



การคัดแยกและประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของแบคทีเรีย
ที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงอาหาร

Isolation and Lipid Decomposition Efficiency of Bacteria Isolated from
Canteen Wastewater

พรพิมล มุขจันทร์¹ ปราภวนา อาษา¹ และ ภิรมย์ น้อยสำแดง^{1*}

¹คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12121

*E-mail: pirom.n@fph.tu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทิ้งโรงอาหารที่มีคุณสมบัติการย่อยสลายไขมันและน้ำมันรวมถึงศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในตัวอย่างน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ การทดสอบขั้นต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียบริสุทธิ์จำนวน 20 ไอโซเลต (WA1 – WA20) ที่ได้จากการสุ่มโคลน พบว่ามีจำนวน 9 ไอโซเลต (9/20, 45%) ที่ให้วงใสรอบบริเวณเชื้อ ได้แก่ ไอโซเลต WA4 WA5 WA8 WA9 WA11 WA13 WA14 W18 และ WA19 โดย ไอโซเลต WA5 ให้ขนาดวงใสของการย่อยสลายไขมันสูงสุดเท่ากับ 7.5 มิลลิเมตร พบเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนรียละ 44.44 (4/9 ไอโซเลต) แกรมบวกรูปร่างกลมรียละ 22.22 (2/9 ไอโซเลต) แกรมลบรูปร่างท่อนรียละ 33.33 (3/9 ไอโซเลต) การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์โดยวิธี Partition gravimetric พบว่าไอโซเลต WA5 มีประสิทธิภาพสามารถลดปริมาณไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบจากไขมันพืชและไขมันสัตว์ได้เฉลี่ยร้อยละ 20.44 และ 52.84 ตามลำดับ ในขณะที่ *Bacillus subtilis* มีประสิทธิภาพเพียง 7.20 และ 10.72 ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อไอโซเลต WA5 สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันมากกว่า *B. subtilis* ประมาณ 3-5 เท่า

คำสำคัญ: ไขมันและน้ำมัน แบคทีเรียย่อยสลายไขมัน น้ำทิ้งจากโรงอาหาร เอนไซม์ไลเปส

Received: July 09, 2017

Revised: October 13, 2017

Accepted: November 21, 2017

Abstract

The aims of this research were to isolate the lipid degrading bacteria from canteen wastewater and to study the lipid hydrolysis efficiency of selected bacteria in the synthetic lipid wastewater. Twenty purified bacterial isolates obtained by randomly colonial selection were primarily tested for lipase enzyme production by using Tributyrin agar medium. As a result, nine of twenty isolates (9/20 isolates, 45%) which were isolates WA4, WA5, WA8, WA9, WA11, WA13, WA14, WA18 and WA19 could generate the clear zone; while the isolate WA5 gave the highest clear zone of 7.5 millimeters, indicating all nine isolates were lipolytic bacteria. Four of nine isolates (4/9, 44.44%) were gram positive with rod-shape, two of nine (2/9, 22.22%) isolate were gram positive with cocci-shape and three of nine (3/9, 33.33%) isolates were gram negative with rod-shape bacteria. The isolate WA5 was selected for testing the lipid hydrolysis efficiency. The result found that it could decompose the synthetic lipid wastewater containing plant lipid and animal lipid by decreasing the lipid concentration in average of 20.44% and 52.84%, respectively. While, the *Bacillus subtilis* laboratory strain could reduce the lipid concentration in average of 7.20% and 10.72%, respectively. It was indicated that the isolate WA5 which was isolated from lipid contaminated environment had higher hydrolysis efficiency than *B. subtilis* by 3-5 times.

Keywords: Fat and oil, Lipid degrading bacteria, Canteen wastewater, Lipase enzyme

1. บทนำ

ไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนมากับน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ร้านอาหาร ที่พักอาศัย นับเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของแหล่งน้ำ การปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำผิวดินก่อให้เกิดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อม และยังทำลายทัศนียภาพ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อให้ระบบบำบัดน้ำเสียมีประสิทธิภาพต่ำลง โดยจะรบกวนการทำงานของระบบในขั้นตอนต่าง ๆ ไขมันและน้ำมันอาจสะสมในบริเวณระบบบำบัดน้ำเสียจนเป็นปัญหาในการปฏิบัติงานได้ [1, 2] จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการกำจัดไขมันและน้ำมันออกจากน้ำเสียก่อนจะปล่อยให้เข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียต่อไป

การกำจัดไขมันและน้ำมันออกจากน้ำเสีย มักใช้สารเคมีในการบำบัดหรือการสร้างบ่อตกชั้นไขมัน อย่างไรก็ตามพบว่าอาจทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีรวมถึงเพิ่มปัญหาในการกำจัด และการตกไขมันไปทิ้งอาจทำให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมตามมา ปัจจุบันนอกจากวิธีการดังกล่าวข้างต้นแล้ว การนำจุลินทรีย์เข้ามาช่วยในการเปลี่ยนสภาพของเสียในน้ำให้อยู่ในสภาพที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการบำบัดน้ำเสียคือแบคทีเรีย [3-5] ข้อดีของการใช้แบคทีเรียคือต้นทุนต่ำ สามารถทำได้ง่าย ประหยัดพลังงาน และมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

นับเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ มีหลายงานวิจัยได้ทำการคัดแยกและศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน โดยพบจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัตินี้ได้ทั้งในบ่อดักไขมันในระบบบำบัดน้ำเสีย ดินที่ปนเปื้อนไขมัน น้ำหมักชีวภาพ และตามธรรมชาติ เช่น ตะกอนดินป่าชายเลน น้ำจากคลองรวบรวมน้ำเสีย เป็นต้น [6-9] มีการคัดแยกแบคทีเรียได้หลากหลายสายพันธุ์ เช่น *Staphylococcus warneri*, *Burkholderia* sp. แบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* sp. เช่น *Acinetobacter baumannii*, *A. soli* แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. เช่น *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* spp. [6, 7, 10, 11-13] โดยแบคทีเรียดังกล่าวมีกลไกที่สำคัญคือสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสซึ่งสามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งทางด้านอุตสาหกรรมและการบำบัดของเสียทั้งแบบให้อากาศและในขบวนการไร้อากาศ [14, 15]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในท้องถิ่นที่มีอยู่ตามธรรมชาติจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนไขมันและน้ำมัน และศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและเป็นแนวทางในการนำมาใช้ประโยชน์ให้ระบบบำบัดน้ำเสียมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ซึ่งหากมีการใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากสภาพแวดล้อมจริงน่าจะมีประสิทธิภาพในการบำบัดได้สูงกว่าการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งอื่นมาใช้เพราะได้ผ่านการคัดเลือกจากธรรมชาติแล้ว [6] นอกจากนี้ยังสามารถช่วยลด

รายจ่ายเนื่องจากไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างในระบบบำบัดน้ำเสีย เพราะเป็นการกำจัดไขมันและน้ำมันโดยวิธีทางชีวภาพ

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำ

(1) เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อรวบรวมน้ำทิ้งโรงอาหาร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โดยนำตัวอย่างน้ำ 5 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria – Bertani medium (LB broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(2) ทำการเจือจาง bacterial culture แบบ 10-fold serial dilution ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth จนถึงระดับความเจือจาง 10^{-10} จากนั้นดูด bacterial suspension ที่ระดับความเจือจาง 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} 10^{-9} และ 10^{-10} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเกลี่ยเชื้อ (spread plate) ลงบนอาหาร LB agar ในจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง

(3) นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร LB agar ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ 1 มิลลิลิตร โดยเลือกคำนวณจากความเจือจางที่เหมาะสม (เพลทมีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30 – 300 โคโลนี) และรายงานผลเป็นจำนวน colony forming unit (cfu) ต่อ น้ำ 1 มิลลิลิตร โดยคำนวณจากสมการ

$$N = n / vd$$

โดย N = จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด n = ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้จากความเจือจางที่นำมาคำนวณ v = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ และ d = ความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาคำนวณ

(4) ทำการสุ่มโคโลนีแบบ random selection ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีต่าง ๆ จำนวน 20 โคโลนี มาทำการลาก (streak plate) ลงบนอาหาร LB agar ในจานเพาะเชื้อจนได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และเก็บเชื้อที่ได้บนอาหารวุ้นเอียง (Nutrient agar slant) ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

(1) นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ จีกลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tributyrin agar (ประกอบด้วย Peptone 5 กรัม Yeast extract 3 กรัม Tributyrin 100 มิลลิกรัม และ Agar 15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) [6, 7, 16] ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดกรองความสามารถของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายไขมันหรือความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(2) สังเกตวงใส (clear zone) ที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารรอบบริเวณที่จีดเชื้อ และทำการวัดขนาดของวงใส

(3) นำเชื้อที่สามารถทำให้เกิดวงใสรอบบริเวณที่จีดเชื้อมาย้อมสีแกรมด้วยเทคนิคการย้อมสีแกรม (gram's staining) พร้อมทั้งตรวจสอบการติดสี และรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ โดยวิธี Partition gravimetric

เลือกเชื้อแบคทีเรียที่ให้ขนาดวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar มากที่สุด สำหรับใช้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับเชื้อ *Bacillus subtilis* และชุดควบคุม

(ใส่ NB medium แทนแบคทีเรีย) ซึ่งในการศึกษาได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำมันพืช ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ทุก ๆ ตัวอย่าง

ส่วนที่ 2 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำมันหมู ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ทุก ๆ ตัวอย่าง

(1) การเตรียมน้ำเสียไขมันสังเคราะห์

การเตรียมน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ได้ดัดแปลงจากการทดลองของกิจจา จิตรกริมย์ และปธานิน แสงอรุณ (2555) [6] ดังนี้ ส่วนประกอบสำหรับการเตรียมน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำมันพืชปริมาณ 45 มิลลิกรัม ประกอบด้วย แป้งมัน 0.1 กรัม นมผง 0.1 กรัม น้ำตาล 0.1 กรัม และน้ำมันพืช 5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิกรัม สำหรับการเตรียมน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบจากน้ำมันหมู จะทำการเตรียมน้ำเสียไขมันสังเคราะห์เช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนองค์ประกอบจากน้ำมันพืชเป็นน้ำมันหมูแทน

(2) การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของแบคทีเรียโดยวิธี Partition gravimetric method [7, 17, 18]

ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลวนูเทรียนต์ (Nutrient broth : NB) ปริมาตร 100 มิลลิกรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิกรัม เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.5 ด้วยการวัดปริมาณความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

(OD₆₀₀) แล้วจึงนำเชื้อแบคทีเรียจากอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมนลงในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบจากน้ำมันพืชหรือน้ำมันหมู นำไปเขย่าต่อที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 168 ชั่วโมง (1 สัปดาห์) หลังจากนั้นนำชุดน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่เติมเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตรและชุดควบคุม (ใส่ NB แทน แบคทีเรีย) ไปหาปริมาณน้ำมันและไขมันโดยวิธี Partition gravimetric method โดยใช้ Hexane เป็นตัวทำละลายในการสกัดไขมันและน้ำมันออกจากตัวอย่าง เปรียบเทียบปริมาณไขมันและน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับชุดควบคุมเพื่อสรุปความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของแบคทีเรีย โดยสามารถหาปริมาณไขมันและน้ำมันจากการชั่งน้ำหนักและคำนวณได้จากสมการ [18]

$$\text{ไขมันและน้ำมัน (mg/L)} = \frac{(B-A) \times 10^6}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (ml)}}$$

เมื่อ A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเปล่า

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องรวมไขมันและน้ำมัน

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจาก ตัวอย่างน้ำ

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำทิ้งโรงอาหาร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ด้วยวิธี serial dilution และ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB agar พบว่าสามารถนับจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำทิ้งจากโรงอาหารที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 4.3×10^9 cfu ต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร และทำการคัดเลือกโคโลนีโดยการสุ่ม (random selection) จากลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจำนวน 4 ลักษณะที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 20 โคโลนี (5 โคโลนีต่อ 1 ลักษณะ) มาทำ

การลาก (streak plate) ลงบนอาหาร LB agar ในจานเพาะเชื้อจนได้โคโลนีเดี่ยวๆ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ โดยปกติตามธรรมชาติแล้วสามารถพบแบคทีเรียอยู่ปะปนกันหลายชนิดทั้งแบบที่เจริญได้จากการอาศัยและไม่อาศัยออกซิเจนในการสร้างพลังงาน จึงจำเป็นที่จะต้องแยกแบคทีเรียออกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ก่อนไปทดสอบขั้นต่อไป ซึ่งผลจากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท (WA1 – WA20)

3.2 ผลการทดสอบขั้นต้นเพื่อคัดเลือก

แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

จากผลการนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ จำนวน 20 ไอโซเลท (WA1 – WA20) ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน โดยการขีดเชื้อลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้สำหรับการคัดกรอง (screening) ความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายไขมัน และทำการวัดขนาดวงใส (clear zone) พบว่ามีจำนวน 9 ไอโซเลท (9/20 หรือ 45%) ที่ให้วงใสรอบบริเวณเชื้อ ได้แก่ ไอโซเลท WA4 WA5 WA8 WA9 WA11 WA13 WA14 W18 และ WA19 ดังแสดงตัวอย่างดังรูปที่ 1 โดยไอโซเลท WA5 ให้ขนาดวงใสของการย่อยสลายไขมันสูงสุดคือเท่ากับ 7.5 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1) การเกิดวงใสรอบบริเวณโคโลนีของเชื้อแสดงว่าแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยสลาย Tributyrin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ [7] และเมื่อนำแบคทีเรียไปศึกษาสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมเพื่อดูรูปร่าง และลักษณะการติดสีย้อม พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 6 ไอโซเลทและแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 3 ไอโซเลท มีรูปร่างท่อนจำนวน 7 ไอโซเลทและรูปร่างกลม จำนวน 2 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 1

ซึ่งการย้อมสีวิธีนี้มีมีความสำคัญและใช้กันแพร่หลาย เพื่อเป็นการศึกษารูปร่างลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ จึงทำให้สามารถแยกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) ผลที่ได้จากการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายไขมันได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำเสียในถังดักไขมัน น้ำหมักชีวภาพ น้ำเสียจากคลอง และตะกอนดินป่าชายเลนดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน เป็นต้น [6, 7] และพบว่าแบคทีเรียมีความสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน โดยพบชนิดของแบคทีเรียที่เป็นได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รูปร่างท่อนหรือ

รูปร่างกลมได้ เช่น *S. epidermidis*, *S. warneri*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* เป็นต้น [4-7, 10-12]



รูปที่ 1 ลักษณะวงใสรอบบริเวณเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการย่อยสลายไขมันใน Tributyrin agar โดยการวัดขนาดวงใสที่เกิดและผลการย้อมสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

รหัสเชื้อ	ขนาดของวงใส (มิลลิเมตร) ¹	การติดสี / รูปร่าง	รหัสเชื้อ	ขนาดของวงใส (มิลลิเมตร) ¹	การติดสี / รูปร่าง
WA1	-	ND	WA11	5.5	บวก / กลม
WA2	-	ND	WA12	-	ND
WA3	-	ND	WA13	5.5	ลบ / ท่อน
WA4	4.5	บวก / ท่อน	WA14	6	ลบ / ท่อน
WA5	7.5	บวก / ท่อน	WA15	-	ND
WA6	-	ND	WA16	-	ND
WA7	-	ND	WA17	-	ND
WA8	6.5	บวก / ท่อน	WA18	6	ลบ / ท่อน
WA9	5.5	บวก / กลม	WA19	6.5	บวก / ท่อน
WA10	-	ND	WA20	-	ND

หมายเหตุ ¹ขนาดของวงใส (มิลลิเมตร) = วัดจากกึ่งกลางโคโลนีถึงขอบของวงใส

- คือ ไม่มีการเจริญเติบโตหรือไม่เกิดวงใส (clear zone), ND (not determine) คือ ไม่ได้ศึกษา

3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์

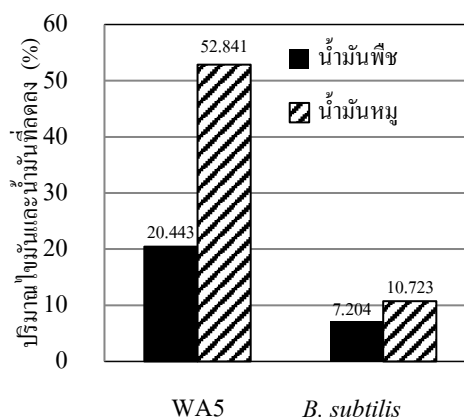
จากการนำไอโซเลท WA5 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ให้ขนาดวงใสของการย่อยสลายบนอาหาร Tributyrin agar สูงสุดมาเป็นตัวแทนในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ ทั้งนี้ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ และชุดควบคุมที่ไม่ได้มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย (ใส่ NB แทนแบคทีเรีย)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันระหว่างไอโซเลท WA5 และ *B. subtilis* ในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบจากน้ำมันพืช พบว่าเชื้อไอโซเลท WA5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดีโดยมีปริมาณไขมันและน้ำมันลดลงเฉลี่ยร้อยละ 20.44 ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าเชื้อ *B. subtilis* ที่สามารถลดปริมาณไขมันและน้ำมันได้เพียงร้อยละ 7.20

นอกจากนี้การทดสอบการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบจากน้ำมันหมู พบว่า เชื้อไอโซเลท WA5 สามารถลดปริมาณไขมันและน้ำมันได้มากกว่าเชื้อ *B. subtilis* เช่นเดียวกันกับในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบจากน้ำมันพืช โดยที่เชื้อไอโซเลท WA5 สามารถลดปริมาณไขมันและน้ำมันได้ร้อยละ 52.84 ในขณะที่เชื้อ *B. subtilis* สามารถลดปริมาณไขมันและน้ำมันได้เพียง ร้อยละ 10.72 นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อไอโซเลท WA5 และ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มี

องค์ประกอบจากน้ำมันหมูมากกว่าน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบจากน้ำมันพืช ดังรูปที่ 2

เมื่อดูความแตกต่างด้านองค์ประกอบแล้วพบว่าน้ำมันหมูมีองค์ประกอบเป็นกรดไขมันอิ่มตัวซึ่งเป็นกรดไขมันที่อยู่ในหมูไฮโดรคาร์บอนมีพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนเป็นพันธะเดี่ยว แตกต่างจากน้ำมันพืชที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งในหมูไฮโดรคาร์บอนมีพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนบางพันธะเป็นพันธะคู่และผลจากการที่มีพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนที่แตกต่างกันนี้อาจมีผลต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของแบคทีเรียในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ได้เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นและยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ เป็นต้น [13, 19, 20] นอกจากนี้การย่อยสลายไขมันและน้ำมันให้มีประสิทธิภาพนั้นยังขึ้นอยู่กับลักษณะการแตกตัวของไขมันและน้ำมันในน้ำเสียอีกด้วย [7]



รูปที่ 2 กราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาณไขมันและน้ำมันที่ลดลงจากการทดสอบการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ระหว่างเชื้อไอโซเลท WA5 กับเชื้อ *B. subtilis* โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแบคทีเรียเป็นชุดควบคุม

4. สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทิ้งโรงอาหารพบว่าในตัวอย่างน้ำมีจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ปริมาณ 4.3×10^9 cfu ต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร จากการสุ่มตามลักษณะโคโลนีสามารถแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์ได้ทั้งสิ้น 20 ไอโซเลท (WA1 – WA20) เมื่อทำการทดสอบขั้นต้นเพื่อดูความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar พบว่ามี 9 ไอโซเลท (9/20 หรือร้อยละ 45) ที่ให้วงใสรอบบริเวณเชื้อได้แก่ไอโซเลท WA4 WA5 WA8 WA9 WA11 WA13 WA14 W18 และ WA19 โดยมีไอโซเลท WA5 ให้ขนาดวงใสของการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 7.5 มิลลิเมตร แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 6 ไอโซเลทและแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 3 ไอโซเลทมีรูปร่างท่อนจำนวน 7 ไอโซเลทและรูปร่างกลมจำนวน 2 ไอโซเลท เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของแบคทีเรียไอโซเลท WA5 ในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบจากน้ำมันพืชและน้ำมันหมูเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. subtilis* และชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อแบคทีเรีย (ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ NB แทนแบคทีเรีย) พบว่าเชื้อไอโซเลท WA5 มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบจากน้ำมันพืชและน้ำมันหมูคือลดปริมาณไขมันและน้ำมันได้ร้อยละ 20.44 และ 52.84 ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเชื้อ *B. subtilis* ที่สามารถลดปริมาณไขมันและน้ำมันได้เพียงร้อยละ 7.20 และ 10.72 ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการขั้นต้นเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนที่จะนำไปปรับใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อน

ไขมันจริง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียในด้านต่าง ๆ ต่อไป เช่น การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตรวมถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน การสร้างเอนไซม์ไลเปสหรือสารชีวภาพอื่น ๆ การศึกษาจุลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปส จำแนกยีนที่ควบคุมหรือรับผิดชอบในกลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน [4, 5, 21] และสุดท้ายการพัฒนาเชื้อแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันซึ่งจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนด้านห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและด้านสิ่งแวดล้อมรวมทั้งเอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีในการดำเนินงานทดลอง ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] George N., Mustafa A.S., Amerjeet B. and Victor L. Anaerobic treatability of high oil and grease rendering. *Wastewater Hazardous Materials*. 2003. B(102): 243-255.
- [2] กรมควบคุมมลพิษ. คู่มือแนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันจากบ่อดักไขมันและการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับชุมชน. 2551. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก : http://infofile.pcd.go.th/water/manual_Commu09.pdf?CFID=1986315&CFTOKEN=51831307.

- [3] Wakelin N.G. and Forster C.F. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. *Bioresource Technology*. 1997. 59: 37-43.
- [4] Matsumiya Y., Wakita D., Kimura A., Sanpa S. and Kubo M. Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2007. 103:325-330.
- [5] Prasad M.P. and Manjunath K. Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacteria species. *Indian Journal of Biotechnology*. 2011. 10: 121-124.
- [6] กิจจา จิตรกริรมย์และ ปธานิน แสงอรุณ. การตรวจหาแบคทีเรียย่อยไขมันจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม. *วารสารสาธารณสุขศาสตร์*. 2555. 42(3): 3-18.
- [7] อลงกฎ แซมสีม่วง ศิริพรรณ สารินทร์ และ จริญญา สารินทร์. การศึกษาการใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน. *Journal of Community Development Research*. 2011. 4(2): 18-25.
- [8] Verma S. and Shama K.P. Isolation, identification and characterization of lipase producing microorganisms from environment. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2014. 7: 219-222.
- [9] Veerapagu M., Sankara N.A., Jeya K.R. and Alagendran S. Isolation and identification of a novel lipase producing bacteria from oil spilled soil. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. 2007. 3: 18122-18129.
- [10] ประชุมพร เล่าห์ประเสริฐ เจนจิรา แพงจันทร์ เจษฎา ชาญศิริรัตน ดันติกร พูนารม. การบำบัดไขมันในบ่อดักไขมันโรงอาหารโดยใช้กลุ่มแบคทีเรียคัดสายพันธุ์. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)*. 2558. 13: 41-49.
- [11] Phong N.T., Duyen N.T. and Diep C.N. Isolation and characterization of lipid-degrading bacteria in wastewater of food processing plants and restaurants in Can Tho city, Vietnam. *American Journal of Life Sciences*. 2014. 2: 382-388.
- [12] Vishwe V.S., Gajbhiye S.P., Vaidya S.P. and Chowdhary A.S. Isolation and characterization of lipolytic *Pseudomonas* spp. from oil contaminated water samples. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 2015. 1: 33-36.
- [13] Sugimori D., Nakamura M. and Mihara Y. Microbial degradation of lipid by *Acinetobacter* sp. Strain SOD-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2002. 66: 1579-1582.

- [14] อรุษา รุ่งเรือง และ ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันด้วยเซลล์แบคทีเรียตรึงรูปและไลเปสตรึงรูปต่าง ๆ. 2554. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก : http://www.conference.phuket.psu.ac.th/proceedings/PSU_OPEN_WEEK_2011/data/SCI/Sci011_paper.pdf.
- [15] จิราวรรณ มลาไวย์ สายน้ำผึ้ง ฉายาพัฒน์ และ ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. การคัดเลือกไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 2555. 14(2): 71-77.
- [16] Chappe, P., Mourey, A. and Kibertus, G. Variation of lipolytic activity in the genus *Acinetobacter* sp. *Journal of General & Applied Microbiology*. 1994. 4: 103-114.
- [17] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater” 20th Edition, Washington. D.C: APHA-AWWA-WEF. 1998.
- [18] มั่นสิน ตันทุลเวศม์. คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2540.
- [19] ลิพิดและกรดไขมัน. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก : <https://ag2.kku.ac.th/eLearning/137748/Doc%5CChapter%204%20Lipid%20and%20fatty%20acid.pdf>.
- [20] บทนำเรื่องไลเปส. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก : http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2391/12/223354_ch1.pdf.
- [21] Rocha D.C.D., Gomes B.M., Gomes S.D., Sene L. and Zenatti C. Selection of microorganisms producer of lipase for fat removal from biodiesel purification water. *Engenharia Agrícola*. 2013. 33: 332-340.