

การย่อยสลายทางชีวภาพของไขมันและน้ำมันในบ่อดักไขมันโดยแบคทีเรียตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟม



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIODEGRADATION OF FOG IN GREASE TRAP BY IMMOBILIZED BACTERIA ON  
POLYURETHANE FOAM

Miss Palisa Mahachai



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Science  
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายทางชีวภาพของไขมันและน้ำมันในบ่อดักไขมันโดยแบคทีเรียตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟม
โดย	นางสาวพลิศา มหาชัย
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเนตร ชุตินธรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุทัย ขวาลภาฤทธิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร. เฉลิมชัย เรืองชัยนิคม)

พลิศา มหาชัย : การย่อยสลายทางชีวภาพของไขมันและน้ำมันในบ่อดักไขมันโดยแบคทีเรีย  
 ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟม (BIODEGRADATION OF FOG IN GREASE TRAP BY  
 IMMOBILIZED BACTERIA ON POLYURETHANE FOAM) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:  
 รศ. ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย, 100 หน้า.

การปล่อยไขมันและน้ำมันลงแหล่งน้ำหรือท่อระบายน้ำ ทำให้เกิดความเสียหายต่อ  
 สภาพแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงสนใจนำวิธีทางชีวภาพมาใช้ร่วมกับบ่อดักไขมัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ  
 ของระบบและปรับปรุงคุณภาพของน้ำทิ้งให้ดีขึ้น โดยการทดลองประกอบด้วยการคัดเลือกแบคทีเรีย  
 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน การตรึงแบคทีเรียผสมบนพอลิยูรีเทนโฟม และการศึกษา  
 ประสิทธิภาพการย่อยไขมันของแบคทีเรียตรึงในขวดทดลองและถังดักไขมันแบบจำลอง ทั้งนี้คัด  
 กรองแบคทีเรียจากทั้งหมด 17 สายพันธุ์ โดยดูจากความสามารถการย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่ความ  
 เข้มข้น 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำเสียสังเคราะห์ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ  
*Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1, *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1 และ  
*Paenibacillus elgii* RO3 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์  
 เป็นแบคทีเรียไม่ก่อโรคและไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน เมื่อนำแบคทีเรียผสมทั้ง 3 สายพันธุ์มาตรึงบนพอลิ  
 ยูรีเทนโฟม โดยให้จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้นมีค่าประมาณ  $11.2 \log \text{CFU}$  ต่อกรัม พบว่าแบคทีเรียตรึง  
 สามารถย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่อัตรา 0.32 กรัมไขมันต่อกรัมแบคทีเรียต่อชั่วโมง  
 จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียโดยใช้น้ำเสียจริงจากร้านอาหารที่มีความเข้มข้นของ  
 ไขมัน 1200-3000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในบ่อดักไขมันจำลองมีปริมาตร 4 ลิตร และระยะเวลาในการกัก  
 เก็บ 12 ชั่วโมง พบว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียตรึงและอากาศ มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย  
 ไขมัน 61 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และสามารถลดค่าบีโอดี และซีโอดี ได้ 38 และ  
 39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เซลล์ตรึงเพื่อลดปริมาณน้ำมัน ค่าบี  
 โอดี และค่าซีโอดี ในน้ำทิ้งของบ่อดักไขมันได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 5687215020 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEYWORDS: POLYURETHANE FOAM / OIL BIODEGRADATION / IMMOBILIZED BACTERIA

PALISA MAHACHAI: BIODEGRADATION OF FOG IN GREASE TRAP BY IMMOBILIZED BACTERIA ON POLYURETHANE FOAM. ADVISOR: ASSOC. PROF. EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., 100 pp.

The disposing of fat, oil and grease into water resources and drains can cause environmental problems. This study focused on the application of biological treatment with grease trap to improve the quality of effluent as well as the efficiency of wastewater treatment system. The experiments included the selection of oil degrading bacteria, the immobilization of mixed bacterial strains on polyurethane foam, and the investigation of their oil biodegradation efficiency in shake flask and grease trap model. Seventeen isolated bacteria were screened from oil biodegrading activity in synthetic wastewater containing 1500 mg/L of palm oil. Three isolated bacteria including *Bacillus thuringiensis* SBO1, *Bacillus subtilis* URBO1 and *Paenibacillus elgii* RO3 showed the positive results with more than 80% in palm oil biodegradation. In addition, they are non-pathogenic bacteria and did not posed antagonistic effect. The bacteria were mixed and immobilized on polyurethane at approximately 11.2 log CFU/g of initial cells. The oil biodegradation rate of immobilized bacteria in oil containing wastewater was 0.32 g of oil/g of bacteria/hour. The oil removal efficiency was later carried out in a grease trap model containing real wastewater from a restaurant with 1200-3000 mg/L of oil. The total volume of model was 4 liters with a hydraulic retention time of 12 hours. The system was operated for 21 days, the oil removal was decreased to 61%, while BOD and COD were decreased to 38% and 39%, respectively. This study showed that the immobilized bacteria can be used to reduce the oil concentration, BOD and COD in the effluent from grease trap.

Field of Study: Environmental Science      Student's Signature .....

Academic Year: 2016      Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อรทัย ขวาลภาฤทธิ์ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคงและดร. เฉลิมชัย เรืองชัยนิคม เป็นอย่างสูงที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณนางสาวนันท์ธร เกียรราช และพี่น้องน้องๆ 1704/14 ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ คอยให้คำปรึกษา คำสอนและคำแนะนำต่างๆ ให้ผ่านพ้นมาด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆร่วมรุ่นทุกคนทั้งรหัส 56 และ 57 พี่ๆ และเจ้าหน้าที่สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมทุกคน สำหรับกำลังใจ การอยู่เคียงข้าง การรับฟังและช่วยเหลือ ให้ยิ้มของและอยู่จนตึกตื่น ตลอดจนคอยช่วยพุงกันจนถึงที่สุด ขอขอบคุณพี่น้อง CUPL ที่คอยเป็นเสียงหัวเราะ มาหาทุกครั้งทีรู้ว่าเครียด คอยเล่าเรื่องตลก คอยทำให้ไม่คิดมาก พวกกันทำเรื่องป่วน ขับรถไปเก็บน้ำเสียด้วย ขอขอบคุณหมอและพยาบาลคลินิกดาวเหลืองโรงพยาบาลรามาศิริสถานพยาบาลใกล้เคียงที่ทำให้ร่างกายกลับมาใช้งานได้โดยเร็ว สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณครอบครัว บิดามารดาและพี่สาว ที่ให้การสนับสนุนทั้งด้านจิตใจ การเงิน ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน คอยมารับมาส่ง รวมทั้งเป็นกำลังใจที่สำคัญแก่ผู้วิจัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป .....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
บทที่ 1      บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	3
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2      ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	5
2.1 ไขมันและน้ำมัน (Fat and Oil).....	5
2.2 การปนเปื้อนของไขมันและน้ำมัน .....	8
2.3 การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในน้ำ .....	9
2.3.1 วิธีการทางเคมี.....	9
2.3.2 วิธีการทางกายภาพ.....	10
2.3.3 วิธีทางชีวภาพ .....	10
2.5 แבקที่เรี่ยย่อยสลายไขมัน .....	11
2.5.1 กลไกการย่อยไขมันทางชีวภาพ.....	11
2.5.2 ชนิดของแบคทีเรีย .....	12

2.6 เซลล์ตรึง .....	16
2.7 บ่อดักไขมัน .....	17
2.8 มาตรฐานน้ำทิ้งจากอาคารบางประเภทและบางขนาด .....	20
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	21
2.9.1 การคัดแยกแบริที่เรี่ยย่อยสลายไขมันจากสิ่งแวดลอม .....	21
2.9.1.1 แบริที่เรี่ยเดี่ยว .....	21
2.9.1.2 แบริที่เรี่ยกลุม .....	22
2.9.2 การเลือกวัสดุในการตรึงเซลล์ .....	23
2.9.3 การนำเซลล์ตรึงไปใช้ .....	24
บทที่ 3     วิธีการดำเนินการวิจัย .....	26
3.1 อุปกรณ์ .....	26
3.2 เคมีภัณฑ์ .....	27
3.3 แผนผังของงานวิจัย .....	29
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย .....	30
3.4.1 การคัดกรองแบริที่เรี่ยย่อยสลายไขมันที่คัดแยกจากตัวอย่างน้ำทิ้งและดินบริเวณ บ่อดักไขมัน .....	30
3.4.1.1 ทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม .....	32
3.4.1.2 การจัดจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบริที่มีประสิทธิภาพในการ ย่อยไขมัน .....	32
3.4.2 การตรึงเซลล์ของแบริที่เรี่ยผสมในพอลิยูรีเทนโฟม (Polyurethane foam; PUF) .....	33
3.4.2.1 ทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของแบริที่เรี่ยที่คัดเลือก .....	33
3.4.2.2 ทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อในพอลิยูรีเทนโฟม (Polyurethane foam) .....	33
3.4.2.3 ทดสอบปริมาณเชื้อแบริที่เรี่ยในรูปแบบเซลล์ตรึงก่อนนำมาใช้จริง .....	34



3.4.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ทรงของแบคทีเรียผสม โดยศึกษา จลนพลศาสตร์การย่อยสลายน้ำมันพืชในน้ำเสียสังเคราะห์.....	34
3.4.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจริงในระบบบำบัดจำลองระดับ ห้องปฏิบัติการ.....	35
3.4.3.1 เก็บตัวอย่างน้ำเสียมาวิเคราะห์ค่าเบื้องต้น .....	35
3.4.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียผสมในรูปแบบ เซลล์ทรงระดับห้องปฏิบัติการ.....	36
3.4.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันโดยระบบบำบัดจำลองระดับ ห้องปฏิบัติการ .....	37
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	39
4.1 การคัดกรองแบคทีเรียย่อยสลายไขมันที่คัดแยกจากตัวอย่างน้ำทิ้งและดินบริเวณบ่อดัก ไขมัน .....	39
4.1.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดเลือก 17 ไอโซเลท.....	39
4.1.2 ผลการจัดจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อย ไขมัน .....	42
4.2 การตรึงเซลล์ของแบคทีเรียผสมในพอลิยูรีเทนโฟม (Polyurethane foam; PUF) .....	42
4.2.1 ผลการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ .....	42
4.2.2 ผลการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อในพอลิยูรีเทนโฟม .....	43
4.2.3 การเก็บรักษาและปริมาณเชื้อแบคทีเรียในรูปแบบเซลล์ตรึงก่อนนำมาใช้จริง .....	44
4.2.4 ผลการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันพืชที่ความเข้มข้นต่างๆในน้ำเสียสังเคราะห์ของ เซลล์ตรึงของแบคทีเรียผสม .....	46
4.2.5 ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียปนเปื้อนไขมันของ เซลล์ตรึงของแบคทีเรียผสม .....	50
4.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจริงในระบบบำบัดจำลองระดับ ห้องปฏิบัติการ.....	51

4.3.1 ผลการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย .....	51
4.3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ ตรึงระดับห้องปฏิบัติการ .....	53
4.3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันโดยระบบบำบัดขนาดจำลองระดับ ห้องปฏิบัติการ .....	54
บทที่ 5     สรุปผลการทดลอง .....	66
5.1 การคัดกรองแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน .....	66
5.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยไขมันของแบคทีเรียเดี่ยวและผสม หลังจากที่ตั้งบน Polyurethane foam (PUF) .....	67
5.3 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยไขมันของแบคทีเรียตรึงบน PUF ในถังตกไขมัน แบบจำลอง .....	68
5.4 ข้อเสนอแนะ .....	69
รายการอ้างอิง .....	70
ภาคผนวก ก     สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	81
ภาคผนวก ข     สูตรและวิธีการเตรียมสารละลาย .....	82
ภาคผนวก ค     กราฟมาตรฐาน .....	83
ภาคผนวก ง     ข้อมูลดิบ .....	85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	100

## สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	ปฏิกิริยาการเกิดไขมันและน้ำมัน.....	5
รูปที่ 2.2	โครงสร้างของไขมันและน้ำมัน .....	5
รูปที่ 2.3	โครงสร้างของกรดปาล์มติก .....	7
รูปที่ 2.4	กระบวนการย่อยสลายไขมันด้วยแบคทีเรีย.....	12
รูปที่ 2.5	แผนภูมิการทำงานทั่วไปของบอดักไขมัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2551).....	18
รูปที่ 2.6	ลักษณะของบอดักไขมัน .....	19
รูปที่ 3.1	เซลล์ตรึงในวันที่ 1 (ซ้ายมือ) และวันที่ 5 (ขวามือ).....	34
รูปที่ 3.2	(ก) ชุดควบคุม และ (ข) การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ความเข้มข้น .....	35
รูปที่ 3.3	ตัวอย่างบ่อน้ำเสียปนเปื้อนไขมันใน (ก) ร้านกาแฟอะเมซอน (ข) ร้านอาหาร Mc Donald (ค) ตัวอย่างน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในร้านกาแฟอะเมซอน และ (ง) ร้านอาหาร Mc Donaldของสถานบริการน้ำมันปตท. วิทยาตรีรังสิต .....	36
รูปที่ 3.4	(ก) ระบบถังดักไขมันแบบจำลอง ขนาด 4 ลิตร ต่อกับ Peristaltic pump โดยควบคุมค่า HRT 12 ชั่วโมง และ(ข) ระบบถังดักไขมันแบบจำลอง ขนาด 4 ลิตร.....	38
รูปที่ 3.5	ตะแกรงลวดอลูมิเนียมทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่บรรจุเซลล์ตรึงบนวัสดุตรึง .....	38
รูปที่ 4.1	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม (%).....	41
รูปที่ 4.2	เปอร์เซ็นต์แบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นใน 3 วัน.....	41
รูปที่ 4.3	จำนวนแบคทีเรีย(logCFUต่อกรัม) ของแบคทีเรียผสมจากพอลิยูรีเทนโฟมวันที่ 1 ถึง 5...44	
รูปที่ 4.4	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บนเซลล์ตรึงหลังจากเก็บเซลล์ตรึงที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0-15 วัน 30 วัน และ 60 วัน .....	45
รูปที่ 4.5	ลักษณะของพอลิยูรีเทนโฟมผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด .....	46
รูปที่ 4.6	จำนวนแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันความเข้มข้นต่างๆ .....	48
รูปที่ 4.7	ปริมาณน้ำมันปาล์มความเข้มข้นต่างๆที่ย่อยสลายโดยแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึงในน้ำเสียสังเคราะห์ (ก) น้ำมันปาล์ม 1.5 กรัมต่อลิตร (ข) น้ำมันปาล์ม 5 กรัมต่อลิตร (ค)	

น้ำมันปาล์ม 15 กรัมต่อลิตร (ง) น้ำมันปาล์ม 40 กรัมต่อลิตร (จ) น้ำมันปาล์ม 60 กรัมต่อลิตร และ (ฉ) น้ำมันปาล์ม 100 กรัมต่อลิตร.....	49
รูปที่ 4.8 อัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึง .....	50
รูปที่ 4.9 ปริมาณไขมันในแหล่งน้ำเสีย .....	52
รูปที่ 4.10 ปริมาณไขมันจากร้านอาหาร Mc Donald ในแต่ละสัปดาห์.....	53
รูปที่ 4.11 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในระบบของชุดการทดลองใช้วัสดุตรึงที่มีการเติมอากาศ.....	56
รูปที่ 4.12 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในระบบของชุดควบคุม (ก) ความเข้มข้นไขมันของน้ำเสียขา เข้าและขาออก (ข) ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน (%).....	57
รูปที่ 4.13 ค่า pH ของน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันขาเข้าและขาออก (ก) ชุดการทดลองใช้วัสดุตรึง ที่มีการเติมอากาศ และ(ข) ชุดควบคุม .....	58
รูปที่ 4.14 ค่าซีโอดีของน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันขาเข้าและขาออก (ก) ชุดการทดลองใช้วัสดุตรึง ที่มีการเติมอากาศ และ(ข) ชุดควบคุม .....	58
รูปที่ 4.15 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงที่ เติมอากาศเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน (ก) ความเข้มข้นไขมันของน้ำเสียขาเข้าและขาออก (ข) ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน (%).....	60
รูปที่ 4.16 ลักษณะการสะสมของชั้นไขมันบริเวณผิวน้ำเมื่อระยะเวลาผ่านไป 13 วัน .....	61
รูปที่ 4.17 ค่า pH ของน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันขาเข้าและขาออกของชุดทดลองที่มีการเติม แบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงที่เติมอากาศเป็นเวลา 21 วัน.....	62
รูปที่ 4.18 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงที่ เติมอากาศเป็นเวลา 21 วัน (ก) ความเข้มข้นไขมันของน้ำเสียขาเข้าและขาออก (ข) ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน (%).....	63
รูปที่ 4.19 ปริมาณซีโอดีที่เหลืออยู่ในการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงที่ เติมอากาศเป็นเวลา 21 วัน.....	64
รูปที่ 4.20 ค่าบีโอดี ของน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันขาเข้าและขาออกของชุดทดลองที่มีการเติม แบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงที่เติมอากาศเป็นเวลา 21 วัน.....	64
รูปที่ 4.21 ปริมาณแบคทีเรียในพอลิยูรีเทนโฟมในวันที่ 0-21.....	65

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	องค์ประกอบไขมันชนิดต่างๆ.....	6
ตารางที่ 2.2	สถิติการนำเข้าและส่งออกถั่วเหลืองของประเทศไทยปี พ.ศ. 2553-2557.....	7
ตารางที่ 2.3	สถิติการนำเข้าและส่งออกน้ำมันปาล์มของประเทศไทยปี พ.ศ. 2553-2557.....	8
ตารางที่ 2.4	ค่าความเข้มข้นขององค์ประกอบน้ำมันและไขมันน้ำเสียในประเทศไทย .....	9
ตารางที่ 2.5	ตัวอย่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน .....	14
ตารางที่ 2.6	ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งในประเทศไทย .....	20
ตารางที่ 3.1	แบคทีเรียย่อยสลายไขมันที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
ตารางที่ 4.1	ความชุ่มชื้นของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน.....	40
ตารางที่ 4.2	การจัดจำแนกอนุกรมวิธานของแบคทีเรียโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA.....	42
ตารางที่ 4.3	การเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบแข็ง.....	43
ตารางที่ 4.4	การย่อยไขมันจากน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของแบคทีเรียผสมบนพอลิยูรีเทนโฟม โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้วัสดุจริงซึ่งเก็บที่ระยะเวลาต่างๆ.....	45
ตารางที่ 4.5	ค่า pH และ ค่าซีโอดีจากแหล่งตัวอย่างน้ำเสีย .....	51
ตารางที่ 4.6	ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันที่ระยะเวลา 5 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมน้ำเสียจากร้านอาหาร Mc Donaldsที่ไม่มีเซลล์จริงโดยปริมาณไขมันในน้ำเสียเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร .....	54
ตารางที่ 4.7	ค่าบีโอดีในระบบที่ระยะเวลา 7 วัน เปรียบเทียบชุดการทดลองใช้วัสดุจริงที่มีการเติมอากาศกับชุดควบคุม.....	59
ตารางที่ 4.8	จำนวนแบคทีเรียในเซลล์จริงในชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์จริงที่เติมอากาศเมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน.....	59
ตารางที่ 4.9	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันโดยแบคทีเรียผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ SBO1, <i>Bacillus subtilis</i> สาย	

พันธุ์ <i>URBO1</i> และ <i>Paenibacillus elgii</i> สายพันธุ์ <i>RO3</i> บนพอลิยูรีเทนโฟม ที่ ระยะเวลา 7 วัน ในแต่ละชุดการทดลอง.....	61
ตารางที่ 5.1 การเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียที่เกาะติดบนเซลล์ตรึงชนิดต่างๆ.....	67



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การนำน้ำมันพืชมาใช้ทำอาหารทั้งในครัวเรือนและสถานประกอบการร้านอาหารอย่างกว้างขวาง ทำให้มีการปนเปื้อนของน้ำมันลงในแหล่งน้ำ น้ำเสียส่วนใหญ่ที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ร้านอาหาร และแหล่งชุมชน มีส่วนประกอบของน้ำมันและไขมันจำนวนมาก (กรมควบคุมมลพิษ, 2546) น้ำมันและไขมันที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสีย หากถูกระบายลงสู่ธรรมชาติโดยไม่ได้ผ่านการบำบัด จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำ เนื่องจากชั้นไขมันจะลอยปิดผิวหน้าของระดับพื้นผิวน้ำ ทำให้ออกซิเจนจากอากาศ ไม่สามารถละลายถ่ายเทลงสู่ชั้นผิวน้ำด้านล่างได้ (พรพรพรรณ คีรีนาถ, 2556) ทำให้ค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำมีระดับลดลง ก่อให้เกิดความเสื่อมโทรมลงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยรอบขยายเป็นบริเวณกว้าง (กรมควบคุมมลพิษ, 2551)

บ่อดักไขมันเป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียมาตรฐานสำหรับจัดการน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2551) บ่อดักไขมันเป็นอุปกรณ์สำหรับแยกไขมันไม่ให้ไหลปนไปกับน้ำทิ้งเพื่อช่วยรักษาสภาพน้ำในขั้นต้น ก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะหรือท่อระบายน้ำทิ้ง (พรพรพรรณ คีรีนาถ, 2556) น้ำทิ้งจากบ่อดักไขมันยังคงมีไขมันหลงเหลือปนอยู่กับน้ำเสีย ดังนั้นเพื่อลดปัญหาและเพิ่มประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียที่มีอยู่ การประยุกต์ใช้ระบบบำบัดทางชีวภาพร่วมด้วยจึงมีความจำเป็น เพื่อปรับปรุงคุณภาพของน้ำทิ้งให้ดีขึ้น และสามารถบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันได้อย่างสมบูรณ์ (สุบัญญัติ นิर्मรัตน์, 2548)

การบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) เป็นวิธีการใช้สิ่งมีชีวิตช่วยบำบัดในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งหมายถึง การนำแบคทีเรียมาใช้กำจัดหรือลดสารอินทรีย์ต่างๆในน้ำเสียลงให้ได้มากที่สุด (สุบัญญัติ นิर्मรัตน์, 2548) เนื่องจากแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมานอกเซลล์เพื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของไขมัน ไปเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล (วีระ ปิยธีรวงศ์, 2555) จึงนำไปสู่การย่อยสลายไขมันอย่างสมบูรณ์ การคัดแยกแบคทีเรียเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและนำไปใช้ต่อ นั้น โดยส่วนมากมักคัดแยกแบคทีเรียในบริเวณที่ปนเปื้อนเพื่อให้ได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่ดี หากแบคทีเรียที่คัดแยกมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพและมีความไม่ชอบน้ำของเซลล์สูงจะช่วยเพิ่มโอกาสในการย่อยสลายไขมัน สถานที่การผลิต หรือใช้ไขมันหรือน้ำมัน เช่น โรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้ไขมันเป็นส่วนประกอบร้านอาหาร และครัวเรือน มีแนวโน้มที่จะพบแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโต ย่อยสลายไขมัน และ

ผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้มากกว่าบริเวณอื่นๆ (Cammarota และ Freire, 2006) ดังตัวอย่างรายงานวิจัยของกิจจา จิตรภิมย์และปราณิน แสงอรุณ (2555) ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติ ได้แก่ น้ำเสียจากถังดักไขมัน (4 ตัวอย่าง) น้ำหมักชีวภาพ (2 ตัวอย่าง) น้ำจากคลองรวบรวมน้ำเสีย (2 ตัวอย่าง) และตะกอนดินป่าชายเลน (3 ตัวอย่าง) แล้วทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันโดยใช้ น้ำมันปาล์ม พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากถังดักไขมัน ไอโซเลท T3/2 สามารถย่อยน้ำเสียไขมันในสังเคราะห์ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งอื่น คือ สามารถย่อยไขมันได้ร้อยละ 52.0 อัตราการย่อยไขมัน 0.025 มิลลิลิตรต่อวัน ในช่วงเวลาทดสอบ 21 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

การตรึงเซลล์ (immobilization) หมายถึง การเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุ ซึ่งเกิดโดยสมบัติเฉพาะของเซลล์และการทำให้เซลล์ตรึงอยู่บนวัสดุ (Cohen, 2001) การตรึงเซลล์ช่วยปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษของสารพิษมากขึ้นกว่าการใช้เซลล์อิสระ (Karel และ Robertson, 1989) ดังเช่น งานวิจัยของ Gentili และคณะ (2006) ได้ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Rhodococcus corynebacterioides* ชนิดเซลล์อิสระเทียบกับเซลล์ตรึงที่ตรึงลงบนผงไคตินและผงไคโตซาน พบว่าหลังจากผ่านไป 15 วัน เซลล์ตรึงทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการลดปริมาณน้ำมันดิบได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

นอกจากนี้ การศึกษาของ Terng-Jou Wan และคณะ (2013) ได้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil) ของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* แยกทดสอบโดยใช้เซลล์แขวนลอยอิสระ เซลล์ตรึงบนเซรามิกที่มีรูพรุน (Porous ceramic) และเซลล์ตรึงบนโฟมพอลิยูรีเทน (polyurethane foam; PUF) พบว่าเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงอยู่บน PUF มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันสูงสุด โดยมีอัตราการย่อยสลายสูงกว่าเซลล์แขวนลอย และเซลล์ตรึงบนเซรามิกที่มีรูพรุน 43% และ 29% ตามลำดับ และมีเวลาการย่อยสลายของน้ำมัน (kinetic parameter, half-life;  $t_{1/2}$ ) น้อยที่สุด และจากงานวิจัยของ Oh และคณะ (2000) พบว่าพอลิยูรีเทนโฟม สามารถลอยตัวได้ดี ดูดซับน้ำมันได้มาก มีรูพรุนค่อนข้างสูงทำให้มีพื้นที่ผิวในการเกาะติดของจุลินทรีย์ได้มาก และยังมีมีความยืดหยุ่นและเสถียร งานวิจัยนี้จึงสนใจนำพอลิยูรีเทนโฟมมาใช้เป็นวัสดุตรึงแบคทีเรียทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสมเพื่อบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน ซึ่งในงานวิจัยก่อนนี้ส่วนใหญ่ใช้แบคทีเรียเดี่ยว แล้วนำแบคทีเรียตรึงมาใช้ในบ่อดักไขมัน เพื่อให้การบำบัดน้ำเสียมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพการย่อยไขมันของแบคทีเรียในรูปแบบเซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟม โดยจะคัดกรองแบคทีเรียที่คัดแยกจากบริเวณที่ปนเปื้อนไขมัน แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการย่อยไขมันดีมาทดสอบการย่อยสลายไขมันในรูปแบบเซลล์ตรึง โดยเปรียบเทียบทั้งแบคทีเรียแบบเดี่ยวและแบคทีเรียผสมหลายไอโซเลท หลังจากนั้นนำแบคทีเรียตรึงที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดมาทดสอบในถังดักไขมันแบบจำลอง เพื่อทดสอบวิธีการใช้งานของแบคทีเรียตรึงสำหรับลดภาระของระบบบำบัดน้ำเสียต่อไป



## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อคัดกรองแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน
- 1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยไขมันของแบคทีเรียผสม หลังจากที่ตั้งรกรากบน Polyurethane foam (PUF)
- 1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยไขมันของแบคทีเรียตรึงบน PUF ในถังดักไขมันแบบจำลอง

## 1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

- 1.3.1 แบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อดักไขมันและบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์ที่มีการปนเปื้อนของไขมัน จะสามารถย่อยสลายน้ำมันพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- 1.3.2 แบคทีเรียผสมจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าแบคทีเรียเดี่ยวในการย่อยสลายไขมัน เนื่องจากแบคทีเรียผสมจะใช้น้ำมันได้หลากหลายชนิดกว่าแบคทีเรียเดี่ยวและทำงานได้ในช่วงความเข้มข้นของน้ำมันที่กว้างกว่าแบคทีเรียเดี่ยว
- 1.3.3 แบคทีเรียที่ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟมเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดไขมันของถังดักไขมันได้ เนื่องจากพอลิยูรีเทนโฟมสามารถเก็บรักษาเซลล์และยังคงความสามารถของเซลล์ไว้ มีพื้นที่ผิวในการเกาะติดของจุลินทรีย์ได้มาก

## 1.4 ขอบเขตการวิจัย

- 1.4.1 นำตัวอย่างแบคทีเรีย 18 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากบ่อดักไขมันและบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์ที่มีการปนเปื้อนของไขมัน มาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันเบื้องต้น เพื่อคัดกรองแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ
- 1.4.2 จัดจำแนกชนิดแบคทีเรียที่คัดกรองจากข้อ 1.4.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่นำมาใช้ทำแบคทีเรียผสม
- 1.4.3 ตรึงเซลล์แบคทีเรียในพอลิยูรีเทนโฟม ขนาด 2x1x1 เซนติเมตร เพื่อหาระยะเวลาการตรึงเซลล์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้
- 1.4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของเซลล์ตรึงบน PUF โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยการทำจลนพลศาสตร์การย่อยสลายน้ำมันพืชในน้ำเสียสังเคราะห์
- 1.4.5 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยไขมันของเซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟมในถังดักไขมันแบบจำลองขนาด 4 ลิตร โดยมีชุดควบคุม คือ ถังดักไขมันที่ไม่มีเซลล์ตรึง ระยะเวลาเก็บ 12 ชั่วโมง

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้หัวเชื้อแบคทีเรียในรูปแบบเซลล์ตรึงที่มีความสามารถในการกำจัดไขมันในน้ำเสีย ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ในถังดักไขมันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันได้

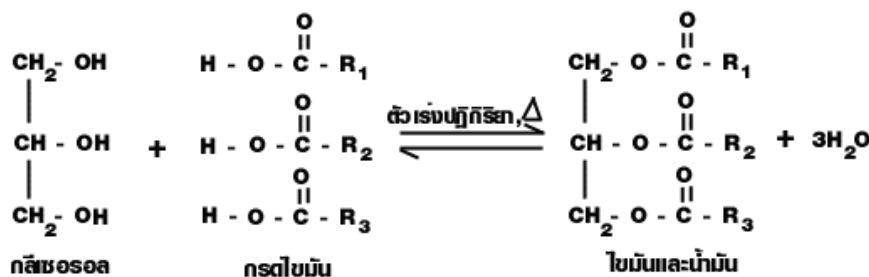


## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

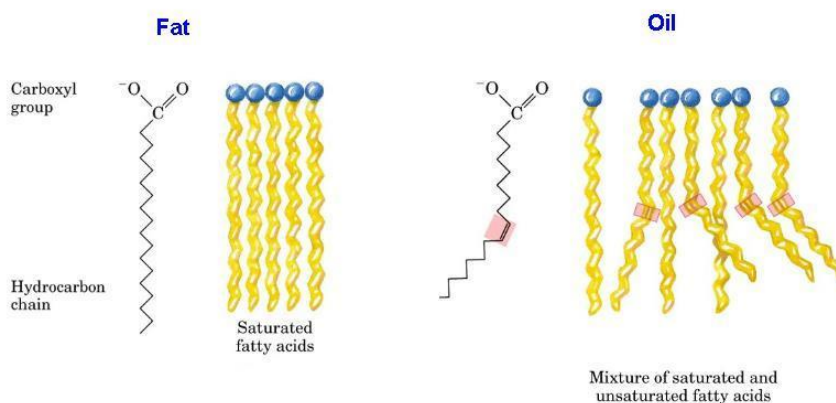
#### 2.1 ไขมันและน้ำมัน (Fat and Oil)

ไขมัน คือ กลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำเป็นลิพิด (lipid) ประเภทไตรกลีเซอไรด์ เกิดจากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) ระหว่าง ไตรไฮ-ดริกแอลกอฮอล์ (เอสเทอร์ที่เกิดจากกลีเซอรอล) กับกรดไขมัน (รูปที่ 2.1) ไขมันที่เป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง มักเป็นเอสเทอร์ (ester) ของกลีเซอรอลกับกรดอินทรีย์ชนิดอิ่มตัวที่มีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 10 อะตอมขึ้นไป เช่น กรดปาล์มิติก (palmitic) และกรดสเตียริก (stearic) ไขมันที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องหรือน้ำมัน (oil) เช่น น้ำมันหมู น้ำมันมะพร้าว จะเป็นเอสเทอร์ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมน้อยกว่า 10 อะตอม หรือเป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว เช่น กรดโอเลอิก (oleic) และกรดลิโนเลอิก (linoleic) เป็นส่วนมาก (รูปที่ 2.2) (ประดิษฐ์ มีสุข, 2548; Jaeger และ Reetz, 1998)



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาการเกิดไขมันและน้ำมัน

(<http://www.rmutphysics.com>, 15 มิถุนายน 2558)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของไขมันและน้ำมัน

(<http://www.foodnetworksolution.com>, 15 มิถุนายน 2558)

กรดไขมันประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) โดยการเรียงตัวของสายคาร์บอนจะต่อกันเป็นสายยาว (C10-C24) ปลายด้านหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) และปลายอีกด้านเป็นหมู่เมทิล (-CH<sub>3</sub>) โดยมีชื่อของกรดไขมันชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบไขมันชนิดต่างๆ

Common name	Carbon atoms	Double bonds	Scientific name	Source
Butyric acid	4	0	Butanoic acid	Butter fat
Caproic acid	6	0	Hexanoic acid	Butter fat
Palmitic acid	16	0	Hexadecanoic acid	Palm oil
Palmitoleic acid	16	1	9- Hexadecanoic acid	Animals fat
Stearic acid	18	0	Octadecanoic acid	Animals fat
Oleic acid	18	1	9- Octadecanoic acid	Olive oil
Vaccenic acid	18	1	11- Octadecanoic acid	Butter fat

ที่มา: Ramwong (2007)

น้ำมันที่ใช้ประกอบอาหารทั่วไปมี 2 ชนิดหลักๆ คือ น้ำมันพืชและน้ำมันสัตว์ เนื่องจากน้ำมันสัตว์ได้รับความนิยมลดลงและน้ำมันพืชสะดวกต่อการเลือกซื้อใช้งาน จึงมีการหันมาใช้น้ำมันพืชกันอย่างกว้างขวาง ในประเทศไทยมีพืชที่สามารถนำมาผลิตน้ำมันเพื่อใช้บริโภคและใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆหลายชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง ปาล์มน้ำมัน มะพร้าว ไร่ข้าว เมล็ดทานตะวัน เป็นต้น (กรมการค้าภายใน, 2556)

ในประเทศไทย น้ำมันพืชที่ครองตลาดสูงสุด คือ น้ำมันปาล์ม และน้ำมันถั่วเหลือง (กรมการค้าภายใน, 2556 ) เนื่องจากการใช้ในครัวเรือนหรือสถานประกอบการร้านอาหาร

น้ำมันถั่วเหลือง เป็นน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดถั่วเหลือง เป็นน้ำมันพืชที่มีกรดลิโนเลอิก (linoleic) สูง จึงเป็นวัตถุดิบในการผลิตเนยเทียม มาร์การีน เนยขาว มายองเนสและผสมกับน้ำมันสลัดอื่นๆ จะเกิดการออกซิเดชันง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศและความร้อนสูง เป็นไตรกลีเซอไรด์



ตารางที่ 2.3 สถิติการนำเข้าและส่งออกน้ำมันปาล์มของประเทศไทยปี พ.ศ. 2553-2557

ปี พ.ศ.	นำเข้า		ส่งออก	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2553	48,012	1,867	226,111	6,717
2554	132,847	6,239	487,942	16,272
2555	157,722	5,849	411,900	13,957
2556	109,772	3,235	725,217	17,646
2557	127,025	4,810	355,323	11,298

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2558)

## 2.2 การปนเปื้อนของไขมันและน้ำมัน

เนื่องจากไขมันและน้ำมันพบได้ทั้งในพืชและสัตว์และมีการนำน้ำมันมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆทั้งในครัวเรือน สถานประกอบการร้านอาหารอย่างกว้างขวาง จึงมีการปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำ น้ำเสียส่วนใหญ่ที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ร้านอาหาร และแหล่งชุมชนมีส่วนประกอบของน้ำมันและไขมันจำนวนมาก จากสมบัติทั่วไปของน้ำมัน ไขมันและไข (Fat Oil and Grease; FOG) คือ ละลายน้ำได้ไม่ดี ย่อยสลายได้ยาก สลายตัวช้าทำให้เกิดกลิ่น ไข สามารถอุดตันในท่อ ปิ๊ม หรืออุปกรณ์ในหน่วยบำบัด (พรธรรมธร ศรีนาค, 2556) น้ำมันและไขมันจะลอยปิดผิวหน้าของน้ำ ปิดกั้นการละลายของออกซิเจนจากอากาศ ทำให้ออกซิเจนจากอากาศ ไม่สามารถละลายถ่ายเทลงสู่ชั้นผิวน้ำด้านล่าง ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยรอบ (Cipinyte และคณะ, 2009)

องค์ประกอบน้ำมันและไขมันในน้ำเสีย ค่าความเข้มข้นของน้ำมันและไขมันเพิ่มขึ้นตามขนาดพื้นที่ของแหล่งกำเนิดน้ำเสีย โดยลักษณะน้ำเสียจากครัวของบ้านพักอาศัยกรณีที่ไม่ผ่านตะแกรงจะมีน้ำมันและไขมันประมาณ 2,700 มิลลิกรัม/ลิตร หากผ่านตะแกรงจะมีน้ำมันและไขมันประมาณ 500 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับลักษณะน้ำเสียจากครัวของภัตตาคารจะมีน้ำมันและไขมันเฉลี่ยประมาณ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2546) ดัชนีคุณภาพน้ำและความเข้มข้นองค์ประกอบน้ำมันและไขมันในประเทศไทยได้จากการเก็บตัวอย่างน้ำเสียและวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมและการจัดการด้านสิ่งแวดล้อม สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT) พ.ศ.2551 (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ค่าความเข้มข้นของค์ประกอบน้ำมันและไขมันน้ำเสียในประเทศไทย

ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	ความเข้มข้น		
		น้ำเสียจากบ้านเรือน	สถานีบริการน้ำมันเชื้อเพลิง	สถานประกอบการร้านอาหาร
ค่าความเป็นกรดต่าง	-	5-7	5-8	5-7
สี (color)	ADMI	60-700	55-400	60-700
ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand)	มก./ล.	-	230-280	-
ไนโตรเจนทั้งหมด	มก./ล.	9-106	-	9-106
น้ำมันและไขมัน(FOG)	มก./ล.	14-38,000	90-63,000	14-38,000
ฟอสฟอรัสรวม	มก./ล.	0.13-100	2-13	0.13-100

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ (2546)

## 2.3 การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในน้ำ

การกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำนั้นขึ้นอยู่กับหลายวิธีด้วยกัน โดยทั่วไปแล้วจะนิยมใช้วิธีทางเคมี กายภาพ และชีวภาพ (พรชวรธรณ ศรีนาถ, 2556) สำหรับวิธีทางกายภาพและทางเคมีนั้น งานวิจัยส่วนใหญ่ในปัจจุบันมุ่งเน้นการออกแบบโครงสร้างแบบจำลองและปรับปรุงเทคโนโลยีที่ใช้สำหรับวิธีทางชีวภาพนั้น มีการพยายามที่จะหาเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพสำหรับการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน การใช้แบคทีเรียผสม หรือใช้งานทางชีวภาพร่วมกับกายภาพ (Fan, 2014)

### 2.3.1 วิธีการทางเคมี

คือการทำไขมันตกตะกอนโดยสารเคมีโดยทำลายเสถียรภาพของไขมันโดยใช้สารสร้างตะกอนรวม (coagulant) ทำให้เกิดฟล็อกและตกตะกอน (Eckenfelder, 1989) เช่น การเติมคลอรีนหรือเติมคลอรีนร่วมกับการเป่าอากาศ เนื่องจากคลอรีนสามารถละลายได้ดีในน้ำและทำปฏิกิริยาอย่างรุนแรงกับไขมัน จับตัวกับไขมันทำให้ไขมันรวมตัวเป็นก้อนและตกตะกอน และยังมี การปรับปรุงประสิทธิภาพในการแยกตะกอนออกจากระบบ โดยเติมกรด (pH=3) และการเติมสารส้ม

โพลีอะลูมิเนียมคลอไรด์ เฟอร์ริคคลอไรด์ (Rattanapanและคณะ, 2011) แต่วิธีการทางเคมีนั้นมักจะก่อมลพิษ เหลือสารตกค้างในน้ำ (Haritash และ Kaushik, 2009)

### 2.3.2 วิธีการทางกายภาพ

วิธีที่เป็นที่นิยมใช้และเป็นมาตรฐานทั่วไปในการกำจัดไขมัน ง่ายที่สุดในการกำจัด เช่น การทำให้ลอย (Flotation) แล้วเก็บกวาดออกจากผิวน้ำ, การเพิ่มอุณหภูมิ เพื่อช่วยลดค่าความถ่วงจำเพาะของน้ำมันหรือไขมันทำให้ลอยขึ้น, การขัด ใช้สำหรับพวกน้ำมันหรือไขมันเกาะตามถังหรือเครื่องมือต่างๆ, การเป่าอากาศเพื่อให้ฟองอากาศพาน้ำมันหรือไขมันลอยขึ้นมา (Cammarota และ Freire, 2006) หรือทำระบบกำจัดไขมันหรือน้ำมันที่มีลักษณะ เป็นถังมีแผ่นขวางอยู่ในบ่อ เพื่อดักไขมันไว้ให้ได้ปริมาณมาก แต่ไขมันที่เหลือจากการฝังกลบ อาจเกิดกลิ่นเหม็น (Matsumiya และคณะ, 2007) จึงมักมีการนำวิธีทางชีวภาพเข้ามาช่วยเป็นขั้นตอนสุดท้ายในการบำบัด

### 2.3.3 วิธีทางชีวภาพ

วิธีนี้ทำโดยการกระบวนการทางชีวภาพหรือใช้จุลินทรีย์ ระบบทางชีวภาพจะมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่าทางเคมีและทางกายภาพและยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Fosso-Kankeua และ คณะ 2014) จุลินทรีย์จะกำจัดสิ่งเจือปนในน้ำเสียโดยเฉพาะสารคาร์บอนอินทรีย์ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส สารเหล่านี้จะถูกใช้เป็นอาหารและเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ในถังเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโต ทำให้น้ำเสียมีค่าความสกปรกลดลง (สุบัญญัติ นิมรัตน์, 2548) ดังเช่น การนำน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมมาผลิตแก๊สชีวภาพโดยผ่านกระบวนการหมักเพื่อให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic Digestion) โดยใช้แบคทีเรียหลายชนิด แต่เนื่องจากปริมาณผลผลิตแก๊สชีวภาพที่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่ป้อนเข้าและขึ้นกับเทคโนโลยีที่ใช้เหมาะสมกับโรงงานขนาดใหญ่ (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2553) หรือการใช้จุลินทรีย์ร่วมกับถังบำบัดแบบต่างๆ เช่น การเติมแบคทีเรียอิสระลงบ่อแอนแอโรบิก (Anaerobic Pond) และระบบแอกติเวทเต็ดสลัดจ์ (Activated Sludge) หรือการใช้ระบบบำบัดที่จุลินทรีย์เกาะติดผิวตัวกลาง (มันสิน ตันกุลเวศม์, 2542)

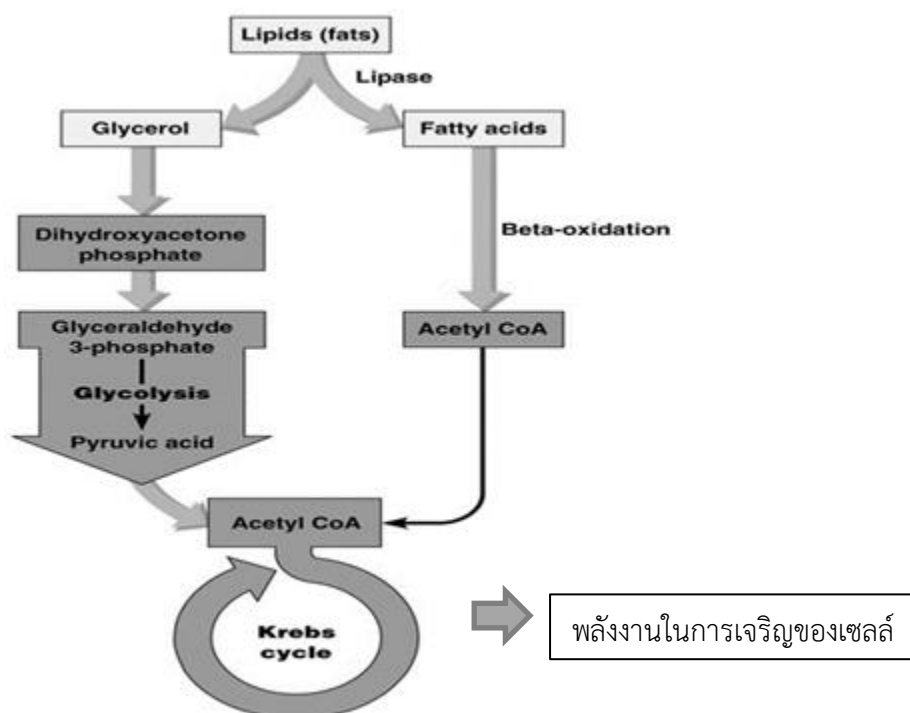


## 2.5 แบคทีเรียย่อยสลายไขมัน

แบคทีเรียแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ แอโรบิกแบคทีเรีย (aerobic bacteria) และแอนแอโรบิกแบคทีเรีย (anaerobic bacteria) บางชนิดสามารถใช้ไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานโดยกระบวนการย่อยสลายไขมัน ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม (Wakelin และ Forster, 1998; Prasad และ Manjunath, 2011; Affandi และคณะ, 2014) โดยส่วนมากแบคทีเรียจะสามารถหลั่งไลเปสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการย่อยสลายไขมัน (Serikovna และคณะ, 2013) โดยส่วนมากนั้นมักคัดแยกแบคทีเรียในบริเวณที่ปนเปื้อนเพื่อให้ได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่ดี สถานที่การผลิตหรือใช้ไขมันหรือน้ำมัน เช่น โรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้ไขมันเป็นส่วนประกอบ ร้านอาหาร คริวเรือนมีแนวโน้มที่จะพบแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโต ย่อยสลายไขมันและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าบริเวณอื่นๆ (Camarota และ Freire, 2006) ตัวอย่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไขมัน ซึ่งใช้ไขมันจากพืชและสัตว์เป็นสารตั้งต้น ตารางที่ 2.5

### 2.5.1 กลไกการย่อยไขมันทางชีวภาพ

กระบวนการย่อยสลายไขมันทางชีวภาพ เกิดจากการหลั่งเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมัน ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน (Lin และคณะ, 1995; Borkar และคณะ, 2009) ทำให้ไตรกลีเซอไรด์เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะเอสเทอร์แล้วแตกตัวเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล หลังจากนั้นกรดไขมันจะผ่านเข้าวิถีบีตาออกซิเดชัน ( $\beta$ -oxidation) เปลี่ยนเป็นอะซิติล-โคเอ (Acetyl-CoA) และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) และได้พลังงานในการเจริญของเซลล์ออกมา ส่วนกลีเซอรอลจะถูกย่อยสลายจนกระทั่งเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) ได้เป็นฟอสโฟอินอลไพรูเวท (phosphoenolpyruvate) และเข้าวัฏจักรเครบส์ต่อไป (Matsui และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.4 กระบวนการย่อยสลายไขมันด้วยแบคทีเรีย  
(Matsui และคณะ, 2005)

### 2.5.2 ชนิดของแบคทีเรีย

การนำแบคทีเรียมาใช้ในการบำบัดนั้น มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส เพื่อใช้ในการย่อยสลายไขมัน เช่น *Candida rugose* (Jeganathan และคณะ, 2006) *Acinetobacter* sp. (Tanaka และคณะ, 2010) *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, และ *Bacillus cereus* (Affandi และคณะ, 2014) การใช้แบคทีเรียใช้การบำบัดน้ำเสีย ถือว่ามีประสิทธิภาพสูง ปลอดภัย และเนื่องจากความปลอดภัยในการแบคทีเรีย ทำให้สามารถใช้ในพื้นที่ปนเปื้อนไขมันทั่วไปและแหล่งน้ำตามธรรมชาติได้ (Glazer และ Nikaido 1995)

อย่างไรก็ดีงานวิจัยบางเรื่องพบว่าแบคทีเรียผสมมีความสามารถในการย่อยสลายมากกว่าแบคทีเรียเดี่ยวในระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าแบคทีเรียชนิดเดียว เนื่องจากแบคทีเรียผสมเกิดจากการผสมการของแบคทีเรียหลายชนิดทำให้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในการบำบัดน้ำเสียจากแหล่งไขมันที่แตกต่างกัน (Wakelin และForster, 1997) การผสมแบคทีเรียหลายสายพันธุ์เข้าด้วยกันเพื่อใช้ในการบำบัดไขมันนั้น ทำให้มีประสิทธิภาพที่มากขึ้น เนื่องจากหัวเชื้อแบคทีเรียผสมจะ

สามารถใช้งานได้ในอุณหภูมิช่วงกว้างกว่าและเติบโตได้ในช่วงเวลาแตกต่างกันกว่าแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว (Tano-Debrah และคณะ, 1999)

การประยุกต์นำแบคทีเรียมาใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียเชิงพาณิชย์ จุดที่ควรคำนึงมากที่สุดคือแบคทีเรียที่ใช้ต้องไม่ก่ออันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และมีผลต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้แบคทีเรียยังต้องสามารถใช้บำบัดได้ตามปกติ จากเงื่อนไขดังกล่าว ทำให้เราจำกัดสายพันธุ์ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ ผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์หลายอย่างในปัจจุบันนิยมใช้ *Bacillus* sp. หรือแบคทีเรียที่ใกล้เคียง (Brooksbank และคณะ, 2006)

จุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) หมายถึงจุลินทรีย์ที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งสามารถตรวจสอบรายชื่อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้จากพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ และCenters for disease control and prevention (CDC) เช่น *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เรียงประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน

ชื่อสายพันธุ์	ชนิดของไขมัน	ความเข้มข้นไขมัน	อัตราการย่อย	อ้างอิง
<i>Acinetobacter</i> sp. สายพันธุ์ Ud-4	น้ำมันคาโนลา		96% ใน 7 วัน	Tanaka และคณะ (2010) <sup>a</sup>
	น้ำมันมะกอก		48% ใน 7 วัน	
	น้ำมันงา	10,000 มก./ล.	60% ใน 7 วัน	
	น้ำมันถั่วเหลือง		60% ใน 7 วัน	
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> สายพันธุ์ IBRLnra	น้ำมันหมู		67% ใน 7 วัน	Balan และคณะ (2012) <sup>a</sup>
	น้ำมันมะกอก		100% ใน 24 ชั่วโมง	
	น้ำมันปาล์ม	12.5 มก./ล.	96% ใน 24 ชั่วโมง	
	น้ำมันข้าวโพด		90% ใน 24 ชั่วโมง	
เชื้อผสมระหว่าง <i>Kochuria palustris</i> และ <i>Enterococcus faecalis</i>	น้ำมันดอกทานตะวัน		86% ใน 24 ชั่วโมง	Mazlan (2012) <sup>a</sup>
	น้ำมันปาล์มใช้แล้ว	8119 มก./ล.	88% ใน 7 วัน	
<i>Acinetobacter</i> sp. สายพันธุ์ SS-192	น้ำมันสัตว์		80% ใน 24 ชั่วโมง	Sugimori และ Utsue (2012) <sup>a</sup>
	น้ำมันหมู	3,000 มก./ล.	64% ใน 24 ชั่วโมง	
	ไขมันสัตว์		70% ใน 24 ชั่วโมง	
	น้ำมันสัตว์	3,000 มก./ล.	82% ใน 24 ชั่วโมง	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ SS-219	น้ำมันหมู		72% ใน 24 ชั่วโมง	
	ไขมันสัตว์		71% ใน 24 ชั่วโมง	

ชื่อสายพันธุ์	ชนิดของไขมัน	ความเข้มข้นไขมัน	อัตราการย่อย	อ้างอิง
<i>P. aeruginosa</i> สายพันธุ์ G23	น้ำเสียปนเปื้อนไขมันจากร้านกาแฟ		61.5±7% ใน 7 วัน	Serikovna และคณะ (2013) <sup>a</sup>
<i>A. punctata</i> สายพันธุ์ G30		55,000 มก./ล.	45.2±5% ใน 7 วัน	
<i>P. aeruginosa</i> สายพันธุ์ Zb32			37.5±3% ใน 7 วัน	
<i>Serratia marcescens</i> สายพันธุ์ EU555434	น้ำเสียจากโรงงานอาหาร	79,000 มก./ล.	89% ใน 12 วัน	Affandi และคณะ (2014) <sup>a</sup>
<i>Aeromonas hydrophila</i> สายพันธุ์ KF049214	น้ำเสียจากโรงงานอิเล็กทรอนิกส์	5.19 มก./ล.	100% ใน 12 วัน	
<i>Bacillus cereus</i> สายพันธุ์ KJ605415	น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม	3012 มก./ล.	100% ใน 7 วัน	
<i>Bacillus cereus</i> สายพันธุ์ 103PB	น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	190.6 มก./ล.	85.14% ใน 5 วัน	Bala และคณะ (2014) <sup>a</sup>
<i>Bacillus cereus</i> สายพันธุ์ 106 PB			83.04% ใน 5 วัน	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> สายพันธุ์ 102 PB			73.30% ใน 5 วัน	

หมายเหตุ : <sup>a</sup> ระบุขนาดแบบใช้อากาศ

<sup>b</sup> ระบุขนาดแบบไม่ใช้อากาศ

### 2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายไขมัน

เนื่องจากในธรรมชาติประกอบไปด้วยหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายของไขมัน หรือมีผลต่อความสามารถในการปรับตัวของแบคทีเรียนอกเหนือจากชนิดของแบคทีเรียแล้วยังมีปัจจัยภายนอกต่างๆ ที่ส่งผล เช่น สารอาหาร ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และสารลดแรงตึงผิว

สารอาหาร คือหนึ่งในปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรีย เนื่องจากคาร์บอนและไนโตรเจนจะมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไขมันจะช่วยเป็นตัวชักนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ไนโตรเจนมีความเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของแบคทีเรีย (Gupta และคณะ, 2004) อัตราการกำจัดไขมันที่แตกต่างกันของแต่ละชนิดน้ำมันเนื่องจากน้ำมันจะแยกย้ายกันไปเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์และกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (Brooksbank และคณะ, 2006) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิและออกซิเจน สามารถส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของแบคทีเรียทำให้เกิดผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียด้วย (Fan, 2014) แบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่างตามธรรมชาติ ช่วงค่าความเป็นกรดต่างที่ 6-9 มีออกซิเจนที่เพียงพอ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไป ทำให้เกิดผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียย่อยสลายไขมันและน้ำมันลดลง (Immanuel และคณะ, 2008; Mahdi และคณะ, 2012) นอกเหนือจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังมีส่วนช่วยในการละลายโมเลกุลของไขมันหรือน้ำมัน ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Fan, 2014)

### 2.6 เซลล์ตรึง

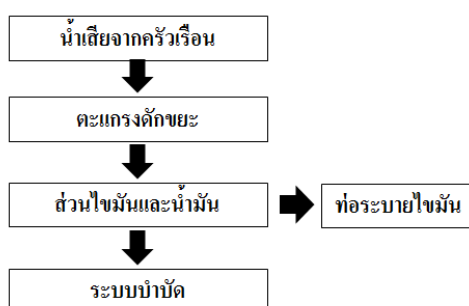
การตรึงเซลล์ (immobilization) หมายถึง การเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุ ซึ่งเกิดโดยสมบัติเฉพาะของเซลล์และการทำให้เซลล์ตรึงอยู่บนวัสดุ (Cohen, 2001) หรือ การจำกัดที่อยู่ของเซลล์ให้อยู่บนวัสดุที่เหมาะสมและยังคงมีกิจกรรมหรือประสิทธิภาพตามต้องการ (Leskosek-Aukalovia และ Nedovic, 2005) เป็นการเก็บรักษาเซลล์ ป้องกันและคงความสามารถของเซลล์ไว้ และช่วยปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษของสารพิษมากขึ้นกว่าการใช้เซลล์อิสระ (Karel และ Robertson, 1989; Cipolatti และคณะ, 2015) ข้อดีของเซลล์ตรึงที่ได้เปรียบกว่าเซลล์อิสระ คือ เซลล์มีเสถียรภาพมากขึ้นกว่าเดิมถ้าวิธีการตรึงนั้นเหมาะสม ใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างออกไปจากเซลล์อิสระได้ สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำและต่อเนื่องกันได้หลายครั้งและลดต้นทุนการผลิต สามารถแบ่งเซลล์ตรึงได้เป็น 4 ประเภทตามกลไกทางกายภาพ คือ (1) การเกาะและการดูดซึมบนพื้นผิวแข็งจะถูกยึดโดยแรงทางกายภาพ นอกจากนี้ไบโอฟิล์มที่เซลล์แบคทีเรียสร้างขึ้นจะมีส่วน

ช่วยในการตรึงเซลล์ เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมสูงเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ข้อเสียของการตรึงเซลล์ตามกลไกนี้คือเซลล์ขาดการป้องกันตัวจากสารละลายภายนอกทำให้หลุดเป็นเซลล์อิสระได้ง่าย (2) การกักเซลล์ในวัสดุที่มีรูพรุน เป็นการตรึงเซลล์เข้าไปในวัสดุที่เป็นรูพรุน เพื่อป้องกันการหลุดของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และคงความสามารถในการแลกเปลี่ยนสารอาหารในการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเซลล์ตามกลไกนี้ คือ ความสามารถในการกระจายตัวของเซลล์ในวัสดุ ปริมาณเซลล์ที่สามารถกักขังไว้ได้ ปริมาณออกซิเจน (3) การเกาะกลุ่มของเชื้อ อาจเกิดตามธรรมชาติ หรือเหนี่ยวนำให้เกิดโดยใช้สารมวลโมเลกุลต่ำบางชนิด ปัจจัยที่มีผล คือ ค่า pH คุณสมบัติของผนังเซลล์ ออกซิเจนในอาหาร สารอาหาร (4) การบรรจุเซลล์ไว้ภายในวัสดุ การตรึงด้วยวิธีนี้ยังคงเป็นอุดมคติ เนื่องจากมีข้อจำกัดมาก เช่น เกิดของเสียสะสมภายใน ข้อจำกัดในการแลกเปลี่ยนสารอาหารของเซลล์ (Kourkoutas และคณะ, 2004) ปัจจัยอีกประการที่มีผลต่อการเซลล์ตรึงคือ วัสดุที่นำมาใช้สำหรับให้จุลินทรีย์ยึดเกาะ ได้แก่ วัสดุธรรมชาติ เช่น แอลจิเนต วัณ ไคโตซาน และวัสดุสังเคราะห์ เช่น พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) โฟมพอลิยูรีเทน (polyurethane foam; PUF) และพอลิโพรพิลีน (Rahman และคณะ, 2006; Dumore และ Mukhopadhyay, 2012) อย่างไรก็ตาม พอลิยูรีเทนโฟม ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องด้วยมีศักยภาพอย่างมากในงานด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้งานในการควบคุมและป้องกันมลพิษ (Urgun-Demirtas และคณะ, 2007) นอกจากนี้ PUF ยังถูกใช้เป็นเครื่องมือในการตรึงเอนไซม์และเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจาก PUF มีกลไกที่แข็งแรง และเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีได้ยาก (Biochemically inert characteristics) (Klein และ Kluge, 1981; Wang และ Ruchenstein, 1993; Bang และคณะ, 2001) และจากสมบัติของ PUF ที่สามารถลอยตัวได้ดี ดูดซับได้มาก มีรูพรุนค่อนข้างสูง ทำให้มีพื้นที่ผิวในการเกาะติดของจุลินทรีย์ (Oh และคณะ, 2000; Sivertsen, 2007) จึงมีความสนใจการนำ PUF มาใช้บำบัดมลพิษทางน้ำ

## 2.7 บ่อดักไขมัน

วิธีการดักไขมันนั้นเป็นเทคนิคหลักในการใช้แยกไขมันและน้ำมันจากน้ำเสีย (Cammarota และ Freire, 2006) การทำบ่อดักไขมันเป็นวิธีทางกายภาพ การออกแบบบ่อดักไขมันสำหรับประเทศไทยนั้น เนื่องจากการจับตัวของไขมันเข้าเพราะอากาศที่มีอุณหภูมิสูง ดังนั้นเวลาที่น้ำเสียอยู่ในถังทั่วไป (Hydraulic Retention Time: HRT) ของบ่อดักไขมันจึงไม่ควรน้อยกว่า 6 ชั่วโมง เพื่อให้ไขมันและไขมันมีโอกาสแยกตัวและลอยขึ้นมาสะสมกันอยู่บนผิวน้ำและตักออกไปกำจัด (กรมควบคุมมลพิษ, 2551)

บ่อดักไขมันอย่างง่ายตามมาตรฐานโดยทั่วไปนั้น จะประกอบด้วยตะแกรงดักเศษอาหาร และส่วนแยกไขมันเป็นหลัก แต่ขนาดและวัสดุที่ทำนั้น ขึ้นอยู่กับการใช้ประโยชน์และความเหมาะสมของสถานที่ บ่อดักไขมันสามารถกำจัดไขมันได้มากกว่าร้อยละ 60 มีทั้งแบบสำเร็จรูปที่สามารถซื้อและติดตั้งได้ง่ายหรือสามารถสร้างเอง โดยใช้วงขอบซีเมนต์หรือถังซีเมนต์หินขัด ซึ่งประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าแบบสำเร็จรูป และสามารถปรับให้เหมาะสมกับพื้นที่และปริมาณน้ำที่ใช้ (กรมควบคุมมลพิษ, 2553)



รูปที่ 2.5 แผนภูมิการทำงานทั่วไปของบ่อดักไขมัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2551)

ลักษณะของบ่อดักไขมันนั้น ขึ้นกับปริมาตรเก็บกักตามที่ได้คำนวณไว้ โดยทางน้ำเข้าและทางน้ำออกของบ่อดักไขมันอาจใช้ท่อรูปตัวที (T) หรือแผ่นกั้น (Baffle) สำหรับในกรณีที่น้ำเสียมีปริมาณมากอาจก่อสร้างจำนวนสองบ่อหรือมากกว่าความเหมาะสมแล้วแบ่งน้ำเสียไหลเข้าแต่ละบ่อในอัตราเท่า ๆ กัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2537)





## 2.8 มาตรฐานน้ำทิ้งจากอาคารบางประเภทและบางขนาด

ในประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากอาคารบางประเภทและบางขนาด ลงวันที่ 7 พฤศจิกายน 2548 ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 122 ตอนที่ 125ง วันที่ 29 ธันวาคม 2548 และประกาศกระทรวงฯ ฉบับใหม่ กำหนดให้ระบบบำบัดน้ำเสียรวมของชุมชนเป็นแหล่งกำเนิดมลพิษที่จะต้องถูกควบคุมการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะหรือออกสู่สิ่งแวดล้อม ตามราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนพิเศษ 69ง ลว.2 มิถุนายน 2553 บังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 3 มิถุนายน 2553 เป็นต้นไป โดย ข้อ 3 ของประกาศฯ ห้ามมิให้เจ้าของหรือผู้ครอบครองระบบบำบัดน้ำเสียรวมของชุมชน ปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะหรือออกสู่สิ่งแวดล้อม เว้นแต่จะบำบัดน้ำเสียให้เป็นไปตามมาตรฐาน ควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียรวมของชุมชน พหุวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบน้ำทิ้งโดยทั่วไป ได้แก่ ความเป็นกรดและด่าง (pH) , บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand), ของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids), น้ำมันและไขมัน (Fat Oil and Grease), ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total Phosphorus), ไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen) (กรมควบคุมมลพิษ, 2553) โดยมาตรฐานน้ำทิ้งในแต่ละแหล่งมีรายละเอียดดังตาราง 2.6

ตารางที่ 2.6 ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งในประเทศไทย

ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	เกณฑ์กำหนดสูงสุด ตามประเภทมาตรฐาน ควบคุมการระบายน้ำทิ้ง			วิธีวิเคราะห์
		ระบบ บำบัดน้ำ เสีย ชุมชน	สถานี บริการ น้ำมัน เชื้อเพลิง	สถาน ประกอบการ ร้านอาหาร	
ค่าความเป็นกรด ด่าง	-	5.5-9	5.5-9	5.0-9	pH Meter
BOD (Biological Oxygen Demand)	มก./ล.	ไม่เกิน 20	-	ไม่เกิน 20	วิธีการ Azide Modification ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ติดต่อกัน

ปริมาณของแข็ง	มก./ล.	ไม่เกิน 30	ไม่เกิน 60	ไม่เกิน 30	กรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว (Glass Fibre Filter Disc)
ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand)	มก./ล.	-	ไม่เกิน 200	-	Potassium Dichromate Digestion
น้ำมันและไขมัน (FOG)	มก./ล.	ไม่เกิน 25	ไม่เกิน 15	ไม่เกิน 20	วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแล้วแยกหาน้ำหนักของน้ำมันและไขมัน

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ (2553)

## 2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.9.1 การ คัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายไขมันจากสิ่งแวดล้อม

#### 2.9.1.1 แบคทีเรียเดี่ยว

กิจจา จิตรภิมย์ และปราณิน แสงอรุณ (2555) คัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติได้แก่น้ำเสียจากถังดักไขมัน (4 ตัวอย่าง) น้ำหมักชีวภาพ (2 ตัวอย่าง) น้ำจากคลองรวบรวมน้ำเสีย (2 ตัวอย่าง) และตะกอนดินป่าชายเลน (3 ตัวอย่าง) และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันโดยใช้น้ำมันปาล์ม พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกมาจากถังดักไขมัน ไอโซเลท T3/2 สามารถย่อยน้ำเสียไขมันในสังเคราะห์ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งอื่นคือสามารถย่อยไขมันได้ร้อยละ 52.0 อัตราการย่อยไขมัน 0.025 มิลลิลิตรต่อวัน ในช่วงเวลาทดสอบ 21 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

Matsumiya และคณะ (2007) คัดแยกแบคทีเรียจากดินในบ่อดักไขมันได้แบคทีเรีย *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ DW2-1 พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันสลัด น้ำมันมะกอก น้ำมันงา และไขมันวัว ที่ความเข้มข้น 10000 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 96.7, 92.3, 90.1 และ 7.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

Rahman และคณะ (2007) คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันปาล์มได้แบคทีเรีย *Geobacillus zalihae* สายพันธุ์ T1 ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

Tanaka และคณะ (2010) คัดแยกแบคทีเรียมาจากตัวอย่างน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมัน ได้แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ Ud-4 ศึกษาการย่อยสลายไขมัน พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำมันคาโนลา น้ำมันมะกอก น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันหมู ได้ 96, 48, 60, 60 และ 67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และยังสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 67 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 7 วัน

Kanmani และคณะ (2015) คัดแยกแบคทีเรียจากโรงงานน้ำมัน ได้แบคทีเรีย *Staphylococcus pasteurii* และ *Bacillus subtilis* และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารผสมน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะพร้าว พบว่า *Staphylococcus pasteurii* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะพร้าวถึง 20 กรัมต่อลิตร และยังสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์สำคัญอื่นๆได้

### 2.9.1.2 แบคทีเรียกลุ่ม

Wakelin และ Forster (1996) ศึกษาแบคทีเรียในน้ำเสียปนเปื้อนไขมันจากร้านอาหารฟาสต์ฟู้ด โดยคัดแยกออกมาเป็นเชื้อเดี่ยวคือ *Acinetobacter* sp., *Rhodococcus rubra*, *Nocardia amarae* และ *Microthrix parvicella* และเชื้อกลุ่ม MC1 พบว่า *Acinetobacter* sp. มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันดีที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อเดี่ยวกลุ่มอื่นๆ ซึ่งสามารถย่อยสลายไขมันได้ 60-65% จากปริมาณไขมันเริ่มต้น 8 กรัมต่อลิตร และเชื้อกลุ่ม MC1 สามารถย่อยสลายไขมันได้หลายชนิด มีประสิทธิภาพการย่อยที่ดีที่สุดคือสามารถย่อยน้ำมันที่มาจากร้านอาหารได้ 73%

El-Bestawy และคณะ (2005) คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย *Pseudomonas* sp. (L1), *P. diminuta* (L2), *P. pseudoalcaligenes* (L3) และ *Escherichia* sp. (L5) จากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันพืช และวัดเปอร์เซ็นต์ free fatty acid ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียที่มีการเติมน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ของเชื้อเดี่ยวและผสมเชื้อ 3 กลุ่ม คือ M1 (*P. diminuta* และ *P. pseudoalcaligenes*) M2 (*P. diminuta*, *P. pseudoalcaligenes* และ *Pseudomonas* sp.) M3 (*P. diminuta*, *Escherichia* sp., *P. pseudoalcaligenes* และ *Pseudomonas* sp.) พบว่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายของเชื้อกลุ่มมีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อเดี่ยวคือ 98.2, 99.0 และ 86.3% ตามลำดับ

Fadile และคณะ (2011) ทำการศึกษาการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียโดยใช้แบคทีเรียกลุ่ม มาทำการทดสอบในน้ำเสียจากร้านอาหาร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่า แบคทีเรียกลุ่มสามารถลดค่าซีไอทีในน้ำเสียได้ 83.3 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดปริมาณไขมันในน้ำเสียร้านอาหารได้ถึง 81 เปอร์เซ็นต์

จากงานวิจัยข้างต้น เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เมื่อนำไปทดสอบโดยการทำเป็นเชื้อผสมเทียบกับเชื้อเดี่ยว แบคทีเรียผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ดีกว่าแบคทีเรียเดี่ยว

### 2.9.2 การเลือกวัสดุในการตรึงเซลล์

Gentili และคณะ (2006) ทำการทดลองโดยทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Rhodococcus corynebacterioides* เซลล์อิสระเทียบกับเซลล์ตรึงบนผงไคตินและผงไคโตซาน พบว่าหลังจากผ่านไป 15 วัน เซลล์ตรึงทั้งสองมีความสามารถในการลดปริมาณน้ำมันดิบได้ดีกว่าเซลล์อิสระ Lan และคณะ (2009) ใช้ระบบเซลล์ตรึง โดยตรึง *Yarrowia lipolytica* W29 บนแคลเซียมแอลจีเนต (calcium alginate) เปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระ ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนปิโตรเลียม โดยปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นทั้งเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระเท่ากับ  $6.65 \times 10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมัน และค่า ซีไอที เท่ากับ 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร pH 7.0 และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เขย่าเป็นเวลา 50 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการตรึง *Yarrowia lipolytica* W29 บนแคลเซียมแอลจีเนต มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันสูงกว่า 80% และสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในระบบได้ดีกว่าการใช้ *Yarrowia lipolytica* W29 ในรูปเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน นำกลับมาใช้ใหม่ได้ทั้งสิ้น 12 ครั้ง

Mostafa และคณะ (2015) ได้ศึกษาความสามารถในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันจากอุตสาหกรรมโดยใช้ *Rhodotorula mucilaginosa* 2 และ *Candida utilis* ระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง โดยใช้วัสดุตรึง 2 ชนิด ได้แก่ แคลเซียมแอลจีเนตและไคโตซาน พบว่า เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสูงกว่าเซลล์อิสระ และ *R. mucilaginosa* 2 มีความสามารถในการบำบัดน้ำเสียได้ดีกว่า *C. utilis* โดย *R. mucilaginosa* 2 ที่ตรึงบนไคโตซานมีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยลดค่า ไขมันและน้ำมัน ค่าซีไอที ได้ 70% และ 77% ตามลำดับ

Oh และคณะ (2000) พบว่า PUF สามารถลอยตัวได้ดี ดูดซับน้ำมันได้มาก มีรูพรุนค่อนข้างสูงทำให้มีพื้นที่ผิวในการเกาะติดของจุลินทรีย์ได้มาก และยังมีมีความยืดหยุ่นและเสถียร จึงนิยมนำ PUF มาใช้ในการบำบัดกันอย่างกว้างขวาง

Manohar และคณะ (2001) ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายแนพทาลีน (Naphthalene) ของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. NGK ที่ความเข้มข้น 25mM โดยการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. NGK บนวัสดุตรึง 4 ชนิดคือ แอลจีเนต วัุ้น พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) และโฟมพอลิยูรีเทน (PUF) พบว่าเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงอยู่บน PUF มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแนพทาลีนได้สูงสุด คือย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ 40 ครั้ง

Patil และคณะ (2006) เปรียบเทียบการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. โดยตรึงแบคทีเรียบนแอลจีเนต PUF และใช้เซลล์อิสระ เพื่อทดสอบการย่อยสลาย Phthalate ความเข้มข้น 10mM และ 20mM ในเครื่องปฏิกรณ์แบบแพ็คเบด (Packed bed reactor: PBR) ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียที่ตรึงลงบน PUF สามารถย่อยสลายได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอิสระและแบคทีเรียตรึงในแอลจีเนต โดยสามารถย่อยสลาย Phthalate ที่ความเข้มข้น 10 mM และ 20 mM ได้หมดที่เวลา 36 ชั่วโมง และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ และยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 24 รอบ

Tallur และคณะ (2009) ทดลองใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. PHN1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย *p*-cresol ที่ความเข้มข้น 20 mM และ 40 mM โดยการตรึงแบคทีเรียลงบนวัสดุ 4 ชนิดคือ แอลจีเนต วัุ้น พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) และโฟมพอลิยูรีเทน (PUF) และใช้เซลล์อิสระ พบว่า PUF มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย *p*-cresol ได้ดีที่สุด คือ สามารถย่อยสลาย *p*-cresol ที่ความเข้มข้น 20 mM และ 40 mM ได้ภายใน 120 ชั่วโมง

### 2.9.3 การนำเซลล์ตรึงไปใช้

Quek และคณะ (2005) ตรึง *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ F92 *Candida* sp. สายพันธุ์ F43 *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ P12 และ *Arthrobacter* sp. ในพอลิยูรีเทนโฟม ขนาด 1x1x1 เซนติเมตร เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำทะเล โดยทำขบวนการหมัก โดยใส่เซลล์ตรึงปริมาณ 1 ขึ้นต่อ 100 มิลลิลิตร พบว่า *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ F92 สามารถย่อยสลาย n-alkanes ของน้ำมันปิโตรเลียมได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 7 วัน

Chantamalee และคณะ (2013) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันหล่อลื่นของแบคทีเรีย *Gordoria* sp. สายพันธุ์ JC11 พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นชนิดที่ใช้แล้วและยังไม่ใช้งาน นำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันบริเวณใต้ท้องเรือประมงขนาดเล็ก ทดสอบในระบบจำลองที่ไม่เติมสารอาหารพบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อประจำถิ่นในน้ำขังใต้ท้องเรือ มีประสิทธิภาพ 48 เปอร์เซ็นต์ และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นตัวอย่างเซลล์ตรึงพื้นที่ผิวขนาด 40 ตารางซม.ต่อชิ้น โดยบรรจุในถุงตาข่าย แล้วพอลิยูรีเทนโฟมลอย

อยู่บริเวณผิวหน้าน้ำซึ่ง พบว่าโพลีเมอร์สามารถดูดซับน้ำมันได้อย่างรวดเร็ว จากการดูดซับเริ่มต้นที่ 200 มิลลิลิตรน้ำมันต่อกรัมพอลิยูรีเทนโพลีเมอร์ เป็นมากที่สุดที่ 25,967 มิลลิลิตรน้ำมันต่อกรัมพอลิยูรีเทนโพลีเมอร์ ในเวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อผ่านไป 96 ชั่วโมง ปริมาณน้ำมันบนชิ้นโพลีเมอร์ลดลงมีค่าไม่ต่างจาก ชุดควบคุมพอลิยูรีเทนโพลีเมอร์



### บทที่ 3

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 3.1 อุปกรณ์

1. กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX, USA
2. ขวดแก้ว ฝาเกลียว (Vial) ปริมาตร 22 มิลลิลิตร (Screw Cap with Teflon Liner) บริษัท Lab System, Thailand
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125, 200, 1000 มิลลิลิตร บริษัท PYREX, USA
4. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 บริษัท DecanUltrasonics, England
5. เครื่องเขย่า รุ่น PNP, Green SSeriker 2 บริษัท pana polytech.co.th
6. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
9. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer) รุ่น Biomate 3S-Thermal บริษัท Thermo Scientific, USA
11. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific supply Co., Ltd., Thailand
12. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE800, Germany
13. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น 06063 บริษัท Memmert, Germany
14. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf AG, Germany
15. เครื่อง TLC-FID รุ่น IATROSCAN MK-6s ของบริษัท Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Japan
16. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ของบริษัท PYREX, USA
17. ตะแกรงอลูมิเนียม รูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 2x15x17 เซนติเมตร
18. ตู้ดูดควัน (Fumehood) รุ่น Airone 12009s ของบริษัท Safelab systems, England



19. แท่งโครโมรอด (Chromarod) ของบริษัท Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Japan
20. ปีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX, USA
21. พาสเจอร์ปีเปต (Pasteur pipette) บริษัท Hirshmann Laborgerate, Germany
22. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
24. แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader)
25. วัสดุตุ้ริง พอลิยูรีเทนโฟม (Polyurethane foam) บริษัท Chiang Mai Foam Factory Co., Ltd., Thailand
26. อุปกรณ์ประกอบถังปฏิกรณ์
27. หลอดเอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf tube) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร บริษัท AXYGEN, INC., USA
28. เครื่องวัดมาตรฐานความตึง (tensionmeter, DAphysics, Germany)
29. ตู้แช่เย็น (Refrigerated showcase) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น SPE-0753D11A บริษัท Sanden Intercool, Thailand
30. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น MP125 บริษัท Mettler Toledo Co.,Ltd., Switzerland
31. Peristaltic pump
32. ถังน้ำสี่ขุ่นขนาด 6 ลิตร
33. เครื่องวัดค่าออกซิเจน รุ่น PDO-520 บริษัท Lutron

### 3.2 เคมีภัณฑ์

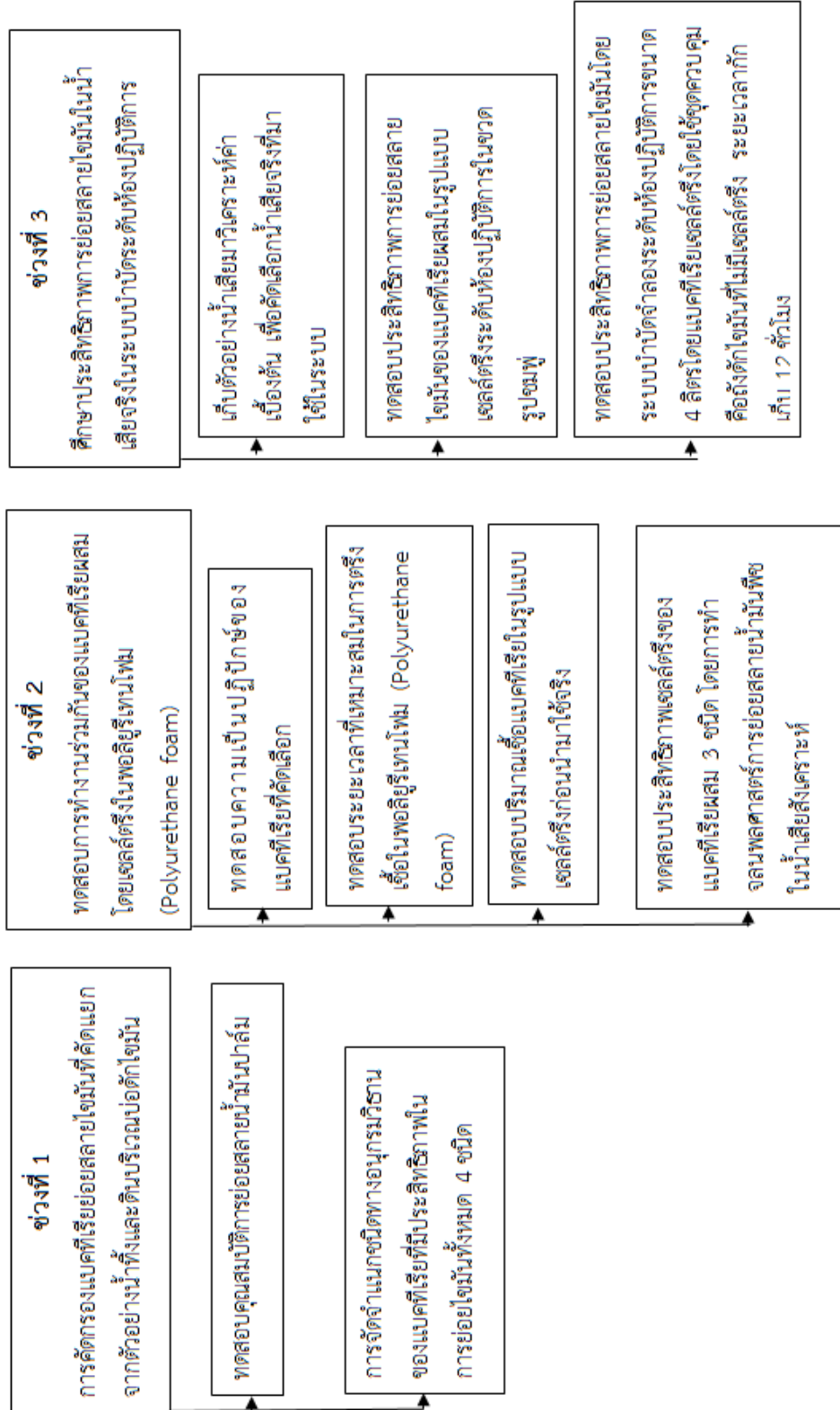
1. กรดบอริก ( $H_3BO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany
3. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) บริษัท RCI Labscan, Thailand
4. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
5. แบคโตอะการ์ (Bacto agar) บริษัท Difco Laboratories, USA
6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
7. แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) บริษัท Carlo ERBA, France
8. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
9. อาหาร LB สำเร็จรูป (Luria-Bertani) บริษัท Hardy Diagnostics, USA
10. ไตคลอโรมีเทน ( $CH_2Cl_2$ ) บริษัท Merck, Germany
11. เปปโตน (peptone)

12. Beef extract
13. ยูเรีย (urea) บริษัท Merck, Germany
14. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
15. สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ (Ammonia solution 25%) บริษัท Merck, Germany
16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
17. น้ำมันปาล์ม ตราแวว
18. น้ำเสียปนเปื้อนไขมันจากร้านอาหารและร้านกาแฟในสถานบริการน้ำมันปตท. วิวาวดีรังสิต



### 3.3 แผนผังของงานวิจัย

แผนผังของงานวิจัย แบ่งออกเป็น 3 ช่วง ดังนี้

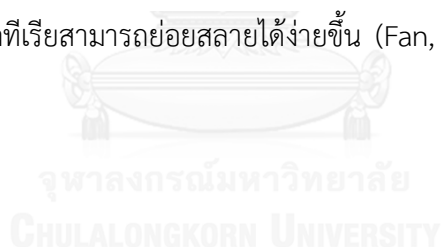


รูปที่ 3.1 แผนผังของงานวิจัย

### 3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1 การ คัดกรองแบคทีเรียย่อยสลายไขมันที่คัดแยกจากตัวอย่างน้ำทิ้งและดินบริเวณ บ่อตกไขมัน

แบคทีเรียย่อยสลายไขมันที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้คัดแยกโดยนางสาวนันท์ธร เถาราช ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้ตัวอย่างดินในและรอบบ่อตกไขมัน และบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์ น้ำทิ้งในบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์ ของระบบบำบัดน้ำเสียร้านอาหาร ใน กรุงเทพมหานคร ทั้งหมด 17 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.1) การแยกเชื้อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เกลี่ยด้วยน้ำมันแต่ละชนิดได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันรำข้าวใช้แล้ว น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จนสังเกตพบการเจริญของโคโลนี คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยการขีดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ โดยเลือก คัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะเหมือนแบคทีเรีย *Bacillus* sp. หรือแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้เคียง เพื่อสามารถนำประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ เนื่องจากมีแนวโน้มไม่ก่ออันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และมีผลต่อสิ่งแวดล้อม (Brooksbank และคณะ, 2006) และ *Bacillus* sp. บางชนิดยังสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว (Al-Bahry และคณะ, 2013) ที่ช่วยในการทำลายโมเลกุลของไขมันหรือน้ำมันให้เล็กลง ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Fan, 2014)



ตารางที่ 3.1 แบบที่เรียย่อสลายไขมันที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	การติดสีแกรมและรูปร่าง
SGT UPO1	ดินในบ่อดักไขมัน	แกรมบวก ท่อนต่อกันสองท่อน สร้างสปอร์
SGT URBO1	ดินในบ่อดักไขมัน	แกรมบวก ท่อนขนาดใหญ่
SGT SBO1	ดินในบ่อดักไขมัน	แกรมบวก ท่อนขนาดเล็ก สร้างสปอร์
SGT URBO2	ดินในบ่อดักไขมัน	แกรมบวก ท่อนขนาดใหญ่ สร้างสปอร์
SAS URBO1	ดินในแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	แกรมบวก ท่อนขนาดใหญ่
SAS SFO1	ดินในแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	แกรมบวก ท่อนต่อกันเป็นสาย สร้างสปอร์
SAS RBO1	ดินในแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	แกรมบวก ท่อนขนาดใหญ่
SAS PO1	ดินในแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	แกรมบวก ท่อนต่อกันสองท่อน สร้างสปอร์
SAGT SBO2	ดินรอบบ่อดักไขมัน	แกรมบวก ท่อนต่อกันสองท่อน
SAGT URBO1	ดินรอบบ่อดักไขมัน	แกรมบวก ท่อนต่อกันสองท่อน
SAGT RBO1	ดินรอบบ่อดักไขมัน	แกรมบวก ท่อนต่อกันเป็นสาย
SAGT PO1	ดินรอบบ่อดักไขมัน	แกรมบวก ท่อนต่อกันสองท่อน
SAGT SBO1	ดินรอบบ่อดักไขมัน	แกรมบวก ท่อนต่อกันสองท่อน
WAS URBO1	น้ำบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	แกรมบวก ท่อนขนาดเล็ก สร้างสปอร์
WAS PO1	น้ำบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	แกรมบวก ท่อนขนาดใหญ่
WAS SFO1	น้ำบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	แกรมบวก ท่อนขนาดใหญ่
WAS UPO1	น้ำบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	แกรมบวก ท่อนต่อกันเป็นสาย สร้างสปอร์

### 3.4.1.1 ทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

เลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนโดยเติมน้ำมันปาล์ม 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 3 สังเกตความขุ่นของเชื้อ และปริมาณน้ำมันที่ลอยอยู่บนผิว เพื่อหาเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันได้ในเวลาที่รวดเร็ว เพื่อหาอัตราการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยวิธีทรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ทำซ้ำ 3 ซ้ำ และหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันโดยนำตัวอย่างมาสกัดไขมันโดยเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 50 มิลลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดชั้นล่างที่เป็นส่วนของคลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลองใหม่ ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารจนเหลือปริมาตรคลอโรฟอร์มประมาณ 1 มิลลิตร และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไขมันด้วยวิธี TLC-FID โดยใช้เครื่อง TLC/FID Analyzer รุ่น IATROSCAN MK-6s (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Japan) ตามวิธีของ Solaesa และคณะ (2015) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์ไขมันและน้ำมันที่มีความนิยม เนื่องจากสามารถใช้แยกสารพิษสูงชนิดของสารและตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น โดยเฉพาะในกรณีที่มีสารมีจำนวนน้อย มีความแม่นยำและรวดเร็วมากกว่าวิธีการชั่งน้ำหนัก โดยการใช้หลักการเดียวกับโครมาโตกราฟีแต่ใช้แท่งโครมาโรดซึ่งเคลือบด้วยของแข็งในการดูดซับจุดสารตัวอย่าง แล้วนำไปบ่มในโหลแก้วที่บรรจุตัวทำละลาย (คลอโรฟอร์ม) และอิมดวยไอของมัน เมื่อให้เวลาในการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายและสารตัวอย่างเพียงพอแล้ว นำแท่งโครมาโรดไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC/FID Analyzer เมื่อสารตัวอย่างและ carrier gas ผ่านเข้าสู่เปลวไฟจะทำให้สารเหล่านั้นเกิดไอออนไนเซชันได้เป็นอิเล็กตรอนและไอออนบวก อิเล็กตรอนจะวิ่งไปยัง flame jet ส่วนไอออนบวกจะเคลื่อนที่ไปยังอิเล็กโทรด แล้วเกิดเป็นสัญญาณขึ้น โดยจะสังเกตสัญญาณพีคที่เด่นชัดในช่วงเวลา 0.05-0.12 นาที เนื่องจากกราฟโครมาโตแกรม TLC/FID (ภาคผนวก ค) ในช่วงเวลาดังกล่าว คือ ไขมันทรานส์ ไตรกลีเซอไรด์ และกรดไขมัน ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของน้ำมัน โดยคำนวณความเข้มข้นน้ำมันจากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ค1) แทน  $x = \text{peak area}$  มีชุดควบคุม คือ น้ำเสียสังเคราะห์ที่เติมน้ำมันปาล์มแต่ไม่เติมแบคทีเรียวันที่ 0 และ 3

### 3.4.1.2 การ จัดจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมัน

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกระจายน้ำมัน ความไม่ชอบน้ำของเชื้อหุ้มเซลล์ (%) สูง ค่าความสามารถในการลดแรงตึงผิวสูงและมีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันมากกว่า 80% แล้วส่งแบคทีเรียไปจัดจำแนกอนุกรมวิธานโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ BLAST เพื่อดู %identity ของแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุด และนำข้อมูลไปตรวจสอบการก่อโดยจาก เว็บไซต์

[www.dmsc.moph.go.th/dmscnew/upload/regulations/29\\_58all.pdf](http://www.dmsc.moph.go.th/dmscnew/upload/regulations/29_58all.pdf) พระราชบัญญัติเชื้อโรค และพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 และเว็บไซต์ <http://www.bpat.in.th/doc/jobs.pdf> ประกาศ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรีย ที่เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค นำไปศึกษาต่อ

### 3.4.2 การตรึงเซลล์ของแบคทีเรียผสมในพอลิยูรีเทนโฟม (Polyurethane foam; PUF)

#### 3.4.2.1 ทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ทำโดยนำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB โดยทำการขีด เชื้อแต่ละชนิดให้ตัดผ่านกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB เพื่อดูการเจริญเติบโตว่าทั้งสามชนิดสามารถ เจริญเติบโตร่วมกันได้หรือไม่ จากนั้นเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นแยก เซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มา ละลายในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า เท่ากับ 1.0 แล้วนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ เนื่องจากแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกมานั้นมีเพียงสอง สายพันธุ์ที่ตรวจพบแล้วว่าไม่ก่อโรค แต่เนื่องด้วยจีนัสที่เหมือนกันจะมีกลไกการย่อยสลายไขมัน คล้ายคลึงกัน จึงทำการผสมแบคทีเรียชนิดอื่นเพื่อเพิ่มการทำงานในระบบ โดยผสมในสัดส่วนที่ เท่ากัน มาตรึงในพอลิยูรีเทนโฟม ขนาด 2x1x1 เซนติเมตร โดยชั่งโฟมปริมาณ 2.5 กรัม ใส่ในขวดรูป ชมพูที่บรรจุอาหารเหลว LB ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เติมน้ำสารแขวนลอยเซลล์ให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นา โนเมตร เท่ากับ 0.1

#### 3.4.2.2 ทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อในพอลิยูรีเทนโฟม

##### (Polyurethane foam)

นำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมมาตรึงในพอลิยูรีเทนโฟมขนาด 2x1x1 เซนติเมตร อ้างอิง ตามงานวิจัยของจิรภัทร จันทมาลี (2553) โดยชั่งพอลิยูรีเทนโฟมปริมาณ 0.25 กรัม ใส่ในขวดรูป ชมพูที่บรรจุอาหารเหลว LB ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เติมน้ำสารแขวนลอยเซลล์โดยวิธีจากข้อ 1 ให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 150 รอบต่อ นาที เก็บตัวอย่างเซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟมทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 5 วัน มานับจำนวนแบคทีเรีย โดย หยิบโฟม 1 ชิ้น มาชั่งน้ำหนัก ตัดให้เป็นชิ้นส่วนที่เล็กลง เพื่อเพิ่มพื้นที่ในของเซลล์ที่จะสัมผัสกับ

PUM buffer ใส่ในขวดทดลองขนาด 22 มิลลิลิตร แล้วเติม PUM buffer ให้ได้ความเจือจางเริ่มต้นที่  $10^{-1}$  โดยคำนวณจากน้ำหนักโฟม นำไป sonicate ด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 5 นาที และเขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำ ทั้งหมด 2 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ที่เกาะอยู่บนพอลิยูรีเทนโฟมหลุดออกมา จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่หลุดออกจากวัสดุตั้งมาเจือจางโดยวิธี 10-fold dilution แล้ววิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยการ spread plate ทหาระยะเวลา 18 ชั่วโมง เซลล์ที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากปริมาณเซลล์มีชีวิตที่เกาะบนวัสดุตั้งมากที่สุดในระยะเวลานี้ น้อย



รูปที่ 3.1 เซลล์ตรึงในวันที่ 1 (ซ้ายมือ) และวันที่ 5 (ขวามือ)

### 3.4.2.3 ทดสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียในรูปแบบเซลล์ตรึงก่อนนำมาใช้จริง

ทดสอบปริมาณแบคทีเรียในรูปแบบเซลล์ตรึงก่อนนำมาใช้จริง โดยการตรึงเซลล์ตามวิธีข้อ 1.1 เก็บเซลล์ตรึงในตู้แช่เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน แล้วนำเซลล์ตรึงที่เก็บมานับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตที่เกาะอยู่บนวัสดุตั้ง โดยนับแบคทีเรียที่ระยะเวลาที่ระยะเวลา 0-15 วัน 30 วัน และ 60 วัน และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน โดยใช้แบคทีเรียเซลล์ตรึงปริมาณ 1000 มิลลิกรัม ต่อน้ำเสียสังเคราะห์ 1 ลิตร และใช้น้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยวิธี TLC-FID

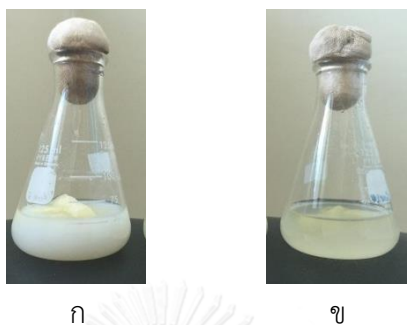
### 3.4.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงของแบคทีเรียผสม โดยศึกษา

#### จลนพลศาสตร์การย่อยสลายน้ำมันพืชในน้ำเสียสังเคราะห์

ทำโดยนำเซลล์ตรึงอายุ 10 วัน ของแบคทีเรียผสม มาทดสอบการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่งความเข้มข้นน้ำมันปาล์มที่นำมาศึกษาจลนพลศาสตร์มี 6 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 1.5, 5, 15, 40, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร โดยใช้แบคทีเรียเซลล์ตรึงปริมาณ 1000 มิลลิกรัม ต่อน้ำเสียสังเคราะห์ 1 ลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 เพื่อหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากพอลิยูรีเทนโฟมจากวิธีข้อ 1.1 และจากน้ำเสียสังเคราะห์ นำมาเจือจางโดยวิธี 10-fold dilution แล้ววิเคราะห์หา



จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยการ spread plate และหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยวิธี TLC-FID โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือน้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย และนำมาคิดอัตราการย่อยสลายน้ำมันแต่ละความเข้มข้น โดยคิดเป็นปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักแบคทีเรียต่อเวลา (กรัมไขมัน/กรัมแบคทีเรีย/ชั่วโมง) เพื่อศึกษาความเร็วของการย่อยสลายน้ำมันของแบคทีเรีย



รูปที่ 3.2 (ก) ชุดควบคุม และ (ข) การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

### 3.4.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจริงในระบบบำบัดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

#### 3.4.3.1 เก็บตัวอย่างน้ำเสียมาวิเคราะห์ค่าเบื้องต้น

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งน้ำเสียปนเปื้อนจากร้านอาหาร ทำโดยการเก็บน้ำเสียจากบ่อน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในร้านกาแฟอะเมซอนและร้านอาหาร McDonald ของสถานบริการน้ำมันปตท. วิภาวดีรังสิต(รูปที่ 3.4) โดยเก็บลึกลงจากผิวน้ำ 30 เซนติเมตร ปริมาณ 200 มิลลิลิตร นำมาปั่นเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอนอาหารขนาดใหญ่ออก จากนั้นนำมาวัดค่า pH ค่าซีโอดี และนำตัวอย่างน้ำเสีย 20 มิลลิลิตร จากทั้งสองแหล่งมาสกัดหาปริมาณไขมันในน้ำเสีย โดยเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดชั้นล่างที่เป็นส่วนของคลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลองใหม่ ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารจนเหลือปริมาตรคลอโรฟอร์มประมาณ 1 มิลลิลิตร และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไขมันด้วยวิธี TLC-FID วิเคราะห์ค่า pH ค่าซีโอดี ค่าบีโอดี และปริมาณไขมันของน้ำเสีย เพื่อเปรียบเทียบค่าจากทั้งสองแหล่ง เพื่อคัดเลือกแหล่งของน้ำเสียสำหรับนำมาใช้ในระบบบำบัดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ และเก็บตัวอย่างน้ำเสียจริงในทุกๆ สัปดาห์เพื่อหาปริมาณไขมันของน้ำเสียในแต่ละเดือน



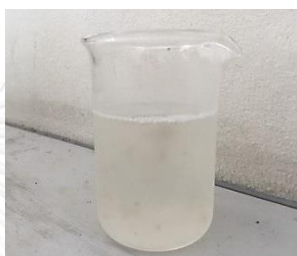
ก



ข



ค



ง

รูปที่ 3.3 ตัวอย่างบ่อน้ำเสียปนเปื้อนไขมันใน (ก) ร้านกาแฟอะเมซอน (ข) ร้านอาหาร Mc Donald (ค) ตัวอย่างน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในร้านกาแฟอะเมซอน และ (ง) ร้านอาหาร Mc Donaldของสถานีบริการน้ำมันปตท. วิศวกรรมศาสตรมหาวิทาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

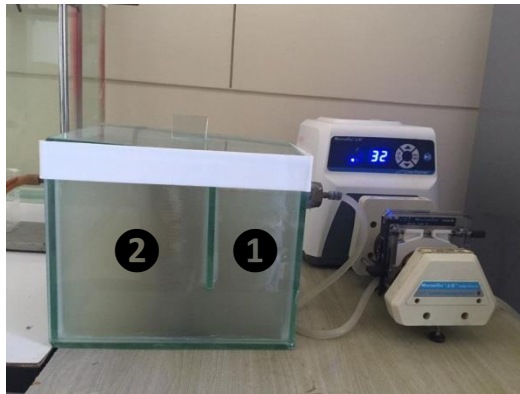
#### 3.4.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงระดับห้องปฏิบัติการ

เลือกน้ำเสียจากแหล่งน้ำเสียในข้อ 3.4.3.1 โดยการพิจารณาจากค่า pH ค่าซีโอดี และปริมาณไขมันของน้ำเสีย ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันของแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงโดยนำเซลล์ตรึงอายุ 10 วัน ของแบคทีเรียผสม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุน้ำเสียจริงในอัตราส่วนเซลล์ตรึง 1 กรัมต่อน้ำเสีย 1 ลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำเสียและเซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟม มานับจำนวนแบคทีเรียตามข้อ 1.1 และหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยวิธี TLC-FID วิเคราะห์ค่า pH ค่าซีโอดี โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือน้ำเสียจริงที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียในรูปแบบเซลล์ตรึง

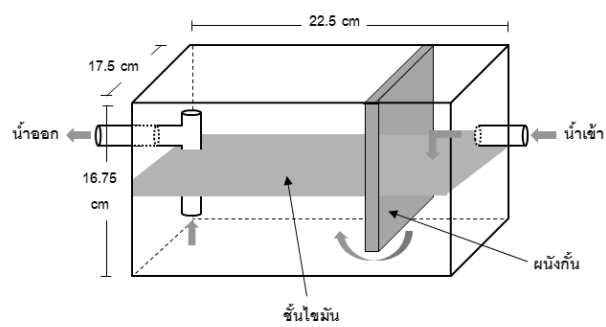
### 3.4.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันโดยระบบบำบัดจำลองระดับ

#### ห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียเซลล์ตรึงในระยะเวลาที่เหมาะสมมาทดสอบการบำบัดน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันที่เก็บจากร้านอาหาร ปริมาณ 20 ลิตร สัปดาห์ละ 2 ครั้ง เพื่อความต่อเนื่องในการทดลอง นำตัวอย่างน้ำเก็บ ในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพน้ำไม่ให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่าตลอดระยะเวลาการทดลอง วิเคราะห์ค่า pH ค่าซีโอดี ค่าดีไอ ปริมาณแบคทีเรียและปริมาณไขมันของน้ำเสีย ก่อนเข้าบำบัดเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเสียหลังจากผ่านกระบวนการบำบัดด้วยระบบตัวกรองชีวภาพ โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด คือ ชุดควบคุมถังดักไขมันเปล่า ชุดการทดลองใช้วัสดุตรึงเปล่าเติมอากาศ และชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงเติมอากาศ การเติมเซลล์ตรึงใช้เซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟมโดยดูจากอัตราการย่อยสลายน้ำมันกรัมน้ำมันต่อกรัมแบคทีเรียต่อชั่วโมง ใส่ตะแกรงลวดสี่เหลี่ยมขนาด 10x17 เซนติเมตร นำไปใส่ลงในถังดักไขมันแบบจำลองขนาด 4 ลิตร (รูป 3.5ข) โดยใส่ตะแกรงในแนวตั้งขนานกับผนังกัน เพื่อให้เซลล์ตรึงสามารถสัมผัสกับไขมันที่ละลายในน้ำและที่อยู่บนผิวน้ำได้ บรรจุน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมัน การเติมอากาศจากปั้มน้ำ lifetech ลงในช่องที่ 2 ของถังดักไขมันให้ค่าดีไอเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อไม่ให้อากาศดันเซลล์ตรึงไปกองไว้ที่ด้านในด้านบนหนึ่งของถังดักไขมัน มีการควบคุมค่า HRT 12 ชั่วโมง (รูปที่ 3.5ก) เพื่อจำลองกิจกรรมการใช้บ่อดักไขมันจริงของร้านอาหาร โดยการปั้มน้ำเข้าในถังดักไขมัน 4 ลิตรต่อวัน เก็บตัวอย่างน้ำเข้าจากตัวอย่างน้ำเสียก่อนปั้มน้ำเข้าในระบบ น้ำขาออกจากตัวอย่างน้ำเสียที่ออกจากถังดักไขมันจำลองแล้ว และเซลล์ตรึงของแต่ละชุดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ค่า pH ค่าซีโอดี ค่าดีไอ ค่าบีโอดี และปริมาณไขมันของน้ำเสียที่เหลืออยู่โดยวิธี TLC-FID รวมทั้งหาอัตราการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมัน โดยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง LB ความเข้มข้น 25 เพอร์เซ็นต์ ส่งตัวอย่างพอลิยูรีเทนโฟมที่ผ่านการใช้ในระบบไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สังเกตลักษณะของไขมันหรือน้ำมันในบ่อดักไขมัน เติบระบบและเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ดูประสิทธิภาพของระบบและอายุการใช้งานของเซลล์ตรึง



ก



ข

รูปที่ 3.4 (ก) ระบบถังตกไขมันแบบจำลอง ขนาด 4 ลิตร ต่อกับ Peristaltic pump โดยควบคุมค่า HRT 12 ชั่วโมง และ (ข) ระบบถังตกไขมันแบบจำลอง ขนาด 4 ลิตร



รูปที่ 3.5 ตะแกรงลวดอลูมิเนียมทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่บรรจุเซลล์ตรึงบนวัสดุตรึง

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การคัดกรองแบคทีเรียย่อยสลายไขมันที่คัดแยกจากตัวอย่างน้ำทิ้งและดินบริเวณบ่อดักไขมัน

แบคทีเรียย่อยสลายไขมันที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้คัดแยกโดยนางสาวนันท์ธร เการาช คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะเหมือนกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* และ *Lactobacillus* ทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยการฉีดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ได้ทั้งหมด 17 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1)

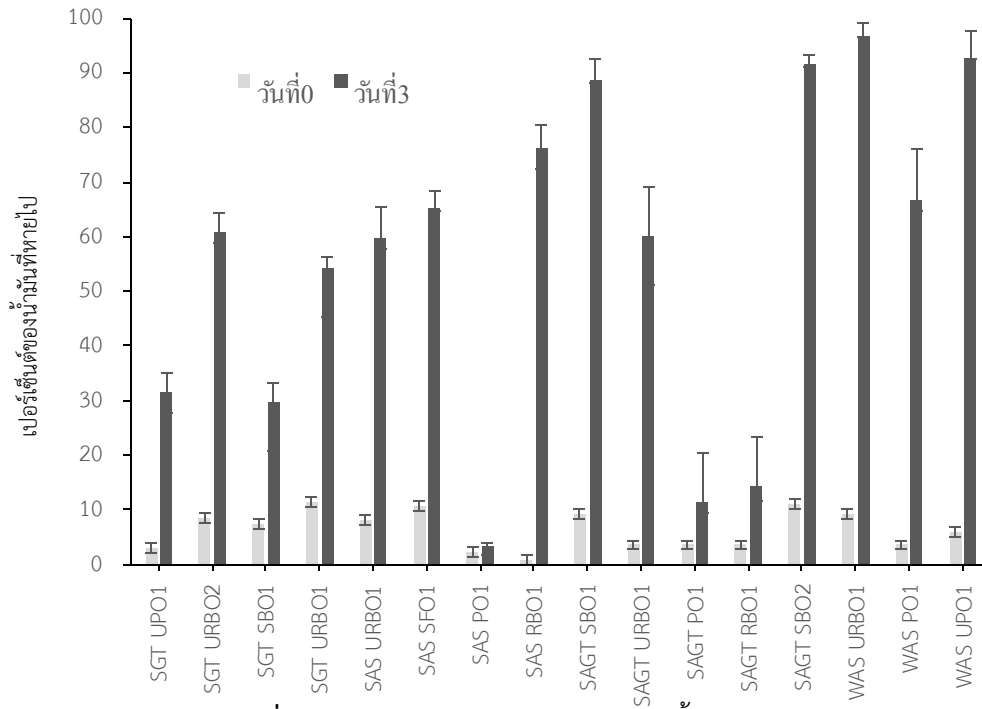
##### 4.1.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดเลือก 17 ไอโซเลท

ทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียพบว่า การย่อยสลายน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเชื้อทั้ง 17 ไอโซเลท พบว่า มี 4 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มมากกว่า 80% คือ WAS URBO1(97%), WAS UPO1(93%), SAGT SBO2(92%) และ SAGT SBO1(89%) (รูปที่ 4.1) ซึ่งเมื่อนำไปพิจารณากับจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของจำนวนแบคทีเรียในกลุ่มที่สูงที่สุด คือ มากกว่า 10% (รูปที่ 4.2)

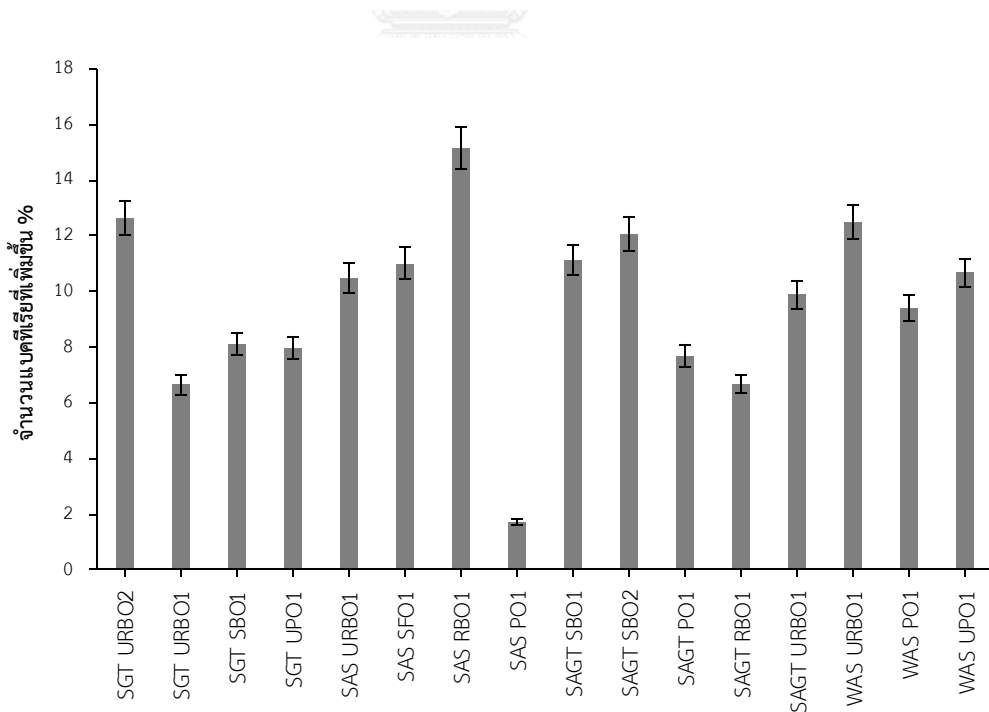
ตารางที่ 4.1 ความชุ่มของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน

ตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ความชุ่มของเชื้อ
ชุดควบคุม		
SGT UPO1	ดินในบ่อดักไขมัน	++
SGT URBO1	ดินในบ่อดักไขมัน	++
SGT SBO1	ดินในบ่อดักไขมัน	++
SGT URBO2	ดินในบ่อดักไขมัน	+++
SAS URBO1	ดินในแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	+++
SAS SFO1	ดินในแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	+++
SAS RBO1	ดินในแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	+++
SAS PO1	ดินในแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	+
SAGT SBO2	ดินรอบบ่อดักไขมัน	+++
SAGT URBO1	ดินรอบบ่อดักไขมัน	+++
SAGT RBO1	ดินรอบบ่อดักไขมัน	++
SAGT PO1	ดินรอบบ่อดักไขมัน	++
SAGT SBO1	ดินรอบบ่อดักไขมัน	+++
WAS URBO1	น้ำทิ้งบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	+++
WAS PO1	น้ำทิ้งบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	+++
WAS SFO1	น้ำทิ้งบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	+++
WAS UPO1	น้ำทิ้งบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์	+++

\* + คือชุ่มเล็กน้อย ++ คือชุ่มปานกลาง +++ คือชุ่มมาก



รูปที่ 4.1 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม (%)



รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์แบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นใน 3 วัน

#### 4.1.2 ผลการจัดจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมัน

แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มมากกว่า 80% มีแนวโน้มในการผลิตสารแรงดึงผิว และมีความสามารถในการกระจายน้ำมัน คือ WAS URBO1, WAS UPO1, SAGT SBO2 และ SAGT SBO1 จึงส่งตัวอย่างแบคทีเรียไปจัดจำแนกอนุกรมวิธานโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ได้ตามตารางที่ 4.2 แล้วนำมาตรวจสอบการก่อโรคจากเว็บไซต์พระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 และประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พบว่าแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1 และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1

ตารางที่ 4.2 การจัดจำแนกอนุกรมวิธานของแบคทีเรียโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

ตัวอย่าง	Accession number	ชนิดของแบคทีเรียใกล้เคียง	ความยาว ดีเอ็นเอ	% ความเหมือน
WAS URBO1	HM469385.1	<i>Bacillus subtilis</i>	1046 bp	99
WAS UPO1	KF601957.1	<i>Bacillus cereus</i>	1557 bp	98
SAGT SBO2	KM248376.1	<i>Bacillus cereus</i>	1572 bp	98
SAGT SBO1	KT358972.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	985 bp	99

#### 4.2 การตรึงเซลล์ของแบคทีเรียผสมในพอลิยูรีเทนโฟม (Polyurethane foam; PUF)


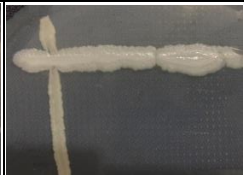
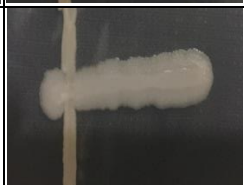
##### 4.2.1 ผลการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์

การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1, *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1 และเพิ่มเชื้อ *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 ที่คัดแยกมาจากดินรอบในบ่อ Grease trap ซึ่งได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของ *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 ในภายหลัง พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 3 วัน เท่ากับ 89% และมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น 11% ไม่พบว่าเป็นเชื้อก่อโรค *Paenibacillus elgii* เป็นแบคทีเรียใช้อากาศ แกรมลบ เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรม การเกษตรและยังเป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์ (Piuri และคณะ, 1998) จากการทดสอบความเป็น



ปฏิสัมพันธ์พบว่าเชื้อทั้งสามสามารถเจริญเติบโตด้วยกันได้ ตามตารางที่ 4.3 ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้สามารถย่อยสลายไขมันได้ดีกว่า งานวิจัยของ Bala และคณะ (2014) ที่คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยได้นำแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ 103PB และ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ 106 PB มาทดสอบในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่มีความเข้มข้นไขมันเริ่มต้น 190.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 85.14 เปอร์เซ็นต์และ 83.04 เปอร์เซ็นต์ ใน 5 วัน ตามลำดับ โดยทั่วไป *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมัน ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน ทำให้ไตรกลีเซอไรด์เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะเอสเทอร์แล้วแตกตัวเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ไปใช้เป็นพลังงานในการเจริญของเซลล์ ส่วนกลีเซอรอลจะถูกย่อยสลายจนกระทั่งเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) ได้เป็นฟอสโฟอินอลไพรูเวท (phosphoenolpyruvate) และเข้าวัฏจักรเครบส์ต่อไป

ตารางที่ 4.3 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบแข็ง

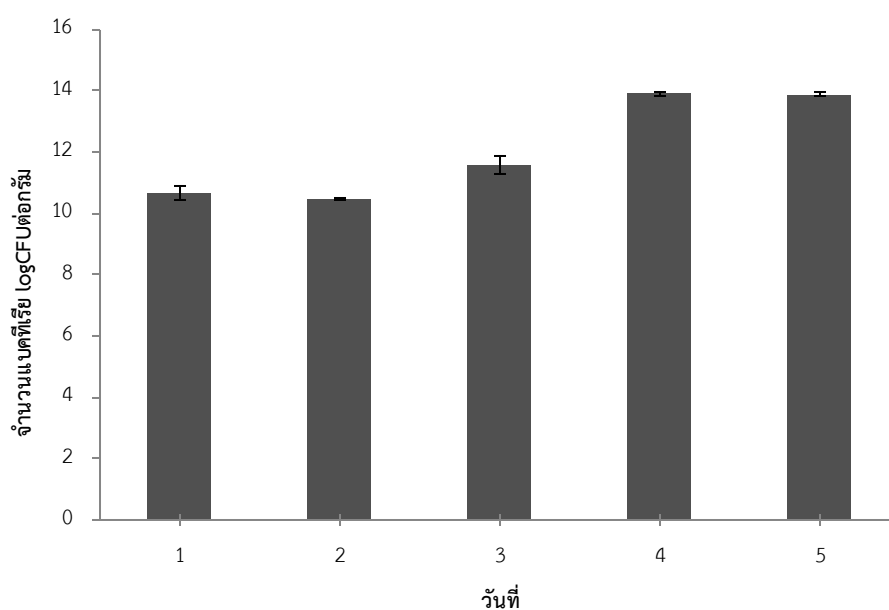
ชื่อสายพันธุ์	ผลการเจริญเติบโต	
	<i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ URBO1	<i>Paenibacillus elgii</i> สายพันธุ์ RO3
<i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ SBO1		
<i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ URBO1	N	

n ไม่ได้ทำการทดสอบ

#### 4.2.2 ผลการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อในพอลิยูรีเทนโฟม

เมื่อทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อในพอลิยูรีเทนโฟมของแบคทีเรียผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1, *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1 และ *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 พบว่าจำนวนแบคทีเรียมีปริมาณมากที่สุดและใกล้เคียงกันในวันที่ 4 และวันที่ 5 ดังรูปที่ 4.3 และเมื่อพิจารณาจากปริมาณแบคทีเรียที่มีจำนวนใกล้เคียงกันของทั้งสองวันดังกล่าว ทำให้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสมในพอลิยูรีเทนโฟมที่จะได้จำนวนแบคทีเรียปริมาณมากที่สุดในระยะเวลาที่สั้นคือ 4 วัน ซึ่งมีการเกาะติดของเซลล์บนพอลิยูรีเท

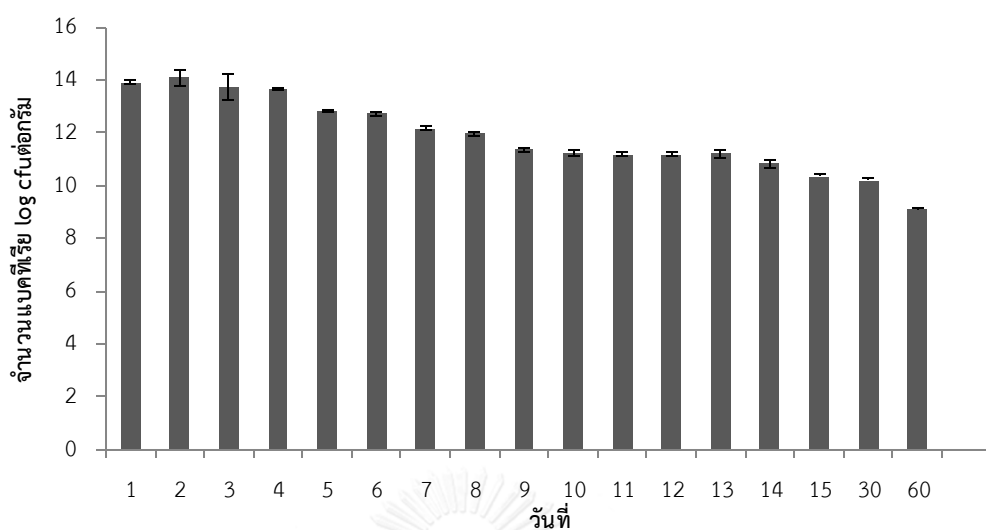
นโพน 13.9 logCFUต่อกรัม เนื่องจากลักษณะที่เป็นรูปทรงของพอลิยูรีเทนโพน รูปทรงค่อนข้างสูงทำ ให้มีพื้นที่ผิวในการเกาะติดของจุลินทรีย์ได้มาก (Oh และคณะ, 2000)



รูปที่ 4.3 จำนวนแบคทีเรีย (logCFUต่อกรัม) ของแบคทีเรียผสมจากพอลิยูรีเทนโพนวันที่ 1 ถึง 5

#### 4.2.3 การเก็บรักษาและปริมาณเชื้อแบคทีเรียในรูปแบบเซลล์ตรึงก่อนนำมาใช้จริง

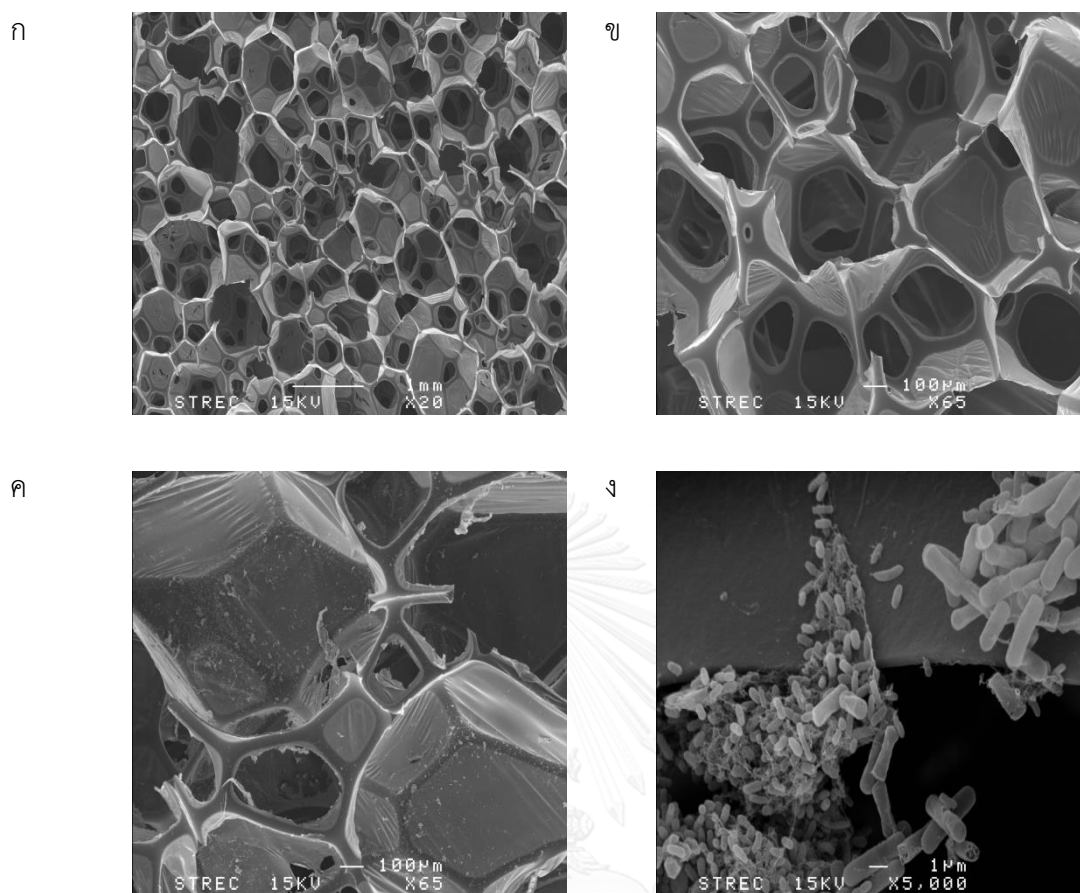
เมื่อนำเซลล์ตรึงของแบคทีเรียผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1, *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1 และ *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 ที่เก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0-15 วัน 30 วัน และ 60 วัน มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่อยู่บนพอลิยูรีเทนโพน พบว่าเซลล์ที่มีชีวิตบนพอลิยูรีเทนโพน มีจำนวนเซลล์เริ่มคงที่ในช่วงวันที่ 10-13 ซึ่งมีจำนวนเซลล์อยู่ที่ 11.18-11.23 logCFUต่อกรัม และเมื่อเวลา 30 วัน หรือ 1 เดือน มีเซลล์ที่มีชีวิตบนพอลิยูรีเทนโพนจำนวน 10.17 logCFUต่อกรัม (รูปที่ 4.4) ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของเซลล์ตรึง มีค่าในช่วง 72-88% (ตารางที่ 4.5) เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบเซลล์แบคทีเรียปริมาณมากบนโครงสร้างของพอลิยูรีเทนโพน (รูปที่ 4.5 ข) แสดงว่าเซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทน โพนสามารถเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน โดยมีปริมาณแบคทีเรียลดลงเพียง 26% เมื่อเทียบกับการเตรียมใหม่ ช่วยให้มีความสะดวกในการจัดเก็บและขนส่งในการใช้จริง



รูปที่ 4.4 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บนเซลล์ตรึงหลังจากเก็บเซลล์ตรึงที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0-15 วัน 30 วัน และ 60 วัน

ตารางที่ 4.4 การย่อยไขมันจากน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของแบคทีเรียผสมบนพอลิยูรีเทนโฟม โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้วัสดุตรึงซึ่งเก็บที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (วัน)	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยแบคทีเรียผสมบนเซลล์ตรึงในน้ำเสียสังเคราะห์
5	88.5±2.1
10	83.0±0.6
15	76.0±2.3
30	72.1±1.4
60	68.9±3.9
ชุดควบคุม	1.81±4.0



รูปที่ 4.5 ลักษณะของพอลิยูรีเทนโฟมผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

(ก) พอลิยูรีเทนโฟมที่กำลังขยาย 20 เท่า และ (ข) 65 เท่า

(ค) แบบที่เรียบบนพอลิยูรีเทนโฟมก่อนการใช้งานกำลังขยาย 65 เท่า และ (ง) 5000 เท่า ตามลำดับ

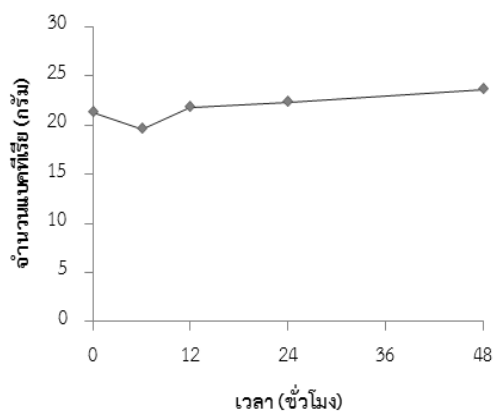
#### 4.2.4 ผลการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันพืชที่ความเข้มข้นต่างๆในน้ำเสียสังเคราะห์ของเซลล์ตรึงของแบคทีเรียผสม

การศึกษาจลนพลศาสตร์ในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียปนเปื้อนไขมันของแบคทีเรียผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1, *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1 และ *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 โดยทดสอบแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟม ใช้น้ำมันปาล์มเป็นต้นแบบในการศึกษา โดยศึกษาทั้งหมด 6 ความเข้มข้น คือ 1.5, 5, 15, 40, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์และมีการให้ออกซิเจน

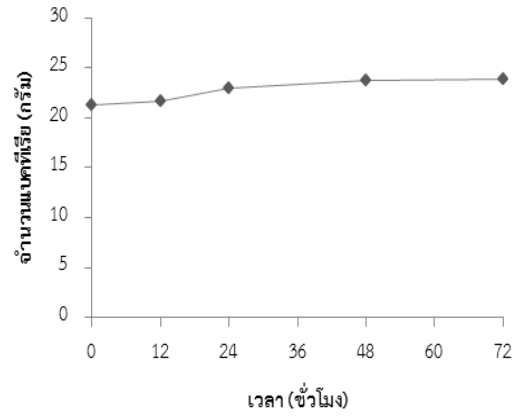
เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึงบนโพลียูรีเทนโพนสามารถเจริญได้ค่อนข้างดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มทั้ง 6 ความเข้มข้น และสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1.5 และความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 24 น้ำมันปาล์มความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนโพลียูรีเทนโพนย่อยสลายได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง และน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ของการย่อยสลายน้ำมันปาล์มแต่ละความเข้มข้นแสดงดังรูปที่ 4.7

การทดสอบการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึง พบว่าแบคทีเรียเจริญได้ค่อนข้างดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มทั้ง 6 ความเข้มข้น โดยมีแบคทีเรียเริ่มต้นจำนวนประมาณ 21 กรัม (รูปที่ 4.6) อย่างไรก็ตามกราฟการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพเมื่อน้ำมันปาล์มมีความเข้มข้น 1.5-15 กรัมต่อลิตร แต่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 40-100 กรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพจะค่อยๆลดลง

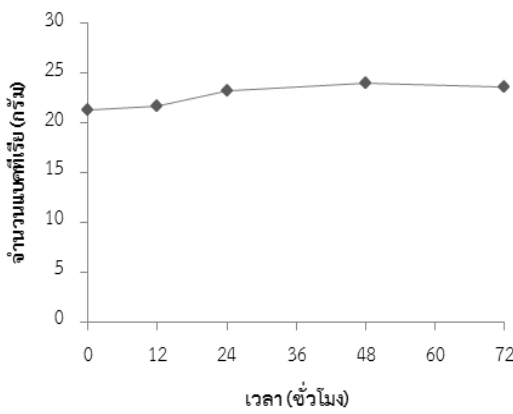




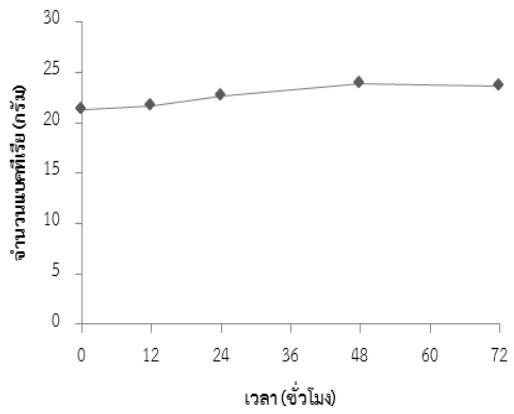
ก.



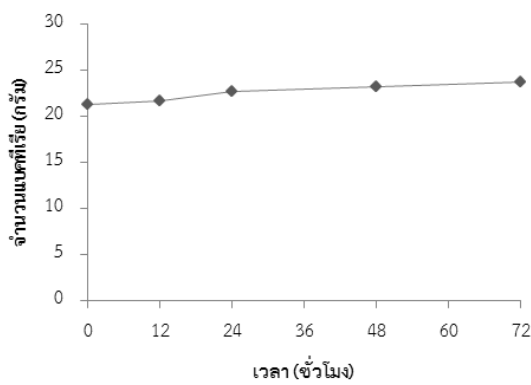
ข.



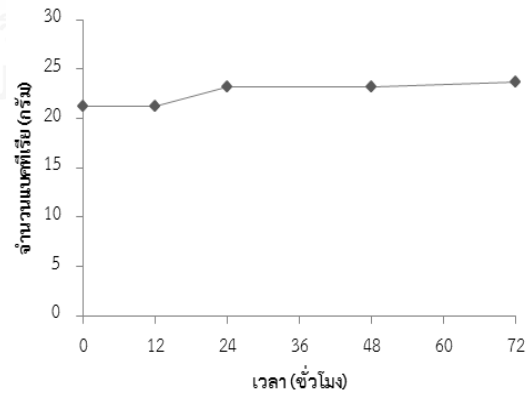
ค.



ง.



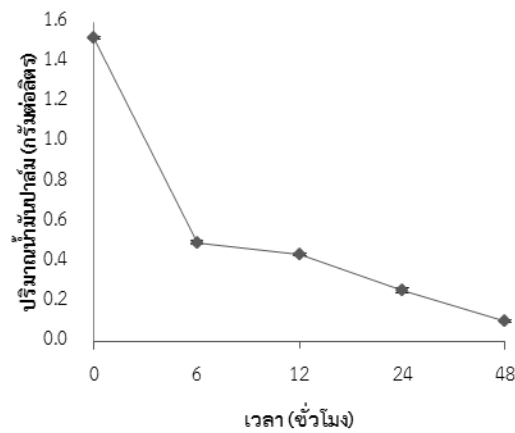
จ.



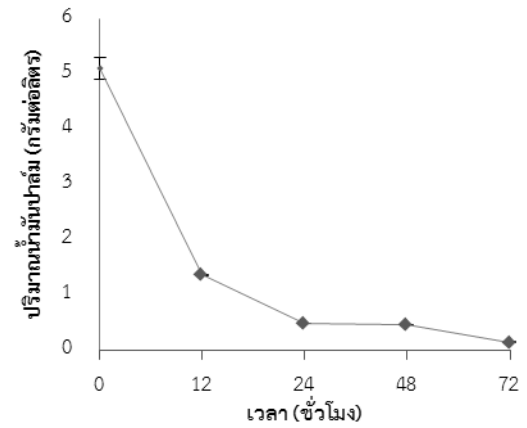
ฉ.

รูปที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันความเข้มข้นต่างๆ

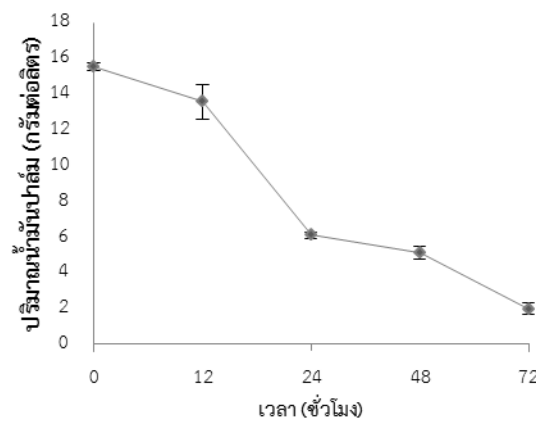
(ก) น้ำมันปาล์ม 1.5 กรัมต่อลิตร (ข) น้ำมันปาล์ม 5 กรัมต่อลิตร (ค) น้ำมันปาล์ม 15 กรัมต่อลิตร (ง) น้ำมันปาล์ม 40 กรัมต่อลิตร (จ) น้ำมันปาล์ม 60 กรัมต่อลิตร และ (ฉ) น้ำมันปาล์ม 100 กรัมต่อลิตร



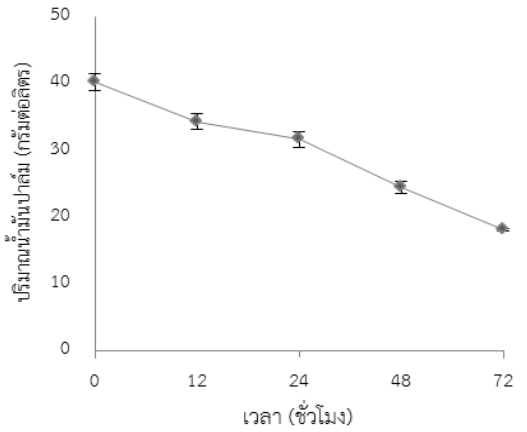
ก.



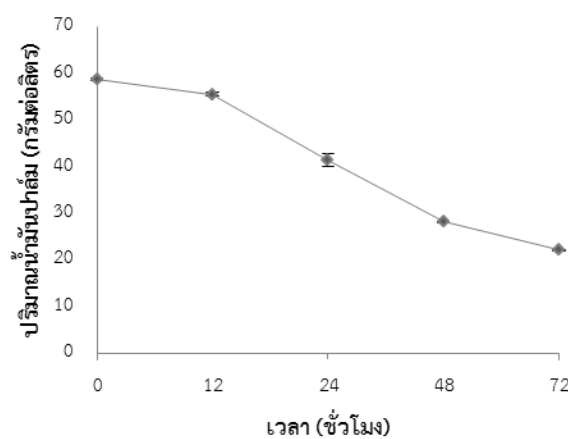
ข.



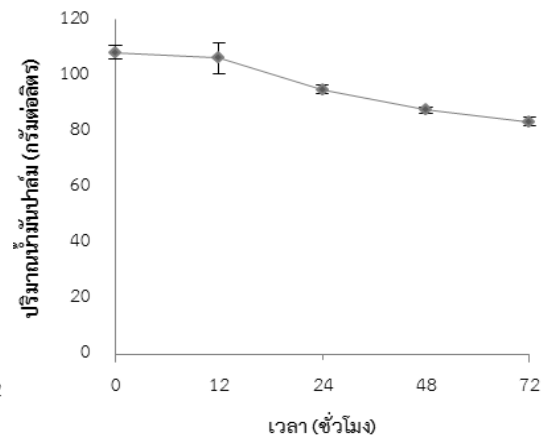
ค.



ง.



จ.

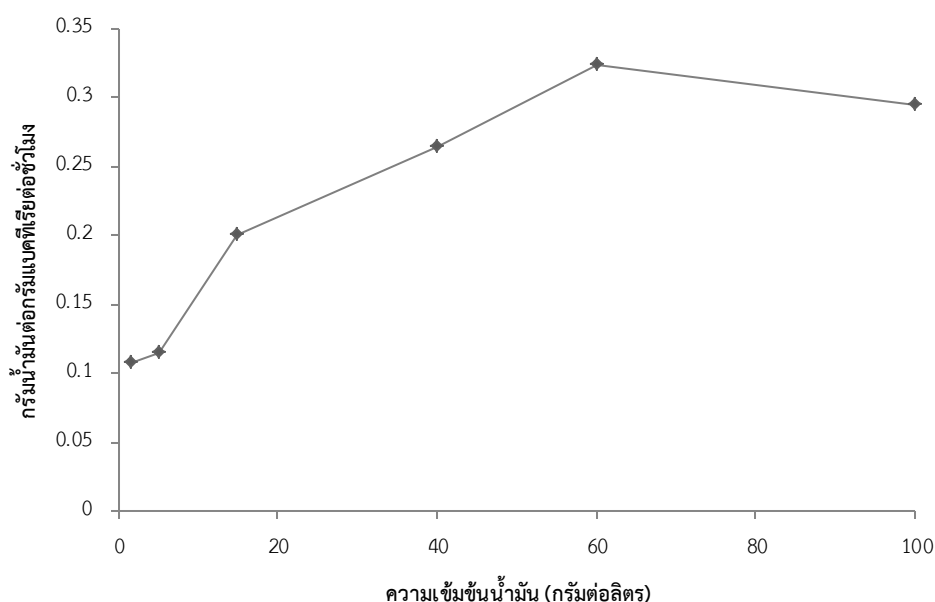


ฉ.

รูปที่ 4.7 ปริมาณน้ำมันปาล์มความเข้มข้นต่างๆที่ทยอยสลายโดยแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึงในน้ำเสียสังเคราะห์ (ก) น้ำมันปาล์ม 1.5 กรัมต่อลิตร (ข) น้ำมันปาล์ม 5 กรัมต่อลิตร (ค) น้ำมันปาล์ม 15 กรัมต่อลิตร (ง) น้ำมันปาล์ม 40 กรัมต่อลิตร (จ) น้ำมันปาล์ม 60 กรัมต่อลิตร และ (ฉ) น้ำมันปาล์ม 100 กรัมต่อลิตร

#### 4.2.5 ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียปนเปื้อนไขมันของ เซลล์ตรึงของแบคทีเรียผสม

เมื่อคิดเป็นอัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์มทั้ง 6 ความเข้มข้น พบว่าอัตราการย่อยสลาย น้ำมันปาล์มของการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึงเริ่มคงที่ เมื่อน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้นเริ่มต้นมากกว่า 60 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.8) แสดงถึงความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มสูงสุดที่ เซลล์สามารถใช้ได้ ปริมาณเซลล์ที่ stationary phase จะเพิ่มขึ้นในอัตราที่ลดลงตามลำดับ เนื่องจากการ สะสมพิษที่เกิดจากการเจริญของเซลล์เองและการสะสมสารพิษนี้ เมื่อเพิ่มขึ้นมากถึงจุดหนึ่งแล้ว จะทำให้เซลล์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้ แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มอีกก็ตาม โดย แบคทีเรียตรึงมีอัตราการย่อยสลายน้ำมัน เท่ากับ 0.32 กรัมไขมันต่อกรัมแบคทีเรียต่อชั่วโมง เกิดจาก การทำงานร่วมกันของแบคทีเรียหลายชนิด โดยแบคทีเรียที่นำมาเป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกจากแหล่ง ธรรมชาติ จากตัวอย่างดินในและรอบบ่อดักไขมันและบ่อแอคติเวทเต็ดสลัดจ์ น้ำทิ้งในบ่อแอคติเวท เต็ดสลัดจ์ ของระบบบำบัดน้ำเสียร้านอาหาร ทำให้เมื่อนำไปใช้จริงจะเป็นการเพิ่มแบคทีเรียในแหล่ง เดิม ทำให้เกิดการย่อยสลายไขมันได้เร็วขึ้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการย่อย สลายนี้ จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการนำไปใช้บำบัดไขมัน ในน้ำเสียในบ่อดักไขมัน รวมทั้งการจัดการระบบบำบัดให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 4.8 อัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึง



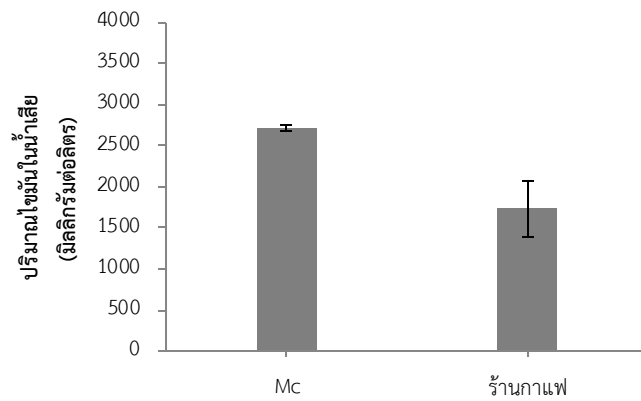
### 4.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจริงในระบบบำบัดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

#### 4.3.1 ผลการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย

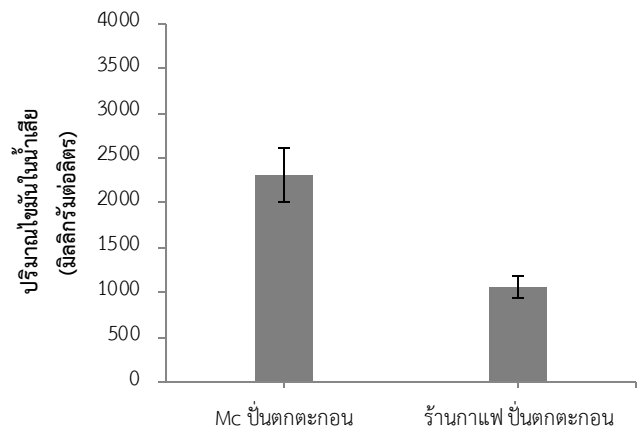
การวิเคราะห์ค่า pH ค่าซีโอดีและปริมาณไขมันในน้ำเสียจากแหล่งน้ำเสียสองแหล่ง คือ ร้านอาหาร Mc Donald และ ร้านกาแฟพบว่า ค่า pH และค่าซีโอดี ของทั้งสองแหล่งมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.5) ต่างจากปริมาณไขมันในน้ำเสียผ่านการปั่นเหวี่ยงและไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง เพื่อกำจัดเศษตะกอนหนักขนาดใหญ่ที่สามารถจมตัวเมื่อผ่านการบำบัดโดยถังตกไขมัน ให้น้ำเสียที่เป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าปริมาณไขมันในน้ำเสียของร้านอาหารมีค่าประมาณ 2300 และ 2700 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าปริมาณไขมันในน้ำเสียของร้านกาแฟที่มีค่า 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อผ่านการปั่นเหวี่ยง และ 1700 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (รูปที่ 4.9) ดังนั้นจึงเลือกน้ำเสียในร้านอาหาร Mc Donald มาใช้ในการทดลองในระบบบำบัดขนาดจำลองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยดูจากปริมาณไขมันที่มีค่ามากกว่าร้านกาแฟ เมื่อทำการเก็บน้ำเสียบ่อน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในร้านอาหารโดยเก็บลึกลงจากผิวน้ำ 30 เซนติเมตร ปริมาณ 200 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์ค่าปริมาณไขมันในระยะทำการทดลองในขั้นที่ต่อไปตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม พบว่าค่าปริมาณไขมันในน้ำเสียของในแต่ละสัปดาห์ในเดือนเดียวกันจะมีค่าปริมาณไขมันใกล้เคียงกัน แต่จะลดน้อยลง(รูปที่ 4.10) แสดงว่าคุณภาพของน้ำเสียเกี่ยวข้องกับฤดูกาลและจากการสอบถามน้ำเสียร้านอาหาร Mc Donald มีแหล่งกำเนิดน้ำเสียจากน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว และน้ำมันจากการทอดนมและครีม ซอส น้ำอัดลมและการชะล้างภาชนะต่างๆโดยผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด

ตารางที่ 4.5 ค่า pH และ ค่าซีโอดีจากแหล่งตัวอย่างน้ำเสีย

แหล่งน้ำเสีย	ผ่านการปั่นเหวี่ยง		ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง	
	COD	pH	COD	pH
Mc Donald	2517	6.2	2850	6.2
ร้านกาแฟ	2467	6.14	2767	6.14



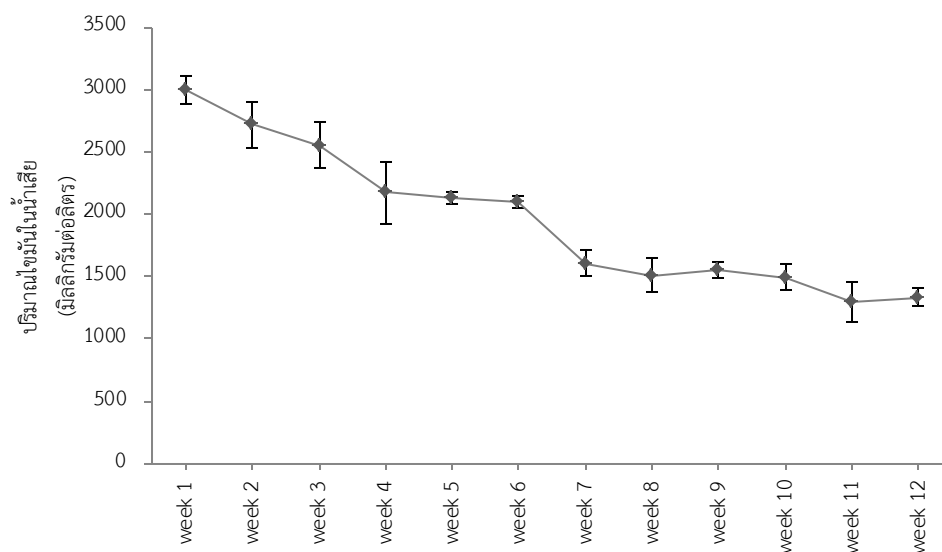
ก



รูปที่ 4.9 ปริมาณไขมันในแหล่งน้ำเสียน้ำ

(ก.) ปริมาณไขมันในน้ำเสียน้ำจากร้าน Mc Donald และร้านกาแฟที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง

(ข.) ปริมาณไขมันในน้ำเสียน้ำจากร้าน Mc Donald และร้านกาแฟที่ผ่านการปั่นเหวี่ยง



**รูปที่ 4.10** ปริมาณไขมันจากร้านอาหาร Mc Donald ในแต่ละสัปดาห์ (week 1-2 คือเดือนพฤษภาคม week 3-6 คือเดือนมิถุนายน week 7-10 คือเดือนกรกฎาคม week 11-12 คือเดือนสิงหาคม)

#### 4.3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในขวดรูปชมพู่ โดยเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน กับ น้ำเสียจากร้านอาหาร Mc Donald ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตของชุดควบคุมเมื่อผ่านไป 5 วัน มีค่าเท่ากับ 13.21 logCFUต่อลิตร และปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่อยู่บนพอลิยูรีเทนโพรของชุดทดลองเมื่อผ่านไป 5 วันมีค่าเท่ากับ 13.90 logCFUต่อกรัม และค่า pH ของชุดการทดลองที่มีเซลล์ตรึงมีค่าเท่ากับ 4.7 กับชุดควบคุมน้ำเสียจากร้านอาหาร Mc Donaldที่ไม่มีเซลล์ตรึงมีค่าเท่ากับ 4.54 ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.45 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันพบว่า ปริมาณไขมันเริ่มต้นของน้ำเสียจริงมีค่าประมาณ 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดควบคุมมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันใน 5 วัน เท่ากับ 19 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้คาดว่าลดลงเนื่องด้วยปริมาณเชื้อเดิมที่มีอยู่ในน้ำเสีย (13.51 logCFUต่อลิตร) และชุดทดลองที่มีการใส่แบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันใน 5 วันเท่ากับ 46 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6)

**ตารางที่ 4.6** ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันที่ระยะเวลา 5 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมน้ำเสียจากร้านอาหาร Mc Donald ที่ไม่มีเซลล์ตรึงโดยปริมาณไขมันในน้ำเสียเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลอง	ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันใน 5 วัน (เปอร์เซ็นต์)
	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	
ชุดทดลอง	1230.23±15.27	515.49±99.49	500.86±38.61	59
ชุดควบคุม	1327.58±12.32	1067.56±16.28	989.63±7.56	19

#### 4.3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันโดยระบบบำบัดขนาดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

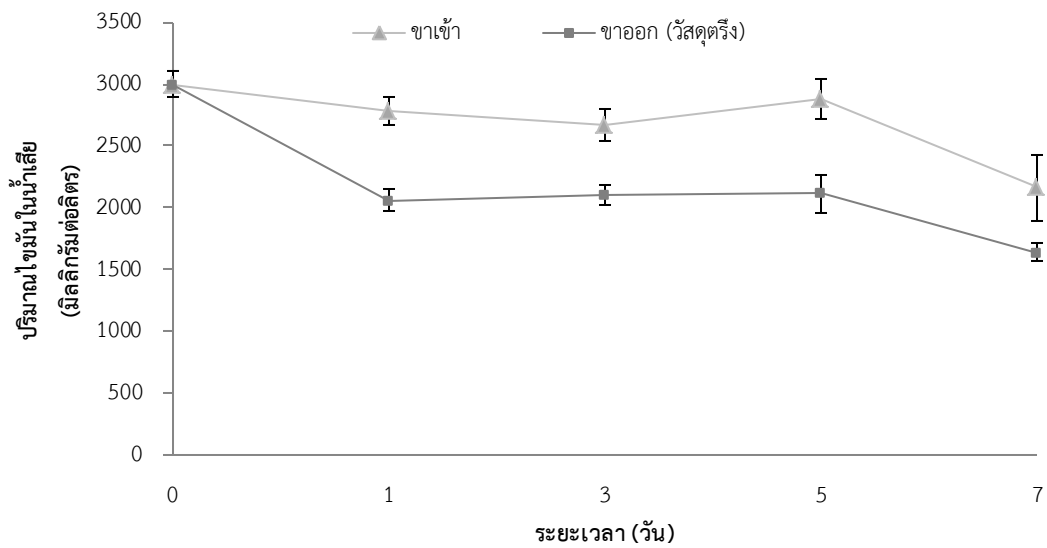
ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงในน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ 1200-3000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากร้านอาหาร Mc Donald โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด ได้แก่ ชุดควบคุม ชุดการทดลองใช้วัสดุตรึงที่มีการเติมอากาศ และชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงและเติมอากาศโดยการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงโดยคำนวณจากอัตราการย่อยสลายน้ำมัน เท่ากับ 0.32 กรัมไขมันต่อกรัมแบคทีเรียต่อชั่วโมง ซึ่งในการเปิดระบบ 12 ชั่วโมง ในการย่อยสลายไขมันประมาณ 3000 มิลลิกรัมต่อลิตรต้อง ใช้แบคทีเรีย 0.96 กรัม ในเซลล์ตรึง 1 กรัม มีปริมาณ 0.25 กรัม จึงต้องใช้ปริมาณแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงประมาณ 3.84 กรัม

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในระบบของชุดการทดลองใช้วัสดุตรึงที่มีการเติมอากาศกับชุดควบคุม ค่า pH ของระบบอยู่ในช่วง 4.4 ถึง 5.3 อาจเกิดจากน้ำเสียจากร้านอาหาร สารอินทรีย์ปนเปื้อนเป็นจำนวนมาก และการที่น้ำเสียเกิดการทิ้งไว้ไม่บำบัดโดยเร็วทำให้เกิดกระบวนการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย เช่น การย่อยโปรตีนทำให้ไนโตรเจนและกำมะถันในโปรตีนเปลี่ยนเป็น แอมโมเนีย และก๊าซไข่เน่า ( $H_2S$ ) ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นและน้ำเสียมีสภาพเป็นกรด (รูปที่ 4.13ก และ 4.13ข) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ในชุดการทดลองมีความเข้มข้นของไขมันเหลืออยู่ประมาณ 1630 มิลลิกรัมต่อลิตร จากความเข้มข้นไขมันประมาณ 2200 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.11ก) ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันคิดเป็น 23 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.11ข) และในชุดควบคุมมีปริมาณไขมันเหลืออยู่ประมาณ 1470 มิลลิกรัมต่อลิตร จากความเข้มข้นไขมันประมาณ 1520 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.12ก) ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันคิดเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับน้ำขาเข้า (รูปที่ 4.12ข) เช่นเดียวกับค่าซีโอดีทั้งของชุดควบคุมและชุดทดลองใช้วัสดุเซลล์ตรึงที่มีการเติมอากาศมีค่าลดลงเพียง 3 เปอร์เซ็นต์ และ 28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 4.14) ค่าบีโอดีของ

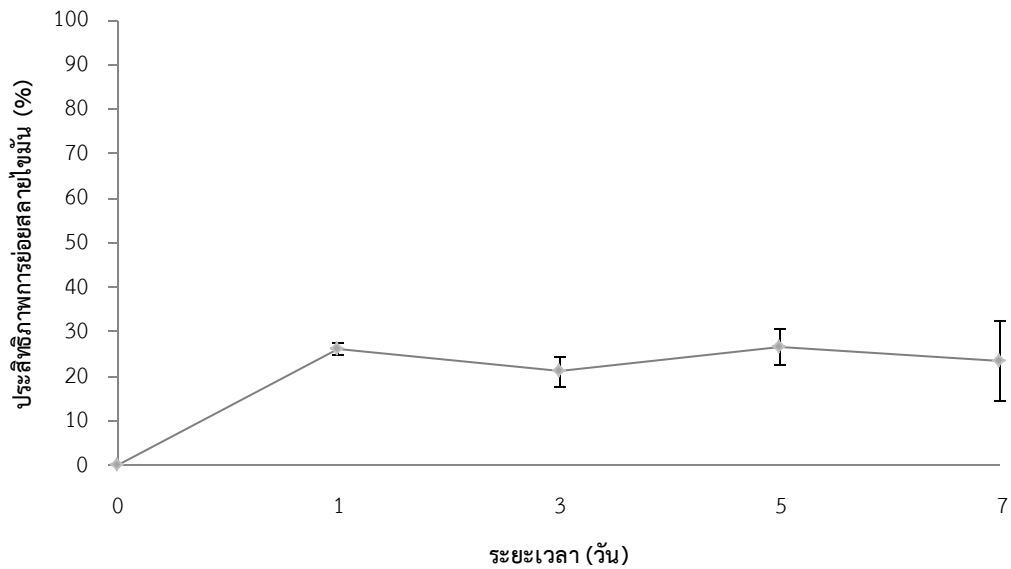
ชุดควบคุมมีค่าลดลงจาก 649 มิลลิกรัมต่อลิตรเหลือ 399 มิลลิกรัมต่อลิตร และการทดลองใช้วัสดุ  
ตรึงที่มีการเติมอากาศมีค่าลดลงจาก 867 มิลลิกรัมต่อลิตรเหลือ 433 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามตารางที่  
4.7 และชุด และค่า pH ในน้ำขาเข้าและขาออกของน้ำเสียจริงในชุดการทดลองใช้วัสดุตรึงที่มีการเติม  
อากาศและชุดควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ค่าดีไอของชุดการทดลองมีการปรับให้อยู่ในช่วง  
2.0-2.3 ตลอดการทดลอง ทั้งนี้การเติมอากาศให้ระบบจะช่วยลดค่าซีไอดีในระบบเพิ่มมากขึ้น ดัง  
งานวิจัยของ Devi และ Dahiya (2005) และงานวิจัยของ Becker และคณะ (1999) ที่มีเติมอากาศ  
0.3 ลิตรต่อนาที่ ในถังปฏิกริยาแบบกวนอย่างต่อเนื่องของ *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์  
IHI-91 ขนาด 2 ลิตร พบว่าปริมาณไขมันลดลง 20 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ใน 10 ชั่วโมง และลดค่าซีไอดี  
ได้ 15 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าซีไอดีเริ่มต้น ดังนั้นในชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรีย  
ตรึงได้มีการเติมอากาศ ให้ค่าดีไออยู่ในช่วง 2.0 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน และลด  
ค่าซีไอดีในระบบ



ก

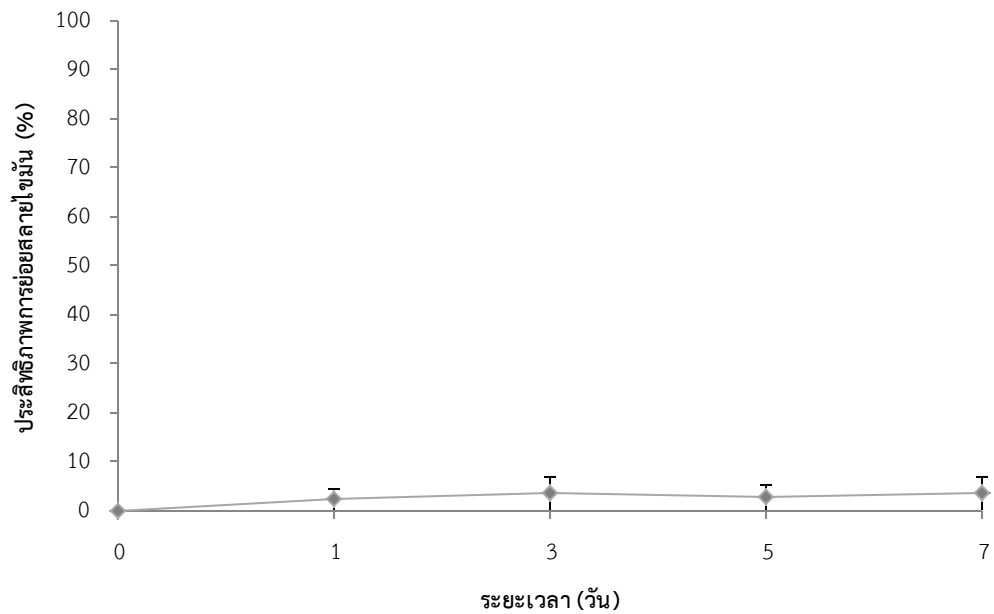
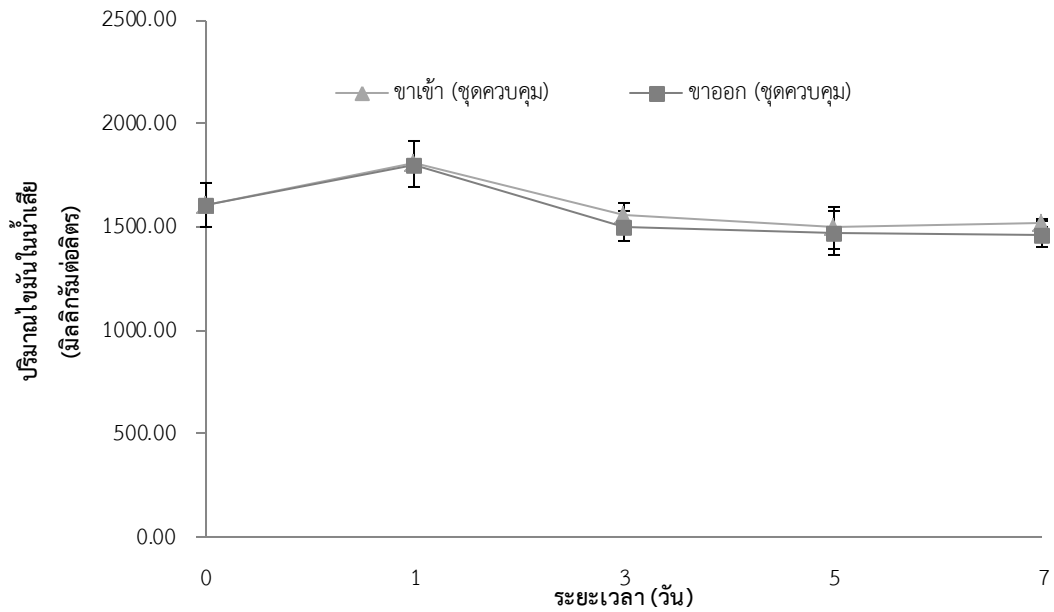


ข

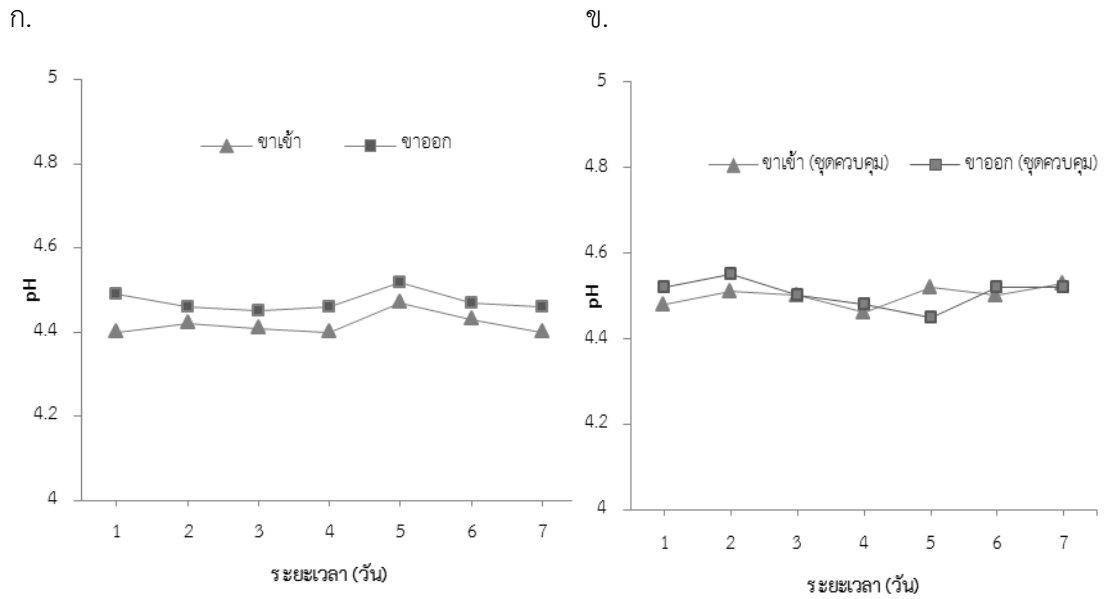


รูปที่ 4.11 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในระบบของชุดการทดลองใช้วัสดุจริงที่มีการเติมอากาศ  
(ก) ความเข้มข้นไขมันของน้ำเสียขาเข้าและขาออก (ข) ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน(%)

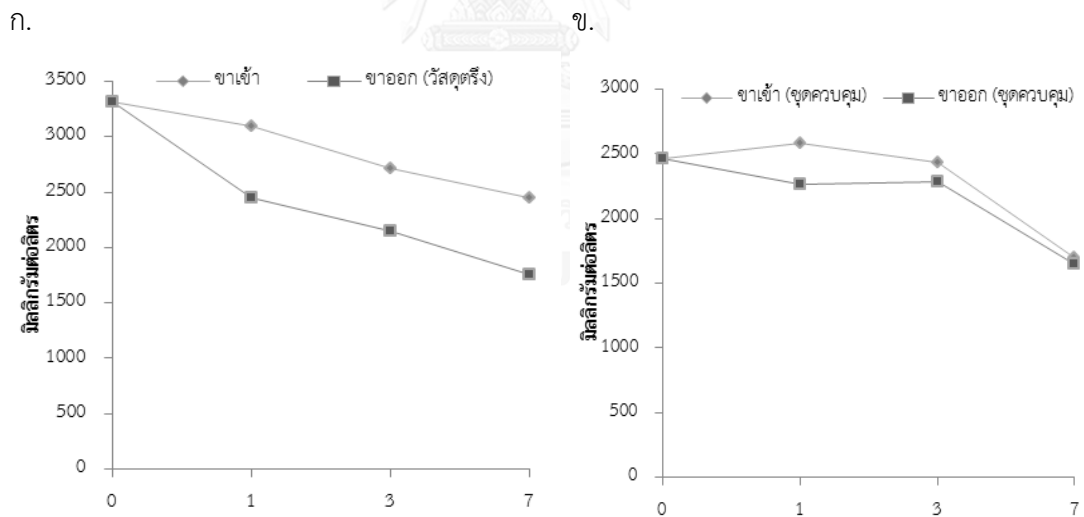
ก.



รูปที่ 4.12 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในระบบของชุดควบคุม (ก) ความเข้มข้นไขมันของน้ำเสียขาเข้า และขาออก (ข) ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน (%)



รูปที่ 4.13 ค่า pH ของน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันขาเข้าและขาออก (ก) ชุดการทดลองใช้วัสดุจริงที่มีการเติมอากาศ และ(ข) ชุดควบคุม



รูปที่ 4.14 ค่าซีโอดีของน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันขาเข้าและขาออก (ก) ชุดการทดลองใช้วัสดุจริงที่มีการเติมอากาศ และ(ข) ชุดควบคุม



**ตารางที่ 4.7** ค่าบีโอดีในระบบที่ระยะเวลา 7 วัน เปรียบเทียบชุดการทดลองใช้วัสดุตั้งที่มีการเติมอากาศกับชุดควบคุม

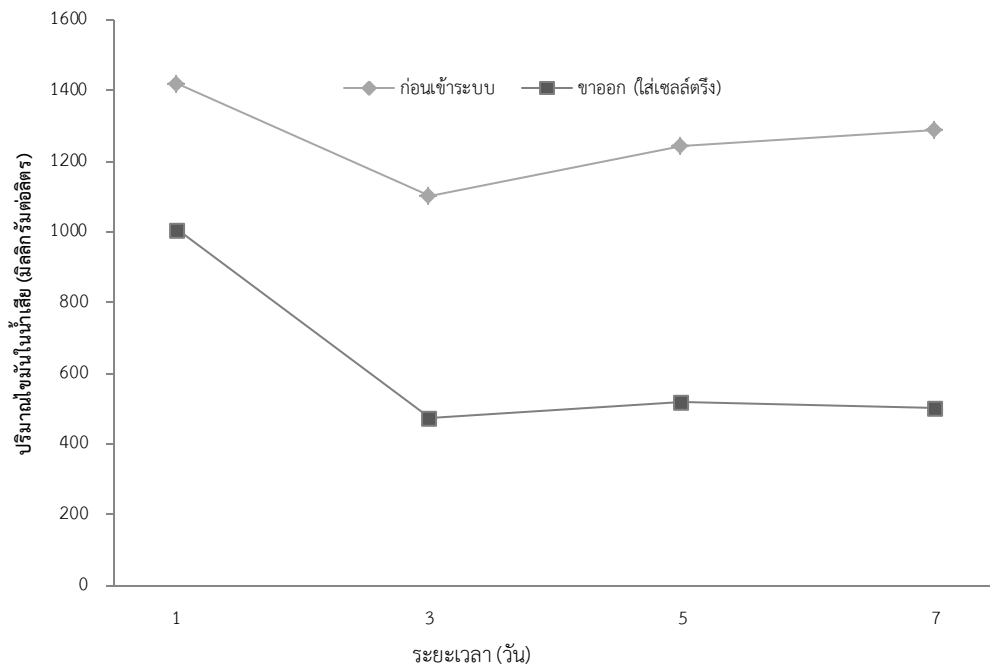
ชุดการทดลอง	ค่าบีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)		การลดลงของค่าบีโอดี (เปอร์เซ็นต์)
	วันที่ 0	วันที่ 7	
ชุดควบคุม	649	399	25
ชุดทดลอง วัสดุตั้ง	867	433	50
ชุดทดลอง แบคทีเรียตั้ง	742	359	52

อย่างไรก็ตาม เมื่อนำมาเทียบกับชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตั้งที่เติมอากาศ จำนวนเซลล์ตั้งเริ่มต้นบนพอลิยูรีเทนโฟมในชุดการทดลอง มีค่าประมาณ 11.65 LogCFU ต่อกรัม เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน เพิ่มขึ้นเป็น 13.88 LogCFU ต่อกรัม (ตารางที่ 4.8) โดยจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสียเริ่มต้น มีค่าประมาณ 12.86 LogCFU ต่อกรัม สำหรับปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในระบบ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ในชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตั้งที่เติมอากาศมีความเข้มข้นของไขมันเหลืออยู่ ประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.15ก) ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันคิดเป็น 61.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.15ข) ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าชุดควบคุมถึง 17 เท่า และชุดการทดลองที่เติมวัสดุตั้งถึง 2.5 เท่า ส่วนค่า pH ในช่วง 7 วันแรกพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 4.55 ถึง 5.2 ชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตั้งที่เติมอากาศ สามารถย่อยสลายไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นเวลา 7 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดการทดลองใช้วัสดุตั้งที่มีการเติมอากาศมีประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันได้ไม่ดี ดังตารางที่ 4.9

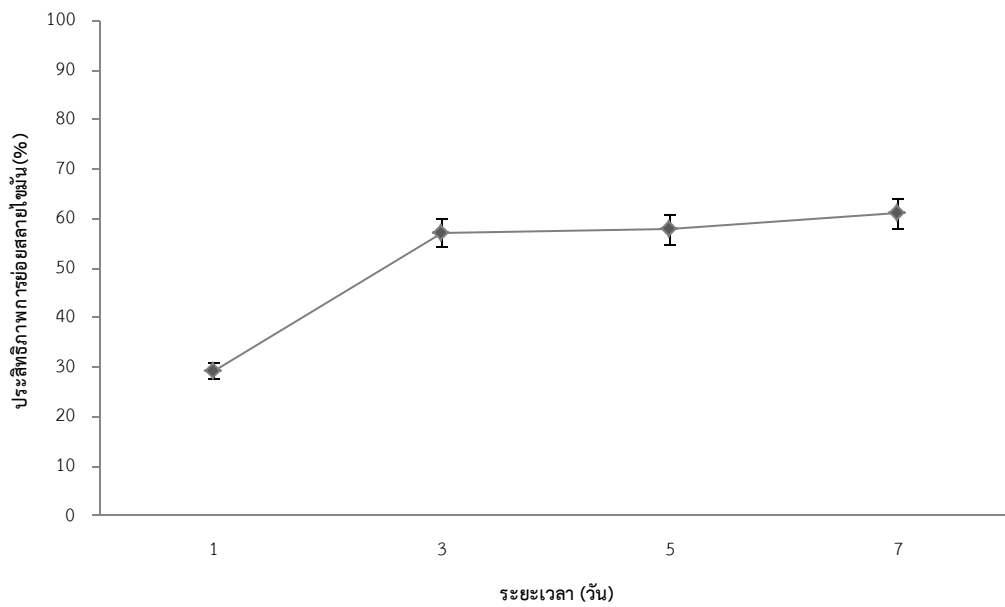
**ตารางที่ 4.8** จำนวนแบคทีเรียในเซลล์ตั้งในชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตั้งที่เติมอากาศเมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน

ชุดการทดลอง	จำนวนแบคทีเรียในเซลล์ตั้ง LogCFUต่อกรัม			
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21
ชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตั้ง	11.65	13.88	13.09	13.37

ก



ข



รูปที่ 4.15 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์จริงที่เติมอากาศเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน (ก) ความเข้มข้นไขมันของน้ำเสียขาเข้าและขาออก (ข) ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน (%)

ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันโดยแบคทีเรียผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1, *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1 และ *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 บนพอลิยูรีเทนโฟม ที่ระยะเวลา 7 วัน ในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน (เปอร์เซ็นต์)*
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 7	
ชุดควบคุม	1606.9± 109.5	1502.3±72.1	1464.9±62.3	3
ชุดทดลอง (วัสดุจริง)	2995.5±107.5	2104.6±85.9	1639.9±75.1	23
ชุดทดลอง (เซลล์จริง)	1495.8±149.5	474.1±75.5	500.9±38.6	62

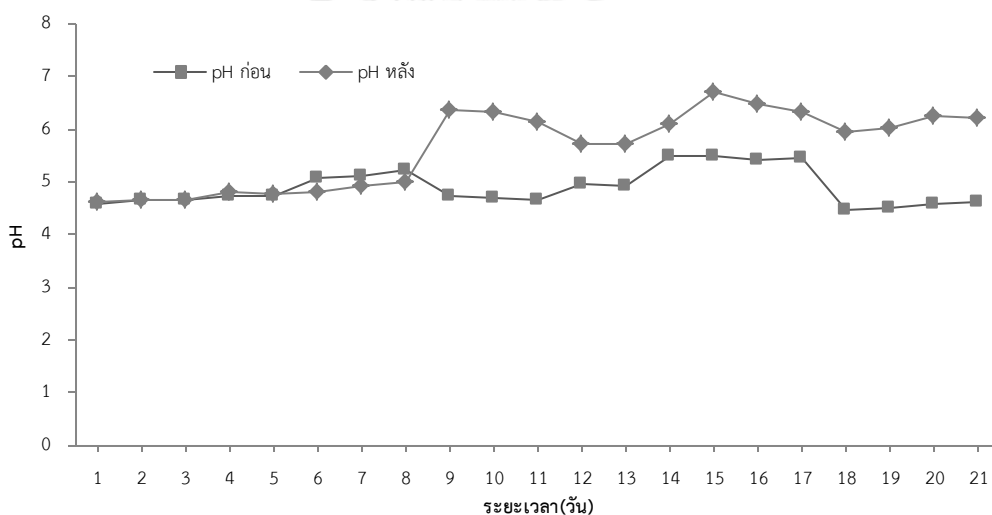
หมายเหตุ \* ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันคิดในวันที่ 7 ของทุกชุดการทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจริงพบว่าชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์จริงที่เติมอากาศ สามารถคงประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในระบบได้ถึง 13 วัน ก่อนที่จะเกิดกลิ่นและการสะสมจับตัวของไขมัน ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในระบบ และสารอินทรีย์บางส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลาย จึงเกิดการจับตัวกันและเกิดเป็นฟิล์มไขมันในระบบ บนผิวหน้าน้ำเต็มพื้นที่ในบ่อดักไขมันทั้งสองช่อง ดังรูปที่ 4.16



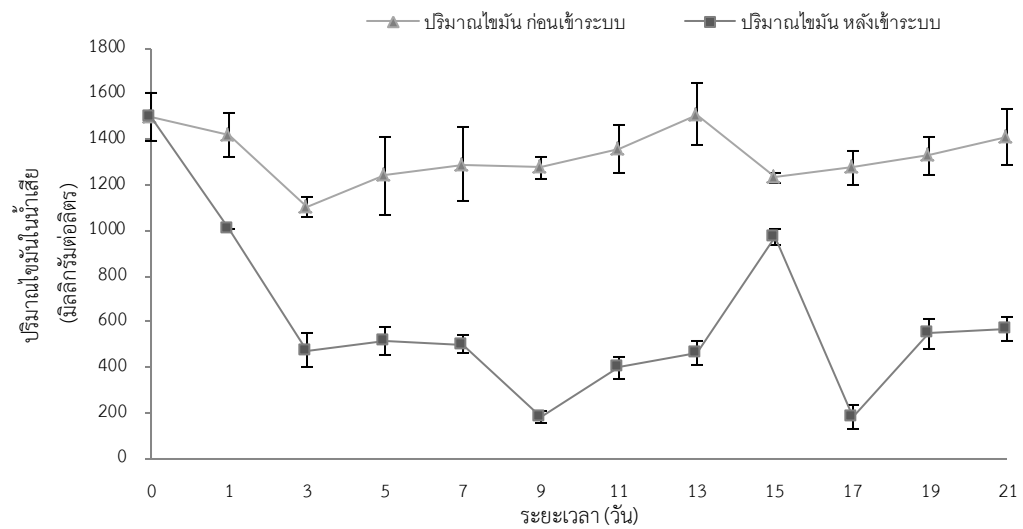
รูปที่ 4.16 ลักษณะการสะสมของชั้นไขมันบริเวณผิวน้ำเมื่อระยะเวลาผ่านไป 13 วัน

ต่อมาจึงทดลองเปลี่ยนเซลล์ตรึงในระบบ และเปิดระบบต่อไปเป็นเวลา 21 วัน ค่า pH ก่อนเข้าระบบ มีค่าเป็นกรด อาจเกิดจากน้ำเสียจากร้านอาหารสารอินทรีย์ปนเปื้อนเป็นจำนวนมากและการที่น้ำเสียเกิดการทิ้งไว้ไม่บำบัดโดยเร็วทำให้เกิดกระบวนการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย เช่น การย่อยโปรตีนทำให้ไนโตรเจนและกำมะถันในโปรตีนเปลี่ยนเป็น แอมโมเนีย และก๊าซไข่เน่า ( $H_2S$ ) ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นและน้ำเสียมีสภาพเป็นกรด แต่เมื่อผ่านการบำบัดค่า pH อยู่ในช่วง 5-6.7 คือมีค่าเป็นกลางขึ้น (รูปที่ 4.17) ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันพบว่าในช่วงวันที่ 1-13 ชุดการทดลองมีความเข้มข้นของไขมันเหลืออยู่ประมาณ 180-475 มิลลิกรัมต่อลิตร จากความเข้มข้นไขมันประมาณ 1000-1500 มิลลิกรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันคิดโดยเฉลี่ยเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเมื่อเปลี่ยนเซลล์ตรึง กลับมามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ใกล้เคียงกับในช่วงแรก ในวันที่ 17-21 คือ 60 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.18ก และ 4.18ข) เช่นเดียวกับค่าซีไอดีและค่าบีไอดี โดยค่าซีไอดีที่ลดลงแปรผันตรงกับค่าปริมาณไขมันในน้ำเสีย (รูปที่ 4.19)

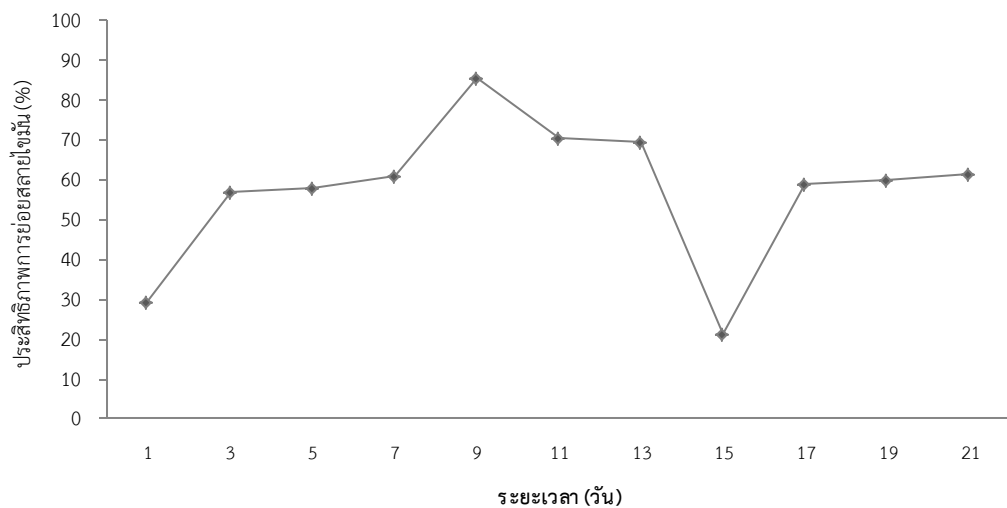


รูปที่ 4.17 ค่า pH ของน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันขาเข้าและขาออกของชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงที่เติมอากาศเป็นเวลา 21 วัน

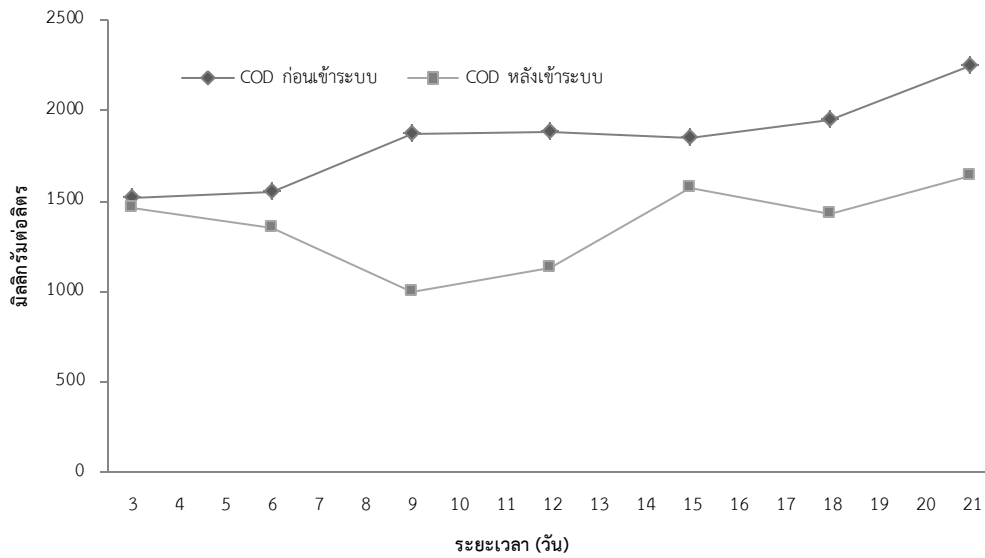
ก



ข

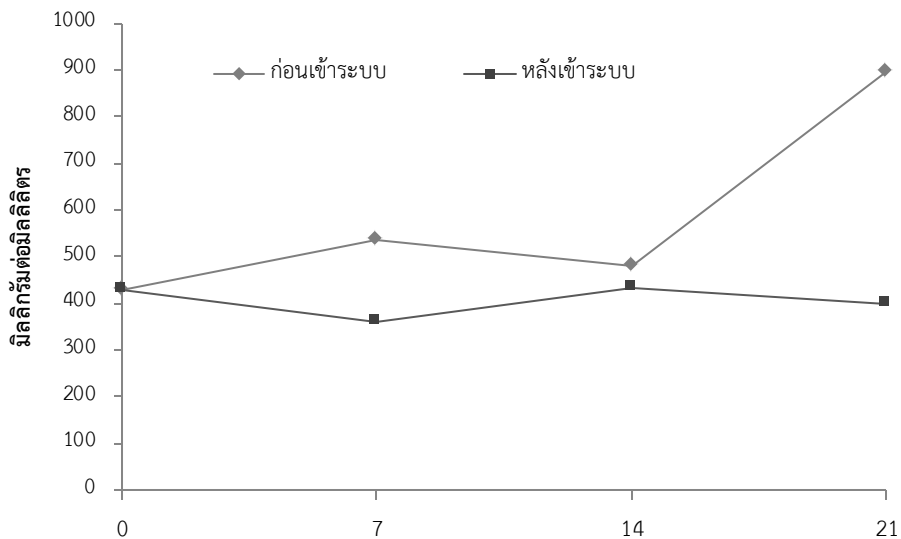


รูปที่ 4.18 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงที่เติมอากาศเป็นเวลา 21 วัน (ก) ความเข้มข้นไขมันของน้ำเสียขาเข้าและขาออก (ข) ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน (%)



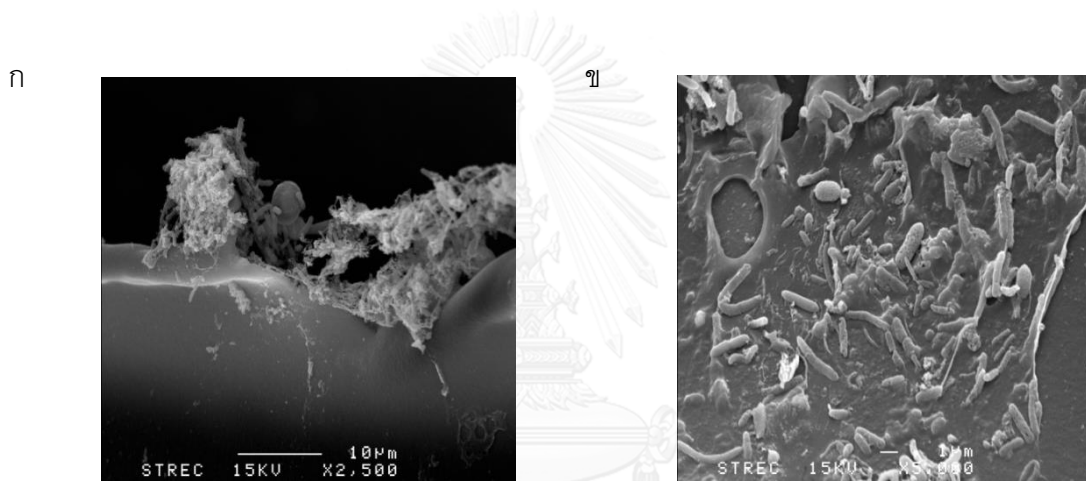
รูปที่ 4.19 ปริมาณซีโอดีที่เหลืออยู่ในการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงที่เติมอากาศเป็นเวลา 21 วัน

ค่าบีโอดีในระบบมีค่าลดลงจาก 895 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 398 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.20) ความเข้มข้นของไขมันเหลืออยู่จะค่อยๆลดลงเมื่อผ่านไปเป็นเวลา 3 วัน หลังการเปลี่ยนเซลล์ตรึงใหม่

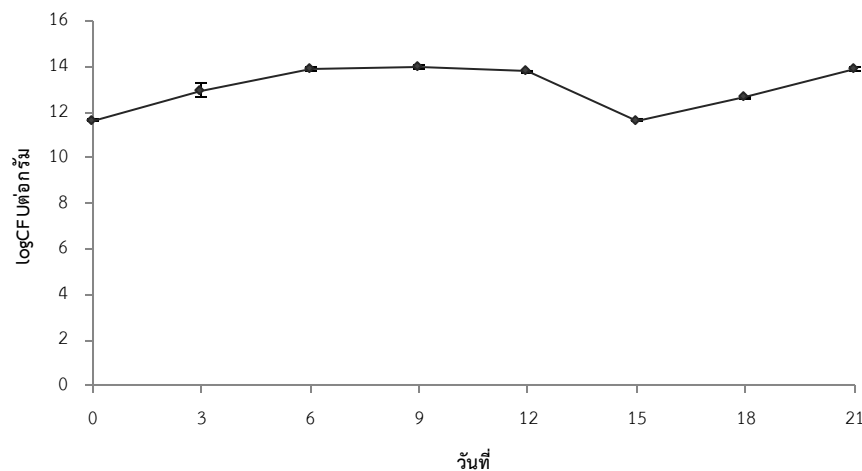


รูปที่ 4.20 ค่าบีโอดี ของน้ำเสียจริงปนเปื้อนไขมันขาเข้าและขาออกของชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงที่เติมอากาศเป็นเวลา 21 วัน

เมื่อนำเซลล์ตรึงจากระบบในวันที่ 14 ไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบเซลล์แบคทีเรียบนโครงสร้างของพอลิยูรีเทนโฟมจำนวนมาก (รูปที่ 4.21ก) และสามารถสังเกตเห็นทั้งแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียผสมที่ใช้ในการทดลองและแบคทีเรียอื่น และยังสังเกตเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ตายแล้ว ซึ่งพบรูเล็กๆ บริเวณผิวเซลล์ (รูปที่ 4.21ข) ปริมาณแบคทีเรียในเซลล์ตรึงเริ่มต้นมีค่า 11.7 logCFUต่อกรัม มีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 9 คือ มีค่าในช่วง 12.9 -14 logCFUต่อกรัม และลดลงในวันที่ 12 ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน และการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เมื่อเปลี่ยนแบคทีเรียเซลล์ตรึงในระบบในวันที่ 15-21 มีค่าปริมาณแบคทีเรียในพอลิยูรีเทนโฟม 11.6-13.9 logCFUต่อกรัม แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียอื่นๆ ที่อยู่ในระบบมีการเกาะติดเข้าไปในพอลิยูรีเทนโฟมเพิ่มขึ้นมากขึ้น



รูปที่ 4.21 ลักษณะของแบคทีเรียบนพอลิยูรีเทนโฟมหลังการใช้งานผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่ (ก) กำลังขยาย 2500 เท่า และ (ข) 5000 เท่า ตามลำดับ



รูปที่ 4.21 ปริมาณแบคทีเรียในพอลิยูรีเทนโฟมในวันที่ 0-21

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยไขมันของแบคทีเรียในรูปแบบเซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทน โฟม โดยการตรึงเซลล์เข้าไปในพอลิยูรีเทนโฟมซึ่งเป็นวัสดุที่มีรูพรุน เพื่อป้องกันการหลุดของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และคงความสามารถในการแลกเปลี่ยนสารอาหารในการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเซลล์ตามกลไกนี้ คือ ความสามารถในการกระจายตัวของเซลล์ในวัสดุ ปริมาณเซลล์ที่สามารถกักขังไว้ได้ ปริมาณออกซิเจน (Kourkoutas และคณะ, 2004) และจากสมบัติของพอลิยูรีเทนโฟมที่สามารถลอยตัวได้ดี ดูดซับน้ำมันได้มาก 7-9 เท่าของน้ำหนักของพอลิยูรีเทนโฟมเอง มีรูพรุนค่อนข้างสูง ทำให้มีพื้นที่ผิวในการเกาะติดของจุลินทรีย์ และเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านสิ่งแวดล้อม (Bang และคณะ, 2001)

ในงานวิจัยนี้เริ่มจากการคัดกรองแบคทีเรียที่คัดแยกจากบริเวณที่ปนเปื้อนไขมันทั้งหมด 17 ไอโซเลท เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการย่อยไขมันดีมาทดสอบการย่อยสลายไขมันในรูปแบบเซลล์ตรึง ต่อมาได้เลือกแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1 *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1 และ *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 มาผสมกัน แล้วหาค่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงและระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์ตรึง พบว่าแบคทีเรียสามารถเกาะติดกับพื้นผิวของพอลิยูรีเทนโฟมจำนวนมาก จึงสามารถคงจำนวนแบคทีเรียอยู่ในระบบการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในบ่อดักไขมันจำลองได้ นอกจากนี้แบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในถังดักไขมันขนาดจำลอง ปริมาณไขมันที่ออกจากระบบมีจำนวนลดลงมาก จึงเป็นการลดภาระของระบบการบำบัดลำดับต่อไป ทั้งนี้มีรายละเอียดของผลการทดลองแต่ละขั้น ดังต่อไปนี้

#### 5.1 การคัดกรองแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน

การคัดกรองแบคทีเรียย่อยสลายไขมันที่คัดแยกจากตัวอย่างน้ำทิ้งและดินบริเวณบ่อดักไขมันทั้งหมด 17 ไอโซเลท โดยทดสอบการย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่มีความเข้มข้น 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 3 วัน พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียที่มีผลของแรงดึงผิวเป็นบวก คือ WAS URBO1, WAS UPO1, SAGT SBO2 และ SAGT SBO1 เมื่อนำไปแบคทีเรียเหล่านี้ไปจัดจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธาน พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลท ที่ไม่เป็นเชื้อก่อโรค นั่นคือ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1 *Bacillus*



*subtilis* สายพันธุ์ URBO1 ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม 89 และ 97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

## 5.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยไขมันของแบคทีเรียเดี่ยวและผสม หลังจากที่ตั้งบน Polyurethane foam (PUF)

การตรึงเซลล์ของแบคทีเรียผสมในพอลิยูรีเทนโฟม ได้เพิ่มเชื้อ *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 อีก 1 ชนิด เมื่อทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อในพอลิยูรีเทนโฟมของแบคทีเรียผสม 3 สายพันธุ์ พบว่าระยะเวลาที่มีปริมาณของแบคทีเรียปริมาณมากที่สุดคือ 4 วัน ซึ่งมีการเกาะติดของเซลล์บนพอลิยูรีเทนโฟม 13.9 log CFUต่อกรัม จากการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียผสมที่จำนวนแบคทีเรียเกาะติดบนเซลล์ตรึงของงานวิจัยนี้ กับการวิจัยอื่นพบว่า โฟมมีปริมาณแบคทีเรียมากกว่าการเตรียมในวัสดุอื่น (ตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 การเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียที่เกาะติดบนเซลล์ตรึงชนิดต่างๆ

ชื่อสายพันธุ์	วัสดุใช้การ ตรึง	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU ต่อกรัม)	อ้างอิง
เชื้อผสมในงานวิจัยนี้	พอลิยูรี เทนโฟม	13.9	งานวิจัยนี้
- <i>Gordonia</i> sp. สายพันธุ์ JC11	พอลิยูรี เทนโฟม	8.6	Chantamalee และ Luepromchai (2012) ; Chantamalee และคณะ(2013)
- <i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	ผงไคติน ผงไคโตซาน	1.82 7.69	Gentili และคณะ (2006)
- <i>Yarrowia lipolytica</i> สายพันธุ์ W29	แคลเซียมแอล จีเนต	6.82	Lan และคณะ (2009)
- <i>Acinetobacter junii</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Enterococcus faecalis</i>	ซีโอไลต์จาก ธรรมชาติ	10.10 8.66 7.1	Hrenovic และคณะ (2012)

เมื่อเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 เดือน พบว่าแบคทีเรียตรึงยังคงประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันไม่ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณแบคทีเรียลดลงเพียง 26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการเตรียมใหม่ การตรึงเซลล์ในวิธีนี้จึงช่วยให้มีความสะดวกในการจัดเก็บและขนส่งในการใช้จริง

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันพืชในน้ำเสียสังเคราะห์ ของแบคทีเรียผสม 3 สายพันธุ์ ในรูปแบบเซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟม โดยใช้ไขมันปาล์มเป็นต้นแบบในการศึกษา ทั้งหมด 6 ความเข้มข้น คือ 1.5, 5, 15, 40, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียผสมแบบเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายน้ำมัน เท่ากับ 0.32 กรัม น้ำมันต่อกรัมแบคทีเรียต่อชั่วโมง

### 5.3 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยไขมันของแบคทีเรียตรึงบน PUF ในถังดักไขมันแบบจำลอง

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจริงในระบบบำบัดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ โดยคัดเลือกน้ำเสียจริงจากร้านอาหาร Mc Donald เป็นตัวแทนน้ำเสียที่ใช้ในระบบ พบว่าแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟม สามารถย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจริงได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของไขมัน เท่ากับ 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเวลา 3 วัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียเซลล์ตรึงในน้ำเสียจริงและน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีปริมาณไขมันในน้ำใกล้เคียงกันพบว่า ประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียเซลล์ตรึงในน้ำเสียจริงมีค่าน้อยกว่าประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ คาดว่าเนื่องจากสารปนเปื้อนอื่นๆ ในน้ำเสียจริง และ ค่า pH ที่แตกต่างกันของน้ำเสียจริงและน้ำเสียสังเคราะห์

การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจริงที่มีความเข้มข้นของไขมัน 1200-3000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยบ่อดักไขมันจำลองปริมาตร 4 ลิตร พบว่า ชุดควบคุมและชุดทดลองที่มีแค่วัสดุตรึงและเติมอากาศ มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันเพียง 3 และ 23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ค่าบีโอดีลดลงกว่าชุดควบคุมกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และค่าซีโอดีจากการเติมวัสดุตรึงและอากาศ ลดลงกว่าชุดควบคุมกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 7 วัน จากการทดลองพบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันประมาณ 61 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน เมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุมที่มีการลดลงของไขมันเพียงเล็กน้อย แสดงว่าปริมาณไขมันที่หายไปเกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายของแบคทีเรียเซลล์ตรึงในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้การใช้แบคทีเรียตรึงยังลดค่าบีโอดีได้ 38 เปอร์เซ็นต์ และลดค่า COD ได้ 39 เปอร์เซ็นต์ ทั้งยังปรับค่า pH ในระบบให้อยู่ในช่วง 5.0-6.7 ซึ่งในทางปฏิบัติน้ำเสียที่ผ่านจากบ่อดักไขมันจะบำบัดต่อด้วยระบบบำบัดแบบตะกอนเร่ง (Activated sludge) ต่อไป

ทั้งนี้แบคทีเรียตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟมที่มีแบคทีเรียผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1 *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1 และ *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน เมื่อพิจารณาการกราฟการวิเคราะห์ TLC ของน้ำเสียก่อนเข้าระบบและหลังออกจากระบบของน้ำเสียจริงและน้ำเสียสังเคราะห์ (ภาคผนวก ง) พบว่า peak ของกราฟในน้ำเสียจริงทั้งขาเข้าและขาออกจะอยู่ในช่วงเวลา 0.08-0.120 นาที ซึ่งเป็น peak ของไตรกลีเซอไรด์ โดยน้ำเสียหลังเข้าระบบมี peak area ที่ต่ำลง แสดงถึงการลดลงของปริมาณไตร

กลีเซอไรด์ในระบบ ซึ่งสอดคล้องกับ peak area ของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี peak area อยู่ในช่วงเวลาเดียวกัน จึงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในระบบสามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันปาล์มทั้งในน้ำเสียจริงและน้ำเสียสังเคราะห์

จากข้อมูลข้างต้นแสดงว่าแบคทีเรียที่เรี่ยตรงจากงานวิจัยนี้ สามารถลดปริมาณไขมันปนเปื้อนในระบบและค่าซีไอได้ดีอย่างมีประสิทธิภาพ สามารถเก็บรักษาได้นาน และยังคงมีประสิทธิภาพในการบำบัดไขมัน ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในการใช้เซลล์ตรึง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของบ่อดักไขมันในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันจากร้านอาหาร และเพื่อลดภาระของระบบบำบัดน้ำเสียวิธีอื่นๆ ต่อไป

#### 5.4 ข้อเสนอแนะ

1) เนื่องจากแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟมของแบคทีเรียผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1 *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1 และ *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 สามารถบำบัดไขมันได้ในพื้นที่จริงในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนขึ้นโฟมอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้เพื่อให้พอลิยูรีเทนไม่ลอยอยู่เพียงบริเวณผิวน้ำเสียหรือเกิดการตันของการเติมอากาศ ควรเลือกตะแกรงหรือวัสดุที่ใส่พอลิยูรีเทนโฟมที่สามารถเปลี่ยนรูปทรงตามบ่อดักไขมันนั้นๆ มีน้ำหนัก สามารถเปลี่ยนเข้าออกได้ง่าย ไม่หนักเกินไปเมื่อเกิดการซบน้ำของพอลิยูรีเทนโฟม เพื่อความสะดวกในการทำงาน เช่น ตาข่ายไนลอน

2) ควรปรับปรุงวิธีการเติมอากาศเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในระบบ เนื่องจากระบบในงานวิจัยนี้มีขนาดเล็ก เมื่อเติมออกซิเจนเพื่อให้แบคทีเรียเจริญเติบโต และสามารถย่อยสลายไขมันได้ กระบวนการย่อยสลายไขมันด้วยแบคทีเรีย จำเป็นต้องใช้ใช้ออกซิเจน เพื่อจะให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Lowry, 1994) อย่างไรก็ตามการเปิดอากาศจากปั้มน้ำของถังดักไขมันเพื่อให้ค่าดีไอเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดการตันของน้ำทำให้ตะกอนในระบบกวนมาติดบริเวณช่องน้ำออก จึงควรเลือกการเติมอากาศโดยการใช้การเติมจากอุปกรณ์อื่นๆ ที่ไม่มีผลต่อการกวนระบบ

3) ควรตรวจวัดค่า pH ในระบบก่อนการบำบัด และปรับให้มีค่า pH ไม่เกินค่าความเป็นกรดต่างตามธรรมชาติ คือ ที่ 6-9 ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ดี (Immanuel และคณะ, 2008; Mahdi และคณะ, 2012) เพื่อลดผลกระทบของค่า pH ที่จะเกิดกับการเจริญเติบโตและอาจส่งผลกระทบกับการย่อยสลายไขมันที่จะเกิดภายในของระบบ

รายการอ้างอิง



## รายการอ้างอิง

- การค้าภายใน. กรม. ทางเลือกการใช้น้ำมันพืช. [ออนไลน์]. 2556. แหล่งที่มา: <http://www.dit.go.th/contentdetail.asp?ID=91> [20 มิถุนายน 2558]
- กิจจา จิตรภิมย์และปราณิน แสงอรุณ. 2555. การตรวจหาแบคทีเรียย่อยไขมันจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม. วารสารสาธารณสุขศาสตร์. 42 (3): 3-18.
- เกรียงศักดิ์ อุทมนโรจน์. 2539. การบำบัดน้ำเสีย. กรุงเทพมหานคร: มิตรนราการพิมพ์.
- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2537. คู่มือการจัดการกากไขมัน. บริษัท ทีคิวพี จำกัด. 13 หน้า.
- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2546. เล่ม 4 เทคนิคการบำบัดน้ำเสียบางวิธีการนำน้ำทิ้งมาใช้ประโยชน์และการทดสอบพิษวิทยาสำหรับน้ำทิ้ง. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. 114 หน้า.
- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2551. คู่มือแนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันจากบ่อดักไขมันและการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับร้านอาหาร. บริษัท ทีคิวพี จำกัด. 36 หน้า.
- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2553. คู่มือแนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันจากบ่อดักไขมันและการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับร้านอาหาร. บริษัท ทีคิวพี จำกัด. 36 หน้า.
- ควบคุมมลพิษ, กรม. พารามิเตอร์มาตรฐานในการตรวจสอบน้ำทิ้ง. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: [http://www.pcd.go.th/info\\_serv/water.html](http://www.pcd.go.th/info_serv/water.html) [20 มิถุนายน 2558]
- นิตยา รัตนาปนนท์. 2548. วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน. กรุงเทพมหานคร:สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- ประดิษฐ์ มีสุข. 2548. เคมีอินทรีย์เบื้องต้น. สงขลา : ภารกิจเอกสารและตำรา กลุ่มงานส่งเสริมและประกันคุณภาพการศึกษา มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- พระราชวรรณ ศรีนาค. 2556. การควบคุมมลพิษทางน้ำ. กรุงเทพมหานคร: มีนเซอร์วิสเซ็พพลาย.
- พัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. กรม. การผลิตแก๊สชีวภาพ (Biogas plants). [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: <http://www.dede.go.th> [24 มิถุนายน 2558]
- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล. ปฏิบัติการการเกิดไขมันและน้ำมัน. [ออนไลน์]. 2554. แหล่งที่มา: <http://www.rmutphysics.com> [15 มิถุนายน 2558]
- มันสิน ตันตุลเวศม์. 2542. เทคโนโลยีบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 127 ตอนพิเศษ 69 ง. 2553. ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่องกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียรวมของชุมชน.

ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 123 ตอนที่ 129ง. 2549.ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากสถานบริการน้ำมันเชื้อเพลิง และ ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดให้สถานบริการน้ำมันเชื้อเพลิงเป็นแหล่งกำเนิดมลพิษที่จะต้องถูกควบคุมการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะหรือออกสู่สิ่งแวดล้อม.

วีระ ปิยธีรวงศ์. 2555. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสสำหรับการเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 17 (1): 192-197.

ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร. โครงสร้างของกรดพาล์มิติก. [ออนไลน์]. 2554. แหล่งที่มา: <http://www.foodnetworksolution.com> [15 มิถุนายน 2558]

ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร. โครงสร้างของไขมันและน้ำมัน. [ออนไลน์]. 2554. แหล่งที่มา: <http://www.foodnetworksolution.com> [15 มิถุนายน 2558]

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. สถิติการนำเข้าส่งออกสินค้าการเกษตร. [ออนไลน์]. 2558. [http://www.oae.go.th/oae\\_report/export\\_import/export.php](http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php) [22 มิถุนายน 2558]

สุบัณฑิต นิมรัตน์. 2548. จุลชีววิทยาของน้ำเสีย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Affandi I.E., Suratman N.H., Abdullah S., Ahmad W.A., Z.A. Z (2014) Degradation of oil and grease from high-strength industrial effluents using locally isolated aerobic biosurfactant-producing bacteria. International Biodeterioration & Biodegradation 95: 33-40

Al-Bahry S. N., Al-Wahaibi Y. M., Elshafie A. E., Al-Bemani A. S., Joshi S. J., Al-Makhmari H. S., Al-Sulaimani H. S. (2013) Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. International Biodeterioration & Biodegradation 81: 141-146

Bala J.D., Lalung J., Ismail n. (2014) Biodegradation of palm oil mill effluent (POME) by bacterial. International Journal of Scientific and Research Publications 4

- Balan A., Ibrahim D., Abdul Rahim R., Ahmad Rashid F. A. (2012) Purification and Characterization of a Thermostable Lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra. Enzyme Research 2012: 987523
- Bang S.S., Galinat J.K., Ramakrishnan V. (2001). Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. Enzyme and Microbial Technology 28:404-409
- Becker, P., Koster, D., Popov, M.N., Markoslan, S., Antranikian, G. and Markl, H. (1999). The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. Water Research 33: 653-660.
- Bhumibhamon O., Phattayakorn K. (2003). Lipase producing microorganisms for use in contaminated fat and oil kitchen wastewater treatment. Natural Science 37:327-33
- Borkar PS, Bodade RG, Rao SR, Khobragade CN (2009) Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. Brazilian Journal of Microbiology 40: 358-66
- Brooksbank A. M., Latchford J. W., Mudge S. M. (2006) Degradation and modification of fats, oils and grease by commercial microbial supplements. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 977-985
- Cammarota M. C., Freire D. M. (2006) A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. Bioresource Technology 97: 2195-2210
- Chantamalee C., Luepromchai E. (2012). Isolation and application of *Gordonia* sp. JC11 for removal of boat lubricants. Journal of General and Applied Microbiology. 58: 19-31.
- Chanthamalee, J., Wongchitphimon, T. and Luepromchai, E. (2013) Treatment of oily bilge water from small fishing vessels by PUF-immobilized *Gordonia* sp. JC11. Water, Air, and Soil Pollution 224:1601
- Cipinyte V., Grigiskis S., Baskys E. (2009) Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. Biologija 55: 84-92

- Cipolatti E.P., Silva, M.J.A., Kleina M., Feddernb V., Feltes M.N.C., Oliveira J.V., Ninowa J.L., Oliveira D. (2014). Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 99:56–67
- Cohen Y (2001) Biofiltration the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. Bioresource Technology 77: 257-274
- Devi, R., and Dahiya, R.P. (2005). Chemical oxygen demand (COD) reduction in domestic wastewater by fly ash and brick kiln ash. Water, Air, and Soil Pollution 174: 33-46.
- Dumore N.S., Mukhopadhyay M. (2012) Removal of oil and grease using immobilized triacylglycerin lipase. International Biodeterioration & Biodegradation 68: 65-70
- Eckenfelder W.W. (1989). Industrial Water Pollution Control. New York: McGraw-Hill
- El-Bestawy E., El-Masry M.H., El-Adl N.E. (2005) The Potentiality of Free Gram-negative Bacteria for Removing Oil and Grease from Contaminated Industrial Effluents. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 815-822
- Fadile A., El Hassani F.Z., Aissam F., Merzouki M., Benlemlih M. (2011). Aerobic treatment of lipid-rich wastewater by a bacterial consortium. African Journal of Microbiology Research 5: 5333-5342
- Gaoteng Fan (2014) Biodegradation of Fat, Oil, and Grease (FOG) in Wet Wells. Master's Thesis, Department of Civil and Environmental Engineering University of Alberta
- Gentili A.R., Cubitto M.A., Ferrero M., Rodríguez M.S. (2006) Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. International Biodeterioration & Biodegradation 57: 222-228
- Glazer, A. N.; Nikaido, H. (1995) Microbial Biotechnology - Fundamentals of Applied Microbiology. New York. W. H. Freeman and Company Editors.
- Gogra A.B., Yao J., Sandy E.H., Zheng S., Zaray G., Koroma B.M., Hui Z. (2010). Cell surface hydrophobicity (CSH) of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger* and the biodegradation of Diethyl Phthalate (DEP) via Microcalorimetry. Journal of American Science 6: 68-88



- Gupta R., Gupta N., Rathi P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology 64: 763-81
- Haritash A.K., Kaushik C.P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Journal of Hazardous Materials 169: 1-3
- Hrenovic J., Milenkovic J., Ivankovic T., Rajic N. (2012). Antibacterial activity of heavy metal-loaded natural zeolite. Journal of Hazardous Materials 201-201: 260-264
- Immanuel G., Esakkiraj P., Jebadhas A., Iyapparaj P., Palavesam A. (2008) Investigation of Lipase Production by Milk Isolate *Serratia rubidaea*. Food Technol Biotechnol 46: 60-65
- Jaeger K.E., Reetz M. T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends in Biotechnology 16: 396-403
- Jeganathan J., Bassi A., Nakhla G. (2006) Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. Journal of Hazardous Materials 137: 121-8
- Jin J., Li D., Zhu X.M., Adhikari P., Lee K.T., Lee J.H. (2011). Production of diacylglycerols from glycerol monooleate and ethyl oleate through free and immobilized lipase-catalyzed consecutive reactions. New Biotechnology 28: 190-195
- Kanmani P., Kumaresan K., Aravind J. (2015) Utilization of coconut oil mill waste as a substrate for optimized lipase production, oil biodegradation and enzyme purification studies in *Staphylococcus pasteurii*. Electronic Journal of Biotechnology 18: 20-28
- Karel S. F., Robertson C. R. (1989). Cell mass synthesis and degradation by immobilized *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering 34:337-356
- Karel, S.F., Robertson, C.R., (1989) Cell mass synthesis and degradation by immobilized *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering 34, 337-356.
- Katrine Sivertsen. (2007). Polymer Physics. Norway: IndaBook

- Klein J., Kluge M., (1981). Immobilization of microbial cells in polyurethane matrices. Biotechnology Letters 3:65-67
- Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I. M., Marchant R., Koutinas A. A. (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. Food Microbiology 21: 377-397
- Krongkaew Ramwong. (2002). Growth and physiology of *Schizochytrium magrovei* Sk-02 grown on oils and/or free fatty acids. Faculty of graduate studies. Mahidol university
- Lan W., Gang G., Jinbao W. (2009) Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. Journal of Environmental Sciences 21: 237-242
- Leskošek-Åukaloviã J., Nedoviã V.A. (2005) Immobilized cell technology in beer brewing current experience and results. Proceedings of the National Academy of Sciences 109: 129-141
- Lin R., Wu R., Huang X., Xie T. (2011) Immobilization of oxalate decarboxylase to Eupergit and properties of the immobilized enzyme. Preparative Biochemistry and Biotechnology 41: 154-65
- Lowry J.B., Conlan L.L., Schlink A.C., McSweeney C.S. (1994) Acid detergent dispersible lignin in tropical grasses. Journal of the Science of Food and Agriculture 65: 41-45
- Mahdi B.A., Bhattacharya A., Gupta A. (2011) Enhanced lipase production from *Aeromonas* sp. S1 using Sal deoiled seed cake as novel natural substrate for potential application in dairy wastewater treatment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 87: 418-426
- Manohar S, Kim CK, Karegoudar TB (2001) Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas* sp. strain NGK1 in polyurethane foam. Applied Microbiology and Biotechnology 55: 311-6
- Matsui T., Miura A., Iiyama T., Shinzato N., Matsuda H., Furuhashi K. (2005) Effect of fatty oil dispersion on oil-containing wastewater treatment. Journal of Hazardous Materials 118: 255-8

- Matsumiya Y., Wakita D., Kimura A., Sanpa S., 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: 325-30
- Mazlan M.A.B (2012) Biodegradation of used cooking oil by indigenous bacteria. Master's Thesis, Faculty of Biosciences and Bioengineering, University Teknologi Malaysia
- Mongkolthararuka W., Dharmsthita S. (2002) Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation 50: 101-105
- Morikawa M., Daido H., Takao T., Murata S., Shimonishi M., Imanaka T. (1993) A New Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38. Journal of bacteriology 175: 6459-6466
- Mostafa A.A., Abou-Z A.M., Eman H.F., El-Zaher A., Arif D.M. (2015) Bitreatment of Industrial Oil Waste Water by Free and Immobilized *Rhodotorula mucilaginosa* 2 and *Candida utilis*. Advances in Biological Research 9: 271-280
- Oh Y.S., Kim S.J. (2000) Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. Applied Microbiology and Biotechnology 54: 418-423
- Patil N.K., Veeranagouda Y., Vijaykumar M. H., Anand N.S., Karegoudar T. B. (2006) Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus* sp. immobilized cells in alginate and polyurethane. International Biodeterioration & Biodegradation 57: 82-87
- Piuri M., Sanchez-Rivas C., Ruzal SM. (1998) A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. Letters in Applied Microbiology 27:9-13.
- Prasad M.P., Manjunath K. (2011) Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. Indian Journal of Biotechnology 10: 121-124

- Primasari B., Ibrahim S., Annuar M.S.M., Remmie L.X.I. (2011). Aerobic treatment of oily wastewater: Effect of aeration and sludge concentration to pollutant reduction and PHB accumulation. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Environmental, Chemical, Ecological, Geological and Geophysical Engineering 5: 172-176.
- Qin L., Zhang G., Meng Q., Zhang H., Xu L., Lv B. (2012) Enhanced submerged membrane bioreactor combined with biosurfactant rhamnolipids: performance for frying oil degradation and membrane fouling reduction. Bioresource Technology 126: 314-20
- Quek E., Ting Y. P., Tan H. M. (2006) *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. Bioresource Technology 97: 32-8
- Rahman R. N., Leow T. C., Salleh A. B., Basri M. (2007) *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. BMC Microbiology 7: 77
- Rattanapan C., Sawain A., Suksaroj T., Suksaroj C. (2011) Enhanced efficiency of dissolved air flotation for biodiesel wastewater treatment by acidification and coagulation processes. Desalination 280: 370-377
- Serikovna S.Z., Serikovich K.S., Sakenovna A.S., Murzakhmetovich S.S., Khamitovich A.K. (2013) Screening of lipid degrading microorganisms for wastewater treatment. Malaysian Journal of Microbiology 9: 219-226
- Solaesaa Á.G., Sanza M.T., Melgosaa R., Bucioa S.L., Beltrána S. (2015). Glycerolysis of sardine oil catalyzed by a water dependent lipase in different tert-alcohols as reaction medium. Grasas y Aceites Journal Impact & Description 66:4
- Tallur P. N., Megadi V. B., Z. NH (2009) Biodegradation of p-cresol by immobilized cells of *Bacillus* sp. strain PHN 1. Biodegradation 20: 79-83
- Tanaka D., Takashima M., Mizuta A., Tanaka S., Sakatoku A., Nishikawa A., Osawa T., Noguchi M., Aizawa S., Nakamura S. (2010) *Acinetobacter* sp. Ud-4 efficiently degrades both edible and mineral oils: isolation and characterization. Current Microbiology 60: 203-9

- Tano-debrah K., Fukuyama S., Otonari N., Taniguchi F., Ogura M. (1999) An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentration of fats and oils. Bioresource Technology 69: 133-139.
- Terng-Jou W., Shu-Min S., Hwei-Yuan H., Hung-Yuan F. (2013) Soybean oil biodegradation using *Pseudomonas aeruginosa* attached on porous ceramic or polyurethane. Arabian Journal for Science and Engineering 38: 1025-1030
- Urgun-Demirtas M., Singh D., Pagilla K. (2007) Laboratory investigation of biodegradability of a polyurethane foam under anaerobic conditions. Polymer Degradation and Stability 92: 1599-1610
- Wakelin N. G., Forster C. F. (1997) An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. Bioresource Technology 59: 37-43
- Wang X., Ruckenstein E. (1993). Preparation of porous polyurethane particles and their use in enzyme immobilization. Biotechnology Progress 9:661-665



## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB) เจือจาง 4 เท่า

อาหารสำเร็จรูป LB	6.25	กรัม
-------------------	------	------

ละลายอาหารสำเร็จรูป 6.25 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB) เจือจาง 4 เท่า

ละลายอาหารสำเร็จรูป 6.25 กรัมและ ผงวุ้นหรือแบคโตอะการ์ 15 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## น้ำเสียสังเคราะห์ (The synthetic wastewater medium; SWO) (Matsumiya และคณะ, 2007)

เปปโตน (peptone)	0.6	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	0.4	กรัม
ยูเรีย (urea)	0.1	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	0.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.03	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ )	0.014	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.014	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4$ )	0.014	กรัม

ปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ภาคผนวก ข**  
**สูตรและวิธีการเตรียมสารละลาย**

**สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์**

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม

ละลาย โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัมในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**บัฟเฟอร์ PUM**

ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) 16.9 กรัม

โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) 7.3 กรัม

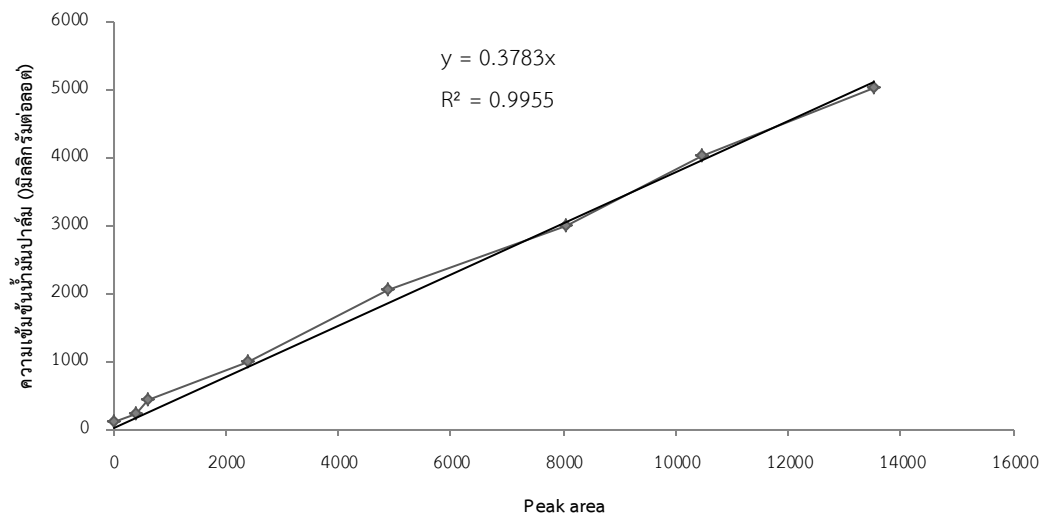
ยูเรีย (urea) 1.8 กรัม

แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4$ ) 0.2 กรัม

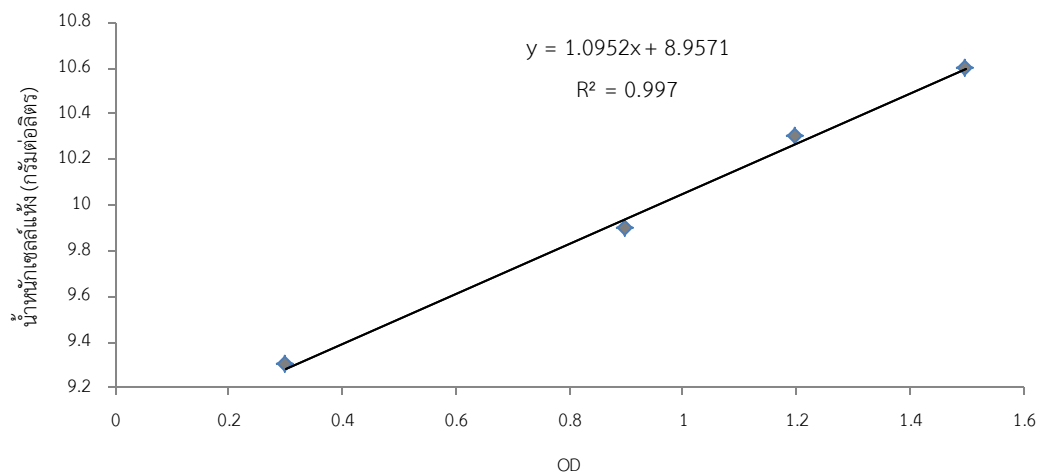
ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



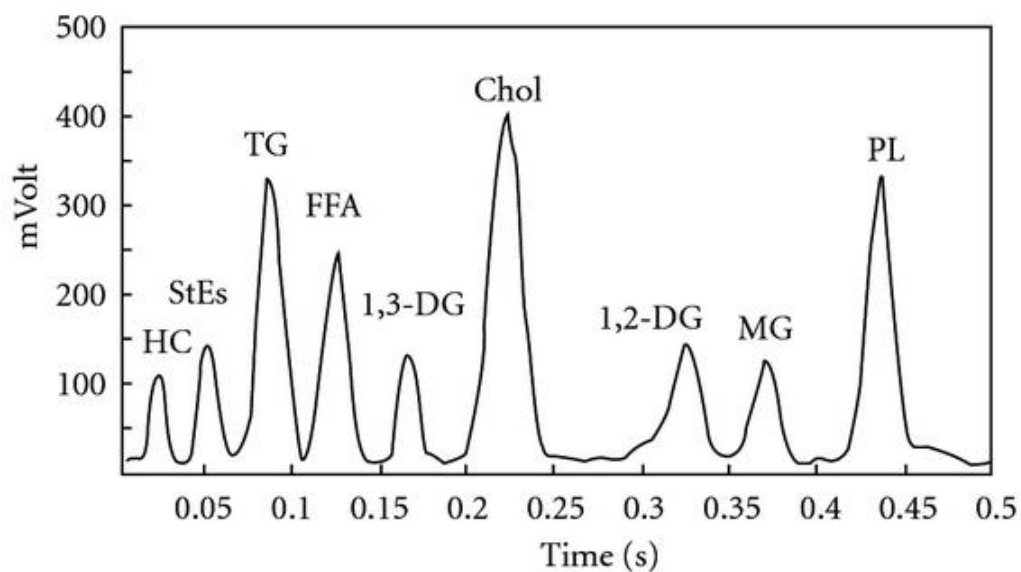
ภาคผนวก ค  
กราฟมาตรฐาน



รูปที่ ค1 กราฟมาตรฐานของน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 100-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย TLC-FID แต่ละจุดในกราฟมาจากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ ค2 กราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียผสมที่ OD 0.3-1.5 แต่ละจุดในกราฟมาจากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ ค3 TLC/FID โครมาโตแกรมของน้ำมันและองค์ประกอบของน้ำมันจากคู่มือการใช้งานของเครื่อง TLC/FID Analyzer รุ่น IATROSCAN MK-6s (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Japan)

HC คือ ไฮโดรคาร์บอน StEs คือ ไชมันทรานส์ TG คือ ไตรกลีเซอไรด์ FFA คือ กรดไขมัน

1,3-DG คือ 1,3 ไตรกลีเซอไรด์ Chol คือ คอเลสเตอรอล 1,2-DG คือ 1,2 ไตรกลีเซอไรด์

MG คือ โมโนกลีเซอไรด์ PL คือ กรดปาล์มิติก

## ภาคผนวก ง

## ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ง.1 ค่าแรงตึงผิวของเชื้อ 17 สายพันธุ์ น้ำหนักเซลล์แห้งและความสามารถในการกระจายน้ำมัน

	ค่า surface tension ที่วัดได้	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	oil displacement
CONTROL	40.773		
SGT UPO1	44.916	0.880	-
SGT URBO1	40.800	0.840	-
SGT SBO1	40.894	0.980	-
SGT URBO2	42.511	0.500	-
SAS URBO1	45.928	0.900	-
SAS SFO1	42.068	0.700	-
SAS RBO1	42.411	0.680	-
SAS PO1	45.027	0.600	-
SAGT SBO2	46.649	0.940	-
SAGT URBO1	43.646	0.340	-
SAGT RBO1	45.717	0.380	-
SAGT PO1	42.904	0.520	-
SAGT SBO1	46.231	0.760	-
WAS URBO1	36.009	1.140	+
WAS PO1	46.739	0.680	-
WAS SFO1	43.1205	0.600	-
WAS UPO1	44.607	0.640	-

ตารางที่ ง.2 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ลดลงด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SBO1 ที่ความเข้มข้น 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	น้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ SBO1	ชุดควบคุม
0	1574.57±63.73	1631.94±58.01
3	176.96±8.40	1556.70±110.92
	น้ำมันที่หายไป (%)	
0	3	
3	89	

ตารางที่ ง.3 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ลดลงด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ URBO1 ที่ความเข้มข้น 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	น้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ URBO1	ชุดควบคุม
0	1573.31±148.84	1631.94±58.01
3	50.23±2.84	1556.70±110.92
	น้ำมันที่หายไป (%)	
0	3	
3	97	

ตารางที่ ง.4 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ลดลงด้วย *Paenibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3 ที่ความเข้มข้น 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	น้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	<i>Paenibacillus elgii</i> สายพันธุ์ RO3	ชุดควบคุม
0	1579.40±71.20	1631.94±58.01
3	164.35±9.90	1556.70±110.92
เวลา (วัน)	น้ำมันที่หายไป (%)	
0	3	
3	89	

ตารางที่ ง.5 จำนวนแบคทีเรีย(logCFUต่อกรัม) ของแบคทีเรียผสมจากพอลิยูรีเทนโฟมวันที่ 1 ถึง 5

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรีย (logCFUต่อกรัม)
1	10.68±0.23
2	10.48±0.05
3	11.57±0.28
4	13.91±0.07
5	13.89±0.08

ตารางที่ ง.6 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ลดลงด้วยแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนโพลิยูรีเทนโฟม  
ด้วยในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	น้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	แบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ ตรึงบนโพลิยูรีเทนโฟม	ชุดควบคุม
0	1550.82±52.65	1554.81±65.44
6	499.78±11.37	1497.86±14.66
12	440.09±7.64	1490.50±19.20
24	258.93±9.90	1374.28±18.94
48	103.40±5.46	1292.53±10.92

เวลา (วัน)	น้ำมันที่หายไป (%)
0	0
6	66
12	70
24	81
48	91

ตารางที่ ง.7 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ลดลงด้วยแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม ใน น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	น้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	แบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม	ชุดควบคุม
0	5119.03±202.68	5110.41±45.65
12	1370.92±11.11	4595.71±33.21
24	495.57±8.67	4129.14±185.16
48	466.57±4.37	3909.73±88.54
72	156.57±14.87	3682.12±53.01
เวลา (วัน)	น้ำมันที่หายไป (%)	
0	0	
12	70	
24	88	
48	88	
72	95	

ตารางที่ ง.8 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ลดลงด้วยแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม ใน น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	น้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	แบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม	ชุดควบคุม
0	15526.69±236.62	16705.10±83.45
12	13575.51±983.40	16761.84±96.18
24	6093.36±168.44	13761.71±744.62
48	5100.11±367.42	12883.64±362.58
72	1991.12±304.55	10504.55±398.94
เวลา (วัน)	น้ำมันที่หายไป (%)	
0	3	
12	19	
24	56	
48	60	
72	81	

ตารางที่ ง.9 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ลดลงด้วยแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม ใน น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	น้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	แบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม	ชุดควบคุม
0	40239.14±1206.29	39673.58±83.00
12	34326.94±1122.92	40123.34±155.63
24	31670.44±1158.71	37453.80±630.41
48	24429.98±940.90	36176.41±241.40
72	18150.83±160.81	34464.39±390.39
เวลา (วัน)	น้ำมันที่หายไป (%)	
0	0	
12	14	
24	15	
48	32	
72	47	



ตารางที่ ง.10 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ลดลงด้วยแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม  
 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	น้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	แบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม	ชุดควบคุม
0	58691.35±340.98	58929.68±660.90
12	55391.53±439.70	58020.50±558.45
24	41298.17±1396.14	46353.10±1013.87
48	28023.83±193.08	42533.74±636.49
72	22013.28±127.90	40078.36±185.34
เวลา (วัน)	น้ำมันที่หายไป (%)	
0	0	
12	5	
24	11	
48	34	
72	45	

ตารางที่ ง.11 ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ลดลงด้วยแบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม  
ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	น้ำมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	แบคทีเรียผสมในรูปแบบเซลล์ ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม	ชุดควบคุม
0	108378.54±2343.90	108915.09±1038.07
12	106202.05±5542.13	106419.57±2557.29
24	95030.64±1611.52	96119.73±954.48
48	87652.32±1130.66	92525.24±1868.33
72	83513.93±1624.06	89179.81±924.51
เวลา (วัน)	น้ำมันที่หายไป (%)	
0	0	
12	0	
24	1	
48	5	
72	6	

ตารางที่ ง.12 จำนวนแบคทีเรีย (logCFUต่อกรัม) ของแบคทีเรียผสมที่อยู่บนจากพอลิยูรีเทนโฟมในที่  
ผ่านการทำจลนพลศาสตร์การย่อยสลายน้ำมันโดยมีจำนวนเริ่มต้นประมาณ 11.2-11.6 logCFUต่อ  
กรัม

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนแบคทีเรีย (logCFUต่อกรัม)					
	ความเข้มข้นน้ำมันปาล์ม (กรัมต่อลิตร)					
	1.5	5	15	40	60	100
6	9.67±0.57	-	-	-	-	-
12	11.65±0.06	11.60±0.11	11.63±0.10	11.52±0.06	11.46±0.07	10.88±0.03
24	12.21±0.09	12.63±0.07	12.90±0.05	12.32±0.17	12.52±0.07	12.97±0.03
48	13.19±0.05	13.44±0.14	13.58±0.08	13.48±0.06	12.52±0.04	12.53±0.05
72	-	13.57±0.08	13.40±0.10	13.31±0.36	13.32±0.08	13.29±0.09

ตารางที่ ง.13 ปริมาณไขมันในน้ำเสียจริงจากร้าน Mc Donald โดยชุดควบคุม ในบ่อดักไขมันจำลอง ขนาด 4 ลิตร

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณไขมัน(มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	ชุดควบคุม		น้ำมันที่หายไป (%)
	น้ำเข้า	น้ำออก	
0	1606.93±109.48	1606.90± 109.47	0
1	1796.29±15.53	1837.91±55.22	2
3	1502.27±72.09	1554.81±65.44	3
5	1455.82±95.82	1495.80±105.40	3
7	1464.86±62.32	1517.61±20.04	3

ตารางที่ ง.14 ปริมาณไขมันในน้ำเสียจริงจากร้าน Mc Donald โดยชุดทดลองวัสดุตั้งและอากาศ ในบ่อดักไขมันจำลองขนาด 4 ลิตร

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณไขมัน(มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	ชุดควบคุม		น้ำมันที่หายไป (%)
	น้ำเข้า	น้ำออก	
0	2995.51±107.54	2955.78±173.77	0
1	2782.19±113.55	2230.71±119.65	19
3	2668.91±122.76	2104.61±85.86	21
5	2876.97±166.48	2238.28±185.69	22
7	2161.56±268.66	1639.93±75.07	23

ตารางที่ ง.15 ปริมาณไขมันในน้ำเสียจริงจากร้าน Mc Donald โดยชุดทดลองใส่แบบที่เรียเซลล์ตรง และอากาศในบ่อดักไขมันจำลองขนาด 4 ลิตร

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณไขมัน(มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	ชุดทดลอง		น้ำมันที่หายไป (%)
	น้ำเข้า	น้ำออก	
0	1495.80±105.40	1495.79±149.40	0
1	1418.96±94.06	1005.19±149.53	29
3	1100.77±43.76	474.13±75.50	57
5	1242.17±172.84	519.11±61.57	58
7	1291.18±163.12	500.86±38.60	61
9	1276.05±50.48	181.75±28.90	86
11	1359.86±107.65	399.48±50.16	70
13	1511.94±135.63	459.76±53.37	69
15	1235.28±22.19	972.90±34.56	21
17	1331.62±73.16	547.61±55.26	59
19	1413.83±83.48	569.22±65.83	60
21	1517.99±124.42	583.09±58.61	62

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ SBO1

&gt;Contig-0

TACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGC  
 ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTG  
 CCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA  
 TCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGG  
 AGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGTAG  
 TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGT  
 TTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGAAGCCAGCCGCTTAGGGGGGAACAAATAATTGGGGTGC  
 AAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGC  
 GCGCGCTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGGGGCTGCTGGCACGTAGTTA  
 GCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACACAGA  
 GTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTC  
 CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGC  
 TACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACA  
 GCCGAAGCCGCTTTCAATTTGAAACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGTTTCCCGGAGT  
 TATCCCAGTCTTATGGGCAG

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ URBO1

&gt;Contig-0

GCTGCACGGTACTCCAGCGGATGCTTATGCGTTAGCTGCGTCACTAAAGGGCGGAACCCCTAACACTTAACA  
 CTCCTCGTTTTAGCGCGTGAATAACCGGGGTATCTAATCGTGTTCTCTCCCCACGCTTTTCGCTCCTCAGTGTC  
 AGTTAAAGACCAAAGAGTCCCCCTCCCCAGTGGTGTTCCTCCATATCTCTACCATTTACCGCTACACGTAGAA  
 TTCCACTCTCCTTCTGCACTCAAGTTCCCAATTTCAATGACCCTCCGCGGGAGACCCGGGGACTTTTAC  
 CTCACACTTAAAAAACCCCGCGAGCCTTTTACCCCAATAATTAGGAAAACGCTTGCCACCTACATAATAC  
 CGCGGGTGGTGGCAAATATATAGCCGTGGTTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCCCTATTGAAATTT  
 ACTTTTTCTTCACTAACACATACATTTACGATGCGAAAACCTTCATCACTCACGTTGCGTTGCACTGTCAGAT  
 GTTCTCCATTGAGGAATATCCCTACTGCTGACTCCCGTAGGAGTCTGGGACGCGTCTCAATCATAAGTGA  
 TCGATCACCTCTCAGGTCGGATACCAATAATTACCTTGGTGAACCATACCTCACCACTACCATATGTGTCT  
 CGGGTCAATGTGAAAGTGGTAGTCAAAGCCACCTTTTATGATCGAATCATAAGGTTCAAACAAGTATCCACGT  
 AGTAACTCACGGTTTCCCGGACTTATCCCAATCGTACAGGTAGATTAGCCAGTTGTAAGTCAAGCCGTCAGCCG  
 TTAATATCAGGAGAGACAAACCTAAATAGCCCGCTCGACTTGCATGTATTAGAAAACGCCGCTAGAGTTCGTCC  
 TGAGCTGTAAAAAACCCCTAAAAAACCTTTACAAAATCTTTTAGGGGCAAAGTTTT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ SBO2

&gt;Contig-0

AGTAACACGTGGGTAACCTGCCCGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTG  
 TGAACCTCATGGTTCGAGATTGAAAGATGGCTTCGGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAG  
 TTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT  
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC  
 AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTATTTGAAT  
 AAGCTGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
 GTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
 ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATCCCATGTGT  
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGA  
 GCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTGCTAAGTGTAGAGGGTT  
 CCGCCCTTTAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCA  
 ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTCCCCCTTTGGGAGGACAG  
 AGAGAGGGGGGGCGTGGGGGTGTCCACCTCTCGTGTGAGATGTGGGGGAAATCCCCAACGAGAGCACCC  
 CTTTTGATTTTTGCGCCATTTCTTGGGGGCTCTCTAGGGAGAGTCTAATCTTCTGTGCCTTTTGAGATGT  
 GGGATACACGTGTGCTACTGTGGGGGGCACAGAGATGCGCGACACCGAGGGGGGGATCTTCTCTTATAACAG  
 CGCTCTTCTCATAGTGGGCGGTGCCTCTCCTCTATGCGGTGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ UPO1

&gt;Contig-0

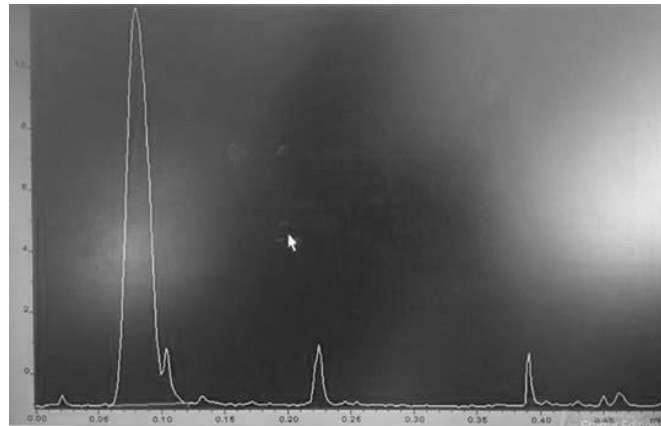
GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG  
 TGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTG  
 ATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTG  
 GAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTG  
 TAACTGACACTCGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
 GGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT  
 CTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
 GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCAC  
 TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG  
 GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCG  
 TTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC  
 CGCGGTGAATACGTT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *peanibacillus elgii* สายพันธุ์ RO3

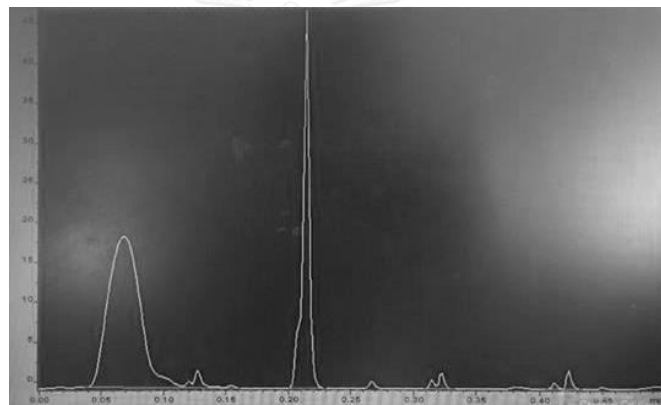
>Contig-0

AAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAAC  
TGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGA  
CCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCG  
ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCG  
GGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAA  
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC  
GTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAA  
CTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA  
ATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAAAGCGACTGGGGAGCAAAC  
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTC  
CGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGG  
CCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACA  
GAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT  
TGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACT  
CAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAAGAAAGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTCAACCAGG  
GGTACCACCGCCTACATGAATTGTTTTTACAAAAAAA

ก



ข

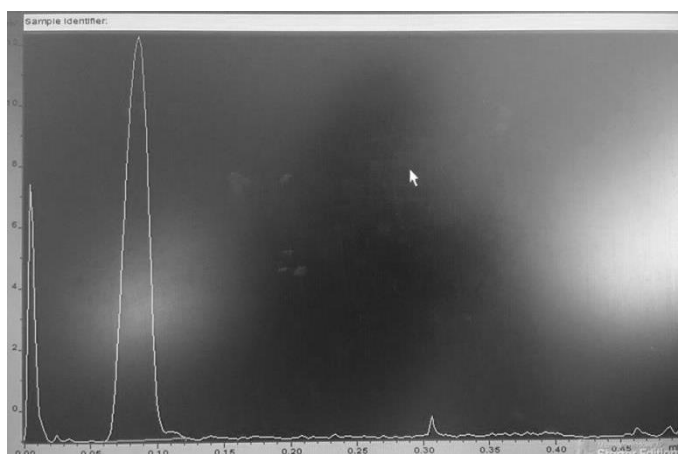


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

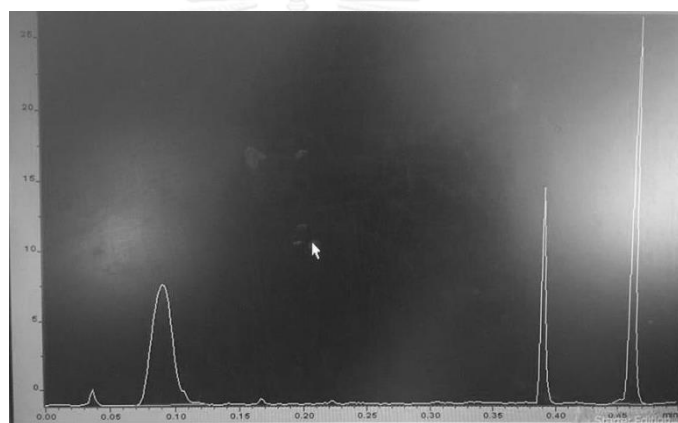
รูปที่ ง1 ตัวอย่าง TLC-FID โครมาโตแกรมของน้ำเสียจริงจากบ่อดักไขมันจำลอง  
 ก.น้ำเสียจริงก่อนเข้าระบบ Retention time=0.088 peak area=6383  
 ข.น้ำเสียจริงหลังเข้าระบบ Retention time=0.087 peak area=4468



ก



ข



รูปที่ 2 ตัวอย่าง TLC-FID โครมาโตแกรมของน้ำเสียสังเคราะห์หลังจากเติมแบคทีเรียตรึง

ก. น้ำเสียสังเคราะห์ชั่วโมงที่ 0 Retention time=0.093 peak area=10984

ข. น้ำเสียสังเคราะห์ชั่วโมงที่ 72 Retention time=0.090 peak area=5254

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพลิศามหาชัย เกิดเมื่อวันที่ 3 พฤศจิกายน พ.ศ.2533 ที่จังหวัดพิษณุโลก สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556

#### ผลงานตีพิมพ์

Mahachai P., Paorach N., Luepromchai E. (2015). Isolation and identification of bacteria from grease trap and activated sludge process for degradation of fat and oil. The 1st International Conference on Environment, Livelihood, and Services: EnvironmentforLife. Bangkok, Thailand, 2-5 November (Poster presentation proceeding)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY