ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250003

# การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปส ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย

ว่าที่ร้อยตรีอลงกฎ แซมลีม่วง

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
พฤษภาคม 2555
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

b00254462

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250003

# การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปส ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย

ว่าที่ร้อยตรีอลงกฎ แซมสีม่วง

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
พฤษภาคม 2555
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ เรื่อง "การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย" ของ ว่าที่ร้อยตรีอลงกฎ แซมสีม่วง เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยนเรศวร

.....ประธาน
(ดร.ชาญยุทธ กฤตสุนันท์กุล)

.....กรรมการ
(ดร.จรูญ สารินทร์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพรรณ สารินทร์)

.....กรรมการ
(ดร.เชาวน์ นกอยู่)

**อนุมัติ**

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คนึงนิจ ภู่พัฒน์วิบูลย์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
10 พฤษภาคม 2555

# ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความเมตตา กรุณาและช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ดร.จรูญ สารินทร์ ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ไปด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพรรณ สารินทร์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะในระหว่างดำเนินการวิจัยจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะต่างๆ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรฯ และภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่านที่กรุณาประสาทวิชาและให้คำปรึกษาแนะนำด้วยดีเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ตลอดจนช่วยอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานด้วยดีเสมอมา

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

สุดท้ายนี้หากคุณค่าและคุณประโยชน์ใดๆ อันพึงได้รับจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณ และครูอาจารย์ผู้เคยประสาทวิชาความรู้ทุกๆ ท่าน หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

ว่าที่ร้อยตรีอลงกฎ แซมสีม่วง

| | |
|---|---|
| **ชื่อเรื่อง** | การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย |
| **ผู้วิจัย** | ว่าที่ร้อยตรีอลงกฎ แซมสีม่วง |
| **ประธานที่ปรึกษา** | ดร.จรูญ สารินทร์ |
| **กรรมการที่ปรึกษา** | รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพรรณ สารินทร์ |
| **ประเภทสารนิพนธ์** | วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2554 |
| **คำสำคัญ** | น้ำมันและไขมัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อิมัลชัน ไลเปส |

## บทคัดย่อ

250003

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาการสร้างเอนไซม์ไลเปส และกิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* TP8 และ *Pseudomonas fluorescens* G7 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน และน้ำมัน (Fat Oil and Grease (FOG)) ศึกษาการสร้างไบโอฟิล์ม และการประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายไขมัน และน้ำมันจากน้ำเสียครัวเรือนด้วยระบบบำบัดน้ำเสียแบบ คอลัมน์ทราย จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิด สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ โดยเชื้อ *B. subtilis* TP8 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.0319 ± 0.0005 U/ml และ *P. fluorescens* G7 สูงสุดที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 0.0230 ± 0.0020 U/ml เมื่อทดสอบ ประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน และน้ำมัน พบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิด สามารถลด FOG ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 96 โดยเชื้อ *P. fluorescens* G7 มีค่า Removal Efficiency (RE %) เท่ากับ 89.65 รองลงมาคือ เชื้อผสม และ *B. subtilis* TP8 มีค่าเท่ากับ 86.88 และ 86.50 ตามลำดับ สำหรับประสิทธิภาพย่อยสลายไขมัน และน้ำมันในระบบคอลัมน์ทรายแบคทีเรียทั้งสองชนิด ลด FOG ในชั่วโมงที่ 96 โดยเชื้อ *P. fluorescens* G7 มีค่า RE % เท่ากับ 95.61 รองลงมาคือ เชื้อผสม และ *B. subtilis* TP8 มีค่าเท่ากับ 94.61 และ 94.24 ตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างไบโอฟิล์ม เชื้อ *P. fluorescens* G7 สามารถเกาะติดบนวัสดุตัวกลางได้ดีกว่าเชื้อ *B. subtilis* TP8 และเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายไขมัน และน้ำมันจากน้ำเสียครัวเรือน พบว่าที่อัตราการไหลของน้ำเสีย 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เชื้อ *P. fluorescens* G7 มีประสิทธิภาพในการลดค่า BOD และ FOG (89.86%, 99.09%) ของน้ำเสีย ได้ดีกว่า เชื้อผสม (84.57%, 89.09%) และ *B. subtilis* TP8 (75.97%, 75.10%) ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน และน้ำมัน จากน้ำเสียครัวเรือนได้

| | |
|---|---|
| **Title** | APPLICATION OF BIOSURFACTANT AND LIPASE PRODUCING BACTERIA FOR DEGRADATION OF FAT OIL AND GREASE IN WASTEWATER |
| **Author** | Acting Second Lieutenant Alongkot Samsrimuang |
| **Advisor** | Charoon Sarin, Ph.D. |
| **Co - Advisor** | Associate Professor Siripan Sarin, Ph.D. |
| **Academic Paper** | Thesis M.S. in Environmental Science, Naresuan University, 2011 |
| **Keywords** | Oil and Grease, Biosurfactant, Emulsion, lipase |

## ABSTRACT

250003

The aims of this research were to study lipase production and their activity of biosurfactant producing bacteria, *B. subtilis* TP8 and *P. fluorescens* G7. Efficiency of Fat Oil and Grease (FOG) degradation, Biofilm formation and application for FOG degradation in domestic wastewater by Sand Biofilm Columns system were determined. Results showed that both bacteria were positive for lipase production. The lipase activity of *B. subtilis* TP8 and *P. fluorescens* G7 was the highest at 72 hours (00.0319 ± 0.0005 U/ml.) and 96 hours (0.0230 ± 0.0020 U/ml.) respectively. The results also indicated that *P. fluorescens* G7 was the highest degradation efficiency of 89.65 % removal at 96 hours of incubation time, while the mixed cultures and *B. subtilis* TP8 were 86.88 and 86.50 % of removal respectively. In Sand Biofilm Columns system, *P. fluorescens* G7 was degradation efficiency of 89.65 % removal at 96 hours of incubation time, while the mixed cultures and *B. subtilis* TP8 were 94.61 and 94.24 % of removal. Efficiency of biofilm formation on the sand partical of *P. fluorescens* showed higher than *B. subtilis* TP8. Application in domestic wastewater at the flow rate 100 ml/hours, *P. fluorescens* removed BOD with efficiency at 89.86% and FOG at 99.09% higher than mixed culture and *B. subtilis* was found. In conclusion, the *B. subtilis* TP8 and *P. fluorescens* G7 are biosurfactant and lipase producing bacteria which are effective to degrade FOG from domestic wastewater.

# สารบัญ


| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | **บทนำ** | 1 |
| | ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| | วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 2 |
| | ขอบเขตของการวิจัย | 2 |
| 2 | **เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** | 4 |
| | ลักษณะสมบัติของน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากบ้านเรือน | 4 |
| | ปริมาณน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากบ้านเรือน | 6 |
| | แนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากบ้านเรือน | 6 |
| | ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological process) | 7 |
| | เอนไซม์ไลเปส | 7 |
| | การจัดจำแนกเอนไซม์ไลเปส | 8 |
| | แหล่งของเอนไซม์ไลเปส | 10 |
| | แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส | 11 |
| | เมตาบอลิซึมของไลปิดในแบคทีเรีย | 11 |
| | สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactants) | 17 |
| | ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ | 17 |
| | จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ | 19 |
| | ระบบบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางชีวภาพแบบเกาะติด | 21 |
| | ไบโอฟิล์ม (Biofilm) | 22 |
| 3 | **วิธีดำเนินการวิจัย** | 25 |
| | อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย | 25 |
| | สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ | 26 |
| | เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง | 28 |
| | วิธีดำเนินการวิจัย | 28 |

# สารบัญ (ต่อ)

**บทที่** **หน้า**


**4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล** ..... 38

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ..... 38

การศึกษาประสิทธิภาพ ของแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปส ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน ด้วยวิธีการวิเคราะห์ Fat Oil and Grease (FOG) (แบบแขวนลอย) ..... 40

การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์ม ของแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปส ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันจากน้ำเสียสังเคราะห์ ในระบบคอลัมน์ทราย ด้วยวิธีการวิเคราะห์ FOG ..... 41

การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยึดติดของไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทดสอบกับพื้นผิววัสดุตัวกลาง ..... 42

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี, FOG, BOD ในน้ำเสียครัวเรือนที่นำมาทำการทดลอง ก่อนผ่านการบำบัดของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ..... 43

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันจากครัวเรือน ..... 46

**5 บทสรุป** ..... 49

สรุปผลการวิจัย ..... 49

อภิปรายผล ..... 49

ข้อเสนอแนะ ..... 53

**บรรณานุกรม** ..... 54

**ภาคผนวก** ..... 63

# สารบัญ (ต่อ)


**บทที่** **หน้า**

**อภิธานศัพท์**..... 77

**ประวัติผู้วิจัย**..... 79

# สารบัญตาราง

ตาราง หน้า


1 แสดงองค์ประกอบน้ำมันและไขมันจากบ้านเรือน..... 6

2 แสดงจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส..... 11

3 แสดงคุณลักษณะของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TP8..... 14

4 แสดงคุณลักษณะของแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* G7..... 16

5 แสดงจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ..... 20

6 แสดงผลค่า lipase activity ของแบคทีเรียทดสอบ..... 39

7 แสดงผลการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของแบคทีเรียทดสอบแบบแขวนลอย
ในน้ำเสียสังเคราะห์..... 40

8 แสดงปริมาณเชื้อที่หลุดออกมาจากไบโอฟิล์ม..... 42

9 แสดงผลการย่อยสลายไขมันและน้ำมันของแบคทีเรียทดสอบบนวัสดุตัวกลาง
ในน้ำเสียสังเคราะห์..... 43

10 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจากบ่อดักไขมัน
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ก่อนการบำบัดด้วยเชื้อแบคทีเรียทดสอบ..... 45

11 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ FOG ภายหลังผ่านการบำบัดของเชื้อแบคทีเรีย
ทดสอบที่อัตราการไหลเวียนน้ำเสียต่างๆ และประสิทธิภาพ
ในการกำจัด FOG หลังผ่านการบำบัด 5 วัน..... 47

12 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ BOD ภายหลังผ่านการบำบัดของเชื้อแบคทีเรีย
ทดสอบที่อัตราการไหลเวียนของน้ำเสียต่างๆ และประสิทธิภาพในการกำจัด
BOD หลังผ่านการบำบัด 5 วัน..... 48

# สารบัญภาพ

ภาพ หน้า


1 แสดงโครงสร้างไทรเอซิลกลีเซอรอล..... 4

2 แสดงโครงสร้างกลีเซอรอล..... 5

3 แสดงโครงสร้างกรดไขมันอิ่มตัว (ก) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (ข)..... 5

4 แสดง β-oxidation of fatty acid..... 12

5 แสดง Glycerol degradation pathway..... 13

6 แสดงการเกิดไบโอฟิล์มของแบคทีเรียบนผิวของตัวกลาง (Biofilm formation) ในระบบบำบัดโปรยกรอง..... 21

7 แสดงลักษณะไบโอฟิล์มบนตัวกลางของระบบโปรยกรอง..... 22

8 แสดงขั้นตอนการเกิดไบโอฟิล์ม..... 24

9 แสดงกราฟมาตรฐาน lipase activity ที่ความเข้มข้น pNP 0.001 – 0.1 µmol..... 30

10 แสดงลำดับขั้นตอนของงานวิจัย..... 37

11 แสดงclear zone บริเวณที่ขีดเชื้อ บนอาหาร Tributyrin agar (ก) *B. subtilis* TP8 (ข) *P. fluorescens* G7..... 38

12 แสดงการเปลี่ยนสีของอาหาร chromogenic plate จากสีชมพูเป็นสีเหลือง (ก) *B. subtilis* TP8 (ข) *P. fluorescens* G7..... 39

13 แสดงการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA plate) เป็นเวลา 5 วัน..... 41

# อักษรย่อ

| | | |
|---|---|---|
| mg/l | = | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| ml | = | มิลลิลิตร |
| µS/cm | = | ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร |
| pH | = | power of hydrogen ion concentration |
| hr | = | ชั่วโมง |
| µM | = | ไมโครโมล |
| mM | = | มิลลิโมล |
| U/ml | = | ยูนิตต่อมิลลิลิตร |
| ml/h | = | มิลลิลิตรต่อชั่วโมง |
| FOG | = | Fat Oil and Grease |
| BOD | = | Biochemical Oxygen Demand |
| DO | = | Dissolved Oxygen |
| *p*NPP | = | para-nitrophenyl palmitate |
| *p*NP | = | para-nitrophenol |
| RE | = | Removal Efficiency |
| NA | = | Nutrient Agar |
| NB | = | Nutrient Broth |
| MSM | = | Mineral Salt Medium |
| CFU | = | Colony Forming Unit |
| ppt | = | part per thousand |
| S | = | Salinity |
| EC | = | Electrical Conductivity |
| TDS | = | Total Dissolved Solids |