การย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วด้วยแบคทีเรียที่แยกได้จากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

Biodegradation of used lubricating oil by bacteria isolated from the eastern coast of Thailand

อนันทญา แสนสวัสดิ์[1*], นิภาพร ก้านทอง[2]
Ananthaya Sansawat[1*], Nipaporn Kanthong[2]

Received: 23 January 2022; **Revised**: 8 April 2022; **Accepted**: 26 May 2022

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของแบคทีเรียที่แยกได้จากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ผลการศึกษาพบว่า สามารถแยกแบคทีเรียได้ จำนวน 315 ไอโซเลต มีแบคทีเรีย จำนวน 18 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้มากกว่า 80% ภายในระยะเวลา 7 วัน ประสิทธิภาพการย่อยสลายส่วนประกอบของมันหล่อลื่นใช้แล้วด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อแบบเดี่ยวและแบบผสม เป็นเวลา 14 วัน พบว่าการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแบบเดี่ยวของกลุ่มทดลอง *Pseudomonas* sp. TR-47.5 และแบบผสมของกลุ่มทดลอง Mixed 3 (*Pseudomonas* sp. CB-25.1, *Staphylococcus* sp. TR-46.6 และ *Pseudomonas* sp. TR-47.5) สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม glycerol, *n*-alkanes และ fatty acid ลดลงมากกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ในการศึกษานี้สรุปได้ว่า *Pseudomonas* sp. TR-47.5 และ Mixed 3 มีแนวโน้มที่ดีที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ในอนาคต

คำสำคัญ: การย่อยสลายทางชีวภาพ น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว กล้าเชื้อแบบเดี่ยว กล้าเชื้อแบบผสม

Abstract

The objective of this research was to study the biodegradation of used lubricating oil by bacteria isolated from the eastern coast of Thailand. Results showed that out of a total of 315 bacterial isolates, 18 bacterial isolates had the ability to degrade used lubricating oil by more than 80% over 7 days compared to control. The degradation efficiency of the components of used lubricating oil was tested with selected bacterial isolates as single and mixed cultures for 14 days. Results showed that *Pseudomonas* sp. TR-47.5 and Mixed 3 (*Pseudomonas* sp. CB-25.1, *Staphylococcus* sp. TR-46.6, and *Pseudomonas* sp. TR-47.5) had the ability to degrade glycerol, *n*-alkanes, and fatty acids more efficiently than the other treatments. In summary, *Pseudomonas* sp. TR-47.5 and Mixed 3 could be applied in the future for decontamination treatment of oil in environment.

Keywords: Biodegradation, Used lubricating oil, Single culture, Mixed cultures

[1] อาจารย์, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก จังหวัดชลบุรี 20110
[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก จังหวัดชลบุรี 20110a
[1] Lecturer, Department of Sciences and Mathematics, Faculty of Science and Technology Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Chonburi, 20110
[2] Assist. Prof., Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Chonburi, 20110
* Corresponding author: Ananthaya_sa@rmutto.ac.th

บทนำ

การปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (used lubricating oils) ในสิ่งแวดล้อมกำลังเป็นปัญหาที่สำคัญทั่วโลก เนื่องจากการพัฒนาของประเทศต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการสร้างเมือง การคมนาคม อุตสาหกรรม เกษตรกรรม ประมง และการท่องเที่ยว ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้ล้วนต้องใช้น้ำมันหล่อลื่นสำหรับเครื่องยนต์หรือเครื่องจักรทั้งสิ้น น้ำมันหล่อลื่นที่ถูกนำไปใช้แล้วนี้ส่วนหนึ่งจะมีการนำกลับไปใช้ใหม่ และอีกส่วนหนึ่งจะถูกนำไปกำจัด แต่พบว่าส่วนใหญ่เป็นการกำจัดที่ไม่ถูกวิธี เช่น การขุดหลุมฝัง การเผา หรือการปล่อยทิ้งลงดินหรือแหล่งน้ำ นอกจากนี้การปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วอาจเกิดจากการรั่วไหลระหว่างการขนส่งและรวบรวมได้ (Meeboon *et al.*, 2016; Kurnia *et al.*, 2018)

น้ำมันหล่อลื่นประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ชนิดอิ่มตัวสายยาว (C_{16}-C_{36}) มากกว่า 75% และสารเติมแต่ง 10-20% (Ibrahim, 2016) โดยส่วนใหญ่แล้วสารอินทรีย์ในน้ำมันพื้นฐานที่สำคัญ ได้แก่ สารประกอบโพลีนิวเคลียสอะโรมาติก (polynucleus aromatic, PNA) ส่วนสารเพิ่มคุณภาพ ได้แก่ สารต้านทานการกัดกร่อน สารช่วยการกระจายเขม่า และตะกอน ซึ่งจะมีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์ เช่น ไนโตรเจนและโลหะต่างๆ (พงษ์สิทธิ์ บุญรักษา, 2547) แต่เมื่อเกิดกระบวนการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ น้ำมันหล่อลื่นจะพบสารปนเปื้อนบางชนิดเพิ่มสูงขึ้น เช่น ตะกั่ว สังกะสี แบเรียม แมกนีเซียม อัลคิลเบนซีน แนฟทาลีน เมทิลแนฟทาลีน และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbons, PAHs) โดยน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วนี้จะมีปริมาณของ PAHs และโลหะหนักมากกว่าน้ำมันหล่อลื่นที่ยังไม่ได้ใช้ สารเหล่านี้เป็นสารก่อมะเร็งและมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตสูง (Salam, 2016; Parikh *et al.*, 2018) นอกจากนี้สารพิษเหล่านี้มีความคงทนต่อการย่อยสลายโดยกระบวนการทางธรรมชาติ ทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน (Gan *et al.*, 2009) การสัมผัสน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่ความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลานานจะก่อให้เกิดอันตรายต่ออวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไต และไขกระดูก รวมทั้งยังเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์มากขึ้นด้วย นับว่าน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเป็นภัยคุกคามที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และพืชพรรณเป็นอย่างมาก จึงต้องมีวิธีการกำจัดน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วนี้อย่างเหมาะสม เพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยตามบริเวณที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนน้ำมัน (Hussein and Khudhair, 2018)

วิธีการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น เก็บกวาดคราบน้ำมัน การเผา หรือการใช้สารเคมี ซึ่งวิธีการเหล่านี้สามารถกำจัดน้ำมันได้อย่างรวดเร็ว แต่มีค่าใช้จ่ายสูงและมักก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ตามมา เช่น การตกค้างของสารเคมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตบริเวณนั้น และมลภาวะทางอากาศ เป็นต้น การใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดน้ำมันเป็นวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) อีกวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการกำจัดน้ำมันเนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์ในธรรมชาติหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันได้ดี (Younus *et al.*, 2020) และจุลินทรีย์บางชนิดยังมีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้อีกด้วย ทั้งนี้ในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างโมเลกุลใหญ่และซับซ้อน ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เพราะบางสายพันธุ์อาจจะมีความสำคัญในช่วงแรกหรือช่วงหลังหรือตลอดระยะเวลาของการย่อยสลาย ทำให้โอกาสในการเปลี่ยนรูปหรือกำจัดสารเกิดขึ้นได้มากกว่าสิ่งแวดล้อมที่มีจุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียว เพราะในบางสภาวะแวดล้อมอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์นั้น จึงทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนรูปหรือการกำจัดสารต่างๆ ได้ (Anene and Chika, 2011) การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เกิดขึ้นได้สมบูรณ์จะให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งไม่เป็นอันตรายสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม มีรายงานก่อนหน้านี้ว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่แยกได้จากดินหรือน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันมีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพได้ดี ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas, Bacillus*, *Monococcus*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Rhodococcus* เป็นต้น (Sihag and Pathak, 2016; Salam, 2016; Obuotor *et al.*, 2016; Mahmood *et al.*, 2017; Sagheer *et al.*, 2017; Stephen *et al.*, 2020) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วจากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในการกำจัดน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม แหล่งนิคมอุตสาหกรรม ท่าเทียบเรือ และชุมชนต่างๆ สำหรับเป็นทางเลือกในการกำจัดน้ำมันที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและไม่ส่งผลผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยา

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำทะเล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทราย และโคลน ตัวอย่างละ 50 กรัม การเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บบริเวณชายฝั่งทะเล ท่าเทียบเรือ แหล่งนิคมอุตสาหกรรม และชุมชน ในจังหวัดฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด ในช่วงเวลาเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม 2558 ได้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 62 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างถูกเก็บใส่ในหลอดที่มีฝาปิดสนิท และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการทันที

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว

นำตัวอย่างน้ำทะเล 1% (v/v) ทรายหรือโคลน 1% (w/v) ใส่ลงในอาหาร Marine broth (Conda, Spain) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย ถ่ายเชื้อ 1% (v/v) ลงในอาหาร Bushnell Haas Broth (BHB) (Fluka, India) และเติมน้ำมันหล่อลื่นที่มีอายุการใช้งานมาแล้วมากกว่า 6 เดือน จากร้านซ่อมรถยนต์ในจังหวัดชลบุรี ในสัดส่วน 1% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm. เป็นเวลา 7 วัน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Basuki *et al.*, 2011) หลังจากนั้นทำการแยกแบคทีเรียบนอาหาร Marine agar ด้วยเทคนิค spread plate และคัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกัน นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของแบคทีเรียที่แยกได้

เลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหาร Marine broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัดการเจริญของเซลล์ให้ได้ค่า OD 600 nm เท่ากับ 1) ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย 1% (v/v) ลงในอาหาร BHB และเติมน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว 1% (v/v) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มเชื้อโดยการเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm. ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นแยกน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วโดยการใช้ hexane ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและใส่ในกรวยแยกสาร (Separatory funnel) ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (VARIAN Cary 50 Conc) คำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว (ดัดแปลงจากวิธีของ Rahman *et al.*, 2002 และ Kumar *et al.*, 2014) จากสมการ ดังนี้

$$\text{ร้อยละการย่อยสลายน้ำมัน} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{sample})}{Abs_{control}} \times 100$$

เมื่อ

$Abs_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วแต่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย

Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วและมีการเติมแบคทีเรีย

การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือก

ศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีแกรมของแบคทีเรียที่แยกได้ แล้วจึงคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่ดีที่สุด จำนวน 5 ไอโซเลต จำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ทำการเพิ่ม DNA ด้วยเทคนิค PCR ไพรเมอร์ที่ใช้คือ universal primers 27F และ 1492R จากนั้นทำการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีนช่วงนี้ โดยใช้ไพรเมอร์ 785F และ 907R (Macrogen Inc, Korea) นำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของแบคทีเรียที่คัดเลือกด้วย Gas chromatography–mass spectrometry

การศึกษาแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแบบเดี่ยว ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลต CB-18.3, CB-25.1, TR-46.6, TR-47.5 และ TR-48.3 และการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแบบผสม ได้แก่ Mixed 1 (TR-46.6 และ TR-47.5), Mixed 2 (CB-18.3, TR-46.6 และ TR- 48.3), Mixed 3 (CB-25.1, TR-46.6 และ TR-47.5) และ Mixed 4 (CB-18.3, CB-25.1, TR-46.6, TR-47.5 และ TR-48.3) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหาร Marine Broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัดการเจริญของเซลล์ให้ได้ค่า OD 600 nm เท่ากับ 1) เติมกล้าเชื้อจำนวน 1% (v/v) ตามกลุ่มทดลองลงในอาหาร BHB ที่มีน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว 1% (v/v) นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm. ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 14 วัน สกัดน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว โดยการละลายด้วย hexane 100 มิลลิลิตร และใส่ในกรวยแยกสาร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แยกน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว ด้วยเครื่อง Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) (Agilent Technologies: GC/6890N, MS/5973N) คอลัมน์ชนิด HP-5MS (30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร, I.D 0.25 ไมโครเมตร) สภาวะที่ใช้ในการฉีดสารแบบ split ใช้อัตราส่วนในการ split เป็น 30:1 อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของ injector และ detector เป็น 250 และ 300 °C ตามลำดับ โดยอุณหภูมิ เริ่มต้นที่ 100 °C คงไว้เป็นเวลา 5 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 300 °C ในอัตรา 5 °C ต่อนาที คงไว้ 5 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 310 °C ในอัตรา 2 °C ต่อนาที คงไว้เป็นเวลา 2 นาที ดัดแปลงจากวิธีการของ Kumar *et al.* (2014)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว

จากการแยกแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำทะเล ทราย และโคลน พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร BHB ที่มีน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว 1% (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอน จำนวน 315 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วมากกว่า 80% จำนวน 18 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายอยู่ที่ 81.77-90.47% และแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่สุดคือ TR-47.5 (Figure 1) โดยมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้ เช่น *P. aeruginosa* LP5 ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนปิโตรเลียมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วมากกว่า 90% ภายใน 21 วัน (Obayori *et al.*, 2014) *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอนมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว 81% ภายใน 28 วัน (Thenmozhi *et al.*, 2011) และ Hussein and Khudhair (2018) รายงานว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่น จำนวน 25 ไอโซเลต แต่มีเพียง 3 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้มากกว่า 70% อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันยังขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลาย เช่น ความชื้น พีเอช ออกซิเจน อุณหภูมิ และสารอาหาร (Coulon *et al.*, 2005)

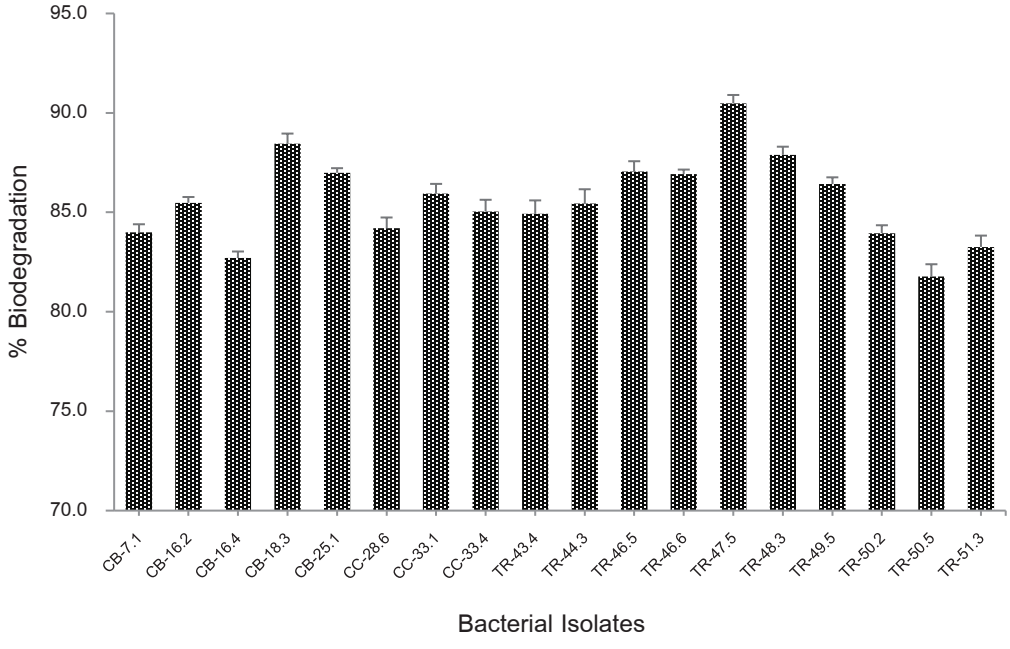

Figure 1 Biodegradation potential of the selected bacterial isolates. (n=3)

การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือก

จากการศึกษาลักษณะโคโลนี รูปร่าง การเรียงตัว การติดสีแกรมของแบคทีเรีย จำนวน 18 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วมากกว่า 80% พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน จำนวน 17 ไอโซเลต และมีเพียง 1 ไอโซเลต คือ TR-46.6 เป็นแบคทีเรียรูปแกรมบวกรูปกลม จึงคัดเลือกแบคทีเรีย จำนวน 5 ไอโซเลต คือ CB-18.3, CB-25.1, TR-46.6, TR-47.5 และ TR-48.3 มาจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย พบว่าไอโซเลต CB-18.3 มีความเหมือน *Pseudomonas mendocina ymp* 99% ไอโซเลต CB-25.1 มีความเหมือน *Pseudomonas mendocina ymp* 98% ไอโซเลต TR-46.6 มีความเหมือน *Staphylococcus hominis* strain BP3_2A 99% ไอโซเลต TR-47.5 มี *Pseudomonas mendocina* strain NCBI 10541 98% และไอโซเลต TR-48.3 มีความเหมือน *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain JCM 5968 98% จึงกำหนดเรียกชื่อแบคทีเรียใหม่ว่า *Pseudomonas* sp. CB-18.3, *Pseudomonas* sp. CB-25.1, *Staphylococcus* sp. TR-46.6, *Pseudomonas* sp. TR-47.5 และ *Pseudomonas* sp. TR-48.3 ตามลำดับ มีหลายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีแบคทีเรียหลายสกุลที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันปิโตรเลียม หรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ เช่น Kumar *et al.* (2014) รายงานว่า *Pseudoalteromonas* sp., *Ruegeria* sp., *Exiguobacterium* sp. และ *Acinetobacter* sp. แยกได้จาก

ตะกอนในอ่าวเบงกอลที่ระดับความลึก 2100 เมตร สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ และ Abdel-Megeed and Rudolf (2009) พบว่า *P. frederiksbergensis* แยกได้จากเกาะสปิตส์เบอร์เกน ประเทศนอร์เวย์ สามารถย่อยสลาย n-alkanes สายยาว (C_{10}-C_{22}) ที่อุณหภูมิ 4 °C และ 20 °C ได้เช่นกัน

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของแบคทีเรียที่คัดเลือกด้วย Gas chromatography–mass spectrometry

การศึกษาส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย พบว่ากลุ่มควบคุมมีส่วนประกอบของสารทั้งหมด 13 ชนิด ซึ่งเมื่อจัดกลุ่มแล้วได้ 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ glycerol ได้แก่ 1,2,3 – Propanetriol, monoacetate ($C_5H_{10}O_4$) และ 1,2,3 – Propanetriol, triacetate ($C_9H_{14}O_6$) กลุ่มที่ 2 คือ *n*-alkane ได้แก่ Heptadecane ($C_{17}H_{38}$), Docosane ($C_{22}H_{46}$), Hexadecane ($C_{16}H_{34}$), Octane ($C_{11}H_{24}$), Hexane ($C_{10}H_{22}$), Heneicosane ($C_{21}H_{44}$) และ Eicosane ($C_{20}H_{42}$) กลุ่มที่ 3 คือ aromatic hydrocarbon ได้แก่ 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-Phenol ($C_{14}H_{22}O$) และกลุ่มที่ 4 คือ fatty acid ได้แก่ Methyl 12-methyltetradecanoate ($C_{16}H_{32}O_2$) ส่วนประกอบในน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วจะอยู่ในรูปของ *n* -alkane มากที่สุดคือ 49.02%, glycerol 43.22%, aromatic hydrocarbon 5.03% และ fatty acid 2.71% มี retention time ตั้งแต่ 8.76 – 39.11 นาที (Table 1 และ Figure 2) แต่เมื่อศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วที่ถูกย่อยสลายด้วยกล้าเชื้อ *Pseudomonas* sp. TR-47.5 มีประสิทธิภาพดีที่สุดสามารถย่อยสลายได้ทั้งกลุ่ม glycerol, *n*-alkanes และ fatty acid เหลือสารเพียงกลุ่ม aromatic hydrocarbon คือ Phenol,2,4-bis (1,1-dimethylethyl)- ดัง Table 1 และ Figure 3 ที่ยังคงเหลือพีคที่ retention time 15.82 นาที และการใช้กล้าเชื้อ *Pseudomonas* sp. TR-48.3 สามารถย่อยสลายส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้ใกล้เคียงกัน คือสามารถย่อยสลายสารกลุ่ม glycerol, fatty acid และ *n*-alkanes อื่นๆ ยกเว้น Phenol,2,4-bis (1,1-dimethylethyl)- และ Eicosane (Table 1) ในขณะที่การใช้กล้าเชื้อ *Pseudomonas* sp. CB-18.3, *Pseudomonas* sp. CB-25.1 และ *Staphylococcus* sp. TR-46.6 พบว่าเหลือส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วหลายชนิดที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ (Table 1)

Table 1 Compounds of used lubricating oil by GC-MS analysis

Treatment	Peak	RT (min)	Area (%)	Name of Compounds
Control	1	8.76	24.61	1, 2, 3 – Propanetriol, monoacetate
	2	11.49	18.61	1, 2, 3 – Propanetriol, triacetate
	3	13.07	1.71	Heptadecane
	4	15.69	2.09	Docosane
	5	15.83	5.03	Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) -
	6	18.16	2.34	Docosane
	7	20.45	3.21	Heptadecane
	8	22.63	2.33	Hexadecane
	9	24.69	2.66	Octane, 2, 4, 6 – trimethyl -
	10	25.01	2.71	Tetradecanoic acid, 12-methyl-, methyl ester
	11	26.66	2.99	Hexane, 2, 2, 3, 3 – tetramethyl –
	12	28.53	4.40	Heneicosane
	13	39.11	27.29	Eicosane
Pseudomonas sp. CB-18.3	1	15.83	21.22	Phenol, bis (1, 1 – dimethylethyl) -
	2	39.12	62.39	Eicosane
	3	40.03	16.39	1, 3 – dimethyl – 4 - azaphenanthrene
Pseudomonas sp. CB-25.1	1	13.08	2.94	Docosane
	2	15.70	3.49	4 – Octanone
	3	15.83	14.32	Phenol, 2, 4 – bis (1, 1 –dimethylethyl) -
	4	20.46	5.23	Ether, heptyl hexyl
	5	24.71	6.74	Docosane
	6	26.66	5.99	10 – Methylnonadecane
	7	28.53	5.75	Pentatriacontane
	8	39.10	43.24	Eicosane
	9	43.03	12.31	N – ethyl – 1, 3 – dithioisoindoline

Table 1 Compounds of used lubricating oil by GC-MS analysis (cont.)

Treatment	Peak	RT (min)	Area (%)	Name of Compounds
Staphylococcus sp. TR-46.6	1	13.07	3.23	Docosane
	2	14.93	1.56	Ethanedial, dioxime
	3	15.69	3.92	Pentadecane
	4	15.83	10.89	Phenol, 2, 4 – bis (1, 1 – dimethylethyl) -
	5	18.15	3.85	Tetradecane
	6	20.46	5.95	Heptadecane
	7	22.63	4.55	Eicosane
	8	24.70	5.33	Nonadecane
	9	25.21	5.08	Hexadecanoic acid, methyl ester
	10	26.65	5.38	Pentacosane
	11	28.53	8.06	Triacontane
	12	39.10	32.15	Eicosane
	13	43.04	10.06	N – ethyl – 1, 3 – dithioisoindoline
Pseudomonas sp. TR-47.5	1	15.82	100	Phenol, 2, 4 – bis (1, 1 – dimethylethyl) -
Pseudomonas sp. TR-48.3	1	15.83	26.87	Phenol, 2, 4 – bis (1, 1 – dimethylethyl) -
	2	39.10	73.13	Eicosane
Mixed 1	1	15.83	27.65	Phenol, 2, 4 – bis (1, 1 – dimethylethyl) -
	2	39.08	72.35	Eicosane
Mixed 2	1	15.83	21.40	Phenol, 2, 4 – bis (1, 1 – dimethylethyl) -
	2	39.10	78.60	Eicosane
Mixed 3	1	15.82	100	Phenol, 2, 4 – bis (1, 1 – dimethylethyl) -
Mixed 4	1	15.83	27.05	Phenol, 2, 4 – bis (1, 1 – dimethylethyl) -
	2	39.11	45.38	Eicosane
	3	43.03	15.58	N – ethyl – 1, 3 – dithioisoindoline
	4	44.11	11.99	N – ethyl – 1, 3 – dithioisoindoline

เมื่อศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแบบผสม พบว่ากลุ่มทดลอง Mixed 3 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเหลือเพียง Phenol, 2, 4-bis (1, 1-dimethylethyl)- ได้ผลเช่นเดียวกับ *Pseudomonas* TR-47.5 (Table 1 และ Figure 4) ขณะที่กลุ่มทดลอง Mixed 1 และ Mixed 2 สามารถย่อยสลายส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเหลือ Phenol, 2, 4-bis (1, 1-dimethylethyl)- และ Eicosane ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ *Pseudomonas* TR-48.3 ยกเว้นกลุ่มทดลอง Mixed 4 ที่ยังพบ N-ethyl-1,3-dithioisoindoline ด้วย (Table 1)

จากผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว พบว่าการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม แบคทีเรียจะสามารถย่อยสลายสารในกลุ่มของ glycerol, n-alkanes และ fatty acid แต่จะไม่สามารถย่อยสลายสารในกลุ่มของ aromatic hydrocarbon หรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสายยาวได้ โดยปกติแล้วสารกลุ่ม n-alkanes ที่เป็นสายสั้นจะถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าสารกลุ่ม n-alkanes ที่เป็นสายยาว หรือแบบกิ่งหรือสารกลุ่ม aromatic hydrocarbons (Hasanuzzaman *et al.*, 2007) จากรายงานของ Basuki *et al.* (2011) เมื่อใช้แบคทีเรีย *Acinetobacter junii* TBC 1.2 ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสายสั้น ($\leq C_9$) และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสายยาว ($\geq C_{25}$) ลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรก แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลาย n-Octadecane ($C_{18}H_{38}$) และ *n*-Eicosane ($C_{20}H_{42}$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Obayori *et al.* (2014) พบว่า *P. aeruginosa* LP5 สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน C_{14}, C_{17}, C_{18} และ C_{21} ในน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้อย่างรวดเร็วภายใน 12 วัน แต่ในวันที่ 21 พบว่ามีปริมาณของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน C_{14}, C_{17}, C_{18} และ C_{21} เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโมเลกุลใหญ่คือ C_{19}, C_{22}, C_{23}, C_{24}, C_{25}, C_{26} และ C_{27} ไปเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหน่วยเล็กๆ นั่นเอง

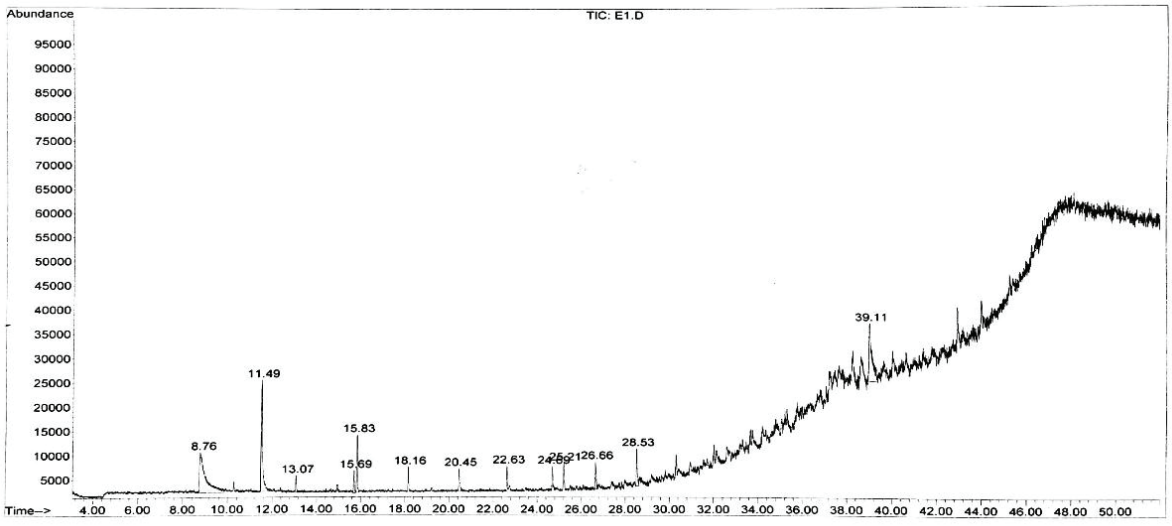

Figure 2 Chromatograms obtained by GC-MS analysis of used lubricating oil in the control of 14 days

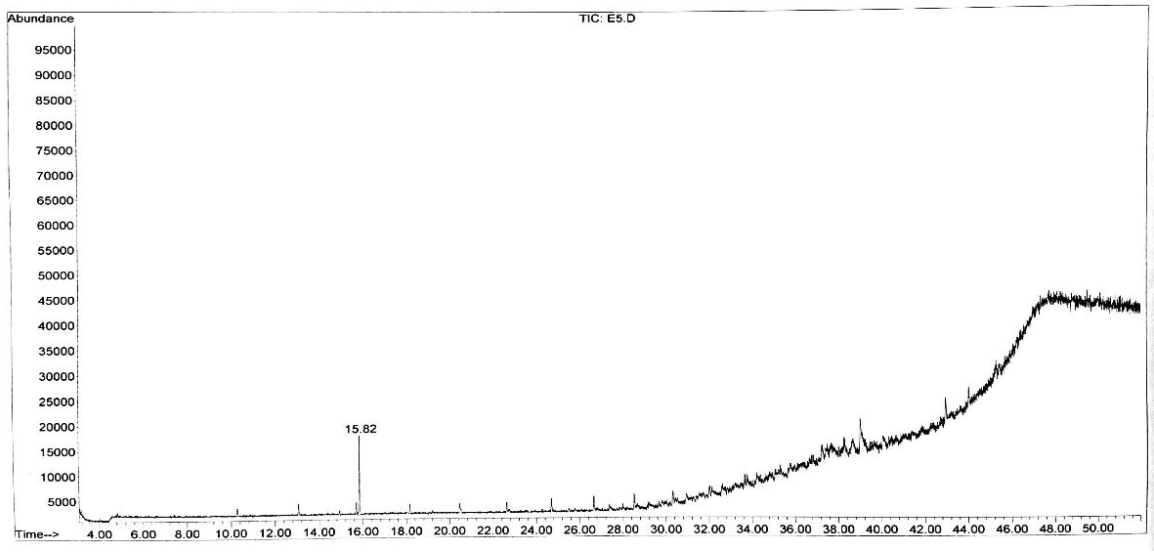

Figure 3 Chromatograms obtained by GC-MS analysis of biodegrading by *Pseudomonas* TR-47.5 of 14 days

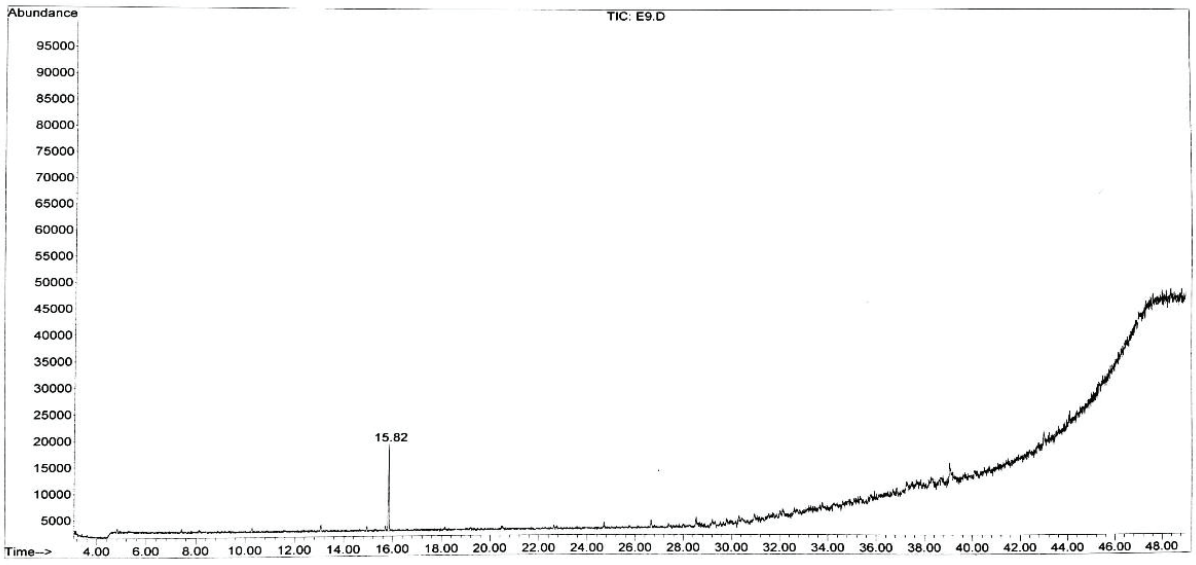

Figure 4 Chromatograms obtained by GC-MS analysis of biodegrading by Mixed 3 of 14 days

แบคทีเรียจะย่อยสลาย alkanes ที่มีคาร์บอนอะตอม C_{10} – C_{16} และ alkanes ที่มีคาร์บอนอะตอม C_{20} – C_{22} ได้เร็วกว่า alkanes ที่มีคาร์บอนอะตอม C_{32} – C_{40} ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย alkanes (Abdel-Megeed and Mueller, 2009) ถ้าแบคทีเรียมีความสามารถย่อยสลาย *n*-alkanes ได้หลากหลายแสดงว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีเอนไซม์ alkane hydroxylase มากกว่าหนึ่งชนิดเนื่องจากเอนไซม์ alkane hydroxylase ต้องมีความจำเพาะต่อช่วงความยาวของ alkanes ต่างกัน (Beilen *et al*., 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Gordomia* sp. สายพันธุ์ TY-5 สามารถย่อยสลาย propane ได้เป็น secondary alcohol ต่อมา secondary alcohol ถูกออกซิไดซ์เป็น ketone ด้วยเอนไซม์ Baeyer-Villiger monooxygenase ได้เป็น ester และ ester เข้าสู่ปฏิกิริยา hydroxylation ด้วยเอนไซม์ esterase ได้เป็น alcohol และ fatty acid ได้เช่นกัน (Kotani *et al*., 2007) ความสามารถในการย่อยสลายส่วนประกอบของน้ำมันจึงขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียเป็นหลัก ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลองที่มีการใช้กล้าเชื้อแบบเดี่ยวและแบบผสม พบว่า การใช้กล้าเชื้อแบบผสมทุกกลุ่มทดลองสามารถย่อยสลายส่วนประกอบของน้ำมันได้ดีกว่าการใช้กล้าเชื้อแบบเดี่ยวในบางกลุ่มทดลอง ซึ่งมีหลายการศึกษาที่พิสูจน์ว่าการใช้กล้าเชื้อแบบผสมจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายทางชีวภาพได้มากกว่า เนื่องจากเกิดการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์แต่ชนิด โดยที่จุลินทรีย์บางชนิดสามารถกำจัดสารพิษที่เป็นอันตรายต่อกิจกรรมของสายพันธุ์อื่นได้ จึงเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ จะสามารถย่อยสลายสารประกอบที่ซับซ้อนได้ทั้งหมด ดังนั้นในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพที่มีการใช้กล้าเชื้อแบบผสมจึงไม่จำเป็นต้องอาศัยความสามารถในการย่อยสลายส่วน ประกอบของน้ำมันได้ทั้งหมดของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ก็ได้ (Bagherzadeh-Namazi *et al*., 2008) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าในกลุ่มทดลองทั้งที่มีการใช้กล้าเชื้อแบบเดี่ยวและแบบผสมพบสารในกลุ่ม aromatic hydrocarbon คือ Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)- มีโครงสร้างเป็นแบบวงที่ทำให้เกิดการย่อยสลายได้ยากกว่า n-alkanes ที่มีลักษณะเป็นสายตรง สอดคล้องกับรายงานของ Roy *et al.* (2015) เมื่อใช้ *Nocardiopsis* VITSISB ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วพบสารหลายชนิด เช่น phenol, 3,5-bis (1,1-dimethylethyl)-, benzene, 1,3-bis (1,1-dimethylethyl), dibutyl phthalate ,2-tert-butyl-4,6-bis (3,5-di-tert-butyl-4 hydroxybenzyl) phenol และ dodecane, 1-fluoro ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม aromatic hydrocarbon เช่นกัน ดังนั้นในการกำจัดสารประกอบในกลุ่มที่กำจัดยากนี้จึงอาจต้องใช้วิธีการอื่นร่วมด้วย

สรุป

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วด้วยการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก พบว่า *Pseudomonas* TR-47.5 และ Mixed 3 ซึ่งประกอบด้วย *Pseudomonas* CB-25.1, *Staphylococcus* TR-46.6 และ *Pseudomonas* TR-47.5 มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบต่างๆ ที่พบได้ในน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้ดีกว่ากลุ่มอื่น โดยที่ทั้ง 2 กลุ่มทดลองสามารถย่อยสลายได้ทั้ง glycerol, *n*-alkanes และ fatty acid ยกเว้นสารในกลุ่ม aromatic hydrocarbon คือ Phenol,2,4-bis (1,1-dimethyl-ethyl)- ที่มีโครงสร้างเป็นแบบวงที่ทำให้เกิดการย่อยสลายได้ยาก ทั้งนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับสารอาหาร สภาวะแวดล้อม และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสาร aromatic hydrocarbon รวมทั้งการศึกษาการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียแต่ละชนิดในกลุ่มทดลอง Mixed 3 เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว สำหรับเป็นทางเลือกในการนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ปีงบประมาณ 2558-2559 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ สถานที่สำหรับทำการทดลอง และอำนวยความสะดวกในการวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

พงษ์สิทธิ์ บุญรักษา. (2547). ปัญหาน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วกับแนวทางการจัดการในประเทศไทย. *วารสาร มฉก. วิชาการ., 8(15),* 59-69.

Abdel-Megeed., A. and Mueller, R. (2009). Degradation of long chain alkanes by a newly Isolated *Pseudomonas frederiksbergesis* at low temperature. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability, 3(2),* 55-60.

Anene, M. and Chika, N. (2011). Studies on the bioutilization of some petroleum hydrocarbons by single and mixed cultures of some bacterial species. *Afr. J. Microbiol. Res., 5,* 1457-1466

Bagherzadeh-Namazi, A., shojaosadati, S.A. and Hashemi-Najafabadi, S. (2008). Biodegradation of used engine oil using mixed and isolated cultures. *Int. J. Environ Res., 2(4),* 431-440.

Basuki, W., Syahputra, K., Suryani, A.T. and Pradipta, I. (2011). Biodegradation of used engine oil by *Acinetobacter junii* TBC 1.2. *Indones. J. Biotechnol., 16,* 132-138.

Beilen, J.B.V., Smits, T.H.M., Whyte, L.G., Schorcht, S., Rothlisberger, M., Plaggemeier, T., Engesser, K.H., and Witholt, B. (2002). Alkane hydroxylase homologues in gram-positive strains. *Environ. Microbiol., 4(11),* 676-682

Coulon, F., Pelletier, E., Gourhant, L., and Delille, D. (2005). Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated Sub-Antarctic soil. *Chemosphere, 58,* 1439-1448.

Gan, S., Lau, E.V., and Ng, H.K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. Hazard. Mater., 172*, 532-549.

Hasanuzzaman, M., Ueno, A., Ito, Y., Yamamoto Y., Yumoto, I., and Okuyama, H. (2007). Degradation of long-chain n-alkanes (C36 and C40) by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. *Int. Biodeterior. Biodegradation, 1,* 40-43.

Hussein, A.A. and Khudhair, S.H. (2018). Biological treatment of used engine oil by single and mixed bacterial cultures isolated from soil of mechanic workshops. *J. Biotech Res. Center,* 12(1), 115-123

Kotani, T., Yurimoto, H., Kato, N. and Sakai, Y. (2007). Novel acetone metabolism in a propane-utilizing bacterium, *Gordonia* sp. Stain TY-5. *J. Bacteriol., 189,* 886-893.

Kumar, A.G., Vijayakumar, L., Joshi, G., Peter, D.M., Dharani, G., and Kirubaran, R. (2014). Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresour. Technol., 170,* 556-564.

Kurnia, D.R., Mangunwardoyo, W. and Ambarsari, H. Biodegrading of used lubricant oil hydrocarbons using *Bacillus subtilis* InaCC B289 and *Pseudomonas aeruginosa* InaCC B290 in single or mixed cultures. *The 8th Annual basic Science International Conference; 2018 Oct 17.*

Ibrahim, H.M.M. (2016). Biodegradation of used engine oil by novel strains of *Ochrobactrum anthropic* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil, *Biotech, 6:226,* 1-13

Meeboon, N., Kaewsuwan, S., Leigh, M.B. and Maneerat S. (2016). Assessment of the bacterial community of soils contaminated with used lubricating oil by PCR-DGGE, *Songklanakkarin J. Sci. Technol, 38(6),* 667-674

Mahmood, M.H., Yang, Z., Thanoon, R.D., Makky, E.A. and Rahim, M.H.A. (2017). Lipase production and optimization from bioremediation of disposed engine oil, *J. Chem. Pharm. Res., 9(6)*, 26-36

Obayori, O.S., Salam, L.B., and Ogunwumi, O.S. (2014). Biodegradation of fresh and used engine oils by *Pseudomonas aeruginosa* LP5. *J. bioremed. biodeg., 5(1),* 213-219.

Obuotor, T.M., sakariyau, A.O. and Bada, B.S. (2016). Enhanced biodegradation of spent engine oil contaminated soil using organic wastes, *App. Envi. Res., 38(3),* 27-38

Parikh, D.R., Tipre, D.R., Nayak, N.S. and Dave, S.R. (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

Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J. Lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I.M. (2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour. Technol., 85(3),* 257-261

Roy, S., Chandni, S., Das, I., Karthik, L., Kumar, G. and Rao, K.V.B. (2015). Aquatic model for engine oil degradation by rhamnolipid producing *Nocardiopsis* VITSISB, *Biotech, 5(2),* 153-164

Sagheer, A., Dobhal, S and Tomar, V. (2017). A comparative study of oil degradation with used and unused engine oil by microbes isolated from water sample of mechanic workshops, *Agri Res & Tech, 10(2),* 36-38

Salam, L.B. (2016). Metabolism of waste engine oil by *Pseudomonas* species, *Biotech, 6:98,* 1-10

Sihag, S. and Pathk, H. (2016). Biodegradation of 2T engine oil using soil microbe and gravimetric analysis., *Int. j. sci. eng. res., 7(2),* 1286-1294

Stephen, A.C., Uchendu, U.I., Mbagwu, C.F., Oji, E.C., Duruanyin, I.E. and Nwankwo, O.U. (2020). Assessment of spent motor oil degradation potential of some bacteria isolated from soil of Ohiya Mechanic Village Umuahia, Abia State*, j. environ. sci., toxicol. food technol.14(6),* 24-29

Thenmozhi, R., Nagasathya, A., and Thajuddin, N. (2011). Studies on biodegradation of used engine oil by consortium culture. *Adv. Environ. Biol., 5,* 1051-1057.

Younus, R.M., Aziz, E.M.T. and Mohammed, D.A. (2020). Degradation of hydrocarbon substances by some bacterial species isolated from contaminated soils with motor oil, *Eurasia. J. Biosci, 14,* 1087-1095.