บทความวิจัย

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

Isolation of Waste Lubricating Oil-degrading Microorganisms

วิชุดา เกตุใหม่[1*] เสาวภา แก้วสุกใส[2] และลีซา แยนา[2]

Wichuda Katemai[1*], Soawapa Kaewsuksai[2] and Leesa Yaena[2]

บทคัดย่อ

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 36 ไอโซเลท ได้แก่แบคทีเรีย 25 ไอโซเลท และยีสต์ 11 ไอโซเลท โดยยีสต์ไอโซเลท PO1.2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าโคโลนีของยีสต์ PO1.2 บนอาหาร YM agar มีลักษณะสีขาวขุ่น ขอบเรียบ แบนราบ เมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางลำดับดีเอ็นเอ ด้วย 26S rDNA sequencing พบว่าเป็นเชื้อ *Issatchenkia orientalis* เมื่อนำ I.*orientalis* PO1.2 มาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ผลการทดลองพบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุดที่ 0.5% ซึ่งจะให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 63.60 % นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *I. orientalis* PO1.2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเมื่อนำส่วนใสมาทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification activity) โดยใช้น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าว พบว่า เชื้อ *I. orientalis* PO1.2 มีประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุดเท่ากับ 71.67 % ในอาหารที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน

คำสำคัญ : จุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ยีสต์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

---

[1] อาจารย์สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93110

[2] นิสิตสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93110

[*] Corresponding author: โทรศัพท์/โทรสาร: 074-693992 email: w_katemai@hotmail.com

Abstract

Waste lubricating oil-degrading microorganisms were isolated from oil contaminated soil which collected from Hat Yai District, Songkhla Province. The isolation and screening of microorganisms that can degrade waste lubricating oil showed 36 isolates (bacteria 25 isolates and yeast 11 isolates). Isolate PO1.2 was the most active microorganism in the assimilation of waste lubricating oil and biosurfactant production. The isolated yeast strain, PO 1.2 was characterized on YM agar plate as followed: growth at 30 °C, off-white color, smooth with margins ranging from smooth to lobed, and flat. Determination of the nucleotide sequence of the gene encoding 26S rDNA of the isolate PO1.2 was identified as *Issatchenkia orientalis*. *I. orientalis* PO1.2 showed the best degrading activity was 63.60% when waste lubricating oil was 0.5%. In addition, *I. orientalis* PO1.2 can produce biosurfactant. Determination of emulsification activity (%EA) from *I. orientalis* PO1.2 with soy bean oil, palm oil or rice bran oil, the result showed the best %EA with rice bran oil (71.67%) when used 0.1% waste lubricating oil as a carbon source.

Keywords : Biosurfactant, Waste Lubricating Oil-degrading Microorganisms, Waste Lubricating Oil, Yeast

คำนำ

การปนเปื้อนคราบน้ำมันในสิ่งแวดล้อมเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ประสบกับปัญหาการปนเปื้อนน้ำมัน เนื่องจากประเทศไทยมีโรงงานอุตสาหกรรมจำนวนมาก มีกิจกรรมประจำวัน รวมทั้งมีการขนส่งทางน้ำเป็นหลักในการแลกเปลี่ยนสินค้าระหว่างประเทศ ซึ่งล้วนแต่ต้องใช้น้ำมันหล่อลื่นเป็นแหล่งพลังงานทั้งสิ้น ทำให้เกิดการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นที่เหลือจากการใช้งาน ทั้งในน้ำและพื้นดินซึ่งปัญหาเหล่านี้ทำลายระบบนิเวศให้เปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงมีการเร่งบำบัดคราบน้ำมันโดยใช้สารเคมี ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงในการบำบัด และอาจจะทำให้เกิดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม และวิธีการนี้ไม่สามารถบำบัดได้ในระยะยาว นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งหมายถึงสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ที่ไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การเกษตรและสิ่งแวดล้อม [1] เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อได้เปรียบในเรื่องของความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพโดยไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และสามารถทำงานภายใต้สภาวะที่วิกฤติ (extreme condition) ได้ [2] สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิด มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้ง อิมัลซิฟิเคชั่น (emulsification) และดิ-อิมัลซิฟิเคชั่น (de-emulsification) ซึ่งคุณสมบัติอิมัลซิฟิเคชั่นหมายถึงความสามารถในการเข้ากันได้ระหว่างน้ำกับน้ำมัน คุณสมบัตินี้เองทำให้นำมาใช้ในการทำความสะอาดอุปกรณ์ต่างๆ เช่น ถังเก็บน้ำมัน ท่อส่งน้ำมัน เป็นต้น ส่วนคุณสมบัติดิอิมัลซิฟิเคชั่นได้ถูกนำมาใช้ในการลดสภาพของอิมัลชันที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม [3] Vasudevan และ Rajaram [4] ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินโดยการใช้เทคนิค bioaugmentation พบว่าการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียจะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย 40% หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 90 วัน และเมื่อเติมสารอาหารอนินทรีย์ร่วมกับการเติมกล้าเชื้อจะให้ประสิทธิภาพในการ

ย่อยสลาย 65% นอกจากนี้จากการคัดเลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วบริเวณอู่ซ่อมรถและปั๊มน้ำมันในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานีและสงขลาโดยวิธี enrichment culture ในอาหาร mineral salt medium (พีเอช 7.0) ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย 40% เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC-9 มาศึกษาปริมาณสูงสุดของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเท่ากับ 1 % มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 40.46% [5]

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นคณะวิจัยจึงสนใจทำการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ในดินบริเวณพื้นที่จังหวัดสงขลามาย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายต่อน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งวิธีนี้อาจจะช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับระบบนิเวศ และลดต้นทุนในการใช้สารเคมีลงได้

อุปกรณ์และวิธีการ

วัตถุดิบ

ดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์มของ บริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลาโดยเก็บตัวอย่างที่ระดับความลึก 0 - 15 เซนติเมตร ใส่ถุงพลาสติกและเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว จากร้านซ่อมรถมอเตอร์ไซค์ อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง

น้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าว

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Basal salt medium (BSM) (ดัดแปลงจาก Katemai) [6] ที่ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

Nutrient Agar (NA)

Nutrient Broth (NB)

Yeast Malt Agar (YMA)

Yeast Malt Broth (YMB)

วิธีการทดลอง

การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ใส่ตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปาล์มของ บริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด น้ำหนัก 1 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร BSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน) บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันหรือจนกระทั่งเห็นการเจริญของจุลินทรีย์ [7] จากนั้นถ่ายเชื้อ 10% ลงในอาหารใหม่และทำการเลี้ยงตามวิธีการเดิมอีก 3 ครั้ง (ดัดแปลงจาก Al-Sharidah) [8] ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยทำการเจือจางแบบ serial dilution ในช่วง 10^{-1} ถึง 10^{-5} ลงบนอาหาร NA (ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะชนิดแอมโฟเทอริซินบีเพื่อยับยั้งเชื้อรา)และ YMA (ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะชนิดคลอแรมเฟนิคอลเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย) ทำการเกลี่ยให้ทั่วด้วยเทคนิค spread plate นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี สังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน จากนั้นแยกเชื้อซ้ำอีก 2-3 ครั้ง ให้ได้จุลินทรีย์บริสุทธิ์

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น (agar) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และลำดับดีเอ็นเอโดย 16S rDNA (กรณีแบคทีเรีย) หรือ 26S rDNA (กรณียีสต์และรา) โดยใช้ universal oligonucleotide primers [9] วิเคราะห์ลำดับเบสโดยเครื่อง ABI PRISM™ 3100 DNA Sequencer และทำการเทียบเคียงลำดับเบสที่ได้ด้วยโปรแกรม BLAST

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหาร NB หรือ YMB เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (มีความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5) เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อที่แยกได้10% ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร BSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 0.1 0.5 และ 1% เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (ดัดแปลงจาก Katemai) [6] แล้วนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน และนำส่วนใสมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัดกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน %EA และ %EI ต่อ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าว

วิธีวิเคราะห์

ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

วิธีชั่งหาน้ำหนักน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่หายไป (Weight loss method) โดยสกัด Culture broth ด้วยเฮกเซน ในอัตราส่วน 1:1 ทำการสกัด 2 ครั้ง แล้วนำส่วนของตัวทำละลายมากำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4 ทำแห้งตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำสารที่ได้อบในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดความชื้น และชั่งน้ำหนักสารที่ได้ [7] จากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว [10] จากสูตร

ประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน

$$(\%) = (W_1 - W_2)/W_1 \times 100$$

W_1 = น้ำหนักของน้ำมันเริ่มต้น

W_2 = น้ำหนักของน้ำมันที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน [Emulsification activity (%EA) และ Emulsification Index (%EI)]

ปิเปตน้ำมันที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการวัดความสูงของของเหลวทั้งหมด และของเหลวที่เกิดอิมัลชันด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ ทำการบันทึกผลความคงตัวของการเกิดอิมัลชัน และคำนวณ % กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน ค่าที่ได้เรียกว่า %EA และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลความคงตัวของการเกิดอิมัลชัน และคำนวณกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน(%) ค่าที่ได้เรียกว่า %EI [11] การคำนวณหากิจกรรมการเกิดอิมัลชัน(%) แสดงดังสมการ

$$\%EA \text{ และ } \%EI = \frac{\text{ความสูงของของเหลวที่เกิดอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของของเหลวทั้งหมด}} \times 100$$

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

จากการแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน พบว่าสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในอาหาร BSM ที่ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอนได้ 36 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรีย 25 และยีสต์ 11 ไอโซเลท ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 1 โดยยีสต์ไอโซเลท PO 1.2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 61.30% จากการสังเกตลักษณะของอาหารเหลวในฟลาสก์ที่มีการเติมยีสต์ไอโซเลท PO1.2 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมยีสต์ จากการสังเกตฟลาสก์ที่มีการเติมยีสต์ไอโซเลท PO1.2 จะมีลักษณะขุ่นทั้งฟลาสก์ ไม่มีน้ำมันเกาะอยู่ที่ผิวหรือที่ขอบฟลาสก์ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่มีน้ำมันลอยอยู่ที่ผิวหน้าและบริเวณขอบฟลาสก์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Katemai [6] ซึ่งแยกยีสต์จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าสามารถแยกยีสต์ได้ 81 ไอโซเลต ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารที่มี weathered crude oil (WCO เป็นแหล่งคาร์บอน โดย 5 ไอโซเลตสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำกว่า 60 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อใช้กลูโคส WCO n-hexadecane หรือไซลีน เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ Koma และคณะ [12] แยกเชื้อจากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ และส่วนของ cyclic alkane ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน พบว่ามี 2 สายพันธุ์ คือ NDKK48 และ NDKY76A สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ W medium ที่ความเข้มข้นของน้ำมัน 1% เป็นแหล่งคาร์บอนโดยสายพันธุ์ NDKK48 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์และส่วน cyclic alkane ได้ 27% และ 16 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ NDKY76A มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์และส่วน cyclic alkane หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน ได้ 27% และ 18% ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท PO1.2 ในอาหาร BSM ที่ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอนมาทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน พบว่ายีสต์ไอโซเลท PO1.2 สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ (ตารางที่ 2) จากการศึกษานี้กล่าวได้ว่าว่ายีสต์ไอโซเลท PO1.2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว อีกทั้งยังสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดอีกด้วย ดังนั้นจึงนำยีสต์ไอโซเลท PO1.2 ไปศึกษาในขั้นต่อไป

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)	**ไอโซเลท**	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)
แบคทีเรีย		ยีสต์	
PO1.9	15.50±0.00	PO1.2	61.30±0.00
PO2.4	10.75±0.35	PO1.9	35.50±0.00
PO2.10	22.00±0.35	PO2.4	10.95±0.35
PO2.15	16.50±0.00	PO2.10	22.00±0.00
PO3.1	20.15±0.35	PO2.15	18.50±0.00
PO3.3	12.00±0.35	PO3.1	31.15±0.35
PO3.4	15.50±0.00	PO3.3	42.00±0.35
PO3.10	10.75±0.35	PO3.4	25.50±0.35
PO3.16	22.00±0.35	PO3.10	30.75±0.35
PO4.1	16.50±0.00	PO3.16	29.00±0.35
PO5.3	24.15±0.35	PO4.1	15.65±0.00
PO5.4	17.50±0.35		
PO5.10	9.50±0.00		
PO7.5	28.55±0.35		
PO7.11	10.75±0.35		
PO8.3	7.50±0.00		
PO8.4	27.15±0.35		
PO8.10	18.50±0.35		
PO8.16	11.55±0.00		
PO9.1	20.15±0.35		
PO9.3	12.00±0.35		
PO9.4	9.50±0.00		
PO9.10	21.15±0.35		
PO9.15	17.85±0.00		
PO9.21	19.10±0.00		

ตารางที่ 2 กิจกรรมการเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ของยีสต์ไอโซเลท PO1.2

อโซเลท	ทดสอบกิจกรรมกับ	%EA	%EI
PO1.2	น้ำมันถั่วเหลือง	56.25	31.25
	น้ำมันปาล์ม	46.67	26.67
	น้ำมันรำข้าว	71.67	33.33

หมายเหตุ %EA หมายถึง ร้อยละกิจกรรมการเกิดอิมัลชันเป็นเวลา 10 นาที
%EI หมายถึง ร้อยละกิจกรรมการเกิดอิมัลชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ไอโซเลท PO1.2 พบว่า ลักษณะโคโลนีแบนราบ ผิวหน้าด้าน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ และการเจริญในอาหาร YMB อาหารจะขุ่นและตกตะกอนที่ก้นหลอด มีการสร้างฟิล์มเหนืออาหาร นอกจากนี้ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อยีสต์ไอโซเลท PO1.2 มีรูปร่างของเซลล์เป็นรูปรี การเรียงตัวของเซลล์จะเดี่ยว และเพิ่มจำนวนแบบแตกหน่อเมื่อศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ 26S rDNA *Sequening* พบว่ายีสต์ไอโซเลท PO1.2 มีความใกล้เคียง 99% กับเชื้อ *Issatchenkia orientalis*

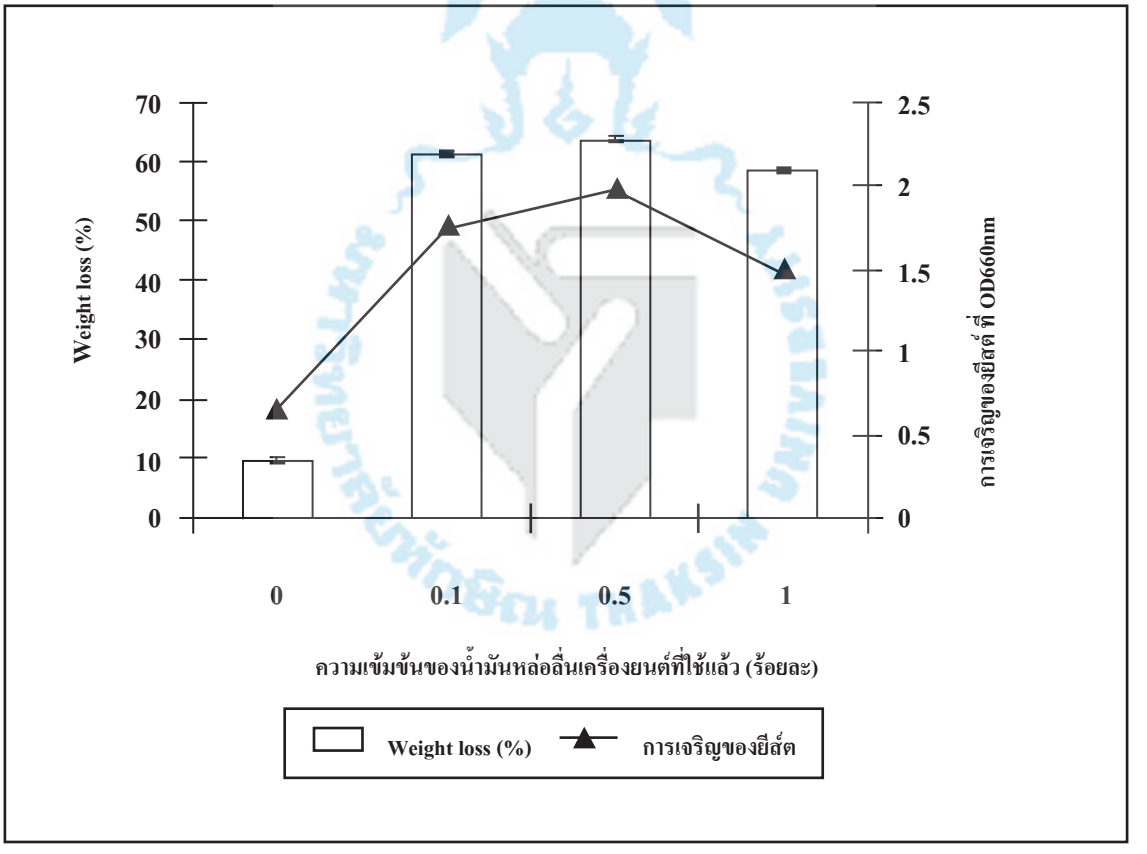
ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 ในอาหาร BSM ที่ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.1% และมีชุดควบคุมคือ อาหาร BSM ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% แต่ไม่มีการเติมยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 พบว่ายีสต์ *I. orientalis* PO1.2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยการหาน้ำหนักที่หายไปของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Weight loss) ในอาหาร BSM ที่ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.1% เท่ากับ 61.30% ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมยีสต์ มีค่า weight loss เท่ากับ 9.25% ที่ผลการทดลองในชุดควบคุมเป็นเช่นนี้น่าจะมีสาเหตุมาจากการระเหย หรือการเกิดปฏิกิริยา photochemical oxidation ที่ส่งผลให้น้ำหนักของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหายไป [13]

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1% และมีชุดควบคุม คือ อาหาร BSM ที่ไม่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว แต่มีการเติมยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 พบว่ายีสต์ *I. orientalis* PO1.2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ที่ใช้แล้ว โดยการหาน้ำหนักที่หายไปของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Weight loss) กับวัดการเจริญเติบโตของยีสต์ควบคู่กัน แสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งจากผลการศึกษานี้กล่าวได้ว่ายีสต์ *I. orientalis* PO1.2 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.5% ได้ดีที่สุดและยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดด้วย ในขณะที่ชุดควบคุมทุกความเข้มข้นยีสต์มีการเจริญเติบโตน้อยมาก รวมถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องที่ใช้แล้วก็ต่ำเช่นกัน ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Mandri และ Lin [14] ที่แยกเชื้อที่

สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell-Haas ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 10% พบว่าสามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด 3 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter calcoaceticum*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Flavobacterium* sp. โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายหลังจากเลี้ยงเชื้อ 28 วันได้ 84, 71 และ 60% ตามลำดับ

นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 โดยวัดค่า %EA และ %EI ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งทำการแปรผันความเข้มข้นน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร BSM ที่ 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5% ผลการทดลองพบว่ายีสต์ *I. orientalis* PO1.2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุดเท่ากับ 71.67%เมื่อเลี้ยงยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 ในอาหารที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร BSM

ตารางที่ 3 กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (%EA) ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ

ชนิดน้ำมัน	%EA				
	ความเข้มข้นน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
น้ำมันถั่วเหลือง	56.30	25.61	60.78	54.91	55.02
น้ำมันปาล์ม	74.00	45.83	47.89	50.24	40.56
น้ำมันรำข้าว	71.67	58.33	64.91	56.06	61.11
ชุดควบคุม	0	0	0	0	0

หมายเหตุ ชุดควบคุม หมายถึง อาหาร BSM ที่มีเชื้อ I. orientalis PO 1.2 แต่ไม่มีแหล่งคาร์บอน
%EA หมายถึง ร้อยละกิจกรรมการเกิดอิมัลชันเป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 4 กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (%EI) ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ

ชนิดน้ำมัน	%EA				
	ความเข้มข้นน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
น้ำมันถั่วเหลือง	31.20	20.83	21.57	22.91	21.14
น้ำมันปาล์ม	26.50	16.67	18.75	18.75	17.65
น้ำมันรำข้าว	33.18	21.57	22.92	25.00	21.57
ชุดควบคุม	0	0	0	0	0

หมายเหตุ ชุดควบคุม หมายถึง อาหาร BSM ที่มีเชื้อ I. orientalis PO 1.2 แต่ไม่มีแหล่งคาร์บอน
%EI หมายถึง ร้อยละกิจกรรมการเกิดอิมัลชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยทำการแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา พบว่าสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ 36 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรีย 25 และยีสต์ 11 ไอโซเลท โดยยีสต์ไอโซเลท PO 1.2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด นอกจากนี้เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับดีเอ็นเอ ยีสต์ไอโซเลท PO1.2 พบว่าโคโลนีมีลักษณะแบนราบ สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ในอาหารเหลว อาหารขุ่นและตกตะกอนที่ก้นหลอด มีการสร้างฟิล์มเหนืออาหาร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์รูปร่างของเซลล์เป็นรูปรี การเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว และการเพิ่มจำนวนแบบแตกหน่อ พิสูจน์เอกลักษณ์ยีสต์ไอโซเลท PO1.2 โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ 26S rDNA พบว่าคือเชื้อ *Issatchenkia orientalis* จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 ในอาหาร BSM ที่มีการใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่ายีสต์ *I. orientalis* PO1.2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.5% ได้ดีที่สุด คือ 63.60% นอกจากนี้เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึผิวชีวภาพของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 โดยวัดค่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification activity) ผลการทดลองพบว่ายีสต์ *I. orientalis* PO1.2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุดเท่ากับ 71.67% เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ *I.orientalis* PO1.2 ในอาหารที่มีการใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน

การย่อยสลายคราบน้ำมันเกิดจากการเมแทบอไลซ์ (metabolize) โดยยีสต์สามารถเมแทบอไลซ์ไฮโดรคาร์บอน ทั้งชนิดที่เป็นโครงสร้างแบบเส้นตรง (aliphatic) และที่เป็นวงแหวน (aromatic) จากนั้นไฮโดรคาร์บอนจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานเข้าสู่เซลล์ ซึ่งกลไกการใช้ไฮโดรคาร์บอน โดยการดูดซึมอัลเคน เข้าสู่เซลล์นั้น มีความสัมพันธ์กันกับความสามารถของจุลินทรีย์ในการปล่อยสารลดแรงตึงผิว (surfactant) โดยยีสต์มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวบางชนิดที่เป็นที่น่าสนใจ เช่น โซฟอโรลิพิด (sophorolipid), ลิโพซาน (Liposan), ลิโพมาแนน (Lipomanan) โดยปกติสารลดแรงตึงผิว (surfactant)และอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ส่วนใหญ่ผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมี อย่างไรก็ตามสารลดแรงตึงผิวอาจได้จากกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) นอกจากนี้ในปัจจุบันมลภาวะจากน้ำมันในทะเลพบทั่วไปยีสต์สามารถเมแทบอไลซ์ไฮโดรคาร์บอนนั้น หลังจากที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันลงไปในทะเล ยีสต์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากเดิมที่มีประมาณ 30-200 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเป็น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรซึ่งยีสต์ที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและปล่อยสารลดแรงตึงผิว คือ *Yarrowia lipolytica Candida guilliermondii Candida tropicalis Candida maltose Debaryomyces hansenii และ Rhodosporidium* [15] จากผลการศึกษาทดลองครั้งนี้ได้แยกและคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว อีกทั้งยังสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้อีกด้วย ฉะนั้นสามารถนำยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 นี้ไปใช้ในการกำจัดหรือบำบัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ซึ่งถือเป็นการแก้ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

เอกสารอ้างอิง

[1] Kitamoto, D., Isoda, H. and Nakahara, T. (2002). Functionsand potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering. 94**, 187-201.

[2] Kim, S.H., Lim, E.J., Lee, J.D. and Lee, T.H. (2000). Purification and characterization of biosurfactant from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. **31**, 249-253.

[3] Nadarajah N , Singh A and Ward O.P. (2001). De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. **Process Biochemistry**. **37**, 1135–1141.

[4] Vasudevan, N. and Rajaram, P. (2001). Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. **Environment International. 26**, 409-411.

[5] จิตติมา แก้วเรือง. (2551). **การแยกและคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้ในดิน**.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[6] Katemai, W., Maneerat, S., Kawai, F., Kanzaki, H., Nitoda, T. and H-Kittikun, A. (2008). Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Issatchenkia orientalis* SR4. **The Journal of General and Applied Microbiology**. **54**, 79-82.

[7] Mercadé, M. E., Monleón, L., de Andeés, C., Rodón, I.,Martinez, E., Espuny, M. J. and Manresa, A. (1996). Screening and selecting of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. **Journal of Applied Bacteriology**. **81**,161-166.

[8] Al-Sharidah, A., Richardt, A., Golecki, J. R., Dierstein, R. and Tadros, M. H. (2000). Isolation and characterization of two hydrocarbon-degrading *Bacillus subtilis* strains from oil contaminated soil of Kuwait. **Microbial Research. 155**, 157-164.

[9] Vasdinyei, R. and Deak, T. (2003). Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. **International Journal of Food Microbiology. 86**,123-130.

[10] Shirai, K., Hanzawa, N. and Katusta, M. (1995). Heavy oil degrading bacteria isolated by long term enrichment in alumina columns containing heavy oil C. Bioscience **Biotechnology and Biochemistry**. **59**, 2159–2161.

[11] Cooper,D.G., and Goldenberg, B.G. (1987). Surfactant-ative agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology. 53**, 224-229.

[12] Koma, D., Sakashita, Y., Kubota, K., Fujii, Y., Hasumi, F., Chung, S. Y. and Kubo, M. (2003). Degradation of car engine base oil by *Rhodococcus* sp.NDKK48 and *Gordonia* sp. NDNY76A. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. **67**, 1590-1593.

[13] Ghazali, F.M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B. and Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**. **54**, 61-67.

[14] Mandri, T. and Lin, J. (2007). Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazula-Natal, South Afica. **African Journal of Biotechnology**. **6**, 23-27.

[15] Spencer, J.F.T. and D.M. Spencer. (1997). Yeast in Natural and Artificial Habitats Ecology. **Where live yeast**. **11**, 33-58.