

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

Isolation of Waste Lubricating Oil-degrading Microorganisms

วิชาดา เกตุใหม่^{1*} เสาวภา แก้วสุกใส² และลีซา แยน²

Wichuda Katemai^{1*}, Soawapa Kaewsuksai² and Leesa Yaena²

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 โดยเมื่อนำส่วนในมาทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification activity) โดยใช้น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าว พบว่า เชื้อ *I. orientalis* PO1.2 มีประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุดเท่ากับ 71.67 % ในอาหารที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ยีสต์
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

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] เนื่องจากสารลดแรง

ตึงผิวชีวภาพมีข้อได้เปรียบในเรื่องของความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพโดยไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และสามารถทำงานภายใต้สภาวะที่วิกฤติ (extreme condition) ได้ [2] สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิด มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้ง อิมัลซิฟิเคชั่น (emulsification) และดี-อิมัลซิฟิเคชั่น (de-emulsification) ซึ่งคุณสมบัติอิมัลซิฟิเคชั่นหมายถึงความสามารถในการเข้ากันได้ระหว่างน้ำกับน้ำมัน คุณสมบัตินี้เองทำให้น่ามาใช้ในการทำความสะอาดอุปกรณ์ต่างๆ เช่น ถังเก็บน้ำมัน ท่อส่งน้ำมัน เป็นต้น ส่วนคุณสมบัติดีอิมัลซิฟิเคชั่นได้ถูกนำมาใช้ในการลดสภาพของอิมัลชันที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม [3] Vasudevan และ Rajaram [4] ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินโดยใช้เทคนิค bioaugmentation พบว่าการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียจะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย 40% หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 90 วัน และเมื่อเติมสารอาหารอนินทรีย์ร่วมกับการเติมกล้าเชื้อจะให้ประสิทธิภาพในการ

ย่อยสลาย 65% นอกจากนี้จากการคัดเลือกรุ่นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วบริเวณอุโมงค์มรดกและปั้มน้ำมันในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช 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]

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นคณะวิจัยจึงสนใจทำการแยกและคัดเลือกรุ่นเชื้อจุลินทรีย์ในดินบริเวณพื้นที่จังหวัดสงขลาที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายต่อน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งวิธีนี้อาจจะช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับระบบนิเวศ และลดต้นทุนในการใช้สารเคมีลงได้

อุปกรณ์และวิธีการ

วัตถุดิบ

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

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว จากร้านซ่อมรถยนต์อู่โชค อำเภอบางปะอิน จังหวัดพิจิตร

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

การแยกและคัดเลือกรุ่นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

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] ปิเปิดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยทำการเจือจางแบบ serial dilution ในช่วง 10^{-1} ถึง 10^{-5} ลงบนอาหาร NA (ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะชนิดแอมพิเทอริซิน บีเพื่อยับยั้งเชื้อรา) 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 และลำดับดีเอ็นเอของ เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

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

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและประสิทธิภาพการผลิตสาร ลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหาร NB หรือ YMB เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (มีความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5) เพื่อใช้เป็นก๊อปปี้ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อที่แยกได้ 10% ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร BSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 0.1 0.5 และ 1% เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ ทำการทดลอง 3 ขั้ว บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (คัดแปลงจาก Katemai) [6] แล้วนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน และนำส่วนใสมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัดกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน %EA และ %EI ต่อ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าว

วิธีวิเคราะห์

ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

วิธีชั่งหาน้ำมันหนักน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่หายไป (Weight loss method) โดยสกัด Culture broth ด้วยเฮกเซน ในอัตราส่วน 1:1 ทำการสกัด 2 ครั้ง แล้วนำส่วนของตัวทำละลายมากำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4 ทำแห้งตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ 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)]

ปีเปิดน้ำมันที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการวัดความสูงของของเหลวทั้งหมด และของเหลวที่เกิดอิมัลชันด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ ทำการบันทึกผลความคงตัวของสารเกิดอิมัลชัน และคำนวณ % กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน ค่าที่ได้เรียกว่า %EA และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลความคงตัวของสารเกิดอิมัลชัน และคำนวณกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน(%) ค่าที่ได้เรียกว่า %EI [11] การคำนวณหา กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน(%) แสดงดังสมการ

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

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการแยกและคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ สูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

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% จากการสังเกตลักษณะของอาหารเหลวในพลาสติกที่มีการเติมยีสต์ไอโซเลท PO1.2 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมยีสต์ จากการสังเกตพลาสติกที่มีการเติมยีสต์ไอโซเลท PO1.2 จะมีลักษณะขุ่นทั้งพลาสติก ไม่มีน้ำมันเกาะอยู่ที่ผิวหรือที่ขอบพลาสติก ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่มีน้ำมันลอยอยู่ที่ผิวหน้าและบริเวณขอบพลาสติก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Katemai [6] ซึ่งแยกยีสต์จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าสามารถแยกยีสต์ได้ 81 ไอโซเลท ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารที่มี weathered crude oil (WCO เป็นแหล่งคาร์บอน โดย 5 ไอโซเลทสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำกว่า 60 มิลลินิวตันต่อเมตร

เมื่อใช้กลูโคส WCO n-hexadecane หรือไขมัน เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ Koma และคณะ [12] แยกเชื้อจากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ และส่วนของ cyclic alkane ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน พบว่ามี 2 สายพันธุ์คือ 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) จากการศึกษานี้ก็กล่าวได้ว่ายีสต์ไอโซเลท PO1.2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว อีกทั้งยังสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดอีกด้วย ดังนั้นจึงนำยีสต์ไอโซเลท PO1.2 ไปศึกษาในขั้นต่อไป

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้ แล้ว (%)	ไอโซเลท	ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)
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

ไอโซเลท	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

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับ ดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ
ยีสต์ไอโซเลท PO1.2 พบว่า ลักษณะโคโลนีบนราบ
ผิวหน้าด้าน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ และการเจริญใน
อาหาร YMB อาหารจะขุ่นและตกตะกอนที่ก้นหลอด
มีการสร้างฟิล์มเหนื่ออาหาร นอกจากนี้ลักษณะ
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อยีสต์ไอโซเลท PO1.2
มีรูปร่างของเซลล์เป็นรูปรี การเรียงตัวของเซลล์จะ
เดี่ยว และเพิ่มจำนวนแบบแตกหน่อเมื่อศึกษาลำดับ
เบสของดีเอ็นเอโดยใช้ 26S rDNA Sequencing พบว่า
ยีสต์ไอโซเลท PO1.2 มีความใกล้เคียง 99% กับเชื้อ
Issatchenkia orientalis

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน หล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและประสิทธิภาพการ ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน
หล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยยีสต์ *I. orientalis*
PO1.2 ในอาหาร BSM ที่ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์
ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.1% และมีชุดควบคุมคือ
อาหาร BSM ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่
ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% แต่ไม่มีการเติมยีสต์
I. orientalis PO1.2 พบว่ายีสต์ *I. orientalis* PO1.2
มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่อง
ยนต์ที่ใช้แล้ว โดยการหาน้ำหนักที่หายไปของน้ำมัน

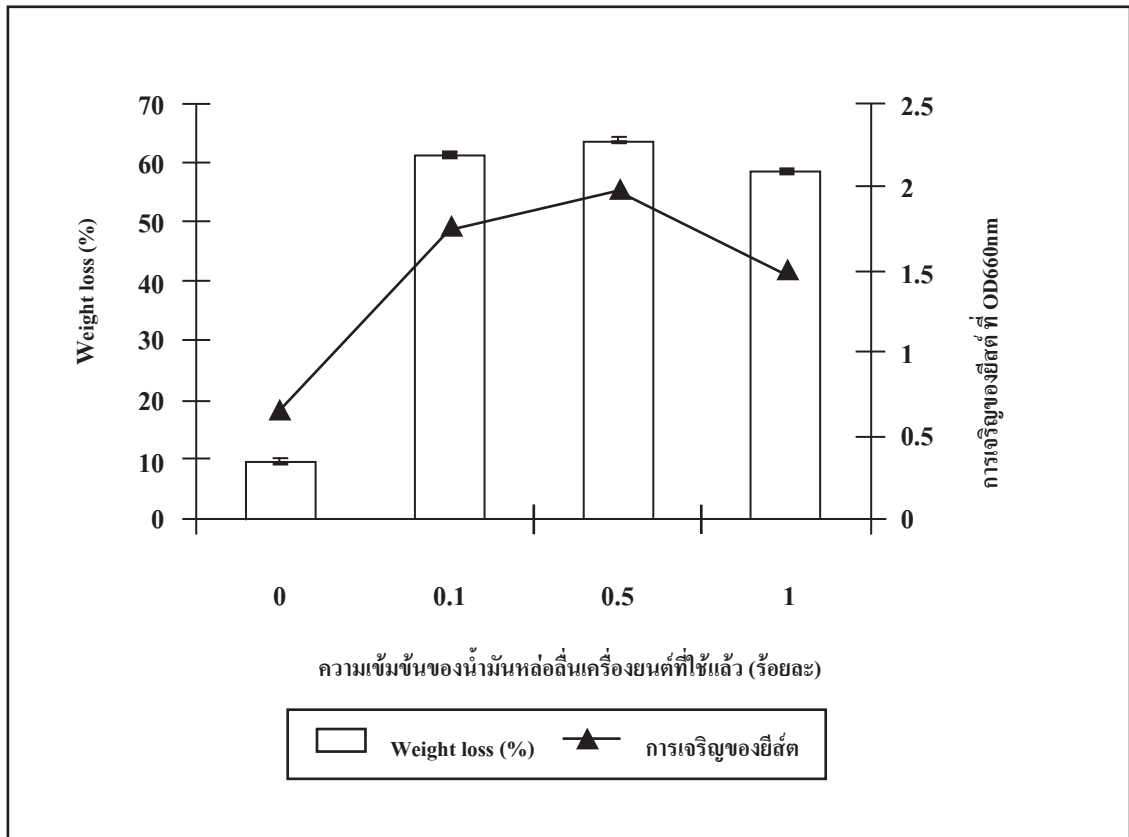
หล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Weight loss) ในอาหาร
BSM ที่ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความ
เข้มข้น 0.1% เท่ากับ 61.30% ในขณะที่ชุดควบคุม
ที่ไม่มีการเติมยีสต์ มีค่า weight loss เท่ากับ 9.25%
ที่ผลการทดลองในชุดควบคุมเป็นเช่นนั้นจะมีสาเหตุ
มาจากการระเหย หรือการเกิดปฏิกิริยา photochemical
oxidation ที่ส่งผลให้น้ำหนักของน้ำมันหล่อลื่น
เครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหายไป [13]

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย
น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ที่ความเข้มข้น
0.1 0.5 และ 1% และมีชุดควบคุม คือ อาหาร BSM
ที่ไม่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว แต่มีการ
เติมยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 พบว่ายีสต์ *I. orientalis*
PO1.2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น
เครื่องยนต์ ที่ใช้แล้ว โดยการหาน้ำหนักที่หายไปของ
น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Weight loss) กับวัด
การเจริญเติบโตของยีสต์ควบคู่กัน แสดงดังรูปที่ 1
ซึ่งจากผลศึกษานี้ก็กล่าวได้ว่ายีสต์ *I. orientalis*
PO1.2 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์
ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.5% ได้ดีที่สุดและยีสต์
I. orientalis PO1.2 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดด้วย
ในขณะที่ชุดควบคุมทุกความเข้มข้นยีสต์มีการเจริญ
เติบโตน้อยมาก รวมถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลาย
น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วก็ต่ำเช่นกัน ซึ่งแตกต่าง
จากรายงานของ Mandri และ Lin [14] ที่แยกเชื้อที่

สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จากดิน
 ที่ปนเปื้อนน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell-Haas
 ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 10% พบว่า
 สามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย
 สูงสุด 3 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter calcoaceticum*,
Pseudomonas aeruginosa และ *Flavobacterium*
sp. โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายหลังจาก
 เลี้ยงเชื้อ 28 วันได้ 84, 71 และ 60% ตามลำดับ

นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพ
 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *I. orientalis*

PO1.2 โดยวัดค่า %EA และ %EI ผลการทดลอง
 แสดงดังตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งทำการแปรผัน
 ความเข้มข้นน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว
 ในอาหาร BSM ที่ 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5% ผลการ
 ทดลองพบว่ายีสต์ *I. orientalis* PO1.2 สามารถผลิต
 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และเกิดอิมัลชันต่อ
 น้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุดเท่ากับ 71.67% เมื่อเลี้ยงยีสต์
I. orientalis PO1.2 ในอาหารที่มีการเติมน้ำมัน
 หล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% เป็น
 แหล่งคาร์บอน



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

จากการทดลองแยกและคัดเลือกรูปร่างของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยทำการแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอำเภอลาดหญ้า 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 มีการสร้างฟิล์มเหนียวอาหาร 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% ได้ดีที่สุดคือ 63.60% นอกจากนี้เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อยีสต์ *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

การย่อยสลายคาร์บอนน้ำมันเกิดจากการเมแทบอลิซึม (metabolize) โดยยีสต์สามารถ

เมแทบอลิซึมไฮโดรคาร์บอน ทั้งชนิดที่เป็นโครงสร้างแบบเส้นตรง (aliphatic) และที่เป็นวงแหวน (aromatic) จากนั้นไฮโดรคาร์บอนจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานเข้าสู่เซลล์ ซึ่งกลไกการใช้ไฮโดรคาร์บอน โดยการดูดซึมอัลเคน เข้าสู่เซลล์นั้น มีความสัมพันธ์กันกับความสามารถของจุลินทรีย์ในการปล่อยสารลดแรงตึงผิว (surfactant) โดยยีสต์มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวบางชนิดที่เป็นที่น่าสนใจ เช่น โซฟอโรลิพิด (sophorolipid), ลิโปซาน (Liposan), ลิพومانาน (Lipomanan) โดยปกติสารลดแรงตึงผิว (surfactant) แอลิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ส่วนใหญ่ผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมี อย่างไรก็ตามสารลดแรงตึงผิวอาจได้จากกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) นอกจากนี้ในปัจจุบันมลภาวะจากน้ำมันในทะเลพบทั่วไปยีสต์สามารถเมแทบอลิซึมไฮโดรคาร์บอนนั้น หลังจากที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันลงไปในทะเล ยีสต์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากเดิมที่มีประมาณ 30-200 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเป็น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรซึ่งยีสต์ที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและปล่อยสารลดแรงตึงผิว คือ *Yarrowia lipolytica* *Candida guilliermondii* *Candida tropicalis* *Candida maltose* *Debaryomyces hansenii* และ *Rhodospiridium* [15] จากผลการศึกษาทดลองครั้งนี้ได้แยกและคัดเลือกรูปร่างของยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว อีกทั้งยังสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้อีกด้วย ฉะนั้นสามารถนำยีสต์ *I. orientalis* PO1.2 นี้ไปใช้ในการกำจัดหรือบำบัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ซึ่งถือเป็นการแก้ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

เอกสารอ้างอิง

- [1] 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.
- [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., Martínez, 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-active 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 Africa. **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.