

## การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว Isolation of Waste Lubricating Oil-degrading Bacteria

จิตติมา กอหรั่งกุล<sup>1</sup> ศิริพร บัวเจริญ<sup>2</sup>

E-mail: Jittima@vru.ac.th

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องใช้แล้วจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว โดยเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนจากบริเวณอยู่ซ่อมรถในตำบลวังน้อย อำเภอน้ำขุ่น จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีลักษณะแตกต่างกันบนอาหารแข็ง Nutrient Agar ที่เคลือบผิวหน้าด้วยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วได้จำนวน 3 ไอโซเลตคือ Bfs1 Bfs2 และ Bfs3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใหม่และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตพบว่า แบคทีเรีย Bfs3 มีความสามารถในการย่อยสลายได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 48 ของการทดลอง จากการทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification activity) โดยใช้ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วพบว่า แบคทีเรียไอโซเลต Bf3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วได้ดีที่สุดเท่ากับ 80.32% เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน

**คำสำคัญ:** แบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว การย่อยสลายทางชีวภาพ

### Abstract

The objective of this study is to isolating waste lubricating oil-degrading bacteria from contaminated soil which collected from a garage in Tambon Wangnoi, Amphoe Wangnoi, Pranakornsiayuthaya Provinces. Three different bacteria colony were isolated on the Nutrient Agar plate that spread with waste lubricating oil and the selected isolates were named Bf1, Bf2 and Bf3. The degrading activity test with lubricating oil and waste lubricating oil of 3 bacteria isolates showed that Bf3 had the highest degrading activity at 48 hours of the experiment. Determination of emulsification activity (%EA) with waste lubricating oil showed that the isolate Bf3 can produce biosurfactant and showed the best %EA with waste lubricating oil at 80.32% when used 0.1% waste lubricating oil as a carbon source.

**Keywords:** lubricating oil-degrading Bacteria, waste lubricating oil, biodegradation

### ความเป็นมาของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ประสบกับปัญหาการปนเปื้อนน้ำมัน เนื่องจากประเทศไทยมีกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมจำนวนมาก น้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งเนื่องจากถูกใช้ในยานพาหนะ อุตสาหกรรมและกิจการอื่นๆ ทำให้เกิดน้ำมันที่ใช้น้ำมันแล้วเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก โดยมีปริมาณมากกว่า 230 ล้านลิตรต่อปี (กรมธุรกิจพลังงาน, 2554) และส่วนหนึ่งมีการปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมทำให้เกิดการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นที่เหลือจากการใช้งานทั้งในน้ำและพื้นดินซึ่งปัญหานี้ทำลายระบบนิเวศ (Geetha J. et al., 2013) ปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้ในการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม คือวิธีการทางกายภาพ วิธีการทางเคมี และวิธีการชีววิทยาหรือการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมัน ซึ่งวิธีทางชีววิทยาเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับที่สุดเพราะเป็นการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันต่างๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติอยู่แล้วโดยไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมดังเช่นวิธีทางเคมี และไม่ต้องมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานที่สูงดังเช่นวิธีทางกายภาพ (พงษ์สิทธิ์, 2547)

การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหรือสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ซึ่งไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมได้มีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การเกษตร และสิ่งแวดล้อม (Kitamoto D. et. al., 2002) เนื่องจากมีข้อได้เปรียบในเรื่องของความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพโดยไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม (Kim S.H. et. al., 2000) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิด มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้ง อิมัลซิฟิเคชัน (emulsification) และ ดี-อิมัลซิฟิเคชัน (de-

<sup>1</sup> อาจารย์สังกัดหลักสูตรนวัตกรรมชีวผลิตภัณฑ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

<sup>2</sup> นักศึกษาหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

emulsification) ซึ่งคุณสมบัติอิมัลซิฟิเคชันหมายถึงความสามารถในการเข้ากันได้ระหว่างน้ำกับน้ำมันซึ่งเป็นคุณสมบัติที่นำมาใช้ในการทำความสะอาดของอุปกรณ์ต่างๆ เช่น ถังเก็บน้ำมัน ท่อเก็บน้ำมัน เป็นต้น ส่วนคุณสมบัติอิมัลซิฟิเคชันได้ถูกนำมาใช้ในการลดสภาพของอิมัลชันที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Nadarajah N. et. al., 2001)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วมาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายต่อน้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อเป็นแนวทางในการกำจัดและแก้ไขปัญหามลพิษของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสิ่งแวดล้อมต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว
2. เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. วัตถุดิบ

ดินปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วจากบริเวณอู่ซ่อมรถจักรยานยนต์และรถยนต์ ในตำบลวังน้อย อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยเก็บตัวอย่างที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร ใส่ถุงพลาสติกและเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วจากอู่ซ่อมรถจักรยานยนต์และรถยนต์ ในตำบลวังน้อย อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

#### 2. การคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วดัดแปลงจากวิธีของ Geetha (2013)

ซึ่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ละลายในน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์ 9 มิลลิลิตร และนำไปปั่นผสม (Vortex) ตั้งทิ้งให้ตกตะกอน ปิเปตส่วนใส 2.5 มิลลิลิตรลงในอาหาร Luria Bertani Broth (LB) 50 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วลงไป 1% บ่มเชื้อโดยเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงหลอดเซนต์ปีทริกหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนต์ปีทริกที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสออกและล้างเซลล์ที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6-8) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้นละลายเซลล์กลับด้วยอาหาร LB ปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland (ประมาณ  $10^8$  CFU/ml) นำมาแยกเชื้อโดยการเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง (Nutrient Agar-NA) ที่ spread ด้วยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เลือกแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวนำมา streak ลงบนอาหารแข็งวันเอียงเพื่อทำการทดสอบต่อไป

#### 3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แบคทีเรียไอโซเลทที่คัดแยกได้จะนำมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทำการสังเกต ขนาด รูปร่าง และลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง NA ทำการศึกษาโดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) และย้อมสปอร์

#### 4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน ดัดแปลงจากวิธีของ พิรภานต์ (2552)

นำเชื้อที่แยกได้แต่ละไอโซเลทมาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) โดยใช้หัวง่ายเชื้อแต่ละโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อบนอาหาร NA ลงใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยมีขวดที่ไม่ใส่เชื้อเป็นชุดควบคุม วัดปริมาณเชื้อในแต่ละขวดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) ให้ได้ 0.5 จากนั้นเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปขวดละ 2 มิลลิลิตร นำไปเขย่าต่ออีก 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตปริมาณน้ำมันบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ สี และความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการสังเกตทุกๆ 24 ชั่วโมง และทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงกับชุดควบคุม (รัฐพร, 2541) โดยมีการกำหนดระดับความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดังนี้

ระดับ 0 ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ระดับ + ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าอาหารเปลี่ยนแปลงไป คือ น้ำมันแตกตัวออกเป็นเม็ดน้ำมันขนาดใหญ่และมีบางส่วนยังไม่แตกตัว

ระดับ ++ ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าอาหารเปลี่ยนแปลงไปโดยน้ำมันแตกตัวเป็นเม็ดขนาดเล็กและจับตัวกันที่ข้างๆ ขวด

ตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 1 (พริกานต์, 2552)



ชุดควบคุม (ระดับ 0)



ระดับ +



ระดับ ++

ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปแบบของน้ำมัน

## 5. การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง (ให้ถึงความขุ่นเมื่อวัดด้วยการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5) เพื่อใช้เป็นกล่าเชื้อ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อที่แยกได้ 10% ลงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน ปั่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (ดัดแปลงจาก Katemai W., (2008)) แล้วนำส่วนใสมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 5.1 การทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification index) (วิชุดา และคณะ, 2553)

ปิแต่น้ำมันที่ต้องการทดสอบปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีไอโซเลตที่ต้องการทดสอบปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 2 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการวัดความสูงของของเหลวทั้งหมด และของเหลวที่เกิดอิมัลชันด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ ทำการบันทึกผลความคงตัวของการเกิดอิมัลชัน ค่าที่ได้เรียกว่า %EA และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลความคงตัวของการเกิดอิมัลชัน และคำนวณกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (%) ค่าที่ได้เรียกว่า %EI การคำนวณหากิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (%) แสดงดังสมการ

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

## ผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ในอาหาร NA ที่ spread ด้วยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว ได้ 3 ไอโซเลต โดยสังเกตจากลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 และให้ชื่อว่า Bfs1 Bfs2 และ Bfs3

ตารางที่ 1 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรีย	ไอโซเลต		
	Bfs1	Bfs2	Bfs3
สีของโคโลนี	ครีมขุ่น	ครีมขาวขุ่น	ครีมขาวขุ่น
รูปร่าง	กลม	กลม	กลม
ลักษณะขอบ	หยักเป็นคลื่น	เรียบ	ไม่สม่ำเสมอ
ระดับผิวโคโลนี	โค้งนูน	โค้งนูน	แบนราบ
ลักษณะผิวหน้า	มันวาว	ขุ่นทึบ	แห้งด้าน

จากศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยสังเกตลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียโดยวิธีการย้อมแกรม การย้อมสปอร์ และดูลักษณะการเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วโดยวิธีการย้อมแกรมและลักษณะการเรียงตัวของแบคทีเรียที่กล้องจุลทรรศน์

ไอโซเลต	การย้อม		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	
	การย้อมแกรม	สปอร์	รูปร่าง	การเรียงตัว
Bfs1	ลบ	ไม่มี	ท่อนยาว (Rod)	เรียงตัวต่อกันเป็นลูกโซ่เส้นยาว
Bfs2	ลบ	ไม่มี	กลม (Coccus)	เรียงตัวเกาะกันเป็นกลุ่มลักษณะคล้ายพวงอุ้ง
Bfs3	บวก	มี	ท่อนยาว (Rod)	เรียงตัวต่อกันเป็นลูกโซ่เส้นยาว

จากตารางที่ 2 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต Bfs1 ย้อมติดสีแดงเป็นแกรมลบ ย้อมไม่ติดสปอร์ มีรูปร่างเป็นท่อนยาวเรียงตัวต่อกันเป็นลูกโซ่ ไอโซเลต Bfs2 ย้อมติดสีแดง เป็นแกรมลบ ย้อมไม่ติดสปอร์ มีรูปร่างกลมเรียงตัวเกาะกันเป็นกลุ่มลักษณะคล้ายพวงอุ้ง และไอโซเลต Bfs3 ย้อมติดสีม่วงเป็นแกรมบวก ย้อมติดสปอร์ มีรูปร่างเป็นท่อนยาวเรียงตัวต่อกันเป็นลูกโซ่

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน โดยศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใหม่ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 2% ในอาหาร NB 100 มิลลิกรัมและมีชุดควบคุมคืออาหาร NB ที่ไม่ได้ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตแสดงดังตารางที่ 3 และตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใหม่

เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ไอโซเลต		
		Bfs1	Bfs2	Bfs3
0	0	0	0	0
24	0	0	+	+
48	0	+	+	++
72	0	++	++	++

ตารางที่ 4 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เครื่องยนต์ใช้แล้ว

เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ไอโซเลต		
		Bfs1	Bfs2	Bfs3
0	0	0	0	0
24	0	+	+	+
48	0	+	+	++
72	0	++	++	++

หมายเหตุ: ระดับ 0 ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ระดับ + ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าอาหารเปลี่ยนแปลงไป คือ น้ำมันแตกตัวออกเป็นเม็ดน้ำมันขนาดใหญ่และมีบางส่วนยังไม่แตกตัว

ระดับ ++ ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าอาหารเปลี่ยนแปลงไปโดยน้ำมันแตกตัวเป็นเม็ดขนาดเล็กและจับตัวกันที่ข้างๆ ขวด

จากตารางที่ 3 และตารางที่ 4 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใหม่และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วในช่วงเวลาที่ต่างกัน พบว่าไอโซเลต Bfs1 และ Bfs2 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ทั้ง 2 ชนิด ในระดับ ++ ในชั่วโมงที่ 72 และไอโซเลต Bfs3 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ทั้ง 2 ชนิด ในระดับ ++ ได้ในชั่วโมงที่ 48

การทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชันในอาหาร NB ที่ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 กิจกรรมการเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว

ไอโซเลต	%EA	%EI
Bfs1	61.98 <sup>b</sup>	58.23 <sup>b</sup>
Bfs2	54.73 <sup>a</sup>	47.57 <sup>a</sup>
Bfs3	80.32 <sup>c</sup>	79.32 <sup>c</sup>

หมายเหตุ: %EA หมายถึง ร้อยละกิจกรรมการเกิดอิมัลชันเป็นเวลา 10 นาที

%EI หมายถึง ร้อยละกิจกรรมการเกิดอิมัลชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงข้อมูลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

จากการทดสอบวัดค่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชันพบว่า ไอโซเลท Bfs3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วได้ดีที่สุดโดยได้ค่า %EA และ %EI เท่ากับ 80.32 และ 79.32 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชันของไอโซเลท Bfs3 กับไอโซเลท Bfs1 และ Bfs2 พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

## อภิปรายผล

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท Bsf1 พบว่า ลักษณะโคโลนีโค้งนูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบหยักเป็นคลื่น ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างของเซลล์เป็นท่อนยาว การเรียงตัวเป็นสายโซ่ ย้อมติดแกรมลบ ไม่พบสปอร์ ไอโซเลท Bsf2 มีลักษณะโคโลนีโค้งนูน ผิวหน้าขุ่นทึบ สีครีมขาวขุ่น ขอบเรียบ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งนัย ย้อมติดแกรมลบ ไม่พบสปอร์ และไอโซเลท Bsf3 มีลักษณะโคโลนีแบนราบ ผิวหน้าแห้งด้าน สีครีมขาวขุ่น ขอบไม่สม่ำเสมอ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างเป็นท่อนยาว เรียงตัวเป็นสายโซ่ ย้อมติดแกรมบวก ย้อมติดสปอร์ จากผลการทดลองลักษณะทางสัณฐานวิทยาคาดว่า ไอโซเลท Bfs1 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็น *Pseudomonas* sp. ไอโซเลท Bfs2 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็น *Staphylococcus* sp. และ ไอโซเลท Bfs3 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็น *Bacillus* sp. ซึ่งการบ่งชี้ชนิดของเชื้อควรควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการทดสอบทางชีวเคมีและลำดับดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของเชื้อที่ชัดเจนต่อไป จากงานวิจัยของ สุวัฒน์ศักดิ์ ด่านศักดิ์ (2551) ได้ทำการศึกษาระสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำพบว่าแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง และไม่มีสปอร์ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายย่อยสลายได้ดี และเมื่อนำไปศึกษาทางเคมีพบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* การศึกษาของ Prasad และ Manjnath (2011) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสเพื่อใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำเสียที่มีไขมันได้คือ *Bacillus subtilis* มีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นแกรมบวก มีสปอร์รูปร่างท่อนยาว และ *Staphylococcus aureus* มีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นแกรมลบ รูปร่างกลม ซึ่งแยกได้จากน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และน้ำเสียชุมชน

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใหม่และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว จากผลเปรียบเทียบลักษณะของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อในตารางที่ 3 และ 4 พบว่า มี 2 ไอโซเลทที่มีลักษณะของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับ ++ (ลักษณะของน้ำมันแตกตัวเป็นเม็ดขนาดเล็กและจับตัวกันที่ข้างๆ ขวด) ในช่วงเวลาที่ 72 คือ Bfs1 และ Bfs2 และพบว่าไอโซเลท Bfs3 มีลักษณะของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับ ++ ในช่วงเวลาที่ 48 ของการทดลอง จากการที่น้ำมันบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะรูปแบบที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแรงตึงผิว คือ แรงดึงดูดและแรงยึดเหนี่ยวโมเลกุลบนพื้นผิวของของเหลวหรือผิวของของแข็ง ซึ่งปกติแล้วน้ำและน้ำมันจะแยกชั้นกัน โดยน้ำมันจะลอยอยู่ส่วนบนของน้ำ น้ำมันจะมีแรงตึงผิวและพันธะในตัวเองและพันธะกับวัตถุอื่นที่แข็งแรงกว่าน้ำ ทำให้น้ำมันยึดเกาะติดกับวัตถุอื่นได้ดีกว่าน้ำ (พีระกานต์ และคณะ 2552) ลักษณะของน้ำมันมีการแตกตัวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bento *et al.* (2004) กล่าวว่า สาร biosurfactant ที่แบคทีเรียผลิตออกมาสามารถย่อยสลายน้ำมันได้บางส่วน แสดงว่าแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นผลิตสาร biosurfactant จึงทำให้น้ำมันแตกตัวได้ดี ไม่รวมกันเป็นแพปกคลุมผิวหน้าอาหาร ซึ่งวิธีการศึกษาเช่นนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ ปิยพรรณ (2550) และ อัญชลี (2550) ที่ได้ทำการศึกษาศามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำมันเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยวัดค่า %EA และ %EI ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 ผลการทดลองพบว่าไอโซเลท Bfs1 Bfs2 และ Bfs3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และไอโซเลท Bfs3 เกิดอิมัลชันต่อน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วได้ดีที่สุดเท่ากับ 80.32% ในอาหารที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน การย่อยสลายคราบไขมันเกิดจากการเมแทบอลิซึม (metabolize) โดยแบคทีเรียสามารถเมแทบอลิซึมไฮโดรคาร์บอนจากนั้นไฮโดรคาร์บอนจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานเข้าสู่เซลล์ (Punniyakotti, 2017) ซึ่งกลไกการดูดซึมเข้าสู่เซลล์นั้นมีความสัมพันธ์กันกับความสามารถของจุลินทรีย์ในการปล่อยสารลดแรงตึงผิว ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มพื้นที่ผิวของไฮโดรคาร์บอนและทำให้เกิดกิจกรรมอิมัลชันได้ง่ายขึ้น ปรากฏการณ์นี้ช่วยเพิ่มการดูดซึมไฮโดรคาร์บอนสำหรับการย่อยสลายของจุลินทรีย์เนื่องจากการละลายน้ำที่เพิ่มขึ้นของไฮโดรคาร์บอน (Banat *et al.*, 2014) การเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมโดยอาศัยคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มีการศึกษาจากหลายกลุ่มของแบคทีเรียอย่างเช่น *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* (Cameotra and Makkar, 2010 และ Abbasia *et al.*, 2016)



## สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วพบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้ 3 ไอโซเลท คือ Bfs1 Bfs2 และ Bfs3 จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์คาดว่า ไอโซเลท Bfs1 น่าจะเป็น *Pseudomonas* sp. ไอโซเลท Bfs2 น่าจะเป็น *Staphylococcus* sp. และ ไอโซเลท Bfs3 น่าจะเป็น *Bacillus* sp. จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใหม่และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วและการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวพบว่าไอโซเลท Bfs3 มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ได้ดีที่สุดในระดับ ++ ในช่วงเวลาที่ 48 ของการทดลอง และสามารถเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วได้ดีที่สุดเท่ากับ 80.32% ในอาหารที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน

## ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อบ่งชี้ชนิดของเชื้อที่แยกได้ และศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายของแต่ละไอโซเลท

## เอกสารอ้างอิง

- กรมธุรกิจพลังงาน. (2554). คู่มือองค์ความรู้เกี่ยวกับน้ำมันหล่อลื่น เรื่อง โครงการจัดการความรู้เกี่ยวกับน้ำมันหล่อลื่น. <<https://www.doeb.go.th/kmv2/knowledge/manual-lub160859.pdf>> (สืบค้นวันที่ 10 มกราคม).
- ปิยะพรรณ สัมยก. (2550). การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- พงษ์สิทธิ์ บุญรักษา. (2547). ปัญหาน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วกับแนวทางการจัดการในประเทศไทย. วารสาร มจร.วิชาการ. 8(15), 59-69.
- พืรงานต์ บรรเจิดกิจ, สมคิด ดิจจริง และ รัฐพร จันทรเดช. (2552). การเลือกและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน(รายงานการวิจัย). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- รัฐพร จันทรเดช. (2541). การคัดแยกและเตรียมดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วิชุดา เกตุใหม่, เสาวภา แก้วสุกใส, และ ลีชา แยนนา. (2553). การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 12(3), 202-213.
- สุวัฒน์ศักดิ์ ด่านศักดิ์ดา. (2551). การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียของโรงงานปลาต้ม. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- อัญชลี สะอาดเอี่ยม. (2550). การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งดินธรรมชาติที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว. ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj, M., and Naidu, R. (2016). A review on the genetics of aliphatic and aromatic hydrocarbon degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 178, 224–250. doi: 10.1007/s12010-015-1881-y
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., and Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, 5, 697.
- Bento, F.M., F.A. de. O., Camago, B.C., Okeke and W.T. Frankenberger Jr. (2004). Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*. 160, 249-255.
- Cameotra, S. S., and Makkar, R. S. (2010). Biosurfactant-Enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. *Journal of Biotechnology*. 82, 97–116. doi: 10.1351/PAC-CON-09-02-10
- Geetha S.J., Sanket J. Joshi and Shailesh K. (2013). Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacterial isolate from oil contaminated site. *APCBEE Procedia*. 5, 237-241.

- Katamai, 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.
- 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.
- Kitamoto, D., Isoda, H. and Nakahara, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 94, 187-201.
- Nadarajah N., Singh A. and Ward O.P. (2001). De-emulsification of petroleum oil emulsion by mixed bacterial culture. **Process Biochemistry**. 26, 409-411.
- Prasad, M.P., and Manjunath, K. (2011). Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. **Indian Journal of Biotechnology**. 10, 121-124.
- Punniyakotti, P., Elumalai, P., Laura, L.M., Pattanathu, K.S.M., Kadarkarai, M. and Aruliah, R. (2017). Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. **Frontiers in Microbiology**. 8, 1-14.