รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน

Biodiversity of waste lubricating oil-degrading bacteria in soil

โดย ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์ และคณะ

พฤษภาคม 2551 เสร็จโครงการ

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน

Biodiversity of waste lubricating oil-degrading bacteria in soil

โดย ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์ และคณะ

พฤษภาคม 2551 เสร็จโครงการ

รหัสโครงการ BRT R_150005

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน

Biodiversity of waste lubricating oil-degrading bacteria in soil

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์ ศูนย์จุลินทรีย์แห่งประเทศไทย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
3. น.ส.จิตติมา แก้วเรือง คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT R_150005

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจากบริเวณอู่ซ่อมรถและสถานีเติมน้ำมันในจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานีและสงขลา ในการแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยวิธี enrichment culture โดยนำตัวอย่างดิน 1 กรัม เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salt medium ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและตรวจสอบกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยวิธี weight loss พบว่า กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุด คือ กลุ่มเชื้อ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40 ภายในเวลา 5 วันของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC-9 มาแยกเชื้อให้เป็นเชื้อเดี่ยว พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 4 ไอโซเลต เป็นแกรมบวก มีรูปร่างแบบแท่ง 2 ไอโซเลต และอีก 2 ไอโซเลต เป็นแกรมลบ มีรูปร่างกลมและรูปร่างแบบแท่ง เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA สามารถจำแนกเชื้อเป็น *Chryseobacterium* sp., Bacillus cereus, *Sphingobacterium multivorum* และ *Agrobacterium tumefaciens*

Abstract

Consortia of waste lubricating oil degrading microorganisms were isolated from oil contaminated soil collected from garages and petrol stations in Nakhonsithammarat, Songkhla and Suratthani Provinces. An enrichment culture technique was used for the isolation of microorganisms responsible for the biodegradation of waste lubricating oil. One gram of soil sample was added into mineral salt medium containing 1% waste lubricating oil as sole carbon source. Waste lubricating oil degradation activity was measured by weight loss method. The most active consortia in the assimilation of waste lubricating oil was SC-9. The SC-9 consortia showed 40.46% oil degrading activity within 5 days. The SC-9 consortia contained four bacterial isolates, two isolates were Gram-positive, rod shaped and the other was Gram-negative, cocci and rod shape. Determination of the nucleotide sequence of the gene encoding 16S rDNA of the four bacterial strains was identified as *Chryseobacterium* sp., Bacillus cereus, *Sphingobacterium multivorum* and *Agrobacterium tumefaciens*.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

การปนเปื้อนน้ำมันเครื่องหรือน้ำมันหล่อลื่นในดินหรือในแหล่งน้ำมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเมื่อไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะมีการรวมตัวหรือเกาะติดกับสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ต่างๆ ซึ่งจะทำให้การย่อยสลายยากมากยิ่งขึ้นและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว การกำจัดไฮโดรคาร์บอนซึ่งปนเปื้อนในธรรมชาติมีหลายวิธีแต่การกำจัดโดยวิธีชีววิธี (bioremediation) เป็นวิธีที่ได้นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีค่าใช้จ่ายน้อย และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งไม่เป็นพิษ แบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันได้หลายชนิดซึ่งแบคทีเรียเหล่านั้นเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในสถานที่ที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหล่านั้น ด้วยเหตุนี้การกำจัดมลพิษด้วยชีววิธีจึงมีเป็นไปได้สูงในการกำจัดคราบน้ำมันดิบหรือน้ำมันหล่อลื่นต่างๆ ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้สูงเพื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์ และเก็บสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไว้เพื่อที่จะได้ใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

Executive Summary

Waste or used lubricating oils have become a serious environmental problem. Once in the environment, waste oil can bind to organic matter, mineral particles and organisms. This fact can play an important role in the persistence and toxicity of oil components. Hydrocarbon assimilation has many methods however, bioremediation is promising method because effective, lower cost than other technologies and final products are water and carbon dioxide. Hydrocarbon microbiology research has supported the hypothesis that hydrocarbons and its derivatives are amenable to microbial degradation; microorganisms possessing this potential are widespread in many environments. The ability of microbial communities to adapt to contaminants is evident from contaminated zones. According to those reason, it has high possibility to use bioremediation to eliminate spilled oil or waste lubricating oil in environment. Therefore, this research aims to isolate and screen waste lubricating oil-degrading bacteria from soil. Bacterial strains which exhibit high degradation activity will be selected and identified and kept the selected strains for use in the future.

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 : (a) เจริญบนอาหาร Nutrient agar, (b) เจริญบนอาหาร mineral salt medium agar ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1	15
2	ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 โดย 16S rDNA	15

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร mineral salt หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน	13
2	แผนภูมิต้นไม้ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SC9-1, SC9-2, SC9-3 และ SC9-4	16

บทนำ

ประเทศไทยมีการใช้น้ำมันหล่อลื่นเป็นจำนวนมากทั้งในอุตสาหกรรมและการคมนาคม พบว่าในปี 2540 มีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วรวมทั้งประเทศประมาณ 329 ล้านลิตร สามารถจัดเก็บได้เพียง 219 ล้านลิตร หรือร้อยละ 66 โดยการจัดเก็บรวบรวมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์อีกครั้ง เช่น ใช้ผสมน้ำมันเตาเป็นเชื้อเพลิง ใช้หล่อลื่นโซ่หรือทากันปลวก เป็นต้น ส่วนอีกกว่า 100 ล้านลิตร หรือร้อยละ 34 คาดว่ามีการจัดเก็บรวบรวมไว้ใช้ประโยชน์หรือเททิ้งในลักษณะที่ไม่เหมาะสม เช่น ทิ้งลงในแหล่งน้ำ บริเวณที่อยู่อาศัย พื้นที่เกษตรกรรม (พนัส งามกนกวรรณ, 2545) ซึ่งก่อให้เกิดมลพิษสะสมในต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว

การปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินหรือแหล่งน้ำเป็นปัญหาหนึ่งที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเมื่อสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะมีการรวมตัวหรือเกาะติดกับสารอินทรีย์ต่างๆ ทำให้การย่อยสลายยากยิ่งขึ้นและมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Mercadé *et al.*, 1996) โดยสาเหตุใหญ่ที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อม คือ การขาดความระมัดระวังและความรับผิดชอบของผู้ใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ เช่น การเททิ้งลงสู่แหล่งดินหรือท่อระบายน้ำหลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำมันเครื่อง การหกสะสมของน้ำมันเครื่องและผลิตภัณฑ์น้ำมันอื่นๆ ภายในบริเวณสถานีบริการน้ำมันหรืออู่ซ่อมรถยนต์ เป็นต้น

การกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนซึ่งปนเปื้อนในธรรมชาติมีหลายวิธีแต่การกำจัดโดยชีววิธี (bioremediation) เป็นวิธีที่นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ค่าใช้จ่ายน้อย และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งไม่เป็นพิษ (Leahy and Colwell, 1990) แบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านั้นเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในสถานที่ที่มีการปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอนดังกล่าว ด้วยเหตุนี้การกำจัดมลพิษด้วยชีววิธีจึงมีความเป็นไปได้สูงในการกำจัดคราบน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Atlas and Atlas, 1991; Balba *et al.*, 1998) โดยการเติม จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนชนิดนั้นๆ ลงไปโดยตรง (bioagumentation) (van Hamme *et al.*, 2003) ซึ่งการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือสารก่อมลพิษต่างๆ จะมีประสิทธิภาพดีขึ้นเมื่อมีการทำงานร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ (Vasudevan and Rajaram, 2001)

สำหรับในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะการศึกษาถึงความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว เพื่อจะได้เป็นข้อมูลและเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำจัดและแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อมต่อไปหรือ

สำหรับการบำบัดหรือกำจัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในแหล่งปนเปื้อนหรือระบบบำบัดน้ำเสียของส่วนราชการหรือเอกชนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
2. เพื่อศึกษาชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินที่คัดเลือกได้ โดยอาศัยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อร่วมกับวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA
3. เพื่อรวบรวมและเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน

วิธีการดำเนินงาน

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium (SMS) ประกอบด้วย (ต่อ 1 ลิตร) K_2HPO_4 1.8 กรัม, KH_2PO_4 1.2 กรัม, NH_4Cl 4.0 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม, NaCl 0.1 กรัม และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 กรัม ปรับพีเอชเท่ากับ 7.5 (ดัดแปลงจาก Ijah and Upke, 1992)

การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายโดยวิธี Weight loss method

สกัด culture broth ด้วย dichloromethane ในอัตราส่วนที่เท่ากันกับ culture broth แล้วนำส่วนของตัวทำละลายมากำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4 ทำแห้งตัวทำละลายด้วยสุญญากาศและชั่งน้ำหนักสารที่ได้ (Mercadé *et al.*, 1996) จากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Shirai *et al.*, 1995) จากสมการ

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

W_1 = น้ำหนักของน้ำมันเริ่มต้น

W_2 = น้ำหนักของน้ำมันที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ตัวอย่างดิน

- เก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณสถานีเติมน้ำมันในเขตจังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราชและสุราษฎร์ธานี โดยเก็บบริเวณที่มีการถ่ายน้ำมันจากรถขนส่งน้ำมันเข้าสู่ถังเก็บน้ำมัน เก็บทุกถังเก็บที่มีการถ่ายน้ำมัน เก็บตัวอย่าง 9 สถานีเติมน้ำมัน

- เก็บตัวอย่างดินบริเวณสถานีถ่ายน้ำมันไบโอดีเซล ของคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยเก็บตัวอย่าง 3 จุด
- เก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจากร้านซ่อมรถในเขตจังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราชและสุราษฎร์ธานี 35 ตัวอย่าง
- เก็บตัวอย่างดินที่ไม่มีการปนเปื้อนน้ำมันบริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 3 ตัวอย่าง

1. การแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

เติมตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน 1 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Mineral salt medium (MSM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วันหรือจนกระทั่งเห็นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Mercadé *et al.*, 1996) จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 % ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วถ่ายเชื้อ 1 % ลงในอาหารใหม่และทำการเลี้ยงตามวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง (ดัดแปลงจาก Al-Sharidah *et al.*, 2000) เก็บตัวอย่างกลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร MSM ที่ผสมกลีเซอรอลร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดสอบขั้นต่อไป

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% มาเติมลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 5% 10% 15% ตามลำดับ โดยในทุกความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วทำการถ่ายเชื้อซ้ำลงในอาหารเดิม 3 ครั้ง เก็บตัวอย่างกลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร MSM ที่ผสมกลีเซอรอลร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดสอบขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้สูงที่สุด

ถ่ายเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1 ที่สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้สูงที่สุดร้อยละ 1 ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วตามความเข้มข้นสูงสุดที่ทราบจากการทดลองข้อ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทดสอบ

ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยวิธี weight loss method เลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3. การเทียบเคียงสายพันธุ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อมาทำการเจือจางให้ได้ระดับที่เหมาะสมแล้ว spread plate บนอาหาร MSM ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เคลือบอยู่บนผิวหน้า บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นำโคโลนีที่แตกต่างกันที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา re-streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดิม 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำเชื้อที่ได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในกรณีที่เป็นแบคทีเรีย (ย้อมสีแกรม, รูปร่างและการจัดเรียงตัว) การทดสอบทางชีวเคมี และเทียบเคียงสายพันธุ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rDNA โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient broth จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol/ chloroform DNA extraction (Ausubel *et al.*, 1995) เพิ่มปริมาณของ 16S rDNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) แล้วทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนที่เพิ่มจำนวนแล้วด้วย PCR purification kits (QIAGEN, Inc.) จากนั้นนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA Sequencer แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank (http://www. ncbi. nlm. nih. gov)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากอู่ซ่อมรถปั๊มน้ำมันในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา สุราษฎร์ธานีและดินบริเวณสถานีไบโอดีเซล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยเก็บที่ระดับความลึก 0 -15 เซนติเมตร ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 3 พบว่าลักษณะของตัวอย่างดินเป็นดินร่วนจำนวน 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50), ดินทราย 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 34) และดินเหนียว 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16) ซึ่งลักษณะเนื้อสัมผัสของดินมีผลต่อการแทรกซึมของน้ำมันลงสู่ดิน โดยดินที่มีลักษณะเป็นดินทรายจะทำให้น้ำมันสามารถซึมผ่านได้ดีกว่าดินร่วนหรือดินเหนียวดังนั้นน้ำมันจะถูกดูดซับไว้ในอนุภาคของดินได้ดีกว่าและอาจจะมีผลต่อการตรวจพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Márques-Rocha *et al.*, 2001) ดังนั้นการแยกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากธรรมชาติจึงควรเลือกดินจากบริเวณที่มีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันมาก่อนเป็นแหล่งในการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากมี

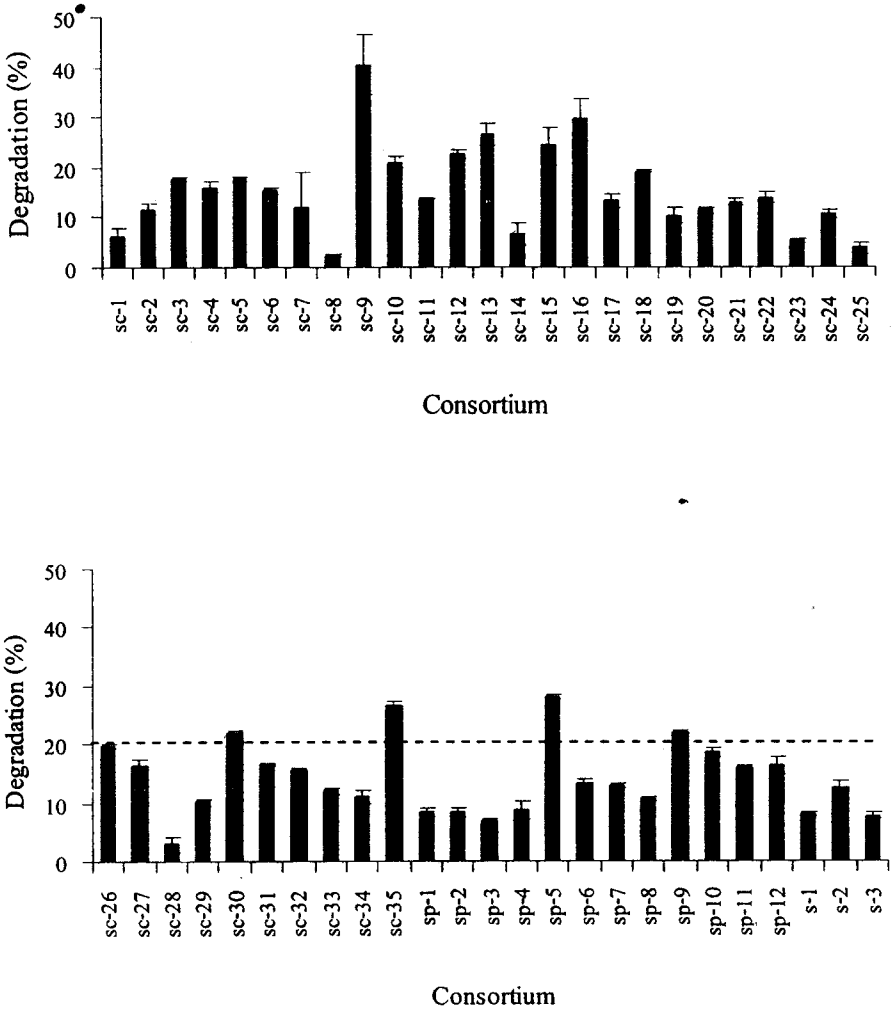
รายงานว่าบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันสูงกว่าบริเวณที่ไม่มีน้ำมันปนเปื้อนร้อยละ 61-67 (Atlas, 1991)

2. การแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

2.1 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์

จากการแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากสถานีเติมน้ำมัน อู่ซ่อมรถยนต์ในจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา สุราษฎร์ธานีและสถานีไบโอดีเซล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยวิธี enrichment culture ในอาหาร mineral salt medium (MSM) ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว และทำการถ่ายกล้าเชื้อร้อยละ 1 ลงอาหารใหม่ 3 ครั้ง ทุกๆ 7 วันของการเลี้ยงเชื้อ เพื่อคัดเลือกกลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการเจริญและย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน มี 10 กลุ่มเชื้อ ที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมากกว่าร้อยละ 20 โดยกลุ่มเชื้อ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือร้อยละ 40.46 (ภาพที่ 1) ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณอู่ซ่อมรถในอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งมีการปนเปื้อนของน้ำมันมาเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงเลือกกลุ่มเชื้อ SC-9 ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยทั่วไปเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดีนั้นโดยส่วนใหญ่มักแยกได้จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเนื่องจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อนทำให้เกิดการคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีความสามารถสูงอยู่ในบริเวณนั้น สอดคล้องกับการทดลองของ Koma และคณะ (2001) ที่แยกเชื้อจากดินปนเปื้อนน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ salt medium ที่มี *n*-paraffin ร้อยละ 1 ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่าสามารถลดปริมาณน้ำมันได้ร้อยละ 20 หลังจากเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะขึ้นกับสายพันธุ์และองค์ประกอบของน้ำมันด้วย เช่น Jirasripongpun (2002) แยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จากดินในอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ 2000 ppm เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าจาก 26 ไอโซเลต ที่แยกได้มี 1 ไอโซเลต คือ strain W9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุดคือ สามารถย่อยสลายสาร saturate, aromatic และ resin ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหลังจากเลี้ยงเชื้อ 30 วันได้ร้อยละ 52.46, 38.13 และ 18.81 ตามลำดับ นอกจากนี้ Koma และคณะ (2003) แยกเชื้อจากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์และส่วนของ cyclic alkane ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน พบว่ามี 2 สายพันธุ์ คือ NDKK48 และ NDKY76A สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ W medium ที่ความเข้มข้นของน้ำมันร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนโดยสายพันธุ์ NDKK48 มี

ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์และส่วน cyclic alkane ได้ร้อยละ 27 และ 16 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ NDKY76A มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์และส่วน cyclic alkane หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน ได้ร้อยละ 27 และ 18 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Mandri และ Lin (2007) แยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell-Haas ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 10 พบว่าสามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด 3 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter calcoaceticum*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Flavobacterium* sp. โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายหลังจากเลี้ยงเชื้อ 28 วันได้ร้อยละ 84, 71 และ 60 ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร mineral salt หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน

3. การเทียบเคียงสายพันธุ์กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC-9 มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Nutrient agar สามารถแยกได้ 4 ไอโซเลต ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันและแบ่งตามลักษณะการติดสีแกรม (Gram staining) ได้แบคทีเรียแกรมบวก 2 ไอโซเลต คือ SC9-1 และ SC9-3 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ไอโซเลต คือ SC9-2 และ SC9-4 โดยไอโซเลต SC9-1, SC9-3 และ SC9-4 เซลล์มีรูปร่างแท่ง (rod) ส่วนไอโซเลต SC9-2 มีรูปร่างกลม (cocci) เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต มา streak บนอาหารแข็ง MSM ที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 พบว่ามีเพียง SC9-2 และ SC9-4 เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้งสองไอโซเลตนี้มีหน้าที่หลักในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในช่วงแรกและเมื่อมีสาร intermediate เกิดขึ้น ไอโซเลต SC9-1 และ SC9-3 จึงทำหน้าที่ในการย่อยสลายต่อไป อย่างไรก็ตามสมมุติฐานนี้ควรมีการพิสูจน์ต่อไปในอนาคต ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่พบมีทั้งโคโลนีแบนราบและนูน สีของโคโลนีมีทั้งโคโลนีสีขาวขุ่นและเหลือง (ตารางที่ 1) เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์ของทั้ง 4 ไอโซเลตโดย 16S rDNA พบว่าไอโซเลต SC9-1 มีความใกล้เคียงร้อยละ 98 กับเชื้อ *Chryseobacterium* sp. ไอโซเลต SC9-2 มีความใกล้เคียงร้อยละ 95 กับเชื้อ *Sphingobacterium multivorum* ไอโซเลต SC9-3 มีความใกล้เคียงร้อยละ 100 กับเชื้อ *Bacillus cereus* และไอโซเลต SC9-4 มีความใกล้เคียงร้อยละ 100 กับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ดังแสดงในตารางที่ 2 และสามารถสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ดังแสดงในภาพที่ 2 จากผลของ 16S rDNA และแผนภูมิต้นไม้ของไอโซเลต SC9-2 ซึ่งมีความเหมือนร้อยละ 95 กับเชื้อ *Sphingobacterium multivorum* หลังจากใช้โปรแกรม Blast แต่เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ผลที่ได้กลับมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas* sp. มากกว่า ซึ่งผลที่ได้อาจจะเนื่องมาจากการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA ใช้ sequence ประมาณ 400 bp มีความเหมือนเพียงร้อยละ 95 ซึ่งค่อนข้างต่ำ ดังนั้นหากต้องการให้ได้ความเหมือนที่มากกว่านี้ควรวิเคราะห์แบบ full length ประมาณ 1500 bp หรืออาจใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลอื่นๆ มาช่วยในการเทียบเคียงสายพันธุ์ของเชื้อเช่น DNA-DNA hybridization หรือการทำ fatty acid profile จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วพบว่ามีทั้งที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Jirasripongpon (2002) ที่คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วพบว่ามี 5 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายมากกว่าร้อยละ 20 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 4 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบ 1 ไอโซเลต เมื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็นเชื้อ *Nocardia simplex, Gordona terrae, Rhodococcus* sp. และ *Pseudomonas mandelii* ขณะที่ Mandri และ Lin (2007) คัดเลือกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell-Haas ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด 3 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบคือ *Acinetobacter*

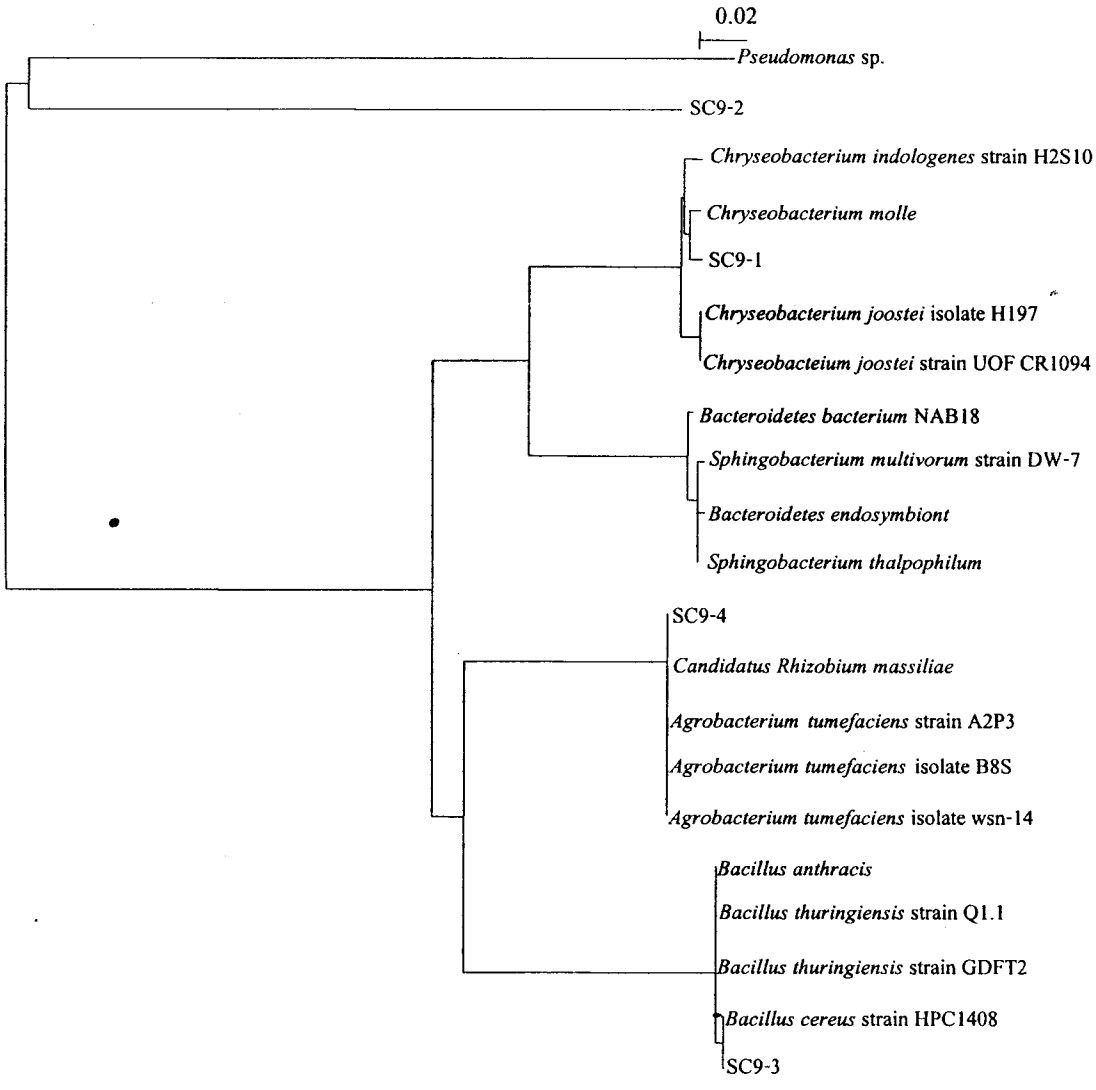
calcoaceticum, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Flavobacterium* sp. โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายร้อยละ 84, 71 และ 60 ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อ 28 วัน ซึ่งต่างจาก Mercadé และคณะ (1996) คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ร้อยละ 65 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็น *Pseudomonas*, *Serratia*, *Escherichai*, *Enterobacter*, *Citrobacter*. *Alcaligenes* และ *Acinetobacter* ส่วน Koma และคณะ (2001) คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย *n*-paraffin ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือเชื้อ *Acinetobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จะเห็นได้ว่าโอกาสในการพบแบคทีเรียแกรมลบในที่ที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก อาจจะเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบมี outer membrane ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นสารในกลุ่มฟอสฟอลิปิดซึ่งมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำจึงทำให้มีหน้าที่เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์หรือสารลดแรงตึงผิวทำให้เชื้อสามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำได้ดีขึ้น (Desai and Banat, 1997)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 : (a) เจริญบนอาหาร Nutrient agar, (b) เจริญบนอาหาร mineral salt medium agar ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1

Isolates	Cell morphology	Colony morphology
SC9-1[a]	gram positive, rod	dark-yellow, circular, convex, smooth edge, opaque
SC9-2[a,b]	gram negative, cocci	yellow, circular, flat, smooth edge, opaque
SC9-3[a,]	gram positive, rod	off-white, circular, convex, erose edge, opaque
SC9-4[a, b]	gram negative, rod	white, circular, flat, smooth edge, opaque

ตารางที่ 2 ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 โดย 16S rDNA

Isolates	Closest strain	Sequence homology (%)
SC9-1	*Chryseobacterium* sp.	98
SC9-2	*Sphingobacterium multivorum*	95
SC9-3	*Bacillus cereus*	100
SC9-4	*Agrobacterium tumefaciens*	100



ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SC9-1, SC9-2, SC9-3 และ SC9-4

เอกสารอ้างอิง

พนัส งามกนกวรรณ. 2545. ปัญหาน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว. วารสารโรงงาน. หน้า 51-56.

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. Res. 155 : 157-164.

Atlas, R. M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. J. Chem. Technol. Biol. 52 : 149-156.

Atlas, R. M. and Atlas, M. C. 1991. Biodegradation of oil and bioremediation of oil spills. Curr. Opin. Biotechnol. 2 : 440-443.

Ausubel, F. M., Brent, R. E., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1995. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. John Wiley and Sons. Inc. New York.

Balba, M. T., Al-Awadhi, N. and Al-Daher, R. 1998. Biodegradation of oil contaminated soil : microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. J. Microbiol. Methods. 32 : 155-164.

Desai, J. D. and Banat, I. M. 1997. Microbail production of surfactants and their commercial potential. MIcrobiol. Mol. Biol. Rev. 61 : 47-64.

Ijah, U. J. J. and Ukpe, L. I. 1992. Biodegradation of crude oil by *Bacillus* strains 28A and 61B isolation from oil spilled soil. Waste Manage. 12 : 55-60.

Jirasripongpun, K. 2002. The characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil. Lett. Appl. Microbiol. 35 : 296-300.

Koma, D., Hasumi, F., Yamamoto, E., Ohta, T., Chung, S.Y. and Kubo, M. 2001. Biodegradation of long-chain *n*-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp.. J. Biosci. Bioeng. 91 : 94-96.

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. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67 : 1590-1593.

Leahy, J. G. and Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54 : 305 –315.

Mandri, T. and Lin, J. 2007. Isolation and Characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazula-Natal, South Afica. Afr. J. Biotechnol. 6 :23-27.

Marquez-Rocha, F. J., Hernandez-Rodriguez, V. and Lamela, M. T. 2001. Biodegradation of engine and diesel oil in soil by microbial consortium. Water Air Soil Pollut. 128 : 313-320.

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. J. Appl. Bacteriol. 81 :161-166.

Shirai, K., Hanzawa, N. and Katusta, M. 1995. Heavy oil degrading bacteria isolated by long term enrichment in alumina columns containing heavy oil C. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 : 2159–2161.

van Hamme, J. D., Singh, A. and Ward, O. P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67 : 503-549.

Vasudevan, N. and Rajaram, P. 2001. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. Environ. Inter. 26 : 409-411.

ภาคผนวก

เอกสารสรุปผลงานวิจัยในรูปแบบและภาษาที่เหมาะสมสำหรับการประชาสัมพันธ์เผยแพร่ต่อประชาชนทั่วไป

การปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในดินหรือแหล่งน้ำเป็นปัญหาหนึ่งที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเมื่อสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะมีการรวมตัวหรือเกาะติดกับสารอินทรีย์ต่างๆ ทำให้การย่อยสลายยากยิ่งขึ้นและมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว โดยสาเหตุใหญ่ที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อม คือ การขาดความระมัดระวังและความรับผิดชอบของผู้ใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ เช่น การเททิ้งลงสู่แหล่งดินหรือท่อระบายน้ำหลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำมันเครื่อง การหกสะสมของน้ำมันเครื่องและผลิตภัณฑ์น้ำมันอื่นๆ ภายในบริเวณสถานีบริการน้ำมันหรืออู่ซ่อมรถยนต์ เป็นต้น

การกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนซึ่งปนเปื้อนในธรรมชาติมีหลายวิธีแต่การกำจัดโดยชีววิธี (bioremediation) เป็นวิธีที่นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ค่าใช้จ่ายน้อย และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งไม่เป็นพิษ แบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านั้นเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในสถานที่ที่มีการปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอนดังกล่าว ด้วยเหตุนี้การกำจัดมลพิษด้วยชีววิธีจึงมีความเป็นไปได้สูงในการกำจัดคราบน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมนั้นไม่ได้บ่งชี้ว่าสารไฮโดรคาร์บอนนั้นจะถูกย่อยสลายไปด้วยเนื่องจากอาจจะขาดสารอาหารชนิดอื่นที่มีความจำเป็นต่อการเจริญหรือสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญ การย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนอาจจะเพิ่มขึ้นได้โดยการเติมแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจนและสารอาหารอื่นๆ หรือโดยการเติม จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนชนิดนั้นๆ ลงไปโดยตรง

สำหรับในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะการศึกษาหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในประเทศรวมไปถึงการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ปนเปื้อน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินจากปั๊มน้ำมัน อู่ซ่อมรถในจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลาและสุราษฎร์ธานี และจากสถานีวิจัยไบโอดีเซล จากคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นอกจากนี้ยังสุ่มเก็บตัวอย่างดินที่ไม่มีการปนเปื้อนน้ำมันภายในบริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ด้วย รวมทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างดินที่เก็บมาทั้งหมดมีกลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว อย่างไรก็ตามความสามารถในการย่อยสลายแตกต่างกัน และ

พบว่ามี 5 กลุ่มเชื้อ ที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% สูงสุด ได้แก่ กลุ่มเชื้อ SC-9, SC-13, SC-15, SC-16 และ SP-5 โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายคือ 40.46%, 26.64%, 24.18%, 29.57% และ 28.20 ตามลำดับ ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณอู่ซ่อมรถซึ่งมีการปนเปื้อนของน้ำมันมาเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดคือ กลุ่มเชื้อ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40 ภายในเวลา 5 วันของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC-9 มาแยกเชื้อให้เป็นเชื้อเดี่ยว พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 4 ไอโซเลต เป็นแกรมบวก มีรูปร่างแบบแท่ง 2 ไอโซเลต และอีก 2 ไอโซเลต เป็นแกรมลบ มีรูปร่างกลมและรูปร่างแบบแท่ง เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA สามารถจำแนกเชื้อเป็น *Chryseobacterium* sp., Bacillus cereus, *Sphingobacterium multivorum* และ *Agrobacterium tumefaciens*

สรุป OUTPUTS ที่ได้รับจากการดำเนินงาน

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน (รหัสโครงการ BRT R_150005)

ตั้งแต่เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2550 ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2551

1. การตีพิมพ์บทความในวารสารทางวิชาการ

   อยู่ระหว่างการจัดทำต้นฉบับ (in manuscript) จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

   Jittima Kaewrueng, Vullapa Arunpairojana and Suppasil Maneerat. 2008. Isolation and screening of waste lubricating oil-degrading microorganisms consortia from soil and its application in soil. To be submitted to International Biodeterioration and Biodegradation.

2. การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

   Jittina Kaewrueng, Vorasan Sophon and Suppasil Maneerat. 2007. Isolation and Screening of Waste Lubricating Oil-Degrading Microorganisms Consortia from Soil. The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness", Thailand, October 9-12, 2007. pp. 62.

3. จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาโท ในโครงการ จำนวน 1 คน ดังนี้

   นางสาวจิตตมา แก้วเรือง

   ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้ในดิน

   ระดับการศึกษา ปริญญาโท

ลงนาม.....

(ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

วันที่ 4 ธ.ค. 2551