

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมัน  
จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

ISOLATION OF FAT DEGRADABLE BACTERIA FROM  
WASTEWATER TREATMENT SYSTEM  
AT SCHOOL OF SCIENCE



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF FAT DEGRADABLE BACTERIA FROM  
WASTEWATER TREATMENT SYSTEM  
AT SCHOOL OF SCIENCE



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED




IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE BIOTECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ACADEMIC YEAR 2022  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมัน จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ Isolation of fat degradable bacteria from wastewater treatment system at School of Science
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนภัสวรรณ เฉลิมวัน รหัสนักศึกษา 62050502 นางสาวนันทริกานต์ บุญพินิจพงศ์ รหัสนักศึกษา 62050505
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วรกฤต วรรณนันทกิจ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.กานต์ วงศาธิยะ กรรมการ	
ดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิของคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมัน จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนภัสวรรณ เฉลิมวัน รหัสนักศึกษา 62050502 นางสาวนันทริกา นต์ บุญพินิจพงศ์ รหัสนักศึกษา 62050505
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา

### บทคัดย่อ

น้ำเสียที่มีปริมาณไขมันมากจะส่งผลให้เกิดการสะสมไขมันในระบบบำบัดน้ำเสียทำให้ท่ออุดตัน และลดประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จะทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมันและไขมันจากน้ำทิ้งจากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ โดยใช้ในอาหาร tributyrin agar และอาหาร phenol red oil agar จากนั้นคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เกิดโซนใสในอาหาร tributyrin agar และสามารถเปลี่ยนสีอาหาร phenol red oil agar จากสีแดงเป็นสีเหลือง พบว่าได้แบคทีเรียทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์ คือ A, B, C, D และ E เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างโซนใสในอาหาร tributyrin agar และการเปลี่ยนสีอาหาร phenol red oil agar พบว่าเชื้อแบคทีเรีย E ให้ความกว้างของโซนใสในอาหาร tributyrin agar มากที่สุด และสามารถเปลี่ยนสีอาหาร phenol red oil agar ได้ จึงนำแบคทีเรีย E มาทดสอบการย่อยสลายน้ำมันปาล์มและไขมันหมูร่วมกับ LAS พบว่า LAS ช่วยในการแตกตัวของหยดไขมันและลดการเกิดอิมัลชันที่ความเข้มข้นของไขมันสูงได้แต่อย่างไรก็ตาม LAS มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก เมื่อในอาหารไม่มีน้ำมันหรือไขมันอยู่

**คำสำคัญ :** การย่อยไขมันและน้ำมัน, การคัดแยกแบคทีเรีย, เอนไซม์ไลเปส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Isolation of fat degradable bacteria from wastewater treatment system at School of Science
<b>Students</b>	Miss Napassawan Chaloeamwan Student ID 62050502 Miss Nanpharikan Bunphinitphong Student ID 62050505
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (BIOTECHNOLOGY)
<b>School</b>	Science
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
<b>Academic Year</b>	2022
<b>Advisor</b>	Dr.Nilnate Assavasirijinda

### Abstract

Wastewater with high fat content will be resulting in the accumulation of fat in the wastewater treatment system, clogged pipes and reduce the efficiency of wastewater treatment. Therefore, this special project will isolate microorganisms with ability of oils and fats degradation from effluent at the Faculty of Science cafeteria by using tributyrin agar medium and phenol red oil agar medium. The microorganisms that formed clear zones on tributyrin agar medium and able to change the color of phenol red oil agar medium from red to yellow will be selected. Five strains of bacteria were isolated, and named as A, B, C, D and E. The clear zones on tributyrin agar medium and changed colour on phenol red oil agar medium were compared. It was found that E isolate gave the largest clear zone width on tributyrin agar medium and were able to change color on phenol red oil agar medium. E isolate were selected and tested their palm oil and lard degraded ability with linear alkylbenzene sulphonate (LAS). In palm oil and fat drgradation test, LAS was added and compared with medium without LAS. The results showed that, LAS can improve lipid breakdown and reduce emulsion in high – fat concentration medium. However, LAS also causes cell lysis when added to the medium with no fat.

**Keywords :** fat and oil degradable, bacterial isolation, lipase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันจากระบบบำบัดน้ำเสียโรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ ดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา ที่ได้ให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงแก้ไขรวมถึงตรวจสอบ การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คณะผู้จัดทำจึงขอขอบพระคุณ เป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณคณะอาจารย์ทุกท่านใน ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับความรู้ที่ได้มอบให้ ตลอดระยะเวลาการศึกษา รวมถึงผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ทำนุนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนการทำโครงการการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันจากระบบบำบัดน้ำเสีย โรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ให้สำเร็จโดยสมบูรณ์และขอขอบคุณมิตรภาพจากทุก ๆ คนที่ได้มอบให้ ตลอดระยะเวลาการศึกษาในหลักสูตรนี้

นภัสวรรณ เฉลิมวัน  
นันทริกันต์ บุญพินิจพงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ที่มาของโครงการพิเศษและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	1
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>2</b>
2.1 การบำบัดน้ำเสีย.....	2
2.1.1 การบำบัดทางกายภาพ (Physical Treatment).....	2
2.1.2 การบำบัดทางเคมี (Chemical Treatment).....	2
2.1.3 ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological Treatment).....	2
2.1.4 กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic wastewater treatment).....	2
2.1.5 กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic wastewater treatment).....	2
2.2 เอนไซม์ไลเปส.....	2
2.3 แหล่งของไลเปส.....	3
2.3.1 ไลเปสจากสัตว์.....	3
2.3.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช.....	3
2.3.3 ไลเปสจากจุลินทรีย์.....	3
2.3.4 ไลเปสจากเชื้อราและยีสต์.....	3
2.4 ไชมันและน้ำมัน.....	4
2.4.1 กรดไขมัน.....	4
2.4.2 ไตรกลีเซอไรด์.....	4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 2.5 สารละลายอัลคิลเชิงเส้นของเบนซีนซัลโฟเนต  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
(Linear Alkyl Benzene Sulfonate, LAS).....	4
2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ .....	4
2.6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็ง (solid media หรือ nutrient agar).....	5
2.6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่บอกความแตกต่าง (Differential medium) .....	5
2.7 การย้อมแกรม (gram staining).....	5
2.7.1 การย้อมสีด้วยคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet).....	6
2.7.2 สารละลายไอโอดีน.....	6
2.7.3 แอลกอฮอล์ 95% .....	6
2.7.4 สารละลายซสฟรานิน .....	6
2.8 แบคทีเรียในระบบน้ำเสีย.....	6
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.9.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ย่อยไขมัน .....	6
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....</b>	<b>10</b>
3.1 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว .....	10
3.2 เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์.....	11
3.3 สารเคมี.....	11
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	12
3.5 บัพเฟอร์ .....	12
3.6 การแยกคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมัน .....	12
3.6.1 การเตรียมอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง.....	12
3.6.2 การเก็บตัวอย่างเชื้อจากบ่อบำบัดไขมันและรางน้ำทิ้งจากโรงอาหารคณะ ..	12
วิทยาศาสตร์.....	12
3.7 ทดสอบการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์และการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย .....	12
3.7.1 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย .....	12
3.7.2 ทดสอบการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ของแบคทีเรีย.....	13
3.8 ทดสอบการย่อยสลายไขมันในห้องปฏิบัติการ.....	13
3.8.1 การเตรียมอาหารเหลวเพื่อทดสอบการย่อยสลายไขมัน .....	13
3.8.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย E .....	13
3.8.3 ทดสอบการย่อยสลายไขมัน .....	13
3.9 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (Fat Oil and Grease;FOG) โดยวิธีกรวยแยก ....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 3.10 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ E. coli ในน้ำปัสสาวะโดยใช้ประโยชน์ได้ 14 คำ

ไม่ว่าการ **บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล** และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรณีไป 15

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมันและนำมันจากท่อน้ำทิ้งและบ่อดักไขมัน .. ของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ .....	15
<b>หน้า</b>	
4.2 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย.....	17
4.3 การทดสอบการย่อยสลายไขมันในห้องปฏิบัติการ .....	18
4.4 การเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์ E.....	20
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>22</b>
เอกสารอ้างอิง .....	23
ภาคผนวก.....	27
ภาคผนวก ก.....	28
ภาคผนวก ข.....	29
ภาคผนวก ค.....	30



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 จำนวนสายพันธุ์ที่เปลี่ยนอาหาร Phenol red oil agar จากสีแดงเป็นสีเหลือง .....	15
4.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายของภาพ 1000 เท่า .....	16
4.3 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหาร Tributyrin agar และการย่อยไตรกลีเซอไรด์ในอาหาร Phenol red oil agar.....	18
4.4 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB เพื่อทดสอบการย่อยไขมันหมูและน้ำมันปาล์ม ก่อนป่มและหลังป่ม .....	20



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
4.1 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย E ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร .....	21



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาของโครงการพิเศษและความสำคัญของปัญหา

น้ำเสียจากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ส่งผลให้มีไขมันและน้ำมันลอยอยู่บนผิวน้ำเสียในปริมาณมาก ทำให้เกิดการกีดขวางการถ่ายเทของออกซิเจนส่งผลให้ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียของระบบบำบัดน้ำเสียต่ำลง การบำบัดน้ำเสียมีหลายวิธี เช่น วิธีทางเคมีคือการใช้สารเคมีบำบัด เช่น การเติม Sodium Hydroxide วิธีทางกายภาพโดยการใช้บ่อดักไขมัน และวิธีทางชีวภาพคือใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยไขมันมาช่วยในการบำบัดน้ำเสีย การใช้จุลินทรีย์นั้น มีต้นทุนต่ำ มีประสิทธิภาพ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จะมีความสามารถในการย่อยไขมันได้ เช่น *Candida maltose*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.* และ *Bacillus subtilis* โดยงานวิจัยนี้จะทำการคัดแยกแบคทีเรียในน้ำเสียที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมันและไขมันเพื่อนำมาศึกษากระบวนการย่อยน้ำมัน และไขมันเพื่อพัฒนาไปใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียในโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สจล.

### 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลาย FOG
2. ตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไลเปส
3. ทดสอบการย่อยสลายไขมันในห้องปฏิบัติการ

### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันในน้ำเสีย โดยคัดแยกเชื้อจากบ่อบำบัดไขมันของโรงอาหารและตัวอย่างเชื้อบำบัดน้ำเสียทางการค้า เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน หลังจากนั้นนำมาทดสอบการย่อยไขมัน และไตรกลีเซอไรด์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin (Prasanth Kumar and Valsa, 2007) และอาหารที่ดัดแปลงมาจาก phenol red olive oil agar (Lee et al., 2015) โดยการเติมไขมันสัตว์หรือน้ำมันปาล์มแทนน้ำมันมะกอก จากนั้นคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยไขมันได้ดีที่สุดและนำมาทดสอบการย่อยไขมันร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวทางการค้า

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยไขมันได้
2. ข้อมูลเบื้องต้นของการย่อยสลายไขมันจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในระดับห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 การบำบัดน้ำเสีย

การเลือกระบบบำบัดน้ำเสียขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ลักษณะน้ำเสีย ระดับการบำบัดน้ำเสียที่ต้องการ ลักษณะของบริเวณพื้นที่ที่ต้องการบำบัด ค่าดำเนินการดูแลและบำรุงรักษา (นลิน, 2548)

#### 2.1.1 การบำบัดทางกายภาพ (Physical Treatment)

วิธีแยกเอาสิ่งเจือปนออกจากน้ำเสีย เช่น เศษอาหาร ไขมันและน้ำมัน พลาสติก ทราญ โดยใช้อุปกรณ์ในการบำบัดทางกายภาพ คือ ถังดักไขมันและน้ำมัน ตะแกรงดักขยะ ถังดักกรวดทราญ ถังดักตะกอน อุปกรณ์เหล่านี้จะลดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่มีในน้ำเสียเป็นหลัก (นลิน, 2548)

#### 2.1.2 การบำบัดทางเคมี (Chemical Treatment)

วิธีนี้จะใช้กระบวนการทางเคมีเพื่อทำปฏิกิริยากับสิ่งเจือปนในน้ำเสีย จะใช้วิธีนี้ในการบำบัดเมื่อน้ำเสียมีส่วนประกอบคือ มีไขมันและน้ำมันที่ละลายน้ำ มีไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสสูงเกินไป มีเชื้อโรค ค่าพีเอชสูงหรือต่ำเกินไป มีสารพิษ มีโลหะหนัก และมีของแข็งแขวนลอยที่ตกตะกอนยาก อุปกรณ์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียทางเคมี คือ ถังกวนเร็ว ถังกวนช้า ถังตกตะกอน ถังกรอง และถังฆ่าเชื้อโรค (นลิน, 2548)

#### 2.1.3 ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological Treatment)

สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ตามชนิดของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ได้แก่ การบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (aerobic wastewater treatment) และการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ หรือไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic wastewater treatment) (สิริรัตน์ และปราโมช, 2548)

#### 2.1.4 กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (Aerobic wastewater treatment)

เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องอาศัยออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) หรือ ออกซิเจนอิสระ ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (สิริรัตน์ และปราโมช, 2548)

#### 2.1.5 กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ (Anaerobic wastewater treatment)

เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยจุลินทรีย์จะอาศัยสารประกอบอื่นเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนละลายน้ำ (สิริรัตน์ และปราโมช, 2548)

### 2.2 เอนไซม์ไลเปส

ไลเปส (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ปล่อยกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลออกมา (Adetunji and Olaniran, 2018; Amenaghawon et al., 2022) ไลเปสกระตุ้นปฏิกิริยาที่สร้างเอสเทอร์จากกลีเซอรอลและกรดไขมัน กรดไขมันอิสระเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดูดซับไขมันและไขมันที่ติดกับของแข็งในน้ำเสีย ทำให้ไขมันเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Amenaghawon et al., 2022) ไลเปสยังช่วยในการย่อยสลายไขมันที่ติดกับของแข็งในน้ำเสีย ทำให้ไขมันเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Amenaghawon et al., 2022) ไลเปสยังช่วยในการย่อยสลายไขมันที่ติดกับของแข็งในน้ำเสีย ทำให้ไขมันเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Amenaghawon et al., 2022)

ไขมันสายยาว เช่น esterification, interesterification, transesterification และ alcoholysis (Gurkok and Ozdal, 2021)

## 2.3 แหล่งของไลเปส

แหล่งของไลเปสพบได้ทั้งใน สัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ ยีสต์ รา และ แบคทีเรีย (Bharathi and Rajalakshmi, 2019)

### 2.3.1 ไลเปสจากสัตว์

เอนไซม์ไลเปสมีอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆของสัตว์ เช่น หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ ซีรัม และที่สำคัญ คือ ตับอ่อน นอกจากนี้ ยังมีการแยกเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของ หนู โค และ กระบือ (สุรอรทด และคณะ, มปป.)

### 2.3.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช

ไลเปสจากพืชมีความจำเพาะต่อสับสเตรตสูงและมีสมบัติเฉพาะ ซึ่งจะไม่พบในไลเปสจากสัตว์ เลี้ยง ลูกด้วยน้ำมันและจุลินทรีย์ (Huang et al., 1988) ผลปาล์มน้ำมัน เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดดอกทานตะวัน มะกอก ผ้าย ข้าวสาลี ละหุ่ง และข้าวเจ้า เป็นแหล่งสำคัญของไลเปส โดยธรรมชาติเมล็ดพืชจะสะสมไขมันไว้ใน lipid-bodies และ glyoxysomes อันเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถพบไลเปสด้วย ขณะที่ไลเปส ของเมล็ดธัญพืช พบได้ในรำ เช่น รำข้าวสาลี และ รำข้าวเจ้า โดยไลเปสที่ได้จากเมล็ดละหุ่งได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ จะอยู่ในช่วงที่เป็นกรด (Shahani, 1975)

### 2.3.3 ไลเปสจากจุลินทรีย์

ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าไลเปสที่ได้จากพืช และจากสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เติบโตได้รวดเร็ว และเลี้ยงง่ายกว่า พืช และสัตว์ ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วย เช่น *Rhizopus oryzae* และ *Cryptococcus sp. S-2* จะผลิตไลเปสที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (Kamini et al., 2000) *Mucor hiemalis f. hiemalis* จะผลิตไลเปสที่ทำงานในสภาวะที่เป็นกลาง *Aspergillus nidulans* (Hiol et al., 1999) จะผลิตไลเปสที่ทำงานในสภาวะที่เป็นกรด (Mayordomo et al., 2000)

### 2.3.4 ไลเปสจากเชื้อราและยีสต์

ไลเปสที่ใช้กันแพร่หลายในทางการค้าส่วนใหญ่ได้จากเชื้อรา ได้แก่ *Mucor javanicus*, *Humicola lauginoso*, *Rhizopus sp.*, *Geotrichum sp.* และ *Aspergillus sp.* และยีสต์ ได้แก่ *Candida lipolytica*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa* และ *Candida cylindracea* เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแหล่งนี้มักนิยมใช้ในการ Resolution ของ Secondary alcohol esters (ณกัญภัทร, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 ไขมันและน้ำมัน

ไขมันและน้ำมัน เป็นส่วนประกอบที่เกี่ยวข้องในน้ำเสียจากครัวเรือนและอุตสาหกรรมอาหาร ส่งผลให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งไขมันและน้ำมัน จะสร้างชั้นลอยตามธรรมชาติหรือหน้ากากผิวที่หยุดการแพร่กระจายของออกซิเจนจากอากาศสู่น้ำ ซึ่งจะลดประสิทธิภาพของปฏิกิริยาการใช้ ออกซิเจนในระหว่างการบำบัดทางชีวภาพและส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชน้ำและ สิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Kachiang'a and Momba, 2015)

### 2.4.1 กรดไขมัน

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่ปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิลปลายอีกข้างหนึ่งมีลักษณะเป็น สายโซ่ยาวของไฮโดรคาร์บอนไม่มีขั้ว ทำให้กรดไขมันไม่ละลายน้ำในธรรมชาติ กรดไขมันมีจำนวน คาร์บอนเป็นเลขคู่ และเป็นสายโซ่ยาวที่อิมตัวหรือไม่อิมตัว กรดไขมันที่พบในพืชและสัตว์จะมีจำนวน คาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ อยู่ระหว่าง 14-22 อะตอม โดยเฉพาะคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 16 และ 18 พบได้มากที่สุดกรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวๆ ( $C_{16}$ - $C_{18}$ ) ละลายน้ำไม่ได้ แต่เกลือของมันสามารถสร้าง ไมเซลล์ในน้ำได้และไมเซลล์สามารถรวมอยู่ได้ด้วยปฏิกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (อาภัสสร, 2537)

### 2.4.2 ไตรกลีเซอไรด์

ไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน 3 โมเลกุล และ กลีเซอรอล 1 โมเลกุล ในน้ำมันพืชไตรกลีเซอไรด์ตามธรรมชาติจะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ที่อุณหภูมิห้องจะมีสถานะเป็นของเหลว ซึ่งต่างจากไขมันจากสัตว์ ที่จะประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว สูง และจะมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง (ดุขภู, 2549)

## 2.5 สารละลายอัลคิลเชิงเส้นของเบนซีนซัลโฟเนต (Linear Alkyl Benzene Sulfonate, LAS)

สารละลายอัลคิลเชิงเส้นของเบนซีนซัลโฟเนต (Linear Alkyl Benzene Sulfonate, LAS) ถูก นำมาใช้เพื่อลดแรงตึงผิวของน้ำมันดิบ เนื่องจากคุณสมบัติที่เหมาะสมของสารชนิดนี้คือ สามารถช่วย ลดแรงตึงผิวของคราบน้ำมันละลายน้ำ ได้ราคาถูกและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (อัษฎพรค์, 2555) และ จากการศึกษาของ Alina (2014) ความเข้มข้น LAS มีผลต่อการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของ จุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น LAS

## 2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีส่วนประกอบของสารอาหารที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญและแบ่งเซลล์เพิ่ม จำนวนโดยจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน มีความต้องการสารอาหาร ตลอดจนสภาพความเป็นกรดต่าง (pH) ของอาหารแตกต่างกัน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานทางจุลชีววิทยามีหลายลักษณะ จุลินทรีย์แต่ละชนิด มีความต้องการธาตุอาหาร ตลอดจน pH ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจึงต่างกันไป เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามความต้องการของจุลินทรีย์และวัตถุประสงค์ของการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานทางจุลชีววิทยา (เนียรวรรณ, 2560)

### 2.6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็ง (solid media หรือ nutrient agar)

อาหารแข็ง (Solid medium) โดยการเติมวุ้น 1.5–2.0% เป็นตัวทำให้แข็ง ถ้าอาหารแข็งบรรจุในหลอดทดสอบและทำให้แข็งในลักษณะที่เอียงเป็นแนวลาด เรียก Slant agar แต่ถ้าแข็งในลักษณะหลอดทดลองตั้งตรงเรียก Agar deep tube แต่ถ้าบรรจุในงานเพาะเชื้อ (Petri dish) เรียก Agar plate (เนียรวรรณ, 2560)

### 2.6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่บอกความแตกต่าง (Differential medium)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกชนิดของจุลินทรีย์ โดยอาศัยลักษณะที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์ เมื่อเจริญบนอาหารที่มีอินดิเคเตอร์ (Indicator) เช่น การใช้อาหารวุ้นที่เติมเลือด (Blood agar medium) ในการแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Haemolysis) แบคทีเรียที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จะเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนี อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม Selective / Differential medium เช่น Mac Conkey Agar เป็นอาหารที่ใช้แยกแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในลำไส้โดยใส่สเตรปโตค็อกคัสและมีการเติมเกลือน้ำดี (Bile salt) เป็นสารคัดเลือก (Selective agent) โดยเกลือน้ำดีมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) เช่น *Escherichia coli*, *Emerobacier sp.*, *Salmonella sp.* และ *Proteus sp.* อีกทั้งมีน้ำตาลกาแลกโตส และ นิวทรีล เรด (Neutral red) ในอาหารเป็นอินดิเคเตอร์บอกความแตกต่าง (Differential agent) ของจุลินทรีย์แกรมลบที่คัดเลือกได้ ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลกาแลกโตสได้โคโลนีจะเป็นสีแดงเช่น *E. coli* ในขณะที่ *Salmonella sp.* ขาดความสามารถใช้น้ำตาลกาแลกโตส โคโลนีจะเป็นสีขาว (เนียรวรรณ, 2560)

## 2.7 การย้อมแกรม (Gram staining)

การย้อมสีแบคทีเรีย (Gram stain) เป็นวิธีที่สำคัญในศึกษาและจำแนกแบคทีเรียเป็น 2 กลุ่มจากความแตกต่างของโครงสร้างของผนังเซลล์ คือ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และ แบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) การย้อมสีแบคทีเรียแบบแกรมนี้นี้เป็นการย้อมสีโดยที่ตัวเซลล์จะติดสี และการย้อมแบบใช้สีมากกว่า 1 ชนิด หรือใช้สารอื่นร่วมด้วยในการย้อมเรียกว่า differential stain โดย Gram negative เป็นแบคทีเรียที่มีสารเปปติโดไกลแคนเคลือบอยู่บนผิวแบบบางๆ จึงถูกล้างออกได้ง่ายโดยแอลกอฮอล์ ดังนั้นสีที่ย้อมเซลล์จึงหลุดออกมาด้วยทำให้ผนังเซลล์ติดสีชมพู แบคทีเรียกลุ่ม Gram positive มีเปปติโดไกลแคนเคลือบอยู่บนผิวหนามากล้างออกไม่ได้ด้วยแอลกอฮอล์เซลล์จึงติดสีม่วงเข้มของสารย้อมไอโอดีนคอมเพล็กซ์ (อัญชิษฐา, 2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.7.1 การย้อมสีด้วยคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)

การย้อมสีแกรมในขั้นแรกย้อมรอยเกลี่ยเชื้อ (smear) ด้วยสี crystal violet เซลล์แบคทีเรียทุกเซลล์บนรอยเกลี่ยเชื้อ จะติดสีน้ำเงินหรือม่วง เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังหนา จึงติดสี crystal violet ได้ดี (ปราโมทย์, 2545)

### 2.7.2 สารละลายไอโอดีน

เมื่อเติมสารละลายไอโอดีนลงไปจะรวมกับสี crystal violet กลายเป็นผลึกที่มีโครงสร้างซับซ้อน (crystal violet-iodine complex) ทำให้สีติดดียิ่งขึ้น (ปราโมทย์, 2545)

### 2.7.3 แอลกอฮอล์ 95%

แอลกอฮอล์ 95% จะทำให้ชั้นเพปทิโดไกลแคนขาดน้ำจึงหดตัว ทำให้คริสตัลไวโอเลตและไอโอดีนโมเลกุลขนาดใหญ่ผ่านออกนอกเซลล์ไม่ได้ จึงทำให้แบคทีเรียแกรมบวกติดสีม่วง แต่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบเสื่อมสภาพทำให้ชั้นเพปทิโดไกลแคนบางลงคริสตัลไวโอเลตและไอโอดีนสามารถผ่านออกไปนอกเซลล์ (Monica Z. Bruckner, 2021)

### 2.7.4 สารละลายซาฟรานิน

เมื่อเติมซาฟรานินในตัวอย่างแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน เนื่องจากซาฟรานินมีโมเลกุลเบากว่าคริสตัลไวโอเลต จึงไม่รบกวนการติดสีม่วงในแกรมบวก (Monica Z. Bruckner, 2021)

## 2.8 แบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียมี 2 ชนิด คือ แบคทีเรียที่ใช้อากาศ และแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ แบคทีเรียใช้อากาศในการบำบัดน้ำเสียจะถ่ายเทอากาศเพื่อให้แบคทีเรียใช้ออกซิเจนเพื่อย่อยสลายมลพิษในน้ำเสียเปลี่ยนเป็นพลังงานในการเจริญ และขยายพันธุ์ แบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศในการบำบัดน้ำเสียมีประโยชน์ในการลดปริมาณตะกอน ผลิตภัณฑ์เทน โดยจะสามารถนำก๊าซมีเทนมาเป็นแหล่งพลังงานทดแทนได้ และแบคทีเรียสามารถกำจัดฟอสฟอรัสออกจากน้ำเสียโดยไม่ต้องเติมอากาศ (AOS Treatment Solutions ,2018)

## 2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.9.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ย่อยไขมัน

ประสาธน์ โพธิ์น่วมแดง (2560) ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อดักไขมันของโรงอาหารและโรงงานแปรรูปเนื้อสุกรมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงและนำมาทดสอบประสิทธิภาพในขบวนการปฏิบัติการแบบไร้อากาศ พบว่าบ่อดักไขมันในโรงอาหารมีการกระจายตัวของแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมันนั้นน้อยกว่าบ่อดักไขมันในโรงงานแปรรูปเนื้อสุกร โดยแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมันนั้นเมื่อนำมาเลี้ยงใน Tributyrin agar นั้นจะมีวงใสขนาด 3.05-13.18 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บำบัดที่ความเข้มข้นของไขมันปานกลางที่ระยะเวลา 5 วัน โดยใช้ชุดเติมหัวเชื้อ FT049 ชุดเติมแบคทีเรียรวม ชุดเติม Lypo-Ex และชุดควบคุมพบว่าประสิทธิภาพการบำบัดเฉลี่ยมีค่าเท่ากับร้อยละ 69.78, 66.06, 64.24 และ 25.94 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของไขมันสูง ชุดเติมหัวเชื้อ FT049 ชุดเติมแบคทีเรียรวม ชุดเติม Lypo-Ex และชุดควบคุม มีประสิทธิภาพการบำบัดเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 44.87, 45.83, 43.10 และ 24.05 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rRNA gene พบว่าแบคทีเรียที่มีวงเสกกว้างที่สุดมีความคล้ายคลึงกับ *Acinetobacter gerveri*

มาริสา อัทธภาพงศ์ (2560) ได้นำจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายลิพิดจากดิน และน้ำเสียจากร้านอาหารและตลาดสดเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน จากการทดสอบพบว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์จากดินได้ 2 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรีย *LS1* และ *LS2* และที่คัดแยกจากน้ำเสียจากร้านอาหารและตลาดสดนั้นได้ 24 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรีย *LWW1 - LWW24* จากนั้นจึงนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus pumilus LWW2*, *B. pumilus LWW8*, *B. pumilus LWW9* และ *Serratia quiniviorans LWW13* มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ  $202.69 \pm 4.50$ ,  $186.18 \pm 6.88$ ,  $193.69 \pm 4.50$  และ  $177.18 \pm 5.20$  หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ มาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสีย พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันที่ความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง แบคทีเรีย *B. pumilus LWW2*, *B. pumilus LWW8*, *B. pumilus LWW9* และ *Serratia quiniviorans LWW13* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันเฉลี่ยร้อยละ  $86.13 \pm 0.24$ ,  $86.79 \pm 0.13$ ,  $91.24 \pm 0.10$  และ  $76.50 \pm 0.36$  ตามลำดับ

กิจจา จิตรภิมย์ และปรานิน แสงอรุณ (2555) คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำเสียจากถังดักไขมัน, น้ำหมักชีวภาพ, น้ำคลองรวบรวมน้ำเสีย และตะกอนดินป่าชายเลน โดยนำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงในอาหาร screening medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายไปยังอาหาร tributyrin agar พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่ย่อยไขมันได้ 39 สายพันธุ์ จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยไขมัน พบว่าแบคทีเรียที่แยกจากถังดักไขมัน T3/2 สามารถย่อยน้ำเสียไขมันได้ดีกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งอื่น ซึ่งสามารถย่อยไขมันได้ร้อยละ 52.0 อัตราการย่อยไขมัน 0.025 มิลลิลิตรต่อวัน ในช่วงเวลาทดสอบ 21 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียที่เติมไขมันสังเคราะห์เมื่อย่อยด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่าน้ำเสียที่เติมไขมันสังเคราะห์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงสภาพตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 11 ของการทดสอบ โดยน้ำใสขึ้นมีการตกตะกอนและความหนาของชั้นไขมันลดลง แบคทีเรียที่แยกได้จากการศึกษานี้สามารถย่อยสลายไขมันได้ดี การเพาะเลี้ยงง่าย ดังนั้นจึงเหมาะกับการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมัน

ณัฐกานต์ ทำทัน (2560) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียผสมที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอกรวดหาไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษา  
มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในอาหารเพาะเชื้อ basal medium และน้ำเสีย  
ไม่ว่าการันต์ฯ ทั้งสน อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากนำไปใช้

สังเคราะห์ โดยทำการศึกษาจากแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 17 สายพันธุ์ ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่าง ๆ ได้ดี คือ สายพันธุ์ GS-3 โดยน้ำมันที่ย่อยสลายได้ดีที่สุด คือน้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว และน้ำมันหมู ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 93, 92 และ 97 ตามลำดับ จึงได้ทำการจับคู่ระหว่างสายพันธุ์ GS-3 ร่วมกับสายพันธุ์ อื่นๆอีก 16 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1 จากการทดสอบการย่อยสลายไขมันและน้ำมันโดยใช้กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง และมีการให้อากาศด้วยการเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียเชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GS-3 และสายพันธุ์ HCUC 5-1 มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันหมูในอาหารเพาะเชื้อได้ดีที่สุด โดยสามารถย่อยสลายได้ร้อยละ  $97.76 \pm 3.34$  และ  $96.21 \pm 3.32$  ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียเชื้อผสมทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังกล่าวยังสามารถเจริญได้ดีในน้ำเสียสังเคราะห์สูตร 3 ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันหมูอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) โดยพบปริมาณเชื้อสายพันธุ์ GS-3 และสายพันธุ์ HCUC 5-1 ที่เวลา 126 ชั่วโมง (7 วัน) เท่ากับ  $9.2 \log \text{CFU/ml}$  และ  $7.3 \log \text{CFU/ml}$  ตามลำดับ และมีอัตราการย่อยสลายน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ เท่ากับร้อยละ  $73.08 \pm 2.07$  อัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์เท่ากับร้อยละ  $85.48 \pm 6.84$  และอัตราการเจริญของเชื้อเท่ากับร้อยละ  $91.45 \pm 5.08$  จากผลทดลองเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเชื้อผสมที่คัดเลือกสามารถช่วยส่งเสริมและเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายมากกว่าการใช้สายพันธุ์เดียว

ประชุมพร เล่าห์ประเสริฐ (2558) ศึกษาประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในการย่อยสลายไขมันและบำบัดน้ำเสียของโรงอาหารมหาวิทยาลัย เก็บจากน้ำเสียที่บ่อดักไขมันของโรงอาหารมหาวิทยาลัย ด้วยวิธี Grab Sampling ทำการทดลองแบบกะ ที่อุณหภูมิห้องความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองพบว่า กลุ่มแบคทีเรียคัดเลือกได้สามารถลดค่า  $\text{BOD}_5$  ได้ร้อยละ 40-65 โดย *B. subtilis* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดค่า  $\text{BOD}_5$  คือ ลดได้ร้อยละ 62.66 รองลงมาคือ *S. epidermidis* และ *P. aeruginosa* ลดได้ร้อยละ 52.31 และ 42.05 ตามลำดับ นอกจากนี้ *P. aeruginosa* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดความหนาของชั้นไขมันคือลดได้ร้อยละ 48.98 ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่า *B. subtilis* และ *S. epidermidis* ที่ลดได้ร้อยละ 32.65 และ 26.53 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p < 0.001$ )

ดังนั้นงานวิจัยนี้จะคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมัน และไขมันจากรางน้ำทิ้งและบ่อบำบัดไขมันของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ โดยจะนำมาเชื้อจาง และทำการ Spread plate ลงอาหาร Tributyrin agar และอาหาร Phenol red oil agar เพื่อทดสอบการผลิตเอไซม์ไลเปสและการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ เมื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะตามต้องการแล้วจะทำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการย่อยน้ำมัน และไขมันในห้องปฏิบัติการเพื่อหาสภาวะในการย่อย เพื่อสามารถใช้เป็น  
ข้อมูลในการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ย่อยน้ำมัน และไขมันในบ่อบำบัดไขมันต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

- 3.1.1 ปีกเกอร์ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.1.2 แท่งแก้วคนสาร
- 3.1.3 ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.1.4 ลูกยาง
- 3.1.5 ซ้อนตักสาร
- 3.1.6 กระจกบอทวงขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.1.7 ขวดดูแรนขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.1.8 เพลทแก้ว และเพลทพลาสติก
- 3.1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.10 ไฟแช็ค
- 3.1.11 พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.1.12 กระจบวยสแตนเลส
- 3.1.13 ถู่มือแพทย์
- 3.1.14 หลอดทดลอง และฝา
- 3.1.15 ตะแกรงหลอดทดลอง
- 3.1.16 Auto pipet ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร
- 3.1.17 ทิปสีฟ้า
- 3.1.18 แท่งแก้วอ
- 3.1.19 แผ่นกระดาษกรอง
- 3.1.20 กรวยกรอง
- 3.1.21 ถ้วยเซรามิก

#### 3.1.22 กรวยแยก (Separatory funnel)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใด 3.1.23 เดซิเคเตอร์ มิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.24 ขาดัง

3.1.25 สำลี

### 3.2 เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

3.2.1 หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) (TOMY, HV-25/50/95/110, Japan)

3.2.2 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo PG803 Scale)

3.2.3 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) (Mettler-Toledo, CH 8603, Switzerland)

3.2.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Vertical laminar air flow)

3.2.5 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu UV-1601, Japan)

3.2.6 ตู้บ่มเชื้อ

### 3.3 สารเคมี

3.3.1 Nutrient broth ยี่ห้อ SRL

3.3.2 Phenol red broth base ยี่ห้อ Himedia™

3.3.3 Tributyrin

3.3.4 Agar powder ยี่ห้อ Bioagars

3.3.5 Sodium chloride (NaCl) ยี่ห้อ SRL

3.3.6 Potassium dihydrogen orthophosphate, mono potassium phosphate  
( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ยี่ห้อ SRL

3.3.7 Di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ยี่ห้อ Deajung

3.3.8 Sodium hydroxide (NaOH) ยี่ห้อ KemAus

3.3.9 Phenol red ยี่ห้อ KemAus

3.3.10 n-Hexane ยี่ห้อ KemAus

3.3.11 Sodium sulfate ยี่ห้อ SRL

3.3.12 น้ำมันปาล์ม ยี่ห้อ หยก (วันที่ซื้อ 7 กุมภาพันธ์ 2566 จาก Tops สาขาลาดกระบัง)

3.3.13 น้ำมันหมู ยี่ห้อ หมูหมู (วันที่ซื้อ 7 กุมภาพันธ์ 2566 จาก Tops สาขาลาดกระบัง)

3.3.14 น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
3.3.15 Linear alkylbenzene sulphonate (LAS)  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อสาธารณะและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.4.1 Nutrient broth
- 3.4.2 Nutrient phenol red agar
- 3.4.3 Nutrient phenol red oil agar
- 3.4.4 Phenol red oil agar
- 3.4.5 Tributyrin agar

### 3.5 บัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข)

- 3.5.1 Phosphate buffer saline (PBS) 0.85%

### 3.6 การแยกคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมัน

#### 3.6.1 การเตรียมอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง

นำพลาสติก 2 อัน ตัดกระดาษฟลอยด์ขนาดที่สามารถปิดฝาพลาสติกได้ จากนั้นนำใส่ถุงพลาสติก และมัดปากถุงให้เรียบร้อย, แห้งแก้วตัวแอล, กระจกปิเปตแก้วที่มีปิเปตแก้ว 1, 5 และ 10 ml ปีกเกอร์ 100 ml ไปนึ่งเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ให้แห้งสนิทก่อนนำไปใช้

#### 3.6.2 การเก็บตัวอย่างเชื้อจากบ่อบำบัดไขมันและรางน้ำทิ้งจากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์

เก็บตัวอย่างเชื้อจากบ่อบำบัดไขมันและรางน้ำทิ้งจากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์มาคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อตลอดการเก็บตัวอย่าง ก่อนจะเริ่มการเก็บตัวอย่างจะต้องใส่ถุงมือแพทย์และฉีดแอลกอฮอล์ 70% ที่มือและถุง พลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว ในจุดที่เป็นรางน้ำทิ้งนำพลาสติกปลอดเชื้อจ้วงลงไปใ้ในรางน้ำให้ได้ปริมาณ 100 ml และในจุดบ่อบำบัดไขมันก่อนจะเริ่มการเก็บตัวอย่างจะนำกระบวยสเตนเลสจุ่มลงในบีกเกอร์ 1000 ml ที่มีแอลกอฮอล์ 95% และนำไปส่นไฟด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์รอจนไฟที่ติดแอลกอฮอล์ 95% ดับลงและทิ้งไว้ให้เย็น ตักตัวอย่างใส่พลาสติกให้ได้ปริมาณ 100 ml จากนั้นนำตัวอย่างน้ำทิ้งจากรางน้ำ (S1) และตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อบำบัดไขมัน (S2) มาเจือจางด้วย Phosphate buffer saline (PBS) 0.85% (ภาคผนวก ข) ด้วยวิธี ten fold dilution ให้ได้ค่าเจือจาง  $10^{-4}$  และนำไป Spread plate ทำบนอาหาร Tributyrin และ Phenol red oil ที่มีวุ้น 2% (ภาคผนวก ก) ตัวอย่างละ 4 ซ้ำและนำบ่มตามอุณหภูมิที่กำหนด คือ 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2-3 วัน

### 3.7 ทดสอบการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์และการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

#### 3.7.1 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

คัดเลือกโคโลนีที่เกิดบริเวณใสบนอาหารแข็ง Tributyrin และ โคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหารจากสีเอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นด้านการค้า แดงเป็นสีเหลืองบนอาหารแข็ง Phenol red oil จากข้อ 3.6.2 นำมาทดสอบซ้ำด้วยวิธีการชิตลงบนไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin (Prasanth Kumar and Valsa, 2007) จากนั้นนำไปบ่มตามอุณหภูมิที่คัดแยกเชื้อมาเป็นเวลา 3 วัน เพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากบริเวณใสรอบโคโลนี

### 3.7.2 ทดสอบการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ของแบคทีเรีย

จากการทดสอบในอาหารแข็ง Tributyrin ซึ่งมีโครงสร้างไม่ซับซ้อนเหมือนกับไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในน้ำเสียจริง ดังนั้น จึงต้องมีการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ โดยการชิตลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจาก phenol red olive oil agar (Lee et al., 2015) โดยแทนที่น้ำมันมะกอกด้วยน้ำมันปาล์ม ซึ่งเป็นไขมันหลักที่ปนเปื้อนจากโรงอาหาร และร้านค้า รวมทั้งทำการชิตลงบน nutrients phenol red agar และ nutrients phenol red oil agar และนำไปบ่มตามอุณหภูมิที่คัดแยกเชื้อได้เป็นเวลา 1 วัน สังเกตการย่อยไตรกลีเซอไรด์จากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง

## 3.8 ทดสอบการย่อยสลายไขมันในห้องปฏิบัติการ

### 3.8.1 การเตรียมอาหารเหลวเพื่อทดสอบการย่อยสลายไขมัน

เตรียมอาหาร Nutrient broth 1 ลิตร โดยชั่งสารปริมาณเท่ากับการเตรียมอาหาร 1 ลิตรและเติมน้ำกลั่นลงไป 800 ml และปรับพีเอชในอาหารเป็นพีเอช 7.2 ทำการเทอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 80 ml ลงในพลาสติกจำนวน 24 พลาสติก เติมน้ำมันปาล์มหรือน้ำมันหมูลงในพลาสติกให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2000 และ 5000 mg/l ทดลองความเข้มข้นละ 4 ข้ำ จากนั้นนำจุกสำลีปิดพลาสติกทั้งหมด และทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

### 3.8.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย E

ถ่ายเชื้อ E จากอาหารแข็ง Phenol red oil agar ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 5 ml จำนวน 5 หลอด นำไปบ่มเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบ 1 วัน ถ่ายเชื้อลงในพลาสติกอาหาร Nutrient broth ที่ปริมาตร 100 ml โดยเชื้อ 1 หลอด ต่ออาหาร 1 พลาสติก จากนั้นนำไปบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

### 3.8.3 ทดสอบการย่อยสลายไขมัน

นำหัวเชื้อที่ได้จาก 3.8.2 มาเทรวมกันในขวด Duran ปลอดเชื้อขนาด 1000 ml และใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น ทดสอบการย่อยไขมันโดยใช้อาหาร Nutrient broth ที่เติมน้ำมันปาล์มหรือไขมันหมูที่ความเข้มข้น 2000, 5000 mg/l สารลดแรงตึงผิวทางการค้า (Commercial surfactant) คือ Linear alkylbenzene sulphonate (LAS) ที่ความเข้มข้น 3 mg/g ของ dss (dss – dry suspended solids) (Hallmann et al., 2013) โดยมี NB เป็นชุดควบคุมนำไปบ่มเขย่าที่ 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน การทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.9 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (Fat Oil and Grease, FOG) โดยวิธีกรวยแยก

นำถ้วยเซรามิกเปล่าไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 3.8.3 ใส่กรวยแยก โดย 1 ฟลาสก์ต่อ 1 กรวยแยก จากนั้นเติมเฮกเซนปริมาตร 10–15 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารผสมแยกชั้นโดยน้ำมันจะอยู่ชั้นตัวทำละลายเฮกเซนชั้นบนถ่ายชั้นน้ำไว้ในบีกเกอร์ จากนั้นถ่ายชั้นของเฮกเซนซึ่งมีน้ำมันปาล์มและไขมันหมูผ่านกระดาษกรองที่มีโซเดียมซัลเฟตลงในถ้วยเซรามิกที่เตรียมไว้ ทำการสกัดซ้ำจนกระทั่งน้ำมันปาล์มหรือไขมันหมูถูกสกัดออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อจนหมด นำถ้วยเซรามิกที่มีเฮกเซนหรือน้ำมันปาล์มและไขมันหมูไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนเฮกเซนระเหยออกจนหมด ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนัก และนำไปคำนวณหาปริมาณไขมัน (ภาคผนวก ค)

### 3.10 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ E

เลี้ยงเชื้อ E ในหลอดทดลองที่มีอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 5 ml จำนวน 3 หลอด บ่มเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์อาหาร Nutrient broth ปริมาตร 100 ml เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm. ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำไปบ่มเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การตัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมันและน้ำมัน จากท่อน้ำทิ้งและบ่อดักไขมันของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากรางน้ำเสียของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ (S1) และบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ (S2) มาตัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยน้ำมัน และไขมัน โดยเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากับ  $10^{-4}$  และนำไป Spread plate บนอาหาร Tributyrin agar และ อาหาร Phenol red agar จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 42 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหาร โดยอาหาร Tributyrin agar จะสังเกตการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี เกิดจากเชื้อผลิตเอนไซม์ไลเปสมาย่อย Tributyrin อาหาร Phenol red oil agar จะสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง เนื่องจากเชื้อสามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้ทำให้เกิดกรดไขมันอาหารจึงเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง จากการตัดแยกเชื้อพบว่าแบคทีเรียที่แตกต่างกัน 5 สายพันธุ์ โดยทั้ง 5 สายพันธุ์คัดแยกได้จากตัวอย่าง S1 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มคือ 37 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.1) โดยกำหนดให้แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์เป็นชื่อดังนี้คือ A, B, C, D และ E จากนั้นทำการ cross streak เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และลักษณะโคโลนี รวมทั้งการย้อมแกรมเพื่อสังเกตการณ์ติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ได้ผลดังตารางที่ 4.2

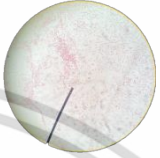



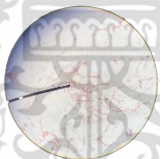

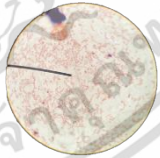
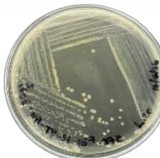

จากการศึกษาการตัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส และย่อยไตรกลีเซอไรด์พบว่าจุลินทรีย์ที่พบในช่วงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมากกว่าช่วงอุณหภูมิอื่น ซึ่งสอดคล้องกับมาริสา (2560) ซึ่งกล่าวว่าอุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อกระบวนการทำงาน และเสถียรภาพของเอนไซม์ ซึ่งแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่อุณหภูมิ 30 - 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโตมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งหากแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตมากก็จะส่งผลให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง

ตาราง 4.1 จำนวนสายพันธุ์ที่เปลี่ยนอาหาร Phenol red oil agar จากสีแดงเป็นสีเหลือง

ตัวอย่าง	37°C	42°C	50°C
S1	5	-	-
S2	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายของภาพ 1000 เท่า

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	โคโลนีบน อาหารแข็ง	ลักษณะโคโลนี	ภาพใต้กล้อง จุลทรรศน์ กำลังขยายของ ภาพ 1000 เท่า	การติด สีแกรม	รูปร่าง และ การจัดเรียงตัว ของเซลล์
A		ทรงกลม สีเหลือง ผิว มีความมันวาว ขอบ ของโคโลนีมีลักษณะ เรียบ		ลบ	ลักษณะเซลล์ เป็นทรงกลม
B		แผ่กว้าง สีขาวขุ่น ผิว ไม่มีความมันวาว ขอบมีลักษณะหยัก		ลบ	ลักษณะเซลล์ เป็นแท่ง
C		ทรงกลมขนาดเล็ก สี ขาวขุ่น ผิวของ โคโลนี มีความวาว ขอบมีลักษณะเรียบ		ลบ	ลักษณะเซลล์ เป็นแท่งเรียง ต่อกันเป็นสาย
D		ลักษณะโคโลนีเป็น ทรงกลม สีขาวใส ผิว ของโคโลนี มีความ วาว ขอบมีลักษณะ หยักเล็กน้อย		ลบ	ลักษณะเซลล์ เป็นแท่งสั้น
E		ทรงกลม สีขาวใส ผิว ของโคโลนีมีความ วาว ขอบมีลักษณะ หยักเล็กน้อย		ลบ	ลักษณะเซลล์ เป็นแท่งสั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

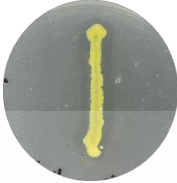

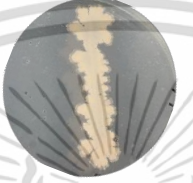


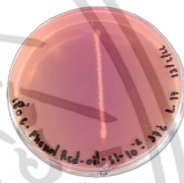




การนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในอาหาร tributyrin agar โดยการขีดเชื้อบนอาหาร tributyrin agar เพื่อเปรียบเทียบขนาดโซนใสรอบโคโลนี พบว่าแบคทีเรีย A, B, C, เกิดโซนใสในอาหาร tributyrin agar แต่ขนาดของโซนใสมีขนาดเล็กกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ D และ E เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มาทดสอบบนอาหาร phenol red oil agar มีเพียงแบคทีเรียสายพันธุ์ D และ E ที่เปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากการเปรียบเทียบแบคทีเรียทุกสายพันธุ์พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ E มีขนาดโซนใส และสามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ในอาหาร phenol red oil agar ได้ดีที่สุด จึงเลือกเชื้อสายพันธุ์ E มาทดสอบการย่อยไขมันในห้องปฏิบัติการ

โดยจากการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยดังนี้

มาริสสา (2560) ได้ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในอาหาร Tributyrin agar โดยคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาออกเซลล์เพื่อย่อยสลาย Tributyrin ซึ่งเป็นไตรกลีเซอไรด์ชนิดหนึ่งซึ่ง เมื่อถูกย่อยแล้วจะได้กลีเซอรอลและกรดไขมัน สามารถสังเกตการเกิดโซนใสรอบโคโลนี โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ได้จากน้ำเสียซึ่งสามารถสร้างโซนใสได้ คือแบคทีเรีย LWW13, LWW15, LWW21, LWW8, LWW11, LWW24, LWW20, LWW9, LWW7 และ LWW19

Singh et al., (2006) ได้ศึกษากิจกรรมการสลายไขมันที่สามารถระบุได้ด้วยสีเหลือง โดยการใช้ไขมันมะกอกเป็นซับสเตรตของไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ phenol red ซึ่งการทดสอบนี้ขึ้นอยู่กับหลักกรดไขมันอิสระถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาการสลายไขมันของแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.3 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหาร Tributyrin agar และการย่อยไตรกลีเซอไรด์ในอาหาร Phenol red oil agar

สายพันธุ์แบคทีเรีย	อาหาร Tributyrin agar	อาหาร Phenol red oil agar
A		
B		
C		
D		
E		

#### 4.3 การทดสอบการย่อยสลายไขมันในห้องปฏิบัติการ

ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันปาล์มและไขมันหมูโดยใช้เชื้อ E ในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่มีการเติมไขมันหรือน้ำมันที่ความเข้มข้น 2000 และ 5000 mg/l ร่วมกับการใช้ Linear alkylbenzene sulphonate (LAS) ที่ความเข้มข้น 300 mg/l (Hallman et al., 2013) โดยใช้ใส่หัวเชื้อ E อายุ 24 ชั่วโมง และปริมาณ 20% โดยปริมาตรต่อปริมาตรมีอาหาร NB และ NB + LAS เป็นตัวควบคุม บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวัดปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ จากการทดลองพบว่าในอาหาร NB แบคทีเรียมีการเจริญเติบโต แต่ในอาหาร NB + LAS แบคทีเรียไม่มีการเจริญเติบโตเนื่องจากอาหารเปลี่ยนเป็นใส ดังนั้น LAS อาจจะมีผลทำให้เซลล์แตกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB + ไขมันหรือน้ำมัน + LAS อาหารจะไม่มีไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะขุ่นเป็นอิมัลชันเนื่องจาก LAS ไปทำให้ไขมันและน้ำมันแตกตัวเป็นไมเซลล์ทำให้ LAS ไม่เกิดผลกระทบบกกับเชื้อ เชื้อจึงสามารถเจริญได้ อย่างไรก็ตามอาหาร NB+น้ำมันปาล์ม 5000 mg/l และ NB + ไขมันหมู 5000 mg/l มีลักษณะเป็นอิมัลชันอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับ NB+น้ำมันปาล์ม 5000 mg/l + LAS และ NB + ไขมันหมู 5000 mg/l +LAS ตามลำดับ เนื่องจากมีการเติมน้ำมันปาล์มหรือไขมันหมูลงไปปริมาณมากทำให้เกิดอิมัลชันขึ้นในอาหารและไขมันไม่เกิดการแตกตัว (ตารางที่ 4.4)

จากการศึกษาของคุณอลงกฏ (2011) ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของ *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 พบว่าทั้งสองสายพันธุ์ผลิตสารลดแรงตึงผิว เชื้อสายพันธุ์ *P. fluorescens* G7 เอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาได้ดีกว่า *B. subtilis* TP8 เนื่องจาก *P. fluorescens* G7 มีสารลดแรงตึงผิวมากกว่าจึงทำให้ไขมันและน้ำมันแตกตัวเป็นโมเลกุลขนาดเล็กเพิ่มประสิทธิภาพให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปทำปฏิกิริยาย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดีขึ้น จากการศึกษาของ Alina (2014) พบว่าสารลดแรงตึงผิวสามารถกระตุ้นกับยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ LAS

จากงานวิจัยของคุณปิยากรณ์ (2556) ได้ทำการศึกษาคูสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปส จากแบคทีเรียสายพันธุ์ MU1-5 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์จะมีความทำงานสูงขึ้นเมื่อมี  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{LiCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  สารลดแรงตึงผิว และสารอิมัลซิฟายเออร์ ดังนั้นการเติม LAS ลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจทำให้การย่อยไขมันมีประสิทธิภาพมากขึ้น

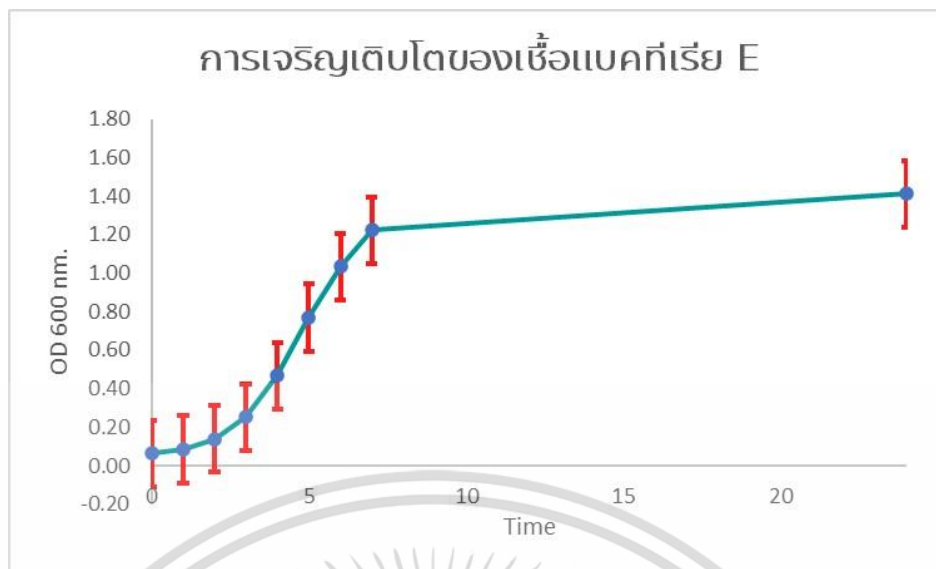
ตารางที่ 4.4 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB เพื่อทดสอบการย่อยไขมันหมูและน้ำมันปาล์มก่อนบ่มและหลังบ่ม

	ก่อน	หลัง
ไขมันหมู		
น้ำมันปาล์ม		

#### 4.4 การเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์ E

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ E มาเลี้ยงในอาหาร NB บ่มแบบเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 ชั่วโมง และวัดเมื่อครบ 24 ชั่วโมงอีกครั้ง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ E มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว โดยพบการเจริญเริ่มเข้าสู่ stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7 เป็นต้นไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย E เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ E เริ่มเข้า stationary phase ตั้งแต่ 7 ชั่วโมง ทำให้ทราบว่ามีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วเหมาะสมกับการนำไปใช้ แต่อย่างไรก็ตามควรต้องจัดจำแนกเชื้อโดยใช้วิธีอื่นเพิ่มเติม เช่น วิธีทางชีวเคมีหรือการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล เพื่อให้ทราบถึงสายพันธุ์ที่แน่นอนของแบคทีเรีย

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำเสียจากรางน้ำทิ้งหลังร้านค้า และบ่อดักไขมันลงบนอาหาร Tributyrin agar และอาหาร phenol red oil agar พบจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ทำให้เกิดโซนใสรอบโคโลนีบนอาหาร Tributyrin agar และเปลี่ยนสีอาหาร phenol red oil agar จากสีแดงเป็นสีเหลืองทั้งสิ้น 5 ไอโซเลท โดยเชื้อสายพันธุ์ E แสดงการเกิดโซนใสบนอาหาร tributyrin agar มากที่สุด และสามารถเปลี่ยนสีในอาหาร phenol red oil agar จากสีแดงเป็นสีเหลืองได้ดีที่สุด จึงนำเชื้อ E มาทดลองการย่อยน้ำมันปาล์มหรือไขมันหมูรวมกับการใช้ LAS พบว่า LAS อาจจะมีผลทำให้เซลล์แตกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB + ไขมันหรือน้ำมัน + LAS อาหารจะไม่มีลักษณะขุ่นเป็นอิมัลชัน อาหาร NB+น้ำมันปาล์ม 5000 mg/l และ NB + ไขมันหมู 5000 mg/L มีลักษณะเป็นอิมัลชันอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับ NB+น้ำมันปาล์ม 5000 mg/l + LAS และ NB + ไขมันหมู 5000 mg/l +LAS ตามลำดับ เนื่องจากมีการเติมน้ำมันปาล์มหรือไขมันหมูลงไปเป็นปริมาณมากทำให้เกิดอิมัลชันขึ้นในอาหารและไขมันไม่เกิดการแตกตัว เมื่อเติม LAS ร่วมกับไขมันปริมาณมาก (5,000 mg/l) LAS สามารถช่วยในการแตกตัวของไมเซลล์ในไขมันได้ เนื่องจากไม่เกิดคอนลอยด์ขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นถ้าจะย่อยไขมันในระบบบำบัดน้ำเสียควรมีการเติมสารลดแรงตึงผิว LAS ร่วมด้วย

เชื้อ E ที่คัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียย้อมติดสีแดงจัดเป็นแกรมลบลักษณะเป็นแท่งสั้น มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ซึ่งสามารถเจริญเข้าสู่ stationary phase ได้ ภายใน 7 ชั่วโมง ซึ่งเป็นผลดีต่อการนำไปใช้เนื่องจากจะช่วยลดระยะเวลาในการเตรียมหัวเชื้อ

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการทดสอบย่อยสลายน้ำมันปาล์มและไขมันหมูควรเพิ่มการทดสอบสารลดแรงตึงผิวชนิดที่นอกเหนือจาก LAS และควรทดสอบกับเชื้อ D เพิ่มเติม

5.2.2 ควรหาวิธีการวัดปริมาณไขมัน และน้ำมันที่มีความแม่นยำต่อไขมันปริมาณน้อย

## เอกสารอ้างอิง

- กุสุมาวดี ฐานเจริญ. (2557). ความหลากหลายของยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสย่อยไขมันในน้ำทิ้งโรงอาหาร มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. [Online]. Available <http://research.rmu.ac.th/rdi-mis//upload/fullreport/1614766996.pdf>
- จूरรัตน์ แซ่แต้. (2541). การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย *Xanthomonas* ที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. [Online]. Available <http://kb.psu.ac.th:8080/psukb/handle/2553/2386>
- ณัญญภัทร จินดา. (2547). “เอนไซม์ไลเปส 1 แหล่งประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม.” *วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*, 24(3) : 114-131.
- ณัฐกานต์ ทำทัน. (2560). “การศึกษาการใช้แบคทีเรียเชื้อผสมในการย่อยสลายน้ำมันและน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมัน.” การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและคณะสาธารณสุขศาสตร์ และสิ่งแวดล้อมมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
- ดุขฎิ รัตน์พระ. 2549. การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 7-79.
- นลิน สิริธรรณ. (2548). การบำบัดน้ำเสียชุมชน. [Online]. Available <http://sutir.sut.ac.th:8080/jspui/bitstream/123456789/2428/1/BIB749.pdf>
- เนียรวรรณ มีเจริญ. (2560). อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์. [Online]. Available <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/7439-2017-08-11-04-33-12>
- ปราโมทย์ น้อยาง. (2545). การย้อมสีแกรมแบคทีเรีย. [Online]. Available <https://www.nectec.or.th/schoolnet/library/create-web/10000/science/10000-6111.html>
- ปิยาภรณ์ สุภักค์คารกุล และจันทร์เพ็ญ วิวัฒน์. 2565. "การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงและการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชและการประยุกต์ใช้.", มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. <http://hcuir.lib.hcu.ac.th:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1035/Piyaporn.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- พัชรนันท์ อมรัตน์พันธ์. (2557). การโคลนและสมบัติของยีนไลเปสจาก *Bacillus sp.* ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูง. [Online]. Available [https://buuir.buu.ac.th/bitstream/1234567890/1853/1/2560\\_046.pdf](https://buuir.buu.ac.th/bitstream/1234567890/1853/1/2560_046.pdf)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาริสสา อัดถาพงศ์. (2560). การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์. [Online]. Available [http://www.thai-explore.net/file\\_upload/submitter/file\\_doc/3683856dcd3ea8a4fb4bb7b677768c9628f.pdf](http://www.thai-explore.net/file_upload/submitter/file_doc/3683856dcd3ea8a4fb4bb7b677768c9628f.pdf)

สิริรัตน์ สุวณิชย์เจริญ และปราโมช เขียวชาญ. (2548). ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ. [Online]. Available [https://www.stou.ac.th/schools/shs/booklet/6\\_2548/occhealth.htm](https://www.stou.ac.th/schools/shs/booklet/6_2548/occhealth.htm)

สุรอรธร ศุภจัตุรัส, วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตน และศุภพงษ์ ภูวพัฒนะพันธ์. มปป. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 712-718.

อารักสา ฆมิธ. 2537. เทคนิคที่สำคัญทางชีวเคมี. โรงพิมพ์สมิตรพรินต์ติ้ง. 32-56. [Online].

Available [https://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2391/12/223354\\_ch1.pdf](https://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2391/12/223354_ch1.pdf)

อลงกฎ แซมสีม่วง,ศิริพรรณ สารินทร์ และจรรยา สารินทร์. (2011). "การศึกษาการใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน." ภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก. [Online]. Available <https://www.journal.nu.ac.th/JCDR/article/view/288/295>

อัมพรศักดิ์ วรรณโกมล. (2558). การใช้สารลิเนียอัลคิลเบนซินซัลโฟเนตเพื่อลดแรงตึงผิวของน้ำมันดิบในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำมันดิบ. [Online]. Available

<http://sutir.sut.ac.th:8080/jspui/bitstream/123456789/5860/2/Fulltext.pdf>

อัญชัชฎา โยธาจันทร์. (2562). การย้อมสีแกรมเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย. [Online].

Available <https://www.ksvrhospital.go.th/ksvr/files/LAB/WI-LAB-การย้อมแกรม.pdf>

AOS Treatment Solutions. (2018). "Role of Microorganisms Used in Wastewater Treatment." [Online]. Available <https://aosts.com/role-microbes-microorganisms-used-wastewater-sewage-treatment/>

Abel Hiol, Marie D. Jonzo, Nathalie Rugani, Danielle Druet, Louis Sarda, Louis Claude Comeau. (2000). "Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit." *Enzyme and Microbial Technology*. Volume 26, Issues 5–6, Pages 421-430.

[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00173-8)

เอกสารนี้ ADETUNJI, A.I., OLANIRAN, A.O., (2018). "Optimization of culture conditions for enhanced lipase production by *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit." *Enzyme and Microbial Technology*. Volume 115, Pages 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.05.010>

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lipase production by an indigenous *Bacillus aryabhattai* SE3-PB using response surface methodology.” *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 32, 1514–1526.

<https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1514985>.

Alina Dereszewska, Stanisław Cytawa, Renata Tomczak-Wandzel, Krystyna Medrzycka. (2014). “The Effect of Anionic Surfactant Concentration on Activated Sludge Condition and Phosphate Release in Biological Treatment Plant.” Department of Chemistry and Industrial Commodity Science, Gdynia Maritime University, Morska 83, 81-225 Gdynia, Poland

Bharathi, D. and Rajalakshmi, (2019). “Microbial Lipases: An Overview of Screening, Production and Purification.” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368>

Dereszewska, A., Cytawa, S., Tomczak-Wandzel, R., Medrzycka, (2015). “The Effect of Anionic Surfactant Concentration on Activated Sludge Condition and Phosphate Release in Biological Treatment Plant.” *Pol. J. Environ. Stud.* 24(1):83–91. <https://doi.org/10.15244/pjoes/28640>

Gurkok, S., Ozdal, M., (2021). **Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry.** [Online]. Available <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105819>.

Hallmann, E., Tomczak-Wandzel, R., & Medrzycka, K. (2013). “Fate of las surfactants in WWTPs based on measured concentrations in wastewater and sludge.” *Proceedings of a Polish-Swedish-Ukrainian Seminar, Krakow Poland*

Huang, A. H. C., Lin Y. H., & Wang, S. (1988). “Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species.” *Journal of the American Oil Chemists ' Society*, 65, 897-899.

J. Suvilampi and J. Rintala. (2003). Thermophilic aerobic wastewater treatment, process performance, biomass characteristics, and effluent quality. Department of Biological and Environmental Science

Kachieng'a, L.O., Momba, M.N.B., 2015. **Biodegradation of fats and oils in domestic wastewater by selected protozoan isolates.** *Water Air Soil Pollut.* 226 (5), 140. [Online]. Available <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2405-7>.

Kanmani, P., Kumaresan, K., & Aravind, J. (2015). “Gene cloning, expression, and  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 lipase.”  
*Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1235-1243.
- Lee, L.P., Karbul, H.M., Citartan, M., Gopinath, S.C.B., Lakshmipriya, T., Tang, T.H. (2015)  
**Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: Promising strains to alleviate oil pollution.** *Biomed Res.* [Online]. Available  
<https://doi.org/10.1155/2015/820575>
- Mayordomo, F. Ranz-Gil and J.A. Prieto. (2000). “Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*.” *J.Agric. Food Chem.* 48 : 105-109.
- Monica Z. Bruckner. (2021).” Gram Staining” [Online]. Available  
[https://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/microscopy/gramstain.html](https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/gramstain.html)
- NR Kamini, T Fujii, T Kurosu, H Iefuji. (2000). “Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2” *Volume 36, Issue 4, November 2000, Pages 317-324*
- Prasad, M. P. and Manjunath, K. (2011). “Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species.” *Indian Journal of Biotechnology*, 10(1): 121-124.
- Prasanth Kumar, M.P., Valsa, A.K., (2007) “Optimization of culture media and cultural conditions for the production of extracellular lipase by *Bacillus coagulans*.” *Indian J. Biotechnol.*
- R. Singh, N. Gupta, V. K. Goswami, and R. Gupta, “A simple activity staining protocol for lipases and esterases,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 70, no. 6, pp. 679–682, 2006.
- Sonune, N., Garode, A., (2018) **Isolation, characterization and identification of extracellular enzyme producer *Bacillus licheniformis* from municipal wastewater and evaluation of their biodegradability.** *Biotechnol.* [Online]. Available <https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.03.001>
- Shahani, K.W. 1975. **Lipase and esterases.** *Enzyme in Food Processing.* 181 – 217

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. อาหาร Tributyrin

##### ส่วนประกอบ

อาหาร Nutrient broth (NB) สำเร็จรูป	8 g
Tributyrin	10 ml
Agar	20 g
น้ำกลั่น	990 ml

##### วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากัน ละลายวุ้นโดยใช้ความร้อน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. อาหาร Phenol red oil

##### ส่วนประกอบ

อาหาร Phenol red broth base สำเร็จรูป	16.02 g
น้ำมันปาล์ม	1 ml
Agar	20 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

##### วิธีการเตรียม

ผสมอาหาร Phenol red broth base สำเร็จรูปกับ Agar ให้เข้ากัน ละลายวุ้นโดยใช้ความร้อนและนำน้ำมันปาล์มที่แยกไว้ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำมันปาล์มที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาผสมในขวดอาหารโดยปิเปต น้ำมันปาล์ม 1 ml ใส่ลงไป เขย่าในเข้ากันและเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ

#### 3. อาหาร Nutrient broth (NB)

##### ส่วนประกอบ

อาหาร Nutrient broth (NB) สำเร็จรูป	8 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

##### วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### Buffer Solution

#### 1. Phosphate Buffer Saline (PBS)

##### ส่วนประกอบ

NaCl	4.25 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.85 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.73 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

##### วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น 500 ml และนำไปปรับ pH ด้วย NaOH จนได้ pH 7.2 โดยใช้เครื่องวัด pH meter mettler toledo จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

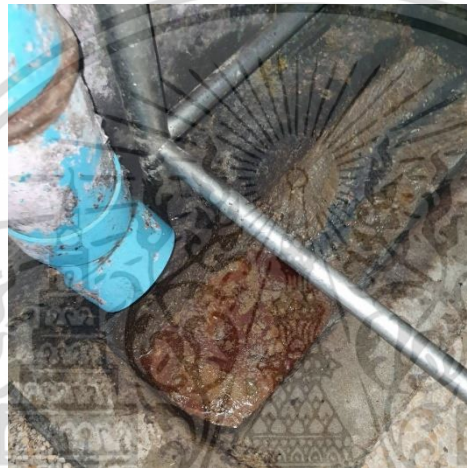
### ภาคผนวก ค

การเก็บตัวอย่างจากรางน้ำทิ้ง และบ่อบำบัดไขมัน จากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์

บ่อบำบัดไขมัน

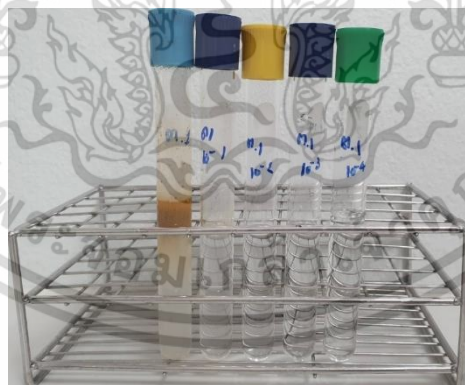


รางน้ำทิ้ง



การทำ ten fold dilution จนถึงความเข้มข้น  $10^{-4}$  ทั้ง 2 ตัวอย่าง

รางน้ำทิ้ง



บ่อบำบัดไขมัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำออกไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเอกสารนี้ไปเผยแพร่หรือใช้เอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 26 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาวนภัสรพรรณ เถลิงวัน รหัสประจำตัว 62050502  
นางสาวนันทริกานต์ บุญพินิจพงศ์ รหัสประจำตัว 62050505

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่องการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมัน จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ Isolation of fat degradable bacteria from wastewater treatment system at School of Science ปีการศึกษา 2565 เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักษราวirus ที่ 3.49 %

ลงชื่อ นภัสรพรรณ เถลิงวัน  
( น.ส.นภัสรพรรณ เถลิงวัน )  
นักศึกษา

ลงชื่อ นันทริกานต์ บุญพินิจพงศ์  
( น.ร.นันทริกานต์ บุญพินิจพงศ์ )  
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ นิลเนตร อัคระศิริจินดา  
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้