การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียในบ่อดักไขมันโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

Isolation of Lipase Producing Bacteria from Waste Water in Grease Trap in Cafeteria Kamphaengphet Rajabhat University.

อภิชญา พัดพิน*
Aphichaya Taychitkunanon
พิมประไพ ขาวขำ*
Pimprapai Khaokham
พิทักษ์ ปอกสอน**
Pitak Pokson

Received : September 2, 2019
Revised : December 23, 2019
Accepted : May 14, 2020

บทคัดย่อ

การศึกษางานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส และศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทำการย่อยสลายน้ำมัน จากน้ำเสียในบ่อดักไขมันโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อดักไขมันโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร แล้วทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถแยกแบคทีเรียได้ 13 ไอโซเลต เมื่อทำการศึกษา ต่อด้วยวิธี double layer technique พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลต ที่สารมารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ จากนั้นนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มาศึกษาด้วยวิธีการย้อมแกรม พบว่า แบคทีเรียติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อน และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันงา และน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ในเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 13.98±1.93, 26.98±6.7, 33.94±2.91 และ 64.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการตรวจวัดที่ 96 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันงา ตามลำดับ

คำสำคัญ : แบคทีเรีย / เอนไซม์ไลเปส / น้ำเสีย / บ่อดักไขมัน

---

*อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร
Lecturer in Environmental Science Program Faculty of Science and Technology Kamphaeng Phet Rajabhat University
**ครูผู้ช่วยสาขาชีววิทยา โรงเรียนสรรพวิทยาคม จังหวัดตาก
Assistant Teacher in Biology Sappasittayakhom School, Tak Province

ABSTRACT

The objective of this research was to study the screening of lipase producing bacteria and the efficiency of screened bacteria from waste water in grease trap in cafeteria Kamphaengphet Rajabhat university. The samples were cultured in olive oil medium as a carbon source. From 13 bacterial isolations, 1 bacteria isolation was found to produce lipase enzyme by double layer technique. The selected bacteria was carried on gram staining. It was found to be a gram–negative rod shaped bacteria, and was tested for the oil and fat removal efficiency of bacterial culture in olive oil, palm oil, sesame oil and soybean oil medium as a carbon source. It was found that percent efficiency of fat oil and grease removal in palm oil was highest (*P*-value ≤ 0.05) more than olive oil, soybean oil, and sesame oil respectively. And at 24, 48, 72 and 96 hours found that percent efficiency of fat oil and grease removal in palm oil were 13.98±1.93, 26.98±6.7, 33.94±2.91 and 64.04±1.24 percent, respectively. At 96 hours found highest of %Efficiency of FOG removal and Followed by olive oil, soybean oil and sesame oil, respectively.

Keywords : Bacteria / Enzyme Lipase / Waste Water / Grease Trap

บทนำ

ปัญหาการบำบัดไขมันในโรงอาหารหรือบ่อน้ำทิ้ง นับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญมากของประเทศที่กำลังพัฒนาหรือด้อยพัฒนา เนื่องจากไม่มีสุขาภิบาลที่ดีในการกำจัดไขมันเหล่านี้ ซึ่งน้ำมันหรือไขมันเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิต มีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ ส่วนใหญ่เป็นขี้ผึ้ง ไข หรือน้ำมัน มีความเกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวันเป็นอย่างมาก เช่น การนำมาเป็นส่วนประกอบของอาหาร โดยน้ำมันและไขมันในน้ำเสียเหล่านี้มีจำนวนมาก ซึ่งหากไม่มีการบำบัดที่ถูกต้องจะมีการปนเปื้อนของน้ำมันออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ เป็นสาเหตุของปัญหาทั้งในท่อระบายน้ำและระบบบำบัดน้ำเสีย (กนกพร, 2547) เนื่องจากแบคทีเรียจะย่อยสลายสารอินทรีย์พวกนี้ได้ยากและที่ย่อยสลายไขมันได้มีอยู่ปริมาณน้อยจึงไม่เพียงพอที่จะย่อยไขมันหรือน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จำเป็นต้องทราบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายของแบคทีเรียเหล่านั้นด้วย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยสลายไขมันแล้วนำไปเป็นแหล่งพลังงาน โดยเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสไลปิดหรือไขมันเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (Thomson, et al., 1999) แหล่งที่พบเอนไซม์ไลเปส คือ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา เป็นต้น (กุสุมาวดี, 2560; มาริสา, 2560; Sharma, et al., 2001) โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ที่ตรวจพบในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เช่น จีนัส *Bacillus, Pseudomonas and Burkholderia* เป็นต้น (Gupta, et al., 2004; Agualimpia, et al., 2016) ซึ่งการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียนั้นมีข้อได้เปรียบหลายประการกว่าพืช และสัตว์ คือ มีอัตราการเจริญเติบโตสูง เพาะเลี้ยงง่าย ไม่ใช้พื้นที่มาก ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล มีประมาณสูงกว่าในระยะเวลาเพาะเลี้ยงเท่ากัน สกัดและทำบริสุทธิ์ง่าย การคัดเลือกและปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญทำได้ง่าย และแบคทีเรียมีอัตราการเจริญสูงกว่าจุลินทร์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสทุกชนิด เพราะมีความคงตัวสูง ใช้สารอาหารได้หลากหลาย และทำงานได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมกดดัน พบได้ทั่วไปในแหล่งอาศัยหลายชนิด เช่น ดิน น้ำเสียจำครัวเรือน หรือน้ำเสียจากโรงอาหาร ภัตตาคาร และโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนของไลปิด โดยพบว่าเชื้อ

Enterobacter aerogenes E13 และ *Arthrobacter* sp. N3. สามารถพบเอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่มีการปนเปื้อนในดิน (Čipinytė, et al., 2009) และจากงานวิจัยของ Shon, et al. (2002) ที่ใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. Strain D2D3 ในการย่อยสลายน้ำมันจากน้ำทิ้งที่ใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งพลังงาน นอกจากนี้ Snengsaenga, et al. (2016) ที่ตรวจพบแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus amyloliquefaciens* E1PA ในเศษขยะอินทรีย์ที่มีน้ำมันมาก (lipid-rich food waste) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานให้กับแบคทีเรีย

โรงอาหารของมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ยังไม่มีระบบกำจัดไขมันที่บ่อดักไขมันที่ดีพอ และจากการสอบถามผู้ประกอบการร้านขายอาหารและเจ้าหน้าที่ทำความสะอาดในโรงอาหาร พบว่ามีแค่การสร้างบ่อดักไขมันที่เป็นท่อปูนขนาดกว้าง 30 เซนติเมตร และยังไม่มีวิธีการกำจัดไขมันที่ถูกต้อง โดยถ้าไขมันเต็มบ่อจึงนำไขมันที่ลอยอยู่ผิวหน้าน้ำตักไปทิ้งในถังขยะเท่านั้น ซึ่งทางคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าถ้ามีการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไขมันนี้ได้ จะทำให้ให้ทราบว่าในบ่อดักไขมันนั้นมีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันเพื่อนำเข้าเซลล์เป็นแหล่งพลังงาน โดยหากจะทำการบำบัดไขมันที่บ่อดักไขมันในอนาคต เราสามารถใช้แบคทีเรียที่พบเป็นตัวบำบัดไขมันได้ตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการหาซื้ออุปกรณ์ในการบำบัด และลดปริมาณไขมันที่ออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แหล่งเก็บตัวอย่าง และสภาพพื้นที่ และการเก็บตัวอย่าง

1.1 แหล่งเก็บตัวอย่างและสภาพพื้นที่

แบคทีเรียใช้ในการศึกษาทำการคัดแยกแบคทีเรียในน้ำเสียจากบ่อดักไขมันของโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ทำการสำรวจพื้นที่ ช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2555 เพื่อศึกษาการปล่อยน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันจากโรงอาหาร และเก็บข้อมูล เพื่อที่จะคัดเลือกพื้นที่ที่จะเก็บตัวอย่างน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันเพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ โดยพื้นที่ที่ได้ทำการคัดเลือก ได้แก่ บริเวณบ่อดักไขมันโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ดังแสดงตามภาพที่ 1 โดยสภาพพื้นที่ของแหล่งเก็บตัวอย่างเป็นบ่อซีเมนต์ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 เซนติเมตร มีตะแกรงดักเศษอาหารขนาดใหญ่ก่อนปล่อยลงสู่บ่อดักไขมัน โดยบริเวณด้านข้างบ่อดักไขมันจะมีคลองด้านหลังโรงอาหารซึ่งเป็นบ่อพักน้ำเสียจากโรงอาหาร ส่วนในบ่อดักไขมันจากการสำรวจมีน้ำมันและ เศษอาหารขนาดเล็กบางส่วนที่ลอดตะแกรงมาได้ลอยอยู่บนผิวหน้าน้ำเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ในบ่อดักไขมันยังส่งกลิ่นเหม็น เนื่องจากเป็นบ่อดักไขมันที่ไม่ได้มาตรฐานทำให้ไขมันที่ลอยอยู่บนผิวหน้าของน้ำบางส่วนลอยลงคลองด้านหลังโรงอาหารจึงทำให้บริเวณคลองมีความสกปรกเพิ่มขึ้น และยากต่อการบำบัดโดยวิธีทางธรรมชาติ

1.2 การเก็บตัวอย่างน้ำเสียและการเตรียมตัวอย่างน้ำเสียเพื่อทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

การเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์หาแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ทำการเก็บตัวอย่างช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2555 เวลา 10.00 น. อุณหภูมิอากาศ 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิน้ำเสีย 33 องศาเซลเซียส โดยอุปกรณ์ที่ทำการเก็บต้องมีการทำให้ปลอดเชื้อก่อน โดยเก็บเฉพาะน้ำเสียที่ไม่มีไขมันที่ลอยอยู่ผิวหน้าปริมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำน้ำเสียตัวอย่างที่เก็บมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทันที

เมื่อได้น้ำเสียที่เก็บมาแล้ว นำตัวอย่างมาวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย นำน้ำเสียตัวอย่างที่ได้มานั้นมาเขย่าเพื่อให้น้ำตัวอย่างมีการผสมกัน จากนั้นมาทำการหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีนำไปเจือจางเชื้อแบบต่อเนื่อง (serial dilution) ในห้องปฏิบัติการทันทีที่เก็บตัวอย่างเสร็จ

ภาพที่ 1 บ่อดักไขมันโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

2. การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ ประยุกต์จากวิธีของ Chappe, et al. (1994) และดาวัล (2551) ดังนี้

2.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยพิจารณาขนาดของรอยใสรอบโคโลนี (clear zone)

เตรียมอาหารแข็งน้ำมันมะกอก (Olive oil agar) สำหรับคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเสียที่มีไขมันปนเปื้อนจากในบ่อดักไขมันของโรงอาหารดังแสดงตามภาพที่ 1 นำน้ำเสียตัวอย่างที่ได้มานั้นมาทำการหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีนำไปเจือจางเชื้อแบบต่อเนื่อง (serial dilution) ในห้องปฏิบัติการทันทีที่เก็บตัวอย่างเสร็จ

ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีในอาหารแข็งน้ำมันมะกอก มาขีดเชื้อในอาหารเพาะเชื้อ (streak plate) ลงบนสารอาหารวุ้นแข็ง (nutrient agar) เพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว และเก็บเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ไว้ในสารอาหารวุ้นแข็งเอียง (nutrient agar slant) เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.2 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นยืนยัน ทำตามขั้นตอน ดังนี้

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้ ถ่ายเทลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 loop เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำเชื้อไปปรับความขุ่นเทียบกับ McFarland เบอร์ 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดน้ำตัวอย่างข้างต้น 1.0 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ ปริมาณฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1–3 วัน

เมื่อตรวจพบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (โดยสังเกตุจากความขุ่นที่เกิดขึ้น) จะทำเจือจางเชื้อแบบต่อเนื่องด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยปิเปตเซลล์จากหลอดที่มีความเจือจางที่ต้องการลงในหลอดทดสอบที่บรรจุอาหารที่มีน้ำมันมะกอกและวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมละลายแล้ว (อาหารบรรจุในหลอดปริมาณเท่ากับ 6 มิลลิลิตร) และอยู่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (water bath) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าให้เชื้อกระจาย จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร basal medium บรรจุอยู่ก่อน

แล้ว บ่มจานเพาะเชื้อที่ได้ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4–7 วัน แบคทีเรียที่สามารถสร้างไลเปสได้จะเกิดบริเวณรอยใสรอบโคโลนีขึ้น

จากนั้นทำการคัดแยกแยกแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่มีรูปร่างแตกต่างกัน ที่เจริญได้รวดเร็วและสร้างบริเวณใสมาทำซ้ำอีกครั้ง และตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี มาขีดเชื้อในอาหารเพาะเชื้อสารอาหารวุ้นแข็ง เพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ และนำเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาทดสอบทางสัณฐานวิทยา สุดท้ายทำการเก็บเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ไว้ในสารอาหารวุ้นแข็งเอียง

3. การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ (คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2554)

ศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยดูลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย และทำการย้อมสีแกรม โดยการดูการติดสีย้อม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเชื้อแบคทีเรีย

4. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็น ลงในอาหารมีแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเป็น น้ำมันพืชต่างๆ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ คือ น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันงา และน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

เก็บตัวอย่างที่ได้มาสกัดเพื่อหาปริมาณไขมันที่เหลืออยู่และที่ถูกย่อยสลายไปโดยเป็นการหาค่าประสิทธิภาพการกลับคืนไขมันและน้ำมัน (%Efficiency of FOG removal)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

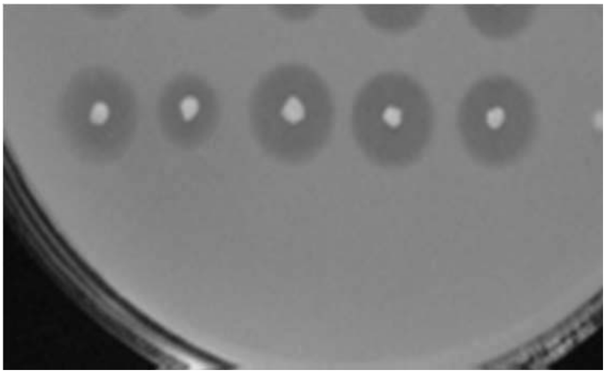
การวิเคราะห์ทางสถิติ ทำการใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติสำเร็จรูป วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลความแปรปรวน โดยวิธี One-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนเพื่อจัดกลุ่มค่าเฉลี่ยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี Duncan’s new multiple’s range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P \leq 0.05$) เพื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูลที่ได้จากการศึกษา

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากบ่อดักไขมัน

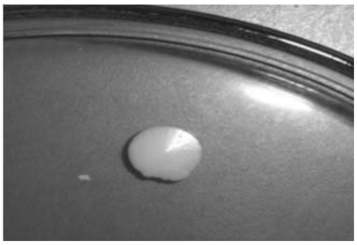
จากการเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อดักไขมันโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียโดยใช้อาหารแข็งที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะกอก โดยวิธีนี้เป็นการใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งพลังงานในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อย่อยสลายสับสเตรท จึงทำให้เห็นพื้นที่ใสรอบๆ โคโลนีบนอาหารคัดเลือกเชื้อขั้นต้นได้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 13 โคโลนี โดยแบคทีเรียดังกล่าวจะสร้างบริเวณรอยใสรอบโคโลนี (ภาพที่ 2) หลังจากได้เชื้อ 13 โคโลนี แล้วนำมาศึกษาวิธี double layer technique ประยุกต์ตามวิธีของ Chappe, et al. (1994) และดาวัลย์ (2551) พบแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปสเพียง 1 ไอโซเลต จากการสังเกตุลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถคัดแยกได้นั้นพบว่าโคโลนีมีสีขาวขุ่น มันวาว กลางของโคโลนีมีลักษณะเป็นจุกคล้ายร่มในสารอาหารวุ้นแข็ง ดังแสดงตามภาพที่ 3

(ก)



(ข)

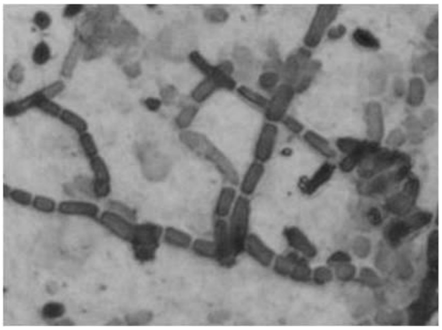
ภาพที่ 2 ลักษณะรอยใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ บนอาหารแข็งสำหรับคัดเลือกเชื้อ (ก) ลักษณะรอยใสรอบโคโลนีโดยวิธีการแต้มเชื้อในอาหาร (point inoculation) (ข)



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะของโคโลนี จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ บนสารอาหารวุ้นแข็ง

2. การศึกษาลักษณะ รูปร่าง การย้อมติดสีแกรมของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทำการย้อมสีแกรม และตรวจดูด้วยเลนวัตถุกำลังขาย 100X พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีการย้อมติดสีแดงของ Safranin O และมีลักษณะเป็นรูปท่อน ดังแสดงตามภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ลักษณะรูปร่างท่อนของแบคทีเรีย และการย้อมติดสีแดงแกรมลบ ตรวจดูด้วยเลนวัตถุกำลังขาย 100X ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

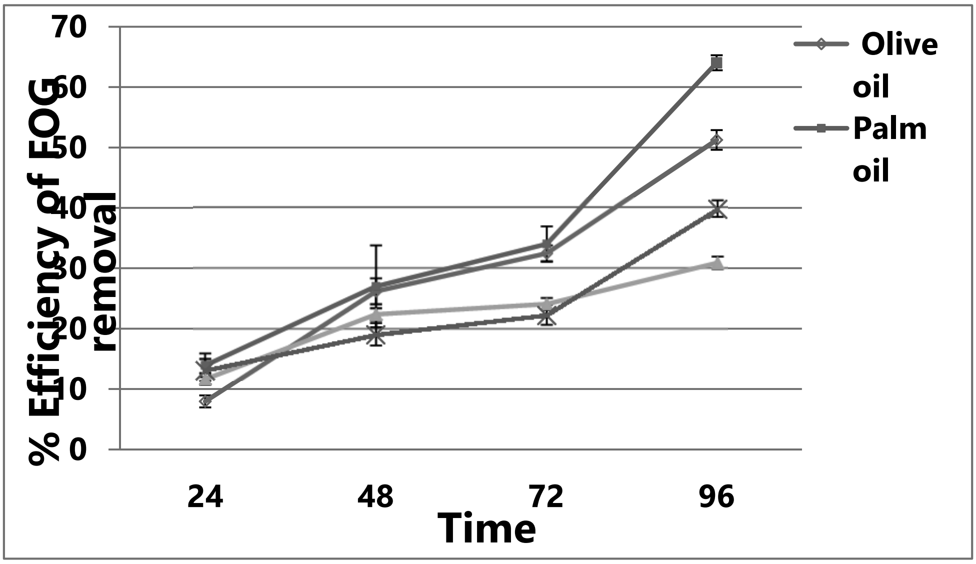
3. การศึกษาการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

การศึกษาโดยนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้ มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยน้ำมันชนิดต่างๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดละ 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันที่ใช้ได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันงา และน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าทุกชั่วโมงน้ำมันปาล์ม มีค่าประสิทธิภาพการกลับคืนไขมันและน้ำมัน มากที่สุด คือ 13.98±1.93, 26.98±6.73, 33.94±2.91 และ 64.04±1.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการที่พบว่าค่าประสิทธิภาพการกลับคืนไขมันและน้ำมันสูงสุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 1 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพการกลับคืนไขมันและน้ำมันในการย่อยสลาย น้ำมัน จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ที่เวลาต่างๆ กัน

ชนิดน้ำมัน	ชั่วโมงที่ 24 (%)	ชั่วโมงที่ 48 (%)	ชั่วโมงที่ 72 (%)	ชั่วโมงที่ 96 (%)
มะกอก	7.96±0.99	26.16±2.13	32.41±1.32	51.25±1.64
ปาล์ม	13.98±1.93	26.98±6.73	33.94±2.91	64.04±1.24
งา	11.69±0.92	22.36±0.98	24.06±1.78	30.86±2.60
ถั่วเหลือง	13.20±1.82	19.07±1.83	22.30±1.67	39.75±1.37

หมายเหตุ : วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี one-way analysis of variance ($P \leq 0.05$) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 5 แสดงค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

อภิปรายผล

1. จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียในบ่อดักไขมันโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเพียง 1 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยเกิดบริเวณรอยใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารคัดเลือกเชื้อ โดยลักษณะการเจริญของโคโลนีที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะ สีขาวขุ่น มันวาว ตรงกลางของโคโลนีมีลักษณะเป็นจุกคล้ายร่ม และเมื่อทำการย้อมสีแกรมเพื่อศึกษารูปร่างของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียติดสีแดงของ Safranin O จึงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแบบท่อน ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Shon, et al. (2002) ที่ใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. Strain D2D3 ในการย่อยสลายน้ำมันที่ใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งพลังงาน โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ที่ตรวจพบในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เช่น จีนัส *Bacillus, Pseudomonas and Burkholderia* เป็นต้น (Gupta et al., 2004; Agualimpia, et al., 2016) นอกจากนี้ Snengsaenga, et al. (2016) ที่ตรวจพบแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus amyloliquefaciens* E1PA ในเศษขยะอินทรีย์ที่มีน้ำมันมาก (lipid-rich food waste) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานให้กับแบคทีเรีย

2. การศึกษาการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียจะสามารถย่อยสลายนำมันปาล์มได้มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 96 โดยพบค่าประสิทธิภาพการกลับคืนไขมันและน้ำมัน เท่ากับ 64.04 เปอร์เซนต์ เนื่องมาจากในโรงอาหารส่วนใหญ่ใช้น้ำมันปาล์มเป็นส่วนประกอบในการทำอาหาร ทำให้แบคทีเรียในพื้นที่ที่ตรวจพบสามารถย่อยน้ำมันปาล์มได้ดีที่สุด และน้ำมันปาล์มจะแตกตัว (hydrolyze) ได้งายด้วยเอนไซม์ไลเปส เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถย่อยสลายน้ำมันพืชได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ทรัพย์ทวี (2544) ได้ผลิตจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูง โดยพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส 2 ไอโซเลต คือ KUL8 และ KUL39 โดยเชื้อทั้งสองสามารถย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์มได้ และอลงกฏ (2555) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน และน้ำมันของเชื้อและ *B. subtilis* TP8 เชื้อ *P. fluorescens*

G7 พบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิด สามารถลด FOG ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 96 โดยเชื้อ *P. fluorescens* G7 มีค่า %Efficiency of FOG removal เท่ากับ 89.65 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ เชื้อผสม และ *B. subtilis* TP8 มีค่าเท่ากับ 86.88 เปอร์เซนต์ และ 86.50 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ณภัทร และคนอื่นๆ (2558) ได้ศึกษาน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย พบว่า *Pseudomonas* sp. MAS-2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูง ในการก่ออิมัลชันในน้ำมันปาล์มและน้ำมันปาล์มใช้แล้วทำให้พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ประจำปี 2554 การทำงานได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความอนุเคราะห์จากโปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม และโปรแกรมวิชาชีววิทยา ได้เอื้อเฟื้อการใช้ห้องปฏิบัติการและการใช้เครื่องมือต่างๆ ทำให้การดำเนินการวิจัยสำเร็จออกมาดังจุดประสงค์

เอกสารอ้างอิง

กนกพร เสถียรดี. (2547). **การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งน้ำทิ้ง.** งานวิจัยหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

กุสุมาวดี ฐานเจริญ. (2560). การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเสจากน้ำทิ้งโรงอาหาร: การประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียและผลิตไบโอดีเซล. **วารสารเกษตรพระวรุณ, 15**(1), 204-215.

คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา. (2554). **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ**. (พิมพ์ครั้งที่ 6). กรุงเทพฯ : บริษัทเจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด.

ดาวัลย์ ฉิมภู่. (2551). **การคัดแยกจุลินทรีย์ดินผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อการอุตสาหกรรม.** ทุนอุดหยุนโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. 65 หน้า.

ทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. (2544). **การผลิตจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณภัทร พิทักษ์รุ่งโรจน์ และคนอื่นๆ. (2558). การคัดแยกเชื้อและทดสอบแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแหล่งปนเปื้อนน้ำมันในโรงงานอุตสาหกรรม. ใน **การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหวางสถาบัน ครั้งที่ 3** ระหว่างวันที่ 28-29 พฤษภาคม 2558 (หน้า 449-455). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย.

มาริสา อัตถาพงศ์. 2560. **การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิตและวิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยพะเยา.

อลงกฏ แซมสีม่วง. (2555). **การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร.

Agualimpia, B., J.V. Otero & G. Zafra. 2016. Evaluation of native microorganisms for biodegradation of oil and grease in palm oil refinery effluents. **Biotecnología Aplicada, 33**(1), 1221-1226.

Cappe, P.A., A. Mourey & G. Kilbertus. (1994). Variation of lipolytic activity in the genus *Acinetobacter* sp. **Apply Microbiology, 4**, 113-114.

Čipinytė, V., S. Grigiškis & E. Baškys. 2009. Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. **BIOLOGIJA, 55**(3–4), 84-92

Gupta, R., N. Gupta & P. Rathi. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Apply Microbiology and Biotechnology, 64**, 763-781.

Saengsanga, T., W. Siripornadulsil & S. Siripornadulsil. (2016). Molecular and enzymatic characterization of alkaline lipase from Bacillus amyloliquefaciens E1PA isolated from lipid-rich food waste. **Enzyme and microbial technology, 82**, 23-33.

Sharma, R., Y. Chisti, & U. C. Banerjee. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advance, 19**, 627-662.

Shon. H. Kyong, D. Tian, D.Y. Kwon, C.S. Jin, T.J. Lee &W.J. Chung. 2002. Degradation of Fat, Oil, and Grease (FOGs) by Lipase-Producing Bacterium *Pseudomonas* sp. Strain D2D3. **Journal of Microbiology and Biotechnology, 12**(4), 583-591.

Thomson, C., P. Delaquis & G. Mazza. (1999). Detection and Measurement of Microbial Lipase Activity. **Food Science Natural, 39**(2), 165-187.