การบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลด้วยแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนผสม

Bioremediation of gasoline and diesel contaminated soil by mixed nitrogen fixing bacteria

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1*], ไตรมาศ บุญไทย[2] และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[3]
Subuntith Nimrat[1*], Traimat Boonthai[2] and Verapong Vuthiphandchai[3]
[1]*ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*
[2]*สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*
[3]*ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*
[1]*Department of Microbiology and Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University*
[2]*Biological Science Program, Faculty of Science, Burapha University*
[3]*Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University*

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้การบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลด้วยแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนผสม (*Bacillus polymyxa, Derxia* spp., *Enterobacter cloaeae* และ T6) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยมี 5 ชุดทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1: ดินที่เติมน้ำมันเบนซิน 5% และแบคทีเรียผสมทั้ง 4 ชนิด 5% ชุดการทดลองที่ 2: ดินที่เติมน้ำมันเบนซิน 5% ชุดการทดลองที่ 3: ดินที่เติมน้ำมันดีเซล 5% และแบคทีเรียผสมทั้ง 4 ชนิด 5% ชุดการทดลองที่ 4: ดินที่เติมน้ำมันดีเซล 5% และชุดการทดลองที่ 5: ดินเท่านั้น ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนสามารถเพิ่มจำนวนในดินที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล 5% และมากกว่าในดินชุดควบคุม และดินที่มีการเติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนลดความเข้มของสีน้ำมันได้รวดเร็วกว่าชุดที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียผสม ส่วนความเป็นกรด-ด่าง พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลงเมื่อมีการเติมน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล และเติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียผสมกลุ่มตรึงไนโตรเจน ในการศึกษาครั้งนี้น่าจะมีความสามารถการย่อยสลายน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล ความเข้มข้น 5% หรือน้อยกว่า และน่าจะนำมาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพในดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลต่อไป

คำสำคัญ: การย่อยสลาย น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

Abstract

In this study, biodegradation of gasoline and diesel by nitrogen fixing bacteria (*Bacillus polymyxa, Derxia* spp., *Enterobacter cloaeae* and T6) was determined under aerobic conditions. Five treatments were established which were T1 (soil added with 5% gasoline and 5% mixture of bacteria), T2 (soil added with 5% gasoline), T3 (soil added with 5% diesel and 5% mixture of bacteria), T4 (soil added with 5% diesel) and T5 (soil only). Results showed that nitrogen fixing bacteria were able to grow in soils contaminated with 5% gasoline or diesel and grew in higher amount in the controls. Moreover, the treatments with nitrogen fixing bacteria showed the faster reduetion of oil intensity than the treatments without application of these bacteria. When soil samples were inoculated with gasoline and diesel and nitrogen fixing bacteria, pH of these soils decreansed. Therefore, in this study concluded that the nitrogen fixing bacteria was able to degrade gasoline and diesel of 5% or lower concentrations, and should be applied in bioremediation of soil contaminated with gasoline and diesel oil further.

Keywords : Biodegradation, Gasoline, Diesel, Nitrogen fixing bacteria

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

บทนำ

ในโลกปัจจุบันนี้มีการใช้น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล ในชีวิตประจำวันอย่างมากมาย และเมื่อเกิดการปนเปื้อนในดินและน้ำใต้ดิน การที่สิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันทั้ง 2 ชนิดอาจจะเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การรั่วไหลของน้ำมันจากเรือบรรทุกน้ำมันที่เกิดการชนกัน ไฟไหม้ เกยตื้น จากการขนถ่ายน้ำมันจากเรือบรรทุกน้ำมันขึ้นสถานีรับฝั่ง การขุดเจาะสำรวจน้ำมันบนไหล่ทวีป การเผาถ่านหินและน้ำมันเชื้อเพลิง และจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับน้ำมันและสารเคมีต่างๆ โดยน้ำมันและสารประกอบของน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลจะมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมดังนี้ คือ การทำให้เกิดมลพิษทางดิน เมื่อน้ำมันซึมลงดินผ่านช่องว่างในชั้นดินจะทำให้ช่องว่างในชั้นดินเต็มไปด้วยน้ำมันส่งผลกระทบไปถึงการปนเปื้อนของแหล่งน้ำใต้ดินด้วย กรณีที่น้ำมันชนิดที่มีความหนืดสูงเมื่อซึมลงในดินบริเวณนั้นจะไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการเพาะปลูกได้ เนื่องจากน้ำมันจะเคลือบที่พื้นผิวของอนุภาคต่างๆ ของดินจนไม่สามารถปล่อยธาตุอาหารให้พืชได้และทำให้จุลินทรีย์ต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในดินบริเวณดังกล่าวมีการลดจำนวนลง ส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์ของดินและความสมดุลของระบบนิเวศ [1-5]

การบำบัดน้ำมันมีอยู่ 3 วิธีคือ วิธีทางกายภาพ ยกตัวอย่างเช่น การใช้ทุ่นกักน้ำมัน ต้องใช้ในบริเวณที่สามารถจำกัดขอบเขตของน้ำมันได้ ถ้าใช้ในการกำจัดคราบในทะเลจะต้องใช้ในบริเวณที่คลื่นลมสงบ หรือการใช้วัสดุดูดซับหรือจับน้ำมัน ซึ่งวัสดุจะเป็นตัวกลางจำพวกสารสังเคราะห์หรือโลหะบางชนิดคอยดูดซับหรือจับน้ำมันที่ลอยเหนือผิวน้ำแล้วถูกส่งผ่านไปรีดออกด้วยแผ่นรีดน้ำมันก่อนถูกสูบไปเก็บยังถังเก็บ การใช้เครื่องมือที่ใช้หลักการทำงานให้น้ำมันที่ลอยเหนือผิวน้ำผ่านทำนบหรือเขื่อนด้วยแรงโน้มถ่วงเข้าสู่ถังแยกน้ำมันออกจากน้ำ ก่อนที่จะถูกสูบไปเก็บยังถังเก็บน้ำมัน ใช้เครื่องมือในการดูดหรือสูบน้ำมันมีหลักการทำงานโดยใช้ปลายท่อของเครื่องให้ลอยอยู่ในตำแหน่งที่ระดับผิวน้ำ จากนั้นใช้เครื่องสูบสูบเอาคราบน้ำมันที่ผิวน้ำเข้าไปยังถังแยกน้ำมัน ซึ่งวิธีเหล่านี้สามารถกำจัดคราบน้ำมันได้เพียงจำนวนเล็กน้อยเท่านั้นและวิธีทางเคมี ได้แก่ การใช้สารเคมีในการกำจัดน้ำมัน โดยการนำสารเคมีไปฉีดในบริเวณที่มีการปนเปื้อนเพื่อให้แรงตึงผิวของน้ำมันลดลงจนน้ำมันแตกตัวและแพร่กระจายในน้ำ โดยใช้สารเคมีประเภทดิสเปอร์แซนน์ (Dispersant) การใช้สารเคมีดังกล่าวนี้จะทำให้เกิดสารเคมีตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม

อย่างไรก็ตามวิธีการบำบัดน้ำมันที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่สุด ได้แก่ วิธีทางชีวภาพ ได้แก่ การย่อยสลายโดยอาศัยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติโดยเฉพาะในบริเวณที่มีการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมักจะมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ [6-19] อย่างไรก็ตามการย่อยสลายตามธรรมชาติมักเกิดได้ค่อนข้างช้า ในปัจจุบันจึงได้มีการกระตุ้นหรือมีการเร่งเพื่อให้ขบวนการย่อยสลายเกิดได้เร็วขึ้นและมีประสิทธิภาพมากขึ้น การย่อยสลายโดยวิธีเร่งธรรมชาติกระทำได้โดยการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน [20,21] แบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อพืชเพราะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่ผลิตปุ๋ยไนโตรเจนและทำให้ดินอุดมสมบูรณ์เนื่องจากดินโดยทั่ว ๆ ไปมักจะมีไนโตรเจนไม่เพียงพอกับความต้องการของพืชเพราะไนโตรเจนส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของก๊าซไนโตรเจนซึ่งพืชไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ และไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่น แอมโมเนียมไอออนและไนเทรตจะมีอยู่ในดินในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น [22,23]

น้ำมันเบนซิน เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงที่นิยมใช้กันทั่วโลก ซึ่งเป็นน้ำมันที่ได้จากการปรุงแต่งคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการกลั่นน้ำมันโดยตรง และอาจได้จากการแยกก๊าซธรรมชาติเหลวหรือแก๊สโซลีนธรรมชาติ น้ำมันเบนซินจะมีส่วนผสมต่าง ๆ เช่น สารเบนซิน, โทลูอีน, เอทิลเบนซิน และไซลีน [24] สารเพิ่มคุณภาพเพื่อให้เหมาะกับการใช้งาน ยกตัวอย่างเช่น สารเพิ่มค่าออกเทน สารต้านการรวมตัวกับอากาศ สารเคมีสำหรับป้องกันสนิม ป้องกันการกัดกร่อนในถังน้ำมัน และท่อทางน้ำมัน รวมทั้งสารเคมีที่ช่วยทำความสะอาดคาร์บูเรเตอร์เพื่อทำให้เหมาะสมกับยานพาหนะ เช่น รถยนต์ รถจักรยานยนต์ หรือเครื่องยนต์ทั่วไป เช่น เครื่องสูบน้ำ เครื่องปั่นไฟขนาดเล็ก [25] นอกจากนั้นพบว่ามีส่วนผสมของบิวเทน อัลคิเลท รีฟอร์เมท สี และสารเพิ่มออกซิเจน (Oxygenate) ซึ่งที่ใช้ในปัจจุบันคือ MTBE (Methyl

Tertiary Butyl Ether) เพื่อทำให้น้ำมันเบนซินที่มีคุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนดคุณภาพน้ำมัน [26]

ดังนั้นถ้าเกิดการปนเปื้อนของน้ำมันเบนซินในดินจะทำให้เกิดการสะสมของสารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันเข้าสู่ดินตะกอน มีผลทำให้สารเหล่านั้นมีความคงทนต่อการย่อยสลาย [27] แต่ถ้าถูกชะลงในแหล่งน้ำ จะมีผลกระทบต่อสัตว์ที่ได้สัมผัสน้ำมันเบนซิน คือ เมื่อขนสัตว์สัมผัสกับน้ำมันจะจับกันเป็นก้อนทำให้น้ำซึมเข้าถึงผิวหนังมีผลให้ สัตว์ไม่สามารถรักษาอุณหภูมิของร่างกายได้จึงหนาวตาย หรืออาจจมน้ำตายได้ นอกจากนั้นพบว่าน้ำมันมีความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ตับ ตับอ่อน ไต ปอด ระบบประสาทส่วนกลาง และมีผลระยะยาวต่อระบบสืบพันธุ์ โดยน้ำมันสามารถเข้าสู่ตัวสัตว์ได้ทั้งทางการหายใจ (ไอระเหย) ซึมผ่านทางผิวหนังและทางปาก สัตว์น้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันจะมีสารพิษในตัว เมื่อสัตว์ผู้ล่ากินเข้าไปก็จะได้รับสารพิษ และสัตว์ที่เปื้อนมักมีกลิ่นน้ำมันทำให้ผู้ล่าไม่กิน เกิดภาวะขาดอาหาร [27] ส่วนผลกระทบต่อมนุษย์นั้นพบว่าถ้าน้ำมันเบนซินระเหยมาสู่มนุษย์จะทำให้เกิดอาการวิงเวียนศีรษะ และอาจหมดสติ ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการใช้ปากดูดสายน้ำมัน เพราะน้ำมันเบนซินเพียงเล็กน้อยสามารถจะทำอันตรายต่อปอดได้อย่างร้ายแรง ส่วนการสัมผัสน้ำมันเบนซินโดยตรงเป็นระยะเวลานาน ๆ หรือบ่อยครั้งอาจทำให้เกิดอาการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ และอาจทำให้เกิดโรคผิวหนังเรื้อรัง แต่ถ้าหากมีความจำเป็นที่ต้องสัมผัสกับน้ำมันเบนซินหลังจากเสร็จสิ้นจากงานควรรีบล้างทำความสะอาดด้วยสบู่และน้ำให้สะอาด [25]

ส่วนน้ำมันดีเซล (Diesel Fuel) คือ น้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลที่ประกอบด้วยสารประกอบกลุ่มไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัวหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น พาราฟิน และสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน [28] เป็นส่วนหนึ่งของผลิตภัณฑ์น้ำมันดิบที่ได้จากโรงกลั่นเช่นเดียวกับน้ำมันเบนซิน ซึ่งเป็นน้ำมันที่เรียกว่า น้ำมันใส หรือ Distillate Fuel มีช่วงจุดเดือดประมาณ 180-370 องศาเซลเซียส น้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล ซึ่งเป็นเครื่องยนต์แรงอัดสูง (High Compression) และจุดระเบิดเอง (Self Ignition Engine) ซึ่งการจุดระเบิดของเชื้อเพลิงเกิดขึ้นจากความร้อนจากแรงอัดสูงของอากาศในกระบอกสูบโดยไม่ต้องใช้หัวเทียน [5] น้ำมันดีเซลที่มีจำหน่ายในปัจจุบันนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ น้ำมันดีเซลหมุนเร็ว และน้ำมันดีเซลหมุนช้า แต่ในการศึกษาครั้งนี้เป็นน้ำมันดีเซลสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลรอบหมุนเร็วที่ใช้กับยานยนต์ (Automotive Diesel Oil หรือ Gas Oil) เช่น รถยนต์, รถบรรทุก, เรือประมง, เรือโดยสาร, รถแทรกเตอร์ และเครื่องจักรกลหนักทุกชนิดที่มีรอบหมุนเร็วเกิน 1,000 รอบต่อนาที เครื่องยนต์ประเภทนี้ จำเป็นต้องใช้น้ำมันที่มีค่าซีเทนสูงและมีการระเหยเร็ว มิฉะนั้นเครื่องยนต์จะเดินไม่สะดวก น้ำมันเชื้อเพลิงประเภทนี้เรียกว่า น้ำมันดีเซลหมุนเร็ว (HSD; High Speed Diesel Oil) แต่ในตลาดเป็นที่รู้จักกันในชื่อของน้ำมันโซล่า ส่วนอีกชนิดหนึ่งใช้กับเรือเดินสมุทรเรียกว่า Marine Gas Oil [29]

ความเป็นพิษของน้ำมันดีเซลพบว่า เมื่อมีการสัมผัสทางผิวหนังบ่อย ๆ หรือสัมผัสเป็นเวลานาน ๆ และอาจทำให้เกิดการระคายเคือง ผิวหนังแห้ง และอาจเกิดเป็นผื่นโรค และอาจซึมผ่านผิวหนังทำให้เกิดความเป็นพิษได้ การทำให้สารเข้าสู่ปอดทำให้ถุงลมปอดอักเสบหรือเนื้อเยื่อปอดอักเสบอาจเสียชีวิตได้ ถ้ามีการสัมผัสสารที่มีปริมาณมากเกินไปในระยะสั้นไอระเหยที่มีความเข้มข้นเกินระดับที่ยอมรับได้การหายใจเข้าไป สามารถก่อการระคายเคืองต่อตา จมูก หลอดคอ และปอดได้ ที่ความเข้มข้นของไอสูงๆ จะระคายเคืองเยื่อบุเมือก ทำให้ปวดศีรษะ คลื่นไส้ หมดสติหรือผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ส่วนผลจากการสัมผัสสารที่มีปริมาณมากเกินไปในระยะยาว จะทำให้สาร Polycyclic aromatic compounds (PACs) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของน้ำมันดีเซลซึ่งการสัมผัสสารนี้บ่อยๆ อาจทำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง การหายใจเข้าไปอาจทำให้เกิดมะเร็งปอด [30] นอกจากนั้นพบว่าน้ำมันดีเซลเป็นพิษต่อพืชโดยทำให้พืชเจริญเติบโตช้าลงรวมทั้งทำให้การงอกของพืชลดลง [31] ดังนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรียกลุ่มตรึงก๊าซไนโตรเจนซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินทั่วไป และมีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน ให้เปลี่ยนเป็นปุ๋ยของพืชในรูปของแอมโมเนียมไอออน และในปัจจุบันมีการศึกษาถึงการนำเอาจุลินทรีย์ที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนในกลุ่มสาหร่ายน้ำเงินแกมเขียวใส่ในดินที่ทำการทดลองและพบว่าจากการเติมจุลินทรีย์ดังกล่าวทำให้ปริมาณของแร่ธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น [32] และพืชตระกูลถั่วร่วมกับ

แบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ในรากพืชตระกูลถั่วเหล่านี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกลุ่ม Rhizobium สามารถเพิ่มปริมาณไนโตรเจนเมื่อทำการปลูกในดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ [33-36]

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาถึงการบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลด้วยแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจน เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการฟื้นฟูสภาพดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันทั้ง 2 ชนิดในอนาคตต่อไป

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล

น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลได้ถูกซื้อมาจากสถานีบริการน้ำมันในจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย แล้วนำมาใส่ในภาชนะที่สะอาดและมีฝาปิดสนิท จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและห่างไกลจากสิ่งก่อประกายไฟจนกระทั่งนำไปใช้

ดินตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินจากมหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรีโดยเก็บตัวอย่างดิน ด้วยอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำดินใส่ลงในขวดและปิดฝาหลวมๆ เก็บที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการทดลองต่อไป

แบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจน [37-39]

แบคทีเรียที่นำมาศึกษาในครั้งนี้คือ แบคทีเรียในกลุ่มตรึงไนโตรเจนจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus polymyxa, Derxia* spp., *Enterobacter cloaeae* และ T6 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากดินนากุ้งร้างที่ผ่านกระบวนการฟื้นฟูสภาพด้วยถั่วเหลืองและถั่วเขียว

การเตรียมแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจน [37]

การเตรียมแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนโดยนำแบคทีเรียในข้อที่ 3 ที่แยกให้บริสุทธิ์แล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมานำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยทำการล้างเซลล์ 3 ครั้ง เพื่อให้ปราศจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมานำส่วนเซลล์มาละลายในสารบัฟเฟอร์และปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร เท่ากับ 1.5 A.U. เพื่อนำไปใช้ในหัวข้อการย่อยสลายน้ำมันเบนซินและดีเซลด้วยแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนต่อไป

การย่อยสลายน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลด้วยแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจน

นำดินมาใส่ในภาชนะเปิดจำนวน 5 ชุดการทดลอง โดยแบ่งออกเป็น

ชุดทดลองที่ 1 (T1): ดินที่เติมน้ำมันเบนซิน 5% และแบคทีเรียผสมทั้ง 4 ชนิด 5%

ชุดทดลองที่ 2 (T2): ดินที่เติมน้ำมันเบนซิน 5%

ชุดทดลองที่ 3 (T3): ดินที่เติมน้ำมันดีเซล 5% และแบคทีเรียผสมทั้ง 4 ชนิด 5%

ชุดทดลองที่ 4 (T4): ดินที่เติมน้ำมันดีเซล 5%

ชุดทดลองที่ 5 (T5): ดินเท่านั้น

และตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), และลักษณะทางกายภาพด้วยการสังเกตด้วยตาเปล่า, ปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Most Probable Number (MPN) และตรวจนับแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดโดยวิธีมาตรฐานบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ด้วยเทคนิคสเปรดเพลท (Spread plate technique) ทำการตรวจวัดทุก 7 วัน เป็นเวลานาน 21 วัน

การวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่างด้วย pH meter [40]

ก่อนวัดค่าความเป็นกรด-ด่างจำเป็นต้อง Standardize pH meter ด้วย pH Buffer solution ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0, 7.0 และ 10.0 ก่อน หลังจากนั้นชั่งดิน 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนดินและน้ำเข้ากันก่อนวัดประมาณ 30 นาที ในระหว่างที่วางทิ้งไว้ 30 นาที ควรคนดินเป็นครั้งคราว

การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม N_2-Fixation ด้วยวิธี MPN [41]

นำตัวอย่างดินมาเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ จากนั้นนำตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วมาเพาะเชื้อในหลอดอาหาร Nitrogen-free Culture Medium 10 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 5 หลอด แล้ว

นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจผลโดยตรวจดูความขุ่นของอาหารในหลอดอาหาร ขุ่นให้แสดงว่ามีการเจริญของเชื้อให้เป็นผลบวก และใสให้เป็นผลลบเนื่องจากไม่มีการเจริญ จากนั้นนำผลที่ได้ไปแปรผลกับตารางเอ็มพีเอ็นมาตรฐาน รายงานผลเป็นเอ็มพีเอ็นต่อกรัม

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotrophic bacteria) [42]

นำตัวอย่างดินมาเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ด้วยสารละลาย 0.85% Normal saline และถ่ายตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางปริมาตรละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วด้วยเทคนิคสเปรดเพลท (Spread plate technique) นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อคำนวนและบันทึกผลในหน่วย Colony forming unit ต่อกรัม (CFU/g)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาถึงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) พบว่าดินใน T1 (ดิน + น้ำมันเบนซิน 5% + แบคทีเรียผสม 5%) มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นในการศึกษาเพียง 1 ชั่วโมง รวมทั้งมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนที่คงเหลือในวันที่ 21 ของการศึกษาที่สูงกว่าชุด T2 (ดิน + น้ำมันเบนซิน 5%) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนสามารถอยู่ในสภาวะที่มีการเติมน้ำมันเบนซิน 5% ได้บางส่วน เช่นเดียวกับการทดลองในชุด T3 (ดิน + น้ำมันดีเซล 5% + แบคทีเรียผสม 5%) ที่ค่อย ๆ เพิ่มจำนวนในช่วง 7 วันแรกของการทดลองและมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนสูงสุดในวันที่ 14 ของการทดลอง และลดลงในวันที่ 21 ของการทดลอง ทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถเจริญได้ในดินที่ทำการศึกษาครั้งนี้แม้จะมีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซลในปริมาณ 5% จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนสามารถเจริญได้ในดินที่มีการเติมน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล 5% (Table 1)

จากการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในทั้ง 5 ชุดการทดลองพบว่า ในดินชุด T5 (ดิน) มีปริมาณกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.40 \pm 0.20 \times 10^{8}$ ถึง $3.45 \pm 0.45 \times 10^{8}$ CFU/g ส่วนดินที่มีการเติมเฉพาะน้ำมันเบนซิน พบว่า ปริมาณกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงภายใน 1 ชั่วโมงและคงที่ตลอดการศึกษา รวมทั้งดินที่มีการเติมน้ำมันดีเซลทำให้ปริมาณกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงภายใน 1 ชั่วโมงและคงที่จนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง และลดลงอีก 10 เท่าในวันที่ 21 ของการทดลอง นั่นแสดงถึงน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลมีพิษต่อกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเติมแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนและน้ำมันเบนซิน พบว่าปริมาณกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงภายใน 1 ชั่วโมงเช่นกัน แต่มีปริมาณกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดรวมคงเหลือสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนประมาณ 10 เท่า ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนที่เติมลงไป ทำให้ปริมาณกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดทนต่อน้ำมันเบนซินหรือดีเซล 5% (Table 2)

Table 1. Numbers of mixed nitrogen fixing bacteria (MPN/g) in soil after oil application with/without mixed bacteria

Treatments	Numbers of mixed nitrogen fixing bacteria (MPN/g)				
	Before added	1 hr.	7 days	14 days	21 days
T1: Soil added with gasoline oil 5% and mixed bacteria 5%	0.23	1.7	0.49	1.40	1.30
T2: Soil added with gasoline oil 5%	0.23	0.23	0.46	1.40	1.10
T3: Soil added with diesel oil 5% and mixed bacteria 5%	0.23	0.23	0.95	7.16	1.40
T4: Soil added with diesel oil 5%	0.23	0.23	0.49	1.40	1.10
T5: Soil	0.23	0.23	0.33	0.49	1.10

Table 2. Numbers of total heterotrophic bacteria (CFU/g) in soil after added with oil and/or mixed bacteria

Treatments	Numbers of total heterotrophic bacteria (CFU/g)				
	Before added	1 hr.	7 days	14 days	21 days
T1: Soil added with gasoline oil 5% and mixed bacteria 5%	$3.45±0.45 \times 10^8$	$7.17±2.35 \times 10^6$	$1.04±0.11 \times 10^6$	$5.40±0.20 \times 10^6$	$8.80±0.20 \times 10^6$
T2: Soil added with gasoline oil 5%	$3.45±0.45 \times 10^8$	$2.75±0.25 \times 10^7$	$3.00±0.30 \times 10^7$	$5.50±1.81 \times 10^7$	$3.80±0.60 \times 10^7$
T3: Soil added with diesel oil 5% and mixed bacteria 5%	$3.45±0.45 \times 10^8$	$8.97±0.83 \times 10^7$	$8.97±0.83 \times 10^7$	$1.17±0.29 \times 10^7$	$1.90±0.10 \times 10^7$
T4: Soil added with diesel oil 5%	$3.45±0.45 \times 10^8$	$1.87±1.70 \times 10^7$	$1.23±0.04 \times 10^7$	$3.00±2.70 \times 10^7$	$4.70±1.40 \times 10^6$
T5: Soil	$3.45±0.45 \times 10^8$	$3.45±0.45 \times 10^8$	$3.00±0.10 \times 10^8$	$2.25±0.95 \times 10^8$	$1.40±0.20 \times 10^8$

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ดินที่มีการเติมน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซลทั้งที่เติมหรือไม่เติมแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนพบว่าดินมีสีเข้มที่สุด แต่เมื่อทำการศึกษาพบว่าภายใน 14 วันดินมีสีที่จางที่สุดเท่ากับดินที่ไม่มีการเติมน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซล (T5) ส่วนชุดการทดลอง T2 และ T4 พบการจางลงเป็นระดับจางที่สุดภายใน 21 วันของการทดลอง สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนมีบทบาทในการลดปริมาณของน้ำมันที่เติมนั่นเอง (Table 3)

จากการศึกษาถึงค่าความเป็นกรด-ด่างพบว่าเมื่อมีการเติมน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซล 5% (T2 (ดิน + น้ำมันเบนซิน 5%) และ T4 (ดิน + น้ำมันดีเซล 5%)) ในดินทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินลดลงจาก 8.0 ± 0.0 เหลือ 7.0 ± 0.0 และ 6.0 ± 0.0 ตามลำดับ ภายใน 1 ชั่วโมงของการทดลองและคงที่ตลอด 21 วันของการทดลอง และเมื่อชุดการทดลองที่มีการเติมน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซล 5% รวมทั้งเติมแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจน (T1 (ดิน + น้ำมันเบนซิน 5% + แบคทีเรียผสม 5%) และ T3 (ดิน + น้ำมันดีเซล 5% + แบคทีเรียผสม 5%)) ในดินที่ทำการทดลอง ผลการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของดินจาก 8.0 ± 0.0 ลดลงเท่ากับ 7.0 ± 0.0 ภายใน 1 ชั่วโมงในทั้ง 2 ชุดการทดลอง และลดลงเท่ากับ 6.0±0 ในวันสุดท้ายของการทดลอง (21 วัน) (Table 4) จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าน้ำมันดีเซล 5% และน้ำมันเบนซิน 5% ทำให้ความเป็นกรด-ด่างลดลง และเมื่อมีการเติมแบคทีเรียผสมในชุดการทดลองที่มีการเติมน้ำมันเบนซิน 5% ทำให้ความเป็นกรด-ด่างลดลงได้รวดเร็วกว่าชุดที่มีแต่น้ำมันเบนซิน 5% ดังนั้นสามารถคาดการณ์ได้ว่าแบคทีเรียผสมย่อยสลายสารในน้ำมันเบนซินและทำให้เกิดผลผลิตที่ทำให้ความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งกลไกของกระบวนการย่อยของแบคทีเรียผสมกลุ่มนี้น่าจะทำการศึกษาต่อไป

Table 3. Intensity of tested soil after oil application with/without mixed bacteria

Treatments	Intensity of tested soil after oil application with/without mixed bacteria				
	Before added	1 hr.	7 days	14 days	21 days
T1: Soil added with gasoline oil 5% and mixed bacteria 5%	+++	+++	++	+	+
T2: Soil added with gasoline oil 5%	+++	+++	++	++	+
T3: Soil added with diesel oil 5% and mixed bacteria 5%	+++	+++	++	+	+
T4: Soil added with diesel oil 5%	+++	+++	++	++	+
T5: Soil	+	+	+	+	+

Note: +++, High intensity; ++, moderate intensity; +, low intensity

Table 4. pH of tested soil after oil application with/without mixed bacteria

Treatments	pH of tested soil after oil application with/without mixed bacteria				
	Before added	1 hr.	7 days	14 days	21 days
T1: Soil added with gasoline oil 5% and mixed bacteria 5%	8.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
T2: Soil added with gasoline oil 5%	8.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0
T3: Soil added with diesel oil 5% and mixed bacteria 5%	8.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
T4: Soil added with diesel oil 5%	8.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
T5: Soil	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าน้ำมันเบนซิน 5% และน้ำมันดีเซล 5% ไม่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจน รวมทั้งสามารถย่อยสลายน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล 5% ด้วยแบคทีเรียผสมกลุ่มนี้จากการประเมินจากค่าปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) พบว่าในวันสุดท้ายของการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 1 (ดินที่เติมน้ำมันเบนซิน 5 % และแบคทีเรียผสมทั้ง 4 ชนิด 5%) และ 3 (ดินที่เติมน้ำมันดีเซล 5% และแบคทีเรียผสมทั้ง 4 ชนิด 5%) มีปริมาณสูงสุดและสูงกว่าปริมาณของแบคทีเรียที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนในชุดทดลองที่ 2 (ดินที่เติมน้ำมันเบนซิน 5%) และ 4 (ดินที่เติมน้ำมันดีเซล 5%) รวมทั้งชุดควบคุม ซึ่งทั้ง 3 ชุดการทดลองนี้มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้ในปริมาณเท่ากันทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถเจริญได้ในดินที่ทำการศึกษาครั้งนี้ แม้จะมีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซลในปริมาณ 5% รวมทั้งลักษณะทางกายภาพด้วยการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่า ดินที่มีการเติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสามารถลดความเข้มของสีน้ำมันได้รวดเร็วกว่าชุดที่ไม่มีการเติมน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล ดังนั้นแบคทีเรียผสมกลุ่มตรึงไนโตรเจนแบบอิสระในการศึกษาครั้งนี้น่าจะมีความสามารถในการย่อยสลายและฟื้นฟูดินที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซล ความเข้มข้น 5% หรือน้อยกว่า และน่าจะนำมาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพในดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลต่อไป

จากรายงานของ ภิรยาพร และคณะ [43] พบว่าเมื่อทำการศึกษาความสามารถของราทะเล 6 ชนิด ในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในห้องปฏิบัติการพบว่า การเติมน้ำมันเบนซินความเข้มข้นสุดท้าย 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, C. tropicalis* และ *Alternaria sp.* สามารถทำให้น้ำมันแตกตัวและรวมตัวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น แต่มีเฉพาะ *C. pulchella* และ *Alternaria sp.* เท่านั้นที่สามารถลดปริมาณน้ำมันในหลอดความเข้มข้น 5% ในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง

ส่วน Cunha และ Leite [3] ได้รายงานถึงจุลินทรีย์ในดินเก็บจาก Rio de Janeiro ประเทศบราซิล รวมทั้งดินจากแหล่งที่กล่าวมาแล้วผสมกับแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Pseudomonas putida, Pseudomonas cepacia* และ *Pseudomonas alcaligenes* ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันเบนซิน 50% และ 61.3 – 66.7% ตามลำดับ นอกจากนั้น Ridgway et al. [44] พบว่า *Pseudomonas putida* และ *Pseudomonas alcaligenes* ที่แยกจากน้ำได้ดินสามารถใช้น้ำมันเบนซินเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานได้เท่ากับ 18.4 และ 1.6% ตามลำดับ นอกจากนั้นพบว่า Panda and Panda [45] รายงานถึงการแยกแบคทีเรีย *Pseudomonas spp.* จากดิน น้ำทะเล และดินตะกอนบริเวณท่าเรือที่มีปั๊มน้ำมันเก่าตั้งอยู่ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.5% ได้เท่ากับ 49.93% ภายในเวลา 20 วัน ส่วน Nikhil et al. [5] ได้คัดแยก

แบคทีเรีย *Micrococcus sp.* และ *Pseudomonas sp.* จากดินที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันปิโตรเลียมและพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยน้ำมันดีเซลได้เท่ากับ 52.95% และ 67.57% ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียผสมระหว่าง *Micrococcus sp.* และ *Pseudomonas sp.* สามารถย่อยน้ำมันดีเซลได้สูงถึง 89.98%

จากผลการศึกษาทั้งหมดพบว่าน้ำมันเบนซิน 5% และน้ำมันดีเซล 5% ไม่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนและกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ดังนั้นคาดว่าแบคทีเรียผสมน่าจะมีความสามารถในการบำบัดน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลปริมาณ 5% หรือน้อยกว่าที่ปนเปื้อนในดินได้โดยแบคทีเรียดังกล่าวน่าจะย่อยสลายน้ำมันและเจริญโดยใช้น้ำมันแบนซิน 5% เป็นแหล่งของคาร์บอนได้มากกว่าน้ำมันดีเซล 5% รวมทั้งน่าจะทำการศึกษาต่อไปในรายละเอียดของการย่อยสลายสารแต่ละชนิดในน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียผสมกลุ่มตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (*Bacillus polymyxa, Derxia* spp., *Enterobacter cloaeae* และ T6) มีความสามารถในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล ความเข้มข้น 5% หรือน้อยกว่า เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนสามารถเพิ่มจำนวนในดินที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลด้วยความเข้มข้นสูงถึง 5% ด้วยปริมาณที่สูงกว่าในดินชุดควบคุม และดินที่มีการเติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสามารถลดความเข้มของสีน้ำมันได้รวดเร็วกว่าชุดที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียผสม และจะทำการศึกษาต่อไปในการฟื้นฟูสภาพในดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลในสภาวะต่าง ๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยสนับสนุนอุปกรณ์และสถานที่ในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Edwards, E.A., L.E. Wills, M. Reinhard, and D. Grbic-Galic. 1992. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer mcroorganism under sulfate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 58:794-800.
2. Solano-Serena, F., R. Marchal, D. Blanchet, and J.P. Vandecasteele. 1998. Intrinsic Capacities of soil microflora for gasoline degradation. *Biodegradation.* 9:319-326.
3. Cunha, C. D. and S.G.F. Leite. 2000. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology.* 31:45-49.
4. Cohen, M.F., J. Williams, and H. Yamasaki. 2002. Biodegradation of diesel fuel by an Azolla-derived bacterial consortium. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering.* A37(9):1593–1606.
5. Nikhil, T., V. Deepa, G. Rohan, and B. Satish. 2013. Isolation, Characterization and Identification of Diesel Engine Oil Degrading Bacteria from Garage Soil and Comparison of their Bioremediation Potential. *International Research Journal of Environment Sciences* 2(2):48-52.
6. Turner, D.A., and J.V. Goodpaster. 2009. The effects of microbial degradation on ignitable liquids. *Anal Bioanal Chem.* 394:363-371.
7. Turner, D.A., and J.V. Goodpaster. 2011. The effect of microbial degradation on thechromatographic profiles of tiki torch fuel, lamp oil, and turpentine. *Journal of Forensic Sciences.* 56:984-987.
8. Turner, D.A., and J.V. Goodpaster. 2012. Comparing the effects of weathering and microbial degradation on gasoline using principal components analysis. *Journal of Forensic Sciences* .57:64-69.
9. Crawford, R.L., and D.L. Crawford. 1996. *Bioremediation: Principles and Applications. Biotechnology Research Series*, In J. Lynch (ed.). Press Syndicate of the University of Cambridge. Great Britain.
10. Heipieper, H.J. 2007. *Bioremediation of Soils Contaminated with Aromatic Compounds*. Earth and Environmental Sciences, In NS Series (ed.). Springer: Dordrecht, The Netherlands.

11. Hernandez, B.S., S.C. Koh, M. Chial, D.D. Focht. 1997. Terpene utilizing isolates and their relevance to enhanced biotransformation of polychlorinated biphenyls in soil. *Biodegradation* .8:153-158.
12. Huang, H., and S. Larter. 2005. *Biodegradation of Petroleum in Subsurface Geological Reservoirs*, In B. Ollivier, & M. Magot (eds), Petroleum Microbiology. ASM Press, Washington, DC. p .91-122.
13. Magot, M. 2005. *Indigenous microbial communities in oil fields, In B. Ollivier*, & M. Magot (eds), Petroleum Microbiology. ASM Press, Washington, DC.
14. Mars, A.E., J.P. Gorissen, I. van den Beld, and G. Eggink. 2001. Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillic acid by Pseudomonas putida GS1 in a fed-batch reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* .56:101-107.
15. McLoughlin, E., A.H. Rhodes, S.M. Owen, and K.T. Semple. 2009. Biogenic volatile organic compounds as a potential stimulator for organic contaminant degradation by soil microorganisms. *Environmetal Pollution*. 157:86-94.
16. Misra, G., and S.G. Pavlostathis. 1997. Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and soil-slurry systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47:572-577.
17. Sasek, V., J.A. Glaser, and P. Baveye, 2003. *The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions*. Earth and Environmental Sciences, ed. N.S. Series, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
18. Singh, A., and O.P. Ward. 2004. *Biodegradation and Bioremediation*. In A. Varma (ed.), Soil Biology. Springer-Verlag: Berlin, Germany.
19. Van Agteren, M.H., S. Keuning, and D.B. Janssen. 1998. *Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
20. Gestel, K.V., J. Mergaert, J. Swings, J. Coosemans, and J. Ryckebore. 2003. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental Pollution*. 125:361-368.
21. Nikolopoulou, M., N. Pasadakis, and N. Kalogerakis. 2013. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Marine Pollution Bulletin*. 72:165–173.
22. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2549. *จุลชีววิทยาทางดิน*. กรุงเทพฯ: โอเดียน สโตร์.
23. John, R.C., A.Y. Itah, J.P. Essien, and D.I. Ikpe. 2011. Fate of Nitrogen-Fixing Bacteria in Crude Oil Contaminated Wetland Ultisol. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 87:343-353.
24. Marchal, R., S. Penet, F. Solano-Serena, and J.P. Vandecasteele. 2003. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP 58(4):441-448.
25. ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ. 2554. เชื้อเพลิงและสารหล่อลื่น. กรุงเทพฯ: ซีเอ็ดยูเคชั่น.
26. จงโปรด คชภูมิ. 2549. ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของการเปลี่ยนน้ำมันเบนซินเป็นแก๊สโซฮอล์โดยใช้การประเมินวงจรชีวิตผลิตภัณฑ์. *วารสารร่มพฤษ์* 24:165-189.
27. มูลนิธิสืบนาคะเสถียร. 2553. น้ำมันรั่ว: กับผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อม. เข้าถึงได้จาก http://www.seub.or.th/index.php?option=com_content&view=article&id=465:seubnews&catid=5:2009-10-07-10-58-20&Itemid=14 : [Online]. (สืบค้นวันที่ 7 พฤศจิกายน 2556).
28. Dussán, J., and M. Numpaque. 2012. Degradation of diesel, a component of the explosive ANFO, by bacteria selected from an open cast coal mine in La Guajira, Colombia. *Journal of Bioprocess and Biotechnique* 2(4):1-5.
29. วาสนา บุญจริง และคณะ. 2549. *น้ำมันดีเซล*. กรุงเทพฯ: โรงเรียนสตรีศรีสุริโยทัย.
30. International Agency for Research on Cancer

[IARC]. 1983. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.* UK: World Health Organization.

31. Baker, J.M. 1982. *Mangroove swamps and the oil Industry*. Environmental Pollution 12.
32. Rai, U.N., R.D. Tripathi, N. Singh, A. Kumar, M.B. Ali, and A. Pal. 2000. Amelioration of fly ash by selected nitrogen fixing blue green algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 64:294–301.
33. Sanginga, N., S.K.A. Danso, K. Mulongoy, and A.A. Ojeifo. 1994. Persistence and recovery of introduced Rhizobium ten years after inoculation on Leucaena leucocephala grown on Alfisol in Southwestrn Nigeria. *Plant Soil* 159:199–204.
34. Cheung, K.C., J.P.K. Wong, Z.Q. Zhang, J.W.C. Wong, and M.H. Wong. 2000. Revegetation of lagoon ash using the legume sp. *Acacia auriculiformis and Leucaena leucocephala. Environmental Pollution.* 109:75–82.
35. Requena, N., P. Jeffries, and J.M. Barea. 1996. *Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem.* 62:842-847.
36. Barea, J.M., R.M. Tobar, and C. Azcon-Aguilar. 1996. Effect of genetically modified Rhizobium melioloti inoculant on the development of arbuscular mycorrhizas, root morphology, nutrient uptake and biomass accumulation in Medicago sativa. *New Phytologist.* 134:361–369.
37. วรพจน์ แซ่โค้ว วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย ธีรนาถ สุวรรณเรือง และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2549. *ผลของดินนากุ้งร้างที่บำบัดด้วยถั่วเหลืองต่อการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนอิสระและแอมโมเนียมอิออน.* การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 5. วันที่ 8-10 มีนาคม 2549. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.
38. วรพจน์ แซ่โค้ว วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย ธีรนาถ สุวรรณเรือง และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2550. *ผลของการฟื้นฟูดินนากุ้งร้างด้วยพืชตระกูลถั่วต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนอิสระแอมโมเนียมอิออน และฟอสฟอรัส.* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 ระหว่างวันที่ 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2550.
39. ธีรนาถ สุวรรณเรือง วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย นิตยา ไชยเนตร และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2550. *ผลของพืชตระกูลถั่วในการฟื้นฟูสภาพดินนากุ้งร้าง.* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 ระหว่างวันที่ 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2550.
40. ทัศนีย์ อัตตะนันทน์ และจงรักษ์ จันทร์เจริญสุข. 2542. *แบบฝึกหัดและคู่มือปฏิบัติการ การวิเคราะห์ดินและพืช (Soil and Plant analysis).* ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
41. Alexander, M. 1965. Most-probable-number method for microbial populations. In: C.A. Black (Editor), Methods of Soil Analysis, Part 2, Black. *American Society of Agronomy*, Madison, WI, 1467-1472.
42. Ukaegbu-Obi, K.M. and C.C Mbakwem-Aniebo. 2014. Bioremediation potentials of bacteria isolated from rhizosphere of some plants of oil contaminated soil of Niger Delta. *Journal of Applied & Environmental Microbiology.* 2(4):194-197
43. ภิรยาพร เปรมประเสริฐ, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และอภิรดี ปิลันธนภาคย์. 2006. ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเบนซินของราทะเลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา* 11:47-55.
44. Ridgway, H.D. J. Safarik, D. Phipps, P. Carl, and D. Clark. 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degradind bacteria from a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology.* 56:3565-3575.
45. Panda, S.K., Kar, R.N., and C.R. Panda. 2013. Isolation and identification of petroleum hydrocarbon degrading microorganisms from oil contaminated environment. *International Journal of Environmental Sciences.* 3(5):1314-1321.