

การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส
ในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียของโรงงานปลาต้ม

สุวัฒน์ศักดิ์ ด้านศักดิ์ดา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง
การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส
ในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียของโรงงานปลาต้ม

โดย
สุวัฒน์ศักดิ์ ด้านศักดิ์ดา

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุฬน ชื่นบาล)

วันที่ 22 เดือน ๗ พ.ศ. ๒๕๕๗

กรรมการที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่ 22 เดือน ๗ พ.ศ. ๒๕๕๗

กรรมการที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.สมคิด ดิจริง)

วันที่ 22 เดือน ๗ พ.ศ. ๒๕๕๗

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่ 22 เดือน ๗ พ.ศ. ๒๕๕๗

สำนักงานบัณฑิตศึกษารับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.เทพ พงษ์พานิช)

ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา

วันที่ 27 เดือน ๗ พ.ศ. ๒๕๕๗

ชื่อเรื่อง	การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียของโรงงานปลาต้ม
ชื่อผู้เขียน	นายสุวัฒน์ศักดิ์ ด้านศักดิ์ดา
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุฬน ชื่นบาล

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตปลาต้มด้วยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำ จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค enrichment culture ได้จำนวน 447 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น โดยทดสอบการเกิดบริเวณใสบนอาหารแข็งสูตร Tween 80 จากการทดลอง พบว่า มีจุลินทรีย์จำนวน 91 ไอโซเลท เกิดบริเวณใสและตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี จุลินทรีย์ที่มีขนาดของบริเวณใสรอบโคโลนีตั้งแต่ 12 มิลลิเมตร ซึ่งคาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดี จำนวน 21 ไอโซเลท ถูกนำมาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลท S13-8, N12-1 และ N10-9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดีที่สุด จากนั้นทำการตรวจสอบค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ไลเปส พบว่า ไอโซเลท N10-9 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส สูงสุด เท่ากับ 295.2 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ในชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ ไอโซเลท N12-1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เท่ากับ 251.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ในชั่วโมงที่ 18 และ S13-8 เท่ากับ 220.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ในชั่วโมงที่ 24

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย คือ น้ำเสียมีปริมาณไขมันและน้ำมันเป็นองค์ประกอบ ร้อยละ 20 ของน้ำเสียทั้งหมด มีการปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 9.0 โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 ไอโซเลท ร้อยละ 1 ของน้ำเสียทั้งหมด และมีความเร็วรอบในการกวนผสม เท่ากับ 200 รอบต่อนาที จากนั้นทำการสร้างระบบแยกและย่อยไขมันเพื่อนำไปใช้ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานปลาต้ม ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วน

ถังแยก ทำหน้าที่แยกส่วนของน้ำ ไขมันและน้ำมันรวมทั้งของแข็งออกจากกัน และ ส่วนของถังย่อยไขมัน ทำหน้าที่ย่อยไขมันและน้ำมันโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของถังแยกไขมันของระบบแยกและย่อยไขมัน โดยใช้ น้ำเสียจากโรงงานปลาสำเสร็จรันทน ตำบลบ้านสาาง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา จำนวน 150 ลิตร ซึ่งมีปริมาณไขมันและน้ำมัน เท่ากับ 160.40 กรัมต่อลิตร พบว่า ถังแยกมีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 99.57 โดยน้ำเสียที่ออกจากถังแยกมีปริมาณไขมันและน้ำมันเท่ากับ 0.69 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาประสิทธิภาพของถังย่อยไขมันของระบบแยกและย่อยไขมัน โดยใช้ น้ำเสียเป็นเวลานาน 13 วัน พบว่า ถังย่อยไขมันมีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 96.82 และมีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี เท่ากับ ร้อยละ 70.83

จากนั้นทำการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียทั้ง 3 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า ไอโซเลท N10 – 9 คือ *Pseudomonas stutzeri* ส่วนไอโซเลท N12 – 1 คือ *Acinetobacter baumannii* และไอโซเลท S13 – 8 คือ *Bacillus cereus* จากผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันปนเปื้อนจากอุตสาหกรรมอื่น ๆ ต่อไป

Title	A study on efficiency of lipase – producing microorganisms for removal fat and oil contaminated in fish fermented plant wastewater
Author	Mr. Suwatsak Dansakda
Degree of	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Tapan Cheunbarn

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the fat and oil degradation from wastewater in the fermented fish process. The lipase – producing microorganisms was isolated from fermented fish process from thirty soil and water samples using enrichment culture technique. It was found that four hundred and forty - seven isolates were able to grow on olive oil agar. Then, the primary screening of lipase – producing microorganisms by colonies on Tween 80 agar was detected. The result was that only ninety – one isolates showed clear zone around colony. After that, twenty – one isolates that produced more than 12 millimeters in diameter of clear zone were selected for study on efficiency of fat and oil degradation in synthetic wastewater. The finding was that three isolates: N10 -9, N12 – 1 and S13 – 8 had highest fat and oil degradation efficiency (78.97%, 72.24% and 72.12%, respectively). For lipase specific activity determination, N10 -9, N12 – 1 and S13 – 8 had 295.2, 251.9 and 220.1 unit/mg of lipase specific activity at 24, 18 and 24 h of cultivation, respectively.

The suitable condition for fat and oil degradation of consortium was further studied. The finding was that fat and oil contained wastewater was 20 percents of fat and oil, the pH level was conducted at 9. Then, 1 percent of the consortium was added and mixed with 200 rpm mixing rate. From the suitable condition, the fat and oil separation and degradation system was designed. The system consisted of 2 parts, separating tank that separated fat and oil phase from solid and water phase, and degrading tank that fat and oil were degraded using lipase - producing consortium.

The application of the fat and oil separation and degradation system for wastewater treatment was studied at Sri – ton Fish Fermented Factory (Tambon Bansang, Muang District, Phayao) for 13 days, using 150 liters of wastewater which contained 160.40 g/L fat and oil. For separating tank, it was found that removal efficiency of this tank was 99.6 percents, the effluent contained 0.69 g/L fat and oil. For degrading tank, the result showed that fat and COD removal was 96.8 and 70.8 percents, respectively.

Then, identification of three fat and oil degrading microorganism using 16S rRNA sequencing technique was studied. It was found that N10 – 9, N12 – 1 and S13 – 8 isolate was *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter baumannii* and *Bacillus cereus*, respectively. Therefore, this system can be applied to treat other fat and oil contaminated wastewater.

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง “การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียของโรงงานปลาต้ม” เพื่อประกอบการศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐปน ชื่นบาล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และอาจารย์ ดร.สมคิด ดิจริง กรรมการที่ปรึกษา รวมถึงอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และข้อคิดเห็นต่างๆของการวิจัยมาโดยตลอด อีกทั้งขอขอบพระคุณประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ข้อคิดเห็นในการแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เครือข่ายภาคเหนือที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และให้คำแนะนำในการใช้งานเป็นอย่างดี รวมถึงเพื่อนนักศึกษาปริญญาโททุกท่านที่ให้การช่วยเหลือด้วยความจริงใจตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย

เหนือสิ่งอื่นใดขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆ ด้านมาโดยตลอด ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คุณความดีและผลของสิ่งดีที่เกิดขึ้นจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบให้แก่ บิดา มารดา ครูบาอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจไม่มากนัก

สุวรรณศักดิ์ ด่านศักดิ์ดา

25 ตุลาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
ไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย	3
วิธีการกำจัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย	4
เอนไซม์ไลเปส	5
จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส	6
การผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์	7
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	12
กลไกการย่อยสลายไขมันของจุลินทรีย์	14
การใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย	17
กรอบแนวความคิด	19
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	20
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	20
วัสดุและอุปกรณ์	20
เครื่องมือ	21
สารเคมีและน้ำยาทดสอบ	22
ชุดทดลองสำเร็จรูป (kit)	23

หน้า

ดีเอ็นเอและโปรตีนมาตรฐาน (DNA and protein marker)	23
ไพรเมอร์ (primer)	23
อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	24
วิธีการทดลอง	24
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	27
วิธีการดำเนินงาน	27
สถานที่ดำเนินการวิจัย	33
ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	33
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	34
การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	34
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย	45
สังเคราะห์ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสม	
ระบบแยกและย่อยไขมัน	54
การศึกษาประสิทธิภาพของระบบแยกและย่อยไขมัน	58
การศึกษาลักษณะและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการ	67
บำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันจากโรงงานปลาต้ม	
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	79
สรุปผลการทดลอง	79
ข้อเสนอแนะ	80
บรรณานุกรม	81
ภาคผนวก	88
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	89
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	95
ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์	101
ภาคผนวก ง ประวัติผู้วิจัย	110

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	จำนวนไอโซเลทของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา	34
2	ไอโซเลทของจุลินทรีย์ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำ บริเวณจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา ซึ่งเกิดบริเวณใสหรือบริเวณที่เป็นตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี (Clear zone) เมื่อทดสอบเบื้องต้นด้วยอาหารแข็งสูตร Tween 80	37
3	ขนาดและลักษณะของวงใสที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทบนอาหารแข็งสูตร Tween 80	39
ตารางผนวก		หน้า
1	ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับภาชนะย่อยสลายขนาดต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ซีไอดี โดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด	100
2	ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	102
3	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดโอเลอิคมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร	103
4	ร้อยละของไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้ในน้ำเสียสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ทั้ง 21 ไอโซเลท	104
5	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	105
6	ความเข้มข้นเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์	106
7	ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน	106
8	ความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์	107

9	ความเร็วรอบในการกวนผสมที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์	107
10	ปริมาณไขมันและน้ำมัน ค่าซีโอดี (FCOD) และร้อยละในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันกับซีโอดี (FCOD) ในน้ำเสียจากโรงงานปลาสด ซึ่งทำการบำบัดด้วยถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ	108
11	ลักษณะของแข็งแขวนลอย (SS) ของแข็งทั้งหมด (TS) และค่าพีเอชของน้ำเสียจากโรงงานปลาสด ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการบำบัดด้วยถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ	109

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ประเภทของเอนไซม์ไลเปสแบ่งตามความจำเพาะของกิจกรรมต่อต้านแบงบนกลีเซอไรด์	9
2	รูปแบบปฏิกิริยา transesterification ของเอนไซม์ไลเปส	11
3	ปฏิกิริยาเอกติเวชัน การขนส่ง และ เบตา – ออกซิเดชันของกรดไขมัน	16
4	ปฏิกิริยาการย่อยสลายกลีเซอรอล	16
5	แบบและส่วนประกอบต่าง ๆ ของถังแยกและย่อยไขมัน	31
6	ระบบบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันปนเปื้อน	32
7	ลักษณะการเกิดบริเวณใส หรือบริเวณที่เป็นตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี (Clear zone)	43
8	เปรียบเทียบร้อยละของไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท	44
9	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท เปรียบเทียบกับ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
10	เปรียบเทียบความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์	46
11	ลักษณะของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม นาน 7 วัน	47
12	เปรียบเทียบค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์	49
13	ลักษณะของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม นาน 7 วัน	49
14	เปรียบเทียบความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์	51

15	ลักษณะของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นของไขมันและน้ำมัน เริ่มต้นระดับต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม นาน 7 วัน	51
16	เปรียบเทียบความเร็วรอบในการกวนผสมที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์	52
17	ลักษณะของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ความเร็วรอบในการกวนผสมต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม นาน 7 วัน	53
18	ระบบแยกและย่อยไขมัน	55
19	แผนควบคุมการทำงานของระบบแยกและย่อยไขมัน	56
20	ภายในถังแยกไขมัน	56
21	ท่อน้ำเข้าและออกของถังแยกไขมัน	57
22	ร่างระบายน้ำมัน	57
23	ถังย่อยไขมัน	58
24	ไขมันที่แยกออกด้วยถังแยกของระบบแยกและย่อยไขมัน	59
25	ปริมาณไขมันและน้ำมัน และประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน และน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานปลาสด ซึ่งทำการบำบัดด้วยถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ	61
26	ปริมาณซีโอดี (FCOD) ในน้ำเสีย และประสิทธิภาพในการย่อยสลายซีโอดี (FCOD) ในน้ำเสียจากโรงงานปลาสด ซึ่งทำการบำบัดด้วยถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ	62
27	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่าของแข็งแขวนลอย (กรัมต่อลิตร) ของน้ำเสียจากโรงงานปลาสดในถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ	64
28	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่าของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ของน้ำเสียจากโรงงานปลาสดในถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ	64

29	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำเสียจากโรงงานปลาต้ม ใน ถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ	65
30	ปริมาณไขมันและน้ำมัน (Fat) ค่าของแข็งแขวนลอย (SS) ของแข็ง ทั้งหมด (TS) และซีโอดี (FCOD) ในน้ำเสียจากโรงงานปลาต้มศรี ทน จังหวัดพะเยา ซึ่งทำการบำบัดด้วยถังย่อยไขมันของระบบแยก และย่อยไขมันในวันต่าง ๆ	66
31	ลักษณะของน้ำเสียจากโรงงานปลาต้มที่ผ่านการบำบัดด้วยระบบแยก และย่อยไขมันในวันต่าง ๆ	67
32	ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ไอโซเลท N10 - 9 บนอาหารแข็งสูตร NA	68
33	ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ไอโซเลท N10 - 9 เมื่อทำการย้อมสีแบบแกรม	68
34	ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท N10 - 9	69
35	Contig บริเวณ $V_1 - V_3$ ของยีน 16S rRNA ของเชื้อจุลินทรีย์ไอ โซเลท N10 - 9	69
36	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ contig ของยีน 16S rRNA ของ ไอโซเลท N10 - 9 กับฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn)	70
37	ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ไอโซเลท N12 - 1 บนอาหารแข็งสูตร NA	71
38	ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ไอโซเลท N12 - 1 เมื่อทำการย้อมสีแบบแกรม	71
39	ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท N12 - 1	72
40	Contig บริเวณ $V_1 - V_9$ ของยีน 16S rRNA ของเชื้อจุลินทรีย์ไอ โซเลท N12 - 1	72
41	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ contig ของยีน 16S rRNA ของ ไอโซเลท N12 - 1 กับฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn)	73

ภาพ

หน้า

42	ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ไอโซเลท S13 – 8 บนอาหารแข็งสูตร NA	75
43	ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ไอโซเลท S13 – 8 เมื่อทำการย้อมสีแบบแกรม	75
44	ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท S13 – 8	76
45	Contig บริเวณ $V_1 - V_3$ ของยีน 16S rRNA ของเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท S13 – 8	76
46	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ contig ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท S13 – 8 กับฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn)	77

ภาพผนวก

หน้า

1	กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน BSA	102
2	กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดโอเลอิกมาตรฐาน	103

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันปัญหาน้ำทิ้งจากภาคอุตสาหกรรมเป็นปัญหาสำคัญและมีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากประเทศไทยมีการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรมอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อมซึ่งได้รับการสนับสนุนจากภาครัฐโดยมีการรวมกลุ่มของสมาชิกในชุมชน เพื่อที่จะผลิตสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP) ของแต่ละชุมชน โดยผลิตภัณฑ์ส่วนหนึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ด้านอาหาร เมื่อมีการผลิตสินค้าในปริมาณมากส่งผลให้เกิดของเสียเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะน้ำเสียจากกระบวนการผลิตที่มีการปนเปื้อนของไขมันและน้ำมัน ทั้งนี้กลุ่มชาวบ้านขาดความรู้และการจัดการน้ำเสียอย่างถูกวิธี ทำให้น้ำเสียถูกปล่อยสู่สภาพแวดล้อมส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและเกิดสภาพไม่น่าดูขึ้นในชุมชน

ไขมันและน้ำมันที่พบในน้ำเสียเป็นสารอินทรีย์ที่มีเสถียรภาพและย่อยสลายได้ยาก ประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน กลีเซอรอล และกรดไขมัน มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำทำให้แยกชั้นกับน้ำ เมื่อปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติไขมันและน้ำมันจะจับกลุ่มรวมตัวกันลอยปกคลุมที่ผิวน้ำส่งผลให้เป็นอุปสรรคต่อการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตใต้น้ำและขัดขวางการส่งผ่านของออกซิเจนจากอากาศลงสู่น้ำทำให้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีน้อยลง แหล่งน้ำเกิดการเน่าเสียได้ง่าย นอกจากนั้นยังทำให้เกิดสภาพไม่น่าดูและทำให้เกิดการอุดตันของระบบท่อน้ำเสีย เมื่อเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพไขมันและน้ำมันจะลอยอยู่บริเวณผิวบ่อบำบัดส่งผลให้กระบวนการบำบัดทางชีวภาพไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร

อุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อมของกลุ่มชาวบ้าน บ.สันเวียงใหม่ หมู่ที่ 4 ต.บ้านสา อ.เมือง จ.พะเยา ทำการผลิตพลาสติกเป็นสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์และเกิดปัญหาเรื่องน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันปนเปื้อนจากกระบวนการผลิตในขั้นตอนการล้างพลาสติกเป็นจำนวนมาก การกำจัดไขมันและน้ำมันที่เกิดขึ้นใช้บ่อดักไขมันและทำการดักไขมันและน้ำมันที่ลอยแยกชั้นกับน้ำไปทิ้งวิธีนี้เป็นเพียงการย้ายที่ของสิ่งที่ปนเปื้อนเท่านั้น ไม่ได้เป็นการกำจัดหรือย่อยสลายให้หมดไปและส่งผลให้เกิดกลิ่นเหม็นบริเวณที่นำไปทิ้งอีกด้วย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาระบบแยกและย่อยไขมันโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งคัดเลือกได้จากท้องถิ่นภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สำหรับย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้

อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะใช้ในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย โดยนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อมของกลุ่มชาวบ้าน บ้านสันเวียงใหม่ หมู่ที่ 4 ตำบลบ้านสา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในระดับห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของระบบแยกและย่อยไขมัน ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันจากโรงงานปลาต้มของกลุ่มชาวบ้าน บ้านสันเวียงใหม่ หมู่ที่ 4 ตำบลบ้านสา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันปนเปื้อน
2. สามารถกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย จากโรงงานปลาต้มของกลุ่มชาวบ้าน บ้านสันเวียงใหม่ หมู่ที่ 4 ตำบลบ้านสา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ได้
3. สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันปนเปื้อนจากครัวเรือนและอุตสาหกรรมประเภทอื่นได้
4. สภาพแวดล้อมทางน้ำของชุมชนดีขึ้น เนื่องจากการจัดการของเสียที่ถูกต้อง ทำให้สามารถใช้น้ำจากแหล่งน้ำของชุมชนเพื่อการอุปโภคและบริโภคได้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย

ไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสามารถแบ่งออกได้โดยอาศัยหลักการ 3 อย่างได้แก่ ลักษณะความมีขั้ว (polarity) ความสามารถในการย่อยสลายทางชีววิทยา (biodegradability) และลักษณะทางฟิสิกส์ (physical characteristics) โดยลักษณะความมีขั้วสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ มีขั้ว (polar) และไม่มีขั้ว (non - polar) ไขมันที่มีขั้วส่วนใหญ่มาจากสัตว์และพืชผัก เช่น ของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมอาหารซึ่งสามารถย่อยสลายทางชีววิทยาได้และจะกลายเป็นสารอินทรีย์ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา ส่วนไขมันที่ไม่มีขั้วได้มาจากปิโตรเลียมหรือแหล่งแร่ธาตุซึ่งไม่สามารถย่อยสลายทางชีววิทยาได้ โดยการแบ่งตามลักษณะทางฟิสิกส์ คือ ไม่ลอยตัว (non - floatable) หรือกระจายตัว (emulsified) กับไม่กระจายตัว (non - emulsified) ไขมันที่ลอยหรือไม่กระจายตัวจะพบได้ทั่วไปในน้ำทิ้งชุมชนแต่ไม่พบในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เนื่องจากไขมันนี้จะถูกสะสมอยู่ในท่อน้ำเสียและเป็นสาเหตุให้เกิดการอุดตัน ส่วนไขมันที่กระจายตัวจะถูกแยกออกในกระบวนการตกตะกอนเบื้องต้นและถูกกำจัดออกโดยการดักออกหรือการดูดซับ (adsorption) กับของแข็งแล้วนอนก้นส่วนที่เหลือจะเข้าสู่กระบวนการบำบัดทางชีววิทยา

ไขมันและน้ำมันซึ่งพบในน้ำเสียที่มาจากร้านอาหารทั่วไปและโรงงานอุตสาหกรรมอาหารก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม โดยไขมันและน้ำมันเป็นสารประกอบพวกไฮโดรคาร์บอนเกิดจากกลีเซอรอลรวมกับกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ส่วนที่เป็นของเหลว ณ อุณหภูมิปกติ เรียกว่า น้ำมันและส่วนที่เป็นของแข็ง เรียกว่า ไขมัน โดยทั่วไปในน้ำเสียจะมีไขมันและน้ำมันเป็นส่วนประกอบประมาณ 1 - 1,480 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดของน้ำเสีย โดยพวกน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากชุมชนเกิดจากเนย เนื้อสัตว์ และน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ เป็นต้น มีปริมาณอยู่ในช่วง 50 - 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไขมันและน้ำมันที่พบในน้ำเสียเป็นสารอินทรีย์ที่มีเสถียรภาพและย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้ยาก ประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน กลีเซอไรด์ สเตียรอยด์ กรดไขมัน ซึ่งกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบของไขมันที่พบในน้ำเสียนั้นจะมีอยู่ด้วยกัน 2 พวก คือ กรดไขมันอิ่มตัว ซึ่งรวมทั้งกรดสเตียริก (stearic acid) กรดปาล์มิติก (palmitic acid) เป็นต้น และกรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งพบว่าเป็นกรดโอเลอิกถึงร้อยละ 95 เนื่องจากส่วนประกอบต่าง ๆ จะไม่ละลายน้ำดังนั้นจึงทำให้ส่วนประกอบดังกล่าวแยกชั้นกับน้ำซึ่งหนึ่งในสามของส่วนประกอบดังกล่าวจะอยู่ในลักษณะ colloid และส่วนที่เหลือจะอยู่ในลักษณะ supercolloid

น้ำเสียจากครัวเรือนจะมีปริมาณไขมันและน้ำมันน้อยกว่าร้อยละ 25 ของซีโอดี ทั้งหมดขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร ชนิดของไขมันและน้ำมันที่ใช้ในการทำอาหาร ซึ่งไขมันและน้ำมันเหล่านี้เป็นส่วนที่สกัดได้จากตัวอย่างน้ำเสียโดยใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน (hexane) หรือ ฟีออน (freon) รวมทั้งไขมันที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยการนำไขมันกลับมาใช้ใหม่นั้นทำได้ยาก เนื่องจากไขมันจะรวมตัวกับเนื้อเยื่อ ดิน หรือวัสดุต่าง ๆ ดังนั้นของเสียที่มีไขมันสูงจะทำให้การบำบัดทำได้ยาก เพราะไขมันชอบที่จะรวมตัวกันและลอยขึ้นมาบนผิวน้ำ ทำให้อัตราส่วนพื้นที่ผิวหน้าต่ำ จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ช้าและทำให้ระบบท่อระบายน้ำอุดตัน (Wakelin and Forster, 1997; Broughton et al., 1998; Lefebvre et al., 1998)

ปริมาณของน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมนั้นแปรเปลี่ยนไปตามชนิดของอุตสาหกรรม โดยอุตสาหกรรมที่ปล่อยน้ำเสียสู่สิ่งแวดล้อมประกอบด้วย อุตสาหกรรมผลิตขนมอบกรอบ อุตสาหกรรมผลิตน้ำมันพืชและอุตสาหกรรมกลั่นน้ำมัน ซึ่งน้ำมันและไขมันที่ถูกปล่อยออกมาจะลอยอยู่บนผิวน้ำซึ่งยากแก่การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพและนอกจากนี้ยังปิดกั้นการถ่ายเทออกซิเจนจากอากาศลงสู่ น้ำซึ่งมีผลให้เกิดการเน่าเสีย และเพิ่มปัญหามลภาวะในน้ำมากขึ้น (Sastri et al., 1995)

2. วิธีการกำจัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย

โดยทั่วไปการกำจัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียเกิดขึ้นในระบบบำบัดน้ำเสียขั้นที่หนึ่ง (primary treatment) ด้วยการใช้ถังดักไขมันตามด้วยการบำบัดขั้นที่สอง (secondary treatment) โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ ในปัจจุบันวิธีการกำจัดไขมันและน้ำมันออกจากน้ำเสียมีหลายวิธี เช่น วิธีทางเคมี โดยใช้สารเคมีช่วยในการตกตะกอน โปรตีนและไขมัน โดยใช้อะลูมิเนียมซัลเฟต เฟอร์ริกคลอไรด์ และเพอร์สัลเฟต แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง เพราะสารเคมีมีราคาแพง อีกทั้งสารเคมีที่ใช้ยังมีฤทธิ์กัดกร่อนวัสดุและอุปกรณ์ที่ติดตั้งในระบบบำบัดน้ำเสีย ในขณะที่การใช้สารเคมีไม่สามารถกำจัดสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำเสียได้ (Vidal et al., 2000)

การกำจัดไขมันและน้ำมันโดยวิธีทางฟิสิกส์ โดยใช้ถังดักไขมันเพื่อให้ไขมันและน้ำมันลอยตัว ทำให้สามารถแยกออกได้ง่าย โดยการทำให้ไขมันลอยตัวในถังดักไขมันเป็นกระบวนการที่นิยมใช้อีกอย่างหนึ่งสำหรับการกำจัดไขมันและน้ำมัน สำหรับระบบกำจัดไขมันหรือน้ำมันแบบที่นิยมมากที่สุด ซึ่งจะนิยมใช้เป็นถังพักที่มีแผ่นกั้นขวางอยู่ในบ่อเพื่อดักไขมันให้ได้ปริมาณมากซึ่งจะเรียกว่าถังดักไขมัน (grease trap) หลักการการออกแบบถังดักไขมันก็ต้องมีขนาดของพื้นที่ผิวของถังเพียงพอกับปริมาณไขมันที่จะลอยขึ้นมา โดยความเร็วของน้ำในถังต้องต่ำที่สุดเท่าที่จะควบคุมได้ ส่วนบริเวณทางออกต้องไม่ทำให้ไขมันหลุดลอยออกไปได้ และถ้าเป็นถังดักไขมันที่ใช้

คนเก็บกวาดขึ้นมามากต้องหมั่นเก็บขึ้นมาให้หมดทุกวัน เวลาเก็บกากของถังดักไขมันควรมีมากกว่า 30 นาฬิกา แต่ต้องไม่นานเกินไปจนเกิดกลิ่นเหม็นขึ้นในถัง

สำหรับถังดักไขมันขนาดเล็กที่ใช้ดักไขมันตามบ้านเรือนหรือในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของไขมันจำนวนไม่มากจะออกแบบให้ถังดักไขมันนั้นสามารถรับปริมาณน้ำเสียได้ประมาณ 30 ลิตรต่อวินาที และปล่อยให้ไขมันลอยตัวขึ้นมาสู่ผิวน้ำเองแล้วปล่อยน้ำที่ผ่านการดักไขมันลงสู่ท่อระบายน้ำทิ้งสาธารณะต่อไป แต่ในการใช้ถังดักไขมันที่มีขนาดใหญ่ซึ่งสามารถรองรับปริมาณน้ำเสียและปริมาณไขมันและน้ำมันได้อย่างเพียงพอ โดยการสร้างนั้นจะสร้างเป็นบ่อดักไขมันขนาดใหญ่ซึ่งอาจจะต้องมีการเติมอากาศ เข้าไปช่วยให้ไขมันและน้ำมันลอยขึ้นสู่ผิวน้ำได้ง่ายขึ้น เพื่อไม่ให้เกิดภาวะไร้อากาศในบ่อดักไขมัน (Sastry et al., 1995)

การกำจัดไขมันและน้ำมันโดยวิธีทางชีวภาพสิ่งสำคัญที่จะใช้ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย คือ เอนไซม์ไลเปส

3. เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส หรือ กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (triacylglycerol hydrolase) (E.C.3.1.1.3) จัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) เอนไซม์ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์เป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบทั่วไปในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ของสัตว์เช่น หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ ซีรัม (serum) และที่สำคัญคือ ตับอ่อน (pancreatic lipase) โดยเฉพาะจากตับอ่อนของสุกร เนื่องจากมีความเข้มข้นสูงและสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก นอกจากนี้ยังมีการแยกเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหนู โคและกระบือ ส่วนเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากน้ำมันได้มีรายงานบ้างแต่การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ไม่ค่อยประสบความสำเร็จ เนื่องจากคุณสมบัติไม่คงตัว

เอนไซม์ไลเปสพบในพืชจำพวก ข้าวสาลี ข้าวโอต ข้าวไรย์ ฝ้าย ถั่วเหลืองและละหุ่ง โดยมีการศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดถั่ว พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์จะอยู่ในช่วงเป็นกรดและมีรายงานการใช้เอนไซม์ไลเปสจากข้าวสาลีในรูปสารละลายเข้มข้นแต่ไม่พบรายงานการใช้เอนไซม์ไลเปสจากข้าวสาลีในรูปสารละลายบริสุทธิ์ แต่แหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญมาจากจุลินทรีย์ซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์เพราะจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เร็วและเลี้ยงง่าย นอกจากนี้

ยังสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมได้และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์

4. จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการทำงานแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และชนิดของไขมันที่พบในแหล่งที่คัดเลือกจุลินทรีย์ ซึ่งในที่นี้จะแบ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสไว้ 3 จำพวกใหญ่ ๆ คือ

4.1. เชื้อรา เชื้อราถือว่าเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ดี และนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร มีการศึกษาพบว่า *Aspergillus niger* หลาย ๆ สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีและนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้ (Pokorny et al., 1994; Macris et al., 1996; Hatzinikolaou et al., 1996)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาพบว่า *Rhizopus sp.* (Espinosa et al., 1990; Hiol et al., 2000; Elibol and Özer, 2000) และ *Penicillium sp.* (Miranda et al., 1999) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เช่นกัน และยังคงมีเชื้อราอีกหลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส แต่ยังไม่มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์

4.2. ยีสต์ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกประเภทหนึ่ง ที่มีผู้ศึกษาถึงคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์จนถึงระดับการค้า เนื่องจากยีสต์ที่ใช้ศึกษาไม่ก่อให้เกิดโรคและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ พบว่ายีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ *Candida rugosa* (Benjamin and Pandey, 1996)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Yarrowia lipolytica* 681 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่า *Yarrowia lipolytica* 179, *Y. lipolytica* ACP, *Candida rugosa* ATCC 14830 และ *C. utilis* CDBBC245 (Corzo and Revah, 1999) โดยขึ้นอยู่กับกระบวนการหมักและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ พีเอช และสารเหนี่ยวนำ (inducer) เป็นต้น (Destain et al., 1997)

4.3. แบคทีเรีย การใช้แบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ไลเปสนิยมนำไปใช้อย่างมาก เนื่องจากสามารถปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ได้ง่าย โดยพบว่า *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F - 11 สามารถผลิต alkaline lipase ได้ในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำมันมะกอก (olive oil) ถากถั่วเหลือง (soy meal) triton X - 100 และ โซเดียมไอออน (sodium ion) เช่นเดียวกับ *Pseudomonas fragi* CRDA 037 ที่สามารถผลิต alkaline lipase ได้ในอาหารที่มีหางนม (whey) (Lin et al., 1995; Schuepp et al., 1997) ในขณะที่แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่

ทนอุณหภูมิสูงได้ เช่น *Flavobacterium odoratum* *Bacillus* sp. H1 *Pseudomonas aeruginosa* MB50014 เป็นต้น (Labuschagne et al., 1997)

5. การผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 2 รูปแบบ คือ เอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วถูกขับออกมาทำงานภายนอกเซลล์ เรียกว่า extracellular enzyme กับเอนไซม์ที่สร้างขึ้นและทำงานภายในเซลล์โดยทำปฏิกิริยากับสับสเตรตภายในเซลล์ เรียกว่า intracellular enzyme (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2539)

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูปของ extracellular enzyme เช่น เชื้อรา *Aspergillus niger* BTL (Hatzinikolaou et al., 1996; Macris et al., 1996) *Fusarium solani* (Maia et al., 2001) และ *Hendersonula toruloidea* typeA (ATCC64930) (Odibo et al., 1995)

เชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูปของ extracellular enzyme เช่น *Yarrowia lipolytica* CBC 6303 (Destain et al., 1997) และ *Y. lipolytica* 681 (Corzo and Revah, 1999)

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูปของ extracellular enzyme เช่น *Pseudomonas tolaassii* (Baral and Fox, 1997) *P. pseudoalcaligenes* F - 111 (Lin et al., 1995) *Bacillus* sp. H1 (Handelsman and Shoham, 1994) และ *Streptomyces rimosus* (Abramic et al., 1999) โดยมี *Pseudomonas fragi* CRDA 037 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูป extracellular และ intracellular enzyme ได้ (Schuepp et al., 1997)

โดยประเภทของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์แบ่งตามความจำเพาะของกิจกรรมต่อตำแหน่งบนกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม (Kramer, 1971; Macrae, 1983) ได้แก่

5.1. กลุ่มเอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (Non-specific lipase)

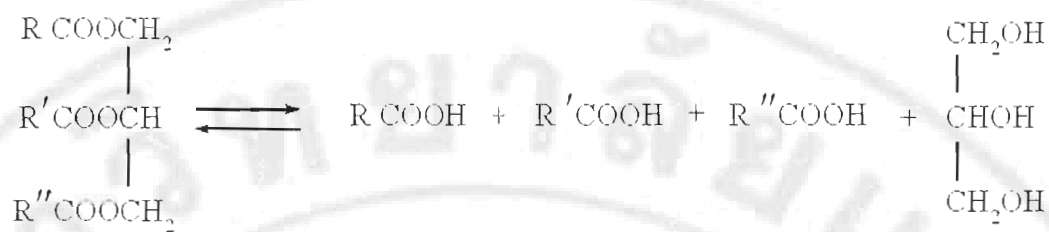
เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ไม่มีความจำเพาะในการย่อยกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งจะย่อยไตรกลีเซอไรด์อย่างสมบูรณ์ได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล แต่จะพบ diglyceride หรือ monoglyceride เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ เอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้ผลิตโดย *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้ (ภาพ 1)

5.2. กลุ่มเอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (1, 3 - specific lipase)

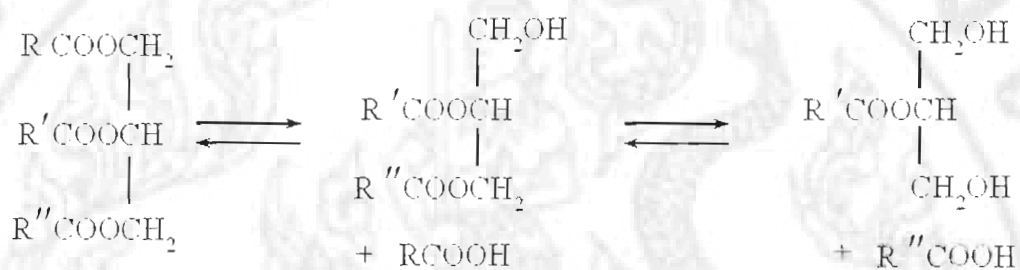
เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อการย่อยกรดไขมันบนตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นผลิตภัณฑ์ คือ 1, 2 (2, 3) - diglyceride และ 2 - monoglyceride เนื่องจากว่า 1, 2 (2, 3) - diglyceride และโดยเฉพาะ 2 - monoglyceride นั้นเป็นไขมันที่ไม่คงตัว เมื่อถูกบ่มเป็นระยะเวลานานจะเกิด acyl migration ได้เป็น 1, 3 - diglyceride และ 1 (3) - monoglyceride ตามลำดับซึ่งเมื่อเอนไซม์ดังกล่าวเข้าไปย่อยสลาย เกิดเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล เอนไซม์ในกลุ่มนี้ผลิตโดยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และพวก *Rhizopus sp.* ปฏิกริยาของเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้ (ภาพ 1)

5.3. กลุ่มเอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (fatty acid specific lipase)

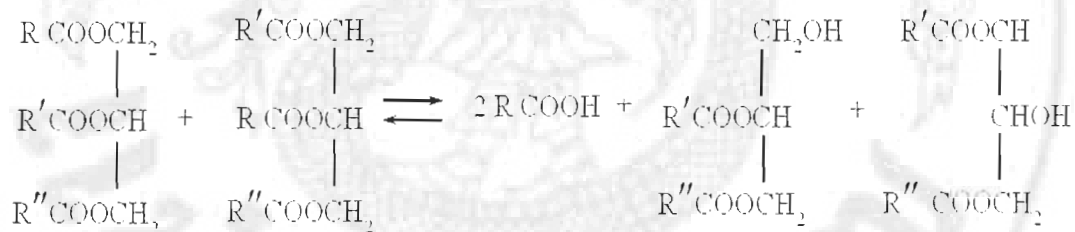
เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Geotrichum candidum* ที่ย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดีแต่กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวที่ไม่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 9 นั้นจะเกิดการย่อยสลายได้ไม่ดี ปฏิกริยาของเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้ (ภาพ 1)



ก)



ข)



ค)

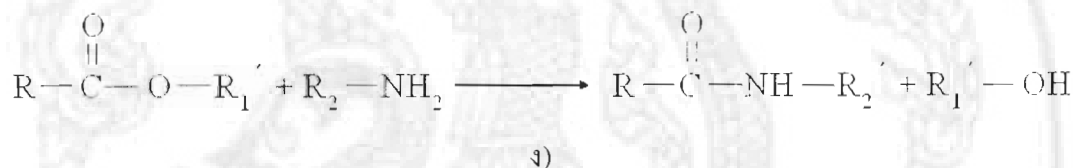
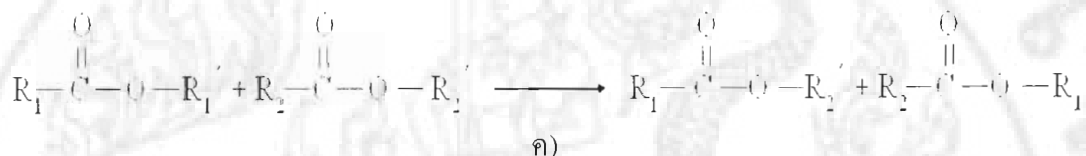
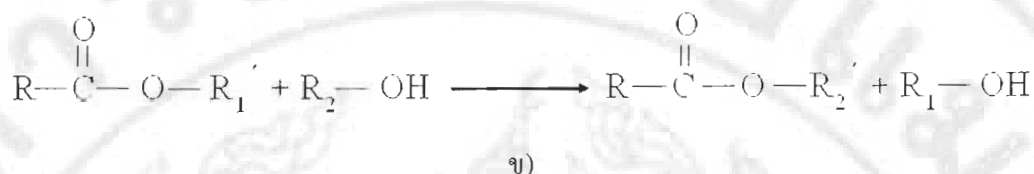
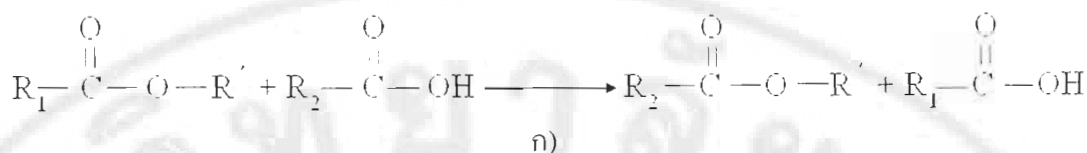
ภาพ 1 ประเภทของเอนไซม์ไลเปสแบ่งตามความจำเพาะของกิจกรรมต่อตำแหน่งบนกลีเซอไรด์

- ก) เอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์
- ข) เอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์
- ค) เอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์

ที่มา : Macrae (1983)

เอนไซม์ไลเปสพวกที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ จะมีการ esterify (reverse hydrolysis) ระหว่างที่มีการย่อยสลาย ขณะที่เอนไซม์ไลเปสชนิดที่มีความจำเพาะจะไม่มี การ reverse hydrolysis จึงทำให้เอนไซม์ไลเปสชนิดที่มีความจำเพาะสามารถย่อยสลายสับสเตรท ได้เร็วกว่าพวกที่มีความจำเพาะ (Okumura et al., 1981)

นอกจากนี้ ยังสามารถแบ่งประเภทของเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะของกิจกรรมต่อ ตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเอสเทอร์ใน โมเลกุลของ ไตรกลีเซอไรด์ กลุ่มที่สองเป็นเอนไซม์ที่เร่งการสังเคราะห์สารประกอบเอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol) ต่างๆ การสังเคราะห์สารที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสเรียกว่า ปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งจะเกิดขึ้นใน 4 รูปแบบคือ เกิดขึ้นระหว่างเอสเทอร์ กับกรดไขมันอิสระ (acidolysis) เอสเทอร์กับแอลกอฮอล์ (alcoholysis) เอสเทอร์กับเอสเทอร์ (ester exchange) และเอสเทอร์กับกรดอะมิโน (aminolysis) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงในภาพ 2 ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้มีความสำคัญมากในการปรับปรุงคุณสมบัติไขมันหรือน้ำมัน รูปแบบของ ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ทั้งสองแบบนี้ต่างมีความสำคัญในอุตสาหกรรม แต่ในกรณีของการ บำบัดน้ำเสียนั้นต้องการเอนไซม์ไลเปสที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่านั้น (Macare, 1983; Yamane, 1987)



ภาพ 2 รูปแบบปฏิกิริยา transesterification ของเอนไซม์ไลเปส

- ก) Acidolysis
- ข) Alcoholysis
- ค) Ester exchange (Interesterification)
- ง) Aminolysis

ที่มา : Yamane (1987)

เมื่อพิจารณาถึงช่วงการเจริญและการผลิตเอนไซม์แล้วมีความแตกต่างกันขึ้นกับกระบวนการหมักและชนิดของจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus* sp. H1 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในช่วง stationary phase ส่วนเชื้อรา *Handersonula toruloidea* type A (ATCC64930) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในช่วง late log phase ซึ่งคล้ายคลึงกับการผลิตเอนไซม์ไลเปสใน *Fonsecaea pedrosoi* และ *Phialophora verrucosa* สำหรับ *Pseudomonas aeruginosa* MB5001 เมื่อเลี้ยงในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) จะสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในช่วง late log phase เช่นกัน (Chartrain et al., 1993; Handelsman and Shoham, 1994)

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

6.1. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดอยู่ในช่วงที่แตกต่างกัน เช่น *Bacillus sp.* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสอยู่ใน 2 ช่วงอุณหภูมิ คือ ช่วงอุณหภูมิปานกลาง (mesophile) คือ อุณหภูมิระหว่าง 20 ถึง 45 องศาเซลเซียส และช่วงอุณหภูมิสูง (thermophile) อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส Pabai et al. (1995) รายงานว่า *Bacillus subtilis* 168 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 45 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ Sharma et al. (2002) รายงานว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus sp.* RSJ - 1 เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมากที่สุดเท่ากับ 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีรายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* จะลดลงอย่างรวดเร็ว ที่อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์จะหายไปเกือบหมดที่ 50 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มไว้เป็นเวลานาน 30 นาที (Hiol et al., 2000)

6.2. พีเอช

Hiol et al. (2000) พบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครั้งหนึ่ง เมื่อบ่มไว้ที่พีเอช 8.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วน Corzo and Revah (1999) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Yarrowia lipolytica* 681 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 6.0 - 7.0 และจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพีเอชสูงกว่า 8.0 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Destain et al. (1997) ที่พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Yarrowia lipolytica* CBS6303 มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.0 จากรายงานของ Lindsay et al. (2000) พบว่า *Bacillus subtilis* 155, *B. pumilus* 122, *B. licheniformis* 137, และ *B. cereus* 144 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เมื่อพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.8 6.8 6.5 และ 7.8 ตามลำดับ Sharma et al. (2002) รายงานว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus sp.* RSJ - 1 เจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดที่พีเอช 9.0 ได้เท่ากับ 10.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร

6.3. ตัวยับยั้ง

Handelsman and Shoham (1994) พบว่าไอออนของโลหะหนักบางชนิด เช่น Hg^{2+} , Al^{3+} และ Fe^{2+} จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* ส่วนเอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Pseudomonas fragi* ถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมีไอออนของ Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} และ Cu^{2+} และพบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium roqueforti* S - 86 จะถูกยับยั้งการทำงานด้วย K^+ และ Na^+ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร (Petrovic et al., 1990)

สารซักฟอก (detergent) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ Hiol et al. (2000) พบว่า SDS (sodium dodecyl sulfate) ที่ความเข้มข้น 1 - 7 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์จะถูกทำลายในตัวทำละลายที่ชอบน้ำได้ (hydrophilic solvent) เช่น อะซีโตน (acetone) หรือ แอลกอฮอล์สายโซ่สั้น ($C_1 - C_3$)

Castellar et al. (1996) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* จะลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อมีกรดโอเลอิก (oleic acid) ความเข้มข้น 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้กรดไขมันเดคาโนอิก (decanoic) และดودेคาโนอิก (dodecanoic) จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *C. viscosum* และ *Acinetobacter sp.* OPA55 ตามลำดับ (Jenta et al., 1997; Markweg - Hanke et al., 1995)

6.4. ความต้องการธาตุอาหาร

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แตกต่างกัน สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่จุลินทรีย์ต้องการผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้นประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสแตกต่างกัน

Kosugi et al. (1988) ได้รายงานว่า *Pseudomonas fluorescens* ต้องการแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว คือ แป้งถั่วเหลือง ปราศจากไขมัน (defatty soy flour) ในขณะที่ Shabtia and Daya-Mishne (1992) และ Kojima et al. (1994) ได้รายงานว่า *Chromobacterium viscosum* ต้องการแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 2 ชนิดคือ soluble starch และ soybean meal

แหล่งคาร์บอนที่สำคัญและจำเป็นต่อการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ น้ำมันที่ได้จากพืชและสัตว์ต่าง ๆ รวมถึง น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก (Del Roi et al., 1990; Pandey, 1996) ไขมันไก่ (Bednarski et al., 1993) และไตรกลีเซอไรด์อื่น ๆ นอกจากนี้สารทำความสะอาด Tween 80 ก็เป็นแหล่งคาร์บอนอีกชนิดหนึ่งที่สามารถเหนี่ยวนำจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง (Okeke and Okolo, 1990; Gilbert et al., 1991; Becker et al., 1997)

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในจุลินทรีย์แต่ละชนิด ก็แตกต่างกันไป แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้แก่ กากถั่วเหลือง ยูเรีย เปปโตน ทริปโตน เนื้อสัตว์ และยีสต์สกัด เชื้อ *Chromobacterium viscosum*, *Yarrowia lipolytica* และ *Candida rugosa* ต้องการยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Valero et al., 1988; Corzo and Revah, 1999)

Sharma et al. (2002) รายงานว่า *Bacillus sp.* RSJ - 1 ต้องการเนื้อสัตว์และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนแหล่งอนินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม และ

เกลือไนโตรเจน เช่น *Alcaligenes sp.* ต้องการ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน (Kokusho et al., 1982) และ *Bacillus sp.* IHI - 91 ต้องการ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน (Becker et al., 1997)

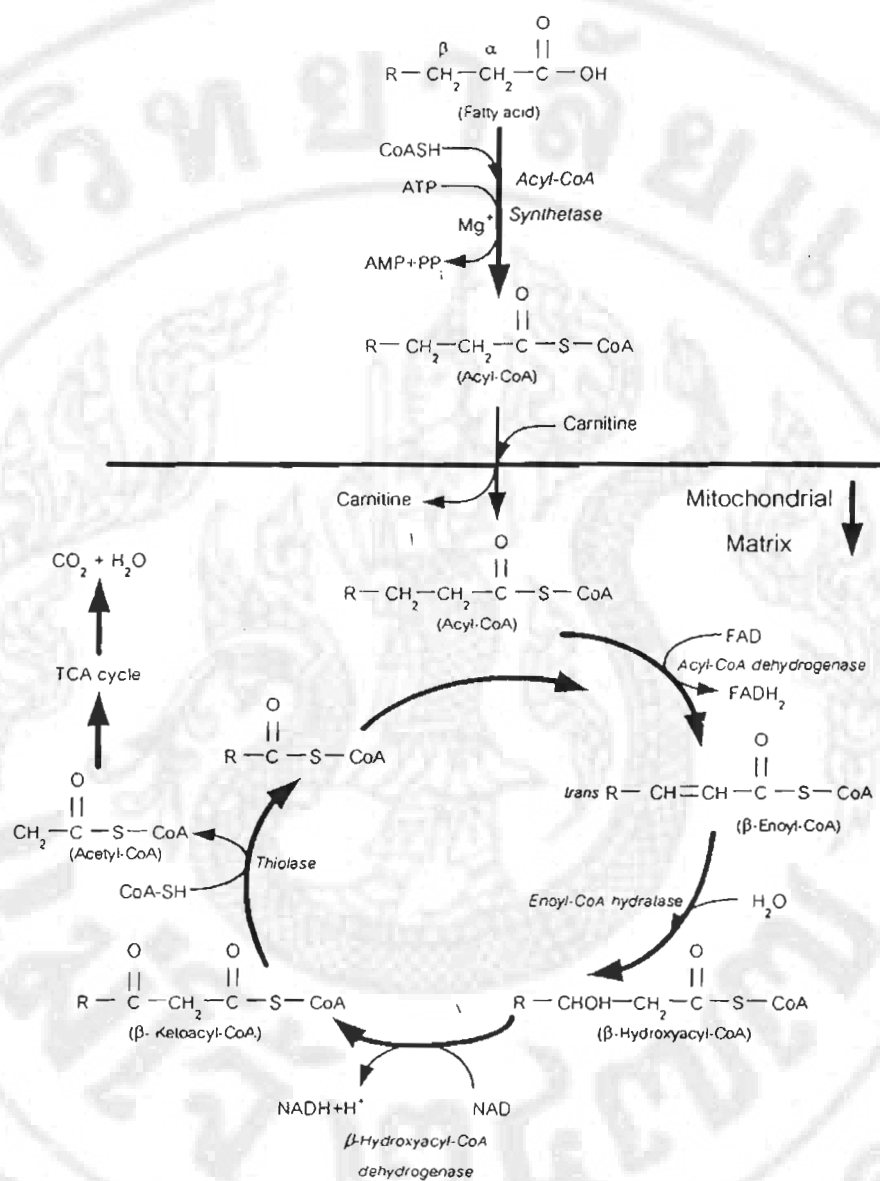
นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุก็มีความสำคัญเช่นกัน โดย Kosugi et al. (1988) ใช้ K_2HPO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ทั้งใน *Pseudomonas fluorescens* และ *Chromobacterium viscosum*

7. กลไกการย่อยสลายไขมันของจุลินทรีย์

การย่อยสลายไขมันโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้น เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตขึ้นในเซลล์จะถูกขับออกมานอกเซลล์เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับไขมัน โดยไขมันส่วนใหญ่เป็นไตรกลีเซอไรด์จะถูกไฮโดรไลซิส (hydrolysis) บริเวณพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ด้วยเอนไซม์ไลเปส ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กลีเซอรอล และกรดไขมัน

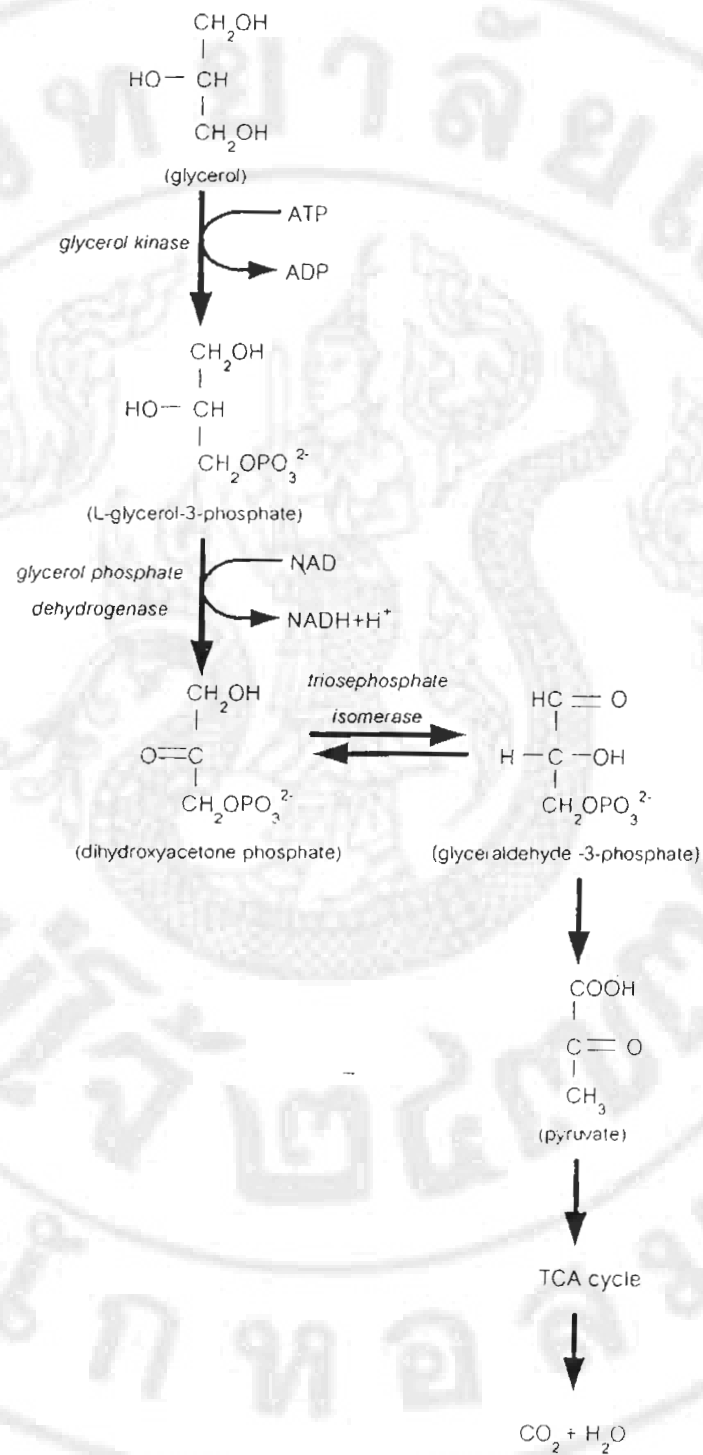
การย่อยสลายไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์ โดยเอนไซม์ไลเปสปฏิกิริยาอาจเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หรือไม่สมบูรณ์ก็ได้ ในกรณีการย่อยสลายเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ไตรกลีเซอไรด์จะถูกย่อยเป็นกรดไขมันกับโมโนกลีเซอไรด์ หรือไดกลีเซอไรด์ก็ได้ แต่ถ้าเกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ กลีเซอรอลและกรดไขมัน โดยกรดไขมันที่สะสมจะถูกใช้โดยจุลินทรีย์ ซึ่งกรดไขมันจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการย่อยภายในเซลล์โดยผ่านวิถีเบตา - ออกซิเดชัน (β - oxidation) จนกระทั่งได้เป็นอะซิติลโคเอ (acetyl - CoA) และเข้าสู่วัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิกแอสิก (tricarboxylic acid cycle) ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (ภาพ 3)

การใช้กลีเซอรอล หมู่ฟอสเฟสจะถูกเติมให้กลีเซอรอลและถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต (dihydroxy acetone phosphate) และจะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นอีกไอโซเมอร์หนึ่งคือ กลีเซอรอลดีไฮด์ - 3 - ฟอสเฟต (glyceraldehydes - 3 - phosphate) ซึ่งเป็นตัวกลางของวิถีไกลโคไลซิส ดังนั้นกลีเซอรอลจึงถูกเปลี่ยนแปลงเป็นไพรูเวต (pyruvate) และเข้าสู่วัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิกแอสิก (tricarboxylic acid cycle) ได้เป็น คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเช่นกัน (ภาพ 4) (Campbell 1992; Wakelin and Forstrer, 1997)



ภาพ 3 ปฏิกริยาแตกตัวขั้น การขนส่ง และ เบตา - ออกซิเดชันของกรดไขมัน

ที่มา : Campbell (1992)



ภาพ 4 ปฏิบัติการย่อยสลายกลีเซอรอล

ที่มา : Campbell et al. (1992)

8. การใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย

ในการศึกษาการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียนั้นมีรายงานการวิจัยต่างๆ เช่น Tan and Gill (1987) ศึกษาการใช้ไขมันจากสัตว์เป็นแหล่งอาหารให้จุลินทรีย์ *Saccharomyces lipolytica* ในการเจริญเติบโต ไขมันสัตว์ที่ใช้จะจับตัวเป็นของแข็งเมื่อเติมลงในอาหาร ทำให้ต้องใช้อัตราการกวนที่แรงเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของไขมัน ซึ่งอัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อไขมันมีการกระจายตัวมากขึ้น ในขณะที่ Marty et al. (1996) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายไขมันในน้ำทะเล โดยทำการผสมน้ำเสียชุมชนกับน้ำทะเล พบว่าสามารถย่อยสลายไขมัน และสเตอรอล (sterol) ได้อย่างรวดเร็ว ในสัปดาห์แรกถึงร้อยละ 70

Cappe et al. (1994) ได้คัดเลือกเชื้อ *Acinetobacter* sp. จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อได้ 4 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ BO2 และ IB2 สามารถย่อยสลายไขมันในช่วงอุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียสได้ จึงนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มาใช้ในการย่อยสลายไขมันในระบบบำบัดน้ำเสีย

Scioli and Vollaro (1997) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันมะกอก โดยใช้เชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 พบว่า สามารถลดปริมาณซีโอดีได้ถึงร้อยละ 80 และยังสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 770 หน่วยต่อลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมง

Wakelin and Forster (1997) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยไขมันได้จากถังดักไขมันระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งและเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ได้แก่ *Acinetobacter* sp., *Rhodococcus rudra*, *Nocardia amarae* และ *Microthrix parvicella* พบว่า *Acinetobacter* sp. เป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไขมันได้มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 60 ถึงร้อยละ 65 แต่จุลินทรีย์ในรูปแบบผสมจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้มากกว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถย่อยสลายไขมันได้มากกว่าร้อยละ 90

Lefebvre et al. (1998) ได้ศึกษาการบำบัดไขมันตามบ้านเรือนด้วยตะกอนเร่งที่นำมาจากระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่า ตะกอนเร่งซึ่งเป็นเชื้อผสมสามารถกำจัดไขมันในน้ำเสียจากบ้านเรือนได้ร้อยละ 60 ถึงร้อยละ 70

Backer et al. (1999) ศึกษาการย่อยสลายน้ำเสียที่มีน้ำมันมะกอกปนเปื้อน จากโรงงานขนแกะที่มีไขมันสูง (lipid - rich wool scouring wastewater) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* IHI - 91 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน และมีอุณหภูมิสูง (65 องศาเซลเซียส) พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกได้มากกว่าร้อยละ 90 มีอัตราการย่อยสูงสุด 900 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกมากกว่า 4 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญของเชื้อถูกยับยั้งอย่างรุนแรง

Kwaku et al. (1999) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันสูง ด้วยกระบวนการแบบใช้ออกซิเจน โดยใช้กล้าเชื้อ JAT ที่มีแบคทีเรียซึ่งแยกมาจากน้ำเสียที่มีไขมันสูงผสมอยู่ 15 สายพันธุ์ พบว่าสามารถย่อยสลายไขมันได้หลายชนิด เช่น น้ำมันสลัด (salad oil) น้ำมันหมู (lard oil) น้ำมันมะกอก (olive oil) น้ำมันงา (sesame oil) น้ำมันข้าวโพด (corn oil) และน้ำมันถั่วลิสง (peanut oil) เป็นต้น

Chahinian et al. (2000) กล่าวว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Penicillium expansum*, *P. solitum*, *P. crustosum* และ *P. citrinum* จะผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิด I ซึ่งจะย่อยไตรบิวทีริน (tributyrin) และไตรโอเลอิน (triolein) ส่วน *P. camembertii* จะผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิด II ซึ่งจะย่อยโมโนเอซิลกลีเซอรอลและไดเอซิลกลีเซอรอลสายโซ่ยาวและปานกลางได้ แต่จะไม่ย่อยไตรเอซิลกลีเซอรอล เช่นเดียวกับเชื้อ *Geotrichum candidum* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้หลายชนิด ซึ่งก็จะจำเพาะต่อสับเตรทที่แตกต่างกัน (Sugihara et al., 1993)

Lescic et al. (2001) พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces rimosus* จะย่อยน้ำมันที่มีองค์ประกอบของกรดลิโนเลอิกและกรดโอเลอิก ในน้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันมะกอก ได้มากกว่ากรดไตรโอเลอินและไตรลิโนเลอิน ในน้ำมันหมู

Bhumibhamon et al. (2002) ได้ทำการศึกษาคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน พบว่ามีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ และมี *Pseudomonas sp.* 4 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง คือ KUL8, KUL12, KUL17 และ KUL39 เมื่อนำจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มาศึกษาการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจากโรงงานขนมอบ พบว่าเชื้อ KUL8 และ KUL39 ย่อยสลายไขมันได้ร้อยละ 88.81 และร้อยละ 81.69 ซึ่งสูงกว่าเชื้อ KUL12 และ KUL17 และมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมจุลินทรีย์ดังกล่าวถึงร้อยละ 20 นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้ร้อยละ 98 ถึงร้อยละ 99 สำหรับการใช้จุลินทรีย์ผสม 4 สายพันธุ์มาศึกษาการย่อยสลายไขมันในน้ำเสีย พบว่าอัตราส่วนระหว่างเชื้อ KUL8: KUL12: KUL17: KUL39 เท่ากับ 1: 1: 1: 2 จะให้การย่อยสลายได้สูงสุดประมาณร้อยละ 74.40 ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว ทั้งนี้เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์ผสมอาจมีเชื้อบางชนิด สามารถสร้างสารที่เป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดอื่น ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อชนิดอื่นลดลงและทำงานได้ไม่เต็มที่ ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ผสมจึงควรเลือกจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญของกันและกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานอย่างแท้จริง

กรอบแนวความคิด



บทที่ 3

วิธีการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Pseudomonas aeruginosa ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

วัสดุและอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ
2. กระบอกตวง
3. บีกเกอร์
4. หลอดไม้โครทิวป์
5. ขวดรูปชมพู่
6. ขวด Duran
7. กรวยแยก
8. ไมโครปิเปตต์
9. ถ้วยกระเบื้อง
10. กระจกกรอง
11. หลอดทดลอง
12. แท่งแก้ว
13. ปิเปตต์แก้ว
14. ขวดปรับปริมาตร
15. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
16. ตะเกียงแอลกอฮอล์
17. ห่วงถ่ายเชื้อ
18. ตะแกรงวางหลอดทดลอง
19. กระจกกรองใบแก้ว GF/C

20. หลอดย่อยสลาย

21. โถคู่ความชื้น

เครื่องมือ

1. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer: Perkin Elmer, model Lambda 25, Germany)
2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave: Hirayama, model HVE – 50, Japan)
3. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker: STUART Scientific, model SI 50, UK)
4. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker: SANYO GALLENKAMP PLC, model IOX400.XX2.C, UK)
5. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker: Forma Scientific, model 4520, USA)
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH meter: Satorius, model PP – 50, Germany)
7. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet: Forma Scientific, model 1285, USA)
8. ตู้อบลมร้อน (hot air oven: BINDER, model ED115(E2), Norway)
9. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator: BINDER, model ED240(E2), Norway)
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath: Memmert, model TW 20, U.S.A)
11. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (balance: METTLER – TOLEDO, model PG802 – S, Switzerland)
12. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical balance: METTLER – TOLEDO, model AG285, Switzerland)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge: ANDREAS HETTICH, model UNIVERSAL 32, Germany)
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge: MSE, model HARRIER18/80, UK)
15. เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กและเตาให้ความร้อน (magnetic stirrer and hot plate: JENWAY, model 1000, UK)
16. เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (gel electrophoresis : Gel mate 2000, model GEP – 103, Japan)
17. เครื่องเขย่าผสม (vortex: Scientific Industries, model G – 560E, USA)
18. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine: MJ research, model PTC 1196 HB, USA)

19. เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (gel electrophoresis: BIO – RAD, model Mini PROTEAN[®] 3Cell, USA)
20. เครื่องวัดปริมาณโปรตีน (microplate reader: BIO – RAD, model 680XR, USA)
21. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope: Olympus, model CH50, Japan)
22. ตู้แช่แข็ง – 80 องศาเซลเซียส (Chest-type Ult Freezer: Sanyo รุ่น MDF-592, Japan)

สารเคมีและน้ำยาทดสอบ

1. Acetic acid (Merck, Germany)
2. Ammonium Chloride (Merck, Germany)
3. Agar powder (Himedia Laboratories, India)
4. Agarose (Nippon Gene, Japan)
5. Ammonium bicarbonate (Ajax, Australia)
6. Ammonium sulphate (Ajax, Australia)
7. Beef extract (Himedia Laboratories, India)
8. Bovine serum albumin (BSA; Merck, Germany)
9. Calcium chloride dehydrate (Merck, Germany)
10. Calcium carbonate (Ajax, Australia)
11. Coomassie Brilliant Blue R – 250 (BIO – RAD, USA)
12. Cupric acetate (Ajax, Australia)
13. di - Potassium hydrogen orthophosphate (Fisher, UK)
14. di - Sodium hydrogen orthophosphate (Fisher, UK)
15. Ethanol (Merck, Germany)
16. Feric chloride (Fisher, UK)
17. Glycerol (Merck, Germany)
18. Hexane (Ajax, Australia)
19. Hydrochloric acid (Merck, Germany)
20. Iron (II) ammonium sulphate (Ajax, Australia)
21. Isooctane (Ajax, Australia)
22. Magnesium sulfate heptahydrate (Fisher, UK)

23. Oleic acid (Merck, Germany)
24. Peptone (Himedia Laboratories, India)
25. Phosphoric acid (Merck, Germany)
26. Potassium dichromate (Fisher, UK)
27. Potassium dihydrogen orthophosphate (Fisher, UK)
28. Pyridine (Ajax, Australia)
29. Silver sulfate (Poch, Poland)
30. Sodium chloride (Merck, Germany)
31. Sodium hydroxide (Merck, Germany)
32. Sulfuric acid (Ajax, Australia)
33. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris base: National diagnostics, USA)
34. Urea (Ajax, Australia)
35. Yeast extract (Bio basic, Canada)
36. น้ำมันมะกอก (Soboroso, Spain)
37. น้ำตาลทราย (มิตรผล, ไทย)

ชุดทดลองสำเร็จรูป (Kit)

1. Isoplant DNA extraction kit (Nippon Gene, Japan)
2. GoTaq Master mix (Promega, USA)
3. TaKaRa SUPRECTM – PCR (Takara, Japan)
4. Gram's staining set (RVL Laboratories, ไทย)

ดีเอ็นเอและโปรตีนมาตรฐาน (DNA and Protein Markers)

1. O' GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder Plus, ready to use (Fermentas, USA)
2. Bovine Serum Albumin (BSA; Bio – Rad, USA)

ไพรเมอร์ (Primer)

1. 27F (5' – TGTGCTCCAAAGTTGCATGT – 3')
2. 357F (5' – CTACGGGAGGCAGCAG – 3')
3. 920F (5' – AAAGAAAAGAATGAATGAACCTT – 3')
4. 520R (5' – ACGCCATCTTTCGATACTGC – 3')
5. 1080R (5' – CC (G/A) AA (T/C) TC (T/C) TC (A/G) CAICCCCA – 3')
6. 1522R (5' – AAGGAGGTGATCCA (AG) CCGCA – 3')

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

1. อาหารสูตร NA
2. อาหารสูตร NB
3. อาหารสูตร Tween 80

วิธีการทดลอง

ในการทดลองแบ่งออกเป็น 5 การทดลอง ได้แก่

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในระดับห้องปฏิบัติการ
3. ออกแบบระบบการแยกและย่อยไขมันและน้ำมันโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ในห้องปฏิบัติการ
4. การศึกษาประสิทธิภาพของระบบแยกและย่อยไขมันและน้ำมันในพื้นที่จริง โดยการติดตั้งร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานปลาสำกริพน จังหวัดพะเยา
5. การศึกษาลักษณะและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันจากโรงงานปลาสำกริพน

โดยแต่ละการทดลองมีรายละเอียด ดังนี้

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

วิธีการทดลอง

ทำการแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของไขมันและน้ำมัน และจากแหล่งธรรมชาติด้วยเทคนิค enrichment culture (Chigusa et al., 1996) แล้วคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น โดยทดสอบการเกิดวงใสบนอาหารแข็งสูตร Tween 80 และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ในระดับห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการตรวจสอบค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ไลเปสเปรียบเทียบกับ *Pseudomonas* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ทำการบันทึกจำนวนไอโซเลทของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนของไขมันและน้ำมัน แล้วนำเสนอข้อมูลในรูปของตารางบันทึกผล ส่วนการทดสอบด้วยอาหารแข็งสูตร Tween 80 ทำการบันทึกผลการเกิดวงใส และขนาดของวงใส แล้วนำเสนอข้อมูลในรูปของตารางบันทึกผล และรูปภาพประกอบ

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ ทำการเก็บผลปริมาณไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้ แล้วนำเสนอข้อมูลในรูปแบบของตารางบันทึกผล โดยแสดงร้อยละของไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้ พร้อมทั้งภาพประกอบ

การตรวจสอบค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ไลเปส ทำการบันทึกค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (lipase activity) และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส (lipase specific activity) เปรียบเทียบกับ *Pseudomonas* sp. แล้วนำเสนอข้อมูลในรูปแบบของตารางบันทึกผลและภาพประกอบ

การทดลองที่ 2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในห้องปฏิบัติการ

วิธีการทดลอง

เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสีย ความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้น และความเร็วรอบในการกวนผสมที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ในระดับห้องปฏิบัติการ แบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD)

การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ทำการบันทึกปริมาณไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้ แล้วนำเสนอข้อมูลในรูปแบบของตารางบันทึกผล โดยแสดงร้อยละของไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้ พร้อมทั้งภาพประกอบ

การทดลองที่ 3 การออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมัน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการทดลอง

ทำการสร้างถังแยกและย่อยไขมันที่มีขนาดความจุของน้ำเสีย 150 - 180 ลิตร โดยนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาใช้เพื่อควบคุมการออกแบบ

การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ทำการนำเสนอข้อมูลระบบบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมัน พร้อมภาพประกอบ

การทดลองที่ 4 การศึกษาประสิทธิภาพของระบบแยกและย่อยไขมันในพื้นที่จริง โดยการติดตั้งร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานปลาสำศรีทน จังหวัดพะเยา

วิธีการทดลอง

ทำการติดตั้งระบบแยกและย่อยไขมันร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานปลาสำศรีทน จังหวัดพะเยา โดยน้ำเสียจะถูกพักไว้ที่ถังพักน้ำเสียก่อนเข้าสู่ถังแยกไขมันและน้ำมัน แล้วทำการศึกษาประสิทธิภาพในการแยกไขมันและน้ำมันของถังแยกไขมัน แล้วทำการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยไขมันและน้ำมันของถังย่อยไขมัน

การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ทำการบันทึกปริมาณไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้ ค่าซีโอดี (FCOD) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งแขวนลอย (SS) และค่าพีเอช แล้วนำเสนอข้อมูลในรูปแบบของตารางบันทึกผล พร้อมทั้งภาพประกอบ

การทดลองที่ 5 การศึกษาลักษณะและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันจากโรงงานปลาต้ม

วิธีการทดลอง

ทำการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้ โดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) และลักษณะของโคโลนี จากนั้นจำแนกชนิด (identification) ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA (16S rRNA sequencing)

การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ทำการบันทึกรูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์และการติดสีแกรม ลักษณะโคโลนี และผลการจำแนกชนิดจุลินทรีย์ในระดับยีนส์และสปีชีส์ แล้วนำเสนอข้อมูล พร้อมภาพประกอบ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองทางสถิติ ด้วยวิธี Analysis of Variances (ANOVA) และจัดกลุ่มของข้อมูล ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม STATGRAPHIC Plus 3.0

วิธีดำเนินงาน

1. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

1.1. ทำการแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำ บริเวณที่มีการปนเปื้อนของไขมันและน้ำมัน ด้วยเทคนิค enrichment culture โดยใช้ตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างดินใช้ 1 กรัม ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร enrichment culture ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 – 2 วัน

1.2. ทำการเจือจางเชื้อด้วยวิธี serial dilution จากนั้นเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่มีน้ำมันมะกอกเป็นองค์ประกอบ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 – 3 วัน

1.3. นำเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate แล้วเก็บเชื้อบนอาหารวุ้นผิวแข็ง Nutrient agar (NA)

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

2.1. นำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1. มาทำการคัดเลือกขั้นต้น โดยทำการจุด (spot) เชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทบนอาหารแข็งสูตร Tween 80 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จากนั้นสังเกตการเกิดวงใส ลักษณะของวงใส และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

2.2. ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 12 มิลลิเมตร มาทดสอบการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งมีค่าซีโอดี เท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 10 ของน้ำเสียทั้งหมด

2.2.1. เติมน้ำเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทซึ่งเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน ร้อยละ 5 ของน้ำเสียทั้งหมด

2.2.2. เพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีการกวนผสมที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 7 วัน

2.2.3. วิเคราะห์ปริมาณไขมันและน้ำมันที่เหลือในน้ำเสียด้วยวิธีกรวยแยก โดยใช้ เฮกเซน (Hexane) เป็นตัวทำละลาย และบันทึกผลในหน่วย กรัมต่อลิตร

3. การตรวจสอบค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ไลเปส

3.1. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีร้อยละการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสูงที่สุด 3 ไอโซเลทแรก

3.2. ตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี Colorimetric (Kwon and Rhee 1986)

3.3. จากเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1.1. เปรียบเทียบกับเชื้อ *Pseudomonas* sp. (จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

4. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ผสม เพื่อการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในห้องปฏิบัติการ

4.1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท ในอาหารเหลวสูตร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

4.2. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วทำการเจือจางให้เชื้อแต่ละไอโซเลท มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) เท่ากับ 0.5

4.3. ผสมเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทเข้าด้วยกัน ในอัตราส่วนที่เท่ากัน เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของเชื้อจุลินทรีย์ผสม ในระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 ไอโซเลท ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 4. เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันพืช (โอเลิน) ซึ่งมีค่าซีโอดีเริ่มต้น เท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ดังนี้

5.1. ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้นที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยไขมันและน้ำมัน

5.1.1. เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่เตรียมได้ ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งมีน้ำมันพืชเป็นองค์ประกอบ ร้อยละ 10 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น เท่ากับ ร้อยละ 0, 1, 2.5, 5 และ 10 ตามลำดับ มีค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ เท่ากับ 7.0

5.1.2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

5.1.3. ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันและน้ำมันที่เหลือในน้ำเสียสังเคราะห์ ด้วยวิธีกรวยแยก โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย

5.2. ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของเชื้อจุลินทรีย์ผสม

5.2.1. เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่เตรียมได้ ในความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งมีน้ำมันพืชเป็นองค์ประกอบ ร้อยละ 10 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ เท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ตามลำดับ

5.2.2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

5.2.3. ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันและน้ำมันที่เหลือในน้ำเสียสังเคราะห์ ด้วยวิธีกรวยแยก โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย

5.3. ความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้นในน้ำเสียที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

5.3.1. เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่เตรียมได้ ในความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 5.1. ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งมีน้ำมันพืชเป็นองค์ประกอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น ร้อยละ 5, 10, 20, 30 และ 40 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ เท่ากับ ค่าพีเอชที่เหมาะสมจาก ข้อ 5.2

5.3.2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

5.2.3. ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันและน้ำมันที่เหลือในน้ำเสียสังเคราะห์ ด้วยวิธีกรวยแยก โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย

5.4. ความเร็วรอบในการกวนผสมที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

5.4.1. เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่เตรียมได้ในความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ

5.1 ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งมีน้ำมันพืชเป็นองค์ประกอบ ความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ

5.3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ เท่ากับ ค่าพีเอชที่เหมาะสมจาก ข้อ 5.2

5.4.2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 0, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

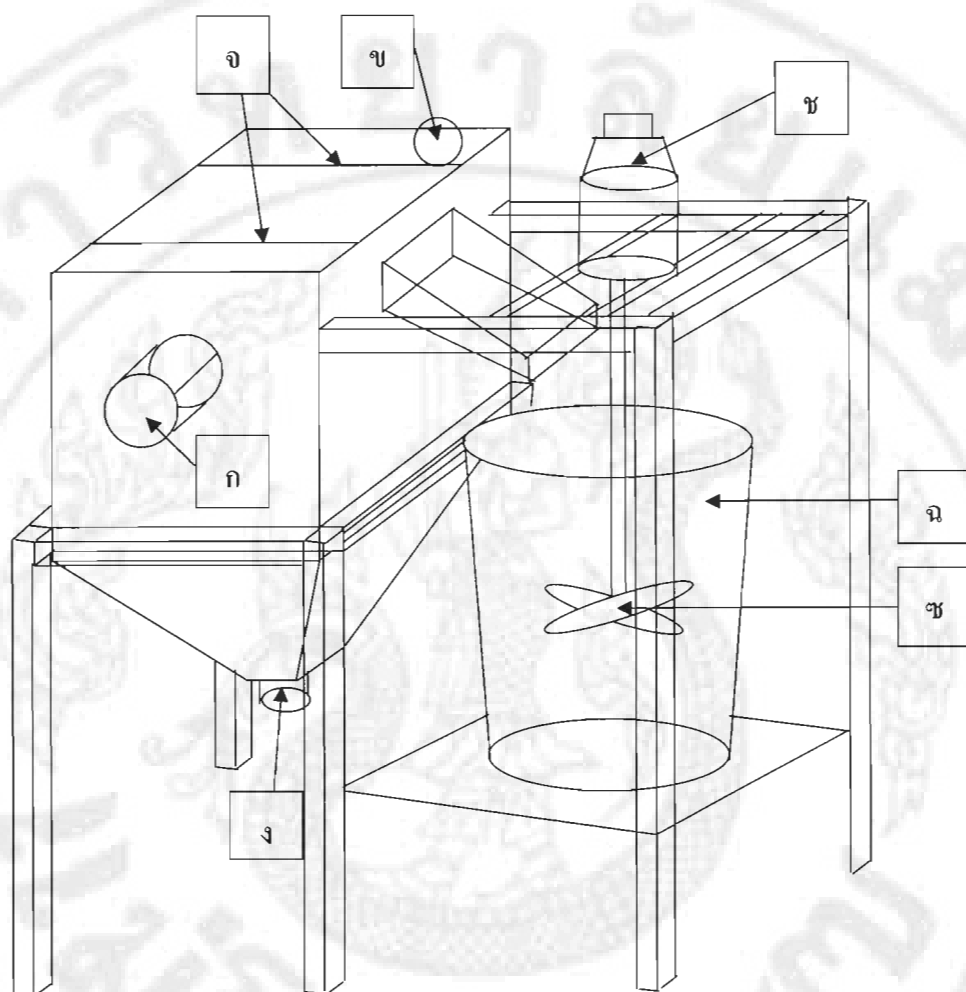
5.4.3. ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันและน้ำมันที่เหลือในน้ำเสียสังเคราะห์ ด้วยวิธีกรวยแยก โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย

6. ออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียไขมันและน้ำมัน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ในห้องปฏิบัติการ

ทำการสร้างถังแยกและย่อยไขมัน (ภาพ 5) ซึ่งมีความจุน้ำเสีย ปริมาตร 150 ลิตร ด้วยวัสดุแผ่นเหล็กอย่างหนาเคลือบสารกันสนิม โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน

6.1. ถังแยก ทำหน้าที่แยกส่วนของน้ำ ไขมันและน้ำมัน รวมถึงของแข็ง ออกจากกัน โดยอาศัยแรงกลและความถ่วงจำเพาะของสาร

6.2. ถังย่อย ทำหน้าที่ย่อยไขมันและน้ำมันโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส



ภาพ 5 แบบและส่วนประกอบต่างๆ ของถังแยกและย่อยไขมัน

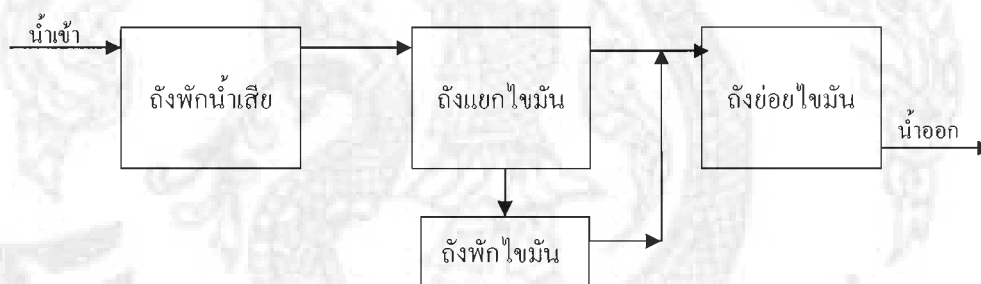
- ก) ท่อส่งน้ำเข้า
- ข) ท่อน้ำออก
- ค) ลวดระบายไขมัน
- ง) ท่อระบายของแข็ง
- จ) แผ่นตัดไขมัน
- ฉ) ถังย่อยไขมัน
- ช) มอเตอร์ไฟฟ้า
- ซ) ใบพัดกวนผสม

7. การศึกษาประสิทธิภาพของระบบแยกและย่อยไขมันในพื้นที่จริงโดยการติดตั้งร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานปลาสำกรรทน อำเภอเมือง จังหวัพะเยา

น้ำเสียจากกระบวนการผลิตปลาสำกรรทน จะถูกพักไว้ที่ถังพักน้ำเสีย ก่อนส่งเข้าสู่ถังแยกไขมัน และถังย่อยไขมัน ตามลำดับ (ภาพ 6)

7.1. ประสิทธิภาพของถังแยกไขมัน โดยวิเคราะห์ปริมาณไขมันและน้ำมัน โดยเก็บตัวอย่างน้ำเข้าและออกจากถังแยกไขมัน แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันและน้ำมันในน้ำเสียดังกล่าว

7.2. ประสิทธิภาพในการย่อยไขมันและน้ำมัน โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากถังย่อยไขมัน ทุก 1 วัน เป็นเวลานาน 13 วัน แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ค่าซีโอดี (FCOD) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ของแข็งแขวนลอย (SS) และค่าพีเอชของน้ำเสีย



ภาพ 6 ระบบบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันปนเปื้อน

8. การหาลำดับเบสของ 16S rRNA (16S rRNA sequencing)

8.1. เลี้ยงเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทในอาหารเหลวสูตร NB เป็นเวลานาน 18 – 24 ชั่วโมง

8.2. เก็บเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง

8.3. สกัด genomic DNA จากตะกอนเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท ด้วยชุดสกัด Isoplant DNA extraction kit (Nippon Gene, Japan)

8.4. เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA

8.5. ทำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด TaKaRa SUPREC™-PCR (Nippon Gene, Japan)

8.6. ทำการหาลำดับเบสของ PCR product ที่บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค sequencing (บริษัท First Base Laboratories, Malaysia)

8.7. เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ซึ่งจะทำให้ทราบจีโนมและสปีชีส์ของแบคทีเรียได้

สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสิ่งแวดล้อม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
2. ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
3. โรงงานปลาสำครีทน อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

11 มีนาคม 2549 – 31 มีนาคม 2551

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

1.1. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน และน้ำที่มีการปนเปื้อนของไขมันและน้ำมัน และแหล่งธรรมชาติ ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค enrichment culture พบว่า สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ ทั้งหมดจำนวน 447 ไอโซเลท (ตาราง 1) คล้ายกับงานวิจัยต่าง ๆ ที่ได้มีการคัดแยกจุลินทรีย์จาก ตัวอย่างดิน (Cappe et al., 1995; Gulati et al., 1995; Lin et al., 1995; Gao et al., 2000) น้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของไขมันและน้ำมัน รวมทั้งน้ำในระบบบำบัดน้ำเสีย (Wakelin and Forster, 1997; Ferrer et al., 2000; รสมันต์ และ สวัสดิ์, 2548) และจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (Becker et al., 1997; Shariff et al., 2007) ซึ่งเป็นแหล่งที่สามารถพบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

ตาราง 1 จำนวนไอโซเลทของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา

สถานที่	จังหวัด	จำนวนไอโซเลท ที่แยกได้
น้ำจากบ่อดักไขมัน โรงงานเหมืองปาย่าน	เชียงใหม่	25
น้ำก่อนเข้าระบบบำบัดน้ำเสีย โรงบำบัดน้ำเสีย มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	10
น้ำจากบ่อดักไขมัน น้ำพุร้อนสันกำแพง	เชียงใหม่	4
น้ำจากลำธาร บริเวณน้ำพุร้อนสันกำแพง	เชียงใหม่	9
น้ำทิ้งจากอาคารเทคสกร(โรงอาหาร) มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	33
น้ำจากบ่อดักไขมัน โรงงานเหมืองบุปผิน	เชียงใหม่	35

ตาราง 1 (ต่อ)

สถานที่	จังหวัด	จำนวนไอโซเลท ที่แยกได้
น้ำจากบ่อดักไขมัน ร้านอาหารข้างคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	14
น้ำพุร้อนจากน้ำพุร้อนแม่ชะจาน	เชียงราย	9
น้ำจากลำธาร น้ำพุร้อนแม่ชะจาน	เชียงราย	17
น้ำจากบ่อดักไขมัน โรงงานปลาต้มแม่ทองปอน	พะเยา	17
น้ำจากบ่อดักไขมัน โรงงานปลาต้มศรีทน (บ่อที่ 1)	พะเยา	18
น้ำจากบ่อดักไขมัน โรงงานปลาต้มศรีทน (บ่อที่ 2)	พะเยา	24
น้ำบ่อเติมอากาศโรงบำบัดน้ำเสีย มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	8
น้ำจากบ่อดักไขมันอาคารเทคสกร(โรงอาหาร) มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	4
น้ำเสียจากโรงงานผลิตไบโอดีเซล	เชียงใหม่	7
ดินบริเวณบ่อดักไขมัน โรงงานเหมืองป้าฮ่น	เชียงใหม่	21
ดินจากบ่อดักตะกอนหนัก(Grit Sump) ที่ 1 โรงบำบัดน้ำเสีย มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	18
ดินจากบ่อดักตะกอนหนัก(Grit Sump) ที่ 2 โรงบำบัดน้ำเสีย มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	13
น้ำจากลำธาร บริเวณน้ำพุร้อนสันกำแพง	เชียงใหม่	11
ตะไคร่น้ำจากบ่อดักไขมัน น้ำพุร้อนสันกำแพง	เชียงใหม่	6
ดินและไขมันจากบ่อดักไขมัน โรงงานเหมืองยูฟีน	เชียงใหม่	23
ดินบริเวณ บ่อดักไขมัน ร้านอาหารข้างคณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	8
ดินจากน้ำพุร้อนแม่ชะจาน	เชียงราย	8
ตะไคร่น้ำจากลำธาร น้ำพุร้อนแม่ชะจาน	เชียงราย	7
หินจากลำธาร น้ำพุร้อนแม่ชะจาน	เชียงราย	10
ดินบริเวณบ่อดักไขมัน โรงงานปลาต้มแม่ทองปอน	พะเยา	20
ดินบริเวณบ่อดักไขมัน โรงงานปลาต้มศรีทน	พะเยา	38

ตาราง 1 (ต่อ)

สถานที่	จังหวัด	จำนวนไอโซเลท ที่แยกได้
ดินบริเวณอาคารเทคสกร (โรงอาหาร) มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	9
ดินบริเวณ โรงงานผลิตไบโอดีเซล มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	6
ดินบริเวณแปลงเพาะปลูกภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	เชียงใหม่	15
รวม		447

1.2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น

จากการทดลองนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 447 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้มาทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้นบนอาหารแข็งสูตร Tween 80 พบว่า มีจุลินทรีย์จำนวน 91 ไอโซเลท ที่เกิดบริเวณใสและตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี (ตาราง 2) คล้ายกับงานวิจัยของ Haba et al. (2000) และ สุรอรรรถ และคณะ (2550) ซึ่งใช้อาหารแข็งสูตร Tween 80 ในการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้นแล้วทำการศึกษาการเกิดบริเวณใส หรือบริเวณที่เป็นตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี เนื่องจาก Tween 80 มีลักษณะ โครงสร้างทางเคมีคล้ายไขมันจะช่วยกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไลเปส และกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ (Dalmua et al., 2000)

ตาราง 2 ไอโซเลทของจุลินทรีย์ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำ บริเวณจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา ซึ่งเกิดบริเวณใสหรือบริเวณที่เป็นตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี เมื่อทดสอบเบื้องต้นด้วยอาหารแข็งสูตร Tween 80

สถานที่	ไอโซเลทที่เกิดวงใส
น้ำจากบ่อดักไขมัน โรงงานเหมืองปาย่าน	N1 - 20, N1 - 23
น้ำก่อนเข้าระบบบำบัดน้ำเสีย	N2 - 4, N2 - 9
โรงบำบัดน้ำเสีย มหาวิทยาลัยแม่โจ้	ไม่มี
น้ำจากบ่อดักไขมัน น้ำพุร้อนสันกำแพง	ไม่มี
น้ำจากลำธาร บริเวณน้ำพุร้อนสันกำแพง	ไม่มี
น้ำทิ้งจากอาคารเทคกสิกร (โรงอาหาร) มหาวิทยาลัยแม่โจ้	N5 - 28, N5 - 30, N5 - 32
น้ำจากบ่อดักไขมัน โรงงานเหมืองยูฟีน	N6 - 6, N6 - 10, N6 - 11, N6 - 13, N6 - 15, N6 - 16, N6 - 21, N6 - 28, N6 - 34, N6 - 35
น้ำจากบ่อดักไขมัน ร้านอาหารข้าง	N7 - 9
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
น้ำพุร้อนจากน้ำพุร้อนแม่ชะจาน	N8 - 5
น้ำจากลำธาร น้ำพุร้อนแม่ชะจาน	N9 - 1, N9 - 2, N9 - 3, N9 - 4, N9 - 6, N9 - 10, N9 - 11, N9 - 12, N9 - 15
น้ำจากบ่อดักไขมัน โรงงานปลาต้มแม่ทองปอน	N10 - 9, N10 - 16
น้ำจากบ่อดักไขมัน โรงงานปลาต้มศรีทน (บ่อที่ 1)	N11 - 6, N11 - 17
น้ำจากบ่อดักไขมัน โรงงานปลาต้มศรีทน (บ่อที่ 2)	N12 - 1, N12 - 3, N12 - 6, N12 - 11, N12 - 12, N12 - 13, N12 - 14, N12 - 17, N12 - 18, N12 - 22
น้ำบ่อเติมอากาศโรงบำบัดน้ำเสีย	N13 - 3, N13 - 8
มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
น้ำจากบ่อดักไขมันอาคารเทคกสิกร (โรงอาหาร) มหาวิทยาลัยแม่โจ้	N14 - 2, N14 - 3
น้ำเสียจากโรงงานผลิตไบโอดีเซล	N15 - 1, N15 - 4, N15 - 5, N15 - 6
ดินบริเวณบ่อดักไขมัน โรงงานเหมืองปาย่าน	S1 - 11, S1 - 15, S1 - 19, S1 - 20

ตาราง 2 (ต่อ)

สถานที่	ไอโซเลทที่เกิดวงใส
ดินจากบ่อดักตะกอนหนัก(Grit Sump) ที่ 1	S2 - 10, S2 - 11, S2 - 12, S2 - 14, S2 - 16,
โรงบำบัดน้ำเสีย มหาวิทยาลัยแม่โจ้	S2 - 18
ดินจากบ่อดักตะกอนหนัก(Grit Sump) ที่ 2	S3 - 6, S3 - 13
โรงบำบัดน้ำเสีย มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
น้ำจากถ้ำธาร บริเวณน้ำพุร้อนสันกำแพง	ไม่มี
ตะไคร่น้ำจากบ่อดักไข่ น้ำพุร้อนสันกำแพง	ไม่มี
ดินและไขมันจากบ่อดักไขมัน โรงงานเหมยมยุพิน	S6 - 17, S6 - 20, S6 - 13
ดินบริเวณบ่อดักไขมัน ร้านอาหารช้าง	S7 - 3, S7 - 4, S7 - 7
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
ดินจากน้ำพุร้อนแม่ชะจาน	S8 - 2
ตะไคร่น้ำจากถ้ำธาร น้ำพุร้อนแม่ชะจาน	
หินจากถ้ำธาร น้ำพุร้อนแม่ชะจาน	S10 - 6
ดินบริเวณบ่อดักไขมัน โรงงานปลาสามแม่ทองปอน	S11 - 16, S11 - 20
ดินบริเวณบ่อดักไขมัน โรงงานปลาสามศรีทน	S12-4, S12-7, S12-13, S12-19, S12-26, S12-31, S12-33, S12-35
ดินบริเวณอาคารเทคกสิกร (โรงอาหาร)	S13-6, S13-8
มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
ดินบริเวณโรงงานผลิตไบโอดีเซล	S14-1, S14-3, S14-5, S14-6
มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
ดินบริเวณแปลงเพาะปลูกภาควิชาพืชไร่	S15-2, S15-5, S15-8, S15-13, S15-14
มหาวิทยาลัยแม่โจ้	

เมื่อทำการวัดขนาดของบริเวณใส หรือบริเวณที่เป็นตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี พบว่าขนาดของบริเวณใสหรือบริเวณที่เป็นตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 91 ไอโซเลท มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 99.9 โดยไอโซเลท S6 - 20 ซึ่งคัดแยกจากดินและไขมันบริเวณบ่อดักไขมัน โรงงานเหมยมยุพิน จังหวัดเชียงใหม่ มีขนาดของวงใสมากที่สุด เท่ากับ 39 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลท S13 - 8 ซึ่งได้จากดินบริเวณโรงอาหาร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และไอโซเลท S12 - 7 ซึ่งได้จากดินบริเวณบ่อตกไขมัน โรงงานปลาสำกรรทน จังหวัดพะเยา มีขนาดวงใส เท่ากับ 27 และ 23 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตาราง 3)

จากการทดลองได้คัดเลือกไอโซเลทที่มีขนาดของบริเวณใสรอบโคโลนีตั้งแต่ 12 มิลลิเมตร ซึ่งคาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดี จำนวน 21 ไอโซเลท เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ระดับห้องปฏิบัติการต่อไป (ตาราง 3 และ ภาพ 7) ได้แก่ ไอโซเลท N2 - 4, N6 - 10, N9 - 6, N9 - 10, N10 - 9, N11 - 6, N12 - 1, N12 - 3, N12 - 6, N12 - 12, N12 - 13, N12 - 14, N12 - 18, S2 - 11, S6 - 20, S7 - 7, S12 - 7, S12 - 19, S13 - 8, S14 - 5 และ S15 - 14

ตาราง 3 ขนาดและลักษณะของวงใสที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทบนอาหารแข็งสูตร Tween 80

ไอโซเลท	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)	ลักษณะของวงใส
N1 - 20	11.3	ตะกอนขาวขุ่น และวงใส
N1 - 23	2.0	ตะกอนสีขาวยุ่น
N2 - 4	12.3	ตะกอนขาวขุ่น
N2 - 9	11.7	ตะกอนขาวขุ่น
N5 - 28	3.0	ตะกอนสีขาวยุ่น
N5 - 30	2.3	ตะกอนสีขาวยุ่น
N5 - 32	8.0	ตะกอนสีขาวยุ่น
N6 - 6	5.0	ตะกอนขาวขุ่น
N6 - 10	20.0	ตะกอนขาวขุ่น
N6 - 11	7.3	ตะกอนขาวขุ่น
N6 - 13	5.3	ตะกอนขาวขุ่น
N6 - 15	11.3	ตะกอนขาวขุ่น
N6 - 16	5.0	ตะกอนขาวขุ่น
N6 - 21	7.0	ตะกอนขาวขุ่น
N6 - 28	6.7	ตะกอนขาวขุ่น

ตาราง 3 (ต่อ)

ไอโซเลท	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)	ลักษณะของวงใส
N6 - 34	3.0	ตะกอนสีขาวขุ่นเป็นชั้น ๆ
N6 - 35	3.0	วงใส
N7 - 9	5.0	ตะกอนขาวขุ่น
N8 - 5	8.0	ตะกอนขาวขุ่น
N9 - 1	5.7	ตะกอนขาวขุ่น
N9 - 2	6.7	ตะกอนขาวขุ่น
N9 - 3	7.3	ตะกอนขาวขุ่น
N9 - 4	3.0	ตะกอนขาวขุ่น
N9 - 6	21.3	ตะกอนขาวขุ่น
N9 - 10	20.0	ตะกอนขาวขุ่น
N9 - 11	7.0	ตะกอนขาวขุ่น
N9 - 12	6.7	วงใส
N9 - 15	2.7	ตะกอนขาวขุ่น
N10 - 9	14.0	ตะกอนขาวขุ่นเป็นวงแหวน
N10 - 16	5.0	ตะกอนสีขาวขุ่นได้โคโลนี
N11 - 6	13.0	ตะกอนขาวขุ่น
N11 - 17	2.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
N12 - 1	14.3	ตะกอนขาวขุ่น
N12 - 3	12.3	วงใส
N12 - 6	14.3	ตะกอนขาวขุ่นเป็นวงแหวน
N12 - 11	2.7	วงใส
N12 - 12	12.0	ตะกอนขาวขุ่น
N12 - 13	14.0	ตะกอนขาวขุ่น
N12 - 14	16.0	ตะกอนขาวขุ่น
N12 - 17	10.0	ตะกอนขาวขุ่น

ตาราง 3 (ต่อ)

ไอโซเลท	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)	ลักษณะของวงใส
N12 - 18	17.3	ตะกอนขาวขุ่นเป็นวงแหวน
N12 - 22	10.0	ตะกอนขาวขุ่น
N12 - 22	10.0	ตะกอนขาวขุ่น
N13 - 3	5.7	วงใส
N13 - 8	5.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
N14 - 2	1.3	ตะกอนสีขาวขุ่น
N14 - 3	5.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
N15 - 1	0.5	ตะกอนสีขาวขุ่น และวงใส
N15 - 4	0.5	ตะกอนสีขาวขุ่น
N15 - 5	0.5	ตะกอนสีขาวขุ่น
N15 - 6	0.5	ตะกอนสีขาวขุ่น
S1 - 11	1.3	ตะกอนสีขาวขุ่น และวงใส
S1 - 15	5.3	ตะกอนสีขาวขุ่นเป็นชั้น ๆ
S1 - 19	5.3	ตะกอนสีขาวขุ่นใต้โคโลนี
S1 - 20	5.0	ตะกอนสีขาวขุ่นใต้โคโลนี
S2 - 10	4.7	วงใส
S2 - 11	12.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
S2 - 12	7.3	ตะกอนสีขาวขุ่นใต้โคโลนี
S2 - 14	3.0	ตะกอนสีขาวขุ่นใต้โคโลนี
S2 - 16	11.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
S2 - 18	6.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
S3 - 6	5.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
S3 - 13	3.3	ตะกอนสีขาวขุ่น
S6 - 17	10.3	ตะกอนสีขาวขุ่นใต้โคโลนี

ตาราง 3 (ต่อ)

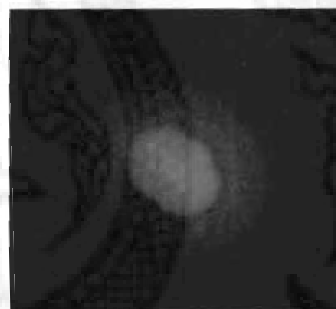
ไอโซเลท	ขนาดวงไต (มิลลิเมตร)	ลักษณะของวงไต
S6 - 20	39.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
S6 - 23	3.3	ตะกอนสีขาวขุ่น
S7 - 3	8.0	ตะกอนขาวขุ่น
S7 - 4	11.0	ตะกอนขาวขุ่น และวงไต
S7 - 7	13.3	ตะกอนขาวขุ่น และวงไต
S8 - 2	10.7	ตะกอนขาวขุ่น
S10 - 6	5.3	ตะกอนขาวขุ่น และวงไต
S11 - 16	3.3	ตะกอนสีขาวขุ่น
S11 - 20	2.7	ตะกอนสีขาวขุ่น
S12 - 4	11.3	ตะกอนขาวขุ่น
S12 - 7	23.0	ตะกอนขาวขุ่น
S12 - 13	7.7	ตะกอนขาวขุ่น และวงไต
S12 - 19	16.0	ตะกอนขาวได้โคโลนี
S12 - 26	11.3	ตะกอนขาวขุ่น และวงไต
S12 - 31	6.3	ตะกอนขาวขุ่น และวงไต
S12 - 33	3.3	ตะกอนขาวขุ่น และวงไต
S12 - 35	2.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
S13 - 6	2.3	ตะกอนสีขาวขุ่น
S13 - 8	27.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
S14 - 1	6.7	ตะกอนสีขาว เป็นวงแหวน
S14 - 3	3.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
S14 - 5	14.7	ตะกอนสีขาวขุ่น
S14 - 6	7.7	ตะกอนสีขาวขุ่น
S15 - 2	5.3	ตะกอนสีขาวขุ่น

ตาราง 3 (ต่อ)

ไอโซเลข	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)	ลักษณะของวงใส
S15 - 5	9.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
S15 - 8	10.3	ตะกอนสีขาวขุ่น
S15 - 13	5.7	ตะกอนสีขาวขุ่น
S15 - 14	22.0	ตะกอนสีขาวขุ่น



ก)



ข)

ภาพ 7 ลักษณะการเกิดบริเวณใส หรือบริเวณที่เป็นตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี

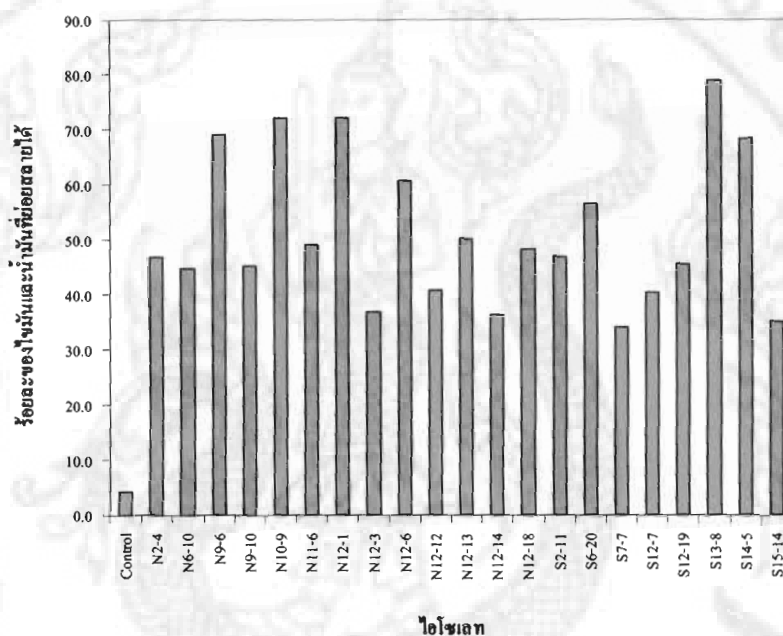
ก) ตัวอย่างของไอโซเลขที่เกิดบริเวณใส

ข) ตัวอย่างของไอโซเลขที่เกิดบริเวณที่เป็นตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี

1.3. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส สำหรับกำจัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย

เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้ง 21 ไอโซเลข มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ ระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 21 ไอโซเลข มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 โดยจุลินทรีย์ไอโซเลข S13 - 8 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดีที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 79.0 รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลข N12 - 1 และ N10 - 9 เท่ากับ ร้อยละ 72.2 และ 72.1 ตามลำดับ (ภาพ 8) จึงได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลข เพื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย

ร่วมกันต่อไป สอดคล้องกับการทดลองของ Matsumiya et al. (2007) ซึ่งคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท DW2-1 ได้จากการทดสอบการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของเชื้อที่แยกได้ทั้ง 7 ไอโซเลทในระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีร้อยละของการย่อยสลายไขมันและน้ำมันมากที่สุด ประมาณร้อยละ 80 ไปใช้ในการศึกษาต่อไป



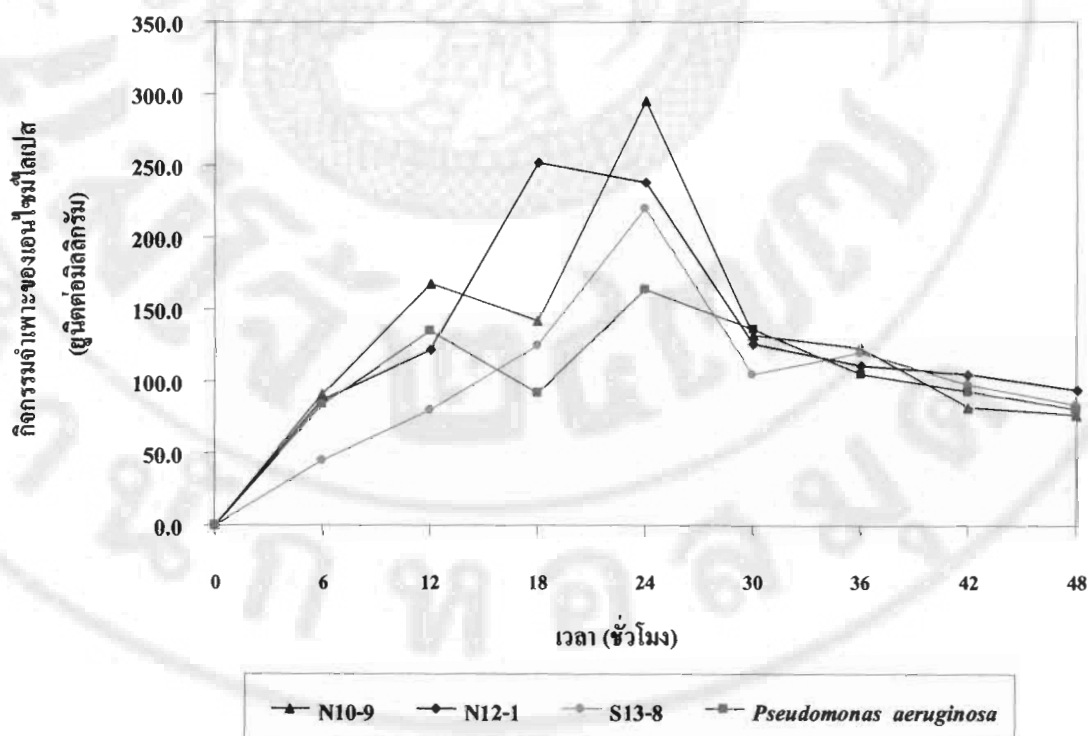
ภาพ 8 เปรียบเทียบร้อยละของไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท

1.4. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท

จากการทดลองได้เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ N10 – 9, N12 – 1 และ S13 – 8 กับ *Pseudomonas aeruginosa* (ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส (lipase specific activity) สูงกว่า *P. aeruginosa* โดย ไอโซเลท N10 – 9 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เท่ากับ 295.2 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ในชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ ไอโซเลท N12 – 1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เท่ากับ 251.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ในชั่วโมงที่ 18 และ S13 – 8 เท่ากับ 220.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ในชั่วโมงที่ 24 และ *P. aeruginosa* มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เท่ากับ 163.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ในชั่วโมงที่ 24 (ภาพ 9) โดย *P. aeruginosa* หลายสายพันธุ์ได้มีผู้ทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์

ไลเปสมาแล้ว เช่น *P. aeruginosa* SR - 1 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด เท่ากับ 74.1 หน่วยต่อมิลลิกรัม (รสมันต์ และสาวตรี, 2548) ในขณะที่ Gaur et al. (2008) ตรวจสอบ เอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จาก *P. aeruginosa* PseA พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะเพียง 143.3 หน่วยต่อ มิลลิกรัม ซึ่งน้อยกว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่คัดแยก ได้

จากการทดลอง พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลาที่ 6 และ 12 เช่นเดียวกับ *P. aeruginosa* หลังจากนั้น ในช่วงเวลาที่ 18 ไอโซเลท N10 - 9 และ *P. aeruginosa* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลง แต่ ไอโซเลท N12 - 1 และ S13 - 8 ยังมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และเมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์มากกว่า 24 ชั่วโมง กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งหมดมีค่าลดลง (ภาพ 8) จะเห็นได้ว่า เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์น่าจะมี ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดี หลังการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีไขมัน และน้ำมันเป็นองค์ประกอบ นานประมาณ 18 - 24 ชั่วโมง



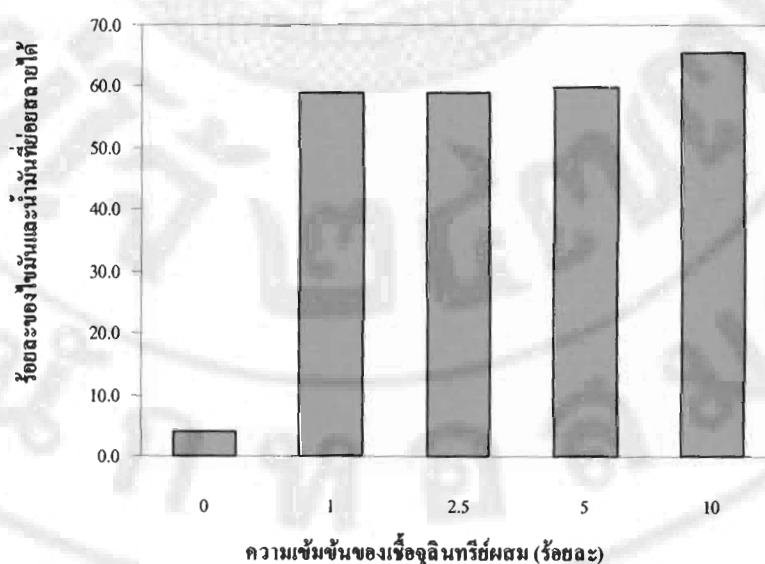
ภาพ 9 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับ *Pseudomonas aeruginosa*

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยใช้ เชื้อจุลินทรีย์ผสม

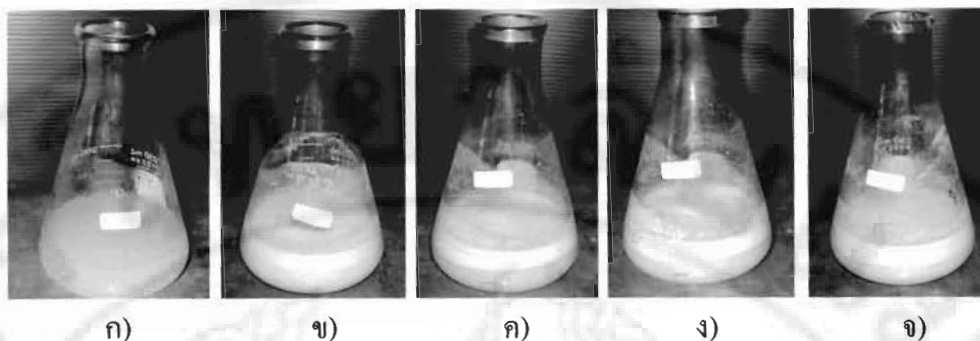
เมื่อทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากการทดลอง ขั้นต้นแล้ว จึงนำจุลินทรีย์มาทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน ในน้ำเสียสังเคราะห์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ N10-9, N12-1 และ S13-8

2.1. ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้นที่เหมาะสม

การย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมต้องทำการ กำหนดปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น เพื่อให้สามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้อย่าง มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในน้ำเสีย สังเคราะห์ซึ่งมีค่าซีโอดี เท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีน้ำมันพืชเป็นองค์ประกอบ ร้อยละ 10 ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีการกวนผสม 200 รอบต่อนาที นาน 7 วัน พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการ ย่อยสลายไขมันและน้ำมัน โดยความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้น ร้อยละ 10 สามารถย่อย สลายไขมันและน้ำมันสูงที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 65.6 รองลงมา ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 5, 2.5 และ 1 ซึ่งสามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 59.9, 59.0 และ 59.0 ตามลำดับ (ภาพ 10 และ 11)



ภาพ 10 เปรียบเทียบความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและ น้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์



ภาพ 11 ลักษณะของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นต่าง ๆ หลังการบ่มด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม นาน 7 วัน

- ก) ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม
- ข) เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม ร้อยละ 1
- ค) เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม ร้อยละ 2.5
- ง) เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม ร้อยละ 5
- จ) เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม ร้อยละ 10

จากการทดลองที่ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น ร้อยละ 1, 2.5, 5 และ 10 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันแตกต่างกันไม่มาก โดยปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้นไม่ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากอัตราในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์นั้นไม่ได้เป็นสัดส่วนกับการเจริญของเซลล์ ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์อาจไม่มีผลต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Orapin and Kriangkrai (2003) ซึ่งพบว่า ปริมาณเชื้อ *Pseudomonas* sp. (KLB1) เริ่มต้นร้อยละ 2.5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 65.2 ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดีกว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 55.9 ในขณะที่เชื้อผสมระหว่าง *Acinetobacter* sp. (KUL8) และ *Pseudomonas* sp. (KLB1) ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 60.4 ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ดีกว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 57.1

นอกจากนี้อาจเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้เป็นสารตัวกลางซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ จากการศึกษาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis)

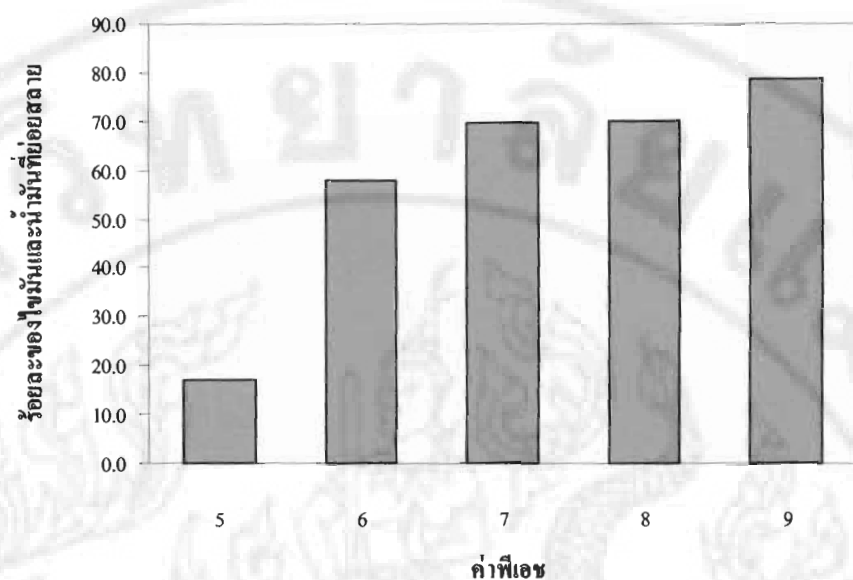
ของไครโอเลอินด้วยเอนไซม์ไลเปส พบว่า ปฏิกริยาจะถูกยับยั้งเมื่อมีกรดโอเลอิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 150 มิลลิโมล (Macris et al., 1996)

สาเหตุอีกประการหนึ่งอาจเกิดจากปฏิกริยาที่มีต่อกันระหว่างจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน โดยปฏิกริยาที่มีต่อกันของการเจริญของจุลินทรีย์ 2 ชนิด มี 3 รูปแบบด้วยกันคือ 1. จุลินทรีย์ชนิดที่ 1 มีการเจริญสูงขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดที่ 2 มีการเจริญต่ำลง 2. จุลินทรีย์ชนิดที่ 1 เจริญอย่างรวดเร็วในช่วงแรก หลังจากนั้นการเจริญต่ำลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดที่ 2 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ 3. จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดเจริญไปพร้อมๆ กัน แต่มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน จากรูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์รวม จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีการแข่งขันซึ่งกันและกัน จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งอาจไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งได้ โดยอาจเกิดแบบได้แบบหนึ่งหรือเกิดทั้ง 3 แบบได้ (Bushell and Slater, 1981)

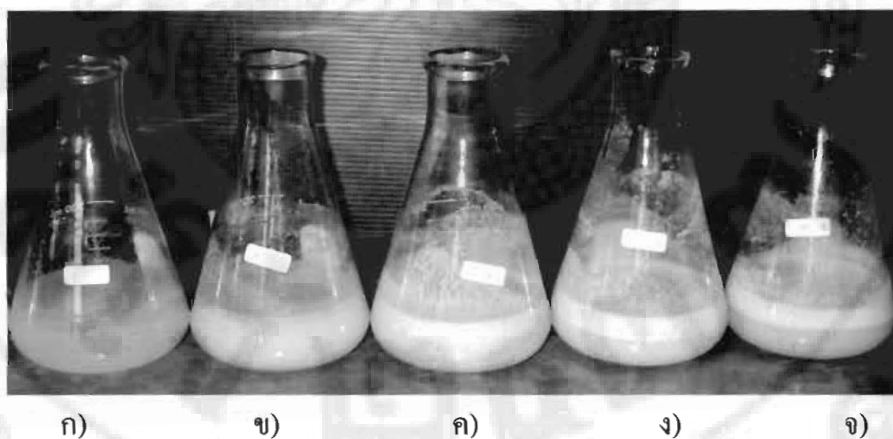
ดังนั้นในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันเป็นองค์ประกอบ ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 1 ของปริมาณน้ำเสียทั้งหมด ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดและมีประสิทธิภาพ เนื่องจากในการทดลองการใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้น ร้อยละ 10 ไม่มีความแตกต่างในการบำบัดน้ำเสีย ทั้งนี้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันในปริมาณมาก การใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้น ร้อยละ 1 จะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมีความคุ้มค่าทางเชิงเศรษฐศาสตร์มากกว่า

2.2. ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่เหมาะสม

การศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่เหมาะสมที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ ที่มีค่าซีโอดี เท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีน้ำมันพืชเป็นองค์ประกอบร้อยละ 10 โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้น ร้อยละ 1 และมีค่าพีเอชของน้ำเสียเริ่มต้นที่ระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีการกวนผสม 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียมีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 โดยน้ำเสียที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 9.0 เชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้สูงที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 78.6 รองลงมา ได้แก่ ที่ระดับพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสีย เท่ากับ 7.0 และ 8.0 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 69.8 และ 69.1 ตามลำดับ (ภาพ 12 และ 13)



ภาพ 12 เปรียบเทียบค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์



ภาพ 13 ลักษณะของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม นาน 7 วัน

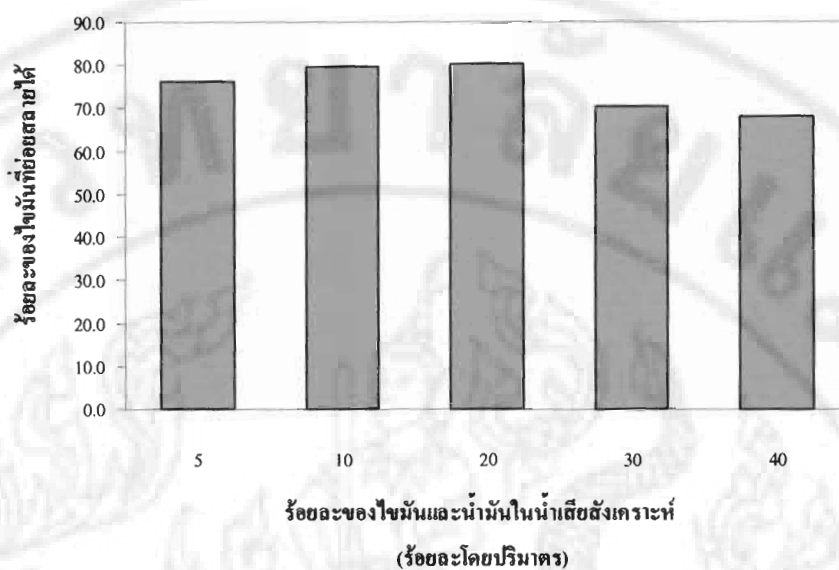
- ก) ค่าพีเอชของน้ำเสีย เท่ากับ 5.0
- ข) ค่าพีเอชของน้ำเสีย เท่ากับ 6.0
- ค) ค่าพีเอชของน้ำเสีย เท่ากับ 7.0
- ง) ค่าพีเอชของน้ำเสีย เท่ากับ 8.0
- จ) ค่าพีเอชของน้ำเสีย เท่ากับ 9.0

จากการทดลองเชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดีในน้ำเสียที่มีค่าพีเอช ระหว่าง 7.0 – 9.0 ซึ่งจะมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท สันนิษฐานว่า จุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท น่าจะจัดอยู่ในกลุ่มของ neutrophile และ alkalophile ซึ่งเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในช่วงพีเอช 6.0 – 8.0 และ 8.0 – 11.0 ตามลำดับ คล้ายกับงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ส่วนใหญ่ มีการเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอช ระหว่าง 6.0 – 9.0 เช่น *Bacillus pumilus* 122, *Bacillus licheniformis* 137 และ *Bacillus cereus* 144 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เมื่อค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.8 6.5 และ 7.8 ตามลำดับ (Lindsay et al., 2000) ส่วนที่ค่าพีเอช เท่ากับ 9.0 *Bacillus sp.* RSJ-1 (Sharma et al., 2002) และ *Bacillus licheniformis* H1 (Horani, 1996) สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด

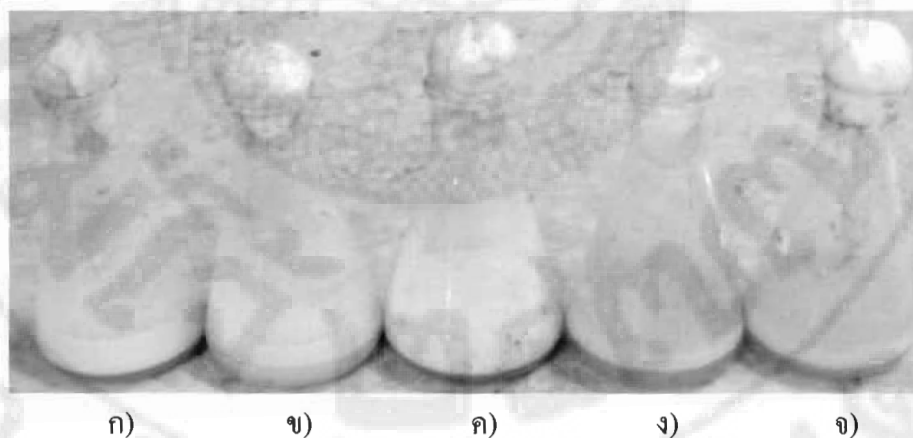
ดังนั้นค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่เหมาะสมซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถทำงานได้ดีที่สุด เท่ากับ 9.0 โดยการทดลองต่อไปจะใช้ระดับพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสีย เท่ากับ พีเอช 9.0 ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน ได้ดีที่สุด

2.3. ความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้นที่เหมาะสม

การศึกษาผลของความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าซีโอดี เท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณไขมันและน้ำมันจากน้ำมันพืชที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นองค์ประกอบ โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้น ร้อยละ 1 และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสีย เท่ากับ 9.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการกวนผสม 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้น ไม่มีความแตกต่างกัน ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมัน โดยความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้น ร้อยละ 20 เชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันสูงที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 80.5 รองลงมา ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 10, 5, 30 และ 40 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 79.9, 76.3 และ 68.2 ตามลำดับ (ภาพ 14 และ 15)



ภาพ 14 เปรียบเทียบความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียดังเคราะห์



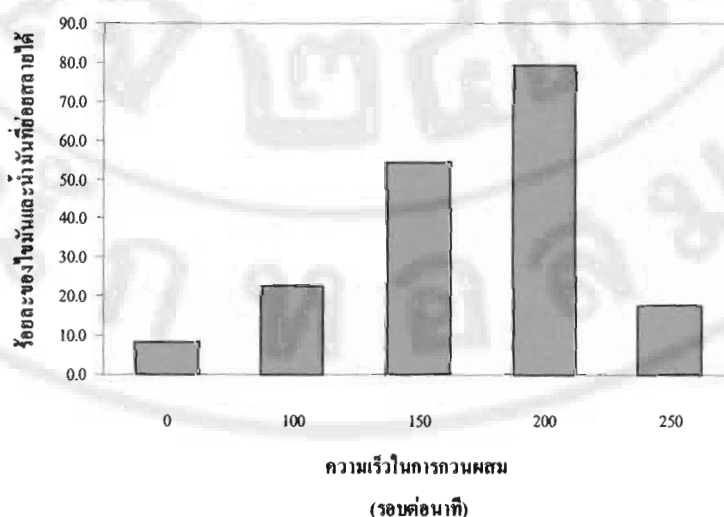
ภาพ 15 ลักษณะของน้ำเสียดังเคราะห์ที่ความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้นระดับต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม นาน 7 วัน

- ก) ปริมาณไขมันและน้ำมันเริ่มต้น ร้อยละ 5
- ข) ปริมาณไขมันและน้ำมันเริ่มต้น ร้อยละ 10
- ค) ปริมาณไขมันและน้ำมันเริ่มต้น ร้อยละ 20
- ง) ปริมาณไขมันและน้ำมันเริ่มต้น ร้อยละ 30
- จ) ปริมาณไขมันและน้ำมันเริ่มต้น ร้อยละ 40

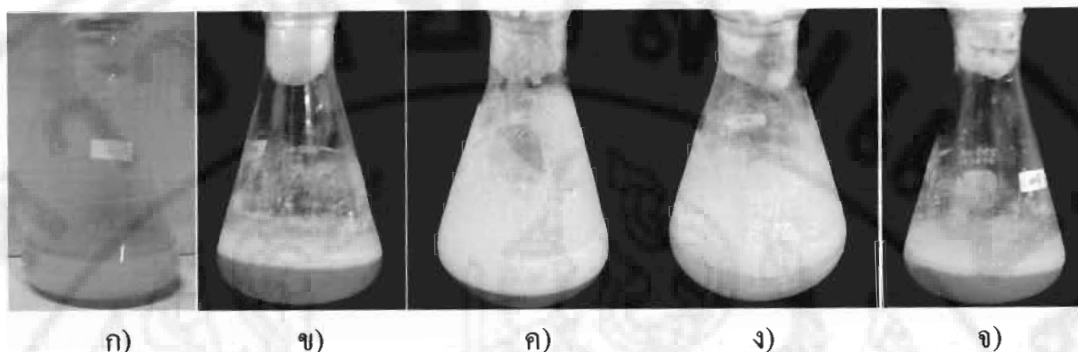
จากการทดลองเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง ร้อยละ 20 และลดลงเมื่อมีความเข้มข้นไขมันและน้ำมันตั้งแต่ ร้อยละ 30 อาจเนื่องมาจากปริมาณไขมันและน้ำมันเริ่มต้นซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปสมีมากเกินไป ทำให้มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และทำให้เชื้อจุลินทรีย์ผสมเจริญเติบโตได้ช้าลง ทำให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพลดลง ซึ่งในการทดลองต่อไปได้เลือกใช้น้ำเสียที่มีความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้น เท่ากับ ร้อยละ 20 ซึ่งเป็นระดับที่เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดีที่สุด

2.4. ความเร็วรอบในการกวนผสมที่เหมาะสม

การศึกษาความเร็วรอบในการกวนผสมที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าซีไอดี เท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำมันพืชเป็นองค์ประกอบ ร้อยละ 20 และมีค่าพีเอช เท่ากับ 9.0 โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้น ร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการกวนผสมที่ความเร็วต่าง ๆ นาน 7 วัน พบว่า ความเร็วรอบในการกวนผสมที่แตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 โดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันสูงที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 79.1 เมื่อมีการกวนผสมที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที รองลงมา ได้แก่ ความเร็ว 150, 100 และ 250 รอบต่อนาที มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 54.2, 22.6 และ 17.5 ตามลำดับ (ภาพ 16 และ 17)



ภาพ 16 เปรียบเทียบความเร็วรอบในการกวนผสมที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์



ภาพ 17 ลักษณะของน้ำเสียดังเคราะห์ที่ความเร็วรอบในการกวนผสมต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วย เชื้อจุลินทรีย์ผสม นาน 7 วัน

- ก) ไม่มีการกวนผสม
- ข) มีการกวนผสมที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที
- ค) มีการกวนผสมที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที
- ง) มีการกวนผสมที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที
- จ) มีการกวนผสมที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

การกวนผสมเป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์ โดยในสถานะที่มีปริมาณออกซิเจนที่น้อยเกินไป จะส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ช้า เนื่องจากมีออกซิเจนไม่เพียงพอต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์ ในทางกลับกันการกวนผสมมากเกินไปอาจทำให้เกิดสถานะที่ไม่เหมาะสมกับจุลินทรีย์และทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์จุลินทรีย์เกิดการเสียหายได้ นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความต้องการปริมาณออกซิเจนที่แตกต่างกัน ความเร็วรอบในการกวนผสมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จึงแตกต่างกันด้วย และจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กันมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเร็วรอบในการกวนผสมที่ต่างกัน โดยเชื้อไอโซเลท 1A42 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเมื่อมีการกวนผสมที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในขณะที่ไอโซเลท 2C8 จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเมื่อมีการกวนผสมที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (สุวรรณ และคณะ, 2540)

ดังนั้นในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ เชื้อจุลินทรีย์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อความเร็วในการกวนผสมเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อจุลินทรีย์

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียซึ่งมีค่าซีโอดีประมาณ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ น้ำเสียมีปริมาณไขมันและน้ำมันเป็นองค์ประกอบ ไม่เกิน ร้อยละ 20 มีการปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 9.0 โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 ไอโซเลท ร้อยละ 1 และมีความเร็วรอบในการกวนผสม เท่ากับ 250 รอบต่อนาที ซึ่งจะนำไปใช้ในการออกแบบระบบแยกและย่อยไขมัน เพื่อทดลองบำบัดน้ำเสียจากโรงงานปลาต่อไป

3. ระบบแยกและย่อยไขมัน

ระบบแยกและย่อยไขมันในการทดลองครั้งนี้เป็นถังเหล็กเคลือบด้วยสารกันสนิม ขนาดความจุ้น้ำเสียประมาณ 150 - 180 ลิตร (ภาพ 18) มีหลักการทำงานเป็น 2 ส่วน ได้แก่

3.1. ถังแยกไขมัน

ส่วนของถังแยกไขมัน มีปริมาตรประมาณ 150 ลิตร ทำหน้าที่ในการแยกน้ำ ไขมันและน้ำมันรวมทั้งของแข็งออกจากกัน โดยเมื่อน้ำเสียผ่านเข้าถังตรงท่อน้ำเข้า (ภาพ 21 ก) จะมีระยะเวลาพักเก็บภายในถังประมาณ 30 - 45 นาที หากนานเกินไปจะทำให้เกิดกลิ่นเหม็นขึ้นภายในถัง (เกรียงศักดิ์, 2539) ไขมันและน้ำมันที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำจะแยกอยู่ด้านบนของน้ำ และถูกกักเก็บไว้ในถังโดยมีแผ่นกั้นขวางป้องกันไม่ให้ไขมันและน้ำมันหลุดลอยออกไปตรงท่อน้ำออก (ภาพ 21 ข) น้ำที่แยกชั้นกับไขมันและน้ำมันแล้วจะไหลลงผ่านด้านล่างของแผ่นกั้นขวางแล้วไหลออกบริเวณท่อน้ำออก ส่วนของแข็งที่มีน้ำหนักมากจะตกตะกอนลงสู่ก้นถังแล้วถูกปล่อยออกทางด้านล่างของถัง (ภาพ 18 ข) ส่วนของไขมันที่ถูกกักเก็บไว้ในถังจะถูกแยกออกจากถังโดยวางระบายไขมันและน้ำมัน (ภาพ 22) เข้าสู่ถังย่อยไขมัน

3.2. ถังย่อยไขมัน

ส่วนของถังย่อยไขมัน มีปริมาตรประมาณ 180 ลิตร (ในการทดลองใช้น้ำเสียร่วมกับไขมันและน้ำมัน ปริมาตร 150 ลิตร) ทำหน้าที่ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันโดยใช้จุลินทรีย์ผสมที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ภายในถังย่อยมีส่วนประกอบหลัก คือ ใบพัดกวนผสม ทำหน้าที่กวนผสมให้น้ำเสีย ไขมันและน้ำมัน และจุลินทรีย์รวมกัน อีกทั้งเป็นการช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์ในระบบถังย่อยไขมัน โดยใบพัดจะถูกควบคุมโดยแผงควบคุมการทำงาน (ภาพ 19) ให้มีการกวนเป็นจังหวะ ครั้งละ 1 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้งต่อ 1 วัน

การให้อากาศในถังบำบัดน้ำเสียโดยการกวนผสมหรือการเขย่า มีความแตกต่างกับการให้อากาศโดยใช้เครื่องพ่นอากาศ ซึ่งการให้อากาศทั้งสองแบบมีผลต่อการเจริญและการผลิต

เอนไซม์ไลเปสของเชื้อจุลินทรีย์ จะเห็นได้จากงานวิจัยของ Genovefa et al. (1994) ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Staphylococcus carnosus* (pLipMut2) ที่เลี้ยงในคอลัมน์แบบฟองอากาศ (bubble column) กับขวดรูปชมพู่ที่มีการเขย่า ซึ่งการเพาะเลี้ยงในคอลัมน์แบบฟองอากาศ จุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้ช้ากว่า และการผลิตเอนไซม์ไลเปสเกิดขึ้นน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีการเขย่า โดยในการทดลองใช้การกวนด้วยใบพัดซึ่งมีลักษณะในการให้อากาศคล้ายกับการใช้ขวดรูปชมพู่ที่มีการเขย่า จึงคาดว่า จุลินทรีย์ที่ใช้ในระบบจะมีการเจริญเติบโตได้ดี และสามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ก)



ข)

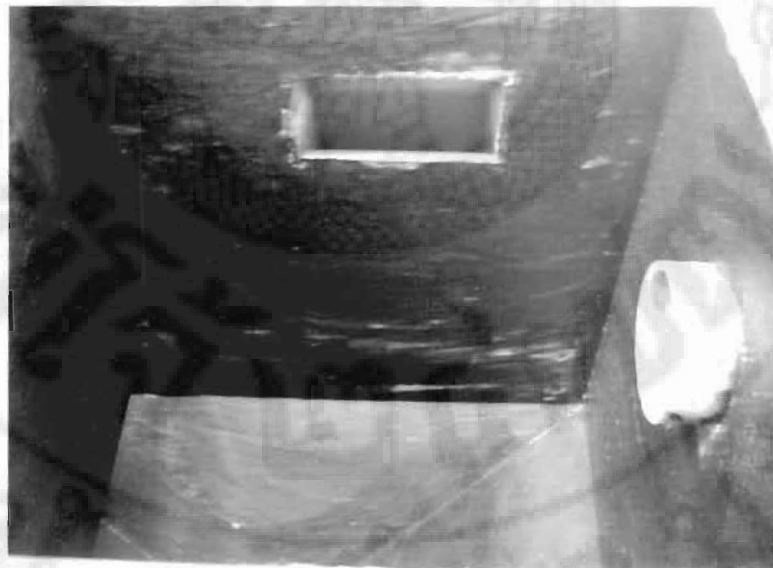
ภาพ 18 ระบบแยกและย่อยไขมัน

ก) ด้านหน้า

ข) ด้านหลัง



ภาพ 19 แผงควบคุมการทำงานของระบบแยกและย่อยไขมัน



ภาพ 20 ภายในถังแยกไขมัน



ก)

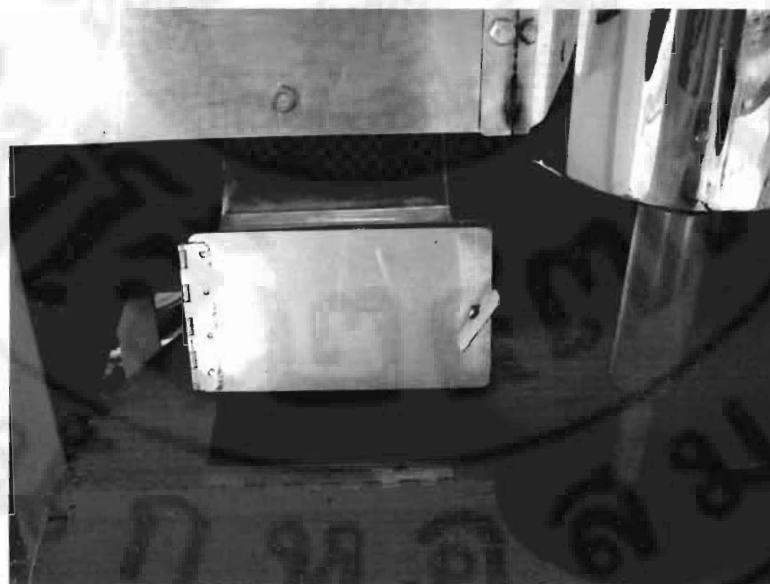


ข)

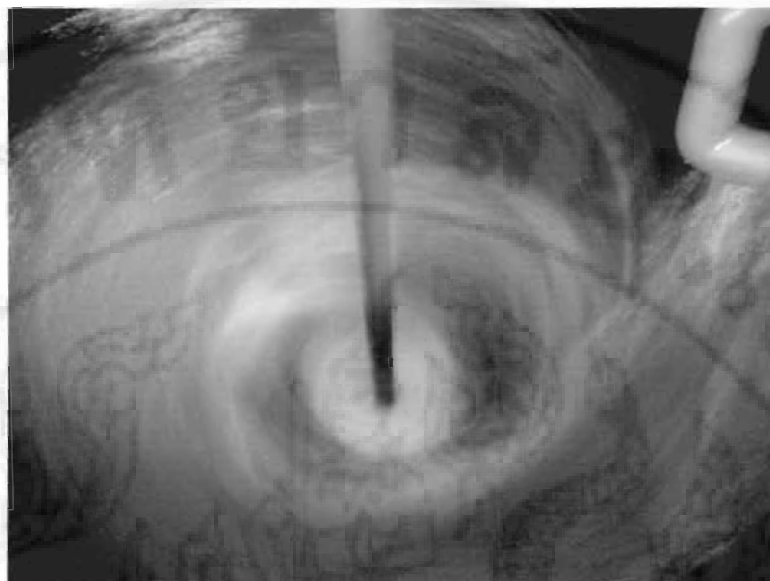
ภาพ 21 ท่อน้ำเข้าและออกของถังแยกไขมัน

ก) ท่อน้ำเข้า

ข) ท่อน้ำออก



ภาพ 22 รางระบายไขมัน



ภาพ 23 ถังข่อยไขมัน

4. การศึกษาประสิทธิภาพของระบบแยกและข่อยไขมัน

4.1. การศึกษาประสิทธิภาพของถังแยกไขมันของระบบแยกและข่อยไขมัน

ในการศึกษาประสิทธิภาพของถังแยกไขมันของระบบแยกและข่อยไขมัน โดยใช้ น้ำเสียจากโรงงานปลาสำศรีทน ตำบลบ้านสา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา จำนวน 150 ลิตร มีปริมาณไขมันและน้ำมัน เท่ากับ 160.40 กรัมต่อลิตร เมื่อผ่านถังแยกไขมัน น้ำที่ออกจากถังแยกมีปริมาณไขมันและน้ำมันเท่ากับ 0.69 กรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันและน้ำมันคิดเป็นร้อยละ 99.6 ลักษณะในการแยกไขมันออกจากน้ำเสียเบื้องต้นด้วยถังแยกไขมัน คล้ายกับการแยกไขมันของถังดักไขมัน จึงเป็นการกำจัดไขมันด้วยวิธีทางกายภาพเท่านั้น ซึ่งจะต้องทำการข่อยสลายไขมันและน้ำมันที่แยกได้ด้วยถังข่อยไขมันต่อไป



ภาพ 24 ไขมันที่แยกออกด้วยถังแยกของระบบแยกและย่อยไขมัน

4.2. การศึกษาประสิทธิภาพของถังย่อยไขมันของระบบแยกและย่อยไขมัน

การศึกษาประสิทธิภาพของถังย่อยไขมันของเครื่องแยกและย่อยไขมัน ใช้ไขมันและน้ำมันที่แยกได้จากถังแยกไขมันซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ ร้อยละ 20 โดยผสมกับน้ำเสียส่วนที่แยกออกมาจากท่อน้ำออก และทำการทดลองที่โรงงานปลาสำศรีทน จังหวัดพะเยา นาน 13 วัน โดยทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้

4.2.1. ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียของถังย่อยไขมันในแต่ละวัน พบว่า มีความแตกต่างกัน โดยวันที่เริ่มการทดลองน้ำเสียในถังย่อยมีปริมาณไขมันและน้ำมัน เท่ากับ 81.25 กรัมต่อลิตร ในวันแรกของการทดลองสามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ ร้อยละ 19.6 จากนั้นอัตราการย่อยสลายไขมันและน้ำมันเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในวันที่ 2, 3 และ 4 ของการทดลอง มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 24.2, 29.4 และ 31.1 ตามลำดับ โดยมีปริมาณไขมันและน้ำมัน เท่ากับ 61.62, 57.36 และ 55.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อัตราการย่อยสลายไขมันและน้ำมันเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 5 และ 6 ของการทดลอง โดยสามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ เท่ากับ ร้อยละ 69.7 และ 82.1 ตามลำดับ โดยมีปริมาณไขมันและน้ำมัน เท่ากับ 24.65, 14.53 กรัมต่อลิตร หลังจากวันที่ 6 ของการทดลองอัตรา

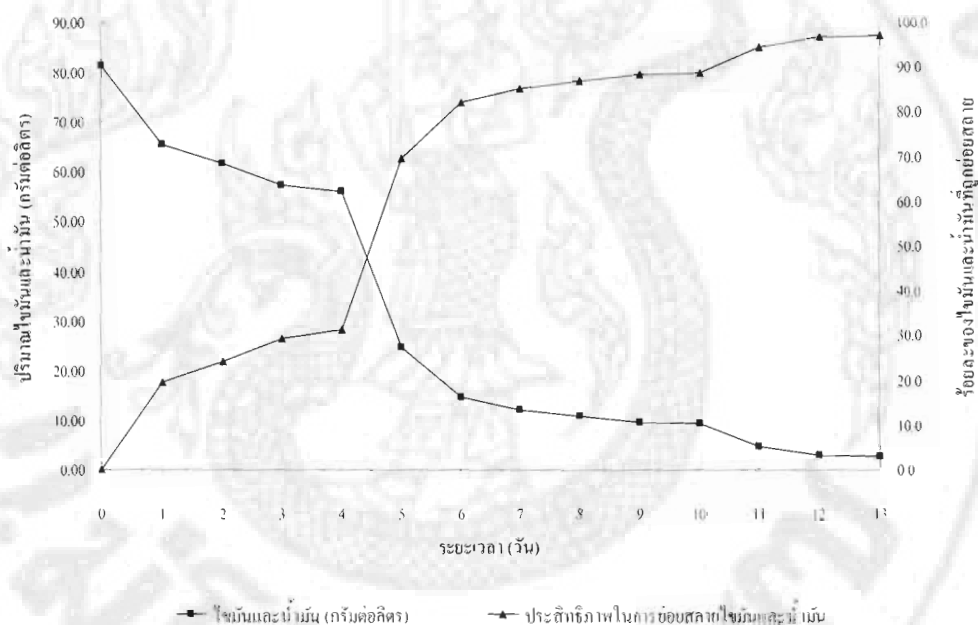
การย่อยสลายไขมันเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ โดยอยู่ในช่วงประมาณ ร้อยละ 85.1 - 96.8 โดยมีปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในน้ำเสีย ประมาณ เท่ากับ 2.58 - 12.09 กรัมต่อลิตร (ภาพ 25)

จากการทดลอง พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตปลาต้มได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาจเกิดจากเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมีความจำเพาะต่อไขมันและน้ำมันจากปลาที่นำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตปลาต้ม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการซึ่งใช้น้ำเสียที่มีน้ำมันพืชเป็นองค์ประกอบ พบว่า จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันจากปลามากกว่าน้ำมันพืช โดย Wakelin and Forster (1997) และ Tan and Gill (1985) ได้อธิบายว่า เชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น ทำให้มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นแตกต่างกัน ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Lescic et al. (2001) พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces rimosus* จะย่อยน้ำมันที่มีองค์ประกอบของกรดลิโนเลอิกและกรดโอเลอิกในน้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันมะกอก ได้มากกว่ากรดไตรโอเลอิก และไตรลิโนเลอิกในน้ำมันหมู

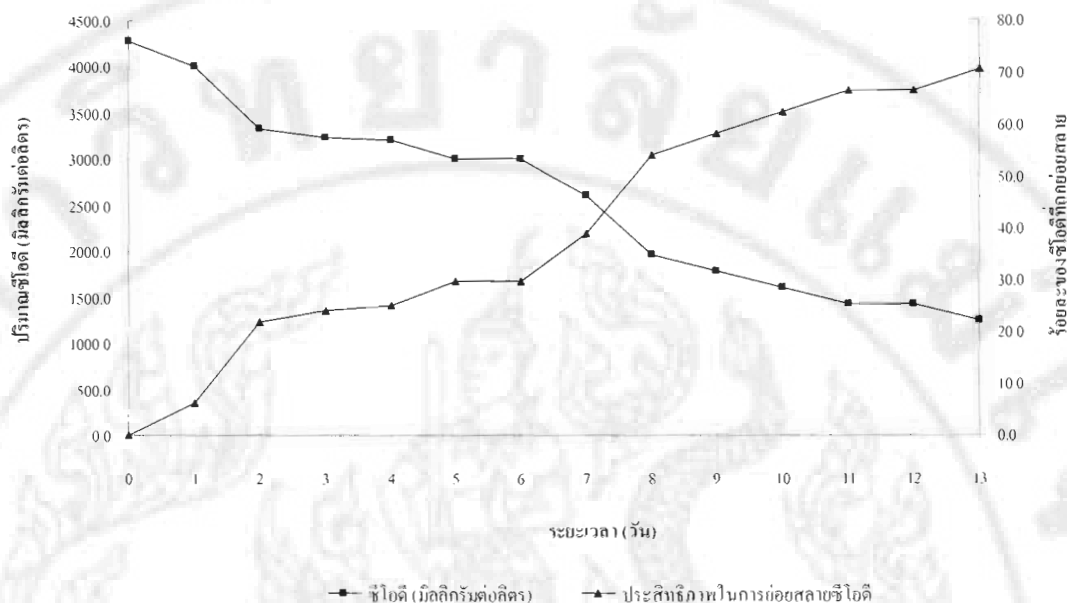
4.2.2. ประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีโอดี (FCOD)

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีโอดีในน้ำเสียของถังย่อยไขมันของระบบแยกและย่อยไขมันในแต่ละวัน พบว่า วันที่เริ่มการทดลองมีปริมาณชีโอดี เท่ากับ 4,275 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันแรกของการทดลองสามารถย่อยสลายชีโอดีได้เพียง ร้อยละ 6.3 จากนั้นการย่อยสลายชีโอดีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการทดลอง โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีโอดี เท่ากับ ร้อยละ 21.9 โดยน้ำเสียมีค่าชีโอดี เท่ากับ 3,340 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ถึง 6 ของการทดลอง อัตราการย่อยสลายชีโอดีค่อนข้างคงที่ โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีโอดีระหว่าง ร้อยละ 24.2 - 29.7 โดยมีปริมาณชีโอดีในน้ำเสีย ระหว่าง ลดลงเหลือ 3,006 - 3,329 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมาอัตราการย่อยสลายชีโอดีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้ง ในวันที่ 7 และ 8 ของการทดลอง โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดชีโอดี เท่ากับ ร้อยละ 39.1 และ 54.2 ตามลำดับ และมีปริมาณชีโอดี เท่ากับ 2,605 และ 1,960 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ถึง 13 ของการทดลอง อัตราการย่อยสลายชีโอดีเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีโอดี ระหว่าง ร้อยละ 58.3 - 70.8 และมีปริมาณชีโอดีในน้ำเสีย ระหว่าง 1,247 - 1,781 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 26)

จากการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานปลาสำเสร็จ จังหวัดพะเยา ด้วยถังย่อยไขมันของระบบแยกและย่อยไขมัน มีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันและน้ำมัน และซีโอดี เท่ากับ ร้อยละ 96.8 และ 70.8 ตามลำดับ คล้ายกับการทดลองของ Mkhize et.al. (2000) ซึ่งบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมัน โดยใช้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสปีอาร์ (aerobic sequencing batch reactor) พบว่า หลังจากทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ของน้ำเสีย ระบบสามารถลดค่าซีโอดีได้ ร้อยละ 75 พร้อมทั้งสามารถกำจัดไขมันและน้ำมัน และสารแขวนลอยได้มากกว่าร้อยละ 90



ภาพ 25 ปริมาณไขมันและน้ำมันในน้ำเสียและประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานปลาสำ ซึ่งทำการบำบัดด้วยถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ



ภาพ 26 ปริมาณชีโอดี (FCOD) ในน้ำเสีย และประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีโอดีในน้ำเสียจากโรงงานปลาต้ม ซึ่งทำการบำบัดด้วยถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ

4.2.3. ปริมาณของแข็งแขวนลอย (SS)

จากการศึกษาปริมาณของแข็งแขวนลอยของน้ำเสียภายในถังย่อยไขมันตลอดการทดลอง พบว่า ปริมาณของแข็งแขวนลอยในแต่ละวันของการทดลองมีความแตกต่างกัน โดยปริมาณของแข็งแขวนลอยในน้ำเสียเริ่มต้น เท่ากับ 4.64 กรัมต่อลิตร จากการทดลองปริมาณของแข็งแขวนลอยมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ในวันที่ 1 ถึง 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณของแข็งแขวนลอย ระหว่าง 6.88 - 8.99 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณของแข็งแขวนลอยจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 4 ถึง 8 ของการทดลอง โดยมีปริมาณของแข็งแขวนลอย ระหว่าง 11.41 - 21.29 กรัมต่อลิตร และปริมาณของแข็งแขวนลอยค่อนข้างคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยมีปริมาณของแข็งแขวนลอย ระหว่าง 21.73 - 22.31 กรัมต่อลิตร (ภาพ 27)

4.2.4. ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS)

จากการศึกษาปริมาณของแข็งทั้งหมดของน้ำเสียภายในถังย่อยไขมันตลอดการทดลอง พบว่า ปริมาณของแข็งทั้งหมดในแต่ละวันของการทดลองมีความแตกต่างกัน โดยปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำเสียเริ่มต้น เท่ากับ 11.28 กรัมต่อลิตร จากการทดลองในวันที่ 1 และ 2 ของการทดลอง ปริมาณของแข็งทั้งหมดค่อนข้างคงที่ เท่ากับ 11.42 และ 12.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากนั้นในวันที่ 3 และ 4 ของการทดลอง ปริมาณของแข็งทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 17.51 และ 33.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณของแข็งทั้งหมดลดลง ในช่วงวันที่ 5 ถึง 7 โดยมีปริมาณของแข็งทั้งหมด ระหว่าง 32.19 - 26.32 กรัมต่อลิตร และในวันที่ 8 จนถึงสิ้นสุดการทดลองของแข็งทั้งหมดมีปริมาณคงที่ ระหว่าง 24.23 - 25.91 กรัมต่อลิตร (ภาพ 28)

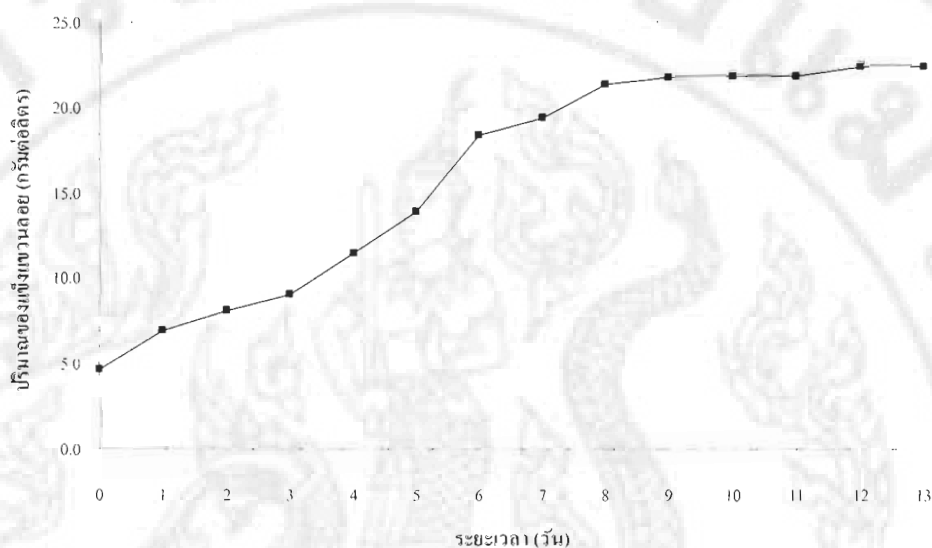
จากการทดลองจะเห็นว่าปริมาณของแข็งทั้งหมดในช่วงเริ่มต้นการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากของแข็งที่มีขนาดใหญ่ เช่น เปลือกพริก เศษกระเทียม เศษข้าว และเศษปลาที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ปลาส่วนใหญ่วางตัวอยู่ในชั้นของไขมันและน้ำมันซึ่งยังไม่มีการย่อยสลายละลายลงไปอยู่ในชั้นของน้ำเสีย ทำให้ของแข็งทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ในชั้นของน้ำมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่ในวันที่ 3 และ 4 ของการทดลอง ปริมาณของแข็งทั้งหมดมีค่าที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนมีปริมาณสูงสุด ในวันที่ 4 ของการทดลอง เนื่องจากไขมันและน้ำมันมีการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น ทำให้ของแข็งในชั้นไขมันและน้ำมันเกิดการกระจายตัว และรวมตัวของชั้นไขมันและน้ำเสียมากขึ้น (ภาพ 31) ทำให้ปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำเสียจึงมีปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น หลังจากนั้นเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้มีโมเลกุลเล็กลง เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ได้ ทำให้ปริมาณของแข็งทั้งหมดลดลงอย่างต่อเนื่อง และคงที่

4.2.5. ค่าพีเอช

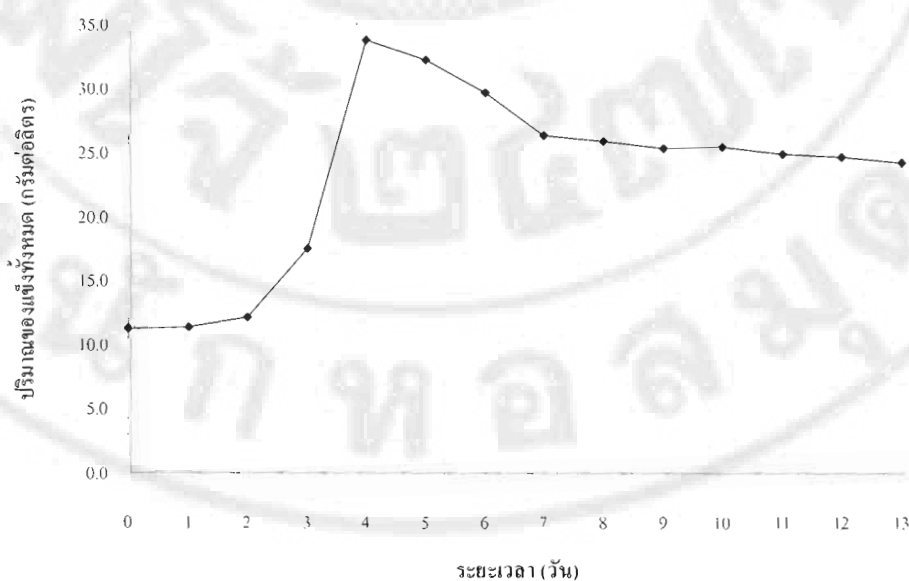
จากการศึกษาค่าพีเอชของน้ำเสียจากโรงงานปลาสดตลอดการทดลอง พบว่า ในวันเริ่มต้นการทดลองค่าพีเอชของน้ำเสีย เท่ากับ 9.0 จากนั้นในวันที่ 1 ถึง 7 ของการทดลอง ค่าพีเอชอยู่ในช่วงที่เป็นด่างอ่อน ระหว่าง 7.6 – 8.8 หลังจากนั้นในวันที่ 8 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ค่าพีเอชค่อนข้างคงที่ในช่วงที่เป็นกลาง ระหว่าง 7.0 - 7.3 (ภาพ 29)

จากการทดลองค่าพีเอชของน้ำเสียในช่วงแรกของการทดลอง จะมีค่าเป็นด่างอ่อน ซึ่งเกิดจากการปรับค่าพีเอชของน้ำเสียให้เหมาะสมกับการทำงานของจุลินทรีย์ผสมที่นำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานปลาสด จากนั้นและค่าพีเอชจะลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียของเชื้อจุลินทรีย์ และไขมันและน้ำมันให้เป็นกรดไขมัน ทำให้ค่าพีเอชของน้ำเสียลดลงเล็กน้อย สอดคล้องกับงานวิจัยของเกรียงไกร (2545) ซึ่งพบว่า หลังจากมีการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันลงในถังบำบัดที่มีการเติมอากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก (air pump) จะทำให้ค่าพีเอชจะลดต่ำลง จาก 7.4 – 7.9 เหลือเพียง กับ 7.0 นอกจากนี้ Bernard and Gray (2000) ยังพบว่า การใช้ตะกอนเร่ง (Activated sludge) กำจัด

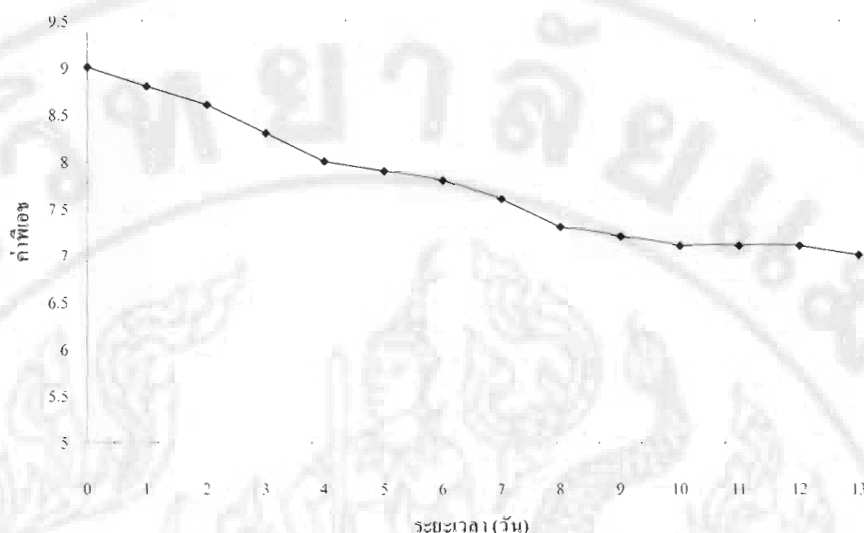
สารอินทรีย์ในน้ำเสียชุมชน จะทำให้ค่าพีเอชจะลดลงในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่น โดยค่าพีเอชจะลดลงจาก 8.0 เหลือเพียง 4.9 - 6.1



ภาพ 27 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่าของแข็งแขวนลอยของน้ำเสียจากโรงงานปลาต้มในถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่างๆ



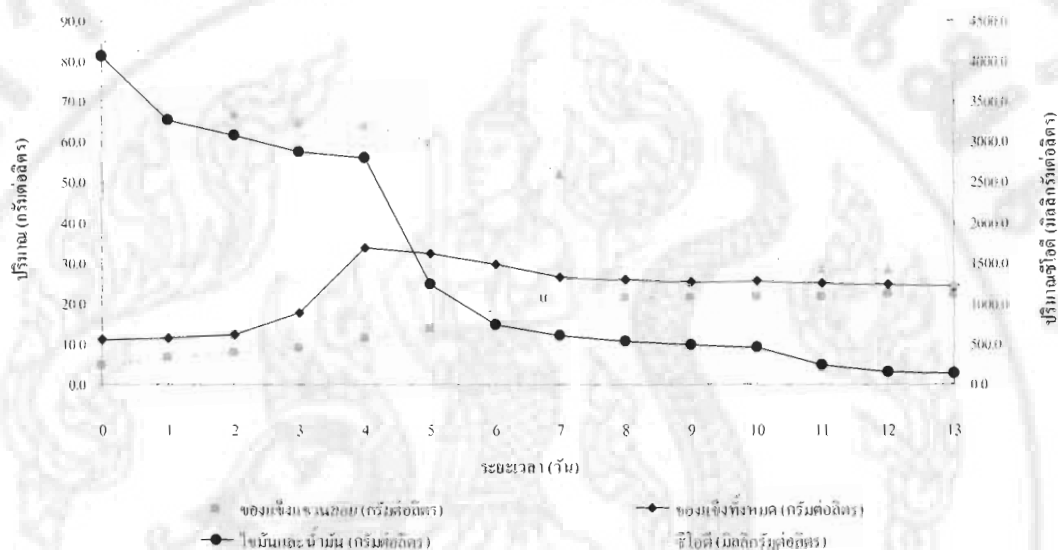
ภาพ 28 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่าของแข็งทั้งหมดของน้ำเสียจากโรงงานปลาต้มในถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่างๆ



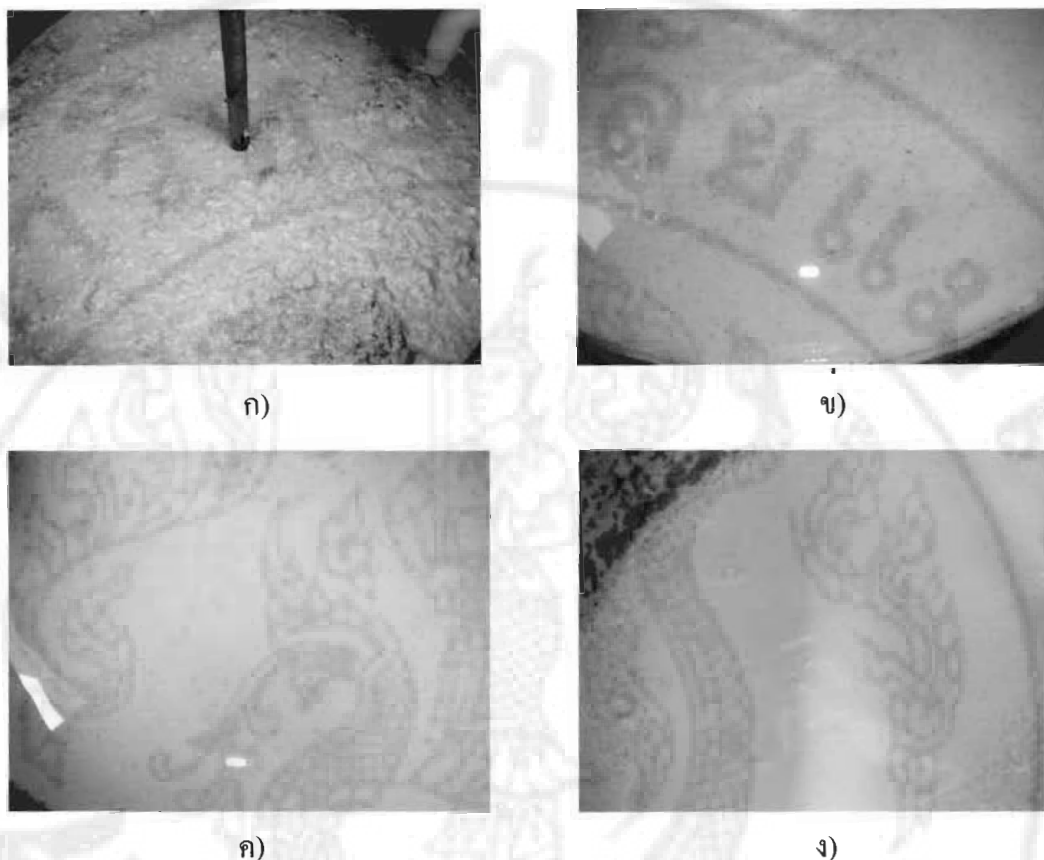
ภาพ 29 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่าพิษของน้ำเสียจากโรงงานปลาต้ม ในถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ

จากการทดลอง เมื่อทำการเปรียบเทียบพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของน้ำเสีย พบว่า ปริมาณไขมันและน้ำมัน ปริมาณซีไอดี (FCOD) และของแข็งแขวนลอย ที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลองมีความสัมพันธ์กัน โดยจุลินทรีย์จะย่อยสลายไขมันและน้ำมันด้วยการผลิตเอนไซม์ไลเปสแล้วขับออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อย่อยสลายไขมันและน้ำมันให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการสร้างเซลล์และเป็นแหล่งพลังงานของปฏิกิริยาต่างๆภายในเซลล์ก่อนสังเกตได้จาก ในวันที่ 4 ถึง 6 ของการทดลองปริมาณของไขมันและน้ำมันจะลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นทำให้ค่าของแข็งแขวนลอยเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถเห็นได้ชัด ในวันที่ 4 ถึง 6 ของการทดลอง จากนั้นปริมาณจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมากพอที่จะจับรวมตัวกันแล้วตกตะกอนได้ และจุลินทรีย์จะเริ่มใช้สารอินทรีย์ที่ละลายอยู่ในน้ำเสียส่งผลให้ปริมาณซีไอดีซึ่งเป็นสารอินทรีย์ในน้ำเสียถูกย่อยสลายและปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 6 ถึง 8 ของการทดลอง (Low and Chase 1999; พิชญ์นาฏ, 2003) ในช่วงสุดท้ายของการทดลอง พบว่า อัตราในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันและซีไอดี (FCOD) ลดลง อาจเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์เจริญเริ่มเข้าสู่ระยะ Stationary phase (อรไท, 2543) ทำให้จุลินทรีย์เริ่มตายลงเนื่องจากขาดสารอาหาร หรือสารอินทรีย์ ในน้ำเสีย เนื่องจากไม่ได้มีการเติมน้ำเสียเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง และทำให้เกิดการสะสมของสารต่าง ๆ ที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาและอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ สอดคล้องกับรายงานของ Espinosa and Stephenson (1996) ซึ่งพบว่าการย่อยสลายซีไอดีในช่วงแรกจะ

เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น แต่เมื่อแหล่งคาร์บอนหมดไป จะทำให้เซลล์มีจำนวนลดลง การย่อยสลายซีโอดีจะลดลงด้วย โดยสังเกตได้จากปริมาณของแข็งแขวนลอยซึ่งมีปริมาณคงที่ตั้งแต่วันที่ 8 ของการทดลอง (ภาพ 30)



ภาพ 30 ปริมาณไขมันและน้ำมัน ปริมาณของแข็งแขวนลอย ปริมาณของแข็งทั้งหมด และซีโอดี (FCOD) ในน้ำเสียจากโรงงานปลาสำกริทน จังหวัดพะเยา ซึ่งทำการบำบัดด้วยถังย่อยไขมันของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่างๆ



ภาพ 31 ลักษณะของน้ำเสียจากโรงงานปลาซัมที่ผ่านการบำบัดด้วยระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่าง ๆ

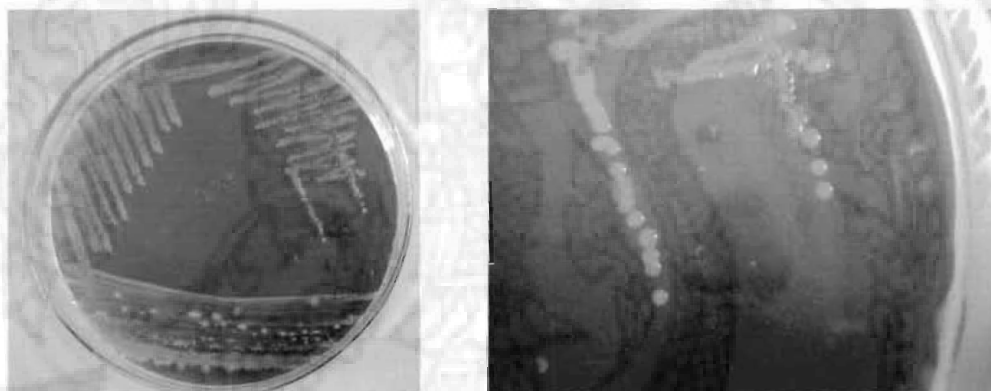
- ก) วันที่ 0 ของการทดลอง
- ข) วันที่ 3 ของการทดลอง
- ค) วันที่ 7 ของการทดลอง
- ง) วันที่ 13 ของการทดลอง

5. การศึกษาลักษณะและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันจากโรงงานปลาซัม

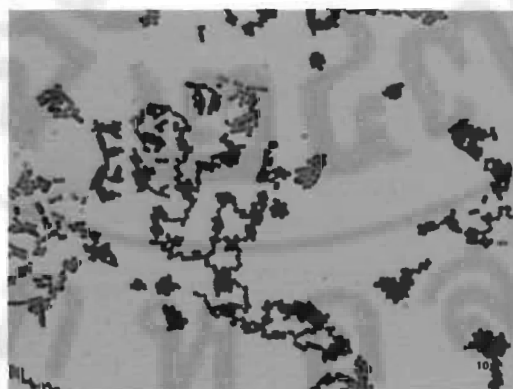
จากการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส และทดสอบการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันและน้ำมันจากโรงงานปลาซัมแล้ว สามารถจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคการย้อมแกรม การสังเกตลักษณะโคโลนี และการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ได้ดังนี้

5.1. จุลินทรีย์ไอโซเลท N10 – 9

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของ จุลินทรีย์ไอโซเลท N10 – 9 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultural characteristic) ด้วยอาหารแข็งสูตร NA พบว่า โคโลนีของจุลินทรีย์ไอโซเลท N10 – 9 มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร โคโลนีมีสีเหลือง ขอบโคโลนีเรียบ และโคโลนีมีผิวหน้าเกลี้ยง (ภาพ 32) เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เซลล์ของจุลินทรีย์ไอโซเลท N10 – 9 มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น คีดสีแกรมลบ (สีแดง) มีการจัดเรียงตัวเป็นแบบเดี่ยว เซลล์มีขนาดประมาณ 1 ไมครอน (ภาพ 33)



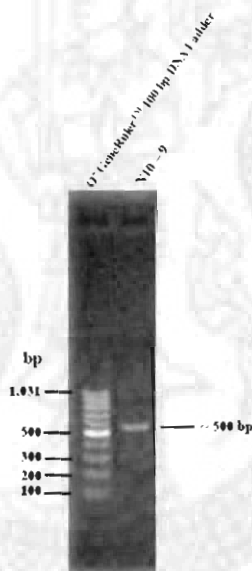
ภาพ 32 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ไอโซเลท N10-9 บนอาหารแข็งสูตร NA



ภาพ 33 ลักษณะรูปร่างและการคีดสีแกรมของจุลินทรีย์ไอโซเลท N10-9 เมื่อทำการย้อมสีแบบแกรม

จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง V₁-V₃ โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 520R พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส (ภาพ 34) และทำการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยไพรเมอร์ 27F และ 520R โดยบริษัท First

Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย แล้วสร้าง contig ของบริเวณ $V_1 - V_3$ ของยีน 16S rRNA ที่หาลำดับเบสได้ด้วยโปรแกรม BioEdit (ภาพ 35) เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์ที่มีรายงานไว้ใน GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลท N10 - 9 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับจีโนมของ *Pseudomonas stutzeri* (accession no. CP000304) ร้อยละ 99.1 ดังนั้นจุลินทรีย์ไอโซเลท N10 - 9 คือ *Pseudomonas stutzeri* (ภาพ 36)



ภาพ 34 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท N10 - 9

100 bp DNA ladder คือ คีเอ็นเอมาตรฐาน O' GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder
N10 - 9 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท N10 - 9

1	GCTGGCGGCA	GGCCTAACAC	ATGCAAGTCG	AGCGGATGAG	TGGAGCTTGC
51	TCCATGATTC	AGCGGCGGAC	GGGTGAGTAA	TGCCCTAGGAA	TCTGCCTGGT
101	AGTGGGGGAT	AACGTTTCGA	AAGGAACGCT	AATACCGCAT	ACGTCCTACG
151	GGAGAAAGTG	GGGGATCTTC	GGACCTCACG	CTATCAGATG	AGCCTAGGTC
201	GGATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAATGGCCCA	CCAAGGCGAC	GATCCGTAAC
251	TGGTCTGAGA	GGATGATCAG	TCACACTGGA	ACTGAGACAC	GGTCCAGACT
301	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGG	GGAATATTGG	ACAATGGGCG	AAAGCCTGAT
351	CCAGCCATGC	CGCGTGTGTG	AAGAAGGTCT	TCGGATTGTA	AAGCACTTTA
401	AGTTGGGAGG	AAGGGCAGTA	AG		

ภาพ 35 Contig บริเวณ $V_1 - V_3$ ของยีน 16S rRNA ของเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท N10 - 9

Pseudomonas stutzeri A1501, complete genome
Length=4567418

Features in this part of subject sequence:

rRNA-16S ribosomal RNA

Score = 758 bits (410), Expect = 0.0
Identities = 418/422 (99%), Gaps = 0/422 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      GCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTC 60
              |||
Sbjct 866742 GCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTC 866801

Query 61      AGCGGCGGCAGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGA 120
              |||
Sbjct 866802 AGCGGCGGCAGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAAACGTTTCGA 866861

Query 121     AAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCAGC 180
              |||
Sbjct 866862 AAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCAGC 866921

Query 181     CTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGAATGGCCACCAAGGCGAC 240
              |||
Sbjct 866922 CTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTCACCAAGGCGAC 866981

Query 241     GATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACT 300
              |||
Sbjct 866982 GATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACT 867041

Query 301     CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGC 360
              |||
Sbjct 867042 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGC 867101

Query 361     CGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTA 420
              |||
Sbjct 867102 CGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTA 867161

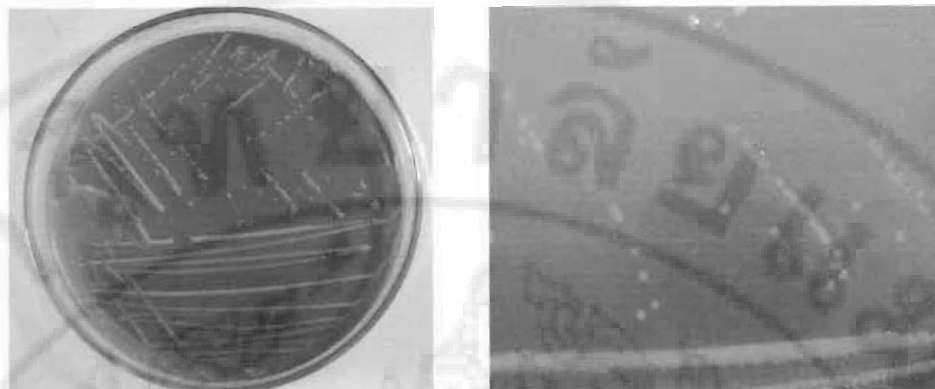
Query 421     AG 422
              ||
Sbjct 867162 AG 867163

```

ภาพ 36 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ contig ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท N10 – 9 กับ
ฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn)

5.2. จุลินทรีย์ไอโซเลท N12 – 1

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท N12 – 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย
อาหารแข็งสูตร NA พบว่า โคโลนีของจุลินทรีย์ไอโซเลท N12 – 1 มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง
ประมาณ 1 มิลลิเมตร โคโลนีมีสีขาว ขอบโคโลนีเรียบ และโคโลนีมีผิวหน้าเกลี้ยง (ภาพ 37) เมื่อ
ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เซลล์ของจุลินทรีย์ไอโซเลท N10 – 9 มี
รูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ (สีแดง) มีการจัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว ขนาดของเชลล์ประมาณ
1 ไมครอน (ภาพ 38)

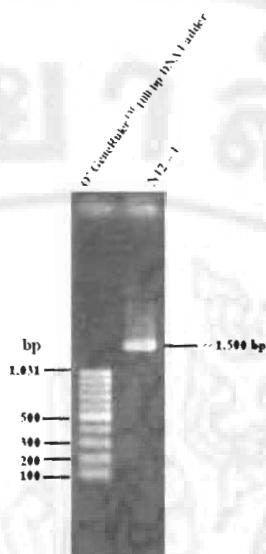


ภาพ 37 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ไอโซเลต N12 – 1 บนอาหารแข็งสูตร NA



ภาพ 38 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ไอโซเลต N12 – 1 เมื่อทำการย้อมสีแบบแกรม

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง V_1 - V_9 โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1522R พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (ภาพ 39) จากนั้นหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยไพรเมอร์ 27F 357F 920F 520R 1080R และ 1522R โดยบริษัท First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย แล้วสร้าง contig ของบริเวณ V_1 – V_9 ของยีน 16S rRNA ที่หาลำดับเบสได้ด้วยโปรแกรม BioEdit ได้ขนาด 1,410 คู่เบส (ภาพ 40) เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับมีฐานข้อมูลของยีน 16S RNA ของจุลินทรีย์ที่มีรายงานไว้ใน GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลต N12 – 1 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับจีโนมของ *Acinetobacter baumannii* (accession no. CP000863) ร้อยละ 97.1 ดังนั้นจุลินทรีย์ไอโซเลต N12 – 1 คือ *Acinetobacter baumannii* (ภาพ 41)



ภาพ 39 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท N12 - 1

100 bp DNA ladder

คือ คีเอ็นเอมาตรฐาน O' GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

N12 - 1

คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท N12 - 1

1	GGTTGCTTTC	GGTAACTGAG	CTAGCGGCGG	ACGGGTGAGT	AATACTTAGG
51	AATCTGCCTA	TTAGTGGGGG	ACAACGTTTC	GAAAGGGACG	CTAATACCGC
101	ATACGCCCTA	CGGGGGAAAG	CAGGGGATCG	CAAGACCTTG	CGCTAATAGA
151	TGAGCCTAAG	TCGGATTAGC	TAGTTGGTGG	GGTAAAGGCC	TACCAAGGCG
201	ACGATCTGTA	GCGGGTCTGA	GAGGATGATC	CGCCACACTG	GGACTGAGAC
251	ACGGCCAGAG	CTCCTACGGG	AGGCAGCAGT	GGGGAATATT	GGACAATGGG
301	GGGAACCCTG	ATCCAGCCAT	GCCGCGTGTG	TGAAGAAGGC	CTTATGGTTG
351	TAAAGCACTT	TAAGCGAGGA	GGAGAAGTAC	TCTGGTTAAT	ACCCAGAATT
401	ACTGGACGTT	ACTCGCAGAA	TAAGCACC GG	CTAACTCTGT	GCCAGCAGCC
451	GCGGTAAATC	AGAGGGTGGC	AGCGTTAATC	GGATTACTTG	GGCGTAAAGC
501	GTGCGTAGGC	GGCTAATTAA	GTCGGATGTG	AAATCCCCGA	GCTCAACTTG
551	GGAATTGCAT	TCGATACTGG	TTAGCTAGAG	TATGGGAGAG	GATGGTAGAA
601	TTCCAGGTGT	AGCGGTGAAA	TGCGTAGAGA	TCTGGAGGAA	TACCGATGGC
651	GAAGGCAGCC	ATCTGGCCTA	ATACTGACGC	TGAGGTACGA	AAGCATGGGG
701	AGCAACAGAG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ATGCCGTAAA	CGATGTCTAC
751	TAGCCGTTGG	GGCCTTTGAG	GCTTTAGTGG	CGCAGCTAAC	GCGATAAGTA
801	GACCGCCTGG	GGGAGTACGG	GTCGCAAGAC	TAAAAACTCA	AATGAAATTG
851	ACGGGGGCCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC
901	GAAGAACCTT	ACCTGGCCTT	GACATACTAA	GAACCTTCTA	GAGATAGATT
951	GGTGCCTTCG	GGAACTTAGA	TACAGGTGCT	GCATGGCTGT	CGTCAGCTCG
1001	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC	CCTTTTCCTT
1051	ACTTGCCAGC	ATTTCGGATG	GGAACCTTAA	GGATACTGCC	AGTGACAAAC
1101	TGGAGGAAGG	CGGGGACGAC	GTCAAGTCAT	CATGGCCCTT	ACGGCCAGGG
1151	CTACACACGT	GCTACAATGG	TCGGTACAAA	GGGTTGCTAC	ATAGCGATAT
1201	GATGCTAATC	TCAAAAAGCC	GATCGTAGTC	CGGATTGGAG	TCTGCAACTC
1251	GACTCCATGA	AGTCGGAATC	GCTAGTAATC	GCGGATCAGA	ATGCCGCGGT
1301	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTCACACC	ATGGGAGTTT
1351	GTTGCACCAG	AAGTAGCTAG	CCTAACTTAA	TTGAGGGCGG	TTACCACGGT
1401	GTGGCCGATG				

ภาพ 40 Contig บริเวณ $V_1 - V_9$ ของยีน 16S rRNA ของเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท N12 - 1

Acinetobacter baumannii ACICU, complete genome Length=3904116

Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA

Score = 2353 bits (1274), Expect = 0.0

Identities = 1363/1403 (97%), Gaps = 18/1403 (1%) Strand=Plus/Plus

```

Query 15      ACT-GAGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACA 73
                |||
Sbjct 216686  ACTGGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACA 216745

Query 74      ACGTTTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATC-GCA 132
                |||
Sbjct 216746  ACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTC- 216804

Query 133     AGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA 192
                |||
Sbjct 216805  GGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA 216864

Query 193     CCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACAC 252
                |||
Sbjct 216865  CCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACAC 216924

Query 253     GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGGAACCCCTGAT 312
                |||
Sbjct 216925  GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGGAACCCCTGAT 216984

Query 313     CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGG 372
                |||
Sbjct 216985  CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGG 217044

Query 373     AGAAG-TACTCTGGTTAATACCCAGA-ATTACTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGG 430
                |||
Sbjct 217045  AG--GCTACTTTAGTTAATACCTAGAGA-TAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGG 217101

Query 431     CTAACCTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGATTTACTG 490
                |||
Sbjct 217102  CTAACCTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGATTTACTG 217161

Query 491     GGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCTAATTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTG 550
                |||
Sbjct 217162  GGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCTTATTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTG 217221

Query 551     GGAATTGCATTTCGATACTGGTTAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGT 610
                |||
Sbjct 217222  GGAATTGCATTTCGATACTGGTTAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGT 217281

Query 611     AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTA 670
                |||
Sbjct 217282  AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTA 217341

Query 671     ATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC 730
                |||
Sbjct 217342  ATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC 217401

Query 731     ATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAAC 790
                |||
Sbjct 217402  ATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAAC 217461

Query 791     GCGATAAGTAGACCGCTGGGGGAGTACGGGTCGCAAGACTAAAACTCAAATGAAATTG 850
                |||
Sbjct 217462  GCGATAAGTAGACCGCTGGGG-AGTACGG-TCGCAAGACTAAAA-CTCAAATGAA-TTG 217517

Query 851     ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT 910
                |||
Sbjct 217518  ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT 217577

```

ภาพ 41 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ contig ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท N12 - 1 กับ

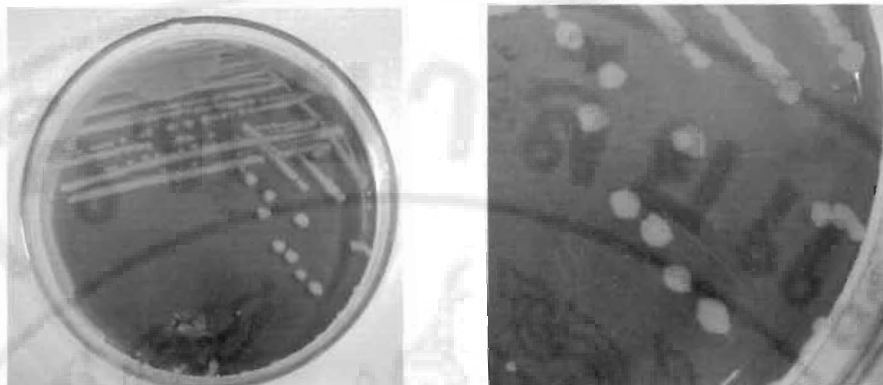
ฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn)

Query	911	ACCTGGCCTTGACATACTAAGAA-CTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAA-CTTA	968
Sbjct	217578	ACCTGGCCTTGACATACTA-GAAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCT-A	217635
Query	969	GATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC	1028
Sbjct	217636	GATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC	217695
Query	1029	AACGAGCGCAACCCCTTTTCCTTACTTGCCAGCATTTTCGGATGGGAACTTAAGGATACTG	1088
Sbjct	217696	AACGAGCGCAACCCCTTTTCCTTACTTGCCAGCATTTTCGGATGGGAACTTAAGGATACTG	217755
Query	1089	CCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAG	1148
Sbjct	217756	CCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAG	217815
Query	1149	GGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACATAGCGATATGATGCTAA	1208
Sbjct	217816	GGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACACAGCGATGTGATGCTAA	217875
Query	1209	TCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA	1268
Sbjct	217876	TCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA	217935
Query	1269	TCGCTAGTAATCGCGGATCAGAAATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACC	1328
Sbjct	217936	TCGCTAGTAATCGCGGATCAGAAATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACC	217995
Query	1329	GCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTAGCTAGCCTAACTT-AATTGAGGG	1387
Sbjct	217996	GCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTAGCTAGCCTAACTGCAAA-GAGGG	218054
Query	1388	CGGTTACCACGGTGTGGCCGATG	1410
Sbjct	218055	CGGTTACCACGGTGTGGCCGATG	218077

ภาพ 41 (ต่อ)

5.3. จุลินทรีย์ไอโซเลท S13 - 8

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S13 - 8 บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็งสูตร NA พบว่า โคโลนีของจุลินทรีย์ไอโซเลท S13 - 8 มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร โคโลนีมีสีขาว ขอบโคโลนีหยัก และ โคโลนีมีผิวหน้าเกลี้ยง (ภาพ 42) เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เซลล์ของจุลินทรีย์ไอโซเลท S13 - 8 มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ดิคส์แกรมบวก (สีม่วง) มีการจัดเรียงตัวเป็นสาย มีสปอร์รูปไข่อยู่ภายในเซลล์ (endospore) บริเวณกลางเซลล์ ขนาดของเซลล์ประมาณ 2 ไมครอน (ภาพ 43)

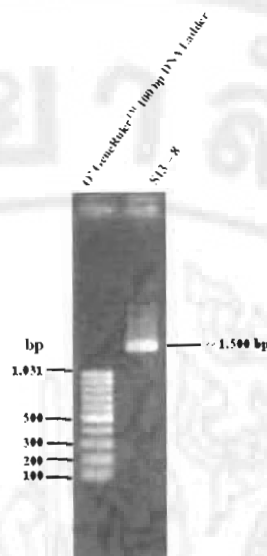


ภาพ 42 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ไอโซเลท S13 - 8 บนอาหารแข็งสูตร NA



ภาพ 43 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ไอโซเลท S13 - 8 เมื่อทำการย้อมสีแบบแกรม

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง V_1 - V_9 โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1522R พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (ภาพ 44) จากนั้นหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยไพรเมอร์ 27F 357F 920F 520R 1080R และ 1522R โดยบริษัท First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย แล้วสร้าง contig ของบริเวณ V_1 - V_9 ของยีน 16S rRNA ที่หาลำดับเบสได้ด้วยโปรแกรม BioEdit ได้ขนาด 1,396 คู่เบส (ภาพ 45) เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับมีฐานข้อมูลของยีน 16S RNA ของจุลินทรีย์ที่มีรายงานไว้ใน GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลท N10 - 9 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับจีโนมของ *Bacillus cereus* (accession no. AE016877.1) ร้อยละ 99.2 ดังนั้นจุลินทรีย์ไอโซเลท N12 - 1 คือ *Bacillus cereus* (ภาพ 46)



ภาพ 44 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท S13 – 8

100 bp DNA ladder คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน O' GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

S13 – 8 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท S13 – 8

```

1   TGCTCTTATG AAGTTAGCGG CGGACGGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG
51  CCCATAAGAC TGGGATAACT CCGGGAAACC GGGGCTAATA CCGGATAACA
101 TTTTGAACCG CATGGTTCGA AATTGAAAGG CGGCTTCGGC TGTCACCTTAT
151 GGATGGACCC GCGTCGCATT AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG
201 GCAACGATGA GTACCCAACC TGAGAAGGGT GATCGGCCAC ACTGGGACTG
251 AGACACCAGC CCAGACTTCC CACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC
301 AATCGACGAA AGTCTGACCG GAGCAACGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCTTT
351 CGGGTCGTAA AACTCTGTTG TTAGGGAAGA ACAAGTGCTA GTTGAATAAG
401 CTGGCACCTT GACGGTACCT AACCAGAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA
451 GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTATCCGGAA TTATTGGGCG
501 TAAAGCGCGC GCAGGTGGTT TCTTAAGTCT GATGTGAAAG CCCACGGCTC
551 AACCGTGGAG GGTCAATTGA AACTGGGAGA CTTGAGTGCA GAAGAGGAAA
601 GTGGAATTCC ATGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC
651 AGTGGCGAAG GCGACTTTCT GGTCTGTAAC TGACACTGAG GCGCGAAAGC
701 GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT
751 GAGTGCTAAG TGTTAGAGGG TTTCCGCCCT TTAGTGCTGA AGTTAACGCA
801 TTAAGCACTC CGCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGCTGAAA CTCAAAGGAA
851 TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA
901 CGCGAAGAAC CTTACCAGGT CTTGACATCC TCTGAAAACC CTAGAGATAG
951 GGCTTCTCCT TCGGGAGCAG AGTGACAGGT GGTGCATGGT TGTCGTCAGC
1001 TCGTGTCTGT AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCTTGAT
1051 CTTAGTTGCC ATCATTAAGT TGGGCACTCT AAGGTGACTG CCGGTGACAA
1101 ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAATC ATCATGCCCC TTATGACCTG
1151 GGCTACACAC GTGCTACAAAT GGACGGTACA AAGAGCTGCA AGACCGCGAG
1201 GTGGAGCTAA TCTCATAAAA CCGTTCTCAG TTCGGATTGT AGGCTGCAAC
1251 TCGCCTACAT GAAGCTGGAA TCGCTAGTAA TCGCGGATCA GCATGCCGCG
1301 GTGAATACGT TCCCGGGCCT TGTACACACC GCCCCTCACA CCACGAGAGT
1351 TTGTAACACC CAAAGTCGGT GGGGTAACCT TTTTGGAGCC AGCCGC

```

ภาพ 45 Contig บริเวณ V₁ – V₉ ของยีน 16S rRNA ของเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท S13 – 8

Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome

Length=5411809

Features in this part of subject sequence: rRNA-Small Subunit Ribosomal RNA

Score = 2514 bits (1361), Expect = 0.0
Identities = 1385/1396 (99%), Gaps = 4/1396 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	TGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGAC	60
Sbjct	9271	TGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGAC	9330
Query	61	TGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTTCTGA	120
Sbjct	9331	TGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTTCTGA	9390
Query	121	AATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCGCGTCGCATTAGCTAGTTGG	180
Sbjct	9391	AATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCGCGTCGCATTAGCTAGTTGG	9450
Query	181	TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGAGTACCCAACCTGAGAAGGGTGATCGGCCAC	240
Sbjct	9451	TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG-AGGGTGATCGGCCAC	9509
Query	241	ACTGGGACTGAGACACCAGCCAGACTTCCCACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC	300
Sbjct	9510	ACTGGGACTGAGACA-CGGCCAGAC-TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC	9567
Query	301	AATCGACGAAAGTCTGACCGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAA	360
Sbjct	9568	AATGGACGAAAGTCTGA-CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAA	9626
Query	361	AACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCT	420
Sbjct	9627	AACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCT	9686
Query	421	AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG	480
Sbjct	9687	AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG	9746
Query	481	TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG	540
Sbjct	9747	TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG	9806
Query	541	CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAA	600
Sbjct	9807	CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAA	9866
Query	601	GTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG	660
Sbjct	9867	GTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG	9926
Query	661	GCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA	720
Sbjct	9927	GCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA	9986
Query	721	GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCT	780
Sbjct	9987	GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCT	10046
Query	781	TTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAA	840
Sbjct	10047	TTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAA	10106
Query	841	CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA	900
Sbjct	10107	CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA	10166

ภาพ 46 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ contig ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท S13 - 8 กับ

ฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST (blastn)

Query	901	CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCT	960
Sbjct	10167	CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCT	10226
Query	961	TCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGG	1020
Sbjct	10227	TCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGG	10286
Query	1021	TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCT	1080
Sbjct	10287	TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCT	10346
Query	1081	AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC	1140
Sbjct	10347	AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC	10406
Query	1141	TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAG	1200
Sbjct	10407	TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAG	10466
Query	1201	GTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAT	1260
Sbjct	10467	GTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAT	10526
Query	1261	GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT	1320
Sbjct	10527	GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT	10586
Query	1321	TGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCT	1380
Sbjct	10587	TGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCT	10646
Query	1381	TTTTGGAGCCAGCCGC	1396
Sbjct	10647	TTTTGGAGCCAGCCGC	10662

ภาพ 46 (ต่อ)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. จากการทดลองสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส จากตัวอย่างดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนของไขมันและน้ำมัน และแหล่งธรรมชาติ ในจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา จำนวน 30 ตัวอย่าง ได้จุลินทรีย์ทั้งหมด 447 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ จำนวน 91 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้บนอาหารสูตร Tween 80 และคัดเลือกจุลินทรีย์ จำนวน 21 ไอโซเลท ซึ่งมีขนาดบริเวณใส หรือบริเวณที่เป็นตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนีมากกว่า 12 มิลลิเมตร ไปทดสอบการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์

2. จากทดสอบการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่า จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ N10 – 9, N12 – 1 และ S13 – 8 มีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์สูงที่สุด และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูง

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 ไอโซเลท คือ ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เหมาะสม เท่ากับ ร้อยละ 1 ของปริมาณน้ำเสียทั้งหมด โดยน้ำเสียที่จุลินทรีย์ผสมสามารถกำจัดไขมันและน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้น เท่ากับ ร้อยละ 20 ของปริมาณน้ำเสียทั้งหมด และค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 9.0 โดยมีการกวนผสม เท่ากับ 200 รอบต่อนาที

4. การศึกษาประสิทธิภาพของระบบแยกและย่อยไขมันในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงาน ปลาสิ่มศรีทนจังหวัดพะเยา พบว่า ถังแยกไขมันมีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันและน้ำมัน เท่ากับ ร้อยละ 99.6 ส่วนประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันและน้ำมัน และซีโอดีในน้ำเสียของถังย่อยไขมัน เท่ากับ ร้อยละ 96.8 และ 70.8 ตามลำดับ

5. การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียทั้ง 3 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า ไอโซเลท N10 – 9 คือ *Pseudomonas stutzeri* ส่วนไอโซเลท N12 – 1 คือ *Acinetobacter baumannii* และไอโซเลท S13 – 8 คือ *Bacillus cereus*

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาประสิทธิภาพของระบบแยกและย่อยไขมัน พบว่า ค่าซีไอดีของน้ำเสีย ที่ผ่านการบำบัดในถังย่อยไขมันเป็นระยะเวลา 13 วัน ยังมีค่าที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการหรือกระบวนการที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำเสียหลังผ่านการบำบัดในถังย่อยไขมัน
2. การกวนผสมของใบพัดกวนผสมในถังย่อยไขมันควรมีการกวนผสมให้ต่อเนื่องเพิ่มมากขึ้น เพื่อลดระยะเวลาในการบำบัดให้น้อยลง
3. ควรมีการถ่ายทอดความรู้ให้กับกลุ่มชาวบ้าน เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาน้ำเสียที่เกิดจากระบบการผลิตปลา

บรรณานุกรม

- เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์. 2539. วิศวกรรมกรรมการกำจัดน้ำเสีย. กรุงเทพฯ: มิตรนราการพิมพ์. 642 น.
- เกรียงไกร พัทธยากร. 2545. การใช้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสในการบำบัดน้ำเสียจากครัวที่ปนเปื้อนไขมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 135 น.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2539. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 735 น.
- พิชญ์นาฏ สุทธิสมณ. 2546. การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันล้นเหลือโดยการเติมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในระบบบำบัดแบบแอกติเวตเต็ดสลัดจ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 76 น.
- ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และ อุษา วิเศษสุนน. 2535. คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. กรุงเทพฯ: สมาคมสิ่งแวดล้อมไทยและ World Environmental Center. 410 น.
- รศมนต์ จงเจริญ และ สาวิตรี วาญญูไพศาล. 2548. การศึกษาความสามารถในการผลิตไลเปสของแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติและโรงงานอุตสาหกรรม. น. 347-355. ใน: เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรอรธ สุกจัตุรัส, วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต, วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และ สุภพษ์ ภูพัฒนะพันธุ์. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. น. 712-718. ใน: เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุวรรณา เนียมสนิท, งานนิจ นนทโส, ประสาท โพธิ์นัมแดง, พลสันห์ มหาจันทร์, สุรศักดิ์ ศิริพร อุดุลศิลป์ และ นิยม กำลังดี. 2540. การคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน. รายงานการวิจัย. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 29 น.
- อรไท สุขเจริญ. 2543. วิศวกรรมชีวเคมี. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 290 น.
- Backer, P., D. Koster, M.N. Popov, S. Markossian, G. Antranikian and H. Markl. 1999. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid - rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. **Wat. Res.** 33(3): 653 - 660.
- Baral, A. and P.F. Fox. 1997. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Pseudomonas tolaasii*. **Food Chem.** 58(1 - 2): 33 - 38.

- Becker, P., I.A. Reesh, S. Markossian, G. Artranikian and H. Marki. 1997. Determination of the kinetic parameter during continuous cultivation of the lipase – producing thermophile *Bacillus sp.* IHI – 91 on olive oil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 184 – 190.
- Bednaski, W., J.K. Piontas, Z. Zeparska and M. Adamczak. 1993. Growth of three Fungi on poultry fat or beef tallow. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 9: 656 – 659.
- Benjamin, S. and A. Pandey. 1996. Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. **Bioresource Technol.** 55: 167 – 170.
- Bernard, S. and N. F. Gray. 2000. Aerobic digestion of pharmaceutical and domestic wastewater sludges at ambient temperature. **Wat. Res.** 34(3): 725 – 734.
- Bhumibhamon, O., A. Kopraserstak and S. Funthong. 2002. Biotreatment of high fat and oil wastewater by lipase producing bacteria. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 36: 261 - 267.
- Broughton, M.J., J.H. Thiele, E.J. Birch and A. Cohen. 1998. Anaerobic batch digestion of sheep tallow. **Wat.Res.** 32(5): 1423 - 1428.
- Bushell, M.E. and J.H. Slater. 1981. **Mixed culture fermentation**. New York: Society General Microbiology. 175 p.
- Cambell, M.K. 1992. **Biochemistry**. Philadelphia: Saunders College Publishing. 468 p.
- Castellar, M.R., M.A. Taipa and J.M.S. Cabral. 1996. Kinetic and stability characterization of *Chromobacterium viscosum* lipase and its comparison with *Pseudomonas glumae* lipase. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 61: 299 – 314.
- Chanhinian, H., G. Vanot, A. Ibrik, N. Rugain, L. Sarda and L. C. Comeau. 2000. Production of extracellular lipase by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 64(2): 215 – 222.
- Chartrain, M., C. Marein, L. Katz, P. Salmon, T. Brix, B. Buckland and R. Greasham. 1993. Enhancement of lipase production during fed – batch cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. **J. Ferment Bioeng.** 76(6): 487 – 492.
- Chappe, P.A., A. Mourey and G. Kibertus. 1994. Variation lipolytica activity in the genus *Acinetobacter sp.* **J. Gen. Appl. Microbilo.** 4: 103 – 114.
- Chigusa K., T. Hasegawa, N. Yamamoto and Y. Watanaba. 1996. Treatment of wastewater from oil manufacturing plant by yeast. **Wat. Sci. Tech.** 34(11): 51 - 58

- Corzo, G. and S. Revah. 1999. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technol.** 70: 173 – 180.
- Dalmau, E., A. Sanchez, L. Montesinos, F. Valero, F. J. Lafuente and C. Casas. 1998. Study of the drop size frequencies in a microbial growth system with an aqueous – organic culture medium: lipase production from *Candida rugosa*. **Biotechnol.** 59: 183 – 192.
- Del Rio, J.L., P. Serra, F. Valero, M. Poch and C. Sola. 1990. Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil. **Biotechnol. Lett.** 12 (11): 835 – 838.
- Destain, J., D. Roblain and P. Thonart. 1997. Improvement of lipase production *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol. Lett.** 19(2): 105 – 107.
- Elibol, M. and D. Özer. 2000. Lipase production by immobilised *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochem.** 36: 219 – 223.
- Ferrer, M., F.J. Plou, O.M. Nuero, F. Reyes and A. Ballesteros. 2000. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial waste. **J. Chem. Technol. Biotech.** 75: 569 – 576.
- Gilbert, E. J., A. Cormish and C.W. Jones. 1991. Purification and properties of Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. **J. Gen. Microbiol.** 40: 435 – 443.
- Espinosa, L.M. and T. Stephenson. 1996. Grease biodegradation : is bioaugmentation more effective than natural populations for start – up?. **Wat. Sci. Tech.** 34(5 - 6): 303 – 308.
- Gao, X.G., C. Shu – Gui and Z. Ke – Chang. 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. **Enzyme Microb. Technol.** 27: 74 – 82.
- Gaur, R., A. Gupta and S.K. Khare. 2008. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Process Biochemistry.** 43: 1040 – 1046.
- Genovefa, Z., E. Wenzig and A. mersmann. 1994. Improvement of lipase production by addition of catalase during fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 40: 650 – 652.
- Gulati, R., R.K. Saxena and R. Gupta. 2000. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. **Process Biochem.** 36: 149 – 155.

- Miranda, O.A., A.A. Salgueiro, M.C.B. Pimentel, J.L. Lima Filho, E.H.M. Melo and N. Duran. 1999. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technol.** 69: 145 – 147.
- Odibo, F.J.C., U.O. Okereke and C.A. Oyeka. 1995. Influence of culture conditions on the production of lipase of *Hendersonula toruloide*. **Bioresource Technol.** 54: 81 – 83.
- Okumura, S., M. Iwai and Y. Tsujisuka. 1981. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase. **Agri. Biol. Chem.** 45(1): 180 – 189.
- Petrovic, S.E., M. Skrinjar, A. Becarevic, I.F. Vujicic and L. Banka. 1990. Effect of various carbon sources on microbial lipase biosynthesis. **Biotechnol. Lett.** 12(4): 299 – 304.
- Pokorny, D., J. Friedrich and A. Cimerman. 1994. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Lett.** 16(4): 363 – 366.
- Sastry, C.A., M. Hashim and P. Agamuthu. 1995. **Waste Treatment Plant**. New york: John Willey & Sons. 863 p.
- Schuepp, C., S. Kermasha, M.C. Michalski and A. Morin. 1997. Production, partial purification and characterization of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA037. **Process Biochem.** 32(3): 225 – 232.
- Scioli, C. and L. Vollaro. 1997. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewater. **Wat. Res.** 31(10): 2520 - 2524.
- Shabtai, Y. and N. Daya – Michne. 1992. Production, properties and properties of a lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS – 7) capable of growing in water – restricted environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 178 – 180.
- Sharma, R., S.K. Soni, R.M. Vohra, L.K. Gupta and J.K. Gupta. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus sp.* RSJ – 1. **Proc. Biochem.** 37: 1075 – 1084.
- Shariff, F. M., T. C. Leow, A. D. Mukred, A. B. Salleh, M. Basri, R. and N. Zaliha. 2000. Production of L2 lipase by *Bacillus sp.* strain L2: nutritional and physical factors. **J Basic Microbiol.** 47(5): 406 – 4112.
- Sugihara, A., S. Hata, Y. Shimada, K. Goto, S. Tsunasawa and Y. Tominaga. 1993. Characterization of *Geotrichum candidum* lipase III with some preference for the inside ester bond of triglyceride. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 40: 279 – 283.

Tan, K.H. and C.O. Gill. 1985. Batch growth of *Saccharomycopsis lipolytica* on animal fat.

Appl. Microbial. Biotechnol. 21: 292 – 298.

Valero, F., F. Ayats, J. Lopez – Santin and M. Poch. 1988. Lipase production by *Candida rugosa*: Fermentation behaviour. **Biotech. Lett.** 10(10): 741 - 744

Vidal, G., A. Cavalho, R. Mendez and J.M. Lema. 2000. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewater. **Bioresource Technol.** 74: 231 - 239.

Wakelin, N.G. and C.F. Forster. 1997. An investigation into microbial removal of fats, Oil and greases. **Bioresource Technol.** 59: 37 - 43.

Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipase industry: an engineering overview. **J. Amer. Oil. Chem. Soc.** 64(2): 1657 – 1661.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารสูตร Enrichment culture

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำมันมะกอก	10.0	มิลลิลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.3	กรัม
Yeast Extract	0.3	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Tween 80	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร NA ซึ่งมีน้ำมันมะกอกเป็นองค์ประกอบ สำหรับคัดแยกเชื้อ

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
น้ำมันมะกอก	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
วุ้น	15.0	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. อาหารสูตร NB

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. อาหารสูตร NA สำหรับเก็บรักษาเชื้อ

อาหารสูตร NB ซึ่งเติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร 1 ลิตร โดยผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5. อาหารสำหรับการเตรียมกล้าเชื้อในการผลิตเอนไซม์

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำมันมะกอก	10.0	มิลลิลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.3	กรัม
K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
Yeast Extract	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นน้ำมันมะกอกให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ถ่ายใส่ภาชนะที่จะทดสอบ จากนั้นจึงเติมน้ำมันมะกอกลงในภาชนะให้มีความเข้มข้น ร้อยละ 1 นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

6. อาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำมันมะกอก	10.0	มิลลิลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.3	กรัม
K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
CaCO_3	5.0	กรัม
Yeast Extract	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นน้ำมันมะกอกให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ถ่ายใส่ภาชนะที่จะทดสอบ จากนั้นจึงเติมน้ำมันมะกอกลงในภาชนะให้มีความเข้มข้น ร้อยละ 1 นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

7. อาหารสูตร Tween 80

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
CaCl ₂	0.1	กรัม
Tween 80	10.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
พีเอช	7.0	

ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

8. น้ำเลี้ยงสังเคราะห์

น้ำเลี้ยงสังเคราะห์ในการทดลองมีค่าซีโอดี เท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย 1 ลิตร ประกอบด้วย

FeCl ₃	0.008	กรัม
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.094	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.153	กรัม
NaHCO ₃	1.600	กรัม
CaCl ₂	0.016	กรัม
NH ₄ HCO ₃	2.300	กรัม
ยูเรีย	0.300	กรัม
น้ำตาล	4.430	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ให้เข้ากันปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ถ่ายใส่ภาชนะที่จะทดสอบ จากนั้น นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

9. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

9.1. Copper reagent

ละลาย cupric acetate 5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 6.1 ด้วย pyridine จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

9.2. กรดโอเลอิกเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ละลายกรดโอเลอิก 0.28 กรัม ในสารละลายไอโซออกเทน จากนั้นปรับปริมาตรจนเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

9.3 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์

เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ร้อยละ 37 ปริมาตร 592 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นประมาณ 400 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรจนเท่ากับ 1 ลิตร

9.4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.0

ละลาย KH_2PO_4 12.68 กรัม และ K_2HPO_4 12.68 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเท่ากับ 1 ลิตร

9.5. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ละลาย CaCl_2 0.11 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

10. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

10.1. สีย้อม (0.01% w/v Coomassie brilliant blue G - 250)

ละลาย Coomassie brilliant blue G - 250 100 มิลลิกรัม ใน 95% เอทานอล 50 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งสีย้อมละลายหมด เติมกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85% 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และกรองสีย้อมด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ก่อนนำไปใช้เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

10.2. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSAเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลาย BSA 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร

11. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ค่าซีโอดี

11.1. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.0167 โมลาร์

อบโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งอย่างละเอียด 4.913 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 167 มิลลิลิตร เติมเมอร์คิวริกซัลเฟต 33.3 กรัม คนให้ละลายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

11.2. สารละลายกรดซัลฟิวริกเกรดเจเนอรัล

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 10.11 กรัม ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) 1 ลิตร มีการกวนช้า ๆ จนกว่าซิลเวอร์ซัลเฟตจะละลายหมด (ต้องใช้เวลาในการละลาย 1 – 2 วัน)

11.3. สารละลายเฟอโรอินอินดิเคเตอร์

ละลาย 1, 10 - ฟิแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต [1, 10 - phenanthroline monohydrate ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$)] 1.485 กรัม และไอร์ออน (II) ซัลเฟตเฮปต้าไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.695 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

10.4. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$] (FAS) 39.2 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ทิ้งให้เย็น สารละลายนี้ต้องเทียบมาตรฐานกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้ในการย่อยสลาย ทุกครั้งที่น่ามาใช้



ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

1.1. วิธีการทำกราฟมาตรฐานของโปรตีน

ใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรรวมในแต่ละหลอดให้ครบ 0.50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำหลอดทดลองอีกหลอดหนึ่งมาใส่น้ำกลั่น 0.50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสีย้อม 4.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ผสมสารด้วย Vortex mixer ตั้งไว้ 10 นาที นำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่มีน้ำกลั่น 0.50 มิลลิลิตร แทนสารละลายโปรตีนมาตรฐานเป็น blank นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีนในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2. วิธีหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

ทำการทดลองควบคู่พร้อมกับการทำกราฟมาตรฐานโดยใส่สารตัวอย่าง 0.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสีย้อม 4.50 มิลลิลิตร ผสมสารด้วย Vortex mixer ตั้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน

2. วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Colorimetric

2.1. วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดโอลิอิก

ใส่สารละลายกรดโอลิอิกเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.30, 0.60, 1.00, 1.30, 1.60, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50, 4.00, 4.50, 5.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรรวมในแต่ละหลอดให้เท่ากับ 5.00 มิลลิลิตร ด้วยไอโซออกเทน จากนั้นเติม copper reagent 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ตั้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น นำสารละลายชั้นบนไอโซออกเทนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออกเทนเป็น blank นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดโอลิอิกเป็นไมโครโมล

2.2. การเตรียมสารละลายเอนไซม์

เตรียม preculture ของเชื้อแต่ละไอโซเลท โดยเชื้อจากอาหารวุ้น 1 loop ใส่ลงในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200

รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก preculture 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวใหม่ 99 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บอาหารเหลวทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเก็บอาหารเหลว 5 มิลลิลิตร แล้วชนิดิฟิวจ์แยกตะกอนเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Microcentrifuge โดยใช้แรง $14,000 \times g$ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายใสส่วนบนไปหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และ ปริมาณโปรตีน

2.3. วิธีตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ผสมน้ำมันมะกอก 0.20 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตปีเพอร์เข้มข้น 0.20 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 0.30 มิลลิลิตร เข้าด้วยกันในขวดรูปชมพู่ 2 ใบ เติมสารละลายเอนไซม์ 0.50 มิลลิลิตร ในขวดที่ 1 นำสารละลายทั้ง 2 ขวดไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายเอนไซม์ 0.50 มิลลิลิตร ในขวดที่ 2 ซึ่งเป็น blank จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายในทั้ง 2 ขวดให้เท่ากับ 1-2 ด้วย 6 โมลาร์ HCl ทดสอบด้วยกระดาษพีเอช เติมไอโซออกเทน 5 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนของไอโซออกเทนออกมาทำการวิเคราะห์ โดยเติม Copper reagent 1.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ตั้งไว้ให้แยกชั้น นำสารละลายชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโอลีอิก อ่านปริมาณของกรดโอลีอิกเป็น ไมโครโมลและนำไปคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยไลเปส คือ ปริมาณกรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้นด้วยแอกติวิตีของไลเปส ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

2.4. การคำนวณค่ากิจกรรมและค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

เมื่อเทียบค่า A_{715} ของสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการใช้ไลเปส A มิลลิลิตร ไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันมะกอกเป็นเวลา 60 นาที กับกราฟมาตรฐานกรดโอลีอิกพบปริมาณกรดโอลีอิกที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา B ไมโครโมล

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{B}{A \times 60}$$

$$\frac{\text{ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}} = \text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)}$$

3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย

วิธีวิเคราะห์ปริมาณไขมันและน้ำมันในน้ำเสียโดยดัดแปลงจาก Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 20th ed. (1998)

3.1. วิธีวิเคราะห์

เก็บตัวอย่างน้ำเสียประมาณ 50 – 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วปากกว้าง ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของตัวอย่างให้มีค่าพีเอชเท่ากับหรือต่ำกว่า 2.0 โดยใช้กรดซัลฟิวริกร้อยละ 50 เติมตัวอย่างใส่ในกรวยแยก ชีดระดับน้ำไว้ที่กรวยแยกเพื่อหาปริมาณที่แน่นอนได้ภายหลังเติมเฮกเซนปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วเพื่อชะไขมันและน้ำมันที่เหลือค้างอยู่ให้หมด แล้วเทรวมกับตัวอย่างน้ำในกรวยแยก ทำการสกัดไขมันและน้ำมันโดยเขย่าแรง ๆ นาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น หากเกิดชั้นของอิมัลชันให้เพิ่มปริมาณเฮกเซนได้ (จดปริมาตรเฮกเซนที่ใช้ด้วย) พร้อมทั้งมีการเขย่ากรวยแยกเบา ๆ 5 – 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น หลังจากนั้นแยกส่วนที่เป็นน้ำออกจากกรวยแยกใส่ภาชนะเดิมที่ใช้เก็บตัวอย่างน้ำ สำหรับส่วนของเฮกเซนให้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 40 ที่ชุบด้วยเฮกเซนลงในถ้วยกระเบื้องที่อบแห้งและมีการชั่งน้ำหนักไว้แล้ว นำตัวอย่างน้ำที่แยกออกมาได้ทำการสกัดซ้ำตามวิธีเดิม หลังจากนั้นทำการชะกระดาษกรองและกรวยกรองด้วยเฮกเซน 10 – 20 มิลลิลิตร รวมเฮกเซนทั้งหมดที่ใช้ในการสกัดทั้งสองครั้งในถ้วยกระเบื้อง นำไประเหย เฮกเซนบน hotplate ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 70 องศาเซลเซียส ในตู้ดูดควัน จนกระทั่งเฮกเซนระเหยหมด ทำให้แห้งขึ้นโดยอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 15 – 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาชั่งน้ำหนัก ส่วน Blank ทำโดยใช้เฮกเซนปริมาณเท่ากับที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว นำไประเหยเช่นเดียวกับตัวอย่างและชั่งน้ำหนักด้วยกระเบื้องที่ใส่ นำค่าที่ได้มาหาปริมาณไขมันและน้ำมัน

3.2. การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมันและน้ำมันในตัวอย่างน้ำ} = \frac{A - B \times 1,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}} \quad (\text{กรัมต่อลิตร})$$

กำหนดให้ A = น้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของถ้วยกระเบื้องที่มีน้ำมันลบด้วยน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเปล่า (กรัม)

B = น้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของถ้วยกระเบื้องที่ทำ Blank ลบด้วยน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเปล่า (กรัม)

4. การวิเคราะห์ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand) โดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด

4.1. การเทียบมาตรฐานสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

การเทียบมาตรฐานสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตทำโดยเติมสารเคมีคล้ายกับการวิเคราะห์ซีโอดี ของน้ำตัวอย่างในภาชนะย่อยสลาย แต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ ทั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วไตเตรทด้วย FAS ใช้เฟอโรอินอินดิเคเตอร์ 0.05 – 0.1 มิลลิลิตร ทำ 2 ซ้ำ ไทเตรทจนถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากสีฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS)

$$\text{ความเข้มข้นของ FAS (โมลาร์)} = \frac{\text{ปริมาตรของ โปแตสเซียมไดโครเมต (มล.)} \times 0.1}{\text{ปริมาตร FAS ที่ใช้ไตเตรท}}$$

4.2. วิธีวิเคราะห์

ล้างหลอดย่อยสลายและฟาจุกด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 50 ก่อนนำไปใช้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์ แล้วเลือกใช้ปริมาตรน้ำตัวอย่างและสารเคมีที่เหมาะสม (ตาราง 12) โดยนำตัวอย่างน้ำมาใส่ในหลอดย่อยสลายและเติมสารละลายที่ใช้ในการย่อยสลายได้แก่ สารละลายมาตรฐาน โปแตสเซียมไดโครเมต จากนั้นค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเรเจนต์ ปิดจุกหลอดให้แน่น แล้วคว่ำหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง เพื่อผสมให้เข้ากัน นำหลอดย่อยสลายไปอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปไทเตรท โดยเติมเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ 0.05 – 0.1 มิลลิลิตร (1 – 2 หยด) แล้วทำการไทเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.1 โมลาร์ จนถึงจุดยุติคือสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

Blank ให้ดำเนินการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ แต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ

4.3. การคำนวณ

$$\text{ซีไอดี (มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร)} = \frac{(A - B) \times M \times 8,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ}}$$

กำหนดให้ A = ปริมาตรของ FAS ที่ใช้ในการไทเทรต Blank (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของ FAS ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)

M = ความเข้มข้นของ FAS (โมลาร์)

ตารางผนวก 1 ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับภาชนะย่อยสลายขนาดต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ซีไอดี โดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด

ขนาดของภาชนะ ย่อยสลาย	ตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)	สารละลายในการ ย่อยสลาย (มิลลิลิตร)	กรดซัลฟูริก รีเอเจนต์ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)
หลอดย่อยสลาย				
16 x 100 มม.	2.5	1.5	3.5	7.5
20 x 150 มม.	5.0	3.0	7.0	15.0
25 x 150 มม.	10.0	6.0	14.0	30.0
แอมพลูมาตรฐาน				
10 มม.	2.5	1.5	3.5	7.5

ที่มา : ธงชัย และ อุษา (2535)



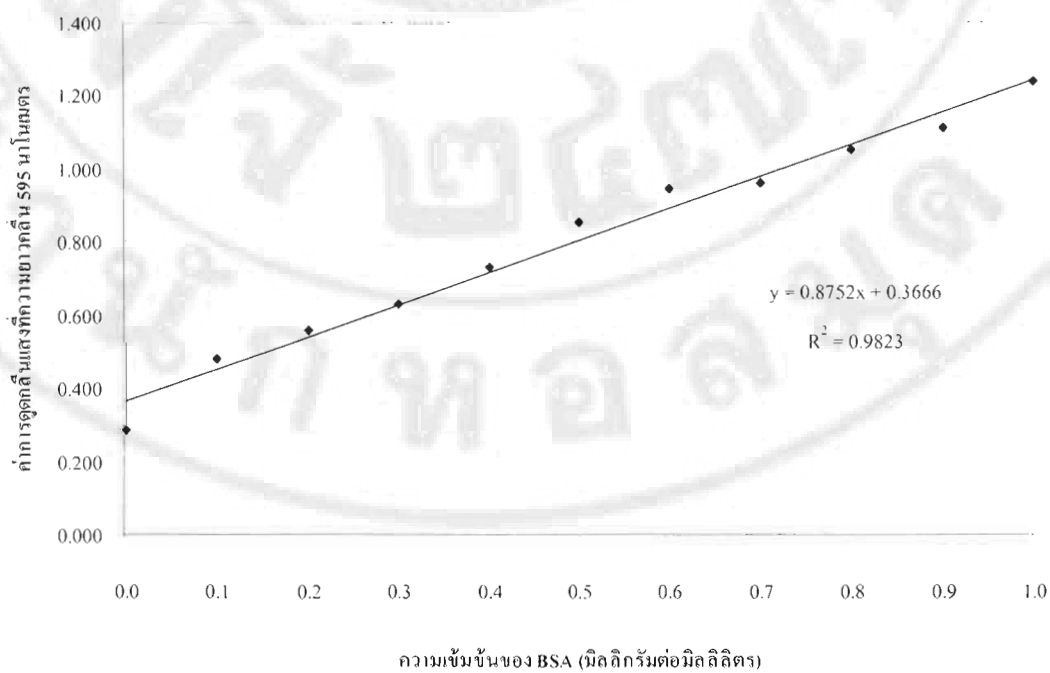
ภาคผนวก ก
ผลการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์

1. กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน BSA

ตารางผนวก 2 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A_{595})
0.0	0.286
0.1	0.480
0.2	0.561
0.3	0.632
0.4	0.730
0.5	0.852
0.6	0.944
0.7	0.958
0.8	1.053
0.9	1.112
1.0	1.238



ภาพผนวก 1 กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน BSA

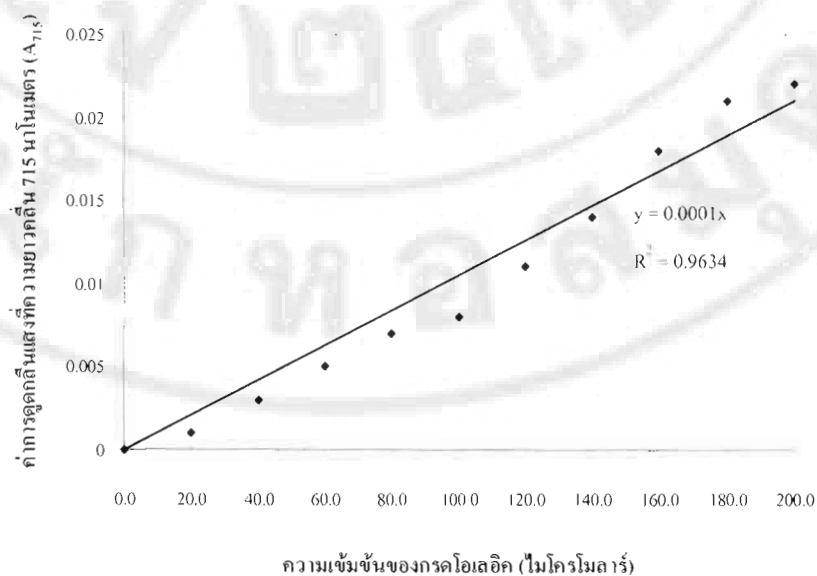
การคำนวณปริมาณโปรตีน

$$\text{ความเข้มข้น โปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A_{595} - 0.3666}{0.8752}$$

2. กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิก

ตารางผนวก 3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดโอเลอิกมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกรดโอเลอิก (ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร (A_{715})
0.0	0
20.0	0.001
40.0	0.003
60.0	0.005
80.0	0.007
100.0	0.008
120.0	0.011
140.0	0.014
160.0	0.018
180.0	0.021
200.0	0.022



ภาพผนวก 2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดโอเลอิก

3. ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย
สังเคราะห์

ตารางผนวก 4 ความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้ในน้ำเสียสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์
ทั้ง 21 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ไขมันและน้ำมันที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)
Control	77.55
N2 - 4	42.90
N6 - 10	44.68
N9 - 10	24.99
N9 - 6	44.29
N10 - 9	22.65
N11 - 6	41.32
N12 - 1	22.56
N12 - 3	51.05
N12 - 6	31.81
N12 - 12	47.87
N12 - 13	40.29
N12 - 14	51.64
N12 - 18	41.85
S2 - 11	42.94
S6 - 20	35.31
S7 - 7	53.26
S12 - 7	48.19
S12 - 19	44.10
S13 - 8	17.09
S14 - 5	25.55
S15 - 14	52.63

4. ผลการทดสอบกิจกรรมจำเพาะของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ทั้ง 3 ไอโซเลท
ตารางผนวก 5 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับ *Pseudomonas aeruginosa*

ไอโซเลท	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)							
	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 18	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 30	ชั่วโมงที่ 36	ชั่วโมงที่ 40	ชั่วโมงที่ 48
N10 – 9	91.0	168.2	142.5	295.2	132.4	123.0	82.2	76.6
N12 – 1	86.7	121.6	251.9	238.3	125.9	110.8	105.1	94.3
S13 – 8	45.3	80.1	124.8	220.1	105.3	119.5	98.1	84.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84.5	134.7	92.2	163.9	136.5	104.9	92.9	80.9

5. ผลการทดสอบสถานะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท ในการย่อยสลายไขมัน และน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์

ตารางผนวก 6 ความเข้มข้นเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์

ร้อยละของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น	ร้อยละของไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้*
0	3.9 ^b
1	59.0 ^a
2.5	59.0 ^a
5	59.9 ^a
10	65.6 ^a

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางผนวก 7 ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสีย	ร้อยละของไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้*
5.0	17.2 ^c
6.0	57.9 ^b
7.0	69.8 ^{ab}
8.0	69.1 ^{ab}
9.0	78.6 ^a

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางผนวก 8 ความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

ร้อยละของไขมันและน้ำมันเริ่มต้น (ร้อยละโดยปริมาตร)	ร้อยละของไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้*
5	76.3 ^a
10	79.9 ^a
20	80.5 ^a
30	70.5 ^b
40	68.2 ^b

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางผนวก 9 ความเร็วรอบในการกวนผสมที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์

ความเร็วรอบในการกวนผสม (รอบต่อนาที)	ร้อยละของไขมันและน้ำมันที่ย่อยสลายได้*
0	8.4 ^c
100	22.6 ^c
150	54.2 ^b
200	79.1 ^a
250	17.5 ^d

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางผนวก 10 ปริมาณไขมันและน้ำมัน ค่าซีโอดี (FCOD) และร้อยละในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันกับซีโอดี (FCOD) ในน้ำเสียจากโรงงานปลาต้ม ซึ่งทำการบำบัดด้วยถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่างๆ

วันที่	ไขมันและน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)	ร้อยละของไขมันและ น้ำมันที่ย่อยสลายได้	ค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของซีโอดีที่ ย่อยสลายได้
0	81.25	0.0	4,275	0.0
1	65.37	19.6	4,008	6.3
2	61.62	24.2	3,340	21.9
3	57.36	29.4	3,239	24.2
4	55.95	31.1	3,206	25.0
5	24.65	69.7	3,006	29.7
6	14.53	82.1	3,006	29.7
7	12.09	85.1	2,605	39.1
8	10.70	86.8	1,960	54.2
9	9.55	88.3	1,781	58.3
10	9.17	88.7	1,603	62.5
11	4.65	94.3	1,425	66.7
12	2.81	96.5	1,425	66.7
13	2.58	96.8	1,247	70.8

ตารางผนวก 11 ลักษณะของแข็งแขวนลอย (SS) ของแข็งทั้งหมด (TS) และค่าพีเอชของน้ำเสียจากโรงงานปลาต้ม ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการบำบัดด้วยถังย่อยของระบบแยกและย่อยไขมันในวันต่างๆ

วันที่	ของแข็งแขวนลอย (กรัมต่อลิตร)	ของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	4.6	11.3	9.0
1	6.9	11.4	8.8
2	8.0	12.2	8.6
3	9.0	17.5	8.3
4	11.4	33.7	8.0
5	13.9	32.2	7.9
6	18.4	29.7	7.8
7	19.4	26.3	7.6
8	21.3	25.9	7.3
9	21.3	25.3	7.2
10	21.8	25.4	7.1
11	21.8	24.9	7.1
12	22.3	24.7	7.1
13	22.3	24.2	7.0



ภาคผนวก ง
ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นายสุวัฒน์ศักดิ์ ด้านศักดิ์ดา
เกิดเมื่อ	5 สิงหาคม 2524
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2542 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพะเยาพิทยาคม จังหวัดพะเยา พ.ศ. 2546 วท. บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
งานวิจัยเผยแพร่	การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 7 (ภาคบรรยายและโปสเตอร์) เรื่อง “ประสิทธิภาพของ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในการกำจัด ไขมันและน้ำมันในน้ำเสียของโรงงานปลาต้ม” ระหว่าง วันที่ 12 – 14 มีนาคม 2551 ณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพมหานคร