

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

Nuchanat POTHARAM¹

1 Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand; Potaram_N2@su.ac.th

ARTICLE HISTORY

Received: 7 April 2025

Revised: 21 April 2025

Published: 6 May 2025

ABSTRACT

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 64% 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.

Keywords: Lubricating-oil, Microorganisms, Weight Loss Method

CITATION INFORMATION: Potharam, N. (2025). Isolation and Study of Lubricating-oil Degrading Microorganisms from Oil-contaminate SOIL Sites. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 3(5), 56

การแยกและการศึกษาจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นจากดินบริเวณ ปนเปื้อนน้ำมัน

นุชนาถ โพธราชม¹

1 สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; Potaram_N2@silpakorn.edu

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ซึ่งการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์เป็นทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นบริเวณปนเปื้อนน้ำมันจากดินที่เก็บบริเวณอุโมงค์มรดกจำนวน 3 แหล่งตัวอย่าง 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) จากนั้นนำไปศึกษาการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Tween-80 agar พบว่า จุลินทรีย์ทั้งหมด 8 ไอโซเลต มีจำนวน 5 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 62.5) สามารถสร้างเอนไซม์ได้ และพบว่า *Kalmanozyma* sp. KS5-2 มีการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดที่ระดับ +++ เมื่อนำไปศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันโดย Weight loss method พบว่า *Kalmanozyma* sp. KS5-2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุด ร้อยละ 64 ในระยะเวลา 3 วัน ที่ความเข้มข้นของน้ำมัน ร้อยละ 1 ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์และต่อยอดงานวิจัยได้ในอนาคต

คำสำคัญ: น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์, จุลินทรีย์, วิธีการชั่งน้ำหนักที่หายไป

ข้อมูลการอ้างอิง: นุชนาถ โพธราชม. (2568). การแยกและการศึกษาจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นจากดินบริเวณปนเปื้อนน้ำมัน. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 3(5), 56

บทนำ

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

การปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม โดยน้ำมันหล่อลื่นส่วนใหญ่แล้วประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว สายยาว (C16-C36) มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ และสารเพิ่มคุณภาพ 10-20 เปอร์เซ็นต์ (Ibrahim, 2016) ซึ่งเมื่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อม จะเกิดการรวมตัวหรือเกาะติดกับสารอินทรีย์ต่างๆ ส่งผลให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและมีการย่อยสลายที่ยากขึ้น (Mercadé et al., 1996) นอกจากนี้องค์ประกอบของสารเพิ่มคุณภาพในน้ำมันหล่อลื่นยังประกอบด้วยสารอินทรีย์ เช่น ไนโตรเจน และโลหะต่างๆ ซึ่งเมื่อเกิดการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ทำให้พบสารปนเปื้อนโลหะหนักบางชนิด เช่น ตะกั่ว (Pb), แบเรียม (Ba), สังกะสี (Zn), แมกนีเซียม (Mg) และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Aromatic hydrocarbons, PAHs) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งและก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตสูงมาก (Parikh et al., 2018) นอกจากนี้เมื่อสัมผัสกับน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วปริมาณความเข้มข้นต่ำหรือสูงเป็นระยะเวลานาน อาจทำให้เกิดอันตรายต่อระบบประสาท ตับ ไต และไขกระดูก รวมทั้งอาจไปขัดขวางต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ (Uranai et al., 2005) ดังนั้นจึงต้องมีการบำบัดน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในดิน เพื่อลดผลกระทบที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม พืช สัตว์และมนุษย์ (Rank & Lawrence, 2013)

การบำบัดน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในดินสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) โดยในแต่ละวิธีมีข้อดี และข้อจำกัดที่แตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามวิธีการบำบัดทางชีวภาพเป็นอีกทางเลือกที่นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย โดยประหยัดกว่าการบำบัดทางกายภาพและทางเคมี สามารถประยุกต์ใช้ได้ในพื้นที่ปนเปื้อนขนาดใหญ่ได้และมีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้หลังการบำบัด คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Leahy & Colwell, 1990) นอกจากนี้จุลินทรีย์จำนวนมากที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันได้ ซึ่งแหล่งที่อยู่ส่วนใหญ่ของจุลินทรีย์เหล่านั้นพบได้ในดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันดังกล่าว ดังนั้นการบำบัดมลพิษด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์จึงมีความเป็นไปได้สูงในการคัดแยกจุลินทรีย์ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนเพื่อนำมาบำบัดน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในบริเวณเหล่านั้น หรือนำไปประยุกต์ใช้ในแหล่งปนเปื้อนอื่นได้ต่อไป โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยก และจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

การทบทวนวรรณกรรม

วิธีการกำจัดคราบน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสิ่งแวดล้อม

วิธีการกำจัดคราบน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสิ่งแวดล้อม สามารถแบ่งวิธีการกำจัดได้เป็น 3 วิธี คือ

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 เพียรมนกุล, 2556) โดยใช้วัสดุดูดซับหรือจับน้ำมัน ซึ่งวัสดุจะเป็นตัวกลางจำพวกสังเคราะห์หรือโลหะบางชนิดคอยดูดซับน้ำมันที่ลอยเหนือผิวน้ำ แล้วถูกส่งผ่านไประตอกด้วยแผ่นรีดน้ำมันก่อนจะสูบไปเก็บไว้ที่ถังเก็บ (ชรินทร์ รุ่งเรืองศิลป์, 2533)

2) วิธีทางเคมี

เป็นการใช้สารเคมีในการกำจัดน้ำมัน โดยมีการนำสารเคมีไปฉีดในบริเวณที่มีการปนเปื้อน โดยสามารถแบ่งประเภทการกำจัดได้ 3 ลักษณะ คือ 1) ลักษณะกระจายคราบน้ำมัน มีสารลดแรงตึงผิวเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับน้ำมัน ทำให้น้ำมันแตกตัวและแพร่กระจายในน้ำ ช่วยให้สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการธรรมชาติโดยง่าย 2) ลักษณะการล้างคราบน้ำมัน ซึ่งจะประกอบด้วยสารเพิ่มความเปียก (wetting agent) ที่ทำให้น้ำมันอ่อนตัวลง หรือมีความหนืดลดลงเพื่อช่วยให้สามารถใช้น้ำในการชะล้างและทำความสะอาดน้ำมันจากพื้นผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ 3) ลักษณะการรวบรวมคราบน้ำมัน มีสารที่ทำให้น้ำมันรวมตัวกับน้ำ หรือรวมตัวกันเป็นก้อนหรือเปลี่ยนสภาพเป็นสารเหนียวข้นคล้ายยางหรือวุ้น รวมทั้งวัสดุหรือสารที่สามารถดูดซับน้ำมัน โดยน้ำมันที่รวมกับสารเหล่านี้จะลอยตัวอยู่บนผิวน้ำ และต้องดำเนินการเก็บรวบรวมเพื่อนำไปกำจัดต่อไป นอกจากนี้ ศิริรัตน์ บุญโสภณ (2561) ได้ทำการศึกษาการขจัดคราบน้ำมันในทะเลอ่าวพร้าว ซึ่งใช้สารเคมีในกลุ่ม slickgone โดยปริมาณการใช้ที่เหมาะสมของสาร slickgone คือ สารเคมี 1 ส่วน ต่อน้ำมัน 30 ส่วน สารในกลุ่มนี้ยังไม่มีข้อมูลว่าทำให้เกิดความผิดปกติในระยะยาว แต่มีผลทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง แสบร้อน ซึ่งอาการแพ้เกิดขึ้นได้สำหรับคนที่เข้าไปจัดเก็บโดยตรง เนื่องจากสารดังกล่าวมีการสะสม ซึ่งปริมาณคราบน้ำมันที่ประเมินได้จากภาพถ่ายดาวเทียมมีความกว้าง 10-15 ตารางกิโลเมตร ยาว 8 ตารางกิโลเมตร ปริมาณน้ำมันคาดว่าจะอยู่ที่ประมาณ 15 ตัน พบว่า สภาพทางกายภาพของอ่าวพร้าวพื้นดินสภาพมาเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำทะเลไม่มีคราบน้ำมันที่ผิว ทราบชายหาดกลับมามีสีขาว แต่ผลกระทบระยะยาวต่อเนื่องจากคราบน้ำมันและการใช้สารเคมียังต้องมีการศึกษาและติดตามผลต่อไป

3) วิธีทางชีวภาพ

วิธีการทางชีวภาพเป็นวิธีการที่เกี่ยวข้องกับการใช้สิ่งมีชีวิตเพื่อย่อยสลายสารอันตรายที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม การฟื้นฟูทางชีวภาพในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่มีประสิทธิภาพ ประหยัด และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งประสิทธิภาพของวิธีการนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำมัน ลักษณะของดิน และองค์ประกอบของสารมลพิษ (Balba et al., 1998) เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้นพบในจุลินทรีย์ทุกกลุ่ม โดยจุลินทรีย์บางชนิดอาจมีความสามารถในการย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดขึ้นอยู่กับสภาพปรับตัว และการพัฒนาระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายเพื่อให้จุลินทรีย์ใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในปัจจุบันมีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมมาใช้กำจัดน้ำมันเครื่องยนต์ โดยมีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง ทนต่อสภาพแวดล้อม สามารถเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนมีจำนวนเพียงพอต่อการย่อยสลายโมเลกุลน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสภาพแวดล้อมได้ดี โดยอาศัยเทคโนโลยี และควบคุมโดยผู้เชี่ยวชาญ ทำให้ปราศจากจุลินทรีย์ก่อโรค ไม่เป็นพิษต่อ คน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์โดยจุลินทรีย์

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการต่างๆ เช่น การดูดซับกับดินหรือตะกอน การสลายตัวโดยแสง การระเหย การสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิต และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวที่เกิดขึ้นสามารถทำให้สารพิษที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมหายไปได้ส่วนหนึ่ง โดยเฉพาะในกลุ่มของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ แต่สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลสูงส่วนใหญ่จะถูกดูดซับไว้ในอนุภาคดินหรือตะกอนในดิน ซึ่งส่งผลให้เกิดการสะสมและเพิ่มความคงทนของสารพิษในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพการปรับตัวและระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ แต่สายพันธุ์ที่สามารถสร้างได้ โดยจุลินทรีย์จะใช้ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันเพื่อเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการดำรงชีวิต และทำการเปลี่ยนรูปของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลงได้ (สมศักดิ์วังใน, 2528) นอกจากนี้ วิชิตา เกตุใหม่ และคณะ (2553) ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ผลการศึกษาพบว่า สามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 36 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรีย 25 ไอโซเลต และยีสต์ 11 ไอโซเลต โดยยีสต์ไอโซเลต PO1.2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยา พบว่าโคโลนีของยีสต์ PO1.2 บนอาหาร YM agar มีลักษณะ สีขาวขุ่น ขอบเรียบ แบนราบ เมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางลำดับ ดีเอ็นเอด้วย 26S rDNA sequencing พบว่าใกล้เคียงกับเชื้อ *Issatchenkia orientalis* จากนั้นนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุดที่ 0.5% ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ร้อยละ 63.60

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างดินและแยกจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างดินจากอู่ซ่อมรถ 3 แหล่งตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม ราชบุรี และกาญจนบุรี ทำการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยเทคนิค 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 จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ใหม่ที่มี N-hexadecane 1% v/v บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำซ้ำเป็นจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นทำการคัดแยกจุลินทรีย์โดยวิธี Spread plate ทำโดยดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร Luria bertani (LB) medium ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญบนผิวหน้าอาหาร และคัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Streak plate จากนั้นเก็บรักษาเชื้อบนหลอดอาหารผิวเอียง (NA Slant) สำหรับใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

การระบุชนิดของจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

1) การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth (NB) บ่มแบบเขย่า ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเก็บเซลล์โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ล้างเซลล์ด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 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) นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) 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 จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA 12.0 (Tamura et al., 2021)

2) การระบุชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

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

การศึกษา Extracellular hydrolytic enzyme ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในการสร้างเอนไซม์ไลเปส

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Tween 80 agar ด้วยเทคนิค Point inoculation นำไปป้อมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตหากมีตะกอนขุ่นขาวที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนี แสดงว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยไขมันได้ (Sharma et al., 2001)

การศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้

นำจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการถ่ายจุลินทรีย์ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และมีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 0.5 เปอร์เซ็นต์, 1 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการทดลองทั้งหมด 4 ข้าง โดยการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ นำไปป้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการย่อยน้ำมันของเชื้อที่คัดแยกได้ โดยใช้วิธีชั่งหาน้ำหนักน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่หายไป (Weight loss method) โดยการสกัด Culture broth ด้วยเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 (Mercadé et al., 1996) และนำส่วนของตัวทำละลายมาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ชั่งน้ำหนักสารที่ได้ จากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Shairai et al., 1995)

ผลการวิจัย

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

งานวิจัยนี้ใช้อาหาร Nutrient agar (NA) ในการแยกจุลินทรีย์ที่ได้มาจากการเก็บตัวอย่างดินโดยวิธีการ Spread plate สามารถแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันจาก 3 แหล่งตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ได้จำนวน 8 ไอโซเลต

ตารางที่ 1 จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมัน

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ไอโซเลตที่	รหัสเชื้อ
ต.ทุ่งลูกนก อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	1	RS5-1
	2	RS5-2
	3	RS5-3
	4	RS5-4
ต.สนามแย้ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี	5	KS5-1
	6	KS5-2
ต.กรับใหญ่ อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	7	NS5-1
	8	NS5-2

จากผลการวิจัยการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่า สามารถแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งสิ้น 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

การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และระบุชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rRNA และ 18S rRNA กับลำดับเบสในฐานข้อมูล Ezbiocloud และ NCBI แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

รหัสเชื้อ	จุลินทรีย์สายพันธุ์ใกล้เคียง	ค่าความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)	ชนิดจุลินทรีย์
RS5-1	<i>Candida tropicalis</i> Y12 ^T (KT236445)	99.93	ยีสต์
RS5-2	<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i> IFO 14344 ^T (AB004715)	99.79	แบคทีเรีย
RS5-3	<i>Achromobacter veterisilvae</i> LMG 30378 ^T (LT976503)	99.45	แบคทีเรีย
RS5-4	<i>Tsukamurella inchoensis</i> DSM 44067 ^T (X85955)	99.86	แบคทีเรีย
KS5-1	<i>Microbacterium aurum</i> KACC 15219 ^T (CP018762)	99.58	แบคทีเรีย
KS5-2	<i>Kalmanozyma brasiliensis</i> GHG001 ^T (XR_001630179)	99.87	ยีสต์
NS5-1	<i>Brucella intermedia</i> LMG 3301 ^T (AB680967)	99.51	แบคทีเรีย
NS5-2	<i>Microbacterium paraoxydans</i> NBRC 103076 ^T (AJ491806)	99.72	แบคทีเรีย

จากผลการวิจัยการระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต RS5-2 มีความคล้ายคลึงกับ *Microbacterium arabinogalactanolyticum* ร้อยละ 99.79, ไอโซเลต RS5-3 มีความคล้ายคลึงกับ *Achromobacter veterisilvae* ร้อยละ 99.45, ไอโซเลต RS5-4 มีความคล้ายคลึงกับ *Tsukamurella inchoensis* ร้อยละ 99.86, ไอโซเลต KS5-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Microbacterium aurum* ร้อยละ 99.58, ไอโซเลต NS5-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Brucella intermedia* ร้อยละ 99.51 และไอโซเลต NS5-2 มีความคล้ายคลึงกับ *Microbacterium paraoxydans* ร้อยละ 99.72 นอกจากนี้พบยีสต์จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต RS5-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Candida tropicalis* ร้อยละ 99.93 และไอโซเลต KS5-2 มีความคล้ายคลึงกับ *Kalmanozyma brasiliensis* ร้อยละ 99.87

การศึกษา Extracellular hydrolytic enzyme ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการสร้างเอนไซม์ไลเปส

ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Tween 80 agar ด้วยเทคนิค Point inoculation ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ พบจุลินทรีย์ 6 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยเกิดตะกอนขาวขุ่นรอบๆ โคลนี แสดงผลการทดสอบได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

รหัสเชื้อ	ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส
RS5-1	++
RS5-2	-
RS5-3	++
RS5-4	++
KS5-1	-
KS5-2	+++
NS5-1	-
NS5-2	+

หมายเหตุ: เครื่องหมาย + แสดงความกว้างของตะกอนขาวขุ่น, เครื่องหมาย - ไม่เกิดตะกอนขาวขุ่น

จากผลการศึกษา Extracellular hydrolytic enzyme ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการสร้างเอนไซม์ไลเปส พบว่า ไอโซเลต KS5-2 แสดงความกว้างของตะกอนขาวขุ่นมากที่สุดในระดับ +++ ไอโซเลต RS5-1, RS5-3 และ RS5-4 แสดงความกว้างของตะกอนขาวขุ่นในระดับ ++ ไอโซเลต NS5-2 แสดงความกว้างของตะกอนขาวขุ่นน้อยที่สุดในระดับ + และไอโซเลต RS5-2, KS5-1 และ NS5-1 ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส

การศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมันจำนวน 5 ไอโซเลต มาศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมัน ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ความเข้มข้น		
	0.5%	1%	2%
Control	0.50±0.00a	1.00±0.00a	2.00±0.00a
RS5-1	0.32±0.06bc (35%)	0.70±0.15b (31%)	1.09±0.09d (46%)
RS5-3	0.38±0.10abc (24%)	0.64±0.11b (36%)	1.61±0.26b (19%)
RS5-4	0.38±0.10abc (23%)	0.74±0.06b (27%)	1.49±0.23bc (26%)
KS5-2	0.26±0.07c (48%)	0.36±0.09c (64%)	1.16±0.13d (42%)
NS5-2	0.42±0.03ab (15%)	0.88±0.04a (12%)	1.14±0.11d (43%)

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

จากผลการวิจัยการศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ พบว่า ความเข้มข้นของน้ำมัน 0.5% ไอโซเลต KS5-2 มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงที่สุดที่ 48%, ความเข้มข้นของน้ำมัน 1% ไอโซเลต KS5-2 มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงที่สุดที่ 64% และความเข้มข้นของน้ำมัน 2% ไอโซเลต RS5-1 มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงที่สุดที่ 46%

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการแยกจุลินทรีย์บริเวณดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจาก 3 แหล่งตัวอย่างสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 8 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรีย 6 ไอโซเลตและยีสต์ 2 ไอโซเลต เมื่อนำไอโซเลตทั้งหมดมาระบุชนิดของจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า จัดอยู่ใน 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 พบว่า จุลินทรีย์ทั้งหมด 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) พบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำมันร้อยละ 0.5 *Kalmanozyma brasiliensis* KS5-2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันสูงที่สุด ร้อยละ 48 และที่ความเข้มข้นของน้ำมัน ร้อยละ 1 *Kalmanozyma brasiliensis* KS5-2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันสูงที่สุด ร้อยละ 64 และที่ความเข้มข้นของน้ำมัน ร้อยละ 2 *Candida tropicalis* RS5-1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันสูงที่สุด ร้อยละ 46 ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของน้ำมันที่สูงส่งผลต่อความเป็นพิษแก่จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่ย่อยน้ำมัน ซึ่งจากผลการศึกษามีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Abioye et al. (2012) โดยศึกษาการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วโดยใช้ *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Trichosporon mucoides* และ *Candida tropicalis* พบว่า *Candida tropicalis* มีประสิทธิภาพในการย่อยได้ดีที่สุดในเวลา 28 วัน คิดเป็นร้อยละ 40.6 เนื่องจากความสามารถของยีสต์ในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นพิษของน้ำมันได้ดีกว่าแบคทีเรีย และยีสต์มีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายที่มีประสิทธิภาพกว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ นอกจากนี้ Mbachu et al. (2016) ทำการแยกเชื้อที่ปนเปื้อนในดินบริเวณอู่ซ่อมรถยนต์ พบจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Candida tropicalis*, *Rhodosporidium toruloids*, *Fusarium oxysporium* และ *Aspergillus clavatus* เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน พบว่า *Candida tropicalis* มีประสิทธิภาพการย่อยสลายมากกว่าร้อยละ 70 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงที่สุด จากผลการศึกษาสามารถนำจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงไปต่อยอดงานวิจัย และสามารถประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ซึ่งเป็นการแก้ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

- ชรรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์. (2533). น้ำมัน. กรุงเทพฯ: กองวิเคราะห์ผลกระทบทสิ่งแวดล้อม สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ.
- พิสุทธิ เพียรมนกุล. (2556, 1 สิงหาคม). แนวทางการบำบัดน้ำมันปนเปื้อนพื้นที่ชายฝั่ง (Shoreline Treatment). Chula Engineering. Retrieved from <https://www.eng.chula.ac.th/th/18201>.
- วิชุดา เกตุใหม่, เสาวภา แก้วสุกใส และ ลีชา แยนนา. (2553). การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ, 12(3), 202-213.
- ศิริรัตน์ บุญโสภณ. (2561). การขจัดคราบน้ำมันในทะเล. วารสารวิชาการโรงเรียนนายเรือ, 1(1), 59-67.
- สมศักดิ์ วังโน. (2528). จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. ไทยวัฒนาพานิชย์.
- Abioye, O. P., Aziz, A. R., & Agamuthu, P. (2012). Biodegradation of used lubricating oil by microbes isolated from Pristine soil environment. *Malaysian journal of science*, 31, 3-15.
- Balba, M. T., Al-Awadhi, N., & Al-Daher, R. (1998) Bioremediation of Oil-Contaminated Soil: Microbiological Methods for Feasibility Assessment and Field Evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 155-164.

- 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.
- 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.
- Leachy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Rev*, 54(3), 305-315.
- Mbachu, A. E., Chukwura, E. I., & Mbachu, N. A. (2016). Isolation and characterization of hydrocarbon degrading fungi from used (spent) engine oil polluted soil and their use for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation. *Universal Journal of Microbiology Research*, 4(1), 31-37.
- Mercadé, 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.
- Okubo, T., Ikeda, S., Yamashita, A., Terasawa, K., & Minamisawa, K. (2012). Pyrosequence read length of 16S rRNA gene affects phylogenetic assignment of plant-associated bacteria. *Microbes and environments*, 27(2), 204-208.
- 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.
- Rank, I. L., & Lawrence, I. (2013). Effects of crude oil spillage on soil physico-chemical properties in ugborodo community. *IJMER*, 3(6), 3336-3342.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19, 627-662.
- Shirai, K., Hanzawa, N., & Katusta, M. (1995). Heavy oil degrading bacteria isolated by long term enrichment in alumina columns containing heavy oil C. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 59, 2159-2161.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11.0. *Mol. Biol. Evol.* 38(7), 3022-3027.
- 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.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1613-1617.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2025 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).