



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ทนโลหะหนักจากฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และการพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อม

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

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา  
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

รองศาสตราจารย์ ดร. อรุทัย ภิญญาคง  
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๙

มิถุนายน ๒๕๖๐

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๑๘๑๖๑๔

สัญญาเลขที่ ๒ /๒๕๕๙

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ทนโลหะหนักจากฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และการพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อม

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

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๙

มิถุนายน ๒๕๖๐

## บทคัดย่อ

การรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียม เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและเศรษฐกิจของประเทศ อย่างไรก็ตามการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีทางชีวภาพมักมีข้อจำกัดจากจำนวนและความสามารถของ แบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ฟองน้ำทะเลถือเป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเป็นแหล่งที่มีแบคทีเรียอย่างอุดมสมบูรณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความหลากหลายและคัดแยกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากฟองน้ำทะเลโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและไม่เพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน ผลการทดลองสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 13 กลุ่ม โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 60–92 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน และสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ จากนั้นนำแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมชนิดอื่น ได้แก่ น้ำมันดีเซลและน้ำมันเตา พบว่ามีแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมได้ทั้ง 3 ชนิด โดยย่อยสลายน้ำมันดิบ น้ำมันดีเซลและน้ำมันเตา ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 34-60 เปอร์เซ็นต์ 31-76 เปอร์เซ็นต์ และ 30-64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในเวลา 7 วัน นอกจากนี้พบว่า *Sphingobium* sp. MO2-4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันทั้ง 3 ชนิดดีที่สุด โดยย่อยสลายได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สายพันธุ์ MO2-4 ยังสามารถย่อยสลายเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร พีแนนทรินและไพรีนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 71, 33 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในเวลา 7 วัน เมื่อศึกษาเมตาจีโนมของฟองน้ำทะเลพบแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria Actinobacteria, Cyanobacteria และ Firmicutes เป็นประชากรหลักในทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ยังตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนและ PAHs ในฟองน้ำทะเลหลายตัวอย่าง จากผลการทดลองทำให้ได้ข้อมูลแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมในฟองน้ำทะเลและยังแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากฟองน้ำทะเลมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนต่อไปได้

## Abstract

Petroleum oil spills are a worldwide problem, which is growing more serious with ecosystem and economic development. The success of the bioremediation of petroleum hydrocarbons is limited because of the low number and activity of hydrocarbon-degrading bacteria. Marine sponges (Porifera) are considered as important sources of active natural products, and contain an abundance of microorganisms. This study combined the culture and noncultured methods to examine bacterial diversity and isolate petroleum hydrocarbon-degrading bacteria from marine sponge samples. Thirteen sponge-associated bacterial consortia with ability to degrade 60-92% of 0.25% (v/v) crude oil in liquid cultivation within 7 days were obtained after enrichment. A total of 19 bacterial strains exhibited crude oil degrading ability was isolated from the consortia afterward. They were further screened for petroleum oil degradation capability including diesel oil and fuel oil. Nine strains showed potency in all types of petroleum oil biodegradation. They could degrade 0.25% (v/v) of crude oil, diesel oil, and fuel oil at 34%-60%, 31%-76%, and 30%-64%, respectively within 7 days. Among them, *Sphingobium* sp. MO2-4 showed the best ability to degrade all types of petroleum oil. The strain degraded more than 50% of initial amount of the oil within 7 days. Strain MO2-4 was then selected to evaluate its ability to degrade aliphatic and PAHs, the major components in petroleum oil. The results showed that MO2-4 could degrade 500 mg L<sup>-1</sup> of tetradecane at 71% and degrade 50 mg L<sup>-1</sup> of phenanthrene and pyrene around 33% and 25%, respectively within 7 days. In addition, the microbial diversity in marine sponge was investigated by metagenomic approach and the genes involved in petroleum hydrocarbon degradation were detected. Proteobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria and Firmicutes were dominant phyla in all the samples. Furthermore, the genes involved in alkane and PAH degradation were observed in several samples. Our results provide insight into microbial diversity and ecosystem function in marine sponges. These results demonstrated that the petroleum oil-degrading bacteria from marine sponges have potential for further bioremediation of petroleum contaminated sites.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๒ /๒๕๕๙

## Acknowledgement

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 2 / 2559)

## สารบัญ

รายการ	หน้า
1. บทนำ	1
2. การดำเนินการวิจัย	14
2.1 วิธีดำเนินการวิจัย	14
2.2 ผลการวิจัย	22
3. อภิปรายผลการวิจัย	45
4. สรุป	50
5. ข้อเสนอแนะ	51
6. ผลผลิต	52
บรรณานุกรม	53
ภาคผนวก	60
ประวัติคณะผู้วิจัย	62

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ระหว่างปีพ.ศ. 2540-2558	7
1.2	ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ	8
1.3	ความสามารถในการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียชนิดต่างๆ	10
2.1	แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย	14
2.2	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและ PAHs	20
2.3	ปริมาณน้ำมันดีเซลและน้ำมันเตาที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายน้ำมันความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน	22
2.4	ปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายน้ำมันดิบ	23
2.5	ปริมาณน้ำมันดีเซลที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายน้ำมันดีเซล	27
2.6	ปริมาณน้ำมันเตาที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายน้ำมันเตา	29
2.7	ปริมาณเตตระเดคเคนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายเตตระเดคเคนเป็นเวลา 7 วัน	32
2.8	ปริมาณฟีนานทรีนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายฟีนานทรีน ความเข้มข้น 50 ppm เป็นเวลา 7 วัน	34
2.9	ปริมาณไพรีนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 50 ppm เป็นเวลา 7 วัน	35
2.10	ปริมาณเตตระเดคเคนและฟีนานทรีนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของ <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 หลังการย่อยสลายสารผสมเป็นเวลา 7 วัน	37
2.11	การทนต่อโลหะหนักของ <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 หลังบ่มเป็นเวลา 3 วัน	38
2.12	การทนต่อสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียสายพันธุ์ MO2-4 หลังบ่มเป็นเวลา 3 วัน	39
2.13	จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์) และปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของ <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวเป็นเวลา 7	39

	วัน	
2.14	จำนวน read ที่วิเคราะห์ได้และผ่านการคัดกรองคุณภาพ	40
2.15	ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	43
3.1	ปริมาณน้ำมันที่ลดลงของแบคทีเรียหลังการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมชนิดและความเข้มข้น ต่างๆ	46
3.2	แบคทีเรียสกุล <i>Sphingobium</i> ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	49



## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างองค์ประกอบของน้ำมันดิบ	5
2.1	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 19 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 0 และ 7 วัน	24
2.2	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 19 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 0 และ 7 วัน	24
2.3	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 5 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์	26
2.4	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 5 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	26
2.5	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 8 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์	28
2.6	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 8 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	28
2.7	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 5 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์	30
2.8	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 5 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	30
2.9	การย่อยสลายเตตระเดคเคนของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว 10 สายพันธุ์ (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ซ้าย) ในเวลา 7 วัน	31- 32
2.10	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 10 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 ppm ที่เวลา 0 และ 7 วัน	33
2.11	การย่อยสลายพีแนนทรินของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ซ้าย) ในเวลา 3 วัน	33
2.12	การย่อยสลายพีแนนทรินของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ซ้าย) ในเวลา 7 วัน	34
2.13	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายพีแนนทรินความเข้มข้น 50 ppm	

	ที่เวลา 0 และ 7 วัน	34
2.14	การย่อยสลายไพลินของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ซ้าย) ในเวลา 7 วัน	35
2.15	จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายไพลินความเข้มข้น 50 ppm ที่เวลา 0 และ 7 วัน	36
2.16	จำนวน <i>Sphingobium</i> sp. MO2-4 หลังการย่อยสลายสารผสมของพีแนนทรินความเข้มข้น 25 ppm และเตตระเตดเคนความเข้มข้น 500 ppm เป็นเวลา 7 วัน	37
2.17	โครงสร้างไมโครไบโอมของตัวอย่างฟองน้ำจำนวน 26 ตัวอย่าง ในระดับอาณาจักร	42
2.18	โครงสร้างไมโครไบโอมของตัวอย่างฟองน้ำจำนวน 26 ตัวอย่าง ในระดับไฟลัม	42
2.19	โครงสร้างไมโครไบโอมของตัวอย่างฟองน้ำจำนวน 26 ตัวอย่าง ในระดับคลาส	43

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

สัญลักษณ์และคำย่อ	คำเต็ม
มล.	มิลลิกรัม
CFU	Colony forming unit
COD	Chemical oxygen demand
GC-FID	Gas chromatography - flame ionization detector
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PCR	Polymerase chain reaction
TLC-FID	Thin layer chromatography - flame ionization detector

## 1. บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกมีความตื่นตัวเกี่ยวกับปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก เนื่องจากปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบต่อหลายด้าน เช่น กระทบต่อสุขภาพประชากร และทรัพยากรธรรมชาติ รวมถึงประเทศไทยได้ตระหนักถึงเรื่องดังกล่าว โดยที่ผ่านมามีปัญหาสิ่งแวดล้อมในประเทศไทยมีแนวโน้มสูงขึ้นเนื่องจากการเพิ่มจำนวนประชากร และการขยายตัวในภาคอุตสาหกรรม โดยเฉพาะพื้นที่ชายฝั่งทะเลบริเวณอ่าวไทย เนื่องจากเป็นเขตที่มีอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ รวมทั้งมีท่าเรือน้ำลึกและท่าเรือสินค้าสำหรับการขนส่งสินค้า ทำให้บริเวณดังกล่าวมีโอกาสปนเปื้อนสารมลพิษหลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ น้ำมันปิโตรเลียม พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs) และโลหะหนัก

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

การปนเปื้อนสารมลพิษดังกล่าวก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม โดยปัญหาที่สำคัญคือ สารมลพิษสามารถเข้าไปอยู่ในสายใยอาหารได้ (Mitra และคณะ, 2011) และแม้มีความเข้มข้นต่ำก็เป็นพิษต่อมนุษย์ สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้ โดยโลหะหนักสามารถทำลายระบบประสาท ตับ กระจก รวมถึงขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ (Urani และคณะ, 2005) และน้ำมันปิโตรเลียม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PAHs ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมัน เป็นสารประกอบที่ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตโดยอาจชักนำให้เกิดมะเร็งและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต (Cachot และคณะ, 2006) ซึ่ง The United State Environment Protection Agency (U.S. EPA) จัดให้ PAHs อยู่ในกลุ่มของสารก่อมลพิษที่ต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน

การบำบัดการปนเปื้อนสารพิษในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) ซึ่งเป็นการอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายหรือลดปริมาณสารพิษในสิ่งแวดล้อมและเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และ PAHs เนื่องจากมีต้นทุนต่ำและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Haritash และ kaushik, 2009) กระบวนการย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรียในสถานะที่มีอากาศ เริ่มต้นจากการเติมหมู่ออกซิเจนแกว่งแอร์เมติกซึ่งเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส

dioxygenase) จากนั้นผ่านการเปลี่ยนรูปอีกหลายขั้นตอนจนได้สารตั้งต้นที่คล้ายแคทีคอล ซึ่งจะถูกลดสลายตัว (ยเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) ผ่านทางวิธีการแตกวงแอรโอมติกแบบ เมตา เป็นส่วนใหญ่ หรือย่อยสลายด้วยอินตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส (intradiol dioxygenase) ผ่านทางวิธีการแตกวงแอรโอมติกแบบ ออโธ เพื่อเข้าสู่วัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Peng และคณะ, 2008)

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

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

จากผลการวิจัยของโครงการวิจัยในปีที่ 1 ได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ทั้งหมด 13 กลุ่มแบคทีเรีย จากตัวอย่างฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีน้ำตาลเหลือง ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง ฟองน้ำต้นไม้สีดำ สาหร่ายสีน้ำตาล ฟองน้ำสีน้ำเงิน ฟองน้ำไฟ ฟองน้ำเคลือบสีเหลือง ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ ฟองน้ำเชือก และฟองน้ำสีน้ำตาล ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 60–92 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน และยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 27 สายพันธุ์จาก 13 กลุ่มแบคทีเรีย โดยพบว่า 19 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* 6 สายพันธุ์, *Acinetobacter* 1 สายพันธุ์, *Brevibacterium* 2 สายพันธุ์, *Aeromonas* 1 สายพันธุ์, *Enterobacter* 2 สายพันธุ์, *Bacillus* 4 สายพันธุ์, *Sphingobium* sp. 1 สายพันธุ์, *Methylobacterium* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Microbacterium* 1 สายพันธุ์

โครงการวิจัยในปีที่ 2 จึงมุ่งเน้นการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมและ PAHs หลายชนิด และความทนต่อโลหะหนักชนิดต่างๆ รวมทั้งความสามารถการดูดซับโลหะหนักของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ รวมทั้งศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมโดยวิธีเมตาจีโนมอีกด้วย และโครงการวิจัยในปีที่ 3 จะมุ่งเน้นการเตรียมแบคทีเรียในรูปแบบแบคทีเรียพร้อมใช้ ได้แก่ การตรึงแบคทีเรียในวัสดุตรึงที่เหมาะสม เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากวัสดุตรึงทำหน้าที่เป็นตัวช่วยดูดซับ และเป็นวัสดุป้องกันเซลล์ รวมถึงสามารถใช้ซ้ำได้ในระบบบำบัดแบบต่อเนื่อง (Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001 และ Rahman และคณะ, 2006)

โดยรายงานวิจัยฉบับนี้เป็นรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยในปีที่ 2 ซึ่งได้รายงานผล ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมและ PAHs และความทนต่อโลหะหนักชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ และรายงานผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมของแบคทีเรียในฟองน้ำในเบื้องต้นอีกด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

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

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

### ปีที่ 1

1. การคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน จะคัดแยกจากฟองน้ำที่เก็บจากบริเวณแหล่งตัวอย่างคือ บริเวณชายฝั่งทะเล จังหวัดชลบุรี และจังหวัดชุมพร เพื่อให้ได้แบคทีเรียหรือกลุ่มแบคทีเรียอย่างน้อย 10 สายพันธุ์หรือกลุ่ม

### ปีที่ 2

2. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ทำโดยวิเคราะห์ข้อมูลชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ และข้อมูลจากการศึกษาจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อมระดับโมเลกุล ได้แก่ การใช้เทคนิคเมตาจีโนมิกส์ เพื่อตรวจหาชนิดของแบคทีเรียโดยตรงจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้จะตรวจหาชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

3. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และความสามารถในการทนต่อโลหะหนัก ได้แก่ การศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ได้แก่ องค์กรประกอบสำคัญในน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน คือ อัลเคน และ PAHs ชนิดต่างๆ โดยศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย หรือความทนต่อสารตั้งต้น เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น การใช้สารตั้งต้นแบบผสม รวมถึงศึกษาความสามารถการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

### ปีที่ 3

4. การพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารพิษโดยวิธีชีวภาพ โดยการตรึงแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม และหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ หาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลาย และการดูดซับสารมลพิษ รวมถึงประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของวัสดุตรึง ในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

#### 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้คัดแยกและศึกษาความหลากหลายและประสิทธิภาพของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และทนต่อโลหะหนัก จากฟองน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรีและชุมพร รวมถึงการพัฒนาเป็นแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับการบำบัดทางชีวภาพ โดยโครงการวิจัยมีกรอบแนวความคิดการวิจัยดังนี้

การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและทนต่อโลหะหนัก จากสิ่งแวดล้อมที่พบการปนเปื้อนของสารมลพิษดังกล่าว โดยเฉพาะฟองน้ำซึ่งเป็นตัวกรองทั้งแบคทีเรียและสารมลพิษในทะเล จะทำให้มีโอกาสสูงที่จะได้แบคทีเรียหลากหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพดีเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารมลพิษ และการคัดแยกแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมที่มีความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียสูง โดยวิธีการ enrichment ซึ่งเป็นการกระตุ้นในแบคทีเรียต่างๆ จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมนั้นใช้สารมลพิษ ก็จะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะทำให้ได้แบคทีเรียที่น่าสนใจที่มีประสิทธิภาพสูง

นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อมระดับโมเลกุล ได้แก่ การใช้เทคนิคเมตาจีโนมิกส์ เพื่อตรวจหาชนิดของแบคทีเรียโดยตรงจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม และตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม จะทำให้ได้ข้อมูลความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

และสำหรับการพัฒนาการเตรียมแบคทีเรียพร้อมใช้ การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสมจะช่วยเป็นแหล่งคุ้มกัน ทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เช่น ปริมาณน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง หรือสารอาหารที่มีปริมาณต่ำในน้ำเสีย ทำให้อัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำแบคทีเรียที่ถูกตรึงนี้กลับมาใช้ซ้ำได้ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการบำบัดน้ำเสียในระยะยาวต่ำ

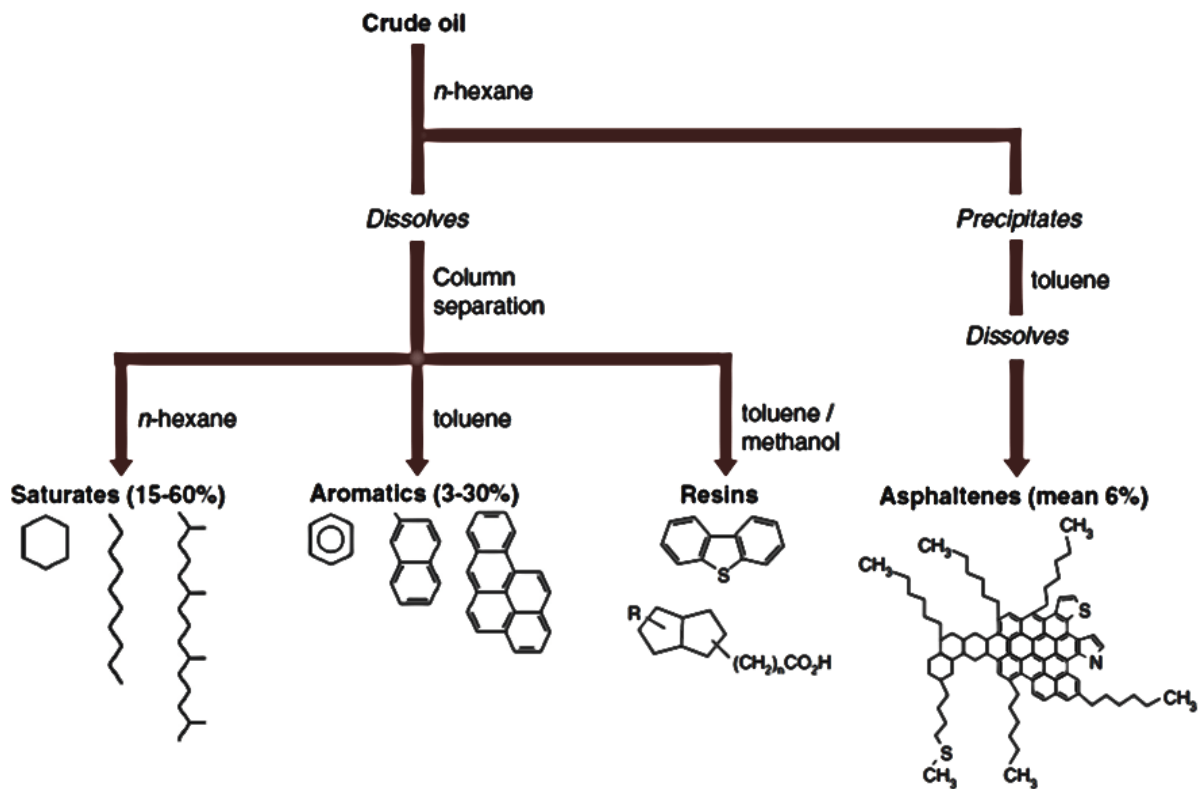
#### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ จากการดำเนินการวิจัยครบ 3 ปี

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

#### 1.6 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันพบปัญหาการปนเปื้อนสารมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้น อาทิ การปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยเฉพาะ PAHs และโลหะหนัก เช่น สารหนู แคดเมียม โครเมียม ทองแดง ตะกั่ว ปรอท สังกะสี ในน้ำทะเลโดยเฉพาะบริเวณแหล่งอุตสาหกรรม เช่น นิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด และแหลมฉบัง รวมถึงบริเวณชายฝั่งทะเล และแม่น้ำ (Boonyatumanond และคณะ, 2006; 2007) ตัวอย่างองค์ประกอบของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (น้ำมันดิบ) แสดงในรูปที่ 1.1 โดยองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ พอลิไซคลิกอะโรมาติก

ไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) ซึ่งมีความเป็นพิษ และเป็นสารเนื้อมันน้ำ ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ มะเร็งและความผิดปกติของทารกในครรภ์ (Peng และคณะ, 2008)



รูปที่ 1.1 ตัวอย่างองค์ประกอบของน้ำมันดิบ (Mcgenity, 2014)

เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลในประเทศไทย พบว่าจากสถิติของกรมเจ้าท่าระหว่างปี พ.ศ. 2540-2558 มีเหตุการณ์การรั่วไหลของน้ำมันทั้งในทะเล และบริเวณชายฝั่ง รวมทั้งไปถึงท่าเทียบเรือ อันเนื่องมาจากอุบัติเหตุระหว่างการขนถ่ายน้ำมันบริเวณท่าเทียบและอุบัติเหตุอื่นๆ เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังสรุปตัวอย่างในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ระหว่างปีพ.ศ. 2540-2558

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

ที่มา: กรมเจ้าท่า (2558)



ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ระหว่างปีพ.ศ. 2540-2558 (ต่อ)

ลำดับที่	วัน/เดือน/ปี	ชนิดของน้ำมัน	สาเหตุ	สถานที่	ปริมาณ
9	4 กันยายน 2554	น้ำมันดีเซล (B5)	เรือบรรทุก น้ำมันอัปปาง	ห่างจากเกาะราชา- ใหญ่ ทางตะวันออก ประมาณ 4 ไมล์ทะเล จ.ภูเก็ต	40,000 ลิตร
10	27 กรกฎาคม 2556	น้ำมันดิบ	รั่วไหลจากท่อ รับน้ำมันดิบ	บริเวณทุ่นรับน้ำมัน กลางทะเล จ.ระยอง	50,000 ลิตร
11	26 มีนาคม 2557	น้ำมันเตา	ไม่ทราบ	ในเขตท่าเรือศรีราชา จ.ชลบุรี	ไม่ทราบ
12	7 เมษายน 2557	น้ำมันเครื่อง ใช้แล้ว กากน้ำมันเตา น้ำทิ้งเรือ	เรือชื่อ “นภสินธุ์”จม	ใกล้ปากแม่น้ำท่าจีน อ.เมือง จ.สมุทรสาคร	10,000 ลิตร
13	8 ตุลาคม 2558	น้ำมันเตา	ท่อระบาย อากาศของเรือ HEIKE P ที่เชื่อม ผ่านไปยังถัง น้ำมันแตกหัก	ท่าเทียบเรือ แหลมฉบัง C1	5,000 ลิตร
14	29 พฤศจิกายน 2558	ก้อนน้ำมันสีดำ (Tar ball)	ไม่ทราบ	ชายหาดบริเวณ ปากน้ำหลังสวน-หาด บางมะพร้าว จ.ชุมพร	ไม่ทราบ (เป็นแนวยาว ประมาณ 10 กิโลเมตร)
15	17 ธันวาคม 2558	ก้อนน้ำมันสีดำ (Tar ball)	ไม่ทราบ	ชายหาดบริเวณ หมู่ 9 ต.เกาะเพชร อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช	ไม่ทราบ (เป็นแนวยาว ประมาณ 3 กิโลเมตร)

ที่มา: กรมเจ้าท่า (2558)

การปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อม ทำให้มีผลกระทบทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อม สุขภาพ และ เศรษฐกิจ จึงจำเป็นต้องมีการจัดการปัญหามลพิษดังกล่าวอย่างถูกต้อง และเป็นการแก้ปัญหาอย่างยั่งยืน โดยการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารพิษโดยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจ โดยเป็นการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารพิษ โดยจุลินทรีย์สามารถนำสารเคมีนั้นๆไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน หรืออาจเปลี่ยนโครงสร้างของสารพิษบางส่วน ทำให้ความเป็นพิษหมดไปหรือลดลง ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำ (Johnsen และคณะ, 2005; Peng และคณะ, 2008) ทั้งนี้การบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธีจำเป็นต้องมีจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ และทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ต้องการบำบัดได้

มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม ทั้งในดินปนเปื้อนสารมลพิษ และน้ำเสีย น้ำทะเล และดินตะกอน เช่น แบคทีเรียที่ย่อยสลาย n-อัลเคน ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* *Alcanivorax* *Burkholderia* *Pseudomonas* *Mycobacterium* และ *Rhodococcus* (van Beilen และ Funhoff, 2007) แบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs เช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* (Zhang และคณะ, 2004) สกุล *Sphingomonas* (Pinyakong และคณะ, 2003) สกุล *Mycobacterium* (Heitkamp และคณะ, 1988; Bastiaens และคณะ, 2000) และในงานวิจัยก่อนหน้านี้กลุ่มผู้วิจัยสามารถคัดแยกแบคทีเรียจากธรรมชาติ ได้แก่ จากดินและน้ำเสียในประเทศไทยที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม แบคทีเรียที่แยกได้เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายสารในกลุ่มปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ PAHs เช่น *Diaphorobacter* sp. และ *Pseudoxanthomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายไพรีน พีแนนทริน (Klankeo และคณะ, 2009) *Sphingomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีน (Saiphet และคณะ, 2006) ซึ่งต่อมาก็พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ นอกจากนี้ยังได้คัดแยก *Acinetobacter* sp. ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ (Tathong, 2007) เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษากลไกการย่อยสลาย และการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ เช่น ยีนประมวลรหัสอัลเคนไฮดรอกซิเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอัลเคน (Wang และคณะ, 2010) ได้แก่ ยีน *alk* ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ

ยีน	หน้าที่	อ้างอิง
<i>alkB</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>6</sub> -C <sub>12</sub>	Kohno และคณะ, 2002
<i>alkM</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายยาว C <sub>12</sub> ขึ้นไป	Kohno และคณะ, 2002
<i>alkB<sub>1</sub></i>	ไม่จำเพาะเจาะจง	Kohno และคณะ, 2002

ยีน	หน้าที่	อ้างอิง
<i>alkB-1</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>13</sub> -C <sub>23</sub>	Kloos และคณะ, 2006
<i>alkB1</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลางถึงอัลเคนสายยาว C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub> และอัลเคนที่เป็นไซโซกิ่ง	Whyte และคณะ, 2002
<i>alkB2</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลางถึงอัลเคนสายยาว C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	Whyte และคณะ, 2002
CYP 153	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>6</sub> -C <sub>16</sub>	Wang และคณะ, 2011
CYP 153	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>8</sub> -C <sub>15</sub>	Wang และคณะ, 2010
<i>almA</i>	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>8</sub> -C <sub>16</sub> และอัลเคนสายยาว C <sub>22</sub> -C <sub>36</sub>	Liu และคณะ, 2011
CYP 153	จำเพาะกับอัลเคนสายกลาง C <sub>8</sub> -C <sub>16</sub>	van Beilen และคณะ, 2006

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

อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพและน่าสนใจอีกเป็นจำนวนมากในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย ที่ยังไม่ได้ถูกคัดแยกและศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างจากธรรมชาติที่น่าสนใจที่จะเป็นแหล่งของแบคทีเรียย่อยสลายสารมลพิษ เช่น ฟองน้ำ น้ำทะเล และดินตะกอนที่ปนเปื้อนสารมลพิษ เนื่องจากมีรายงานพบว่าฟองน้ำสามารถทำหน้าที่เป็นตัวกรองทั้งแบคทีเรีย และสารต่างๆ รวมถึงสารมลพิษในทะเล เช่น มีรายงานว่าฟองน้ำทะเล *Halichondria panacea* สะสมโลหะหนัก ได้แก่ ทองแดง สังกะสี และแคดเมียม ในปริมาณที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของโลหะหนักที่ละลายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง จึงแนะนำว่าสามารถใช้ฟองน้ำทะเลสปีชีส์นี้เป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพได้อีกด้วย (Hansen และคณะ, 1995) และยังพบว่ากว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของมวลชีวภาพของฟองน้ำประกอบไปด้วยแบคทีเรีย (Webster และ Bourne, 2007) และยังมีรายงานที่ศึกษาการใช้แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับฟองน้ำเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนสารอินทรีย์ (Kefalas และคณะ, 2003) รวมถึงรายงานการศึกษาแบคทีเรีย ได้แก่ *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Coliforms*, *Salmonella* และ *Shigella* จากน้ำทะเล และดินตะกอนจากอ่าวเบงกอล ที่สามารถทนต่อโลหะหนักได้หลายชนิด ได้แก่ นิกเกิล โครเมียม คอปเปอร์ โคบอลต์ ตะกั่ว และปรอท Ni, Cr, Cu, Co, Pb and Hg (50 mM) ได้ (Santhiya และคณะ, 2011) ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนต่อโลหะหนักแสดงดังตารางที่ 1.3 ดังนั้นจึงคาดว่าทั้งฟองน้ำ น้ำทะเล และดินตะกอนน่าจะเป็นแหล่งที่

จะสามารถพบแบคทีเรียที่น่าสนใจที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารมลพิษ และมีสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

ตารางที่ 1.3 ความสามารถในการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	โลหะหนัก (mM)								อ้างอิง
	Cu <sup>2+</sup>	As <sup>3+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	800	84	1071	500	1000	ND	ND	ND	Dopson และคณะ, 2003
<i>Thiomonas cuprina</i> DSM 5495	7.9	1.3	150	0.09	170	ND	ND	ND	Schippers, 2007
<i>Roseobacter</i> sp. MSI06	20	ND	ND	0.5	40	40	40	ND	Selvin และคณะ, 2009
<i>Pseudomonas</i> sp. MSI09	40	ND	ND	160	40	40	40	ND	
<i>Vibrio</i> sp. MSI016	40	ND	ND	160	40	40	40	ND	
<i>Micromonospora</i> sp. MSI28	20	ND	ND	160	160	40	160	ND	
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	3	4	12	4	13	ND	ND	ND	Monsieurs และคณะ, 2011
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> O12	4.7	ND	8.5	<0.4	17	ND	2.5	0.4	Altimiral และคณะ, 2012
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> A32	3.9	ND	8.5	<0.4	17	ND	2.5	0.4	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> A55	3.9	ND	8.5	<0.4	17	ND	2.5	0.4	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> C21	3.1	ND	<0.8	<0.4	0.9	ND	0.8	0.1	
<i>Arthrobacter oxydans</i> O4	3.9	ND	<0.8	<0.4	8.5	ND	2.5	0.1	

นอกจากนี้ในปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์กว่าร้อยละ 99 ตามธรรมชาติไม่สามารถถูกเพาะเลี้ยงได้ในสภาวะที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ หรือเพาะเลี้ยงได้ยาก จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ยังขาดข้อมูลของจุลินทรีย์ ยีนและเอนไซม์ที่สำคัญอีกมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคใหม่ทางชีวโมเลกุลในการศึกษาแบคทีเรียและยีนในสิ่งแวดล้อม

โดยตรง เช่น การศึกษาประชากรแบคทีเรียโดยเทคนิค PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), Fluorescent in situ hybridization (FISH), การโคลน 16S rDNA, การโคลนยีนเป้าหมายอื่นๆ เช่น ยีนไดออกซีจีเนส, DNA barcode, การคัดแยกยีนจากห้องสมุดเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรง, การศึกษาด้วย phyloarray, microarray, real-time PCR, metaproteomics, metatranscriptomics, metabolomics เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้ทำให้สามารถค้นพบแบคทีเรีย ยีนและเอนไซม์ที่มีประโยชน์จากสิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องคัดแยกเชื้อก่อน รวมถึงหลายวิธีการทำให้เข้าใจบทบาทหน้าที่ของแบคทีเรียและยีนเหล่านั้นในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Liang และคณะ, 2009; Santos และคณะ, 2009; Spiegelman และคณะ, 2005) ซึ่งจะทำให้จัดการสิ่งแวดล้อมได้อย่างถูกวิธี และสามารถหาวิธีนำแบคทีเรียและยีนใหม่ๆ ไปใช้ประโยชน์ได้อีกด้วย ทั้งนี้มีงานวิจัยที่รายงานการพบแบคทีเรียหลากหลายชนิด และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมและ PAHs จากดินตะกอนและน้ำทะเลในต่างประเทศ เช่น Long และคณะ (2009) ใช้วิธี PCR-DGGE และโคลน 16S rDNA ทำให้พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Proteobacteria* และ *Actinobacteria* มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายพีแนนทริน และแอนทราซีนในดินตะกอนปากแม่น้ำบริสตอล ประเทศอังกฤษ และ Niepceron และคณะ (2010) ใช้วิธีการทำระบบนิเวศจำลองน้ำทะเลปนเปื้อน PAHs, PCR-DGGE, RT-PCR, โคลน 16S rDNA และ real-time PCR แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียหลายสปีชีส์ในกลุ่ม *Cycloclasticus* และ *Pseudomonas* มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย PAHs ในน้ำทะเลประเทศฝรั่งเศส Marcos และคณะ (2009) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไดออกซีจีเนสของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก และใช้ในการตรวจหายีนดังกล่าวในระบบนิเวศน้ำทะเล บริเวณซับ-แอนตาร์คติก นอกจากนี้ Wang และคณะ (2010) ได้ศึกษาความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม และยีนอัลเคนไฮดรอกซีเลส (*alkB*) ในน้ำทะเลบริเวณเกาะเซียงเหมิน ประเทศจีน และสามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายได้น้ำมันได้ 16 สายพันธุ์ และตรวจพบยีน *alkB* ในทุกสายพันธุ์โดยใช้วิธี PCR รวมทั้งยังสามารถพบ *alkB* จาก DNA ของเมตาจีโนมด้วย และเมื่อใช้วิธี real-time PCR ก็ทำให้ทราบความอุดมสมบูรณ์ของยีน *alkB* ในบริเวณดังกล่าวอีกด้วย งานวิจัยของ Mason และคณะ (2014) ได้เก็บตัวอย่างดินตะกอนบริเวณที่มีการรั่วไหลของน้ำมันของแท่นขุดเจาะน้ำมัน Deepwater Horizon ได้ศึกษาไมโครไบโอมเปรียบเทียบกับบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน โดยการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งแวดล้อมโดยตรง ผลการศึกษาพบว่า *Proteobacteria* โดยเฉพาะ *Gammaproteobacterium* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในดินตะกอนที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน แสดงให้เห็นว่าการมีอยู่หรือความเข้มข้นของไฮโดรคาร์บอนส่งผลต่อความแตกต่างของไมโครไบโอม และงานวิจัยของ Alex และ Antunes คณะ (2015) ได้ศึกษาไมโครไบโอมตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บมาจากมหาสมุทรแอตแลนติก สามารถพบจุลินทรีย์หลากหลายชนิด โดยพบแบคทีเรีย 75.5 เปอร์เซ็นต์ และอาร์เคีย 22 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมี *Proteobacteria* เป็นประชากรเด่น ซึ่งพบ 43.4 เปอร์เซ็นต์ และ *Crenarchaeota* 20.6 เปอร์เซ็นต์ โดยในปัจจุบันการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งแวดล้อมโดยตรง ถือเป็นวิธีการที่ทันสมัยที่สุดในการศึกษาไมโครไบโอมในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมที่สนใจ ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีที่ทำแล้ววิเคราะห์ผลได้ปริมาณมาก (high throughput

methods) และทำให้เข้าใจบทบาทของจุลินทรีย์ต่อสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้มากขึ้น (Fierer และคณะ, 2012; Roder และคณะ, 2015)

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

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลของโลหะหนักต่อการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น Zukauskaite และคณะ (2008) พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เพิ่มขึ้น 11-15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเติมทองแดง และแมงกานีสลงในดิน และประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดำเพิ่มขึ้น 29% เมื่อมีการเติมแมงกานีสและทองแดง Al-Mailem และคณะ (2011) รายงานว่าอาเคียร์ทนเค็มที่สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้สามารถทนต่อเมอคิวรีได้ในสภาพที่มีความเค็มสูง และ Al-Saleh และ Obuekwe (2009) รายงานถึงผลของนิกเกิลต่อการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดินประเทศคูเวต โดยพบว่านิกเกิลมีผลทำให้ลดจำนวนจุลินทรีย์ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในดิน โดยผลดังกล่าวเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณนิกเกิล สำหรับการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายพบว่าขึ้นอยู่กับชนิดของสาร เช่น ปริมาณนิกเกิลไม่มีผลกระทบต่อการย่อย น้ำมันดิบและเฮกซะเดคเคน แต่มีผลยับยั้งการย่อยเนฟทาซีน

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

รายงานการใช้เซลล์ตรึงในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ Rahman และคณะ (2006) ใช้แบคทีเรียตรึงในอัลจิเนตเพื่อการบำบัดน้ำทะเลสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการถูกใช้ซ้ำได้มากกว่า 150 วันโดยไม่ลดความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

Gentili และคณะ (2006) นำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนตรึงบนไคตินและไคโตซานจากกุ้งและใช้ในการบำบัดน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบในระบบบำบัดระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าการตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ และเพิ่มการอยู่รอดของแบคทีเรียในระบบบำบัด

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

## 2. การดำเนินการวิจัย

### 2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 2.1.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบจำนวน 19 สายพันธุ์ ซึ่งคัดแยกได้จากงานวิจัยในปีที่ 1 แบคทีเรียเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 16-60 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

สายพันธุ์	ชนิดแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันดิบ
Chan2-2	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	59.96±4.80
MO2-1	<i>Bacillus</i> sp.	56.90±1.11
MO2-4	<i>Sphingobium</i> sp.	50.53±1.03
MO2-5	<i>Bacillus</i> sp.	45.23±2.87
NN4-1	<i>Bacillus</i> sp.	36.92±1.08
NY1-3	<i>Brevibacterium casei</i>	34.99±3.11
NY1-5	<i>Brevibacterium</i> sp.	50.84±5.19
SAK2-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	60.12±1.71
SS-B1-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	33.46±1.65
SS-B1-5	<i>Enterobacter cloacae</i>	16.26±2.92
SS-C1-1	<i>Acinetobacter</i> sp.	59.42±1.58
SS-C1-2	<i>Pseudomonas putida</i>	44.40±1.27
TL01-2	<i>Bacillus megaterium</i>	52.30±2.19
TL02-3	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	40.46±1.08
TL02-4	<i>Methylobacterium</i> sp.	36.37±2.00
TY4-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33.81±3.88
TY5-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	26.71±4.11
TY5-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	26.25±3.32
TY5-3	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	48.72±4.31



### 2.1.2 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม ได้แก่ น้ำมันดีเซลและน้ำมันเตา ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว 19 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โดยเชื้อโคลนเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาละลายในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อให้แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ประมาณ 8 Log CFU/ml และเติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่มีน้ำมันดีเซลหรือน้ำมันเตา ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วยวิธีทรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยวิธี TLC-FID เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.1.3 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้นต่างๆของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบชนิด ARL+AXL 2 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวที่คัดเลือกจากผลการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งมีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ Chan2-2, MO2-1, MO2-4, SAK2-2 และ SS-C1-1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 2.1.2 โดยเติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ประมาณ 8 Log CFU/ml ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 สำหรับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 21 เพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วยวิธีทรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยวิธี TLC-FID เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.1.4 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลสองระดับความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวที่คัดเลือกจากผลการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งมีทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ได้แก่ MO2-1, MO2-4, SS-B1-1, SS-B1-5, SS-C1-1, TY4-1, TY5-1 และ TY5-2 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 2.1.2 โดยเติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้น

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ประมาณ 8 Log CFU/ml ที่มีน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 สำหรับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 21 เพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วยวิธีทรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยวิธี TLC-FID เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.1.5 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันเตาสองระดับความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวที่คัดเลือกจากผลการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งมีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ Chan2-2, MO2-4, TY5-1, TY5-2 และ TY5-3 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 2.1.2 โดยเติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ประมาณ 8 Log CFU/ml ที่มีน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 สำหรับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 21 เพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วยวิธีทรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเตาโดยวิธี TLC-FID เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.1.6 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเตตระเดคเคนของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ทดสอบการย่อยสลายเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 ppm ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวที่คัดเลือกจากผลการย่อยสลายน้ำมันดิบและน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งมีทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้แก่ Chan2-2, MO2-1, MO2-4, SAK2-2, SS-B1-1, SS-B1-5, SS-C1-1, TY4-1, TY5-1 และ TY5-2 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 2.1.2 โดยเติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ประมาณ 8 Log CFU/ml และเติมเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 ppm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วยวิธีทรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ประสิทธิภาพการย่อยสลายเตตระเดคเคนโดยวิธี GC-FID เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.1.7 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายฟิแนนทรินของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ทดสอบการย่อยสลายฟิแนนทรินความเข้มข้น 50 ppm ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวที่คัดเลือกจากผลการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งมีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ MO2-4, TY5-1 และ TY5-2 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 2.1.2 โดยเติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ประมาณ 8 Log CFU/ml และเติมฟิแนนทรินความเข้มข้น 50 ppm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วยวิธีตรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟิแนนทรินโดยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.1.8 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ทดสอบการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 50 ppm ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวที่คัดเลือกจากผลการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งมีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ MO2-4, TY5-1 และ TY5-3 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 2.1.2 โดยเติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ประมาณ 8 Log CFU/ml และเติมไพรีนความเข้มข้น 50 ppm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 7 เพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วยวิธีตรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟิแนนทรินโดยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมแบคทีเรียทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.1.9 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารผสมของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ทดสอบการย่อยสลายสารผสมของฟิแนนทรินความเข้มข้น 25 ppm และเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 ppm ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MO2-4 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 2.1.2 โดยเติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ประมาณ 8 Log CFU/ml และฟิแนนทรินความเข้มข้น 25 ppm และเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 ppm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 เพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วยวิธีตรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟิแนนทรินโดยวิธี HPLC และประสิทธิภาพการย่อยสลายเตตระเดคเคนโดยวิธี GC เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.1.10 ทดสอบความสามารถในการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

โลหะหนักที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 9 ชนิด คือ Hg ( $\text{HgCl}_2$ ), Zn ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Fe ( $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), Pb ( $\text{O}_4\text{PbS}$ ), Ni ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Co ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Cd ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ), Cr ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) และ Cu ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ )

แบคทีเรียที่นำมาทดสอบความสามารถในการทนต่อโลหะหนัก คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ MO2-4 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 2.1.2 โดยเติมแบคทีเรีย 10 เพอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW OD600 = 0.1 และโลหะหนักชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่มีโลหะหนักชนิดต่างๆ ด้วยวิธีดรอปปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และวัดด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมโลหะหนัก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 2.1.11 ทดสอบความสามารถในการทนต่อสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

สารลดแรงตึงผิวที่นำมาทดสอบในการทดลองนี้มี 2 ชนิด คือ ซิลิกอนและสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TL401 แบคทีเรียที่นำมาทดสอบความสามารถในการทนต่อสารลดแรงตึงผิว คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ MO2-4 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 2.1.2 โดยเติมแบคทีเรีย 10 เพอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW OD600 = 0.1 และซิลิกอน 1 เพอร์เซ็นต์ และ 2.4 เพอร์เซ็นต์ ส่วนสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TL401 เติมที่ความเข้มข้น 2.4 เพอร์เซ็นต์ (2XCMD) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่มีสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ ด้วยวิธีดรอปปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมสารลดแรงตึงผิว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 2.1.12 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมในสถานะที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว

ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบชนิด ARL+AXL ความเข้มข้น 0.25 เพอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ในสถานะที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวสายพันธุ์ MO2-4 สารลดแรงตึงผิวที่นำมาทดสอบในการทดลองนี้มี 2 ชนิด คือ ซิลิกอน 1 เพอร์เซ็นต์ และสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TL401 2.4 เพอร์เซ็นต์ (2XCMD) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 2.1.2 โดยเติมแบคทีเรีย 10 เพอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ประมาณ 8 Log CFU/ml และเติมสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3 และ 7 เพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ด้วยวิธีดรอปปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยวิธี TLC-FID เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NSW ที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.1.13 ศึกษาไมโครไบโอมในตัวอย่างฟองน้ำโดยวิธี 16S metagenome sequencing

สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียในฟองน้ำโดยตรง โดยใช้ตัวอย่างฟองน้ำทะเล 5 กรัม สกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ PowerSoil® DNA Isolation Kit (บริษัท MO BIO Laboratories, Inc., USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้ง 3 ซ้ำมารวมกัน

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 515F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') และ 806R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') ซึ่งจำเพาะต่อบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 291 bp ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยาดังนี้ GoTaq® Green Master Mix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะดังนี้

- |                          |                             |                    |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation  | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที    |
| 2. Denaturation          | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3. Annealing             | ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 45 วินาที |
| 4. Extension             | ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 ซ้ำ | จำนวน 28 รอบ                |                    |
| 6. Final extension       | ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 7 นาที    |

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ AxyPrep™ Mag CR Clean-Up (บริษัท Axygen, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นติด Index ด้วยชุด Nextera XT Index Kit (บริษัท Illumina, USA) ที่บริเวณปลาย sequencing primer ทั้ง 2 ด้าน และติดที่ Illumina sequencing adapters ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาในปฏิกิริยาดังนี้ 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (บริษัท Kapa Biosystems, USA) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร สารละลาย Nextera XT Index Primer 1 (N7xx) 5 ไมโครลิตร Nextera XT Index Primer 2 (S5xx) 5 ไมโครลิตร ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ 5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะดังนี้

- |                          |                             |                    |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation  | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 3 นาที    |
| 2. Denaturation          | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3. Annealing             | ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension             | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 ซ้ำ | จำนวน 8 รอบ                 |                    |
| 6. Final extension       | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที    |

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ Index PCR อีกครั้งโดยใช้ AxyPrep™ Mag CR Clean-Up (บริษัท Axygen, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต เพื่อชะล้างสารละลายไพโรเมอร์ไธเมอร์ที่อาจยังคงมีหลงเหลืออยู่ในระหว่างขั้นตอนของการทำ PCR วัดความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง DeNovix (บริษัท DeNovix, USA) และคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยมีสูตรคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ดังนี้

$$\frac{\text{(concentration in ng/}\mu\text{L)}}{(660 \text{ g/mol} \times \text{average library size})} \times 10^6 = \text{concentration in nM}$$

เจือจางตัวอย่างและรวมตัวอย่าง (Pooling) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 nM จากนั้นวิเคราะห์ metagenomic sequencing ด้วยเครื่อง Miseq (บริษัท Illumina, USA) โดยใช้ Miseq Reagent kit V2 (บริษัท Illumina, USA) และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ไมโครไบโอม

#### 2.1.14 ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างฟองน้ำด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1.13 ตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหายีนอัลเคนไฮดรอกซิเลสและยีนไดออกซิจีเนส ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพโรเมอร์และขนาดคาดหวังของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส แสดงในตารางที่ 2.2 โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 2.1.13 จากนั้นทำ PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ตารางที่ 2.2 ไพโรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและ PAHs

ชื่อไพโรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (bp)	ดีเอ็นเอเป้าหมาย (เอนไซม์)	อ้างอิง
alk1	CATAATAAAGGGCATCACCGT-(F) GATTTTCATTCTCGAAACTCCAAAC-(R)	185	<i>alkB</i>	Kohno และคณะ, 2002
alk2	GAGACAAATCGTCTAAAACGTAA-(F) TTGTTATTATTCCAACCTATGCTC-(R)	271	<i>alkM</i>	
alk3	TCGAGCACATCCGCGGCCACCA-(F) CCGTAGTGCTCGACGTAGTT-(R)	330	<i>alkB1</i>	
alkB-1	AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAYAA-(F) GCRTGRTGRTCNGARTGNCGYTG-(R)	550	<i>alkB-1</i>	Kloos และคณะ, 2006
alkB1	ATCTGGGCGCGTTGGGATTTGAGCG-(F) CGCATGGTGATCGCTGTGCCGCTGC-(R)	629	<i>alkB1</i>	Whyte และคณะ, 2002

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ PCR (bp)	ดีเอ็นเอ เป้าหมาย (เอนไซม์)	อ้างอิง
alkB2	ACTCTGGCGCAGTCGTTTTACGGCC-(F) CCCCTGGGCAGGTTGGGCGCACCG-(R)	552	<i>alkB2</i>	Whyte และ คณะ, 2002
CYP 153	ATGTTYATYGCNATGGAYCCN-(F) GCGRTTVCCCATRCARCGRTG-(R)	820	CYP153	Wang และ คณะ, 2011
P450	TGTCGGTTGAAATGTTTCATYGCNMTGGAYCC-(F) TGCAGTTCGGCAAGGCGGTTDCCSRYRCAVCKRTG -(R)	800	CYP153	Wang และ คณะ, 2010
almAw	GGNGGNACNTGGGAYCTNTT-(F) ATRTCNGCYTTNAGNGTCC-(R)	1131	<i>almA</i>	Liu และคณะ, 2011
P450 fw1 & rv3	GTSGGCGGCAACGACACSAC-(F) GCASCGGTGGATGCCGAAGCCRAA (R)	339	CYP153	van Beilen และคณะ, 2006
GN	GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA-(F) AGCTGTTGTTCCGGGAAGAYWGTGCMGTT-(R)	306	PAH- RHD $\alpha$ ใน แบคทีเรีย แกรมลบ	Cébron และ คณะ, 2008
GP	CGGCGCCGACAAATTYGTNGG-(F) GGGGAACACGGTGC CRTGDATRAA-(R)	292	PAH- RHD $\alpha$ ใน แบคทีเรีย แกรมบวก	

## ผลการวิจัย

### 2.1 ผลการวิจัย

#### 2.2.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 19 สายพันธุ์ ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล พบว่ามีแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ MO2-1, MO2-4, SS-B1-1, SS-B1-5, SS-C1-1, TY4-1, TY5-1 และ TY5-2 สำหรับการย่อยสลายน้ำมันเตา พบว่ามีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ Chan2-2, MO2-4, TY5-1, TY5-2 และ TY5-3 (ตารางที่ 2.3) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ทั้งในน้ำมันดีเซลและน้ำมันเตา (รูปที่ 2.1-2.2)

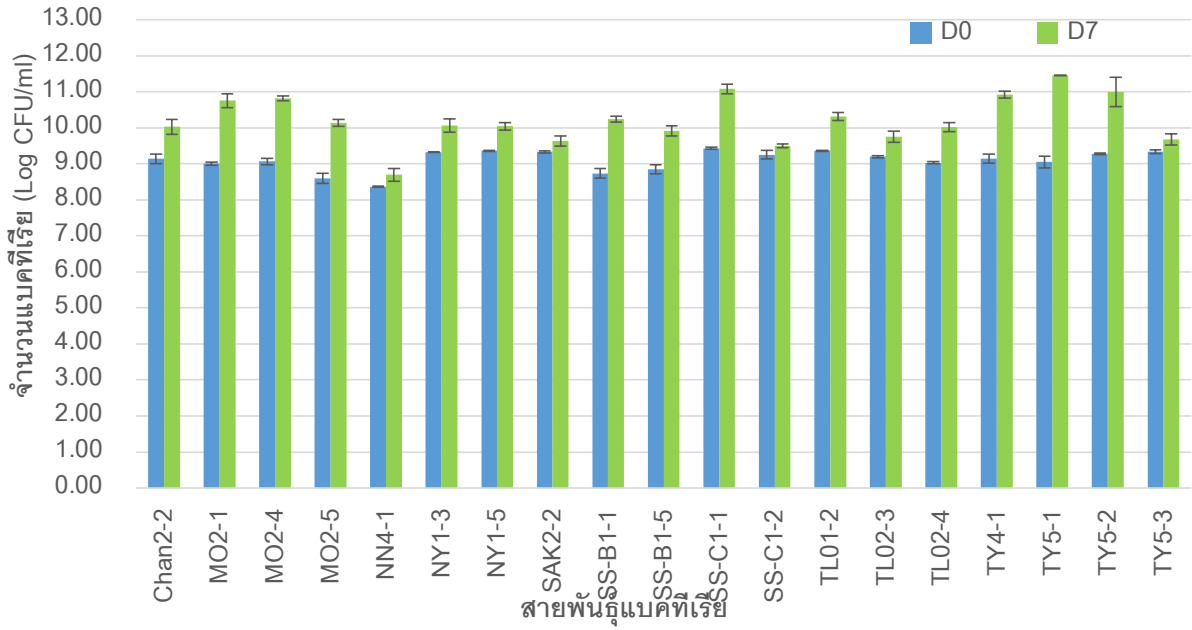
ตารางที่ 2.3 ปริมาณน้ำมันดีเซลและน้ำมันเตาที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายน้ำมันความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณน้ำมันดีเซลที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำมันเตาที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
Chan2-2	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	34.97±2.52	56.50±2.89
MO2-1	<i>Bacillus</i> sp.	66.80±0.87	48.37±4.12
MO2-4	<i>Sphingobium</i> sp.	52.54±2.72	54.18±0.77
MO2-5	<i>Bacillus</i> sp.	46.54±3.37	31.01±3.19
NN4-1	<i>Bacillus</i> sp.	29.88±2.40	20.40±1.56
NY1-3	<i>Brevibacterium casei</i>	44.48±2.49	13.41±1.86
NY1-5	<i>Brevibacterium</i> sp.	34.89±4.39	24.25±4.83
SAK2-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	30.31±5.71	30.15±5.49
SS-B1-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	69.12±1.43	35.03±4.52
SS-B1-5	<i>Enterobacter cloacae</i>	60.88±1.57	39.76±4.62
SS-C1-1	<i>Acinetobacter</i> sp.	62.02±0.99	39.12±4.58
SS-C1-2	<i>Pseudomonas putida</i>	14.03±3.76	25.04±5.90
TL01-2	<i>Bacillus megaterium</i>	33.67±3.77	29.97±3.25
TL02-3	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	23.69±0.86	40.37±2.34
TL02-4	<i>Methylobacterium</i> sp.	34.31±3.23	43.94±2.57

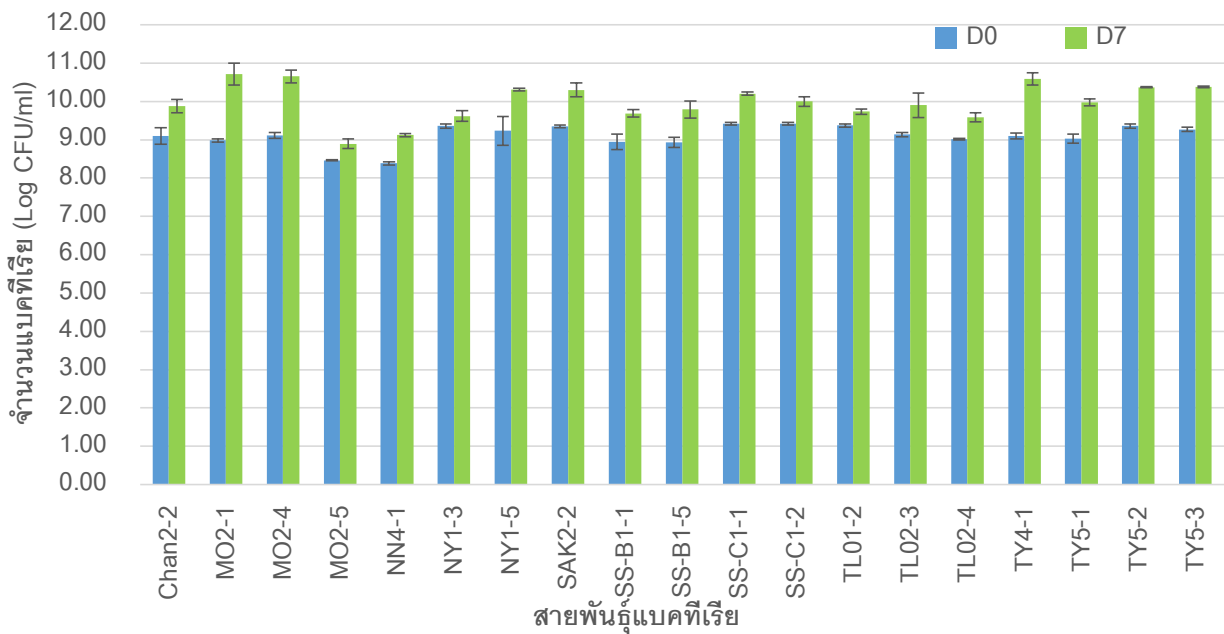


สายพันธุ์	ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณน้ำมันดีเซลที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำมันเตาที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
TY4-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57.40±2.46	46.94±5.80
TY5-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	76.47±2.26	57.51±2.77
TY5-2	<i>Pseudomonas sp.</i>	52.08±2.12	63.74±1.30
TY5-3	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	16.17±3.94	61.90±2.31

หมายเหตุ ปริมาณน้ำมันที่ลดลงของแบคทีเรียคิดเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 2.1 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 19 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 0 และ 7 วัน



รูปที่ 2.2 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 19 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 0 และ 7 วัน

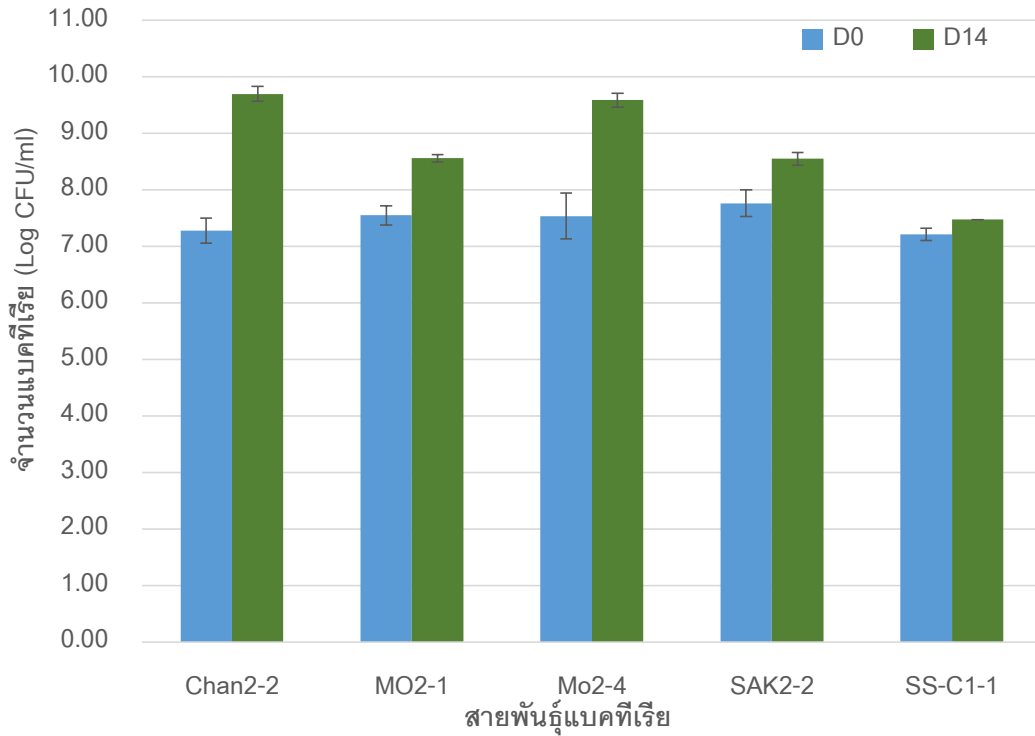
## 2.2.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้นต่างๆของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ Chan2-2, MO2-1, MO2-4, SAK2-2 และ SS-C1-1 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้ 29-66 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 14 วัน โดย *Sphingobium* sp. MO2-4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุด สำหรับน้ำมันดิบความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายใกล้เคียงกัน โดยสามารถย่อยสลายได้ 38-49 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน แสดงดังตารางที่ 2.4 โดยพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 2.3-2.4)

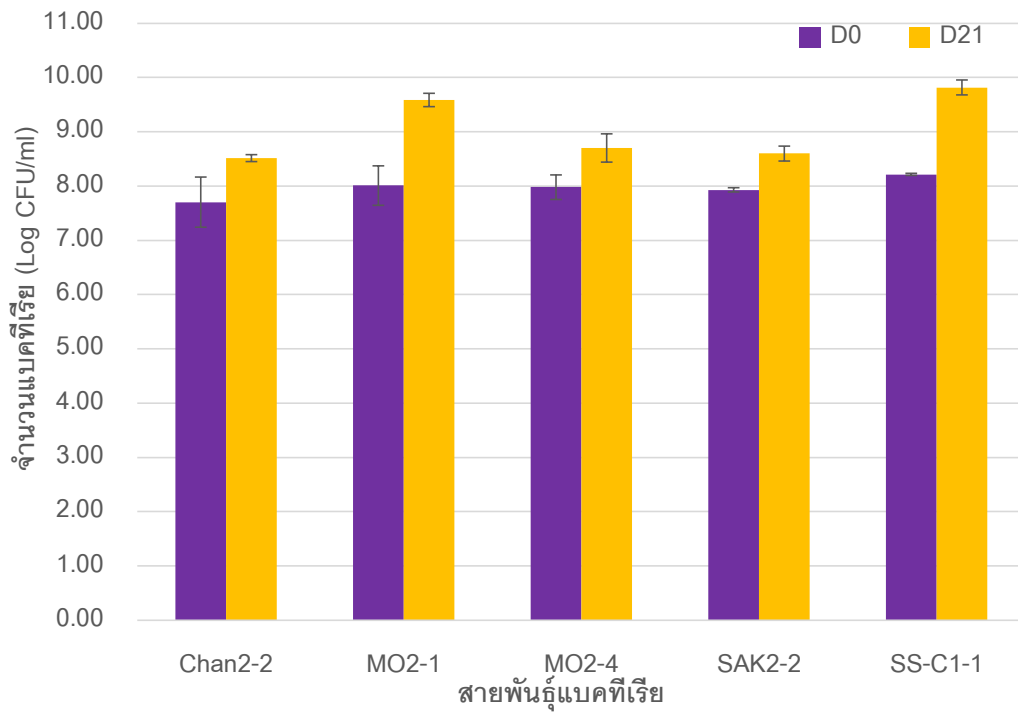
ตารางที่ 2.4 ปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายน้ำมันดิบ

สายพันธุ์	ชนิดแบคทีเรีย	ความเข้มข้น น้ำมันดิบ (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณน้ำมันดิบที่ ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
Chan2-2	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	0.5	14	50.86±5.35
		1	21	48.52±1.88
MO2-1	<i>Bacillus</i> sp.	0.5	14	34.29±4.72
		1	21	38.13±3.18
MO2-4	<i>Sphingobium</i> sp.	0.5	14	65.69±0.95
		1	21	47.17±3.36
SAK2-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.5	14	29.28±2.24
		1	21	48.27±4.41
SS-C1-1	<i>Acinetobacter</i> sp.	0.5	14	39.35±3.45
		1	21	46.22±1.51

หมายเหตุ ปริมาณน้ำมันที่ลดลงของแบคทีเรียคิดเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 2.3 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 5 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 2.4 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 5 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

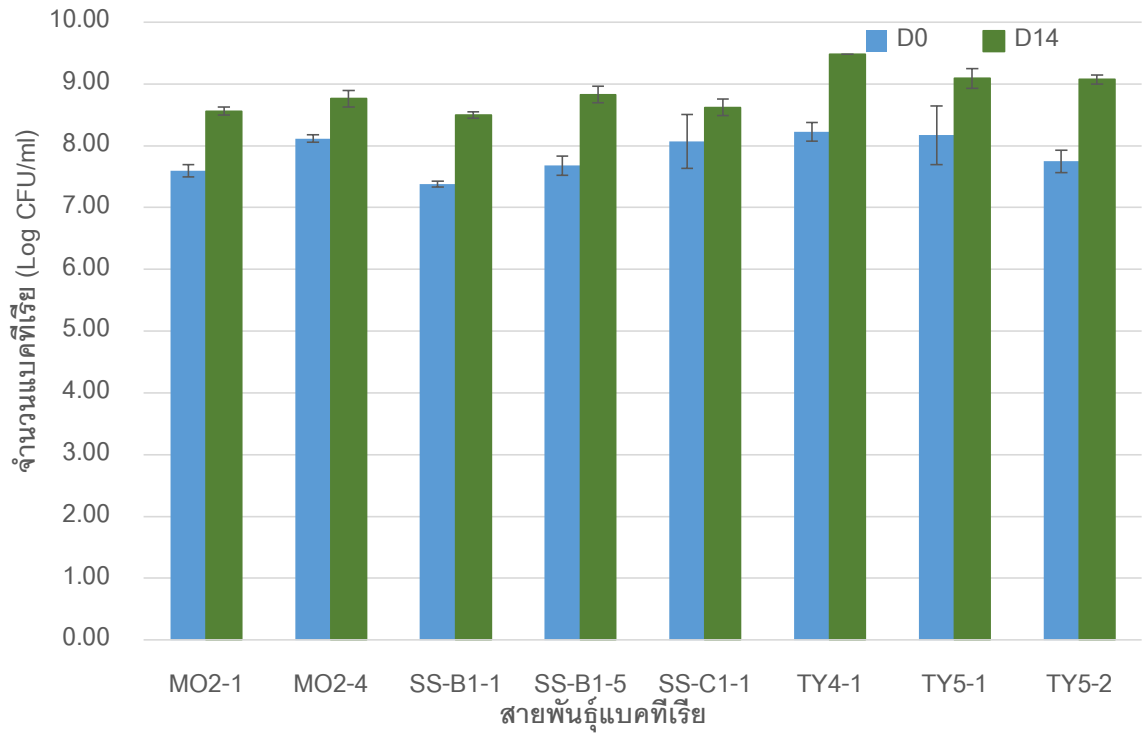
### 2.2.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้นต่างๆของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ MO2-1, MO2-4, SS-B1-1, SS-B1-5, SS-C1-1, TY4-1, TY5-1 และ TY5-2 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้ 13-54 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 14 วัน โดย *Sphingobium* sp. MO2-4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุด สำหรับน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายประมาณ 14-45 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน โดย *Sphingobium* sp. MO2-4, *Aeromonas* sp. SS-B1-1 และ *Pseudomonas* sp. TY5-2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีที่สุด แสดงดังตารางที่ 2.5 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 2.5-2.6)

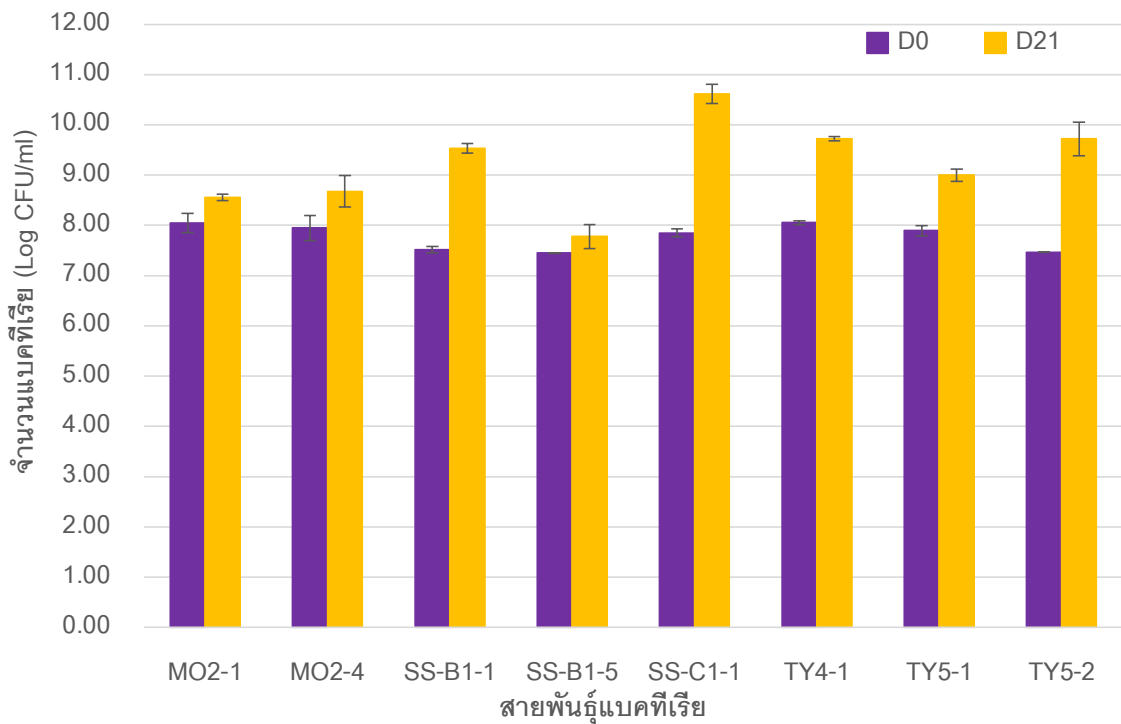
ตารางที่ 2.5 ปริมาณน้ำมันดีเซลที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

สายพันธุ์	ชนิดแบคทีเรีย	ความเข้มข้นน้ำมันดีเซล (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณน้ำมันดีเซลที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
MO2-1	<i>Bacillus</i> sp.	0.5	14	31.99±4.72
		1	21	14.02±0.52
MO2-4	<i>Sphingobium</i> sp.	0.5	14	54.16±2.07
		1	21	43.72±0.25
SS-B1-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.5	14	46.79±5.60
		1	21	45.16±2.36
SS-B1-5	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.5	14	43.68±1.76
		1	21	15.39±1.31
SS-C1-1	<i>Acinetobacter</i> sp.	0.5	14	13.44±1.01
		1	21	42.39±2.00
TY4-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.5	14	46.65±4.19
		1	21	40.04±1.54
TY5-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.5	14	53.00±1.38
		1	21	23.16±1.16
TY5-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.5	14	38.53±3.21
		1	21	43.74±1.31

หมายเหตุ ปริมาณน้ำมันที่ลดลงของแบคทีเรียคิดเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 2.5 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 8 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์



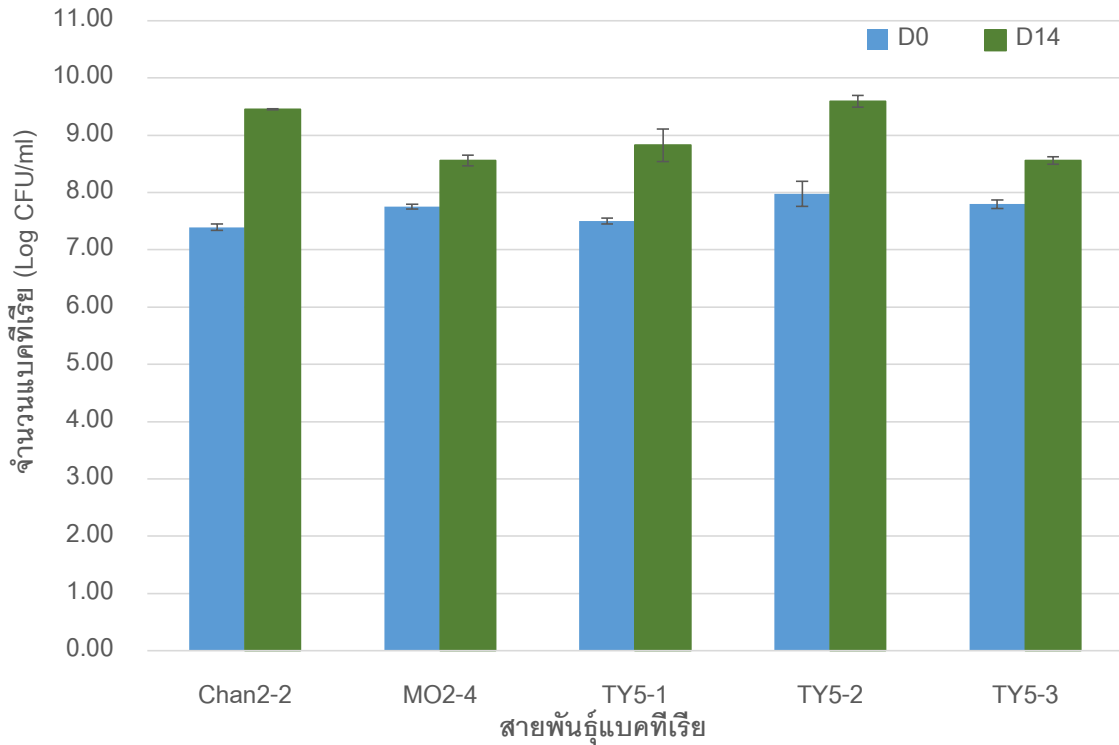
รูปที่ 2.6 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 8 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

## 2.2.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

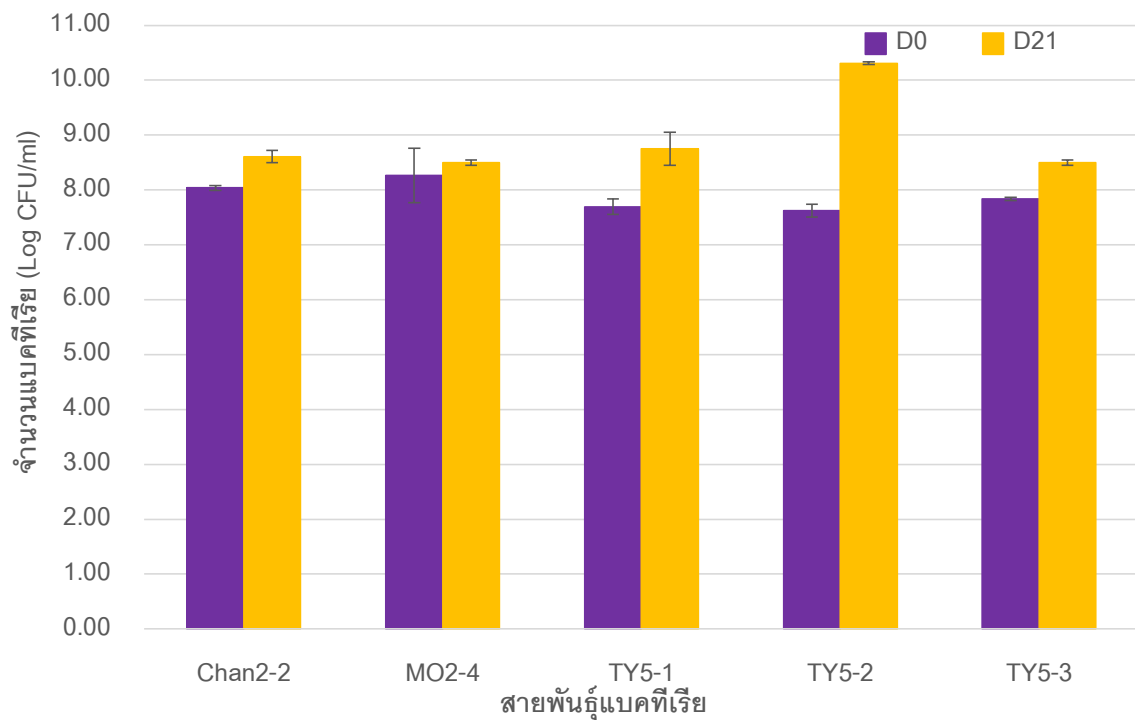
ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ Chan2-2, MO2-4, TY5-1, TY5-2 และ TY5-3 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้ 29-56 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 14 วัน สำหรับน้ำมันเตาความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายประมาณ 34-59 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน โดย *Pseudomonas* sp. TY5-2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุดทั้งสองความเข้มข้น แสดงดังตารางที่ 2.6 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 2.7-2.8)

ตารางที่ 2.6 ปริมาณน้ำมันเตาที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายน้ำมันเตา

สายพันธุ์	ชนิดแบคทีเรีย	ความเข้มข้น น้ำมันเตา (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณน้ำมันเตาที่ ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
Chan2-2	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	0.5	14	35.31±2.41
		1	21	35.87±2.69
MO2-4	<i>Sphingobium</i> sp.	0.5	14	29.35±1.09
		1	21	34.07±2.07
TY5-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.5	14	47.85±3.61
		1	21	55.21±0.91
TY5-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.5	14	56.01±4.83
		1	21	59.35±1.71
TY5-3	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	0.5	14	40.16±0.25
		1	21	57.37±2.14



รูปที่ 2.7 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 5 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

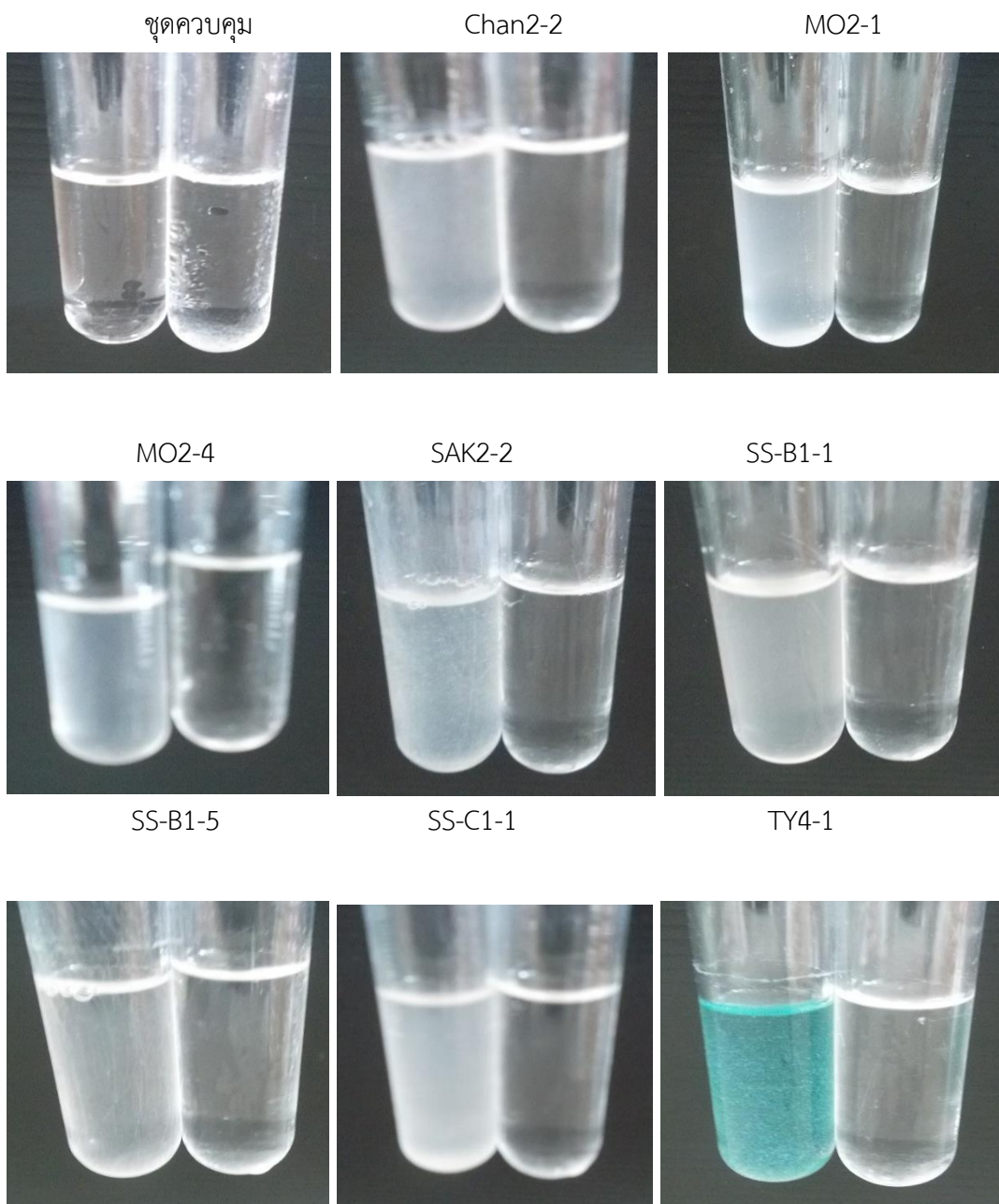


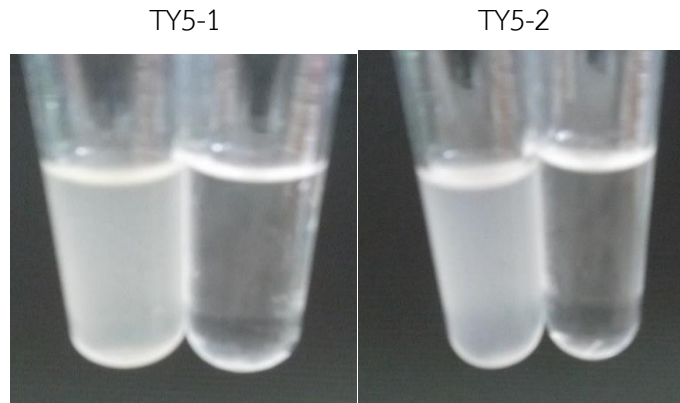
รูปที่ 2.8 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 5 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์



## 2.2.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายเตตระเดคเคนของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 ppm ของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากผลการย่อยสลายน้ำมันดิบและน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้แก่ Chan2-2, MO2-1, MO2-4, SAK2-2, SS-B1-1, SS-B1-5, SS-C1-1, TY4-1, TY5-1 และ TY5-2 (รูปที่ 2.9) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายเตตระเดคเคนได้ โดย *Sphingobium* sp. MO2-4, *Enterobacter* sp. SS-B1-5, *Bacillus* sp. MO2-1, *Pseudomonas* sp. SAK2-2 และ *Pseudomonas* sp. Chan2-2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเตตระเดคเคนได้สูงถึง 71-87 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน แสดงดังตารางที่ 2.7 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 2.10)



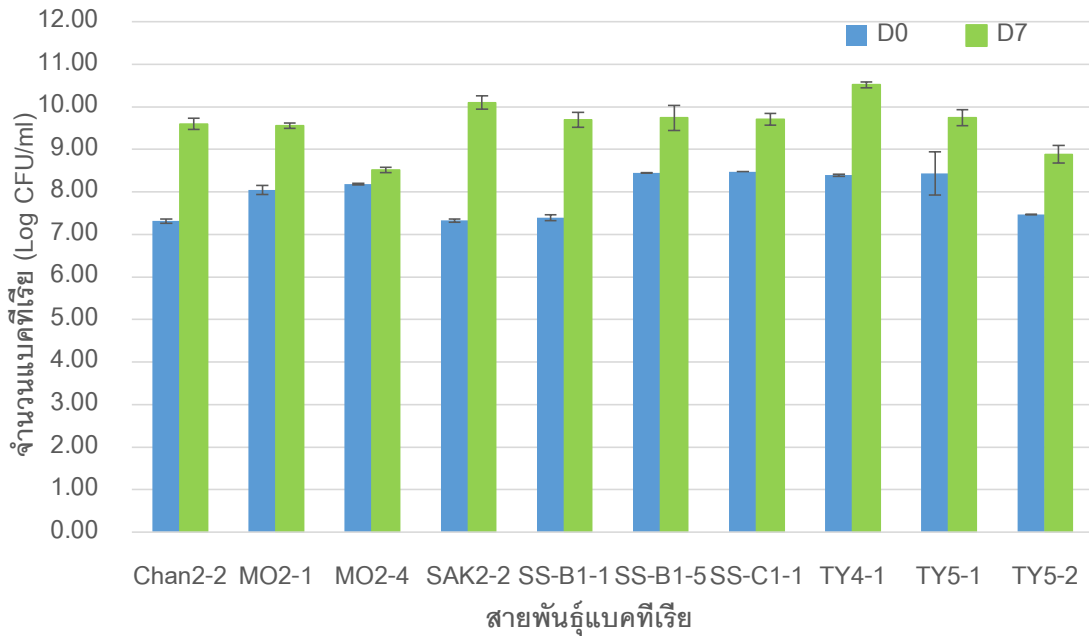


รูปที่ 2.9 การย่อยสลายเตตระเดคเคนของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว 10 สายพันธุ์ (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ขวา) ในเวลา 7 วัน

ตารางที่ 2.7 ปริมาณเตตระเดคเคนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายเตตระเดคเคนเป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณเตตระเดคเคนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
Chan2-2	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	87.38±2.70
MO2-1	<i>Bacillus</i> sp.	82.00±4.39
MO2-4	<i>Sphingobium</i> sp.	71.47±1.67
SAK2-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	84.67±3.15
SS-B1-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	53.87±6.60
SS-B1-5	<i>Enterobacter cloacae</i>	76.57±4.74
SS-C1-1	<i>Acinetobacter</i> sp.	37.69±3.84
TY4-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56.79±10.08
TY5-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	35.86±3.06
TY5-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	38.83±5.07

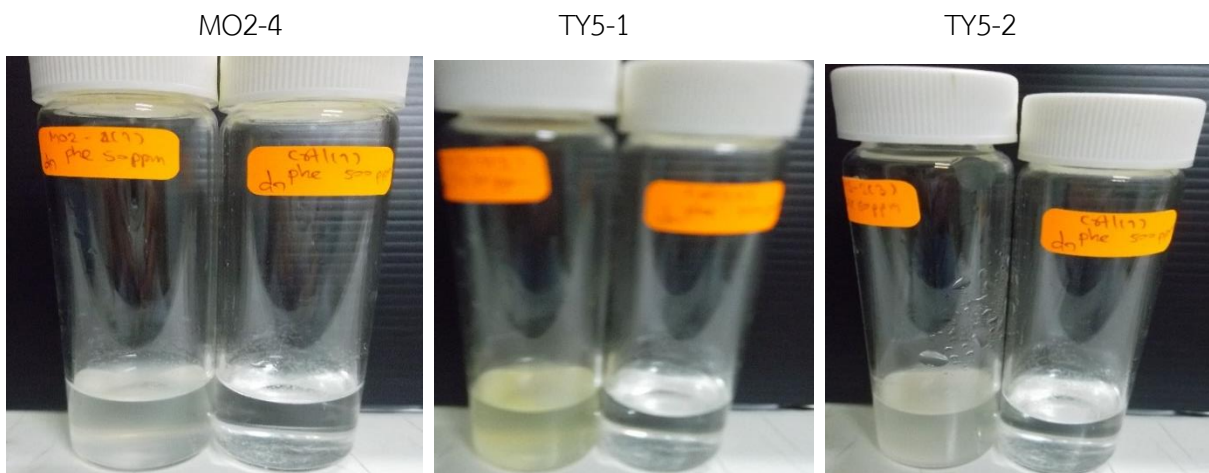
หมายเหตุ ปริมาณเตตระเดคเคนที่ลดลงของแบคทีเรียคิดเทียบกับชุดควบคุม



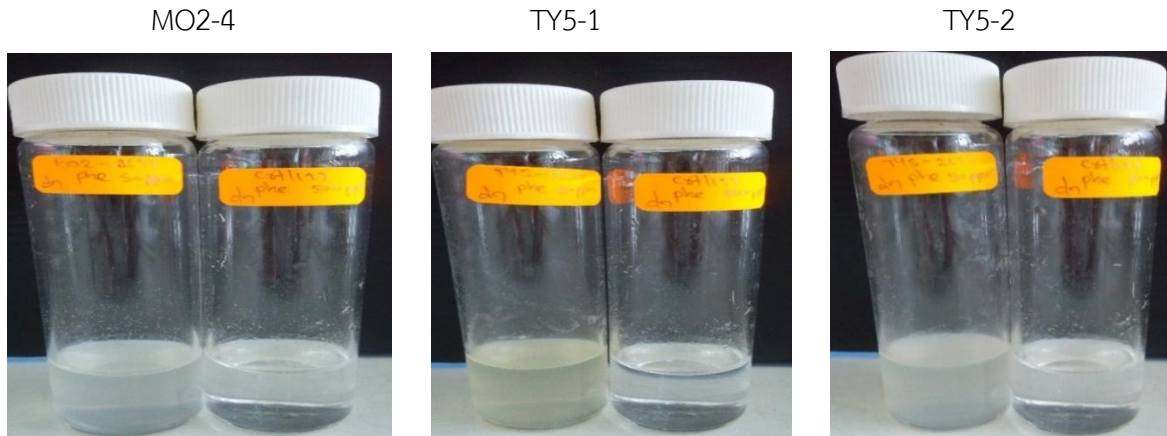
รูปที่ 2.10 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 10 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 ppm ที่เวลา 0 และ 7 วัน

## 2.2.6 ประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนทรีนของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีแนทรีนความเข้มข้น 50 ppm ของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากผลการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ MO2-4, TY5-1 และ TY5-2 (รูปที่ 2.11-2.12) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายพีแนทรีนได้ 25-33 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน แสดงดังตารางที่ 2.8 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 2.13)



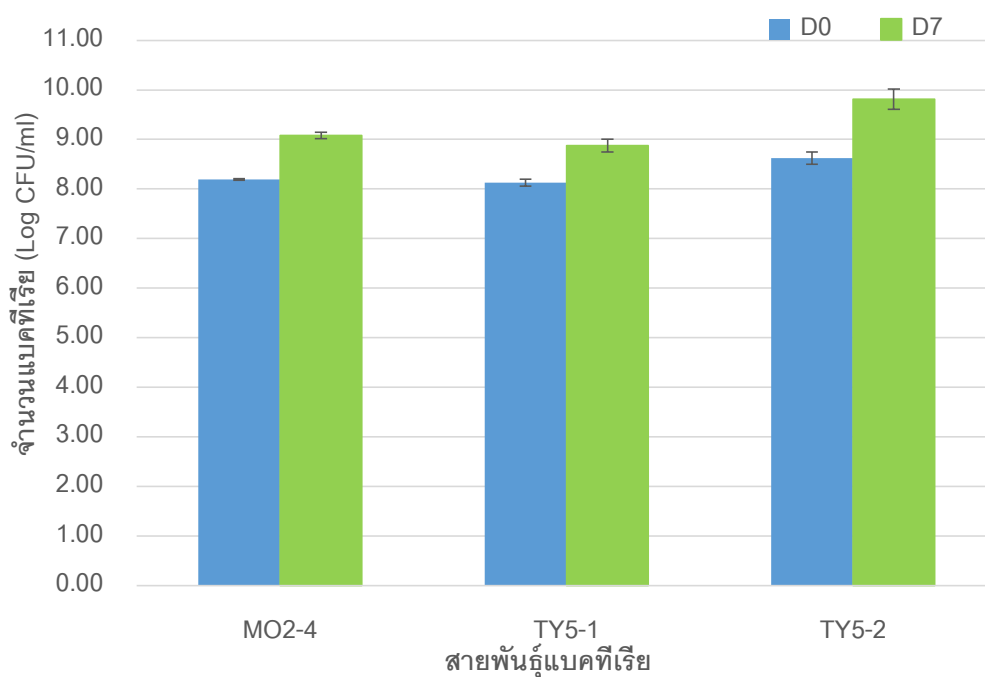
รูปที่ 2.11 การย่อยสลายพีแนทรีนของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ขวา) ในเวลา 3 วัน



รูปที่ 2.12 การย่อยสลายฟิแนทรีนของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ขวา) ในเวลา 7 วัน

ตารางที่ 2.8 ปริมาณฟิแนทรีนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายฟิแนทรีนความเข้มข้น 50 ppm เป็นเวลา 7 วัน

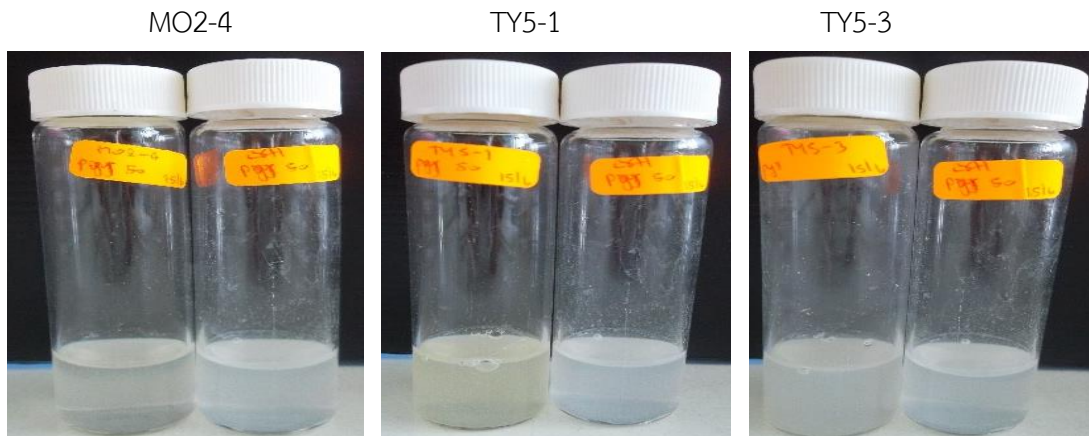
สายพันธุ์	ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณฟิแนทรีนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
MO2-4	<i>Sphingobium</i> sp.	32.67±0.24
TY5-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	25.67±4.12
TY5-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	24.81±4.16



รูปที่ 2.13 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายฟิแนทรีนความเข้มข้น 50 ppm ที่เวลา 0 และ 7 วัน

## 2.2.7 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลินของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

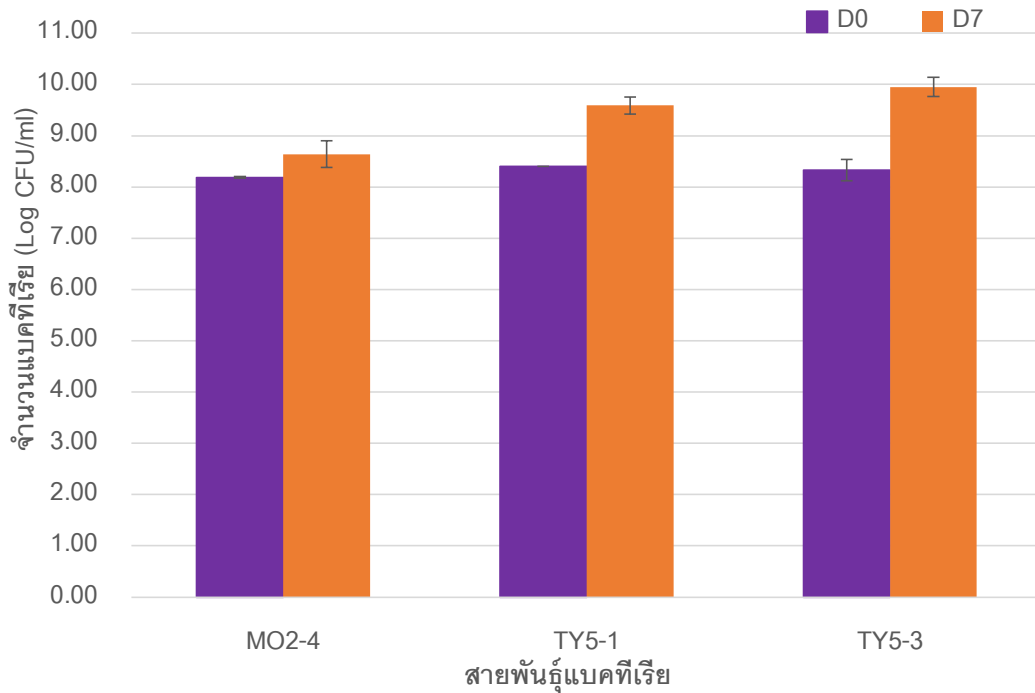
ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพลินความเข้มข้น 50 ppm ของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากผลการย่อยสลายน้ำมันเตาความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ MO2-4, TY5-1 และ TY5-3 (รูปที่ 2.14) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายพีแนนทรินได้ 24-26 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 7 วัน แสดงดังตารางที่ 2.9 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 2.15)



รูปที่ 2.14 การย่อยสลายพีแนนทรินของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ขวา) ในเวลา 7 วัน

ตารางที่ 2.9 ปริมาณไพลินที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวหลังการย่อยสลายไพลินความเข้มข้น 50 ppm เป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณไพลินที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
MO2-4	<i>Sphingobium</i> sp.	25.16±2.04
TY5-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	24.08±3.28
TY5-3	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	26.47±5.15



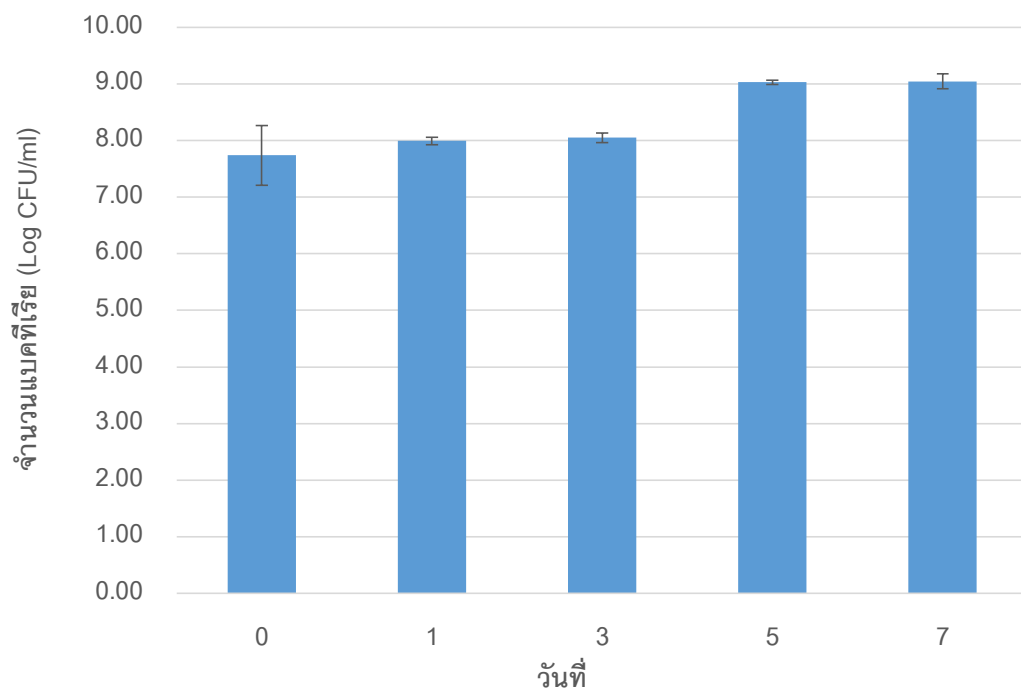
รูปที่ 2.15 จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ ของการย่อยสลายไพรินความเข้มข้น 50 ppm ที่เวลา 0 และ 7 วัน

### 2.2.8 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารผสมของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารผสมของพีแนทรีนความเข้มข้น 25 ppm และเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 ppm ของ *Sphingobium* sp. MO2-4 พบว่าสามารถย่อยสลายพีแนทรีนได้ 31 เปอร์เซ็นต์ และย่อยสลายเตตระเดคเคนได้ 29 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน แสดงดังตารางที่ 2.10 โดยพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 2.16) อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายเตตระเดคเคนลดลงเมื่ออยู่ในรูปแบบสารผสม ซึ่ง *Sphingobium* sp. MO2-4 สามารถย่อยสลายเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 ppm ได้ถึง 71 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน เมื่ออยู่ในรูปแบบสารเดี่ยว

ตารางที่ 2.10 ปริมาณเตตระเดคเคนและพีแนนทรินที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของ *Sphingobium* sp. MO2-4 หลังการย่อยสลายสารผสมเป็นเวลา 7 วัน

วันที่	ปริมาณเตตระเดคเคนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณพีแนนทรินที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
0	3.80±0.92	0.79±0.32
1	24.43±7.58	4.60±0.40
3	35.82±5.15	14.89±4.76
5	36.64±3.89	25.09±1.46
7	28.57±5.16	30.72±0.43



รูปที่ 2.16 จำนวน *Sphingobium* sp. MO2-4 หลังการย่อยสลายสารผสมของพีแนนทรินความเข้มข้น 25 ppm และเตตระเดคเคนความเข้มข้น 500 ppm เป็นเวลา 7 วัน

## 2.2.9 ความสามารถในการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ผลการทดสอบการทนต่อโลหะหนักของ *Sphingobium* sp. MO2-4 พบว่าแบคทีเรียสามารถทนต่อโลหะหนักได้หลากหลายชนิด โดยสามารถทนต่อโคบอลต์ แคดเมียมและโครเมียมได้ดี แสดงดังตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 การทนต่อโลหะหนักของ *Sphingobium* sp. MO2-4 หลังบ่มเป็นเวลา 3 วัน

ชนิดโลหะหนัก	ความเข้มข้นโลหะหนัก (ไมโครกรัมต่อลิตร)	OD <sub>600</sub>	จำนวนแบคทีเรียที่เหลืออยู่ (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU/ml)
Hg	100	0.05±0.01	39.66	2.64±0.05
Zn	100	0.09±0.01	69.92	4.66±0.06
Fe	100	0.12±0.02	60.31	4.02±0
Pb	100	0.03±0.01	36.00	2.40±0
Ni	100	0.28±0.03	80.01	5.33±0.02
Co	10	0.23±0.01	+26.30	8.41±0.05
	50	0.19±0.02	+8.69	7.24±0.06
	100	0.04±0.00	0	0
Cd	10	0.18±0.03	+21.15	8.07±0.13
	50	0.09±0.00	20.21	5.31±0.33
	100	0.02±0.00	0	0
Cr	10	0.28±0.02	+10.88	7.39±0.04
	50	0.09±0.01	28.42	4.77±0.02
	100	0.02±0.01	0	0
Cu	100	0.14±0.02	82.55	5.50±0.04
ชุดควบคุม		0.34±0.02	100	6.66±0.10

หมายเหตุ เครื่องหมาย + คือจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น

## 2.2.10 ความสามารถในการทนต่อสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ผลการทดสอบการทนต่อสารลดแรงตึงผิวของ *Sphingobium* sp. MO2-4 โดยใช้ซิลิกอนและสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TL401 พบว่า *Sphingobium* sp. MO2-4 สามารถทนต่อสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TL401 และซิลิกอนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ได้ แต่ไม่สามารถอยู่รอดได้ในซิลิกอนความเข้มข้น 2.4 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 2.12



ตารางที่ 2.12 การทนต่อสารลดแรงดึงผิวของแบคทีเรียสายพันธุ์ MO2-4 หลังบ่มเป็นเวลา 3 วัน

ชนิดสารลดแรงดึงผิว	ความเข้มข้นสารลดแรงดึงผิว (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนแบคทีเรียที่เหลืออยู่ (เปอร์เซ็นต์)
ซิลิกอน	1	97.90
ซิลิกอน	2.4	0
Culture broth จากสายพันธุ์ TL401	2.4	100

### 2.2.11 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมเมื่อการเติมสารลดแรงดึงผิวของแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบชนิด ARL+AXL ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ของ *Sphingobium* sp. MO2-4 เมื่อมีการเติมสารลดแรงดึงผิวซิลิกอน 1 เปอร์เซ็นต์ และสารลดแรงดึงผิวที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. TL401 2.4 เปอร์เซ็นต์ (2XCMD) พบว่าในชุดที่มีการเติมซิลิกอน 1 เปอร์เซ็นต์ เกิดการย่อยสลายน้ำมันดิบเพียงเล็กน้อยประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าจำนวนแบคทีเรียลดลงจำนวนมาก ในขณะที่ชุดที่มีการเติมสารลดแรงดึงผิวที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. TL401 2.4 เปอร์เซ็นต์ พบการย่อยสลายน้ำมันดิบประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน แสดงดังตารางที่ 2.13 อย่างไรก็ตามพบว่าผลการเติมสารลดแรงดึงผิวที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. TL401 ไม่ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ ของ *Sphingobium* sp. MO2-4

ตารางที่ 2.13 จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์) และปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์) ของ *Sphingobium* sp. MO2-4 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่มีการเติมสารลดแรงดึงผิวเป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU/ml)		จำนวนแบคทีเรียที่ เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)		ปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	
	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 3	วันที่ 7
NSW+ซิลิกอน 1 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-	8.17±0.43	8.17±0.43
NSW+Culture broth จาก สายพันธุ์ TL401 2.4 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-	3.71±1.62	3.71±1.62
NSW+MO2-4+ซิลิกอน 1 เปอร์เซ็นต์	3.72±0.33	3.59±0	*-47.22	-49.12	18.12±2.01	18.12±2.01

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU/ml)		จำนวนแบคทีเรียที่ เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)		ปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)	
	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 3	วันที่ 7
NSW+MO2-4+ Culture broth จากสายพันธุ์ TL401 2.4 เปอร์เซ็นต์	7.81±0.18	8.73±0.22	10.63	23.65	39.94±1.50	39.94±1.50

หมายเหตุ คิดปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลงเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวและแบคทีเรีย

เครื่องหมาย \* คือ แบคทีเรียที่ลดลง

จำนวนแบคทีเรียวันที่ 0 เท่ากับ 7.06±0.06

### 2.1.12 ข้อมูลไมโครไบโอมเบื้องต้นของตัวอย่างฟองน้ำจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี 16S metagenomics analysis

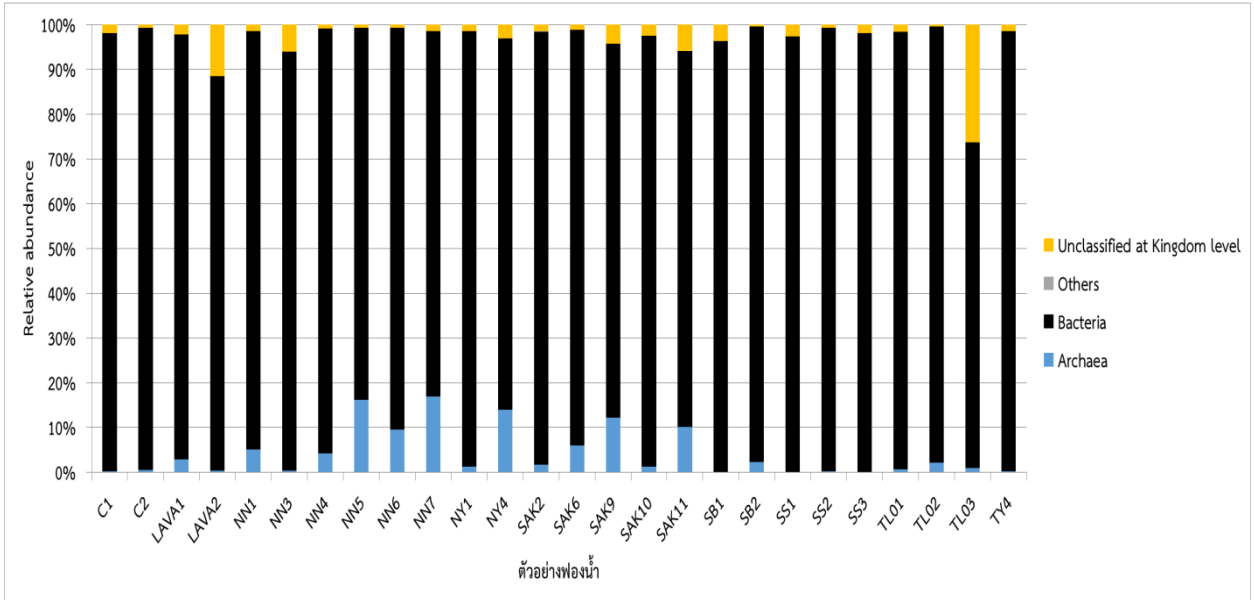
จากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างฟองน้ำ 41 ตัวอย่าง สามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างฟองน้ำได้ทั้งหมด 26 ตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากสารบางอย่างจากฟองน้ำอาจรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นจึงใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นแม่แบบในการวิเคราะห์หาความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยวิธี 16S metagenomics analysis ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) โดยพบว่าจำนวน read ที่วิเคราะห์ได้และผ่านการคัดกรองคุณภาพ มีค่าประมาณ 71,955 ถึง 386,242 read ซึ่งส่วนใหญ่มีค่ามากกว่า 100,000 read แสดงดังตารางที่ 2.14

ตารางที่ 2.14 จำนวน read ที่วิเคราะห์ได้และผ่านการคัดกรองคุณภาพ

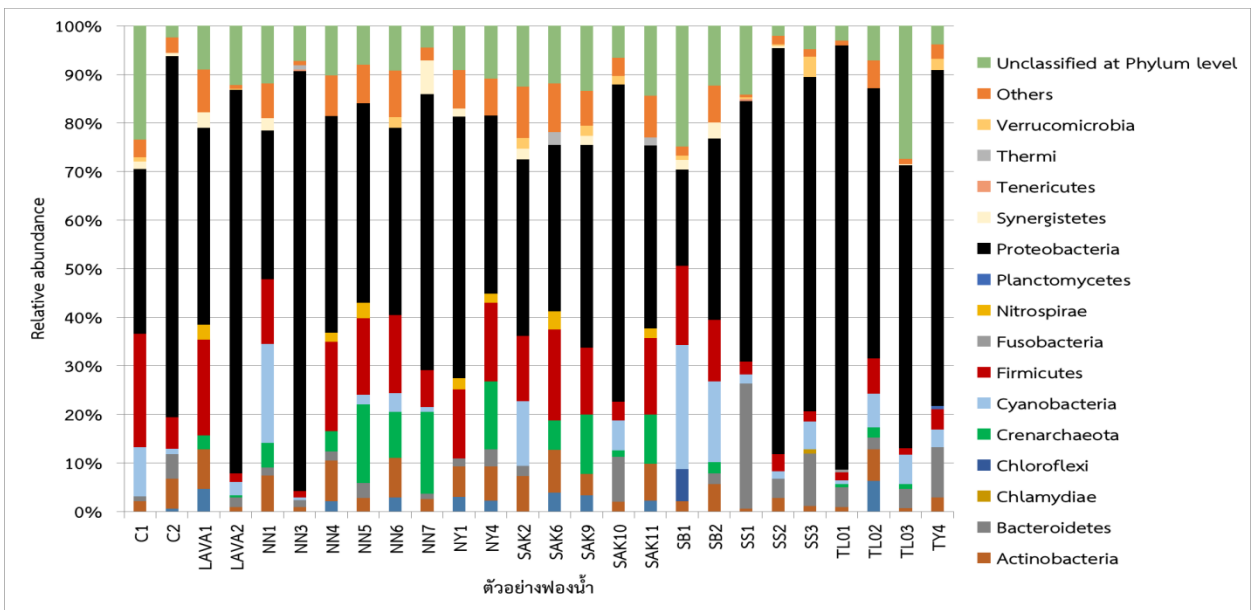
ตัวอย่างฟองน้ำ	จำนวน read
C1	137,619
C2	94,440
LAVA1	212,760
LAVA2	71,955
NN1	233,101
NN3	142,200
NN4	90,014
NN5	73,291
NN6	242,705
NN7	113,816
NY1	117,271

ตัวอย่างฟองน้ำ	จำนวน read
NY4	258,586
SAK2	217,683
SAK6	173,114
SAK9	130,223
SAK10	161,873
SAK11	237,322
SB1	103,969
SB2	267,813
SS1	221,021
SS2	212,807
SS3	231,442
TL01	173,956
TL02	386,242
TL03	162,968
TY4	125,966

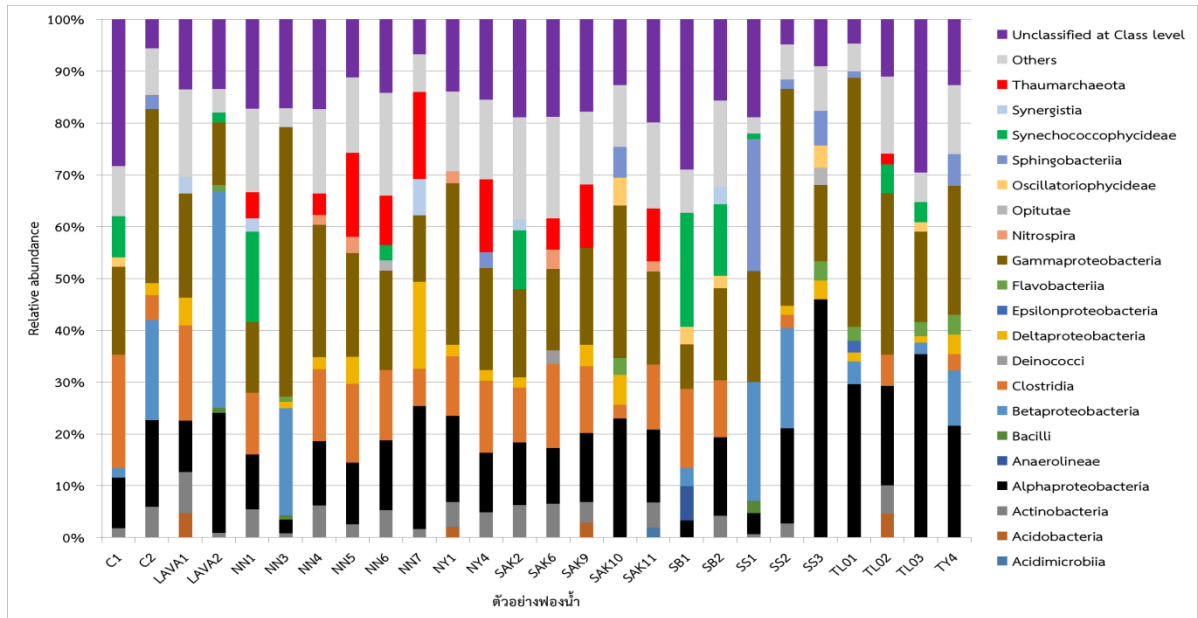
เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลไมโครไบโอมของตัวอย่างฟองน้ำ 26 ตัวอย่าง ในระดับอาณาจักร (Kingdom) พบว่ามีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน คือพบแบคทีเรียเป็นประชากรหลัก ประมาณ 72.72 ถึง 99.03 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบอาร์เคีย 0.06 ถึง 16.90 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังรูปที่ 2.17 เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลในระดับไฟลัม (Phylum) พบว่าข้อมูลไมโครไบโอมของฟองน้ำทั้ง 26 ตัวอย่าง มีความใกล้เคียงกัน แสดงดังรูปที่ 2.18 โดยพบแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria เป็นประชากรหลัก ประมาณ 19.84 ถึง 87.35 เปอร์เซ็นต์ และพบแบคทีเรียไฟลัมอื่นๆ เช่น Actinobacteria, Cyanobacteria และ Firmicutes เป็นต้น เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลในระดับคลาส (Class) พบว่าข้อมูลไมโครไบโอมของฟองน้ำทั้ง 26 ตัวอย่าง มีความใกล้เคียงกัน แสดงดังรูปที่ 2.19 โดยพบ Gammaproteobacteria และ Alphaproteobacteria เป็นประชากรเด่นในทุกตัวอย่าง ประมาณ 8.63 ถึง 52.02 เปอร์เซ็นต์ และ 2.63 ถึง 45.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมา ได้แก่ Clostridia



รูปที่ 2.17 โครงสร้างไมโครไบโอมของตัวอย่างฟองน้ำจำนวน 26 ตัวอย่าง ในระดับอาณาจักร



รูปที่ 2.18 โครงสร้างไมโครไบโอมของตัวอย่างฟองน้ำจำนวน 26 ตัวอย่าง ในระดับไฟลัม



รูปที่ 2.19 โครงสร้างไมโครไบโอมของตัวอย่างฟองน้ำจำนวน 26 ตัวอย่าง ในระดับคลาส

2.1.13 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างฟองน้ำ

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์อัลเคนไฮดรอกซิเลส และอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลสที่ได้ออกซีจีเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในตัวอย่างฟองน้ำ พบว่าสามารถพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนหลากหลายยีน ในตัวอย่างฟองน้ำส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีเพียง 4 ตัวอย่างที่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ได้แก่ ตัวอย่าง NN5, SAK2, SB2 และ SS3 ทั้งนี้ยังจำเป็นต้องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ตรวจพบ เพื่อยืนยันและศึกษาความหลากหลายของยีน

ตารางที่ 2.15 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ตัวอย่างฟองน้ำ	Alk1	Alk2	Alk3	AlkB1	AlkB2	AlkB-1	almAw	CYP153	P450	P450fw	GN	GP
C1	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
LAVA1	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
LAVA2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NN1	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
NN3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NN4	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
NN5	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
NN6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
NN7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

ตัวอย่าง ฟองน้ำ	Alk1	Alk2	Alk3	AlkB1	AlkB2	AlkB-1	almAw	CYP153	P450	P450fw	GN	GP
NY4	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
SAK2	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
SAK6	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
SAK9	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
SAK10	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
SAK11	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
SB1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
SB2	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
SS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SS3	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
TL01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TL02	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
TL03	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-

หมายเหตุ + คือ พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง

- คือ ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง

### 3. อภิปรายผลการการวิจัย

กิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางทะเล ซึ่งมีสาเหตุมาจากการขนส่ง การท่องเที่ยว คมนาคม อุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงการเกิดอุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมัน ด้วยสมบัติความเป็นพิษของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบนิเวศทางทะเล และมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย และแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากฟองน้ำทะเล โดยฟองน้ำทะเลเป็นสิ่งมีชีวิตที่รับสารอาหารจากการสูบน้ำทะเลเข้าทางช่องออสเทียผ่านระบบทางเดินน้ำภายในก่อนปล่อยให้ น้ำทะเลออกทางช่องออสคูลัม ซึ่งทำให้มีโอกาสเกิดการสะสมของสารปนเปื้อนที่พบในสิ่งแวดล้อมทางทะเลในเนื้อเยื่อของฟองน้ำทะเล นอกจากนี้ในชั้นมีโซฟิลล์ของฟองน้ำทะเลยังเป็นแหล่งของสารอาหารที่สมบูรณ์สำหรับแบคทีเรียมากกว่าสภาพแวดล้อมภายนอก (Webster และ Bourne, 2007) ดังนั้นฟองน้ำทะเลจึงเป็นแหล่งสำคัญที่สามารถพบแบคทีเรียที่คงทนต่อสารปนเปื้อน และสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ โดยงานวิจัยในปีที่ 1 สามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากฟองน้ำทะเลได้ทั้งหมด 13 กลุ่มแบคทีเรียและคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 19 สายพันธุ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 16-60 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน

สำหรับงานวิจัยในปีที่ 2 นี้ ได้ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมชนิดอื่นๆ ได้แก่ น้ำมันดีเซลและน้ำมันเตาของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 19 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมเมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นอีกด้วย ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายชนิดของน้ำมันปิโตรเลียมและความเข้มข้นแตกต่างกัน สรุปดังตารางที่ 3.1 นอกจากนี้ยังได้ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายอัลเคน ได้แก่ เตตระเดเคน และ PAHs ได้แก่ ฟิแนนทรีนและไพรีน จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ที่มีความน่าสนใจ คือ *Sphingobium* sp. MO2-4 เนื่องจากมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมได้ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งย่อยสลายได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ในเวลา 7 วัน ย่อยสลายเตตระเดเคนความเข้มข้น 500 ppm ได้ 71 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน ย่อยสลายฟิแนนทรีนและไพรีนความเข้มข้น 50 ppm ได้ 33 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในเวลา 7 วัน

แบคทีเรียสกุล *Sphingobium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในแฟมิลี Shingomonaceae มักถูกคัดแยกจากสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสมบัติในการใช้ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เช่น PAHs โดยมีรายงานวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลาย PAHs โมลโมเลกุลต่ำและโมลโมเลกุลสูง ของ *Sphingobium* อีกด้วย เช่น *Sphingobium* sp. P2 (Pinyakong และ คณะ , 2003), *Sphingobium* sp. HV3 (Sipila และ คณะ , 2010), *Sphingobium scionense* WP01 (Liang และ Lloyd-Jones, 2010), *Sphingobium chungbukense* DJ77 (Yeon และ Kim, 2011), *Sphingobium* sp. KK22 (Maeda และคณะ , 2013) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน

ปิโตรเลียมอื่นๆ เช่น น้ำมันดีเซล น้ำมัน Jet ยกตัวอย่างเช่น *Sphingobium* sp. P2 (Khondee และคณะ, 2012), *Sphingobium* sp. DhA-95 (Yu และคณะ, 2000) ตัวอย่างแบคทีเรียสกุล *Sphingobium* ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ และปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ แสดงในตารางที่ 3.2 นอกจากนี้แบคทีเรียในสกุลนี้ไม่อยู่ในบัญชีรายการเชื้อโรคควบคุมตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ทำให้มีความน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อ

ตารางที่ 3.1 ปริมาณน้ำมันที่ลดลงของแบคทีเรียหลังการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมชนิดและความเข้มข้นต่างๆ

สายพันธุ์	ความเข้มข้นน้ำมัน (เปอร์เซ็นต์)			ระยะ เวลา (วัน)	ปริมาณน้ำมันที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)		
	น้ำมันดิบ	น้ำมันดีเซล	น้ำมันเตา		น้ำมันดิบ	น้ำมันดีเซล	น้ำมันเตา
Chan2-2	0.25	0.25	0.25	7	59.96±4.8 0	34.97±2.5 2	56.50±2.89
	0.5	0.5	0.5	14	50.86±5.3 5	-	35.31±2.41
	1	1	1	21	48.52±1.8 8	-	35.87±2.69
MO2-1	0.25	0.25	0.25	7	56.90±1.1 1	66.80±0.8 7	48.37±4.12
	0.5	0.5	0.5	14	34.29±4.7 2	31.99±4.7 2	-
	1	1	1	21	38.13±3.1 8	14.02±0.5 2	-
MO2-4	0.25	0.25	0.25	7	50.53±1.0 3	52.54±0.8 7	54.18±0.77
	0.5	0.5	0.5	14	65.69±0.9 5	54.16±2.0 7	29.35±1.09
	1	1	1	21	47.17±3.3 6	43.72±0.2 5	34.07±2.07



สายพันธุ์	ความเข้มข้นน้ำมัน (เปอร์เซ็นต์)			ระยะ เวลา (วัน)	ปริมาณน้ำมันที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)		
	น้ำมันดิบ	น้ำมันดีเซล	น้ำมันเตา		น้ำมันดิบ	น้ำมันดีเซล	น้ำมันเตา
SAK2-2	0.25	0.25	0.25	7	60.12±1.7 1	30.31±5.7 1	30.15±5.49
	0.5	0.5	0.5	14	29.28±2.2 4	-	-
	1	1	1	21	48.27±4.4 1	-	-
SS-B1-1	0.25	0.25	0.25	7	33.46±1.6 5	69.12±1.4 3	35.03±4.52
	0.5	0.5	0.5	14	-	46.79±5.6 0	-
	1	1	1	21	-	45.16±2.3 6	-
SS-B1-5	0.25	0.25	0.25	7	16.26±2.9 2	60.88±1.5 7	39.76±4.62
	0.5	0.5	0.5	14	-	43.68±1.7 6	-
	1	1	1	21	-	15.39±1.3 1	-
SS-C1-1	0.25	0.25	0.25	7	59.42±1.5 8	62.01±0.9 9	39.12±4.58
	0.5	0.5	0.5	14	39.35±3.4 5	13.44±1.0 1	-
	1	1	1	21	46.22±1.5 1	42.39±2.0 0	-

สายพันธุ์	ความเข้มข้นน้ำมัน (เปอร์เซ็นต์)			ระยะ เวลา (วัน)	ปริมาณน้ำมันที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)		
	น้ำมันดิบ	น้ำมันดีเซล	น้ำมันเตา		น้ำมันดิบ	น้ำมันดีเซล	น้ำมันเตา
TY4-1	0.25	0.25	0.25	7	33.81±3.8 8	57.40±2.4 6	46.94±5.80
	0.5	0.5	0.5	14	-	46.65±4.1 9	-
	1	1	1	21	-	40.04±1.5 4	-
TY4-1	0.25	0.25	0.25	7	26.71±4.1 1	76.47±2.2 6	57.51±2.77
	0.5	0.5	0.5	14	-	53.00±1.3 8	47.85±3.61
	1	1	1	21	-	23.16±1.1 6	55.21±0.91
TY5-2	0.25	0.25	0.25	7	26.25±3.3 2	52.08±2.1 2	63.74±1.30
	0.5	0.5	0.5	14	-	38.53±3.2 1	56.01±4.83
	1	1	1	21	-	43.74±1.3 1	59.35±1.71
TY5-3	0.25	0.25	0.25	7	48.72±4.3 1	16.17±3.9 4	61.90±2.31
	0.5	0.5	0.5	14	-	-	40.16±0.25
	1	1	1	21	-	-	57.37±2.14

หมายเหตุ - หมายถึงไม่ได้ทำการทดลอง

ตารางที่ 3.2 แบคทีเรียสกุล *Sphingobium* ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

แบคทีเรีย	ความสามารถในการย่อยสลาย	อ้างอิง
<i>Sphingobium</i> sp. P2	แนพธาลีน, อะซีแนพทริน, อะซีแนพธิลีน, พีแนนทริน, ไคเบนโซฟูแรน, ฟลูออแรนธิน, ฟลูออรีน, แอนทราซีน น้ำมันหล่อลื่น	Pinyakong และคณะ (2000); Supaka และคณะ (2001)  Khondee และคณะ, 2012
<i>Sphingobium</i> sp. HV3	แนพธาลีน, ฟลูออรีน, พีแนนทริน	Sipila และคณะ, 2010
<i>S. chlorophenolicum</i> C3R	พีแนนทริน	Colombo และคณะ, 2011
<i>Sphingobium</i> sp. PNB	พีแนนทริน	Roy และคณะ, 2012
<i>Sphingobium</i> sp. KK22	พีแนนทริน, เบนซ์[เอ]แอนทราซีน	Maeda และคณะ, 2013
<i>Sphingobium</i> sp. DhA-95	น้ำมัน JetA-1	Yu และคณะ, 2000

เมื่อทดสอบการทนต่อโลหะหนักของ *Sphingobium* sp. MO2-4 พบว่าสายพันธุ์ MO2-4 สามารถอยู่รอดประมาณ 82, 36 และ 70% ต่อทองแดง ตะกั่ว และ สังกะสี ความเข้มข้นถึง 100 ไมโครกรัมต่อลิตรได้ ซึ่งโลหะหนักเหล่านี้มีรายงานของ Chaiyara และคณะ (2013) รายงานว่าพบในแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน และแม่น้ำแม่กลอง ได้แก่ แคดเมียม (ความเข้มข้น 0.03, 0.03, 0.02 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ทองแดง (ความเข้มข้น 0.81, 0.46 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ), ตะกั่ว (ความเข้มข้น 0.43, 0.43, 0.08 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และสังกะสี (ความเข้มข้น 0.19, 0.53, 0.19 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) จากผลการทดสอบพบว่าสายพันธุ์ MO2-4 สามารถทนต่อความเข้มข้นของโลหะหนักที่สูงกว่าความเข้มข้นที่พบในแม่น้ำหลายเท่า

จากการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครไบโอมของตัวอย่างฟองน้ำ 26 ตัวอย่าง พบว่ามีความหลากหลายของแบคทีเรีย โดยพบแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria เป็นประชากรหลักในทุกตัวอย่าง ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมักพบเป็นประชากรเด่นในสิ่งแวดล้อม ทั้งในดิน (Janssen, 2006) ดินตะกอน (Wang และคณะ, 2012; Mason และคณะ, 2014) น้ำทะเล (Feng และคณะ, 2009) รวมถึงสามารถพบในฟองน้ำทะเลอีกด้วย (Radax และคณะ, 2009) และยังเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สำคัญที่พบในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารพิษ เช่น น้ำมัน (Harayama และคณะ, 2004) PAHs (Zhang และคณะ, 2010) และโลหะหนักอีกด้วย (Margesin และคณะ, 2011) โดยกลุ่มแบคทีเรียที่มักพบในฟองน้ำทะเล ได้แก่ Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Nitrospira และ Proteobacteria โดยเฉพาะในคลาส Alpha-, Delta- และ Gammaproteobacteria (Webster และคณะ, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบ Gammaproteobacteria และ Alphaproteobacteria เป็นประชากรเด่นในทุกตัวอย่างฟองน้ำ

#### 4. สรุป

ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อมทางทะเล ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย และแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างฟองน้ำทะเลที่เก็บจากทะเลจังหวัดชลบุรีและจังหวัดชุมพร จากข้อมูลไมโครไบโอมพบว่าในฟองน้ำทะเลมีความหลากหลายของแบคทีเรีย และยังพบกลุ่มแบคทีเรียที่สำคัญที่มักพบในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารพิษ และเมื่อตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน พบว่าในตัวอย่างฟองน้ำทะเลมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนหลากหลายยีน แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอยู่ในฟองน้ำ และเมื่อเพิ่มกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าว พบว่าสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ทั้งหมด 13 กลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 60-92 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน และสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ได้ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* 6 สายพันธุ์, *Acinetobacter* 1 สายพันธุ์, *Brevibacterium* 2 สายพันธุ์ *Aeromonas* 1 สายพันธุ์ *Enterobacter* 2 สายพันธุ์ *Bacillus* 4 สายพันธุ์ *Sphingobium* sp. 1 สายพันธุ์ *Methylobacterium* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Microbacterium* 1 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรีย 19 สายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบ น้ำมันดีเซลและน้ำมันเตา ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 16-60 เปอร์เซ็นต์ 14-76 เปอร์เซ็นต์ และ 13-64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในเวลา 7 วัน โดยพบว่าแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. MO2-4 เป็นแบคทีเรียที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมทั้ง 3 ชนิดได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และยังย่อยสลายเตตระเดเคน พีแนนทรินและไพรีนได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อโลหะหนักได้หลากหลายชนิด เช่น ทองแดง ตะกั่ว สังกะสี โคบอลต์ แคดเมียม และโครเมียม จึงจะนำแบคทีเรียดังกล่าวไปพัฒนาเป็นแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารพิษโดยวิธีชีวภาพต่อไป

## 5. ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยพบว่า *Sphingobium* sp. MO2-4 สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้หลากหลายชนิดและมีความสามารถในการทนต่อโลหะหนัก จึงควรนำมาศึกษาต่อยอดและพัฒนาเป็นแบคทีเรียตรึง ซึ่งจะ สามารถช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการใช้แบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อมได้ โดยจะต้องมีการศึกษาวัสดุที่ใช้ใน การตรึง ซึ่งควรเป็นวัสดุที่หาง่าย เตรียมง่าย มีความสามารถในการดูดซับสารมลพิษได้ดี และแบคทีเรียสามารถยึด เกาะได้ดี หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายและการดูดซับ สารมลพิษในน้ำเสียสังเคราะห์ รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของวัสดุตรึงในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบ บำบัดจำลองระดับห้องปฏิบัติการต่อไป

ในส่วนของการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอนจากฟองน้ำ จากข้อมูลที่ได้มีความน่าสนใจที่จะนำไปเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ของข้อมูลไมโครไบโอมที่ได้กับข้อมูลชนิดของฟองน้ำ เพื่อสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับประโยชน์จากแบคทีเรียในฟองน้ำ ซึ่ง ข้อเสนอแนะทั้งหมดนี้จะนำไปศึกษาต่อในปีที่ 3 ของโครงการ

## 6. ผลผลิต

1. งานวิจัยปีที่ 2 ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับความสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้
2. งานวิจัยปีที่ 2 ได้ข้อมูลไมโครไบโอมในฟองน้ำทะเลที่เก็บมาจากทะเลจังหวัดชลบุรีและจังหวัดชุมพร และ ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมในตัวอย่างฟองน้ำ
3. มีแผนจะนำผลการวิจัยในปีที่ 1 รวมกับผลการวิจัยปีที่ 2 บางส่วน เตรียมเป็น manuscript สำหรับตีพิมพ์ เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

## บรรณานุกรม

### ภาษาไทย

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

จุมพล สงวนสิน สุธิดา กาญจนอติเรกลาภ ศุภวัตร กาญจนอติเรกลาภ และ สมพงษ์ บันติวิวัฒน์กุล, 2543. วารสาร การประมง ปีที่ 58 ฉบับที่ 3 เดือนพฤษภาคม-มิถุนายน หน้า 263.

### ภาษาอังกฤษ

Alex, A., and Antunes, A. 2015. Pyrosequencing characterization of the microbiota from Atlantic intertidal marine sponges reveals high microbial diversity and the lack of co-occurrence patterns. *PlosOne*. DOI:10.1371/journal.pone.0127455.

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

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

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

Altimiral, F., Yáñez, C., Bravo, G., González, M., Rojas, L. A., and Seeger, M. 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *Microbiology*. 12: 193-205.

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

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

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

- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M. H., Pottier, D., and Budzinski, H. 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol.* 79: 257-267.
- Cassidy, M. B., Lee, H., and Trevors, J. T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *J Ind Microbiol.* 16: 79-101.
- Cébron, A., Norini, M. P., Beguiristain, T., and Leyval, C. 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Microbiol Methods.* 73: 148-159.
- Censi, P., Spoto, S. E., Saiano, F., Sprovieri, M., Mazzola, S., Nardone, G., Di Geronimo, S. I., Punturo, R., and Ottonello, D. 2006. Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. *Chemosphere.* 64: 1167-1176.
- Chaiyara, R. Ngoendee, M., and Kruatrachue, M. 2013. Accumulation of Cd, Cu, Pb, and Zn in water, sediments, and mangrove crabs (*Sesarma mederi*) in the upper Gulf of Thailand. *Science Asia.* 39: 376-38.
- Colombo, M., Cavalca, L., Bernasconi, L., and Andreoni, V. 2011. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioaugmentation with *Sphingobium chlorophenolicum* strain C3R: A feasibility study in solid- and slurry-phase microcosms. *Int Biodeterioration Biodegrad.* 65: 191-197.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P. R., and Bond, P. L. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology.* 149: 1959-1970.
- Ei Tun, Z. H., Parkpian, P., Delaune, R. D., Gambrell, R. P., and Jugsujinda, A. 2009. Cadmium concentration in sea bottom sediment and its potential risk in the upper Gulf of Thailand. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 44: 244-248.
- Feng, B. W., Li, X. R., Wang, J. H., Hu, Z. Y., Meng, H., and Xiang, L. Y. 2009. Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. *FEMS Microbiol Ecol.* 70: 80-92.
- Fierer, N., Leff, J. W., Adams, B. J., Nielsen U. N., Bates S. T., Lauber, C. L., Owens, S., Gilbert, J. A., Wall, D. H., and Caporaso, J. G. 2012. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *PNAS.* 109: 21390-21395.



- Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M., and Rodriguez, M. S. 2006. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *Int Biodeterioration Biodegrad.* 57: 222-228.
- Gentry, T. J., Rensing, C., and Pepper, I. L. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Cri Rev Env Sci Tech.* 34: 447-494.
- Hansen, V., Weeks, J. M., and Depledge, M. H. 1995. Accumulation of copper, zinc, cadmium and chromium by the marine sponge *Halichoria panicea* pallas and the implications for biomonitoring. *Mar Pollut Bull.* 31: 133-138.
- Harayama, S., Kasai, Y., and Hara, A. 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol.* 15: 205-214.
- Haritash, A. K., and Kaushik, C. P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater.* 169: 1-15.
- Heitkamp, M. A., Franklin, W., and Cerniglia, C. E. 1988. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Isolation and characterization of a pyrene degrading bacterium. *Appl Microbiol Biotechnol.* 54: 2549-2555.
- Janssen, P. H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* 72: 1719-1728.
- Johnsen, A. R., Wick, L. Y., and Harm, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut.* 133: 71-84.
- Kefalas, E., Castritsi-Catharios, J., and Miliou, H. 2003. Bacteria associated with the sponge *Spongia officinalis* as indicators of contamination. *Ecol Indic.* 2: 339-343.
- Khondee, N., Tathonga, S., Pinyakongb, O., Powtongsookd, S., Chatchuponge, T., Ruangchainikome, C., and Luepromchai, E. 2012. Airlift bioreactor containing chitosan-immobilized *Sphingobium* sp. P2 for treatment of lubricants in wastewater. *J Hazard Mater.* 213-214: 466-473.
- Klankeo, P., Nopcharoenkul, W., and Pinyakong, O. 2009. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil. *J Biosci Bioeng.* 108: 488-495.
- Kloos, K., Munch, J. C., and Schlöter, M. 2006. A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *J Microbiol Methods.* 66: 486-496.
- Kohno, T., Sugimoto, Y., Sei, K., and Mori, K. 2002. Design of PCR primers and gene probes for general detection alkane-degrading bacteria. *Environ Microbiol.* 17: 114-212.

- Lan, W. U., Gang, G. E., and Jinbao, W. 2009. Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. *J Environ Sci.* 21: 237-242.
- Liang, Q., and Lloyd-Jones, G. 2010. *Sphingobium scionense* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from contaminated sawmill soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60: 413-416.
- Liang, Y., Li, G., Van Nostrand, J. D., He, Z, Wu, L., Deng, Y., Zhang, X., and Zhou, J. 2009. Microarray-based analysis of microbial functional diversity along an oil contamination gradient in oil field. *FEMS Microbiol Ecol.* 70: 168-177.
- Liu, C., Wang, W., Wu, Y., Zhou, Z., Lai, Q., and Shao, Z. 2011. Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Environ Microbiol.* 13: 1168-1178.
- Long, R. M., Lappin-Scott, H. M., and Stevens, J. R. 2009. Enrichment and identification of polycyclic aromatic compound-degrading bacteria enriched from sediment samples. *Biodegradation* 20: 521-531.
- Marcos, M. S., Lozada, M., and Dionisi, H. M. 2009. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. *Lett Appl Microbiol.* 49: 602-608.
- Mason, O. U., Scott, N. M., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Bælum, J., Kimbrel, J., Bouskill, N. J., Prestat, E., Borglin, S., Joyner, D. C., Fortney, J. L., Jurelevicius, D., Stringfellow, W. T., Alvarez-Cohen, L., Hazen, T. C., Knight, R., Gilbert, J. A., and Jansson, J. K. 2014. Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME.* 8: 1464–1475.
- Maeda, A. H., Nishi, S., Ozeki, Y., Ohta, Y., Hatada, Y., and Kanaly, R. A. 2013. Draft genome sequence of *Sphingobium* sp. strain KK22, a high molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Cattle Pasture soil. *Genome Announc.* 1: 1-2.
- Margesin, R., Plaza, G. A., and Kasenbacher, S. 2011. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. *Chemosphere.* 82: 1583-1588.
- McGenity, T. J. 2014. Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. *Curr Opin Biotechnol.* 27: 46–54.
- Mitra, A., Chowdhury, R., and Banerjee, K. 2012. Concentrations of some heavy metals in commercially important finfish and shellfish of the River Ganga. *Environ Monit Assess.* 184: 2219-2230.
- Monsieurs, P., Moors, H., Van Houdt, R., Janssen, P. J., Janssen, A., Coninx, I., Mergeay, M., and Leys, N. 2011. Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by and intricate transcriptional network. *Biometals.* 24: 1133-1151.

- Niepceron, M., Portet-Koltalo, F., Merlin, C., Motelay-Massei, A., Barray, S., and Bodilis, J. 2010. Both *Cycloclasticus* spp. and *Pseudomonas* spp. as PAH-degrading bacteria in the Seine estuary (France). *FEMS Microbiol Ecol.* 71: 137-147.
- Obuekwe, C. O., and Al-Muttawa, E. M. 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. *Biotech Letters.* 23: 1025-1032.
- Peng, R. H, Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S., and Yao, Q. H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 927-955.
- Pinyakong, O., Habe, H., and Omori, T. 2003. The unique aromatic catabolic genes in *Sphingomonads* degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Gen Appl Microbiol.* 49: 1-19.
- Pinyakong, O., Habe, H., Supaka, N., Pinpanichkarn, P., Juntongjin, K., Yoshida, T., Furihata, K., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T. 2000. Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2. *FEMS Microbiol Lett.* 191: 115-121.
- Radax, R., Rattei, T., Lanzen, A., Bayer, C., Rapp, H. T., Urich, T., and Schleper, C. 2012. Metatranscriptomics of the marine sponger *Geodia barrette*: tackling phylogeny and function of its microbial community. *Environ Microbiol.* 14: 1308-1324.
- Rahman, R. N., Ghaza, F. M., Salleh, A. B., and Basri, M. 2006. Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells. *J Microbiol.* 44: 354-359.
- Roder, C., Bayer, T., Arana, M., Kruse, M., and Voolstra, C. R. 2015. Microbiome structure of the fungid coral *Ctenactis echinata* aligns with environmental differences. *Mol Ecol.* 24: 3501-3511.
- Roy, M., Khara, P., and Dutta, T. K. 2012. *meta*-cleavage of hydroxynaphthoic acids in the degradation of phenanthrene by *Sphingobium* sp. strain PNB. *Microbiology.* 158: 685-695.
- Saipheth, A., Juntongjin, K., Pattarakulwanich, K., Pinphanichakarn, P., and Thaniyavarna, S. 2006. Novel acenaphthene degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain SP2. *J Sci Res Chula Univ.* 31: 83-94.
- Santhiya, G., Lakshumanan, C., Selvin, J., and Asha, D. 2011. Microbiological analysis of seawater and sediments in urban shorelines: Occurrence of heavy metals resistance bacteria on Chennai beaches, Bay of Bengal. *Microchem J.* doi:10.1016/j.microc.2011.05.004.
- Santos, A. L., Peixoto, R., and Rosado, A. S. 2009. New approaches to understanding microbial diversity in wastewater, landfills and leachate treatment. *Oecol Bras.* 13: 631-648.

- Schippers, A. 2007. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic-acid based molecular methods for their identification. In: Donati ER, Sand W (eds.) Microbial processing of metal sulfides. Springer. 3-33.
- Selvin, J., Priya, S. S., Kiran, G. S., Thangavelu, T., and Bai, N. S. 2009. Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. *Microbiol Res.* 164: 352-363.
- Sipila, T. P., Väisänen, P., Paulin, L., and Yrjölä, K. 2010. *Sphingobium* sp. HV3 degrades both herbicides and polyaromatic hydrocarbons using *ortho*- and *meta*-pathways with differential expression shown by RT-PCR. *Biodegradation.* 21: 771-784.
- Spiegelman, D., Whissell, G., and Greer, C. W. 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can J Microbiol.* 51: 355-386.
- Supaka, N., Pinphanichakarna, P., Pattaragulwanita, K., Thaniyavarna, S., Omorib, T., and Juntongjina, K. 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. *Science Asia.* 27: 21-28.
- Tathong, S. 2007. Assessment of bioremediation potential of wastewater from petrol station. Master thesis. Program in Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University.
- Urani, C., Melchiorretto, P., Canevali, C., and Crosta, G. F. 2005. Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 cells exposed to cadmium. *Toxicol In Vitro.* 19: 887-892.
- van Beilen, J. B., and Funhoff, E. G. 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74: 13-21.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Röthlisberger, M., Li, Z., and Witholt, B. 2006. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Applied and Environmental Microbiology,* 72: 59-65.
- Wang, L., Wang, W., Lai, Q., and Shao, Z. 2010. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environ Microbiol.* 12: 1230-1242.
- Wang, W., Wang, L., and Shao, Z. 2010. Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes in the subtropical seawater of Xiamen island. *Microb Ecol.* DOI 10.1007/s00248-010-9724-4.
- Wang, Y., Guan, S., Acharya, P., Koop, D. R., Liu, Y., Liao, M., Burlingame, A. L., and Correia, M. 2011. Ubiquitin-dependent proteasomal degradation of human liver cytochrome P450 2E1:

- identification of sites targeted for phosphorylation and ubiquitination. *J Biol Chem.* 286: 9443-9456.
- Wang, Y., Sheng, H. F., He, Y., Wu, J. Y., Jiang, Y. X., Tam, N. F. Y., and Zhou, H. W. 2012. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of Illumina tags. *Appl Environ Microbiol.* 78: 8264-8271
- Webster, N. S., and Bourne, D. 2007. Bacterial community structure associated with the Antarctic sort coral, *Alcyonium antarcticum*. *FEMS Microbiol Ecol.* 59: 81-94.
- Whyte, L. G., Smits, T. H. M., Labbe, D., Witholt, B., Greer, C. W. and van Beilen, J. B. 2002. Cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* spp. strains Q15 and 16531. *Appl Environ Microbiol.* 12: 5933-5942.
- Yeon, S. M., and Kim, Y. C. 2011. Complete sequence and organization of the *Sphingobium chungbukense* DJ77 pSY2 plasmid. *J Microbiol.* 49: 684-688.
- Yu, Z., Stewart, G. R., and Mohn, W. W. 2000. Apparent contradiction: Psychrotolerant bacteria from hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils that degrade diterpenoids synthesized by trees. *Appl Environ Microbiol.* 66: 5148-5154.
- Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A. I., and Drainas, C. 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65: 124-131.
- Zhang, W., Wang, H., Zhang, R., Yu, X. Z., Qian, P. Y., and Wong, M. H. 2010. Bacterial communities in PAH contaminated soils at an electronic-waste processing center in China. *Ecotoxicology.* 19: 96-104.
- Zukauskaite, A., Jakubauskaite, V., Belous, O., Ambrazaitiene, D., and Stasiskiene, Z. 2008. Impact of heavy metals on the oil products biodegradation process. *Waste Manag Res.* 26: 500-507.

## ภาคผนวก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

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

ละลายสารทั้ง 3 ชนิดในน้ำกลั่นปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

เข้มข้น 5 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งละลายผงวุ้นหรือแบคโตอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Natural sea water (NSW)

น้ำทะเล (Sea water)	200	มิลลิลิตร
น้ำประปา	800	มิลลิลิตร
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02	กรัม
Ferric citrate	0.02	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.5	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### ส่วนประกอบของน้ำมันดิบ

Arab Extra Light (AXL)

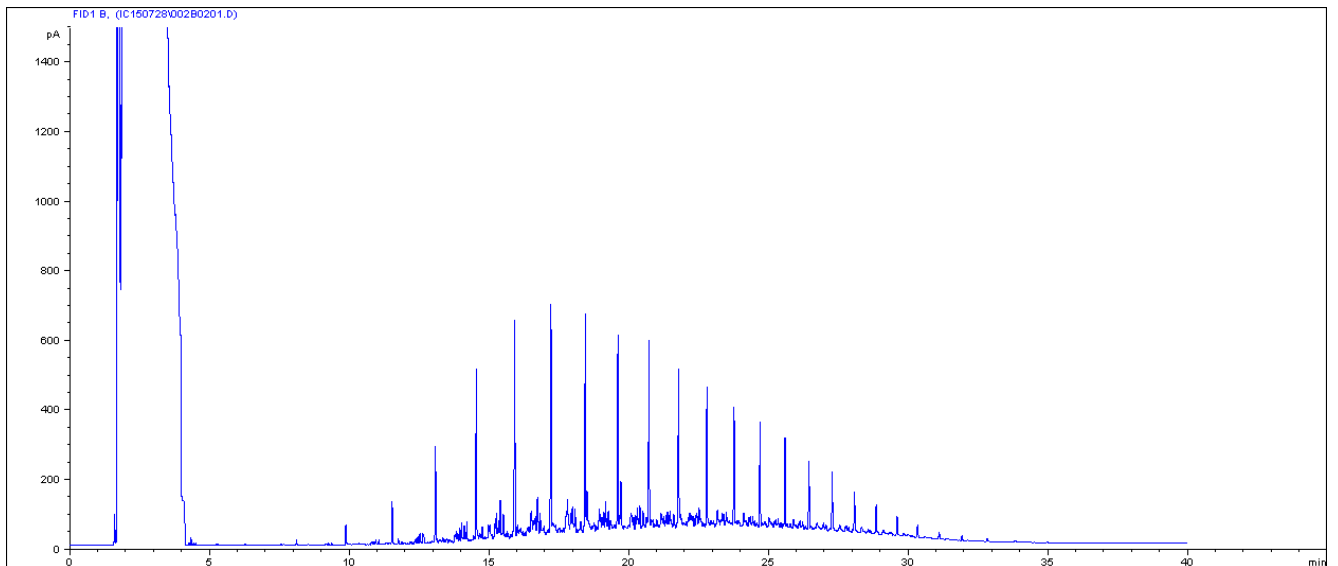
LPG	1.64	%
TOPS (C5-C85)	9.18	%
Naphtha (C85-C150)	14.08	%
Kerosene (C150-C270)	24.06	%
Gasoil (C270-C370)	18.39	%
Waxy (C370-C570)	24.06	%
SR (C570+)	8.59	%

Arab Light (ARL)

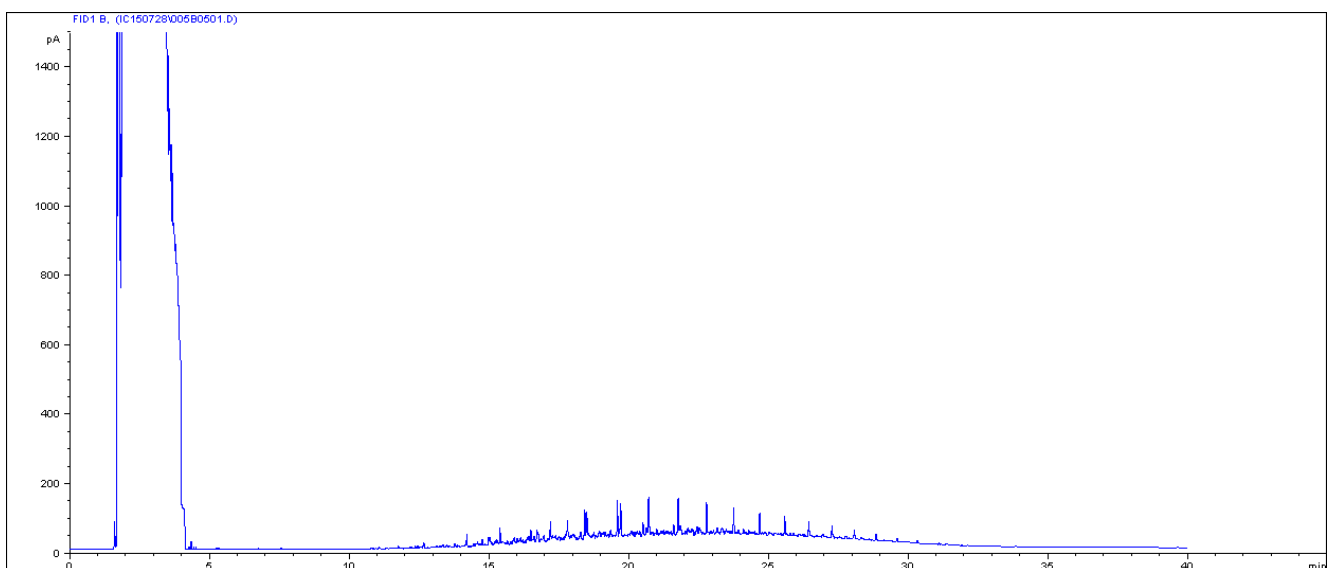
LPG	2.22	%
-----	------	---

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

### ตัวอย่าง Chromatogram



ก).



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

ทดลอง

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