



การแยกและการศึกษาจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นจากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมัน



โดย

นางสาวนุชนาถ โปธoram

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ก แบบ ก 2

ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การแยกและการศึกษาจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นจากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมัน



โดย  
นางสาวนุชนาถ โปธoram

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ก แบบ ก 2

ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

ISOLATION AND STUDY OF LUBRICATING-OIL DEGRADING MICROORGANISMS  
FROM OIL-CONTAMINATE SOIL SITES



By  
MISS Nuchanat POTHARAM

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for Master of Science ENVIRONMENTAL SCIENCE  
Department of ENVIRONMENTAL SCIENCE  
Academic Year 2024  
Copyright of Silpakorn University



650720039 : วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ก แบบ ก 2

คำสำคัญ : น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์, จุลินทรีย์, วิธีการชั่งน้ำหนักที่หายไป

นางสาว นุชนาถ โพรราม: การแยกและการศึกษาจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นจากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นภวรรณ รัตสุข

การปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ซึ่งการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์เป็นทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นบริเวณปนเปื้อนน้ำมันจากดินที่เก็บบริเวณอู่ซ่อมรถจำนวน 3 แห่งตัวอย่าง แยกจุลินทรีย์ได้ทั้งสิ้น 8 ไอโซเลต บนอาหาร Nutrient agar โดยวิธีการ Spread plate จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA และ 18s rRNA พบว่าจัดอยู่ใน 6 สกุล ได้แก่ *Achromobacter* (1 ไอโซเลต), *Brucella* (1 ไอโซเลต), *Candida* (1 ไอโซเลต), *Kalmanozyma* (1 ไอโซเลต), *Microbacterium* (3 ไอโซเลต) และ *Tsukamurella* (1 ไอโซเลต) จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Tween-80 agar พบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมด 8 ไอโซเลต มีจำนวน 5 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 62.5) สามารถสร้างเอนไซม์ได้ และพบว่า *Kalmanozyma* sp. KS5-2 มีการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดที่ระดับ +++ เมื่อนำไปศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันโดย Weight loss method พบว่า *Kalmanozyma* sp. KS5-2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดร้อยละ 63.50 ในระยะเวลา 3 วัน ที่ความเข้มข้นของน้ำมันร้อยละ 1 ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์และต่อยอดงานวิจัยได้ในอนาคต

650720039 : Major ENVIRONMENTAL SCIENCE

Keyword : Lubricating-oil, Microorganisms, Weight loss method

MISS Nuchanat POTHARAM : Isolation and study of lubricating-oil degrading microorganisms from oil-contaminate soil sites Thesis advisor : Assistant Professor Nopawan Rattasuk, Ph.D.

The contamination of soil with used engine lubricants adversely affects both living organisms and the environment. One of the widely adopted approaches for treating such contaminated sites is bioremediation using microorganisms. This study aimed to isolate microorganisms capable of degrading lubricating oil from soil collected from three different automobile repair shops. The isolation process, using the spread plate method on Nutrient Agar, resulted in a total of eight microbial isolates. Based on nucleotide sequence analysis of the 16S rRNA and 18S rRNA genes, the isolates were classified into six genera: *Achromobacter* (1 isolate), *Brucella* (1 isolate), *Candida* (1 isolate), *Kalmanozyma* (1 isolate), *Microbacterium* (3 isolates), and *Tsukamurella* (1 isolate). Lipase enzyme production was assessed using Tween-80 agar, revealing that five out of the eight isolates (62.5%) exhibited lipase activity. Among them, *Kalmanozyma* sp. KS5-2 demonstrated the highest enzyme production, rated at +++. The oil degradation efficiency of the isolates was further evaluated using the weight loss method. *Kalmanozyma* sp. KS5-2 exhibited the highest degradation efficiency, achieving a 63.50% reduction of used engine lubricant within three days at an oil concentration of 1%. These findings highlight the potential application of *Kalmanozyma* sp. KS5-2 in bioremediation and provide a foundation for future research.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นภวรรณ รัตสุข ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่คอยติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัย ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่อผู้วิจัย รวมทั้งอาจารย์ ดร.ดาวรุ่ง สังข์ทอง ประธานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่างๆ ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนี มิ่งมา ผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำในทุกขั้นตอนของกระบวนการทำวิจัย ตั้งแต่การคิดหัวข้องานวิจัย วางแผนงานวิจัย การเก็บ ตัวอย่าง การวิเคราะห์ผล สรุปผลการวิจัย ให้คำปรึกษาในการเขียนรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไป ได้ด้วยดี ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีในการทำวิจัย ผู้วิจัยขอกราบ ขอบพระคุณในความกรุณาของท่านเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่ให้ความรู้ ให้คำแนะนำ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณคุณทัศนีย์ กาญจนศรี ที่เป็นผู้ประสานงาน และอำนวยความสะดวกด้านเอกสารต่างๆ ซึ่งช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความ สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสนทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอขอบพระคุณเพื่อนร่วมงาน สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และ กำลังใจผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย สามี และบุตรของผู้วิจัยที่คอยเป็นแรงสนับสนุนอยู่ เบื้องหลัง คอยเป็นแรงผลักดัน ให้กำลังใจ และอยู่เคียงข้างซึ่งเป็นกำลังที่สำคัญยิ่งในทุกด้าน จนผู้วิจัย สามารถดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นุชนาถ โพธธรรม

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 สมมติฐานของการศึกษา.....	2
1.4 ขอบเขตการศึกษา.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	4
2.1 ความหมายของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์.....	4
2.2 องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์.....	4
2.2.1 น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน (Base oils).....	4
2.2.2 สารเพิ่มคุณภาพ (Additives).....	5
2.3 หน้าที่ของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์.....	8
2.4 ผลกระทบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์.....	8
2.4.1 ผลกระทบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ต่อมนุษย์.....	9
2.4.2 ผลกระทบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ต่อสิ่งแวดล้อม.....	9

2.5 ปริมาณการใช้น้ำมันหล่อลื่นในประเทศไทย .....	9
2.5.1 ปริมาณการจัดหาและการจัดจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์.....	9
2.5.2 ปริมาณการจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องภายในประเทศสำหรับเครื่องยนต์แต่ละประเภท .....	10
2.6 วิธีการกำจัดคราบน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสิ่งแวดล้อม .....	11
2.6.1 วิธีทางกายภาพ.....	11
2.6.2 วิธีทางเคมี .....	12
2.6.3 วิธีทางชีวภาพ.....	15
2.7. การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์.....	15
2.7.1 กลไกการย่อยสลายสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์ .....	18
2.7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์.....	21
3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
3.1 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DP-1 และการหาสภาวะที่เหมาะสม (Parikh et al., 2018).....	22
3.2 การบำบัดทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยแบคทีเรียชนิดเดี่ยวและผสมที่คัดแยกได้จากดินของโรงงานช่างกล (Hussein and Khudhair, 2018).....	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	41
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ .....	41
3.2 อาหารและสารเคมี.....	42
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ .....	43
3.4 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว .....	43
3.4.1 การเก็บตัวอย่างดิน.....	43
3.4.2 การเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว.....	43

3.4.3 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว.....	44
3.4.4 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์.....	44
3.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี.....	44
3.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics).....	44
3.5.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics).....	46
3.6 การระบุชนิดของจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	48
3.6.1 การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	48
3.6.2 การระบุชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	49
3.7 การศึกษา Extracellular hydrolytic enzyme ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในการสร้างเอนไซม์ไลเปส.....	49
3.8 การศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้.....	49
3.8.1 วิธีวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการย่อยน้ำมัน.....	50
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	51
4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว.....	51
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี.....	53
4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics).....	53
4.2.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics).....	61
4.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และระบุชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA.....	64
4.4 การศึกษา Extracellular hydrolytic enzyme ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการสร้างเอนไซม์ไลเปส.....	70
4.5 การศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้.....	73
บทที่ 5.....	77
สรุปผล.....	77

ข้อเสนอแนะ.....	78
รายการอ้างอิง.....	79
ภาคผนวก.....	86
ภาคผนวก ก.....	87
ภาคผนวก ข.....	95
ภาคผนวก ค.....	98
ประวัติผู้เขียน.....	105



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ประเภทของสารเพิ่มคุณภาพ (Additives) ในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ .....	7
ตารางที่ 2 รายชื่อสารเคมีจัดคราบน้ำมันที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในประเทศไทย .....	12
ตารางที่ 3 ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน .....	16
ตารางที่ 4 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันและสารที่อยู่ในองค์ประกอบของน้ำมัน .....	17
ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายอาหารที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Used engine oil ,UEO) และ Tributyrin (TB) .....	26
ตารางที่ 6 จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว	33
ตารางที่ 7 การคัดเลือกแบคทีเรียขั้นแรกด้วยการวัดการเจริญของแบคทีเรีย .....	34
ตารางที่ 8 การคัดเลือกแบคทีเรียขั้นที่ 2 โดยการตรวจหาประสิทธิภาพในการย่อยสลาย .....	34
ตารางที่ 9 การทดสอบทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย .....	35
ตารางที่ 10 ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบเดี่ยวและแบบผสมในอาหาร BH ต่อการเจริญของแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 10 วัน .....	39
ตารางที่ 11 จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมัน .....	52
ตารางที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้านโคโลนี่ของเชื้อ (Cultural characteristics) ที่คัดแยกได้จำนวน 8 ไอโซเลต .....	53
ตารางที่ 13 การติดสีแกรม (Gram staining) ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ .....	58
ตารางที่ 14 ลักษณะและรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ .....	59
ตารางที่ 15 การเคลื่อนที่และลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ .....	60
ตารางที่ 16 การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในสภาพออกซิเดชันและเฟอร์เมนต์เตชันของจุลินทรีย์ .....	61
ตารางที่ 17 ความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ .....	63
ตารางที่ 18 ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	65
ตารางที่ 19 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ .....	71

ตารางที่ 20 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้..... 73



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ .....	4
ภาพที่ 2 องค์ประกอบของน้ำมันพื้นฐานและสารเพิ่มคุณภาพในน้ำมันหล่อลื่น .....	6
ภาพที่ 3 ปริมาณการจัดการและการจัดหน่ายน้ำมันหล่อลื่น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 – พ.ศ. 2562 .....	10
ภาพที่ 4 ปริมาณการจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ภายในประเทศสำหรับเครื่องยนต์ .....	11
ภาพที่ 5 กลไกการย่อยสลายสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน .....	20
ภาพที่ 6 ช่วงอุณหภูมิที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต .....	21
ภาพที่ 7 ไอโซเลตที่สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วบนอาหาร MSM agar plate ....	25
ภาพที่ 8 ไอโซเลต DP-1 ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน .....	27
ภาพที่ 9 ค่า pH ที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว .....	28
ภาพที่ 10 ปริมาณของเชื้อที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว .....	28
ภาพที่ 11 ค่าของอุณหภูมิที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว .....	29
ภาพที่ 12 ความเข้มข้นของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ ...	30
ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต .....	37
ภาพที่ 14 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต .....	37
ภาพที่ 15 ผลของ pH ต่อการเจริญของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต .....	38
ภาพที่ 16 ผลของ pH ต่อการย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต .....	38
ภาพที่ 17 ตัวอย่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ บนอาหาร Nutrient agar ที่แยกได้จากดินของชุมชนกรุงเทพมหานครปทุม .....	51
ภาพที่ 18 ตัวอย่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ บนอาหาร Nutrient agar ที่แยกได้จากดินของชุมชนจังหวัดกาญจนบุรี .....	51

ภาพที่ 19 ตัวอย่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ บนอาหาร Nutrient agar ที่แยกได้จากดินของอุโมงค์มรดกจังหวัดตราขบุรี .....	52
ภาพที่ 20 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต RS5-1.....	54
ภาพที่ 21 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต RS5-2.....	54
ภาพที่ 22 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต RS5-3.....	55
ภาพที่ 23 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต RS5-4.....	55
ภาพที่ 24 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต KS5-1.....	56
ภาพที่ 25 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต KS5-2.....	56
ภาพที่ 26 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต NS5-1 .....	57
ภาพที่ 27 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต NS5-2 .....	57
ภาพที่ 28 จุลินทรีย์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Motile) และมีลักษณะการเจริญ แบบสม้ำาเสมอตามแนวซิดเชื้อ (Filiform).....	60
ภาพที่ 29 จุลินทรีย์เป็นชนิด Fermentative metabolized.....	62
ภาพที่ 30 จุลินทรีย์เป็นชนิด Oxidative metabolized.....	62
ภาพที่ 31 จุลินทรีย์เป็นชนิด Non-metabolised .....	62
ภาพที่ 32 การหมักน้ำตาลกลูโคส (ภาพซ้าย) และซูโครส (ภาพขวา) ของไอโซเลต RS5-1.....	64
ภาพที่ 33 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล <i>Microbacterium</i> กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ) โดยใช้ <i>Mycolicibacillus trivialis</i> ATCC 23292 <sup>T</sup> (X88924) เป็น outgroup.....	66
ภาพที่ 34 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล <i>Tsukamurella</i> กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ) โดยใช้ <i>Dietzia maris</i> DSM 43672 <sup>T</sup> (X79290) เป็น outgroup.....	67
ภาพที่ 35 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล <i>Achromobacter</i> กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี	

Neighbour-joining (NJ) โดยใช้ *Corticimicrobacter populi* 3d-2-2<sup>T</sup> (KY214293) เป็น outgroup ..... 68

ภาพที่ 36 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล *Brucella* กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ) โดยใช้ *Falsochrobacterum ovis* CCM 8460<sup>T</sup> (MT760205) เป็น outgroup ..... 69

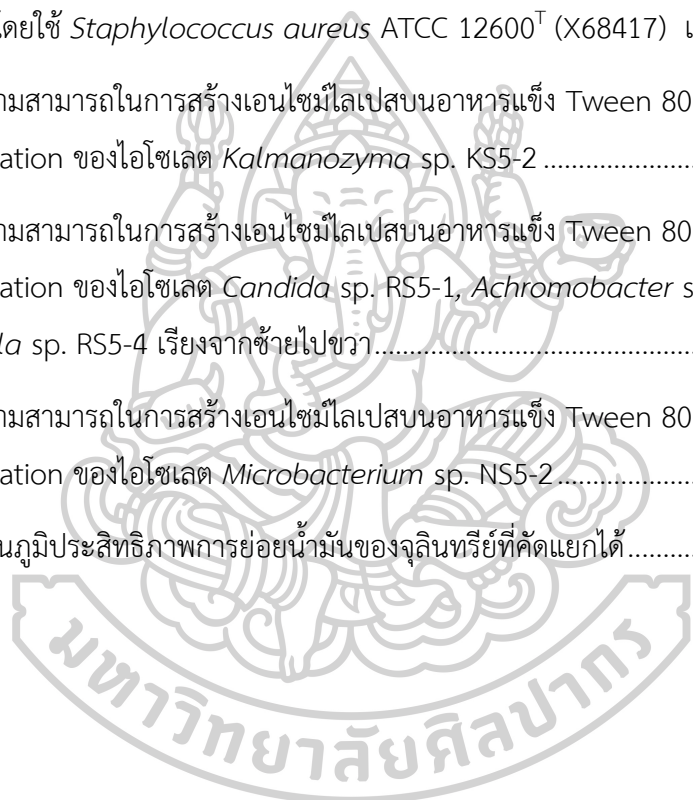
ภาพที่ 37 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 18S rRNA ของยีสต์จำนวน 2 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล *Candida* กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ) โดยใช้ *Staphylococcus aureus* ATCC 12600<sup>T</sup> (X68417) เป็น outgroup ..... 70

ภาพที่ 38 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Tween 80 agar ด้วยเทคนิค Point inoculation ของไอโซเลต *Kalmanozyma* sp. KS5-2 ..... 72

ภาพที่ 39 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Tween 80 agar ด้วยเทคนิค Point inoculation ของไอโซเลต *Candida* sp. RS5-1, *Achromobacter* sp. RS5-3 และ *Tsukamurella* sp. RS5-4 เรียงจากซ้ายไปขวา ..... 72

ภาพที่ 40 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Tween 80 agar ด้วยเทคนิค Point inoculation ของไอโซเลต *Microbacterium* sp. NS5-2 ..... 72

ภาพที่ 41 แผนภูมิประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ..... 74



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำมันหล่อลื่นหรือน้ำมันเครื่องเป็นสิ่งที่จำเป็นที่ถูกใช้ไปเป็นจำนวนมากทั้งในด้านการคมนาคม อุตสาหกรรม เกษตรกรรม ประมง และการท่องเที่ยว ทำให้เกิดน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจทำให้มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นในสิ่งแวดล้อมขึ้นได้ โดยสาเหตุหลักที่ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อม เกิดจากการกำจัดที่ไม่ถูกวิธี เช่น การเททิ้งลงสู่ดินหรือท่อระบายน้ำโดยตรง การขุดหลุมฝัง การเผา นอกจากนี้การปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้วอาจเกิดจากภาชนะเก็บสะสมที่ไม่ได้มาตรฐาน การหกสะสมของน้ำมันในระหว่างการใช้งาน การรวบรวมเพื่อขนส่ง การจัดเก็บและทำลายซึ่งอาจเกิดขึ้นภายในบริเวณโรงงาน อุตสาหกรรม สถานีบริการปั้มน้ำมัน หรืออู่ซ่อมรถ (Kurnia et al., 2018) ดังนั้นควรเก็บรวบรวมในถังเก็บที่มีมิดชิดและปลอดภัยจากเชื้อเพลิง เพื่อรอการนำไปกำจัดหรือใช้ประโยชน์ใหม่ นอกจากนี้ควรนำไปกำจัดอย่างถูกวิธี เช่น จัดส่งให้หน่วยงานที่ขนส่งวัสดุที่ไม่ใช้แล้วจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ได้รับการรับรองจากกรมโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อกำจัดต่อไป

การปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม โดยน้ำมันหล่อลื่นส่วนใหญ่แล้วประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัวสายยาว (C16-C36) มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ และสารเพิ่มคุณภาพ 10-20 เปอร์เซ็นต์ (Ibrahim, 2016) ซึ่งเมื่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมจะเกิดการรวมตัวหรือเกาะติดกับสารอินทรีย์ต่างๆ ส่งผลให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและมีการย่อยสลายที่ยากขึ้น (Mercade et al., 1996) นอกจากนี้องค์ประกอบของสารเพิ่มคุณภาพในน้ำมันหล่อลื่นยังประกอบด้วยสารอินทรีย์ เช่น ไนโตรเจน และโลหะต่างๆ ซึ่งเมื่อเกิดการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ทำให้เกิดสารปนเปื้อนโลหะหนักบางชนิด เช่น ตะกั่ว (Pb), แบเรียม (Ba), สังกะสี (Zn), แมกนีเซียม (Mg) และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Aromatic hydrocarbons, PAHs) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งและก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตสูงมาก (Parikh et al., 2018) นอกจากนี้เมื่อสัมผัสกับน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วปริมาณความเข้มข้นต่ำหรือสูงเป็นระยะเวลาที่นาน อาจทำให้เกิดอันตรายต่อระบบประสาท ตับ ไต และไขกระดูก รวมทั้งอาจไปขัดขวางต่อประสิทธิภาพ

การทำงานของเอนไซม์ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ (Uranai et al., 2005) ดังนั้นจึงต้องมีการบำบัดน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในดินเพื่อลดผลกระทบที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม พืช สัตว์และมนุษย์ (Rank & Lawrence, 2013)

การบำบัดน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในดินสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) โดยในแต่ละวิธีมีข้อดี และข้อจำกัดที่แตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามวิธีการบำบัดทางชีวภาพเป็นอีกทางเลือกที่นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย โดยประหยัดกว่าการบำบัดทางกายภาพและทางเคมี สามารถประยุกต์ใช้ได้ในพื้นที่ปนเปื้อนขนาดใหญ่ได้และมีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้หลังการบำบัด คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Leahy & Colwell, 1990) นอกจากนี้มีจุลินทรีย์จำนวนมากที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันได้ ซึ่งแหล่งที่อยู่ส่วนใหญ่ของจุลินทรีย์เหล่านั้นพบได้ในดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันดังกล่าว ดังนั้นการบำบัดมลพิษด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์จึงมีความเป็นไปได้สูงในการคัดแยกจุลินทรีย์ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนเพื่อนำมาบำบัดน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในบริเวณเหล่านั้นหรือนำไปประยุกต์ใช้ในแหล่งปนเปื้อนอื่นได้ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.2.1 เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว
- 1.2.2 เพื่อจำแนกจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว
- 1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

## 1.3 สมมติฐานของการศึกษา

ได้ทราบชนิดจุลินทรีย์และประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่คัดแยกได้จากดินปนเปื้อน

#### 1.4 ขอบเขตการศึกษา

งานวิจัยนี้คัดแยกจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากอุ้งมือรถ 3 แห่งตัวอย่าง ในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี และกาญจนบุรี โดยใช้วิธีการเพิ่มจำนวนในอาหาร Carbon-free mineral medium (CFMM) จากนั้นทำการศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ และระบุชนิดเชื้อโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ 18S rRNA จากนั้นศึกษา Extracellular hydrolytic enzyme ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน

#### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ได้จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว
- 1.5.2 ได้ทราบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมัน
- 1.5.3 ได้ทราบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้



## บทที่ 2

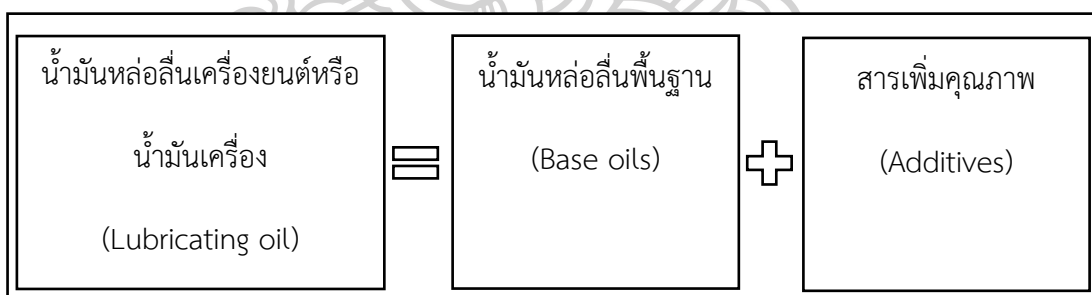
### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 ความหมายของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ (Lubricating oil) หรือน้ำมันเครื่อง หมายถึง น้ำมันที่ใช้หล่อลื่นเครื่องยนต์ที่มีการสันดาปภายใน โดยทำหน้าที่หล่อลื่นชิ้นส่วนต่างๆ ที่เคลื่อนไหวภายในของเครื่องยนต์ ลดการเสียดสีและสึกหรอ ระบายความร้อน นอกจากนี้ยังสามารถอุดช่องว่างระหว่างชิ้นส่วนภายในของเครื่องยนต์ ส่งผลให้เครื่องยนต์สามารถทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ (ประเสริฐ เทียนนิมิตร, 2554) โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากการกลั่นน้ำมันดิบ มีจุดเดือดอยู่ระหว่าง 380-500 องศาเซลเซียส

#### 2.2 องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ประกอบด้วยสารที่สำคัญสองส่วน คือ น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน (Base oils) และสารเพิ่มคุณภาพ (Additives) ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

ที่มา: ดัดแปลงจาก สมศักดิ์ พวงศรี (2562)

##### 2.2.1 น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน (Base oils)

น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานเป็นส่วนประกอบหลักของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ โดยเป็นน้ำมันที่ยังไม่มีการเติมสารเพิ่มคุณภาพเพิ่มเติม น้ำมันหล่อลื่นส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือนั้นจะเป็นสารเพิ่มคุณภาพ ซึ่งมีจุดประสงค์หลักคือ การลดแรง

เสียดทานภายในของเครื่องยนต์แต่ละชนิด (“Base oils”, 2022) โดยน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่

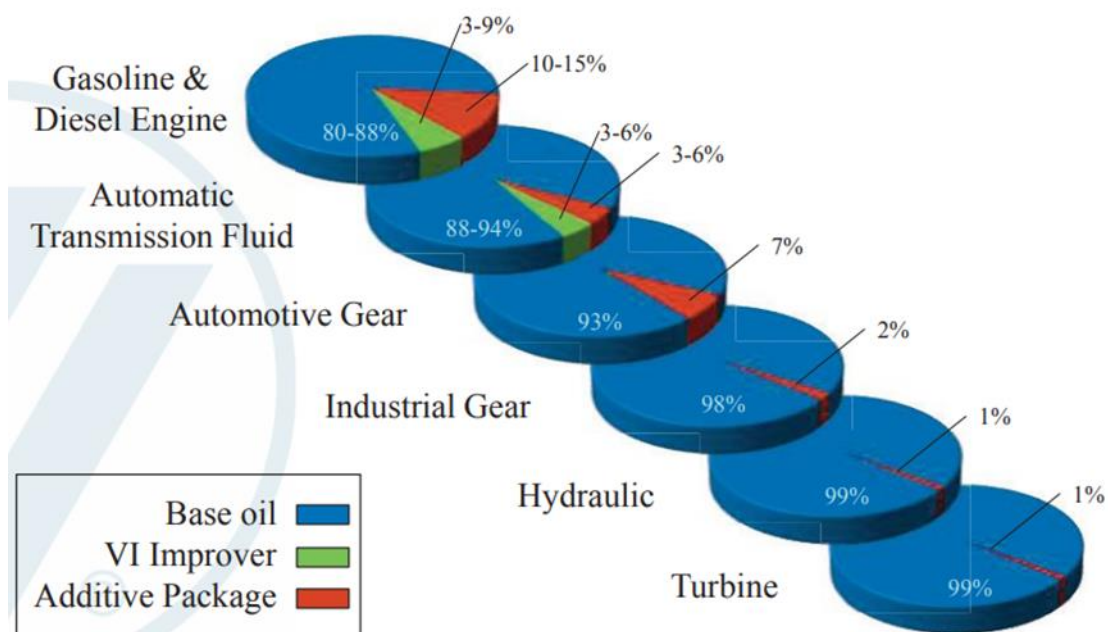
2.2.1.1 น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานจากน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์ (Vegetable or Animal oils) เป็นน้ำมันที่ได้มาจากธรรมชาติประเภทนี้มีความคงตัวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่ำ ไม่มีความคงทนถาวรและเสื่อมสภาพได้ง่าย จึงต้องนำไปปรับปรุงคุณภาพก่อนนำมาใช้งาน ซึ่งส่งผลให้เพิ่มต้นทุนในการผลิตที่สูง ทำให้น้ำมันประเภทนี้ไม่ได้รับความนิยมที่จะนำมาใช้งาน แต่มีการนำไปใช้งานในการเป็นตัวเติมเพิ่มคุณภาพให้กับน้ำมันหล่อลื่นที่ผลิตมาจากน้ำมันปิโตรเลียม เพื่อเพิ่มความลื่นและความเข้ากันกับน้ำ (ภูมิวิวัฒน์ พิงพันธ์, 2555)

2.2.1.2 น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานจากน้ำมันแร่ (Minerals Oils) หรือ น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานจากปิโตรเลียม (Petroleum basestock) เป็นน้ำมันที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากมีคุณภาพดีและราคาถูก ได้มาจากการนำส่วนหนักที่ได้จากการกลั่นน้ำมันดิบ (Long residue) มากลิ้นใหม่อีกครั้งโดยใช้การกลั่นแบบสูญญากาศ และนำไปปรับปรุงคุณภาพให้ดีขึ้น (กรมธุรกิจพลังงาน, 2554)

2.2.1.3 น้ำมันสังเคราะห์ (Synthetics oils) เป็นน้ำมันที่สังเคราะห์ขึ้นโดยกระบวนการทางเคมี ซึ่งผลิตในห้องปฏิบัติการโดยสารเริ่มต้นส่วนใหญ่ที่ใช้มาจากน้ำมันปิโตรเลียม จากนั้นนำไปปรับแต่งให้มีโครงสร้างของโมเลกุลให้มีความบริสุทธิ์และมีความสม่ำเสมอ ก่อนนำไปใช้งานต่อไป (“The Difference Between Synthetic Oil and Mineral Oil”, 2021) ซึ่งน้ำมันสังเคราะห์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีราคาค่อนข้างแพง ใช้เฉพาะในงานที่ต้องการคุณสมบัติพิเศษในบางประเภท เช่น ใช้ในเครื่องยนต์ที่ต้องการดัชนีความข้นใสที่สูง จุดไหลเทที่ต่ำ หรือมีอัตราการระเหยของน้ำมันที่ต่ำ เป็นต้น (ภูมิวิวัฒน์ พิงพันธ์, 2555)

## 2.2.2 สารเพิ่มคุณภาพ (Additives)

น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานสามารถทำหน้าที่หล่อลื่นได้ระดับหนึ่ง แต่เพื่อให้เกิดความเหมาะสมของการใช้งานของแต่ละประเภทเครื่องยนต์ จึงมีการเติมสารเพิ่มคุณภาพลงไปในน้ำมันหล่อลื่นในสัดส่วนที่เหมาะสม โดยเครื่องยนต์หรือส่วนประกอบของเครื่องยนต์แต่ละชนิดมีความต้องการสารเพิ่มคุณภาพที่แตกต่างกันออกไป ดังภาพที่ 2 โดยการใช้สารเพิ่มคุณภาพในเครื่องยนต์ที่ใช้ น้ำมันดีเซลหรือน้ำมันเบนซินมีอัตราการใช้สูงที่สุด และมีอัตราการใช้สารเพิ่มคุณภาพในใบพัดและอุปกรณ์ไฮดรอลิกในอัตราที่ต่ำที่สุด (Gatto, 2015)



ภาพที่ 2 องค์ประกอบของน้ำมันพื้นฐานและสารเพิ่มคุณภาพในน้ำมันหล่อลื่น  
ที่มา: Gatto (2015)

นอกจากนี้สารเพิ่มคุณภาพส่วนใหญ่เป็นสารเคมีที่ผ่านกระบวนการจนสามารถละลายในน้ำมันได้และไม่ถูกกรองออกไประหว่างกระบวนการผลิต ทั้งนี้เครื่องจักรกลและเครื่องยนต์ในปัจจุบันได้รับการออกแบบให้มีขนาดเล็กลง ทำงานเร็วขึ้นและภาระน้ำมันสูงมากขึ้น น้ำมันหล่อลื่นในเครื่องจักร หรือเครื่องยนต์ดังกล่าวมักต้องประสบกับสภาวะด้านอุณหภูมิ ความเครียด และภาระน้ำหนักสูง น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานเพียงอย่างเดียว อาจมีคุณภาพดีไม่เพียงพอที่จะทำหน้าที่ต่างๆ ให้ได้ครบถ้วนและมีอายุการใช้งานที่สั้นกว่ากำหนด ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารในปริมาณที่พอดี เพื่อเพิ่มคุณสมบัติทั้งในด้านเคมีและกายภาพของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น และเหมาะสมกับงานที่ต้องการ ซึ่งสารเพิ่มคุณภาพมีหลายประเภท และมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1 โดยสารเพิ่มคุณภาพนี้สามารถช่วยทำให้น้ำมันหล่อลื่นมีคุณสมบัติที่ดีขึ้น และเหมาะสมกับการใช้งานกับเครื่องยนต์แต่ละชนิดอีกด้วย

**ตารางที่ 1** ประเภทของสารเพิ่มคุณภาพ (Additives) ในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

ประเภท	สารเพิ่มคุณภาพ (Additives)	คุณสมบัติ
1	สารชะล้างทำความสะอาด (Detergent)	ชะล้างสิ่งสกปรกออกจากผิวของชิ้นส่วนเครื่องยนต์
2	สารกระจายเขม่า (Dispersants)	กระจายเขม่าและตะกอนสิ่งสกปรกไม่ให้จับตัวเป็นก้อน
3	สารป้องกันการสึกหรอ (Anti-wear agents)	ป้องกันการสึกหรอที่เกิดจากการขัดสีของชิ้นส่วนเครื่องยนต์ที่มีการเคลื่อนไหว และช่วยลดแรงกระแทก
4	สารช่วยลดการเกิดฟอง (Anti foam agents)	ช่วยยับยั้งการเกิดฟอง และช่วยให้ฟองที่เกิดขึ้นแล้วแตกตัวไม่เหลือสะสมในระบบหล่อลื่น
5	สารลดการเกิดออกซิเดชัน (Anti oxidation agent)	ช่วยป้องกันไม่ให้ออกซิเจนทำปฏิกิริยากับเนื่อน้ำมันลดการเกิดยางเหนียวและตะกอน ยับยั้งการเสื่อมคุณภาพของน้ำมันหล่อลื่น
6	สารป้องกันสนิม (Rust inhibitors)	ป้องกันการกัดกร่อนของสารเคมี เช่น กรดที่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงซึ่งมีฤทธิ์กัดกร่อนผิวชิ้นส่วนเครื่องยนต์
7	สารป้องกันการกัดกร่อน (Corrosion inhibitors)	ป้องกันการกัดกร่อนของสารเคมี เช่น กรดที่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงซึ่งมีฤทธิ์กัดกร่อนผิวชิ้นส่วนของเครื่องยนต์
8	สารช่วยลดจุดไหลเท (Pour point depressants)	ช่วยให้น้ำมันหล่อลื่นไม่แข็งตัวในที่อุณหภูมิต่ำ และช่วยป้องกันไม่ให้ไขในน้ำมันเกาะตัวเป็นผลึก
9	สารลดแรงเสียดทาน (Friction modifiers)	ช่วยลดความเสียดทานของผิวชิ้นส่วนเครื่องยนต์ที่สัมผัสกับน้ำมัน
10	สารช่วยเพิ่มดัชนีความหนืด (Viscosity index improver)	ช่วยลดอัตราเปลี่ยนแปลงความหนืดของน้ำมันหล่อลื่นเมื่ออุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลง

ที่มา: ดัดแปลงจาก กระทรวงพลังงาน (2554)

## 2.3 หน้าที่ของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

2.3.1 หล่อลื่นชิ้นส่วนต่างๆ ที่เคลื่อนไหวยภายในเครื่องยนต์ ลดแรงเสียดทาน และป้องกันการสึกหรอเครื่องยนต์ประกอบด้วยชิ้นส่วนโลหะที่เคลื่อนไหวยอยู่หลายส่วนด้วยกัน เมื่อเครื่องยนต์ทำงาน ชิ้นส่วนต่างๆ ที่มีการเคลื่อนที่เสียดสีกันทำให้เกิดความผิด เกิดแรงเสียดทาน และเกิดการสึกหรอ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จะสร้างฟิล์มบางๆ เข้าไปแทรกอยู่ระหว่างผิวหน้าของชิ้นส่วนต่างๆ เหล่านี้ เพื่อป้องกันการสัมผัสกันโดยตรงของโลหะ ลดการเสียดสี ลดแรงเสียดทาน และลดการสึกหรอ ทำให้เครื่องยนต์มีอายุการใช้งานยาวนานขึ้น

2.3.2 ช่วยระบายความร้อนให้แก่เครื่องยนต์ ในขณะที่เครื่องยนต์ทำงานจะเกิดความร้อนขึ้นกับชิ้นส่วนภายในเครื่อง โดยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จะเข้าไปช่วยดูดซับความร้อนที่เกิดขึ้นกับชิ้นส่วนต่างๆ ออกมา และควบคุมอุณหภูมิของเครื่องยนต์ให้เหมาะสมเพื่อจะได้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ

2.3.3 ชะล้างสิ่งสกปรก เมื่อเครื่องยนต์ทำงานจะเกิดการเผาไหม้ ทำให้เกิดสิ่งสกปรก หรือเขม่า ตกค้างจากการเผาไหม้เกาะติดอยู่เป็นจำนวนมาก น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จะมีสารชะล้าง เมื่อไหลเวียนไปตามจุดต่างๆ ของเครื่องยนต์ก็จะชำระล้างสิ่งสกปรก เขม่า และตะกอนที่สะสมอยู่จนไหลปะปนมากับน้ำมันเครื่องแล้วเข้าสู่ไส้กรองน้ำมันเครื่องต่อไป

2.3.4 รักษากำลังอัดของเครื่องยนต์ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จะแทรกเข้าไประหว่างลูกสูบ แหวนลูกสูบ และกระบอกสูบ ซึ่งเป็นกระบวนการสร้างแรงอัดให้กับเครื่องยนต์ ป้องกันก๊าซที่เป็นส่วนผสมของเชื้อเพลิงกับอากาศไม่ให้เล็ดลอดผ่านช่องว่างระหว่างแหวน เพื่อไม่ให้กำลังอัดของเครื่องยนต์ที่อยู่บริเวณบนหัวลูกสูบรั่วไหลออกจากห้องเผาไหม้จนทำให้เครื่องยนต์ไม่มีกำลัง

2.3.5 ป้องกันสนิมและการกัดกร่อนของชิ้นส่วนเครื่องยนต์ กรดที่เกิดขึ้นจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงทำให้ชิ้นส่วนของเครื่องยนต์ถูกกัดกร่อน โดยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จะเคลือบผิวชิ้นส่วนของเครื่องยนต์ ป้องกันการเกิดสนิมและทำให้ความเป็นกรดลดน้อยลง

## 2.4 ผลกระทบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ถูกใช้อย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็นที่ปั้มน้ำมัน อู่ซ่อมรถ หรือในบ้านเรือนที่ผู้ใช้งานสามารถทำการบำรุงรักษาเครื่องยนต์ได้ด้วยตนเอง ซึ่งการสัมผัสน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้งานแล้วส่งผลให้เป็นอันตรายแก่ผู้ใช้งานและยังทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่ง การกำจัดน้ำมันหล่อลื่นที่ไม่ถูกวิธี ทำให้ส่งผลเสียหลายประการ เช่น การบำบัดยากขึ้น ค่าใช้จ่ายสูงขึ้น ใช้เวลาการบำบัดนานขึ้น และการฝังกลบที่ได้ดินจะทำให้ของเสียซึมลงสู่น้ำใต้ดิน ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในดินและในน้ำได้ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งผลกระทบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดังนี้

#### 2.4.1 ผลกระทบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ต่อมนุษย์

เมื่อร่างกายสัมผัสกับน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นประจำ ผิวหนังจะเกิดการแห้งแตก ระคายเคืองผิวหนัง นอกจากนี้อาจมีผื่นแดงเกิดขึ้น เนื่องจากน้ำมันจะไปชะล้างไขมันธรรมชาติออกจากผิวหนัง ทำให้เกิดการติดเชื้อและแพ้ได้ง่าย และหากสูดดมรับไอระเหยของน้ำมันหล่อลื่นจะทำให้เกิดอาการวิงเวียน คลื่นไส้อ่อนเพลีย ง่วงนอน ระคายเคืองต่อหลอดลมและปอดได้ หรือหากรับประทานอาหารหรือน้ำที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกาย สารเพิ่มคุณภาพที่มีอยู่ในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จะทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ ปวดท้องและท้องเสียได้ ซึ่งในกรณีที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เข้าสู่ร่างกายเป็นระยะเวลาสั้น อาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ในอนาคต

#### 2.4.2 ผลกระทบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ต่อสิ่งแวดล้อม

หากน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วปนเปื้อนลงในท่อน้ำสาธารณะหรือแหล่งน้ำ ถือเป็นการทำลายระบบนิเวศวิทยาในแหล่งน้ำ เพราะน้ำมันจะลอยตัวและรวมตัวบนผิวน้ำปิดกั้นไม่ให้ออกซิเจน และแสงอาทิตย์ผ่านไปได้ ซึ่งเป็นการทำลายแหล่งอาหาร การวางไข่ของสัตว์น้ำ

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์หากมีการปนเปื้อนลงสู่ดิน ทำให้พื้นดินบริเวณนั้นเสียคุณค่าในการเพาะปลูก ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในดิน และหากซึมลงสู่ชั้นน้ำใต้ดินจะทำให้น้ำนั้นมีกลิ่นเหม็นจนไม่สามารถนำไปอุปโภคและบริโภคได้

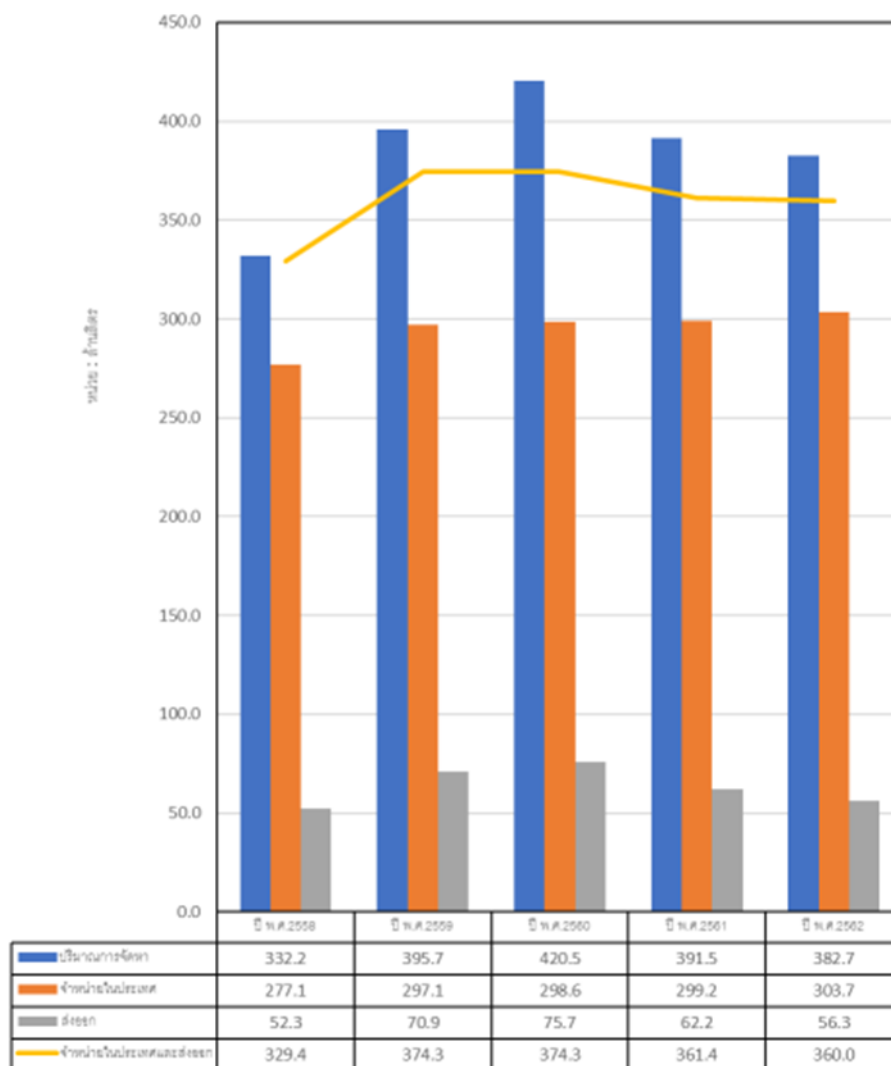
นอกจากนี้การเผาน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วและภาชนะบรรจุทำให้เกิดไอ ควันทันพิษที่มีโลหะหนัก และออกไซด์ของโลหะฟุ้งกระจายสู่บรรยากาศ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาระบบทางเดินหายใจได้

### 2.5 ปริมาณการใช้น้ำมันหล่อลื่นในประเทศไทย

#### 2.5.1 ปริมาณการจัดการและการจัดจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

ปริมาณการจัดการน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ได้แก่ การผลิตภายในประเทศและการนำเข้ามาจากต่างประเทศ และปริมาณการจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ได้แก่ การจำหน่ายภายในประเทศและส่งออก

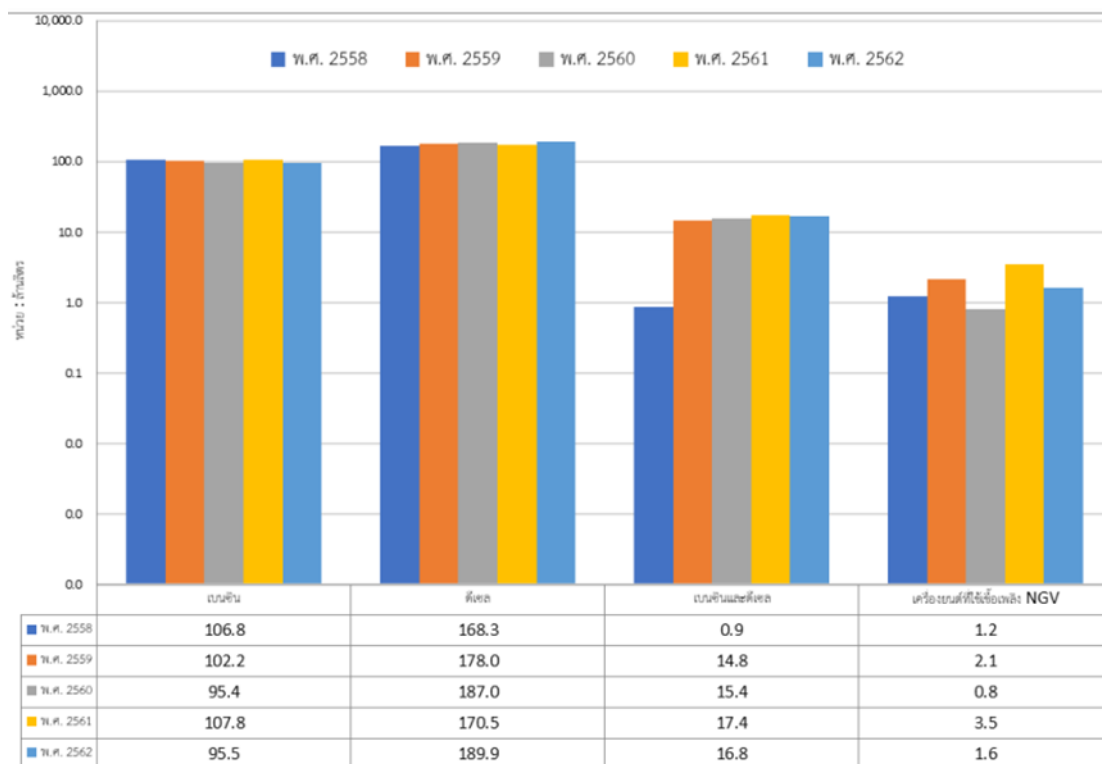
ดังนั้น ปริมาณการจัดการและการจัดจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ สามารถแสดงดังภาพที่ 3 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบปริมาณการจัดการและการจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 – พ.ศ. 2562



ภาพที่ 3 ปริมาณการจัดหาและการจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 – พ.ศ. 2562  
ที่มา: กองคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง (2563)

### 2.5.2 ปริมาณการจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องภายในประเทศสำหรับเครื่องยนต์แต่ละประเภท

ปริมาณการจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ภายในประเทศสำหรับเครื่องยนต์แต่ละประเภท ได้แก่ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์สำหรับเครื่องยนต์เบนซิน เครื่องยนต์ดีเซล เครื่องยนต์เบนซินและดีเซล และสำหรับเครื่องยนต์ที่ใช้เชื้อเพลิง NGV ดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งพบว่ามีความต้องการใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์สำหรับเครื่องยนต์แต่ละประเภทที่เพิ่มขึ้นและลดลงแตกต่างกัน



ภาพที่ 4 ปริมาณการจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ภายในประเทศสำหรับเครื่องยนต์แต่ละประเภท  
ที่มา: กองคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง (2563)

## 2.6 วิธีการกำจัดคราบน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสิ่งแวดล้อม

วิธีการกำจัดคราบน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสิ่งแวดล้อม สามารถแบ่งวิธีการกำจัดได้เป็น 3 วิธีคือ

### 2.6.1 วิธีทางกายภาพ

การกำจัดทางกายภาพมีหลายวิธีที่เกี่ยวข้อง เช่น การฉีดล้างร่วมกับการควบคุมและการนำกลับ (Flushing or washing with containment and recovery) และการกำจัดด้วยแรงงานคนหรือเครื่องจักร (Manual or mechanical removal) ในทางปฏิบัติการกำจัดด้วยแรงงานคน (Manual removal) เกี่ยวข้องกับการตักและกวาดชั้นผิวหน้าน้ำมัน (Thick surface oil) การประยุกต์ใช้ตัวดูดซับน้ำมัน (Sorbent) สำหรับดูดซับและการนำกลับของน้ำมัน (พิสุทธิ์ เพ็ชรมนกุล, 2556) โดยใช้วัสดุดูดซับหรือจับน้ำมัน ซึ่งวัสดุจะเป็นตัวกลางจำพวกสังเคราะห์หรือโลหะบางชนิดคอยดูดซับน้ำมันที่ลอยเหนือผิวน้ำ แล้วถูกส่งผ่านไประิดออกด้วยแผ่นรีดน้ำมันก่อนจะสุบไปเก็บไว้ที่ถังเก็บ (ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์, 2533)

## 2.6.2 วิธีทางเคมี

เป็นการใช้สารเคมีในการกำจัดน้ำมัน โดยมีการนำสารเคมีไปฉีดในบริเวณที่มีการปนเปื้อน โดยสามารถแบ่งประเภทการกำจัดได้ 3 ลักษณะ คือ

ลักษณะกระจายคราบน้ำมัน มีสารลดแรงตึงผิวเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับน้ำมัน ทำให้น้ำมันแตกตัวและแพร่กระจายในน้ำ ช่วยให้สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการธรรมชาติโดยง่าย

ลักษณะการล้างคราบน้ำมัน ซึ่งจะประกอบด้วยสารเพิ่มความเปียก (wetting agent) ที่ทำให้น้ำมันอ่อนตัวลง หรือมีความหนืดลดลงเพื่อช่วยให้สามารถใช้น้ำในการชะล้างและทำความสะอาดน้ำมันจากพื้นผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลักษณะการรวบรวมคราบน้ำมัน มีสารที่ทำให้น้ำมันรวมตัวกับน้ำ หรือรวมตัวกันเป็นก้อน หรือเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นสารเหนียวข้นคล้ายยางหรือวุ้น รวมทั้งวัสดุหรือสารที่สามารถดูดซับน้ำมัน โดยน้ำมันที่รวมกับสารเหล่านี้จะลอยตัวอยู่บนผิวน้ำ และต้องดำเนินการเก็บรวบรวมเพื่อนำไปกำจัดต่อไป ซึ่งสารเคมีที่นำมาใช้ต้องได้รับมาตรฐานและผ่านการอนุญาตจากกรมควบคุมมลพิษ ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** รายชื่อสารเคมีขจัดคราบน้ำมันที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในประเทศไทย

ลำดับที่ (NO.)	ชื่อสารเคมี (Product Name)	บริเวณที่ อนุญาต ให้ใช้ได้ <sup>1</sup> (Approved use)	วันหมดอายุ (Expiry Date)	วันลงทะเบียน/ วันที่ปรับปรุง (Revised Date)	หน่วยงานที่อนุญาต (Authorized agency) <sup>2</sup>
1	ACCELL CLEAN®DWD	*	*	18/07/2011	U.S. EPA.
2	Agma DR 379	S B RS	11/06/2026	*	MMO
3	BIODISPERS	*	*	28/06/2002	U.S. EPA.
4	CHEMAX 307 Oil spill dispersant	*	*	*	TISI
5	Chimec Chimspers 6000 (CHIMEC CHIMSPERSE 6000)	S B	12/10/2023		MMO U.S.EPA

ลำดับที่ (NO.)	ชื่อสารเคมี (Product Name)	บริเวณที่ อนุญาต ให้ใช้ได้ <sup>1</sup> (Approved use)	วันหมดอายุ (Expiry Date)	วันลงทะเบียน/ วันที่ปรับปรุง (Revised Date)	หน่วยงานที่อนุญาต (Authorized agency) <sup>2</sup>
6	Corexit EC9500A	S	14/01/2024	* 02/07/2020	MMO AMSA U.S.EPA.
7	Corexit EC9500B	S	31/07/2025	*	MMO U.S. EPA.
8	Corexit EC9527A (COREXIT®EC9527A)	*	*	01/01/2012	AMSA U.S.EPA.
9	Dasic Slickgone NS	*	01/02/2023	01/02/2018	AMSA
10	Dasic Slickgone EW	*	01/02/2023	01/02/2018	AMSA
11	Disperep 12	S	16/06/2026	*	MMO
12	DISPERSIT SPC 1000™	*		22/04/1999	U.S. EPA.
13	Eflochem OSD	S RS	29/01/2025	*	MMO
14	FFT-SOLUTION®	*	*	1/11/2011	U.S. EPA.
15	Finasol OSR 51	S B RS	12/02/2023	* 20/12/2019	MMO AMSA
16	Finasol OSR 52	S B RS	03/04/2025	03/11/2020	MMO AMSA
17	FINASOL®	*	*	30/01/2003	U.S. EPA.
18	JD-109	*	*	20/09/2000	U.S. EPA.
19	JD-2000™	*	*	06/08/2001	U.S. EPA.
20	NEOS AB3000	*	*	26/01/1996	U.S. EPA.
21	NOKOMIS 3-AA	*	*	31/07/2008	U.S. EPA.
22	NOKOMIS 3-F4	*	*	04/03/2002	U.S. EPA.
23	MARE CLEAN 200	*	*	26/01/1996	U.S. EPA.

ลำดับที่ (NO.)	ชื่อสารเคมี (Product Name)	บริเวณที่ อนุญาต ให้ใช้ได้ <sup>1</sup> (Approved use)	วันหมดอายุ (Expiry Date)	วันลงทะเบียน/ วันที่ปรับปรุง (Revised Date)	หน่วยงานที่อนุญาต (Authorized agency) <sup>2</sup>
24	MARINE D-BLUE CLEAN™	*	*	23/04/2012	U.S. EPA.
25	OSD/LT Oil Spill Dispersant	S B RS	20/06/2026	*	MMO
26	Radigreen OSD	S	03/02/2015	*	MMO
27	SEA BRAT #4	*	*	26/11/2002	U.S. EPA
28	Seacare OSD2	S B RS	15/11/2023	*	MMO
29	Slickgone EW	S B RS	25/03/2024	*	MMO
30	Slickgone NS	S B RS	31/05/2023	*	MMO
31	Super-dispersant 25	S B RS	27/03/2025	*	MMO
32	SAF-RON GOLD	*	*	03/01/2005	U.S. EPA
33	ZI-400	*	*	16/06/2005	U.S. EPA

หมายเหตุ (Remark)

1) บริเวณที่อนุญาตให้ใช้ (Approved use)

S = Sea (ทะเล) B = Beach (ชายหาดทราย)

RS = Rocky shot (ชายหาดหิน) \* = Unidentified (ไม่ได้ระบุ)

2) หน่วยงานที่อนุญาตให้ใช้ (Reference Agencies)

- Marine Management Organisation : MMO
- U.S. Environmental Protection Agency : U.S. EPA
- Australian Maritime Safety Authority : AMSA
- Thai Industrial Standards Institute : TISI

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2566)

นอกจากนี้ ศิริรัตน์ บุญโสภณ (2561) ได้ทำการศึกษาการขจัดคราบน้ำมันในทะเลอ่าวพร้าว ซึ่งใช้สารเคมีในกลุ่ม slickgone โดยปริมาณการใช้ที่เหมาะสมของสาร slickgone คือ สารเคมี 1 ส่วน ต่อน้ำมัน 30 ส่วน สารในกลุ่มนี้ยังไม่มีข้อมูลว่าทำให้เกิดความผิดปกติในระยะยาว แต่มีผลทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง แสบร้อน ซึ่งอาการแพ้เกิดขึ้นได้สำหรับคนที่เข้าไปจับเก็บโดยตรง เนื่องจากสารดังกล่าวมีการสะสม โดยปริมาณคราบน้ำมันที่ประเมินได้จากภาพถ่ายดาวเทียมมีความกว้าง 10-15 ตารางกิโลเมตร ยาว 8 ตารางกิโลเมตร ปริมาณน้ำมันคาดว่าอยู่ที่ประมาณ 15 ตัน พบว่าสภาพทางกายภาพของอ่าวพร้าวพื้นดินสภาพมาเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำทะเลไม่มีคราบน้ำมันที่ผิว และทรายชายหาดกลับมามีสีขาว แต่ผลกระทบระยะยาวต่อเนื่องจากคราบน้ำมันและจากการใช้สารเคมียังต้องมีการศึกษาและติดตามผลต่อไป

### 2.6.3 วิธีทางชีวภาพ

วิธีการทางชีวภาพเป็นวิธีการที่เกี่ยวข้องกับการใช้สิ่งมีชีวิตเพื่อย่อยสลายสารอันตรายที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม การฟื้นฟูทางชีวภาพในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่มีประสิทธิภาพ ประหยัด และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งประสิทธิภาพของวิธีการนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำมัน ลักษณะของดิน และองค์ประกอบของสารมลพิษ (Balba et al., 1998) เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้นพบในจุลินทรีย์ทุกกลุ่ม โดยจุลินทรีย์บางชนิดอาจจะมี ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดขึ้นอยู่กับ การปรับตัว และการพัฒนาระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายเพื่อให้จุลินทรีย์ใช้ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน

ดังนั้นในปัจจุบันมีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมมาใช้กำจัดน้ำมัน เครื่องยนต์ โดยมีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง ทนต่อสภาพแวดล้อม สามารถเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนมีจำนวนเพียงพอต่อการย่อยสลายโมเลกุลน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใน สภาพแวดล้อมได้ดีโดยอาศัยเทคโนโลยี และควบคุมโดยผู้เชี่ยวชาญการคัดเลือก ทำให้ปราศจาก จุลินทรีย์ก่อโรค ไม่เป็นพิษต่อ คน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

## 2.7. การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยกระบวนการต่างๆ เช่น การดูดซับกับดินหรือตะกอน การสลายตัวโดยแสง การระเหย การสะสม อยู่ในสิ่งมีชีวิต และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวที่เกิดขึ้นสามารถทำให้ สารพิษที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมหายไปได้ส่วนหนึ่ง โดยเฉพาะในกลุ่มของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มี

มวลโมเลกุลต่ำ แต่สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลสูง ส่วนใหญ่จะถูกดูดซับไว้ในอนุภาคดินหรือตะกอนในดิน ซึ่งส่งผลให้เกิดการสะสมและเพิ่มความคงทนของสารพิษในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น โดยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เพียงหนึ่งชนิดหรือสองชนิด ในขณะที่จุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้หลายชนิดพร้อมกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การปรับตัว และระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ที่สามารถสร้างได้ โดยจุลินทรีย์จะใช้ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันเพื่อเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการดำรงชีวิต และทำการเปลี่ยนรูปของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลงได้ (สมศักดิ์ วังใน, 2528) ดังตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างของจุลินทรีย์ส่วนหนึ่งที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

### ตารางที่ 3 ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

ประเภทของจุลินทรีย์	สายพันธุ์ของจุลินทรีย์
แบคทีเรีย (Bacteria)	<i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Bacillus thermoleovorans</i> , <i>Pseudomonas putida</i> GPo1 alkB, <i>Acinetobacter</i> spp. alkM, <i>Rhodococcus</i> spp. alkB1, <i>Rhodococcus</i> spp. alkB2, <i>Pseudomonas putida</i> xylE, <i>Pseudomonas putida</i> ndoB และกลุ่มแบคทีเรียพวก Cocci

ที่มา: ดัดแปลงจาก พีรภานต์ บรรเจิดกิจ และคณะ (2552)

นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมัน และชนิดของสารที่อยู่ในองค์ประกอบของน้ำมันที่แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันและสารที่อยู่ในองค์ประกอบของน้ำมัน

องค์ประกอบหลักของน้ำมัน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	โครงสร้างหลักในการย่อย
Aliphatics	<i>Dietzia</i> sp.	<i>n</i> -alkanes (C6-C40)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>n</i> -alkanes (C14-C30)
	<i>Oleispira antarctica</i>	<i>n</i> -alkanes (C10-C18)
	<i>Rhodococcus ruber</i>	<i>n</i> -alkanes (C13-C17)
	<i>Geobacillus thermodenitrifican</i>	<i>n</i> -alkanes (C15-C36)
	<i>Rhodococcus</i> sp.	Cyclohexane
Aromatics	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Mono/polyaromatics
	<i>Aeribacillus pallidus</i>	Mono/polyaromatics
	<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	Monoaromatics
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Monoaromatics
	<i>Cycloclasticus</i>	Polyaromatics
	<i>Neptunomonas naptunomonas</i>	Polyaromatics
	<i>Bacillus mojavensis</i>	Polyaromatics
	<i>Sphingomonas</i>	Polyaromatics
	<i>Sphingobium</i>	Polyaromatics
<i>Novosphingobium</i>	Polyaromatics	
Resins and asphaltenes	<i>Pseudomonas</i> sp.	Resins
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Asphaltenes
	<i>Bacillus</i> sp.	Asphaltenes
	<i>Citrobacter</i> sp.	Asphaltenes

องค์ประกอบหลักของน้ำมัน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	โครงสร้างหลักในการย่อย
	<i>Enterobacter</i> sp.	Asphaltenes
	<i>Staphylococcus</i> sp.	Asphaltenes
	<i>Lysinibacillus</i> sp.	Asphaltenes
	<i>Bacillus</i> sp.	Asphaltenes
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Asphaltenes

ที่มา: ดัดแปลงจาก Xu et al. (2018)

จากงานวิจัย วิชดา เกตุใหม่ และคณะ ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 36 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรีย 25 ไอโซเลต และยีสต์ 11 ไอโซเลต โดยยีสต์ไอโซเลต PO1.2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าโคโลนีของยีสต์ PO1.2 บนอาหาร YM agar มีลักษณะสีขาวขุ่น ขอบเรียบ แบนราบ เมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางลำดับดีเอ็นเอด้วย 26S rDNA sequencing พบว่าใกล้เคียงกับเชื้อ *Issatchenkia orientalis* เมื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุดที่ 0.5% ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ร้อยละ 63.60

### 2.7.1 กลไกการย่อยสลายสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์

การย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์สามารถย่อยได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โดยความเข้มข้นของออกซิเจนส่งผลต่ออัตราการย่อยสลาย เนื่องจากออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ซึ่งในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายอาจเป็นไนเตรต ซัลเฟต หรือเหล็ก และการย่อยสลายทางชีวภาพแบบไม่มีออกซิเจนจะเกิดขึ้นช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรย่อยสลายภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

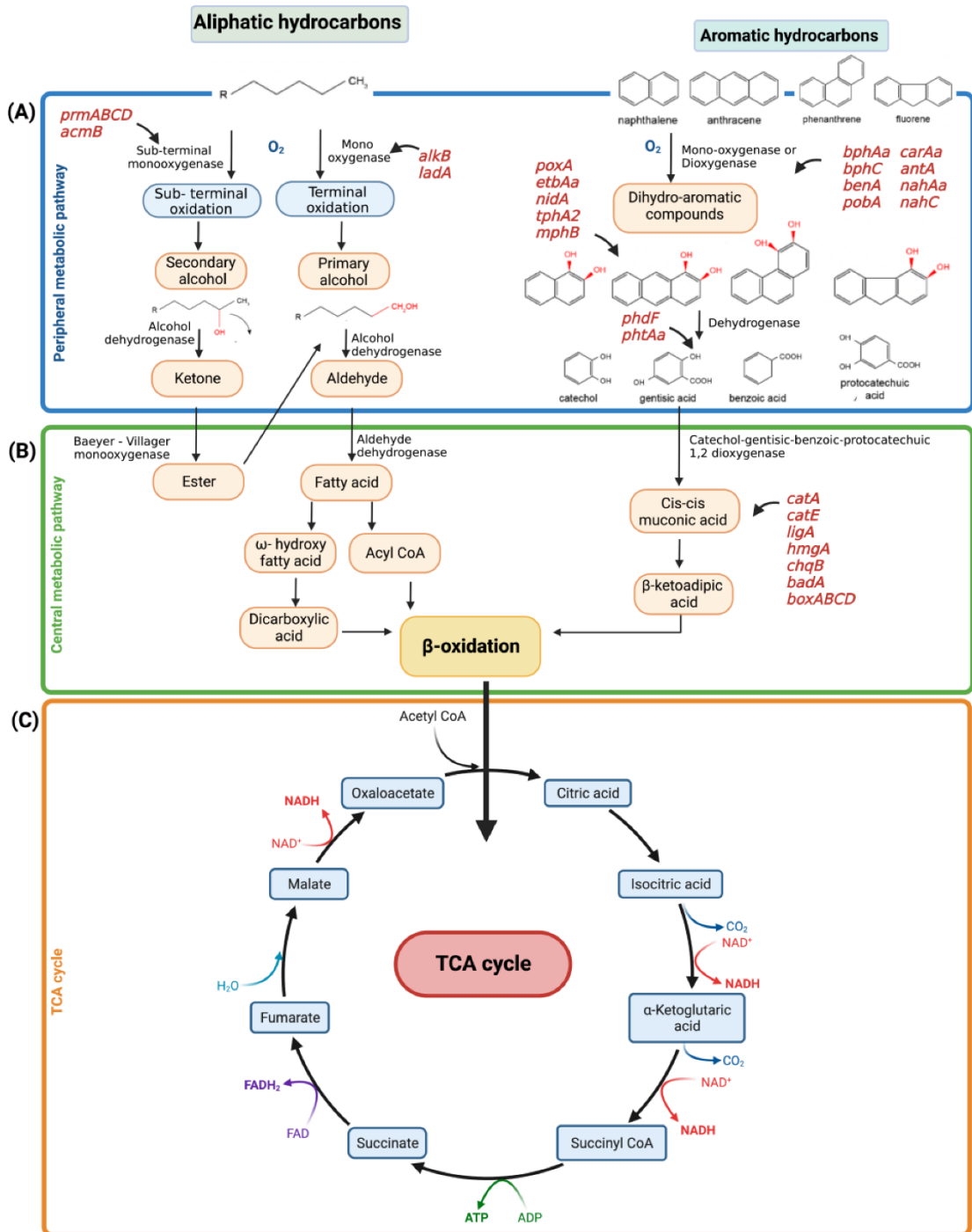
องค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้งานแล้วประกอบด้วยสารอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างและกลไกในการย่อยของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน

### 2.7.1.1 การย่อยสลายสารอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์

สารอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนที่ปลายพันธะไม่มีหมู่ Methyl เกาะอยู่ ซึ่งจะเกิดการย่อยโดยกลไกการเกิดปฏิกิริยา Oxidation และ Dehydration ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นกรดไขมันโดยจะถูกย่อยสลายต่อโดยกลไกการเกิด  $\beta$ -Oxidation ต่อไป นอกจากนี้ในกรณีของการย่อย Cyclohexane เกิดการย่อยโดยปฏิกิริยา Hydroxylation โดยมีเอนไซม์ Oxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดย Alicyclic alcohol จะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยปฏิกิริยา Dehydrogenation และ Oxidation ได้เป็นสารประกอบ Dicarboxylic acid ซึ่งเข้าสู่กลไกการเกิด  $\beta$ -Oxidation ต่อไป (Juhasz et al., 1997)

### 2.7.1.2 การย่อยสลายสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์

ขั้นตอนกระบวนการเริ่มด้วยการย่อยสลายส่วนที่เป็น Side chain แล้วจึงย่อยส่วนของวงแหวนเบนซีน (สมศักดิ์ วังไฉน, 2528) กระบวนการย่อยสลายต้องการออกซิเจน โดยปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องข้องในกระบวนการย่อยสลายคือกระบวนการเกิด Oxidation และ Ring cleavage สารเมตาบอไลต์ที่พบเกิดขึ้นในระหว่างที่มีการย่อยสลาย เช่น Catechol จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น Acetyl CoA หรือ Pyruvic acid ซึ่งจะเข้าสู่ Tricarboxylic acid cycle ต่อไป และเมื่อกระบวนการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Atlas, 1992) โดยกลไกการย่อยสลายสารอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน และสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนแสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กลไกการย่อยสลายสารอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน และสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

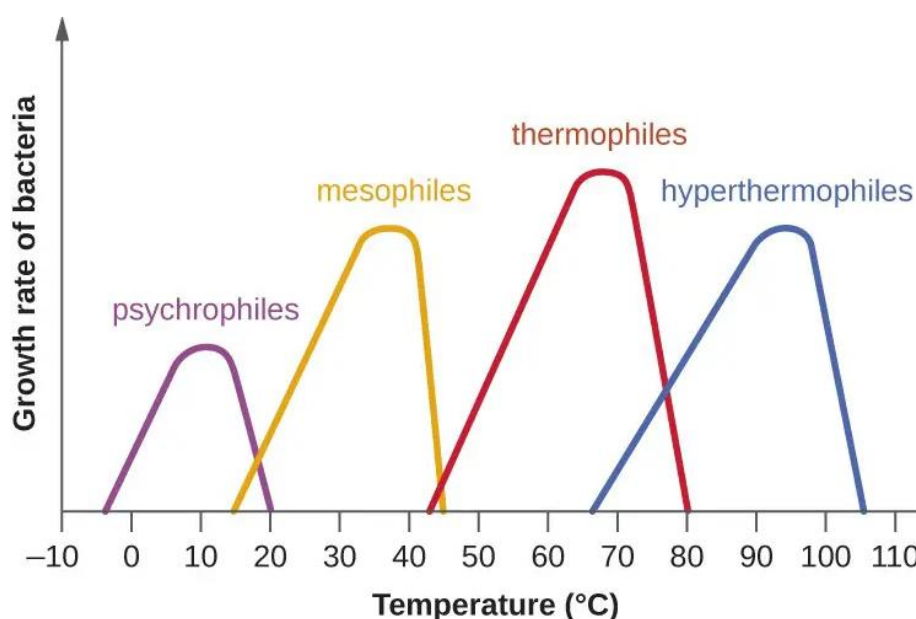
โดยจุลินทรีย์

ที่มา: Pandolfo et al. (2023)

## 2.7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์

### 2.7.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการการเจริญที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ได้แก่ Psychrophiles, Mesophiles, Thermophiles และ Hyper thermophiles ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ -5 ถึง 20 องศาเซลเซียส, 15 ถึง 45 องศาเซลเซียส, 42 ถึง 80 องศาเซลเซียส และ 66 ถึง 105 องศาเซลเซียสตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ช่วงอุณหภูมิที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต  
ที่มา: Tankeshwae (2022)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการย่อยสลายส่วนประกอบต่างๆ ของน้ำมัน ซึ่งจากการศึกษาของขนาดยา ศมศานต์ (2544) พบว่าผลของอุณหภูมิมิมีผลต่อส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำมันระหว่างการย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ โดยการวิเคราะห์โดยวิธี Gas chromatography พบว่าเชื้อ *Acinetobacter* sp. สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยย่อยสลายได้ 72.28 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *Acinetobacter* sp. มีการย่อยสลายน้ำมันลดลงโดยย่อยสลายได้ 65.26 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการย่อยสลายของน้ำมันได้

### 2.7.2.2 ผลของสารอาหารต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์

อัตราส่วนของสารอาหารในรูป Carbon/Nitrogen (C/N) ที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ เริ่มต้นมีผลต่อการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ ซึ่งสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อปริมาณของคาร์บอนที่เปลี่ยนไป ซึ่งทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และ ทำให้ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์นั้นต่ำลงไปด้วย (Choi et al., 2002) ซึ่งในการกระตุ้นให้จุลินทรีย์มีการย่อยสลายน้ำมันจำเป็นต้องมีการเติมคาร์บอน ให้กับจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแล้วอัตรา C/N ที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ คือ 60-100:1 (Dibble & Bartha, 1979)

### 2.7.2.3 ผลของออกซิเจนต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์

ปริมาณออกซิเจนมีผลโดยตรงต่อการย่อยสลายของน้ำมันหล่อลื่นโดยจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (Aerobes) โดยหากมีการปนเปื้อนน้ำมัน ในแหล่งน้ำพบว่าปริมาณออกซิเจนในอากาศมีส่วนช่วยในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ได้โดยตรง ซึ่งหากมีการปนเปื้อนน้ำมันในดินจะพบว่าปริมาณออกซิเจนขึ้นอยู่กับปริมาณของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ออกซิเจนจากอากาศ ปริมาณน้ำในดิน และชนิดของดิน ซึ่งส่งผลให้อัตราการย่อยสลายน้ำมันโดย จุลินทรีย์ในดินช้ากว่าในน้ำ เนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนที่ค่อนข้างจำกัดกว่าในน้ำ อย่างไรก็ตาม การย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการใช้ออกซิเจนในการเจริญสามารถเกิดขึ้นได้เช่นกัน (Bailey et al., 1973)

### 2.7.2.4 ผลของ pH ต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์

ค่า pH มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยส่วนใหญ่ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันจะเจริญได้ดีในช่วง pH เป็นกลาง ซึ่งค่า pH ของดิน เป็นกรดหรือเป็นเบสที่รุนแรงมากจะส่งผลกระทบต่ออัตราการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ โดยจะทำให้อัตราเร็ว ในการย่อยสลายน้ำมันเกิดขึ้นได้ช้า เพราะสภาวะของดินที่เป็นกรดและเบสที่รุนแรงจะยับยั้งการ เจริญและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์

## 3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

3.1 การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดย *Pseudomonas aeruginosa* DP-1 และการหาสภาวะที่เหมาะสม (Parikh et al., 2018)

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีองค์ประกอบการปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว สังกะสี แบริยม เป็นต้น เนื่องจากการสึกหรอของเครื่องยนต์ และการได้รับความร้อนเป็น เวลานาน ซึ่งน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีปริมาณของ PAHs (Polycyclic aromatic

hydrocarbons) ที่เป็นสารก่อมะเร็ง โลหะหนักส่งผลให้เกิดความเป็นพิษที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใหม่ ดังนั้นจึงส่งผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมโดยตรงเมื่อเกิดการรั่วไหลสู่ธรรมชาติ

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมสามารถบำบัดได้ด้วย 3 วิธี คือ วิธีการทางกายภาพ วิธีการทางเคมี และวิธีการทางชีวภาพ พบว่าวิธีการบำบัดทางชีวภาพเป็นทางเลือกที่ดีที่สุด โดยใช้การย่อยสลายของจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารมลพิษในน้ำมันและเปลี่ยนรูปไปเป็นแหล่งอาหาร และแหล่งพลังงาน โดยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวสามารถย่อยสลายสารมลพิษได้ ในขณะที่จุลินทรีย์ผสมสามารถทำให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพสมบูรณ์มากขึ้น

ในกรณีศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อประเมินการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* DP-1 และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด

### 3.1.1 วิธีการศึกษา

#### 3.1.1.1) การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 3 แหล่งตัวอย่างใส่ลงในถุงพลาสติกปิดเชื้อ โดยตัวอย่างที่เก็บได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิเย็นตลอดเวลาจนนำไปทดสอบที่ห้องปฏิบัติการ

#### 3.1.1.2) การเก็บตัวอย่างน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

เก็บตัวอย่างน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากอู่ซ่อมรถใส่ลงในขวดพลาสติกปิดเชื้อ

#### 3.1.1.3) การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

ชั่งตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 10 กรัม เติมนลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร Mineral salt medium (MSM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วปิดเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไปบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  และ  $10^{-6}$  ตูตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในแต่ละความเข้มข้นนำไป Spread plate บนอาหาร MSM agar และ Nutrient agar (NA) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อบ่มครบ 3 วันนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร MSM agar และ NA agar โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ Streak plate ลงบนอาหาร MSM agar หลังจากนั้นนำโคโลนีที่คัดแยกได้เก็บลงบนอาหาร NA Slant

3.1.1.4) การคัดเลือกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว จากเชื้อคัดแยกได้

จากวิธีการคัดแยกเชื้อสามารถคัดเลือกเชื้อได้ 15 ไอโซเลต หลังจากนั้นทำการทดสอบโดยการดูตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ของเชื้อแต่ละไอโซเลตที่มีความเข้มข้น  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วปลอดเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที และตรวจสอบการย่อยของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยวิธีการ Gravimetric method

เพื่อเป็นการยืนยันการย่อยอีกหนึ่งวิธี โดยการใช้สารละลายเชื้อ ความเข้มข้น  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของแต่ละไอโซเลตปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยใช้วิธีการ Spot inoculated ลงบนอาหาร TBA agar หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส แล้วนำไปวัดขนาดของโซนใสรอบโคโลนี (Clear zone) ซึ่งแบคทีเรียที่สร้าง Clear zone ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดบนอาหาร TBA agar จะถูกคัดเลือกเพื่อการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.1.1.5) การตรวจหาการย่อยไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ 2,6-DCPIP

การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันสูงที่สุดบนอาหาร Tributyrine agar (TBA) คือ *Pseudomonas aeruginosa* DP-1 หลังจากนั้นนำเชื้อไปตรวจหาการใช้ไฮโดรคาร์บอนจากน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยการนำสารละลายของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* DP-1 ที่มีความเข้มข้น  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วปลอดเชื้อ 15 ไมโครลิตร และ 2,6-DCPIP ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสังเกตการณ์จางหายไปของสี 2,6-DCPIP ที่เติมลงไป

3.1.1.6) การหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อที่คัดเลือกในการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

การศึกษานี้มีการกำหนดพารามิเตอร์ในการทดลองเพื่อหาแนวโน้มที่ส่งผลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยกำหนดพารามิเตอร์ pH ที่ pH 5, 6, 7 และ 8 และกำหนดพารามิเตอร์อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 20, 30, 35 และ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้กำหนดพารามิเตอร์ความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ 1%, 2%, 3% และ 4% และกำหนดพารามิเตอร์ของปริมาณหัวเชื้อขนาด 1%, 2%, 3% และ 4% ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยจุลินทรีย์ คือ pH 7 บ่มที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส โดยทดลองที่ความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ 1% และเติมปริมาณหัวเชื้อ 1% (v/v) และเติมเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร (v/v) ซึ่งมีความเข้มข้นของจุลินทรีย์อยู่ที่  $3 \times 10^7$  โดย

การทดลองทั้งหมดและชุดการทดลองควบคุมถูกบ่มไว้เป็นเวลา 32 วัน และการวัดปริมาณของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ววัดโดยการใช้วิธี Gravimetric method

### 3.1.2 ผลการศึกษา

#### 3.1.2.1) การแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อ

ตัวอย่างที่แยกได้จากอาหาร M broth พบโคลินี่ที่มีความแตกต่างกันทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำนวน 42 ไอโซเลตบนอาหาร Nutrient agar และจำนวน 15 ไอโซเลตบนอาหาร MSM agar และพบการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจำนวน 15 ไอโซเลตบนอาหาร NA agar ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยมีขนาด Clear zone ที่ 3-16 มิลลิเมตร แสดงในภาพที่ 7 และพบการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจำนวน 15 ไอโซเลตบนอาหาร TBA agar ซึ่งมีขนาด Clear zone ที่ 7-24 มิลลิเมตร



ภาพที่ 7 ไอโซเลตที่สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วบนอาหาร MSM agar plate  
ที่มา: Parikh et al. (2018)

นอกจากนี้เชื้อที่คัดแยกได้สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว คิดเป็น 14-37 เปอร์เซ็นต์ โดยภายใน 32 วันหลังการบ่ม ไอโซเลต DP1, DS1 และ DS7 มีประสิทธิภาพการย่อยที่สูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต DS5, DS6 และ OP มีประสิทธิภาพการย่อยที่ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** ประสิทธิภาพของไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายอาหารที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Used engine oil ,UEO) และ Tributyrin (TB)

Isolate	Zone of clearance (mm)		Degradation of UEO
	TB	UEO	%
Control	0	0	0
DP1	24	16	37
DS1	22	12	31
DS2	19	12	30
DS3	16	11	20
DS4	15	12	26
DS5	12	5	17
DS6	9	3	14
DS7	21	8	36
MSMa	19	12	28
MSMb	14	9	24
YP	19	13	25
OP	7	3	18
Z1	20	14	26
Z2	15	11	29
Z3	20	15	27

ที่มา: Parikh et al. (2018)

3.1.2.2) การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยใช้การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* DP-1 สามารถทำให้เกิด Clear zone บนอาหาร TBA agar สูงที่สุด และมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการจางหายไปของสี 2,6-DCPIP ภายในเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากการบ่ม (ภาพที่ 8) ซึ่งแสดงผลเป็นบวกในการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* DP-1 จึงถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 8 ไอโซเลต DP-1 ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน  
(ภาพซ้าย) ไม่เกิดปฏิกิริยา=ผลลบ (ภาพขวา) เกิดปฏิกิริยา=ผลบวก

ที่มา: Parikh et al. (2018)

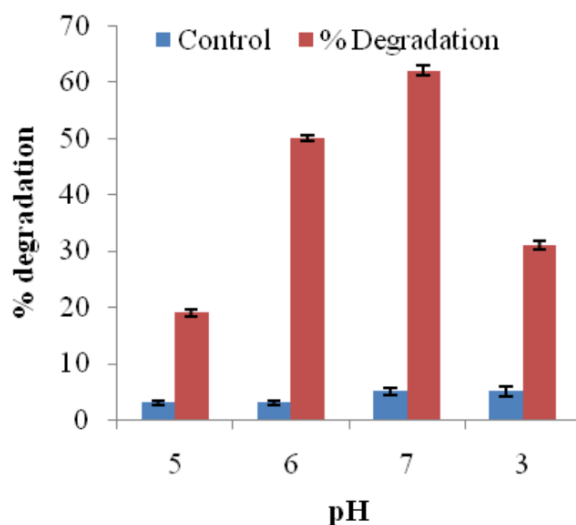
### 3.1.2.3) การระบุชนิดของแบคทีเรีย

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลต DP-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Pseudomonas aeruginosa* (MG976750)

### 3.1.2.4) การหาสภาวะที่เหมาะสม

3.1.2.4.1) การหา pH ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น  
เครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

จากการศึกษา pH ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย  
น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ซึ่งแสดงผลในภาพที่ 9 พบการย่อยสลายสูงที่สุดที่ pH 7 ซึ่งใน  
สภาวะ pH ที่เป็นกรดมีอิทธิพลน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า pH ที่เป็นเบส จากผลการทดลอง  
พบว่าที่ pH เป็นเบสอ่อน (pH 7 ถึง 8) มีอัตราการย่อยสลายน้ำมันเครื่องใช้แล้วได้น้อยกว่า เมื่อ  
เปรียบเทียบกับ pH ที่เป็นกรดอ่อน (pH 7 ถึง 6) โดยพบว่าเมื่อสภาวะเป็นเบสจะส่งผลให้  
ประสิทธิภาพของการย่อยสลายน้ำมันลดลง

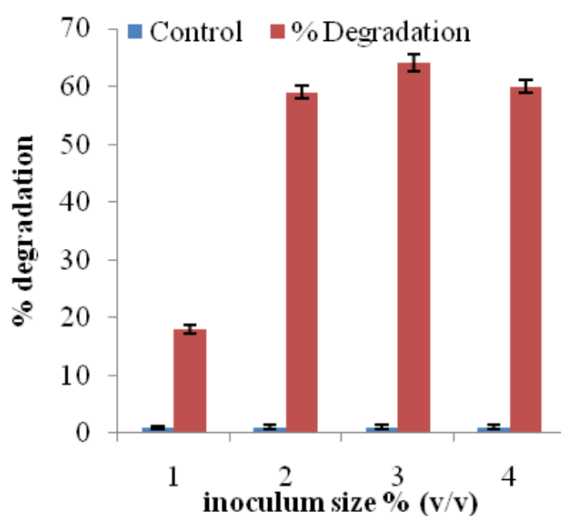


ภาพที่ 9 ค่า pH ที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

ที่มา: Parikh et al. (2018)

3.1.2.4.2) การหาปริมาณของเชื้อที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

จากการศึกษาปริมาณของเชื้อที่มีอิทธิพลในสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ซึ่งแสดงผลในภาพที่ 10 พบว่าผลของความเข้มข้นของเชื้อที่ความเข้มข้นที่  $3 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$  และ  $1.2 \times 10^8$  มีช่วงการย่อยสลายอยู่ในช่วง 59 ถึง  $60 \pm 2$  เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มเป็นเวลา 32 วัน

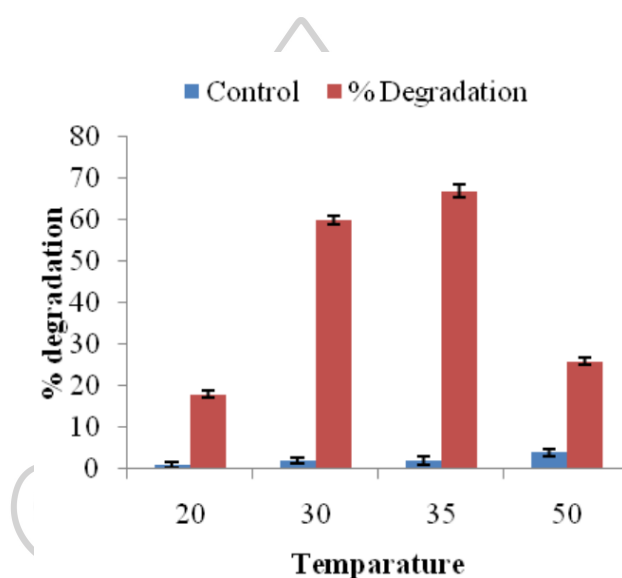


ภาพที่ 10 ปริมาณของเชื้อที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

ที่มา: Parikh et al. (2018)

### 3.1.2.4.3) การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

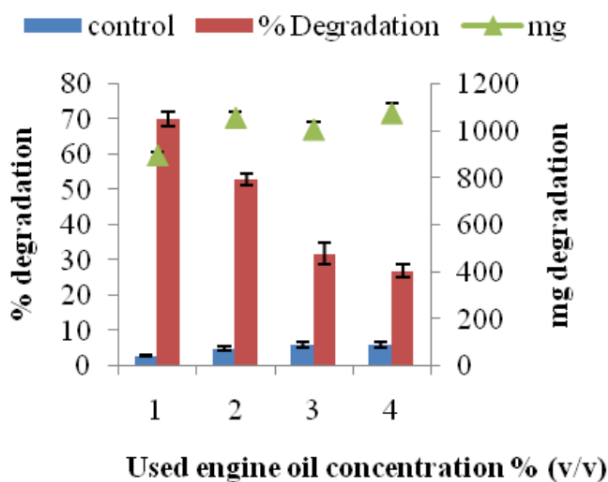
จากการศึกษาอุณหภูมิที่มีอิทธิพลในสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ซึ่งแสดงผลในภาพที่ 11 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส และการย่อยสลายต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 20 และ 50 องศาเซลเซียส ถึง 2.5 และ 3.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การย่อยสลายสูงสุด อาจเนื่องมาจากเชื้อเป็นประเภท Mesophilic และสถานที่เก็บตัวอย่างมีอุณหภูมิประมาณ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส



ภาพที่ 11 ค่าของอุณหภูมิที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว  
ที่มา: Parikh et al. (2018)

### 3.1.2.4.4) การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์

จากการศึกษาการหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่มีอิทธิพลในสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ซึ่งแสดงผลดังภาพที่ 12 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์การสลายของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจะลดลง ซึ่งในความเข้มข้นของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายลดลงอยู่ในช่วง 67 ถึง 27 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากปริมาณน้ำมันเครื่องใช้แล้วที่เติมเข้าไปความเข้มข้นแตกต่างกัน หากพิจารณาการย่อยสลายเป็นมิลลิกรัมของน้ำมันเครื่องใช้แล้วที่เสื่อมสภาพนั้นจะเท่ากับ 900, 1,060, 1,010 และ  $1,080 \pm 50$  มิลลิกรัม



ภาพที่ 12 ความเข้มข้นของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์  
ที่มา: Parikh et al. (2018)

ดังนั้นผลการศึกษานี้พบแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต ที่แสดงการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และพบไอโซเลต DP-1 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Pseudomonas aeruginosa* อีกทั้งไอโซเลต DP-1 ให้ผลบวกในการทดสอบออกซิเดชันด้วย 2,6-DCPIP และเมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันพบไอโซเลต DP-1 สามารถย่อยได้สูงสุดถึง 69 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่อไป

3.2 การบำบัดทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยแบคทีเรียชนิดเดี่ยวและผสมที่คัดแยกได้จากดินของโรงงานช่างกล (Hussein and Khudhair, 2018)

### 3.2.1 วิธีการศึกษา

#### 3.2.1.1) การเก็บรวบรวมดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

เก็บรวบรวมดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากโรงงานช่างกลในเมืองแบกแดด ระหว่างวันที่ 1-28 เมษายน 2016 ซึ่งพื้นที่นี้ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นเวลานานมากกว่า 10 ปี และทำการเก็บตัวอย่างดิน 25 กรัม โดยใช้ Spatula ปลอดเชื้อโดยเก็บความลึกที่ 0-5 เซนติเมตร ใส่ลงในภาชนะที่ปลอดเชื้อ

### 3.2.1.2) การคัดแยกแบคทีเรีย

นำตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1 กรัม ใส่ลงในพลาสติกอาหารเหลวที่มีอาหาร Bushnell Haas medium (BH) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไปบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วัน ทำการถ่ายเชื้อปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร จากแต่ละพลาสติก และ Spread plate ลงบนอาหาร BH agar ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนจานอาหารไป Sub culture ลงบน NA plate

### 3.2.1.3) การติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

วัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลว BH ด้วยการวัด optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer

### 3.2.1.4) การสกัดและการตรวจสอบปริมาณน้ำมันคงเหลือ

การวัดปริมาณน้ำมันคงเหลือในอาหารเหลว BH ใช้วิธี Gravimetric โดยนำพลาสติกอาหารเหลว BH ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ใส่กรวยแยก (Separating funnels) แล้วเติมสาร Dichloromethane 50 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างชั้น Organic solvent และนำมาตกตะกอนด้วย Sodium sulfate จำนวน 15 กรัม จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันเครื่องโดยใช้สูตร

$$\% \text{การย่อยสลายของน้ำมันเครื่องใช้แล้ว} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำมันชุดควบคุม} - \text{น้ำหนักน้ำมันชุดทดลอง}}{\text{น้ำหนักน้ำมันชุดควบคุม}} \times 100$$

### 3.2.1.5) การคัดเลือกแบคทีเรีย

การคัดเลือกแบคทีเรีย โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH ที่ pH 7 ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นลงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกในแต่พลาสติก และมีพลาสติกที่ไม่ลงเชื้อแบคทีเรีย (Control หรือชุดควบคุม) จากนั้นนำพลาสติกทั้งหมดไปบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน นำไปวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ 600 นาโนเมตร และวัดปริมาณน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ตกค้างในอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 3.2.1.6) การระบุชนิดของจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่คัดแยกและมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจะถูกคัดเลือกจากความสามารถในการใช้น้ำมันในอาหารเหลว โดยเชื้อจะแสดงคุณสมบัติในระดับสายพันธุ์ ซึ่งสามารถแสดงออกทางด้านสัณฐานวิทยาของโคโลนี การติดสีแกรม และการทดสอบทางชีวเคมี เช่น การหมักแลคโตส ซิเตรต คอะตาเลส อินโดล เมทิลเรด ออกซิเดส และอื่นๆ ตามคู่มือของ Bergey

### 3.2.1.7) การศึกษาผลของอุณหภูมิและ pH ต่อการย่อยสลายน้ำมัน

เตรียมอาหารเหลว BH ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว 5 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH เท่ากับ 7 จากนั้นเลี้ยงแบคทีเรียลงในแต่ละฟลาสก์ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ต่างกัน ดังนี้ อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

การศึกษาค่า pH ที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมัน โดยการเตรียมอาหารเหลว BH ที่มีค่า pH ต่างกัน ได้แก่ pH 5, 6, 7, 8 และ 9 จากนั้นเลี้ยงแบคทีเรียบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน และตรวจหาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และปริมาณน้ำมันคงเหลือ

### 3.2.1.8) การย่อยสลายทางชีวภาพโดยแบคทีเรียเดี่ยวและแบคทีเรียกลุ่ม

แบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Acinebacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. เตรียมโดยผสมเชื้อบริสุทธิ์ในปริมาณที่เท่ากัน จากนั้นนำไปเลี้ยงลงในอาหารเหลว BH ที่ pH 7 ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารทั้งแบบเดี่ยวและแบบกลุ่ม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน หาค่าการเจริญของแบคทีเรีย และการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

## 3.2.2 ผลการศึกษา

### 3.2.2.1) แบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อน

จากการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียได้ 25 ไอโซเลต จากตัวอย่างดินจำนวน 5 ตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานช่างกล โดยใช้อาหาร BH agar ที่ pH 7 ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลการศึกษากการแยกแบคทีเรียแสดงในตารางที่ 6 ความแตกต่างของจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดินในแต่ละแหล่งตัวอย่าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะแหล่งตัวอย่างดินตามปริมาณสารปนเปื้อนและระยะเวลาการปนเปื้อน

**ตารางที่ 6** จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

Soil samples	Symbol	Collection period	Number of isolates
Al-Jadriya	A	1 <sup>th</sup> April, 2016	5
Al-Karrada	K	7 <sup>th</sup> April, 2016	2
Al-Bayaa	B	14 <sup>th</sup> April, 2016	9
Al-Ghazaliyah	G	21 <sup>th</sup> April, 2016	2
Al-Dora	D	28 <sup>th</sup> April, 2016	7
Total isolates =			25

ที่มา: Hussein, A. A., & Khudhair, H. S. (2018)

ในปัจจุบันการแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันจากพื้นที่ปนเปื้อนน้ำมันพบว่าเป็นแหล่งที่ดีที่สุด โดยแบคทีเรียที่แยกได้สามารถนำไปใช้สำหรับการย่อยน้ำมันที่มีไฮโดรคาร์บอนต่างๆ และสามารถใช้ฟื้นฟูบริเวณที่ปนเปื้อนได้

### 3.2.2.2) การคัดเลือกแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จำนวน 25 ไอโซเลต นำไปศึกษาการใช้ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหารเหลว BH โดยสามารถวัดการเจริญของแบคทีเรีย และการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเครื่อง Spectrophotometer ที่ OD<sub>600</sub> นาโนเมตร และสามารถตรวจวัดการย่อยสลายทางชีวภาพโดยวิธี Gravimetric ซึ่งผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแสดงในตารางที่ 7 แต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกันในการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ และพบว่าไอโซเลต A4, B6 และ D5 มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุด คือ 0.67, 0.61 และ 0.73 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่นในการศึกษานี้

**ตารางที่ 7** การคัดเลือกแบคทีเรียชั้นแรกด้วยการวัดการเจริญของแบคทีเรีย

Isolates	Bacterial growth at 600 nm	Isolates	Bacterial growth at 600 nm	Isolates	Bacterial growth at 600 nm
A1	0.29	B3	0.33	D1	0.44
A2	0.44	B4	0.26	D2	0.39
A3	0.11	B5	0.50	D3	0.41
A4	0.67	B6	0.61	D4	0.26
A5	0.09	B7	0.46	D5	0.73
K1	0.09	B8	0.17	D6	0.52
K2	0.16	B9	0.31	D7	0.22
B1	0.24	G1	0.28		
B2	0.42	G2	0.08		

ที่มา: Hussein and Khudhair, (2018)

อย่างไรก็ตามการศึกษการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในแต่ละไอโซเลตเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วดังในตารางที่ 8 ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต A4 B6 และ D5 เป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุด โดยคิดเป็น 74.6, 70.2 และ 78.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่นในการศึกษาครั้งนี้

**ตารางที่ 8** การคัดเลือกแบคทีเรียชั้นที่ 2 โดยการตรวจหาประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

Isolates	Biodegradation(%)	Isolates	Biodegradation(%)	Isolates	Biodegradation (%)
A1	45.3	B3	55.9	D1	63.1
A2	62.6	B4	53.3	D2	58.5
A3	39.4	B5	67.3	D3	59.4
A4	74.6	B6	70.2	D4	49.9
A5	32.9	B7	63.8	D5	78.5
K1	29.4	B8	47.8	D6	69.2
K2	41.2	B9	54.6	D7	51.2
B1	50.1	G1	52.3		
B2	60.7	G2	26.5		

ที่มา: Hussein and Khudhair, (2018)

โดยผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถใช้ไขมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียว ซึ่งไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 5 แห่ง นำไป spread plate บนอาหาร BH agar plate ซึ่งเป็น Selective media ที่ใช้สำหรับแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมัน

### 3.2.2.3) การจำแนกแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันมากที่สุด คือ ไอโซเลต A4, B6 และ D5 ซึ่งนำแบคทีเรีย 3 ไอโซเลตนี้ไปทำการทดสอบทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี โดยผลการศึกษาแสดงดังในตารางที่ 9 สามารถระบุได้ว่าไอโซเลต A4, B6 และ D5 จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp., *Acinebacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. ตามลำดับ

**ตารางที่ 9** การทดสอบทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย

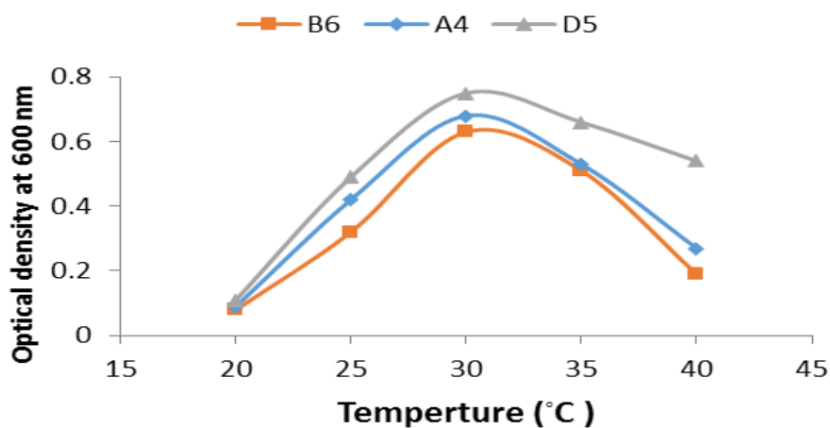
Tests	A4	B6	D5
Form	Circular	Rough	Circular
Surface	Smooth	Smooth	Smooth
Color	Cream	Cream	Whitish
Margin	Undulate	Entire	Entire
Elevation	Raised	Slightly raised	Convex
Opacity	Opaque	Opaque	Translucent
Gram stain	Positive	Negative	Negative
Catalases	+	+	+
Oxidase	+	-	+
Citrate utilization	+	+	+
Lactose ferment	-	-	-
H <sub>2</sub> S production	+	-	-
Methyl red	-	-	-
Nitrate reduction	+	-	+
Indole	-	-	-
Urease	-	-	-
Motility	+	-	+

ที่มา: Hussein, A. A., & Khudhair, H. S. (2018)

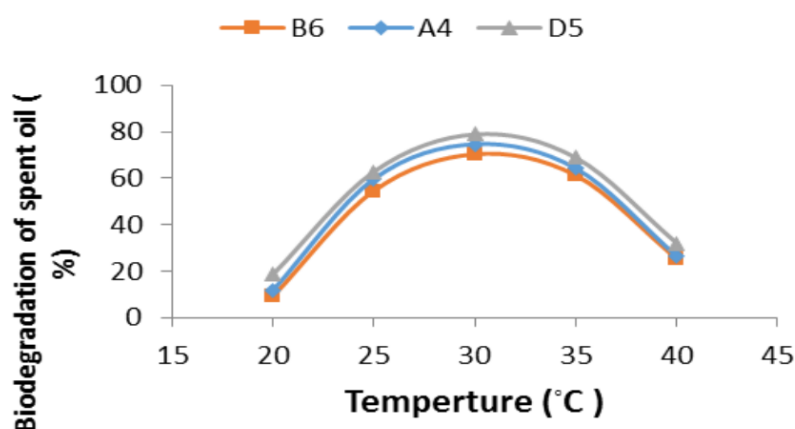
Atlas (1992) ได้ทำการศึกษาหาแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมัน โดยพบแบคทีเรีย *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Salmonella* และ *Streptococcus* ถูกคัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน โดยแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas* และ *Bacillus* มีรายงานว่าอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งปนเปื้อนน้ำมัน นอกจากนี้ Thenmozhi et al. (2011) ได้คัดแยกแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต ซึ่งสามารถใช้น้ำมันเป็นแหล่งอาหารได้ ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ถึง 81 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการบ่ม 30 วัน ในขณะที่ *Serratia marcescens* และ *Bacillus licheniformis* มีประสิทธิภาพย่อยสลายที่ 72 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการศึกษานี้พบว่า *Pseudomonas* จัดเป็นแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันที่พบได้บ่อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pokethitiyook et al. (2003) และ Abdel-El-HD et al. (2002) พบว่า *Acinebacter* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และสามารถกำจัดหรือย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ และสารประกอบอนินทรีย์ได้หลากหลาย

#### 3.2.2.4) ผลของอุณหภูมิ และ pH ต่อการย่อยสลายน้ำมัน

อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดย *Bacillus* sp., *Acinebacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลของอัตราการเจริญ และการย่อยสลายทางชีวภาพ แสดงไว้ในภาพที่ 13 และ 14 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราการเจริญ และการย่อยสลายดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิอื่น นอกจากนี้ ผลการวิจัยพบว่า *Pseudomonas* sp. มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ 78.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรีย *Bacillus* sp. และ *Acinebacter* sp. มีประสิทธิภาพการย่อยที่ 74.7 และ 70.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



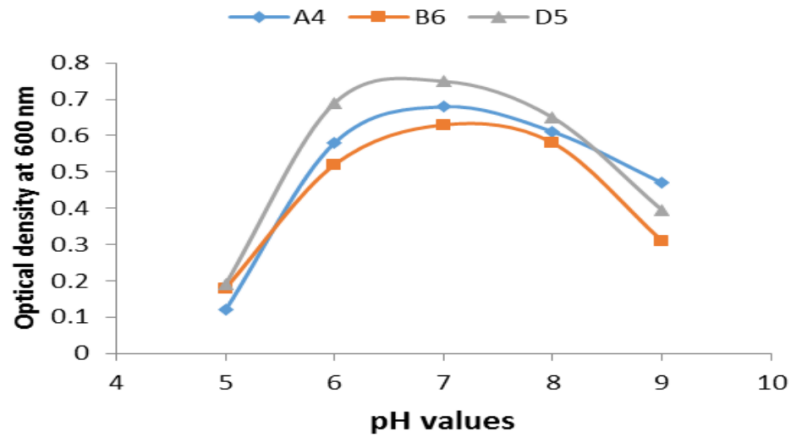
ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต  
ที่มา: Hussein and Khudhair, (2018)



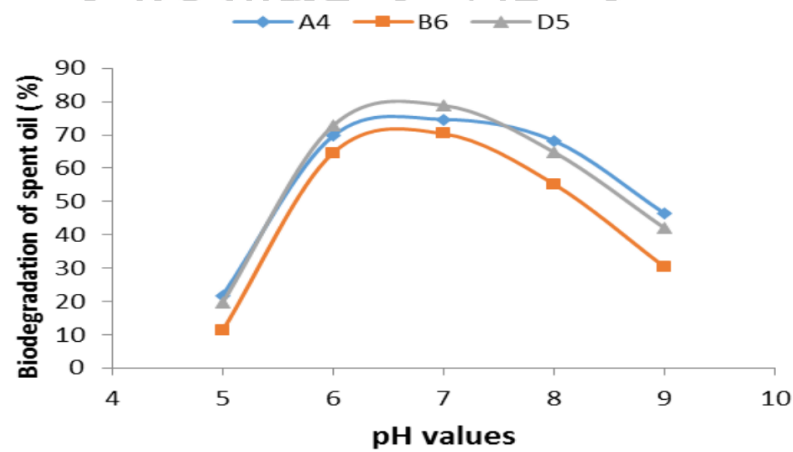
ภาพที่ 14 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต  
ที่มา: Hussein and Khudhair, (2018)

ผลของ pH ต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดย *Bacillus* sp. *Acinebacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. เลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 15 และ 16 ซึ่งแสดงความสามารถที่แตกต่างกันในการเจริญเติบโตที่ pH ต่างๆ และการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยที่ pH 7 พบการเจริญสูงสุดทั้ง 3 ไอโซเลต ในขณะที่ *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยสลายน้ำมันได้สูงสุดถึง

79.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ *Bacillus* sp. และ *Acinebacter* sp. สามารถย่อยสลายน้ำมัน 74.8 และ 70.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ



ภาพที่ 15 ผลของ pH ต่อการเจริญของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต  
ที่มา: Hussein and Khudhair, (2018)



ภาพที่ 16 ผลของ pH ต่อการย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต  
ที่มา: Hussein and Khudhair, (2018)

จากการรายงานพบว่าอุณหภูมิต่ำที่สุดในการเจริญ และ อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ให้แล้วสูงสุด เนื่องจากแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันเป็นแบคทีเรียที่ชอบสภาวะเป็นกลาง (Namazi et al., 2008)

### 3.2.2.5) การย่อยสลายทางชีวภาพโดยเชื้อแบคทีเรียแบบเดี่ยวและแบบผสม

ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ใช้แล้วโดย แบคทีเรียแบบเดี่ยวและแบบผสมของ *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. มีการตรวจสอบการเจริญ และความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ในอาหาร BH ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันเครื่องยนต์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการบ่มเป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นวัดอัตราการเจริญของแบคทีเรีย และอัตราการย่อยสลายน้ำมัน

จากผลการศึกษา (ตารางที่ 10) แบคทีเรียแบบผสมมีอัตราการเจริญ และการย่อยสลายน้ำมันสูงสุด 0.94 และ 90.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบคทีเรียแบบเดี่ยว

**ตารางที่ 10** ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบเดี่ยวและแบบผสมในอาหาร BH ต่อการเจริญของแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 10 วัน

Type of inoculum	Bacterial growth at 600 nm	Percentage of biodegradation %
<i>Bacillus</i> sp.	0.68	74.8
<i>Acinetobacter</i> sp.	0.63	70.5
<i>Pseudomonas</i> sp.	0.75	79.1
Consortium culture	0.94	90.2

ที่มา: Hussein and Khudhair, (2018)

ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ (Umanu et al., 2013) แสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียแบบผสมมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีกว่า เพราะในแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วออกมาเป็นสารประกอบที่สายพันธุ์อื่นนำไปใช้ได้ และที่สำคัญกลุ่มสายพันธุ์แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมมีการทำงานร่วมกันทำให้สามารถใช้สารประกอบอะลิฟาติกได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 30 วัน

จากการรายงานพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้สูงสุด 53.44 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Bacillus* sp. มีการย่อยสลายได้ 34.92 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 30 วัน (Atlas, 1981) ซึ่งในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยใช้แบคทีเรียแบบเดี่ยว เมื่อกระบวนการย่อยสลายเสร็จสิ้นจะได้สารตั้งต้นเป็นไฮโดรคาร์บอน (Marin et al., 1996) อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ที่หลากหลายในการย่อยสลายสารประกอบที่ซับซ้อนของไฮโดรคาร์บอนได้



### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1.1 เสียมเล็ก (Spade)
- 3.1.2 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 3.1.3 ถุงซิปล็อค (Zip lock bag)
- 3.1.4 กล่องโฟม (Foam box)
- 3.1.5 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 3.1.6 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 3.1.7 หลอดทดลอง (Test tube)
- 3.1.8 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 3.1.9 ขวดระเหยสาร (Evaporating flask)
- 3.1.10 กรวยแยกสาร (Separatory funnel)
- 3.1.11 กระบอกตวง (Cylinder)
- 3.1.12 หลอดดักแก๊ส (Durham tube)
- 3.1.13 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
- 3.1.14 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
- 3.1.15 เข็มเย็บเชื้อ (Needle)
- 3.1.16 ห่วงเย็บเชื้อ (Loop)
- 3.1.17 กระจกสไลด์ (Microscope slide)
- 3.1.18 กระจกปิดสไลด์ (Cover glass)
- 3.1.19 ปากคีบ (Forcep)
- 3.1.20 หลอดเซนติฟิวก์ (Centrifuge tube)
- 3.1.21 หลอดไมโครเซนทริฟิวก์ (Microcentrifuge tube)
- 3.1.22 หลอดพีซีอาร์ (PCR tube)
- 3.1.23 ขวดใส่อาหาร (Bottle with screw cap)
- 3.1.24 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
- 3.1.25 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.1.26 ตู้เย็บเชื้อ (Laminar flow)

- 3.1.27 เครื่องเขย่าสาร (Shaker)
- 3.1.28 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
- 3.1.29 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)
- 3.1.30 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.1.31 เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven)
- 3.1.32 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.1.33 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.1.34 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nano drop)
- 3.1.35 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 3.1.36 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (MultiGene optimax thermal cycle)
- 3.1.37 ตู้เย็น (Refrigerator)
- 3.1.38 ตู้แช่แข็ง (Freezer)
- 3.1.39 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 3.1.40 ออโต้ปิเปต (Autopipette)
- 3.1.41 เครื่องชั่ง (Analytical balance)
- 3.1.42 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
- 3.1.43 เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Gel electrophoresis)
- 3.1.44 เครื่องส่องเจล (UV transilluminator)
- 3.1.45 เครื่องให้ความร้อนตลอดทดลอง (Heat block)

### 3.2 อาหารและสารเคมี

- 3.2.1 Hexane
- 3.2.2 Ethyl alcohol 95%
- 3.2.3 Ethyl alcohol 70%
- 3.2.4 N-hexadecane
- 3.2.5 Glycerol
- 3.2.6 HgCl<sub>2</sub>
- 3.2.7 Iodine
- 3.2.8 Crystal violet
- 3.2.9 Safranin O

- 3.2.10 Liquid paraffin
- 3.2.11 Ammonium oxalate
- 3.2.12 Potassium iodide (KI)
- 3.2.13 Acetone

### 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.3.1 Nutrient agar (NA)
- 3.3.2 Nutrient broth (NB)
- 3.3.3 Luria-Bertani (LB)
- 3.3.4 Yeast malt broth (YMB)
- 3.3.4 Yeast malt agar (YMA)
- 3.3.4 Carbon-free mineral medium (CFMM)
- 3.3.5 Hugh&Leifson O-F medium
- 3.3.6 Tween 80 agar หรือ Lipase test medium
- 3.3.7 Glucose yeast extract bromcresol purple broth
- 3.3.8 Lactose yeast extract bromcresol purple broth
- 3.3.9 Sucrose yeast extract bromcresol purple broth

### 3.4 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

#### 3.4.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากอุจจาระ 3 แหล่งตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม ราชบุรี และกาญจนบุรี ใส่ในถุงซิปลาสติกปลอดเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นตลอดเวลา ก่อนนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

#### 3.4.2 การเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

เพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยเทคนิค Enrichment เป็นการกระตุ้นให้จุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมนั้นใช้สารมลพิษ โดยการนำตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว Carbon-free mineral medium (CFMM) broth 15 มิลลิลิตร ที่เติม 1% N-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เหลว CFMM ใหม่ที่มี N-hexadecane 1% v/v บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำซ้ำเป็นจำนวน 5 ครั้ง

#### 3.4.3 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์มาทำการคัดแยกจุลินทรีย์โดยวิธี Spread plate โดยจุดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร Luria bertani (LB) medium โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจดูการเจริญบนผิวหน้าอาหาร และคัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันนำมาทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

#### 3.4.4 การทำให้บริสุทธิ์

คัดเลือกโคโลนีของจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันจากขั้นตอนการคัดแยกจุลินทรีย์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Streak plate จากนั้นเก็บรักษาเชื้อบนหลอดอาหารผิวเอียง (NA Slant) สำหรับใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป และทำการเก็บรักษาเชื้อในสารละลาย 20% กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาเชื้อไว้ใช้ในระยะเวลา

### 3.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

#### 3.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

3.5.1.1 ลักษณะโคโลนี (Cultural characteristics) ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลาง, รูปร่าง (Form), ขอบ (Margin), ผิวหน้า (Surface), ความนูน (Elevation), สี (Color), ความขุ่น (Optical features) และความเหนียว (Consistency)

3.5.1.2 การย้อมสีแกรม (Gram staining) เป็นวิธีการเบื้องต้นในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) โดยมีวิธีการดังนี้

3.5.1.2.1 การเกลี่ยเชื้อ (Smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป และปล่อยให้แห้งในอากาศ (Air dry)

3.5.1.2.2 การตรึงเซลล์ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ทำให้ไม่หลุดออกขณะย้อมสี การตรึงเซลล์ทำได้โดยการนำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อไว้จนแห้งดีแล้วไปผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง

3.5.1.2.3 หยดสีคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วมทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วเทสีทิ้ง

3.5.1.2.4) หยดสารละลายไอโอดีน (Iodine's solution) บนรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง สารละลายไอโอดีนทำหน้าที่เป็นมอร์แดนต์ (Mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น

3.5.1.2.5) ล้างสีออก (Decolorize) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด

3.5.1.2.6) หยดสีซาฟรานินโอ (Safranin O) บนรอยเกลี่ย ประมาณ 15-30 วินาที ล้างน้ำ และซับสไลด์ให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจผล ผลจากการย้อมสีหากพบว่าแบคทีเรียติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และแบคทีเรียติดสีแดงของซาฟรานินโอ แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria)

3.5.1.3) การเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ ตรวจสอบโดยใช้เข็มเขี่ยโคลินแบคทีเรียปลายตรง (Needle) เขี่ยโคลินแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบจิ้มลงไป ในอาหาร Hugh&Leifson O-F medium ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดอาหารในสภาพ Semi-solid deep tube agar เป็นแนวเส้นตรง และดึงเข็มเขี่ยเชื้อออกในแนวเส้นตรงเดิม (Stab inoculation) การตรวจผลหากจุลินทรีย์มีการเจริญแยกออกมาจากรอย Stab แสดงว่าจุลินทรีย์สามารถเคลื่อนที่ได้

3.5.1.4) ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ ตรวจสอบโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายตรง (Needle) เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบจิ้มลงไป ในอาหาร Hugh&Leifson O-F medium ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดอาหารในสภาพ Semi-solid deep tube agar เป็นแนวเส้นตรง และดึงเข็มเขี่ยเชื้อออกในแนวเส้นตรงเดิม (Stab inoculation) สามารถตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์โดยดูจากรอย Stab ที่เกิดขึ้น ดังนี้

- Filiform การเจริญสม่ำเสมอและเรียวยาวตามแนวที่ปลูกเชื้อ
- Beaded การเจริญของเป็นเม็ดกระจัดกระจายตามแนวที่ปลูกเชื้อ
- Papillate การเจริญเป็นปุ่มเล็กๆ ยื่นออกจากรอยที่ปลูกเชื้อ
- Villous การเจริญเป็นเส้นเรียวยาวตามรอยที่ปลูกเชื้อและมีเส้นแขนง
- Echinulate การเจริญมีรอยหยักที่ขอบคล้ายฟันเรื้อย
- Arborescent การเจริญแตกกิ่งก้านคล้ายต้นไม้
- Rhizoid การเจริญแตกกิ่งคล้ายราก
- Effuse การเจริญมีน้อย บาง และกระจัดกระจาย

### 3.5.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics)

#### 3.5.2.1) การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในสภาพออกซิเดชันและเฟอร์เมนต์เตชัน

จุลินทรีย์ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งอาหารสำคัญ เพื่อใช้สร้างพลังงานและส่วนประกอบของเซลล์ (Carbon skeleton) เป็นวิธีการศึกษาว่าจุลินทรีย์ได้มีการย่อยคาร์โบไฮเดรตแบบใช้ออกซิเจนหรือไม่ใช้ออกซิเจน (Oxidative หรือ Fermentative) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Hugh & Leifson O-F medium อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเล็กที่ละลายน้ำได้คือน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน และใช้เปปโตอินในความเข้มข้นต่ำเป็นแหล่งไนโตรเจน การใช้เปปโตอินในความเข้มข้นที่ต่ำนี้เพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียพวก Non-oxidative และ Non-fermentative ที่สามารถเจริญโดยใช้เปปโตอินเป็นแหล่งพลังงานแทนได้ ทำให้การสังเกตผลผิดพลาด ซึ่งอาหารนี้มีสภาพเป็น Semisolid deep tube agar สามารถตรวจการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ได้ อาหารชนิดนี้จะใช้ Bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งเมื่อจุลินทรีย์ผลิตกรดหรือแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้อาหารมี pH ลดลงทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีเขียว (pH 7.5) เป็นสีเหลือง (pH เป็นกรด) โดยมีวิธีการดังนี้

3.5.2.1.1) ใช้เข็มเย็บเย็บปลายตรง (Needle) เย็บเย็บที่ต้องการทดสอบแทงลงไปอาหาร Hugh & Leifson O-F medium ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดอาหารในสภาพ Semi-solid deep tube agar เป็นแนวเส้นตรง และดึงเข็มเย็บเย็บออกในแนวเส้นตรงเดิม (Stab inoculation)

3.5.2.1.2) หลังจากทำ Stab inoculation ให้เทพาราฟินเหลวปิดทับบนผิวหน้าอาหารให้สูงขึ้นมาประมาณ 2 เซนติเมตร เพื่อป้องกันออกซิเจน โดยทำเปรียบเทียบกับหลอดที่เทพาราฟินเหลวและไม่ได้เทพาราฟินเหลว

3.5.2.1.3) นำหลอดอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

#### การตรวจผล

1. สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสีอาหาร ซึ่งสามารถระบุได้ว่า จุลินทรีย์ชนิดใดเกิด Oxidative metabolism หรือ Fermentative metabolism ดังนี้

- สีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลงทั้งคู่ แสดงว่าจุลินทรีย์ชนิดนั้นเป็น

Non-metabolised

- อาหารที่ไม่ได้เทหับด้วยพาราฟินเหลว มีบางส่วนหรือทั้งหมดเป็นสีเหลือง แต่อาหารที่เทหับด้วยพาราฟินไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าจุลินทรีย์ชนิดนั้นเกิด Oxidative metabolism

- อาหารที่เทหับด้วยพาราฟินเหลว และอาหารที่ไม่ได้เทหับด้วยพาราฟินเหลว มีบางส่วนหรือทั้งหมดเป็นสีเหลือง แสดงว่าจุลินทรีย์ชนิดนั้นเกิดทั้ง Oxidative metabolism และ Fermentative metabolism

- อาหารที่ไม่ได้เทหับด้วยพาราฟินเหลวไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่อาหารที่เทหับด้วยพาราฟินเหลวมีบางส่วนหรือทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าจุลินทรีย์ชนิดนั้นเกิด Fermentative metabolism

2. สังเกตการเกิดแก๊ส โดยการตรวจสอบว่ามีรอยแตก หรือรอยแยกเกิดขึ้นในเนื้ออาหารหรือไม่

### 3.5.2.2) การหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation)

กระบวนการหมักเป็นการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ให้เกิดพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่ใช้ออกซิเจน โดยแบคทีเรียหรือยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักจะใช้สารอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดไพรูวิก (Pyruvic acid) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน กระบวนการนี้จะเกิดพลังงานขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เพราะคาร์โบไฮเดรตถูกย่อยสลายโดยไม่สมบูรณ์ ยังคงเหลือผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นแอลกอฮอล์หรืออะซิโตน หรือกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดแอสติก กรดแลคติก และกรดซิตริก หรือแก๊สชนิดต่างๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ หรือแก๊สไฮโดรเจน ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์จากการศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรต เพื่อใช้คัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการหมัก โดยนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมด้านเทคโนโลยีชีวภาพ นอกจากนี้การหมักคาร์โบไฮเดรตสามารถจำแนกหมวดหมู่ของเชื้อ (Classification) ได้ เนื่องจากจุลินทรีย์มีความสามารถที่แตกต่างในการนำคาร์โบไฮเดรตไปใช้ (กัญญา และคณะ, 2536) ซึ่งวิธีการทดสอบมีดังนี้

3.5.2.2.1) นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาปลูกลงในอาหาร Fermentation carbohydrate medium ได้แก่ Glucose yeast extract bromcresol purple broth, Lactose yeast extract bromcresol purple broth และ Sucrose yeast extract bromcresol purple broth

3.5.2.2.2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.5.2.2.3) ตรวจสอบผลการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ และตรวจการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร

การตรวจผล

ผลบวก 1. อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ไม่มีก๊าซในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้เฉพาะกรด

2. อาหารมีสีเหลือง และมีก๊าซในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้กรดและก๊าซ

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าเชื้อไม่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้

### 3.6 การระบุชนิดของจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 3.6.1 การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth (NB) บ่มแบบเขย่า ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเก็บเซลล์โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง นำเซลล์มาสกัด DNA ด้วยชุด i-genomic BYF DNA extraction kit และเพิ่มจำนวนยีนโดยนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (MultiGene optimax thermal cycle) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1525R (5' AAGGAGGTGWTCCARCC3') (Okubo et al., 2012) สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 2X PCR master mixed (ประกอบด้วย dNTP mixture 2.5 mM, i-Tap DNA polymerase 2.5 Unit, 1X PCR reaction buffer และ Gel loading buffer) ไพรเมอร์ 27F 0.4  $\mu$ M และ ไพรเมอร์ 1525R 0.4  $\mu$ M ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 50 ไมโครลิตรด้วยน้ำ Deionized โดยมี Control reaction (Negative control) ที่ไม่มี DNA emplate สภาวะในการทำ PCR เริ่มจาก Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยขั้นตอน การสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ จำนวน 30 รอบ ดังนี้ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ Final-extension ต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เพื่อดูแถบของยีน

16S rRNA ซึ่งมีขนาด 1,500 คู่เบส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูล 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในฐานข้อมูล EzTaxon-e โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Tool) จากเว็บไซต์ออนไลน์ EzBiocloud (<http://ezbiocloud.net>) (Yoon et al., 2017) เพื่อระบุสกุลของแบคทีเรีย จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA 12.0 (Tamura et al., 2021)

### 3.6.2 การระบุชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งตัวอย่างโคโลนีของเชื้อบน Potato dextrose agar plate ให้กับบริษัท กิ๊ปไทย จำกัด เพื่อทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ยีสต์ในระดับสกุล โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA

### 3.7 การศึกษา Extracellular hydrolytic enzyme ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในการสร้างเอนไซม์ไลเปส

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Tween 80 agar ด้วยเทคนิค Point inoculation นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตตะกอนขาวที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนี แสดงว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยไขมันได้ (Sharma et al., 2001) การตรวจผลสามารถตรวจผลได้โดยตรงโดยไม่ต้องใช้สารเคมี หากจุลินทรีย์มีการสร้างเอนไซม์ไลเปส จะสามารถย่อย Tween 80 ที่อยู่ในอาหารได้ ดังนั้นถ้าบริเวณรอบๆ โคโลนีของจุลินทรีย์มีลักษณะเป็นวงขน เนื่องจาก fatty acid ทำปฏิกิริยากับ  $Ca^{2+}$  ที่ผสมอยู่ในอาหาร เกิดเป็นตะกอนขาวขุ่น แสดงว่าจุลินทรีย์มีการสร้างเอนไซม์ไลเปสขึ้น

### 3.8 การศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้

นำจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการถ่ายจุลินทรีย์ ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และมีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 0.5 เปอร์เซ็นต์, 1 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่ง

คาร์บอน ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ โดยทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ นำไปบ่มเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการย่อยน้ำมันของเชื้อที่คัดแยกได้

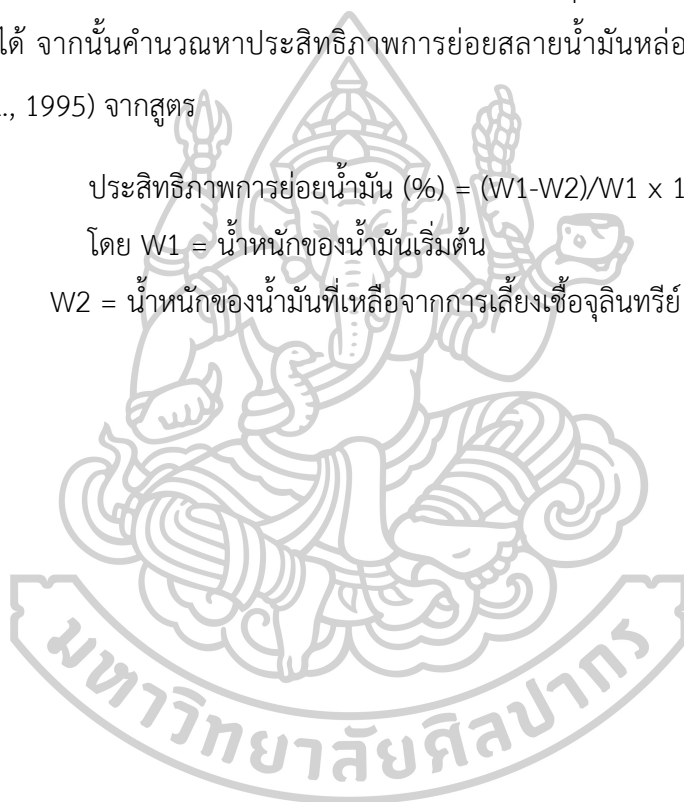
### 3.8.1 วิธีวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการย่อยน้ำมัน

ใช้วิธีชั่งน้ำหนักน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่หายไป (Weight loss method) โดยการสกัด Culture broth ด้วยเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 (Mercadé et al., 1996) จากนั้นนำส่วนของตัวทำละลายมาทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) และชั่งน้ำหนักสารที่ได้ จากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Shairai et al., 1995) จากสูตร

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน (\%)} = (W1-W2)/W1 \times 100$$

โดย W1 = น้ำหนักของน้ำมันเริ่มต้น

W2 = น้ำหนักของน้ำมันที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

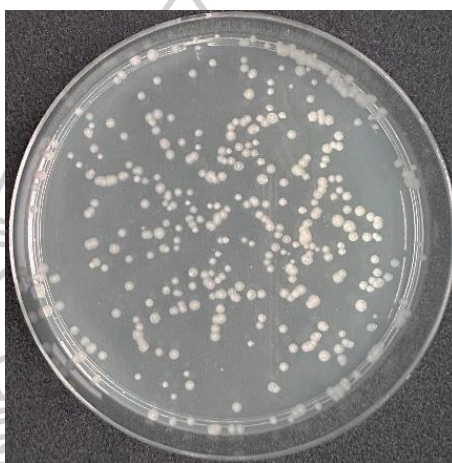


## บทที่ 4

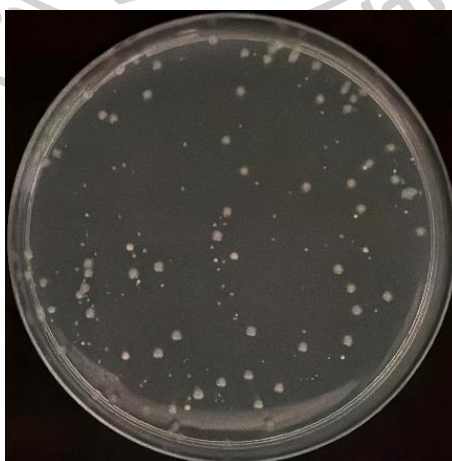
### ผลการวิจัย

#### 4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

งานวิจัยนี้ใช้อาหาร Nutrient agar (NA) ในการแยกจุลินทรีย์ที่ได้มาจากการเก็บตัวอย่างดินโดยวิธีการ Spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งพบการเจริญของจุลินทรีย์บนจานอาหาร ดังภาพที่ 17, 18 และ 19



ภาพที่ 17 ตัวอย่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหาร Nutrient agar ที่แยกได้จากดินของอุบลราชธานี



ภาพที่ 18 ตัวอย่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหาร Nutrient agar ที่แยกได้จากดินของอุบลราชธานี



**ภาพที่ 19** ตัวอย่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหาร Nutrient agar ที่แยกได้จากดินของอุ้มอรรถจังหวัดราชบุรี

งานวิจัยนี้สามารถแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันจาก 3 แหล่งตัวอย่าง (ตารางที่ 11) ได้จำนวน 8 ไอโซเลต ที่แตกต่างกัน

**ตารางที่ 11** จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมัน

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อ
ต.ทุ่งลูกนก อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	4	RS5-1, RS5-2, RS5-3, RS5-4
ต.สนามแย้ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี	2	KS5-1, KS5-2
ต.กรับใหญ่ อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	2	NS5-1, NS5-2

จากผลการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งสิ้น 8 ไอโซเลต ดังนี้ พื้นที่เก็บตัวอย่าง ต.ทุ่งลูกนก อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม พบ 4 ไอโซเลต คือ RS5-1, RS5-2, RS5-3 และ RS5-4, พื้นที่เก็บตัวอย่าง ต.สนามแย้ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี พบ 2 ไอโซเลต คือ KS5-1 และ KS5-2 และพื้นที่เก็บตัวอย่าง ต.กรับใหญ่ อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี พบ 2 ไอโซเลต คือ NS5-1 และ NS5-2 นอกจากนี้ศุภศิลา มณีรัตน์ (2553) ได้ทำการแยกจุลินทรีย์จากดินปนเปื้อนน้ำมันจากบริเวณอุ้มอรรถและบึงน้ำมันในจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานีและสงขลา โดยวิธี Enrichment culture ในอาหาร Minimal salt medium (MSM) ทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง พบจุลินทรีย์ในดินทั้งสิ้น 50 กลุ่มเชื้อ ซึ่ง Oloye et al. (2022) ได้ทำการแยกจุลินทรีย์จากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมันที่ปากแม่น้ำไนเจอร์ ประเทศไนจีเรีย โดยวิธี Enrichment culture ในอาหาร Bushnell Haas broth พบแบคทีเรียที่

สามารถย่อยสลายน้ำมันได้จำนวน 22 ไอโซเลต และ Dipti et al. (2018) ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินจำนวน 5 ตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานช่างกล โดยใช้อาหาร Bushnell Haas agar ที่ pH 7 โดยเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 25 ไอโซเลต ซึ่งความแตกต่างของจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดินในแต่ละแหล่งตัวอย่างขึ้นอยู่กับลักษณะแหล่งตัวอย่างดินตามปริมาณสารปนเปื้อนและระยะเวลาการปนเปื้อน

## 4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

### 4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้านโคโลนีของเชื้อที่อายุ 24 ชั่วโมง ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลาง รูปร่าง ขอบ ผิวหน้า ความนูน สี ความทึบแสง และความหนืดของโคโลนีจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร Nutrient agar พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อเฉลี่ยที่ 1.98 มิลลิเมตร โดยพบว่าเชื้อมีรูปร่างกลมร้อยละ 87.5 มีขอบโคโลนีเรียบร้อยละ 87.5 โคโลนีผิวหน้าเรียบร้อยละ 87.5 โคโลนีมีความหนาสูงชันจากผิวหน้าของอาหารร้อยละ 62.5 โคโลนีมีสีครีมร้อยละ 50 โคโลนีที่ทึบแสงร้อยละ 75 และโคโลนีมีความหนืดคล้ายเนยเหลวร้อยละ 87.5 ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้านโคโลนีของเชื้อ (Cultural characteristics) ที่คัดแยกได้จำนวน 8 ไอโซเลต

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี							
	เส้นผ่านศูนย์กลาง (MM)	รูปร่าง (Form)	ขอบ (Margin)	ผิวหน้า (Surface)	ความนูน (Elevation)	สี (Color)	ทึบ/โปร่งแสง	ความหนืด
RS5-1	2.89	Circular	Entire	Smooth	Raised	Cream	ทึบ	Butyrous
RS5-2	2.58	Circular	Entire	Smooth	Convex	Beige	ทึบ	Butyrous
RS5-3	1.83	Circular	Entire	Smooth	Raised	Cream	ทึบ	Butyrous
RS5-4	2.50	Irregular	Lobate	Rough	Raised	Yellow	ทึบ	Butyrous
KS5-1	1.75	Circular	Entire	Smooth	Flat	White	โปร่งแสง	Butyrous
KS5-2	3.01	Circular	Entire	Smooth	Raised	Cream	ทึบ	Stringy
NS5-1	1.00	Circular	Entire	Smooth	Convex	Cream	ทึบ	Butyrous
NS5-2	0.83	Circular	Entire	Smooth	Raised	Yellow	โปร่งแสง	Butyrous

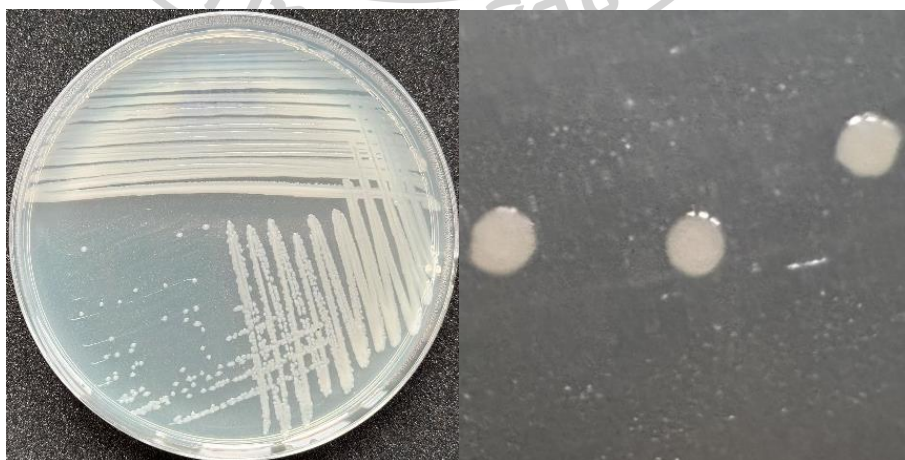
นอกจากนี้สามารถแสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหาร Nutrient agar ได้ดังนี้

ไอโซเลต RS5-1 เมื่อเลี้ยงลงบนอาหาร Nutrient agar ไอโซเลต RS5-1 (ภาพที่ 20) มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ มีความหนาสูงขึ้นจากผิวหน้าของอาหาร สีครีม ทึบแสง ความหนืดคล้ายเนยเหลว



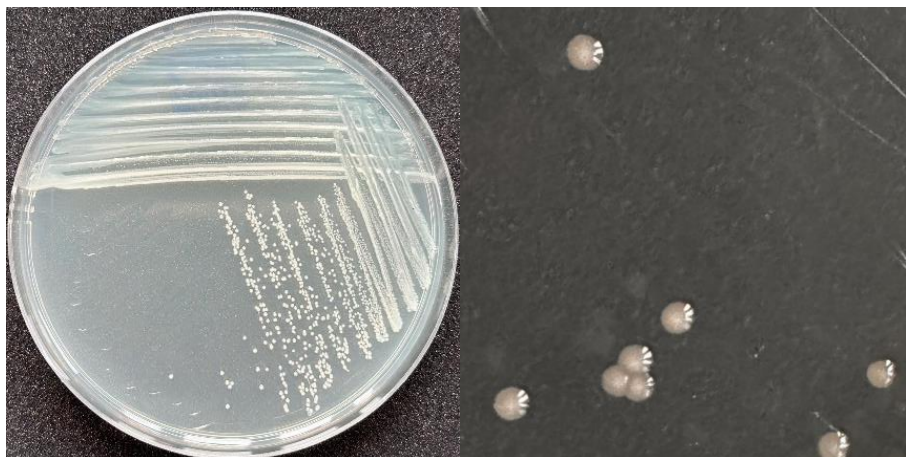
ภาพที่ 20 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต RS5-1

ไอโซเลต RS5-2 เมื่อเลี้ยงลงบนอาหาร Nutrient agar (ภาพที่ 21) มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ มีความโค้งนูนเล็กน้อยจากผิวหน้าของอาหาร สีเบจ ทึบแสง ความหนืดคล้ายเนยเหลว



ภาพที่ 21 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต RS5-2

ไอโซเลต RS5-3 เมื่อเลี้ยงลงบนอาหาร Nutrient agar (ภาพที่ 22) มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ มีความหนาสูงขึ้นจากผิวหน้าของอาหาร สีครีม ทึบแสง ความหนืดคล้าย เนยเหลว



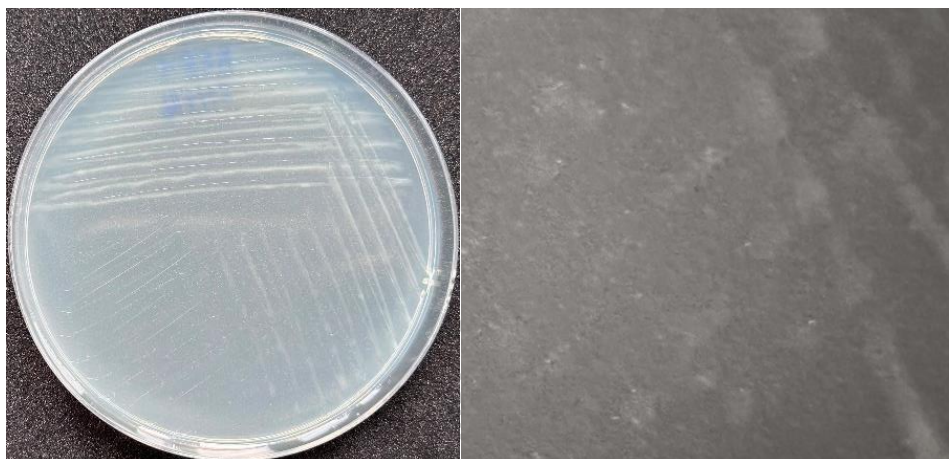
ภาพที่ 22 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต RS5-3

ไอโซเลต RS5-4 เมื่อเลี้ยงลงบนอาหาร Nutrient agar (ภาพที่ 23) มีลักษณะโคโลนีรูปร่าง ไม่แน่นอน ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้า ผิวหน้าขรุขระ มีความหนาสูงขึ้นจากผิวหน้าของอาหาร สีเหลือง ทึบแสง ความหนืดคล้ายเนยเหลว



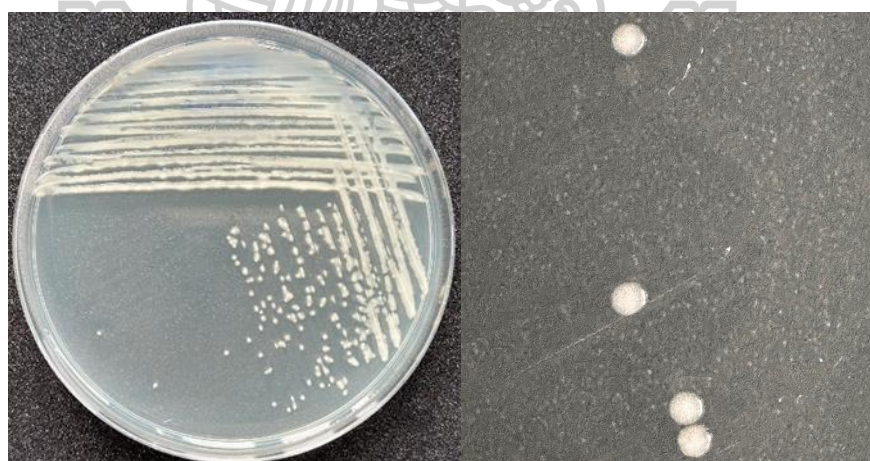
ภาพที่ 23 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต RS5-4

ไอโซเลต KS5-1 เมื่อเลี้ยงลงบนอาหาร Nutrient agar (ภาพที่ 24) มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ โคโลนีแบนราบอาหาร สีขาว โปร่งแสง ความหนืดคล้ายเนยเหลว



ภาพที่ 24 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต KS5-1

ไอโซเลต KS5-2 เมื่อเลี้ยงลงบนอาหาร Nutrient agar (ภาพที่ 25) มีลักษณะ โคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ มีความหนาสูงชันจากผิวหน้าของอาหาร สีครีม ทึบแสง ความหนืดเหนียว คล้ายเมือก



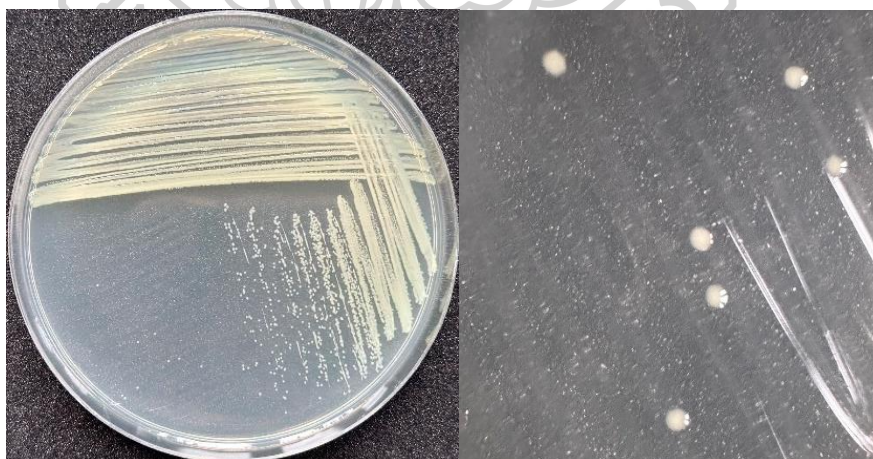
ภาพที่ 25 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต KS5-2

ไอโซเลต NS5-1 เมื่อเลี้ยงลงบนอาหาร Nutrient agar (ภาพที่ 26) มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ มีความโค้งนูนเล็กน้อยจากผิวหน้าของอาหาร สีครีม ทึบแสง ความหนืดคล้ายเนยเหลว



ภาพที่ 26 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต NS5-1

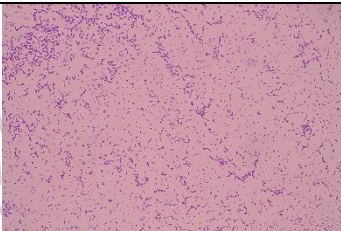

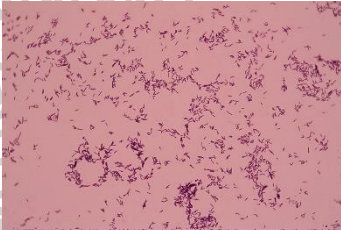
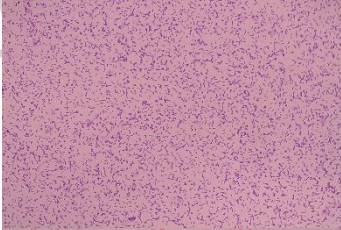
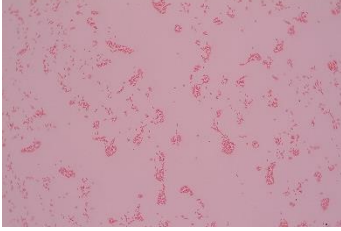
ไอโซเลต NS5-2 เมื่อเลี้ยงลงบนอาหาร Nutrient agar (ภาพที่ 27) มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ ความหนาสูงขึ้นจากผิวหน้าของอาหาร สีเหลือง โปร่งแสง ความหนืดคล้ายเนยเหลว

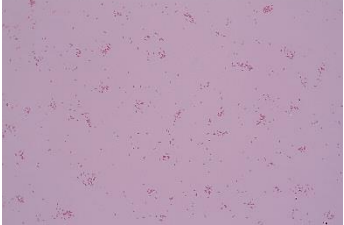


ภาพที่ 27 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ของไอโซเลต NS5-2

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้านการติดสีแกรมของเชื้อพบว่าในจำนวน 8 ไอโซเลต มี 4 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก คิดเป็นร้อยละ 55 และ 2 ไอโซเลตติดสีแกรมลบ คิดเป็นร้อยละ 25 ดังแสดงในตารางที่ 13 นอกจากนี้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทางด้านโคโลนี และรูปร่างของเชื้อพบว่ามีรูปร่างคล้ายยีสต์จำนวน 2 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะและรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 13 การติดสีแกรม (Gram staining) ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
RS5-2	แกรมบวก	
RS5-3	แกรมลบ	
RS5-4	แกรมบวก	
KS5-1	แกรมบวก	
NS5-1	แกรมลบ	

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
NS5-2	แกรมบวก	

ตารางที่ 14 ลักษณะและรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายยีสต์

รหัสเชื้อ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
RS5-1	
KS5-2	

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้านการเคลื่อนที่และลักษณะการเจริญของเชื้อ 8 ไอโซเลต พบว่าในจำนวน 8 ไอโซเลต มี 3 ไอโซเลตที่สามารถเคลื่อนที่ได้ คิดเป็นร้อยละ 37.5 และจำนวน 5 ไอโซเลตที่ไม่เคลื่อนที่ คิดเป็นร้อยละ 62.5 ดังแสดงในตารางที่ 15 และลักษณะการเจริญทั้ง 8 ไอโซเลตมีการเจริญแบบ Filiform คิดเป็นร้อยละ 100 ซึ่งเป็นการเจริญสม่ำเสมอตามรอยขีดเชื้อ ดังภาพที่ 28

ตารางที่ 15 การเคลื่อนที่และลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

รหัสเชื้อ	การเคลื่อนที่	ลักษณะการเจริญ
RS5-1	+	Filiform
RS5-2	-	Filiform
RS5-3	-	Filiform
RS5-4	-	Filiform
KS5-1	-	Filiform
KS5-2	+	Filiform
NS5-1	-	Filiform
NS5-2	+	Filiform

หมายเหตุ + เคลื่อนที่ได้  
- เคลื่อนที่ไม่ได้



ภาพที่ 28 จุลินทรีย์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Motile) และมีลักษณะการเจริญแบบสม่ำเสมอตามแนวซิดเชื้อ (Filiform)

#### 4.2.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics)

##### 4.2.2.1) การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในสภาพออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน

จากผลการศึกษาการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ที่แยกได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Hugh&Leifson O-F medium ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 16

**ตารางที่ 16** การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในสภาพออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชันของจุลินทรีย์

ไอโซเลต	จุลินทรีย์เป็นชนิด Oxidative/Fermentative
RS5-1	Fermentative
RS5-2	Non-metabolised
RS5-3	Non-metabolised
RS5-4	Non-metabolised
KS5-1	Non-metabolised
KS5-2	Oxidative
NS5-1	Non-metabolised
NS5-2	Non-metabolised

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics) ของจุลินทรีย์ด้านการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในสภาพออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน โดยคาร์โบไฮเดรตเป็นโมเลกุลอินทรีย์ที่มีคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนในอัตราส่วน  $(CH_2O)_n$  ซึ่งสิ่งมีชีวิตมีการใช้คาร์โบไฮเดรตแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับส่วนประกอบเอนไซม์ นอกจากนี้รูปแบบของการหมักเป็นลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตบางชนิด สกูลหรือกลุ่ม ส่งผลให้ใช้เป็นวิธีการในการแยกความแตกต่างทางชีวเคมีของจุลินทรีย์อย่างแพร่หลาย โดย Hugh and Leifson (1953) ได้จำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Oxidative bacteria เป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น และ Fermentative bacteria เป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์เป็นชนิด Fermentative metabolised จำนวน 1 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 12.5 ดังภาพที่ 29, จุลินทรีย์เป็นชนิด Oxidative metabolised จำนวน 1 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 12.5 ดังภาพที่ 30 และจุลินทรีย์เป็นชนิด Non-metabolised คือไม่สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้ หรือเรียกว่า Non-Saccharolytic จำนวน 6 ไอโซเลต คิดเป็น

ร้อยละ 75 ดังภาพที่ 31 ซึ่งต้องมีการศึกษาเพื่อดูความสามารถในการผลิตกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรตในการศึกษาขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 29 จุลินทรีย์เป็นชนิด Fermentative metabolized



ภาพที่ 30 จุลินทรีย์เป็นชนิด Oxidative metabolized



ภาพที่ 31 จุลินทรีย์เป็นชนิด Non-metabolised

#### 4.2.2.2) การหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation)

การหมักคาร์โบไฮเดรตเป็นการประเมินความสามารถของจุลินทรีย์ในการหมักคาร์โบไฮเดรตที่เฉพาะเจาะจง เพื่อใช้ระบุชนิดของจุลินทรีย์ตามรูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรตเหล่านั้น โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตเฉพาะชนิดต่างกัน บางชนิดสามารถหมักน้ำตาลชนิดหนึ่งได้ ในขณะที่บางชนิดไม่สามารถหมักน้ำตาลชนิดเดียวกันได้ในระหว่างการหมักคาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์จะถูกผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย กรดที่ผลิตขึ้นเหล่านี้จะลดค่า pH ของตัวกลาง การลดลงของค่า pH ดังกล่าวทำให้ตัวบ่งชี้ค่า pH ที่มีอยู่ในตัวกลางเปลี่ยนสี ซึ่งการเปลี่ยนสีนี้บ่งบอกถึงการหมักเกิดขึ้น จึงสามารถยืนยันว่าจุลินทรีย์ที่ทดสอบสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเฉพาะที่ใช้ในอาหารทดสอบได้ (Dahal, 2023)

จากผลการศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ที่แยกได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ Glucose yeast extract bromcresol purple broth, Lactose yeast extract bromcresol purple broth และ Sucrose yeast extract bromcresol purple broth ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 17

**ตารางที่ 17** ความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต		
	กลูโคส	แลคโตส	ซูโครส
RS5-1	+,G	-	+,G
RS5-2	-	-	-
RS5-3	-	-	-
RS5-4	-	-	-
KS5-1	+	-	+
KS5-2	-	-	-
NS5-1	-	-	-
NS5-2	-	-	-

หมายเหตุ + เกิดการหมัก, - ไม่เกิดการหมัก, G มีการสร้างแก๊ส

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics) ของเชื้อด้านการหมักคาร์โบไฮเดรต พบว่าจุลินทรีย์สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้จำนวน 2 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 25 จุลินทรีย์ไม่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้ทั้ง 10 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 0 และจุลินทรีย์สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ 2 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 25 นอกจากนี้ ไอโซเลต RS5-1 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและสร้างแก๊สเกิดขึ้น (ดังภาพที่ 32) ซึ่งการศึกษาของ Hossain et al. (2022) ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน พบแบคทีเรีย 3 ไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วได้ดีกว่าน้ำมันดีเซล และเมื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตมีความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสได้ นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงเมื่อนำน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (Veerabagu et al., 2013)



ภาพที่ 32 การหมักน้ำตาลกลูโคส (ภาพซ้าย) และซูโครส (ภาพขวา) ของไอโซเลต RS5-1

#### 4.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และระบุชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

ผลการศึกษาโดยเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rRNA และ 18S rRNA กับลำดับเบสในฐานข้อมูล Ezbiocloud และ NCBI แสดงในตารางที่ 18

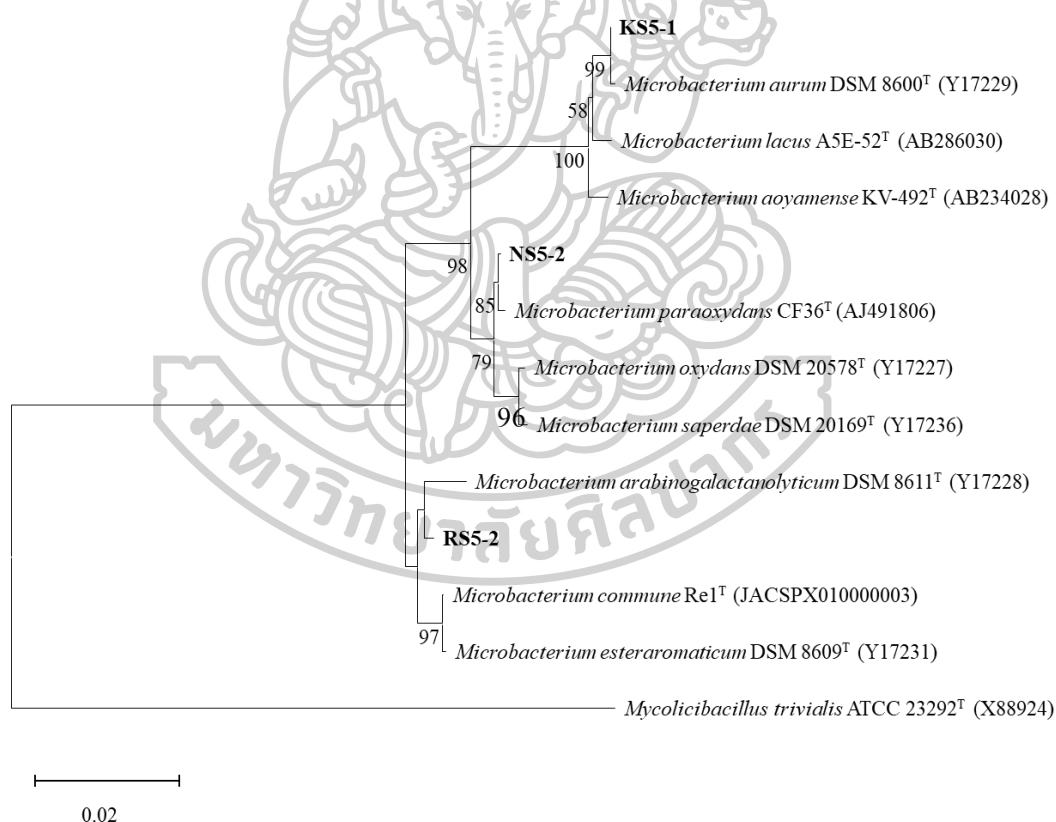
ตารางที่ 18 ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ไอโซเลต	จุลินทรีย์สายพันธุ์ใกล้เคียง	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)	ชนิดจุลินทรีย์
RS5-1	<i>Candida tropicalis</i> Y12 <sup>T</sup> (KT236445)	99.93	ยีสต์
RS5-2	<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i> IFO 14344 <sup>T</sup> (AB004715)	99.31	แบคทีเรีย
RS5-3	<i>Achromobacter veterisilvae</i> LMG 30378 <sup>T</sup> (LT976503)	99.79	แบคทีเรีย
RS5-4	<i>Tsukamurella inchonensis</i> DSM 44067 <sup>T</sup> (X85955)	99.86	แบคทีเรีย
KS5-1	<i>Microbacterium aurum</i> KACC 15219 <sup>T</sup> (CP018762)	99.93	แบคทีเรีย
KS5-2	<i>Kalmanozyma brasiliensis</i> GHG001 <sup>T</sup> (XR_001630179)	99.87	ยีสต์
NS5-1	<i>Brucella intermedia</i> LMG 3301 <sup>T</sup> (AB680967)	100.00	แบคทีเรีย
NS5-2	<i>Microbacterium paraoxydans</i> NBRC 103076 <sup>T</sup> (AJ491806)	99.86	แบคทีเรีย

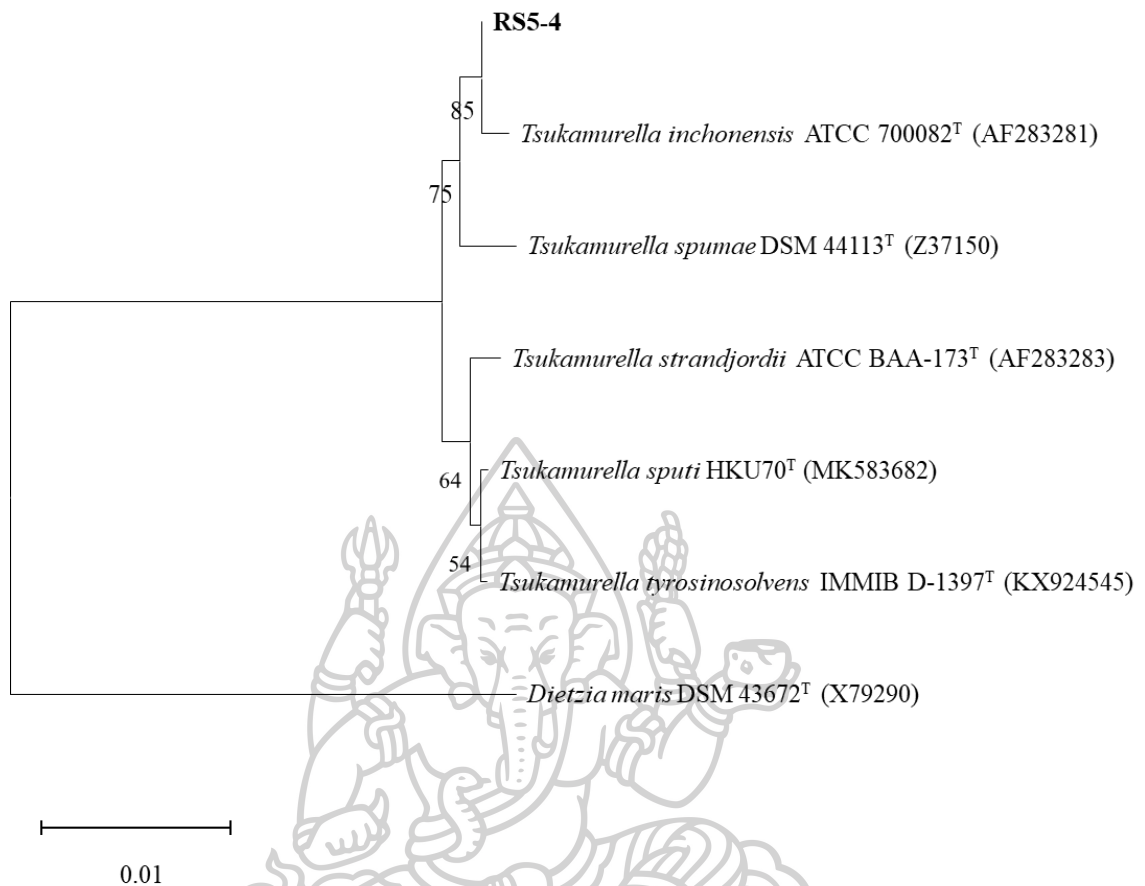
จากผลการศึกษาการระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต RS5-2 จัดอยู่ในสกุล *Microbacterium* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Microbacterium arabinogalactanolyticum* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.31 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลต RS5-3 จัดอยู่ในสกุล *Achromobacter* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Achromobacter veterisilvae* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.79 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลต RS5-4 จัดอยู่ในสกุล *Tsukamurella* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Tsukamurella inchonensis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.86 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลต KS5-1 จัดอยู่ในสกุล *Microbacterium*

sp. มีความใกล้เคียงกับ *Microbacterium aurum* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.93 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลต NS5-1 จัดอยู่ในสกุล *Brucella* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Brucella intermedia* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต NS5-2 จัดอยู่ในสกุล *Microbacterium* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Microbacterium paraoxydans* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.86 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบยีสต์จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต RS5-1 จัดอยู่ในสกุล *Candida* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Candida tropicalis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.93 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต KS5-2 จัดอยู่ในสกุล *Kalmanozyma* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Kalmanozyma brasiliensis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.87 เปอร์เซ็นต์

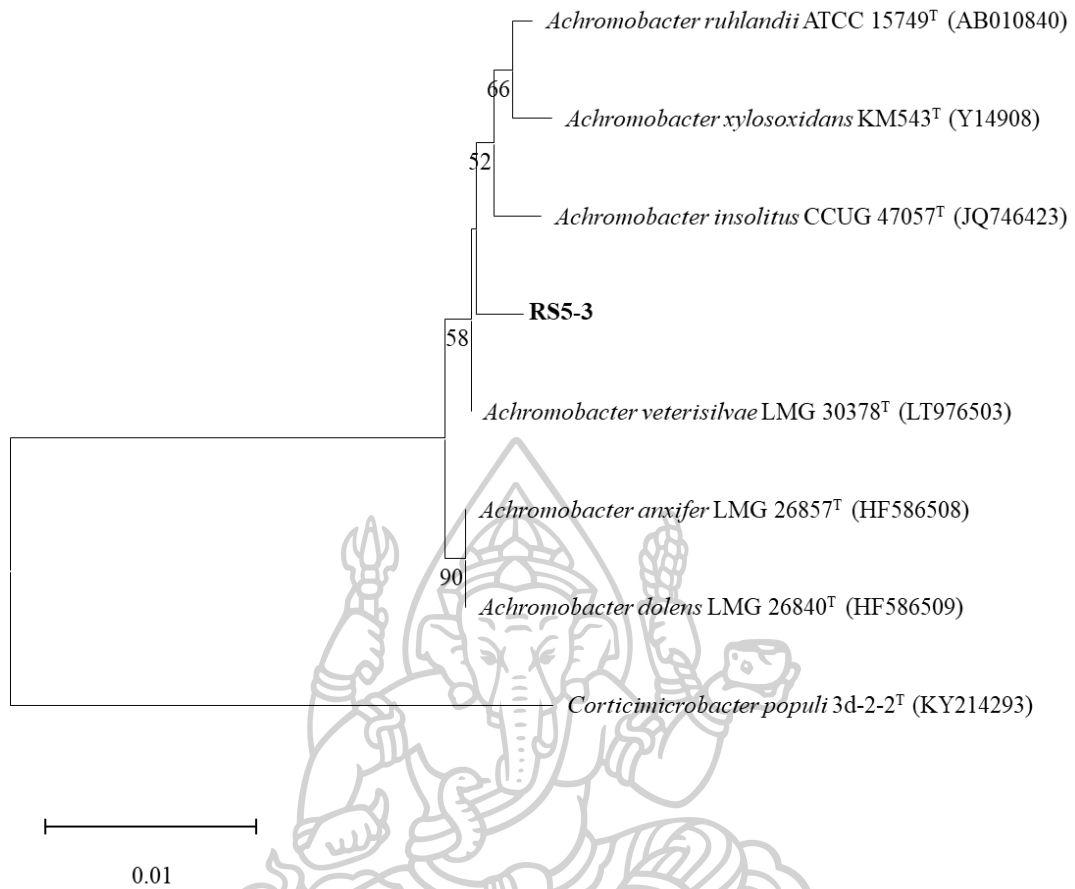
นอกจากนี้สามารถแสดงผลการศึกษาในรูปแบบของแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16s rRNA และ 18S rRNA ได้ดังภาพที่ 33, 34, 35, 36 และ 37 ดังนี้



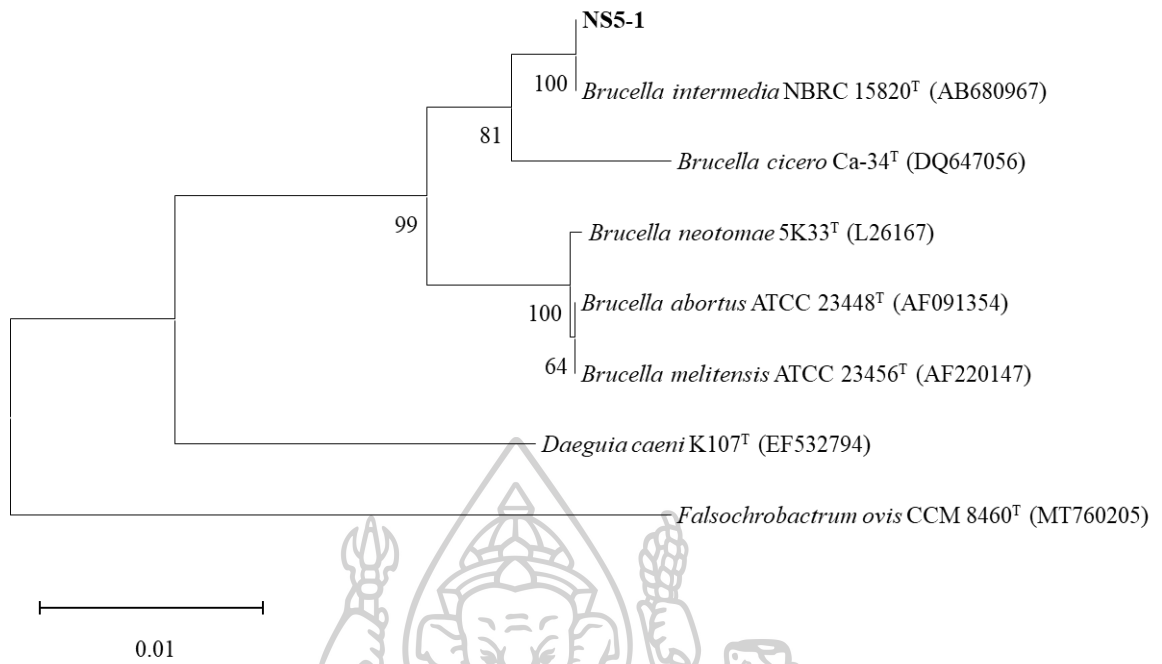
ภาพที่ 33 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล *Microbacterium* กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ) โดยใช้ *Mycolicibacillus trivialis* ATCC 23292<sup>T</sup> (X88924) เป็น outgroup



ภาพที่ 34 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล *Tsukamurella* กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ) โดยใช้ *Dietzia maris* DSM 43672<sup>T</sup> (X79290) เป็น outgroup

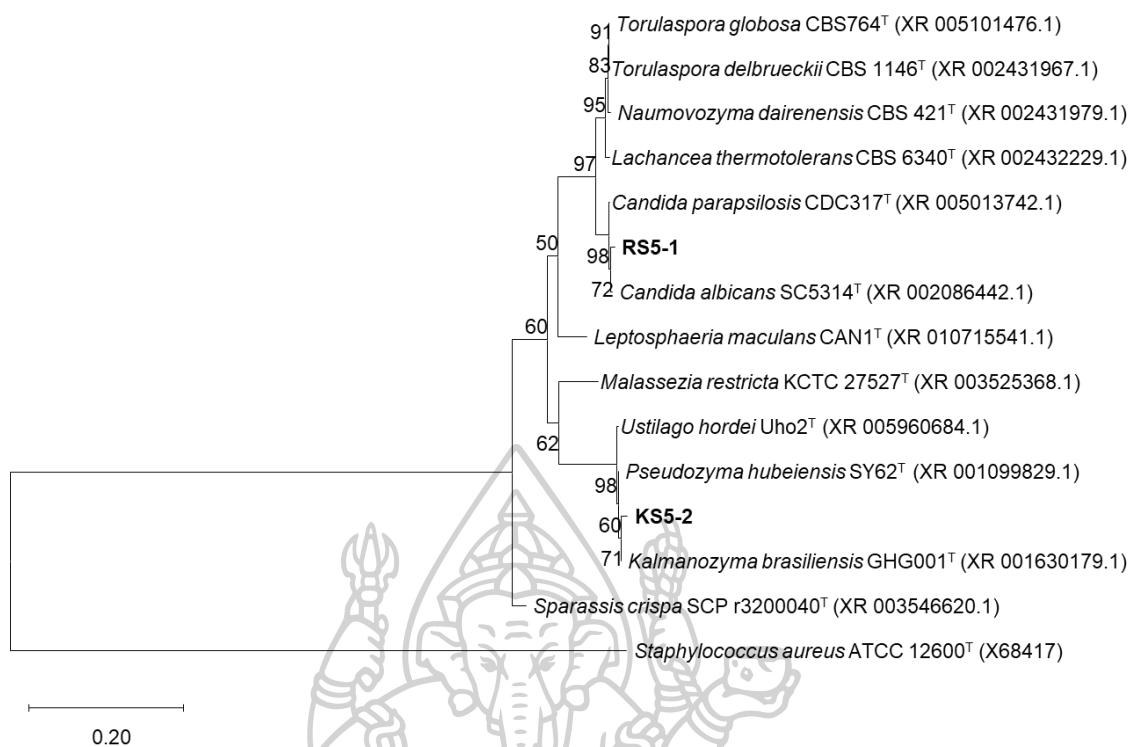


ภาพที่ 35 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล *Achromobacter* กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ) โดยใช้ *Corticimicrobacter populi* 3d-2-2<sup>T</sup> (KY214293) เป็น outgroup



ภาพที่ 36 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล *Brucella* กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ) โดยใช้ *Falsochrobactrum ovis* CCM 8460<sup>T</sup> (MT760205) เป็น outgroup





ภาพที่ 37 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 18S rRNA ของยีสต์จำนวน 2 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล *Candida* กับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ) โดยใช้ *Staphylococcus aureus* ATCC 12600<sup>T</sup> (X68417) เป็น outgroup

#### 4.4 การศึกษา Extracellular hydrolytic enzyme ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการสร้าง เอนไซม์ไลเปส

ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Tween 80 agar ด้วยเทคนิค Point inoculation ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ พบจุลินทรีย์ 6 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการสร้าง เอนไซม์ไลเปส โดยเกิดตะกอนขาวขุ่นรอบๆ โคลนนี้ เนื่องจาก fatty acid ทำปฏิกิริยากับ  $\text{Ca}^{+}$  ที่ผสมอยู่ในอาหาร เกิดเป็นตะกอนขาวขุ่น แสดงว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์ไลเปส ออกมาย่อย Tween 80 ได้ (Sharma et al., 2001) เนื่องจากไลเปสสามารถย่อยไขมันได้เป็น กรดไขมัน (fatty acid) ซึ่งในอาหารแข็งที่นำมาทดสอบมีส่วนผสมของ Tween 80 เป็นสารที่มี โครงสร้างบางส่วนคล้ายไขมัน แสดงผลการทดสอบได้ดังตารางที่ 19

**ตารางที่ 19** ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

รหัสเชื้อ	ชื่อจุลินทรีย์	ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส
RS5-1	<i>Candida</i> sp. RS5-1	++
RS5-2	<i>Microbacterium</i> sp. RS5-2	-
RS5-3	<i>Achromobacter</i> sp. RS5-3	++
RS5-4	<i>Tsukamurella</i> sp. RS5-4	++
KS5-1	<i>Microbacterium</i> sp. KS5-1	-
KS5-2	<i>Kalmanozyma</i> sp. KS5-2	+++
NS5-1	<i>Brucella</i> sp. NS5-1	-
NS5-2	<i>Microbacterium</i> sp. NS5-2	+

หมายเหตุ: + แสดงรัศมีของตะกอนมีความกว้างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.0 มิลลิเมตร  
 ++ แสดงรัศมีของตะกอนมีความกว้างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.1-4 มิลลิเมตร  
 + + + แสดงรัศมีของตะกอนมีความกว้างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.1 มิลลิเมตรขึ้นไป  
 - ไม่เกิดตะกอน

จากผลการศึกษา Extracellular hydrolytic enzyme ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยพบว่าจุลินทรีย์จำนวน 5 ไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ แบ่งเป็นแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต และยีสต์ 2 ไอโซเลต ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 62.5 ดังนี้

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดตะกอนขาวขุ่นมากที่สุด +++ (รัศมีของตะกอนมีความกว้างตั้งแต่ 4.1 มิลลิเมตรขึ้นไป) จำนวน 1 ไอโซเลต คือ *Kalmanozyma* sp. KS5-2 ดังภาพที่ 38

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดตะกอนขาวขุ่นได้มาก ++ (รัศมีของตะกอนมีความกว้างตั้งแต่ 3.1-4.0 มิลลิเมตร) จำนวน 3 ไอโซเลต คือ *Candida* sp. RS5-1, *Achromobacter* sp. RS5-3 และ *Tsukamurella* sp. RS5-4 ดังภาพที่ 39

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดตะกอนขาวขุ่นได้ + (รัศมีของตะกอนมีความกว้างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.0 มิลลิเมตร) จำนวน 1 ไอโซเลต คือ *Microbacterium* sp. NS5-2 ดังภาพที่ 40

นอกจากนี้ Hassan et al. (2018) มีการใช้ Tween 80 เพื่อนำมาเป็นสารตั้งต้นและแหล่งคาร์บอนในการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในประเทศ

มาเลเซีย พบว่าจากการคัดแยกเชื้อจำนวน 20 ไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งหมดบนอาหาร Tween 80 และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนอยู่ระหว่าง 6–20 มิลลิเมตร



ภาพที่ 38 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Tween 80 agar ด้วยเทคนิค Point inoculation ของไอโซเลต *Kalmanozyma* sp. KS5-2



ภาพที่ 39 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Tween 80 agar ด้วยเทคนิค Point inoculation ของไอโซเลต *Candida* sp. RS5-1, *Achromobacter* sp. RS5-3 และ *Tsukamurella* sp. RS5-4 เรียงจากซ้ายไปขวา



ภาพที่ 40 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Tween 80 agar ด้วยเทคนิค Point inoculation ของไอโซเลต *Microbacterium* sp. NS5-2

#### 4.5 การศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมันจำนวน 5 ไอโซเลต มาศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง และนำผลการทดลองดังกล่าวมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Duncan test ดังตารางที่ 20

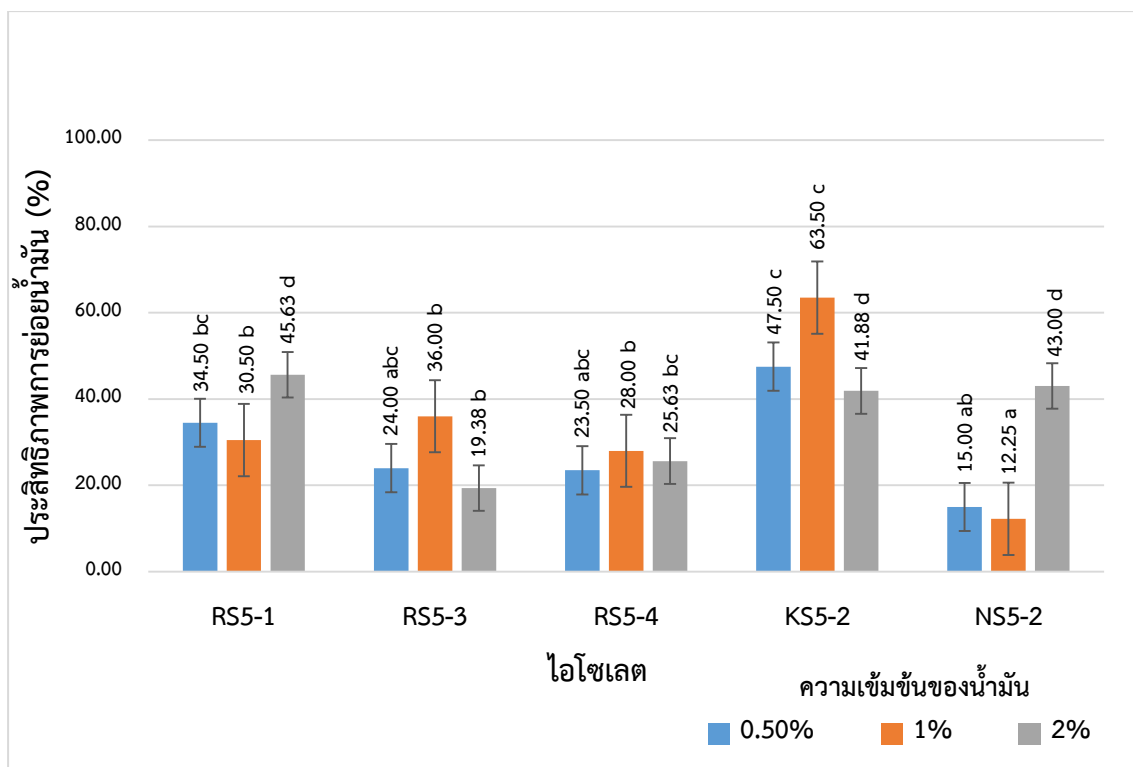
ตารางที่ 20 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	น้ำหนักน้ำมันที่เหลือ (ประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน%)		
	ความเข้มข้นน้ำมัน	ความเข้มข้นน้ำมัน	ความเข้มข้นน้ำมัน
	0.5%	1%	2%
ชุดควบคุม	0.50±0.00a	1.00±0.00a	2.00±0.00a
RS5-1	0.32±0.06bc (34.50%)	0.70±0.15b (30.50%)	1.09±0.09d (45.63%)
RS5-3	0.38±0.10abc (24.00%)	0.64±0.11b (36.00%)	1.61±0.26b (19.38%)
RS5-4	0.38±0.10abc (23.50%)	0.74±0.06b (28.00%)	1.49±0.23bc (25.63%)
KS5-2	0.26±0.07c (47.50%)	0.36±0.09c (63.50%)	1.16±0.13d (41.88%)
NS5-2	0.42±0.03ab (15.00%)	0.88±0.04a (12.25%)	1.14±0.11d (43.00%)

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่มีภาษาอังกฤษกำกับอยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan test

จากตารางที่ 20 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์ Multiple Comparison ด้วย Duncan's multiple range test แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มไอโซเลตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) พบว่า *Kalmanozyma* sp. KS5-2 มีค่าประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันสูงที่สุด รองลงมาคือ *Candida* sp. RS5-1 และ *Achromobacter* sp. RS5-3 ขณะที่ N5S-2 มีประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันต่ำที่สุด

นอกจากนี้สามารถนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยในรูปแบบแผนภูมิ ดังภาพที่ 41 ได้ดังนี้



ภาพที่ 41 แผนภูมิประสิทธิภาพการลดน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

จากภาพที่ 41 เมื่อพิจารณารายละเอียดในแต่ละระดับความเข้มข้นของน้ำมัน พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5% *Kalmanozyma* sp. KS5-2 มีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หมายถึงความสามารถในการลดน้ำมันได้ดีที่สุดในระดับความเข้มข้นนี้ ขณะที่ *Candida* sp. RS5-1, *Achromobacter* sp. RS5-3 และ *Tsakamurella* sp. RS5-4 มีประสิทธิภาพการลดน้ำมันอยู่ในระดับปานกลาง ส่วน *Achromobacter* sp. RS5-3 และ *Tsakamurella* sp. RS5-4 ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ที่ความเข้มข้น 1% *Kalmanozyma* sp. K5S-2 ยังคงแสดงประสิทธิภาพสูงที่สุดในการย่อยสลายน้ำมัน และแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน *Candida* sp. RS5-1, *Achromobacter* sp. RS5-3 และ *Tsakamurella* sp. RS5-4 มีประสิทธิภาพในการลดน้ำมันรองลงมา และแตกต่างจากชุดควบคุม ขณะที่ *Microbacterium* sp. N5S-2 ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ที่ความเข้มข้น 2% ทุกไอโซเลตมีค่าคงเหลือน้ำมันต่ำกว่าชุดควบคุม โดยเฉพาะ *Candida* sp. RS5-1, *Kalmanozyma* sp. K5S-2 และ *Microbacterium* sp. N5S-2 ซึ่งแตกต่างจาก

ชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงถึงความสามารถในการย่อยน้ำมันได้สูงแม้ในระดับความเข้มข้นของน้ำมันที่สูง

จากผลการศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมัน 0.5% *Kalmanozyma* sp. KS5-2 มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงที่สุดที่ 47.50%, ที่ความเข้มข้นของน้ำมัน 1% *Kalmanozyma* sp. KS5-2 มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงที่สุดที่ 63.50% และที่ความเข้มข้นของน้ำมัน 2% *Candida* sp. RS5-1 มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงที่สุดที่ 45.63% นอกจากนี้มีรายงานการแยกจุลินทรีย์จากดินปนเปื้อนน้ำมันโดยแยกตามไอโซเลตได้ดังนี้

ไอโซเลต RS5-1 จัดอยู่ในสกุล *Candida* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Candida tropicalis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.93 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานการแยก *Candida tropicalis* จากดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ และมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันได้ร้อยละ 98 ในเวลา 10 วัน (Chandran & Das, 2012) นอกจากนี้ผลการศึกษาที่มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Abioye et al. (2012) โดยศึกษาการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วโดยใช้ *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Trichosporon mucoides* และ *Candida tropicalis* พบว่า *Candida tropicalis* มีประสิทธิภาพในการย่อยได้ดีที่สุดในเวลา 28 วัน คิดเป็นร้อยละ 40.6 เนื่องจากความสามารถของยีสต์ในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นพิษของน้ำมันได้ดีกว่าแบคทีเรียและยีสต์มีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายที่มีประสิทธิภาพในยีสต์ที่แยกได้ นอกจากนี้ Mbachu et al. (2016) ทำการแยกเชื้อที่ปนเปื้อนในดินบริเวณอู่ซ่อมรถยนต์ พบจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Candida tropicalis*, *Rhodospiridium toruloids*, *Fusarium oxysporium* และ *Aspergillus clavatus* เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน พบว่า *Candida tropicalis* มีประสิทธิภาพการย่อยสลายมากกว่าร้อยละ 70 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงที่สุด

ไอโซเลต RS5-3 จัดอยู่ในสกุล *Achromobacter* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Achromobacter veterisilvae* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.79 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Li (2021) ได้ทำการศึกษาการย่อยน้ำมันของแบคทีเรีย โดยพบว่าสายพันธุ์ *Achromobacter* จำนวน 20 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและสารพิษ ซึ่งสามารถย่อยอัลเคนที่มีอยู่ในน้ำมันดิบได้ถึง 50-70 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า *Achromobacter veterisilvae* มียีนหลายชนิด ได้แก่ *alkB*, *monooxygenase*, *FAD-binding*, *Flavin-containing monooxygenase*, *putative cytochrome P450 oxidoreductase* และ *Putative cytochrome P450 hydroxylase* ที่สามารถย่อยสลายปิโตรเลียมต่างๆ ได้

ไอโซเลต RS5-4 จัดอยู่ในสกุล *Tsukamurella* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Tsukamurella inchonensis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.86 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานศึกษาการแยก

*Tsukamurella inchonensis* ได้จากดิน (Petrovski et al., 2011) นอกจากนี้ Tao et al. (2019) ได้แยก *Tsukamurella inchonensis* จากดินปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ร้อยละ 42.32 ในเวลา 10 วัน เมื่อเลี้ยงผสมกับ *Brevibacillus laterosporus* และ *Candida tropicalis*

ไอโซเลต KS5-2 จัดอยู่ในสกุล *Kalmanozyma* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Kalmanozyma brasiliensis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.87 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนชื่อ *Kalmanozyma brasiliensis* เป็น *Pseudozyma brasiliensis* โดยใช้วิธีการจำแนกทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อ (Li et al., 2022) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่สามารถคัดแยก *Kalmanozyma brasiliensis* ได้จากแมลงศัตรูพืชบริเวณรากอ้อย (Oliveira et al., 2014) โดยยังไม่พบรายงานการศึกษา *Kalmanozyma brasiliensis* เกี่ยวกับการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยจากงานวิจัยนี้ถือเป็นรายงานใหม่ที่สามารถค้นพบ *Kalmanozyma brasiliensis* ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในดินได้

ไอโซเลต NS5-2 จัดอยู่ในสกุล *Microbacterium* sp. มีความใกล้เคียงกับ *Microbacterium paraoxydans* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.86 เปอร์เซ็นต์ Douaa et al. (2018) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของ *Alcaligenes faecalis*, *Microbacterium oxydans* และ *Microbacterium Paraoxydans* พบว่าที่ pH 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 30 วัน ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที สามารถทำให้เชื้อมีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันได้ดีที่สุด

## บทที่ 5

### สรุปผล

การปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่สำคัญ ส่งผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการปนเปื้อนน้ำมันที่ไ้แล้วในดิน ทำให้ดินบริเวณนั้นและใกล้เคียงเสื่อมสภาพ สิ่งมีชีวิตไม่สามารถอาศัยอยู่ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจการคัดแยกจุลินทรีย์ในดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ จากนั้นทำการระบุชนิดของจุลินทรีย์ และศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมัน เพื่อใช้ประโยชน์ในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนต่อไป

การศึกษาค้นคว้าคัดแยกจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ไ้แล้วจากอู่ซ่อมรถ 3 แห่งในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี และกาญจนบุรีได้จำนวนทั้งสิ้น 8 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลต และเป็นยีสต์จำนวน 2 ไอโซเลต โดยอู่ซ่อมรถในจังหวัดนครปฐมพบแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต พบบีสต์ 1 ไอโซเลต อู่ซ่อมรถในจังหวัดกาญจนบุรีพบแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลต พบบีสต์ 1 ไอโซเลต และอู่ซ่อมรถในจังหวัดราชบุรี พบแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลต เมื่อนำไอโซเลตทั้งหมดมาระบุชนิดของจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าจัดอยู่ใน 6 สกุล ได้แก่ *Achromobacter* (1 ไอโซเลต), *Brucella* (1 ไอโซเลต), *Candida* (1 ไอโซเลต), *Kalmanozyma* (1 ไอโซเลต), *Microbacterium* (3 ไอโซเลต) และ *Tsukamurella* (1 ไอโซเลต)

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Tween-80 agar พบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมด 8 ไอโซเลต มีจำนวน 5 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 62.5) สามารถสร้างเอนไซม์ได้ และพบว่า *Kalmanozyma* sp. KS5-2 มีการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดที่ระดับ +++ , ไอโซเลต RS5-1, RS5-3 และ RS5-4 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์อยู่ที่ระดับ ++ , ไอโซเลต NS5-2 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์อยู่ที่ระดับ + และไอโซเลต RS5-2, KS5-1 และ NS5-1 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ เมื่อนำไปศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันโดย Weight loss method (Mercadé et al., 1996) พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันร้อยละ 0.5 *Kalmanozyma brasiliensis* KS5-2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันสูงที่สุดร้อยละ 47.50 และที่ความเข้มข้นของน้ำมันร้อยละ 1 *Kalmanozyma brasiliensis* KS5-2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันสูงที่สุดร้อยละ 63.50 และความเข้มข้นของน้ำมันร้อยละ 2 *Candida tropicalis* RS5-1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันสูง

ที่สุตร้อยละ 45.63 ในการทดลองนี้พบว่า *Kalmanozyma brasiliensis* KS5-2 เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันที่สูงขึ้นจะส่งผลต่อความเป็นพิษแก่จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่ใช้น้ำมัน ทำให้มีปริมาณเซลล์ลดลงได้ นอกจากนี้เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ซึ่ง Hossain et al. (2022) ได้ศึกษาการแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมัน โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณที่ทิ้งน้ำมันในบ่มน้ำมันในเมืองรังปุระ ประเทศบังกลาเทศ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วเพิ่มขึ้น อัตราการเติบโตของแบคทีเรียก็เพิ่มขึ้น จากผลการศึกษานำจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงไปต่อยอดงานวิจัย และสามารถประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วซึ่งเป็นการแก้ปัญหามลพิษน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



### ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ อย่างไรก็ตามอาจมีการปนเปื้อนน้ำมันชนิดอื่นในสิ่งแวดล้อม ทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อมได้เช่นเดียวกัน ซึ่งองค์ประกอบของน้ำมันที่ปนเปื้อนนั้นมีความแตกต่างกัน อีกทั้งประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันขึ้นอยู่กับอีกหลายปัจจัยที่แตกต่างกันด้วย เช่น อุณหภูมิ, ค่า pH, ปริมาณออกซิเจน, ความเข้มข้นของน้ำมัน, ปริมาณของจุลินทรีย์, ชนิดของจุลินทรีย์ และการใช้จุลินทรีย์ผสมเพื่อช่วยเสริมฤทธิ์ในการช่วยย่อยน้ำมัน เป็นต้น ดังนั้นเพื่อให้ทราบขอบเขตประสิทธิภาพการทำงานของจุลินทรีย์จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องข้างต้น

นอกจากนี้การระบุชนิดของเชื้อไอโซเลตที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้เป็นเพียงการระบุชนิดของเชื้อได้ในเบื้องต้นที่ระดับสกุล โดยหากต้องการระบุถึงสปีชีส์หรือชนิดของเชื้อจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ได้แก่ วิธีการทางด้าน Phenotype เช่น Morphological methods, Physiological and Biochemical characteristics, Immunological methods และ Chemical analysis วิธีการทางด้านโมเลกุล เช่น WGS, Ribotyping, Real-Time PCR, DNA fingerprinting, Microarray และ Metagenomics ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการระบุชนิดของเชื้อให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้นในอนาคต

## รายการอ้างอิง

- กัญจนา ชีระกุล และคณะ. (2536). จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กรมควบคุมมลพิษ. (2566, 9 กุมภาพันธ์). รายชื่อสารเคมีขจัดคราบน้ำมันที่อนุญาตให้ใช้ในประเทศไทย ปี 2565 (List of Dispersants approved for use in Thailand 2022). <https://www.pcd.go.th/waters/รายชื่อสารเคมีขจัดคราบน้ำมันที่อนุญาตให้ใช้ในประเทศไทย-ปี-2565-list-of-dispersants-approved-for-use-in-thailand-2022>
- กรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน. (2554). คู่มือองค์ความรู้เกี่ยวกับน้ำมันหล่อลื่น. <https://www.doeb.go.th/kmv2/knowledge/manual-lub160859.pdf>
- กองคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง. (ม.ป.ป.). รายงานปริมาณการค้าน้ำมันหล่อลื่น (น้ำมันเครื่อง) ประจำปี 2562. [http://www.doeb.go.th/info/data/datadistribution/lubricant\\_volume\\_report\\_160663.pdf](http://www.doeb.go.th/info/data/datadistribution/lubricant_volume_report_160663.pdf)
- ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์. 2533, น้ำมัน. กองวิเคราะห์ผลกระทบสิ่งแวดล้อม สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- ประเสริฐ เทียนนิมิตร, ขวัญชัย สันทิพย์สมบุรณ์, และ ปานเพชร ชินินทร. (2532). เชื้อเพลิงและวัสดุหล่อลื่น. ซีไอเอดยูเคชั่น.
- นัตยา สมตานต์. (2544). ผลกระทบของอุณหภูมิที่มีผลต่อความพร้อมทางชีวภาพของส่วนประกอบในน้ำมันดีเซลระหว่างการย่อยสลายทางชีวภาพ [วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต]. ฐานข้อมูลวิทยานิพนธ์ไทย. <http://www.thaithesis.org/detail.php?id=45595#>
- พิรกานต์ บรรเจิดกิจ. (2552). การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน. รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. [https://digital.library.tu.ac.th/tu\\_dc/frontend/Info/item/dc:109692](https://tarr.arda.or.th/preview/item/ภูมิวิวัฒน์ ฟิ่งพันธ์. (2555). การปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลของไฮโดรเวกส์เพื่อผลิตเป็นน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานคุณภาพสูง [วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต]. TU DIGITAL COLLECTIONS. <a href=)
- วิชุดา เกตุใหม่, เสาวภา แก้วสุกใส และ ลีชา แยนนา. (2553). การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ, 12(3), 202-213.
- ศิริรัตน์ บุญโสภณ. (2561). การขจัดคราบน้ำมันในทะเล. วารสารวิชาการโรงเรียนนายเรือ, 1(1),

59-67.

- ศุภศิลา มณีรัตน์. (2553). การแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และการประยุกต์ใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ใน soil slurry. <https://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2010/7814/1/321882.pdf>
- สมศักดิ์ พวงศรี. (2562). น้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์. kmcenter. [Kmceneter.rid.go.th/kcome/2014/wp-content/uploads/2019/08/องค์ความรู้ น้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์.pdf](https://kmcenter.rid.go.th/kcome/2014/wp-content/uploads/2019/08/องค์ความรู้ น้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์.pdf)
- สมศักดิ์ วังใน. (2528). จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. ไทยวัฒนาพานิชย์.
- สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง กรมธุรกิจพลังงาน. (2555). แนวโน้มการพัฒนา น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน (Base Oil) ที่ใช้ในการผลิตน้ำมันเครื่อง. สืบค้นเมื่อ 3 กันยายน 2566. <https://www.doeb.go.th/knowledge/data/TrendBaseOil.pdf>
- Abdel-El-HD, Moawad H., Zaki, E. & Zaki, S. (2002). Molecular characterization of phenol degrading bacteria isolated from different Egyptian ecosystems. *Microbiology Ecol.* 43(2). 217-224. <http://doi.org/10.1007/s00248-002-2003-2>
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiology. Rev.* 45(1), 180-209. <http://doi.org/10.1128/mr.45.1.180-209.1981>
- Atlas, R. M. (1981). Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 52(2), 149-156. <https://doi.org/10.1002/jctb.280520202>
- Atlas, R. M. (1992). Petroleum microbiology. *Baltimore*, 11, 363-369. <http://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Bagherzadeh-Namazi, A., Shojaosadati, S.A. & Hashemi-Najafabadi, S. (2008). Biodegradation of used engine oil using mixed and isolated cultures. *Internation J. Environ. Res.*, 2(4). 431-440.
- Balba, M.T., Al-Awadhi, N. and Al-Daher, R. (1998) Bioremediation of Oil-Contaminated

- Soil: Microbiological Methods for Feasibility Assessment and Field Evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 155-164. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00020-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00020-7)
- Dehal, P. (2023, April 13). *Carbohydrate Fermentation Test (Sugar Fermentation Test)*. <https://microbenotes.com/carbohydrate-fermentation-test/>
- Dipti R. P., Devayani R. T., Nisha S. N. and Shailesh R. D. (2018). Degradation of Discarded used Engine Oil by *Pseudomonas aeruginosa* DP-1 and Its Optimization. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 7(4):2224-2229. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.253>
- Gatto, V. (2015, June 17). *The chemistry and function of lubricant additives*. [https://www.stle.org/images/pdf/STLE\\_ORG/BOK/LS/Additives/The%20Chemistry%20and%20Function%20of%20Lubricant%20Additives.pdf](https://www.stle.org/images/pdf/STLE_ORG/BOK/LS/Additives/The%20Chemistry%20and%20Function%20of%20Lubricant%20Additives.pdf)
- Hassan, S. W. M., Abd El Latif, H. H., & Ali, S. M. (2018). Production of Cold-Active Lipase by Free and Immobilized Marine *Bacillus cereus* HSS: Application in Wastewater Treatment. *Frontiers in microbiology*, 9, 2377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02377>
- Hossain, M. F., Akter, M. A., Sohan, M. S. R., Sultana, D. N., Reza, M. A., & Hoque, K. M. F. (2022). Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment. *Saudi journal of biological sciences*, 29(1), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.069>
- Hugh, R., and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative rods. *J. Bacteriol.* 66, 24–26.
- Hussein, A. A., & Khudhair, H. S. (2018). Biological treatment of used engine oil by single and mixed bacterial cultures isolated from soil of mechanic workshops. *Journal of biotechnology research center*, 12(1), 115-123. <https://doi.org/10.24126/jobrc.2018.12.1.556>

- Ibrahim, H. M. M. (2016). Biodegradation of used engine oil by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil. *3 Biotech*, *6*(2), 226-240. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0540-5>
- Juhasz, A., M. Britz, M. & Stanley, G.A. (1997). Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz [a,h] anthracene by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Microbiology*, *83*(2), 189-198. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00220.x>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*.*35*:1547-1549
- Kurnia, D.R., Mangunwardoyo, W. & Ambarsari, H. (2018). Biodegradation of used lubricant oil hydrocarbons using *Bacillus subtilis* InaCC B289 and *Pseudomonas aeruginosa* InaCC B290 in single or mixed cultures. *American Institute of physics*, *8*, 1-6. <http://doi.org/10.1063/1.5062805>
- Leachy, J. G. & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Rev*, *54*(3), 305-315. <http://doi.org/10.1128/mr.54.3.305-315.1990>
- Li, Q. (2021). Mining secondary metabolism of achromobacter and analysis of key genes of petroleum degradation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. *692*. <http://doi.org/10.1088/1755-1315/692/4/042032>.
- Li, Y. Y., Wang, M. M., Groenewald, M., Li, A. H., Guo, Y. T., Wu, F., Zhang, B. Q., Tanaka, E., Wang, Q. M., Bai, F. Y., & Begerow, D. (2022). Proposal of Two New Combinations, Twenty New Species, Four New Genera, One New Family, and One New Order for the Anamorphic Basidiomycetous Yeast Species in *Ustilaginomycotina*. *Frontiers in microbiology*, *12*, 777338. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.777338>

- Lu, W.J., H.T. Wang, S.J. Yang, Z.C. Wang and Y.F. Nie. 2005. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5. 353-360. <http://doi.org/10.2323/jgam.51.353>
- Marin, M. A., Pedregosa A., Rios S. & Laborda, F. (1996). Study of factors influencing the degradation of heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. *International biodeterioration and biodegradation*, 38, 69-75. [http://doi.org/10.1016/S0964-8305\(96\)00027-3](http://doi.org/10.1016/S0964-8305(96)00027-3)
- Mercade, M. E., Monleon, L., Andres, C., Rodon, I., Martinez, E., Espuny, M. J. & Manresa, A. (1996). Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *Applied Bacteriology*, 81(2), 161-166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb04494.x>
- MOSIL LUBRICANTS. (2021, December 27). *The Difference Between Synthetic Oil & Mineral Oil*. <https://www.mosil.com/blog/synthetic-oil-vs-mineral-oil/>
- Oliveira, J. V. C., Borges, T. A., Corrêa Dos Santos, R. A., Freitas, L. F. D., Rosa, C. A., Goldman, G. H., & Riaño-Pachón, D. M. (2014). *Pseudozyma brasiliensis* sp. nov., a xylanolytic, ustilaginomycetous yeast species isolated from an insect pest of sugarcane roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(6), 2159–2168. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.060103-0>
- Oloye, A., Chikere, C. & Okpokwasili, G. (2020). Isolation and Characterization of Hexadecane Degrading Bacteria from Oil- polluted soil in Gio Community, Niger Delta, Nigeria. *Scientific African*. 9. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00340>.
- Pandolfo, E., Caracciolo B. A. & Rolando L. (2023). Recent advances in bacterial degradation of hydrocarbons. *Water*, 15(2), 375. <https://doi.org/10.3390/w15020375>
- Parikh, D., Tipre, D., Nayak, N. & Dave, S. (2018). Degradation of discarded used engine oil by *Pseudomonas aeruginosa* DP-1 and its optimization. *International journal of*

*current microbiology and applied sciences*, 7(4), 2224-2229.  
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.253>

PCC Group. (2022, March 10). *Base oils as the main component of lubricants and functional fluids*. <https://www.products.pcc.eu/en/blog/base-oils-as-the-main-component-of-lubricants-and-functional-fluids/>

Pokethitiyook, P., Sungpetch, A., Upathame, S., & Kruatrachue, M. (2003). Enhancement of *Acinetobacter calcoaceticus* in biodegradation of Tapis crude oil. *Applied Environ. Microbial*, 42, 1-10.

Rank, I. L. & Lawrence, I. (2013). Effects of crude oil spillage on soil physico-chemical properties in ugorodo community. *IJMER*, 3(6), 3336-3342.  
<https://doi.org/10.6084/M9.FIGSHARE.1114977.V1>

Sharma, R., Y. Chisti and U.C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*19: 627-662.  
[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00086-6)

Tankeshwar, A. (2022, October 4). *Psychrophiles, Mesophiles, Thermophiles*. *Microbe online*. <https://microbeonline.com/psychrophiles-mesophiles-thermophiles/>

Thenmozhi, R., Nagasathya, A. & Thajuddin, N. (2011). Biodegradation of used engine oil by consortium cultures. *Advances in Environmental Biology*, 5(6), 1051-1057.

Umanu, G., Akpe, A.R. and Omoikhudu, A. (2013). Oil degradation assessment of bacteria isolated from used motor oil contaminated soils in Ota, Nigeria. *RIJABR*, 3(4), 506-513.

Uranai, C., Melchiorretto, P., Canevali, C., & Crosta, G.F. (2005). Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 cells exposed to cadmium. *Toxicol In Vitro*, 19(7), 887-892. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.011>

Veerapagu, M., Narayanan, A. S., Ponmurugan, K., & Jeya, K. R. (2013). Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. *Asian J Pharm Clin Res*, 6(3), 62-67.

Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H. & Yu, H. (2018).

Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic condition: A perspective analysis. *Frontiers in microbiology*, 9, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>





ภาคผนวก



### 1. Carbon-free mineral medium (CFMM)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.8	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2.2	กรัม
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	3.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50	มิลลิกรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

### 2. LB (Luria-Bertani)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

### 3. Hugh&Leifson O-F medium

Peptone	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3	กรัม
Bromthymol blue	0.03	กรัม
Agar	3	กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.1

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นตั้งหลอดอาหารทิ้งไว้ในแนวตรงให้อาหารแข็งตัว

### 4. Tween 80 agar หรือ Lipase test medium

Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
Tween 80	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที สำหรับ Tween 80 ให้นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแยกจากส่วนประกอบอื่นแล้วจึงนำมาผสมกันที่หลัง

### 5. Skimmed milk agar หรือ Sodium caseinate agar

Sodium caseinate

หรือ Skimmed milk 2 กรัม

Glucose 1 กรัม

$K_2HPO_4$  0.2 กรัม

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 กรัม

$FeSO_4$  trace

Agar 15 กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

### 6. Starch agar

Soluble starch 2 กรัม

Nutrient agar 1,000 มิลลิลิตร

เตรียม Nutrient agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Soluble starch 2 กรัม ปรับ pH เป็น 6.8-7.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

### 7. Gelatin agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Gelatin	6.0-8.0	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

### 8. Glucose yeast extract brom cresol purple broth

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Glucose	10	กรัม
Brom cresol purple	0.0133	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม และบรรจุลงในหลอดทดลองที่มีหลอดดักแก๊สในลักษณะคว่ำหลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที

### 9. Lactose yeast extract bromcresol purple broth

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Lactose	10	กรัม
Brom cresol purple	0.0133	กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม และบรรจุลงในหลอดทดลองที่มีหลอดดักแก๊สในลักษณะคว่ำหลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที

### 10. Sucrose yeast extract bromcresol purple broth

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Brom cresol purple	0.0133	กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม และบรรจุลงในหลอดทดลองที่มีหลอดดักแก๊สในลักษณะคว่ำหลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที

### 11. Yeast Malt Agar (YMA)

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	15	กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.5

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

### 12. Yeast Malt Agar (YMB)

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.5

ละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

### 13. Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

ละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

### 14. Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

ละลายส่วนประกอบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข  
สื่อพิมพ์และสารทศสอบ

## 1. Gram stain

### 1.1 Crystal violet

#### สารละลาย A

Crystal violet	10	g
Ethyl alcohol 95%	200	ml

ละลายสี Crystal violet ในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด

#### สารละลาย B

Ammonium oxalate	8	g
น้ำกลั่น	800	ml

ละลาย Ammonium oxalate ในน้ำกลั่นจนละลายหมด

- ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ถ้ามีตะกอนกรองก่อนการใช้งาน

### 1.2 Safranin O counterstain (Stock solution)

Safranin	2.5	g
Ethyl alcohol 95%	100	ml
น้ำกลั่น	1000	ml

- ละลายสี Safranin O ใน Ethyl alcohol 95% และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

- หากใช้สีในการย้อมแกรม ให้เจือจางเป็น 1:10 (stock safranin 10 ml ผสมกับน้ำกลั่น 90 ml) ถ้ามีตะกอนกรองก่อนการใช้งาน

### 1.3 Gram's iodine solution (mordant)

Iodine	1	g
Potassium iodide (KI)	2	g
น้ำกลั่น	300	ml

- ละลาย iodine และ KI ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆ ให้ละลายหมด จากนั้นเติมน้ำจนครบ ปริมาตรที่ต้องการ

### 1.4 Alcohol-acetone (decolorizer)

Ethyl alcohol 95%	500	ml
Acetone	500	ml

- นำ Ethyl alcohol 95% และ Acetone มาผสมให้เข้ากัน

## 2. Acid HgCl<sub>2</sub> (ทดสอบการสร้างเอนไซม์ gelatinase)

HgCl <sub>2</sub>	15	g
HCl conc.	20	ml
น้ำกลั่น	100	ml

- ผสมส่วนประกอบตามปริมาตรที่ต้องการเตรียม และบรรจุลงในขวดแก้ว



ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ค1 จำนวนโคโลนีในการเก็บตัวอย่างจาก 3 แหล่งตัวอย่าง

แหล่งข้อมูล	Subculture4				Subculture5				Subculture6			
	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
รูปถ่ายไปรษณีย์ รูปถ่ายรังผึ้ง	>300	>300	>300	242	>300	>300	124	19	>300	>300	>300	>300
	>300	>300	>300	59	>300	>300	197	73	>300	>300	>300	>300
	>300	>300	>300	244	>300	>300	232	197	>300	>300	>300	>300
รูปถ่ายรังผึ้ง รูปถ่ายรังผึ้ง	>300	>300	>300	83	>300	>300	>300	174	>300	>300	250	37
	>300	>300	>300	42	>300	>300	>300	90	>300	>300	245	31
	>300	>300	>300	76	>300	>300	>300	15	>300	>300	262	29
รูปถ่ายรังผึ้ง รูปถ่ายรังผึ้ง	>300	>300	55	17	>300	>300	212	58	>300	>300	289	63
	>300	>300	42	4	>300	>300	186	64	>300	>300	212	168
	>300	>300	46	0	>300	>300	198	94	>300	>300	276	186

ตารางผนวกที่ ค2 ผลประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ของไอโซเลต RS5-1

ปริมาณ น้ำมันตั้งต้น (%)		น้ำหนัก Flask (กรัม)	น้ำหนัก Flask+ สารสกัดที่เหลือ (กรัม)	น้ำมันที่ เหลือ (W2) (กรัม)	ประสิทธิภาพ การย่อยน้ำมัน (%)
0.5 %	Control	146.67	147.17	0.50	
	ซ้ำ 1	149.06	149.31	0.25	50.00 %
	ซ้ำ 2	387.60	387.95	0.35	30.00 %
	ซ้ำ 3	295.10	295.41	0.31	38.00 %
	ซ้ำ 4	145.06	145.45	0.39	22.00 %
1 %	Control	146.81	147.81	1.00	
	ซ้ำ 1	145.69	146.17	0.48	52.00 %
	ซ้ำ 2	149.62	150.40	0.78	22.00 %
	ซ้ำ 3	295.11	295.93	0.82	18.00 %
	ซ้ำ 4	145.82	146.52	0.70	30.00 %
2 %	Control	386.94	388.94	2.00	
	ซ้ำ 1	293.86	294.94	1.08	46.00 %
	ซ้ำ 2	147.01	148.12	1.11	44.50 %
	ซ้ำ 3	293.48	294.45	0.97	51.50 %
	ซ้ำ 4	145.62	146.81	1.19	40.50 %

ตารางผนวกที่ ค3 ผลประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ของไอโซเลต RS5-3

ปริมาณ น้ำมันตั้งต้น (%)		น้ำหนัก Flask (กรัม)	น้ำหนัก Flask+ สารสกัดที่เหลือ (กรัม)	น้ำมันที่ เหลือ (W2) (กรัม)	ประสิทธิภาพ การย่อยน้ำมัน (%)
0.5 %	Control	146.38	149.88	0.50	
	ซ้ำ 1	145.93	146.33	0.40	20.00 %
	ซ้ำ 2	145.55	145.97	0.42	16.00 %
	ซ้ำ 3	149.00	149.46	0.46	8.00 %
	ซ้ำ 4	107.55	107.79	0.24	52.00 %
1 %	Control	289.59	290.59	1.00	
	ซ้ำ 1	386.16	386.64	0.48	52.00 %
	ซ้ำ 2	293.66	294.38	0.72	28.00 %
	ซ้ำ 3	145.94	146.63	0.69	31.00 %
	ซ้ำ 4	149.38	150.05	0.67	33.00 %
2 %	Control	145.54	147.54	2.00	
	ซ้ำ 1	293.61	295.58	1.97	1.50 %
	ซ้ำ 2	148.97	150.60	1.63	18.50 %
	ซ้ำ 3	145.94	147.36	1.42	29.50 %
	ซ้ำ 4	149.38	150.81	1.43	28.50 %

ตารางผนวกที่ ค4 ผลประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ของไอโซเลต RS5-4

ปริมาณ น้ำมันตั้งต้น (%)		น้ำหนัก Flask (กรัม)	น้ำหนัก Flask+ สารสกัดที่เหลือ (กรัม)	น้ำมันที่ เหลือ (W2) (กรัม)	ประสิทธิภาพ การย่อยน้ำมัน (%)
0.5 %	Control	149.70	150.20	0.50	
	ซ้ำ 1	145.91	146.31	0.40	20.00 %
	ซ้ำ 2	145.53	145.98	0.45	10.00 %
	ซ้ำ 3	289.71	290.16	0.45	10.00 %
	ซ้ำ 4	293.62	293.85	0.23	54.00 %
1 %	Control	149.35	150.35	1.00	
	ซ้ำ 1	148.96	149.64	0.68	32.00 %
	ซ้ำ 2	145.92	146.72	0.80	20.00 %
	ซ้ำ 3	386.02	386.70	0.68	32.00 %
	ซ้ำ 4	145.57	146.35	0.78	28.00 %
2 %	Control	149.32	151.32	2.00	
	ซ้ำ 1	145.89	147.10	1.21	39.50 %
	ซ้ำ 2	148.87	150.27	1.40	30.00 %
	ซ้ำ 3	293.02	294.62	1.60	20.00 %
	ซ้ำ 4	145.62	147.36	1.74	13.00 %

ตารางผนวกที่ ค5 ผลประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ของไอโซเลต KS5-2

ปริมาณ น้ำมันตั้งต้น (%)		น้ำหนัก Flask (กรัม)	น้ำหนัก Flask+ สารสกัดที่เหลือ (กรัม)	น้ำมันที่ เหลือ (W2) (กรัม)	ประสิทธิภาพ การย่อยน้ำมัน (%)
0.5 %	Control	146.05	146.55	0.50	
	ซ้ำ 1	146.57	146.94	0.37	26.00 %
	ซ้ำ 2	103.81	104.06	0.25	50.00 %
	ซ้ำ 3	107.86	108.08	0.22	56.00 %
	ซ้ำ 4	145.95	145.74	0.21	58.00 %
1 %	Control	149.60	150.60	1.00	
	ซ้ำ 1	145.52	145.88	0.36	64.00 %
	ซ้ำ 2	149.36	148.93	0.43	57.00 %
	ซ้ำ 3	145.94	146.37	0.43	57.00 %
	ซ้ำ 4	149.86	150.10	0.24	76.00 %
2 %	Control	145.68	147.68	2.00	
	ซ้ำ 1	149.51	150.71	1.20	40.00 %
	ซ้ำ 2	149.21	150.50	1.29	35.50 %
	ซ้ำ 3	150.49	151.47	0.98	51.00 %
	ซ้ำ 4	149.11	150.29	1.18	41.00 %

ตารางผนวกที่ ค6 ผลประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ของไอโซเลต NS5-2

ปริมาณ น้ำมันตั้งต้น (%)		น้ำหนัก Flask (กรัม)	น้ำหนัก Flask+ สารสกัดที่เหลือ (กรัม)	น้ำมันที่ เหลือ (W2) (กรัม)	ประสิทธิภาพ การย่อยน้ำมัน (%)
0.5 %	Control	149.47	149.97	0.50	
	ซ้ำ 1	146.00	146.45	0.45	10.00 %
	ซ้ำ 2	289.73	290.18	0.45	10.00 %
	ซ้ำ 3	145.69	146.10	0.41	18.00 %
	ซ้ำ 4	149.07	149.46	0.39	22.00 %
1 %	Control	293.87	294.87	1.00	
	ซ้ำ 1	386.37	387.21	0.84	16.00 %
	ซ้ำ 2	149.50	150.36	0.86	14.00 %
	ซ้ำ 3	146.10	147.02	0.92	8.00 %
	ซ้ำ 4	145.67	146.56	0.89	11.00 %
2 %	Control	293.83	295.83	2.00	
	ซ้ำ 1	149.11	150.10	0.99	50.50 %
	ซ้ำ 2	149.51	150.67	1.16	42.00 %
	ซ้ำ 3	386.33	387.48	1.15	42.50 %
	ซ้ำ 4	146.04	147.30	1.26	37.00 %

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นุชนาถ โพรธราม	
วุฒิการศึกษา	โรงเรียนบ้านป่าถล่ม	2541 - 2546 ประกาศนียบัตร ป.6
	โรงเรียนสามร้อยยอดวิทยาคม	2547 - 2549 ประกาศนียบัตร ม.3
	โรงเรียนสามร้อยยอดวิทยาคม	2550 - 2552 ประกาศนียบัตร ม.6
	มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม	2553 - 2557 วทบ. (ชีววิทยา)

