

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

The Efficiency of Bacteria in Degradation of Fat, Oil and Grease in Synthetic Wastewater

สุชนญา ทองเครือ* มาริสา อรรถพงษ์ และศิริลักษณ์ สันพา

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา

*Email: suchanya_9@yahoo.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้น้ำเสียจากร้านอาหารในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ ผลการวิจัยพบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียจากร้านอาหารตัดแยกได้ 5 ไอโซเลท คือ LWW1, LWW2, LWW3, LWW4 และ LWW5 ซึ่งมีค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสเฉลี่ยเท่ากับ 1.27 ± 0.07 , 1.31 ± 0.67 , 2.22 ± 0.00 , 1.28 ± 0.08 และ 1.25 ± 0.05 ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเฉลี่ยเท่ากับ 144.14 ± 4.50 , 105.11 ± 10.40 , 129.13 ± 5.20 , 135.14 ± 4.50 และ 157.66 ± 4.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำไอโซเลท LWW5 มาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันที่ความเข้มข้นเริ่มต้นอยู่ที่ความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 32 ชั่วโมง แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันเฉลี่ยร้อยละ 85.19 ± 0.27 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลและวิธีทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรีย LWW5 คือ *Bacillus pumilus*

คำสำคัญ: บาซิลลัส พูมิลัส แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ไลเปส น้ำมันและไขมัน

Abstract

The purpose of this research is to study the efficiency of bacteria isolated from the wastewater from restaurants in degradation of fat, oil and grease in synthetic wastewater. Bacteria from the wastewater from the restaurants were categorized into 5 isolates: LWW1, LWW2, LWW3, LWW4 and LWW5 with the average of Lipase index at 1.27 ± 0.07 , 1.31 ± 0.67 , 2.22 ± 0.00 , 1.28 ± 0.08 and 1.25 ± 0.05 , respectively, and the average of Lipase activity a 144.14 ± 4.50 , 105.11 ± 10.40 , 129.13 ± 5.20 , 135.14 ± 4.50 and 157.66 ± 4.60 unit/mL, respectively. Then, isolate LWW5 was used to study the efficiency of the degradation of fat, oil and grease in the synthetic wastewater. The optimum conditions for fat, oil and grease degradation at the initial concentration of fat, oil and grease are at 1,500 mg/L and are incubated at 30 °C for 32 hours. The average efficiency level of bacteria degradation of fat, oil and grease is $85.19 \pm 0.27\%$. The

LWW5 bacteria is identified by 16S rDNA gene sequencing and biochemical test and revealed the that the LWW5 bacteria are *Bacillus pumilus*.

Keywords: *Bacillus pumilus*, Lipolytic bacteria, Lipase enzyme, Fat, Oil and Grease

บทนำ

น้ำเสียชุมชนมีการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก และละลายน้ำได้น้อยคือ น้ำมันและไขมัน (Fat, Oil and Grease : FOG) ร้านอาหารเป็นแหล่งกำเนิดน้ำเสียหลักที่มีน้ำมันและไขมันสูง เนื่องจากมักไม่มีการติดตั้งบ่อดักไขมัน เมื่อน้ำมันและไขมันปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกจะก่อให้เกิดผลกระทบต่างๆ ได้แก่ น้ำมันและไขมันที่สะสมอยู่ในท่อน้ำเสียเป็นสาเหตุให้เกิดการอุดตัน และเคลือบที่ผิวหน้าน้ำทำให้เกิดความไม่นาดู เป็นอุปสรรคต่อการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำและกีดขวางการถ่ายเทของออกซิเจนลงสู่แหล่งน้ำทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำลดลง (ขวัญเนตร, 2554) และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในน้ำทั้งพืชและสัตว์เนื่องจากขาดออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ในการหายใจ (Mongkolthanaruka and Dharmsth, 2002) หากน้ำมันและไขมันปนเปื้อนในน้ำปริมาณมากจะส่งผลกระทบต่อระบบบำบัดน้ำเสียด้วย เนื่องจากน้ำมันและไขมันจะไปขัดขวางการไหลเวียนของน้ำเสีย (Matsumiya et al., 2007) อีกทั้งน้ำมันและไขมันจะไปขัดขวางการทำงานของแบคทีเรียในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศทำให้การบำบัดน้ำเสียทำได้ยากหรือทำให้ระบบบำบัดน้ำเสียขัดข้องได้ (กิจจา และปธานิน, 2555) น้ำเสียชุมชนมีปริมาณน้ำมันและไขมันเฉลี่ยเท่ากับ 14-38,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2551) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน เช่น *Staphylococcus warneri*, *Bacillus cereus* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น (Prasad and Manjunath, 2011) ซึ่งข้อดีของการนำจุลินทรีย์มาใช้งานเนื่องจากจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันนั้นเป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) ไปเป็นกลีเซอรอล (Glycerols) และกรดไขมันอิสระ (Free fatty acids) โดยกลีเซอรอลจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นโพวเวตและเข้าสู่วัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิกแอซิด (Tricarboxylic acid cycle : TCA) ส่วนกรดไขมันจะเข้าสู่วิถี Beta oxidation จนเป็น Acetyl CoA และเข้าสู่ TCA cycle ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และ น้ำ (H₂O) (สุรอรธ, 2545)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียร้านอาหารในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้บำบัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียในสถานการณ์จริงด้วยวิธีทางชีวภาพต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างสำหรับคัดแยกแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากท่อระบายน้ำเสียจากร้านอาหารหน้ามหาวิทยาลัยพะเยา 3 จุด โดยกลุ่มตัวอย่างได้จากการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (Simple Random Sampling) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชาที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บรักษาสภาพไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่งไปห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

การคัดแยกแบคทีเรียและการทำให้บริสุทธิ์

แยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Screening medium (แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 กรัม, แคลโคโตเปปโตน 5 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 1 กรัม, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 5 กรัม, ผงสกัดจากยีสต์ 1 กรัม, โบโรโมครีซอล เพอร์เฟิล (Bromocresol purple) 0.064 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มและเขย่าด้วยตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำมาทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-7} ในน้ำกลั่น และนำความเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-4} ถึง 10^{-7} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ไปแยกเชื้อให้เชื้อกระจาย (Spread plate technique) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Screening medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีการเปลี่ยนสีของ โบโรโมครีซอล เพอร์เฟิล (Bromocresol purple) ในอาหารแข็ง จากสีม่วงเป็นสีเหลือง จากนั้นนำโคโลนีที่มีการเปลี่ยนสีของอาหารมาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Streak plate technique) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Screening medium เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว และถ่ายแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง (Nutrient agar) (แคลโคโตเปปโตน 5 กรัม, สารสกัดจากเนื้อ 3 กรัม, ผงวุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูป (Loop)แตะโคโลนีที่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีและเกลี่ยเชื้อ (Smear) ลงบนสไลด์ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 1 หยด ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป และปล่อยให้แห้งแล้วทำการตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์เพื่อให้เชื้อไม่หลุดออกขณะย้อมสี แล้วนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้คือ ศึกษาการติดสีแกรม รูปร่างการจัดเรียงตัวของเซลล์ และการสร้างเอนโดสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียบริสุทธิ์ไว้ในอาหารเหลว (Nutrient broth) (แคลโคโตเปปโตน 5 กรัม, สารสกัดจากเนื้อ 3 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ที่มีกลีเซอรอล (Glycerol) ร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อ

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว (Nutrient broth) เพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย จากนั้นนำแบคทีเรียมาปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียให้เท่ากับ 1.5×10^8 CFU/mL โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.08-0.1 นำมาศึกษาความสามารถในการ

ผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการคูปริเวณใส ซึ่งทำโดยถ่ายแบคทีเรียจากอาหารเหลว (Nutrient broth) ปริมาตร 10 มิลลิตร หยดลงบนอาหารไทรบูทีริน อาการ์ (Tributylin agar) (ไทรบูทีริน 10.0 มิลลิตร, แบคโตเปปโตน 5.0 กรัม, สารสกัดจากยีสต์ 3.0 กรัม, ผงวุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิตร) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดขนาดบริเวณใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น และคำนวณดัชนีเอนไซม์ไลเปส (Lipase index) (สุรอรธ, 2545) ดังสมการ (1) จากนั้นนำแบคทีเรียทุกไอโซเลทไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity)

$$\text{ดัชนีเอนไซม์ไลเปส} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (มิลลิเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)}} \quad (1)$$

การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity)

การเตรียมเอนไซม์สกัดอย่างหยาบ (Crude enzyme)

นำแบคทีเรียที่สามารถสร้างบริเวณใสจากข้อ 3 ทุกไอโซเลท มาทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว (Nutrient broth) เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียให้เท่ากับ 1.5×10^8 CFU/mL โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสง 0.08 ถึง 0.1 จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Screening medium ปริมาตร 9 มิลลิตร แล้วนำไปบ่มและเขย่าด้วยตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 19,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใส (Supernatant) ที่ได้คือสารละลายเอนไซม์ไลเปส และนำส่วนใส (Supernatant) ที่ได้ไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity)

วิธีทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity)

เตรียมสารตั้งต้น ดังนี้ คือ โพสฟอรัสแอลกอฮอล์ร้อยละ 2 ปริมาตร 45 มิลลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 45 มิลลิตร และน้ำมันมะกอกปริมาตร 10 มิลลิตร ผสมสารตั้งต้นทั้งหมดให้เข้ากันในบีกเกอร์ และนำสารตั้งต้นเตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 2 มิลลิตร ผสมกับ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ ที่ pH 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิตร และสารละลายเอนไซม์ไลเปส (Supernatant) ปริมาตร 4 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันในขวดรูปชมพู่ (สำหรับการทดสอบ Blank เติมน้ำกลั่นแทนเอทานอลในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 4 มิลลิตร) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วเติมน้ำกลั่นแทนเอทานอลในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 20 มิลลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา และเติมฟีนอล์ฟทาลีน ปริมาณ 4-5 หยด แล้วจึงนำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 นอร์มัล จนสารละลายเป็นสีชมพูอ่อนจึงหยุดการไทเทรต ทั้งสารละลายไว้หากภายใน 30 วินาที สีชมพูไม่เปลี่ยนถือว่าเป็นจุดยุติ จากนั้นคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิตร ดังสมการ (2) (Horoni, 1996) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสแสดงให้เห็นถึงปริมาณ

เอนไซม์ไลเปสที่แบคทีเรียผลิตออกมาเนื่องจาก 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยสลายน้ำมันและไขมันให้ได้เป็นกรดไขมันในรูปของกรดโอเลอิก 1 ไมโครโมลใน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) สูงที่สุดมา 1 ไอโซเลท เพื่อการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ต่อไป

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = (M - Mo) / \text{ความชัน} \quad (2)$$

โมลของ NaOH ที่ถูกใช้ทำปฏิกิริยา = ปริมาณ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต X molar NaOH

โดยที่ M คือ โมลของ NaOH ที่ถูกใช้ทำปฏิกิริยา

Mo คือ โมลของ NaOH ที่ถูกใช้ทำปฏิกิริยา กับ blank

ความชัน คือ ความชันของกราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

นำแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) สูงที่สุด มาเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเหลว (Nutrient broth) แล้วนำไปบ่มและเขย่าด้วยตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียให้เท่ากับ 1.5×10^8 CFU/mL โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.08 ถึง 0.1 จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์จากส่วนผสมเหล่านี้คือ แบคโตเปปโตน 0.6 กรัม ผงสกัดจากเนื้อ 0.4 กรัม ผงสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัม ยูเรีย 0.1 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.1 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.03 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.014 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.014 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.01 กรัม และ Tween80 0.5 มิลลิลิตร (Matsumiya et al., 2007; จุฑากานต์, 2552) นำมาใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำมันปาล์มปริมาตร 0.28, 0.56, 1.11, 1.67 และ 2.2 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใส่ในขวดปรับปริมาตรแล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร น้ำเสียสังเคราะห์ที่ได้จะมีความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมัน เท่ากับ 250, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยศึกษาผลของปัจจัยต่างๆดังนี้ คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมัน (250, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร), อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง (20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง (8, 16, 24, 32 และ 40 ชั่วโมง) โดยมีชุดควบคุม (Control) คือ น้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย หลังจากทดลองเสร็จ นำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและไขมันคงเหลือด้วยวิธีการสกัดด้วยเฮกเซนแล้วแยกด้วยชอกซ์เลต (Rice et al., 2012) แล้วคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน ดังสมการ (3)

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลาย} = \frac{(\text{ปริมาณน้ำมันและไขมันก่อนทดลอง (มก./ล.)} - \text{ปริมาณน้ำมันและไขมันหลังทดลอง (มก./ล.)}) \times 100}{\text{ปริมาณน้ำมันและไขมันก่อนทดลอง (มก./ล.)}} \quad (3)$$

น้ำมันและไขมัน (%)

รวมทั้งคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) (สุรอรธ, 2545) ดังสมการ (4)

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = (B - A) \times 10^6 / \text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \quad (4)$$

โดยที่ A คือ น้ำหนักกระดาดและน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

B คือ น้ำหนักกระดาด (กรัม)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลดัชนีเอนไซม์ไลเปส และกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส สถิติที่ใช้คือ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ และปริมาณน้ำหนักแห้ง สถิติที่ใช้คือ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ F-test (one-way ANOVA) โดยทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ทำการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) สูงที่สุด ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิค 16S rDNA gene sequencing ไพร์เมอร์ที่ใช้ คือ 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3', บริเวณตำแหน่ง 9-27 บน 16S rDNA) และ 1500R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3', บริเวณตำแหน่ง 1509 – 1492 บน 16S rDNA) และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ในฐานข้อมูลของ GenBank และสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogeny) โดยใช้โปรแกรม Mega version 7.0 แสดงผลออกมาในรูปแบบแผนภูมิ Phylogenetic tree รวมทั้งการระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการทางชีวเคมี (Biochemical Test) โดยชุดทดสอบ API 20E

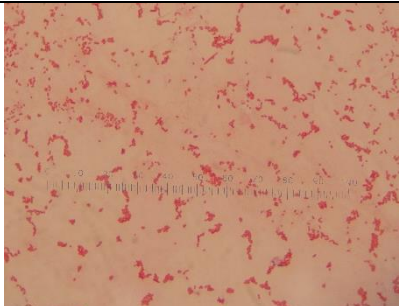
ผลการวิจัย

แบคทีเรียที่คัดแยกได้และลักษณะทางสัณฐานวิทยา

คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียร้านอาหารหน้ามหาวิทยาลัยพะเยาได้ 5 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสแบคทีเรีย คือ ไอโซเลท LWW1, LWW2, LWW3, LWW4 และ LWW5 พบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ คือ สีขาวขุ่น รูปร่างกลม (Circular) ผิวหน้าโคโลนีเรียบ (Smooth) ขอบเรียบ (Entire) สีขาวทึบไม่ให้แสงผ่าน (Opaque) โคโลนีและคล้ายเนยเหลว (Butyrous) แต่ลักษณะโคโลนีของ LWW1, LWW2, LWW3 และ LWW4 จะนูนจากอาหารเล็กน้อย (Convex) LWW5 โคโลนีจะแบนราบบนผิวอาหารเล็กน้อย (Flat) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของไอโซเลท LWW1, LWW2, LWW3, LWW4 เป็น

แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น (Rod) การจัดเรียงตัวกระจุกกระจาย (Scatter) ส่วนไอโซเลท LWW5 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น (Rod) การจัดเรียงตัวเป็นเส้นสาย (Chain) โดยรายละเอียดแสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียร้านอาหาร

รหัสแบคทีเรีย	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบสเตอริโอ	ลักษณะการติดสีแกรมของแบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
LWW1, LWW2, LWW3 และ LWW4		
LWW5		

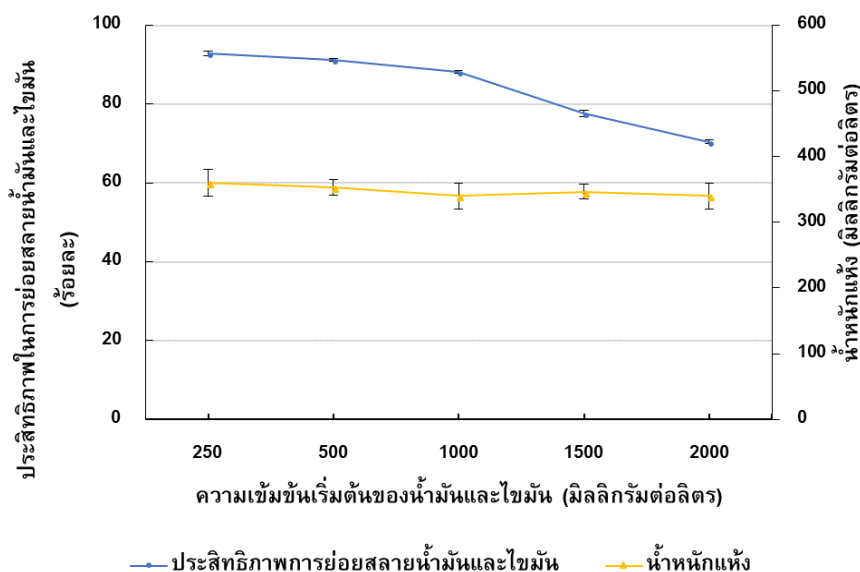
ดัชนีเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการดูบริเวณใส (Clear zone) บนอาหารไตรบูทีริน อาการ์ (Tributyrin agar) พบว่า ไอโซเลท LWW1, LWW2, LWW3, LWW4 และ LWW5 มีค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสเฉลี่ยเท่ากับ 1.27 ± 0.07 , 1.31 ± 0.67 , 2.22 ± 0.00 , 1.28 ± 0.08 และ 1.25 ± 0.05 ตามลำดับ แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจะพบว่าบนผิวหน้าอาหารไตรบูทีริน อาการ์ (Tributyrin agar) นั้นจะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี เนื่องจากแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาออกเซลล์เพื่อย่อยสลายไตรบูทีริน (Tributyrin) ซึ่งเป็นไตรกลีเซอไรด์ชนิดหนึ่งซึ่งเมื่อถูกย่อยแล้วจะได้กลีเซอรอลและกรดไขมัน (ทิพวรรณ, 2555) ซึ่งการวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียมีค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสใกล้เคียงกับการศึกษาของพักตร์พิมล (2552) ที่ได้ดัชนีเอนไซม์ไลเปสอยู่ระหว่าง 0.50-3.83 และพบว่าไอโซเลท LWW1, LWW2, LWW3, LWW4 และ LWW5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) เฉลี่ยเท่ากับ 144.14 ± 4.50 , 105.11 ± 10.40 , 129.13 ± 5.20 , 135.14 ± 4.50 และ 157.66 ± 4.60 ยูนิ ต ต่อ มิลลิ ลิตร ตามลำดับ ซึ่งไอโซเลท LWW5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด จึงนำไปใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันต่อไป

ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมัน

การทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมันเท่ากับ 250, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเวลา 24 ชั่วโมง ไอโซเลท LWW5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 92.93 ± 0.61 , 91.20 ± 0.40 , 88.16 ± 0.30 , 77.64 ± 0.86 และ 70.43 ± 0.46 ตามลำดับ และมีน้ำหนักร้างเฉลี่ยเท่ากับ 360 ± 20.00 , 353.33 ± 11.54 , 340 ± 20.00 , 346.67 ± 11.54 และ 340 ± 20.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพ 1) ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมันมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \text{ value} \leq 0.05$) โดยความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นเริ่มต้น 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ปริมาณน้ำหนักร้างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \text{ value} \leq 0.05$)

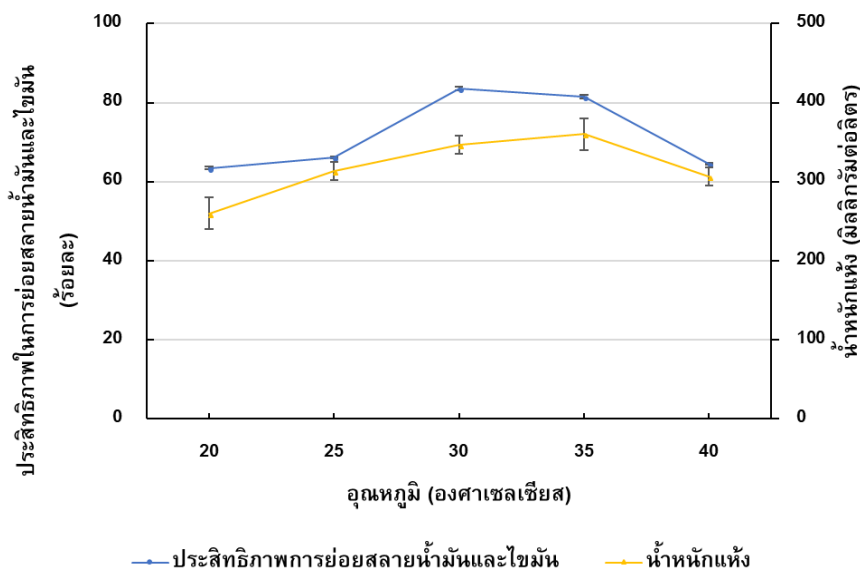


ภาพ 1 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นน้ำมันและไขมันต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของไอโซเลท LWW5

ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมันเท่ากับ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร (เพื่อให้ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจริงจากร้านอาหาร) และเวลา 24 ชั่วโมง ไอโซเลท LWW5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันเฉลี่ยร้อยละ 63.48 ± 0.28 , 66.13 ± 0.13 , 83.48 ± 0.43 , 81.48 ± 0.43 และ 64.46 ± 0.23 ตามลำดับ และมีน้ำหนักร้างเฉลี่ยเท่ากับ

260±20.00, 313.33±11.54, 346.67±11.54, 360±20.00 และ 306.67±11.54 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพ 2) อุนหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \text{ value} \leq 0.05$) โดยอุนหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุนหภูมิที่ 20, 25, 35 และ 40 องศาเซลเซียส

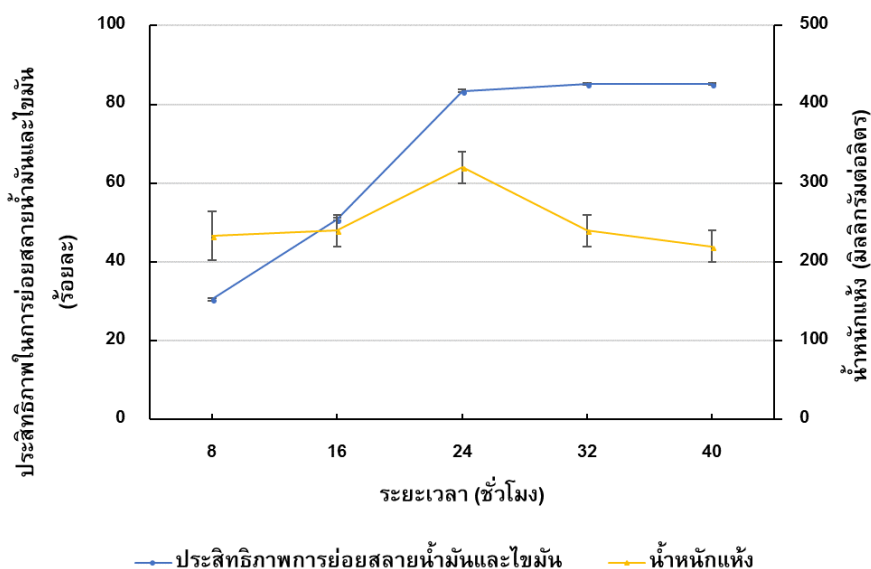


ภาพ 2 ผลของอุนหภูมิต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของไอโซเลท LWW5

ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองที่ระยะเวลา 8, 16, 24, 32 และ 40 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมันเท่ากับ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุนหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไอโซเลท LWW5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันเฉลี่ยร้อยละ 30.53±0.28, 50.86±0.37, 83.48±0.43, 85.19±0.27 และ 85.21±0.33 ตามลำดับ และมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยเท่ากับ 233.33±30.55, 240±20.00, 320±20.00, 240±20.00 และ 220±20.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพ 3)

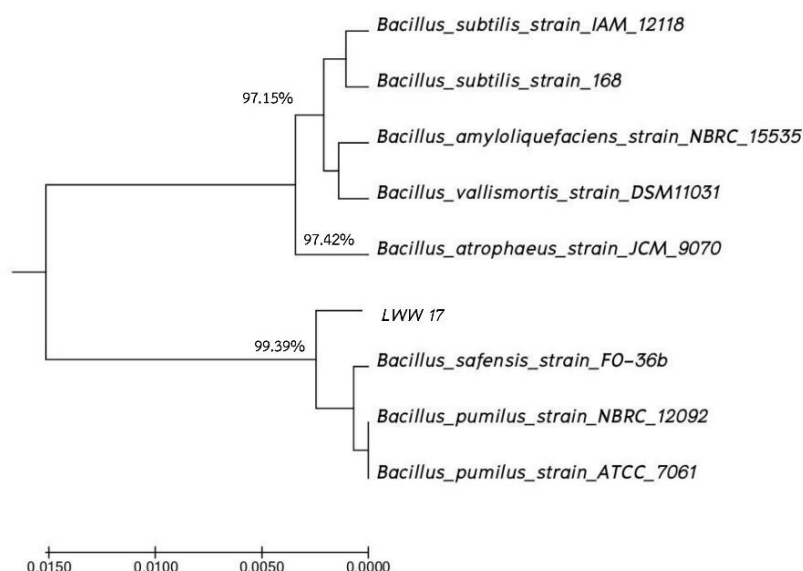
ไอโซเลท LWW5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันสูงที่ระยะเวลา 32 และ 40 ชั่วโมง แต่ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \text{ value} \leq 0.05$) หลัง 24 ชั่วโมง และพบว่าแบคทีเรียมีปริมาณน้ำหนักแห้งลดลง



ภาพ 3 ผลของระยะเวลาต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของไอโซเลท LWW5

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียไอโซเลท LWW5 โดยใช้เทคนิค 16S rDNA gene sequencing แสดงผลออกมาในรูปแบบแผนภูมิ Phylogenetic tree พบว่า ไอโซเลท LWW5 เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน Bacillaceae เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bacillus* sp. ในฐานข้อมูลของ Genbank และสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogeny) พบว่า ไอโซเลท LWW5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Bacillus safensis* และ *Bacillus pumilus* โดยมีดัชนีความเหมือนร้อยละ 99.39 แสดงดังภาพ 4 ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียไอโซเลท LWW5 ได้อย่างชัดเจน



ภาพ 4 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียไอโซเลท LWW5

ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียไอโซเลท LWW5 มาทำการระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวเคมี (Biochemical Test) โดยชุดทดสอบ API 20E พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท LWW5 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus pumilus* ร้อยละ 99.9 ซึ่งผลการทดสอบทางชีวเคมีแสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีการทางชีวเคมี (Biochemical test)

การทดสอบ	ผลการทดสอบ	<i>Bacillus pumilus</i> William, B. W. et al., 2009
การติดสีแกรม	+ve	+ve
D-ribose	+	+
D-glucose	+	+
D-mannitol	+	+
D-maltose	-	-
L-arabinose	+	+
D-sorbitol	-	-
Glycogene	-	-
L-arabitol	-	-
D-trehalose	+	+

หมายเหตุ: +ve = gram positive, - = ให้ผลเป็น negative, + = ให้ผลเป็น positive

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียร้านอาหารพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท LWW5 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด โดยมีค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสและค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) เฉลี่ยเท่ากับ 1.25 ± 0.05 และ 157.66 ± 4.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์เท่ากับ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ไอโซเลท LWW5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันสูงสุดเฉลี่ยร้อยละ 92.93 ± 0.61 เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมันเพิ่มขึ้น ไอโซเลท LWW5 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีปริมาณน้ำมันและไขมันมากเกินไปส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ลดลง เนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมันที่มีปริมาณมาก ทำให้น้ำมันเคลือบที่ผิวหน้า และกีดขวางการถ่ายเทออกซิเจนลงสู่แหล่งน้ำ ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้น้อยลง จึงทำให้เอนไซม์ไลเปสที่แบคทีเรียผลิตออกมาไม่สามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ได้หมด (Aysun, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Aboolfazl et al. (2014) และ สุวัฒน์ศักดิ์ (2551) ที่พบว่า *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter baumannii* และ *Bacillus cereus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันและไขมันเพิ่มมากขึ้น และส่วนใหญ่แบคทีเรียจะเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส (พัทธรพิมล, 2552)

เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมันให้ใกล้เคียงกับน้ำเสียจริงจากร้านอาหารที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส ไอโซเลท LWW5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันเฉลี่ยร้อยละ 83.48 ± 0.43 เนื่องจากอุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงมากเกินไปจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย และการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย ซึ่งถ้าหากอุณหภูมิไม่เหมาะสมแบคทีเรียก็จะเจริญเติบโตได้ไม่ดีและสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณน้อย อีกทั้งอุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงเกินไปยังส่งผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจะทำให้โครงสร้างเปลี่ยนแปลงไป และคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็จะลดลง ทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ลดลง (จุฑากานต์, 2552)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณน้ำหนักระหว่าง เมื่ออุณหภูมิมากกว่า 30 องศาเซลเซียส ไอโซเลท LWW5 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันแบคทีเรียลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท LWW5 โดยผลการทดลองของงานวิจัยนี้สอดคล้องกับ Aboolfazl et al. (2014) ที่พบว่า อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *Pseudomonas sp.* มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันร้อยละ 88 ± 2 และเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันและปริมาณน้ำหนักระหว่างลดลง และผลการวิจัยนี้พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 32 ชั่วโมง ไอโซเลท LWW5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันเฉลี่ยร้อยละ 85.19 ± 0.27 จากการทดลองเมื่อระยะเวลาในการทดลองมากขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำมันและไขมันเพิ่มขึ้นด้วย แต่แบคทีเรียมีปริมาณน้ำหนักระหว่างลดลง เนื่องจากแบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะเดธ เฟส

(Death phase) แต่มีปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตออกมาในปริมาณมากพอที่จะใช้ย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้มากขึ้นในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานของ สุรอรธ ศุภจัตุรัส (2545) ที่พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของแบคทีเรียไอโซเลท SSB-12 ที่คัดแยกได้จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันพืชจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และการระบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลและวิธีทางชีวเคมีพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท LWW5 คือ *Bacillus pumilus* จากผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจริงจากร้านอาหารต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ปี 2559 จนการทำวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. (2551). คู่มือแนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันจากบ่อดักไขมันและการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับร้านอาหาร. กรมควบคุมมลพิษ. 35 น.
- กิจจา จิตกริรมย์ และปธานิน แสงอรุณ. (2555). การตรวจหาแบคทีเรียย่อยไขมันจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม. วารสารสาธารณสุขศาสตร์, 42 (3), 3-18.
- ขวัญเนตร สมบัติสมภพ, อานาจ ปราการสมุทร และณัฐวิทย์ วิทาวโรจน์. (2554). การเปรียบเทียบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงอาหารของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. วารสารพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 21(1), 72-79.
- จุฑากานต์ บุญมี. (2552). การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน (ปริญญาานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ
- ทิพวรรณ ประพันธ์. (2555). การคัดแยกและจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus spp.* โดยเทคนิค PCR สำหรับประยุกต์ใช้ในการบำบัดกากไขมันจากการผลิตปลาต้ม (ปริญญาานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยพะเยา. พะเยา
- พัทตร์พิมล อึ้งเจริญวิวัฒน์. (2552). การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียโรงงานผลิตปลากระป๋องและการประยุกต์ใช้ (ปริญญาานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา
- สุรอรธ ศุภจัตุรัส. (2545). การศึกษาการใช้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้บำบัดไขมันในระบบบำบัดน้ำเสีย (ปริญญาานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- สุวัฒน์ศักดิ์ ด้านตักดา. (2551). การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในการทำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียของโรงงานปลาต้ม (ปริญญาานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่
- Aboualfazl, A., Bagher, M. and Gholamreza, M. (2014). Oily wastewaters treatment using *Pseudomonas* sp. isolated from the compost fertilizer. Journal of Environmental Health Science & Engineering, 12(77), 1-7.

- Aysun, A. (2009). Isolation and identification of a lipase producing psychrotrophic bacteria from soil: cloning and partial characterization of its lipase (M.Sc. Thesis). School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology. Turkey.
- Haroni, H.K., (1996). Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipasae. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 12(4): 399-401.
- Matsumiya, Y., Wakita, D., Kimura A., Sanpa, S. and Kubo, M. (2007). Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid containing wastewater treatment. Journal of Bioscience and Bioengineering, 103 (4), 325–330.
- Mongkolthanaruka, W. and Dharmsthiti, S. (2002). Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation, 50(2): 101-105.
- Prasad, M. P. and Manjunath, K. (2011). Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. Indian Journal of Biotechnology, 10(1): 121-124.
- Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D. and Clesceri, L.S. (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd Ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1496 p.