บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01

4.1.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

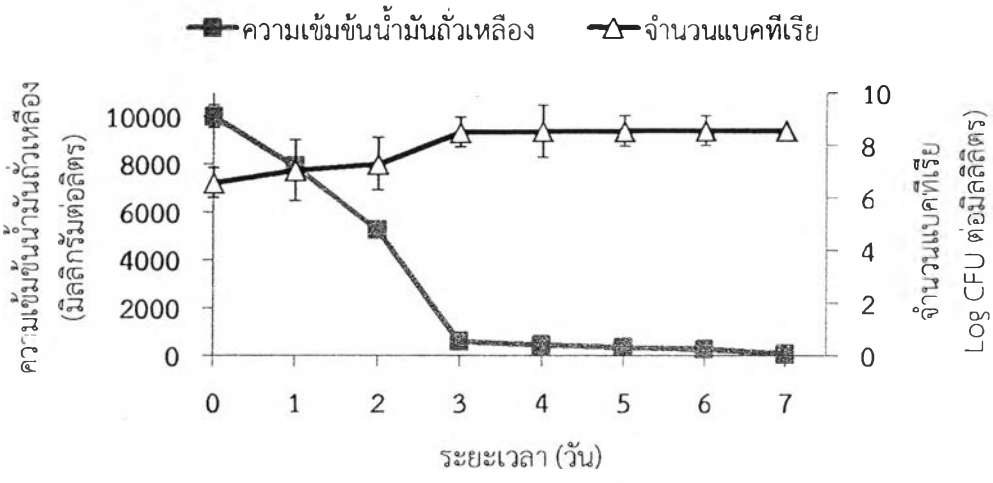
ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 กรัมต่อลิตร ของ *Serratia* sp.สายพันธุ์ W4-01 พบว่ามีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน โดยในช่วงระดับความเข้มข้น 10 และ 25 กรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองได้ประมาณ 98 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และจากการนับจำนวนแบคทีเรียในวันเริ่มต้นและสุดท้ายของการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าสายพันธุ์ W4-01 สามารถเจริญได้ดี

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

ความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย	*Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 (Log CFU ต่อมิลลิลิตร)	
		วันที่ 0	วันที่ 7
10	98.97 ± 0.06	6.41 ± 0.58	8.51 ± 2.08
25	98.51 ± 0.27	6.41 ± 0.58	8.48 ± 0.58
50	95.67 ± 0.49	6.41 ± 0.58	7.45 ± 1.15

จากนั้นได้คัดเลือกความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 1 ความเข้มข้น เพื่อศึกษาระยะเวลาย่อยสลายที่เหมาะสมซึ่งได้พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายได้ดีที่สุด พบว่าสายพันธุ์ W4-01 ย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 10 และ 25 กรัมต่อลิตรได้ดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายกับงานวิจัยอื่น พบว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในงานวิจัยนี้ ยังมีความเข้มข้นไขมันสูงกว่างานวิจัยอื่น ดังนั้นจึงได้คัดเลือกความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรมาศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายต่อไป

ผลการทดสอบระยะเวลาย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมของสายพันธุ์ W4-01 พบว่าในระยะเวลา 3 วัน สามารถย่อยสลายย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพย่อยสลายเท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และภายหลังจาก 3 วัน จำนวนแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ระยะเวลาย่อยสลาย 3 วัน เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันต่อไปดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ประสิทธิภาพและจำนวนแบคทีเรียของสายพันธุ์ W4-01ย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

4.1.2 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันอื่นๆของ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันอื่นๆ ได้แก่ น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์ม น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันมะกอก และน้ำมันหมู ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรพบว่าสายพันธุ์ W4-01สามารถย่อยสลายไขมันทุกชนิดได้มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 3 วัน โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันรำข้าวและน้ำมันปาล์มได้ดีที่สุดเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันมะกอก และน้ำมันหมู ย่อยสลายได้เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ W4-01 สามารถเจริญได้ดี แสดงดังในตารางที่ 4.2

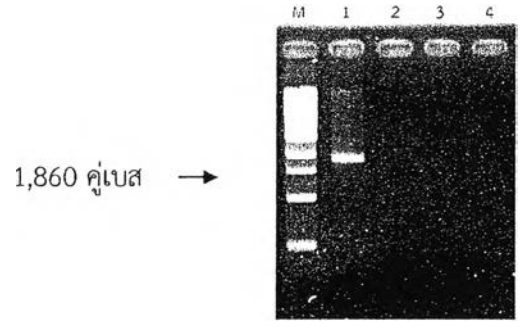
ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพและจำนวนแบคทีเรียของสายพันธุ์ W4-01 ย่อยสลายไขมันอื่นๆ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

ชนิดไขมัน ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร	**เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย**	***Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 (Log CFU ต่อมิลลิลิตร)**	
		วันที่ 0	**วันที่ 3**
น้ำมันรำข้าว	98.49 ± 0.28	6.16 ± 3.05	8.05 ± 1.52
น้ำมันปาล์ม	98.49 ± 0.14	6.16 ± 3.05	9.35 ± 0.57
น้ำมันดอกทานตะวัน	97.35 ± 0.99	6.16 ± 3.05	9.21 ± 1.52
น้ำมันมะกอก	97.47 ± 0.31	6.16 ± 0.57	9.00 ± 4.35
น้ำมันหมู	97.37 ± 0.90	6.16 ± 0.57	8.21 ± 1.15

4.1.3 ตรวจหายีนประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปส

สกัดดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ W4-01 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์คู่ lipAF/R (Long และคณะ, 2007) โดยออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Serratia morcescens* สายพันธุ์ Sr41 8000และ SlLipF/R (Yao และคณะ, 2008) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนของ *Serratia liquefaciens* สายพันธุ์ SM6 และ *Serratia proteomaculans* สายพันธุ์ 568 มีความจำเพาะต่อยีน *lip*A ของ *Serratia* sp.

ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรเรซิส พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ lipAF/R ตามขนาดที่คาดหวังคือ 1,860 คู่เบส แต่ไม่พบผลิตภัณฑ์เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ SlLipF/R แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ lipAF/R และ SlLipF/R

ช่องวิ่งที่ M คือ 1 kb DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 1 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ lipAF/R
ช่องวิ่งที่ 2 คือ Negative ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ lipAF/R
ช่องวิ่งที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ SlLipF/R
ช่องวิ่งที่ 4 คือ Negative ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ SlLipF/R

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ lipAF/R ไปวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์(ภาคผนวก จ) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปแกรม BLASTx พบว่ามีความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของ Lipase (ยีน *lip*A) ของ *Serratia* ดังแสดงในตารางที่ 4.3

Serratia sp. สายพันธุ์ W4-01 มีความสามารถย่อยสลายไขมันอื่นๆ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันมะกอก และน้ำมันหมู และสามารถย่อยสลายไขมันที่ความเข้มข้นสูงได้ นอกจากนี้ยังตรวจพบการมีอยู่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมัน แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ W4-01 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันได้

ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล (BLASTx)

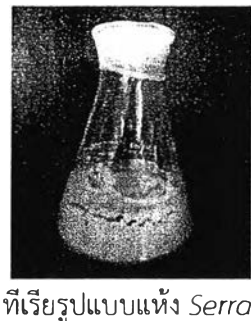
ลำดับที่	โปรตีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Amino acid sequence Identity (%)	อ้างอิง
1	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens* สายพันธุ์ WW4	YP_007406058	89 (346/388)	Kuo และคณะ, 2013
2	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	AAA81002	88 (342/388)	Li และคณะ, 1995
3	Lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	ABI13521	87 (337/388)	Lee และคณะ, 2006
4	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	ABI83633	79 (357/450)	Long และคณะ, 2007
5	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	ADI77082	79 (356/450)	Wu และคณะ, 2010
6	Lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	BAA02519	71 (340/388)	Akatsuka และคณะ, 1994
7	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia proteamaculans* สายพันธุ์ 568	YP_001478438	69 (267/389)	Copeland และคณะ, 2007
8	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens* สายพันธุ์ AS12	YP_004500584	68 (265/387)	Lucas และคณะ, 2011
9	Lipase (*lip*A)	*Serratia plymuthica* สายพันธุ์ 4Rx13	YP_008138205	68 (264/387)	Thuermer และคณะ, 2013
10	Lipase (*SL lip*A)	*Serratia liquefaciens* สายพันธุ์ S33 DB-1	ABP04234	66 (257/391)	Yao และคณะ, 2006

4.2 การผลิต เก็บรักษา และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01

การผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน ต้องพัฒนาวิธีการผลิตและเก็บรักษา เพื่อให้แบคทีเรียอัดเม็ดมีคุณสมบัติที่ดี ซึ่งพิจารณาจากการอยู่รอดของแบคทีเรียและเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียอัดเม็ด

4.2.1 การคัดเลือกสารป้องกันความเย็น

เพื่อให้แบคทีเรียมีอัตราการอยู่รอดเพิ่มมากขึ้น จำเป็นต้องใส่สารป้องกันความเย็นลงในขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียแบบแห้ง จากการคัดเลือกสารป้องกันความเย็นได้แก่ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หางนม และ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หางนมที่เติม 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โมโนโซเดียมกลูตาเมท (Monosodium glutamate; MSG) ผลการทดลองพบว่าภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ปริมาณเชื้อลดลงจาก 14 เหลือ 12 Log CFU ต่อมิลลิลตร และเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน แบคทีเรียรูปแบบแห้งที่เติมหางนม 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีแบคทีเรียรอดชีวิต ในขณะที่การเติมหางนม 10 เปอร์เซ็นต์และ MSG 5 เปอร์เซ็นต์ ยังคงมีจำนวนแบคทีเรียเหลือรอดชีวิตจนสิ้นสุดการทดลอง โดยมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 58.22 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสารป้องกันความเย็นที่ทำให้แบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตได้สูงสุดคือ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หางนมที่เติม 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) MSG นำไปใช้ในการเตรียมแบคทีเรียแบบแห้งสำหรับผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01



รูปที่ 4.3 แบคทีเรียรูปแบบแห้ง *Serratia* sp. W4-01
ที่มีการใส่สารป้องกันความเย็นคือ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หางนมที่เติม 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) MSG

4.2.2 ส่วนผสมของแบคทีเรียอัดเม็ดและการอัดเม็ด

การผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด ซึ่งเตรียมจากแบคทีเรียรูปแบบแห้งและส่วนผสมต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ซูโครส แมกนีเซียมสเตียเรต และแป้งข้าวโพด โดยปริมาณของแหล่งไนโตรเจนและแหล่งฟอสฟอรัสที่เติมลงไป จำเป็นต้องมีสารอาหารเพียงพอให้แบคทีเรียเจริญและเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนี้ส่วนผสมอื่นที่ได้เติมลงไป จะไปช่วยทำให้ผงของแบคทีเรียอัดเม็ดขึ้นรูปเป็นเม็ดแบคทีเรียรูปร่างเม็ดยาได้ง่ายคือ ซูโครส เป็นสารยึดเกาะและสารอาหาร โดยเพิ่มแรงเกาะกันของสารประกอบ และเมื่อได้รับแรงตอกอัดจะทำให้เป็นเม็ดได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ทำให้เกิดการแตกตัวและการละลาย แต่ไม่ควรใช้ในปริมาณที่สูง เนื่องจากสามารถดูดความชื้นได้ง่าย ส่งผลให้แบคทีเรียอัดเม็ดมีความแข็งเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานและมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ แมกนีเซียมสเตรียเรต เป็นสาร

ช่วยลื่น สารกันติด และสารช่วยไหล ทำหน้าที่ลดแรงเสียดทานที่เกิดขึ้นระหว่างผิวเม็ดกับผนังของเบ้าและผิวหน้าของสาก ขณะที่เกิดการตอกอัด โดยทั่วไปจะใช้ในปริมาณที่ต่ำมากคือ น้อยกว่าร้อยละ 1 และแป้งข้าวโพด เป็นสารช่วยแตกตัว โดยอนุภาคของแป้งที่อยู่ในเม็ดแบคทีเรียจะเกิดการพองตัวเมื่อสัมผัสกับน้ำแล้วทำให้เกิดการแตกตัวของเม็ดแบคทีเรีย ซึ่งใช้ปริมาณร้อยละ 1-2 (กรีพล แม่นวิวัฒนกุล, 2555)

นำส่วนผสมในอัตราส่วนต่างๆ ผสมกับแบคทีเรียรูปแบบแห้งตามอัตรส่วนในตารางที่ 3.5 จากนั้นนำไปอัดเม็ดด้วยเครื่องตอกเม็ดยาสากเดียว ผลที่ได้คือ เม็ดแบคทีเรียรูปร่างกลมคล้ายเม็ดยา (tablet) สีชมพู และผิวหน้าเรียบสม่ำเสมอ แสดงดังในรูปที่ 4.5 จากนั้นทดสอบหาปริมาณแบคทีเรีย น้ำหนักและความหนา และความสามารถการละลายน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

รูปที่ 4.4 แบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01

*ตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย*ภายหลังจากทำเป็นแบคทีเรียอัดเม็ด พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 8-10 Log CFU ต่อกรัม โดยแบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 9 มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุดคือ 10 Log CFU ต่อกรัม รองลงมาคือ สูตร 12 และ 1 ตามลำดับ

น้ำหนักและความหนาของแบคทีเรียอัดเม็ด พบว่ามีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 600-780 มิลลิกรัม และมีความหนาโดยเฉลี่ยที่ 3.00 มิลลิเมตร

ความสามารถการละลายน้ำของแบคทีเรียอัดเม็ด พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดทุกสูตรใช้เวลาในการละลายน้ำอยู่ในช่วงระยะเวลา 6-11 นาที ซึ่งแบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 4 ละลายน้ำได้เร็วที่สุด รองลงมาคือสูตร 15 และ 1 ตามลำดับ ในขณะที่สูตร 7 ละลายน้ำได้ช้าที่สุด

ตารางที่ 4.4 จำนวนแบคทีเรีย น้ำหนัก ความหนาและเวลาละลายของแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 ในสูตรอัดเม็ดต่างๆ

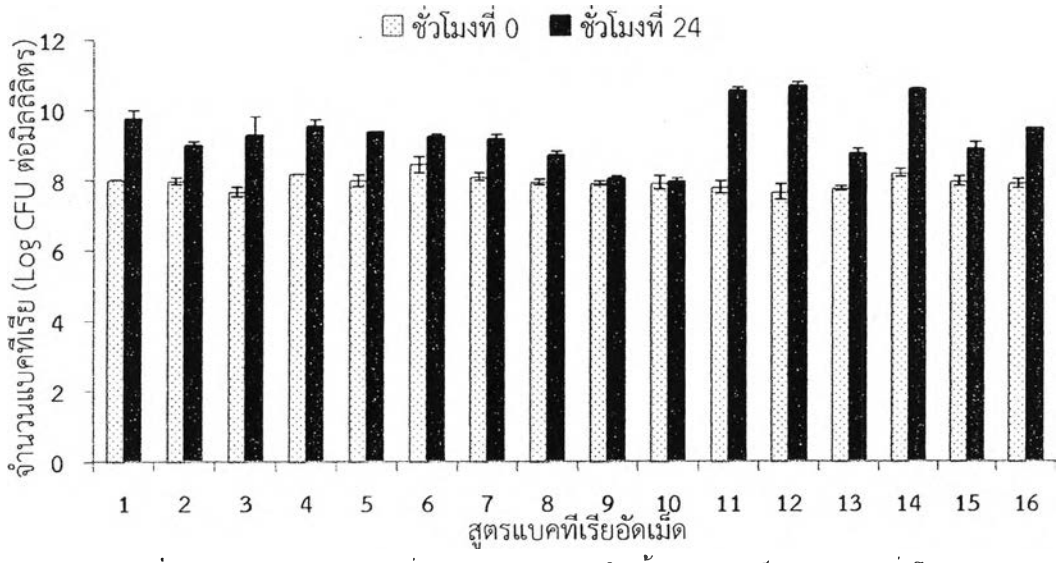
สูตร	จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU ต่อกรัม)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ความหนา (มิลลิเมตร)	เวลาละลาย (นาที)
1	9.80 ± 0.05	626.83 ± 83.60	3.67 ± 0.29	8.33 ± 0.29
2	9.64 ± 1.15	649.40 ± 81.93	3.93 ± 0.23	22.08 ± 0.58
3	9.36 ± 0.26	701.03 ± 41.11	3.87 ± 0.23	19.50 ± 4.95
4	9.66 ± 0.63	718.17 ± 54.50	3.83 ± 0.06	6.67 ± 0.58
5	8.75 ± 0.05	741.67 ± 37.53	3.87 ± 0.06	11.92 ± 0.43
6	8.98 ± 0.09	782.33 ± 40.41	3.90 ± 0.10	25.77 ± 0.68
7	8.63 ± 0.16	745.60 ± 56.64	3.87 ± 0.12	61.67 ± 3.51
8	8.49 ± 0.09	715.40 ± 20.26	3.83 ± 0.15	36.33 ± 1.53
9	10.07 ± 0.06	728.13 ± 17.03	3.77 ± 0.06	10.00 ± 0.50
10	9.70 ± 0.11	677.97 ± 20.21	3.73 ± 0.06	10.92 ± 0.63
11	9.71 ± 0.02	662.33 ± 35.97	3.80 ± 0.00	8.77 ± 0.68
12	9.91 ± 0.24	645.23 ± 19.99	3.70 ± 0.00	9.95 ± 0.58
13	8.77 ± 0.08	694.00 ± 18.53	3.67 ± 0.06	7.65 ± 0.61
14	8.73 ± 0.07	697.23 ± 38.68	3.70 ± 0.00	8.65 ± 0.71
15	8.50 ± 0.12	621.57 ± 128.33	3.73 ± 0.06	7.88 ± 0.38
16	8.80 ± 0.05	740.13 ± 65.01	3.70 ± 0.00	11.10 ± 0.53

4.2.3 คัดเลือกสูตรที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ดในการย่อยสลายไขมัน

4.2.3.1 คัดเลือกสูตรแบคทีเรียอัดเม็ดที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์ของการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดคือ นำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันจากสถานีบริการน้ำมัน ดังนั้นจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนแบคทีเรียให้มีปริมาณมากพอก่อนนำไปใช้ในถังบำบัดซึ่งมีแนวคิดการใช้แบคทีเรียอัดเม็ดคือ แบคทีเรียอัดเม็ด 1 เม็ดต่อน้ำประปา 1 ลิตร โดยนำผงแบคทีเรียอัดเม็ดปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใส่ในน้ำประปา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 12 มีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียมากที่สุดคือ 39 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสูตร 11 และ 14 ตามลำดับ แสดงว่าอัตราส่วนระหว่างแหล่งไนโตรเจนและแหล่งฟอสฟอรัสเหมาะสม ทำให้แบคทีเรียมีการเจริญและเพิ่มจำนวนได้ดี แต่ในสูตรแบคทีเรียนี้ มีส่วนผสมของซูโครสสูง ทำให้ได้แบคทีเรียอัดเม็ดมีลักษณะไม่สมบูรณ์คือ ผิวหน้าของแบคทีเรียอัดเม็ดไม่เรียบและไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้เกิดความชื้นได้ง่าย และส่วนผสมติดทั้งเบ้าและสากของเครื่องตอกเม็ดยาในขณะอัดเม็ดแบคทีเรีย จึงไม่ได้ถูกเลือกใช้ ในขณะที่แบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 1 และ 3 ที่มีการเพิ่มจำนวนเพียง 22 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ได้เม็ดแบคทีเรียมีลักษณะสมบูรณ์ และมีปริมาณซูโครสน้อยกว่า ทำให้ไม่เกิดปัญหาความชื้นในขณะอัดเม็ดแบคทีเรีย นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 9 และ 10 ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง

จำนวนแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ดังนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 1 และ 3 ที่ผ่านการขยายส่วนไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันต่อไป



รูปที่ 4.5 จำนวนแบคทีเรียที่ผ่านการขยายส่วนในน้ำประปา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.3.2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ดในการย่อยสลายไขมัน

โดยนำผงแบคทีเรียอัดเม็ดปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเม็ดแบคทีเรียของสูตร 1 และ 3 เท่ากับ 62 และ 70 มิลลิกรัมตามลำดับ ใส่ในน้ำประปา 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 1 สามารถย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองได้ดีกว่าสูตร 3 โดยมีเปอร์เซ็นต์ย่อยสลายเท่ากับ 87 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในเวลา 3 วัน และมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ดังนั้นจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 1 ไปใช้ทดสอบวิธีการเก็บรักษาระยะยาวต่อไป

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 สูตร 1 และ 3 ย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

สูตร	*Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 (Log CFU ต่อมิลลิลิตร)		จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น (%)	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย (%)
	วันที่ 0	วันที่ 3		
1	8.24 ± 0.30	13.21 ± 0.19	37.60	87.27 ± 6.49
3	8.72 ± 0.12	12.75 ± 0.26	31.65	70.71 ± 7.10

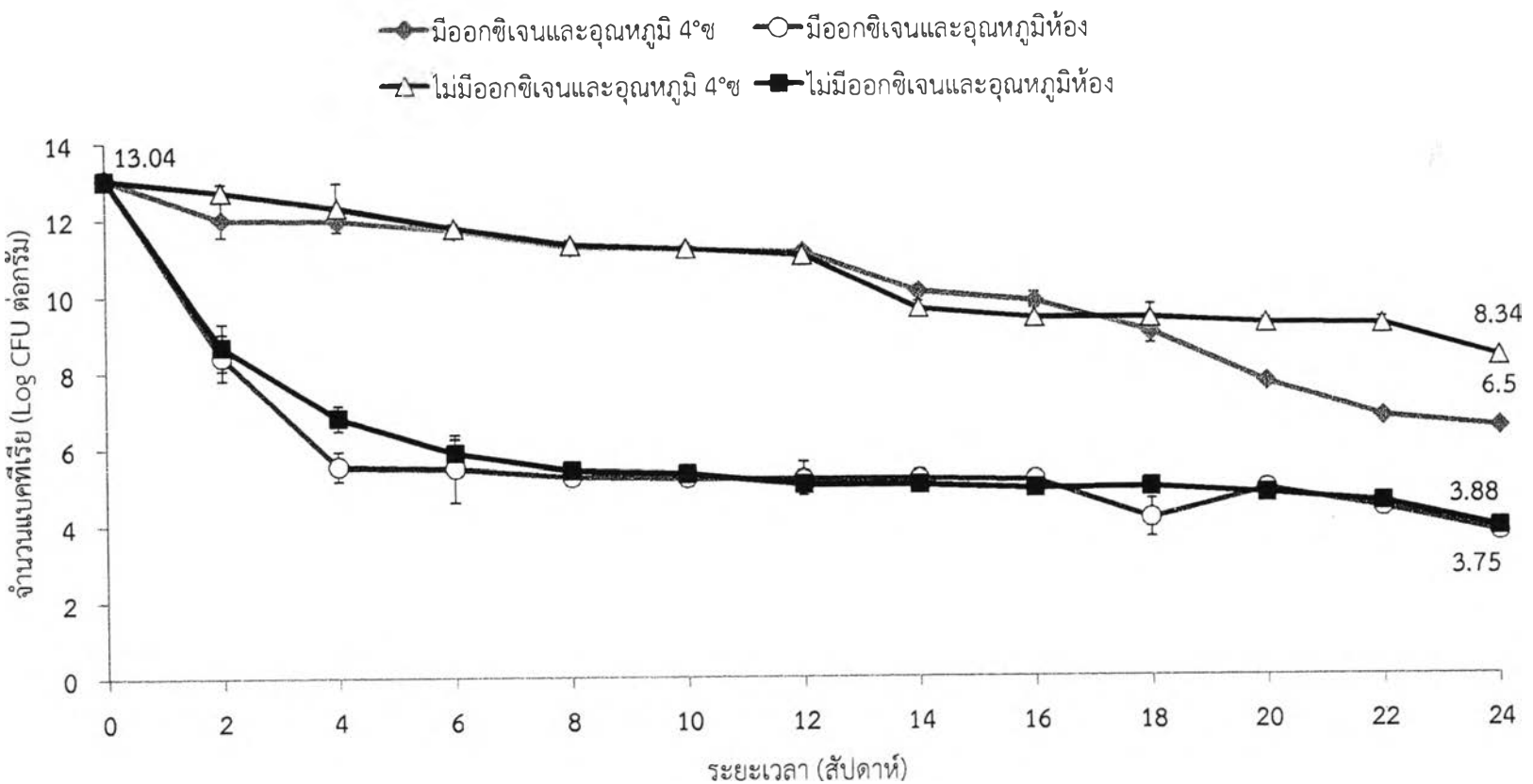
4.2.4 วิธีเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ด

ทดสอบวิธีการเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 ใน4 สภาวะได้แก่ 1) สภาวะที่มีออกซิเจนและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2) สภาวะที่มีออกซิเจนและอุณหภูมิห้อง 3) สภาวะไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 4) สภาวะไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า ในสภาะที่ไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตรารอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 63.96 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สภาวะมีออกซิเจนและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สภาวะไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิห้อง และสภาวะมีออกซิเจนและอุณหภูมิห้อง มีอัตรารอดชีวิตเท่ากับ 49.85, 29.75 และ 28.76 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6

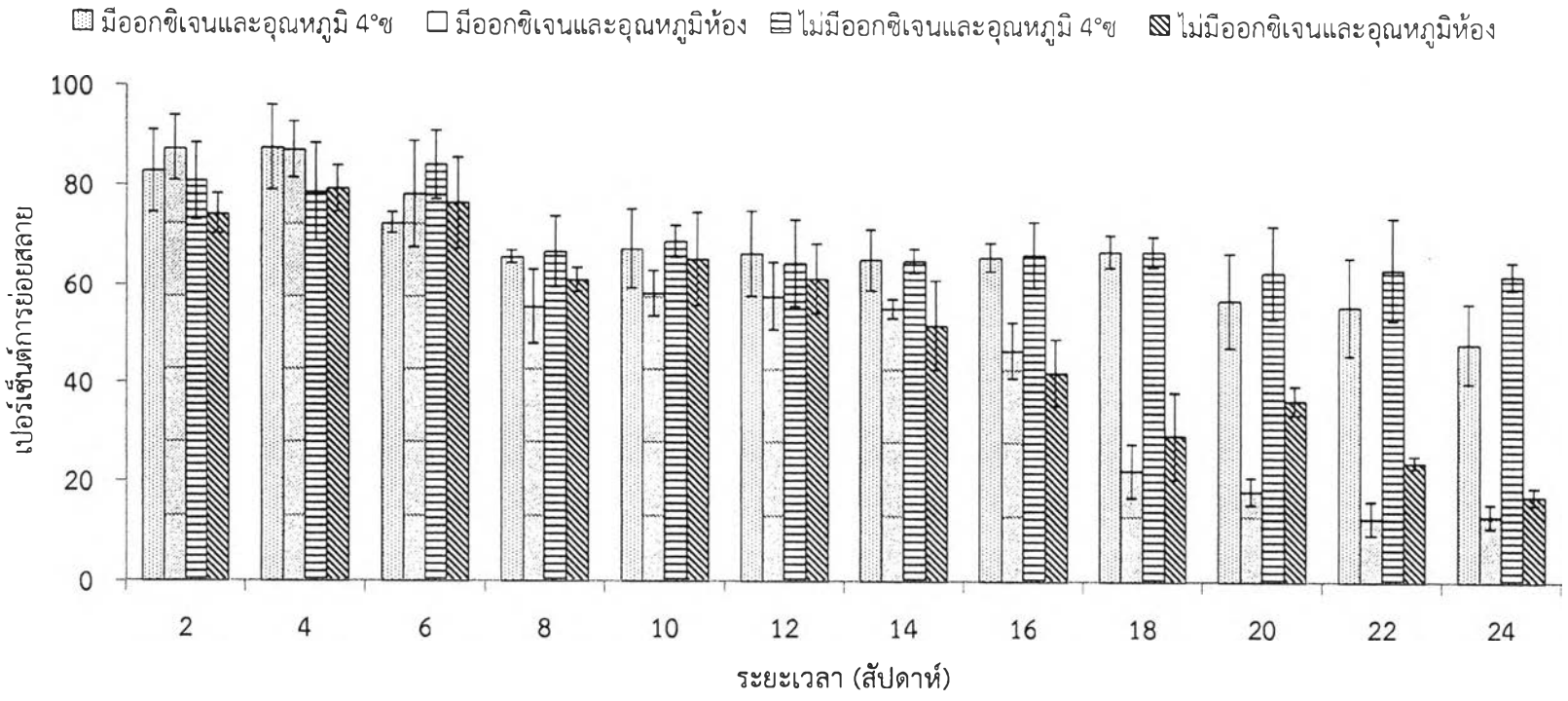
จากผลการทดลองพบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง และการเก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนมีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียสูงกว่าที่มีออกซิเจน ในขณะที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนไม่มีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีความชื้นเท่ากับ 14.91 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้มีจำนวนแบคทีเรียเหลือรอดชีวิตน้อยลง

นำแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 ที่ผ่านการเก็บรักษา ณ เวลาต่างๆ มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองโดยนำผงแบคทีเรียอัดเม็ดปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเม็ดแบคทีเรียสูตร 1 เท่ากับ 62 มิลลิกรัมมาใส่ในน้ำประปา 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตรในน้ำเสียสังเคราะห์พบว่า การเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ที่สภาวะไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 62.32 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ มีออกซิเจนและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิห้อง และมีออกซิเจนและอุณหภูมิห้อง มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 48.30, 17.28 และ 13.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และ 4.8

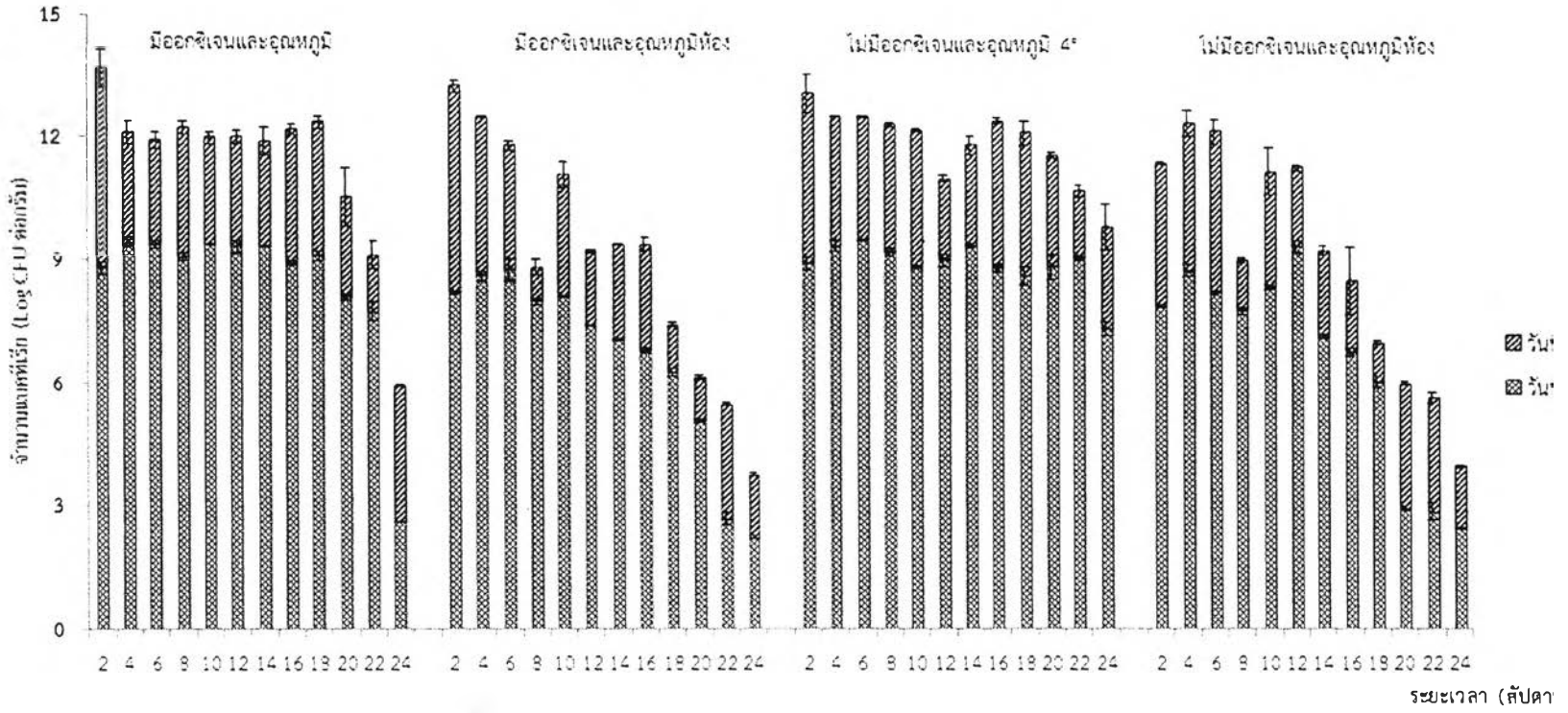
การเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดในทุกสภาวะเป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากสัปดาห์ที่ 8 ในทุกสภาวะ มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายลดลงอยู่ที่ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นที่สภาวะมีออกซิเจนและอุณหภูมิห้อง มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายลดลงเหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มมากขึ้น และพบว่าสามารถเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดได้ทุกสภาวะและยังคงมีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง ทั้งนี้หากต้องการเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดเป็นเวลานาน สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และต้องการลดต้นทุนในการเก็บรักษา สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 เดือน



รูปที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 เมื่อเก็บรักษาในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 6 เดือน



รูปที่ 4.7 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 ในการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เมื่อผ่านการเก็บรักษาในสภาวะต่างๆ



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

การพัฒนาสูตรแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 ที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายไขมัน ประกอบด้วย แบคทีเรียรูปแบบแห้งที่มีสารป้องกันความเย็นคือ หางนม ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์(w/v) ที่เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมท ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์(w/v) 438 มิลลิกรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 68 มิลลิกรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 68 มิลลิกรัม ซูโครส 32 มิลลิกรัม แมกนีเซียมสเตรียเรต 6 มิลลิกรัม และแป้งข้าวโพด 13 มิลลิกรัม สามารถเก็บรักษาในสภาวะไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ 6 เดือน โดยมีอัตราการรอดชีวิต 63 เปอร์เซ็นต์และยังคงมีประสิทธิภาพย่อยสลายไขมัน 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในงานวิจัยนี้สามารถพัฒนาแบคทีเรียอัดเม็ดได้ประสบความสำเร็จ และมีประสิทธิภาพย่อยสลายไขมัน จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด เพื่อเปรียบเทียบความสามารถการย่อยสลายของแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 กับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดในขั้นตอนต่อไป

4.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันระหว่างแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 กับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด

นับจำนวนแบคทีเรียผลิตภัณฑ์ A และผลิตภัณฑ์ B พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่นับได้มีจำนวนน้อยกว่าที่ผลิตภัณฑ์แนะนำมา ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อเวลาผ่านไประยะเวลาหนึ่ง ทำให้แบคทีเรียลดจำนวนลง จึงทำให้แบคทีเรียที่นับได้มีจำนวนน้อยกว่าความเป็นจริง จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด พบว่าทั้งสองชุดการทดลองมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองไม่แตกต่างกันคือ ผลิตภัณฑ์ B และแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองสูงใกล้เคียงกันในขณะที่ผลิตภัณฑ์ A มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายปานกลาง ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และ 4.9

เลขหมู่ วพ.2556
เลขทะเบียน 7292
วันเดือนปี 25 ก.ค. 2560

ตารางที่ 4.6 รายละเอียดของผลิตภัณฑ์ A และผลิตภัณฑ์ B

ผลิตภัณฑ์	ลักษณะ	จำนวนแบคทีเรียที่ระบุในผลิตภัณฑ์ (Log CFU ต่อกรัม)	น้ำหนักต่อเม็ด (กรัม)	สายพันธุ์แบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรียที่นับได้จริง (Log CFU ต่อกรัม)	วิธีใช้	วันหมดอายุ
A	เม็ดกลม สีน้ำตาลอ่อน	9	1.62	แบคทีเรียรูปแบบสปอร์ และเอนไซม์ 3 ชนิด	7.95	ละลายผลิตภัณฑ์ A 1 เม็ด ในน้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปใช้งาน	31-07-14
B	เม็ดกลม สีฟ้าอ่อน	8	5	แบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ และเอนไซม์ 3 ชนิด (*Bacillus subtilis*)	7.79	ละลายผลิตภัณฑ์ B 1 เม็ด ในน้ำ 20 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปใช้งาน	ไม่ระบุ

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

ผลิตภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย	จำนวนแบคทีเรีย (Log CFUต่อมิลลิลิตร)	
		วันที่ 0	วันที่ 3
แบคทีเรียอัดเม็ด W4-01	87.27 ± 6.49	8.24 ± 0.30	13.21 ± 0.19
ผลิตภัณฑ์ A	40.13 ± 4.50	8.05 ± 0.58	9.43 ± 5.77
ผลิตภัณฑ์ B	90.00 ± 0.40	8.06 ± 2.08	10.04 ± 2.08

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

ผลิตภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย	จำนวนแบคทีเรีย (Log CFUต่อมิลลิลิตร)	
		วันที่ 0	วันที่ 3
แบคทีเรียอัดเม็ด W4-01	87.27 ± 6.49	8.24 ± 0.30	13.21 ± 0.19
ผลิตภัณฑ์ A	55.73 ± 0.62	10.01 ± 3.46	11.15 ± 2.08
ผลิตภัณฑ์ B	93.42 ± 0.11	9.27 ± 2.08	10.50 ± 6.66

แบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 มีประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันสูงหรือเทียบเท่าผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ จึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริงในบ่อดักไขมันจำลองต่อไป

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp.สายพันธุ์ W4-01 ในน้ำเสีย

งานวิจัยของขั้นตอนนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันของแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 ในบ่อดักไขมันจำลอง โดยเริ่มจากทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายเบื้องต้นในน้ำเสียจริงระดับห้องปฏิบัติการ ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ในบ่อดักไขมันจำลอง และทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจริงในบ่อดักไขมันจำลอง

4.4.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันระดับห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในน้ำเสียจริงจากร้านค้า 3 ประเภทด้วยวิธี TLC-FID พบว่าร้านอาหารมีปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 14,634 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ร้านของทอดและร้านกาแฟมีปริมาณไขมันเท่ากับ 7,692 และ 1,719 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ดังนั้นระยะเวลาในการย่อยสลายที่เหมาะสมของน้ำเสียจากร้านกาแฟเป็นเวลา3 วัน ร้านของทอดและร้านอาหาร

เป็นเวลา 9 วัน จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 พบว่ามีประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันจากร้านของทอดและร้านอาหารใกล้เคียงกันเท่ากับ 64 และ 61 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในเวลา 9 วัน และสามารถย่อยสลายไขมันจากร้านกาแฟได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 3 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.9 ปริมาณไขมันของร้านอาหาร ร้านของทอด และร้านกาแฟ

แหล่งน้ำเสีย	ปริมาณไขมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ร้านอาหาร	14,634.53 ± 4,840.26
ร้านของทอด	7,692.33 ± 963.08
ร้านกาแฟ	1,719.01 ± 669.49

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 ในการย่อยสลายน้ำเสียจริง ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีอุณหภูมิห้อง ตามระยะเวลาที่เหมาะสม

แหล่งน้ำเสีย	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย	ระยะเวลาย่อยสลาย (วัน)	สายพันธุ์ W4-01 (Log CFU ต่อมิลลิลิตร)		
			วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 9
ร้านอาหาร	61.10 ± 1.07	3	9.43 ± 0.03	9.78 ± 0.88	7.04 ± 0.40
ร้านของทอด	64.02 ± 0.12	9	8.86 ± 0.24	8.90 ± 0.42	8.17 ± 0.46
ร้านกาแฟ	49.92 ± 2.19	9	9.19 ± 0.10	11.87 ± 0.24	ND

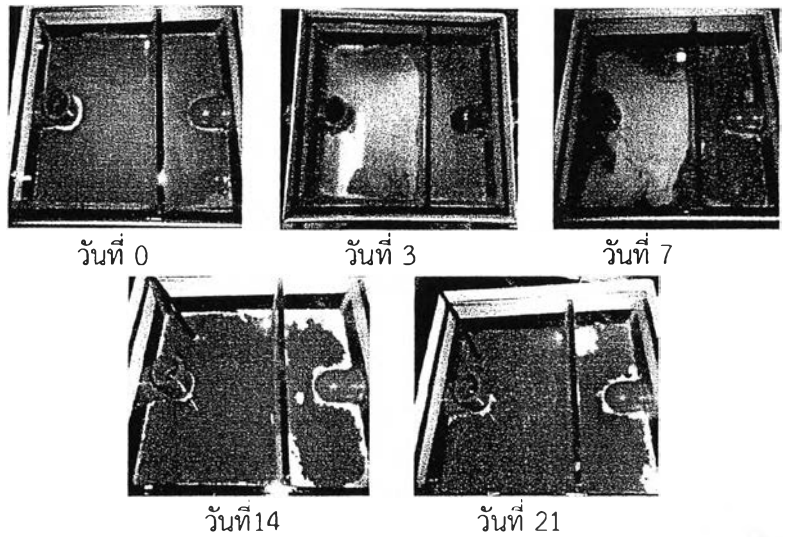
หมายเหตุ: ND ไม่ได้ทดลอง

แบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 มีความสามารถย่อยสลายไขมันจากร้านของทอด ร้านอาหาร และร้านกาแฟได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้นำแบคทีเรียอัดเม็ดไปทดสอบการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันในบ่อดักไขมันจำลองต่อไป

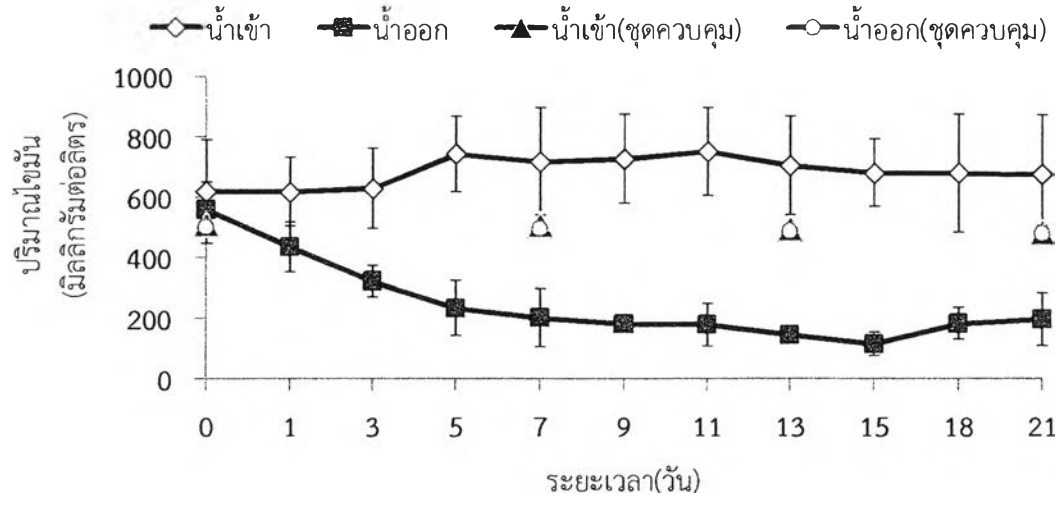
4.4.2 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนไขมันโดยระบบบำบัดขนาดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร โดยน้ำเสียสังเคราะห์เป็นแบบน้ำมันในน้ำอิมัลชันในระบบบำบัดขนาดจำลอง ปริมาตรในการบำบัดเท่ากับ 4 ลิตร ที่ระยะเวลาเก็บกักน้ำเท่ากับ 12 ชั่วโมง และเติมแบคทีเรียที่ผ่านการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียในปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่อปริมาตรถังบำบัด 4 ลิตรเท่ากับ 400 มิลลิลิตรทุกวัน พบว่าเมื่อเริ่มระบบบำบัดใน 7 วันแรก เกิดการรวมตัวของไขมันเป็นฟิล์มแผ่นบางลอยอยู่เหนือน้ำในช่องที่สองของระบบบำบัด (ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ของวันที่ 7) จึงได้ติดตั้งเครื่องปั๊ม เพื่อเพิ่มการไหลวนของน้ำให้เพิ่มมากขึ้น และพบว่าแผ่นฟิล์มไขมันได้ลดหายไป แต่ก็ยังมีแผ่นฟิล์มไขมันบ้างเล็กน้อยจนสิ้นสุดการทดลอง ประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วในน้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านระบบบำบัดเป็นเวลา 21 วัน ลดลง 70.95 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียขาเข้า ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม

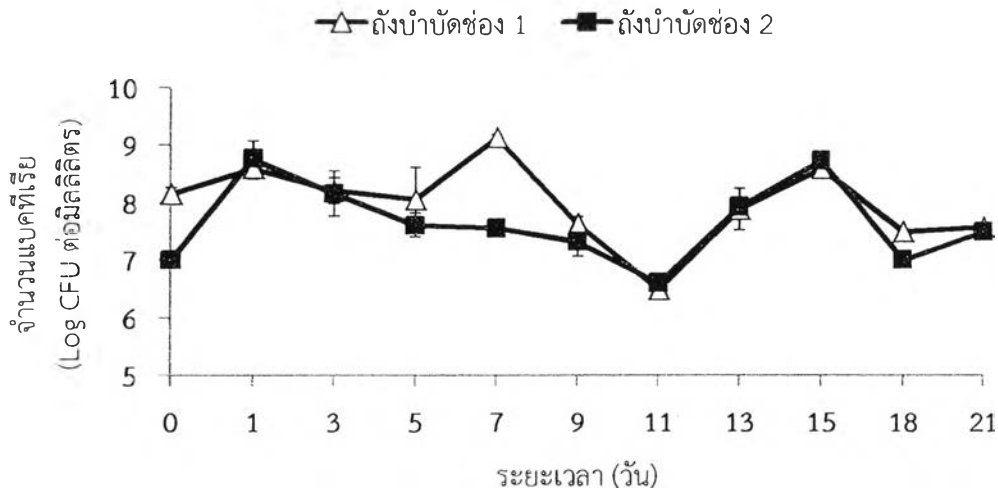
แบคทีเรีย พบว่าไม่มีการลดลงของไขมัน จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 มีจำนวนค่อนข้างใกล้เคียงกันตลอดการทดลองในทั้งสองช่องของระบบบำบัด ดังแสดงในรูปที่ 4.11 มีประสิทธิภาพลดค่า COD ได้ 55 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 และค่า pH มีค่าเป็นกลางตลอดการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.13



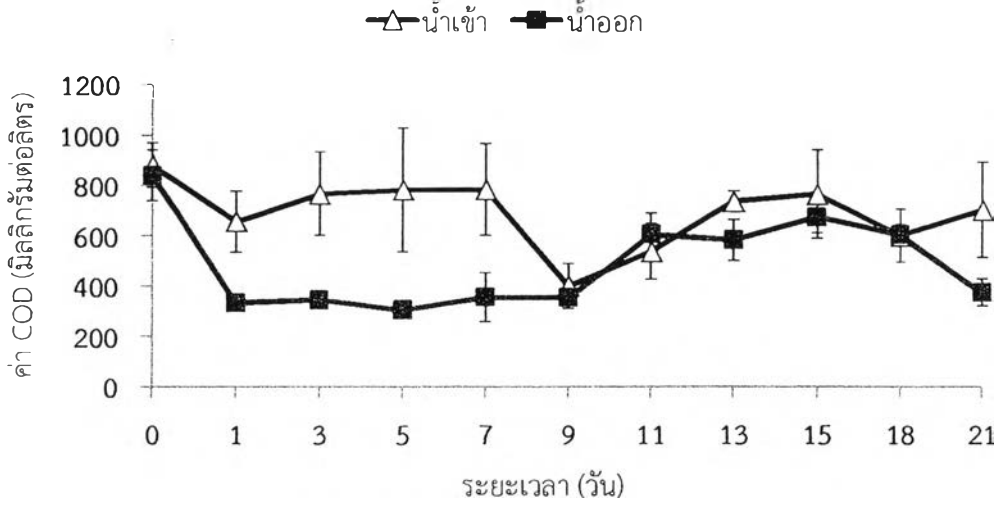
รูปที่ 4.9 ถังดักไขมันแบบจำลองของชุดที่เติมแบคทีเรีย *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 ในน้ำเสียสังเคราะห์รูปแบบน้ำมันในน้ำอิมัลชันที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร



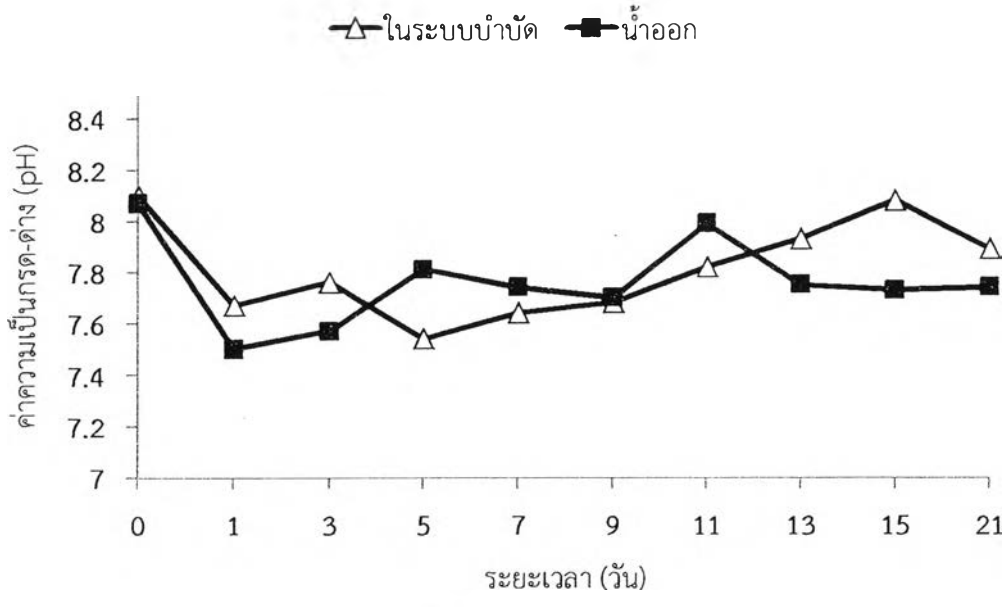
รูปที่ 4.10 ปริมาณไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดจำลอง



รูปที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 (Log CFU ต่อมิลลิลิตร) ในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดจำลอง



รูปที่ 4.12 ค่า COD (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดจำลอง



รูปที่ 4.13 ค่า pH ในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดจำลอง

การบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ในบ่อดักไขมันจำลอง โดยเลือกใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วให้เป็นตัวแทนไขมันจากร้านอาหารและร้านของทอดด้วยแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 สามารถบำบัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามในขั้นตอนต่อไปได้เลือกน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟเป็นต้นแบบในการทดสอบการใช้แบคทีเรียอัดเม็ดบำบัดน้ำเสียจริง เนื่องจากมีปริมาณไขมันไม่สูงเกินไป ทำให้น่าจะเห็นผลการบำบัดโดยใช้ระยะเวลาสั้นกว่า

4.4.3 ลักษณะสมบัติของน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ

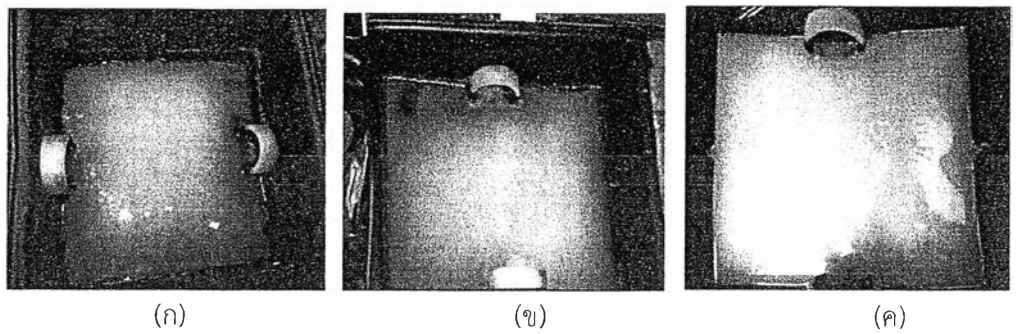
ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟอเมซอน ตามวิธีมาตรฐาน เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าpH ค่า FOG ค่า COD ปริมาณน้ำมันที่มีอยู่ ค่าไนโตรเจนทั้งหมด และค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 4.11 โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียจำนวน 3 ครั้ง ได้แก่ ในวันที่ 27 มีนาคม 2556 วันที่ 2 เมษายน 2556 และวันที่ 9 เมษายน 2556

ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์น้ำเสีย

ค่าพารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์[1]	มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง[2]
ค่า pH	6.14 - 6.56	5.5 - 9.0
ค่า FOG (มิลลิกรัมต่อลิตร)	155 - 316	ไม่เกิน 15
ค่า COD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	1,050 - 2,703	ไม่เกิน 200
ค่า DO (มิลลิกรัมต่อลิตร)	6.10 - 7.30	-
ปริมาณน้ำมันที่มีอยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	641 - 691	-
ไนโตรเจนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	2 - 4.5	-
ฟอสฟอรัสทั้งหมด(มิลลิกรัมต่อลิตร)	<0.03	-

หมายเหตุ[1] วิเคราะห์โดยบริษัท บางกอก เอ็นจิเนียริ่ง เซอร์วิสแอนด์เทคโนโลยี จำกัด

[2]มาตรฐานน้ำทิ้งจากสถานีบริการน้ำมันเชื้อเพลิง ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม (พ.ศ. 2549) เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากสถานีบริการน้ำมันเชื้อเพลิง ลงวันที่ 8 พฤศจิกายน 2549 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 123 ตอนพิเศษ 129 ง วันที่ 15 ธันวาคม 2549



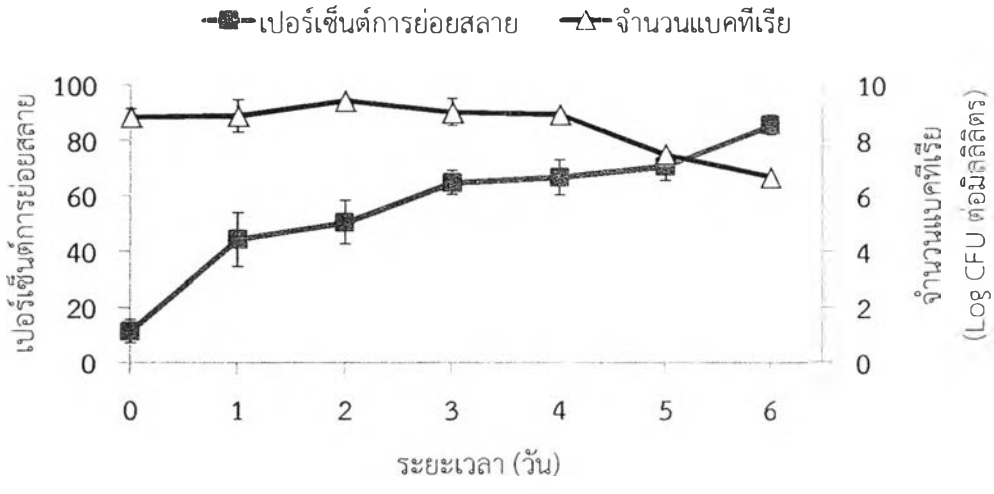
(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4.14 น้ำเสียจริงจากร้านกาแฟอเมซอน เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 (ก) ครั้งที่ 2 (ข) และครั้งที่ 3 (ค)

วิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เพื่อให้ทราบคุณลักษณะเบื้องต้นของน้ำเสียจริงในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 และ 2 น้ำเสียมีสีน้ำตาลคล้ายสีของกาแฟ และมีกลิ่นค่อนข้างเหม็น ส่วนการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 น้ำเสียมีสีขาวขุ่นคล้ายสีนม และมีกลิ่นเหม็นน้อยกว่า ผลจากการวิเคราะห์พบว่าน้ำเสียมีค่า pH เท่ากับ 6.14 - 6.56 ปริมาณสารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทั้งหมด มีปริมาณค่อนข้างน้อยมีค่า FOG อยู่ในช่วง 155-316 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกินมาตรฐานที่กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมกำหนดคือ ไม่เกิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตรค่า COD อยู่ในช่วง 1,050-2,703 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกินมาตรฐานที่กำหนดไว้คือ ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันด้วยเครื่อง TLC-FID พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 641-691 มิลลิกรัมต่อลิตรจากผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียแสดงให้เห็นว่า น้ำเสียจากบ่อดักไขมันนั้นยังคงมีไขมันหลงเหลือปนอยู่ ดังนั้นการบำบัดทางชีวภาพจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่เข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในระบบบำบัดได้มากขึ้น เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดีขึ้นและอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ถูกกำหนดไว้

4.4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำเสียร้านกาแฟระดับห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำเสียร้านกาแฟอเมซอนที่มีปริมาณไขมันเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตรพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองสามารถย่อยสลายได้ 85.39 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 6 วัน จากผลการทดลองนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียพบว่า จำนวนแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นและมีจำนวนสูงสุดในวันที่ 2 หลังจากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดจำนวนลงและลดจำนวนลงจนสิ้นสุดการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.15 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่าจำนวนแบคทีเรียมีจำนวนลดลงแต่ยังคงมีจำนวนเพียงพอที่จะย่อยสลายไขมันได้ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่จะสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเพิ่มระยะเวลาการบำบัดมากกว่า 6 วัน



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

4.4.5 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟด้วยระบบบำบัดขนาดจำลอง

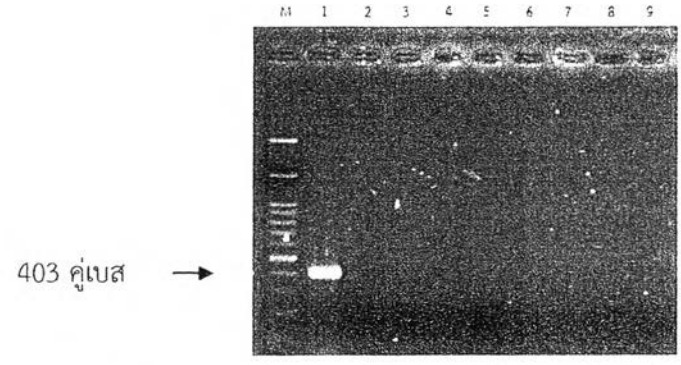
งานวิจัยในขั้นตอนนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจติดตามและตรวจนับแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมันในระบบบำบัดน้ำเสียจริงด้วยการออกแบบไพร์เมอร์สำหรับ real-time PCR จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟด้วยบ่อดักไขมันจำลอง ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี PCR-DGGE และทดสอบความเป็นพิษของน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว

4.4.5.1 ความจำเพาะของไพรเมอร์ lipA_rF และ lipA_rR สำหรับ real-time qPCR

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ lipA_rF และ lipA_rR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากแบคทีเรียดังนี้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายไขมัน *Gordonio* sp. สายพันธุ์ GY40 แบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้แก่ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ R2 (สิทธิ ทาทอง, 2550) แบคทีเรียย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs) ได้แก่ *Novosphingobium pentaromativorans* สายพันธุ์ PCY (Wongwongsee และคณะ, 2013), *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402, *Diophorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB (Klankeo และคณะ, 2009) และ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Kouzuma และคณะ, 2006) และแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายทั้ง PAHs และน้ำมันปาล์มได้แก่ *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 (Pinyakong และคณะ, 2003)

ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรเรซิส พบว่าคู่ไพรเมอร์นี้มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของสายพันธุ์ W4-01 เท่านั้น ซึ่งตรวจพบผลิตภัณฑ์ตามขนาดที่คาดหวัง 403 คู่เบส ในขณะที่คู่ไพรเมอร์นี้ไม่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอื่น ดังแสดงในรูปที่ 4.16

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ lipA_rF/R ไปวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ แล้วเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปแกรม BLASTx พบว่ามีความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของ Lipase (ยีน *lip*A) ของ *Serrotia* ดังแสดงในตารางที่ 4.12 ดังนั้นคู่ไพรเมอร์นี้เหมาะสำหรับนำไปใช้ตรวจติดตามแบคทีเรียที่มียีน *lip*A ในระบบบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน



รูปที่ 4.16 แสดงการทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ lipA_rF/R

ช่องวิ่งที่ M	100 bp ladder
ช่องวิ่งที่ 1	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01
ช่องวิ่งที่ 2	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *Gordonia* sp. สายพันธุ์ GY40
ช่องวิ่งที่ 3	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *Novosphingbium pentaromativorans* สายพันธุ์ PCY
ช่องวิ่งที่ 4	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402
ช่องวิ่งที่ 5	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB
ช่องวิ่งที่ 6	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2
ช่องวิ่งที่ 7	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ R2
ช่องวิ่งที่ 8	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4
ช่องวิ่งที่ 9	Negative ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ lipA_rF/R

ตารางที่ 4.12 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล (BLASTx)

ลำดับที่	โปรตีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Amino acid sequence Identity (%)	อ้างอิง
1	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens* สายพันธุ์ WW4	YP_007406058	88 (113/129)	Kuo และคณะ, 2013
2	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	AAA81002	88 (113/129)	Li และคณะ, 1995
3	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	ADI77082	87 (112/129)	Wu และคณะ, 2010
4	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	ABI83633	87 (112/129)	Long และคณะ, 2007
5	Lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	BAA02519	86 (111/129)	Akatsuka และคณะ, 1994
6	Lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	AGT95802	86 (111/129)	Mohammadi และคณะ, ยังไม่ตีพิมพ์
7	Lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens*	ABI13521	85 (110/129)	Lee และคณะ, 2006
8	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia proteamaculans* สายพันธุ์ 568	YP_001478438	63 (81/129)	Copeland และคณะ, 2007
9	Extracellular lipase (*lip*A)	*Serratia marcescens* สายพันธุ์ AS12	YP_004500584	59 (265/129)	Lucas และคณะ, 2011
10	Lipase (*lip*A)	*Serratia plymuthica* สายพันธุ์ 4Rx13	YP_008138205	58 (75/129)	Thuermer และคณะ, 2013

4.4.5.2 การตรวจนับจำนวนยีน 16S rRNA และยีน *lip*A ในน้ำเสียจากร้านกาแฟ

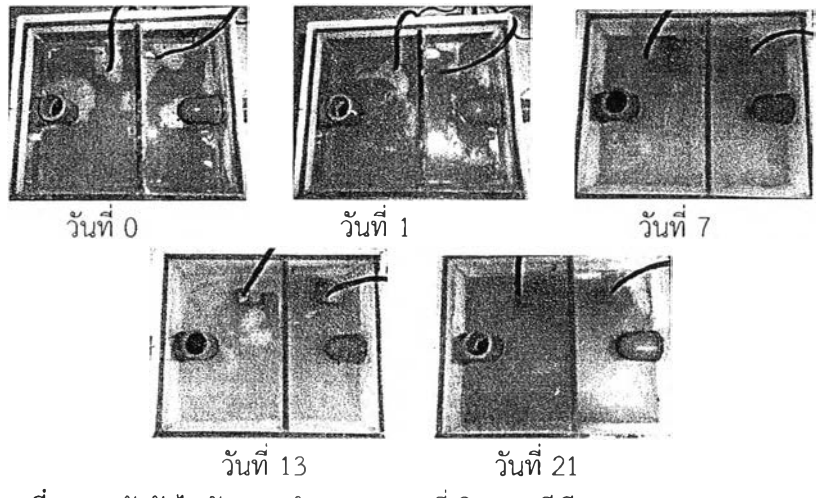
การตรวจนับจำนวนยีน 16S rRNA และยีน *lip*A ของแบคทีเรียในน้ำเสียจากร้านกาแฟด้วยวิธี real-time qPCR โดยนำค่า C_t ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค) เพื่อคำนวณเป็นจำนวนแบคทีเรียพบว่าในน้ำเสียมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 6 log copies numbers ซึ่งสอดคล้องกับผลการนับจำนวนแบคทีเรียที่เพาะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate count) พบว่ามีจำนวนแบคทีเรีย 6 Log CFU ต่อมิลลิลิตร และพบลักษณะโคโลนี 2 แบบได้แก่ โคโลนีขาว กลม ขอบเรียบ และโคโลนีขาว กลม ขอบหยัก และสอดคล้องกับผล PCR-DGGE ที่พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ แสดงว่ามีแบคทีเรียหลักๆ ในน้ำเสียเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.22 และมีจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *lip*A ซึ่งสามารถย่อยสลายไขมันได้เท่ากับ 2 log copies numbers แสดงว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่มีสามารถย่อยสลายไขมันได้น้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.13 ดังนั้นในระบบบำบัดจำลองต้องเติมสายพันธุ์ W4-01 ให้มีปริมาณมากเกินพอ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน

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

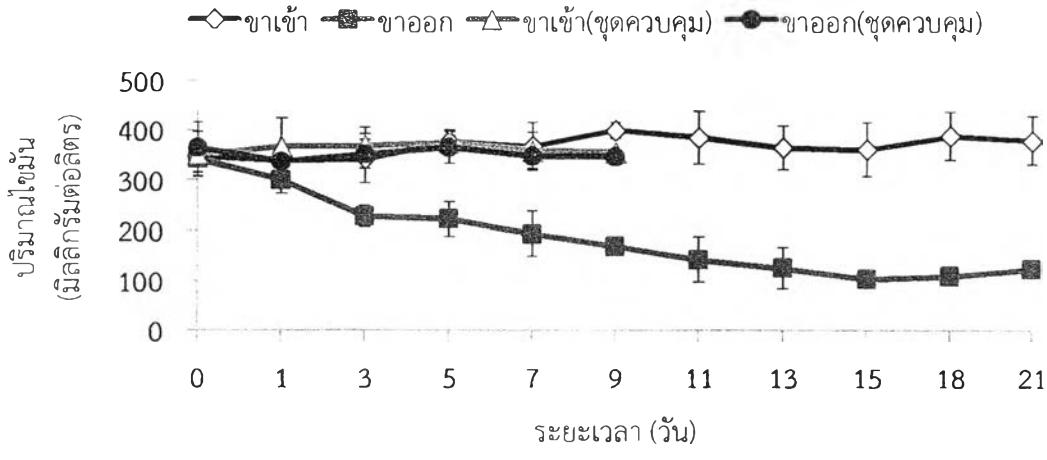
ตัวอย่างน้ำเสีย	Log copies numbers	
	ยีน 16S rRNA	ยีน *lip*A
น้ำที่ไม่ได้ผ่านการเจือจาง	6.46 ±0.18	2.65 ± 0.02

4.4.5.3 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟที่เจือจาง 5 เท่าด้วยระบบบำบัดขนาดจำลอง

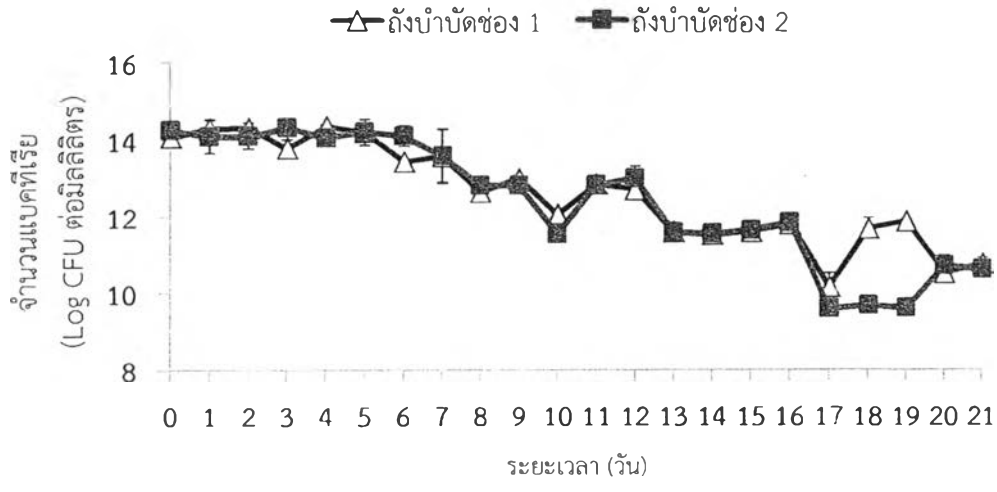
นำน้ำเสียจากร้านกาแฟมาเจือจาง 5 เท่า เนื่องจากน้ำเสียที่นำมาบำบัด ได้นำมาจากบ่อดักไขมัน ซึ่งมีการสะสมของไขมันทุกวัน ทำให้มีปริมาณไขมันสูงกว่าไขมันในน้ำเสียที่ถูกปล่อยออกมาก่อนเข้าสู่บ่อดักไขมัน ดังนั้นต้องเจือจางน้ำเสียจากร้านกาแฟ เพื่อทำให้มีปริมาณไขมันในน้ำเสียที่ต้องการบำบัดเท่ากับปริมาณไขมันในน้ำเสียที่ถูกปล่อยออกมาก่อนเข้าสู่บ่อดักไขมัน โดยเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 ให้มากเกินพอใน 7 วันแรกเท่ากับ 13 Log CFU ต่อมิลลิลิตรด้วยการเติมแบคทีเรียวันละ 2 ครั้ง และห่างกัน 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสายพันธุ์ W4-01 วันละ 1 ครั้งเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดพบว่าประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟลดลงอย่างเห็นได้ชัด สามารถย่อยสลายไขมันได้สูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียขาเข้าดังแสดงในรูปที่ 4.18 และในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียพบว่าไม่มีการลดลงของไขมัน จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 มีจำนวนค่อนข้างใกล้เคียงกันตลอดการทดลองในทั้งสองช่องของระบบบำบัดดังแสดงในรูปที่ 4.19 และประสิทธิภาพการลด COD ได้ 45 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในรูปที่ 4.20 และพบค่า pH อยู่ในช่วงเป็นกลางจนสิ้นสุดการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.21



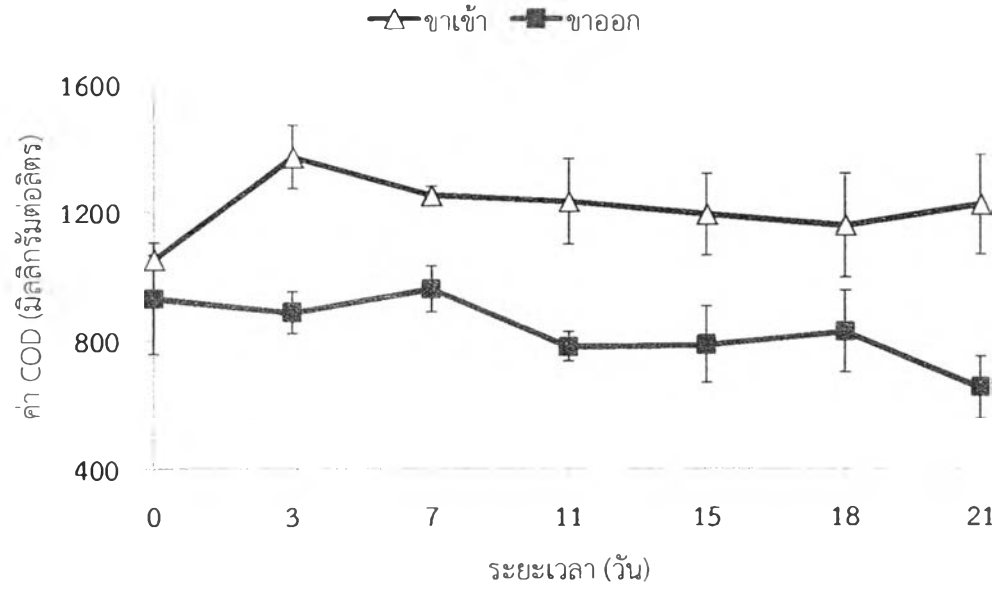
รูปที่ 4.17 ถังดักไขมันแบบจำลองของชุดที่เติมแบคทีเรีย *Serratia* sp. W4-01 ในน้ำเสียจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่า



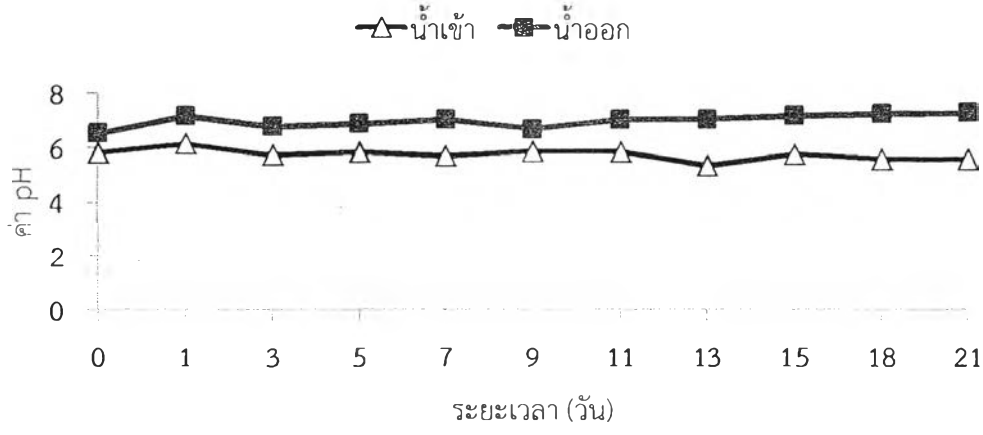
รูปที่ 4.18 ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่า



รูปที่ 4.19 จำนวนแบคทีเรียสาย**พันธุ์** W4-01 (Log CFU ต่อมิลลิลิตร) ในน้ำเสียจริงจากร้านกา**แฟ** เจือจาง 5 เท่า



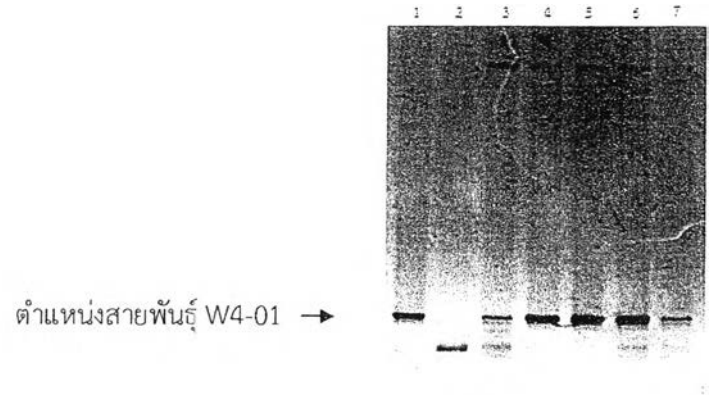
รูปที่ 4.20 ค่า COD (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำเสียจริงจากร้านกา**แฟ** เจือจาง 5 เท่า



รูปที่ 4.21 ค่า pH ในน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่า

4.4.5.4 ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟที่เจือจาง 5 เท่า

การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี PCR-DGGE พบแถบดีเอ็นเอเด่นของสายพันธุ์ W4-01 อยู่ตลอดช่วงการทดลอง แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ W4-01 เป็นประชากรหลักในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย และเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายไขมันในระบบบำบัด ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 4.18 และ 4.22) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียประจำท้องถิ่นหลังผ่านการบำบัด แสดงว่าแบคทีเรียประจำท้องถิ่นสามารถปรับตัวและสามารถใช้ไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้

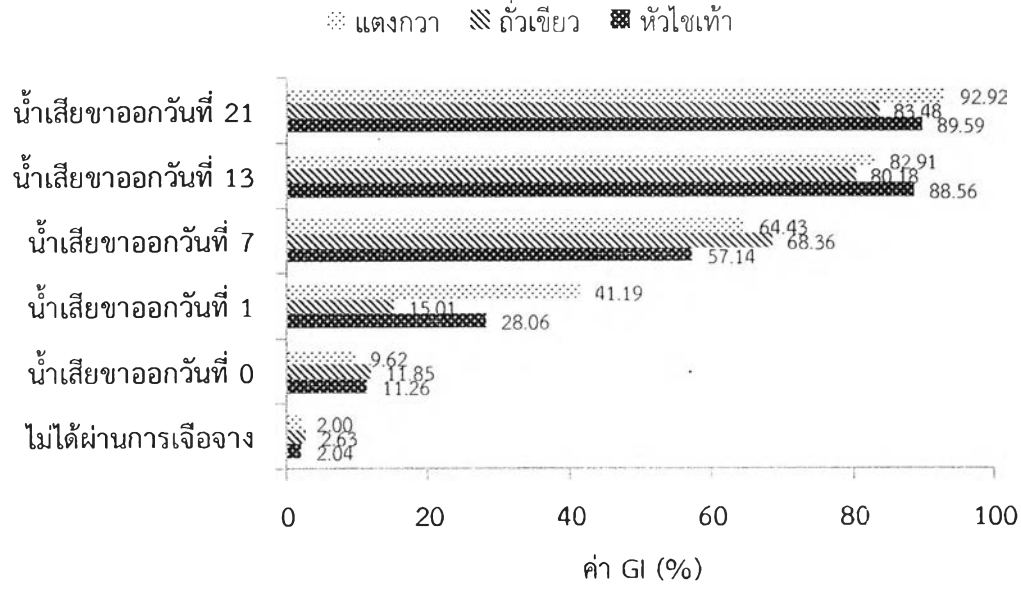


รูปที่ 4.22 แผนภาพ PCR-DGGE ของน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่า ในระบบบำบัด เป็นเวลา 21 วัน

ช่องวิ่งที่ 1 ดีเอ็นเอของ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01
ช่องวิ่งที่ 2 น้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ ที่ไม่ได้เจือจาง
ช่องวิ่งที่ 3 น้ำเสียจริงขาออกวันที่ 0
ช่องวิ่งที่ 4 น้ำเสียจริงขาออกวันที่ 3
ช่องวิ่งที่ 5 น้ำเสียจริงขาออกวันที่ 7
ช่องวิ่งที่ 6 น้ำเสียจริงขาออกวันที่ 15
ช่องวิ่งที่ 7 น้ำเสียจริงขาออกวันที่ 21

4.4.9 ทดสอบความเป็นพิษ

ทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี Phytotoxicity ด้วยเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว หัวไชเท้า และแตงกวา โดยมีน้ำประปาเป็นชุดควบคุมมีเกณฑ์พิจารณาคือ มีค่าดัชนีการงอก (Germination Index; GI) มากกว่าหรือเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ บ่งบอกว่าไม่มีความเป็นพิษ พบว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดในระบบบำบัดสามารถลดความเป็นพิษของน้ำเสียได้ดังแสดงในรูปที่ 4.23



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

การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันด้วยแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ W4-01 สามารถบำบัดน้ำเสียจากร้านของทอด ร้านอาหาร และร้านกาแฟในระดับห้องปฏิบัติการได้ และสามารถบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร และสามารถบำบัดน้ำเสียจากร้านกาแฟ ความเข้มข้นไขมัน 350 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 70 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 21 วันในบ่อดักไขมันจำลอง ระบบแบบต่อเนื่อง ปริมาตร 4 ลิตร ที่มีระยะเวลาเก็บกักน้ำเสีย 12 ชั่วโมง และมีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 ทุกวัน นอกจากนี้ น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดในระบบบำบัด ไม่มีความเป็นพิษต่อเมล็ดพันธุ์พืชถั่วเขียว หัวไชเท้า และแตงกวา