# สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน ในน้ำเสียสังเคราะห์ของ *Burkholderia gladioli*

# Optimization of oil and fat degradation in synthetic wastewater by *Burkholderia gladioli*


**นางสาวจันจิรา จันทร์ฉาย**

**นางสาวนฤมล สิงห์สุวรรณ**


**โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา**
**วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)**
**ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์**
**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**
**ปีการศึกษา 2566**


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Optimization of oil and fat degradation in synthetic wastewater by *Burkholderia gladioli*

CHANCHIRA CHANCHAI
NARUEMOL SINGSUWAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED
IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน<br>ในน้ำเสียสังเคราะห์ของ *Burkholderia gladioli*<br>Optimization of oil and fat degradation<br>in synthetic wastewater by *Burkholderia gladioli* |
| **ชื่อนักศึกษา** | นางสาวจันจิรา จันทร์ฉาย รหัสนักศึกษา 63050451<br>นางสาวนฤมล สิงห์สุวรรณ รหัสนักศึกษา 63050488 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา |
| **ปีการศึกษา** | 2566 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผศ.ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** | ดร.อิงครัต กิ่งแก้ว |

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

| คณะกรรมการสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ<br>ประธานกรรมการ | |
| ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ<br>กรรมการ | |
| ผศ.ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา<br>กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา | |
| ดร.อิงครัต กิ่งแก้ว<br>กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | อิงครัต กิ่งแก้ว |

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงงานพิเศษ** สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน
ในน้ำเสียสังเคราะห์ของ *Burkholderia gladioli*
**ชื่อนักศึกษา** นางสาวจันจิรา จันทร์ฉาย รหัสนักศึกษา 63050451
นางสาวนฤมล สิงห์สุวรรณ รหัสนักศึกษา 63050488
**ปริญญา** วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
**ภาควิชา** ชีววิทยา
**คณะ** วิทยาศาสตร์
**มหาวิทยาลัย** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
**ปีการศึกษา** 2566
**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ.ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา
**อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** ดร.อิงครัต กิ่งแก้ว

## บทคัดย่อ

น้ำเสียที่มีปริมาณน้ำมันและไขมันสะสมสูง เป็นปัญหาต่อการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตใต้น้ำ เป็นแหล่งเพาะพันธุ์เชื้อโรคและยังก่อให้เกิดปัญหาการสะสมและอุดตันในระบบบำบัดน้ำเสีย โครงงานพิเศษนี้มุ่งที่จะลดปริมาณน้ำมันและไขมันด้วยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งแบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย ต้นทุนต่ำ และสามารถย่อยน้ำมันและไขมันได้อย่างรวดเร็วในปริมาณมาก โดยนำ *Burkholderia gladioli* ซึ่งคัดแยกได้จากบ่อดักไขมัน โรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ ที่สจล.ได้รับการทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในห้องปฏิบัติการ โครงงานพิเศษนี้ ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 30, 32, 35, 37, 42 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดและมีอัตราการเจริญจำเพาะที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.5430 จากนั้นศึกษาความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น ในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 30 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ดีที่สุดคิดเป็นร้อยละ 23.19±0.31 จากนั้นศึกษาระยะเวลาที่เชื้อสามารถทนอยู่ได้ในน้ำเสีย พบว่าวันที่ 0 และ 7 มีการเจริญของเชื้อเป็นจำนวนมาก หลังจากวันที่ 14 จำนวนเชื้อลดลงอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตาม วันที่ 21 และ 28 ยังพบการเจริญของเชื้ออยู่

**คำสำคัญ** : *Burkholderia gladioli*, การย่อยสลายน้ำมันและไขมัน, การสกัดน้ำมันและไขมัน, น้ำเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Title** | Optimization of oil and fat degradation in synthetic wastewater by *Burkholderia gladioli* |
| **Students** | Miss Chanchira Chanchai Student ID 63050451 |
| | Miss Naruemol Singsuwam Student ID 63050488 |
| **Degree** | Bachelor of Science (Industrial Microbiology) |
| **Department** | Biology |
| **School** | Science |
| **University** | King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang |
| **Academic Year** | 2023 |
| **Advisor** | Asst. Prof. Dr. Nilnate Assavasirijinda |
| **Co-advisor** | Dr. Engkarat Kingkaew |


## Abstract


Wastewater with high levels of oil and fat is a problem for the photosynthesis of water living organisms and a propagation source of pathogens. The purpose of this special project is to decrease oil and fat in wastewater by biological methods. Bacteria are an effective organism that use in wastewater treatment with low-cost of operation and rapidly decrease a lot of oil and fat. *Burkholderia gladioli* was isolated from the grease trap at the canteen of the School of Science, KMITL. It has been tested oil and fat degradation ability in the laboratory. Therefore, this special project will be studied on the optimum temperature for *Burkholderia gladioli* growth, inoculum size for oil and fat degradation and survival period in real wastewater. The culture was observed growth at 30, 32, 35, 37, 42 and 45 ºC. The result showed that the optimum temperature was observed at 37 ºC and gived the highest specific growth rate of 0.5430. When observed oil and fat degradation in synthetic wastewater an inoculum size of 30% has show the highest oil and fat degradation efficiency of $23.19 \pm 0.31$. Besides, the existance of *Burkholderia gladioli* in real wastewater, were observed by viable plate count every 7 days. At days 0 and 7, there was a large amount of *Burkholderia gladioli* growing colonies. After day 14, the number of bacteria was a huge decreased. However, on days 21 and 28, the bacteria was still alive.



**Keywords** : *Burkholderia gladioli*, oil and fat degradation, oil and fat extraction, wastewater



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

การทำโครงงานพิเศษ เรื่อง "สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน ในน้ำเสียสังเคราะห์ของ *Burkholderia gladioli*" เพื่อประกอบการศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา และดร.อิงครัต กิ่งแก้ว กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รวมถึงอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการทำโครงงานพิเศษมาโดยตลอด อีกทั้งขอขอบพระคุณประธานกรรมการและกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาให้ข้อคิดเห็นในการแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และให้คำแนะนำในการใช้งานเป็นอย่างดี รวมถึงเพื่อนนักศึกษาปริญญาตรีทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือด้วยความจริงใจตลอดระยะเวลาที่ทำโครงงานพิเศษ

เหนือสิ่งอื่นใดขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในทุก ๆ ด้านมาโดยตลอด ทำให้โครงงานพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจไม่มากก็น้อย

จันจิรา จันทร์ฉาย
นฤมล สิงห์สุวรรณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช

**บทที่ 1 บทนำ**

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ ..... 2
1.3 ขอบเขต ..... 2
1.3.1 ขอบเขตด้านเนื้อหา ..... 2
1.3.1 ขอบเขตด้านสถานที่ ..... 2
1.3.1 ขอบเขตด้านระยะเวลา ..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 2

**บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

2.1 ลิปิด (Lipid) ..... 3
2.1.1 คำจำกัดความและประเภทของลิปิด ..... 3
2.1.2 อนุพันธ์ของลิปิด ..... 3
2.1.2.1 กรดไขมัน (Fatty acid) ..... 3
2.1.2.2 กลีเซอรอล (Glycerol) ..... 5
2.1.3 ประเภทของลิปิด ..... 6
2.1.3.1 ลิปิดอย่างง่าย ..... 6
2.1.3.2 ลิปิดเชิงซ้อน ..... 7
2.1.3.2.1 ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) ..... 7
2.1.3.2.2 ไกลโคลิปิด (Glycolipid) ..... 7
2.1.3.2.3 ไลโปโปรตีน (Lipoprotein) ..... 8
2.2 เอนไซม์ไลเปส ..... 8
2.2.1 คำจำกัดความและประเภทของเอนไซม์ไลเปส ..... 8
2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ..... 10
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ..... 11
2.5 กลไกการย่อยสลายน้ำมันและไขมันโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ..... 13
2.6 งายวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 17

**บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย**

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ..... 18
3.2 วัสดุและอุปกรณ์ ..... 18


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


หน้า

3.3 เครื่องมือ ..... 18
3.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ ..... 19
3.5 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ..... 19
3.6 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ..... 19
3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของ *Burkholderia gladioli* ..... 20
3.8 การศึกษาระยะเวลาที่เชื้อสามารถทนอยู่ได้ในน้ำเสียจริง ..... 21

**บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล**

4.1 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ..... 22
4.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ..... 23
4.3 การศึกษาความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของ *Burkholderia gladioli* ..... 25
4.4 การศึกษาระยะเวลาที่เชื้อสามารถทนอยู่ได้ในน้ำเสียจริง ..... 27

**บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ**

5.1 สรุปผลการวิจัย ..... 29
5.2 ข้อเสนอแนะ ..... 29

เอกสารอ้างอิง ..... 30
ภาคผนวก ..... 33
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ..... 34
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์และการคำนวณ ..... 36
ภาคผนวก ค ลำดับเบสของ *Burkholderia gladioli* ..... 47
ภาคผนวก ง ข้อมูล SPSS ..... 50
ภาคผนวก ฉ การเก็บตัวอย่างน้ำเสีย ..... 52


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**

2.1 ตัวอย่างกรดไขมันอิ่มตัว ..... 4
2.2 ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัว ..... 5
2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ..... 11
4.1 ผลของอุณหภูมิที่มีต่ออัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของ *Burkholderia gladioli* ..... 25
4.2 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหัวเชื้อเริ่มต้น ..... 26
4.3 ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ ..... 26
4.4 จุลินทรีย์ที่ทนอยู่ได้ในน้ำเสียจริง ..... 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


**รูปที่** **หน้า**

2.1 โครงสร้างกรดไขมัน ... 3
2.2 โครงสร้างกรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) ... 4
2.3 โครงสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) ... 5
2.4 โครงสร้างกลีเซอรอล ... 6
2.5 โครงสร้าง โมโนกลีเซอร์ไรด์ (a), ไดกลีเซอร์ไรด์ (b) และไตรเซอร์ไรด์ (c) ... 6
2.6 โครงสร้างฟอสโฟพาทีเดียแอซิด ... 7
2.7 โครงสร้างไกลโคลิปิด ... 8
2.8 โครงสร้างไลโปโปรตีน ... 8
2.9 การจับสับสเตรทของเอนไซม์ ... 9
2.10 โครงสร้าง Ser, His และ Asp หรือ Glu ... 10
2.11 โครงสร้างเอนไซม์ไลเปส ... 10
2.12 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียต่อเวลาแบบกะ ... 13
2.13 ปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ ... 13
2.14 ปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดไขมัน ... 15
2.15 ปฏิกิริยาการย่อยสลายกลีเซอรอล ... 16
4.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ *Burkholderia gladioli* กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn) ... 23
4.2 การเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ในอาหารเหลว ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยมี ชุดควบคุม (a) และ ชุดตัวอย่างที่ใส่เชื้อ (b) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยมี ชุดควบคุม (c) และ ชุดตัวอย่างที่ใส่เชื้อ (d) ... 24
4.3 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 30, 32, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ... 24
4.4 ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ ... 27


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและครัวเรือนมีน้ำมันและไขมันปนเปื้อนในปริมาณมาก ก่อให้เกิดปัญหาในการบำบัดน้ำเสีย โดยน้ำมันและไขมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากร้านอาหารและตลาดสดมีปริมาณน้ำมันและไขมันเฉลี่ยเท่ากับ 14-38,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2551) ซึ่งเกินมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากอาคารบางประเภทและบางขนาดของประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่องกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากอาคารบางประเภทและบางขนาด ซึ่งค่าน้ำมันและไขมันกำหนดไว้ไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร การปนเปื้อนของน้ำมันและไขมันในน้ำทิ้งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของแหล่งน้ำ เนื่องจากน้ำมันและไขมันเป็นสารอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว มีเสถียรภาพและย่อยสลายได้ยาก กรดไขมันที่พบในน้ำเสียชุมชนมีอยู่ 2 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัว กรดไขมันอิ่มตัว เช่น กรดสเตียริค (Stearic acid) พบมากในไขมันพืชและสัตว์ และกรดปาล์มิติก (Palmitic acid) พบมากในน้ำมันปาล์มและไขมันสัตว์ เป็นต้น สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดโอเลอิก (Oleic acid) พบมากในไขมันพืช ถึงร้อยละ 95 (พจน์ และคณะ, 2555) ซึ่งน้ำมันและไขมันที่กล่าวมานั้นมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ทำให้แยกชั้นและลอยตัวอยู่บนผิวน้ำ เป็นอุปสรรคต่อการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตใต้น้ำ ขัดขวางการแพร่ของออกซิเจนลงสู่แหล่งน้ำ ห่อหุ้มตัวสัตว์น้ำ ทำให้หายใจไม่ได้ เกิดสภาพไม่น่าดู เกิดการอุดตันของท่อระบายน้ำเสีย และเป็นแหล่งเพาะพันธุ์เชื้อโรค เมื่อเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ น้ำมันและไขมันจะลอยอยู่บริเวณผิวบ่อบำบัด ส่งผลให้กระบวนการบำบัดน้ำเสียไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร

การบำบัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ วิธีทางกายภาพมีค่าใช้จ่ายสูงในด้านของอุปกรณ์ วิธีการบำบัดทางเคมีจำเป็นต้องใช้สารเคมีในปริมาณมาก ส่งผลให้สารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม สำหรับวิธีการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเป็นการนำจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันมาช่วยในการบำบัดน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต้นทุนต่ำ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน เช่น *Staphylococcus warneri, Bacillus cereus* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น โดยมีการนำ *Acinetobacter gerneri* มาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดไขมันในน้ำเสียเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีประสิทธิภาพเท่ากับ 52.62±12.48% (อูน, 2560) และ *Bacillus pumilus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันเป็นระยะเวลา 32 ชั่วโมง เฉลี่ย 85.19±0.27% (สุชัญญา และมาริสา, 2561)

นภัสวรรณ และนันทริกานต์ (2565) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากบ่อบำบัดไขมันและรางน้ำทิ้งจากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมันและไขมัน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ A, B, C, D และ E โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ E ให้บริเวณใสบนอาหาร Tributyrin agar เป็นวงกว้างที่สุด ซึ่งคาดว่ามีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ดี จากการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rRNA gene ของเชื้อสายพันธุ์ E พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Burkholderia gladioli* 100% จึงนำเชื้อดังกล่าวมาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ รวมทั้งศึกษาการอยู่รอดของ *Burkholderia gladioli* ในน้ำเสียจริงที่มีน้ำมันและไขมันปนเปื้อน

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli*

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ *Burkholderia gladioli* ในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

1.2.3 เพื่อศึกษาการอยู่รอดของ *Burkholderia gladioli* ในน้ำเสียจริง

## 1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

### 1.3.1 ขอบเขตด้านเนื้อหา

1.3.1.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli*

1.3.1.2 *Burkholderia gladioli* ที่แยกได้จากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (นภัสวรรณ และนันทริกานต์, 2565)

1.3.1.3 น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการเติมน้ำมันและไขมัน (จุฑากานต์, 2552)

1.3.1.4 ศึกษาประสิทธิภาพของ *Burkholderia gladioli* ในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น และความเข้มข้นของน้ำมันและไขมันเริ่มต้น

1.3.1.5 ศึกษาการอยู่รอดของ *Burkholderia gladioli* ในน้ำเสียจริง

### 1.3.2 ขอบเขตด้านสถานที่

ทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 1.3.3 ขอบเขตด้านระยะเวลา

การศึกษาครั้งนี้ใช้เวลาในการศึกษาค้นคว้าและทดลองเป็นระยะเวลา 11 เดือน (ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2566 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2567)

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลพื้นฐานในการย่อยน้ำมันและไขมันของ *Burkholderia gladioli* เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้กับระบบบำบัดน้ำเสียจริงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ลิปิด (Lipid)

### 2.1.1 คำจำกัดความ

ลิปิดเป็นชีวโมเลกุลที่ประกอบด้วยธาตุที่สำคัญ 3 ชนิด คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยมีอัตราส่วนของออกซิเจนน้อยมาก (ดาวัลย์ ฉิมภู่ , 2555) ซึ่งลิปิดเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลาย ทั้งที่เป็นกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดไขมัน (Fatty acid) เป็นสารประเภทเอสเทอร์ เช่น ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) และไข (Wax) ไขมันมีสมบัติทางกายภาพ คือ ไม่ละลายน้ำ หรือละลายน้ำได้ไม่ดี แต่ละลายลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เบนซิน อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน เป็นต้น เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของลิปิดไม่มีขั้ว (Non polar) หรือมีขั้วน้อยมาก (พจน์ และคณะ, 2555)

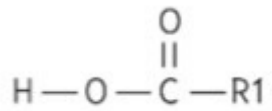
ไขมัน (Fat) และน้ำมัน (Oil) เป็นลิปิดชนิดหนึ่ง เช่น น้ำมันหมู น้ำมันสัตว์ และน้ำมันพืชต่าง ๆ ซึ่งไขมันเป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวตั้งแต่ 10 อะตอมขึ้นไป ส่วนน้ำมันเป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว ไขมันและน้ำมันต่างกันที่จุดหลอมเหลว คือ ไขมันจะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง และน้ำมันจะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง

### 2.1.2 อนุพันธ์ของลิปิด

อนุพันธ์ของลิปิด เป็นสารที่เมื่อทำปฏิกิริยาเคมีกันแล้วได้เป็นลิปิดอย่างง่าย หรือลิปิดเชิงซ้อน ในทางกลับกันเมื่อเกิดปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ (Hydrolysis) ลิปิดอย่างง่าย หรือลิปิดเชิงซ้อน ก็จะได้อนุพันธ์ของลิปิดกลับคืนมาโดยที่สารเหล่านี้ยังคงมีสมบัติของลิปิดอยู่ อนุพันธ์ของลิปิดที่สำคัญ คือ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และแอลกอฮอล์ ซึ่งแอลกอฮอล์ที่พบได้บ่อยคือ กลีเซอรอล

**2.1.2.1 กรดไขมัน (Fatty acid)** (พจน์ และคณะ, 2555)

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ประเภทหนึ่ง มีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) เชื่อมต่อกับ ไฮโดรคาร์บอน ดังรูปที่ 2.1 มีสูตรทั่วไปคือ R-C00H และจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมเลกุลมาก จะทำให้ละลายน้ำได้น้อยลง ซึ่งกรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัว

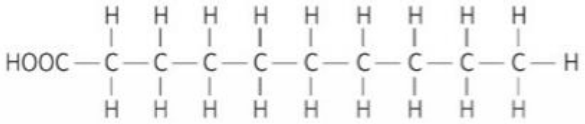



**รูปที่ 2.1** โครงสร้างกรดไขมัน

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

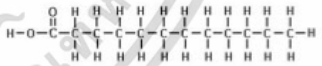
กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่ไม่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุล ดังรูปที่ 2.2 ไม่สามารถรับไฮโดรเจน หรือธาตุอื่นใดเข้าไปในโมเลกุลได้อีก เช่น กรดปาล์มิติก (Palmitic acid), กรดสเตียริก (Stearic acid) และ กรดลอริก (Lauric acid) เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.1



**รูปที่ 2.2** โครงสร้างกรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid)

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

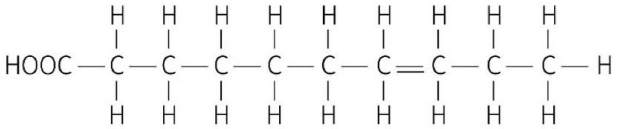
**ตารางที่ 2.1** ตัวอย่างกรดไขมันอิ่มตัว

| ชนิด | สูตรโมเลกุล | แหล่งกำเนิด | โครงสร้าง |
|---|---|---|---|
| Palmitic acid | $C_{15}H_{31}COOH$ | น้ำมันปาล์มและไขมันสัตว์ | |
| Stearic acid | $C_{17}H_{35}COOH$ | ไขมันพืชและสัตว์ | |
| Lauric acid | $C_{11}H_{23}COOH$ | น้ำมันมะพร้าว |  |

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่หนึ่งพันธะคู่ ไปจนถึงหลาย ๆ พันธะคู่ ดังรูปที่ 2.3 ซึ่งสังเกตได้ว่า หากมีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ พันธะคู่จะอยู่ห่างกัน 3 คาร์บอนอะตอม เช่น กรดปาล์มิโตเลอิก (Palmitoleic acid), กรดโอเลอิก (Oleic acid) และ กรดลิโนเลอิก(Linoleic acid) เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.2

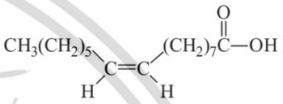
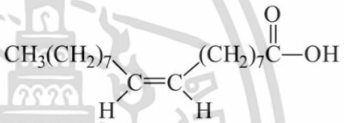
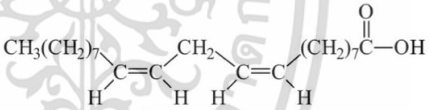
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.3** โครงสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid)

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

**ตารางที่ 2.2** ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัว

| ชนิด | สูตรโมเลกุล | แหล่งกำเนิด | โครงสร้าง |
|---|---|---|---|
| Palmitoleic acid | $C_{16}H_{30}O_2$ | น้ำมันปาล์ม |  |
| Oleic acid | $C_{18}H_{34}O_2$ | ไขมันพืช |  |
| Linoleic acid | $C_{18}H_{32}O_2$ | น้ำมันถั่วเหลือง |  |

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

สมบัติทางกายภาพของกรดไขมัน

สมบัติทางกายภาพของกรดไขมัน ขึ้นกับจำนวนอะตอมคาร์บอน และพันธะคู่ที่อยู่ในโมเลกุล ซึ่งส่งผลถึงสมบัติต่าง ๆ ที่สำคัญ เช่น การละลายน้ำ จุดหลอมเหลว เป็นต้น

1. การละลายน้ำ กรดไขมันที่มีสายโซ่ยาว $C_{16}$ - $C_{18}$ ไม่สามารถละลายน้ำได้ เพราะโครงสร้างโมเลกุลมีสายไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้วอยู่มาก

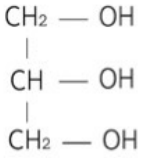
2. จุดหลอมเหลว กรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนมาก จะมีจุดหลอมเหลวสูงกว่ากรดไขมันที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนน้อย

**2.1.2.2 กลีเซอรอล (Glycerol)** (พจน์ และคณะ, 2555)

กลีเซอรอล คือ แอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีคาร์บอน 3 อะตอมต่อกัน และมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ต่อกับคาร์บอน 3 หมู่ ดังรูปที่ 2.4 จึงทำให้ละลายในน้ำได้ดี มีสมบัติในการดูดจับน้ำได้ดี (Hydroscopic) กลีเซอรอลมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นพอลิออล (Polyol) เป็นของเหลว ใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีรสหวานเล็กน้อย กลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบหลักในโมเลกุลของไตรกลีเซอร์ไรด์ ซึ่งได้จากการรวมตัวของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน 3 โมเลกุล



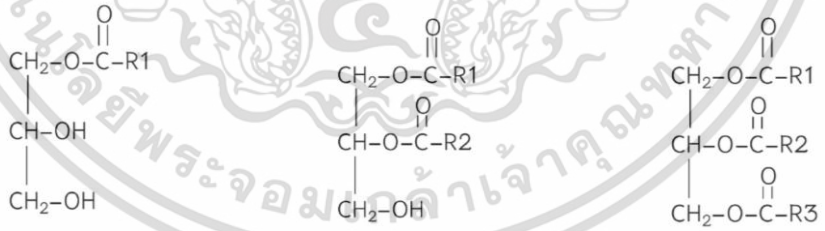
**รูปที่ 2.4** โครงสร้างกลีเซอรอล

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

**2.1.3 ประเภทของลิปิด**

ลิปิดแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ตามองค์ประกอบทางเคมี ดังนี้

**2.1.3.1 ลิปิดอย่างง่าย (Simple lipids)** เป็นสารประกอบเอสเทอร์ที่มีสมบัติเป็นกลาง (Neutral lipid) เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งกลีเซอรอล จัดเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมัน จะได้เป็นโมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) ดังรูปที่ 2.5 (a), ไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) ดังรูปที่ 2.5 (b) และไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ดังรูปที่ 2.5 (c) ขึ้นอยู่กับจำนวนของกรดไขมันที่เกาะอยู่กับกลีเซอรอล 1, 2 หรือ 3 โมเลกุล ตามลำดับ โดยทั่วไปไตรกลีเซอไรด์ ถ้ามีสถานะเป็นของแข็งจะเรียกว่าไขมัน ถ้าสถานะเป็นของเหลวจะเรียกว่าน้ำมัน ถ้าเป็นแอลกอฮอล์ชนิดอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่ากลีเซอรอลมาทำปฏิกิริยากับกรดไขมันจะได้ไข (Waxs)



(a) (b) (c)

**รูปที่ 2.5** โครงสร้าง โมโนกลีเซอไรด์ (a), ไดกลีเซอไรด์ (b) และไตรเซอไรด์ (c)

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

สมบัติทางกายภาพของลิปิดอย่างง่าย (Simple lipids)

โครงสร้างทางเคมีของไตรกลีเซอไรด์ มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบในสัดส่วนที่ค่อนข้างมาก ดังนั้นสมบัติต่าง ๆ จึงขึ้นอยู่กับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ โดยสมบัติทางกายภาพมีดังนี้

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

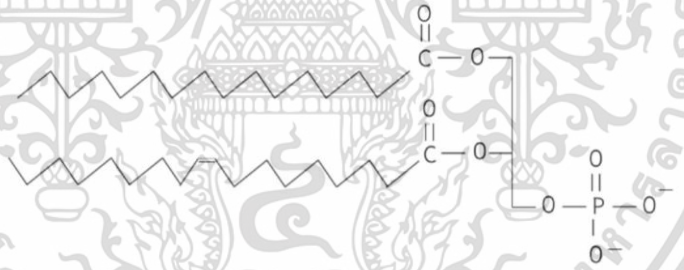
1. การละลาย ลิปิดอย่างง่ายทุกชนิดไม่ละลายน้ำและไม่สร้างไมเซลล์ (Micelle) ส่วนพวกโมโนกลีเซอรอล (Monoglycerol) และไดเอซิลกลีเซอรอล (Diacylglycerol) มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่อิสระ จึงมีความเป็นขั้วมากกว่า สร้างไมเซลล์ (Micelle) ได้ ไตรกลีเซอไรด์สามารถละลายได้ในตัวทำละลาย เช่น คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เบนซีน (Benzene) อีเทอร์ (Ether) เป็นต้น

2. จุดหลอมเหลว น้ำมันหรือไขมันในพืชส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว จึงเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ส่วนน้ำมันและไขมันในสัตว์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว จึงมีจุดหลอมเหลวสูงและเป็นของแข็งหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลวในอุณหภูมิห้อง

3. สี กลิ่น รส น้ำมันและไขมันที่บริสุทธิ์จะไม่มีสี กลิ่น รส แต่ทิ้งไว้ในอากาศระยะหนึ่งจะเกิดสีเหลือง และเปลี่ยนจากสภาวะกลางกลายเป็นกรด เพราะถูกออกซิเจนในอากาศออกซิไดซ์พันธะคู่ในโมเลกุลได้แอลดีไฮด์ซึ่งมีกลิ่นเหม็นหืน

**2.1.3.2 ลิปิดเชิงซ้อน (Compound lipids)** เป็นลิปิดที่มีสารอื่นเป็นองค์ประกอบด้วย ซึ่งมี 3 ประเภท คือ

2.1.3.2.1 ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) คือ ลิปิดซึ่งเกิดจากการรวมตัวของกลีเซอรอล 1 โมเลกุล กรดไขมัน 2 โมเลกุล และกรดฟอสฟอริก 1 โมเลกุล ในโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่าฟอสโฟพาทีดิคแอซิด (Phosphatidic acid) ดังรูปที่ 2.6

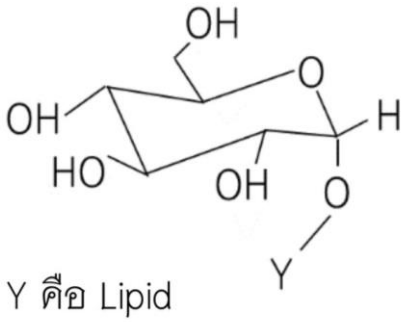


**รูปที่ 2.6** โครงสร้างฟอสโฟพาทีดิคแอซิด (Phosphatidic acid)

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

2.1.3.2.2 ไกลโคลิปิด (Glycolipid) เป็นลิปิดประเภทสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างน้ำตาล หรือพอลิแซ็กคาไรด์กับลิปิด โครงสร้างโมเลกุลของไกลโคลิปิด ประกอบด้วย กลีเซอรอล กรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) ดังรูปที่ 2.7

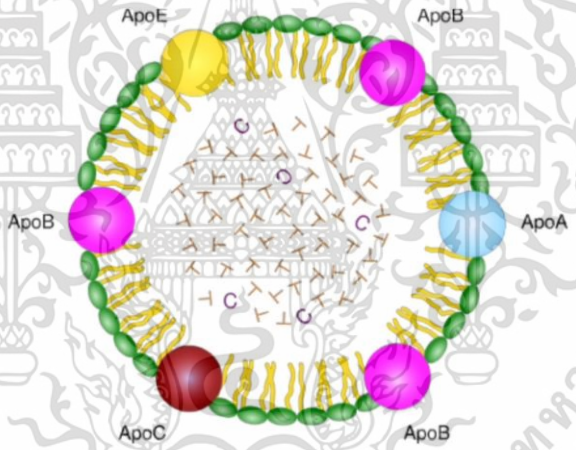
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.7** โครงสร้างไกลโคลิปิด

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

2.1.3.2.3 ไลโปโปรตีน (Lipoprotein) เป็นลิปิดเชิงซ้อนที่มีส่วนประกอบของลิปิด และโปรตีนโครงสร้างไลโปโปรตีน ดังรูปที่ 2.8




**รูปที่ 2.8** โครงสร้างไลโปโปรตีน

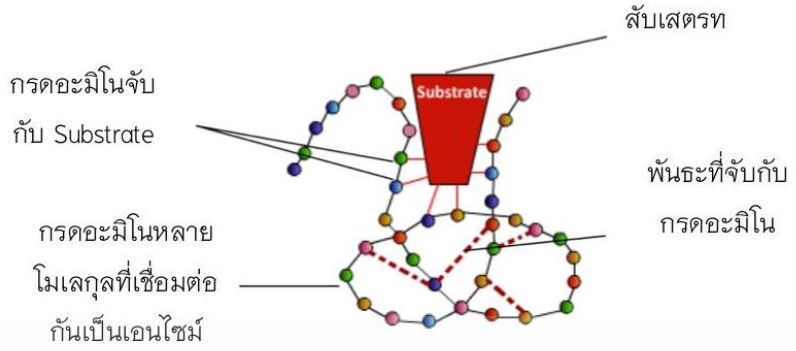
**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

## 2.2 เอนไซม์ไลเปส

### 2.2.1 คำจำกัดความและประเภทของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ คือโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (Biological catalyst) และเกิดกระบวนการย่อยสลายสารต่าง ๆ (Catabolism) การสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล (Anabolism) รวมทั้งการทำงานของฮอร์โมนล้วนต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ทั้งสิ้น การทำงานของเอนไซม์มีลักษณะแบบเดียวกับคะตาลิสต์ (Catalyst) ซึ่งเอนไซม์จะจับกับสับเสตรท (Substrate) ดังรูปที่ 2.9 ส่งผลทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยา และได้เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง (Rcja, N. Z. et al., 2012)

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

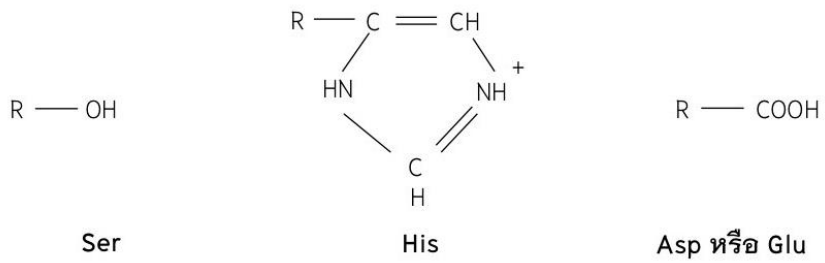



**รูปที่ 2.9** การจับสับสเตรทของเอนไซม์

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

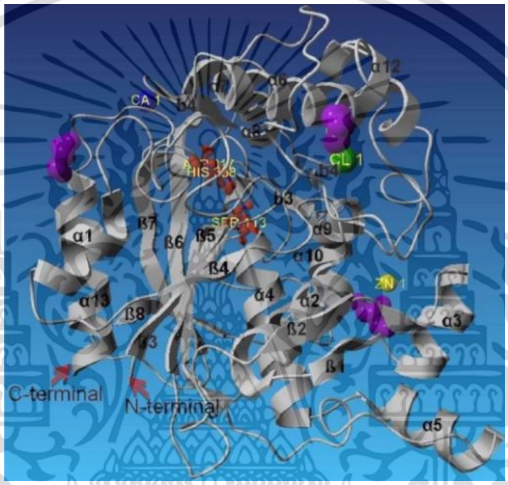
เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของไฮโดรเลส (Hydrolase) มีชื่อตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (Triacylglycerol acyl hydrolase) และมีรหัสคือ E.C.3.1.1.3 เอนไซม์ไลเปสจะจับกับโมเลกุลของน้ำมันและไขมัน ซึ่งเป็นสับเสตรท จากนั้นจะเร่งให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส โดยจะสลายพันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน โมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสมีลักษณะรูปร่างทรงกลม หรือรี และบริเวณศูนย์กลางของโมเลกุลมีรอยแยกขนาดใหญ่ ซึ่งบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ไลเปสจะอยู่ภายในรอยแยกนี้ และบริเวณเร่งนี้จะมีกรดอะมิโน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ไลเปสทุกชนิดมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุล ในรูปแบบเดียวกัน คือ รูปแบบที่เรียกว่า α β-hydrolase fold ซึ่งประกอบด้วยแกนกลางที่เป็นแผ่นพับเบต้าแบบขนานกัน (Parallel β-sheets) เป็นส่วนใหญ่ล้อมรอบด้วยเกลียวแอลฟา (α-helicase) การจัดเรียงตัวแบบนี้ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน 3 ชนิดในทิศทาง และ ตำแหน่งที่เหมาะสม ส่งผลให้เกิดการเร่งปฏิกิริยา โดยบริเวณเร่งปฏิกิริยา (Catalytic site) ประกอบด้วยกรดอะมิโน ดังนี้ เซรีน (Serine ; Ser), ฮีสทีดีน (Histidine ; His), กลูตามีน(Glutamine ; Glu) หรือ แอสพาร์ติก (Aspartic acid ; Asp) โดยโครงสร้างของกรดอะมิโน แสดงรูปที่ 2.10 โครงสร้างของเอนไซม์ไลเปสมีกรดอะมิโนเรียงตัวเป็นรูปร่างเกลียว (α-helix) ปกคลุมอยู่เรียกว่า ฝาปิด (Lid หรือ Flap) ซึ่งฝานี้จะเปิดออกเมื่อเกิดการกระตุ้นที่บริเวณผิวสัมผัส เพื่อให้โมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสเกิดการเร่งปฏิกิริยา แสดง ดังรูปที่ 2.11 ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ และพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำ ได้กลีเซอรอลและกรดไขมันเป็นผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.10** โครงสร้าง Ser, His และ Asp หรือ Glu

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)




**รูปที่ 2.11** โครงสร้างเอนไซม์ไลเปส

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

## 2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 2.3 ซึ่งพบได้ทั่วไป เช่น น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมผลิตนม เนย ขนมปัง อุตสาหกรรมผลิตน้ำมันพืช น้ำทิ้งจากร้านอาหาร และตลาดสด นอกจากนี้ยังพบได้ในดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน กองปุ๋ย บ่อน้ำพุร้อน และเมล็ดพืชที่มีการผลิตน้ำมัน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.3** จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส (มาริสา, 2560)

| จุลินทรีย์ | ชนิดของจุลินทรีย์ | อ้างอิง |
|---|---|---|
| แบคทีเรีย | | |
| แบคทีเรียแกรมบวก | *Lactobacillus sp.,* | Haliru, M. and Bukola, C., |
| | *Bacillus sp.,* | 2012 |
| | *Bacillus subtilis,* | Prasad, M. P. and |
| | *Staphylococcus aureus* | Manjunath, K., 2011 |
| แบคทีเรียแกรมลบ | *Artrobacter sp.,* | Haliru, M. and Bukola, C., |
| | *Acinetobacter calcoaceticus,* | 2012 |
| | *Acinetobacter sp.,* | Abdelali, F. et al., 2011 |
| | *Pseudomonas sp.,* | Matsumiya, Y. et al., 2007 |
| | *Burkholderia sp.,* | |
| รา | *Trichoderma sp.,* | Haliru, M. and Bukola, C., |
| | *Trichoderma minutisporum* | 2012 |
| | *Trichoderma pleuroticola,* | |
| | *Trichoderma ressei,* | |
| | *Trichoderma fertile,* | |
| | *Aspergillus sp.,* | |
| | *Hypocrea patella,* | |
| | *Hypocrea stilbohypoxyli,* | |
| | *Hypocrea neorufa* | |
| ยีสต์ | *Candida sp.,* | Haliru, M. and Bukola, C., |
| | *Yarrowwia sp.* | 2012 |

## 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

การผลิตเอนไซม์ไลเปสจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด อุณหภูมิ ที่ใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส (จุฑากานต์, 2552) มีดังนี้

1. แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ และเป็นแหล่งพลังงานแหล่งใหญ่ที่ใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไร้อากาศนั้นจะต้องการแหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในกระบวนการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอน ประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในกระบวนการสังเคราะห์เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ซึ่งพบทั้งในโปรตีน และกรดนิวคลีอิก ไนโตรเจนเป็นโมเลกุลที่ประกอบเป็นโครงสร้างของเซลล์ หรือเอนไซม์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม ส่วนกรดนิวคลีอิกพบว่า เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนภายในเซลล์จุลินทรีย์ ไนโตรเจนสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และโปรตีน ซึ่งเซลล์จุลินทรีย์จะมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ 8 -10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ ไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ ได้แก่ เปปโตน (Peptone) ทริปโตน (Tryptone) สารสกัดจากยีสต์ และสารสกัดจากเนื้อ เป็นต้น ส่วนไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium chloride) เป็นต้น นอกจากนี้มีการนำกากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง น้ำแช่ข้าวโพด ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับจุลินทรีย์

3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเสถียรภาพของเอนไซม์ จุลินทรีย์ในกลุ่ม Acidophiles เจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำ จุลินทรีย์ในกลุ่ม Neutophiles เจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นกลาง จุลินทรีย์ในกลุ่ม Alkalophiles เจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นเบส และหากความเป็นกรด-ด่าง (pH) เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อผลการผลิตเอนไซม์ และกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์

4.อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อกระบวนการทำงาน การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเสถียรภาพของเอนไซม์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกันออกไป โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม Psychopiles เจริญได้ดีในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ในกลุ่ม Mesophiles เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิประมาณ 25 - 45 องศาเซลเซียส และจุลินทรีย์ในกลุ่ม Thermophiles เจริญได้ดีในอุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะต้องทำการเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งอุณหภูมิจะมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีต่าง ๆ ภายในเซลล์ให้ดำเนินต่อไปได้โดยที่ไม่ส่งผลรบกวนต่อเสถียรภาพของโปรตีนหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ถูกผลิตขึ้นในเซลล์

5. ระยะเวลา

ระยะเวลามีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ถ้าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่ดีจะส่งผลให้แบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาได้มาก และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันดียิ่งขึ้น ซึ่งการเจริญของแบคทีเรียแสดงดังรูปที่ 2.12 โดยการเจริญของแบคทีเรียแบ่งเป็น 4 ระยะ ดังนี้

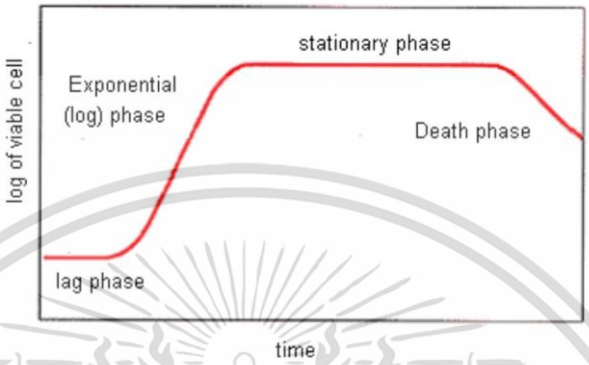
5.1 Lag phase เป็นระยะที่แบคทีเรียปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่เนื่องจากเป็นระยะที่ใส่แบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวนแบคทีเรียยังไม่เพิ่มขึ้น เพราะยังไม่เกิดการแบ่งเซลล์

5.2 Logarithmic phase หรือ Exponential phase หรือระยะ Log phase เป็นระยะที่แบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ คือ การแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่า ๆ กัน ระยะนี้อัตราการเจริญจะมากที่สุด เซลล์ว่องไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมากและรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 Stationary phase ระยะนี้แบคทีเรียจะมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวน ถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่จะเท่ากับอัตราการตาย

5.4 Death phase หรือ Decline phase เป็นระยะที่แบคทีเรียจะตายอย่างรวดเร็วและตายมากขึ้นจนสม่ำเสมอเป็น Exponential หรือ Logarithm สาเหตุการตายอาจเนื่องมาจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์หมดไป

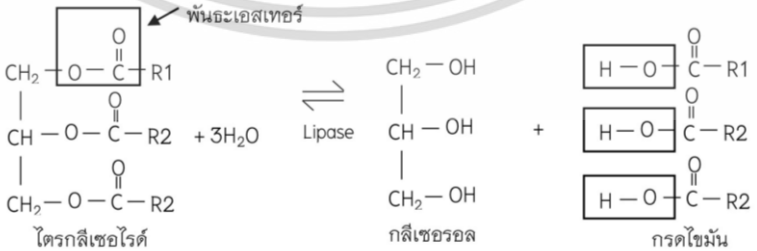



**รูปที่ 2.12** กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียต่อเวลาแบบกะ

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

## 2.5 กลไกการย่อยสลายน้ำมันและไขมันโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในเซลล์จะถูกขับออกมานอกเซลล์ และเกิดการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจะย่อยสลายโมเลกุลของน้ำมันและไขมันซึ่งเป็นไตรกลีเซอไรด์ชนิดหนึ่งโดยไปตัดพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมต่อระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลและหมู่คาร์บอกซิลของกรดไขมัน ดังรูปที่ 2.13 ซึ่งปฏิกิริยาอาจเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หรือไม่สมบูรณ์ก็ได้ ในกรณีการย่อยสลายน้ำมันและไขมันเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ไตรกลีเซอร์ไรด์จะถูกย่อยเป็นกรดไขมันกับโมโนกลีเซอไรด์ หรือไดกลีซอไรด์ก็ได้ แต่ถ้าเกิดการย่อยสลายน้ำมันและไขมันอย่างสมบูรณ์ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ กลีเซอรอลและกรดไขมัน




**รูปที่ 2.13** ปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

กรดไขมันจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการย่อยภายในเซลล์ โดยผ่านกระบวนการเบต้าออกซิเดชั่น (β-oxidation) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาในไมโทคอนเดรีย ประกอบด้วยปฏิกิริยา 4 ขั้นตอนดังนี้

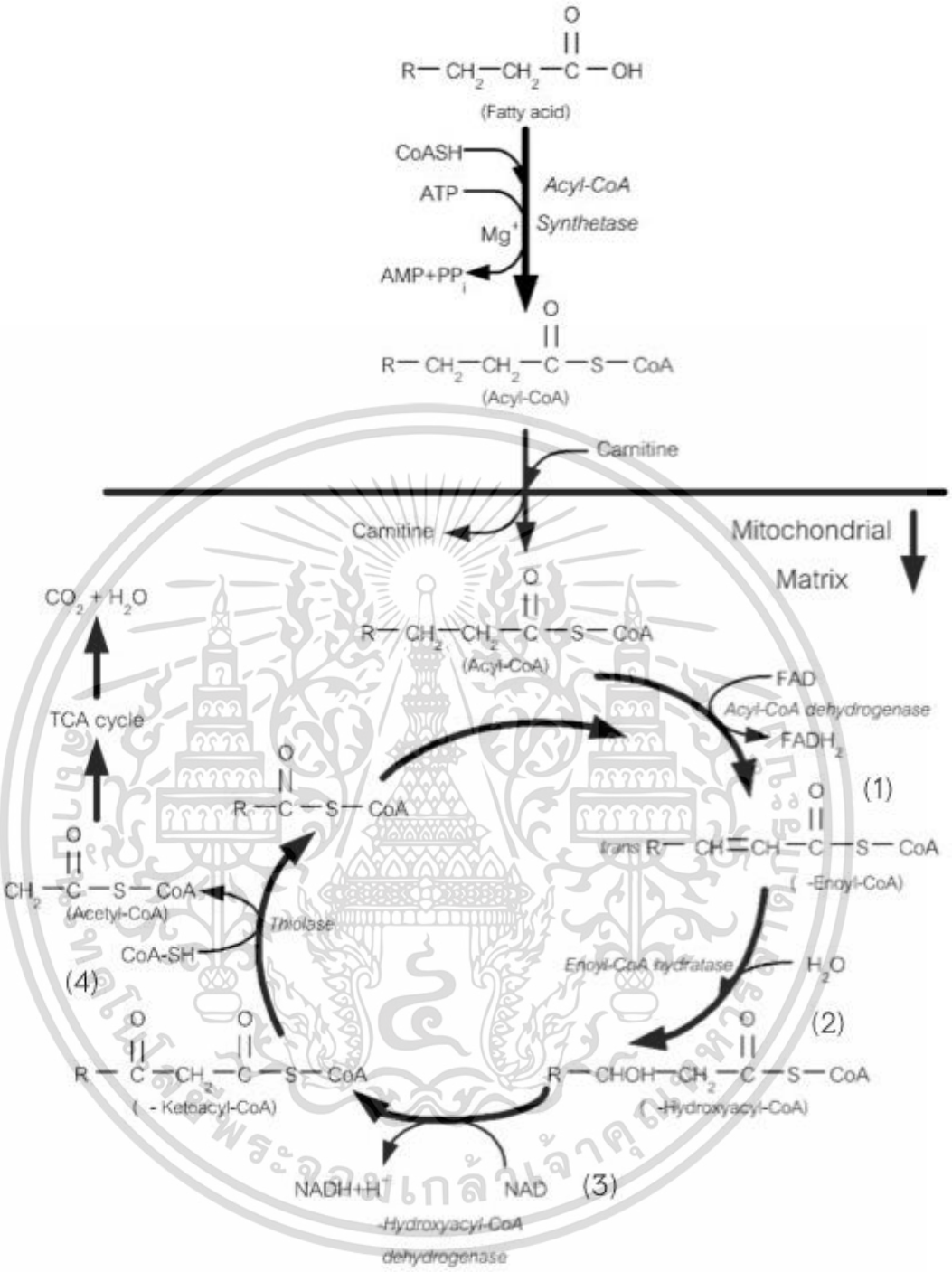
(1) ปฏิกิริยาการขจัดไฮโดรเจน (Dehydrogenation) ซึ่งมีเอนไซม์เอซิลโคเอดีไฮโดรจีเนส (Acyl-CoA dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และฟลาวินอดีนินไดนิวคลีโอไทด์ (Flavin Adenine Dinucleotide ; FAD) จะรับอะตอมของไฮโดรเจนที่ถูกดึงออกจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ส่งผลให้เกิดพันธะคู่ระหว่างอะตอมของคาร์บอนทั้งสอง โดยได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินออลโคเอ (Enoyl-CoA)

(2) ปฏิกิริยาการเติมน้ำ (Hydration) ซึ่งมีการเติมโมเลกุลของน้ำเข้าพันธะคู่ของ คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ได้ผลผลิตเป็นไฮดรอกซีเอซิลโคเอ (Hydroxyacyl-CoA) ซึ่งมีเอนไซม์อินออลโคเอไฮดราเทส (Enoyl-CoA hydratase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(3) ปฏิกิริยาการขจัดไฮโดรเจน (Dehydrogenation) ซึ่ง ไฮดรอกซีเอซิลโคเอ (Hydroxyacyl-CoA) จะถูกเปลี่ยนเป็น คีโตเอซิลโคเอ (Ketoacyl-CoA ) โดยมีนิโคตินาไมด์อดีนินไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide ; $NAD^+$) เป็นตัวออกซิไดซ์ และมีเอนไซม์เป็นไฮดรอกซีเอซิลโคเอดีไฮโดรจีเนส (Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(4) ปฏิกิริยาการตัดพันธะไทโอเอสเทอร์ (Thiolytic cleavage) ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของวิถีเบต้าออกซิเดชั่น (β-oxydation) โดยจะตัดคาร์บอน 2 อะตอมออกจากโมเลกุลของกรดไขมัน และได้ผลิตภัณฑ์เป็น อะซีติลโคเอ (Acetyl-CoA) โดยมีเอนไซม์ไทโอเลส (Thiolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเข้าสู่วัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิกแอซิด (Tricarboxylic acid cycle) ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ รายละเอียดดังรูปที่ 2.14 (พจน์ และคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

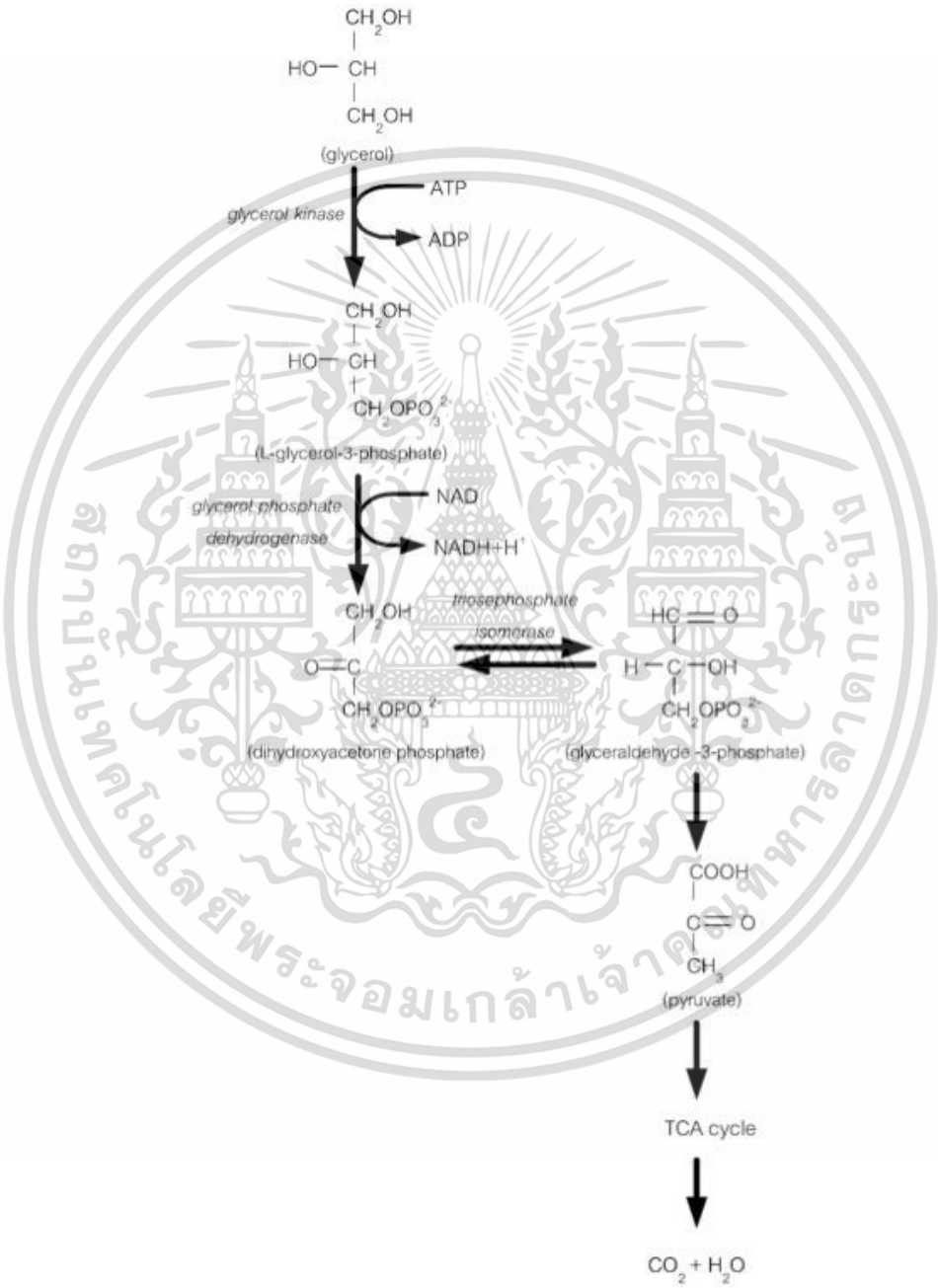



**รูปที่ 2.14** ปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดไขมัน

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการใช้กลีเซอรอล หมู่ฟอสเฟตจะถูกเติมให้กับกลีเซอรอล และถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต (Dihydroxy acetone phosphate) แล้วจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-phosphate) ซึ่งเป็นตัวกลางของวิถีไกลโคไลซิส ดังนั้นกลีเซอรอลจึงถูกเปลี่ยนแปลงเป็นไพรูเวต (Pyruvate) และเข้าสู่วัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิกแอซิด (Tricarboxylic acid cycle) ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ (สุรอรรถ, 2545) รายละเอียดดังรูปที่ 2.15




**รูปที่ 2.15** ปฏิกิริยาการย่อยสลายกลีเซอรอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ที่มา:** มาริสา อัตถาพงศ์ (2560)

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันซึ่งพบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จากสถานที่ที่มีลักษณะหลากหลาย และพบว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้อย่างดี Motsumiya, Y. et al (2007) ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันเพื่อประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน โดยคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน น้ำเสียที่ใช้ คือ น้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้ คือ *Burkhoderia* sp. ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) คือ 1,720 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยในการศึกษาใช้น้ำมันต่างชนิดกันคือ น้ำมันสลัด, น้ำมันมะกอก, น้ำมันงา และน้ำมันสัตว์ พบว่า แบคทีเรียมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันร้อยละ 96.7, 92 3, 90.1 และ 77.41 ตามลำดับ

Abooalfazl, A. and Bagher, M. (2014) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยคัดแยกแบคทีเรียจากปุ๋ยหมัก ซึ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้ คือ *Pseudomonas* sp. พบว่า แบคทีเรียมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) เท่ากับ 1.7-2.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร และการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน ที่เวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันที่ต่ำกว่า 8.4 กรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันร้อยละ 95

Bhumibhamon. et al (2002) ได้ทำการศึกษาคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน พบว่ามีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ และมี *Pseudomonas* sp. 4 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง คือ KUL8, KUL12, KULI7 และ KUL39 พบว่าเชื้อ KUL8 และ KUL39 ย่อยสลายไขมันได้ร้อยละ 88.8 1 และร้อยละ 81.69 นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้ร้อยละ 98 ถึงร้อยละ 99

Lauprasert. et al (2015) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในการย่อยสลายไขมันและบำบัดน้ำเสียของโรงอาหารมหาวิทยาลัย พบว่า *P. aeruginosa* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดความหนาของชั้นไขมันคือลดได้ร้อยละ 48.98 ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่า *B. subtilis* และ *S. epidermidis* ที่ลดได้ร้อยละ 32.65 และ 26.53 ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.001$)

นภัสวรรณ และนันทริกานต์ (2565) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากบ่อบำบัดไขมันและรางน้ำทิ้งจากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมันและไขมัน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ A, B, C, D และ E โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ E ให้บริเวณใสบนอาหาร Tributyrin agar เป็นวงกว้างที่สุด ซึ่งคาดว่ามีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ดี

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* เพื่อนำอุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุดมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น ความเข้มข้นน้ำมันและไขมันเริ่มต้น จากนั้นศึกษาการอยู่รอดในน้ำเสียจริง รายงานผลเป็น log ของจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) เพื่อสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันและไขมันในบ่อบำบัดไขมันต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ลบเปลี่ยนเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 จุลินทรีย์สายพันธุ์ E จาก นภัสวรรณ และนันทริกานต์ (2565)

## 3.2 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1 จานเพาะเชื้อ
3.2.2 ขวดรูปชมพู่
3.2.3 หลอดทดลอง
3.2.4 ปิเปตแก้ว
3.2.5 กระบอกตวง
3.2.6 ห่วงเขี่ยเชื้อ
3.2.7 บีกเกอผร์
3.2.8 ขวดเก็บสาร
3.2.9 กรวยแยก
3.2.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์
3.2.11 กรวยกรอง
3.2.12 ขาตั้งกรวยแยก
3.2.13 ตะแกรงหลอดทดลอง
3.2.14 ห่วงวงแหวนรองกรวยแยก
3.2.15 โถดูดความชื้น

## 3.3 เครื่องมือ

3.3.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical Balances) ยี่ห้อ OHAUS รุ่น PA214
3.3.2 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Mettler-Toledo รุ่น CH 8603
3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking Incubator) ยี่ห้อ gallenkamp
3.3.4 เครื่องไมโครเพลท (Microplate reader) ยี่ห้อ BMG LABTECH รุ่น FLUOstar Omega
3.3.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Hettich รุ่น MIKRO series
3.3.6 เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น Genie 2
3.3.7 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น UF75
3.3.8 ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety Cabinet) ยี่ห้อ Thermo Scientific™ รุ่น 1300 Series
3.3.9 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น IN/IF Series
3.3.10 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ TOMY รุ่น HV-25/50/95/110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 แบคโตเปปโตน ยี่ห้อ Hi-media
3.4.2 ผงสกัดจากเนื้อ ยี่ห้อ Hi-media
3.4.3 ผงสกัดจากยีสต์ ยี่ห้อ Hi-media
3.4.4 ยูเรีย (Urea) ยี่ห้อ KemAus
3.4.5 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4$) ยี่ห้อ SRL
3.4.6 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ยี่ห้อ SRL
3.4.7 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ยี่ห้อ KemAus
3.4.8 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ยี่ห้อ KemAus
3.4.9 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ยี่ห้อ KemAus
3.4.10 เฮกเซน (Hexane) ยี่ห้อ KemAus
3.4.11 Agar ยี่ห้อ Bioagars
3.4.12 Nutrient Broth (NB) ยี่ห้อ SRL
3.4.13 Tributyrin Agar ยี่ห้อ TCI

## ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

### 3.5 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

นำจุลินทรีย์สายพันธุ์ E ที่คัดแยกโดยนภัสวรรณ และนันทริกานต์ (2565) มาทำการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ โดยนำเชื้อ E มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar (NA)(ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม Tributyrin 1% จากนั้นเลือก 1 โคโลนี มาใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร Nutrient Broth (NB)(ภาคผนวก ก) 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร Nutrient Broth (NB) 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อ 50 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นเหวี่ยง 2 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 รอบ และเก็บตัวอย่างให้บริษัท gibthai ทำการเพิ่มปริมาณของยีน 16s rRNA จากนั้นหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) ที่ได้ ด้วยไพรเมอร์ 27F, 1492R, 518F และ 800R และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์ที่มีรายงานไว้ใน GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

### 3.6 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli*

#### 3.6.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำ *Burkholderia gladioli* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม Tributyrin 1% จากนั้นเลือก 1 โคโลนี มาใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร Nutrient Broth (NB) 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร Nutrient Broth (NB) 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

**3.6.2 การวัดการเจริญของ *Burkholderia gladioli***

นำเชื้อ 1 โคโลนีลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 30, 32, 35, 37, 42 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ และนำไปหาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญ โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เตรียมดังข้อ 3.6.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร Nutrient Broth (NB) 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 32, 35 และ37 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดอัตราการเจริญของเชื้อด้วยเครื่องไมโครเพลทที่ 600 นาโนเมตรทุก ๆ 1 ชั่วโมง ทั้งหมด 3 ซ้ำ จนกระทั่งการเจริญเติบโตของเชื้อคงที่ และนำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา

**3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของ *Burkholderia gladioli***

**3.7.1 การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์**

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์เพื่อใช้สำหรับการทดลอง โดยนำส่วนผสมทั้งหมด ได้แก่ แบคโตเปบโตน 0.6 กรัม ผงสกัดจากเนื้อ 0.4 กรัม ผงสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัม ยูเรีย 0.1 กรัม โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4$) 0.1 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.03 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) 0.014 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.014 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.01 กรัม (ดัดแปลงจากจุฑากานต์, 2552) มาใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ขวดละ 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำมันและไขมันตามความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (ดัดแปลงจาก จุฑากานต์, 2552)

**3.7.2 การศึกษาความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของ *Burkholderia gladioli***

ทำการทดสอบความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง ใช้เชื้อเริ่มต้นที่เตรียมดังข้อ 3.6.1 โดยปรับเวลาในการบ่มเป็น 9 ชั่วโมง ปิเปตหัวเชื้อ 1, 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และทำให้เป็นสารแขวนลอยเซลล์ โดยใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ ร้อยละ 1, 10, 20 และ 30 โดยปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นนำมาใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 3.7.1 ที่มีการเติมน้ำมัน 3 มิลลิลิตร บ่มและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุมเป็นน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการเติมน้ำมัน 3 มิลลิลิตรและไม่เติมเชื้อ ทำการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ด้วยวิธี pour plate โดยปิเปตเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มด้วยตู้บ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลเป็นโคโลนีที่เกิดขึ้นต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) และแปลงค่าเป็น log ของจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL)

**3.7.3 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของ *Burkholderia gladioli***

ทำการทดสอบการย่อยไขมันและน้ำมันที่ความเข้มข้นต่างๆของน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยใช้เชื้อเริ่มต้นดังข้อ 3.6.1 และใช้น้ำเสียสังเคราะห์ดังข้อ 3.7.1 ที่มีการเติมน้ำมันปริมาตร 1, 3, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตร ปิเปตเชื้อ 10 มิลลิลิตร มาใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ บ่มและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดปริมาณน้ำมันและไขมันโดยใช้กรวยแยก

**3.7.4 การทดสอบหาปริมาณน้ำมันและไขมันโดยใช้กรวยแยก (Partition gravimetric method)**

นำตัวอย่างน้ำเสียมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่าเท่ากับหรือต่ำกว่า 2 โดยใช้กรดซัลฟิวริกร้อยละ 50 โดยปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นเทตัวอย่างจากขวดรูปชมพู่ใส่ในกรวยแยก เติมเฮกเซนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก ทำการสกัดน้ำมันและไขมัน โดยเขย่าแรง ๆ นาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น ซึ่งชั้นเฮกเซนจะอยู่ข้างบนและตัวอย่างน้ำจะอยู่ข้างล่าง จากนั้นถ่ายชั้นของตัวอย่างน้ำไว้ในขวดรูปชมพู่เดิม เพื่อนำมาสกัดซ้ำ สำหรับส่วนชั้นของเฮกเซนให้ถ่ายลงบีกเกอร์ ทำการสกัดซ้ำด้วยวิธีเดียวกันจนกระทั่งน้ำมันและไขมันถูกสกัดออกจนหมด นำบีกเกอร์ที่มีเฮกเซน น้ำมันและไขมัน ไประเหยในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนแห้งปราศจากความชื้น แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนัก นำไปคำนวณปริมาณน้ำมันและไขมัน (ภาคผนวก ข)

## 3.8 การศึกษาระยะเวลาที่เชื้อสามารถทนอยู่ได้ในน้ำเสียจริง

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อดักไขมัน เมื่อวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2567 โรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ดังรูป ด ภาคผนวก ค นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วแล้ว นำเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมจากข้อ 3.6.1 โดยความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร บ่มเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปตรวจดูจุลินทรีย์ที่มีชีวิตด้วยวิธี pour plate โดยตรวจสอบทุกวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

## 4.1 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ส่งตัวอย่างแบคทีเรียสายพันธุ์ E ให้บริษัท gibthai ทำการเพิ่มปริมาณของยีนบริเวณ 16s rRNA จากนั้นหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) ที่ได้จากไพร์เมอร์ 27F, 1492R, 518F และ 800R ได้ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA ที่มีความยาวขนาด 1444 คู่เบส เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์ที่มีรายงานไว้ใน GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) จุลินทรีย์สายพันธุ์ E มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับจีโนมของ *Burkholderia gladioli* (accesion no. MK474978.1) ร้อยละ 100 ดังรูปที่ 4.1 ดังนั้นจุลินทรีย์สายพันธุ์ E คือ *Burkholderia gladioli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ต้องการอากาศในการเจริญ มีรูปร่างท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ และเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (Hyeran, M. et al 2017) โคโลนีสีขาว กลม ขอบใส ขอบเรียบ สร้างสารสีเหลืองบนอาหาร Nutrient Agar (NA) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 0.66 ไมครอน (บุณยาพร และศิริพร, 2562) และ Martins, P. et al (2022) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ *Burkholderia gladioli* BRM58833 พบว่าสามารถหลั่งเอนไซม์อัลคาไลน์ไลเปส (alkaline lipase) ได้ และอรพิน (2546) กล่าวว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ไลเปสนอกจากจำเพาะต่อน้ำมันปาล์มโอเลอินแล้ว ยังมีความจำเพาะต่อน้ำมันมะกอก น้ำมันปลา และน้ำมันถั่วเหลืองได้ดีอีกด้วย เนื่องจากไตรเอซิลกลีเซอรอลส่วนใหญ่ของน้ำมันเหล่านี้ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลางและสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Job Title** | **Nucleotide Sequence** |
| **RID** | 3MC4GHUC013 *Search expires on 05-08 21:45 pm* Download All |
| **Program** | BLASTN Citation |
| **Database** | nt See details |
| **Query ID** | lcl\|Query_5839889 |
| **Description** | None |
| **Molecule type** | dna |
| **Query Length** | 1444 |
| **Other reports** | Distance tree of results MSA viewer |

**Sequences producing significant alignments** Download Select columns Show 100

select all *100 sequences selected* GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

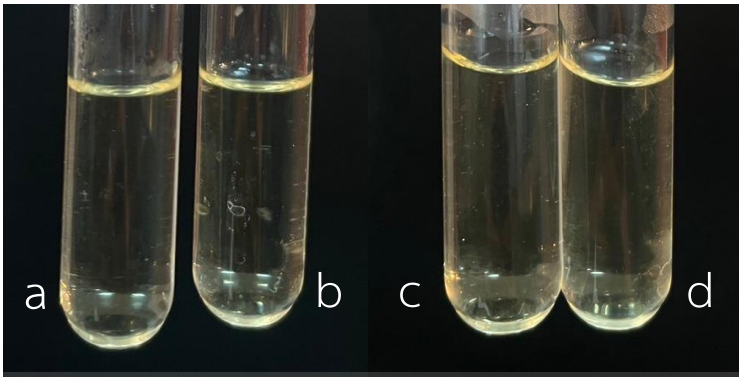
| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Burkholderia gladioli strain E30CS3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1460 | MK474978.1 |
| Burkholderia gladioli pv. gladioli strain FDAARGOS_188 chromosome 1, complete sequence | Burkholderia gladioli pv. gl... | 2667 | 7969 | 100% | 0.0 | 100.00% | 4668533 | CP022213.1 |
| Burkholderia gladioli pv. gladioli strain KACC 11889 chromosome 1, complete sequence | Burkholderia gladioli pv. gl... | 2667 | 7990 | 100% | 0.0 | 100.00% | 4668350 | CP022005.1 |
| Burkholderia gladioli strain KRS027 chromosome 2, complete sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 5327 | 100% | 0.0 | 100.00% | 3892275 | CP121774.1 |
| Burkholderia gladioli strain KRS027 chromosome 1, complete sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 8003 | 100% | 0.0 | 100.00% | 4187756 | CP121773.1 |
| Burkholderia gladioli strain ATCC 10248 chromosome 1, complete sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 7997 | 100% | 0.0 | 100.00% | 4668573 | CP009323.1 |
| Burkholderia sp. strain QY-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia sp. | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1496 | OP542553.1 |
| Burkholderia gladioli strain IHB B 15123 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1499 | KM817205.1 |
| Burkholderia gladioli strain GO337697.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1496 | ON000856.1 |
| Burkholderia gladioli strain MZ664043.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1499 | ON000855.1 |
| Burkholderia gladioli strain MZ664044.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1500 | ON000854.1 |
| Burkholderia gladioli strain KM817205.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1499 | ON000853.1 |
| Burkholderia gladioli strain MK474978.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1460 | ON000851.1 |
| Burkholderia glumae strain M6-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia glumae | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1500 | MZ664044.1 |
| Burkholderia plantarii strain M1-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia plantarii | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1499 | MZ664043.1 |
| Burkholderia gladioli strain S9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Burkholderia gladioli | 2667 | 2667 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1496 | GQ337697.1 |

**รูปที่ 4.1** ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ *Burkholderia gladioli* กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn)

## 4.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli*

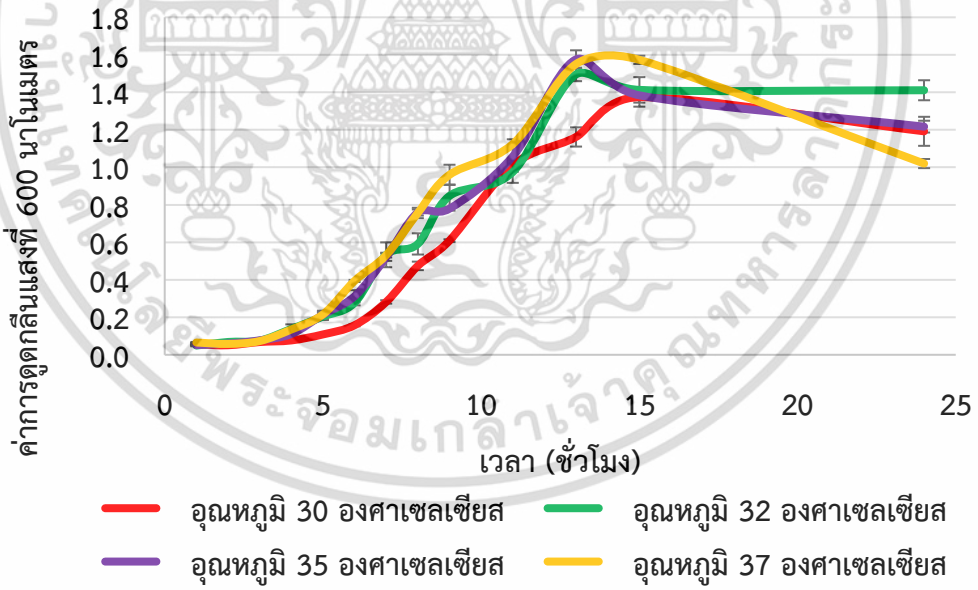
ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเบื้องต้นโดยนำ *Burkholderia gladioli* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่มีการเติม Tributyrin จากนั้นนำเชื้อลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 30, 32, 35, 37, 42 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 42 และ 45 องศาเซลเซียส ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อที่ 24 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.2 สอดคล้องกับนภัสวรรณ และนันทริกานต์ (2565) ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากรางน้ำเสีย ที่อุณหภูมิ 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Tributyrin agar และ Phenol red oil agar เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ A, B, C, D และ E เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเท่านั้น และที่อุณหภูมิ 42 และ 50 องศาเซลเซียส ไม่มีการเจริญของเชื้อ ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ E เป็นเชื้อตัวเดียวกันกับโครงงานพิเศษนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.2** การเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ในอาหารเหลว
ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยมี ชุดควบคุม (a) และ ชุดตัวอย่างที่ใส่เชื้อ (b)
ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยมี ชุดควบคุม (c) และ ชุดตัวอย่างที่ใส่เชื้อ (d)

หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญโดยนำหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1 ลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) และนำไปบ่มเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30, 32, 35 และ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นไปวัดการเจริญ ด้วยเครื่องไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาได้ดังรูปที่ 4.3




**รูปที่ 4.3** การเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 30, 32, 35 และ 37 องศาเซลเซียส

จากกราฟแสดงการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 30, 32, 35 และ 37 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาหาอัตราการเจริญจำเพาะ พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีอัตราการเจริญจำเพาะดีที่สุดเท่ากับ 0.5430 เมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 30, 32 และ 35 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.4266, 0.4589 และ 0.5022 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งสอดคล้องกับ Kowalska. et al (2015) ที่พบว่า *Burkholderia gladioli* สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 30-43 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับนำมาศึกษาความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของ *Burkholderia gladioli* ต่อไป

**ตารางที่ 4.1** ผลของอุณหภูมิที่มีต่ออัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) ของ *Burkholderia gladioli*

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | อัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) |
|---|---|
| 30 | 0.4266 |
| 32 | 0.4589 |
| 35 | 0.5022 |
| 37 | 0.5430 |

## 4.3 การศึกษาความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของ *Burkholderia gladioli*

การศึกษาประสิทธิภาพของ *Burkholderia gladioli* ในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันโดยเตรียมความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 1, 10, 20 และ 30 โดยปริมาตรต่อปริมาตร บ่มและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 1, 10, 20 และ 30 โดยปริมาตรต่อปริมาตร มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 10.97, 11.97, 13.28 และ 13.45 log CFU/mL ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 1, 10, 20 และ 30 โดยปริมาตรต่อปริมาตรมีความเข้มข้นน้ำมันและไขมันก่อนการทดลองเท่ากับ 30.00±0.00, 30.02±0.00, 30.00±0.00 และ 30.01±0.01 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นน้ำมันและไขมันหลังการทดลองเท่ากับ 28.61±0.02, 27.15±0.02, 25.00±0.06 และ 23.05±0.01 กรัมต่อลิตร และมีร้อยละของน้ำมันและไขมันที่ย่อยสลายได้เท่ากับ 4.64 ±0.68, 9.54±0.39, 16.66±2.05 และ 23.19±0.31 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบผลการย่อยสลายน้ำมันและไขมันทางสถิติ (ภาคผนวก ง) พบว่าที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 1 และร้อยละ 10 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันไม่แตกต่างกันแต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 20 และ 30 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 30 โดยปริมาตรต่อปริมาตร มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์สูงสุดร้อยละ 23.19±0.31 ดังรูปที่ 4.4 เมื่อความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมา เพื่อย่อยสลายโมเลกุลของน้ำมันและไขมัน โดยเอนไซม์ไลเปสจะจับกับโมเลกุลของน้ำมันและไขมัน จากนั้นจะเกิดการเร่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ (Hydrolysis) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจะไปตัดพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมต่อระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลกับหมู่คาร์บอกซิลของกรดไขมัน และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (Aysun, A., 2009)

**ตารางที่ 4.2** จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหัวเชื้อเริ่มต้น

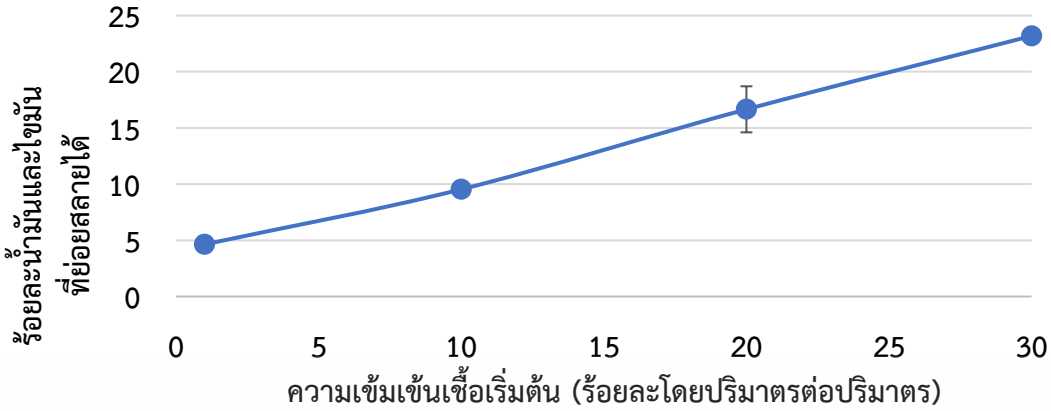
| ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร) | จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/mL) |
|---|---|
| 1 | 10.97 |
| 10 | 11.97 |
| 20 | 13.28 |
| 30 | 13.45 |

**ตารางที่ 4.3** ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นที่มีต่อผลการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

| ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร) | ความเข้มข้นน้ำมันและไขมันก่อนการทดลอง (กรัมต่อลิตร) | ความเข้มข้นน้ำมันและไขมันหลังการทดลอง (กรัมต่อลิตร) | ร้อยละน้ำมันและไขมันที่ย่อยสลายได้* |
|---|---|---|---|
| Control | 30.01±0.00 | 30.19±0.00 | -0.60±0.09[a] |
| 1 | 30.00±0.00 | 28.61±0.02 | 4.64 ±0.68[ab] |
| 10 | 30.02±0.00 | 27.15±0.02 | 9.54±0.39[b] |
| 20 | 30.00±0.00 | 25.00±0.06 | 16.66±2.05[c] |
| 30 | 30.01±0.01 | 23.05±0.01 | 23.19±0.31[d] |

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Least Significant Difference Test (LSD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



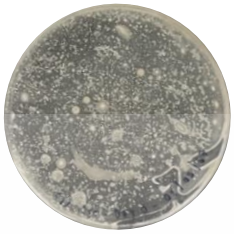
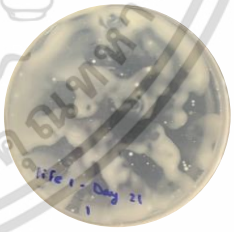

**รูปที่ 4.4** ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

## 4.4 การศึกษาระยะเวลาที่เชื้อสามารถทนอยู่ได้ในน้ำเสียจริง

จากการศึกษาระยะเวลาที่เชื้อสามารถทนอยู่ได้ในน้ำเสียจากบ่อดักไขมันในโรงอาหาร โดยนำเชื้อเริ่มต้นใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร บ่มและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปตรวจดูจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ทุก ๆ 7 วัน ด้วยวิธี pour plate ผลการทดลองพบว่า วันที่ 0 และ 7 มีการเจริญของเชื้อเป็นจำนวนมาก หลังจากวันที่ 14 จำนวนเชื้อลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่อย่างไรก็ตาม วันที่ 21 และ 28 ยังพบการเจริญของเชื้ออยู่ ดังตารางที่ 4.4 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiuyi, L. et al (2015) ซึ่งพบว่า *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ในน้ำเสียลดลงอย่างรวดเร็วจนเหลือร้อยละ 11 ของความเข้มข้นเริ่มต้น เมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 192 ชั่วโมง หรือ 8 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.4** จุลินทรีย์ที่ทนอยู่ได้ในน้ำเสียจริง

| ระยะเวลา (วัน) | จุลินทรีย์ที่มีชีวิต |
|---|---|
| 0 |  |
| 7 | |
| 14 | |
| 21 |  |
| 28 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญจำเพาะที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.5430 โดยที่อุณหภูมิ 42 และ 45 องศาเซลเซียสเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อศึกษาความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของ *Burkholderia gladioli* โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 1, 10, 20 และ 30 โดยปริมาตรต่อปริมาตร มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 10.97, 11.97, 13.28 และ 13.45 log CFU/mL ตามลำดับ และความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 30 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ดีที่สุดร้อยละ 23.19±0.31 จากนั้นศึกษาระยะเวลาที่เชื้อสามารถทนอยู่ได้ในน้ำเสีย พบว่าวันที่ 0 และ 7 มีการเจริญของเชื้อเป็นจำนวนมาก หลังจากวันที่ 14 จำนวนเชื้อลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่อย่างไรก็ตามวันที่ 21 และ 28 ยังพบการเจริญของเชื้ออยู่

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันและไขมันที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของ *Burkholderia gladioli*

2. ควรวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของ *Burkholderia gladioli*

3. ควรมีการศึกษาหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ. (2551). **คู่มือแนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันจากบ่อดักไขมันและการนำไปใช้ ประโยชน์สำหรับร้านอาหาร**. กรมควบคุมมลพิษ.

ขวัญเนตร สมบัติสมภพ, อำนาจ ปราการสมุทร และณัฐวุฒิ วิทยาวิโรจน์. (2554). การเปรียบเทียบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงอาหารของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. วารสารพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 21(1), 72-79.

จุฑากานต์ บุญมี. (2552). การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ วท.บ., จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร.

ดาวัลย์ ฉิมภู่. (2555). **ชีวเคมี (พิมพ์ครั้งที่ 5)** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภัสวรรณ และนันทริกานต์. (2565). การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันจากระบบบำบัดน้ำเสียโรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ (ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต). สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

บุณยาพร ภาคภูมิ และ ศิริพร ดอนเหนือ. (2562). การศึกษาเชื้อ *Burkholderia glumae* และ *B. gladioi* สาเหตุโรคของข้าวในประเทศไทย. วิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ, 2(2), 48-58

พจน์ ศรีบุญลือ, พัชรี บุญศิริ, ชฎามาศ พินิจสุนทร และเปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์. (2555). ตำรา **ชีวเคมี (พิมพ์ครั้งที่ 6)**. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และมั่นรักษ์ ตัณฑุลเวศม์. (2551). **เคมีวิทยาของน้ำและน้ำเสีย** (พิมพ์ครั้งที่3). กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มาริสา อัตถาพงศ์. (2560). การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ (ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตและปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา.

วรรัตน์ แก้วกัณฑ์. (2525). ผลของการสกัดกระเทียม กะเพรา และพริกต่อเนื้อสุกรแช่เย็น วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ วท.บ., มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

วิมลมาศ บุญมี. (2565). การวัดการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ในอาหารเหลว. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สุรอรรถ ศุภจัตุรัส. (2545). การศึกษาการใช้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์โลเปสเพื่อใช้บำบัดไขมันในระบบบำบัดน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร วท.ม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สุวัฒน์ศักดิ์ ด่านศักดิ์ดา. (2551). การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียของโรงงานปลาส้ม (ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรพิน ภูมิภมร และ จันทนา จินดา. (2546). สมบัติไฮโดรไลซิสของเอนไซม์อัลคาไลไลเพส จาก *Pseudomonas* sp. KLB1. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร

อูน ตะสิงห์, กาญนิถา ครองธรรมชาติ และ ประสาท โพธิ์นิ่มแดง. (2560). ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายไขมันที่แยกได้จากถังดักไขมันในการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Abooalfazl, A., Bagher, M. and Gholamreza, M. (2014). Oily wastewaters treatment using *Pseudomonas* sp. isolated from the compost fertilizer. Journal of Environmental Health Science & Engineering, 12(77), 1-7.

Aysun, A. (2009). Isolation and identification of a lipase producing psychrotrophic bacteria from soil: cloning and partial characterization of its lipase, Master thesis, M. Sc, School of Engineering and Sciences of izmir Institute of Technology, Turkey.

Bhumibhamon, O., Koprasertsak, A. and Funthong, S. (2002). Biotreatment of High Fat and Oil Wastewater by Lipase Producing Microorganisms. Kasetsart Journal, (Nat. Sci.), 36(3), 261-267.

Khatib, M., Alqedra, F., and Alam, Z. (2023). Biodegradation of fats, oil and grease using microorganisms isolated from palm oil mill effluent. IIUM Engineering Journal, 24(2), 4-7.

Lauprasert, P., Paengjan, J., Chansirirattana, J. and Khunaprom T. (2013). Treatment of fat-oil and grease in wastewater from canteen Grease traps by selected bacteria. Srinakharinwirot Journal, 7(13), 44-46.

Li, J., Zhao, X., Tian, X., Li, J., Sjollema, J. and Wang A. (2015). Retention in Treated Wastewater Affects Survival and Deposition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Sand Columns.Applied and Environmental Microbiology, 81(6),2199-2205

Martins, P., Pacheco, T., Camargo, B., Marco, J. and Salum, T. (2022). Solid-state fermentation production and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Burkholderia gladioli* strain.Preparative Biochemistry & Biotechnology. 52:70-79

Matsumiya, Y., Wakita, D., Kimura A., Sanpa, S. and Kubo, M. (2007). Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid containing wastewater treatment. Journal of Bioscience and Bioengineering, 103(4), 325 – 330.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mongkolthanaruka, W. and Dharmsthiti, S. (2002). Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation, 50, 101-105.

Moon, H., Park, H., Jeong, A., Han, S. and Park, C. (2017). Isolation and identification of *Burkholderia gladioli* on Cymbidium orchids in Korea. BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT, Vol.31 No.2, 280-288.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol. 7(1-2):203-14.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก
# สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

**อาหารเหลว Nutrient Broth (NB)**

| | |
|---|---|
| อาหาร Nutrient Broth (NB) สำเร็จรูป | 8 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 มิลลิลิตร |

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (ดัดแปลงจาก สุวัฒน์ศักดิ์, 2551)

**อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA)**

| | |
|---|---|
| อาหาร Nutrient Broth (NB) สำเร็จรูป | 8 กรัม |
| ผงวุ้น | 15 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 มิลลิลิตร |

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (ดัดแปลงจาก สุวัฒน์ศักดิ์, 2551)

**อาหารแข็งไตรบูทิริน (Tributyrin Agar)**

| | |
|---|---|
| ไตรบูทิริน | 10 มิลลิลิตร |
| อาหาร Nutrient Broth (NB) สำเร็จรูป | 8 กรัม |
| ผงวุ้น | 15 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 มิลลิลิตร |

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้น เติมไตรบูทิริน 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (ดัดแปลงจาก สุวัฒน์ศักดิ์, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข
# การวิเคราะห์และการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# วิธีการวิเคราะห์

**การวิเคราะห์น้ำมันและไขมัน**

วิธีสกัดด้วยกรวยแยก (Partition gravimetric) เหมาะสำหรับใช้กับน้ำธรรมชาติน้ำใสหรือน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว ขั้นตอนในการวิเคราะห์จะเริ่มจากการปรับ pH ของตัวอย่างน้ำให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (PH) ต่ำกว่า 2.0 และแยกสกัดไขมันและน้ำมันด้วยสารตัวทำละลาย เช่น เฮ-กเซนหรือฟรีออนในกรวยแยก

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและไขมันที่คงเหลือโดยวิธีสกัดด้วยกรวยแยก (Partition gravimetric) ดัดแปลงจากวิธีของ Standard Methods For the Examination of water and Wastewater 22ND edition (Rice, E. W. et al 2012)

นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 50 -100 มิลลิลิตร นำมาผสมในบีกเกอร์ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่าเท่ากับหรือต่ำกว่า 2 โดยใช้กรดซัลฟิวริกร้อยละ 50 จากนั้นเทตัวอย่างน้ำจากบีกเกอร์ใส่ในกรวยแยก เติมเฮกเซนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วเพื่อชะน้ำมันและไขมันที่เหลือค้างอยู่ให้หมด และทำการสกัดน้ำมันและไขมันโดยเขย่าแรง ๆ นาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น ซึ่งชั้นเฮกเซนจะอยู่ข้างบนและตัวอย่างน้ำจะอยู่ข้างล่าง จากนั้นถ่ายชั้นของตัวอย่างน้ำไว้ในบีกเกอร์เดิมเพื่อนำมาสกัด สำหรับส่วนของเฮกเซนลงในบีกเกอร์ ทำการสกัดซ้ำด้วยวิธีเดียวกันจนกระทั่งน้ำมันและไขมันถูกสกัดออกจนหมด นำบีกเกอร์ที่มีเฮกเซนและน้ำมันและไขมันระเหยอยู่ไป ระเหยเอาเฮกเซนออกในเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนแห้งปราศจากความชื้น แล้วปล่อยให้เย็นในโถทำแห้ง 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนักบีกเกอร์ที่มีน้ำมันและไขมันคงเหลือ และนำไปคำนวณปริมาณน้ำมันและไขมันดังสูตร (มาริสา, อัตถาพรศ์. (2560)

**การคำนวณปริมาณน้ำมันและไขมัน**

$$\text{ปริมาณน้ำมันและไขมัน (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง (มล.)}}$$

โดยที่ A คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและน้ำมันและไขมันที่คงเหลือ (กรัม)
B คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง (กรัม)

$$\text{ร้อยละของปริมาณน้ำมันและไขมันที่ถูกย่อยสลาย} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

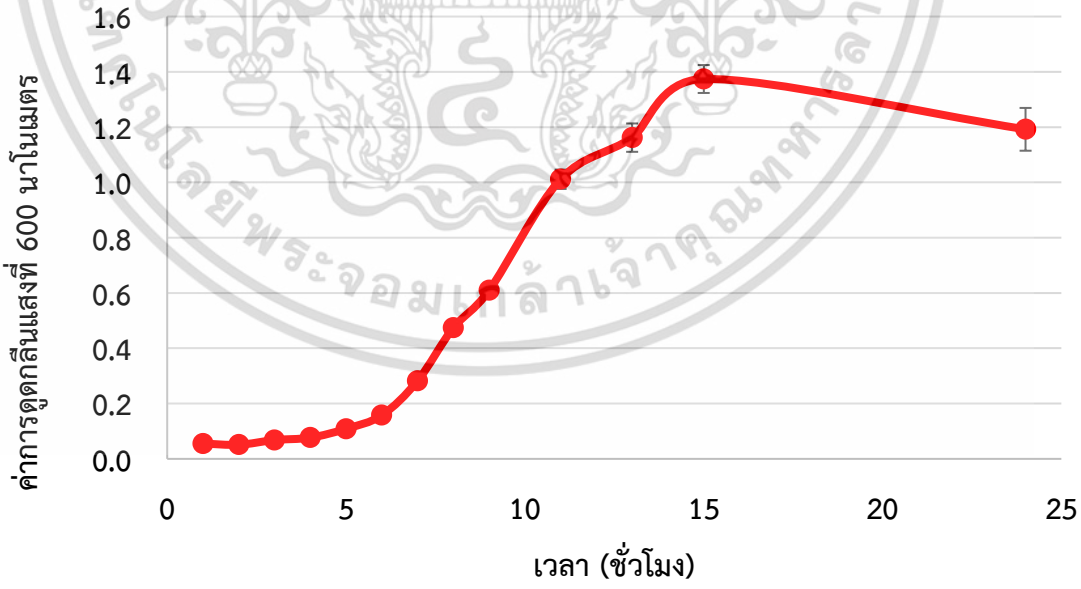
โดยที่ A คือ น้ำหนักน้ำมันและไขมันเริ่มต้น (กรัม)
B คือ น้ำหนักน้ำมันและไขมันคงเหลือ (กรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli***

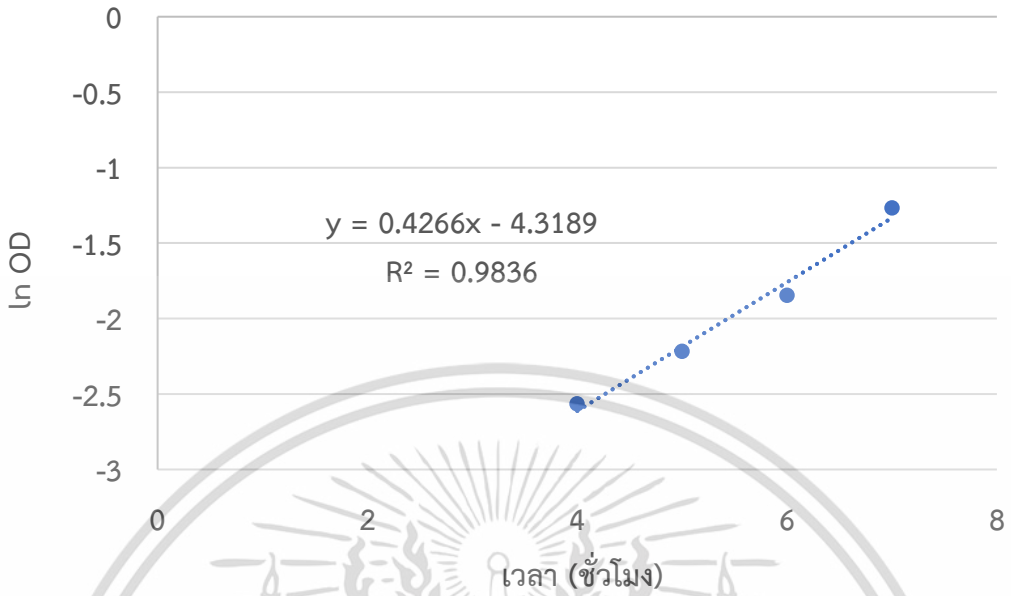
**ตาราง ก** ค่าการดูดกลืนแสงของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำ 1 | ซ้ำ 2 | ซ้ำ 3 | เฉลี่ย |
| 1 | 0.057 | 0.052 | 0.057 | 0.055 |
| 2 | 0.055 | 0.047 | 0.051 | 0.051 |
| 3 | 0.072 | 0.064 | 0.068 | 0.068 |
| 4 | 0.078 | 0.075 | 0.077 | 0.077 |
| 5 | 0.116 | 0.101 | 0.109 | 0.109 |
| 6 | 0.161 | 0.161 | 0.151 | 0.158 |
| 7 | 0.291 | 0.282 | 0.273 | 0.282 |
| 8 | 0.472 | 0.498 | 0.453 | 0.474 |
| 9 | 0.604 | 0.614 | 0.609 | 0.609 |
| 11 | 1.046 | 1.012 | 0.976 | 1.011 |
| 13 | 1.137 | 1.128 | 1.221 | 1.162 |
| 15 | 1.413 | 1.392 | 1.317 | 1.374 |
| 24 | 1.170 | 1.128 | 1.278 | 1.192 |




**รูป ก** การเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูป ข** อัตราการเจริญจำเพาะของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เป็นค่าที่บอกความเร็วของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ยิ่งมีค่ามาก ยิ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็ว ถ้าเซลล์ไม่มีการเจริญ ค่า $\mu$ มีค่า = 0

$$dx/dt = \mu x$$

เมื่อ $\mu$ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

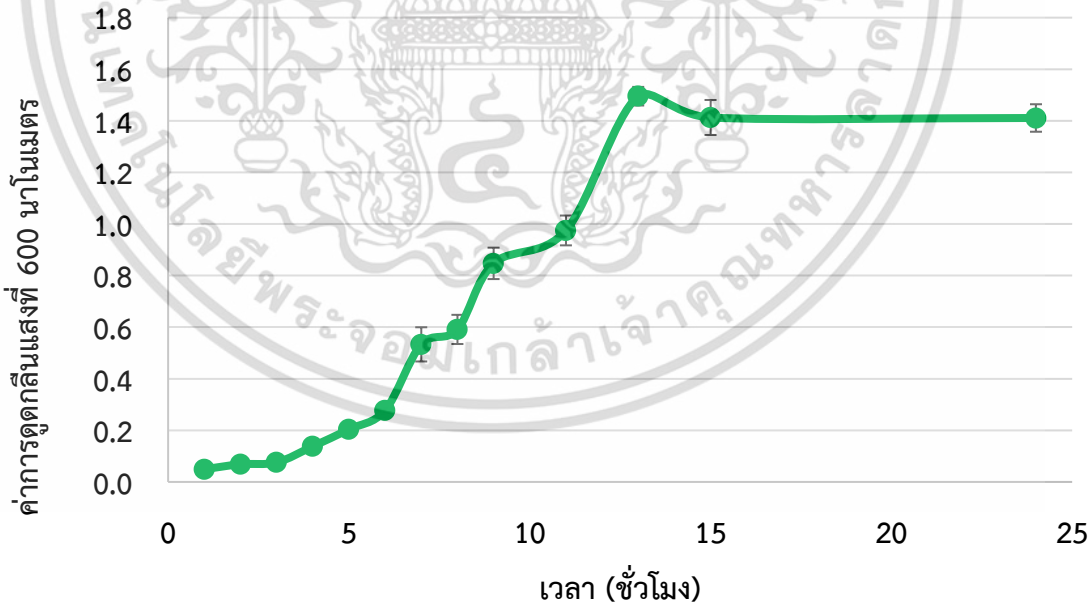
$$\text{อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)} = \frac{-0.746-(-2.564)}{8-4}$$

$$= 0.4585$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

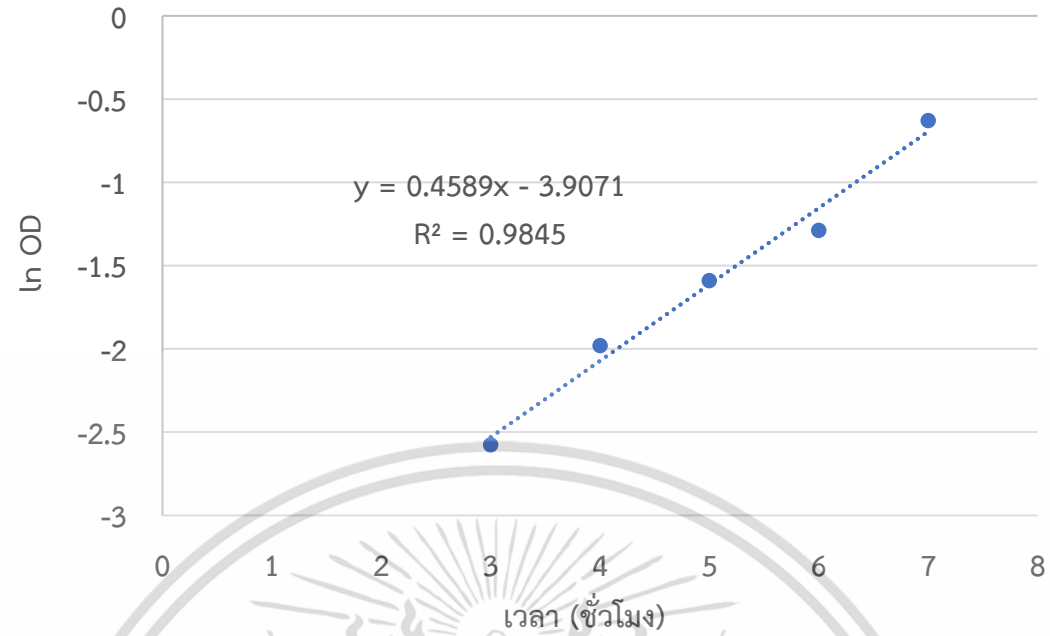
**ตาราง ข** ค่าการดูดกลืนแสงของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำ 1 | ซ้ำ 2 | ซ้ำ 3 | เฉลี่ย |
| 1 | 0.046 | 0.054 | 0.048 | 0.049 |
| 2 | 0.071 | 0.066 | 0.070 | 0.069 |
| 3 | 0.070 | 0.070 | 0.087 | 0.076 |
| 4 | 0.134 | 0.116 | 0.164 | 0.138 |
| 5 | 0.196 | 0.191 | 0.225 | 0.204 |
| 6 | 0.268 | 0.287 | 0.279 | 0.278 |
| 7 | 0.526 | 0.471 | 0.603 | 0.533 |
| 8 | 0.652 | 0.540 | 0.582 | 0.591 |
| 9 | 0.826 | 0.800 | 0.916 | 0.847 |
| 11 | 0.951 | 0.933 | 1.041 | 0.975 |
| 13 | 1.497 | 1.470 | 1.521 | 1.496 |
| 15 | 1.461 | 1.365 | 1.413 | 1.413 |
| 24 | 1.350 | 1.449 | 1.434 | 1.411 |




**รูป ค** การเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูป ง** อัตราการเจริญจำเพาะของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เป็นค่าที่บอกความเร็วของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ยิ่งมีค่ามาก ยิ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็ว ถ้าเซลล์ไม่มีการเจริญ ค่า $\mu$ มีค่า = 0

$$dx/dt = \mu x$$

เมื่อ $\mu$ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

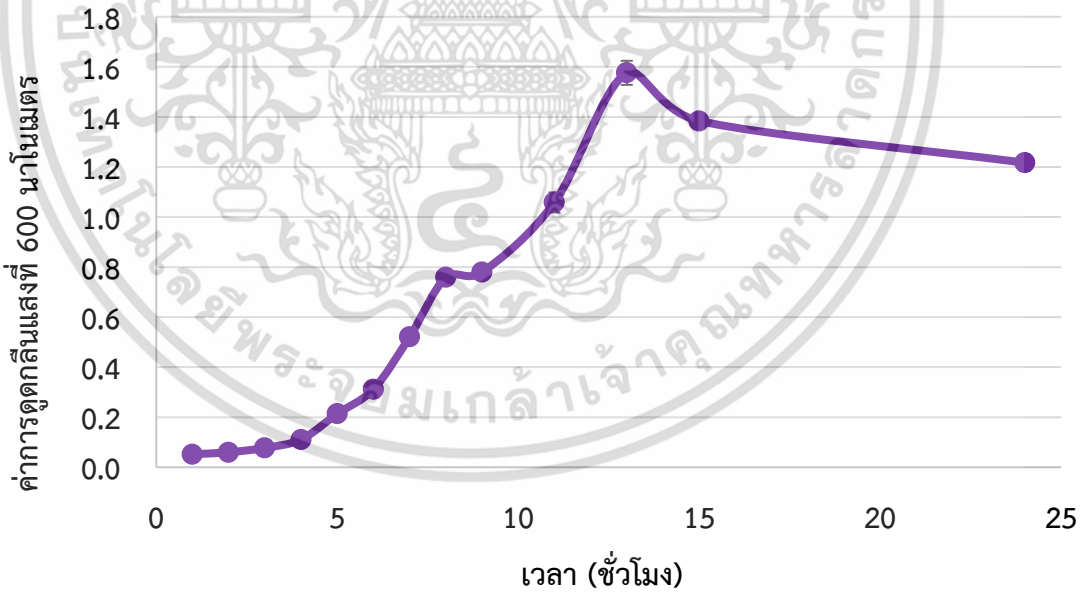
$$\text{อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)} = \frac{-0.629-(-2.577)}{7-3}$$

$$= 0.4589$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

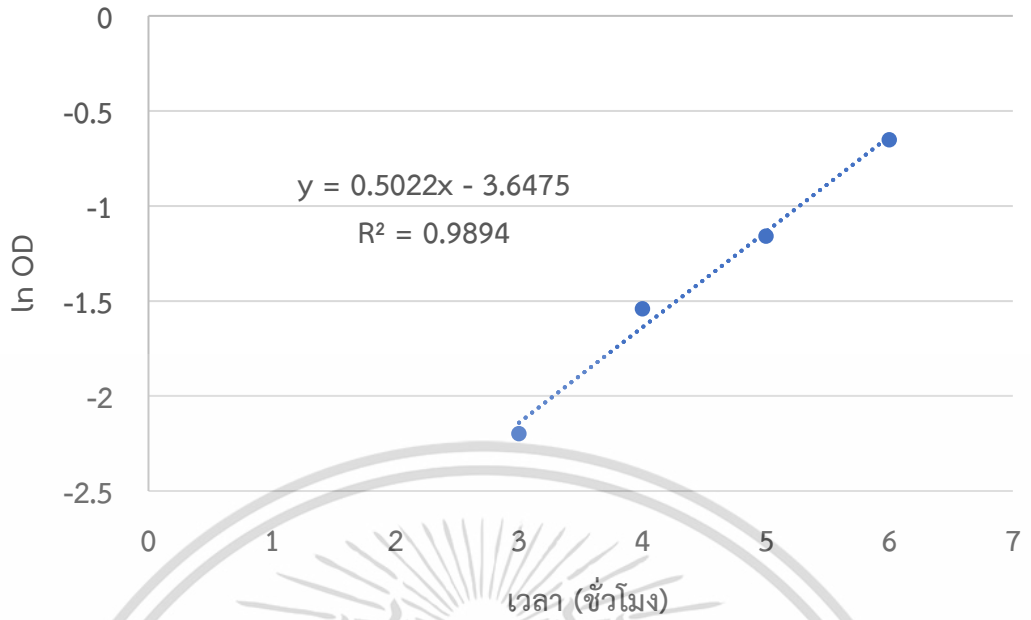
**ตาราง ค** ค่าการดูดกลืนแสงของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำ 1 | ซ้ำ 2 | ซ้ำ 3 | เฉลี่ย |
| 1 | 0.051 | 0.056 | 0.049 | 0.052 |
| 2 | 0.064 | 0.058 | 0.058 | 0.060 |
| 3 | 0.081 | 0.077 | 0.074 | 0.077 |
| 4 | 0.106 | 0.118 | 0.109 | 0.111 |
| 5 | 0.212 | 0.193 | 0.236 | 0.214 |
| 6 | 0.320 | 0.276 | 0.340 | 0.312 |
| 7 | 0.498 | 0.534 | 0.530 | 0.521 |
| 8 | 0.769 | 0.768 | 0.740 | 0.759 |
| 9 | 0.788 | 0.768 | 0.782 | 0.779 |
| 11 | 1.068 | 1.014 | 1.092 | 1.058 |
| 13 | 1.578 | 1.623 | 1.527 | 1.576 |
| 15 | 1.384 | 1.400 | 1.368 | 1.384 |
| 24 | 1.185 | 1.248 | 1.218 | 1.217 |




**รูป จ** การเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูป ฉ** อัตราการเจริญจำเพาะของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เป็นค่าที่บอกความเร็วของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ยิ่งมีค่ามาก ยิ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็ว ถ้าเซลล์ไม่มีการเจริญ ค่า $\mu$ มีค่า = 0

$$dx/dt = \mu x$$

เมื่อ $\mu$ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

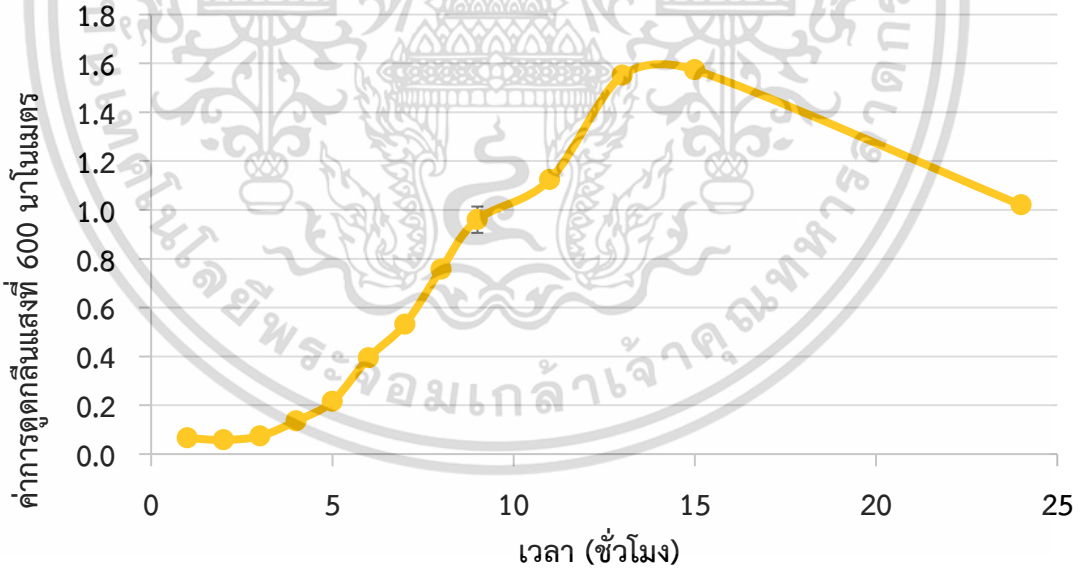
$$\text{อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)} = \frac{-0.652-(-2.198)}{6-3}$$

$$= 0.5022$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

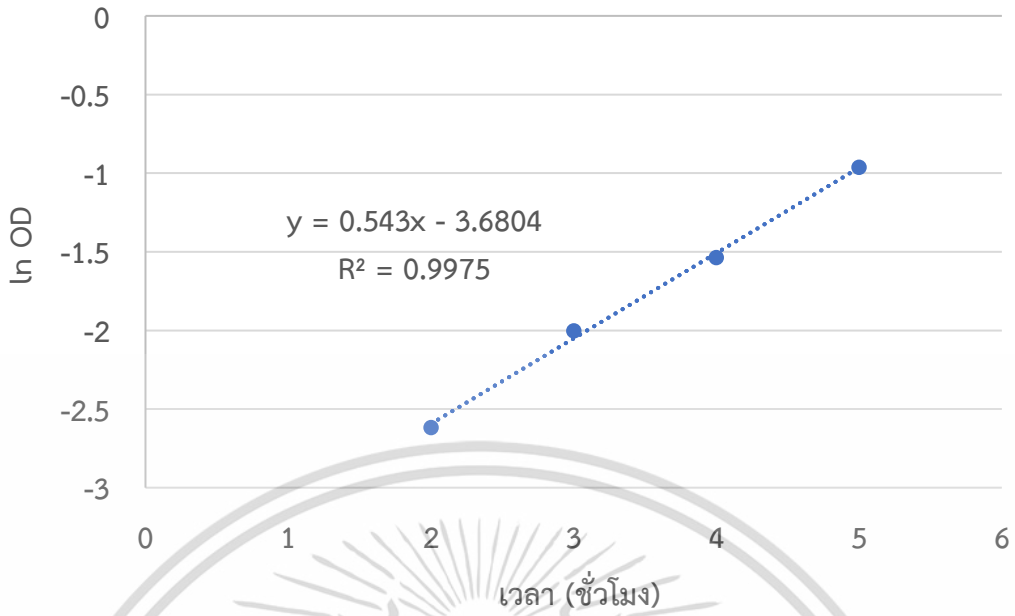
**ตาราง ง** ค่าการดูดกลืนแสงของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำ 1 | ซ้ำ 2 | ซ้ำ 3 | เฉลี่ย |
| 1 | 0.067 | 0.066 | 0.065 | 0.066 |
| 2 | 0.054 | 0.062 | 0.058 | 0.058 |
| 3 | 0.076 | 0.072 | 0.072 | 0.073 |
| 4 | 0.140 | 0.129 | 0.136 | 0.135 |
| 5 | 0.199 | 0.221 | 0.226 | 0.215 |
| 6 | 0.390 | 0.398 | 0.394 | 0.394 |
| 7 | 0.538 | 0.540 | 0.517 | 0.532 |
| 8 | 0.776 | 0.737 | 0.758 | 0.757 |
| 9 | 0.898 | 0.988 | 0.994 | 0.960 |
| 11 | 1.124 | 1.142 | 1.106 | 1.124 |
| 13 | 1.578 | 1.542 | 1.533 | 1.551 |
| 15 | 1.552 | 1.572 | 1.596 | 1.573 |
| 24 | 1.032 | 1.036 | 0.992 | 1.020 |




**รูป ช** การเจริญเติบโตของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูป ซ** อัตราการเจริญจำเพาะของ *Burkholderia gladioli* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เป็นค่าที่บอกความเร็วของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ยิ่งมีค่ามาก ยิ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็ว ถ้าเซลล์ไม่มีการเจริญ ค่า $\mu$ มีค่า = 0

$$dx/dt = \mu x$$

เมื่อ $\mu$ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

$$\text{อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)} = \frac{-0.962-(-2.617)}{5-2}$$

$$= 0.543$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ประสิทธิภาพของ *Burkholderia gladioli* ในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน**

**ตาราง จ** ผลของความเข้มผลของความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นที่มีต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

| ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร) | ซ้ำ | ความเข้มข้นน้ำมันและไขมันก่อนการทดลอง (กรัมต่อลิตร) | ความเข้มข้นน้ำมันและไขมันหลังการทดลอง (กรัมต่อลิตร) | ร้อยละน้ำมันและไขมันที่ย่อยสลายได้ | ค่าเฉลี่ย (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Control | 1 | 3.000 | 3.016 | | |
| | 2 | 3.001 | 3.021 | - | - |
| | 3 | 3.000 | 2.689 | | |
| 1 | 1 | 2.999 | 2.838 | 5.37 | |
| | 2 | 3.000 | 2.864 | 4.53 | 4.64±0.68 |
| | 3 | 3.002 | 2.881 | 4.03 | |
| 10 | 1 | 3.003 | 2.720 | 9.42 | |
| | 2 | 3.005 | 2.728 | 9.22 | 9.54±0.39 |
| | 3 | 2.997 | 2.698 | 9.98 | |
| 20 | 1 | 2.998 | 2.489 | 16.98 | |
| | 2 | 3.000 | 2.566 | 14.47 | 16.66±2.05 |
| | 3 | 3.001 | 2.445 | 18.53 | |
| 30 | 1 | 3.007 | 2.311 | 23.15 | |
| | 2 | 2.995 | 2.309 | 22.90 | 23.19±0.31 |
| | 3 | 3.001 | 2.295 | 23.53 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค
# ลำดับเบสของ *Burkholderia gladioli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Burkholderia gladioli* strain E30CS3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: MK474978.1 Length: 1460
Range 1: 1 to 1444

Score:2667 bits (1444), Expect:0.0,
Identities:1444/1444(100%), Gaps:0/1444(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1    ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCAC  60
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1    ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCAC  60
Query 61   CTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATA  120
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 61   CTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATA  120
Query 121  GCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCG  180
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 121  GCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCG  180
Query 181  GGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCAC  240
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 181  GGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCAC  240
Query 241  CAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACG  300
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 241  CAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACG  300
Query 301  GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC  360
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 301  GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC  360
Query 361  CAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGA  420
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 361  CAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGA  420
Query 421  AATCCTGAGGGCTAATATCCTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAAC  480
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 421  AATCCTGAGGGCTAATATCCTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAAC  480
Query 481  TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT  540
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 481  TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT  540
Query 541  AAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC  600
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 541  AAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC  600
Query 601  TGCATTGGTGACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAG  660
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 601  TGCATTGGTGACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAG  660
Query 661  TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACT  720
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 661  TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACT  720
Query 721  GACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  780
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 721  GACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  780
Query 781  CTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGA  840
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 781  CTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGA  840
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
Query 841   AGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC  900
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 841   AGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC  900
Query 901   GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTT  960
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 901   GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTT  960
Query 961   GACATGGTCGGAATCCTAGAGAGATCTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGATACACAGGTG  1020
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 961   GACATGGTCGGAATCCTAGAGAGATCTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGATACACAGGTG  1020
Query 1021  CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA  1080
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1021  CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA  1080
Query 1081  ACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA  1140
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1081  ACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA  1140
Query 1141  GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATA  1200
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1141  GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATA  1200
Query 1201  CAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATC  1260
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1201  CAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATC  1260
Query 1261  GTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG  1320
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1261  GTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG  1320
Query 1321  ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG  1380
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1321  ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG  1380
Query 1381  GAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGA  1440
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1381  GAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGA  1440
Query 1441  TTCA  1444
            ||||
Sbjct 1441  TTCA  1444
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ง
# ข้อมูล SPSS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตาราง ฉ** ผลของความเข้มผลของความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นที่มีต่อการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

**ANOVA**

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 965.89 | 4 | 241.47 | 683.04 | 0.00 |
| Within Groups | 3.53 | 10 | 0.35 | | |
| Total | 969.43 | 14 | | | |

**Post Hoc Tests** โดยวิธี Least Significant Difference Test (LSD)

| (I) ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร) | (J) ความเข้มข้นของน้ำมันและไขมัน | Sig. |
|---|---|---|
| Control | 1 | 0.53 |
| | 10 | 0.02 |
| | 20 | 0.00 |
| | 30 | 0.00 |
| 1 | Control | 0.53 |
| | 10 | 0.07 |
| | 20 | 0.00 |
| | 30 | 0.00 |
| 10 | Control | 0.02 |
| | 1 | 0.07 |
| | 20 | 0.02 |
| | 30 | 0.00 |
| 20 | Control | 0.00 |
| | 1 | 0.01 |
| | 10 | 0.02 |
| | 30 | 0.02 |
| 30 | Control | 0.00 |
| | 1 | 0.00 |
| | 10 | 0.00 |
| | 20 | 0.02 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก จ

# การเก็บตัวอย่างน้ำเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูป ด** ตัวอย่างน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและไขมันบริเวณบ่อดักไขมัน โรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**รูป ต** ตัวอย่างน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและไขมันที่ใช้ในการศึกษาระยะเวลาที่เชื้อสามารถทนอยู่ได้ในน้ำเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 10 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2567

ข้าพเจ้า นางสาวจันจิรา จันทร์ฉาย รหัสประจำตัว 63050451
นางสาวนฤมล สิงห์สุวรรณ รหัสประจำตัว 63050488

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน ในน้ำเสียสังเคราะห์ของ *Burkholderia gladioli*, Optimization of oil and fat degradation in synthetic wastewater by *Burkholderia gladioli* ปีการศึกษา 2566 เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 2.27 %

ลงชื่อ.....จันจิรา จันทร์ฉาย.....
( นางสาวจันจิรา จันทร์ฉาย )

ลงชื่อ.....นฤมล สิงห์สุวรรณ.....
( นางสาวนฤมล สิงห์สุวรรณ )

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินตา อาจารย์ที่ปรึกษาและ ข้าพเจ้า ดร.อิงครัต กิ่งแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงานพิเศษได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้วขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....
อาจารย์ที่ปรึกษา

ลงชื่อ.....อิงครัต กิ่งแก้ว.....
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้