บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

1. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าทั้งเชื้อ *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ โดยเชื้อ *B. subtilis* TP8 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงกว่า *P. fluorescens* G7

2. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียทั้งสองในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันเชื้อ *P. fluorescens* G7 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ ได้ดีกว่า *B. subtilis* TP8 และการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยวิธี คอลัมน์ทราย มีประสิทธิภาพสูงกว่า วิธีการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีเติมเชื้อแขวนลอยในน้ำ

3. การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เวลา 72-120 ชั่วโมง พบปริมาณเชื้อ *B. subtilis* TP8 หลุดจากวัสดุตัวกลาง ปนอยู่ในสารละลายเชื้อแขวนลอย สูงกว่าปริมาณเชื้อ *P. fluorescens* G7 และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเกาะติดของไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทดสอบกับพื้นผิววัสดุตัวกลาง เมื่อแยกแบคทีเรียออกจากพื้นผิว พบว่าเชื้อ *P. fluorescens* G7 มีประสิทธิภาพเกาะติดบนวัสดุตัวกลางได้ดีกว่า *B. subtilis* TP8

4. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลาย ไขมันและน้ำมันในน้ำเสียครัวเรือน พบว่าเชื้อ *P. fluorescens* G7 มีประสิทธิภาพในการลดค่า BOD และ FOG ของน้ำเสีย ได้ดีกว่า เชื้อผสม และ *B. subtilis* TP8 ตามลำดับ จากการทดลองเป็นเวลา 5 วัน อัตราการไหลเวียนของน้ำ 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ในระบบ คอลัมน์ทราย มีผลต่อประสิทธิภาพในการลดค่า BOD และ FOG ได้สูงสุด ในเชื้อทั้งสามกลุ่ม

อภิปรายผล

ในปัจจุบันน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันเป็นปัญหาสำคัญสำหรับน้ำเสียที่ถูกทิ้งมาจากครัวเรือนหรือโรงอาหาร ถึงแม้ว่าจะมีการใช้บ่อดักไขมันก่อนที่จะปล่อยน้ำเสียนั้นออกสู่สิ่งแวดล้อม แต่ก็ยังคงเหลือไขมันบางส่วนที่ปนมากับน้ำที่ปล่อยออกมา ซึ่งไม่ถูกย่อยสลายให้หมดไป โดยการย่อยสลายไขมันนั้นต้องอาศัยเอนไซม์ไลเปสเพื่อไปย่อยสลายไขมันหรือ Triglyceral ให้ได้เป็น Glyceral และ Fatty acid ออกมา โดยการศึกษาครั้งนี้จะใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์

คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* TP8 และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *P. fluorescens* G7 โดยเชื้อ *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 เคยมีรายงานก่อนนี้ถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ (Sharma, et al., 2001) นอกจากนั้นแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย การสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียจะศึกษาโดยวิธี การทดสอบ Tributyrin agar และ Chromogenic plate เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 ผลปรากฏว่าทั้ง 2 เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ จากการทดสอบ Tributyrin agar เกิดรอยใสรอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเชื้อผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อย Tributyrin ที่เป็นสับสเตรทเพื่อนำไปสังเคราะห์เป็นพลังงานและองค์ประกอบของเซลล์ (Chappe, et al., 1994) นอกจากนั้นเชื้อยังมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยสลาย Tributyrin และปล่อย fatty acid ออกมาทำให้ pH ลดลง มีสภาพเป็นกรด จึงทำให้สีของอาหาร chromogenic plate เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง (Singh, R., et al., 2006)

จากนั้นทำการวิเคราะห์ lipase activity เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ปล่อยออกมาข้างนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ซึ่ง *B. subtilis* TP8 มีค่า lipase activity สูงสุด (0.0319±0.0005) ที่ 72 ชั่วโมง และที่ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า lipase activity ของเชื้อนั้นลดลงที่ 96 ชั่วโมง จาก 0.0319±0.0005 เป็น 0.0269±0.0002 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Ertugrul, et al. ในปี ค.ศ.2007 ที่ค่า Extracellular lipase activity ของเชื้อ *Bacillus sp.* มีค่าสูงสุดที่ 40 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงที่ 64 ชั่วโมง จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของ Peptone, Yeast extract และ 0.5%(v/v) Tributyrin แต่ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TP8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral Salt Medium (MSM) ผสมกับ 2%(v/v) Tributyrin ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของ Tributyrin อาจมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสและ lipase activity ด้วย สำหรับเชื้อ *P. fluorescens* G7 นั้นมีค่า lipase activity สูงสุดที่ 96 ชั่วโมง และมีแนวโน้มที่จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น

สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* TP8, *P. fluorescens* G7 เชื้อผสมที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสได้ ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน โดยแบคทีเรียทดสอบแขวนลอยในน้ำเสียสังเคราะห์พบว่า ชั่วโมงที่ 96 เชื้อ *P. fluorescens* G7 สามารถลดปริมาณ FOG เริ่มต้นจาก 8,810 มิลลิกรัมต่อลิตรเหลือเพียง 912 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้สูงสุดถึง 89.65% รองลงมาคือ เชื้อผสม และเชื้อ *B. subtilis* TP8 โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันถึง 86.88 %

และ 86.50 % ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งเชื้อ *P. fluorescens* G7 เชื้อผสม และเชื้อ *B. subtilis* TP8 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากคุณสมบัติที่สำคัญของทั้ง 2 เชื้อนี้สามารถสร้างไบโอฟิลม์ได้ จึงมีความน่าสนใจในการประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียทดสอบนี้ตรึงกับพื้นผิววัสดุตัวกลาง เพื่อใช้ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ ผลปรากฏว่าเชื้อ *P. fluorescens* G7 สามารถลดปริมาณ FOG เริ่มต้นจาก 8,810 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 387 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้สูงสุดถึง 95.61 % รองลงมาคือเชื้อผสม และเชื้อ *B. subtilis* TP8 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันถึง 94.61 % และ 94.24 % ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้นนี้จึงชี้ให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้แบคทีเรียทดสอบตรึงบนผิววัสดุตัวกลางมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน และน้ำมันได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ El-Masry, et al. ในปี ค.ศ.2004 โดยใช้เชื้อทดสอบคือ *Pseudomonas* sp. และ *P. diminuta* ร่วมกับระบบ biofilm filter system ในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันพืช พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย FOG ได้ 100 % และยังทำให้ค่า BOD_5 และ COD ลดลงถึง 95.6 % และ 96 % ตามลำดับ จึงชี้ให้เห็นว่าวิธีนี้เหมาะสมกับการใช้ย่อยสลายไขมันและน้ำมัน โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วัสดุตัวกลางคือ เม็ดทราย เพื่อให้แบคทีเรียทดสอบใช้ในการเกาะติด พบว่า เชื้อ *P. fluorescens* G7 มีการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีกว่า *B. subtilis* TP8 ทำให้สามารถเกาะติดกับพื้นผิววัสดุตัวกลางได้ดีกว่าในระบบคอลัมน์ทราย จึงส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อ *P. fluorescens* G7 ให้มีการย่อยสลายไขมันได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งการสร้างไบโอฟิล์มของทั้ง 2 เชื้อ มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Constantin ในปี ค.ศ.2010 ที่ผลการศึกษาพบว่าการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. fluorescens* มีแนวโน้มมากกว่า *B. subtilis* เมื่อใช้เวลาในการสร้างไบโอฟิล์มนาน 9 วัน สำหรับประสิทธิภาพการเกาะติดของไบโอฟิล์มกับพื้นผิววัสดุตัวกลางนั้นพบว่าไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. fluorescens* G7 มีประสิทธิภาพการเกาะติดที่ดีที่สุด เนื่องจากว่าการที่เชื้อจะหลุดออกจากวัสดุตัวกลางได้ดีนั้นอยู่ในขั้นตอนของการ Vortex ซึ่งการ Vortex เป็นขั้นตอนที่พื้นผิวของวัสดุตัวกลางมีการเสียดสีกันมากที่สุด แสดงว่าเชื้อที่จะหลุดออกมาในขั้นตอนนี้ได้ต้องมีการเกาะติดได้แน่นกับวัสดุตัวกลางเมื่อเปรียบเทียบกับขั้นตอน Shaker และ การ Centrifuge ที่มีปริมาณเชื้อหลุดออกมาน้อยกว่า

จากการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียทดสอบยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุตัวกลางทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียทดสอบแขวนลอย โดยเปอร์เซ็นต์ Removal efficiency ของทั้ง 2 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ และเชื้อผสมให้ผลเท่ากับ 94.24-95.61 และ 86.50-89.65 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีแบคทีเรียทดสอบยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุตัวกลาง นำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียครัวเรือน

ผลปรากฏว่าเชื้อ *P. fluorescens* G7 มีประสิทธิภาพในการลดค่า BOD และ FOG ของน้ำเสียได้ดีกว่า เชื้อผสม และ *B. subtilis* TP8 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาช่วงต้นในการทดสอบการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ เนื่องจากว่าเชื้อ *P. fluorescens* G7 มีค่า Extracellular lipase activity มีแนวโน้มที่สูงกว่า *B. subtilis* TP8 และมีประสิทธิภาพการสร้างและการเกาะติดบนผิววัสดุตัวกลางได้ดีกว่า *B. subtilis* TP8 อีกด้วย จึงทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดียิ่งขึ้น สำหรับ เชื้อผสม นั้นมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันน้อยกว่า *P. fluorescens* G7 อาจเนื่องมาจากว่าการเลี้ยงเชื้อร่วมกันของ *P. fluorescens* G7 และ *B. subtilis* TP8 นั้น เชื้อ *P. fluorescens* G7 มีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Glycolipid คือ Rhamnolipid ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญทั้งเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวกและแกรมลบ คือ *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ (Sarin, et al., 2011) จึงมีความเป็นไปได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สร้างจาก *P. fluorescens* G7 นี้ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* TP8 ได้ด้วย ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Abouseoud, et al. ในปี ค.ศ.2008 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สร้างจากเชื้อ *P. fluorescens* Migula 1895-DZMZ มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ได้ นอกจากนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีส่วนสำคัญในการช่วยทำให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแอมฟิฟาติก (amphipathic) โดยมีขั้วทั้งสองข้างที่ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งคุณสมบัติของสารเหล่านี้มีผลมาจากการรวมตัวกันของสารมีขั้วและไม่มีขั้วไว้ในโมเลกุลเดียวกัน (Cooper, et al., 1980; Desai and Banat, 1997) ทำให้ไขมันและน้ำมันแตกตัวเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปทำปฏิกริยาย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้เป็นอย่างดี

สำหรับอัตราการไหลในระบบ Sand Biofilm Colunms ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการลดค่า BOD และ FOG ได้สูงสุดคืออัตราการไหลที่ 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ชี้ให้เห็นว่าอัตราการไหลยิ่งสูงก็จะยิ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการลดค่า BOD และ FOG ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ El-Masry, et al. ในปี ค.ศ.2004 ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลถึง 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จะช่วยลดเวลาในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน อีกทั้งมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันยังสูงถึง 100 % อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะในการนำไปใช้ประโยชน์

1.1 การนำเชื้อแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียครัวเรือน พิจารณาเลือกใช้ *P. fluorescens* G7 เนื่องจากมีคุณสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปส รวมไปถึงมีประสิทธิภาพในการบำบัดไขมันและน้ำมันสูงสุด

1.2 ควรนำข้อมูลการศึกษาไปประยุกต์ใช้กับน้ำเสียครัวเรือน โดยใช้ระบบบำบัดการเจริญแบบเกาะติด

1.3 อัตราการไหลมีผลต่อการบำบัดน้ำมันและไขมัน เนื่องจากเป็นการเพิ่มออกซิเจนภายในระบบบำบัด ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเชื้อภายในระบบ ดังนั้นจึงควรมีการกำหนดอัตราการไหลที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดไขมันและน้ำมัน

2. ข้อเสนอแนะในการศึกษาต่อไป

2.1 ทำการศึกษาต่อในเรื่องของสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของระบบบำบัด รวมไปถึงวัสดุตัวกลางชนิดอื่น เพื่อนำเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของไขมันและน้ำมัน

2.2 ทำการศึกษาในรูปแบบของการบำบัดแบบต่อเนื่อง เพื่อนำเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปส ไปประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียขนาดใหญ่