สูตรอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 สำหรับย่อยสลายไขมันในน้ำเสีย

นางสาวณัฐริกา เหล่าธรรมทีป

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 4 7 1 9 6 9 6 2 3

TABLET FORMULATION OF *Serratia* sp. W4-01 FOR LIPID DEGRADATION IN WASTEWATER

Miss Natthariga Laothamteep

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สูตรอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 สำหรับย่อยสลายไขมันในน้ำเสีย
โดย	นางสาวณัฐริกา เหล่าธรรมทีป
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดี)

ณัฐริกา เหล่าธรรมทีป : สูตรอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 สำหรับย่อยสลายไขมันในน้ำเสีย. (TABLET FORMULATION OF *Serratia* sp. W4-01 FOR LIPID DEGRADATION IN WASTEWATER) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.อรฤทัย ภิญญาคง, 140 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรแบคทีเรียรูปแบบอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 และใช้ย่อยสลายไขมันในน้ำเสีย โดยเบื้องต้นพบว่าสายพันธุ์ W4-01 สามารถย่อยสลายน้ำมันหลายชนิดได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันมะกอก และน้ำมันหมู ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรในระยะเวลา 3 วัน และตรวจพบยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปส (*lip*A) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมัน ดังนั้นจึงได้พัฒนาสูตรแบคทีเรียพร้อมใช้แบบอัดเม็ด โดยสูตรที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันสูงที่สุดประกอบด้วย แบคทีเรียรูปแบบแห้งที่มีสารป้องกันความเย็นคือ หางนมและโมโนโซเดียมกลูตาเมท แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ซูโครส แมกนีเซียมสเตรียเรต และแป้งข้าวโพด สามารถเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดในสภาวะไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ 6 เดือน โดยมีอัตราการรอดชีวิต 63 เปอร์เซ็นต์ และยังคงมีประสิทธิภาพย่อยสลายไขมัน และแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 มีประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันได้สูงกว่าหรือเทียบเคียงกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด และเมื่อทดสอบการใช้แบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในบ่อดักไขมันจำลอง ระบบแบบต่อเนื่อง ปริมาตร 4 ลิตร มีระยะเวลาเก็บกักน้ำเสีย 12 ชั่วโมง และมีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 ทุกวัน พบว่าสามารถบำบัดน้ำเสียจากร้านกาแฟ ความเข้มข้นไขมัน 350 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 70 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 21 วัน นอกจากนี้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดในระบบบำบัด ไม่มีความเป็นพิษต่อเมล็ดพันธุ์พืชถั่วเขียว หัวไชเท้า และแตงกวา งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้พัฒนาสูตรแบคทีเรียอัดเม็ดด้วยแบคทีเรียแกรมลบและเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์สำหรับการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในระบบขนาดใหญ่ได้

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ณัฐริกา เหล่าธรรมทีป

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

5471969623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORDS: TABLET FORM W4-01 / LIPIDS / LIPID DEGRADATION IN WASTEWATER

NATTHARIGA LAOTHAMTEEP: TABLET FORMULATION OF *Serratia* sp. W4-01 FOR LIPID DEGRADATION IN WASTEWATER. ADVISOR: ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D., 140 pp.

This study aimed to develop the tablet formulation of *Serratia* sp. W4-01 for lipid degradation in wastewater. *Serratia* sp. W4-01 could degrade various types of lipids such as soybean oil, palm oil, rice-bran oil, sunflower oil, olive oil and lard at concentration 10 g/l within 3 days and the gene encoding for lipase enzyme (*lipA*) involved in lipid degradation could be detected in strain W4-01. Therefore, the tablet formulation was developed and the formulation that have the highest lipid degradation efficiency consisted of lyophilized bacteria containing skim milk and monosodium glutamate, ammonium sulfate, potassium dihydrogen phosphate, sucrose, magnesium stearate and maize flour. The tablet could store in an anaerobic condition at 4°C up to 6 months with 63% of survival rate while still retain its lipid removal ability. The tablet showed lipid removal efficacy of higher or comparable to those of commercial products. The W4-01 tablet was tested for its lipid-contaminated wastewater treatment in a grease trap model carried out continuously. The total volume of model was 4 liters with a hydraulic retention time of 12 hours with W4-01 addition daily. The tablet was able to treat wastewater from coffee shop containing 350 mg/l of lipid with 70% lipid removal within 21 days. In addition, the treated wastewater showed no toxic effect toward the growth of green bean, radish and cucumber seed. This is the pioneer research for the development of tablet formulation with pure culture of Gram-negative bacteria for lipid-contaminated wastewater treatment. The results indicated that the tablet form of W4-01 has potential to use in large scale of lipid-contaminated wastewater treatment.

Department:	Microbiology	Student's Signature	Nattharika Laothamteep
Field of Study:	Industrial Microbiology	Advisor's Signature	
Academic Year:	2013		

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และรองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณทุนวิจัยจากบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) ในหัวข้อโครงการวิจัยการผลิตและการประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียฯ และขอขอบคุณดร. เฉลิมชัย เรืองชัยนิคม สำหรับคำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวนันท์ธร เภาราช ผู้ร่วมทำงานวิจัย โดยได้ร่วมทำงานวิจัยในหัวข้อพัฒนาวิธีการผลิต เก็บรักษา และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 ในน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน

ขอขอบคุณนางสาวณิชากรณ์ คอนดี ผู้ช่วยออกแบบระบบบำบัดบ่อดักไขมันจำลองในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณนางสาวชนกภรณ์ เมืองจินดา นางสาววัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศรี นางสาววรรณรัก นพเจริญกุล และนายสิทธิ ทาทอง ที่ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ร่วมรุ่นทุกคน และพี่น้องทุกคน ที่มีให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ นายนภดลและนางมะลิ เหล่าธรรมทีป ผู้เป็นบิดามารดา และพี่น้องเหล่าธรรมทีปทุกคน ที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน รวมทั้งเป็นกำลังใจที่สำคัญแก่ผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ง

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม 4

2.1 ไขมันในน้ำทิ้ง (น้ำเสียที่มีไขมัน) 4

2.2 การกำจัดไขมัน (Fat removal) 4

2.2.1 การบำบัดน้ำเสียที่มีไขมัน 7

2.2.2 เอนไซม์ไลเปส 7

2.2.3 แบคทีเรียย่อยสลายไขมัน 9

2.2.4 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรีย 16

2.3 หัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ 17

2.4 แบคทีเรียอัดเม็ดรูปแบบเม็ดยา 26

2.5 ระบบบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน 29

2.6 การตรวจติดตามจุลินทรีย์ในระบบบำบัดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล 32

2.7 การทดสอบความเป็นพิษด้วย Phytotoxicity 33

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย 34

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 34

เคมีภัณฑ์ 35

วิธีดำเนินงานวิจัย 38

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 38

3.1.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย 38

3.1.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ 38

3.1.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันอื่นๆ 38

3.1.4 ตรวจหายีนประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปส 39

หน้า

3.2 พัฒนาวิธีการผลิต เก็บรักษา และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 43
3.2.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอัดเม็ด 43
3.2.2 ผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด 44
3.2.3 คัดเลือกสูตรที่เหมาะสมและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ดในการย่อยสลายไขมัน 46
3.2.4 ทดสอบวิธีเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ด 46
3.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันระหว่างแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 กับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด 47
3.4 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp.สายพันธุ์ W4-01 ในน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน 47
3.4.1 วิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียก่อนบำบัด 47
3.4.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันระดับห้องปฏิบัติการ 48
3.4.3 สร้างระบบบำบัดจำลอง (ถังดักไขมัน) 48
3.4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนไขมันโดยระบบบำบัดขนาดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ 48
3.4.5 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำเสียร้านกาแฟระดับห้องปฏิบัติการ 50
3.4.6 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟด้วยระบบบำบัดขนาดจำลอง 50
3.5 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในระบบบำบัดด้วยวิธี PCR-DGGE 51
3.5.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเสีย 51
3.5.2 ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 51
3.6 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *lip*A ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี real-time qPCR 52
3.6.1 การออกแบบไพรเมอร์ยีน *lip*A สำหรับ real-time qPCR 52
3.6.2 การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ยีน *lip*A สำหรับ real-time qPCR 53
3.6.3 เตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับ real-time qPCR 53
3.6.4 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *lip*A ด้วยวิธี real-time qPCR 54
3.6.5 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (ยีน 16S rRNA) ด้วยวิธี real-time qPCR 54

หน้า

3.7 ทดสอบความเป็นพิษโดย phytotoxicity assay 55
3.8 สกัดไขมันและวิเคราะห์ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค TLC-FID 55
3.8.1 สกัดไขมันจากตัวอย่าง 55
3.8.2 วิเคราะห์ปริมาณไขมันที่เหลือด้วยวิธี TLC-FID 55
บทที่ 4 ผลการทดลอง 57
4.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 57
4.1.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ 57
4.1.2 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันอื่นๆของ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 58
4.1.3 ตรวจหายีนประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปส 59
4.2 การผลิต เก็บรักษา และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 61
4.2.1 การคัดเลือกสารป้องกันความเย็น 61
4.2.2 ส่วนผสมของแบคทีเรียอัดเม็ดและการอัดเม็ด 61
4.2.3 คัดเลือกสูตรที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ดในการย่อยสลายไขมัน 63
4.2.4 วิธีเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ด 65
4.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันระหว่างแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 กับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด 69
4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp.สายพันธุ์ W4-01 ในน้ำเสีย 71
4.4.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันระดับห้องปฏิบัติการ 71
4.4.2 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนไขมันโดยระบบบำบัดขนาดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ 72
4.4.3 ลักษณะสมบัติของน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ 75
4.4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำเสียร้านกาแฟระดับห้องปฏิบัติการ 77
4.4.5 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟด้วยระบบบำบัดขนาดจำลอง 77
4.4.9 ทดสอบความเป็นพิษ 86
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 87
บทที่ 6 ข้อเสนอแนะในงานวิจัย 93

หน้า

รายการอ้างอิง 94
ภาคผนวก 104
ภาคผนวก ก 105
ภาคผนวก ข 108
ภาคผนวก ค 113
ภาคผนวก ง 116
ภาคผนวก จ 138
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 140

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง 4
ตารางที่ 2.2 ตารางการเลือกใช้ถังดักไขมันแบบตั้งบนดินและใต้ดิน 6
ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียและประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน 11
ตารางที่ 2.4 ผลิตภัณฑ์ย่อยสลายไขมันในท้องตลาด 18
ตารางที่ 2.5 สมบัติของสารประกอบที่ใช้อัดเม็ด (กรีพล แม่นวิวัฒนกุล, 2555) 26
ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในระบบบำบัด 31
ตารางที่ 2.7 ค่าดัชนีการงอก (GI) ของเมล็ดพืช 10 ชนิด 33
ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 37
ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปส (ยีน *lip*A) 37
ตารางที่ 3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในงายวิจัย 37
ตารางที่ 3.4 สารประกอบและคุณสมบัติของส่วนผสมที่นำมาอัดเม็ด 44
ตารางที่ 3.5 อัตราส่วนของสารประกอบที่ใช้ในการอัดเม็ดแบคทีเรียสูตรสำเร็จ 45
ตารางที่ 3.6 วิธีวิเคราะห์ลักษณะสมบัติต่างๆ ของน้ำเสีย 47
ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพของ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 ในการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 57
ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพและจำนวนแบคทีเรียของสายพันธุ์ W4-01 ย่อยสลายไขมันอื่นๆ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน 58
ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล (BLASTx) 60
ตารางที่ 4.4 จำนวนแบคทีเรีย น้ำหนัก ความหนาและเวลาละลายของแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 ในสูตรอัดเม็ดต่างๆ 63
ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 สูตร 1 และ 3 ย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน 64
ตารางที่ 4.6 รายละเอียดของผลิตภัณฑ์ A และผลิตภัณฑ์ B 70

หน้า

ตารางที่ 4.7 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ย่อยสลายไขมันในการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากันคือ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน 71

ตารางที่ 4.8 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ย่อยสลายไขมันในการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นไม่เท่ากัน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน 71

ตารางที่ 4.9 ปริมาณไขมันของร้านอาหาร ร้านของทอด และร้านกาแฟ 72

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 ในการย่อยสลายน้ำเสียจริง ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีอุณหภูมิห้อง ตามระยะเวลาที่เหมาะสม 72

ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์น้ำเสีย 76

ตารางที่ 4.12 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล (BLASTx) 80

ตารางที่ 4.13 จำนวนยีน 16S rRNA และยีน *lip*A (Log copies numbers) ของน้ำเสียจากร้านกาแฟที่ไม่ได้ผ่านการเจือจาง 81

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 แผนภูมิการทำงานของบ่อดักไขมัน 5
รูปที่ 2.2 บ่อตะกอนและบ่อดักไขมันของสถานีบริการน้ำมันเชื้อเพลิง 5
รูปที่ 2.3 บ่อดักไขมัน (ก) ชนิดตั้งพื้น (ข) ชนิดฝังดิน 6
รูปที่ 2.4 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ด้วยเอนไซม์ไลเปส ได้กลีเซอรอลและกรดไขมันเป็นผลิตภัณฑ์ 8
รูปที่ 2.5 การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นน้ำกับชั้นไขมัน (oil-water interface) 8
รูปที่ 2.6 การกำจัดไขมันโดยอาศัยกระบวนการของแบคทีเรีย 15
รูปที่ 2.7 ระบบการขนส่งโปรตีน ABC-transporter ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ 16
รูปที่ 2.8 แบคทีเรียอัดเม็ด *Bacillus* sp. สายพันธุ์ Mk-8 26
รูปที่ 2.9 ลักษณะสูตรสำเร็จแบคทีเรียอัดเม็ด *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ No.16 27
รูปที่ 3.1 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dryer รุ่น FD-1 ยี่ห้อ EYELA) 44
รูปที่ 3.2 รูปภาพจำลองระบบบำบัดจำลอง (ถังดักไขมัน) 48
รูปที่ 3.3 การบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันปาล์มใช้แล้วในถังดักไขมันแบบจำลอง 49
รูปที่ 3.4 แบบจำลองระบบบำบัดน้ำเสีย 49
รูปที่ 3.5 การบำบัดน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟในถังดักไขมันแบบจำลอง 50
รูปที่ 4.1 ประสิทธิภาพและจำนวนแบคทีเรียของสายพันธุ์ W4-01ย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 58
รูปที่ 4.2 แสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ lipAF/R และ SlLipF/R 59
รูปที่ 4.3 แบคทีเรียรูปแบบแห้ง *Serratia* sp. W4-01 61
รูปที่ 4.4 แบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 62
รูปที่ 4.5 จำนวนแบคทีเรียที่ผ่านการขยายส่วนในน้ำประปา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 64
รูปที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 เมื่อเก็บรักษาในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 6 เดือน 66
รูปที่ 4.7 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 ในการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 67

หน้า

รูปที่ 4.8 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรของวันที่ 0 และวันที่ 3 68

รูปที่ 4.9 ถังดักไขมันแบบจำลองของชุดที่เติมแบคทีเรีย *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 ในน้ำเสียสังเคราะห์รูปแบบน้ำมันในน้ำอิมัลชันที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร 73

รูปที่ 4.10 ปริมาณไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดจำลอง 73

รูปที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 (Log CFU ต่อมิลลิลิตร) ในน้ำเสียสังเคราะห์ ในระบบบำบัดจำลอง 74

รูปที่ 4.12 ค่า COD (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดจำลอง 74

รูปที่ 4.13 ค่า pH ในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดจำลอง 75

รูปที่ 4.14 น้ำเสียจริงจากร้านกาแฟอเมซอน 76

รูปที่ 4.15 ประสิทธิภาพของ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 ในการย่อยสลายน้ำเสียร้านกาแฟ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นประมาณ 8 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน 77

รูปที่ 4.16 แสดงการทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ lipA_rF/R 79

รูปที่ 4.17 ถังดักไขมันแบบจำลองของชุดที่เติมแบคทีเรีย *Serratia* sp. W4-01 ในน้ำเสียจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่า 82

รูปที่ 4.18 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่า .. 82

รูปที่ 4.19 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 (Log CFU ต่อมิลลิลิตร) ในน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่า 83

รูปที่ 4.20 ค่า COD (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่า 83

รูปที่ 4.21 ค่า pH ในน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่า 84

รูปที่ 4.22 แผนภาพ PCR-DGGE ของน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่า 85

รูปที่ 4.23 ค่าGI (%) ของถั่วเขียวหัวไชเท้าและแตงกวาของวันที่ 0, 1, 13 และ 21 86