabarti, S. (n.d.). *Bacterial biosurfactant: Characterization, antimicrobial and metal remediation properties*. Master of science in life. Department of life science. National Institute of Technology Rourkela.
- Chayabutra, C., and Ju, L. K. (2000). Degradation of *n*-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 493-498.
- Chen, S. Y., Wei, Y. H., and Chang, J. S. (2007). Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76 (1), 67-74.

- Cheng, K. B., Jian, Z., and Wang, Z. (2008). *Emulsification properties of bacterial biosurfactants native to the Yellow River Delta on hexadecane and diesel oil*. Research Paper. Clarkson University. Retrieved June 19, 2013, from <http://web2.clarkson.edu>.
- Chioma, O., Ogechukwu, M., Bright, O., Simon, O., and Chinyere, A. F. (2013). Isolation and characterization of biosurfactants producing bacteria from oil polluted soil. *Natural Sciences Research*, 3(5), 119-122.
- Christova, N., Tuleva, B., and Lalchev, Z. (2004). Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on n-hexadecane. *Zeitschrift für Naturforschung (C)*, 59(1-2), 70-74.
- Cooper, D. G., and Goldenberg, B. G. (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2, 224 -229.
- Cooper, D. G., MacDonald, C. R., Du, S. J. B., and Kosaric, N. (1981). Enhanced production of surfactin of *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 408-412.
- Costa, S. G. V. A. O., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M. N., and Contiero, J. (2006). Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*, 41, 483-488.
- Cubitto, M. A., Moran, A. C., Commendatore, M., Chiarello, M. N., Baldini, M. D., and Sineriz, F. (2004). Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation*, 15(5), 281-287.
- Dagorn, A., Chapalain, A., Mijouin, L., Hillion, M., Duclairoir-Poc, C., Chevalier, S., Taupin, L., Orange, N., and Feuilloley, M. G. J. (2013). Effect of GABA, a bacterial metabolite, on *Pseudomonas fluorescens* surface properties and cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 12186-12204.
- Das, P., Mukherjee, S., and Sen, R. (2009). Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresource Technology*, 100, 1015-1019.
- De'ziel, E., Le'pine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O. A., and Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1440, 244-252.
- Deviny, J., and Chang, S. H. (2000). *Bioaugmentation for soil bioremediation*. In D. L. Wise, and D. J. Tranyolo. (eds.). *Bioremediation of contaminated soils*. New York: Marcel Dekker.

- Edwards, K. R., Lepo, J. E., and Lewis, M. A. (2003). Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 1309-1316.
- Fakruddin, M. (2012). Biosurfactant: Production and application. *Petroleum and Environmental Biotechnology*, 3, 1-5.
- Franzetti, A., Tamburini, E., and Banat, I. M. (2009). *Applications of biological surface active compounds in remediation technologies*. In: Sen, R. (Ed.), *Biosurfactants Bioscience Chapter Database: 3526 Chapters Now Online*. LANDES Bioscience.
- Fritsche, W., and M. Hofrichter. (2000). *Aerobic degradation by microorganisms*. In J. Klein (Ed.), *Environmental Processes- Soil Decontamination* (pp. 146–155). Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Gharaei-Fathabad, E. (2011). Biosurfactants in pharmaceutical industry: A mini-review. *Drug Discovery and Development*, 1, 58-69.
- Gill, C. O., and Ratledge, C. (1972). Effect of n-alkanes on the transport of glucose in *Candida* sp. Strain 107. *Biochemical Journal*, 127, 59-60.
- Gomathy, C., and Senthilkumar, R. (2013). Production of rhamnolipid biosurfactant from a marine *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Research in Environmental Science and Technology*, 3(3), 86-91.
- Guerra-Santos, L., Kappeli, O., and Fiechter, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 301-305.
- Gunther, N. W., Nuñez, A., Fett, W., and Solaiman, D. K. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2288–2293.
- Hommel, R. K. (1990). Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Biodegradation*, 1, 107-119.
- Hošková, H., Schreiberová, O., Jezdík, R., Chudoba J., Masák J., Sigler, K., and Rezanka, T. (2013). Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. *Bioresource Technology*, 130, 510-516.
- Hua, Z., Chen, Y., Du, G., and Chen, J. (2004). Effects of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on the biodegradation of petroleum compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 25-29.

- Hussein, M., Amer, A. A., and Gaberah, A. S. (2014). Used lubricating oils re-refining by solvent extraction. *American Journal of Environmental Engineering and Science*, 1(3), 44-50.
- Ilori, M. O., Amobi, C. J., and Odocha, A. C. (2005). Factors effecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from tropical environment. *Chemosphere*, 61, 985-992.
- Ilori, M. O., Amund, O. O., Ezeani, C. J., Omoijiahina, S., and Adebusoye, S. A. (2006). Occurrence and growth potential of hydrocarbon degrading bacteria on the phylloplane of some tropical plants. *African Journal of Biotechnology*, 5, 542-545.
- Janek, T., Lukaszewicz, M., and Krasowska, A. (2013). Identification and characterization of biosurfactants produced by the arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, 379-386.
- Jaysree, R. C., Basu, S., Singh, P. P., Ghosal, T., Patra, P. A., Keerthi, Y., and Rajendran, N. (2011). Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples. *Pharmacologyonline*, 3, 1427-1433.
- Jimenez, I. Y., and Bartha, R. (1996). Solvent augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2311-2316.
- Kaeppli, O., and Finnerty, W. R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *Journal of Bacteriology*, 140, 707-712.
- Karant, N. G. K., Deo, P. G., and Veenanadig, N. K. (n.d.). *Microbial production of biosurfactants and their importance*. Retrieved November 24, 2013, from <http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul10/articles19.htm>
- Khehra, M. S., Saini, H. S., Sharma, D. K., Chadha, B. S. and Chimmi, S. S. (2005). Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes and Pigments*, 67, 55-61.
- Kister, H. Z. (1992). *Distillation Design*. McGraw Hill, Inc., New York
- Korda, A., Santas, P., Tenente, A., and Santas, R. (1997). Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 677-686.
- Kosaric, N. (1993). *Biosurfactants: Production, properties and applications*. Marcel Dekker, New York.

- Kumar, M., Leon, V., Materano, A. S., and Ilzins, O. A. (2007). A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. degrades hydrocarbons and produces tension-active emulsifying agent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 211-220.
- Lang, S., and Philp, J. C. (1998). Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 74, 59-70.
- Li, Z., Zhao, C., Zhang, Y., and Zhao, D. (2008). *Structure and characterization of a biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa strain KO9*. Research Paper. China University. Retrieved March 31, 2014, from <http://www.zhaodongfeng.com/UploadFiles/201268103637.pdf>
- MacDonald, C. R., Cooper, D. G., and Zajic, J. E. (1981). Surface-active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 117-123.
- Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (1998). Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 48-52.
- Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58, 428-434.
- Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R., and Lal, B. (2001). Evaluation of inoculums addition to stimulate in situ bioremediation of oily sludge contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.*, 67(4), 1675-1681.
- Mohan, P. K., Nakhla, G., and Yanful, E. K. (2006). Biogenetics of biodegradability of surfactants under aerobic and anaerobic conditions. *Water Res.*, 40, 533-540.
- Morikawa, M., Hirata, Y., and Imanaka, T. (2000). A study on the structure function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488, 211-218.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198.
- Nadhem, H. H. G. (2012). Inhibitory activity of Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NH22 against *Rhizoctonia solani*. *Journal Biotechnology Research Center*, 6(1), 32-44.
- Naether, D. J., Slawtschew, S., Stasik, S., Engel, M., Olzog, M., Wick, L. Y., Timmis, K. N., and Heipieper, H. J. (2013). Adaptation of the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 to alkanes and toxic organic compounds: A



- physiological and transcriptomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4282-4293.
- Nalini, S., and Parthasarathi, R. (2013). Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresource Technology*, 147, 619-622.
- Nasr, S., Soudi, M. R., Mehrnia, M. R., and Sarrafzadeh, M. H. (2009). Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus* spp. isolated from petroleum contaminated soil. *Microbiology*, 1, 54-61.
- Noudeh, G. D., Sharififar, F., Khatib, M., Behravan, E., and Afzadi, M. A. (2010). Study of aqueous extract of three medicinal plants on cell membrane-permeabilizing and their surface properties. *African Journal of Biotechnology*, 9(1), 110-116.
- Nur Asshifa, M. N. (2009). The effects of *Pseudomonas aeruginosa* (USM-AR2) on crude oil biomodification and its potential in facilitating distillation. Dissertation (M.Sc, Industrial Biotechnology), Universiti Sains Malaysia.
- Nur Asshifa, M. N., Amirul Al-Ashraf, A., Mohamad Nasir, M. I., and Ahmad Ramli, M. Y. (2012). Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 facilitates crude oil distillation. *General and Applied Microbiology*, 58, 153-161.
- Nwaogu, L. A., Onyeze, G. O. C., and Nwabueze, R. N. (2008). Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1939-1943.
- Okoliegbe, I. N., and Agarry, O. O. (2012). Application of microbial surfactant : A review. *Biotechnology*, 1, 15-23.
- Onwosi, C. O., and Odibo, F. J. C. (2012). Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 937-942.
- Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., and Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 633-654.
- Panilaitis, B., Castro, G. R., Solaiman, D., and Kaplan, D. L. (2007). Biosynthesis of emulsion biopolymers from agro-based feedstocks. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 531-537.

- Park, S. H., Youn, I. M., Lim, Y., and Lee, C. S. (2013). Influence of the mixture of gasoline and diesel fuels on droplet atomization, combustion, and exhaust emission characteristics in a compression ignition engine. *Fuel Processing Technol*, 106, 392–401.
- Paul, E. A., and Clark, F. E. (1996). *Soil microbiology and biochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic press.
- Perfumo, A., Banat, I. M., Canganell, F., and Marchant, R. (2006). Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02–1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 132–138.
- Persson, A., and Molin, G. (1987). Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and Vibrionaceae growing on carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26, 439-442.
- Plaza, G., Zjawiony, I., and Banat, I. (2006). Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 50(1), 71-77.
- Popoviciu, D. R., and Bercu, R. (2014). Effects of nutrients and hydrogen peroxide on hydrocarbon biodegradation in marine sandy sediment microcosms. *Annals of R.S.C.B.*, 19 (1), 27-31.
- Priya, T., and Usharani, G. (2009). Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Botany Research International*, 2, 284-287.
- Raaijmakers, J. M., Bruijn, D. I., and Kock, D. M. J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant associated *Pseudomonas* spp.: Diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 699-710.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., and Banat, I. M. (2003). Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, 90, 159-168.
- Rashedi, H., Assadi, M. M., Bonakdarpour, B., and Jamshidi, E. (2005). Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. *International Journal of Environmental Science*, 2, 121-127.
- Rehm, H. J., and Rei, I. (1981). Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 19, 73.

- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., and Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: Potential application in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 609-618.
- Ron, E. Z., and Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3, 229-236.
- Ron, E. Z., and Rosenberg, E., (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 249-252.
- Rosenberg, E., and Ron, E. Z. (1998). *Surface active polymers from the genus Acinetobacter*. In: D. L. Kaplan (Ed). *Biopolymers from renewable resources* (pp. 281-291). New York: Springer Berlin Heidelberg.
- Rosenberg, E., and Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 154-162
- Salminen, J., Tuomi, P., Suortti, A.-M., and Jørgensen, K. (2004). Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. *Biodegradation*, 15, 29-39.
- Santa-Anna, L. M., Sebastian, G. V., Menezes, E. P., Alves, T. L. M., Santos, A. S., Pereira, N. J., and Freire, D. M. G. (2002). Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19, 159-166.
- Saravanan, V., and Vijayakumar, S. (2012). Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil. *Academia and Industrial Research*, 1, 264-268.
- Schulz, D., Passeri, A., and Schmidt, M. (1991). Marine biosurfactants 1 Screening for biosurfactants among crude-oil degrading marine microorganisms from the North-Sea. *Zeitschrift für Naturforschung (C)*, 46(3-4), 197-203.
- Shaw, N. (1970). Bacterial glycolipids. *Bacteriological Reviews*, 34(4), 365-377
- Siegmund, I., and Wagner, F. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 5(4), 265-268.
- Sihag, S., Pathak, H., and Jaroli, D. P. (2014). Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(3), 185-202.
- Silva-Castro, G. A., Rodelas, B., Perucha, C., Laguna, J., Gonzalez-Lopez, J., and Calvo, C. (2013). Bioremediation of diesel-polluted soil using biostimulation as posttreatment after oxidation with Fenton-like reagents: assays in a pilot plant. *Sci. Total Environ*, 445-446, 347-355.

- Singh, A., Van Hamme, J. D., and Ward, O. P. (2006). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25, 99-121.
- Singh, A. K., and Cameotra, S.S., (2013). Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res Int*, 20(10), 7367-7376.
- Smyth, T. J. P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., and Banat, I. M. (2010). Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 3687-3704.
- Souza, E. C., Vessoni-Penna, T. C., and Oliveira, R. P. S. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 89, 88-94.
- Sprocati, A. R., Alisi, C., Tasso, F., Marconi, P., Sciallo, A., Pinto, V., Chiavarini, S., Ubaldi, C., and Cremisini, C. (2012). Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil. *Process Biochem.* 47, 1649-1655.
- Syafruddin, S., Wieshammer, G., Puschenreiter, M., Langer, I., Wieshammer-Zivkovic, M., and Wenzel, W. W. (2010). Effect of N and P fertilisation and aeration on biodegradation of crude oil in aged hydrocarbon contaminated soils. *Plant Soil Environ.*, 56(4), 149-155.
- Tahzibi, A., Kamal, F., and Assadi, M. M., (2004). Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Iranian Biomedical Journal*, 8(1), 25-31.
- Thavasi, R. Jayalakshmi, S., and Banat, I. M. (2010). *Biosurfactants from marine bacterial isolates*. In A. Mendez-Vilas (Ed), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2, 1367-1373.
- Thomas, G. W. (1996). *Exchangeable cations*. In: Page, A. L., Miller, R. H., and Keeney, D. R. (Eds.), *Methods of soil analysis, Part 2* (2<sup>nd</sup> ed.). Madison, USA, American Society of Agronomy, pp. 159-165.
- Tuleva, B. K., Ivanov, G. R., and Christova, N. E. (2002). Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift für Naturforschung (C)- A Journal of Biosciences*, 57(3-4), 356-360.
- Tuleva, B., Christova, N., Jordanov, B., Nikolova-Damyanova, B., and Petrov, P. (2005). Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Zeitschrift für Naturforschung (C)*, 60(7-8), 577-582.

- Van Ginkel, C. G. (1989). Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortium of aerobic microorganisms. *Biodegradation*, 7(2), 151-164.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., and Ward, O. P. (2006). Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 24, 604–620.
- Vasileva-Tonkova, E., and Gesheva, V. (2007). Biosurfactant production by Antarctic Facultative Anaerobe *Pantoea* sp. During growth on hydrocarbons. *Current Microbiology*, 54, 136-141.
- Vollenbroich, D., Ozel, M., Vater, J., Kamp, R. M., and Pauli, G. (1997). Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 25, 289-297.
- Vyas, T. K., and Dave, B. P. (2010). Effect of addition of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers on biodegradation of crude oil by marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences*, 39(1), 143-150.
- Youssef, N., Duncan, K., and Nagle, D. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347.