

การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ  
*Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน  
Phenol Degradation by Mixed Culture of *Methylobacterium* sp. NP3 and  
*Acinetobacter* sp. PK1 Immobilized on Oil Palm Residues

พนิดา โตะสู

Panida Tosu

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร

มหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Environmental Management

Prince of Songkla University

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์                      การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ  
*Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน                                      นางสาวพนิดา โต๊ะสู

สาขาวิชา                                    การจัดการสิ่งแวดล้อม

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ดร.อรมาศ สุทธินน)	.....ประธานกรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ) .....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร กันธโชติ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัฒน์ ลือพร้อมชัย)
.....	.....กรรมการ (ดร.อรมาศ สุทธินน)
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัฒน์ ลือพร้อมชัย)	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัฒน์ ลือพร้อมชัย)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน
ผู้เขียน	นางสาวพนิดา โต้ะสู
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2554

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นพัฒนาวิธีการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 เพื่อกำจัดฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว carbon free mineral medium (CFMM) และในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยเลือกใช้วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ ทะลายเปล่า (empty fruit bunch: EFB) และเส้นใยปาล์ม น้ำมัน (pericarp fiber: PF) มาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ จากผลการศึกษากการสังเคราะห์ exopolysaccharide (EPS) พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์บน EFB และ PF คือ 6 และ 8 วัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวัสดุตรึงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงบน EFB และ PF สามารถลดปริมาณฟีนอลที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวได้ใกล้เคียงกัน คือ 98% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม เซลล์ตรึงบน EFB มีอัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงกว่า เนื่องจากวัสดุมีความเป็นรูพรุนสูง เซลล์เกาะติดได้ดี ลดข้อจำกัดในการแพร่ผ่านของสาร และดูดซับฟีนอลน้อย จึงเลือกเซลล์ตรึงบน EFB มาทดสอบการกำจัดฟีนอลที่ความเข้มข้นในช่วง 10-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้นฟีนอลตั้งแต่ 30-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงสามารถกำจัดฟีนอลได้สูงกว่าเซลล์อิสระ จากผลการนำเซลล์ตรึงมากำจัดฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีฟีนอลปนเปื้อนประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล และการปรับตัวในน้ำทิ้งที่ถูกเจือจางสามารถกำจัดฟีนอลได้สูงสุด 72% ในขณะที่เซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านวิธีการดังกล่าว กำจัดฟีนอลได้เพียง 35% ภายในเวลา 7 วัน และพบว่าเซลล์ตรึงสามารถลดปริมาณ COD ความเข้มข้น 10,296 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 87 % และลดปริมาณ BOD เริ่มต้น 725 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 92% นอกจากนี้เซลล์ตรึงบน EFB สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง และเก็บไว้ได้นาน 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลเท่ากับเซลล์ตรึงที่เตรียมใหม่

**Thesis Title** Phenol Degradation by Mixed Culture of *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 Immobilized on Oil Palm Residues

**Author** Miss Panida Tosu

**Major Program** Environmental Management

**Academic Year** 2011

### ABSTRACT

This research aims to develop immobilized mixed culture of *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 on oil palm residues for phenol degradation in carbon free mineral medium (CFMM) and palm oil mill effluent (POME). The oil palm residues such as empty fruit bunch (EFB) and pericarp fiber (PF) were selected as immobilizing materials in this study. The results showed that the optimum incubation period for cell immobilization on EFB and PF were 6 and 8 days, respectively. Comparing between these two immobilized bacteria, the phenol removal efficiencies were almost similar in which bacteria immobilized on EFB and PF were able to remove 98% of 30 mg/L phenol in CFMM after 24 hr incubation. However, EFB immobilized bacteria had higher phenol degradation rate and was therefore selected for further experiment. High porous structure of EFB probably promoted the attachment of bacteria as well as reduced mass transfer limitations and phenol adsorption on supporting material. The phenol removal efficiency of EFB immobilized bacteria were examined with 10-5,000 mg/L phenol. It was found that bacteria immobilized on EFB had higher degradation ability than that of suspended cells when tested with 30-5,000 mg/L phenol. The immobilized bacteria were later tested with POME contaminated with 30 mg/L phenols. Approximately 72% of phenol in POME was removed after immobilized bacteria were activated in CFMM containing phenol and acclimated in diluted POME prior to use, whereas non-activated and non-acclimated immobilized bacteria had lower removal efficiency of 35% after 7-day incubation. The immobilized bacteria could reduce an initial COD of 10,296 mg/L by 87% and remove BOD of 725 mg/L by 92%. Moreover, the immobilized bacteria could be repeatedly used at least 10 times in both CFMM and POME, and stored at 4 °C for 4 weeks with the phenol removal efficiency comparable to the freshly prepared inoculum.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากหลายฝ่าย โดยเฉพาะดร.อรมาศ สุทธิรัตน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดองค์ความรู้ แนวคิด และทักษะต่างๆ ด้านสิ่งแวดล้อม อันเป็นผลให้วิสัยทัศน์ของผู้วิจัยกว้างไกล สามารถประยุกต์สิ่งต่างๆ ให้ผสมกลมกลืน ทั้งช่วยส่งเสริมให้คำแนะนำ ปรึกษาวิทยากรต่างๆ เพิ่มเติม ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องปัญหา และอุปสรรคต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ ห่วงใย เป็นกำลังใจตลอดมา นอกจากนี้ยังต้องขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณรองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล เลิศคณาวณิชกุลที่กรุณาเสียสละเวลามาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทุนสนับสนุนจากหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อมและขอขอบคุณบริษัท ลากทวิปาล์ม จำกัด ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างน้ำเสียเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการด้วยดีมาตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในทุกส่วนของหน่วยงานคณะกรรมการจัดการสิ่งแวดล้อมที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงานตั้งแต่เริ่มจนสำเร็จลุล่วงด้วยดีเสมอมา

ณ โอกาสนี้ ขอขอบพระคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจสนับสนุนการศึกษาในระดับปริญญาโท และการจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

พนิดา ไต้ะสุ

## คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

EFB	= empty fruit bunch
PF	= pericarp fiber
POME	= palm oil mill effluent
N	= nitrogen
P	= phosphorus
K	= potassium
Mg	= magnesium
EPS	= extracellular polymeric substance หรือ exopolysaccharide
CFMM	= carbon free mineral medium
SEM	= scanning electron microscope

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.2.1 แหล่งกำเนิดฟินอล	2
1.2.2 คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี และความเป็นพิษของฟินอล	3
1.2.3 อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม	4
1.2.4 กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของฟินอล	9
1.2.5 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟินอล	10
1.2.6 แบคทีเรียสกุล <i>Methylobacterium</i> และ <i>Acinetobacter</i>	11
1.2.7 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)	13
1.2.8 การใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลายสารมลพิษ	16
1.2.9 การย่อยสลายฟินอล โดยใช้เซลล์ตรึง	17
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	19
1.4 ขอบเขตการวิจัย	19
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	20
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ	21
2.1 สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์	21
2.1.1 สารเคมี	21
2.1.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์	22
2.2 น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	22
2.3 วิธีดำเนินการวิจัย	23

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย	24
2.5 ศึกษาการผลิต extracellular polymeric substance (EPS) ของแบคทีเรีย	25
2.6 การตรึงเซลล์แบคทีเรีย	26
2.6.1 การเตรียมวัสดุตรึงเซลล์	26
2.6.2 การตรึงเซลล์บนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	28
2.6.3 คัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์	29
2.7 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	30
2.7.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล	30
2.7.2 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล ของเซลล์ตรึงที่ความเข้มข้นต่างๆ	31
2.7.3 ศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ	32
2.8 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	32
2.8.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล	33
2.8.2 ศึกษาการกระตุ้น (Activation) และการปรับตัว (Acclimation) ของเซลล์ตรึง	33
2.8.2.1 การกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอล	33
2.8.2.2 การปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง	34
2.8.2.3 วิธีร่วมระหว่างการกระตุ้นและการปรับตัวของเซลล์ตรึง	34
2.8.3 ศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ	35
2.9 วิธีวิเคราะห์	35
2.9.1 การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	35
2.9.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค colorimetric method	36
2.9.3 วิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย	36
2.9.4 การนับจำนวนแบคทีเรีย และวิเคราะห์น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง	37
2.9.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นสีในน้ำทิ้ง	37



## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	39
3.1 การผลิต extracellular polymeric substance (EPS) ของแบคทีเรียแต่ละชนิด	39
3.2 การพัฒนาเซลล์ตรึงบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	41
3.2.1 คุณสมบัติของวัสดุตรึงเซลล์	41
3.2.2 การตรึงเซลล์แบคทีเรีย	43
3.2.3 การคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์	46
3.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM	47
3.3.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล	47
3.3.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ	50
3.3.3 การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ	53
3.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	55
3.4.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล	56
3.4.2 ผลการกระตุ้น (Activation) และการปรับตัว (Acclimation) ของเซลล์ตรึง	58
3.4.2.1 การกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอล	58
3.4.2.2 การปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง	60
3.4.2.3 ผลการกระตุ้นร่วมกับการปรับตัวของเซลล์ตรึง	61
3.4.3 การนำเซลล์ตรึงมาใช้ซ้ำเพื่อบำบัดน้ำทิ้ง	63
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	64
4.1 สรุปผลการทดลอง	64
4.1.1 การผลิต EPS ของแบคทีเรีย	64
4.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียตรึง ในอาหารเหลว	64

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียครึ่ง ในน้ำที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	65
4.2 ข้อเสนอแนะ	66
บรรณานุกรม	67
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	78
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์	80
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของเซลล์ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	82
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 ตรึงบน EFB	85
ภาคผนวก จ การคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์บนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	88
ภาคผนวก ฉ การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล ของเซลล์ตรึงบน EFB ในอาหารเหลว	91
ภาคผนวก ช การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล ของเซลล์ตรึงบน EFB ในน้ำที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	98
ประวัติผู้เขียน	102

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ความเข้มข้นของฟีนอลในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ	3
1.2	คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของฟีนอล	4
1.3	คุณลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	7
1.4	ปริมาณสารอาหารโดยเฉลี่ยในวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	8
1.5	จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล	11
1.6	การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล <i>Methylobacterium</i>	12
1.7	การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล <i>Acinetobacter</i>	13
2.1	วิธีวิเคราะห์คุณลักษณะของวัสดุ	27
2.2	การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	36
3.1	คุณสมบัติของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นวัสดุตั้งเซลล์	43
3.2	ประสิทธิภาพการตรึงเซลล์บน EFB และ PF ที่ระยะเวลาการตรึงเซลล์ 6 และ 8 วัน	45
3.3	อัตราการย่อยสลายจำเพาะของฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ	53
3.4	องค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อน และหลังการบำบัดด้วยเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล	59
3.5	ปริมาณฟีนอลที่ลดลง (%) โดยใช้เซลล์ตรึงด้วยวิธีต่างๆ	61
ค.1	การผลิต exopolysaccharide ของเซลล์ตรึงเชื่อมสมระหว่าง <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 บน EFB	83
ค.2	ปริมาณการลดลงของสี alcian blue ของชุดควบคุม EFB ปราศจากเซลล์	83
ค.3	การผลิต exopolysaccharide ของเซลล์ตรึงเชื่อมสมระหว่าง <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 บน PF	84
ค.4	ปริมาณการลดลงของสี alcian blue ของชุดควบคุม PF ปราศจากเซลล์	84
ง.1	การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 ตรึงบน EFB	86
ง.2	การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 ตรึงบน EFB	87

## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
จ.1	ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	89
จ.2	ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน PF ที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	89
จ.3	ชุดควบคุมกระบวนการทางกายภาพและเคมีต่อการลดลงของฟีนอลของ EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	90
จ.4	ชุดควบคุมกระบวนการทางกายภาพและเคมีต่อการลดลงของฟีนอลของ PF ที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	90
ฉ.1	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	92
ฉ.2	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร	92
ฉ.3	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	93
ฉ.4	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 50 มิลลิกรัมต่อลิตร	93
ฉ.5	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	94
ฉ.6	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร	94
ฉ.7	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	95
ฉ.8	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการย่อยสลายของเซลล์ตรึงที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลแล้ว	96

## รายการตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
จ.8 (ต่อ)	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการย่อยสลายของเซลล์ตรึงที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลแล้ว	97
ช. 1	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	99
ช.2	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการ Activation และ Acclimation เซลล์ตรึง	99
ช.3	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการย่อยสลายของเซลล์ตรึงที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลแล้ว	100
ช.3 (ต่อ)	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการย่อยสลายของเซลล์ตรึงที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลแล้ว	101

## รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	6
1.2	ต้นปาล์มน้ำมัน (1) ผลปาล์มและเมล็ดปาล์มน้ำมันสำหรับการสกัดน้ำมัน (2) และวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน; ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (3) เส้นใยปาล์มน้ำมัน (4)	8
1.3	วิถีการย่อยสลายฟีนอล (a) วิถีออโท (Ortho-Pathway) (b) วิถีเมทา (Meta-Pathway)	10
1.4	วิธีการตรึงเซลล์	15
2.1	ภาพรวมของการดำเนินวิจัย	23
2.2	ลักษณะป้อนบำบัดน้ำเสีย (a) และลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (b)	24
2.3	แบคทีเรีย (a) <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ (b) <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM	25
2.4	วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน (a) ทะลายปาล์มน้ำมัน (b) เส้นใยปาล์มน้ำมัน	28
2.5	ทดสอบการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงในขวดแก้วฝาเกลียวแล้วบ่มตัวอย่าง ที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	32
3.1	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A <sub>606</sub> จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 เพื่อเกาะติดบน EFB	40
3.2	ลักษณะพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 250x-500x; เส้นใยปาล์มน้ำมัน (a-b) และทะลายปาล์มน้ำมัน (c-d)	42
3.3	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A <sub>606</sub> จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรียระหว่างการตรึงเซลล์บน EFB และ PF เปรียบเทียบ กับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์	44
3.4	การเกาะติดของเซลล์ในวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 3000x-10000x; เส้นใยปาล์มน้ำมัน (a-b) และทะลายปาล์มน้ำมัน (c-d)	46

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.5	ปริมาณฟีนอลที่เหลือหลังจากถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB และ PF เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (วัสดุตรึงที่ไม่มีเซลล์) ใช้ความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	47
3.6	ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของสัดส่วนเซลล์ตรึงบน EFB ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) โดยมีความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	49
3.7	ปริมาณฟีนอลที่เหลือหลังจากถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ (free cells) โดยทดลองที่ความเข้มข้นฟีนอล 10 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นฟีนอล 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นฟีนอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง และความเข้มข้นฟีนอล 500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง	51
3.8	ค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB และเซลล์อิสระที่ฟีนอลความเข้มข้นต่างๆ	52
3.9	ปริมาณฟีนอลที่ถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB หลังจากผ่านการใช้แล้ว 10 ครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติมฟีนอล	54
3.10	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิว EFB และเซลล์ที่ถูกตรึง วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM ที่กำลังขยาย 10000x-15000x; ก่อนการย่อยสลายฟีนอล (a) และหลังการนำกลับมาใช้ย่อยสลาย ฟีนอลซ้ำจำนวน 5 ครั้ง (b)	55
3.11	ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ของเซลล์ตรึงบน EFB โดยการแปรผันปริมาณของเซลล์ตรึงที่สัดส่วนต่างๆ	57
3.12	ปริมาณฟีนอลที่ถูกย่อยสลาย โดยเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการใช้ซ้ำ 10 ครั้ง ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	63
ฉ. 1	ค่าคงที่อัตราการย่อยฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	95

## คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

EFB	= empty fruit bunch
PF	= pericarp fiber
POME	= palm oil mill effluent
N	= nitrogen
P	= phosphorus
K	= potassium
Mg	= magnesium
EPS	= extracellular polymeric substance หรือ exopolysaccharide
CFMM	= carbon free mineral medium
SEM	= scanning electron microscope



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ฟินอลเป็นสารเคมีที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ใน อุตสาหกรรมการผลิตยารักษาโรค อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันมะกอก อุตสาหกรรมผลิตเรซิน อุตสาหกรรมกระดาษ ฟอกเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Leitao et al., 2007) ฟินอลเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ และสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน์ แม้ในปริมาณความเข้มข้นเพียงเล็กน้อย (Van Schie and Young, 2000; Ahmaruzzaman, 2008) ฟินอลเป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่ถูกกำหนดอยู่ใน priority pollutants ของ USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) โดย USEPA ได้กำหนดค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมให้มีปริมาณฟินอลสูงสุดไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้อุตสาหกรรมดังกล่าวข้างต้น ยังพบปัญหาการปนเปื้อนของฟินอลในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมหลักที่สำคัญในภาคใต้ โดยฟินอลเป็นสารประกอบอยู่ในผลของปาล์มน้ำมัน เมื่อผ่านกระบวนการหนึ่งมาใช้ในการสกัดน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำหรือแบบมาตรฐานฟินอลจึงถูกสกัดออกมาปนเปื้อนในน้ำเสีย นอกจากนี้ฟินอลยังเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายลิกนินผ่านกระบวนการ wet oxidation (Kongjan et al., 2010) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบการปนเปื้อนของสารประกอบฟินอลในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มในระดับความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 5 ถึง 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส, 2547; Alam et al., 2009; Cordova-Rosa et al., 2009) ซึ่งความเข้มข้นของสารประกอบฟินอลที่พบมีปริมาณสูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งอุตสาหกรรม ตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ.2539) กำหนดไว้ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกทั้ง อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มยังมีการปล่อยของเสียปริมาณมากในรูปของวัสดุเศษเหลือที่เกิดจากกระบวนการสกัดน้ำมัน เช่น ทะลายปาล์มเปล่า (empty fruit bunch: EFB) เส้นใยปาล์มน้ำมัน (pericarp fiber: PF) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาวิธีการบำบัดฟินอลออกจากน้ำทิ้ง พร้อมทั้งศึกษาทางเลือกในการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

วิธีการบำบัดฟินอลทางชีวภาพนับเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถย่อยสลายสารมลพิษได้อย่างสมบูรณ์ ประหยัด และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Banerjee et al., 2001) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการบำบัดทางกายภาพและเคมี อย่างไรก็ตาม จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์อิสระ (free

cells) สามารถทนต่อความเข้มข้นของฟีนอล หรือสารมลพิษอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียได้ที่มีความเข้มข้นต่ำ (Ruiz-Ordaz et al., 2001) จึงทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารมลพิษลดลง งานวิจัยนี้จึงสนใจนำเซลล์ตรึงมาใช้ในการบำบัดฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย เนื่องจากเซลล์ตรึงมีความทนทานต่อความเข้มข้นของสารพิษที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย และมีอัตราการอยู่รอดสูงแม้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Obuekwe et al., 2001) ทั้งนี้เลือกใช้การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า และเส้นใยปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำวัสดุเศษเหลือมาใช้ประโยชน์ และยังเป็นทางเลือกวัสดุเศษเหลืออีกทางหนึ่งด้วย นอกจากนี้การนำวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นวัสดุตรึง ยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อสารเคมี หรือการสังเคราะห์วัสดุตรึงที่มีราคาแพง และลดความเสี่ยงจากความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์วัสดุตรึง รวมทั้งยังสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ ซึ่งช่วยลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพ ง่าย ราคาถูก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสารฟีนอลออกจากน้ำเสีย และนำทิ้งจากภาคอุตสาหกรรมต่อไป

## 1.2 การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 1.2.1 แหล่งกำเนิดฟีนอล

ฟีนอล และอนุพันธ์ของฟีนอลเป็นสารมลพิษหรือของเสียอันตราย เมื่อโรงงานอุตสาหกรรมปล่อยน้ำทิ้งสู่สิ่งแวดล้อม อาจส่งผลกระทบต่อมนุษย์ พืช และสัตว์ เช่นเดียวกัน เมื่อมนุษย์กินสัตว์ และพืชที่มีฟีนอลปนเปื้อน อาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน อัมพาตหรืออาจเสียชีวิตจากการล้มเหลวของระบบทางเดินหายใจหรือหัวใจหยุดเต้น โดยจะพบฟีนอลในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ในน้ำเสียโรงกลั่นปิโตรเลียม โรงงานปิโตรเคมี โรงงานถ่านหิน โรงงานผลิตน้ำมันมะกอก โรงงานผลิตถ่านหิน (Aksu, 2005; Yan et al., 2006; Bai et al., 2007) สารกำจัดศัตรูพืช อุตสาหกรรมผลิตยา ยีเอกระดาษ อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสีเคลือบเงา และอื่นๆ (Diez et al., 1999; Jung et al., 2001; Aleksieva et al., 2002; Rao and Viraraghavan, 2002) ซึ่งมักจะมีฟีนอลปนเปื้อนในความเข้มข้นตั้งแต่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึงหลายร้อยมิลลิกรัมต่อลิตร (Prieto et al., 2002; Shetty et al., 2007; Nair et al., 2007; Pan and Kurumada, 2008) (ตารางที่ 1.1) นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของฟีนอลในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 5 ถึงมากกว่า 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธรรมศักดิ์

ศรีสุขใส, 2547; Alam et al., 2009; Cordova-Rosa et al., 2009) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องกำจัดฟีนอลให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

### ตารางที่ 1.1 ความเข้มข้นของฟีนอลในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมต่างๆ

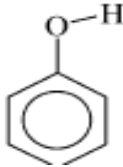
อุตสาหกรรม	ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
เยื่อกระดาษและกระดาษ	268	Sharma and Gupta (2012)
สิ่งทอ	12.3	Kunz et al. (2001)
น้ำมันมะกอก	3,000-10,000	Knupp et al. (1996); Robards and Ryan (1998)
ถ่านหิน	4-4780	Parkhurst et al. (1979)
ผลิตเรซิน	1200->10,000	Patterson (1985); Kavitha and Palanivelu (2004)
กลั่นน้ำมันปิโตรเลียม	33.5	Pfeffer (1979)
สกัดน้ำมันปาล์ม	>1000	Alam et al. (2009)

#### 1.2.2 คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี และความเป็นพิษของฟีนอล

ฟีนอลเป็นสารกึ่งของแข็งที่ปราศจากสี มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว เมื่อละลายน้ำแล้วมีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน อาจเรียกว่า กรดคาร์บอลิก ฟีนอลละลายได้ดีในเอทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี ดังตารางที่ 1.2 โดยฟีนอลมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และต่อระบบนิเวศน์ ในระดับความเข้มข้นฟีนอลต่ำหรือเจือจางมากๆ จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Shetty et al., 2007) และในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 2-5 จะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในทันที ถ้าความเข้มข้นฟีนอลเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตกโปรตีนในเซลล์ตกตะกอน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และทำลายโครงสร้างของเซลล์ ทำให้การผ่านเข้าออกของสารในเซลล์ผิดปกติ เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตาย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และคณะ, 2547; Seymour, 2001) สำหรับมนุษย์เมื่อฟีนอลโดนผิวหนังจะถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว หากสัมผัสร่างกายจะเกิดการกัดกร่อนเนื้อเยื่ออย่างรุนแรง และเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะมีผลต่อตับ ไต ปอด และระบบเลือด อาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ (Busca et al., 2008) ความเข้มข้นของฟีนอลสูงกว่า 50 ppb มีความเป็นพิษต่อสัตว์ พืช และสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำ ทั้งนี้ฟีนอลยัง

มีผลต่อระบบประสาท และอวัยวะที่สำคัญ เช่น ม้าม ตับอ่อน และไต (Manahan, 1994) นอกจากนี้ฟีนอลยังส่งผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพ (Gonzalez et al., 1990)

ตารางที่ 1.2 คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของฟีนอล

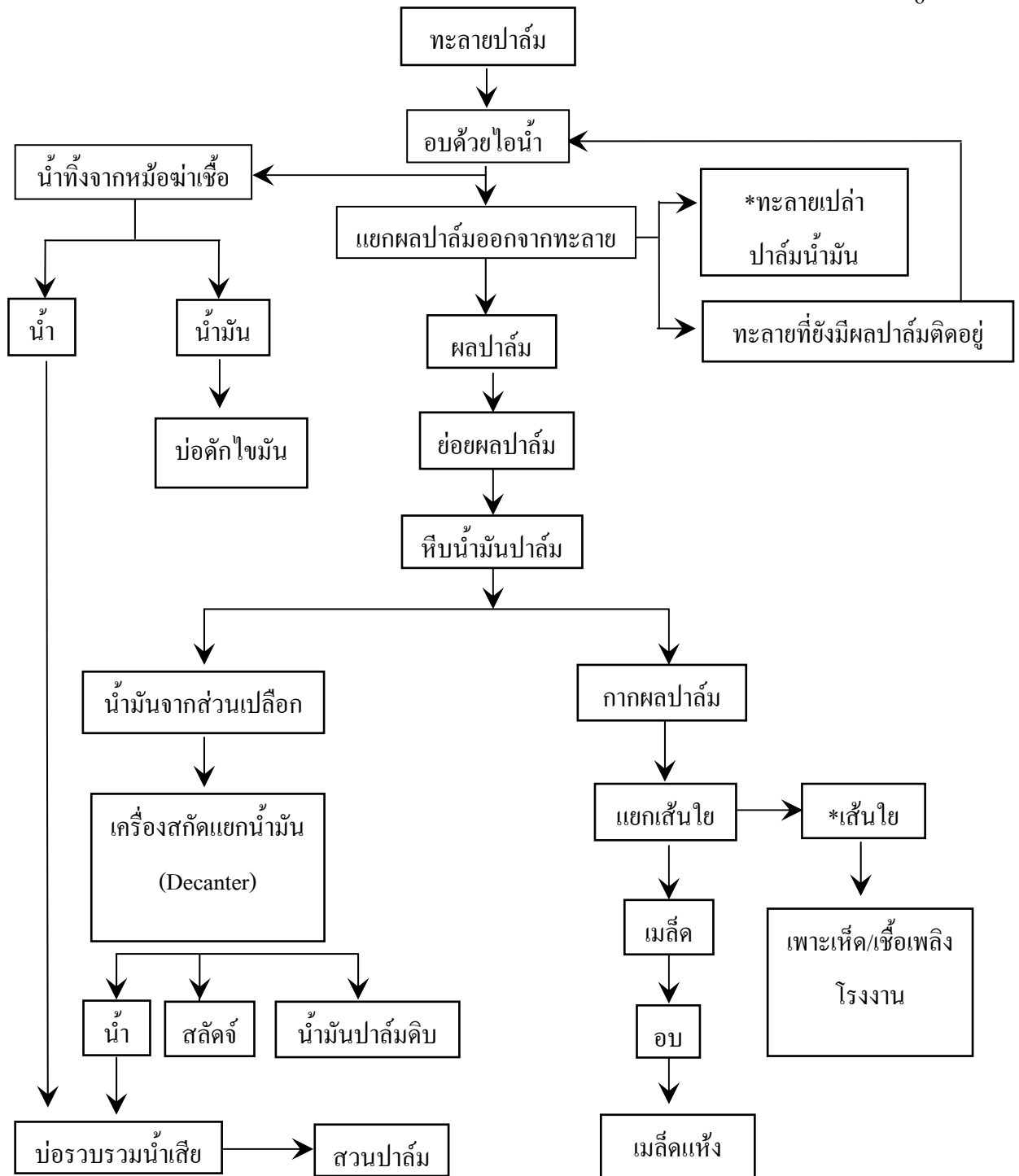
คุณสมบัติ	ค่า
สูตรโมเลกุล	$C_6H_5OH$
สูตรโครงสร้าง	
น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)	94.11
จุดเดือด ( $^{\circ}C$ )	40.9
จุดหลอมเหลว ( $^{\circ}C$ )	181.75
ความสามารถในการละลายน้ำ (r.t.)	9.3 gphenol/100 mLH <sub>2</sub> O
ค่าการแตกตัวของกรด (pKa)	9.89
ความสามารถในการติดไฟในอากาศ (vol%)	1.7 (ต่ำสุด) 8.6 (สูงสุด)
จุดวาบไฟ ( $^{\circ}C$ )	79 (closed cup)
อุณหภูมิที่สารลุกติดไฟได้เอง( $^{\circ}C$ )	715

ที่มา: Busca et al. (2008)

### 1.2.3 อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม

อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่ก่อให้เกิดรายได้ และการจ้างงานในภาคใต้ของประเทศไทย และมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ ซึ่งมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว และมีการเพาะปลูกเพิ่มมากขึ้น จากข้อมูลการสำรวจในปี พ.ศ.2551 พบว่ามีพื้นที่ปลูกปาล์ม น้ำมันรวมทั้งประเทศประมาณ 2,834,600 ไร่ (ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี, 2551) และมีโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทั้งหมดจำนวน 66 โรงงาน (กรมส่งเสริมสหกรณ์, 2555) กระบวนการสกัดน้ำมัน

ปาล์มสามารถแบ่งตามการผลิตได้ 2 แบบ คือ 1) การผลิตแบบมาตรฐานหรือแบบใช้น้ำ และ 2) การผลิตแบบไม่ใช้น้ำ หรือแบบแห้ง ซึ่งก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือจำนวนมาก ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า (empty fruit bunch) กะลาผลปาล์ม (palm shell) เส้นใยปาล์ม (pericarp fiber) และกากเนื้อปาล์ม (palm kernel cake) (รูปที่ 1.1) นอกจากนั้นการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานมีการใช้น้ำในการผลิตมาก มีรายงานว่ากระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ 1 ตันต้องการใช้น้ำ 5–5.7 ตัน และน้ำที่ใช้ในการผลิตมากกว่าร้อยละ 50 กลายเป็นน้ำทิ้ง (palm oil mill effluent, POME) (Wu et al., 2009) ปริมาณน้ำทิ้งส่วนใหญ่มาจากขั้นตอนการอบทะลายปาล์มในรูปน้ำทิ้งจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (sterilizer condensate) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent) น้ำทิ้งจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อมีประมาณ 200 ลิตรต่อ 10 ตันทะลายปาล์ม (พูนสุข ประเสริฐสรรพและคณะ, 2533) โดยในน้ำทิ้งจะประกอบด้วย BOD, COD, ของแข็งแขวนลอย, น้ำมัน และไขมัน (oil and grease) ในปริมาณสูง และพบว่าน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูง เช่น รงควัตถุพวก แอนโทไซยานิน แคโรทีน แทนนิน สารประกอบพวกเมลานอยดิน และสารประกอบพวกกำมะถัน เป็นต้น (พูนสุข ประเสริฐสรรพและคณะ, 2544) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ทำให้น้ำทิ้งมีสีน้ำตาลเข้มถึงน้ำตาลปนดำ (ตารางที่ 1.3) และเมื่อผ่านกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อผลปาล์มที่ใช้ความร้อนและความดันสูง จะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase เป็นผลให้ฟีนอลไม่ถูกย่อยสลาย และปนเปื้อนออกมากับน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม (Sundram et al., 2003) นอกจากนี้ ฟีนอลยังเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายลิกนินผ่านกระบวนการ wet oxidation อีกด้วย (Kongjan et al., 2010)



หมายเหตุ \* วัสดุที่นำมาใช้ตรงเซลล์

รูปที่ 1.1 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

ที่มา: คัดแปลงจากพูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ (2533)

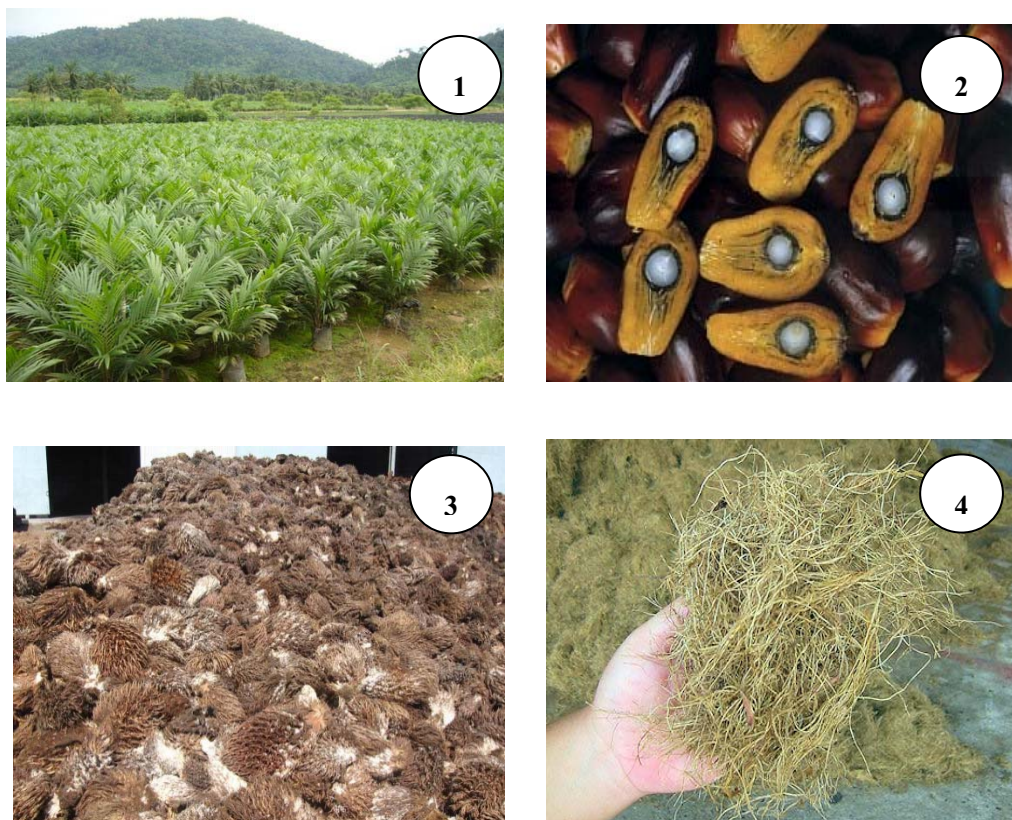
ตารางที่ 1.3 คุณลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	ค่า
pH	4.7
Biochemical Oxygen Demand (BOD <sub>5</sub> ) (mgL <sup>-1</sup> )	25,000
Chemical Oxygen Demand (COD) (mgL <sup>-1</sup> )	50,000
Total Solids (T.S) (mgL <sup>-1</sup> )	40,500
Total Suspended Solids (T.S.S) (mgL <sup>-1</sup> )	18,000
Total Volatile Solids (T.V.S) (mgL <sup>-1</sup> )	34,000
Oil and Grease (O&G) (mgL <sup>-1</sup> )	4,000
Ammonia-Nitrate (NH-N) (mgL <sup>-1</sup> )	35
Total Kjeldahl nitrogen (TKN) (mgL <sup>-1</sup> )	750

ที่มา : Ma et al. (2000)

สำหรับวัสดุเศษเหลือในรูปของแข็ง เช่น ทะลายเปล่า และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 1.2) มีการผลิตประมาณ  $40 \times 10^6$  ตันต่อปี โดยมีการนำวัสดุเศษเหลือนำไปเป็นเชื้อเพลิงในหม้อไอน้ำ (Alam et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ประเภทอื่นด้วย เช่น การเพาะเห็ด หรือการทำปุ๋ยหมัก เป็นต้น

ทั้งนี้ในวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันพบปริมาณสารอาหารต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1.4



รูปที่ 1.2 ต้นปาล์มน้ำมัน (1) ผลปาล์มและเมล็ดปาล์มน้ำมันสำหรับการสกัดน้ำมัน (2) และวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน; ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (3) เส้นใยปาล์มน้ำมัน (4)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sridhar et al. (2009)

ตารางที่ 1.4 ปริมาณสารอาหารโดยเฉลี่ยในวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

วัสดุเศษเหลือ	ปริมาณความชื้น (%)	N (kg/t dry residue)	P (kg/t dry residue)	K (kg/t dry residue)	Mg (kg/t dry residue)
EFB	60	8	0.6	24.1	1.8
PF	20	23	0.1	2	0.4

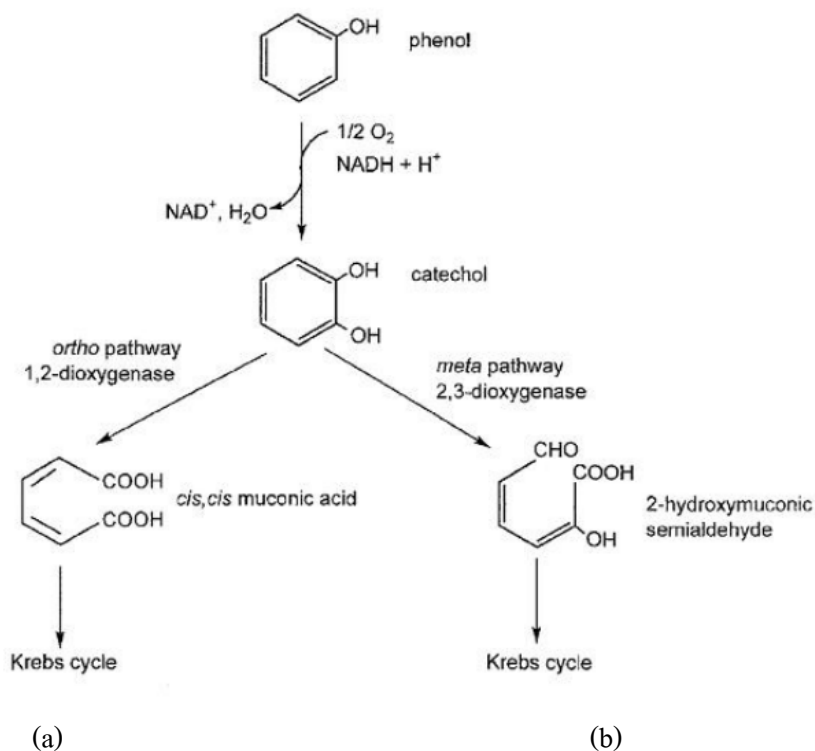
ที่มา : Bureau of Industrial Environment Technology, Department of Industrial Works and Ministry of Industry (1997)



งานวิจัยนี้สนใจนำวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม 2 ชนิด ได้แก่ ทะลายปาล์มน้ำมัน (EFB) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (PF) มาใช้เป็นวัสดุตั้ง โดยเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำวัสดุเศษเหลือมาใช้ประโยชน์ และยังเป็นการทำจัดวัสดุเศษเหลืออีกทางหนึ่งด้วย นอกจากนี้การนำวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นวัสดุตั้ง เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อสารเคมี หรือการสังเคราะห์วัสดุตั้งที่มีราคาแพง

#### 1.2.4 กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของฟินอล

การย่อยสลายทางชีวภาพของฟินอลโดยจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (aerobic) และไม่มีอากาศ (anaerobic) แต่โดยทั่วไปพบว่ากระบวนการย่อยสลายฟินอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศเกิดขึ้นได้อย่างแพร่หลายมากกว่า (Melo et al., 2005) ทั้งนี้เนื่องจากฟินอลสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ใช้อากาศได้ง่าย (Grady et al., 1999) ซึ่งกระบวนการย่อยสลายฟินอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศมี 2 วิธี คือ วิถีเมทา (meta-pathway) และวิถีออโธ (ortho-pathway) โดยเริ่มต้นจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเจนชัน (oxygenation) โดยเอนไซม์ฟินอลไฮดรอกซิเลส (phenol hydroxylase) เปลี่ยนฟินอลให้อยู่ในรูปของสารตัวกลาง คือ แคตคอล (catechol) จากนั้นจะเข้าสู่ปฏิกิริยาการแตกวงของแคตคอล (ring cleavage) หากย่อยสลายผ่านวิถีเมทาได้สารตัวกลางคือ 2-ไฮดรอกซิมูโคนิกแอซิด (2-hydroxymuconic acid) โดยเอนไซม์แคตคอล 1,2 ไดออกซิจีเนส (1,2-dioxygenase) หรือผ่านวิถีออโธ (ortho-pathway) ได้สารตัวกลางเป็น ซิส-ซิส-มูโคนิกแอซิด (cis,cis-muconic acid) โดยเอนไซม์แคตคอล 2,3 ไดออกซิจีเนส (2,3 dioxygenase) ดังแสดงในรูปที่ 1.3 ก่อนจะเข้าสู่วัฏจักร Krebs และเมทาบอลิซึมทั่วไปของสิ่งมีชีวิต (Van Schie และ Young, 2000) ในการย่อยสลายทางชีวภาพที่สมบูรณ์ได้สารประกอบอย่างง่าย เช่น CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O และสารอนินทรีย์อื่นๆ (Nair et al., 2008)



รูปที่ 1.3 วิธีการย่อยสลายฟีนอล (a) วิธีออร์โธ (Ortho-pathway) (b) วิธีเมตา (Meta-pathway)

ที่มา : Van Schie และ Young (2000)

### 1.2.5 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล

ฟีนอลเป็นสารพิษที่ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในระดับความเข้มข้นฟีนอลสูงๆ ซึ่งมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ไวต่อสารนี้ อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีนอล และมีความทนทานต่อฟีนอล จากรายงานที่ผ่านมามีแบคทีเรีย รา และยีสต์สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ใช้ฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ ตารางที่ 1.5 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ ซึ่งคัดแยกจากสิ่งแวดล้อมได้แก่ จินัส *Acinetobacter*, *Candida* และ *Pseudomonas* เป็นต้น

### ตารางที่ 1.5 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล

จุลินทรีย์	แหล่งที่มาของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Pseudomonas Putida</i>	Wastewater treatment plant	Movahedyan et al. (2009)
<i>Candida parapsilopsis</i>	Industrial chemistry effluent	Rigo and Alegre (2004)
<i>Acinetobacter, Kelibsiella, Citrobacter, Pseudomonas</i> และ <i>Shigella</i>	Lake Parishan	Kafilzadeh et al. (2010)
<i>Streptococcus epidermis</i>	Oil contaminated soil	Mohite et al. (2010)
<i>Proteobac Teria</i> PH002	East River, New York, N.Y.	Van Schie et al. (1998)
<i>Azoarcus</i> CR23	Rain forest, Costa Rica	
<i>Thauera</i> FL05	Orange grove, Florida	
<i>Candida tropicalis</i> และ <i>Alcaligenes faecalis</i>	Amazonian rain forest soil	Bastos et al. (2000)
<i>Acinetobacter</i>	Activated sludge	Hao et al. (2002)
	Rhizosphere of duckweed	Yamaga et al. (2010)
	Wastewater treatment plant at Alexandria, Egypt	Abd-El-Haleem et al. (2002)

#### 1.2.6 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* และ *Acinetobacter*

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มีลักษณะโคโคณีเป็นสีชมพูเข้ม จัดเป็นแบคทีเรียประเภท facultative methylotrophs ที่สามารถเจริญได้ง่าย และพบในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไป เช่น ในดิน และเนื้อเยื่อพืช (Aken et al., 2004; Lidstrom and Chistoserdova, 2002) ทั้งนี้พบได้ง่ายบริเวณราก (rhizosphere) และในต้นพืช (endosphere) ที่มีความสามารถในการดูดซับ หรือบำบัดสารมลพิษ (Dourado et al., 2011) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้หลายชนิด เช่น เมทานอล (methanol) และเมทิลเอมีน (methylamine) รวมทั้ง  $C_2$ ,  $C_3$  และ  $C_4$  (Lidstrom and Chistoserdova, 2002) นอกจากนี้มีรายงานการนำแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้ในการบำบัดสารมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม เช่น ไซยาไนด์ (Cyanide) ฟอรัมาไมด์ (formamide) ฟอรัมาลดีไฮด์ (formaldehyde) และฟีนอล (phenol) เป็นต้นดังตัวอย่างแสดงในตารางที่ 1.6

ตารางที่ 1.6 การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*

สายพันธุ์แบคทีเรีย	สารมลพิษที่ย่อยสลาย	อ้างอิง
<i>Methylobacterium</i> sp. RXM CCMI 908	Cyanide และ formamide	Campos et al. (2006)
<i>Methylobacterium organophilum</i> DSMZ 760	methanolic distillation residues	Stepnowski et al.(2004)
<i>Methylobacterium mesophilicum</i> Sr	dimethyl isophthalate	Li and Gu (2007)
<i>Methylobacterium</i> sp. MF1	formaldehyde	Mitsui et al. (2005)
<i>Methylobacterium</i> sp BJ 001	nitro-substituted explosives	Aken et al.(2004)
เชื้อผสมระหว่าง <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1	phenol	ปิยะมาศ คงแถม (2552)

แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* พบได้แพร่หลายในธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน สิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ และจากผิวหนังมนุษย์ แบคทีเรียสกุลนี้มีความน่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ และในด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นที่รู้จักในการย่อยสลายสารมลพิษได้หลากหลายชนิด (ตารางที่ 1.7) เนื่องจากมีความสามารถในการใช้สารประกอบหลากหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เช่น ฟีนอล (phenol) และเบนโซเอท (benzoate) เป็นต้น ทำให้เพาะเลี้ยงได้ง่ายในอาหารเหลว (Caposio et al., 2002 ; Cui et al., 2008) รวมทั้งมีความสามารถในการผลิต emulsifying agents ทำให้สารมลพิษที่ละลายน้ำได้น้อย (low solubility) ถูกย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Marin et al., 1995)

ตารางที่ 1.7 การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter*

สายพันธุ์แบคทีเรีย	สารมลพิษที่ย่อยสลาย	อ้างอิง
<i>Acinetobacter radioresistens</i> USTB-04	methyl parathion	Fang-yao et al. (2007)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> MM5	diesel และ heating Oil	Marin et al. (1995)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCIM 2890	diazo dye direct brown MR	Ghodake et al. (2009)
<i>Acinetobacter calcoaceticum</i> A-122	p-nitrophenol (PNP)	Ignatov et al. (1999)
<i>Acinetobacter</i> sp. HY-7	carbamazepine	Cui et al., (2008)
<i>Acinetobacter</i> sp. PD12	phenol	Ying et al. (2007)

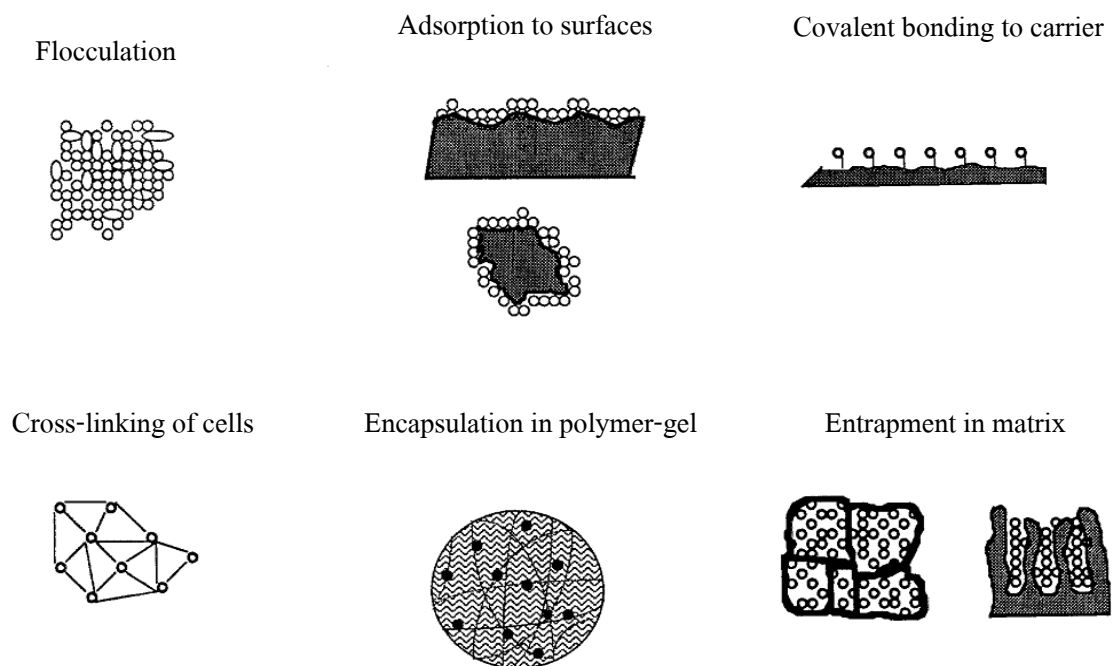
จากการศึกษาของ Khongkhaem et al. (2011) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 โดยวิธีตรึงเซลล์แบบกักขัง (entrapment) ในซีลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 80-85% ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้เกือบ 100% ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยกว่า 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลได้เป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์เดียวแต่ละชนิด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงสนใจใช้แบคทีเรียเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ในการย่อยสลายฟีนอล

### 1.2.7 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)

การบำบัดสารมลพิษด้วยวิธีการเติมจุลินทรีย์ลงไปในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน (bioaugmentation) ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน โดยจุลินทรีย์ที่เติมลงไปอาจเป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีในพื้นที่นั้น (indigenous microorganisms) หรือเรียกอีกอย่างว่าเทคนิค autochthonous bioaugmentation หรืออาจเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างถิ่น (exogenous microorganisms) เพื่อเร่งกระบวนการย่อยสลายสารมลพิษวิธีการนี้มีข้อดีคือ สามารถควบคุมกระบวนการบำบัดสารมลพิษโดยการกำหนดชนิด และปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายสารมลพิษแต่ละชนิด และมีความทนทานต่อสารมลพิษนั้นๆ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารมลพิษ

ส่วนใหญ่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อม และมีการศึกษากิจกรรมการย่อยสลายสารมลพิษในห้องปฏิบัติการแล้ว ที่ผ่านมามีรายงานการใช้ทั้งเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงในการบำบัดสารมลพิษ อย่างไรก็ตาม พบว่าเซลล์ตรึงสามารถทนทานต่อความเข้มข้นของสารมลพิษที่สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ และสามารถป้องกันเซลล์จากผลการเปลี่ยนแปลงของ pH และอุณหภูมิ ทั้งนี้ยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ และเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน ซึ่งช่วยลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ (Aksu and Bulbul, 1999; Kourkoutas et al., 2004)

กระบวนการตรึงเซลล์จุลินทรีย์สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ (1) การเกาะติด/ดูดซับของเซลล์บนวัสดุด้วยวิธีธรรมชาติ (self-attachment/adsorption immobilization) และ (2) การตรึงแบบสังเคราะห์ (artificial immobilization) เช่น การกักขังเซลล์ในพอลิเมอร์ (entrapment within polymers) การสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์กับวัสดุตรึง (covalent bonding) เป็นต้น (Cohen et al., 2001) (รูปที่ 1.4) การเกาะติด/ดูดซับ (self-attachment/adsorption) เป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่าย โดยให้เซลล์ดูดซับกับวัสดุที่เป็นตัวนำด้วยแรง Electrostatic interactions, Covalent bond formation หรือ Hydrophobic interactions ซึ่งมีแรงดูดซับค่อนข้างอ่อน อาจมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายในระหว่างการใช้งาน และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ เป็นต้น (Cheetham et al., 1979) ดังนั้นการตรึงเซลล์โดยให้จุลินทรีย์ดูดซับ หรือยึดเกาะกับวัสดุ เซลล์จะมีการสร้างฟิล์มชีวภาพ (biofilm) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกันอยู่บนผิวหน้าของวัสดุ เป็นสารพอลิเมอร์ที่เซลล์สร้างขึ้นแล้วขับออกภายนอกเซลล์ โดยส่วนใหญ่จะเป็นสารพวก extracellular polymeric substance หรือ exopolysaccharide (EPS) ซึ่งมีองค์ประกอบ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ดีเอ็นเอ และไขมัน ซึ่งสัดส่วนจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะแวดล้อม (Rosche et al., 2009) โดย biofilm ดังกล่าวมีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์สามารถยึดเกาะกับผิวหน้าของวัสดุได้ดียิ่งขึ้น สำหรับจุลินทรีย์ที่มีการสร้าง biofilm มีหลายชนิด ส่วนใหญ่ biofilm จะมีลักษณะเป็นเส้นสาย (filament) มีส่วนช่วยสำคัญที่ทำให้เซลล์ยึดเกาะกับวัสดุได้ดียิ่งขึ้น (Davey et al., 1991) อย่างไรก็ตาม เทคนิคการเกาะติดของเซลล์ด้วยวิธีธรรมชาติเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และสามารถขยายขนาดเพิ่มจำนวนเซลล์ตรึงได้ง่ายกว่าการตรึงแบบสังเคราะห์ นอกจากนี้การตรึงเซลล์แบบกักขังยังมีข้อจำกัดเรื่องการแพร่ผ่านของสารได้น้อยกว่าอีกด้วย (Lee and Palsson, 1994)



รูปที่ 1.4 วิธีการตรึงเซลล์

ที่มา: Cassidy et al. (1996)

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ คือ การคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ ซึ่งต้องเป็นวัสดุที่มีความเป็นรูพรุนสูง มีพื้นที่ผิวมาก เพื่อใช้ในการเกาะติด ไม่ละลายน้ำ มีความแข็งแรง ทนต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ-เคมี การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ และแรงกระทบกระเทือน เนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องทำในภาวะปลอดเชื้อ จึงต้องทนต่อความร้อน ความดันได้สูง นอกจากนั้นวัสดุที่ใช้ไม่ควรเป็นอันตรายต่อเซลล์ และสิ่งแวดล้อม ไม่ดูดซับสารพิษที่ปนเปื้อน และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ วัสดุที่นำมาใช้สามารถเตรียมได้ง่าย และมีเทคนิคการตรึงที่ไม่ยุ่งยาก ประหยัดค่าใช้จ่าย มีความคงทนในการนำไปใช้งาน และเก็บรักษาไว้ได้นาน (Kourkoutas et al., 2004) ที่ผ่านมามีการนำวัสดุจากธรรมชาติ และวัสดุสังเคราะห์ขึ้นมาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ได้แก่ natural zeolite, แกลบ (rice chaff) ชี้เลื่อยไม้ยางพารา (rubber wood meal) กาบมะพร้าว (coconut husk meal) ฟางข้าวสับ (chopped rice straw), ไยบวบ หรือวัสดุที่เป็นโพลิเมอร์ เช่น calcium alginate, polyvinyl alcohol (PVA) หรือวัสดุสังเคราะห์ เช่น ซิลิกา เป็นต้น ซึ่งวัสดุแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน มีรายงานว่า การใช้วัสดุจากธรรมชาติจำพวก organic material มีข้อดี คือ วัสดุที่ใช้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ วัสดุสามารถย่อยสลายได้ตามกลไกทาง

กายภาพ-เคมี ซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดวัสดุที่มีการดูดซับสารมลพิษอีกทางหนึ่ง และมีราคาไม่แพง

### 1.2.8 การใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลายสารมลพิษ

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิค self-attachment immobilization และวัสดุจากธรรมชาติมาใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย เช่น Obuekwe and Al-Muttawa (2001) พบว่าเซลล์แบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. และแบคทีเรียแกรมลบ (ยังไม่ได้จำแนกชนิด) ซึ่งคัดแยกจากบ่อน้ำมัน ในประเทศคูเวต ถูกตรึงบนขี้เลื่อย (sawdust) styroform และรำข้าวสาลี (wheat bran) สามารถรักษาประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน หลังจากเก็บเซลล์ตรึงไว้นาน 6 สัปดาห์ที่ 45 องศาเซลเซียส และพบว่าเซลล์มีการสร้าง extracellular structure เรียกว่าเส้นใย exopolysaccharide เพื่อให้เซลล์เกาะติดบนวัสดุได้ดีขึ้น และช่วยป้องกันเซลล์จากสารมลพิษ โดยเส้นใยดังกล่าวสามารถมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นอกจากนั้นจากรายงานของ Pattanasupong et al. (2004) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่ตรึงบนใยบวบ (Loofa sponge) มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลาย และขจัดความเป็นพิษของยากำจัดศัตรูพืช ได้แก่ Carbendazim (MBC) และ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) โดยสารทั้งสองชนิดสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 5.5 และ 1.5 วันตามลำดับ พบว่าเมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 6-9 และอุณหภูมิประมาณ 15-37 องศาเซลเซียส เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารชนิดนี้ไม่แตกต่างกัน อีกทั้ง Suttinun et al. (2010) ศึกษาวิธีการย่อยสลายสารไตรคลอโรเอทิลีน (trichloroethylene: TCE) แบบโคเมทาบอลิซึม (co-metabolism) โดย *Rhodococcus* sp. L4 ตรึงบนวัสดุจากพืชที่มีน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ เมล็ดคึ้หว่า เปลือกส้ม และใบตะไคร้ พบว่าเซลล์ที่ตรึงในเมล็ดคึ้หว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย TCE ได้ดีกว่าวัสดุชนิดอื่น และสามารถทนต่อ TCE ที่ความเข้มข้นสูง นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ในการย่อยสลาย TCE ได้ใหม่ หลังนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salts นาน 12 ชั่วโมงและจากรายงานของ Kasamsuk and Khanongnuch (2007) ใช้เซลล์แบคทีเรีย *Corioli* *versicolor* RC3 ตรึงบนแกลบ ขี้เลื่อย ไม้ยางพารา กาบมะพร้าว และฟางข้าวสับ ในการย่อยสลายสีในน้ำเสียอุตสาหกรรมสิ่งทอ พบว่าเซลล์ตรึงบนแกลบ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีได้ดีที่สุด ซึ่งย่อยสลายสีได้ 80% ในเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ 2 ครั้ง นอกจากนั้นมีการใช้ zeolite ตรึง *Pseudomonas* sp. ADP เพื่อใช้ย่อยสลาย atrazine โดยสามารถย่อยสลายสารดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 10 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Stelting et al., 2010)



### 1.2.9 การย่อยสลายฟีนอลโดยใช้เซลล์ตรึง

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนฟีนอล โดยใช้เซลล์ตรึงบนวัสดุต่างๆ เช่น การใช้โพลียูรีเทนโฟม (polyurethane foam) ตรึง *Acinetobacter* sp. พบว่าเซลล์ที่มีการตรึงจะสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของฟีนอล 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 19.7 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม (เซลล์อิสระ) ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นของฟีนอล 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Adav et al., 2007)

Ying et al. (2007) ใช้ polyvinyl alcohol (PVA) ตรึงเซลล์ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ PD12 ซึ่งคัดแยกเชื้อจากกากตะกอนเร่ง (Activated sludge) ของระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตสารเคมี โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายฟีนอล ได้แก่ ความเข้มข้นของฟีนอล พีเอช และอุณหภูมิ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายฟีนอลคือ 7.2 และเซลล์ทนต่อความเข้มข้นฟีนอลได้สูงถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร การตรึงเซลล์ช่วยป้องกันแบคทีเรีย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พีเอช และสามารถเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 50 วัน

Liu et al. (2009) ทำการตรึงเซลล์ *Acinetobacter* sp. XA05 และ *Sphingomonas* sp. FG03 บน polyvinyl alcohol (PVA) โดยใช้เชื้อที่แยกจากกากตะกอนเร่ง (Activated sludge) พบว่าเซลล์ที่ไม่ตรึงบน PVA มีอัตราการย่อยสลายฟีนอล (Phenol degradation rate) 0.95 มิลลิกรัมฟีนอลต่อชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่ตรึงบน PVA มีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 1.20 มิลลิกรัมฟีนอลต่อชั่วโมง และเซลล์ตรึงสามารถทนอุณหภูมิ และพีเอชได้ในช่วงกว้างที่มากกว่าเซลล์อิสระ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองอยู่ในช่วง 20-40 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟีนอล 800 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเซลล์ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งยังสามารถลดปริมาณฟีนอลได้ 93% หลังจากเก็บไว้ 50 วัน แต่เซลล์อิสระจะมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลลดลง หลังจากเก็บไว้ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการตรึงเซลล์สายพันธุ์ XA05 และ FG03 สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างน้อย 20 ครั้ง

Santos et al. (2009) ศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง *Aureobasidium pullulans* FE13 (คัดแยกเชื้อได้จากน้ำเสียของโรงงานเหล็กกล้า) ในอัลจินต พบว่าเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้ 20.45 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่เซลล์อิสระมีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 18.35 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้มากกว่าเซลล์อิสระ

Lee et al. (2009) ใช้เมล็ดบีคัตริ่งกากตะกอนเร่ง (Activated sludge) ซึ่งได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเหล็ก พบว่าเซลล์ตรึงมีการย่อยสลายฟีนอลได้ที่ช่วงพีเอชที่กว้าง และที่ความเข้มข้นของฟีนอลสูง โดยมีอัตราการย่อยสลายมากกว่า 95% ภายในเวลา 28 ชั่วโมง โดยเซลล์อิสระถูกยับยั้งการย่อยสลายที่ความเข้มข้นของฟีนอล 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในขณะที่เซลล์ตรึงไม่ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นดังกล่าว

El-Naas et al. (2009) ศึกษาการตรึง *Pseudomonas putida* บน polyvinyl alcohol (PVA) พบว่าเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7 ซึ่งลดปริมาณฟีนอลได้ 95% โดยเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลได้จนถึงความเข้มข้นของฟีนอล 75 มิลลิกรัมต่อลิตร

Zhao et al. (2009) ศึกษาการใช้ polyurethane foam (PUF) และ organic modified montmorillonite (OMMT-PSF capsule) เป็นวัสดุสำหรับตรึงจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลสูงกว่าเซลล์อิสระ โดยเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 342.4 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนเซลล์อิสระมีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 208.4 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Yordanova et al. (2009) ศึกษาการตรึง *Aspergillus awamori* สายพันธุ์ NRRL3112 บน polyacrylonitrile membrane พบว่าเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 1.16 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ

Khongkhaem et al. (2011) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 โดยวิธีตรึงเซลล์แบบกักขัง (Entrapment) ในซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 80-85 % ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้เกือบ 100% ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยกว่า 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการสังเคราะห์ซิลิกาต้องมีค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีเป็นสารตั้งต้น และมีขั้นตอนเฉพาะในการผลิต ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่าย มีประสิทธิภาพ ราคาถูก และสามารถขยายขนาดเพิ่มจำนวนได้ง่าย เพื่อความสะดวกในการนำไปประยุกต์ใช้

งานวิจัยนี้จึงสนใจใช้เทคนิคการตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน เพื่อให้เซลล์ตรึงมีความทนทานต่อฟีนอลและอนุพันธ์ของฟีนอลที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้ง การใช้วัสดุพิเศษเหลื่อดังกล่าวเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้ประโยชน์ของเสีย และการกำจัดของเสีย อีกทั้งขั้นตอนการตรึงเซลล์ไม่ยุ่งยาก และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตวัสดุสังเคราะห์ได้

### 1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1. เพื่อศึกษาวิธีการตรึงเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

1.3.2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมันในการย่อยสลายฟีนอลในอาหารเหลว และน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

### 1.4 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งใช้แบคทีเรียเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 โดยตรึงบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด ได้แก่ ทะลายปาล์ม น้ำมันและเส้นใยปาล์มน้ำมัน แล้วศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุ และการเกาะติดของจุลินทรีย์ในวัสดุตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) รวมทั้งศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในเกาะติดของเซลล์บนวัสดุตรึง ด้วยการวิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย จากนั้นนำเซลล์ตรึงที่ได้ไปศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในอาหารเหลว เพื่อคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่สุด แล้วนำเซลล์ตรึงบนวัสดุที่คัดเลือกได้ไปศึกษาผลของความเข้มข้นของฟีนอลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1. ทราบวิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรียที่ง่ายมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอล และ  
ราคาถูก

1.5.2. ได้เซลล์ตรึงที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความทนทาน  
ต่อความเข้มข้นฟีนอล และอนุพันธ์ของฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.5.3. สามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ ซึ่งช่วยลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการ  
เตรียมหัวเชื้อใหม่

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

#### 2.1 สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์

##### 2.1.1 สารเคมี

- แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) ของบริษัท Merck, Germany
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ของบริษัท Merck, Germany
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท AJEX Finechem, Australia
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท AJEX Finechem, Australia
- กลูโคส ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) ของบริษัท AJEX Finechem, Australia
- เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท AJEX Finechem, Australia
- ฟีนอล ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ) ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc
- 4-อะมิโนแอนติไพรีน (4-Aminoantipyrine, 4-AAP) ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc
- แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc
- เฟอร์ริกไซยาไนด์ ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) ของบริษัท Sigma-Aldrich, Inc
- โมโนเบสิก โซเดียมฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ของบริษัท Aldrich Chemical Company, Inc
- ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ของบริษัท AJEX Finechem, Australia
- กรดอะซิติก ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) ของบริษัท Merck, Germany
- Alcian blue ( $\text{C}_{56}\text{H}_{58}\text{Cl}_{14}\text{CuN}_{16}\text{S}$ ) ของบริษัท s.d. fine-chem
- โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) ของบริษัท AJEX Finechem, Australia
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ของบริษัท AJEX Finechem, Australia

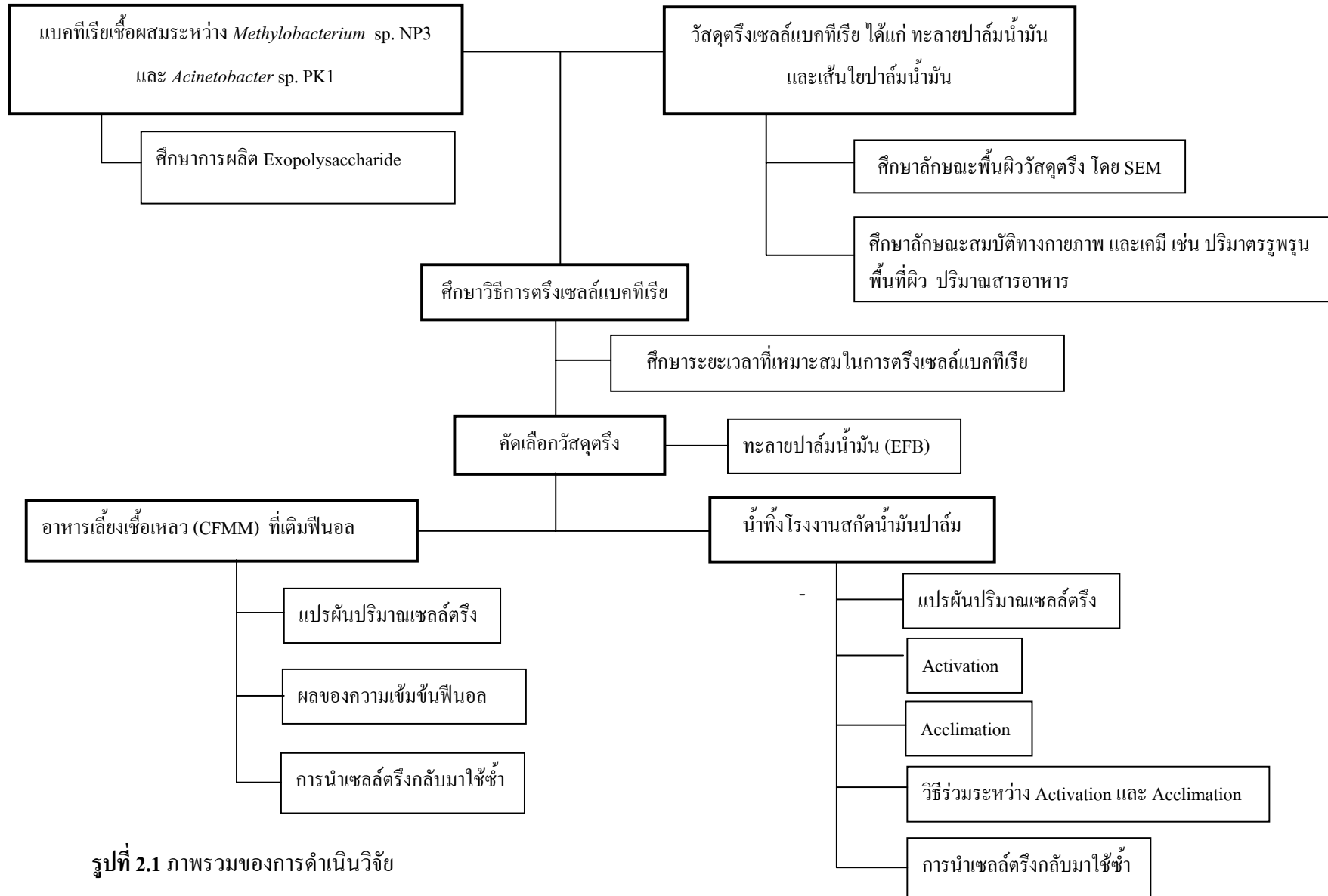
### 2.1.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น RL 150 ของบริษัท Russell
- เครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง รุ่น PB-1502 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy, Japan
- ตู้เขี่ย laminar flow รุ่น Microflow ของบริษัท MDH Limited, England
- เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น NB-101M/MS ของบริษัท N-Bio TEK
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV 1601 ของบริษัท Shimadzu, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น velocity 18R ของบริษัท Dynamica, Australia
- ตู้อบแห้ง ของบริษัท Cotherm, Newzealand
- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น D-78224 ของบริษัท Elma, Germany
- ปุ่มสุญญากาศและชุดกรอง (Filtrator) รุ่น ¼ แรงม้า ของบริษัท GAST, USA
- เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น vibramax 110 ของบริษัท Helderph
- ครอบกึ่งนิยาลพลาสติก ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
- ขวดแก้วฝาเกลียว (vial with screw cap and Teflon liner) ขนาด 22 มิลลิเมตร บริษัท Lab System, Thailand
- ไมโครปิเปต ของบริษัท Denville Scientific, Inc
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 2.2 น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำเสียบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแห่งหนึ่งในจังหวัดสตูล (รูปที่ 2.2) โดยระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเป็นแบบบ่อปรับเสถียร (บ่อคิน) ซึ่งมีจำนวน 4 บ่อ โดยจะนำตัวอย่างน้ำทิ้งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งกรองด้วยผ้าขาวบางก่อนนำมาทดลอง

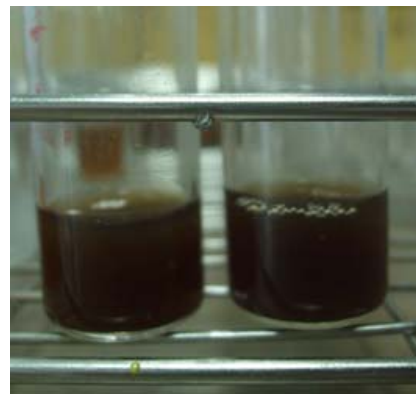
### 2.3 วิธีดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 2.1 ภาพรวมของการดำเนินงานวิจัย



(a)



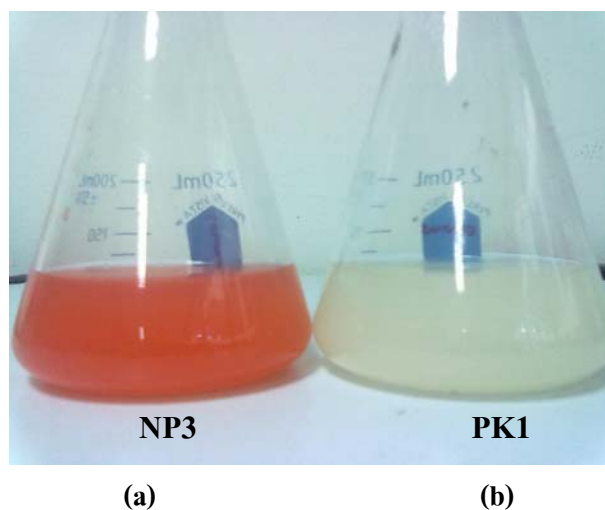
(b)

รูปที่ 2.2 ลักษณะบ่อบำบัดน้ำเสีย (a) และลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (b)

#### 2.4 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

งานวิจัยนี้ใช้จุลินทรีย์เชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 (รูปที่ 2.3a) ซึ่งคัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน (นันท์ธร เถาราช, 2550) และ *Acinetobacter* sp. PK1 (รูปที่ 2.3b) คัดแยกจากอาหารที่มีการเจริญเติบโตของ *Methylobacterium* sp. NP3 (ปิยะมาศ คงแถม, 2552) เลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดแยกกันในอาหารเหลว carbon free mineral medium (CFMM) ที่มีการเติมฟีนอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ปั่นเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วง late-log phase เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่ยัง active มากที่สุด โดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีการเจริญเท่ากัน หลังจากนั้นนำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร CFMM นำเซลล์ที่ได้ไปวัดค่า OD<sub>578</sub> ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 1.0 (Khongkham et al., 2011) โดยมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10<sup>8</sup> CFU/มิลลิลิตร ซึ่งค่า OD<sub>578</sub> กับการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียไม่สัมพันธ์กับการผสมสัดส่วนเซลล์ 1:1 ไม่ได้แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้เซลล์จุลินทรีย์ที่ได้จะนำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไปโดย 1) นำเซลล์ทั้งสองชนิดมาผสมกันในสัดส่วน 1:1 เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์





รูปที่ 2.3 แบคทีเรีย (a) *Methylobacterium* sp. NP3 และ (b) *Acinetobacter* sp. PK1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

## 2.5 ศึกษาการผลิต extracellular polymeric substance (EPS) ของแบคทีเรีย

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการผลิต extracellular polymeric substance หรือ exopolysaccharide (EPS) ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่งทำหน้าที่เสมือนกาวช่วยให้แบคทีเรียยึดติดกับวัสดุทรงได้ดี วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นวัสดุตั้งเซลล์ คือ ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (empty fruit bunch: EFB) ทดลองโดยการนำหัวเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (ตั้งแยกแบคทีเรียแต่ละชนิด) ที่เตรียมได้จากข้อ 2.4 มาบ่มร่วมกับชิ้นส่วน EFB ที่เตรียมตามข้อ 2.6.1 ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) โดยไม่มีการให้แหล่งคาร์บอนใดๆ เพิ่มเพื่อให้เซลล์อยู่ในภาวะอดอาหาร (carbon starvation) ซึ่งช่วยกระตุ้นการสร้าง EPS ของเซลล์ (Sanin et al., 2003) ทั้งนี้ใช้หัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ( $OD_{578}=1.0$ ) มาบ่มร่วมกับวัสดุปริมาณ 0.5 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 22 มิลลิลิตร สัดส่วนปริมาณหัวเชื้อ และวัสดุตั้งดังกล่าว ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของวัสดุตั้งได้อย่างอิสระ และช่วยให้วัสดุตั้งสัมผัสกับเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวได้ดี เตรียมชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (triplicate) จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นแยกเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแล้วออกจากเซลล์อิสระที่เหลืออยู่ในอาหารเหลว โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง GF/C ขนาด 45 มิลลิเมตรล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาทดสอบการสร้าง EPS ด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay ตามวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman (1993) ในหัวข้อ 2.9.3

เตรียมชุดควบคุมประกอบด้วยวัสดุเศษเหลือ EFB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave และไม่มี การเติมเชื้อแบคทีเรีย

## 2.6 การตรึงเซลล์แบคทีเรีย

### 2.6.1 การเตรียมวัสดุตรึงเซลล์

เตรียมวัสดุตรึงเซลล์จากวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด ที่ได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดสตูล ได้แก่ เส้นใยปาล์มน้ำมัน (pericarp fiber: PF) และทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (empty fruit bunch : EFB) (รูปที่ 2.4) โดยนำวัสดุมาตากให้แห้ง แล้วแบ่งขนาดของวัสดุตามการทดลองดังนี้

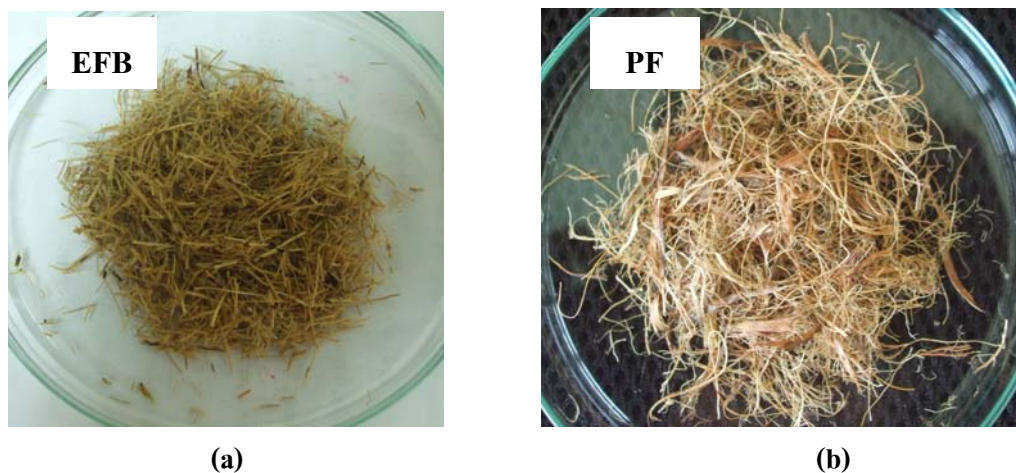
1) คัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ที่เหมาะสมในการย่อยสลายฟีนอล โดยนำวัสดุมาตัดหรือบด แล้วร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 500 ไมโครเมตรถึง 1 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้ขนาดของวัสดุทั้ง 2 ชนิดที่มีความใกล้เคียงกัน

2) เลือกใช้ EFB เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เตรียมวัสดุโดยการตัดวัสดุให้มีขนาด  $1 \times 1 \times 1$  เซนติเมตร เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้

จากนั้นนำวัสดุไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำมาตั้งฆ่าเชื้อซ้ำอีก เพื่อต้องการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความคงทนในวัสดุก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์ นอกจากนั้นศึกษาคุณลักษณะอื่นๆ ของวัสดุดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 วิธีวิเคราะห์คุณลักษณะของวัสดุ

พารามิเตอร์	วิธี/วิเคราะห์โดย
Nitrogen (%): Phosphorus (%):	อ้างอิงจาก Attanun และ Juncharoensuk (1999)
TOC (%):	TOC analyzer (Solid sample module-SSM-5000A, Shimadzu)/ NCE-EHWM, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Total pore volume ( $\text{cc g}^{-1}$ ) Specific surface area ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ) Average pore diameter (nm)	Surface area analyzer (Quantachrome, Autosorb-1)/ วิทยาลัยปิโตรเลียม และปิโตรเคมี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Zeta potential (mV)	Zeta potential analyzer (ZetaPALS, Brookhaven)/ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Scanning electron microscopy (SEM)	WI-RES-SEM Quanta 400-001 และ WI-RES-SEM-001/ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



รูปที่ 2.4 วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน (a) ทะลายปาล์มน้ำมัน (EFB) (b) เส้นใยปาล์มน้ำมัน (PF)

### 2.6.2 การตรึงเซลล์บนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

การตรึงแบคทีเรียบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน อาศัยเทคนิคการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุด้วยวิธีธรรมชาติ (self-attachment immobilization) โดยศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์บน PF และ EFB ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณการสร้าง extracellular polymeric substance หรือ exopolysaccharide (EPS) ของแบคทีเรียบนวัสดุตรึงแต่ละชนิด ทั้งนี้เพื่อให้เกิดการเกาะติดของแบคทีเรียบนวัสดุอย่างดีเพียงพอ และเซลล์ไม่หลุดออกจากวัสดุ เมื่อมีการนำมาใช้หรือใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่อง ขั้นตอนการตรึงเซลล์อ้างอิงจาก Suttinun et al. (2010) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่เตรียมได้จากข้อ 2.4 บ่มร่วมกับวัสดุแต่ละชนิดแยกกันในอัตราส่วน 1:10 (w/v) โดยไม่มีการให้แหล่งคาร์บอนใดๆ เพิ่ม เพื่อให้เซลล์อยู่ในภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอน (carbon starvation) ซึ่งช่วยกระตุ้นการสร้าง EPS ของเซลล์ (Sanin et al., 2003) ทั้งนี้ใช้หัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ( $OD_{578}=1.0$ ) มาบ่มร่วมกับวัสดุปริมาณ 0.5 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 22 มิลลิลิตร สัดส่วนปริมาณหัวเชื้อและวัสดุตรึงดังกล่าว ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของวัสดุตรึงได้อย่างอิสระ และช่วยให้วัสดุตรึงสัมผัสกับเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวได้ดี เตรียมชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (triplicate) จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแล้วออกจากเซลล์อิสระที่เหลืออยู่ในอาหารเหลว โดยการกรองด้วย GF/C ขนาด 45 มิลลิเมตร ล้างเซลล์ตรึงด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาทดสอบการสร้าง EPS ด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay ตามวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman (1993) ในหัวข้อ 2.9.3 เก็บตัวอย่างจนกว่าการสร้าง EPS จะคงที่ ซึ่งถือเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุแต่ละชนิด จากผลการทดลอง พบว่า

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์บนวัสดุเศษเหลือ EFB คือ 6 วันและบน PF คือเวลา 8 วัน ก่อนนำเซลล์ตรึงไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในขั้นตอนต่อไป เตรียมชุดควบคุม ประกอบด้วยวัสดุเศษเหลือ EFB และ PF ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave และไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย

นอกจากนั้นนำเซลล์ตรึงที่เตรียมได้ไปศึกษาลักษณะการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุทั้งก่อน และหลังการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล โดยการวิเคราะห์ด้วย SEM ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข.1 พร้อมทั้งคำนวณประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ (%) ดังต่อไปนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ (\%)} = \frac{\text{จน. เซลล์ทั้งหมดในวัสดุ (CFU)} * 100\%}{\text{จน.เซลล์ทั้งหมดในอาหารเหลว (CFU)} + \text{จน. เซลล์ทั้งหมดในวัสดุ (CFU)}}$$

ทั้งนี้นับจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุ และเซลล์อิสระในอาหารเหลวโดยวิธี total plate count สำหรับการสกัดเซลล์ออกจากวัสดุตรึง ได้ตามวิธีการดัดแปลงจาก Pattanasupong et al. (2004) โดยเติมอาหารเหลว CFMM ลงในหลอดแก้วที่บรรจุเซลล์ตรึงแบคทีเรีย ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เพื่อให้เซลล์สามารถหลุดออกจากวัสดุตรึงได้ง่าย นำไป sonicate ด้วยเครื่อง Ultrasonic bath เป็นเวลา 2 นาที และเขย่าด้วยเครื่อง vortex 2 นาที จากนั้นทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างและแขวนลอยเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ก่อนนำไปนับจำนวนแบคทีเรีย (CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง) นำสารละลายเซลล์มาเจือจางเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี 10-fold dilution และนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี total plate count

### 2.6.3 คัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์

คัดเลือกวัสดุตรึงระหว่างเซลล์ตรึงบน EFB และเซลล์ตรึงบน PF โดยนำเซลล์ตรึงแต่ละชนิดที่เตรียมจากข้อ 2.6.2 มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลตามวิธีการข้อ 2.7 โดยใช้ความเข้มข้นของฟีนอลเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 2.9.2 ซึ่งคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากข้อมูล

การลดลงของฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบกับผลการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ (%) และการวิเคราะห์ลักษณะเซลล์ตรึงบนวัสดุด้วยกล้อง SEM จากผลการทดลองพบว่าชิ้นส่วน EFB เป็นวัสดุที่เหมาะสมมากกว่า PF ในการตรึงเซลล์ จึงคัดเลือกเซลล์ตรึงบน EFB ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

เตรียมชุดควบคุม เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพและเคมีต่อการลดลงของฟีนอล (abiotic controls) เช่น การดูดซับของฟีนอลบนวัสดุตรึง โดยชุดควบคุมประกอบด้วยชิ้นส่วนของ EFB และ PF ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธี Autoclave ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีฟีนอลความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

## 2.7 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ใช้เซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการตรึงเซลล์เป็นระยะเวลา 6 วัน โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2.27 \times 10^{10}$  CFU/กรัมวัสดุ

### 2.7.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล

ศึกษาผลของปริมาณเซลล์ตรึงบน EFB ต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล โดยแปรผันปริมาณเซลล์ตรึง ดังนี้ 0.5, 1.5 และ 3.0 กรัม ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลวเท่ากับ 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) เริ่มต้นเติมเซลล์ตรึงตามปริมาณข้างต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีฟีนอลความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 22 มิลลิลิตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ข้ว จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 2.9.2 กำหนดเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง จากผลการทดลองพบว่า การเติมเซลล์ตรึงในปริมาณดังกล่าวข้างต้น ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลใกล้เคียงกัน จึงเลือกเติมปริมาณเซลล์ตรึง 1 กรัม (1:10 w/v) ไปใช้ศึกษาขั้นต่อไป

เตรียมชุดควบคุม เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพ และเคมีต่อการลดลงของฟีนอล (abiotic controls) เช่น การดูดซับของฟีนอลบนวัสดุตรึง โดยชุดควบคุมประกอบด้วย

ชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีฟินอลความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

### 2.7.2 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟินอลของเซลล์ตรึงที่ความเข้มข้นต่างๆ

นำเซลล์ตรึงบน EFB มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟินอลในระบบกะ (batch) ซึ่งใช้ สัดส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว CFMM เท่ากับ 1:10 (w/v) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิตร ต่อเซลล์ตรึงบน EFB ปริมาตร 0.5 กรัม ทดสอบในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 22 มิลลิตร (รูปที่ 2.5a) แปรผันความเข้มข้นของฟินอลตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำไปจนถึงความเข้มข้นสูง ได้แก่ 10, 30, 50, 100, 500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำ ตัวอย่างไปปั่นที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 2.5b) เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟินอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 2.9.2 จำนวน เฟอร์เซ็นต์ และอัตราการย่อยสลายฟินอลของเซลล์ตรึง ซึ่งผลที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับ ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟินอลของเซลล์อิสระ ( $10^8$  CFU/มิลลิตร) (แบบที่เรียกชื่อผสมจากข้อ 2.4)

เตรียมชุดควบคุม เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพ และเคมีต่อการลดลงของ ฟินอล (abiotic controls) เช่น การดูดซับของฟินอลบนวัสดุตรึง โดยชุดควบคุมประกอบด้วย ชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีการแปรผันปริมาณ ฟินอลตามที่ต้องการศึกษา



**รูปที่ 2.5** ทดสอบการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงในขวดแก้วฝาเกลียวแล้วปมตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

### 2.7.3 ศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

นำเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอล ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจากข้อ 2.7.1 มากรองด้วย GF/C ขนาด 45 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ด้วยเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานแล้วไปทดสอบการย่อยสลายฟีนอลซ้ำ ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลือ จากนั้นทำการทดลองซ้ำขั้นตอนเดิม โดยนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ 10 ครั้ง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง ว่าสามารถนำกลับมาใช้งานซ้ำอย่างต่อเนื่องได้หรือไม่ และประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลหลังการใช้งานแล้วลดลงหรือไม่

### 2.8 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การทดลองนี้เลือกใช้น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นน้ำเสียต้นแบบที่มีการปนเปื้อนของฟีนอล เนื่องจากสารประกอบฟีนอลถูกสกัดออกมาจากผลปาล์มในระหว่างกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน (แบบใช้น้ำ) จึงมีการปนเปื้อนของกลุ่มสารดังกล่าวอยู่ในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มในปริมาณมาก ซึ่งเตรียมตัวอย่างน้ำทิ้ง โดยนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกเอาตะกอนดิน และเศษวัสดุที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งออก แล้วนำไปนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้



### 2.8.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล

ศึกษาผลของปริมาณเซลล์ตรึงบน EFB ต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล โดยการแปรผันปริมาณเซลล์ตรึง 3, 9 และ 18 กรัม (ขนาด 1×1 เซนติเมตร) ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุน้ำทิ้ง 30 มิลลิลิตร ที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำทิ้งด้วยการ Autoclave เพื่อให้ได้สัดส่วน 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ซึ่งน้ำทิ้งมีปริมาณฟีนอลปนเปื้อนประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลือในน้ำทิ้งตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 2.9.2 เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ตรึงที่สัดส่วน 3:10 (w/v) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลสูงที่สุด จึงเลือกใช้สัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำเสียดังกล่าวในการทดลองต่อไป

เตรียมชุดควบคุม เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพ และเคมีต่อการลดลงของฟีนอล (abiotic controls) เช่น การดูดซับของฟีนอลบนวัสดุตรึง โดยชุดควบคุมประกอบด้วยชิ้นส่วน EFB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมในน้ำทิ้ง

### 2.8.2 ศึกษาการกระตุ้น (Activation) และการปรับตัว (Acclimation) ของเซลล์ตรึง

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงบน EFB ในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้ง จึงนำเซลล์ตรึงไปผ่านขั้นตอนการกระตุ้นด้วยฟีนอล หรือ การปรับตัวด้วยการเจือจางน้ำทิ้ง หรือวิธีการร่วมระหว่างการกระตุ้นและการปรับตัวดังนี้

#### 2.8.2.1 การกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอล

เนื่องจากกระบวนการตรึงเซลล์แบบเกาะติดที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ ต้องอาศัยระยะเวลาในการบ่มเซลล์ร่วมกับวัสดุไว้ถึง 6 วัน เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์เส้นใย EPS ในการยึดติดกับผนังของวัสดุตรึง EFB ซึ่งในกระบวนการดังกล่าว ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนใดๆ ดังนั้น ทำให้เซลล์อยู่ในภาวะขาดอาหาร และอาจส่งผลต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้ง จึงทดลองนำเซลล์ตรึงมากระตุ้นในอาหารเหลวที่มีการเติมฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการชักนำ และรักษาการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ก่อนนำไปใช้ จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาทดสอบการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกเอาตะกอน

ดินและเศษวัสดุที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งออก และผ่านการนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น ( $T_0$ ) และเวลาสุดท้าย ( $T_7$ ) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 2.9.2 จำนวนเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงเปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงที่ยังไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล

นอกจากนั้นทดสอบการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วย (กรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกเอาตะกอนดิน และเศษวัสดุที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งออก) เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 7 วัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 2.9.2 จำนวนเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง

### 2.8.2.2 การปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง

เพื่อลดความพิษจากกลุ่มของสารประกอบฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำทิ้ง ซึ่งอาจมีผลยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียตรึง จึงทดลองนำเซลล์ตรึงมาเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง โดยมีการปรับความเข้มข้นของน้ำทิ้งให้เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ทั้งนี้ เพื่อให้เวลาเซลล์ตรึงมีการปรับตัวก่อนนำไปทดสอบด้วยน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการเจือจาง ใช้สัดส่วนน้ำทิ้งที่ฆ่าเชื้อแล้วต่ออาหารเหลว CFMM 25, 50 และ 100% (v/v) ตามลำดับ โดยบ่มตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 2.9.2 จำนวนเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นชิ้นส่วน EFB ที่ปราศจากเซลล์

### 2.8.2.3 วิธีร่วมระหว่างการกระตุ้นและการปรับตัวของเซลล์ตรึง

ใช้วิธีการข้อ 2.8.2.1 ร่วมกับวิธีการข้อ 2.8.2.2 โดยนำเซลล์ตรึงมากระตุ้นในอาหารเหลวที่มีการเติมฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ตรึงมาเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง โดยมีการปรับความเข้มข้นของน้ำทิ้งให้เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ใช้สัดส่วนน้ำทิ้งที่ฆ่าเชื้อแล้วต่ออาหารเหลว CFMM 25, 50 และ 100% (v/v) ตามลำดับ โดยบ่มตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 5, 7 และ 10

เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 2.9.2 จำนวนเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นชิ้นส่วน EFB ที่ปราศจากเซลล์

จากการทดลอง 2.8.2.1 ถึง 2.8.2.3 เตรียมชุดควบคุมการทดลองทางกายภาพ และเคมีต่อการลดลงของฟีนอล (abiotic controls) เช่น การดูดซับของฟีนอลบนวัสดุตรึง โดยชุดควบคุมประกอบด้วยชิ้นส่วน EFB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

### 2.8.3 ศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

นำเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจากข้อ 2.8.2.1 มากรองด้วย GF/C (ขนาด 45 มิลลิเมตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานแล้วไปทดสอบการย่อยสลายฟีนอลซ้ำในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุน้ำทิ้ง 30 มิลลิลิตร และมีเซลล์ตรึงปริมาณ 9 กรัม จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลือ จากนั้นทำการทดลองซ้ำขั้นตอนเดิมโดยนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ 10 ครั้ง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงว่าสามารถนำกลับมาใช้งานซ้ำอย่างต่อเนื่องได้หรือไม่ และประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลหลังการใช้งานแล้วลดลงหรือไม่

## 2.9 วิธีวิเคราะห์

### 2.9.1 การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

วิเคราะห์ลักษณะน้ำทิ้งด้วยวิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสียใน Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) โดยวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่อไปนี้ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
Dissolved oxygen (DO)	Azide modification
Biological oxygen demand (BOD)	5 – day BOD test
Chemical oxygen demand (COD)	Open reflux method
ไนโตรเจน	Kjeldahl method
ฟอสฟอรัส	Persulfate / Ascorbic acid method
สารประกอบฟีนอล (phenols)	Colorimetric method

### 2.9.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค colorimetric method

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลโดยใช้วิธีมาตรฐานของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) โดยนำตัวอย่างน้ำเสียที่กรองเซลล์ตรึงออกด้วยกระดาษกรอง หรือตัวอย่างน้ำเสียที่มีเซลล์อิสระซึ่งผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที มาเติมสารดังต่อไปนี้ 0.5 นอร์มอล สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 2.5 มิลลิลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 4-อะมิโนแอนติไพรีน 1 มิลลิลิตร และ โปแตสเซียมเพอริกไซยาไนด์ 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ฟีนอล แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที โดยจะเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ฟีนอล และ 4-อะมิโนแอนติไพรีน ซึ่งเป็น color reagent ในสถานะที่มีโปแตสเซียมเพอริกไซยาไนด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น antipyrine dye ที่มีสีแดง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ฟีนอลที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

### 2.9.3 วิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย

วิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิค Alcian blue adsorption assay เนื่องจากสี alcian blue จะย้อมติดเฉพาะ exopolysaccharide ที่เซลล์ผลิต ซึ่งไม่ย้อมติดเซลล์ และวัสดุตรึง ใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman (1993) โดยการเติม 1% สารละลายสี alcian blue ลงในตัวอย่างเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเซลล์ตรึงที่บ่มทุก 24 ชั่วโมง นำไปเขย่าที่ 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และกรองเอาเซลล์ตรึงออกด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำส่วนที่เป็นอาหารเหลว (supernatant) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 606

นาโนเมตร ค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงในอาหารเหลว หลังจากสี alcian blue ถูกดูดซับโดย exopolysaccharide จะแปรผันตามค่า exopolysaccharide ที่เซลล์ผลิตขึ้น ณ เวลาต่างนั้นๆ โดยเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างในระยะเริ่มต้นตรึงเซลล์ ( $T_0$ )

#### 2.9.4 การนับจำนวนแบคทีเรีย และวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

การสกัดและนับจำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนวัสดุเศษเหลือทะเลสาบปาล์มน้ำมัน ทำตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Pattanasupong et al. (2004) ขั้นตอนแรกสกัดเซลล์แบคทีเรียให้หลุดออกจากวัสดุตรึงก่อนโดยเติมอาหารเหลว CFMM ลงในหลอดแก้วที่บรรจุเซลล์ตรึงแบคทีเรีย ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เพื่อให้เซลล์สามารถหลุดออกจากวัสดุตรึงได้ง่าย นำไป sonicate ด้วยเครื่อง Ultrasonic bath เป็นเวลา 2 นาที และเขย่าด้วยเครื่อง vortex 2 นาที จากนั้นทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์และแขวนลอยเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ก่อนนำไปวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ (1) นับจำนวนแบคทีเรีย (CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง) นำสารละลายเซลล์มาเจือจางเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี 10-fold dilution และนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี total plate count โดยการ Spread plate ซึ่งใช้ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM หลังจากนั้นนำเซลล์บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน มานับจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนีแล้วคำนวณค่า CFU ต่อกรัมวัสดุ และ (2) วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยนำสารละลายเซลล์ใส่ใน crucible นำไปชั่งน้ำหนัก และอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ชำมคั้นจนเซลล์แห้งและน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นใน โถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก นำน้ำหนักเซลล์ที่ได้มาหาส่วนต่างระหว่างน้ำหนักของสารละลายเซลล์ก่อนอบและน้ำหนักของสารละลายเซลล์หลังอบ ซึ่งจะได้เป็นปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด (Grothe et al., 1999) ผลการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าประมาณ 1.09-1.13 กรัมต่อมิลลิลิตร

#### 2.9.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำทิ้ง

วิเคราะห์ความเข้มข้นโดยใช้วิธีมาตรฐานของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งก่อนและหลังบำบัด นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดของแข็งแขวนลอย จนได้ตัวอย่างที่ใส นำตัวอย่างส่วนใสเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเจือจาง 5 เท่า วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่เหลืออยู่

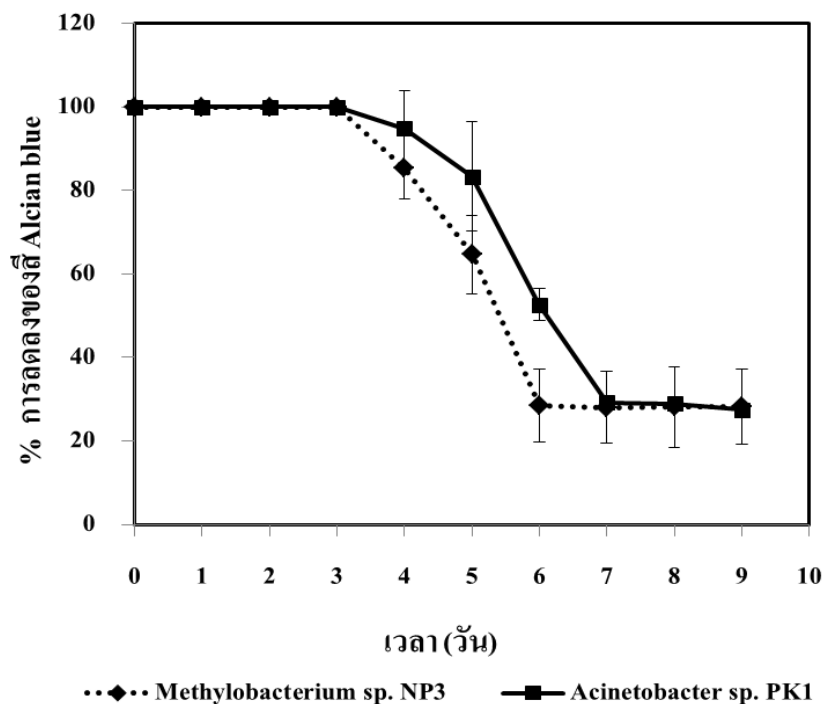
โดยเปรียบเทียบกับความเข้มสี ณ เริ่มต้นการทดลอง ได้ตัวอย่างที่ใส นำตัวอย่างส่วนใสเจือจางด้วย น้ำกลั่นที่ความเจือจาง 5 เท่า วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร เพื่อคำนวณ เปอร์เซ็นต์ความเข้มสีที่เหลืออยู่โดยเปรียบเทียบกับความเข้มสี ณ เริ่มต้นการทดลอง

### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

##### 3.1 การผลิต extracellular polymeric substance (EPS) ของแบคทีเรียแต่ละชนิด

การศึกษานี้สนใจตรงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน โดยอาศัยการเกาะติดด้วยวิธีธรรมชาติ (self-attachment immobilization) โดยอาศัยการสังเคราะห์ EPS ของเซลล์ (Vandevivere and Kirchman, 1993; Obuekwe and Al-Muttawa, 2001; Olofsson et al., 2003; Suttinun et al., 2010) ผู้วิจัยจึงเริ่มจากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิต EPS ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ในภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอน (carbon starvation) โดยนำแบคทีเรียแต่ละชนิดบ่มร่วมกับชิ้นส่วนทะเลาะเปล่าปาล์มน้ำมัน (empty fruit bunch; EFB) เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาปริมาณการผลิต EPS ของแบคทีเรียแต่ละชนิด ทั้งนี้วิเคราะห์การผลิต EPS โดยใช้วิธี Alcian blue adsorption assay ตามวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman (1993) ปริมาณ EPS ที่ผลิตขึ้นคิดจากการลดลงของค่า absorbance ที่ 606 นาโนเมตร ในสารละลายตัวอย่าง เนื่องจากสีจะถูกดูดซับโดย EPS ที่เซลล์ผลิตขึ้นมา กำหนดให้  $A_{606}$  ของวันที่เริ่มต้นทดลอง ( $T_0$ ) มีค่า baseline เท่ากับ 100% จากผลการทดลองในรูปที่ 3.1 แสดงให้เห็นว่าในช่วง 3 วันแรก ค่า  $A_{606}$  ในสารละลายตัวอย่างของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง แต่หลังจากวันที่ 3 ถึงวันที่ 6 พบการลดลงของค่า  $A_{606}$  ประมาณ 70% ในตัวอย่างของ *Methylobacterium* sp. NP3 แสดงว่าเซลล์มีการผลิต EPS เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และรวดเร็วในช่วง 3 วันดังกล่าว หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า  $A_{606}$  เริ่มคงที่ ซึ่งแสดงว่าเซลล์มีอัตราการผลิต EPS คงที่หลังจากวันที่ 6 ในขณะที่ *Acinetobacter* sp. PK1 สามารถลดสีได้ประมาณ 50% ในช่วงวันที่ 3 ถึง 6 และมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีคงที่ประมาณ 70% หลังจากวันที่ 7 นอกจากนั้นพบว่า *Methylobacterium* sp. NP3 มีอัตราในการสังเคราะห์เส้นใย EPS ได้เร็วกว่า *Acinetobacter* sp. PK1 อย่างไรก็ตาม ชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุจริงเพียงอย่างเดียว (ปราศจากเซลล์) มีการลดลงของสี alcian blue น้อยมาก ประมาณ 0-5% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยทางกายภาพ (abiotic factors) อื่นๆ เช่น การเกาะติดของสีบริเวณขวดทดลอง เป็นต้น



รูปที่ 3.1 เปอร์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่  $A_{606}$  จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 เพื่อเกาะติดบน EFB

โดยทั่วไป EPS ทำหน้าที่เสมือนกาวให้เซลล์ยึดติดกับพื้นผิวของวัสดุ และเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยให้เกิดการปกคลุมเซลล์ในรูปแบบฟิล์มชีวภาพ (biofilm) องค์ประกอบของ EPS ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ดีเอ็นเอ และไขมัน ซึ่งสัดส่วนจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และภาวะแวดล้อม (Rosche et al., 2009) อย่างไรก็ตามทั้งปริมาณ และองค์ประกอบของ EPS มีผลต่อศักยภาพในการเกาะติดของแบคทีเรียบนพื้นผิววัสดุ ทั้งนี้มีรายงานว่าในภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอน หรือมีไนโตรเจนเพียงพอ อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้าน hydrophobic ของพื้นผิวของแบคทีเรีย รวมถึงคุณสมบัติการเกาะติดพื้นผิววัสดุด้วย โดยในภาวะนี้ เซลล์จะเปลี่ยนไนโตรเจนไปเป็นโปรตีน และ amino acid ใน EPS ทำให้ค่า hydrophobicity ของเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งช่วยเพิ่มการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุด้วยเช่นกัน (Sanin et al., 2003) จากการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าทั้งแบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* และ *Methylobacterium* สามารถผลิต EPS ที่มีความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมี เช่น จีนัส *Acinetobacter* อาจผลิต EPS ที่มีองค์ประกอบ ได้แก่ D-galactose, D-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose, 3-(L-2-hydroxypropionamido)-3,6-dideoxy-D-galactose, rhamnose, 3-deoxy-3-(D-3-hydroxybutyramido)-D-quinovose, S-(+)-2-(4-sobutylphenyl) propionic acid หรือ lipopolysaccharide (Haseley et al., 1997; Kunii et al., 2001)



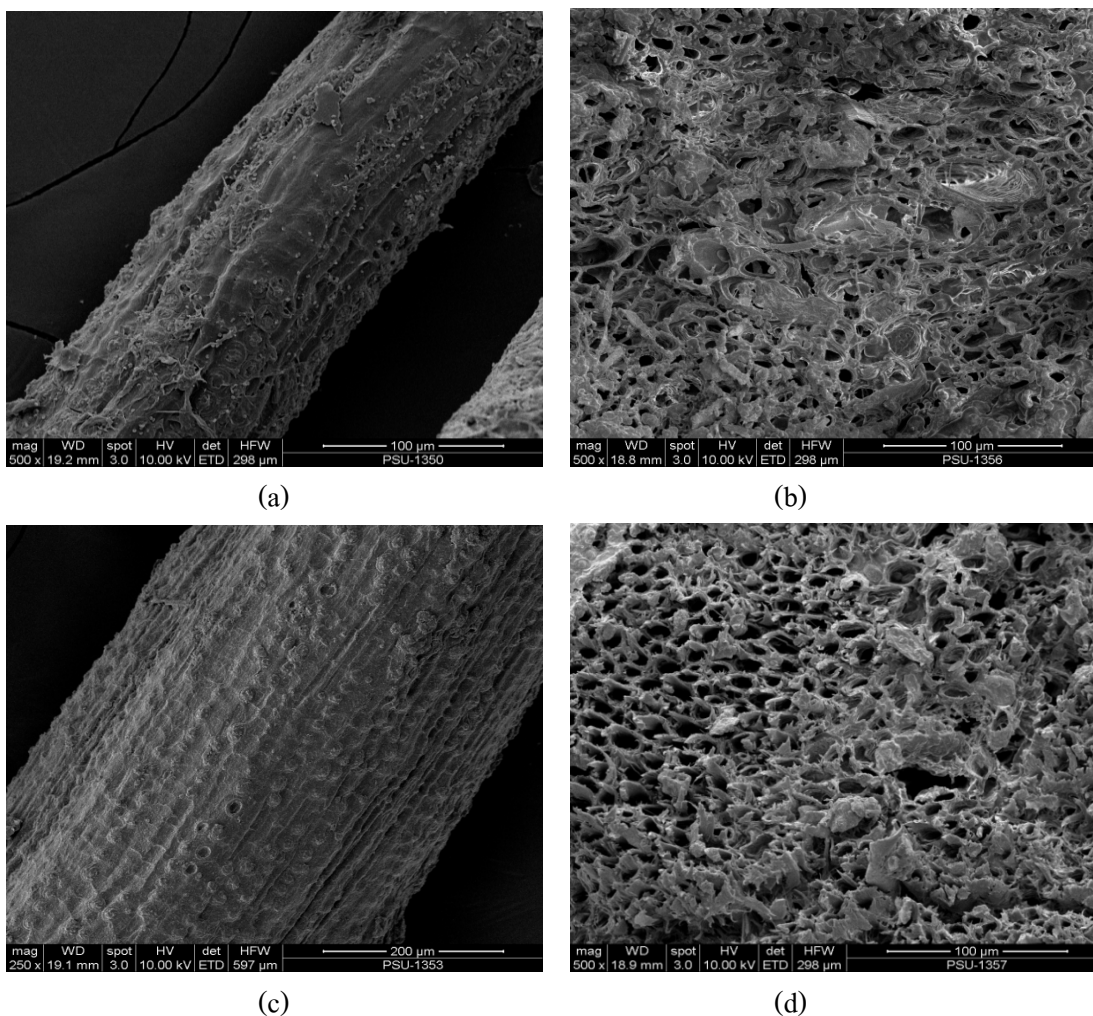
ในขณะที่ *Methylobacterium* ผลิต EPS ที่มีลักษณะเป็น slime สีชมพู ซึ่งมีองค์ประกอบหลักจำพวก  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-galactan polysaccharide (Verhoef et al., 2003) เป็นต้น

### 3.2 การพัฒนาเซลล์ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

#### 3.2.1 คุณสมบัติของวัสดุตรึงเซลล์

การทดลองนี้ใช้วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ได้แก่ เส้นใยปาล์ม น้ำมัน (pericarp fiber: PF) และทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (empty fruit bunch: EFB) ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม การใช้วัสดุตรึงเซลล์ดังกล่าว เป็นทางเลือกหนึ่งในการนำของเสียมาใช้ประโยชน์ และยังเป็นทางเลือกของเสียอีกทางหนึ่งด้วย นอกจากนี้ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตั้งชื่อ หรือสังเคราะห์วัสดุตรึงเซลล์ที่มีราคาแพง รวมทั้งมีวิธีการเตรียมวัสดุ และขั้นตอนการตรึงเซลล์ที่ไม่ยุ่งยาก จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุทั้ง 2 ชนิด โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงให้เห็นดังรูปที่ 3.2 พบว่าลักษณะพื้นผิวของวัสดุทั้งสองชนิดประกอบด้วยโครงสร้างซับซ้อน พื้นผิวก่อนข้างขรุขระ มีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายรังผึ้งดังรูปที่ 3.2 (a-d) โดยส่วนใหญ่พบจำนวนของรูพรุนในทะลายปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 3.2 c-d) มากกว่าเส้นใยปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 3.2 a-b) เล็กน้อย

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของวัสดุดังกล่าว (ตารางที่ 3.1) พบว่าวัสดุ PF (2.16%) มีปริมาณสารอาหารไนโตรเจนมากกว่า EFB (0.91%) ในขณะที่วัสดุทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณฟอสฟอรัสใกล้เคียงกัน คือประมาณ 0.21-0.22% อีกทั้งมีปริมาณคาร์บอนรวมทั้งหมด 35.93% ใน PF และ 41.49% ใน EFB อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารอาหารที่มีในวัสดุ อาจส่งผลโดยตรงต่อปริมาณการผลิต และองค์ประกอบของ EPS ที่เซลล์สร้างขึ้น ทั้งนี้ปริมาณและองค์ประกอบของ EPS มีผลต่อศักยภาพในการเกาะติดของแบคทีเรียบนพื้นผิววัสดุ นอกจากนี้พบว่าวัสดุทั้ง 2 ชนิด มีคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนเฉลี่ย (average pore diameter) และพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area) ใกล้เคียงกัน นั่นคือ มีค่าประมาณ 4.24 (EFB) และ 5.01 (PF) nm และ 4.17 (EFB) และ 5.45 (PF)  $m^2 g^{-1}$  ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม EFB มีค่าปริมาตรรูพรุนทั้งหมด (total pore volume) มากกว่า PF ถึง 64 เท่า โดย EFB มีค่าปริมาตรรูพรุนทั้งหมด 0.44  $cc g^{-1}$  ในขณะที่ PF มีค่าปริมาตรรูพรุนทั้งหมดเท่ากับ 0.0068  $cc g^{-1}$  ซึ่งค่าที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับภาพถ่าย SEM ซึ่งเห็นว่า EFB มีจำนวนรูพรุนสูงกว่า PF และจากการศึกษาประจุของพื้นผิววัสดุทั้งสองโดย zeta potential analyzer พบว่าให้ค่าประจุลบ ประมาณ -25.23 mV (EFB) และ -25.30 mV (PF)



รูปที่ 3.2 ลักษณะพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 250x-500x; เส้นใยปาล์มน้ำมัน (a-b) และทะเลาะปาล์มน้ำมัน (c-d)

หากเปรียบเทียบกับวัสดุตรงชนิดอื่นที่นำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เช่น ทราช หรือ ผงกรอง (Celite) ซึ่งมีปริมาตรรูพรุนทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง  $0.055-1.050 \text{ cc g}^{-1}$  และพื้นที่ผิวประมาณ  $3.690$  (ผงกรอง) และ  $0.755$  (ทราช)  $\text{m}^2\text{g}^{-1}$  (Wang et al., 2005) แสดงว่า EFB มีปริมาตรรูพรุนทั้งหมดระดับปานกลาง ในขณะที่ PF มีค่าดังกล่าวค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตาม วัสดุเศษเหลือทั้งสองมีพื้นที่ผิวสูงกว่าทราช และผงกรอง นอกจากนี้ Ng et al. (2004) ศึกษาการตรึง *Thiomonas* sp. บนถ่านกัมมันต์ (activated carbon) เพื่อกำจัด  $\text{H}_2\text{S}$  จากระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่าปัจจัยของพื้นที่ผิว ปริมาตรของรูพรุน และการกระจายของรูพรุนมีผลต่อการยึดเกาะ และการเจริญของเซลล์ ซึ่งทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด  $\text{H}_2\text{S}$  อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบกับวัสดุสังเคราะห์ เช่น ซิลิกา จะเห็นได้ว่าวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้น มีข้อได้เปรียบในเชิงสมบัติทางกายภาพดีกว่าเศษวัสดุเหลือใช้ โดย Khongkheam et al. (2011) รายงานว่าซิลิกาที่สังเคราะห์เพื่อใช้เป็นวัสดุตรงเซลล์ ในการย่อยสลาย

ฟินอล มีปริมาตรรูพรุนทั้งหมด  $0.87 \text{ cc g}^{-1}$  เส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนเฉลี่ย  $8.75 \text{ nm}$  และพื้นที่ผิว  $397.79 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  ซึ่งทำให้สามารถตรึงเซลล์แบคทีเรียปริมาณมากไว้ในวัสดุได้ดีกว่าวัสดุจากธรรมชาติ

### ตารางที่ 3.1 คุณสมบัติของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์

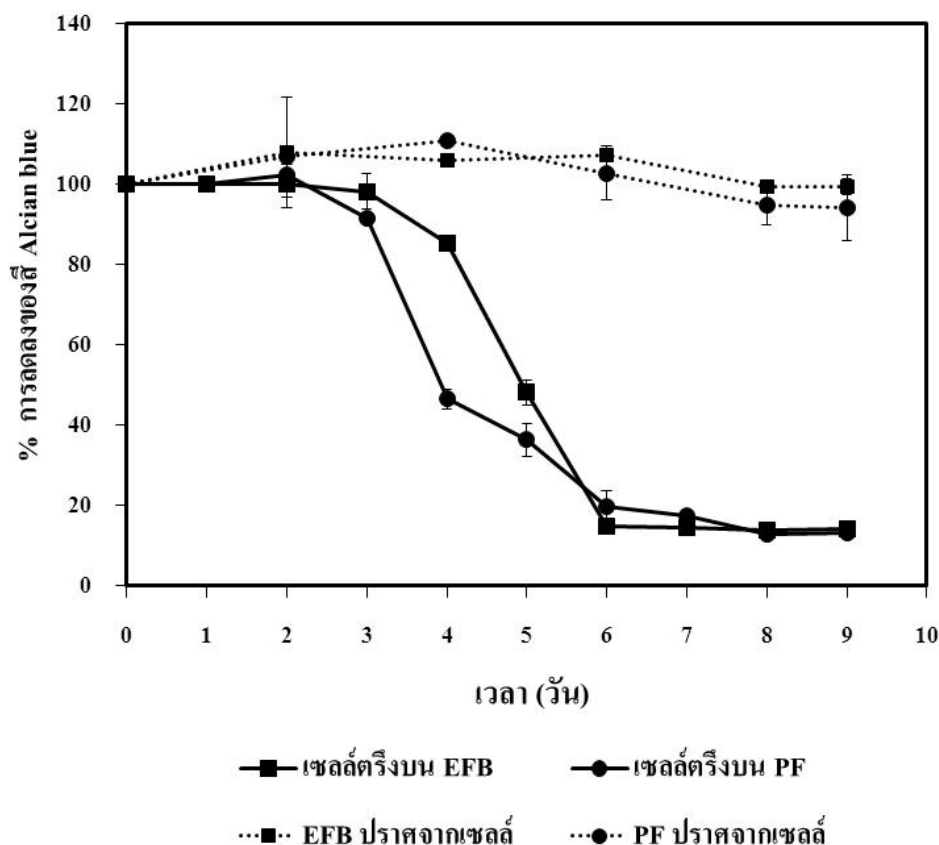
องค์ประกอบ	ชนิดของวัสดุ	
	ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (EFB)	เส้นใยปาล์มน้ำมัน (PF)
Nitrogen (%):	0.91	2.16
Phosphorus (%):	0.22	0.21
TOC (%):	41.49	35.93
Total pore volume ( $\text{cc g}^{-1}$ )	0.44	0.0068
Specific surface area ( $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ )	4.17	5.45
Average pore diameter (nm)	4.24	5.01
Zeta potential (mV)	Negative (-25.23)	Negative (-25.30)

หมายเหตุ : Zeta potential ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 = -6.27 mV, *Acinetobacter* sp. PK1 = -6.90 mV

### 3.2.2 การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

การทดลองนี้จึงสนใจศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึง โดยพิจารณาจากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้วิธี Alcian blue adsorption assay จากผลการทดลองในรูปที่ 3.3 แสดงให้เห็นว่า ในช่วง 3 วันแรก เซลล์มีการผลิต EPS ในวัสดุทั้ง 2 ชนิด ในปริมาณน้อยประมาณ 1-8% หลังจากวันที่ 3 พบว่าเซลล์แบคทีเรียผลิต EPS เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยในวันที่ 6 มีปริมาณ EPS ที่ผลิตขึ้นจากเซลล์ที่ตรึงบนวัสดุทั้ง 2 ประมาณ 80% หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีที่  $A_{606}$  เริ่มคงที่ในตัวอย่างเซลล์ตรึงบน EFB ซึ่งแสดงว่าเซลล์มีอัตราการผลิต EPS คงที่นับจากวันที่ 6 ในขณะที่เซลล์ตรึงบน PF ยังคงผลิต EPS อย่างต่อเนื่องจนเริ่มคงที่ในวันที่ 8 อย่างไรก็ตาม ชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุตรึงเพียงอย่างเดียว (ปราศจากเซลล์) มีการลดลงของสี Alcian blue น้อยมากประมาณ 0-5% ทั้งนี้สีที่ลดลงอาจเนื่องมาจากปัจจัย

ทางกายภาพอื่นๆ (abiotic factor) เช่น การเกาะติดของสปีบริเวณขวดทดลอง หรือเกิดจากกระบวนการโฟโตออกซิเดชัน (photo oxidation) เป็นต้น ดังนั้นจึงตรึงเซลล์ในช่วงเวลา 6 และ 8 วัน สำหรับเซลล์ตรึงบน EFB และ PF ตามลำดับ ก่อนนำเซลล์ตรึงไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพินอลีนในน้ำเสีย ซึ่งช่วยลดการหลุดของเซลล์จากวัสดุตรึงระหว่างการนำไปใช้



**รูปที่ 3.3** เปรอ์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่  $A_{606}$  จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรียระหว่างการตรึงเซลล์บน EFB และ PF เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการตรึงเซลล์ โดยการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เกาะติดกับวัสดุ และเซลล์อิสระที่ยังคงหลงเหลืออยู่ในอาหารเหลว ดังตารางที่ 3.2 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการตรึงเซลล์บน EFB เท่ากับ 17% ในขณะที่การตรึงเซลล์บน PF มีประสิทธิภาพน้อยกว่า ซึ่งมีค่าประมาณ 6% ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย SEM ที่แสดงว่าลักษณะแบคทีเรียที่ถูกตรึงบน EFB (รูปที่ 3.4 c-d) มีการจับตัวอย่างหนาแน่นมากกว่าแบคทีเรียที่ถูกตรึงบน PF (รูปที่ 3.4 a-b) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก EFB มีลักษณะพื้นผิวที่มีความซับซ้อน และมีความเป็นรูพรุนสูง ซึ่งช่วยในการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกาะติดของเซลล์ในวัสดุได้มากกว่า PF ดังจะเห็นได้จาก

คุณสมบัติค่า total pore volume ที่สูงมากกว่าหลายเท่า (ตารางที่ 3.1) อย่างไรก็ตาม ปริมาณ และ อัตราการผลิต EPS ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีกด้วย เช่น องค์ประกอบของวัสดุ เช่น ปริมาณอินทรีย์ คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส

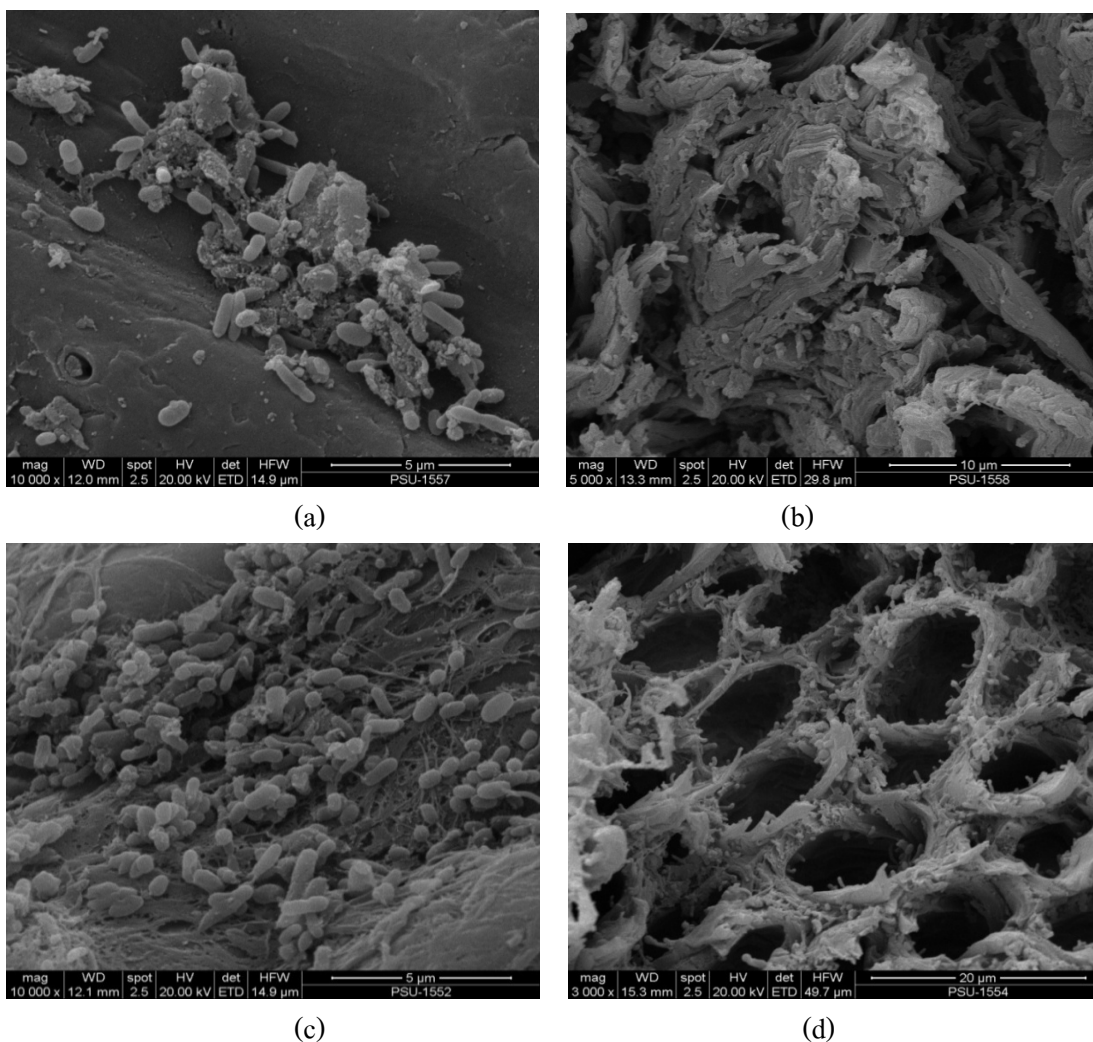
ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพการตรึงเซลล์บน EFB และ PF ที่ระยะเวลาการตรึงเซลล์ 6 และ 8 วัน

ชนิดของเซลล์ตรึง	จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน วัสดุ (0.5 กรัม) ( $\times 10^{10}$ CFU)	จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน อาหารเหลว CFMM (5 mL) ( $\times 10^{10}$ CFU)	ประสิทธิภาพการ ตรึงเซลล์ (%)
เซลล์ตรึงบน EFB	1.14	5.65	17
เซลล์ตรึงบน PF	1.81	28.4	6

จากผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งพบว่าในระหว่างกระบวนการ ตรึงเซลล์แบบเกาะติด (Attachment immobilization) เซลล์แบคทีเรียที่ถูกดูดซับบนผิววัสดุจะมีการ ตั้งโครงข่ายโครมวลขึ้นมาจากเซลล์จำพวก EPS เช่น Quek et al. (2006) รายงานว่าเซลล์ตรึง *Rhodococcus* sp. F92 บน polyurethane foam สามารถย่อยสลายอัลเคนในผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมได้ดี โดยเซลล์มีการผลิตเส้นใยจำพวก EPS ซึ่งสามารถตรวจพบโดยการส่องด้วย SEM เส้นใยเหล่านี้ทำหน้าที่ในการสร้าง monolayer ที่แข็งแรงคงทน และบางเซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ภายในเส้นใย ซึ่งช่วยให้ เกิดการเกาะติดกับพื้นผิววัสดุตรึงได้ดีขึ้น จากการศึกษานี้ของ Obuekwe and Muttawa (2001) รายงาน ว่าเซลล์ *Arthrobacter* sp. ที่ตรึงบนรำข้าว สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนใน น้ำมันดิบได้ และพบว่าเซลล์มีการสร้าง EPS ในการยึดเกาะกับวัสดุตรึง นอกจากนั้นจากการศึกษา ของ Prieto et al. (2002) รายงานว่าเซลล์ตรึง *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 บน Biolite® และ diatomaceous earth ในระบบ packed-bed reactor สามารถย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์และ น้ำเสียโรงงานผลิตเรซินได้ดี และพบว่าเซลล์มีการสร้าง EPS เป็นโครงข่ายของเส้นใยที่มีลักษณะ เป็นไบโอฟิล์ม เพื่อห่อหุ้มเซลล์ และยึดเกาะกับวัสดุตรึง

ทั้งนี้กระบวนการดูดซับ (Adsorption) ของเซลล์แบคทีเรียระหว่างการเกาะติดบนวัสดุตรึง เกิดขึ้นได้จากหลายกระบวนการ เช่น โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างกลุ่ม hydrophobic บนพื้นผิวของวัสดุ และโครงสร้างพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย (Cohen, 2001) และ/หรือความแตกต่างของประจุบนพื้นผิว (Surface charge) ของวัสดุและแบคทีเรีย จากผลการวิเคราะห์ประจุในการทดลองนี้ (ตารางที่ 3.1)

พบว่าพื้นผิวของแบคทีเรียและวัสดุตั้งทั้ง 2 ชนิด มีประจุลบ อย่างไรก็ตาม ค่าระดับประจุที่แตกต่างกันอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของกลไกการดูดซับที่เกิดขึ้นระหว่างการตรึงเซลล์

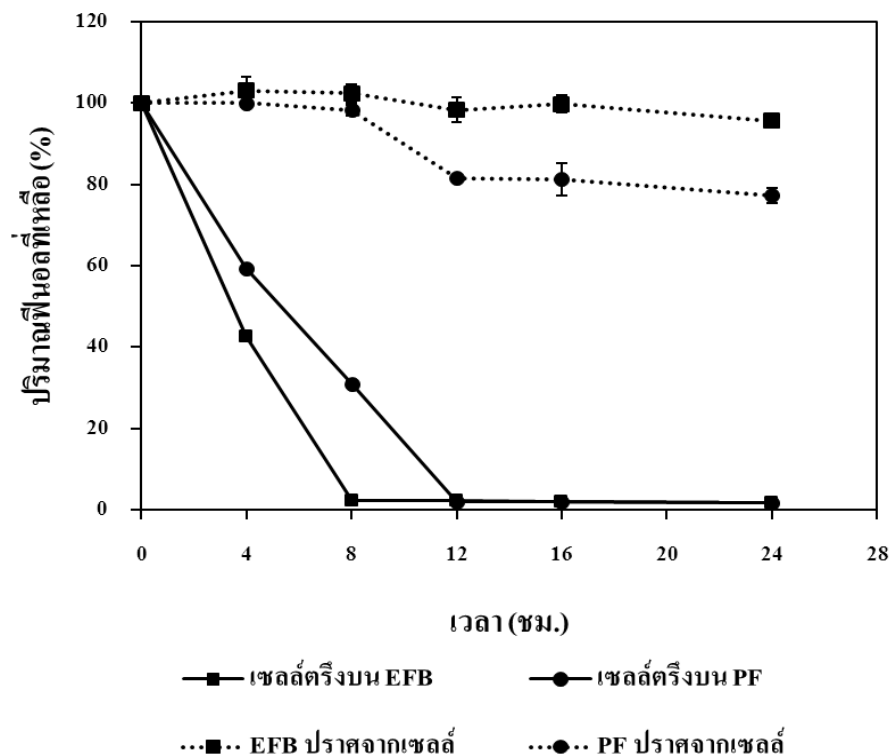


รูปที่ 3.4 การเกาะติดของเซลล์ในวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 3000x-10000x; เส้นใยปาล์มน้ำมัน (a-b) และทะเลาะปาล์มน้ำมัน (c-d)

### 3.2.3 การคัดเลือกวัสดุตั้งเซลล์

การคัดเลือกชนิดของวัสดุตั้งระหว่าง EFB และ PF เพื่อเลือกเซลล์ตั้งที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่สุด พบว่าเซลล์ตั้งบน EFB และเซลล์ตั้งบน PF สามารถลดปริมาณฟีนอล ที่ความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 98% ภายในเวลา 8 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 3.5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ตั้งบน EFB มีอัตราการกำจัดฟีนอล

สูงกว่าเซลล์ครึ่งบน PF นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุม ซึ่งประกอบด้วยวัสดุครึ่งแต่ละชนิดที่ปราศจากเซลล์ พบว่าชิ้นส่วน EFB คูดซับฟีนอลได้น้อยกว่าชุดควบคุม PF ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของวัสดุที่แตกต่างกัน เช่น ปริมาตรรูพรุนทั้งหมด พื้นที่ผิว ปริมาณคาร์บอน อาจมีผลต่อการดูดซับปริมาณฟีนอลที่แตกต่างกัน ซึ่งการดูดซับของฟีนอลโดยวัสดุครึ่งนี้ อาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลทางชีวภาพโดยแบคทีเรียต่ำลง เนื่องจากมวลของสารที่ถูกดูดซับไว้ ทำให้สารถูกกำจัดได้ยากขึ้น เพราะฉะนั้น จากผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกใช้เซลล์ครึ่งบน EFB มาใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากวัสดุดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการครึ่งเซลล์สูงกว่า PF ซึ่งช่วยส่งเสริมการย่อยสลายฟีนอลโดยจุลินทรีย์ได้ดี และดูดซับฟีนอลน้อย จึงมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสีย



รูปที่ 3.5 ปริมาณฟีนอลที่เหลือหลังจากถูกย่อยสลายโดยเซลล์ครึ่งบน EFB และ PF เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (วัสดุครึ่งที่ไม่มีเซลล์) ใช้ความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

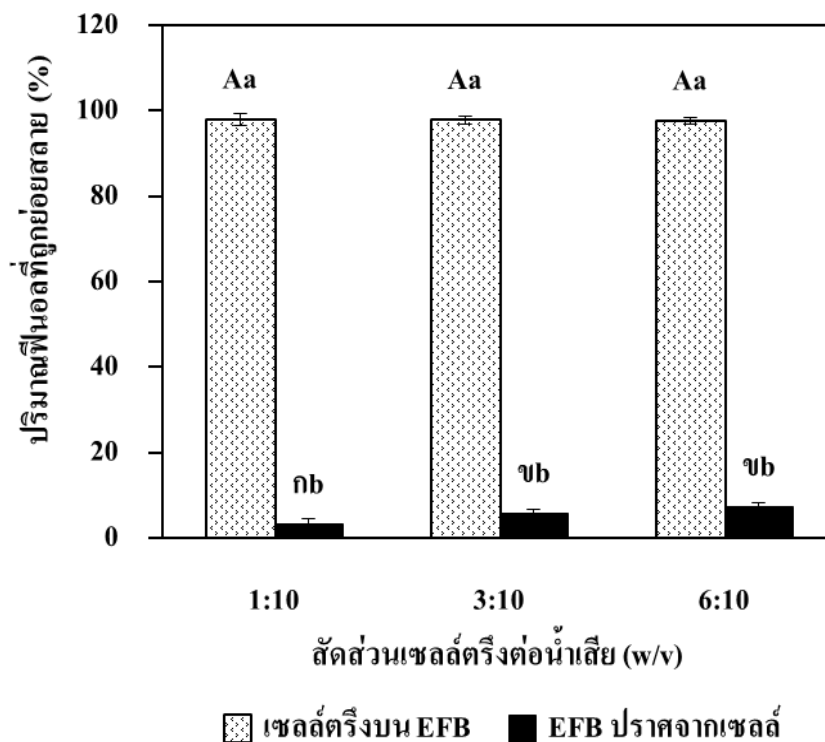
### 3.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

#### 3.3.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล

ศึกษาปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสม ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่สุด โดยแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงบน EFB 0.5, 1.5 และ 3.0 กรัม เพื่อให้ได้สัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว CFMM เท่ากับ 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) และใช้ความเข้มข้นของฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการเติมเซลล์ตรึง 0.5 กรัม (1:10 w/v) ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลสูงถึง 98% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3.6) ดังนั้นการเติมเซลล์ตรึงเพิ่มขึ้นเป็น 1.5 และ 3.0 กรัม จึงไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าปริมาณเซลล์ 0.5 กรัม หรือสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว 1:10 มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเพียงพอในการย่อยสลายมวลของฟีนอลที่เติมลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งปริมาณเซลล์ที่มากเกินไป อาจทำให้เกิดข้อจำกัดในการแพร่ผ่านของสารฟีนอล และออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ตรึง รวมถึงการเติมปริมาณเซลล์ตรึงเพิ่มขึ้น อาจทำให้เกิดการดูดซับของฟีนอลในเซลล์ และวัสดุตรึงมากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อความยั่งยืนในการย่อยสลายฟีนอลทางชีวภาพได้ ในขณะที่หูดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุปราศจากเซลล์มีฟีนอลลดลงประมาณ 3-7% ซึ่งเกิดจากปัจจัยทาง abiotic จะเห็นว่าเมื่อมีปริมาณวัสดุมากขึ้นจะทำให้ปริมาณฟีนอลถูกกำจัดมากขึ้น และสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว 1:10 (w/v) มีการกำจัดฟีนอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว 3:10 และ 6:10 (w/v)

เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้สัดส่วนของเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลวที่ 1:10 (w/v) มาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ในขั้นตอนต่อไป อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการทดลองนี้ไม่ได้มีการศึกษาการใช้เซลล์ตรึงต่ออาหารเหลวในปริมาณน้อยกว่าสัดส่วน 1:10 (w/v) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าถ้าใช้ปริมาณเซลล์ตรึงน้อยกว่านี้ ประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลอาจยังมีค่าใกล้เคียงกับสัดส่วนข้างต้น ซึ่งแสดงว่าเซลล์ตรึงมีความสามารถในการย่อยสลายฟีนอลได้ดีถึงแม้จะใช้ในปริมาณน้อย



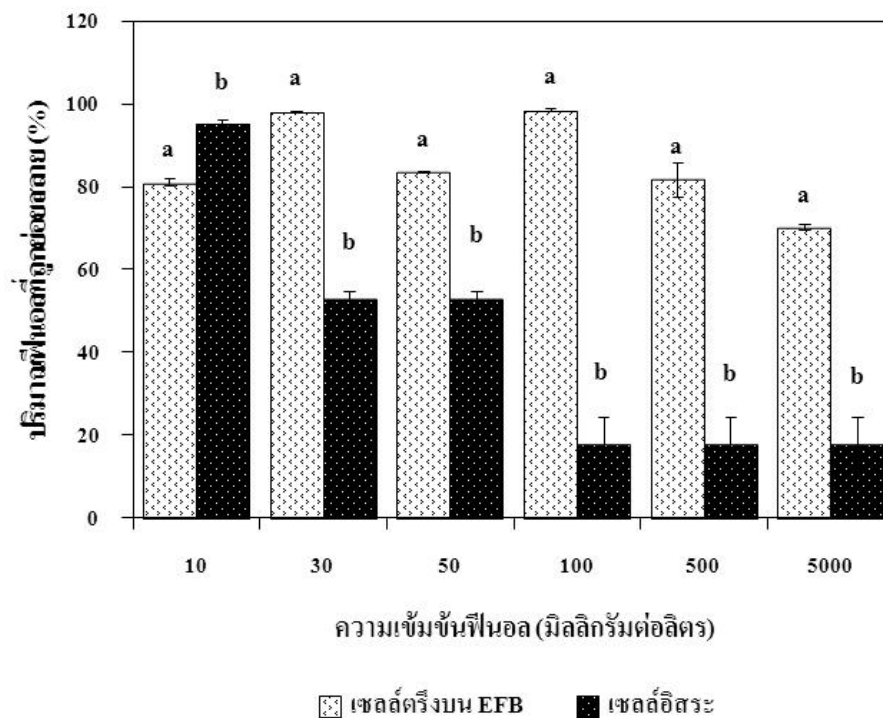


รูปที่ 3.6 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของสัดส่วนเซลลูล์ตรึงบน EFB ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) โดยมีความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

หมายเหตุ: เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างสัดส่วนเซลลูล์ตรึงต่ออาหารเหลว 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ของเซลลูล์ตรึงบน EFB มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่แตกต่างกัน, เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างเซลลูล์ตรึงบน EFB และชุดควบคุม EFB ปราศจากเซลลูล์ในแต่ละสัดส่วนเซลลูล์ตรึงต่ออาหารเหลว มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กแตกต่างกัน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างสัดส่วนเซลลูล์ตรึงต่ออาหารเหลว 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ของ EFB ปราศจากเซลลูล์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาไทยแตกต่างกัน (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $P < 0.05$ )

### 3.3.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

นำเซลล์ตรึงบน EFB มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีการแปรผันความเข้มข้นฟีนอลตั้งแต่ 10, 30, 50, 100, 500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ( $10^8$  CFU/มิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้นฟีนอลดังกล่าวข้างต้น ในด้านประสิทธิภาพของเปอร์เซ็นต์การลดลงของฟีนอล (% phenol removal) ค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอล (first-order degradation rate constant:  $k_1$ ) และอัตราการย่อยสลายฟีนอลจำเพาะสูงสุด (maximum specific degradation rate:  $k_2$ ) ซึ่ง  $k_1$  และ  $k_2$  เป็นพารามิเตอร์ที่ช่วยให้สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสองระบบได้ชัดเจนขึ้น ในกรณีปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเซลล์ตรึง และเซลล์อิสระอาจไม่เท่ากัน จากผลการทดลอง (รูปที่ 3.7 และตารางที่ 3.3) แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์อิสระสามารถบำบัดฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์ตรึง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยสามารถลดปริมาณฟีนอลได้ 95% และ 80% ตามลำดับ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า  $k_1$  เท่ากับ 0.38 และ 0.31  $h^{-1}$  และมีค่า  $k_2$  เท่ากับ 0.0010 และ 0.0013 มิลลิกรัมฟีนอลต่อมิลลิกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นฟีนอลเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 30–5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงสามารถกำจัดฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์อิสระซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยเซลล์ตรึงมีค่าการย่อยสลายฟีนอลประมาณ 70-98% มีค่า  $k_1$  และค่า  $k_2$  อยู่ในช่วงระหว่าง 0.0019-0.048  $h^{-1}$  และ 0.0007–0.0360 มิลลิกรัมฟีนอลต่อมิลลิกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 17-52% ซึ่งมีค่า  $k_1$  และค่า  $k_2$  อยู่ในช่วงระหว่าง 0.0017–0.03  $h^{-1}$  และ 0.0001–0.0060 มิลลิกรัมฟีนอลต่อมิลลิกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

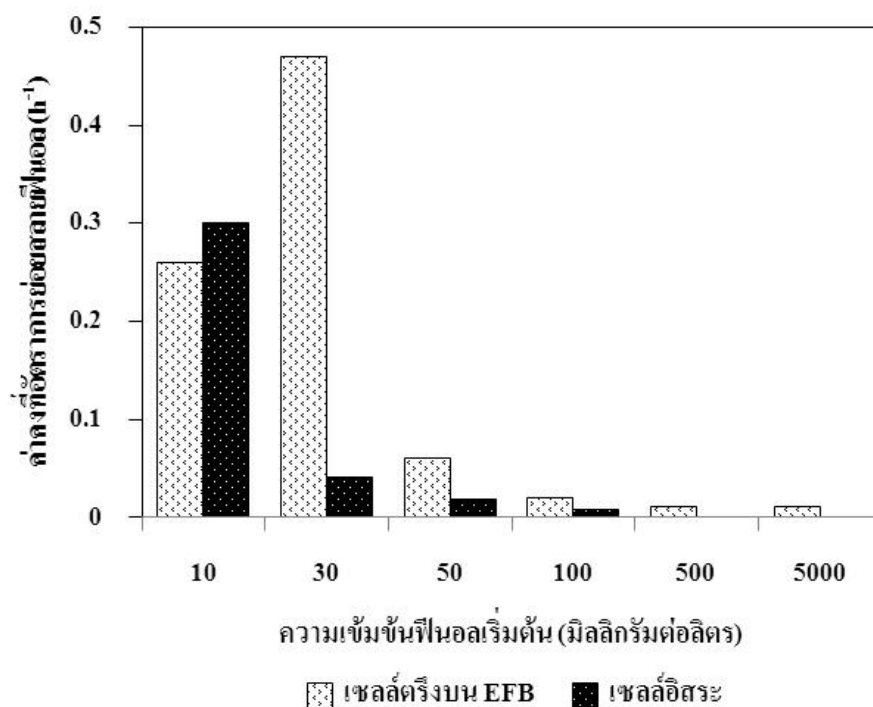


รูปที่ 3.7 ปริมาณฟีนอลที่เหลือหลังจากถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ (free cells) โดยทดลองที่ความเข้มข้นฟีนอล 10 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นฟีนอล 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นฟีนอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง และความเข้มข้นฟีนอล 500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง

หมายเหตุ: เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างเซลล์ตรึงบน EFB และเซลล์อิสระในแต่ละความเข้มข้นฟีนอล มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $P < 0.05$ ) เมื่อตัวอักษรแตกต่างกัน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง และเซลล์อิสระในการกำจัดฟีนอลในเชิง % การกำจัด ค่า  $k_1$  และ  $k_2$  มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน นั่นคือ เมื่อความเข้มข้นฟีนอลต่ำประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์อิสระมีค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงกว่าเซลล์ตรึง อาจเป็นไปได้ว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวมวลของฟีนอลจะแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ตรึงได้น้อยและช้า เนื่องจากเซลล์ตรึงมีข้อจำกัดในการแพร่ผ่านของสาร (Wang et al., 2007; Passos et al., 2010) ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถสัมผัสกับฟีนอลได้โดยตรง จึงทำให้การกำจัดฟีนอลที่ความเข้มข้นดังกล่าวเกิดขึ้นได้ดีกว่า แต่เมื่อความเข้มข้นฟีนอลสูงกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์อิสระมีค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอลต่ำกว่าเซลล์ตรึง (รูปที่ 3.8) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากฟีนอลที่ความ

เข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการเจริญหรือการทำงานหรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์อิสระ ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลลดลง ในขณะที่เซลล์ตรึงมีวัสดุตรึงทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากความเข้มข้นฟีนอลสูงได้ จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์อิสระ



รูปที่ 3.8 ค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB และเซลล์อิสระที่ฟีนอลความเข้มข้นต่างๆ

ผลการศึกษามีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งรายงาน bahwa เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าเซลล์อิสระ เช่น จากการศึกษาการใช้โพลียูรีเทนโฟม (polyurethane foam) ตรึง *Acinetobacter* sp. พบว่าเซลล์ที่มีการตรึงจะสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของฟีนอล 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 19.7 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม (เซลล์อิสระ) ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นของฟีนอล 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Adav et al., 2007) จากการศึกษาตรึงเซลล์ *Acinetobacter* sp. XA05 และ *Sphingomonas* sp. FG03 บน polyvinyl alcohol (PVA) โดยใช้เชื้อที่แยกจากกากตะกอนเร่ง (Activated sludge) ซึ่งได้ทำการศึกษากการย่อยสลายฟีนอลเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึง พบว่าเซลล์ที่ไม่ตรึงบน PVA (เซลล์อิสระ) มีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 0.95 มิลลิกรัมฟีนอลต่อชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่ตรึงบน PVA มีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 1.20 มิลลิกรัมฟีนอลต่อชั่วโมง (Liu et al., 2009) และจากรายงานการใช้เม็ดปิดตรึงกากตะกอนเร่ง พบว่าเซลล์ตรึงมีการ

ย่อยสลายฟีนอลได้ในช่วงความเข้มข้นของฟีนอล 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายมากกว่า 95% ในเวลา 28 ชั่วโมง ทั้งนี้เซลล์อิสระถูกยับยั้งการย่อยสลายที่ความเข้มข้นของฟีนอล 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในขณะที่เซลล์ตรึงไม่ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นดังกล่าว (Lee et al., 2009) จากรายงานการตรึง *Aspergillus awamori* สายพันธุ์ NRRL 3112 บน polyacrylonitrile membrane พบว่าเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 1.16 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ (Yordanova et al., 2009) นอกจากนี้จากรายงานการศึกษาของ Ahmad et al. (2012) พบว่าเซลล์ตรึง *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ AQ5NOL 1 ใน gellan gum สามารถย่อยฟีนอลได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 108, 216 และ 240 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นฟีนอล 1,100, 1,500 และ 1,900 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระย่อยสลายฟีนอลได้สมบูรณ์ภายในเวลา 240 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นฟีนอล 1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร

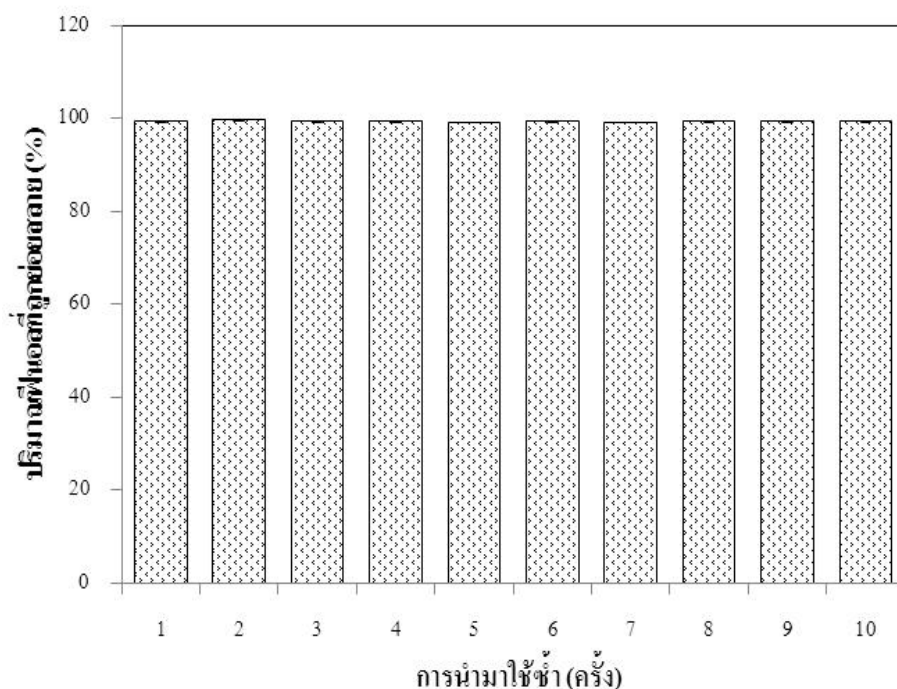
### ตารางที่ 3.3 อัตราการย่อยสลายจำเพาะของฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อัตราการย่อยสลายฟีนอลจำเพาะ (มิลลิกรัมฟีนอลต่อมิลลิกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง)	
	เซลล์ตรึงบน EFB	เซลล์อิสระ
10	0.0013	0.0010
30	0.0360	0.0012
50	0.0013	0.0004
100	0.0007	0.0001
500	0.0029	0.0007
5,000	0.0250	0.0060

#### 3.3.3 การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

เมื่อนำเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทดสอบการนำกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงว่าสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลค่อนข้างคงที่ประมาณ 98% ภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อผ่านการใช้ซ้ำ 10 ครั้ง (รูปที่ 3.9) ทั้งนี้เซลล์ตรึงยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้เท่ากับเซลล์ตรึงที่เพิ่งใช้งานครั้งแรก ซึ่งช่วยลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ และจากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ

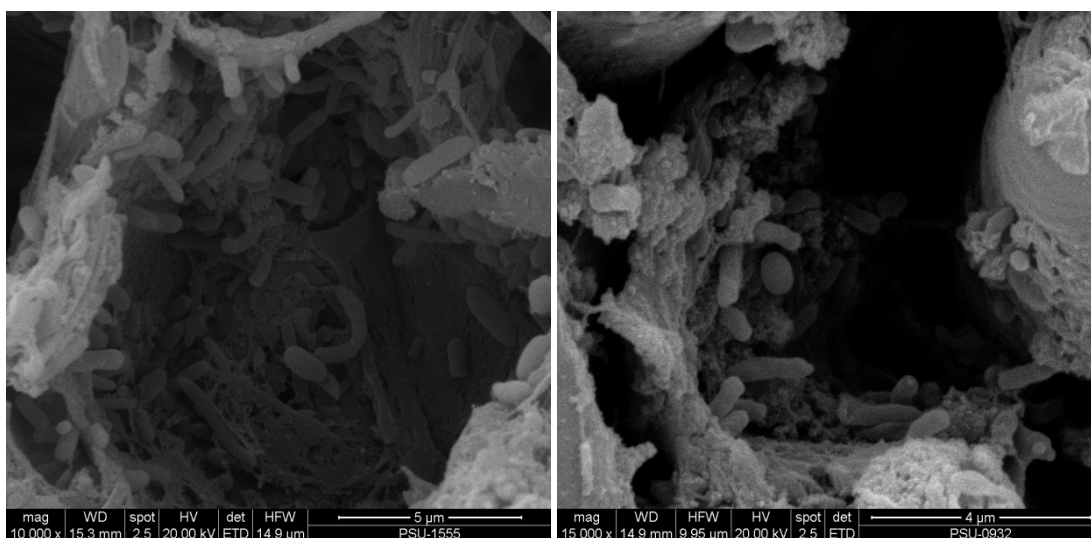
พื้นผิววัสดุและเซลล์ตรึงหลังจากการใช้ซ้ำ ด้วยเทคนิค SEM แสดงให้เห็นว่าวัสดุมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย และยังมีปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงหลงเหลืออยู่บนวัสดุ ดังรูปที่ 3.10 นอกจากนี้ผลการทดสอบการเก็บเซลล์ตรึงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ตรึงที่เก็บไว้สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 90% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง แสดงว่าเซลล์ตรึงที่เก็บรักษาไว้ยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ใกล้เคียงกับเซลล์ตรึงที่เพิ่งเตรียมใหม่ อาจมีสาเหตุมาจากเซลล์ตรึงมีความเสถียร และวัสดุตรึงสามารถปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม รวมทั้งจากการปนเปื้อนได้ดี ในขณะที่การเก็บเซลล์ตรึงที่อุณหภูมิห้องอาจมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่าย เนื่องจากแบคทีเรีย และเชื้อราหลายชนิดสามารถเจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิห้อง



รูปที่ 3.9 ปริมาณฟีนอลที่ถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB หลังจากผ่านการใช้งานแล้ว 10 ครั้ง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติมฟีนอล

จากการศึกษาของ Obuekwe and Al-Muttawa (2001) พบว่าเซลล์แบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. ตรึงบนขี้เลื่อย Styrofoam และรำข้าวสาลี สามารถรักษาประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอน หลังจากเก็บเซลล์ตรึงไว้ยาวนาน 6 สัปดาห์ที่ 45 องศาเซลเซียส Liu et al. (2009) รายงานว่าเซลล์ตรึง *Acinetobacter* sp. XA05 และ *Sphingomonas* sp. FG03 บน polyvinyl alcohol

(PVA) สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งยังสามารถลดปริมาณฟีนอลได้ 93% หลังจากเก็บไว้ 50 วัน แต่เซลล์อิสระจะมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลลดลงหลังจากที่เก็บไว้ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการตรึงเซลล์สายพันธุ์ XA05 และ FG03 สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างน้อย 20 ครั้ง จากรายงานของ Ying et al. (2007) ใช้ polyvinyl alcohol (PVA) ในการตรึงเซลล์ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ PD 12 พบว่าสามารถเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล ได้นาน 50 วัน นอกจากนี้การศึกษาของ Ahmad et al. (2012) พบว่าเซลล์ตรึง *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ AQ5NOL 1 ใน gellan gum สามารถรักษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลโดยนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 45 ครั้ง



(a)

(b)

**รูปที่ 3.10** ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิว EFB และเซลล์ที่ถูกตรึงวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM ที่กำลังขยาย 10000x-15000x; ก่อนการย่อยสลายฟีนอล (a) และหลังการนำกลับมาใช้ย่อยสลายฟีนอลซ้ำจำนวน 5 ครั้ง (b)

### 3.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

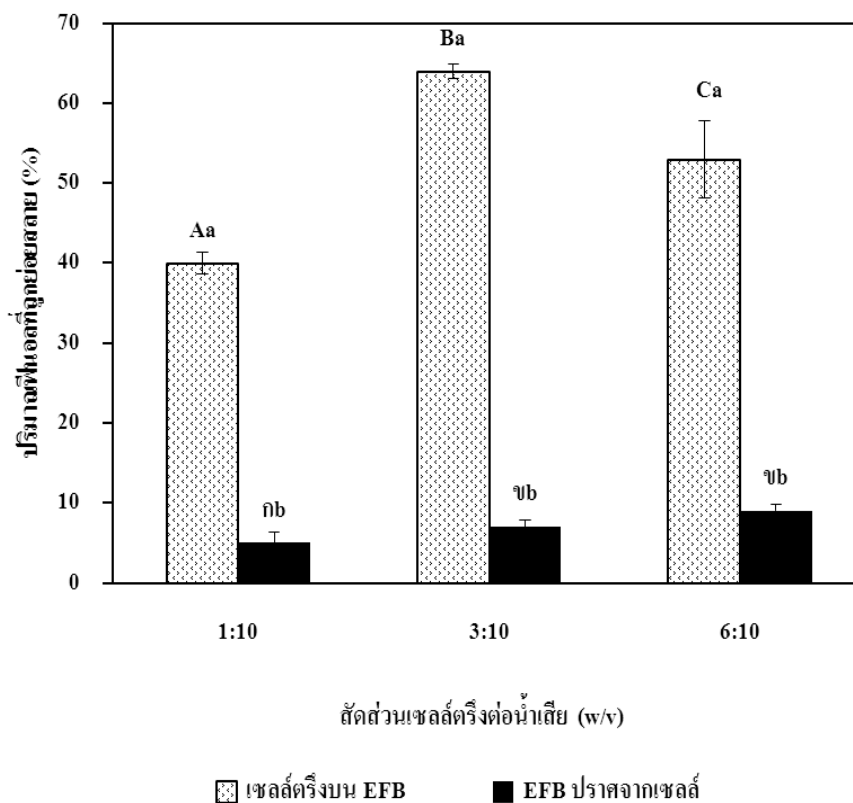
การทดลองนี้เลือกใช้น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นน้ำเสียต้นแบบที่มีการปนเปื้อนของฟีนอล ปาล์มน้ำมันถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มดิบก่อให้เกิดน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์สูง มีสีคล้ำ ซึ่งส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจากสารประกอบฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสีย ซึ่งสารประกอบฟีนอลถูกสกัดออกมาจากผลปาล์มในระหว่างกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน (แบบใช้น้ำ) จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาเทคโนโลยี

ที่มีประสิทธิภาพ ราคาถูก และไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในการจัดการปัญหาน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม

### 3.4.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล

เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำทิ้งที่มีปริมาณสารอินทรีย์ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งมีการเพิ่มขนาดของวัสดุที่ใช้ตรึงให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้งานบำบัดน้ำเสีย จึงต้องทำการแปรผันปริมาณของเซลล์ตรึงต่อสัดส่วนน้ำทิ้งเพิ่มเติม โดยการแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้ง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ทดสอบในน้ำทิ้งที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาว่าปริมาณเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้งที่อัตราส่วนใดมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่สุด ผลการทดลองพบว่าสัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้ง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) สามารถย่อยสลายฟีนอลได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ 40%, 64% และ 53% ตามลำดับ (รูปที่ 3.11) ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าปริมาณเซลล์ตรึง 3 กรัม หรือสัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้ง 3:10 (w/v) มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเหมาะสมเพียงพอในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหาร CFMM พบว่าสัดส่วนเซลล์ตรึงที่เหมาะสมสำหรับน้ำทิ้งที่มีปริมาณมากกว่าความต้องการในอาหารเหลว ซึ่งใช้เพียงสัดส่วน 1:10 (w/v) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในการทดลองนี้มีการเพิ่มขนาดของวัสดุตรึงที่ใช้จาก 0.5-1 มิลลิเมตร เป็น 1x1x1 เซนติเมตร ซึ่งขนาดที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลต่อปริมาณการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุ และอัตราการแพร่ผ่านของสารเข้าสู่เซลล์ตรึง และอีกปัจจัยหนึ่ง ได้แก่ องค์ประกอบของน้ำทิ้ง อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง ดังนั้นจึงนำอัตราส่วนของเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้งที่ 3:10 (w/v) มาศึกษาในการทดลองต่อไป สำหรับชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพและเคมีต่อการลดลงของฟีนอล (abiotic controls) พบว่าชุดควบคุม EFB ปราศจากเซลล์ดูดซับฟีนอลได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่สัดส่วน EFB ต่อน้ำทิ้ง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) คือ 3, 7 และ 9% ตามลำดับ (รูปที่ 3.11) ซึ่งที่สัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้ง 1:10 (w/v) มีการกำจัดฟีนอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้ง 3:10 และ 6:10 (w/v)





**รูปที่ 3.11** ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเซลล์ตริงบน EFB โดยการแปรผันปริมาณของเซลล์ตริงที่สัดส่วนต่างๆ

หมายเหตุ: เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างสัดส่วนเซลล์ตริงต่อน้ำทิ้ง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ของเซลล์ตริงบน EFB มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่แตกต่างกัน, เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างเซลล์ตริงบน EFB และชุดควบคุม EFB ปราศจากเซลล์ในแต่ละสัดส่วนเซลล์ตริงต่อน้ำทิ้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กแตกต่างกัน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างสัดส่วนเซลล์ตริงต่อน้ำทิ้ง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ของ EFB ปราศจากเซลล์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาไทยแตกต่างกัน (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $P < 0.05$ )

### 3.4.2 ผลการกระตุ้น (Activation) และการปรับตัว (Acclimation) ของเซลล์ตรึง

#### 3.4.2.1 การกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอล

ศึกษาผลการกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้ง โดยการนำเซลล์ตรึงบน EFB มากระตุ้นด้วยฟีนอลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร CFMM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้การกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอลจะเป็นการชักนำ และรักษาการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ก่อนนำไปใช้ เนื่องจากในขั้นตอนการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ต้องอาศัยระยะเวลาในการบ่มเซลล์ร่วมกับวัสดุไว้ถึง 6 วัน เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์เส้นใย EPS ในการยึดติดกับผนังของวัสดุตรึง ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนใดๆ ดังนั้นทำให้เซลล์อยู่ในภาวะขาดแคลนอาหาร และอาจส่งผลต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้ง จากการทดลองพบว่าเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลสามารถลดปริมาณฟีนอลในน้ำทิ้งได้ 64% ภายในเวลา 7 วัน ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดฟีนอลได้สูงกว่าเซลล์ตรึงที่ยังไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งลดฟีนอลได้เพียง 35% (ตารางที่ 3.5)

นอกจากนั้นผลการทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเซลล์ตรึงบน EFB ยังสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 71% ภายในเวลา 7 วัน ซึ่งสูงกว่าการใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อเล็กน้อย อาจเป็นผลเสริมมาจากจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ที่มีอยู่เดิมในน้ำทิ้ง

จากการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียในวันเริ่มต้นและหลังการบำบัดพบว่า ในวันที่ 0 ของการทดลอง เซลล์ตรึงมีจำนวนแบคทีเรีย  $2.27 \times 10^{10}$  CFU/กรัมวัสดุ และหลังการทดลองผ่านไป 7 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ  $4.83 \times 10^{10}$  CFU/กรัมวัสดุ และพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียในน้ำทิ้งเท่ากับ  $2.0 \times 10^{10}$  CFU/มิลลิลิตร โดยพบว่าเซลล์ตรึงมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณฟีนอล และสารอินทรีย์ในรูป BOD และ COD ในน้ำทิ้งลดลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอล โดยใช้ฟีนอล รวมทั้งสารอินทรีย์อื่นๆ ในน้ำทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโต

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อน และหลังการบำบัดด้วยเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล

พารามิเตอร์	*ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง	**ก่อนบำบัด	หลังบำบัด
pH	5.5-9.0	8.2	7.9
BOD (มก./ล.)	ไม่เกิน 60 มก./ล.	725	61.5
COD (มก./ล.)	ไม่เกิน 400 มก./ล.	10,296	1,355
TKN (มก./ล.)	ไม่เกิน 200 มก./ล.	210	64
TP (มก./ล.)	-	17.2	16.2
Oil & Grease (มก./ล.)	ไม่เกิน 15 มก./ล.	30	5
Phenols (มก./ล.)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	30	8
Color (%)	-	100	75

ที่มา: \*ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) ลงวันที่ 3 มกราคม 2539 เรื่องกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 13 ลงวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2539

\*\* น้ำทิ้งจาก โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จังหวัดสตูลเก็บตัวอย่างวันที่ 29 มีนาคม 2554

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งก่อนและหลังการบำบัดดังตารางที่ 3.4 พบว่า ปริมาณ COD ลดลงประมาณ 87% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 10,296 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือประมาณ 1,355 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณ BOD ลดลงประมาณ 92% จาก 725 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 61.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นข้อดีของการบำบัดน้ำทิ้งด้วยเซลล์ตรึงบน EFB ด้วยวิธีการนี้ ทั้งนี้ พบว่าค่า pH หลังการบำบัดเท่ากับ 7.94 ค่า TKN, TP และ Oil & Grease หลังการบำบัดเท่ากับ 64, 16.2 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้น นอกจากค่า COD แล้ว พบว่าค่าพารามิเตอร์อื่นมีค่า อยู่ในเกณฑ์ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง นอกจากนั้นพบว่าหลังการบำบัดสามารถลดความเข้มข้นของสารที่เกิดจากสารประกอบฟีนอลลงได้ประมาณ 25% (ตารางที่ 3.4) อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการบำบัดฟีนอลลดลง เมื่อเทียบกับการศึกษาในอาหารเหลว CFMM เนื่องจากในองค์ประกอบของน้ำทิ้งยังมีสารประกอบในกลุ่มฟีนอลชนิดอื่นๆ รวมอยู่ด้วย ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของเซลล์ตรึง ในขณะที่การศึกษาในอาหารเหลวมีเฉพาะฟีนอลเพียงชนิดเดียว

### 3.4.2.2 การปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง

ศึกษาผลการปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยการเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง โดยการนำเซลล์ตรึงบน EFB มาย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งที่มีการปรับความเข้มข้นของน้ำทิ้งให้เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เพื่อให้เวลาเซลล์ตรึงมีการปรับตัวก่อนนำไปทดสอบด้วยน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการเจือจาง เนื่องจากในน้ำทิ้งยังมีอนุพันธ์ของฟีนอลเป็นองค์ประกอบด้วย ซึ่งอนุพันธ์ของฟีนอลบางชนิดแม้ว่าจะมีความเข้มข้นต่ำ ก็อาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์ตรึง และสามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์ได้ โดยใช้สัดส่วนน้ำทิ้งที่ฆ่าเชื้อแล้วต่ออาหารเหลว CFMM 25, 50 และ 100% (v/v) ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าที่สัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 25% เซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 13, 23 และ 29% ที่เวลา 1, 3 และ 5 วัน และสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 50% เซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 29, 50 และ 51% ที่เวลา 1, 3 และ 5 วัน และสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 100% เซลล์ตรึงสามารถลดฟีนอลได้ 30, 41, 52 และ 54% ภายในระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน (ตารางที่ 3.5) ซึ่งที่สัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว 25% มีประสิทธิภาพการกำจัดฟีนอลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 50% และ 100% ณ วันสิ้นสุดการทดลอง และเมื่อใช้เซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการปรับตัว พบว่าเซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 35% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำทิ้งมีผลยับยั้งการทำงานของเซลล์ตรึง จึงทำให้เซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการปรับตัว มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลลดน้อยกว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการปรับตัวด้วยการเลี้ยงในน้ำทิ้งเจือจางก่อน

จากการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าจุลินทรีย์ที่ผ่านขั้นตอนการปรับตัว จะมีความสามารถในการย่อยสลายมลพิษเพิ่มขึ้น ดังรายงานของ Lu et al. (2009) ซึ่งใช้เชื้อราขาว (white rot fungus) ตรึงบนเศษไม้ เพื่อย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตโค้ก โดยทำการปรับสภาพเชื้อราในน้ำทิ้งเจือจาง 50% ก่อน พบว่าเชื้อราสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ 87% ภายในเวลา 6 วัน และจากการศึกษาของ Gonzalez et al. (2001) รายงานการย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียโรงงานผลิตเรซิน โดย *Pseudomonas putida* ATCC 17484 ตรึงบน calcium alginate gel ซึ่งมีความเข้มข้นฟีนอลประมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงลดปริมาณฟีนอลจาก 340 ชั่วโมง (ปรับสภาพเซลล์ครั้งที่ 1) เหลือ 260 ชั่วโมง หลังจากการปรับสภาพเซลล์ครั้งที่ 2 ด้วยการเจือจางน้ำเสีย

ตารางที่ 3.5 ปริมาณฟีนอลที่ลดลง (%) โดยใช้เซลล์ตรึงด้วยวิธีต่างๆ

วิธี	สัดส่วนน้ำทิ้งต่อ อาหารเหลว CFMM	*ปริมาณฟีนอลที่ ลดลง (%)	เวลาที่ใช้ในการย่อย สลายฟีนอล (วัน)
Non activation	100: 0	35 <sup>A</sup>	7
Activation	100: 0	64 <sup>B</sup>	7
Acclimation	25:75	29 <sup>a</sup>	5
	50: 50	51 <sup>b</sup>	5
	100:0	53 <sup>Cb</sup>	7
Activation and Acclimation	25: 75	52 <sup>a</sup>	5
	50: 50	65 <sup>b</sup>	7
	100: 0	72 <sup>D b</sup>	10

\* เปรียบเทียบระหว่างวิธีไม่ผ่านการกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอล (Non activation) และวิธีการกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอล (Activation) วิธีการปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยการเจือจางน้ำทิ้ง (Acclimation) และวิธีร่วมระหว่างการกระตุ้นและการปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง (Activation and Acclimation) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $P < 0.05$ ) เมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่แตกต่างกัน และเปรียบเทียบระหว่างวิธีการปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยการเจือจางน้ำทิ้ง (Acclimation) และวิธีร่วมระหว่างการกระตุ้นและการปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง (Activation and Acclimation) ที่สัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 25%, 50% และ 100% ที่ชุดการทดลองเดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กแตกต่างกัน

### 3.4.2.3 ผลการกระตุ้นร่วมกับการปรับตัวของเซลล์ตรึง

ศึกษาผลการกระตุ้นและการปรับตัวของเซลล์ตรึง โดยการนำเซลล์ตรึงบน EFB มากระตุ้นด้วยฟีนอลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง โดยมีการปรับความเข้มข้นของน้ำทิ้งให้มากขึ้นอย่างช้าๆ ใช้สัดส่วนน้ำทิ้งที่ฆ่าเชื้อแล้วต่ออาหารเหลว CFMM 25, 50 และ 100% (v/v) ตามลำดับ จากการทดลอง พบว่าหลังการกระตุ้นด้วยฟีนอล แล้วนำเซลล์ตรึงไปปรับตัวในน้ำทิ้งที่เจือจางตั้งแต่ 25-

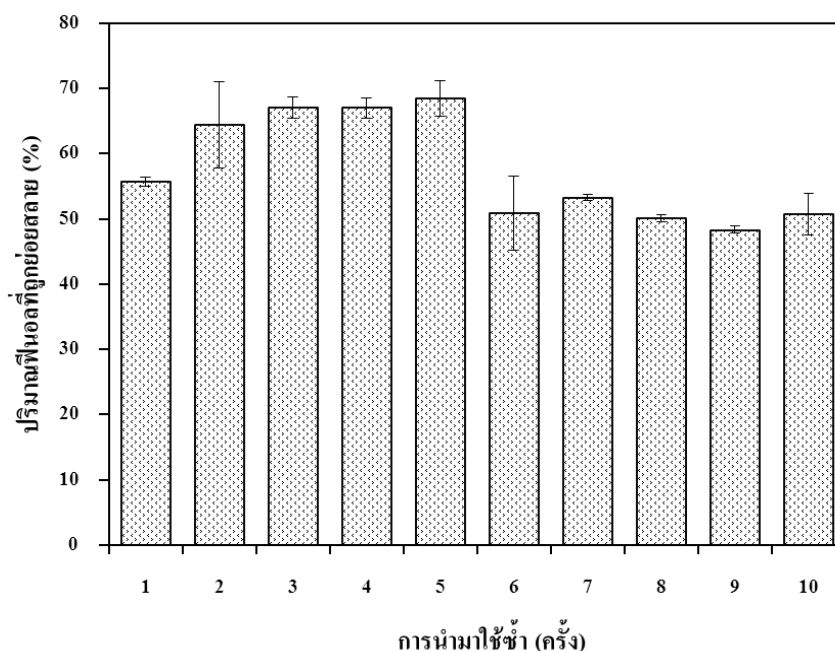
100% พบว่าเซลล์ตรึงลดฟีนอลได้เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยในสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 25% เซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 52% ภายในเวลา 5 วัน จากนั้นเลี้ยงในสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 50% เซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 66% เป็นเวลา 5 วัน และสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 100% เซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 72% ภายในระยะเวลา 10 วัน (ตารางที่ 3.5) ในขณะที่สัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว 25% มีประสิทธิภาพการกำจัดฟีนอลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 50% และ 100% และเมื่อใช้เซลล์ตรึงที่ยังไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล และไม่ผ่านการปรับตัวด้วยการเจือจางน้ำทิ้ง พบว่าเซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 35% อาจเนื่องมาจากเซลล์ตรึงขาดการกระตุ้นเพื่อชักนำ และรักษาการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ จึงทำให้เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลน้อยกว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการกระตุ้น และการปรับตัวจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว โดยใช้สถิติ one way-ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีการเตรียมเซลล์ตรึงก่อนนำไปใช้ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ 1) ไม่ผ่านการกระตุ้นและการปรับตัว (Non-activation and non-acclimation) 2) วิธีการกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอล (Activation) 3) วิธีการปรับตัวเซลล์ตรึงในน้ำทิ้งเจือจาง (Acclimation) และ 4) วิธีร่วมระหว่างการกระตุ้นและการปรับตัว (Activation and acclimation) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงที่ถูกกระตุ้นหรือปรับตัวแล้วในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีค่าต่ำกว่าการบำบัดฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟีนอล ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีทั้งฟีนอล อนุพันธ์ของฟีนอล และสารมลพิษอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งด้วย ซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง จากงานวิจัยนี้พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลในอาหารเหลวเกือบ 100% ในขณะที่สามารถย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งได้ประมาณ 64-72% ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย Limkhuansuwan and Chaiprasert (2010) รายงานว่าพบการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลิก 33.64 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และพบว่า lactic acid bacteria สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ประมาณ 44% จากผลการศึกษาการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเซลล์ตรึงบน EFB ในงานวิจัยนี้พบว่าความเข้มข้นฟีนอลที่เหลือในน้ำทิ้งยังมีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม ซึ่งกำหนดให้มีปริมาณฟีนอลสูงสุดไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม สามารถนำน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้ว มาผ่านการบำบัดซ้ำอีกครั้ง หรืออาจมีการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอล

ในระบบบำบัดแบบกึ่งกะ (Fed batch system) หรือระบบที่มีความต่อเนื่อง (Continuous system) ซึ่งอาจทำให้ค่าความเข้มข้นฟีนอลในน้ำทิ้งลดลงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งได้

### 3.4.3 การนำเซลล์ตรึงมาใช้ซ้ำเพื่อบำบัดน้ำทิ้ง

เมื่อนำเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล มาทดสอบการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งซ้ำ เพื่อดูประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงว่าสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง และยังคงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลได้เหมือนกับการใช้ครั้งแรกหรือไม่ ซึ่งจะทำให้ช่วยลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ พบว่าสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง โดยเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 50-68% ภายในเวลา 7 วัน (รูปที่ 3.12) โดยพบว่าประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการย่อยสลายฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟีนอล อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง รวมทั้งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพื้นผิววัสดุตรึง ซึ่งอาจทำให้เซลล์ตรึงเกิดความเสียหาย และหลุดออกจากวัสดุได้ เมื่อมีการนำมาใช้ซ้ำหลายๆ ครั้ง



รูปที่ 3.12 ปริมาณฟีนอลที่ถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการใช้ซ้ำ 10 ครั้ง ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 4.1 สรุปผลการทดลอง

##### 4.1.1 การผลิต EPS ของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ทั้ง 2 ชนิด มีการผลิต EPS ในระหว่างการตรึงเซลล์บนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ซึ่งพบว่า *Methylobacterium* sp. NP3 มีอัตราการสังเคราะห์เส้นใย EPS ได้เร็วกว่า *Acinetobacter* sp. PK1 และเมื่อนำแบคทีเรียผสม 2 ชนิด มาตรึงบนวัสดุ EFB และ PF พบว่าเซลล์แบคทีเรียผลิต EPS บน EFB และ PF ได้คงที่ในวันที่ 6 และวันที่ 8 ตามลำดับ โดยปริมาณ EPS ที่ผลิตขึ้นมีจำนวนเพิ่มขึ้นประมาณ 80% เมื่อเทียบกับเริ่มต้นทดลอง ดังนั้นจึงทำการตรึงเซลล์ที่ระยะเวลา 6 และ 8 วัน บน EFB และ PF ตามลำดับ เพื่อให้เซลล์มีการเกาะติดกับวัสดุได้ดีเพียงพอ และป้องกันการหลุดของเซลล์ตรึง เมื่อมีการนำไปใช้

##### 4.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียตรึงในอาหารเหลว

จากการคัดเลือกวัสดุตรึงระหว่าง EFB และ PF โดยดูจากประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการกำจัดฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงทั้ง 2 ชนิด สามารถย่อยสลายฟีนอลได้เกือบสมบูรณ์ (98%) โดยเซลล์ตรึงบน EFB มีอัตราการกำจัดฟีนอลสูงกว่าเซลล์ตรึงบน PF และมีการดูดซับฟีนอลน้อยกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้เซลล์ตรึงบน EFB มาใช้ทดสอบการย่อยสลายฟีนอลต่อไป

จากการแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงบน EFB ที่สัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว CFMM เท่ากับ 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) พบว่าการเติมเซลล์ตรึงสัดส่วน 1:10 (w/v) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลสูงถึง 98% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้สัดส่วนของเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลวที่ 1:10 (w/v) มาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ในขั้นตอนต่อไป



จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลด้วยเซลล์ตรึงบน EFB ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 30, 50, 100, 500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์อิสระสามารถบำบัดฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์ตรึง โดยสามารถลดปริมาณฟีนอลได้ 95% และ 80% ตามลำดับ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นฟีนอลเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 30–5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงสามารถกำจัดฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์อิสระ ซึ่งมีค่าการย่อยสลายประมาณ 70-98% ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 17-52% และผลการทดลองยังแสดงว่าเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงกว่าเซลล์อิสระที่ทุกความเข้มข้นของฟีนอล นอกจากนี้เซลล์ตรึงยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 99% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง รวมทั้งสามารถเก็บเซลล์ตรึงไว้ได้นาน 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลยังคงเดิม

#### 4.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียตรึงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาผลของการกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ตรึงลดฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ 64% ภายในเวลา 7 วัน ในขณะที่เซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลสามารถกำจัดฟีนอลได้เพียง 35% และจากการศึกษาผลของการปรับตัวเซลล์ตรึงในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจางก่อนนำไปใช้ พบว่าเซลล์ตรึงหลังการปรับสภาพสามารถลดปริมาณฟีนอลในน้ำทิ้งที่ไม่ได้เจือจางได้ 54% ภายในเวลา 7 วัน นอกจากนี้จากการย่อยสลายฟีนอลด้วยวิธีร่วมระหว่างการกระตุ้น และการปรับตัวของเซลล์ตรึง พบว่าลดปริมาณฟีนอลได้ 72% ภายในเวลา 10 วัน และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการบำบัดน้ำทิ้ง ได้อย่างน้อย 10 ครั้ง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 50–69%

ดังนั้นผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเตรียมเซลล์ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน EFB และ PF สามารถทำได้โดยการบ่มเซลล์แบคทีเรียร่วมกับวัสดุ โดยให้อัตราการเขย่าประมาณ 130 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 6 และ 8 วัน ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เซลล์ตรึงที่เตรียมได้ควรนำไปผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หรือผ่านการปรับตัวในน้ำทิ้งที่เจือจาง หรือวิธีร่วมระหว่าง 2 วิธีการดังกล่าว เพื่อชักนำและรักษาการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายฟีนอล รวมทั้งให้เซลล์ปรับตัวมีความทนทานต่อสารประกอบฟีนอล และอนุพันธ์ของฟีนอลในน้ำ

ทั้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนนำไปใช้งาน นอกจากนั้นยังสามารถนำเซลล์ตรึงกับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง ซึ่งช่วยประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่

#### 4.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาหรือคัดเลือกวัสดุชนิดอื่นๆ มาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์เพิ่มเติม หรือศึกษาการปรับปรุงสภาพพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน เช่น สมบัติในเชิง hydrophobic interaction เพื่อเพิ่มความสามารถในการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุ

2. จากการศึกษาที่ได้ทำการทดลองในระบบกะ (batch system) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลเบื้องต้น ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยระบบที่มีความต่อเนื่อง (continuous system) เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้จริงในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

3. ควรศึกษาแนวทางการนำเซลล์ตรึงไปประยุกต์ใช้บำบัดน้ำทิ้ง เช่น เตรียมเซลล์ตรึงใส่ในภาชนะ ซึ่งทำเป็นลักษณะท่อนลอยในบ่อน้ำทิ้ง หรือพัฒนาเป็นระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุเซลล์ตรึง เป็นต้น

## บรรณานุกรม

- ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส. 2547. การกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยการใช้อีเอ็นไอเอ็มเปอร์ออกซิเดส จากไบยางพารา, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- นันทิธร เการาช. 2550. การคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียทนต่อตัวทำละลายจากดิน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกุล. 2533. กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือทิ้ง และคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วารสาร สงขลานครินทร์. 12: 169-176.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ, อรัญ หันพงศ์กิตติกุลและโสภา จันทโสภา. 2544. เปรียบเทียบน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการทางชีวภาพ ทางเคมี และทางกายภาพ. วารสารสงขลานครินทร์. 23: 807-819.
- ปิยะมาศ คงแถม. 2552. การตรึงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนซิลิกาเพื่อใช้ย่อยสลายฟีนอล, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Abd-El-Haleem, D., Zaki, S., Zaki, E and Moawad, H. 2002. Isolation and molecular characterization of Egyptian phenol degrader isolates. *Microbial Ecology* 43: 217-224.
- Abdel-El-Haleem, D. 2003. *Acinetobacter*: environmental and biotechnological Applications. *African Journal of Biotechnology* 2: 71-74.
- Adav, S. S., Chen, M. Y., Lee, D.J. and Ren, N. Q. 2007. Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic. *Chemosphere* 67: 1566–1572.
- Ahmaruzzaman, Md. 2008. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 143: 48–67.
- Ahmad, S. A., Shamaan, N. A., Koon, G. B., Shukor, M. Y. A. and Syed, M. A. 2012. Enhanced phenol degradation by immobilized *Acinetobacter* sp. strain AQ5NOL 1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 347-352.

- Alam, Md. Z., Muyibi, S. A., Mansor, M. F. and Wahid, R. 2007. Activated carbons derived from oil palm empty fruit bunches: Application to environmental problems. *Journal of Environmental Sciences* 19: 103-108.
- Alam, Md. Z., Ameen, E. S., Muyibi, S. A. and Kabbashi, N. A. 2009. The factors affecting the performance of activated carbon prepared from oil palm empty fruit bunches for adsorption of phenol. *Chemical Engineering Journal* 155: 191–198.
- Aken, V. B., Yoon, J. M. and Schnoor, J. L. 2004. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Applied Environmental Microbiology* 1:508-517.
- Aksu, Z. and Bulbul, G. 1999. Determination of the effective diffusion coefficient of phenol in Ca-alginate-immobilized *P. putida* beads. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 344–348.
- Aksu, Z. 2005. Application of biosorption for removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry* 40: 997-1026.
- Aleksieva Z, Ivanova, D. and Godjevargova, T. 2002. Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57[J]. *Process Biochemistry* 37: 1215-1219.
- APHA, AWWA and WEF. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21<sup>th</sup> edition. American Public Health Association. Washington DC.
- Attanun, T. and Chanchroensuk, J. 1999. Soil and plant analysis. Department of geology, Faculty of agriculture, Kasertsart University, Bangkok, Thailand.
- Bai, J., Wen, J.P., Li, H.M. and Jiang, Y. 2007. Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and m-cresol using *Alcaligenes faecalis*. *Process Biochemistry* 42: 510-517.
- Banerjee, I., Modak, M. J., Bandopadhyay, K., Das, D. and Maiti, R. B. 2001. Mathematical model for evaluation of mass transfer limitations in phenol biodegradation by immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology* 87: 211–223.
- Bureau of Industrial Environment Technology, Department of Industrial Works and Ministry of Industry. 1997. Environmental Management Guideline for the Palm Oil Industry. Environmental Advisory Assistance for Industry.

- Busca, G., Berardinelli, C. and Arrighi, L. 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *Journal of Hazardous Materials* 160: 265–288.
- Bastos, A. E. R., Moon, D. H., Rossi, A., Trevors, J. T. and Tsai, S. M. 2000. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Archives of Microbiology* 174: 346–352.
- Campos, G. M., Pereira, P. and Roseiro, C. J. 2006. Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilized *Fusarium oxysporum* CCMI 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCMI 908. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 848–854.
- Caposio, P., Pessione, E., Giuffrida, G., Conti, A., Landolfo, S., Giunta, C. and Gribaudo, G. 2002. Cloning and characterization of two catechol 1,2-dioxygenase genes from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Research in Microbiology* 153: 69–74.
- Cassidy, M. B., Lee, H. and Trevors, J.T. 1996. Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilized *Fusarium oxysporum* CCMI 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCMI 908. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 848–854.
- Cheetham, P. S. J., Blunt, K. W. and Bucke, C. 1979. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. *Biotechnology Bioengineering* 21: 2155-2168.
- Cordova-Rosa, S. M., Dams, R. I., Cordova-Rosa, E. V., Radetski, M. R., Corra, A. X. R. and Radetski, C. M. 2009. Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Journal of Hazardous Materials* 164: 61–66.
- Cui, Z. C., Hu, Y. H., Yin, Y. and Qi, Y. Y. 2008. Isolation and characterization of a Carbamazepine-degrading strain of *Acinetobacter* sp. HY-7 from activated sludge. *Journal of Biotechnology* 136S: S678–S707.
- Cunningham, J. A., Kellner, J. D., Bridge, P.J., Trevenen, C. L., Mcleod, D. R. and Davies, H. D. 2000. Disseminated bacille Calmette-Guérin infection in an infant with a novel deletion in the interferon-gamma receptor gene. *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* 4:791-794.

- Diez M C, Mom M L, Videla, S. 1999. Adsorption of phenolic compounds and color from bleached haft mill effluent using allophonic compounds[J]. *Water Resources* 33: 125-130.
- Dourado, M. N., Ferreira, A. Araujo, W. L., Azevedo, J. L. and Lacava, P. T. 2011. The diversity of endophytic Methylophilic bacteria in an oil-contaminated and an oil-free mangrove ecosystem and their tolerance to heavy metals. *Biotechnology Research International* 2012 Article ID 759865,doi:10.1155/2012/759865.
- El-Naas, M.H., Al-Muhtaseb, S.A. and Makhlof, S. 2009. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Hazardous Materials* 164: 720–725.
- Fang-yao, M., Ming-zhang, H., Dan-mei, L., Ya-wen, L., Pei-shun, H., Hai, Y. and Guo-qing, S. 2007. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Environmental Sciences* 19 : 1257–1260.
- Ghodake, G., Jadhav, S., Dawkar, V. and Govindwar, S. 2009. Biodegradation of diazo dye Direct brown MR by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM2890. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63 : 433–439.
- González, D.M., Moreno, E., Sarmiento, J.Q. and Ramos-Cormenzana, A. 1990. Studies on antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills (Alpechin): Inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere* 20: 423-432.
- Gonzalez, G., Herrera, G., Garcia, M. T. and Pena, M. 2011. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology* 80 : 137-142.
- Grady, Jr., C. P. L., Daigger, G. T. and Lim, H. C. 1999. *Biological Wastewater Treatment*, seconded. Marcel Dekker Inc, New York.
- Grothe, E., Young, M. M. and Chisti, Y. 1999. Fermentation optimization for the production of poly ( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 132-141.
- Haseley, S. R., Holst, O. and Brade, H. 1997. Structural studies of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter*. *European Journal of Biochemistry* 247:815-819.

- Hao, O. J., Kim, M. H., Seagren, E. A. and Kim, H. 2002. Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter* species. *Chemosphere* 46: 797–807.
- Ignatov, V. O., Khorkina, A. N., Shchyogolev, Y. S., Singirtsev, N. I., Bunin, D. V., Tumaikina, A. Y. and Ignatov, V. V. 1999. Comparison of the electro optical properties and specie respiratory activity of *Acinetobacter calcoaceticum* A-122. *FEMS Microbiology Letters* 173: 453–457.
- Jung, M. W., Ahn, K. H., Lee, Y., Kim, K. P., Rhee, J. S., Park, J. T. and Paeng, K. J. 2001. Adsorption characteristics of phenol and chlorophenols on granular activated carbons (GAC). *Microchemical Journal* 70: 123-131.
- Kafilzadeh, F., Farhangdoost, M. S. and Tahery, Y. 2010. Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. *African Journal of Biotechnology* 9: 6721-6726.
- Kasamsuk, T. and Khanongnuc, C. 2007. Immobilization of *Coriolus versicolor* RC3 on natural carrier for textile wastewater decolorization. Available on website [http://202.28.92.69/inter/images/Fervaap2007/Oral-Poster\\_Pre/Fullpaper/ORAL/O4-10.pdf](http://202.28.92.69/inter/images/Fervaap2007/Oral-Poster_Pre/Fullpaper/ORAL/O4-10.pdf).
- Kavitha, V. and Palanivelu, K. 2004. The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton process for the degradation of phenol. *Chemosphere* 55: 1235-1243.
- Khongkhaem, P., Intasiri, A. and Luepromchai, E. 2011. Silica immobilized *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 degrade high concentrations of phenol. *Letters in Applied Microbiology* 52: 448–455.
- Knupp, G., Rucker, G., Ramos-Cormenzana, A., Garrido Hoyos, S., Neugebauer, M. and Ossenkop, T. 1996. Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38: 277-282.
- Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B. and Angelidaki, I. 2010. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering* 105: 899–908.

- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, M.I., Marchant, R. and Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* 21: 377–397.
- Kunii Y. and Chikatsu, H. 2001. On the Application of 3 Million Consumer Pixel Camera to Digital Photogrammetry, Videometrics and Optical Methods for 3D Shape Measurement, Proceeding of SPIE 4309 :278-287.
- Kunz, A., Reginatto, V. and Durán, N. 2001. Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*-ozone. *Chemosphere* 44: 281-287.
- Lee, G.M. and Palsson, B.O. 1994. Monoclonal antibody production using free-suspended and entrapped hybridoma cells. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 12: 509-533.
- Lee, S. Y., Chun, Y. N. and Kim, S. I. 2009. Characteristics of phenol degradation by immobilized activated sludge. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 15: 323–327.
- Lidstrom, E. M. and Chistoserdova, L. 2002. Plants in the Pink: Cytokinin Production by *Methylobacterium*. *American Society for Microbiology* 184 : 1818.
- Limkhuansuwan, V. and Chaiprasert, P. 2010. Decolorization of molasses melanoidins and palm oil mill effluent phenolic compounds by fermentative lactic acid bacteria. *Journal of Environmental Sciences* 22: 1209–1217.
- Li, J. and Gu, D. J. 2007. Complete degradation of dimethyl isophthalate requires the biochemical cooperation between *Klebsiella oxytoca* Sc and *Methylobacterium mesophilicum* Sr Isolated from Wetland sediment. *Science of the Total Environment* 380: 181–187.
- Liu, Y. J., Zhang, A. N. and Wang, X. C. 2009. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochemical Engineering Journal* 44 : 187–192.
- Lu, Y., Yan, L, Wang, Y., Zhou, S., Fu, J. and Zhang, J. 2009. Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials* 165: 1091–1097.
- Ma, A. N., 2000. Environmental Management for the Oil Palm Industry. *Palm Oil Development* 30: 1-10.
- Manahan, S.E. 1994. Environmental chemistry. Boca Raton, FL: CRC Press.



- Marín, M., Pedregosa, A., Ríos, S., Ortiz, L.M. and Laborda, F. 1995. Biodegradation of Diesel and Heating Oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: its Possible Applications on Bioremediation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 95: 269–285.
- Melo, J. S., Kholi, S., Patwardhan, A. W. and D'Souza, S. F. 2005. Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. *Process Biochemistry* 40: 625–628.
- Mitsui, R., Omori, M., Kitazawa, H. and Tanaka, M. 2005. Formaldehyde-Limited Cultivation of a Newly Isolated Methylophilic Bacterium, *Methylobacterium* sp. MF1: Enzymatic Analysis Related to C<sub>1</sub> Metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99: 18–22.
- Mohite, B. V., Jalgaonwala, R. E., Pawar, S. and Morankar, A. 2010. Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 7 (RESEARCH ARTICLE).
- Movahedyan, H., Khorsandi, H., Salehi, R. and Nikaeen, M. 2009. Detection of phenol degrading bacteria and *Pseudomonas Putida* in activated sludge by polymerase chain reaction. *Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering* 6: 115-120.
- Nair, I. C., Jayachandran, K. and Shashidhar, S. 2008. Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology* 7: 4951–4958.
- Obuekwe, C. O., Hourani, G. and Radwan, S.S. 2001. High-temperature hydrocarbon biodegradation activities in Kuwaiti desert soil samples. *Folia Microbiologica* 46 : 535-539.
- Obuekwe, C. O. and Al-Muttawa, E. M., 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. *Biotechnology Letters* 23: 1025–1032.
- Pan, G. and Kurumada, K. I. 2008. Hybrid gel reinforced with coating layer for removal of phenol from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal* 138: 194–199.
- Passos, C. T. d., Michelon, M., Burkert, J. F. de M., Kalil, S. J. and Burkert, C. A. V. 2010. Biodegradation of phenol by free and encapsulated cells of a new *Aspergillus* sp. isolated from a contaminated site in southern Brazil. *African Journal of Biotechnology* 40 : 6716-6720.
- Parkhurst, B. R., Bradshaw, A. S., and Forte, J. L. 1979. An evaluation of the acute toxicity to aquatic biota of a coal conversion effluent and its major components. *Environmental Contamination and Toxicology* 23: 349-356.

- Pattanasupong, A., Nagase, H., Sugimoto, E., Hori, Y., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M. and Miyamoto, K. 2004. Degradation of Carbendazim and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by Immobilized Consortium on Loofa Sponge. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98: 28–33.
- Patterson, J. W. 1985. Industrial wastewater treatment technology . Butterworths, Boston.
- Pfeffer, F. M. 1979. The 1977 screening survey for measurement of organic priority pollutants in petroleum refinery wastewaters. ASTM Spec. *Technical Publications* 181-190.
- Prieto, M. B., Hidalgo, A, Rodriguez-Fernandez, C., Serra, J.L and Llama, M.J. 2002. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier. *Applied Microbiology Biotechnology* 58: 853-859.
- Quek, E., Ting, Y. P. and Tan, H. M. 2006. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. *Bioresource Technology* 97: 32–38.
- Rao, J., R. and Viaraghavan, T., 2002. Biosorption of phenol from aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass[J]. *Bioresour Technology* 85: 163-171.
- Rigo, M. and Alegre, R. M. 2004. Isolation and selection of phenol-degradation microorganisms from industrial wastewaters and kinetics of the biodegradation. *Folia Microbiology* 49: 41-45.
- Robards, K. and Ryan, D. 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst* 123:31R-44R.
- Rosche, B., Li, X. Z., Hauer, B., Schmid, A. and Buehler, K. 2009. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis. *Trends in Biotechnology* 27: 636–643.
- Ruiz-Ordaz, N., Ruiz-Lagunez, J. C., Castanon-Gonzalez, J. H., Hernandez-Manzano, E., Cristiani-Urbina, E. and Galindez-Mayer, J. 2001. Phenol Biodegradation Using a Repeated Batch Culture of *Candida tropicalis* in a Multistage Bubble Column. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 43:19-25.
- Sanin, S. L., Sanin, F. D. and Bryers, J. D. 2003. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry* 38: 909- 914.

- Santos, J. C., Mussatto, S. I., Dragone, G., Converti, A. and Siva, S. S. 2005. Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. *Biochemistry Engineer Journal* 23: 1-9.
- Santos, V. L., Monteiro, A. S., Braga, D. T., and Santoro, M. M. 2009. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. *Journal of Hazardous Materials* 161: 1413–1420.
- Seetharam, G. B and Saville, B. A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Research* 37: 436–440.
- Seymour, S. B. 2001. *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 5<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Sharma, N. and Gupta, V. C. 2012. Comparative Biodegradation Analysis of Phenol from Paper & Pulp Industrial Effluent by Free and Immobilized Cells of *Aspergillus Niger*. *International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE 30 IACSIT Press, Singapore*
- Shetty, K. V., Ramanjaneyulu, R. and Srinikethan, G. 2007. Biological phenol removal using immobilized cells in a pulsed plate bioreactor: Effect of dilution rate and influent phenol concentration. *Journal of Hazardous Materials* 149: 452–459.
- Sridhar, M. K. C. and AdeOluwa, O. O. 2009. Palm Oil Industry Residues. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation Part III* 341-355.
- Stelting, S., Burns, R. G., Sunna, A. Visnovsky, G. and Bun, C. 2010. Immobilization of *Pseudomonas* sp. strain ADP: a stable inoculant for the bioremediation of atrazine. 19<sup>th</sup> World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World 1–6 August, Brisbane, Australia. Published on DVD.
- Stepnowski, P., Blotevogel, H. K. and Jastorff, B. 2004. Extraction of carotenoid produced during methanol waste biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 53: 127-132.
- Sundram, K., Sambanthamurthi, R. and Tan, Y. A. 2003. Palm fruit chemistry and nutrition. Asia Pacific. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 12 :355-362.
- Suttinun, O., Muller, R. and Luepromchai, E. 2010. Trichloroethylene co-metabolic degradation by *Rhodococcus* sp. L4 immobilized on plant materials rich in essential oils. *Applied Environmental Microbiology* 76: 4684-4690.

- Tuah, P. M., Rashid, N. A. A. and Salleh, M. Md. 2009. Degradation pathway of phenol through *ortho*-cleavage by *Candida tropicalis* RETL-Cr1. *Borneo Science* 24.
- Vandevivere, P., and Kirchman, D. L. 1993. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Applied Environmental Microbiology* 59: 3280-3286.
- Van-Schie, P. M., and Young, L. Y. 1998. Isolation and Characterization of Phenol-Degrading Denitrifying Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology* 64 : 2432-2438.
- Van Schie, P. M. and Young, R. J. 2000. Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation Journal* 4: 1-18.
- Verhoef, R., Waard, P., Schols, H. A., Siika-aho, M. and Voragen, A. G. J. 2003. *Methylobacterium* sp. isolated from a Finnish paper machine produces highly pyruvated galactan exopolysaccharide. *Carbohydrate Research* 338: 1851-1859.
- Wang, X., Gai, Z., Yu, B., Feng, J., Xu, C., Yuan, Y., Lin, Z. and Xu, P. 2007. Degradation of Carbazole by Microbial Cells Immobilized in Magnetic Gellan Gum Gel Beads. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6421-6428.
- Yamaga, F., Washio, K. and Morikawa, M. 2010. Sustainable Biodegradation of Phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 Isolated from the Rhizosphere of Duckweed *Lemna aoukikusa*. *Environmental Science & Technology* 44: 6470-6474.
- Yan, J., Jianping, W., Bai, J., Daoquan, W. and Zongding, H., 2006. Phenol biodegradation by the yeast *Candida tropicalis* in the presence of m-cresol. *Journal of Biochemistry Engineering* 29: 223-227.
- Ying, W., Ye, T., Bin, H., Hua-bing, Z., Jian-nan, B. and Bao-li, C. 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. *Journal of Environmental Sciences* 19: 222-225.
- Yordanova, G., Ivanova, D., Godjevargova, T. and Krastanov, A. 2009. Biodegradation of phenol by immobilized *Aspergillus awamori* NRRL 3112 on modified polyacrylonitrile membrane. *Biodegradation* 20: 717-726.

## ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## ภาคผนวก ก

## สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (Carbon free mineral salt medium) ประกอบด้วยสารอาหารดังต่อไปนี้ (ต่อ 1 ลิตรอาหารเหลว) ได้แก่

- แอมโมเนียมไนเตรด ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	3.0 กรัม
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	2.2 กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.8 กรัม

นำอาหารเหลวดังกล่าวมาฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเติมสารละลายความเข้มข้นสูง (Stock solution) ของสารต่อไปนี้ อย่างละ 1 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ โดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูป micro filter

- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร
- เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.05 กรัมต่อมิลลิลิตร
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.05 กรัมต่อมิลลิลิตร

**ภาคผนวก ข**  
**วิธีวิเคราะห์**



## ภาคผนวก ข

### วิธีวิเคราะห์

#### ข.1 ศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุตั้ง และเซลล์ตั้ง โดย SEM

การศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ทำโดยนำชิ้นส่วนของวัสดุมาติดบนแท่นวางตัวอย่าง Stub) แล้วนำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่อง Sputter coater และส่องดูด้วยเครื่อง SEM สำหรับการศึกษาลักษณะเซลล์ตั้งทั้งก่อนและหลังทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพีนอล โดยคงรักษาสภาพตัวอย่างก่อนฉาบทองด้วย 2.5% glutaraldehyde ( $C_5H_8O_2$ ) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หรือ 4% formaldehyde เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง นำตัวอย่างมา Fix ครั้งที่ 2 ด้วย 1%  $OsO_4$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ขจัดน้ำออกด้วยเอทานอล เป็นเวลา 10 นาที นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying (การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้ดำเนินการโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

#### ข.2 ศึกษาพื้นที่ผิวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของรูพรุน และปริมาตรรูพรุนของวัสดุโดยเครื่อง

##### Surface area analyzer

การศึกษพื้นที่ผิว เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของรูพรุน และปริมาตรของรูพรุน ทำโดยนำชิ้นส่วนของวัสดุ 0.25 กรัม outgas ที่อุณหภูมิ  $150^{\circ}C$  ในสุญญากาศ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อเอาความชื้นหรือสารปนเปื้อนที่อาจดูดซับอยู่บนผิววัสดุออก หลังจากนั้นนำตัวอย่างวางในหลอดตัวอย่างที่เชื่อมต่อกับเครื่องวิเคราะห์ ซึ่งตัวอย่างดูดซับ  $N_2$  ที่ 77 K ด้วยเครื่อง BelsorpII mini (BEL Japan, Inc., Osaka, Japan) ทั้งนี้พื้นที่ผิว BET (specific surface area) คำนวณตามวิธี Brunauer–Emmett–Teller (BET) และ Langmuir plot methods และการกระจายตัวของรูพรุน (pore size distribution) คำนวณตามวิธี Barrer–Joyner–Halenda (BJH) (การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้ดำเนินการวิทยาลัยปิโตรเลียม และปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

**ภาคผนวก ค**

**การวิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของเซลล์ตรึงบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน**

## ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของเซลล์ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

ตารางที่ ค.1 การผลิต exopolysaccharide ของเซลล์ตรึงเชื่อมผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บน EFB

เวลา (วัน)	เซลล์ตรึงบน EFB (A <sub>606</sub> )			ปริมาณการลดลงของสี alcian blue (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3	1	2	3		
0	0.159	0.173	0.181	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
1	0.159	0.173	0.181	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
2	0.159	0.173	0.181	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
3	0.148	0.173	0.183	93.00	100.00	101.00	98.20	4.360
4	0.137	0.147	0.153	86.00	84.00	84.00	85.28	1.150
5	0.082	0.082	0.082	51.00	47.00	45.00	48.13	3.06
6	0.024	0.025	0.026	15.00	14.00	14.00	14.80	0.58
7	0.022	0.025	0.027	13.00	14.00	14.00	14.35	0.58
8	0.022	0.023	0.026	13.00	13.00	14.00	13.69	0.58
9	0.023	0.023	0.025	14.00	13.00	13.00	14.01	0.58

ตารางที่ ค.2 ปริมาณการลดลงของสี alcian blue ของชุดควบคุม EFB ปราศจากเซลล์

เวลา (วัน)	EFB ปราศจากเซลล์ (A <sub>606</sub> )			ปริมาณการลดลงของสี alcian blue (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3	1	2	3		
0	0.024	0.024	0.024	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
2	0.029	0.023	0.025	123.40	97.50	102.48	107.79	13.75
4	0.025	0.025	0.026	105.53	105.42	107.02	105.99	0.90
6	0.025	0.026	0.026	106.81	107.08	107.85	107.25	0.54
8	0.023	0.024	0.024	99.15	99.17	100.00	99.44	0.49
9	0.023	0.024	0.025	98.30	98.33	101.65	99.43	1.93

ตารางที่ ค.3 การผลิต exopolysaccharide ของเซลล์ตรึงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บน PF

เวลา (วัน)	เซลล์ตรึงบน PF (A <sub>606</sub> )			ปริมาณการลดลงของสี alcian blue (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3	1	2	3		
0	0.178	0.199	0.200	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
1	0.178	0.199	0.200	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
2	0.193	0.196	0.200	108.53	98.24	99.90	102.22	5.52
3	0.162	0.182	0.184	90.85	91.37	92.09	91.44	0.62
4	0.087	0.088	0.093	49.05	43.98	46.30	46.44	2.54
5	0.059	0.070	0.082	32.94	34.99	40.94	36.29	4.16
6	0.030	0.036	0.048	16.84	18.12	24.12	19.69	3.89
7	0.029	0.034	0.037	16.50	17.07	18.62	17.40	1.10
8	0.022	0.026	0.027	12.12	12.80	13.31	12.75	0.60
9	0.025	0.025	0.026	13.92	12.75	13.16	13.28	0.59

ตารางที่ ค.4 ปริมาณการลดลงของสี alcian blue ของชุดควบคุม PF ปราศจากเซลล์

เวลา (วัน)	PF ปราศจากเซลล์ (A <sub>606</sub> )			ปริมาณการลดลงของสี alcian blue (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3	1	2	3		
0	0.032	0.033	0.034	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
2	0.035	0.035	0.037	106.79	105.69	109.38	107.29	1.90
4	0.036	0.036	0.037	110.80	108.68	109.68	109.72	1.06
6	0.033	0.039	0.039	102.78	115.27	113.49	110.51	6.76
8	0.031	0.034	0.036	94.75	100.90	104.11	99.92	4.75
9	0.031	0.032	0.037	94.14	94.61	108.80	99.18	8.33

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3

และ *Acinetobacter* sp. PK1 ตรึงบน EFB

## ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ตรีงบน EFB

ตารางที่ ง.1 การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 ตรีงบน EFB

เวลา (วัน)	<i>Methylobacterium</i> sp. NP3 ตรีงบน EFB ( $A_{606}$ )			ปริมาณการลดลงของสี alcian blue (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3	1	2	3		
0	0.083	0.131	0.145	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
1	0.083	0.131	0.145	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
2	0.083	0.131	0.145	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
3	0.083	0.131	0.145	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
4	0.078	0.105	0.118	94.20	80.44	81.80	85.48	7.58
5	0.062	0.074	0.090	75.00	56.46	62.35	64.60	9.47
6	0.032	0.032	0.033	38.41	24.37	22.63	28.47	8.65
7	0.031	0.032	0.032	37.80	24.06	22.01	27.96	8.59
8	0.032	0.031	0.031	39.13	23.38	21.73	28.08	9.61
9	0.032	0.031	0.032	38.41	23.99	22.08	28.16	8.93

ตารางที่ 3.2 การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย *Acinetobacter sp. PK1* ตรีงบน EFB

เวลา (วัน)	<i>Acinetobacter sp. PK1</i> ตรีงบน			ปริมาณการลดลงของสี			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	EFB ( $A_{606}$ )			alcian blue (%)				
	1	2	3	1	2	3		
0	0.106	0.113	0.118	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
1	0.106	0.113	0.118	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
2	0.106	0.113	0.118	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
3	0.106	0.113	0.118	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
4	0.090	0.112	0.119	84.45	99.47	100.59	94.84	9.01
5	0.072	0.102	0.107	68.14	91.02	90.75	83.30	13.13
6	0.051	0.062	0.064	48.16	55.11	54.41	52.56	3.83
7	0.030	0.033	0.035	28.37	29.07	30.05	29.16	0.84
8	0.030	0.032	0.036	28.56	28.09	30.22	28.96	1.12
9	0.030	0.031	0.032	28.28	27.11	26.99	27.46	0.71

**ภาคผนวก จ**

**การคัดเลือกวัสดุรีจิสเทอ์บนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน**



## ภาคผนวก จ

## การคัดเลือกวัสดุตั้งเซลล์บนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

ตารางที่ จ.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตั้งบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	เซลล์ตั้งบน EFB (A <sub>500</sub> )			ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3	1	2	3		
0	0.425	0.431	0.432	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
4	0.181	0.183	0.186	42.61	42.40	42.96	42.65	0.28
8	0.009	0.009	0.010	2.10	2.09	2.22	2.13	0.07
12	0.008	0.010	0.010	1.86	2.27	2.27	2.13	0.24
16	0.009	0.009	0.009	2.07	2.00	1.99	2.02	0.05
24	0.008	0.008	0.008	1.93	1.81	1.78	1.84	0.08

ตารางที่ จ.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตั้งบน PF ที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	เซลล์ตั้งบน PF (A <sub>500</sub> )			ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3	1	2	3		
0	0.425	0.431	0.432	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
4	0.254	0.255	0.256	59.89	59.09	59.10	59.36	0.46
8	0.134	0.131	0.133	31.57	30.33	30.70	30.87	0.64
12	0.009	0.009	0.009	2.05	2.07	1.99	2.03	0.04
16	0.009	0.009	0.009	2.05	2.02	2.08	2.05	0.03
24	0.007	0.008	0.009	1.58	1.90	2.06	1.85	0.25

ตารางที่ จ.3 ชุดควบคุมกระบวนการทางกายภาพและเคมีต่อการลดลงของฟีนอลของ EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	EFB ปราศจากเซลล์ (A <sub>500</sub> )			ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3	1	2	3		
0	0.423	0.423	0.417	100	100	100	100	0.00
4	0.452	0.424	0.424	106.98	100.27	101.75	103.00	3.52
8	0.442	0.424	0.426	104.58	100.23	102.10	102.30	2.18
12	0.405	0.412	0.424	95.72	97.47	101.57	98.25	3.01
16	0.412	0.424	0.424	97.49	100.14	101.59	99.74	2.08
24	0.402	0.402	0.402	95.11	95.08	96.47	95.55	0.79

ตารางที่ จ.4 ชุดควบคุมกระบวนการทางกายภาพและเคมีต่อการลดลงของฟีนอลของ PF ที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	PF ปราศจากเซลล์ (A <sub>500</sub> )			ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3	1	2	3		
0	0.423	0.424	0.425	100	100	100	100	0.00
4	0.423	0.424	0.424	100.11	99.91	99.84	99.96	0.14
8	0.413	0.412	0.424	97.58	97.23	99.84	98.22	1.41
12	0.346	0.345	0.346	81.71	81.35	81.50	81.52	0.18
16	0.325	0.354	0.355	76.75	83.47	83.56	81.26	3.91
24	0.331	0.319	0.333	78.32	75.15	78.40	77.29	1.85

**ภาคผนวก ฉ**

**การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ในอาหารเหลว**

## ภาคผนวก จ

## การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ในอาหารเหลว

ตารางที่ จ.1 ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

สัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำเสีย (w/v)	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
1:10	1.86	1.87	2.20	1.98	0.19
3:10	2.08	2.12	2.20	2.13	0.06
6:10	2.08	2.12	2.20	2.31	0.06

ตารางที่ จ.2 ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	เซลล์ตรึงบน EFB (A <sub>500</sub> )			ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)				
	1	2	3	1	2	3		
0	0.227	0.232	0.233	100	100	100	100	0
2	0.206	0.217	0.221	90.49	93.79	94.90	93.06	2.29
6	0.042	0.042	0.047	18.49	18.29	19.93	18.90	0.90
10	0.044	0.044	0.045	19.37	19.07	19.20	19.21	0.15
14	0.042	0.048	0.049	18.35	20.58	21.09	20.01	1.45
18	0.046	0.048	0.048	20.03	20.66	20.62	20.44	0.36
24	0.042	0.044	0.047	18.35	18.81	19.97	19.05	0.84

ตารางที่ จ.3 ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	เซลล์ตรึงบน EFB (A <sub>500</sub> )			ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)				
	1	2	3	1	2	3		
0	0.425	0.431	0.432	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
4	0.181	0.183	0.186	42.61	42.40	42.96	42.65	0.28
8	0.009	0.009	0.010	2.10	2.09	2.22	2.13	0.07
12	0.008	0.010	0.010	1.86	2.27	2.27	2.13	0.24
16	0.009	0.009	0.009	2.07	2.00	1.99	2.02	0.05
24	0.008	0.008	0.008	1.93	1.81	1.78	1.84	0.08

ตารางที่ จ.4 ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นฟีนอล 50 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	เซลล์ตรึงบน EFB (A <sub>500</sub> )			ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)				
	1	2	3	1	2	3		
0	0.152	0.154	0.155	100	100	100	100	0.00
2	0.101	0.101	0.114	66.45	65.71	73.55	68.57	4.33
24	0.038	0.039	0.040	25.07	25.31	25.68	25.35	0.31
48	0.028	0.028	0.029	18.62	18.35	18.58	18.52	0.15
72	0.025	0.025	0.026	16.51	16.33	16.52	16.45	0.11

ตารางที่ จ.5 ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นฟีนอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	เซลล์ตรึงบน EFB (A <sub>500</sub> )			ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)				
	1	2	3	1	2	3		
0	0.905	0.906	0.989	100	100	100	100	0.00
24	0.457	0.659	0.660	50.49	72.71	66.70	63.30	11.49
48	0.316	0.424	0.424	34.93	46.82	42.87	41.54	6.06
72	0.216	0.197	0.191	23.84	21.75	19.32	21.63	2.26
96	0.120	0.121	0.248	13.30	13.36	25.06	17.24	6.78
120	0.015	0.014	0.012	1.69	1.50	1.18	1.46	0.26

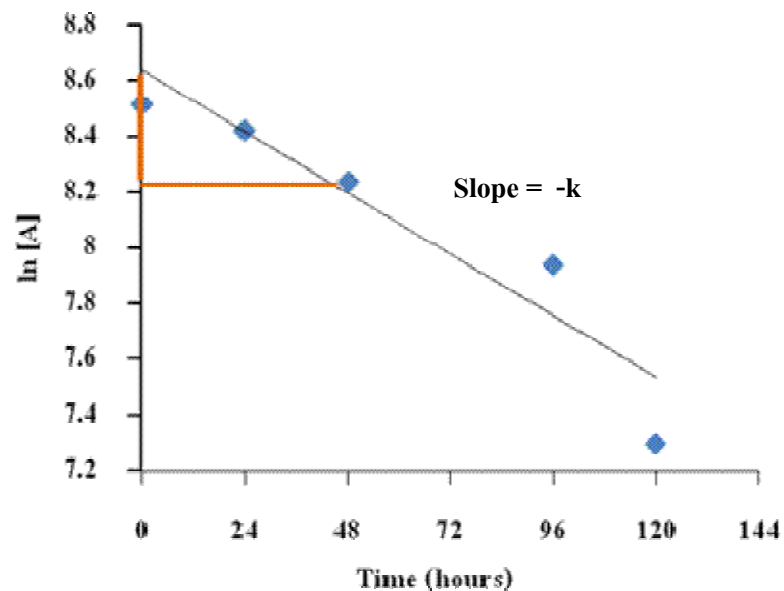
ตารางที่ จ.6 ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นฟีนอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	เซลล์ตรึงบน EFB (A <sub>500</sub> )			ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)				
	1	2	3	1	2	3		
0	0.502	0.497	0.496	100	100	100	100	0.00
24	0.398	0.422	0.426	79.26	84.74	85.86	83.29	3.53
48	0.364	0.367	0.374	72.58	73.72	75.34	73.88	1.39
72	0.382	0.309	0.333	76.11	62.14	67.10	68.45	7.08
96	0.168	0.167	0.164	33.45	33.55	32.94	33.31	0.33
120	0.068	0.104	0.102	13.53	20.89	20.61	18.34	4.17

ตารางที่ จ.7 ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	เซลล์ตรึงบน EFB ( $A_{500}$ )			ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)				
	1	2	3	1	2	3		
0	0.452	0.451	0.445	100	100	100	100	0.00
24	0.402	0.411	0.418	88.91	91.26	93.78	91.31	2.44
48	0.333	0.338	0.349	73.67	74.93	78.30	75.64	2.39
72	0.293	0.296	0.298	64.79	65.55	66.89	65.74	1.06
96	0.237	0.256	0.265	52.57	56.83	59.55	56.32	3.52
120	0.124	0.136	0.139	27.35	30.08	31.15	28.71	1.93

ตัวอย่างการคำนวณค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอล (phenol degradation rate constant:  $k$ )



รูปที่ จ.1 ค่าคงที่อัตราการย่อยฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

$$\ln \frac{[A]_t}{[A]_0} = -k_1 t$$

$$\ln [A]_t = -k_1 t + \ln [A]_0$$

$$8.24 = -k_1 (48) + 8.61$$

$$-0.37 = -k_1 (48)$$

$$k_1 = \frac{-0.37}{-48} = 0.0077$$

ตารางที่ ๘.๘ ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการย่อยสลายของเซลล์ตรึงที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลแล้ว

จำนวนการใช้ซ้ำ (ครั้ง)	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	0.61 0.73 0.69	0.68	0.06
2	0.15 0.38 0.52	0.35	0.19
3	0.53 0.85 0.97	0.78	0.23
4	0.61 0.62 0.82	0.68	0.12
5	0.84 0.85 0.87	0.85	0.02
6	0.73 0.75 0.82	0.77	0.04



ตารางที่ จ.8 (ต่อ) ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการย่อยสลายของเซลล์ตรึงที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลแล้ว

จำนวนการใช้ซ้ำ (ครั้ง)	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
7	0.84	0.84	0.02
	0.83		
	0.87		
8	0.60	0.68	0.12
	0.62		
	0.82		
9	0.75	0.78	0.04
	0.77		
	0.82		
10	0.75	0.78	0.04
	0.77		
	0.82		

**ภาคผนวก ข**  
**การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB**  
**ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม**

## ภาคผนวก ข

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB  
 ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ตารางที่ ข.1 ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

สัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำเสีย (w/v)	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
1:10	59.17	59.21	61.59	59.99	1.38
3:10	36.81	36.80	36.09	36.42	0.42
6:10	46.55	46.51	47.92	46.99	0.80

ตารางที่ ข.2 ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการ Activation และ Acclimation เซลล์ตรึง

เซลล์ตรึง	ปริมาณฟีนอลลดลง (%)	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
Non activation	36.85	35.00	1.78
	33.33		
	34.55		
Activation	63.19	63.43	0.42
	63.20		
	63.91		
Acclimation	54.88	53.54	4.81
	57.54		
	48.20		
Activation และ Acclimation	75.64	72.44	3.64
	73.20		
	68.49		

ตารางที่ ข.3 ปริมาณฟินอลที่เหลือ (%) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการย่อยสลายของเซลล์ที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟินอลแล้ว

จำนวนการใช้ซ้ำ (ครั้ง)	ปริมาณฟินอลที่เหลือ (%)	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	44.39 43.57 45.01	44.32	0.72
2	30.97 32.47 43.13	35.53	6.63
3	31.92 32.08 34.78	32.93	1.61
4	31.99 32.10 34.78	32.96	1.58
5	29.23 30.70 34.49	31.47	2.72
6	44.92 46.83 55.66	49.14	0.48

ตารางที่ ข.3 (ต่อ) ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการย่อยสลายของเซลล์ตรึงที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลแล้ว

จำนวนการใช้ ซ้ำ (ครั้ง)	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
7	46.19	46.72	0.48
	47.12		
	46.86		
8	50.42	49.89	0.50
	49.80		
	49.44		
9	51.06	51.67	0.53
	52.03		
	51.93		
10	49.27	51.06	3.17
	49.19		
	54.72		

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวพนิดา ไต้ะสู	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5210920014	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี)	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2551

## การตีพิมพ์เผยแพร่ ผลงาน

พนิดา ไต้ะสู เอกวัล ลือพร้อมชัย และอรมาศ สุทธินัน. 2554. การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเหลือใช้ปาล์มน้ำมัน. ในเอกสารประกอบงานประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 10 จัดโดยสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย ระหว่างวันที่ 23-25 มีนาคม 2554 ณ จังหวัดสงขลา.