ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของราทะเลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

Ability of Marine Fungi in Biodegradation of Gasoline Under Aerobic Condition

ภิรยาพร เปรมประเสริฐ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ อภิรดี ปิลันธนภาคย์*

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

Pirayaporn Premprasert, Subantiht Nimrat and Apiradee Pilantanapak*

Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

บทคัดย่อ

การศึกษาความสามารถของราทะเล 6 ชนิด ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ในห้องปฏิบัติการ พบว่าการเติมน้ำมันเบนซินความเข้มข้นสุดท้าย 5% ลงในอาหาร minimal salt ทำให้ราทุกชนิดตายเร็วขึ้น ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน โดย *Corollospora pulchella* และ *Cirrenalia tropicalis* สามารถรอดชีวิตได้นานที่สุด การเติมน้ำมันเบนซินความเข้มข้นสุดท้าย 1% - 5% ลงในอาหาร มีผลยับยั้งการเจริญของราทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นน้ำมันเบนซิน 3% และ 5% พบว่า *C. pulchella* และ *C. tropicalis* เจริญได้ถึงสัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 3 ตามลำดับ *Corollospora pulchella*, *C. tropicalis* และ *Alternaria* sp. สามารถทำให้น้ำมันแตกตัวและรวมตัวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น แต่มีเฉพาะ *C. pulchella* และ *Alternaria* sp. เท่านั้นที่สามารถลดปริมาณน้ำมันในหลอดความเข้มข้น 5% ในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง

คำสำคัญ : ราทะเล การย่อยสลายน้ำมันเบนซิน การทนน้ำมันเบนซิน

Abstract

Ability of 6 marine fungi in biodegradation of gasoline under aerobic conditions was investigated in laboratory. Addition of gasoline into minimal salt medium at 5% final concentration decreased viable time of fungi at different rate. *Corollospora pulchella* and *Cirrenalia tropicalis* were found viable at the longest period. Addition of 1% -5% gasoline were found to inhibit all fungal growth. At 3% and 5% gasoline concentration, growth of *C. pulchella* and *C. tropicalis* were detected only until the second week and the third week of experiment, respectively. *Collorospora pulchella*, *C. tropicalis* and *Alternaria* sp. could degrade gasoline into small droplet, suspended in medium, and also caused turbidity of medium. However, decrease in gasoline in medium was detected only with *C. pulchella* and *Alternaria* sp. in the sixth week of experiment.

Keywords : Marine fungi, gasoline degradation, gasoline tolerant

*** Corresponding author.** E-mail: apiradee@buu.ac.th

บทนำ

ความต้องการของโลกปัจจุบันในการใช้เชื้อเพลิงในแต่ละปีได้ทวีขึ้นอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะอย่างยิ่งปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเมื่อเกิดการปนเปื้อนจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมอย่างมาก ตัวอย่างการปนเปื้อนที่พบได้แก่ การรั่วไหลของน้ำมัน จากอุบัติเหตุเรือบรรทุกน้ำมันชนกัน ไฟไหม้ คราบน้ำมันจากเรือเกยตื้น และการขุดเจาะสำรวจน้ำมันบนไหล่ทวีป เป็นต้น สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ จึงได้จัดให้ของเสียจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และน้ำมันหล่อลื่น กากสารพิษอินทรีย์เหลว ของเสียประเภทของเหลวจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี และจากอุตสาหกรรมอินทรีย์เคมีเป็นของเสียที่เป็นอันตราย (ปราณี พันธุมสินชัย, 2539)

จากอดีตถึงปัจจุบันมีการนำวิธีการต่างๆ มาใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น การใช้สารเคมี การตีน้ำให้อากาศ การใช้น้ำดีไล่น้ำเสีย และมีการพัฒนานำวิธีทางชีวภาพมาใช้ ได้แก่ การใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายตามธรรมชาติ เนื่องจากพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย รา ยีสต์ และสาหร่ายมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้ โดยวิธีการเร่งขบวนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (bioremediation) ซึ่งจะทำให้ขบวนการกำจัดสารเหล่านี้เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพและถูกนำมาใช้มากขึ้น ตัวอย่างวิธีการใช้ เช่น การเพิ่มธาตุอาหาร การใส่จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูง ลงในบริเวณปนเปื้อน หรือการใช้สารซึ่งมีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม เหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการย่อยสลาย (Juhasz & Naidu, 2000)

ราทะเลชั้นสูงมีความสำคัญและมีบทบาทต่อระบบนิเวศสิ่งแวดล้อมทางทะเล เนื่องจากเป็นผู้ย่อยสลายสับสเตรทต่างๆ และสามารถตรวจพบได้จากหลายๆ แหล่ง เช่น บนสาหร่าย ไม้ ป่าชายเลน หญ้าทะเล สัตว์ ใบไม้ของพืชที่อยู่บนบก ตะกอน โคลน ดิน และทราย (Moss, 1986) อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาเกี่ยวกับราทะเลชั้นสูงกันน้อยมาก โดยเริ่มมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นในระยะหลังเนื่องจากมีรายงานว่าราทะเลชั้นสูงหลายชนิด สามารถสร้างสารก่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ ปัจจุบันมีการสำรวจพบราทะเลสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทั้งทางด้านการแพทย์ ด้านเกษตรกรรม ด้านอุตสาหกรรม ด้านอาหารและยา รวมถึงมีรายงานการพบราทะเลชั้นสูง ที่แยกได้จากบริเวณน้ำขึ้นน้ำลงสามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ (Pritchard & Costa, 1991; Kirk & Gordon, 1988) Kirk and Gordon (1988) ได้ทำการทดลองโดยนำราทะเล 54 ชนิด ไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอน พบว่าราที่มีแหล่งอาศัยบนเม็ดทราย (arenicolous) 14 ชนิด จาก 18 ชนิด และราที่มีแหล่งอาศัยบนไม้ (lignicolous) 3 ชนิด จาก 27 ชนิด สามารถเจริญบนอาหารที่ผสม hexadecane 1-hexadecane pristine หรือ tetradecane นอกจากนี้ มีรายงานพบ *Corollospora pulchella* สายพันธุ์ 039 สามารถเจริญบนอาหารที่ผสม hexadecane (Baisden & Cooney, 1996) และ Krik and Gordon (1988) พบรา arenicolous และ lignicolous ได้แก่ *Corollospora, Dendryphiella, Lulworthia* และ *Varicosporina* สามารถใช้ alkanes และ alkenes เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ อีกทั้งยังสามารถย่อยสลาย *n* [1-^{14}C] hexadecane อย่างสมบูรณ์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบความเป็นไปได้ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของรา arenicolous และ lignicolous จำนวน 6 ชนิด เพื่อประโยชน์ในการนำราทะเลมาประยุกต์ใช้ ในการลดปัญหาการปนเปื้อนคราบน้ำมันบริเวณทะเลและชายฝั่งทะเลต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างรา

ตัวอย่างราที่นำมาศึกษาเป็นรา arenicolous และ lignicolous ที่ทำการเก็บรักษาไว้ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จำนวน 6 ชนิด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ราทะเลที่นำมาใช้ในการทดลอง

ราทะเล	แหล่งอาศัย
Torpedospora radiata	lignicolous
Corollospora pulchella	arenicolous
Corollospora gracilis	arenicolous
Alternaria sp.	lignicolous
Cirrenalia tropicalis	lignicolous
Aniptodera nypae	lignicolous

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- potato dextrose agar/broth (PDA/PDB)
- mineral salt broth (MSB)
- ampicillin
- น้ำมันเบนซิน ออกเทน 91
- คลอโรฟอร์ม

วิธีการทดลอง

1. การทดสอบการรอดชีวิตของราในน้ำมันเบนซิน

(ดัดแปลงจาก April, *et al*., 2000)

นำราที่ทำการเก็บรักษาไว้ มาทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของรา โดยตัดชิ้นอาหารที่มีเส้นใยราที่เจริญดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในอาหาร MSB 50 มิลลิลิตร ที่ผสม ampicillin 250 มิลลิกรัมต่อลิตร (Muller & Petrini, 1987) บ่มเขย่า 100 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นเติมน้ำมันเบนซินที่ปลอดเชื้อ ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5% ปิดฝาให้สนิทด้วยจุกยางและพันทับด้วยพาราฟิล์มเพื่อลดการระเหยของไอน้ำมันเบนซิน (เป็นชุดทดลอง ทำ 3 ซ้ำ) บ่มต่ออีกเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (negative control) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MSB ที่ใส่ราแต่ไม่ผสมน้ำมันเบนซิน ดูการรอดชีวิตทุกๆ สัปดาห์ โดยนำไปเลี้ยงต่อบนอาหาร PDA ปกติ

2. การตรวจสอบการย่อยสลายน้ำมันเบนซินขั้นต้น

(ดัดแปลงจาก April, *et al*., 2000)

นำรา ที่ทำการเก็บรักษาไว้ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อราเจริญดีแล้ว ทำ preculture โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB 150 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เขย่าเป็นระยะๆ ทุก 2 วัน และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSB ที่ผสม ampicillin 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 18 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองขนาด 30 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต suspension ของ preculture 2 มิลลิลิตร ลงใน MSB ที่เตรียมไว้ บ่มเขย่า 100 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงเติมน้ำมันเบนซินที่ปลอดเชื้อให้มี ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1%, 2%, 3% และ 5% ตามลำดับ เพื่อให้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงแหล่งเดียว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ปิดฝาให้สนิทด้วยพาราฟิล์มเพื่อลดการระเหยของไอน้ำมันเบนซิน บ่มต่ออีกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เขย่าเป็นระยะๆ ทุก 2 วัน โดยมีชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MSB ที่ผสมน้ำมันเบนซินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1%, 2%, 3% และ 5% เช่นเดียวกัน (uninoculated control) และชุดควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSB ที่เติม preculture ราแต่ไม่ผสมน้ำมันเบนซิน (negative control) สังเกตการเจริญของเส้นใย สีของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมถึงการเปลี่ยนแปลงของน้ำมันเบนซินด้วยตาเปล่าทุกๆ สัปดาห์

3. การหาน้ำหนักแห้งของราหลังการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน 6 สัปดาห์

(ดัดแปลงจาก April, *et al*., 2000; Margesin & Schinner, 2001)

แยกน้ำมันเบนซินที่เหลือออกจากอาหารและรา โดยเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วใช้ pasture pipette ดูดชั้นของสารละลายคลอโรฟอร์มที่ก้นหลอดออก ทำซ้ำจนกว่าชั้นของสารละลายคลอโรฟอร์มจะใส ไม่มีสีแดง จากนั้นกรองเส้นใยด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ล้างเส้นใยด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85% 3 ครั้ง แล้วทำให้แห้งโดยการอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา

ผลการทดลอง

1. การรอดชีวิตของราในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSB ที่ผสมน้ำมันเบนซินเมื่อเวลาต่างๆ กัน

จากการศึกษาการรอดชีวิตของราทั้ง 6 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSB ที่ผสมน้ำมันเบนซินความเข้มข้นสุดท้าย 5% เมื่อเวลาต่างๆ โดยดูการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบการรอดชีวิตของ *Torpedospora radiata*, *Corollospora pulchella* และ *Cirrenalia tropicalis* โดย *C. pulchella* รอดชีวิตได้นานที่สุดจนถึงสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง และยังสามารถสังเกตเห็นคราบน้ำมันเบนซินอยู่ในขวดทดสอบ ลักษณะการเจริญของ *C. pulchella* บน PDA หลังจากที่ผ่านการเลี้ยงในขวดทดสอบที่ผสมน้ำมันเบนซิน 5% เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แสดงดังภาพที่ 1 ราที่เจริญนาน รองลงมา คือ *C. tropicalis* รอดชีวิตได้ถึงสัปดาห์ที่ 2 และ *T. radiata* สามารถรอดชีวิตในสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลอง ส่วน *Corollospora gracilis*, *Aniptodera nypae* และ *Alternaria* sp. ไม่พบการเจริญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การรอดชีวิตของราเมื่อเวลาต่าง ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ราทะเล	การเจริญเติบโตของราที่ตรวจพบ [1]									
	สัปดาห์ 1		สัปดาห์ 2		สัปดาห์ 3		สัปดาห์ 4		สัปดาห์ 5	
	ควบคุม	ทดลอง	ควบคุม	ทดลอง	ควบคุม	ทดลอง	ควบคุม	ทดลอง	ควบคุม	ทดลอง
Torpedospora radiata	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Corollospora pulchella	++	++	+	+	+	+	+	-	ND	ND
Corollospora gracilis	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Alternaria sp.	++	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cirrenalia tropicalis	+	+	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND
Aniptodera nypae	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

[1] การเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นโคโลนี (++) มีการเจริญอย่างรวดเร็ว, (+) มีการเจริญ, (-) ไม่พบการเจริญ และ (ND) ไม่ได้ทำการทดสอบ

2. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในชุดควบคุมภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

จากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อ MSB ที่เติมน้ำมันเบนซินปลอดเชื้อ มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1%, 2%, 3% และ 5% ไปบ่มภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีการลดลงของปริมาณน้ำมันเมื่อเวลาผ่านไป คือ ที่ความเข้มข้นน้ำมัน 1% น้ำมันหายไปตั้งแต่สัปดาห์แรก ที่ความเข้มข้นน้ำมัน 2% น้ำมันเริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์แรก และเห็นเป็นคราบน้ำมันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึง 4 ก่อนจะหมดไปในสัปดาห์ต่อมา ที่ความเข้มข้นน้ำมัน 3 % น้ำมันเริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์แรก เห็นเป็นคราบน้ำมันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 ถึง 6 และที่ความเข้มข้นน้ำมัน 5% น้ำมันเริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์แรก แต่ยังคงเห็นชั้นน้ำมันได้ถึงสัปดาห์ที่ 6 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเบนซินในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมที่ระยะเวลาต่างๆ

ความเข้มข้นของน้ำมันเบนซิน	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันเบนซินที่ระยะเวลาต่างๆ[1]						
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 1	สัปดาห์ 2	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 4	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6
	0	1	2	3	4	5	6
0%	0	0	0	0	0	0	0
1%	1+	0	0	0	0	0	0
2%	2+	1+	1+	1+	1+	0	0
3%	3+	2+	2+	1+	1+	1+	1+
5%	5+	4+	3+	3+	3+	3+	3+

[1] ลักษณะทางกายภาพของน้ำมัน : สามารถจัดลำดับการเปลี่ยนแปลงของคราบน้ำมันจากปริมาณคราบน้ำมันเริ่มต้นที่มากที่สุด (5+) และลดลงไปจนถึงหลอดทดสอบที่ปราศจากคราบน้ำมัน (0)

5+ หมายถึง ลักษณะชั้นสีแดงของน้ำมันเบนซิน ไม่รวมตัวกับน้ำลอยอยู่เหนือน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน
4+ หมายถึง ลักษณะชั้นของน้ำมันเบนซินลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน
3+ หมายถึง ลักษณะชั้นของน้ำมันเบนซินลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบางๆ ที่ผิวหน้าอาหาร
2+ หมายถึง น้ำมันเบนซินลดลงมากอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิล์มสีแดงของน้ำมันบางๆ ที่ผิวหน้าอาหาร
1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงคราบสีแดงจางๆ บริเวณขอบหลอดทดสอบ ลักษณะทั่วไปแทบจะไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ใส่น้ำมันเบนซินมากนัก
0 หมายถึง ไม่พบน้ำมันเบนซิน

3. การศึกษาลักษณะการเจริญของราและความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน

เมื่อนำราทั้ง 6 ชนิด เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSB เป็นเวลา 7 วัน ก่อนเติมน้ำมันเบนซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1%, 2%, 3% และ 5% และสังเกตการเจริญของเส้นใยรารวมทั้งลักษณะทางกายภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำมันเบนซินเมื่อเวลาต่างๆ กัน ด้วยตาเปล่า (ตารางที่ 4) พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันเบนซินมีผลต่อการเจริญของรา

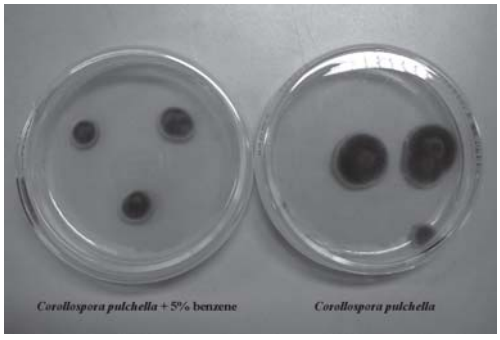
ตารางที่ 4 การเจริญของราและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ของน้ำมันเบนซินภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

ราทะเล/ความเข้มข้นของน้ำมันเบนซิน		ลักษณะการเจริญของรา[1] / การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมัน[2]						
		สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 1	สัปดาห์ 2	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 4	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6
Torpedospora radiata	0%	+/0	++/0	++/0	±/0	–/0	–/0	–/0
	1%	+/1+	+/0	±/0	±/0	–/0	–/0	–/0
	2%	+/2+	+/1+	–/1+	–/1+	–/0	–/0	–/0
	3%	+/3+	–/2+	–/2+	–/2+	–/2+	–/1+	–/1+
	5%	+/5+	–/4+	–/3+	–/3+	–/3+	–/3+	–/3+
Corollospora pulchella	0%	+/0	++/0	++/0	±/0	–/0	–/0	–/0
	1%	+/1+	+/0	±/0	–/0	–/0	–/0	–/0
	2%	+/2+	+/1+	±/1+	–/0	–/0	–*/0	–*/0
	3%	+/3+	+/2+	+/2+	–/2+	–*/1+	–*/1+	–*/1+
	5%	+/5+	+/4+	+/3+	–/3+	–*/2+	–*/2+	–*/2+
Corollospora gracilis	0%	+/0	++/0	±/0	–/0	–/0	–/0	–/0
	1%	+/1	±/0	–/0	–/0	–/0	–/0	–/0
	2%	+/2+	±1+	–/1+	–/1+	–/0	–/0	–/0
	3%	+/3+	±/2+	–/2+	–/2+	–/2+	–/1+	–/1+
	5%	+/5+	–/4+	–/3+	–/3+	–/3+	–/3+	–/3+
Alternalia sp.	0%	+/0	++/0	++/0	±/0	±/0	±/0	±/0
	1%	+/1+	+/0	±/0	±/0	±/0	±/0	±/0
	2%	+/2+	+/1+	±/0	±/0	–*/0	–*/0	–*/0
	3%	+/3+	–/2+	–/2+	–*/2+	–*/1+	–*/1+	–*/1+
	5%	+/5+	–/4+	–/3+	–*/3+	–*/3+	–*/2+	–*/2+
Cirrenilia tropicalis	0%	+/0	++/0	±/0	±/0	±/0	±/0	±/0
	1%	+/1+	++/0	++/0	±/0	±/0	–/0	–/0
	2%	+/2+	±/1+	±/1+	–/1+	–/0	–*/0	–*/0
	3%	+/3+	±/2+	±/2+	±/2+	–*/2+	–*/2+	–*/2+
	5%	+/5+	±/4+	±/3+	±/3+	–*/3+	–*/3+	–*/3+
Aniptodera nypae	0%	+/0	++/0	++/0	±/0	±/0	±/0	±/0
	1%	+/1+	±/0	–/0	–/0	–/0	–/0	–/0
	2%	+/2+	±/1+	–/1+	–/1+	–/1+	–/0	–/0
	3%	+/3+	±/2+	–/2+	–/2+	–/2+	–/2+	–/2+
	5%	+/5+	±/4+	±/3+	–/3+	–/3+	–/3+	–/3+

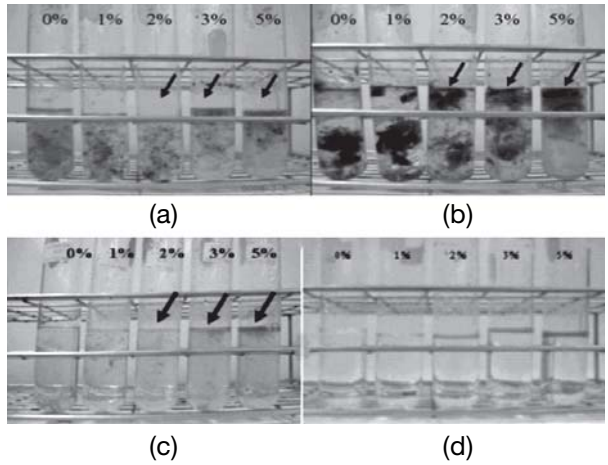
[1] ปริมาณราที่พบในหลอดทดลอง: ปริมาณราเริ่มต้น (+), ปริมาณราเจริญเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น (++), ไม่สามารถบอกได้ว่าปริมาณราเปลี่ยนแปลงหรือไม่ (±) และตกตะกอนหรือไม่พบการเจริญ (–) บางครั้งมีลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (*) ร่วมด้วย

[2] ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันในขวดชุดทดสอบการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน สามารถจัดลำดับการเปลี่ยนแปลงของคราบน้ำมัน จากปริมาณคราบน้ำมันเริ่มต้นที่มากที่สุด (5+) และลดลงไปจนถึงหลอดทดสอบที่ปราศจากคราบน้ำมัน (0) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมน้ำมันเบนซินลงไป

5+ หมายถึง ลักษณะชั้นสีแดงของน้ำมันเบนซินไม่รวมตัวกับน้ำลอยอยู่เหนือน้ำ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน
4+ หมายถึง ลักษณะชั้นของน้ำมันเบนซินลดลงเล็กน้อยแต่ยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน
3+ หมายถึง ลักษณะชั้นของน้ำมันเบนซินลดลงอย่างมาก เหลือเป็นชั้นบางๆ ที่ผิวหน้าอาหาร
2+ หมายถึง น้ำมันเบนซินลดลงมากอย่างเห็นได้ชัด เหลือเป็นคราบฟิลม์สีแดงของน้ำมันบางๆ ที่ผิวหน้าอาหาร
1+ หมายถึง สังเกตพบเพียงคราบสีแดงจางๆ บริเวณขอบหลองทดสอบ ลักษณะทั่วไปแทบจะไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ใส่น้ำมันเบนซินมากนัก
0 หมายถึง ไม่พบน้ำมันเบนซิน



ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญของ *Corollospora pulchella* ที่เลี้ยงในขวดทดสอบที่ผสมน้ำมันเบนซิน 5% หลังจากเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ (ซ้าย) เทียบกับ *Corollospora pulchella* ที่เลี้ยงในสภาวะปกติ (ขวา)



ภาพที่ 2 ลักษณะการเจริญของ *Corollospora pulchella (a), Alternaria* sp. *(b) และ Cirrenalia tropicalis (c)* ในอาหารที่เติมน้ำมันเบนซิน 1% ถึง 5% และไม่เติมน้ำมันเบนซินเปรียบเทียบกับชุด *uninoculated control (d)* ภายใต้สภาวะระบบปิดที่มีออกซิเจน (ลูกศรแสดงตำแหน่งของอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่น)

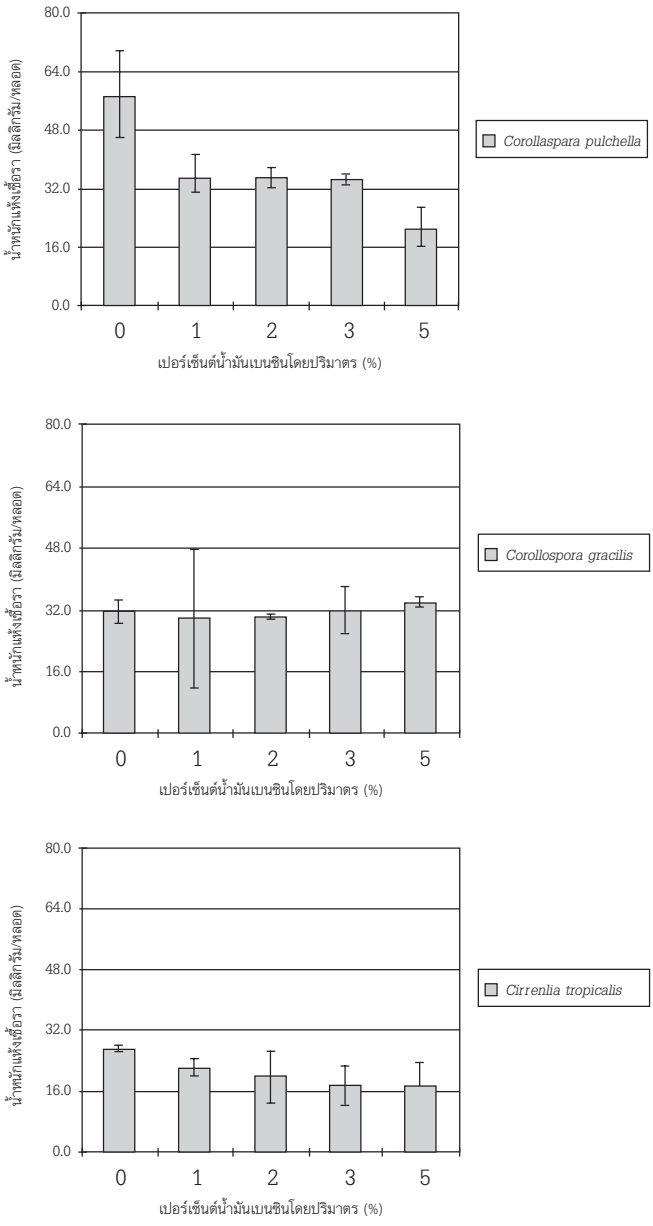
คือ เส้นใยของราส่วนใหญ่จะมีสีคล้ำขึ้น และตกตะกอนลงสู่ก้นหลอดเร็วกว่าเส้นใยในหลอดที่ไม่เติมน้ำมันยกเว้น *Cirenalia. tropicalis* ที่พบว่ายังสามารถเจริญได้ระยะสั้นๆ ที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมัน 1% โดยไม่ตกตะกอน ความเข้มข้นของน้ำมันที่สูงขึ้น ส่งผลให้ราหยุดเจริญเร็วขึ้นในอัตราที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของรา *C. tropicalis* และ *Corollospora pulchella* เป็นราที่ทนต่อน้ำมันได้ดีที่สุด ในน้ำมันเบนซิน 3% และ 5% *C. tropicalis* หยุดเจริญในสัปดาห์ที่ 4 ขณะที่ *C. pulchella* เจริญได้ดีกว่า แต่หยุดเจริญในสัปดาห์ที่ 3 นอกจากนี้ยังพบว่า หลังจากเชื้อ *C. tropicalis* และ *C. pulchella* หยุดเจริญอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดที่มีน้ำมันความเข้มข้นสุดท้าย2%, 3% และ 5% ขุ่น และพบลักษณะการแตกตัวของน้ำมันรวมกับอาหาร ลักษณะดังกล่าว ยังพบได้กับการเลี้ยง *Alternaria* sp. ในอาหาร และในสภาวะเดียวกัน

4. ผลของปริมาณน้ำมันเบนซินต่อน้ำหนักแห้งของรา

หลังจากสิ้นสุดการทดสอบการย่อยน้ำมันเบนซิน ทำการนำเส้นใยมาชั่งหาน้ำหนักแห้งเฉลี่ย พบว่าน้ำมันมีผลยับยั้งการเจริญของรา โดยค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งต่อหลอดของราส่วนใหญ่มีค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยต่ำกว่าชุดควบคุม และมีแนวโน้มลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันสูงขึ้น (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้) ยกเว้น *Corollospora gracilis* ซึ่งมีน้ำหนักแห้งคงที่ (ภาพที่ 3)

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของ *Corollospora pulchella* ที่ความเข้มข้นน้ำมัน 1%, 2% และ 3% มีน้ำหนักแห้งต่อหลอดใกล้เคียงกัน คือ 35.9, 35.0 และ 34.5 มิลลิกรัม ตามลำดับซึ่งต่ำกว่าหลอดควบคุมที่มีค่าน้ำหนักแห้งต่อหลอดเท่ากับ 57.7 มิลลิกรัม ส่วนที่ความเข้มข้นน้ำมัน 5% *C. pulchella* มีค่าน้ำหนักแห้งต่อหลอดลดลงเท่ากับ 21.2 มิลลิกรัม

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งต่อหลอดของ *Cirrenalia tropicalis* ลดลงช้าๆ ที่ความเข้มข้นน้ำมัน 1%, 2%, 3% และ 5% มีค่าน้ำหนักแห้งต่อหลอดเท่ากับ 22.3, 19.5, 17.4 และ 17.2 มิลลิกรัม ตามลำดับ ขณะที่หลอดควบคุม มีค่าเฉลี่ย 27.2 มิลลิกรัม



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งใน 3 ลักษณะของราทะเลหลังสิ้นสุดการทดลองการย่อยน้ำมันเบนซิน

อภิปรายผลการทดลอง

น้ำมันเบนซินมีผลยับยั้งการเจริญของราทะเลที่ทดสอบทุกชนิด แม้ว่าราบางชนิดสามารถย่อยสลายน้ำมันให้แตกตัวได้ แต่ไม่สามารถนำเมตาโบไลท์ไปใช้เพื่อการเจริญ เนื่องจากไม่พบการเจริญหลังจากระยะเวลาที่คาดว่า yeast extract ปริมาณน้อยซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งเดียวที่เติมลงในอาหารหมดลง ลักษณะการเจริญของราแต่ละชนิดในน้ำมันต่างกัน โดย *Corollospora pulchella* สามารถทนความเป็นพิษน้ำมันเบนซินได้และทนได้นานที่สุด โดยในน้ำมันเบนซินความเข้มข้น 3% และ 5% หยุดการเจริญในสัปดาห์ที่ 3 สั้นกว่าราในหลอดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันเพียง 1 สัปดาห์ ราที่ทนน้ำมันเบนซินได้ดีรองลงมาคือ *Cirrenalia tropicalis* ส่วน *Corollospora gracilis*, *Aniptodera nypae* และ *Alternaria* sp. ไม่พบการเจริญตั้งแต่สัปดาห์แรก คล้ายคลึงกับรายงานของ April และคณะ (1999) ที่พบว่า *Alternalia alternata* ไม่สามารถใช้น้ำมันดิบ (crude oil) เพื่อการเจริญได้ ความเป็นพิษของน้ำมันอาจเกิดได้จากไอระเหยของน้ำมันเบนซินเอง หรือเกิดจากสารเมตาโบไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน มีรายงานว่าไอระเหยของน้ำมันเบนซินสามารถยับยั้งการเจริญ โดยทำลายส่วน plasma membrane และความเข้มข้นภายในเซลล์ของราและยีสต์ (Ahearn, *et al.*, 1971; Gill & Ratledge, 1972)

จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันและอาหารในหลอดทดสอบ *C. pulchella*, *C. tropicalis* และ *Alternaria* sp. พบว่าน้ำมันเบนซินที่เติมลงไปนั้น มีการเปลี่ยนแปลงคือน้ำมันแตกตัวเล็กน้อยรวมตัวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่นพร้อมกับการหยุดเจริญของเชื้อ ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าเกิดจากสาเหตุใด เช่น รา มีการดูดซับเมตาโบไลท์ที่อาจมีบ้างหรือไม่ก่อนที่จะหยุดเจริญ หรือตายไป เนื่องจากพบว่า *C. pulchella* ในน้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1%, 2% และ 3% ยังรอดชีวิตอยู่อย่างน้อย ระยะหนึ่งหลังเติมน้ำมัน มีรายงานว่า *C. pulchella* สามารถที่จะย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนบางชนิด เช่น hexadecane, *n*-alkylbenzenes และ *n*-alkylcyclohexanes ที่สามารถพบในน้ำมันเชื้อเพลิงใสประเภทน้ำมันเบนซินและดีเซลได้ (Smith & Workman, 2004; Dutta & Harayama, 2001) แต่ไม่สามารถทนความเป็นพิษของสารชนิดอื่นๆ ที่ผสมอยู่ในน้ำมันเบนซินได้จึงทำให้ราตายก่อนที่จะมีการย่อยสลายสารดังกล่าว

การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเมื่อสิ้นสุดการทดลองสามารถบอกได้ว่า *C. gracilis* ตายจากพิษของน้ำมันเบนซิน ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำๆ ซึ่งเมื่อราตาย ค่าน้ำหนักแห้งของรา (dead biomass) จะคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง มากนัก ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ของแบคทีเรีย (Yan & Viraraghavan, 2000) ขณะที่ *C. pulchella* และ *C. tropicalis* ในน้ำมันเบนซินความเข้มข้น 1%, 2% และ 3% ยังรอดชีวิต การรอดชีวิตของ *C. pulchella* และ *C. tropicalis* สอดคล้องกับความสามารถในการทนความเป็นพิษของน้ำมันเบนซิน

การที่ราส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษา ไม่สามารถย่อยสลายน้ำมันเบนซินได้ดี อาจเนื่องจากในน้ำมันเบนซินนั้นประกอบไปด้วยสารเคมีและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั้ง aliphatic และ aromatic มากกว่า 200 ชนิด (Solano-Serena, *et al.*, 1998) รวมถึงสารไฮโดรคาร์บอนประเภท olefins เช่น alkynes ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีความเป็นพิษและย่อยสลายได้ยาก ดังที่ Atlas (1984) รายงานว่า มีจุลินทรีย์เพียงบางชนิดเท่านั้นที่สามารถจะย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน C_1-C_4 alkanes, C_5-C_9 alkanes เนื่องจากมีมวลโมเลกุลต่ำและละลายน้ำได้ดีจึงสามารถเข้าสู่เซลล์ราได้โดยตรง นอกจากนี้มีรายงานว่าพบราทะเลเพียง 29 เปอร์เซ็นต์ จาก 224 ชนิด ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนพวก *n*-alkane ในน้ำมันดิบ (Fedorak *et al.,* 1984) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า อย่างน้อยมีรา 1 ชนิด ที่สามารถย่อยน้ำมันเบนซินและทนต่อความเป็นพิษได้ระยะหนึ่ง ซึ่งอาจจะนำมาพัฒนา หรือประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินหรือสารองค์ประกอบน้ำมันเบนซินในสิ่งแวดล้อมได้

สรุปผลการทดลอง

น้ำมันเบนซินมีผลยับยั้ง การเจริญของราทะเลที่ทดสอบทุกชนิด แต่มีราบางชนิดสามารถย่อยสลายน้ำมันให้แตกตัวได้ ลักษณะการเจริญของราแต่ละชนิดในน้ำมันต่างกัน โดย *Corollospora pulchella* สามารถทนความเป็นพิษน้ำมันเบนซินได้และทนได้นานที่สุด ในน้ำมันเบนซินความเข้มข้น 3% และ 5% *C. pulchella* ตรวจพบการเจริญได้ถึงสัปดาห์ที่ 2 ราที่ทนน้ำมันเบนซินได้ดีรองลงมาคือ *Cirrenalia tropicalis* ซึ่งตรวจพบการเจริญได้ถึงสัปดาห์ที่ 3 *Corollospora pulchella*, *C. tropicalis* และ *Alternaria* sp. สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวภาพของเส้นใย รวมถึงลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเบนซิน และอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ สามารถทำให้น้ำมันแตกตัวเล็กน้อย ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น อย่างไรก็ตามเฉพาะหลอดที่เลี้ยง *C. pulchella* และ *Alternaria* sp. เท่านั้นที่พบว่ามีการลดลงของปริมาณน้ำมันในหลอดความเข้มข้น 5% ในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

ปราณี พันธุมสินชัย. 2539. *มลพิษอุตสาหกรรมเบื้องต้น.* กรุงเทพฯ: เรือนแก้วการพิมพ์.

Ahearn, D.G., Meyers, S.P., and Standard, P.G. 1971. The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. *Developmental Industry of Microbiology*, 12, 126-134.

April, T.M., Foght J.M., and Currah, R.S. 2000. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 38-49.

Atlas, R.M. 1984. *Petroleum Microbiology,* New York: Macmillan Publishing.

Baisden, C.M., and Cooney, J. J. 1996. Screen marine fungi for plasmids and characterization of a linear mitochondrial plasmid in a *Lulworthia* sp. *Mycologia*, 88, 350-357.

Dutta, T.K., and Harayama, S. 2001. Biodegradation of *n*-alkycycloalkanes and *n*-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. strain MBIC 4326. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1970-1974.

Fedorak, P.M., Semple, K.M., and Westlake, D.W. 1984. Oil-degrading capabilities of yeast and fungi from coastal marine environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 30, 565-571.

Gill, C.O., and Ratledge, C. 1972. Effect of n-alkanes on the transport of glucose in *Candida* sp. Strain 107. *Biochemical Journal,* 127, 59-60.

Juhasz, A.L., and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 45, 57-88.

Kirk, P.W., and Gordon, A.S. 1988. Hydrocarbon degradation by filamentous marine higher fungi. *Mycologia*, 80, 776-782.

Margesin, R., and Schinner, F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contamnated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3127-3133.

Moss, S.T. 1986. *The biology of marine fungi*. Cambridge: Cambridge University Press.

Muller, E., and Petrini, O. 1987. Taxonomy and anamorphs of the *Harpotri chiellaceae* with notes on generic synonymy. *British Mycological Society*, 88, 63-75.

Pritchard, P.H., and Costa, C.F. 1991. EPAs Alaska oil spill bioremediation project. *Environmental Science and Technology*, 25, 372-379.

Smith, J.L., and Workman, J.P. 2004 Alcohol for motor fuels. *Farm and Ranch Series*, 5, 1-3.

Solano-Serena, F., Marchal, R., Blanchet, D., and Vandecasteele, J.P. 1998. Intrinsic capacities of soil microflora for gasoline degradation. *Biodegradation*, 9, 319-326.

Yan, G., and Viraraghavan, T. 2000. Effect of pretreatment on the bioadsorption of heavy metals on *Mucor rouxii*. *Water S.A.*, 26, 119-123.