บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กฤษฎา บุญชัย. (2552). **การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้บำบัดดินที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมและสังกะสี**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

กรมควบคุมมลพิษ. (2538). **คู่มือเล่มที่ 3 แนวทางควบคุมปัญหาน้ำเสีย สำหรับองค์การบริหารท้องถิ่น**. กรุงเทพฯ: เรือนแก้วการพิมพ์.

กรมควบคุมมลพิษ. (2546). **คู่มือแนวทางการจัดการกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย โครงการจัดทำหลักเกณฑ์และแนวทางการจัดการกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย**. กรุงเทพฯ: ทีคิวพี.

กรมควบคุมมลพิษ. (2553). **คู่มือวิธีปฏิบัติสำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งกำเนิดมลพิษ**. กรุงเทพ: ทีคิวพี.

จิรสา กรงกรด. (2548). **สารลดแรงตึงผิว โครงการเคมี กรมวิทยาศาตร์บริการ**. สืบค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2553, จาก http://www.dss.go.th/dssweb/starticles/files/cp72548_surfactant.pdf

จิราภรณ์ ธนียวัน. (2544). **การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตสารไบโอเซอแฟคแตนท์**. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิสัณห์ การสุทธิ์. (2544). **สารลดแรงตึงผิว กองการศึกษาเคมีปฏิบัติ กรมวิชาการเกษตร**. สืบค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2553, จาก http://www.it.dss.go.th/Knowledge/docs/spacestation.html.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และมั่นรักษ์ ตัณฑุลเวศม์. (2551). **คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. (2536). ข้อพิจารณาเกี่ยวกับปริมาณและลักษณะน้ำทิ้งชุมชนในประเทศไทย. ใน **เอกสารประกอบการประชุม สวสท** 36. ม.ป.ท.: ม.ป.พ.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2548). **จุลชีววิทยาของน้ำเสีย**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย.

อรทัย (2545). **คู่มือวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย**. กรุงเทพฯ: จุดทอง.

Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. and Nabi, A., (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, 223, 51-143.

Anguita, J., Rodriguez-Aparicio, L.B. and Naharro, G. (1993). Purification, gene cloning, amino acid sequencing analysis and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. **Appl. Environ. Microbiol**, 59, 2411-2417.

Aoyama, S., Yoshida, N. and Inouya, S. (1988). Cloning, sequencing and expression of lipase gene from *Pseudomonas fragi* IFD-12049 in *Escherichia coli*. **FEBS Lett**, 242, 36-40.

Arnold, R.G., Shahani, R.M. and Dwivedi, B.K. (1975). Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. **J. Dairy Sci**, 58, 1127-1 142.

Benincasa, M. and Contiero, J. (2001). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carton source. **Food Engineering**, 54, 283-288.

Bonilla, M., Olivaro, C., Corona, M., Vazquez, A. and Soubes, M. (2005). Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. **J Appl Microbiol**, 98, 456-463.

Brune, A.K. and Gotz, F. (1992). Degradation of lipids by bacterial lipases. In Winkelman, G. (Ed.), **Microbial degradation of natural products** (pp.243–266). VCH: Weinheim.

Campere, A.K., Hayes, J.T., Sturman, P.J., Jones, W.L. and Cunninghan, A.B. (1993). Effect of motility and absorption rate coefficient on transport of bacteria through saturated porous media. **Appli Environ Microbiol**, 59, 3455-3462.

Carrillo, C., Teruel, J.A., Aranda, F.J. and Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochim. Biophys. Acta**, 1611, 91–97.

Chappe, P., Mourey, A. and Kibertus, G. (1994). Variatation of lipolitec activity in the genus *Acinetobacter* sp. **J. Gen. Appl. Microbiol**, 4, 103-114.

Chartrain, M., Katz, L., Marcin, C., Thien, M., Smith, S., Fisher, E., et al. (1993). Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB5001. **Enzyme. Microb. Technol**, 15, 575-580.

Cirigliano, M.C. and Carman, G.M. (1984). Isolation of bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Appl. Environ. Microbiol**, 48, 747-750.

Cirigliano, M.C. and Carman, G.M. (1985). Purification and characterization of liposan, and bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Appl. Environ. Microbiol**, 51, 846-850.

Clint, J.H. (1992). **Surfactant Aggregation**. New York: Chapman and Hall.

Constantin, O.E. (2010). Air-Liquid interface biofilms of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, 16(3), 317-320.

Cooper, D.G. and Paddock, D.A. (1983). Sorface active agents from bacillus species. **Appl. Environ. Microbiol**, 46, 1426-1429.

Cooper, D.G., Zajic, J.E., Gerson, D.E. and Manninen, K.I. (1980). Isolation and identification of biosurfactant produced during anaerobic growth of *Clostridium pasteurianum*. **Journ. Ferment. Technol**, 58, 83-86.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat. Rev. Drug Discov**, 2, 114-122.

Desai, J.D. and Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactant and their commercial potential. Microbial. **Mol. Biol. Rev**, 61(1), 47-64.

Deziel, J.D., Lepine, F., Milot, S. and Villemur, R. (2000). Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. **Biochem. Biophys. Acta**, 1485, 145-152.

El-Masry, M.H., El-Bestawy, E. and El-Adl, N.I. (2004). Bioremediation of vegetable oil and grease from polluted wastewater using a sand biofilm system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20, 551–557.

Ertugrul, S., Donmez, G. and Takac, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **J. Hazard. Mater**, 149, 720-724.

Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. **TIBTECH**, 10, 208-217.

Francoise, B. and Georges, M. (1992). Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*: Evidence for amino acid activating enzymes. **J. Microbiol. Biotechnol**, 14, 1013-1018.

Gunnlaugsdottir, H. and Sivik, B. (1995). Lipase-catalyzed alcholysis of cod liver oil in supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc**, 72, 399-405.

Gupta R, N. P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 64, 763-781.

Haba, E., Bresco, O., Ferrer, C., Marques, A., Busquetsb, M. and Manresalsolation, A. (2000). Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme Microb Technol**, 26, 40-44.

Hommel, R.K., Weber, L., Weiss, A., Himmelreich, U., Rilke, O. and Kleber, H.P. (1994). Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. **J. Biotechnol**, 33, 147-155.

Horowitz, S., Gilbert, J.N. and Giffin, W.M. (1990). Isolation and characterization of surfactant produced by *Bacillus lichenformis* 86. **J. Ind. Microbiol**, 6, 243-248.

Hou, C.T. (1994). pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection. **J. Industr. Microbiol**, 13, 242-248.

Iwai, M., Okumura, S. and Tsujisaka, Y. (1975). The comparison of the properties of two lipases from *Penicillium cyclopium*. **Westring. Agric Biol Chem**, 39, 1063-1070.

Jaeger, K-E., Dijkstra, B.W. and Reetz, M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annu Rev Microbiol**, 53, 315–351.

Kappeli, O. and Finnerty, W.R. (1979). Partition of alkane by and extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinrtobactor*. **J. Bacteriol**, 140, 707-712.

Kar, M., Ray, L. and Chattopadhyay, P. (1996). Isolation and identification of alkaline thermostable lipase producing microorganism and some properties of crude enzyme. **Ind J Exp Biol**, 34, 535–538.

Kim, H.S., Yoon, B.D., Choung, D.H., Oh, H.M., Katsuragi, T. and Tani, Y. (1999). Charaterization of biosurfactant, mannosyleryth lipid produced from *Candida* sp. SY16. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 52, 713-721.

Kim, H.S., Yoon, B.D., Lee, C.H., Suh, H.H., Oh, H.M., Katsuragi, T. and Tani, Y. (1997). Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **J. Ferment. Bioeng**, 84, 41-46.

Kretschmer, A., Bock, H. and Wagner, F. (1982). Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grow on n-alkane. **Appl. Environ. Microbiol**, 44, 864-870.

Lang, S. (2002). Biological amphiphilies (microbial biosurfactants). **Curr. Opin. Colliod. Interface. Science**, 7, 12-20.

Lanne, C. and Tramper, J. (1990). Tailoring the medium and reactor for biocatalysis. **Chemtech**, 5, 502-506.

Lee, D.W., Koh, Y.S., Kim, K.J., Kim, B.C., Choi, H.J. and Kim, D.S. (1999). Isolation and characterization of a thermophillic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiol Lett**, 179, 393-400.

Lemke, M.J., Ghurchill, P.F. and Wetzel, R.G. (1995). Effect of substreate and cell surface hydrophobicity on phosphate utilization in bacteria. **Appl Environ Microbiol**, 61(3), 913-919.

Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C. (1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **Eur J Biochem**, 216, 155-160.

Lindsay, D. and Von Holy, A. (1997). Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiology**, 14(4), 383-396.

Lin, S.C., Lin, K.G., Lo, C.C. and Lin, Y.M. (1998). Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. **Enzyme. Microbial Technol**, 23, 267–273.

Li, Z.Y., Lang, S., Wanger, F., Witte, I. and Wray, V. (1984). Formation and identification of interfacial-active glycolipids from resting microbial cells of *Arthrobacter* sp. and potential use in tertiary oil recovery. **Appl. Environ. Microbiol. Biotechnol**, 41, 281-285.

Lotrakul, P. and Dharmsthiti, S. (1997). Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. **World J. Microbiol**, 13, 163-166.

Macrae, A.R. (1983). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. **J. Am. Oil Chem. Soc**, 60(2), 243-246.

Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G. and Amundaon, C.H. (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme Microb. Technol**, 14, 426-446.

Martinez Checa, F., Toledo, F., Vilchez, R., Quesada, E. and Calvo, C. (2002). Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 58, 358-363.

McInerney, M.J., Javaheri, M. and Nagle, D.P. (1990). Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus lidheniformis* strain JF-2. **J. Ind. Microbiol**, 5, 95-102.

Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S. and Ron, E. (1995). Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Appl Environ Microbiol**, 61, 3240-3244.

Okamura, S. (1981). The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase. **Agric. Biol. Chem**, 45, 185–189.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, U.T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol Appl Biochem**, 29, 119–131.

Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnolog**, 13, 249-252.

Sarin, S., Khamsri, B. and Sarin, C. (2011). Isolation of biosurfactant-producing bacteria with antimicrobial activity against bacterial pathogens. **EnvironmentAsia**, 4(1), 1-5.

Shahani, K.M. (1975). **Lipase and esterase: enzymes in food processing** (2nd ed.). New York: Academic.

Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and application of lipases. **Biotechnol. Adv**, 19, 627–662.

Singh, R., Gupta, N., Goswami, V.K. and Gupta, R. (2006). A sample activity staining protocol for lipases and esterases. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 70, 679-682.

Simons, JWFA., Adams, H., Cox, R.C., Dekker, N., Gotz, F., Slotboom, A.J. and Verheij, H.M.(1996). The lipase from *Staphylococcus aureus*: expression in *Escherichia coli*, large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase. **Eur J Biochem**, 242, 760–769.

Sonnet, P.E., Foglia, T.A. and Baillargeon, M.A. (1993). Fatty acid selectivity of lipases of *Geotrichum candidum*. **J Am Oil Chem Soc**, 70, 1043-1045.

Sugihara, A., Tani, T. and Tominaga, Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. **J. Biochem**, 109, 211-216.

Toida, J., Arikawa, Y., Kondou, K., Fukuzawa, M. and Sekiguchi, J. (1998). Purification and characterization of triacyglyceral lipase from *Aspergillus oryzae*. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, 62, 759-763.

Uchida, Y., Tsuchiya, R., Chino, M., Hirano, J. and Tabuchi, T. (1989). Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of Rhodococcus erythropolis grown on n-alkanes. **Agric Biol Chem**, 53, 757–763.

Villeneuve, P. and Thomas, A.F. (1997). Lipase specificities: potential application in lipid bioconvensions. **Inform**, 8, 640-650.

Virto, M.D., Lascaray, J.M., Solozabal, R. and Renobales, M.D. (1991). Enzymatic hydrolysis of animal fat in organic solvents at temperatures below their melting points. **J. Am. Oil Chem. Soc**, 68, 324-327.

Watnick, P. and Kolter, R. (2000). Biofilm: city of microbes. **J. Bacteriol**, 182, 2675-2679.

Yamane, T. (1987). Enzyme technology for the lipids industry: an engineering overview. **J. Am. Oil Chem. Soc**, 64(2), 1657-1661.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน pNPP (p-Nitrophenyl palmitate)

เตรียมสารละลาย A

ทำการละลาย pNPP 30 มิลลิกรัม ใน isopropanal 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย B

ละลาย Triton X-100 0.4 มิลลิลิตร ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer pH 8.0 90 มิลลิลิตร ผสมกับ Gum Arabic 0.1 กรัม

ผสมสารละลาย A 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย B 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิดฝาให้สนิท นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. การเตรียมสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer pH 8.0

เตรียมโดยละลาย Tris 0.788 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized water) 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH ผสมให้เข้ากันแล้วปิดฝาให้สนิท

3. การเตรียม Phosphate buffer pH 7.2

เตรียมโดยทำการชั่ง PBS 4.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized water) 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 7.2 ด้วย NaOH ผสมให้เข้ากันแล้วปิดฝาให้สนิท นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. การเตรียมสารละลาย 0.85%NaCl

เตรียมโดยทำการชั่ง NaCl 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized water) 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิดฝาให้สนิท นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. การเตรียมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต

เตรียมโดยทำการชั่ง $MnSO_4.4H_2O$ 480 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิดฝาให้สนิท

6. การเตรียมสารละลายอัลคาไลน์-ไดโอไดด์-เอไซด์

ทำการละลาย NaN_3 10 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร แล้วละลาย NaOH 500 กรัม และ NaI 135 กรัม ในน้ำกลั่น คนจนละลายหมด ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

7. การเตรียมสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.0250 N

ทำการละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 6.205 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเติม NaOH 0.4 กรัม ผสมสารทั้ง 2 เข้าด้วยกันปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปหาความเข้มข้นที่แน่นอนกับสารละลายไบโอไอเดต

8. การเตรียมสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไบไอโอเดต

ทำการละลาย $KH(IO_3)_2$ 812.4 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

9. น้ำแป้ง

ทำการละลายแป้งมัน 2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมกรดซาลิกไซลิก 0.2 กรัม เพื่อกันบูด

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Mineral salt medium (MSM) (Bodour, Drees and Maier, 2003)

ประกอบด้วยสารละลาย A ปริมาตร 1 ลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย A ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

$NaNO_3$	2.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.4	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
KCl	1.0	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.05	กรัม
Phosphoric acid (85%)	10	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วย KOH

เตรียมสารละลาย B ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

$FeSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	1.5	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	1.5	กรัม
Boric acid	0.3	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.15	กรัม
$NaMoO_4.2H_2O$	0.1	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

นำสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย A ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วบรรจุลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Tributyrin agar medium (Chappe, et al., 1994)

ส่วนประกอบ

Peptone	1.5	กรัม
Yeas extract	0.9	กรัม
Tributyrin	3	กรัม
Agar	4.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งส่วนประกอบแต่ละชนิดใส่ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลาย ปรับ pH ให้เป็น 7.0 แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3. chromogenic plate (Singh, R., et al., 2006)

ส่วนประกอบ

Phenol red	0.03	กรัม
Tributyrin	3	มิลลิลิตร
$CaCl_2$	0.432	กรัม
Agar	6	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ชั่งส่วนประกอบแต่ละชนิดใส่ลงในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลาย ปรับ pH ให้เป็น 7.3-7.4 แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. Nutrient agar (Merck)

ส่วนประกอบ

Meat extract	3.0	กรัม
Peptone from meat	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่สัดส่วน 20 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร คนจนละลายหมด ปรับ pH ให้เป็น 6.8±2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

5. Nutrient broth (Merck)

ส่วนประกอบ

Meat extract	3.0	กรัม
Peptone from meat	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ที่สัดส่วน 8 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร คนจนละลายหมด ปรับ pH ให้เป็น 6.8±2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค ผลงานตีพิมพ์

Journal of Community Development Research 2011; 4(2)

การศึกษาการใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

อลงกฎ แซมสีม่วง[a*] ศิริพรรณ สารินทร์[b] และ จรูญ สารินทร์[a]

Study of biosurfactant and lipase producing bacteria for degradation fat oil and grease

Alongkot Samsrimuang[a*], Siripun Sarin[b] and Charoon Sarin[a]

[a]ภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

[b]ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

[a]Department of Natural Resources and Environment, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok Province.

[b]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok Province.

*Corresponding Author. E-mail address: oalongkoto@hotmail.com

บทคัดย่อ

Bacillus subtilis TP8 และ *Pseudomonas fluorescens* G7 เป็นแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้จะสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันจากพืชหรือสัตว์ได้ด้วย ดังนั้น การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี Tributyrin agar medium และ Chromogenic plates พบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ เมื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (lipase activity) ที่เวลา 48-96 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 มีค่า lipase activity เท่ากับ 0.0168-0.0319 และ 0.0155-0.0230 U/ml ตามลำดับ สำหรับประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันโดยการวิเคราะห์ไขมันและน้ำมันที่เหลือหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปส และ removal efficiency percentages (RE %) โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* TP8, *P. fluorescens* G7 และแบคทีเรียผสมทั้งสองชนิด นั้น พบว่า *P. fluorescens* G7 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดีที่สุดที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีค่า RE % เท่ากับ 89.65 รองลงมาคือ แบคทีเรียผสมทั้งสองชนิด และ *B. subtilis* TP8 ที่มีค่า RE % เท่ากับ 86.88 และ 86.50 ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า *P. fluorescens* G7 ที่มีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเชื้อ *B. subtilis* TP8 ซึ่งจะช่วยให้ไขมันและน้ำมันแตกตัวเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก จึงเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: *Bacillus subtilis* TP8, *Pseudomonas fluorescens* G7, สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เอนไซม์ไลเปส

Journal of Community Development Research 2011: 4(2)

Abstract

Bacillus subtilis TP8 and *Pseudomonas fluorescens* G7 are biosurfactant producing bacteria isolated from oil contaminated soil which may be possible to produce of lipase. In this study, lipase production was determined by tributyrin agar medium and chromogenic plates methods. It was found that both bacteria were positive for lipase production. Analysis of lipase activity at 48-96 hours, the results revealed that were 0.0168-0.0319 and 0.0155-0.0230 U/ml for *B. subtilis* TP8 and *P. fluorescens* G7, respectively. Efficiency of fat, oil and grease (FOG) degradation, was determined by analysis of final FOG level and removal efficiency percentages (RE %) after treatment using *B. subtilis* TP8, *P. fluorescens* G7 and mix cultures. The result found that *P. fluorescens* G7 gave the highest degradation efficiency of 89.65 % removal at 96 hours of incubation time, while the mix cultures and *B. subtilis* TP8 were 86.88 and 86.50 % of removal, respectively. Interestingly, the biosurfactant produced by *P. fluorescens* G7 giving higher emulsification activity than *B. subtilis* TP8 may be important factor to form small droplets of FOG suspended in water leading to increase efficiency of lipase for FOG degradation.

Kewords: *Bacillus subtilis* TP8, *Pseudomonas fluorescens* G7, biosurfactant, lipase

บทนำ

น้ำมันและไขมัน (Oil and Grease) เป็นสารอาหารที่มีอยู่ในธรรมชาติได้มาจากพืชหรือสัตว์ ลักษณะทั่วไปของน้ำมันและไขมันจะมีน้ำหนักเบาและลอยน้ำ น้ำมันและไขมันจะพบในน้ำเสียที่มาจากการเตรียมและการประกอบอาหารเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่พบในน้ำเสียครัวเรือน มีปริมาณร้อยละ 10 ของปริมาณสารอินทรีย์ทั้งหมดและเป็นอินทรีย์สารที่มีเสถียรภาพและย่อยสลายได้ยาก (กรมควบคุมมลพิษ, 2546) น้ำเสียจากบ้านเรือนที่มีน้ำมันและไขมันปนเปื้อนส่วนใหญ่มาจากการประกอบอาหารของบ้านเรือน มีประมาณ 500 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งจากการคาดการณ์โดยการคำนวณประสิทธิภาพของบ่อดักไขมันที่ร้อยละ 60 พบว่ามีปริมาณไขมันจากบ่อดักไขมันของบ้านเรือนเท่ากับ 0.8 และ 0.2 กิโลกรัม/วัน-ครัวเรือน ซึ่งขึ้นอยู่กับการติดตั้งและไม่ติดตั้งตะแกรงดักเศษอาหาร ตามลำดับ (กรมควบคุมมลพิษ, 2538; สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2536) ซึ่งน้ำมันและไขมันเหล่านี้ได้ก่อให้เกิดปัญหาเมื่อปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก โดยอาจปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำผิวดินโดยตรง ทำให้เกิดสภาพไม่น่าดูและขวางกั้นการซึมผ่านของออกซิเจนจากอากาศลงสู่แหล่งน้ำและขัดขวางการซึมผ่านของแสงทำให้พืชในแหล่งน้ำไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ เนื่องจากไขมันจะแผ่ปกคลุมผิวหน้าน้ำ มีผลทำให้ออกซิเจนไม่สามารถละลายสู่น้ำได้ ก่อให้เกิดภาวะขาดออกซิเจน เกิดกลิ่นเน่าเหม็น และยังทำให้ท่อระบายน้ำทิ้งอุดตัน เกิดปัญหากลิ่นเหม็นไขมันจากท่อน้ำทิ้ง ส่งผลให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสียตามมาได้

กระบวนการที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันปนเปื้อนนั้น มีทั้งทางด้านกายภาพและชีวภาพ ซึ่งพบว่าการบำบัดทางด้านกายภาพ เช่น การใช้ถังดักไขมัน การใช้ระบบเติมอากาศทำให้เกิดการลอยตัวของไขมัน โดยการบำบัดด้วยวิธีนี้เหล่านี้มีประสิทธิภาพต่ำและยังไม่เพียงพอในกรณีที่มีการแพร่กระจายของน้ำมันและไขมันในน้ำเสีย ดังนั้น การบำบัดทางชีวภาพจึงเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพที่ดีสำหรับการกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียได้ โดยน้ำมันและไขมันเหล่านั้นจะถูกย่อยสลายให้เป็นโมเลกุล

ขนาดเล็กที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันต้องเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สร้างเอนไซม์ไลเปส จะสามารถกำจัดน้ำมันและไขมันให้มีประสิทธิภาพนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะการแตกตัวของน้ำมันและไขมันในน้ำเสียด้วย ซึ่งการที่จะทำให้น้ำมันและไขมันในน้ำเสียแตกตัวอยู่ในรูปที่จะถูกย่อยสลายต่อไปได้โดยการใช้สารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพดังกล่าว ซึ่งพบว่ามีจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ดังนั้น การนำเอาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันจึงจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียได้เป็นอย่างดี

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการใช้แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน ซึ่งผลที่ได้จะเป็นข้อมูลในการพัฒนาไปสู่การจัดการสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมันต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

(1). การศึกษาการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ *Bacillus subtilis* TP8 และ *Pseudomonas fluorescens* G7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณอู่ซ่อมรถที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ที่มีความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีค่า Emulsification activity (EA_{24}) เท่ากับ 40.62±0 และ 45.31±2.2 ตามลำดับ (กฤษดา, 2552) มาทำการเขี่ยโคโลนีเชื้อลงบน Nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมของเอนไซม์ ตามข้อ 1.1, 1.2 และ 1.3

1.1 วิธี Tributyrin agar medium ซึ่งเป็นการทดสอบขั้นต้น (Chappe et al., 1994) โดยเขี่ยโคโลนีเชื้อและขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาแปลผลคือ ถ้าบริเวณรอบๆ เชื้อเกิดรอยใส (clear zone) แสดงว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยสลาย tributyrin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2 วิธี Chromogenic plates ซึ่งเป็นการทดสอบขั้นยืนยัน (Singh R. et al., 2006) โดยเขี่ยเชื้อและขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร chromogenic agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมาแปลผลคือ ถ้าสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยสลาย tributyrin และปล่อยกรดไขมัน (fatty acid) ออกมาทำให้ pH ลดลงมีสภาพเป็นกรด จึงทำให้สีของอาหารเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง

1.3 ทดสอบ lipase activity (Ertugrul S. et al., 2007) โดยทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ *B. subtilis* TP8, *P. fluorescens* G7 ในข้อ (1) จำนวน 1 ลูป ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว Mineral Salt Medium (MSM) ที่มีน้ำมันพืช 2.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48,72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นทำการเหวี่ยงแยก

เซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสข้างบนหรือส่วน supernatant ซึ่งมี extracellular enzyme ไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยการทดสอบ lipase activity จะใช้วิธีการพื้นฐานของ colorimetric estimation โดยผสมสารละลายตั้งต้นจำนวน 9 มิลลิลิตร กับ 1 มิลลิลิตร ของ extracellular enzyme แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยกำหนด 1 unit ของ enzyme activity คือ ปริมาณของเอนไซม์ ที่ทำให้มีการปล่อย *p*NP ออกมา 1 μmol ในเวลา 1 นาที

(2). การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน ด้วยวิธีการวิเคราะห์ Fat Oil and Grease (FOG) (มั่นสิน และมั่นรักษ์, 2551) โดยทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ *B. subtilis* TP8, *P. fluorescens* G7 ในข้อ (1) จำนวน 1 ลูป ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว Mineral Salt Medium (MSM) ที่มีน้ำมันพืช 2.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48,72 และ 96 ชั่วโมง แล้วทำการปรับพีเอชตัวอย่างน้ำที่จะทำการตรวจวิเคราะห์ให้น้อยกว่า 2 ด้วยกรดเกลือเข้มข้นในอัตราประมาณ 5 มิลลิลิตร ต่อน้ำตัวอย่าง 1 ลิตร จากนั้นกรองตัวอย่างน้ำผ่านบนกระดาษกรองที่มีแผ่นกรองดูดซับน้ำมันอยู่ หลังจากนั้นใช้คีมคีบกระดาษกรองนำไปใส่ในทิมเบิล ใช้สำลีชุบเฮกเซนเช็ดไขมันที่ติดถ้วยบุคเนอร์ให้หมด แล้วนำสำลีใส่ในทิมเบิลด้วย นำทิมเบิลไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใส่เม็ดแก้วให้เต็มทิมเบิล โดยชั่งน้ำหนักขวดที่ใช้สกัดซึ่งได้ทำให้แห้งและมีน้ำหนักคงที่ (อบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส) สมมุติเท่ากับ A กรัม ใส่เฮกเซนลงในขวดสกัด 200 มิลลิลิตร นำทิมเบิลใส่ในชุดซอกฮ์เลต ทำการสกัดโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายด้วยอัตรา 20 รอบต่อชั่วโมง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง กลั่นเฮกเซนจากขวดสกัดในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ออกจนแห้ง ปล่อยขวดสกัดให้เย็นในโถทำแห้ง 30 นาที แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก สมมุติเท่ากับ B กรัม นำค่าที่ได้ไปคำนวณ ดังสมการนี้

$$\text{ไขมันและน้ำมัน (มก./ลิตร)} = \frac{(B-A)\ x10^{6}}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (มล.)}}$$

โดยนำค่าที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำตัวอย่าง (EL-Masry et al., 2004) จากสูตร

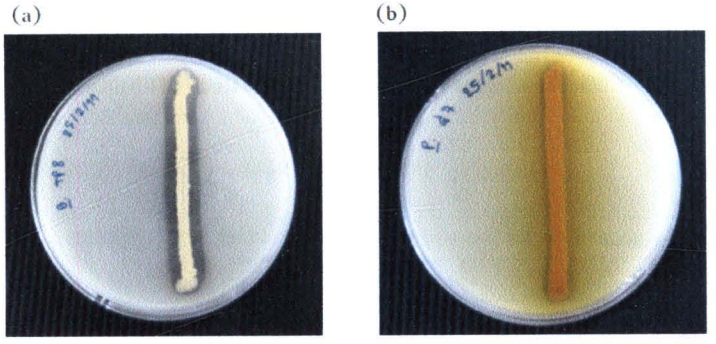
$$\%\ \text{Efficiency of Fat oil and grease removal} = \frac{\text{Initial FOG level in the raw water} - \text{Final FOG level after treatment} \times 100}{\text{Initial FOG in the raw water}}$$

Journal of Community Development Research 2011; 4(2)

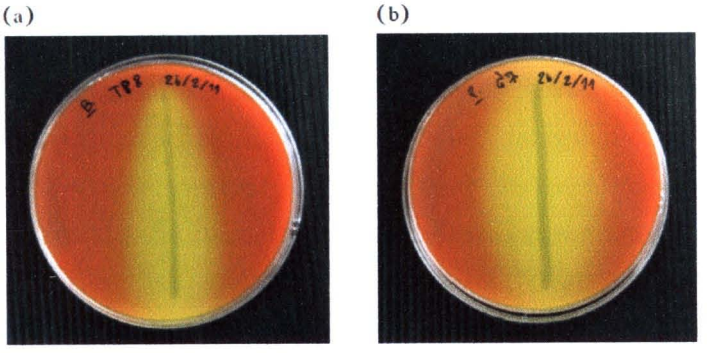
ผลการศึกษา

ผลการศึกษาการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

พบว่าแบคทีเรียทั้ง *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 ผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อย Tributyrin ที่เป็นสับสเตรทเพื่อนำไปสังเคราะห์เป็นพลังงานและองค์ประกอบของเซลล์ ทำให้เกิดรอยใส รอบโคโลนีบนอาหาร Tributyrin agar (รูปที่ 1) และยังพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยสลาย Tributyrin และปล่อย fatty acid ออกมาทำให้ pH ลดลงมีสภาพเป็นกรด จึงทำให้สีของอาหาร chromogenic agar เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง (รูปที่ 2) แสดงว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ จึงทำการวิเคราะห์หา lipase activity แล้วนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน พบว่าเชื้อ *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 ให้ค่า lipase activity เท่ากับ 0.0168-0.0319 และ 0.0155-0.0230 ตามลำดับ ในระหว่างชั่วโมงที่ 48-96 ชั่วโมง (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 แสดง clear zone บริเวณที่ขีดเชื้อ บนอาหาร Tributyrin agar โดยที่ (a) เชื้อ *B. subtilis* TP8 และ (b) เชื้อ *P. fluorescens* G7



รูปที่ 2 แสดงการเปลี่ยนสีของอาหาร chromogenic agar เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง โดยที่ (a) เชื้อ *B. subtilis* TP8 และ (b) เชื้อ *P. fluorescens* G7

Journal of Community Development Research 2011; 4(2)

ตารางที่ 1 ผลการสร้างเอนไซม์ไลเปส และ ค่า lipase activity ของแบคทีเรียทดสอบ

Isolates	Tributyrin agar	chromogenic plate	Extracellular lipase activity (U/ml)		
			48 h	72 h	96 h
B. subtilis TP8	+	+	0.0168 ± 0.0001	0.0319 ± 0.0005	0.0269 ± 0.0002
P. fluorescens G7	+	+	0.0155 ± 0.0002	0.0207 ± 0.0006	0.0230 ± 0.0020

หมายเหตุ + คือให้ผลบวกกับการทดสอบของ Tributyrin agar medium, chromogenic plate

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

จากการวิเคราะห์ FOG ที่เหลืออยู่หลังจากทำการย่อยสลายไขมันด้วยเอนไซม์ lipase จากเชื้อ *B. subtilis* TP8, *P. fluorescens* G7 และ mix culture ระหว่าง *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7พบว่า จากปริมาณ FOG เริ่มต้น 8810 mg/l ลดลงเหลือ 1189, 912 และ 1156 mg/l ในชั่วโมงที่ 96 ตามลำดับ และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน (Removal efficiency %, RE) พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลายไขมันได้สูงถึง 86.50, 89.65 และ 86.88 % ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของแบคทีเรียทดสอบ

Isolates	FOG เริ่มต้น (mg/l)	FOG ที่เหลือหลังจากย่อยสลายด้วยเอนไซม์ lipase,mg/l (removal efficiency %)		
		48 h	72 h	96 h
B. subtilis TP8	8810	6632 (24.72)	3142 (64.34)	1189 (86.50)
P. fluorescens G7	8810	2593 (70.56)	946 (89.26)	912 (89.65)
mix culture	8810	3334 (62.16)	1527 (82.67)	1156 (86.88)

อภิปรายผลการวิจัย

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของ *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 ทั้งขั้นต้นและขั้นยืนยันผล โดยวิธี Tributyrin agar medium และ Chromogenic plates แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองชนิดที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น ยังสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้อีกด้วย ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนนี้ของเชื้อ *Bacillus* sp. (Ertugrul et al., 2007) และ เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* (Kojima & Shinizu , 2003) ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสได้ด้วยเช่นกัน เมื่อนำเชื้อมาทดสอบหาค่า lipase activity พบว่าเชื้อ *B. subtilis* TP8 มีค่า lipase activity สูงกว่า *P. fluorescens* G7 ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยวิธี Tributyrin agar medium ที่ขนาด clear zone ของเชื้อ *B. subtilis* TP8 มีขนาดกว้างกว่า clear zone ของเชื้อ *P. fluorescens* G7 เมื่อเวลาผ่านไป 24-48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. subtilis* TP8 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสดีกว่าเชื้อ *P. fluorescens* G7 และเมื่อนำเชื้อทั้งสองชนิดมาทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน กลับพบว่าเชื้อ *P. fluorescens* G7 มีประสิทธิภาพในการย่อย

สลายไขมันและน้ำมันได้ดีที่สุด รองลงมาคือ mix culture และ เชื้อ *B. subtilis* TP8 ตามลำดับ โดยใช้การวิเคราะห์ไขมันและน้ำมันที่เหลือหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปส และค่า %Removal efficiency ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเชื้อ *P. fluorescens* G7 ที่มีมากกว่าเชื้อ *B. subtilis* TP8 มีส่วนสำคัญในการช่วยทำให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแอมฟิฟาติก(amphipathic) โดยมีขั้วทั้งสองข้างที่ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งคุณสมบัติของสารเหล่านี้มีผลมาจากการรวมตัวกันของสารมีขั้วและไม่มีขั้วไว้ในโมเลกุลเดียวกัน (Cooper et al., 1980; Desai & Banat, 1997) ทำให้ไขมันและน้ำมันแตกตัวเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปทำปฏิกริยาย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้เป็นอย่างดี

สรุปผลการวิจัย

เชื้อ *P. fluorescens* G7 และ *B. Subtilis* TP8 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน โดยอาศัยคุณสมบัติของสารลดแรงตึงชีวภาพร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ไลเปส จึงช่วยลดปริมาณไขมันและน้ำมันลงได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ขอขอบคุณภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่เอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา บุญชัย. (2552). *การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อใช้บำบัดดินที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมและสังกะสี.* วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

กรมควบคุมมลพิษ. (2538). *คู่มือเล่มที่ 3 แนวทางควบคุมปัญหาน้ำเสีย สำหรับองค์กรบริหารท้องถิ่น* กรุงเทพมหานคร: เรือนแก้วการพิมพ์.

กรมควบคุมมลพิษ. (2546). *คู่มือแนวทางการจัดการกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย โครงการจัดทำหลักเกณฑ์และแนวทางการจัดการกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย.*

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และมั่นรักษ์ ตัณฑุลเวศม์. (2551). *คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย (2536). *ข้อพิจารณาเกี่ยวกับปริมาณและลักษณะน้ำทิ้งชุมชนในประเทศไทย.* เอกสารประกอบการประชุม สวสท'36.

Chappe, P., Mourey, A. & Kibertus, G. (1994). Variatation of lipolitec activity in the genus Acinetobacter sp. *Journal of General & Applied Microbiology*, 4, 103-114.

Cooper, D.G., Zajic, J.E., Gerson, D.E. & Manninen, K.I. (1980). Isolation and identification of biosurfactant produced during anaerobic growth of Clostridium pasteurianum. *Journal of Fermentation Technology*, 58, 83-86.

Desai, J.D. & Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactant and their commercial potential. Microbial. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, *61*(1), 47-64.

EI-Masry, M.H., EI-Bestawy, E. & EI-Adl, N.I. (2004). Bioremediation of vegetable oil and grease from polluted wastewater using a sand biofilm system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 551-557.

Ertugrul, S., Donmez, G. & Takac, S. (2007). Isolation of lipase producing Bacillus sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149, 720-724.

Kojima, Y & Shinizu, S. (2003). Purification and characterization of the lipase from Pseudomonas fluorescens HU380. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 96, 219-226.

Singh, R., Gupta, N., Goswami, V.K. & Gupta, R. (2006). A sample activity staining protocol for lipases and esterases. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 70, 679-682.

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

น้ำมันและไขมัน (Oil and Grease)	:	สารอาหารที่มีอยู่ในธรรมชาติ ได้มาจากพืชหรือสัตว์ ลักษณะทั่วไปของน้ำมันและไขมันจะมีน้ำหนักเบาและลอยน้ำ
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)	:	สารตัวกลางที่มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างผิวของเหลวกับก๊าซ เป็นผลผลิตมาจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ
ไลเปส (lipase)	:	เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลปิด ได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล
ไบโอฟิล์ม (Biofilm)	:	โครงสร้างยึดเกาะกับพื้นผิว สร้างโดยกลุ่มของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่รวมกัน ประกอบด้วยสารต่างๆหลายชนิดทำหน้าที่เป็นชั้นปกป้องแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายใน รวมทั้งสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม

ประวัติผู้วิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – ชื่อสกุล ว่าที่ร้อยตรีอลงกฎ แซมสีม่วง

วัน เดือน ปี เกิด 1 พฤศจิกายน 2527

ที่อยู่ปัจจุบัน 16 หมู่ 8 ตำบลนางั่ว อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2550 วท.บ. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลงานตีพิมพ์

อลงกฎ แซมสีม่วง. (2011). การศึกษาการใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน. **วารสารการวิจัยเพื่อพัฒนาชุมชน**, 4(2), 18-25.