รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ทนโลหะหนักจากฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และการพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อม

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

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

รองศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๐

สิงหาคม ๒๕๖๑

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๒๕๘๒๐๖
สัญญาเลขที่ ๑๗ /๒๕๖๐

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ทนโลหะหนักจากฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และการพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อม

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

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

รองศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๐

สิงหาคม ๒๕๖๑

บทคัดย่อ

ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อมทางทะเล ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและเศรษฐกิจของประเทศ งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้ในรูปแบบเซลล์ตรึงสำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยใช้ *Sphingobium* sp. MO2-4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมที่คัดแยกจากตัวอย่างฟองน้ำทะเล และไม่เป็นเชื้อก่อโรค จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะต่างๆ พบว่าเซลล์อิสระของ *Sphingbium* sp. MO2-4 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในสภาวะที่แปรผันความเค็มโดยการเติม NaCl 1.5-5.5% และแปรผันค่า pH ที่ 7 และ 9 ได้ประมาณ 50% ในเวลา 7 วัน ในขณะที่เมื่อมีค่า pH เท่ากับ 5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลงเหลือเพียง 17% และในสภาวะที่มีการเติมตะกั่วพบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบลดลงเหลือเพียง 9% แต่ยังสามารถพบการเจริญของเชื้อได้ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจึงเลือกวิธีการตรึงเซลล์เพื่อช่วยลดผลกระทบของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อเซลล์ โดยวัสดุตรึงที่เลือกใช้ได้แก่ หินพัมมิส, โฟมโพลียูรีเทน, ไบโอบอล, และอควาพอรัสเจล ผลการทดลองพบว่าวัสดุตรึงที่เหมาะสมที่สุดคือ อควาพอรัสเจล ซึ่งเป็นวัสดุที่มีรูพรุนจำนวนมาก มีความคงทน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยสภาวะการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 บนอควาพอรัสเจลที่เหมาะสมที่สุดคือ ใช้อควาพอรัสเจลปริมาณ 1.5 กรัม และเวลาในการตรึง 4 วัน โดยสามารถตรึงเซลล์ได้ประมาณ 6×10^7 CFU/กรัมอควาพอรัสเจล จากหัวเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร เมื่อนำแบคทีเรียตรึงไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยเลือกสภาวะที่มีค่า pH เท่ากับ 5 และสภาวะที่มีตะกั่ว ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีกว่าเซลล์อิสระในสภาวะเดียวกัน และยังมีอัตราการอยู่รอดที่สูงกว่าเซลล์อิสระอีกด้วย ดังนั้นแบคทีเรียพร้อมใช้รูปแบบเซลล์ตรึงจึงมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาต่อยอดสำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ดี

Abstract

Petroleum hydrocarbon contamination is one of major marine environmental problems since it can have impacts to both ecosystem and economic system. This research aims to develop ready-to-use bacteria in form of immobilized cells for bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated environment. *Sphingobium* sp. MO2-4 isolated from marine sponge was chosen based on its ability to degrade petroleum oil and non-pathogenic trait. Various environmental conditions were examined for their influences on the biodegradation of crude oil (0.25% (v/v)) by *Sphingobium* sp. MO2-4, including pH (5-7), salinity (addition of NaCl at 1.5-5.5%), and addition of heavy metal. *Sphingobium* sp. MO2-4 showed good biodegradation efficiency (about 50% in 7 days) under neutral, alkaline, and high salinity conditions. However, the reduction of crude oil was decreased in acidic condition and when lead (O_4Pbs) was added. To enhance crude oil removal, immobilizing of bacteria was performed under acidic condition and in the addition of lead. The immobilized materials were selected among pumice, polyurethane foam, bioball and aquaporous gel. The study found that aquaporous gel was the best immobilizing material due to its high porosity, strengthen and environmental friendly. The immobilizing of bacteria in 1.5 g of aquaporous gel for 4 days achieved the bacterial attachment on immobilized material about 6.13×10^7 CFU/g aquaporous gel from the initial cells of 10^8 CFU/mL. Immobilized cells of *Sphingobium* sp. MO2-4 showed the increasing ability to remove crude oil in acidic condition and in the presence of lead compared to that of free cells. This information indicated

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๑๗ /๒๕๖๐

ขอขอบนางสาวชนกภรณ์ เมืองจินดา นางสาวนันท์ธร เภาราช และนายอดิสรรค์ รังษีหิรัญรัตน์ ผู้ช่วยวิจัยที่ปฏิบัติงานจนงานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

Acknowledgement

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 17 / 2560)

สารบัญ

รายการ **หน้า**

1. บทนำ 1
2. วิธีดำเนินการวิจัย 11
   2.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย 11
   2.2 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้การแปรผันปัจจัยทางกายภาพ 11
   2.3 การคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ *Sphingobium* sp. MO2-4 12
   2.4.ปริมาณวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับการตรึง 12
   2.5. ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 13
   2.6. การกำจัดน้ำมันดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยแบคทีเรียตรึง MO2-4 ในสภาวะไม่เหมาะสม 13
3. ผลและอภิปรายผลการวิจัย 14
4. สรุป 21
5. ข้อเสนอแนะ 22
6. ผลผลิต 22

บรรณานุกรม 23

ภาคผนวก 28

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ระหว่างปีพ.ศ. 2540-2558	6-7
1.2	ความสามารถในการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียชนิดต่างๆ	9
2.1	ประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของ *Sphingobium* sp. MO2-4 ในระยะเวลา 7 วัน	11
3.1	ประสิทธิภาพการดูดซับน้ำมันดิบของโฟมโพลียูรีเทน ไบโอบอล และอควาพอรัสเจล	17
3.2	ความสามารถในการตรึงเซลล์ *Sphingobium* sp. MO2-4 ของวัสดุตรึง	17
3.3	จำนวน *Sphingobium* sp. MO2-4 ที่ตรึงอยู่ในอควาพอรัสเจล	18
3.4	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบและจำนวนแบคทีเรียของแบคทีเรียตรึง MO2-4	20

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างองค์ประกอบของน้ำมันดิบ (Mcgenity, 2014)	5
3.2	ขนาดและรูปร่างของอควาพอรัสเจล	18
3.3	ปริมาณ *Sphingobium* sp. MO2-4 ในอควาพอรัสเจล	19

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

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

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

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

มีรายงานการสำรวจสารปนเปื้อนสารมลพิษต่างๆ บริเวณดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง อาทิ การตรวจสารอินทรีย์ในดินตะกอนบริเวณอ่าวไทยตอนบน ใกล้เกาะสีชัง และพบการปนเปื้อน PAHs ในบริเวณดังกล่าว (Boonyatumanond และคณะ 2006; 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบการสะสมปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสัตว์ทะเล เช่น ไส้เดือนทะเล ส่วนในหอยตลับลาย ปลาเห็ดโคน ปลาทรายแดง และปลาทรายขาว บริเวณอ่าวเพ จังหวัดระยองในช่วงเดือนมิถุนายนและกันยายน 2543 (จุมพล สงวนสิน และคณะ, 2543) ซึ่งการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในธรรมชาติ 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 โดยปัญหาที่สำคัญคือสารมลพิษสามารถเข้าไปอยู่ในสายใยอาหารได้ (Mitra และคณะ, 2011) และแม้มีความเข้มข้นต่ำก็เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้ โดยโลหะหนักสามารถทำลายระบบประสาท ตับ กระดูก 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) ซึ่งเป็นการอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายหรือลดปริมาณสารพิษในสิ่งแวดล้อมและเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับ

การการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และ PAHs เนื่องจากมีต้นทุนต่ำและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Haritash และ kaushik, 2009) การใช้แบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารมลพิษจำเป็นต้องมีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสาร และสามารถคงทนในสิ่งแวดล้อมได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งแวดล้อมที่มีโอกาสปนเปื้อนสารมลพิษหลายชนิด แบคทีเรียที่เลือกใช้จึงจำเป็นต้องมีประสิทธิภาพหลายด้าน อาทิ สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และยังสามารถทนต่อโลหะหนักได้อีกด้วย และหากจะนำไปใช้บำบัดในน้ำทะเล ก็จำเป็นต้องเลือกใช้แบคทีเรียที่มีความทนเค็มได้ นอกจากนี้แบคทีเรียที่จะนำไปใช้ในสถานที่จริงควรจะเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคสิ่งมีชีวิต

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น ความคงทนของแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อมเป็นหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพิษ ดังนั้นการเพิ่มอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งจำเป็น หนึ่งในวิธีดังกล่าวคือ การตรึงแบคทีเรียบนวัสดุตรึง ซึ่งเป็นการจำกัดการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียบนผิวของวัสดุตรึง โดยวัสดุตรึงจะทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากปัจจัยทางกายภาพต่างๆ และช่วยดูดซับสารพิษได้อีกด้วย ทั้งนี้วัสดุตรึงที่ใช้จำเป็นต้องเป็นวัสดุที่มีพื้นที่ผิวมาก มีความคงทน ราคาไม่แพง หาง่าย และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Bayat และคณะ 2015)

โครงการวิจัยในปีที่ 3 จึงมุ่งเน้นการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Spingobium* sp. MO2-4 ซึ่งไม่จัดอยู่ในบัญชีรายการเชื้อโรคควบคุมตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ในสภาวะที่มีการแปรผันปัจจัยทางกายภาพต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเค็ม (salinity) และในสภาวะที่มีตะกั่ว รวมทั้งการพัฒนาเป็นแบคทีเรียตรึง เพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่ไม่เหมาะสม

โดยรายงานวิจัยฉบับนี้เป็นรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยในปีที่ 3 ซึ่งได้รายงานผลประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Sphingobium* sp. MO2-4 ในสภาวะต่างๆ รวมถึงการคัดเลือกวัสดุตรึงและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 และการย่อยสลายน้ำมันดิบของแบคทีเรียตรึง MO2-4 สภาวะที่ไม่เหมาะสม

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

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

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ปีที่ 1

1. การคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน จะคัดแยกจากฟองน้ำ ที่เก็บจากบริเวณแหล่งตัวอย่างคือ บริเวณชายฝั่งทะเล จังหวัดชลบุรี และจังหวัดชุมพร เพื่อให้ได้แบคทีเรียหรือกลุ่มแบคทีเรียอย่างน้อย 10 สายพันธุ์หรือกลุ่ม

ปีที่ 2

2. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ทำโดยวิเคราะห์ข้อมูลชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ และข้อมูลจากการศึกษาจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อมระดับโมเลกุล ได้แก่การใช้เทคนิคเมตาจีโนมิกส์ เพื่อตรวจหาชนิดของแบคทีเรียโดยตรงจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้จะตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

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

ปีที่ 3

4. การพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารพิษโดยวิธีชีวภาพ โดยการตรึงแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม และหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ หาประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในการย่อยสลาย และการดูดซับสารมลพิษ

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้คัดแยกและศึกษาความหลากหลายและประสิทธิภาพของแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และทนต่อโลหะหนัก จากฟองน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรีและชุมพร รวมถึงการพัฒนาเป็นแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับการบำบัดทางชีวภาพ โดยโครงการวิจัยมีกรอบแนวคิดการวิจัยดังนี้

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและทนต่อโลหะหนัก จากสิ่งแวดล้อมที่พบการปนเปื้อนของสารมลพิษดังกล่าว โดยเฉพาะฟองน้ำซึ่งเป็นตัวกรองทั้งแบคทีเรียและสารมลพิษในทะเล จะทำให้มีโอกาสสูงที่จะได้แบคทีเรียหลากหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพดีเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารมลพิษ และการคัดแยกแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมที่มีความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียสูง โดยวิธีการ enrichment ซึ่งเป็นการกระตุ้นในแบคทีเรียต่างๆ จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมนั้นใช้สารมลพิษ ก็จะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะทำให้ได้แบคทีเรียที่น่าสนใจที่มีประสิทธิภาพสูง

นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อมระดับโมเลกุล ได้แก่ การใช้เทคนิคเมตาจีโนมิกส์ เพื่อตรวจหาชนิดของแบคทีเรียโดยตรงจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม และตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม จะทำให้ได้ข้อมูลความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

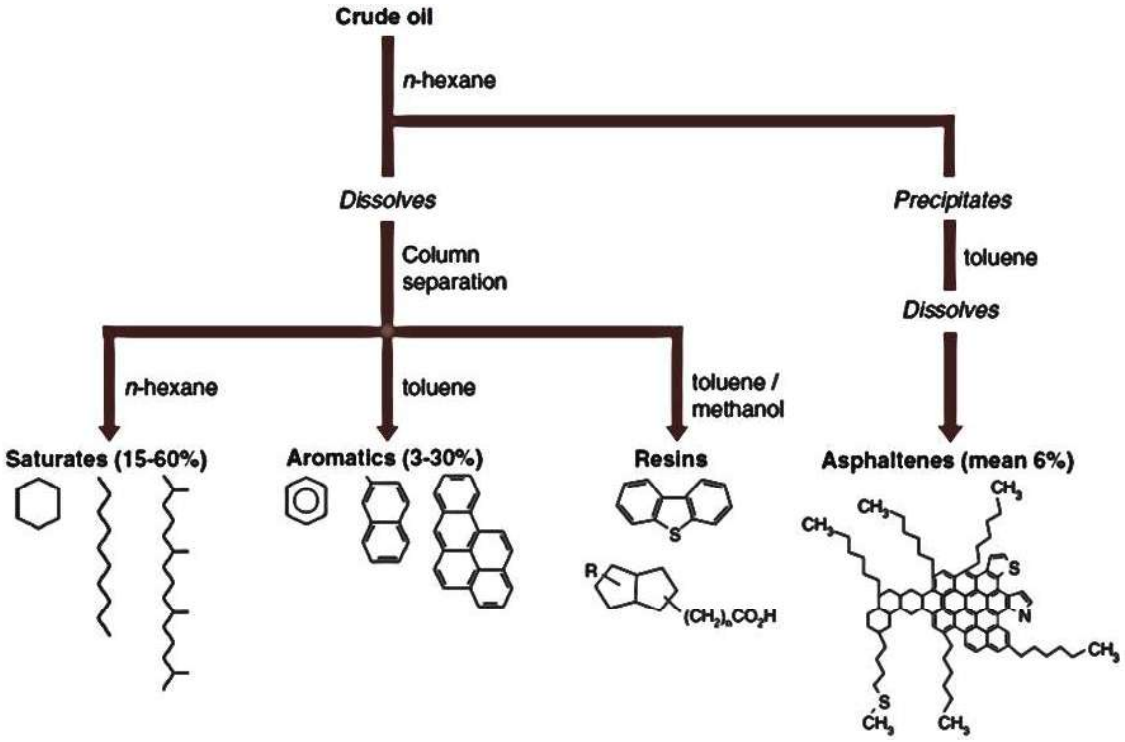
และสำหรับการพัฒนาการเตรียมแบคทีเรียพร้อมใช้ การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสมจะช่วยเป็นแหล่งคุ้มกัน ทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เช่น ปริมาณน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง การปนเปื้อนของสารพิษหลายชนิด และปัจจัยทางกายภาพที่ไม่เหมาะสมแก่การเจริญ ทำให้อัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้

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 พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) ซึ่งมีความเป็นพิษ และเป็นสารเหนี่ยวนำก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ 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

ลำดับที่	วัน/เดือน/ปี	ชนิดของน้ำมัน	สาเหตุ	สถานที่	ปริมาณ
3	17 ธันวาคม 2545	น้ำมันเตา	เรือชนกัน	ทางเข้าท่าเรือแหลม-ฉบัง จ.ชลบุรี	210,000 ลิตร
4	20 พฤศจิกายน 2548	น้ำมันดิบ	ท่อเชื่อมต่อหลุดขณะส่งถ่ายน้ำมัน	บริเวณทุ่นผูกเรือ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี	20,000 ลิตร
5	4 พฤษภาคม 2549	น้ำมันเตา	รั่วไหลจากรอยรั่วที่ระวางของเรือบรรทุกน้ำมัน	บริเวณท่าเทียบเรือ อ.มาบตาพุต จ.ระยอง	20,000 ลิตร
6	6 ตุลาคม 2550	Saraline 185V	รั่วไหลจากถังเก็บน้ำมัน	บริเวณแท่นขุดเจาะน้ำมัน	34,000 ลิตร
7	9 ธันวาคม 2550	น้ำมันดีเซลและน้ำมันเตา	เรือบรรทุกแก๊สอับปาง	ในทะเลห่างชายฝั่ง อ.สทิงพระ จ.สงขลา ประมาณ 6 ไมล์ทะเล	20,000 ลิตร
8	15 มิถุนายน 2551	น้ำมันเตา	รั่วไหลจากเรือบรรทุกสินค้า	บริเวณอู่เรือ อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ	40,000 ลิตร
9	4 กันยายน 2554	น้ำมันดีเซล (B5)	เรือบรรทุกน้ำมันอับปาง	ห่างจากเกาะราชา-ใหญ่ ทางตะวันออก ประมาณ 4 ไมล์ทะเล จ.ภูเก็ต	40,000 ลิตร
10	27 กรกฎาคม 2556	น้ำมันดิบ	รั่วไหลจากท่อรับน้ำมันดิบ	บริเวณทุ่นรับน้ำมันกลางทะเล จ.ระยอง	50,000 ลิตร
11	26 มีนาคม 2557	น้ำมันเตา	ไม่ทราบ	ในเขตท่าเรือศรีราชา จ.ชลบุรี	ไม่ทราบ
12	7 เมษายน 2557	น้ำมันเครื่องใช้แล้วกากน้ำมันเตาน้ำท้องเรือ	เรือชื่อ “นภสินธุ์” จม	ใกล้ปากแม่น้ำท่าจีน อ.เมือง จ.สมุทรสาคร	10,000 ลิตร

ที่มา: กรมเจ้าท่า (2558)

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

ลำดับที่	วัน/เดือน/ปี	ชนิดของน้ำมัน	สาเหตุ	สถานที่	ปริมาณ
13	8 ตุลาคม 2558	น้ำมันเตา	ท่อระบายอากาศของเรือ HEIKE P ที่เชื่อมผ่านไปยังถังน้ำมันแตกหัก	ท่าเทียบเรือแหลมฉบัง C1	5,000 ลิตร
14	29 พฤศจิกายน 2558	ก้อนน้ำมันสีดำ (Tar ball)	ไม่ทราบ	ชายหาดบริเวณปากน้ำหลังสวน-หาดบางมะพร้าว จ.ชุมพร	ไม่ทราบ (เป็นแนวยาวประมาณ 10 กิโลเมตร)
15	17 ธันวาคม 2558	ก้อนน้ำมันสีดำ (Tar ball)	ไม่ทราบ	ชายหาดบริเวณหมู่ 9 ต.เกาะเพชร อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช	ไม่ทราบ (เป็นแนวยาวประมาณ 3 กิโลเมตร)

ที่มา: กรมเจ้าท่า (2558)

การปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อม ทำให้มีผลกระทบทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อม สุขภาพ และเศรษฐกิจ จึงจำเป็นต้องมีการจัดการปัญหามลพิษดังกล่าวอย่างถูกต้อง และเป็นการแก้ปัญหาอย่างยั่งยืน โดยการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารพิษโดยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจ โดยเป็นการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารพิษ โดยจุลินทรีย์สามารถนำสารเคมีนั้นๆไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานหรืออาจเปลี่ยนโครงสร้างของสารพิษบางส่วน 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 Burkhoderia Pseudomonas Mycobacterium* และ *Rhodococcus* (van Beilen และ Funhoff, 2007) แบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs เช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* (Zhang และคณะ, 2004) สกุล *Sphingomonas*

(Pinyakong และคณะ, 2003) สกุล *Mycobacterium* (Bastiaens และคณะ, 2000) และในงานวิจัยก่อนหน้านี้กลุ่มผู้วิจัยสามารถคัดแยกแบคทีเรียจากธรรมชาติ ได้แก่ จากดินและน้ำเสียในประเทศไทยที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม แบคทีเรียที่แยกได้เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายสารในกลุ่มปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ PAHs เช่น *Diaphorobacter* sp. และ *Pseudoxanthomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายไพรีน ฟีแนนทรีน (Klankeo และคณะ, 2009) *Sphingomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน (Saiphet และคณะ, 2006) ซึ่งต่อมาก็พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ นอกจากนี้ยังได้คัดแยก *Acenitobacter* sp. ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ (Tathong, 2007) เป็นต้น

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 1.2 ดังนั้นจึงคาดว่าทั้งฟองน้ำ น้ำทะเล และดินตะกอนน่าจะเป็นแหล่งที่จะสามารถพบแบคทีเรียที่น่าสนใจที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารมลพิษ และมีสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

ตารางที่ 1.2 ความสามารถในการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

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

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลของโลหะหนักต่อการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น Zukauskaite และคณะ (2008) พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เพิ่มขึ้น

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

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียสามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เหมาะสม จะช่วยเป็นแหล่งคุ้มกัน อีกทั้งยังทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เช่น ปริมาณน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง หรือสารอาหารที่มีปริมาณต่ำในน้ำเสีย ทำให้อัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ (Gentry และคณะ , 2004; Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001) นอกจากนี้ยังสามารถนำแบคทีเรียที่ถูกตรึงนี้กลับมาใช้ซ้ำได้ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการบำบัดน้ำเสียในระยะยาวต่ำ การตรึงเซลล์ทำได้หลายรูปแบบ เช่น การจับกลุ่มของเซลล์ การดูดซับบนผิววัสดุตรึง การสร้างพันธะโควาเลนท์ระหว่างเซลล์กับวัสดุตรึง การเชื่อมกันของเซลล์ การบรรจุเซลล์ในวัสดุตรึง และการทำให้เซลล์ติดอยู่ในเมทริกซ์ (Dzionek และคณะ 2016) 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 ซึ่งพบว่าการตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มความเสถียรของเซลล์ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง และช่วยลด COD ได้ดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ และพบว่าเซลล์ตรึงมีความเสถียรเมื่อถูกเก็บที่ 4 องศาเซลลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และถูกนำกลับมาใช้ได้ 12 ครั้ง

2. การดำเนินการวิจัย

2.1. แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Sphingobium* sp. MO2-4 คัดแยกจากตัวอย่างฟองน้ำทะเลสายพันธุ์ *Chalinula* sp. จากเกาะมัน จังหวัดระยอง นอกจากนี้สายพันธุ์ MO2-4 ยังไม่จัดอยู่ในบัญชีรายการเชื้อโรคควบคุมตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 สืบเนื่องจากงานวิจัยปีที่ 2 พบว่าสายพันธุ์ MO2-4 สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม และองค์ประกอบต่างๆ ได้หลากหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.1 จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เพื่อนำไปศึกษาต่อยอดต่อไป

ตารางที่ 2.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของ *Sphingobium* sp. MO2-4 ในระยะเวลา 7 วัน

สารตั้งต้น	ความเข้มข้น	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย (%)
น้ำมันดิบ	0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร)	51
น้ำมันดีเซล	0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร)	53
น้ำมันเตา	0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร)	54
เตตระเดคเคน	500 มิลลิกรัม/ลิตร	71
ฟีแนนทรีน	50 มิลลิกรัม/ลิตร	33
ไพรีน	50 มิลลิกรัม/ลิตร	25

2.2. ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้การแปรผันปัจจัยทางกายภาพ

ศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Sphingobium* sp. MO2-4 โดยเตรียมอาหารเหลว Naturel Sea Water (NSW) 45 มิลลิลิตร ที่มีสภาวะต่างๆดังนี้:

-แปรผันความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่าเท่ากับ 5, 7, และ 9

-แปรผันความเค็ม โดยการเติม NaCl เพิ่ม 1.5, 3.5, และ 5.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

-เติมตะกั่ว โดยใช้ $PbSO_4$ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ลิตร

เพาะเลี้ยง *Sphingobium* sp. MO2-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25 เท่า Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% 2 ครั้ง แขวนลอยเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% จากนั้นปรับความเข้มข้นสารแขวนลอยแบคทีเรียให้เท่ากับ 10^9 CFU/มิลลิลิตร เติมสารแขวนลอย ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและน้ำมันดิบ 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง Thin-layer Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัด Flame Ionization Detector (TLC-FID) และวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลว NSW ด้วยวิธี drop plate

2.3 การคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ *Sphingobium* sp. MO2-4

คัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมโดยวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำมันและความสามารถในการตรึงเซลล์ของวัสดุตรึงแต่ละชนิด ได้แก่ หินพัมมิส (โซนสัตว์เลี้ยงสวนจตุจักร) โฟมโพลียูรีเทน (บริษัท Thai Products Foam) ไบโอบอล (บริษัท 2H GmbH, Germany) และอควาพอรัสเจล (บริษัท Nisshinbo) โดยวัสดุตรึงทั้งหมดเป็นวัสดุที่มีรูพรุนจำนวนมากเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการตรึงแบคทีเรีย หาง่าย ราคาถูก และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

2.3.1 ทดสอบการดูดซับน้ำมันของวัสดุตรึง

ทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับน้ำมันดิบของวัสดุตรึงโดยเติมวัสดุตรึงปริมาณ 200 มิลลิกรัม ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุน้ำทะเลปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมน้ำมันดิบที่ทราบปริมาณแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำมันดิบต่อไปจนกระทั่งสังเกตเห็นคราบน้ำมันลอยบนผิวน้ำทะเลภายหลังการเขย่า โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3.2 ทดสอบความสามารถในการตรึงเซลล์ของวัสดุตรึง

เติมสารแขวนลอยแบคทีเรียจากข้อ 2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว 0.25 เท่า LB ปริมาตร 100 มิลลิลตร และวัสดุตรึงแต่ละชนิดปริมาณ 200 มิลลิกรัม นำไปเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก ล้างแบคทีเรียตรึงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% 2 ครั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำแบคทีเรียตรึงไปตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนวัสดุตรึง

2.4. ปริมาณวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4

เติมสารแขวนลอยแบคทีเรียจากข้อ 2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว 0.25 เท่า LB ปริมาตร 100 มิลลิลตร และวัสดุตรึงที่คัดเลือกจากข้อ 2.3 ปริมาณ 1 และ 1.5 กรัม นำไปเขย่า

เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก ล้างแบคทีเรียตรึงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% 2 ครั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำแบคทีเรียตรึงไปตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนวัสดุตรึง

2.5. ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4

ตรึงแบคทีเรียโดยใช้น้ำหนักที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 2.4 เติมสารแขวนลอยแบคทีเรียจากข้อ 2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว 0.25 เท่า LB ปริมาตร 100 มิลลิลตร และวัสดุตรึง นำไปเขย่าเป็นเวลา 1-7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกวัน จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก ล้างแบคทีเรียตรึงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% 2 ครั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำแบคทีเรียตรึงไปตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนวัสดุตรึง แล้วนำแบคทีเรียตรึงไปตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนวัสดุตรึง

2.6. การกำจัดน้ำมันดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยแบคทีเรียตรึง MO2-4 ในสภาวะไม่เหมาะสม

สืบเนื่องจากผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Sphingobium* sp. MO2-4 ภายใต้การแปรผันปัจจัยทางกายภาพ ข้อ 2.2 เลือกสภาวะที่มีค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ต่ำที่สุดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียตรึง โดยตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 บนวัสดุที่คัดเลือกจากข้อ 2.3 ด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4 และ 2.5 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/กรัมวัสดุตรึง บ่มเป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวและวัสดุตรึงด้วยเครื่อง TLC-FID และวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลว NSW ด้วยวิธี drop plate

3. ผลและการอภิปราย

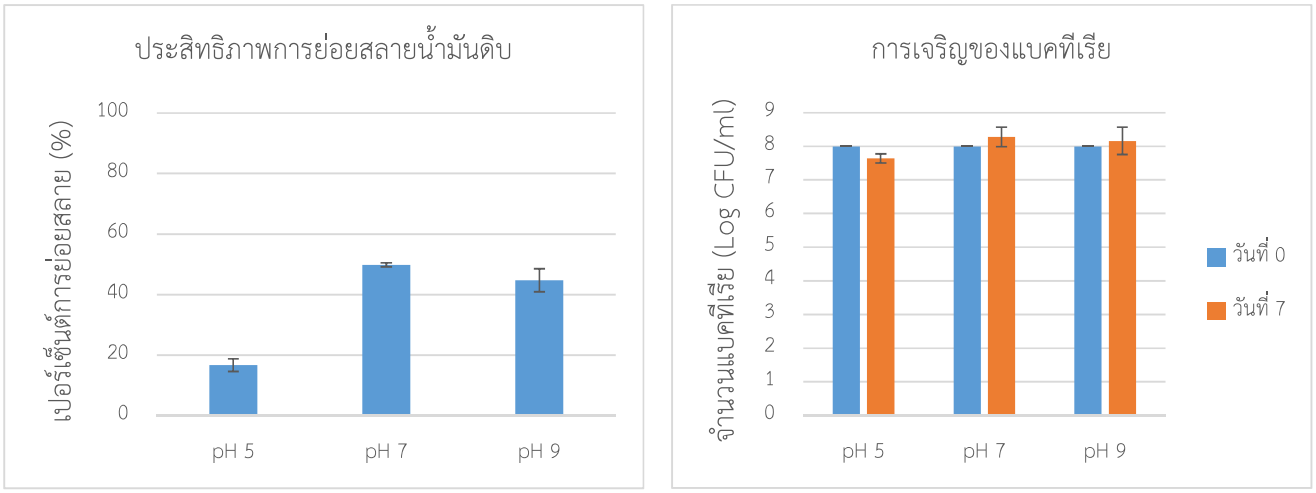
กิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะ สิ่งแวดล้อมทางทะเล ซึ่งมีสาเหตุมาจากการขนส่ง การท่องเที่ยว คมนาคม อุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงการเกิดอุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมัน ด้วยสมบัติความเป็นพิษของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนก่อให้เกิดความเสียทางต่อระบบนิเวศทางทะเล และมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย และแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากฟองน้ำทะเล และพัฒนาเป็นแบคทีเรียพร้อมใช้ในรูปแบบแบคทีเรียตรึงสำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

แบคทีเรียสกุล *Sphingobium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในแฟมิลี Shingomonaceae มักถูกคัดแยกจากสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสมบัติในการใช้ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เช่น PAHs โดยมีรายงานวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลต่ำและมวลโมเลกุลสูง ของ *Sphingobium* อีกด้วย เช่น *Sphingobium* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003), *Sphingobium* sp. HV3 (Sipila และคณะ, 2010), *Sphingobium scionense* WP01 (Liang และ Lloyd-Jones, 2010), *Sphingobium chungbukense* DJ77 (Yeon และ Kim, 2011), *Sphingobium* sp. KK22 (Maeda และคณะ, 2013) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมอื่นๆ เช่น น้ำมันดีเซล น้ำมัน Jet ยกตัวอย่างเช่น *Sphingobium* sp. P2 (Khondee และคณะ, 2012), *Sphingobium* sp. DhA-95 (Yu และคณะ, 2000) ตัวอย่างแบคทีเรียสกุล *Sphingobium* ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ และปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ นอกจากนี้แบคทีเรียในสกุลนี้ไม่อยู่ในบัญชีรายการเชื้อโรคควบคุมตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558

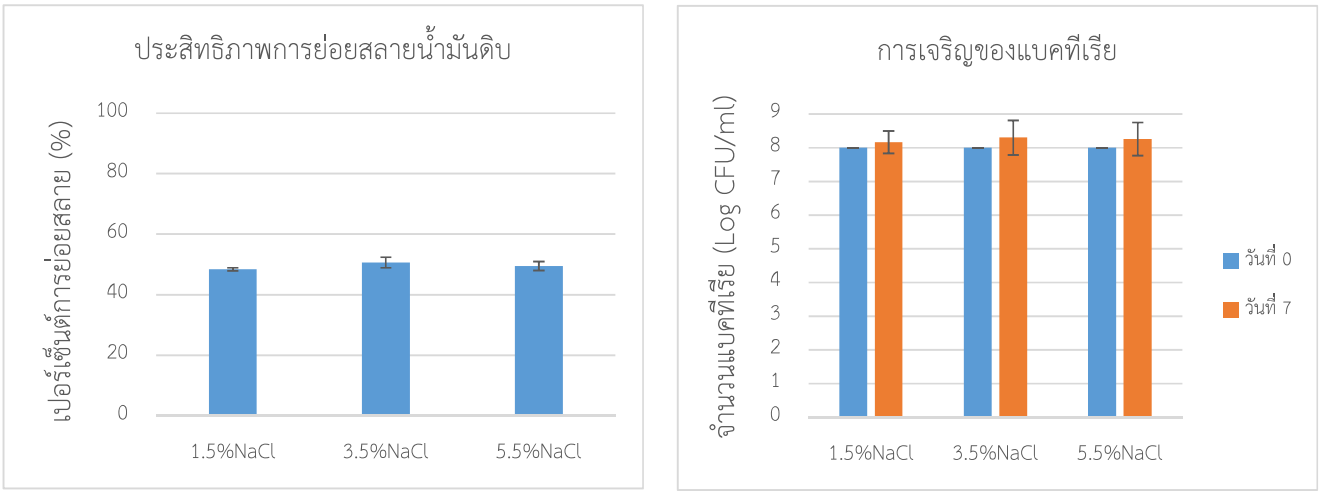
3.1 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบภายใต้การแปรผันปัจจัยทางกายภาพ

จากการทดลองพบว่า ในสภาวะที่มีการแปรผัน pH เท่ากับ 5, 7, และ 9 *Sphingobium* sp. MO2-4 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 16.7, 49.87, และ 44.75% ตามลำดับ ในสภาวะที่มีการแปรผันความเค็มพบว่า *Sphingobium* sp. MO2-4 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบใกล้เคียงกันในทุกสภาวะที่ประมาณ

50% ในสภาวะที่มีการเติมตะกั่วพบว่า *Sphingobium* sp. MO2-4 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบลดลงเหลือประมาณ 9% แสดงในรูปที่ 3.1 ทุกชุดการทดลองพบการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียยกเว้นในชุดที่มีการเติมตะกั่วและที่ pH 5 ซึ่งสอดคล้องกับผลการย่อยสลายที่ลดลง



ก).



ข).

ค).

รูปที่ 3.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบและการเจริญของ *Sphingobium* sp. MO2-4 เมื่อมีการแปรผันสภาวะต่าง ๆ ก). pH ข). ความเค็ม ค). การเติมตะกั่ว

(ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางและด่าง โดยมีประสิทธิภาพสูงที่สุดที่ pH 7 และมีประสิทธิภาพน้อยสุดที่ pH 5 เนื่องจาก pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์โดยทั่วไปควรอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงความเป็นกลาง หากค่า pH สูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ไม่ดี ซึ่งก็สอดคล้องกับการเจริญของ MO2-4 ที่มีการเจริญได้ดีที่สุดในชุดทดลองที่ปรับสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มี pH เท่ากับ 7 และลดลงในชุดทดลองที่มี pH เท่ากับ 5 โดยผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2017) ที่พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 2%(น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยกลุ่มแบคทีเรีย *Exiguobacterium* sp. ASW1, *Pseudomonas aeruginosa* ASW-2, *Alcaligenes* sp. ASW-3 *Alcaligenes* sp. ASS-1 และ *Bacillus* sp. ASS-2 ในสภาวะที่ pH อยู่ในช่วง 7-9 มีการย่อยสลายเกิน 50% ภายในระยะเวลา 7 วัน แต่ใน pH 6 พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายลดต่ำกว่า 40% นอกจากนี้ pH ยังอาจมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ทำให้ส่งผลถึงประสิทธิภาพการย่อยสลายอีกด้วย (Yemashova และคณะ, 2007; Wong และคณะ, 2002)

เมื่อแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ผลการทดลองพบว่าแม้ว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 5.5% *Sphingobium* sp. MO2-4 ยังคงย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีไม่แตกต่างจากในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำ โดย *Sphingobium* sp. MO2-4 คัดแยกมาจากกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำทะเล ทำให้ *Sphingobium* sp. MO2-4 น่าจะมีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของเกลือที่สูงได้

อย่างไรก็ตามเมื่อเติมตะกั่ว ($PbSO_4$) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ลิตร พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบลดลงอย่างมาก ซึ่งก็สอดคล้องกับการเจริญของ MO2-4 ที่ลดลง เนื่องจากความเป็นพิษของตะกั่วมีผลต่อการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆภายในเซลล์ (AL-Saleh และคณะ, 2005; Ofoegbu และคณะ, 2013)

จากผลการทดลองข้างต้นที่มีการแปรผันปัจจัยทางกายภาพต่าง ๆ จะพบว่าในสภาวะที่มีการปรับ pH ให้มี pH เท่ากับ 5 และในสภาวะที่มีการเติมตะกั่ว ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบและการเจริญของ *Sphingobium* sp. MO2-4 ลดลง ดังนั้นจึงนำเทคนิคการตรึงเซลล์มาประยุกต์ใช้เพื่อปกป้องแบคทีเรียจาก

สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เพื่อทำให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดได้มากขึ้นหรือคงอยู่ในระบบการบำบัดได้นานขึ้น (Chen และคณะ, 2017; Wu และคณะ, 2009) โดยงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมแก่การตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 ซึ่งพบว่า อควาพอรัสเจล เป็นวัสดุตรึงที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีปริมาณแบคทีเรียที่เกาะติดได้มาก มีความคงทน ราคาถูก และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม จากนั้นได้ทดสอบหาปริมาณวัสดุตรึงและระยะเวลาที่ใช้ในการตรึงที่เหมาะสม โดยสภาวะการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 บนอควาพอรัสเจลที่เหมาะสมที่สุดคือ ใช้อควาพอรัสเจลปริมาณ 1.5 กรัม และเวลาในการตรึง 4 วัน โดยสามารถตรึงเซลล์ได้ประมาณ 6×10^7 CFU/กรัมอควาพอรัสเจล จากหัวเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร

3.2 การคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ *Sphingobium* sp. MO2-4

3.2.1 การดูดซับน้ำมันดิบของวัสดุตรึง

ผลการทดลองพบว่าโฟมโพลียูรีเทนสามารถดูดซับน้ำมันได้ดีที่สุด รองลงมาคืออควาพอรัสเจลและไบโอบอลแสดงในตารางที่ 3.1 หินพัมมิสไม่สามารถวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำมันดิบได้ เนื่องจากการเขย่าทำให้หินพัมมิสแตกเป็นชิ้นเล็กๆและตกตะกอนลงสู่ก้นขวด

ตารางที่ 3.1 ประสิทธิภาพการดูดซับน้ำมันดิบของโฟมโพลียูรีเทน ไบโอบอล และอควาพอรัสเจล

ชนิดของวัสดุตรึง	ค่าการดูดซับน้ำมันของวัสดุตรึง (กรัม/กรัมวัสดุตรึง)
โฟมโพลียูรีเทน	< 9.000 ± 0.00
ไบโอบอล	< 0.175 ± 0.00
อควาพอรัสเจล	< 0.175 ± 0.00

3.2.2 ความสามารถในการตรึงเซลล์ของวัสดุตรึง

จากการทดลองพบว่า สามารถตรึงเซลล์ *Sphingobium* sp. MO2-4 ได้เยอะที่สุดบนอควาพอรัสเจลและโฟมโพลียูรีเทน แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ความสามารถในการตรึงเซลล์ *Sphingobium* sp. MO2-4 ของวัสดุตรึง

ชนิดของวัสดุตรึง	จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนวัสดุตรึง (CFU/กรัมวัสดุตรึง)	จำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU/มิลลิลิตร)
โฟมโพลียูรีเทน	$3.63 \pm 2.88 \times 10^7$	$5.67 \pm 4.04 \times 10^7$
ไบโอบอล	$3.72 \pm 1.74 \times 10^5$	$1.00 \pm 0.00 \times 10^8$
อควาพอรัสเจล	$3.97 \pm 3.78 \times 10^7$	$8.00 \pm 2.83 \times 10^7$

อย่างไรก็ตามด้วยความสามารถในการดูดซับน้ำมันที่สูงของโฟมโพลียูรีเทนจึงอาจทำให้ความเป็นพิษของน้ำมันดิบส่งผลกระทบต่อเซลล์มากขึ้น จึงเลือกวัสดุตรึงอควาพอรัสเจลเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

อควาพอรัสเจลเป็นวัสดุที่ผลิตจากโพลียูรีเทน ซึ่งเป็นวัสดุที่มีความคงทนสูง มีพื้นที่ผิวมาก ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และราคาถูก อควาพอรัสเจลเป็นวัสดุตรึงชนิดใหม่ซึ่งถูกออกแบบมาเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียและเพิ่มประสิทธิภาพในการเกาะติดของแบคทีเรียบนผิววัสดุตรึง โดยขนาดของอควาพอรัสเจลแสดงในรูปที่ 3.2

รูปที่ 3.2 ขนาดและรูปร่างของอควาพอรัสเจล

3.3 ปริมาณวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4

เมื่อนำวัสดุตรึงไปนับจำนวนแบคทีเรียที่เกาะติดบินผิวของวัสดุตรึงภายหลังการบ่มพบว่า ปริมาณวัสดุตรึงทั้ง 2 ค่าให้ผลที่ใกล้เคียงกันโดยผลแสดงในตารางที่ 3.3 จึงเลือกปริมาณวัสดุตรึงที่สูงกว่าสำหรับการทดลองต่อไป

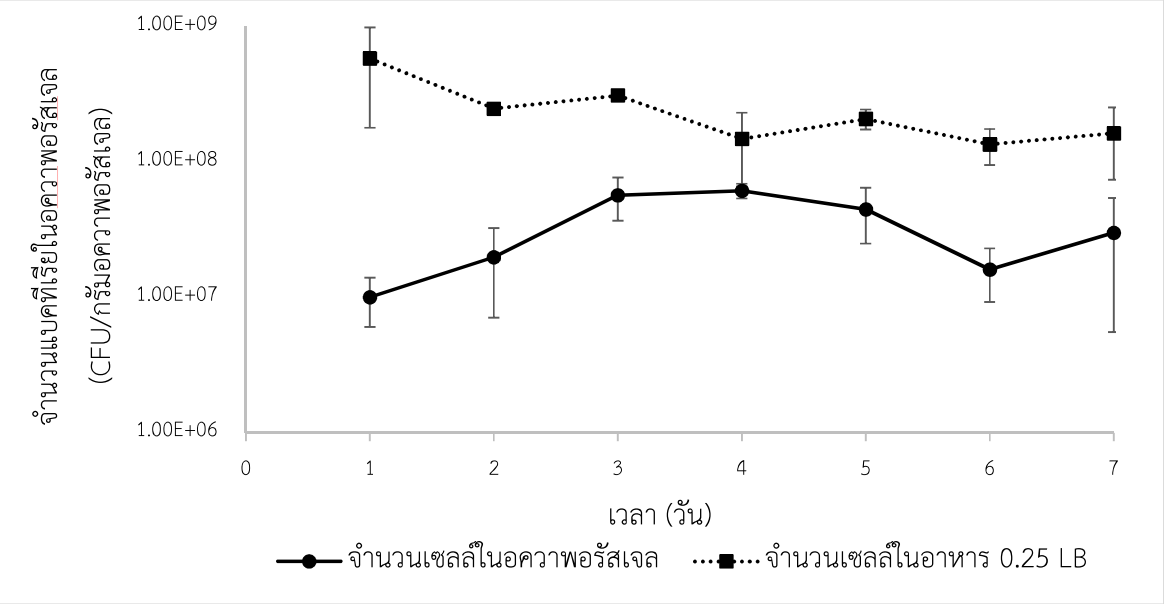
ตารางที่ 3.3 จำนวน *Sphingobium* sp. MO2-4 ที่ตรึงอยู่ในอควาพอรัสเจล

ปริมาณอควาพอรัสเจล	จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่ในอควาพอรัสเจล (CFU/กรัมอควพอรัสเจล)	จำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
1 กรัม	$5.68 \pm 1.41 \times 10^{7}$	$3.10 \pm 2.36 \times 10^{8}$
1.5 กรัม	$5.42 \pm 0.88 \times 10^{7}$	$2.77 \pm 1.45 \times 10^{8}$

จากผลการทดลองจึงพิจรณาเลือกปริมาณวัสดุตรึงที่ 1.5 กรัมเพื่อนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากให้ผลที่ใกล้เคียงกันแต่ได้ปริมาณวัสดุตรึงพร้อมใช้ที่เยอะกว่า

3.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4

โดยใช้ปริมาณวัสดุตรึง 1.5 กรัม ในการทดลองระยะเวลาในการตรึงที่เหมาะสม ผลการทดลองพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 บนอควาพอรัสเจล คือ 4 วัน แสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ปริมาณ *Sphingobium* sp. MO2-4 ในอควาพอรัสเจล

เมื่อทราบสภาวะการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 แล้วจึงนำแบคทีเรียตรึงไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบในสภาวะที่ไม่เหมาะสม

3.5 การกำจัดน้ำมันดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยแบคทีเรียตรึง MO2-4 ในสภาวะไม่เหมาะสม

เมื่อนำแบคทีเรียตรึงไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยเลือกสภาวะที่มีค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของเซลล์อิสระที่ต่ำที่สุด คือ ที่ค่า pH เท่ากับ 5 และ

สภาวะที่มีตะกั่ว ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีกว่าเซลล์อิสระในสภาวะเดียวกัน คือ แบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ประมาณ 25% ในทั้ง 2 สภาวะเมื่อเทียบกับเซลล์อิสระที่ประมาณ 9-17% รวมทั้งแบคทีเรียตรึงยังมีจำนวนแบคทีเรียภายหลังการบ่มที่สูงกว่าเซลล์อิสระ โดยผลแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบและจำนวนแบคทีเรียของแบคทีเรียตรึง MO2-4

สภาวะ	เปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำมันดิบในอาหารเหลว (%)	เปอร์เซ็นน้ำมันที่เหลืออยู่ในอควาพอรัสเจล (%)	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย (%)	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/กรัมอควาพอรัสเจล)
ชุดทดลอง pH 5	37.88 ± 6.45	10.08 ± 1.13	25.28 ± 1.56	$4.54 \pm 3.33 \times 10^{8}$
ชุดทดลองตะกั่ว	35.64 ± 9.28	10.20 ± 3.02	23.33 ± 4.48	$3.00 \pm 2.73 \times 10^{8}$
ชุดควบคุมสภาวะปกติ pH 7.8	40.75 ± 4.23	8.01 ± 0.92	30.88 ± 2.88	$7.21 \pm 6.98 \times 10^{8}$
ชุดควบคุมที่มีวัสดุตรึงที่ปราศจากเชื้อ	95.12 ± 0.54	87.45 ± 3.59	0	-

ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารพิษนั้นการคงอยู่ของแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษเป็นปัจจัยสำคัญ โดยการตรึงเซลล์บนผิวของวัสดุตรึงเป็นการเพิ่มอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียให้มากขึ้น เนื่องจากวัสดุตรึงช่วยปกป้องเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Shen และคณะ, 2015) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Liffourrena และ Lucchesi (2014) ได้ทดสอบการย่อยสลายไตรเมธิลเอมีน (trimethylamine) ความเข้มข้น 885 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยใช้ *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) พบว่าในชั่วโมงที่ 96 ของการทดลอง ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียอิสระ แต่พบการเจริญและการย่อยสลายไตรเมธิลเอมีนที่สูงถึง 100% ในชุดทดลองที่ใช้แบคทีเรียตรึงบนแคลเซียมอัลจิเนต

4. สรุป

ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อมทางทะเล ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้ในรูปแบบของแบคทีเรียตรึงสำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างฟองน้ำทะเลที่เก็บจากทะเลจังหวัดชลบุรีและจังหวัดชุมพร

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะต่างๆของ *Sphingobium* sp. MO2-4 พบว่า *Sphingbium* sp. MO2-4 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25% (ปริมาตร/ปริมตาร) ในสภาวะที่มีค่าย pH เท่ากับ 7 และ 9 ได้ประมาณ 50% ในเวลา 7 วัน ซึ่งมากกว่าในสภาวะที่มีค่า pH เท่ากับ 5 ที่สามารถย่อยสลายได้ประมาณ 17% ในการแปรผันความเค็มพบว่า *Sphingobium* sp. MO2-4 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบใกล้เคียงกันในทุกสภาวะที่ประมาณ 50% ในเวลา 7 วัน ผลของการเติมตะกั่วพบว่า *Sphingobium* sp. MO2-4 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบลดลงเหลือ 9% แต่ยังสามารถพบการเจริญของเชื้อได้ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจึงเลือกวิธีการตรึงเซลล์เพื่อช่วยลดผลกระทบของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อเซลล์ โดยวัสดุตรึงที่เลือกใช้ได้แก่ หินพัมมิส, โฟมโพลียูรีเทน, ไบโอบอล, และ อควาพอรัสเจล จากผลการทดลองพบว่าวัสดุตรึงที่เหมาะสมที่สุดคือ อควาพอรัสเจล ซึ่งเป็นวัสดุที่มีรูพรุนจำนวนมาก, มีความคงทน, เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม, และเป็นวัสดุชนิดใหม่ โดยพบว่าสภาวะการตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 บนอควาพอรัสเจลที่เหมาะสมที่สุดคือ ใช้อควาพอรัสเจลปริมาณ 1.5 กรัม และเวลาในการตรึง 4 วัน โดยสามารถตรึงเซลล์ได้ประมาณ 6×10^7 CFU/กรัมอควาพอรัสเจล จากหัวเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร เมื่อนำแบคทีเรียตรึงไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยเลือกสภาวะที่มีค่า pH เท่ากับ 5 และสภาวะที่มีตะกั่ว ผลการทดลอง

พบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีกว่าเซลล์อิสระในสภาวะเดียวกัน และยังมีอัตราการอยู่รอดที่สูงกว่าเซลล์อิสระอีกด้วย

5. ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยทั้งหมดพบว่าแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ MO2-4 สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม และองค์ประกอบต่างๆได้หลากหลายชนิด รวมทั้งยังสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะต่างๆได้หลายสภาวะ นอกจากนี้แบคทีเรียตรึง *Sphingobium* sp. MO2-4 ยังสามารถกำจัดน้ำมันดิบในสภาวะที่ไม่เหมาะสมแก่การเจริญของเซลล์อิสระได้อีกด้วย ทั้งนี้การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของสายพันธุ์ MO2-4 ก็มีความน่าสนใจ ซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้แบคทีเรียผสม โดยแบคทีเรียที่นำมาผสมนั้นจำเป็นต้องเป็นแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม รวมถึงไม่ยับยั้งการเจริญของกันและกัน หรือสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันได้ รวมทั้งยังสามารถพัฒนาต่อยอดแบคทีเรียผสมเป็นแบคทีเรียตรึง และศึกษาคุณสมบัติต่างๆของแบคทีเรียตรึง อาทิ การใช้ซ้ำและการทดลองแบบต่อเนื่อง

6. ผลผลิต

1. งานวิจัยปีที่ 3 ได้ข้อมูลผลของปัจจัยทางกายภาพต่างๆที่มีผลกระทบต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Sphingobium* sp. MO2-4

2. งานวิจัยปีที่ 3 ได้ข้อมูลสภาวะและวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. MO2-4 ในรูปแบบของแบคทีเรียตรึงพร้อมใช้
3. งานวิจัยปีที่ 3 พิสูจน์ว่าการตรึงแบคทีเรียช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. MO2-4 ในระบบ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบในสภาวะที่ไม่เหมาะสม

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

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

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

ภาษาอังกฤษ

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

AL-Saleh, E.S. and Obuekwe, C. 2005. Inhibition of hydrocarbon bioremediation by lead in a crude oil-contaminated soil. Int Biodeterior Biodegradation. 56: 1-7.

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.

Bayat, Z., Hassanshahian, M., and Cappella, S. (2015). Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: A Mini Review. The Open Microbiol J, 9, 48-54.

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.

Dzionek, A., Wojcieszynska, D., and Guzik, U. 2016. Natural carriers in bioremediation: A review. EJB, 23, 28-36.

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.

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.

Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M., and Rodriguez, M. S. 2006. Bioremediaiton 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.

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

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.

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.

Liffourrena, A.S. and Lucchesi, G.I. 2014. Degradation of trimethylamine by immobilized cells of *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633). Int Biodeterior Biodegradation. 90: 88-92.

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.

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 intrincate transcriptional network. Biometals. 24: 1133-1151.

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.

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.

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

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.

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.

Shen, T., Pi, Y., Bao, M., Xu, N., Li., Y., and Lu, J. (2015). Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. Environ Sci Process Impacts, 17, 2022-2033.

Sipila, T. P., Väisänen, P., Paulin, L., and Yrjäla, 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.

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

Urani, C., Melchioretto, 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.

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

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.

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

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

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

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

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้นหรือแบคโตอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Natural sea water (NSW)

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

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบของน้ำมันดิบ

Arab Extra Light (AXL)

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

Arab Light (ARL)

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