



การตรวจหาแบคทีเรียย่อยไขมันจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

กิจจา จิตรภิมย์* ปธานิน แสงอรุณ*

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยไขมันของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียจากถังดักไขมัน (4 ตัวอย่าง) น้ำหมักชีวภาพ (2 ตัวอย่าง) น้ำจากคลองรวบรวมน้ำเสีย (2 ตัวอย่าง) และตะกอนดินป่าชายเลน (3 ตัวอย่าง) โดยนำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงในอาหาร screening medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายไปยังอาหาร tributyrin agar เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ พบว่าแยกแบคทีเรียที่ย่อยไขมันได้รวม 39 ไอโซเลท โดยผ่านขั้นตอนการตรวจคัดเลือก 13 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากน้ำเสียถังดักไขมัน น้ำหมักชีวภาพ น้ำเสียจากคลอง และตะกอนดินป่าชายเลน จำนวน 7 4 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยไขมัน พบว่าแบคทีเรียที่แยกจากถังดักไขมัน T3/2 สามารถย่อย

น้ำเสียไขมันในสังเคราะห์ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งอื่นคือสามารถย่อยไขมันได้ร้อยละ 52.0 อัตราการย่อยไขมัน 0.025 มิลลิลิตรต่อวันในช่วงเวลาทดสอบ 21 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่ย่อยด้วยแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าน้ำเสียไขมันสังเคราะห์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงสภาพตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 11 ของการทดสอบ โดยน้ำใสขึ้น มีการตกตะกอนและความหนาของชั้นไขมันลดลง แบคทีเรียที่แยกได้จากการศึกษานี้สามารถย่อยสลายไขมันได้ดี การเพาะเลี้ยงง่าย ดังนั้นจึงเหมาะกับการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันได้ โดยประหยัดค่าใช้จ่ายและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ: แบคทีเรียย่อยไขมัน, น้ำเสีย

บทนำ

ความเจริญก้าวหน้าทางสังคมก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านเศรษฐกิจและการเพิ่มจำนวนของประชากร ทั้งยังส่งผลให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมมากมาย ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สำคัญปัญหาหนึ่งคือ ปัญหาน้ำเสีย สาเหตุของการปนเปื้อนมลพิษทางน้ำจนถึงระดับที่ก่อให้เกิดปัญหาน้ำเสียมาจาก 2 แหล่งใหญ่ๆ คือ ชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะน้ำเสียที่มีไขมันปะปนอยู่มาก เช่น ชุมชนที่ประกอบอาหาร อุตสาหกรรมที่มีน้ำมันรั่วซึม เป็นต้น การที่น้ำเสียปนเปื้อนไขมันก่อให้เกิดปัญหาในขั้นตอนของการบำบัดน้ำเสีย โดยไขมันจะไปขัดขวางการทำงานของแบคทีเรียในกระบวนการบำบัดแบบใช้อากาศ ทำให้การบำบัดน้ำเสียทำได้ยากหรือทำให้ระบบการบำบัดน้ำเสียขัดข้องได้^{1,2} และควรเลือกวิธีการกำจัดไขมันที่เหมาะสม เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำเสียนั้นมีหลากหลายวิธี บางวิธีใช้เทคโนโลยีที่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านในการติดตั้งและการบำรุงรักษาระบบ บางกรณีอาจจะทำให้เกิดสารเคมีตกค้างและเกิดผลพลอยได้ที่มีปัญหาในการกำจัดขึ้นอีก การกำจัดไขมันออกจากน้ำเสียโดยปกติแล้วมักจะใช้สารเคมีในการย่อยสลายไขมันหรืออาจจะใช้วิธีการดักชั้นไขมันจากถังดักไขมันออกไปทั้งตามที่ตั้งต่างๆ ซึ่งวิธีการเหล่านี้ทำให้เกิดปัญหาล้างแฉะล้นอื่นๆ เป็นแหล่งของเชื้อโรคต่างๆ สุนัข สัตว์ และพืช และส่งผลกับการท่องเที่ยวอีกด้วย³ ดังนั้นการบำบัดน้ำเสียดังกล่าวนี้นี้ให้เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำที่กำหนดไว้ จำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดไขมันเพิ่มขึ้น

ในปัจจุบันนอกจากการใช้สารเคมีในการบำบัดหรือย่อยสลายไขมันในระบบบำบัดน้ำเสียแล้ว การนำจุลินทรีย์บางกลุ่มที่มีความสามารถในการ

ย่อยสลายไขมันเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ และมีผลการศึกษาว่าไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างในระบบบำบัด⁴ แต่จุลินทรีย์ที่นิยมใช้มักเป็นสายพันธุ์พิเศษที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งนอกจากทำให้ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในกระบวนการบำบัดค่อนข้างมากแล้ว จุลินทรีย์ดังกล่าวนี้อาจส่งผลโดยรวมต่อระบบนิเวศในภายหลังได้ ดังนั้นการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในท้องถิ่นของประเทศไทยมาใช้ในการย่อยสลายไขมันน่าจะมีประสิทธิภาพในการบำบัดได้สูงกว่าเนื่องจากได้ผ่านการคัดเลือกจากธรรมชาติแล้ว และจะมีผลต่อระบบนิเวศโดยรวมน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

ปัจจุบันมีรายงานการคัดแยกจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและยีสต์ที่สามารถย่อยสลายไขมัน และมีคุณสมบัติเฉพาะอื่นๆ มากมาย เช่น *Staphylococcus warneri* นอกจากมีประสิทธิภาพในการย่อยไขมันแล้วยังมีความทนทานต่อความเค็มได้ด้วย⁵ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. มีความทนทานในสิ่งแวดล้อมดีมาก^{6,7} นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. CBS 10854, *Candida tropicalis* และ *Yarrowia lipolytica* แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์หลักที่สามารถอยู่รวมกันได้ในสภาพจุลินทรีย์ผสมที่ย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดี⁸ เมื่อพิจารณาจากสภาพภูมิประเทศของไทยน่าจะมีความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันสูง เนื่องจากตั้งอยู่ในภูมิภาคร้อนชื้น การตรวจหาและแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไขมันจากตัวอย่างน้ำเสียและสิ่งแวดล้อมเพื่อนำไปพัฒนาระบบบำบัดน้ำเสียต่อไปจึงเป็นการนำทรัพยากรชีวภาพมาปรับใช้จนก่อประโยชน์สูงสุด นอกจากช่วยลดปัญหาการนำเข้า

เทคโนโลยีและจุลินทรีย์แล้ว ยังเป็นการพึ่งพาตัวเองจนเกิดความยั่งยืนในที่สุด

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่าง

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงสำรวจและทดลอง โดยการตรวจหาและการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมันจากตัวอย่างน้ำเสียและสิ่งแวดล้อม รวมถึงทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียไขมัน โดยเลือกเก็บตัวอย่างน้ำเสียไขมันและน้ำหมักชีวภาพซึ่งมีรายงานพบว่ามีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันอยู่ และเลือกตัวอย่างจากแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ คือ ตะกอนดินในป่าชายเลน เพื่อที่จะมีความเป็นไปได้ในการตรวจพบแบคทีเรียหลากหลายชนิด สรุปจำนวนตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมันทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ดังนี้ น้ำเสียจากถังดักไขมันที่ติดตั้งภายในร้านอาหารที่ประกอบกิจการอาหารต่างกันจำนวน 4 ตัวอย่าง คือ ร้านข้าวแกง (T1) ร้านก๋วยเตี๋ยว (T2) ร้านอาหารตามสั่ง (T3) และร้านข้าวหมูแดง (T4) โดยการสุ่มเก็บน้ำเสียที่เก็บกักในถังดักไขมันหลังเสร็จสิ้นกิจกรรมในตอนเย็น ปริมาตร 1 ลิตร ตัวอย่างน้ำในคลองรวมน้ำเสียจากชุมชนจำนวน 2 ตัวอย่าง (W1 และ W2) โดยเลือกบริเวณที่มีการปนเปื้อนและเกิดการสะสมคราบน้ำมัน จำนวน 1 ลิตร ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จำนวน 2 ตัวอย่าง คือสูตรฮอว์โมนผลไม้หรือฮอว์โมนยอดพืช (M1) และหาซื้อจากท้องตลาด (M2) ตัวอย่างละ 1 ลิตร และตะกอนดินป่าชายเลนบางขุนเทียนจำนวน 3 ตัวอย่าง (S1-S3) โดยเก็บบริเวณที่มีการปนเปื้อนคราบน้ำมันในช่วงน้ำลดต่ำสุด ผสมดินบริเวณผิวหน้าดินจนถึงลึก 10 เซนติเมตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน สุ่มเก็บมาปริมาณอย่างน้อย 1 กิโลกรัม

การแยกเชื้อจากตัวอย่าง

การแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยไขมัน โดยนำตัวอย่างน้ำเสีย และน้ำหมักชีวภาพ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างตะกอนดินจากป่าชายเลนซึ่งตัวอย่างตะกอนดิน 20 กรัม ใส่ลงใน 180 มิลลิลิตรของ Screening medium ประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 กรัม, Peptone 1 กรัม, NaCl 0.5 กรัม และน้ำมันปาล์ม 10 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ซึ่งดัดแปลงจาก เสาวนีย์ ธรรมสถิต (2540)¹⁰ แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนเป็น Peptone และน้ำมันปาล์ม แทนรำข้าวและน้ำมันรำข้าว และลดแหล่งธาตุอาหารอื่นๆ ได้แก่ Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 ในสูตรอาหารลง เพื่อส่งเสริมให้เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Chemoheterotrophs เจริญได้ง่ายขึ้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar (TA; Peptone 5 กรัม, Yeast extract 2.5 กรัม, Glucose 1 กรัม, Tributyrin 12 มิลลิลิตร และ Agar 15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีที่มีวงใส (Clear zone) รอบโคโลนีจากการย่อยสลายไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเก็บเชื้อที่มีวงใสรอบโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar slant (NA; Peptone 5 กรัม Beef extract 3 กรัม และ Agar 15 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ที่ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อเพื่อเก็บใหม่ หากเก็บไว้เกิน 1 สัปดาห์ เพื่อบำรุงการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันต่อไป

การคัดเลือกสายพันธุ์และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน

การคัดเลือกสายพันธุ์และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันโดยดัดแปลงจากการทดลองของ มณจันทร์ เมฆธน และมณเฑียร ส่งเสริม (2539)⁷

มี 2 ขั้นตอนคือ ขั้นแรก การตรวจคัดเลือกทำโดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมมาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว (Single Colony) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TA อีกครั้ง ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมันโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของการย่อยไขมัน¹¹ ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ที่มีความละเอียด 0.05 มิลลิเมตร เลือกแบคทีเรียที่ให้วงใสของการย่อยไขมันบน TA ได้ เท่ากับหรือมากกว่า 3 มิลลิเมตร เนื่องจากมีรายงานการพบเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดี¹² มาทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB; Peptone 5 กรัม และ Beef extract 3 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ภายใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เก็บเชื้อที่มีคุณสมบัตินี้ไว้ใน NA slant ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในขั้นที่สอง ซึ่งเป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ ทำโดยนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ภายใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยการนับจำนวนเชื้อโดยวิธี Serial Dilution Spread Plate บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเจือจางในสารละลายนอร์มัลซาลิน (Normal Saline Solution; NSS) ในระดับการเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-7} ให้มีจำนวนเชื้อ 10^8 - 10^9 CFU/ml ดูดเชื้อใน NB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (แป้งมัน 0.02 กรัม, นมผง 0.02 กรัม, น้ำตาล 0.02 กรัม และ น้ำมันปาล์ม 1.0 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 8.0 มิลลิลิตร)

การประเมินปริมาณไขมันที่แบคทีเรียย่อยได้

ประเมินปริมาณไขมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่แบคทีเรียย่อยได้โดยการตรวจวัดความหนาของชั้นไขมันด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ที่มีความละเอียด

0.05 มิลลิเมตร ในการวัดใช้ปากวัดนอกของเวอร์เนียคาลิเปอร์วางทาบลงบนหลอดในตำแหน่งของขอบบนถึงขอบล่างของชั้นไขมันหลอดละ 2 ตำแหน่ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยความหนาชั้นไขมันที่หายไปในแต่ละหลอดบันทึกการเปลี่ยนแปลงความหนาของชั้นไขมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ของชุดทดสอบ (ใส่แบคทีเรีย) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ใส่ NB แทนแบคทีเรีย) จำนวน 3 ซ้ำ ที่ผ่านการตรวจติดตามการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียและสรุปความสามารถในการย่อยไขมันทุกๆ 2 วัน และศึกษาต่อไปจนครบ 21 วัน

การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลและคำนวณค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ประสิทธิภาพในการย่อยไขมัน คำนวณได้จากความสามารถในการย่อยไขมันของแบคทีเรียตามสมการที่ 1

$$A_t = \{(B_t/B_0) - (C_t/C_0)\} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

เมื่อ A_t = ความสามารถในการย่อยไขมันของแบคทีเรียที่เวลาใดๆ (ร้อยละ)

B_0 = ค่าเฉลี่ยของความหนาชั้นไขมันในชุดทดสอบเริ่มต้น (มิลลิเมตร)

B_t = ค่าเฉลี่ยของความหนาชั้นไขมันที่หายไปในชุดทดสอบที่เวลาใดๆ (มิลลิเมตร)

C_0 = ค่าเฉลี่ยของความหนาชั้นไขมันในชุดควบคุมเริ่มต้น (มิลลิเมตร)

C_t = ค่าเฉลี่ยของความหนาชั้นไขมันที่หายไปในชุดควบคุมที่เวลาใดๆ (มิลลิเมตร)

2. ปริมาณไขมันที่ถูกย่อยโดยแบคทีเรียสามารถคำนวณด้วยสมการที่ 2

$$V = W/X \dots \dots \dots (2)$$

เมื่อ V = ปริมาณไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ (มิลลิลิตร/มิลลิเมตร)



W = ปริมาณไขมันที่ใส่เริ่มต้น (1 มิลลิลิตร)
รวมไขมันจากนมซึ่งมีปริมาณน้อยมาก

X = ความหนาของชั้นไขมันในน้ำเสีย
ไขมันสังเคราะห์เริ่มต้น (10 มิลลิเมตร)

ดังนั้นปริมาณไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้
ทดสอบคือ 0.1 มิลลิลิตรต่อมิลลิเมตร (1/10) หรือ
หากวัดชั้นไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์หนา 1.0 มิลลิเมตร
จะเทียบได้กับปริมาณไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ 0.1
มิลลิลิตร

3. อัตราการย่อยสลาย คำนวณได้จากสมการ
ที่ 3

$$R_t = (A_t/100) \times d_t^{-1} \dots\dots\dots (3)$$

R_t = อัตราการย่อยที่เวลาใดๆ (มิลลิลิตร
ต่อวัน)

A_t = ความสามารถในการย่อยไขมันที่เวลา
ใดๆ (ร้อยละ)

d_t = จำนวนวันที่เกิดการย่อยที่เวลาใดๆ (วัน)

4. สร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ในการทำนาย
ปริมาณการย่อยไขมันของแบคทีเรีย

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ
การย่อยได้กับระยะเวลา พร้อมทั้งวิเคราะห์ความ
สัมพันธ์ดังกล่าวโดยในสมการถดถอยเชิงเส้นตรง
อย่างง่าย (Simple Linear Regression) คำนวณได้
จากเลขยกกำลังสองของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
(Correlation Coefficient) ใช้สัญลักษณ์แทนด้วย r^2
มีค่าอยู่ระหว่าง 0 -1 ถ้ามีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่า
สมการนั้นเหมาะสำหรับใช้ในการทำนายค่าตัวแปร
ในสมการได้ดี

ผลการศึกษา

การแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไขมัน

การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรียที่
ย่อยสลายไขมันจากการเกิดวงใสรอบโคโลนีบนอาหาร
เลี้ยงเชื้อ TA ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมงได้ทั้งหมด
39 ไอโซเลท จาก 4 แหล่ง ได้แก่ แบคทีเรียจากถัง
ดักไขมันจำนวน 18 ไอโซเลท น้ำจากคลองรวม
น้ำเสียจำนวน 10 ไอโซเลท น้ำหมักชีวภาพจำนวน
5 ไอโซเลท และตะกอนดินป่าชายเลนจำนวน 6
ไอโซเลท (ตารางที่ 1)

7

Table 1 Number of Lipolytic Bacteria Isolated from Different Sources of Samples.

Sources of samples	Isolate Name	No.(%) of Isolates
1. Wastewater from grease traps (4 samples)	T1/1, T1/2, T1/3, T1/4, T1/5, T1/6, T1/7, T1/8, T2/1, T2/2, T2/3, T2/4, T2/5, T2/6, T2/7, T3/1, T3/2, T4/1	18 (46.2)
2. Water from wastewater collecting canal (2 samples)	W1/1, W1/2, W1/3, W1/4, W1/5, W1/6, W2/1, W2/2, W2/3, W2/4	10 (25.6)
3. Bio-fermented water (2 samples)	M1/1, M2/1, M2/2, M2/3, M2/4	5 (12.8)
4. Mangrove sediments (3 samples)	S1/1, S1/2, S2/1, S2/2, S3/1, S3/2	6 (15.4)
Total		39 (100)

ผลการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมัน

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกไว้มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TA อีกครั้งเพื่อทำการวัดวงใสของการย่อยไขมัน พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวให้ขนาดวงใสของการย่อยสลาย ขนาด 2.5 มิลลิเมตรมากที่สุด จำนวน 16 ไอโซเลท (ร้อยละ 41.0) และให้วงใสขนาดใหญ่ที่สุดคือ 13 มิลลิเมตร จำนวน 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 2.2) หากคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ให้วงใสของการย่อยสลายไขมันขนาด ≥ 3 มิลลิเมตร จะเหลือเพียง 23 ไอโซเลท จากทั้งหมด 39 ไอโซเลท (ร้อยละ 59.0) ที่จะใช้ทดสอบในขั้นตอนถัดไป ทั้งนี้

พบว่า ไอโซเลท S2/2 (แยกจากตะกอนดินป่าชายเลน) สามารถย่อยสลายไขมันได้ดีที่สุด คือมีขนาดวงใสของการย่อยสลายไขมันถึง 13 มิลลิเมตร และรองลงมาคือไอโซเลท S1/1, T2/5, S3/2, และ S3/1 มีขนาด 12, 10, 10, และ 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบคุณสมบัติการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ได้ดี มีเพียง 13 ไอโซเลท จากทั้งหมด 23 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) จึงนำทั้ง 13 ไอโซเลท ไปตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

Table 2 Characteristics of Isolated Lipolytic Bacteria (N=39 isolates).

Isolate Name*	Clear Zone Diameter on TA (mm)	Growth in NB at Room Temperature	Isolate Name*	Clear Zone Diameter on TA (mm)	Growth in NB at Room Temperature
T1/1	2.5	ND**	W1/3	5.0	poor
T1/2	2.5	ND	W1/4	5.0	poor
T1/3	7.0	poor	W1/5	5.0	poor
T1/4	2.5	ND	W1/6	6.0	good
T1/5	2.5	ND	W2/1	2.5	ND
T1/6	2.5	ND	W2/2	4.0	poor
T1/7	5.0	good	W2/3	2.5	ND
T1/8	2.5	ND	W2/4	2.5	ND
T2/1	2.5	ND	M1/1	7.0	good
T2/2	2.5	ND	M2/1	7.0	good
T2/3	3.0	good	M2/2	5.0	poor
T2/4	5.0	good	M2/3	3.0	good
T2/5	10.0	good	M2/4	6.0	good
T2/6	2.5	ND	S1/1	12	poor
T2/7	2.5	ND	S1/2	2.5	ND
T3/1	7.0	good	S2/1	2.5	ND
T3/2	7.0	good	S2/2	13	poor
T4/1	7.0	good	S3/1	8	good
W1/1	2.5	ND	S3/2	10	poor
W1/2	6.0	poor			

*Selected isolates for determination of lipid hydrolysis efficiency were typed in bold characters.

**ND; Not Done, because clear zone < 3 mm

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย ไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยไขมันของ
แบคทีเรียที่แยกจากถังดักไขมัน ได้แบคทีเรียที่ผ่าน
การตรวจคัดกรองจำนวน 7 ไอโซเลท (T1/7, T2/3,
T2/4, T2/5, T3/1, T3/2 และ T4/1) พบว่าไอโซเลท
T3/2 สามารถย่อยสลายชั้นไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์
ได้ดีตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดสอบโดยย่อยสลายไขมัน
ได้สูงที่สุดถึง 0.52 มิลลิกรัม จากไขมันเริ่มต้น 1.0
มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ 52.0 โดยมีอัตราการย่อยสลาย
0.025 มิลลิกรัม/วัน ในระยะเวลา 21 วันของการ
ทดสอบ รองลงมาคือ T3/1 ย่อยสลายชั้นไขมันได้ดี
ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดสอบเช่นกัน แต่อัตรา
ย่อยสลายต่ำกว่า T3/2 เล็กน้อย ซึ่งมีความสามารถ
ในการย่อยสลายไขมัน 0.47 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ
47.0 โดยมีอัตราการย่อยสลาย 0.022 มิลลิกรัม/วัน
ส่วนผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยไขมันของ
แบคทีเรียไอโซเลทอื่น มีดังนี้ T4/1 มีความสามารถ
ในการย่อยสลายไขมัน 0.39 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ
39.0 โดยมีอัตราการย่อยสลาย 0.019 มิลลิกรัม/วัน
T2/5 เริ่มย่อยสลายชั้นไขมันในวันที่ 5 ของการทดสอบ
ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน 0.36 มิลลิกรัม
คิดเป็นร้อยละ 36.0 โดยมีอัตราการย่อยสลาย 0.017
มิลลิกรัม/วัน T1/7 เริ่มย่อยสลายชั้นไขมันได้ในวันที่
11 ของการทดสอบ มีความสามารถในการย่อยสลาย
ไขมัน 0.09 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ 9.0 โดยมีอัตรา
การย่อยสลาย 0.004 มิลลิกรัม/วัน T2/3 เริ่มย่อยสลาย
ชั้นไขมันได้ตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดลองแต่ย่อยได้

ช้ามากทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละวันน้อยมาก
มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน 0.08 มิลลิกรัม
คิดเป็นร้อยละ 8.0 โดยมีอัตราการย่อยสลาย 0.004
มิลลิกรัม/วัน และ T2/4 เริ่มย่อยชั้นไขมันได้ในวันที่
11 ของการทดลอง และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ
ชั้นไขมันต่อไปอีก ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลาย
ไขมัน 0.003 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ 0.3 โดยมี
อัตราการย่อยสลาย 0.0001 มิลลิกรัม/วัน

จากผลการทดสอบความสามารถในการย่อย
สลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ของเชื้อแบคทีเรีย
ที่แยกจากถังดักไขมัน 7 ไอโซเลท พบว่า เริ่มมีการ
ย่อยสลายชั้นไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ดีตั้งแต
วันที่ 3 ของการทดสอบ และช้าที่สุดคือวันที่ 11 ของ
การทดสอบ ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน
อยู่ระหว่าง 0.0035-0.52 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ
0.3-52.0 และมีอัตราการย่อยสลาย 0.0001-0.025
มิลลิกรัม/วัน ใน 21 วันของการทดสอบ (รูปที่ 1)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย
ไขมันของแบคทีเรียที่แยกจากน้ำในคลองรวบรวม
น้ำเสีย: ได้แบคทีเรียที่ผ่านการตรวจคัดกรองเพียง
1 ไอโซเลท คือ W1/6 ในช่วง 21 วันของการทดสอบ
พบว่า W1/6 เริ่มย่อยสลายชั้นไขมันในน้ำเสีย
สังเคราะห์ได้ในวันที่ 7 ของการทดสอบ และย่อยสลาย
ได้ช้ามากจนแทบไม่พบการเปลี่ยนแปลงของชั้นไขมัน
ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไขมันเพียง 0.02
มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ 2.0 และมีอัตราการย่อยสลาย
0.001 มิลลิกรัม/วัน (รูปที่ 2)

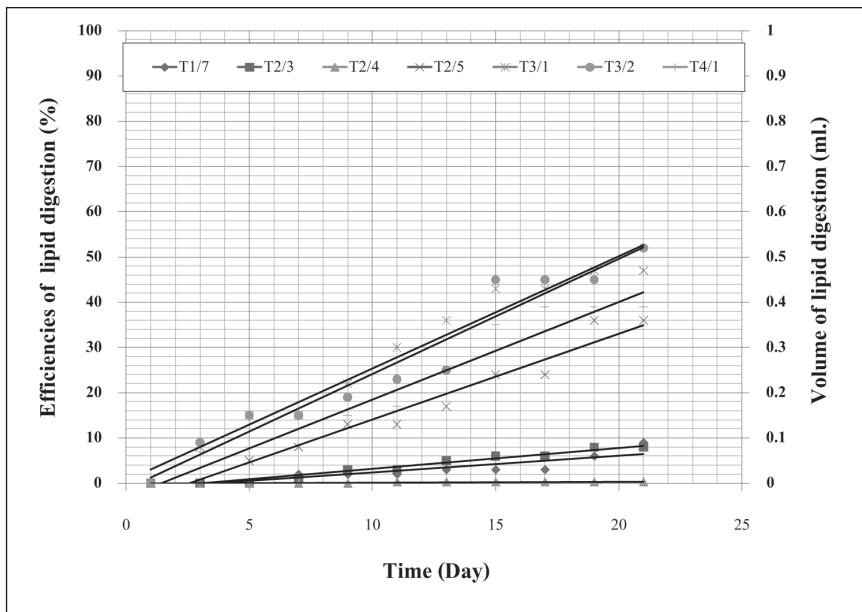


Figure 1 Lipid Hydrolysis Efficiency in Synthetic Lipid Wastewater by 7 Selected Isolates from Grease Traps Wastewater.

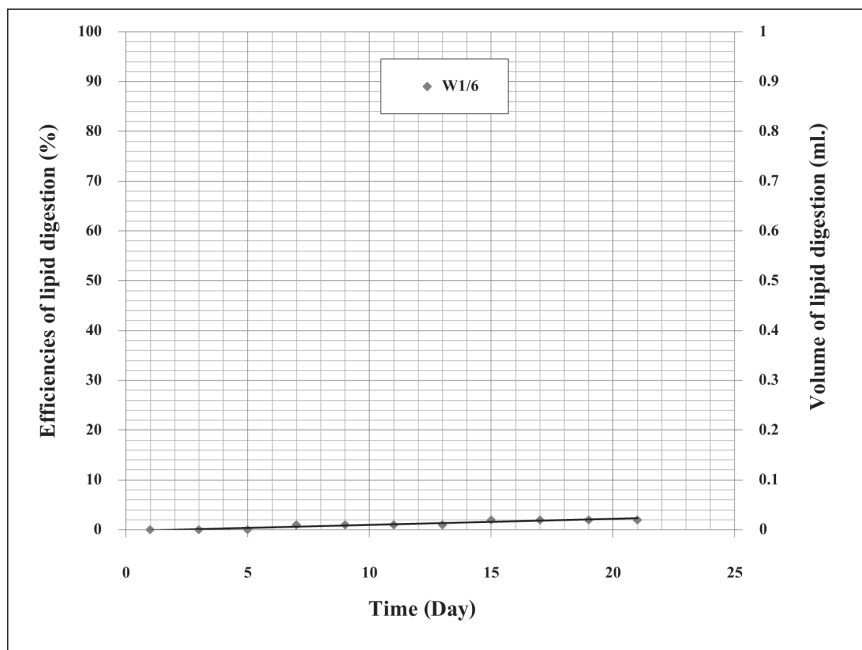


Figure 2 Lipid Hydrolysis Efficiency in Synthetic Lipid Wastewater by 1 Selected Isolate from Waste from Wastewater Collecting Canal.

ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียที่แยกจากน้ำหมักชีวภาพ: ได้แบคทีเรียที่ผ่านการตรวจคัดกรองจำนวน 4 ไอโซเลท (M1/1, M2/1, M2/3, และ M2/4) ในช่วง 21 วันของการทดสอบ พบว่า M2/1 เริ่มย่อยสลายชั้นไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดสอบ แม้ย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ T3/2 แต่สามารถย่อยได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากแหล่งเดียวกัน (น้ำหมักชีวภาพ) คือสามารถย่อยสลายไขมันได้สูงที่สุดเพียง 0.08 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 8.0 โดยมีอัตราการย่อยสลาย 0.004 มิลลิลิตร/วัน รองลงมาคือ M2/4 เริ่มมีการย่อยสลายชั้นไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์วันที่ 11 ของการทดสอบ และย่อยไขมันได้เพียงครึ่งเมื่อเทียบกับ M2/1 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน 0.04 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 4.0 โดยมีอัตราการย่อยสลาย 0.002 มิลลิลิตร/วัน ส่วน M1/1 เริ่มมีการย่อยสลายชั้นไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์วันที่ 5 ของการทดสอบ และไม่ย่อยสลายต่อไป ซึ่งมีความ

สามารถในการย่อยสลายไขมันเพียง 0.02 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 2.0 โดยมีอัตราการย่อยสลาย 0.001 มิลลิลิตร/วัน และ M2/3 เริ่มย่อยสลายชั้นไขมันได้ในวันที่ 15 ของการทดสอบ และย่อยได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งเดียวกัน ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไขมันเพียง 0.01 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 1.0 โดยมีอัตราการย่อยสลาย 0.0005 มิลลิลิตร/วัน

ดังนั้นจากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ของเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักชีวภาพ (M) พบว่าแบคทีเรีย M1/1, M2/1, M2/3 และ M2/4 เริ่มย่อยสลายชั้นไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ตั้งแต่วันที่ 5, 5, 15 และ 11 ของการทดสอบตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไขมันอยู่ระหว่าง 0.01-0.08 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 1.0-8.0 และมีอัตราการย่อยสลาย 0.0005-0.004 มิลลิลิตร/วัน (รูปที่ 3)

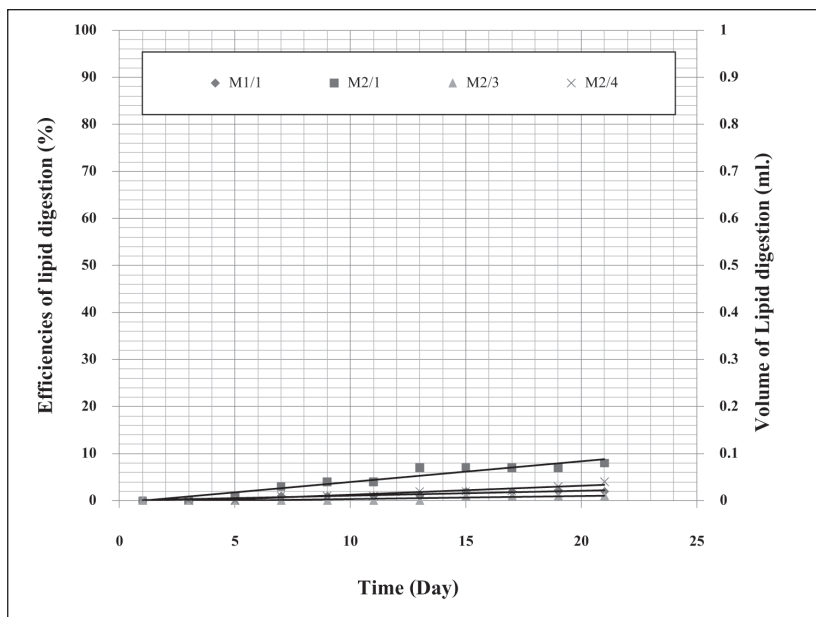


Figure 3 Lipid Hydrolysis Efficiency in Synthetic Lipid Wastewater by 4 Selected Isolates from Bio-fermented Water.

ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียจากตะกอนดินป่าชายเลน: ได้แบคทีเรียที่ผ่านการตรวจคัดกรองจำนวน 1 ไอโซเลท คือ S3/1 ในช่วง 21 วันของการทดสอบ พบว่า S3/1 เริ่มย่อยสลายชั้นไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดสอบ และมีการย่อยอย่างต่อเนื่อง พบว่า S3/1

ย่อยไขมันได้ช้ากว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่แยกได้จากถังดักไขมัน แต่จะย่อยไขมันได้ดีกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำคลองรวมน้ำเสียและน้ำหมักชีวภาพ กล่าวคือ ย่อยไขมันได้ 0.2 มิลลิลิตรหรือร้อยละ 20.0 คิดเป็นอัตราการย่อยเท่ากับ 0.01 มิลลิลิตร/วัน (รูปที่ 4)

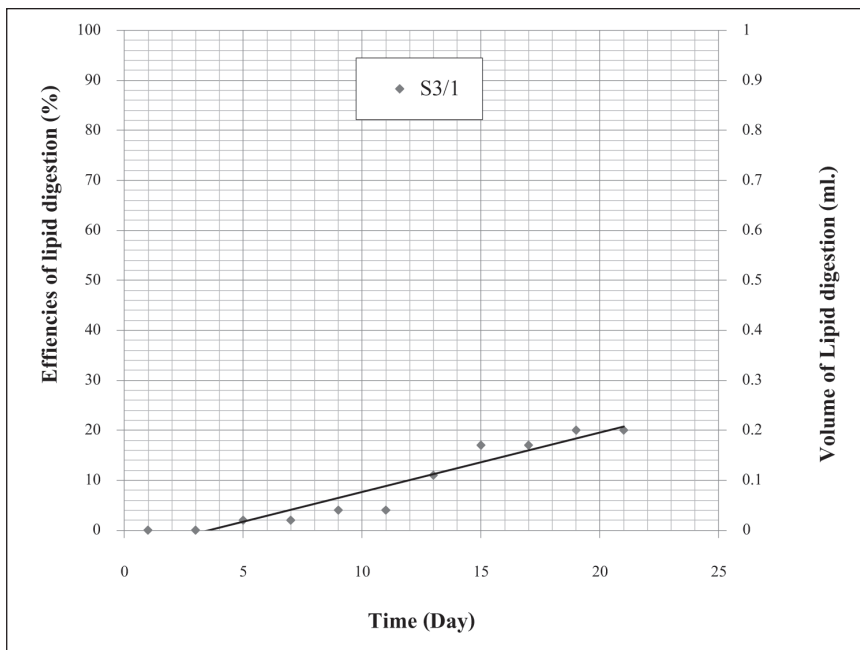


Figure 4 Lipid Hydrolysis Efficiency in Synthetic Lipid Wastewater by 1 Selected Isolate from Mangrove Sediments.

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่เกิดการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียโดยทั่วไปแล้วการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำเสียไขมันสังเคราะห์จะเริ่มพบตั้งแต่วันที่แรกๆของการทดสอบ โดยน้ำเสียไขมันสังเคราะห์เริ่มใสขึ้นมีการตกตะกอน แต่เริ่มพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของชั้นไขมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์เกิดขึ้นในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 11 ของการทดสอบขึ้นอยู่กัชนิดของ

แบคทีเรีย คือเกิดการบดเบี้ยวของชั้นไขมันและความหนาของชั้นไขมันจะเริ่มลดลงจากด้านล่างขึ้นด้านบน จากนั้นชั้นไขมันส่วนบนจะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเป็นของแข็งสีขาวขุ่น และจะคงสภาพไม่ย่อยสลายต่อไป ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ด้วยแบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกแสดงดัง ตารางที่ 3



สมการแสดงความสัมพันธ์ในการทำนายปริมาณการย่อยของแบคทีเรีย

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการย่อยไขมันกับระยะเวลา พบว่ากราฟที่ได้สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียไขมันของแบคทีเรียในแต่ละไอโซเลทโดยใช้สมการเชิงเส้นตรงอย่างง่าย (Simple linear regression)

ได้ดีมากซึ่งมีค่า $r^2 \geq 0.9$ คือสมการย่อยสลายน้ำเสียไขมันสังเคราะห์โดยแบคทีเรีย T2/3, T2/5, T3/1, T3/2, T4/1, M2/1, M2/4 และ S3/1 ส่วนสมการย่อยสลายน้ำเสียไขมันสังเคราะห์โดยแบคทีเรีย T1/7, T2/4, W1/6, M1/1 และ M2/3 ให้ค่า r^2 เป็น 0.80, 0.75, 0.89, 0.85 และ 0.70 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

Table 3 Lipid Hydrolysis Efficiency of Selected Bacterial Isolates in Synthetic Lipid Wastewater at Room Temperature.

Isolate	Initial Time of Lipid Hydrolysis (day)	Percentages of Lipid Hydrolysis in 21 days (SD)	Average of Lipid Hydrolysis Rate* (mL/day)	Estimation of Lipid Hydrolysis by Using Linear Regression**	r^2
T1/7	11	9.0 (0.85)	0.004	$y = 0.37x - 1.32$	0.80
T2/3	5	8.0 (0.00)	0.004	$y = 0.46x - 1.46$	0.96
T2/4	11	0.3 (0.10)	0.0001	$y = 0.02x - 0.06$	0.75
T2/5	5	36.0 (0.52)	0.017	$y = 1.89x - 4.85$	0.96
T3/1	3	47.0 (0.11)	0.022	$y = 2.48x + 0.56$	0.97
T3/2	3	52.0 (2.04)	0.025	$y = 2.55x - 1.36$	0.94
T4/1	3	39.0 (0.96)	0.019	$y = 2.16x - 3.11$	0.93
W1/6	7	2.0 (0.15)	0.001	$y = 0.12x - 0.21$	0.89
M1/1	5	2.0 (0.17)	0.001	$y = 0.10x - 0.03$	0.85
M2/1	5	8.0 (0.31)	0.004	$y = 0.44x - 0.49$	0.92
M2/3	15	1.0 (0.11)	0.0005	$y = 0.06x - 0.039$	0.70
M2/4	11	4.0 (0.52)	0.002	$y = 0.18x - 0.60$	0.91
S3/1	5	20.0 (0.25)	0.010	$y = 1.19x - 4.28$	0.91

* SD < 0.001, ** adjusted by x 100

อภิปรายผล

จากการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายไขมันได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรียจาก 4 แหล่ง ได้แก่ แบคทีเรียจากถังดักไขมันแยกได้มากที่สุด 18 ไอโซเลท จากน้ำคลองรวบรวมน้ำเสีย แยกได้ 10 ไอโซเลท จากน้ำหมักชีวภาพแยกได้ 5 ไอโซเลท และจากดินตะกอน

ป่าชายเลนแยกได้ 6 ไอโซเลท จากนั้นทำการตรวจเลือกไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายไขมันบนอาหาร TA ได้วงใสกว้างขนาดไม่ต่ำกว่า 3 มิลลิเมตร ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมงและเจริญได้ดีในอาหาร NB ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีคุณสมบัติในการเพาะเลี้ยงได้ง่ายไม่ต้องการสารอาหารอื่นๆ ที่จำเพาะ และหาก

เชื้อเจริญได้ดีในอาหารดังกล่าว การปรับเชื้อให้มีจำนวนตามต้องการในการทดสอบขั้นต่อไปจะทำได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นเช่น การแยกจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันและของเสียสูงโดยวิธี Serial Dilution Pour Plate ในอาหาร NA แล้วจึงนำมาคัดกรองการย่อยไขมันบนอาหารแข็ง Congo Red Agar จากการสร้างวงใสของการย่อยไขมัน พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ 37 ไอโซเลท ซึ่งมีขนาดวงใสของการย่อยไขมันตั้งแต่ 3.0-15.5 มิลลิเมตร ภายใน 48 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส¹² ในขณะที่การศึกษานี้ใช้อาหาร TA สามารถแยกแบคทีเรียได้ 39 ไอโซเลทโดยให้วงใสของการย่อยไขมัน ตั้งแต่ 2.5-13.0 มิลลิเมตร ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ไม่ได้ชี้ชัดว่าแบคทีเรียที่ให้วงใสของการย่อยไขมันบนอาหารแข็งกว่าจะมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้สูง แต่ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์¹² และจากการค้นหาแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันอื่นๆ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่ย่อยน้ำมันพืชได้เป็นกรดไขมันจำนวน 3 ไอโซเลท ด้วยวิธี Serial Dilution Pour Plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันพืช¹³ ซึ่งต่างจากการศึกษานี้ที่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อกลุ่มดังกล่าวผ่าน Screening Medium ที่ทำหน้าที่เป็น Enrichment Medium ที่ช่วยสนับสนุนการเจริญของเชื้อในกลุ่มย่อยสลายไขมันก่อนจึงทำให้แยกเชื้อแบคทีเรียในดินได้เพิ่มขึ้นคือแยกได้ถึง 6 ไอโซเลท หรือในทางตรงข้ามอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาอาจไม่สนับสนุนต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในดิน หรือมีแบคทีเรียดังกล่าวในปริมาณน้อยในดิน¹⁴ จากการคัดกรองความสามารถในการย่อยสลายไขมันบนอาหาร TA พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่สามารถให้วงใสของการย่อยสลายไขมันได้ดีที่สุดคือ แบคทีเรียไอโซเลท

S2/2 ที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสได้ถึง 13 มิลลิเมตร และรองลงมาคือ แบคทีเรียไอโซเลท S1/1, T2/5, S3/2, S3/1 วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสได้ 12, 10, 10, 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ ถึงแม้ว่าไอโซเลท S2/2 ให้วงใสของการย่อยสลายสูงที่สุด แต่เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหาร NB พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้น้อยและใช้ระยะเวลาในการเจริญนาน ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ไม่ดีหากจะนำไปใช้ประโยชน์ภายหลัง ดังนั้นจึงเหลือแบคทีเรียที่จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์เพียง 13 ไอโซเลท การที่แบคทีเรียไอโซเลท S2/2 และ S1/1 เป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงยากเนื่องจากต้องการออกซิเจน จึงไม่เหมาะสมกับการที่จะนำมาใช้ในการย่อยไขมันในน้ำเสีย นอกจากนี้พบว่าการเก็บเชื้อที่แยกได้ไว้ใน Nutrient Slant นานเป็นสัปดาห์อาจทำให้เชื้อบางสายพันธุ์ตายหรือเป็นเชื้อที่อยู่ในสภาวะไม่พร้อมที่จะเพิ่มจำนวน จึงไม่ได้นำมาศึกษาต่อ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์พบว่า T3/2 สามารถย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ได้มากที่สุดร้อยละ 52.0 รองลงมาคือ T3/1 ร้อยละ 47.0 ส่วน T2/4 มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันได้น้อยที่สุดคือ ร้อยละ 0.3 อาจเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย T3/2 และ T3/1 มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (ทำให้น้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่ทดสอบใสได้เร็ว) จึงสามารถย่อยสลายไขมันได้เร็วด้วย ทำให้สามารถวัดการหายไปของชั้นไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดสอบ ต่างจาก T2/4 ที่ต้องใช้ระยะเวลาถึง 11 วันของการทดสอบจึงจะเริ่มสามารถวัดการหายไปของชั้นไขมันได้

จากการติดตามสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ น้ำเสียไขมันสังเคราะห์ โดยการย่อยสลายด้วยแบคทีเรีย ที่แยกได้ พบว่าจะเริ่มพบการเปลี่ยนแปลงสภาพของ น้ำเสียไขมันสังเคราะห์ตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 11 ของการทดสอบ โดยน้ำเสียไขมันสังเคราะห์เริ่มใสขึ้น มีการตกตะกอน หลังจากนั้นจึงพบชั้นไขมันปิดเบื้อว และมีความหนาของชั้นไขมันลดลงจากด้านล่าง ขึ้นด้านบน ซึ่งเกิดจากการย่อยไขมันของแบคทีเรีย ที่ย่อย Triglyceride ได้เป็นกรดไขมันอิสระ 1,3-diglyceride, 1,2 diglyceride และ monoglyceride ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ไลเปส¹⁵ หลังจากนั้น ชั้นไขมันส่วนบนเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเป็นของแข็ง สีขาวขุ่น และจะคงสภาพไม่ย่อยสลายต่อไป ซึ่งของแข็ง สีขาวนี้มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับซีตัสเอสเทอร์ (Wax Esters) โดยมีรายงานพบว่ามีแบคทีเรียที่ย่อยไขมันนั้น มีความสามารถในการสังเคราะห์ซีตัส (Biosynthesis of Wax Esters) โดยปฏิกิริยา α -oxidation เช่น ในแบคทีเรีย *Micrococcus cryophilus*¹⁶ *Pseudomonas fluorescens*¹⁷ และ *Acinetobacter baylyi*¹⁸ โดยสามารถสังเคราะห์มาจากโคเอนไซม์ A หรือแอลกอฮอล์ ซึ่งปกติแล้วการย่อยสลายไขมัน ของแบคทีเรียจะหยุดหลังจากวันที่ 21 เนื่องจากการ เปลี่ยนแปลง pH ของระบบทำให้ปริมาณแบคทีเรีย ลดลงอย่างรวดเร็ว¹⁹ เช่นเดียวกับผลการศึกษานี้ ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของชั้นไขมันในน้ำเสียไขมัน สังเคราะห์หลังจากวันที่ 21 ของการทดสอบ โดยสามารถ สร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ การย่อยไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์กับระยะเวลา ซึ่งสามารถใช้สมการเชิงเส้นตรงอย่างง่ายในการ ทำนายปริมาณการย่อยสลายชั้นไขมันในน้ำเสียไขมัน สังเคราะห์ได้ดีเนื่องจากมีค่า r^2 อยู่ระหว่าง 0.70– 0.97 แต่การศึกษาการย่อยของไขมันในระดับความเข้มข้น ต่างๆ โดย *Pseudomonas fluorescens* พบว่า

ในช่วงต้นของการทดสอบ หรือมีความเข้มข้นของ ไขมันเริ่มต้นต่ำ ประสิทธิภาพในการย่อยไขมันจะมี ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linear Relationship) และจะเบี่ยงเบนออกจากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงนี้ เมื่อความเข้มข้นของไขมันเพิ่มขึ้น หรือเมื่อใช้ระยะเวลา ในการทดสอบนานขึ้น¹⁹ นอกจากนี้ยังพบปัจจัย อื่นๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย และการย่อยสลายไขมัน ได้แก่ แหล่งของคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรดรวมทั้งความเข้มข้น ของไอออนของโลหะ (Metal Ions) แต่ละชนิด ในระบบ²⁰ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษา ในห้องปฏิบัติการขั้นต้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนที่จะ นำไปปรับใช้ในการบำบัดน้ำเสียไขมันจริง จึงกำหนด ปริมาณของไขมันเริ่มต้นในการทดสอบเพียง 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ชั้นไขมันที่มีความหนา 1 มิลลิเมตรในหลอด ทดลอง เนื่องจากหากชั้นไขมันมีความหนามากขึ้น อาจส่งผลกระทบต่อกิจกรรมการย่อยของแบคทีเรีย ซึ่งต้องศึกษาต่อไป แต่การศึกษาโดยวิธีดังกล่าวนี้มีข้อดี ที่ไม่ต้องใช้วิธีวิเคราะห์และเครื่องมือที่ยุ้งยากซับซ้อน โดยไม่จำเป็นต้องเติมอากาศ จากการวิเคราะห์การ ย่อยสลายไขมันโดยวิธีอื่นๆ เช่นการศึกษาเปรียบเทียบ การย่อยไขมันในน้ำเสียที่ใช้ *Pseudomonas* spp. เพียงเชื้อเดียว และการใช้เชื้อผสมของ *Acinetobacter* spp. และ *Pseudomonas* spp. พบว่าสามารถย่อย ไขมันในน้ำเสียที่มีไขมัน 15-20 กรัม/ลิตร (ร้อยละ 1.5-2.0 w/v) ได้สูงถึงร้อยละ 55.91 และ 60.42 ตามลำดับ²¹ ส่วนการศึกษานี้พบแบคทีเรียที่สามารถ ย่อยไขมันในน้ำเสียไขมันสังเคราะห์ที่มีไขมันร้อยละ 10 (v/v) ได้ถึงร้อยละ 52.0 ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้นี้ สามารถเพาะเลี้ยงง่าย เหมาะกับนำไปพัฒนาเพื่อใช้ ในการบำบัดน้ำเสียไขมันในสิ่งแวดล้อมได้ โดยประหยัด ค่าใช้จ่ายและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ วิทยาลัยนครราชสีมา วิทยาการ กรุงเทพฯ ที่ให้ความสำคัญของงานวิจัยตลอดจัดสรรงบประมาณในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ. การประยุกต์ใช้แนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันจากถังดักไขมันและการนำกากไขมันไปใช้ประโยชน์. เข้าถึงได้ที่ <http://wqm.pcd.go.th/water/index.php/2010-12-27-03-45-24/106--2554/634-2012-03-15-11-41-24>. เมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2555.
2. กรมควบคุมมลพิษ. คู่มือแนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันจากถังดักไขมันและการนำไปใช้ประโยชน์ สำหรับบ้านเรือน. กรุงเทพฯ: บริษัท ทีคิวพี จำกัด, 2551.
3. Institute for innovative learning, Mahidol University. Ecology Chapter 3. Available at http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/ecology/chapter3/chapter3__water10.htm, accessed Dec 10, 2011.
4. Lanciotti R, Gianotti A, Baldi D, Angrisani R, Suzzi G, Mastrocola D, et al. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour Technol* 2005; 96(3): 317-22.
5. วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต, อนันต์ บุญปาน, ปรียานุช บวรเรืองโรจน์. การจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือและศึกษาสมบัติของเอนไซม์. การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์;

30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2549.

6. ฉวีวรรณ เหลืองวุฒิวิโรจน์, พิมพ์िता เรืองไพศาล, จันจิรา แสงสีเหลือง. ศึกษาการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ซูเปอร์พด.1. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน, 2550.
7. มณจันทร์ เมฆธน, มนต์เกียรติ์ ส่งเสริม. การคัดเลือกสายพันธุ์ และทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย ในการย่อยสลายเศษไขมันจากน้ำทิ้งโรงอาหารในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 34 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2539.
8. จุฑากานต์ บุญมี. การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2552.
9. กรมวิชาการเกษตร. น้ำหมักชีวภาพ : การศึกษาชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ที่พบ. เกษตรกรรมธรรมชาติ. 2548, 3: 42-4.
10. เสาวนีย์ ธรรมสถิต. รายงานการวิจัย การศึกษาคุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ; 2540.
11. Mourey A, Kilbertus G. Simple media containing stabilized Tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils. *J Appl Bacteriol* 1976; 40(1): 47-51.



12. Haliru M, Bukola CAT. Screening of microorganisms isolated from different environmental samples for extracellular lipase production AU J.T. 2012; 15(3): 179-86.
13. พิมพ์ภา จันทนะ. การเปรียบเทียบแอกติวิตีของไลเปสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2551.
14. Ko WH, Wang IT, Ann PJ. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. Soil Biology and Biochemistry 2005; 37(3): 597-9.
15. Lancer AC, Manthey LK, Hou CT. Regioselectivity of new bacterial lipase determined by hydrolysis of triolein. Curr Microbiol 2002; 44: 336-40.
16. Lloyd GM, Russell NJ. Biosynthesis of wax esters in the psychrophilic bacterium *Micrococcus cryophilus*. J Gen Microbiol 1983; 129: 2641-47.
17. Tsujita T, Sumiyoshi M, Okuda H. Wax ester-synthesizing activity of lipases. Lipid 1999; 4(11): 1159-66.
18. Santala S, Efimova E, Kivinen V, Larjo A, Aho T, Karp M, et al. Improved triacylglycerol production in *Acinetobacter baylyi* ADP1 by metabolic engineering. Microb Cell Fact 2011; 10: 36.
19. Goldman ML, Rayman MM. Hydrolysis of fats by bacteria of the *Pseudomonas* Genus. J Food Sci 1952; 17(1-6): 326-37.
20. Zhang Z, Guan C. Screening for lipase-producing *Enterobacter agglomerans* for biodiesel catalyzation. Afr J Biotechnol 2009; 8(7): 1273-9.
21. Bhumibhamon O, Phattayakorn K. Lipase-producing microorganisms for use in contaminated fat and oil kitchen wastewater treatment. Nat Sci 2003; 37: 327-33.

Detection of Lipolytic Bacteria from Environmental Samples

Kitja Chitpirom* Pathanin Sangaroon*

ABSTRACT

18 The aim of this study was to determine the lipid hydrolysis efficiency of the bacteria isolated from wastewater from grease traps (4 samples), bio-fermented water (2 samples), water from wastewater collecting canal (2 samples) and sediments of mangrove (3 samples). The samples were cultured in a screening medium at room temperature for 48 hours, then transferred to tributyrin agar for selecting the lipolytic bacteria isolates. A total of 39 lipolytic isolates were found. Only 13 selected isolates from the wastewater from grease traps, bio-fermented water, water from wastewater collecting canal and sediments of mangrove; 7, 4, 1 and 1 isolates, respectively, were selected for testing the lipid hydrolysis efficiency. The T3/2 isolated from grease traps, can decompose the synthetic

lipid wastewater more than bacteria isolated from others. It has 52 percentage of lipid digestion with 0.025 mL/day of the average rate of lipid hydrolysis within 21 days at room temperature. Following the degradation of synthetic lipid wastewater by isolated bacteria, physiological changes were observed since the first day until the 11th day of the testing. The synthetic lipid wastewater was clear, and precipitation and the thickness of lipid layer decreased. The lipolytic bacteria from this study can hydrolyze lipid well and can grow easily in a basic medium. Thus, it is appropriate to be developed and used in treatment of lipid containing wastewater with cost-effective and environmental friendly.

Key words: lipolytic bacteria, wastewater