การบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยร่วมกับการเติมเชื้อ *Methylobacterium sp.* NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1

Removal of Phenolics and Color from Palm Oil Mill Effluent by *Brachiaria humidicola* Planted Soil with *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 Inoculation

พลิษฐ์ จารุจารีต

Palist Jarujareet

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต 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
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เลขหมู่ TD 758.5.P53 พ156 2559
Bib Key 418142
18 JUL 2017

ชื่อวิทยานิพนธ์ การบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยร่วมกับการเติมเชื้อ *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1

ผู้เขียน นายพลิษฐ์ จารุจารีต

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.อรมาศ สุทธินุ่น)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.....

(ดร.กรกช นาคคนอง)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลรัตน์ ชีวะเศรษฐธรรม)

.....กรรมการ

(ดร.วิยดา กวานเหียน)

.....กรรมการ

(ดร.อรมาศ สุทธินุ่น)

.....กรรมการ

(ดร.กรกช นาคคนอง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร.อรมาศ สุทธินุ่น)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นายพลิษฐ์ จารุจารีต)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....พลิษฐ์ จารุจารีต.....

(นายพลิษฐ์ จารุจารีต)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยร่วมกับการเติมเชื้อ *Methylobacterium sp.* NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1

ผู้เขียน นายพลิษฐ์ จารุจารีต

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

น้ำทิ้งที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังคงมีสีคล้ำ และมีสารประกอบฟีนอลิคตกค้างอยู่ งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคที่เหลืออยู่ในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้หญ้าซิกแนลเลื้อยร่วมกับการเติมแบคทีเรีย การศึกษาพบว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยปล่อยสารประกอบฟีนอลิคจากรากอยู่ในช่วง 33.32 – 41.51 mg GAE/L ตลอด 45 วันของการทดลอง การเติมแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคบริเวณรากหญ้าเพื่อใช้ในการเจริญและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย และพบว่าการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าตั้งแต่เริ่มปลูก ช่วยให้แบคทีเรียเจริญและอยู่รอดได้ดีกว่าการเติมแบคทีเรียในดินตั้งแต่วันที่ 0 วันที่ 20 และวันที่ 35 ของการทดลอง การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคภายในโรงเรือนเพาะปลูก โดยการรดน้ำทิ้งซ้ำทั้งหมด 8 ครั้ง พบว่าดินที่ปลูกหญ้าร่วมกับการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าลดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ดีที่สุดร้อยละ 36-72 และร้อยละ 57- 78 ตามลำดับ รองลงมาคือดินที่เติมแบคทีเรีย, ดินที่ปลูกหญ้า, ดิน และดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทั้งนี้การชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า ช่วยคงความสามารถในการบำบัดสีได้ดี ผลการศึกษามีความสอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ จากการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรแบคทีเรียโดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) พบกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคและทนทานต่อสภาพของน้ำทิ้งตลอดการทดลอง รวมทั้งพบว่าน้ำหนักแห้งของหญ้าที่รดด้วยน้ำทิ้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำหนักแห้งของหญ้าที่รดด้วยน้ำเปล่า อย่างไรก็ตามการใช้หญ้าบำบัดน้ำทิ้งส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าเพิ่มสูงขึ้นกว่าหญ้าที่รดด้วยน้ำเปล่า สำหรับการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในแปลงทดลองที่ปลูกหญ้าร่วมกับการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าในระบบที่ไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า พบว่าให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสูงเท่าเทียมกับระบบที่มีการชะล้างดิน โดยลดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ร้อยละ 30-52 และ 34-56 และสามารถรองรับน้ำได้ 0.025 ลูกบาศก์เมตรต่อตารางเมตรต่อวัน นอกจากนี้พบว่าหญ้าที่เติมแบคทีเรียซึ่งผ่านการบำบัดน้ำทิ้งมีปริมาณโปรตีนและเส้นใยที่สามารถนำไปใช้เป็นพืชอาหารสัตว์ได้

Thesis Title	Removal of phenolics and color from palm oil mill effluent by *Brachiaria humidicola* planted soil with *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 inoculation
Author	Mr. Palist Jarujareet
Major Program	Environmental Management
Academic Year	2015

ABSTRACT

The treated palm oil mill effluent (POME) has a dark brown color with the presence of phenolics. This research aimed to remove the remianing color and phenolics in the treated POME by biological approach using the pasture grass *Brachiaria humidicola* inoculated with baceria. The release of phenolics from plant root was found in the range of 33.32 – 41.51 mg GAE/L throughout 45 days of the study. The rhizosphere inoculation of phenol-degrading bacteria, namely *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 obviously enhanced phenolics degradation and bacterial populations in the root zone. The rhizosphere inoculation during initial planting can improve bacterial growth and survival better than that of soil inoculation at day 0, 20 and 35. In the pot experiment, the highest removal efficiency was found in soil planted with grass and inoculated with bacteria (bioaugmented rhizoremediation), which removed 36-72% color and 57- 78% phenolics after 8 cycles of treatments. The second most efficient was unplanted soil and inoculated with bacteria (bioaugmentation), followed by soil planted with grass (rhizoremediation), unplanted soil (natural attenuation) and unplanted sterile soil (soil sorption). Soil flushing with tap water was able to remove residual organics and further recovered the color removal efficiency. These results were in agreement with the number of phenol-degrading bacteria. The Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) profiles showed the community of phenolics degraders that was found to be tolerant to POME throughout the experiment. Comparing with untreated plants, the POME-treated plants showed insignificantly different growth but slightly higher phenolics. The inoculated plant was further irrigated with treated POME in the field experiment and found to reduce color and phenolics in the range of 30-52% and 34-56%. The similar removal efficiency was obtained in the system with and without soil flushing. This system had capacity of a 0.025 $m^3/m^2/d$. Based on the amount of protein and crude fiber, the use of POME-treated plants for animal feeding was feasible.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่ดีจากอาจารย์หลาย ๆ ท่าน ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ ดร.อรมาศ สุทธินุ่น อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย และ ดร.กรกช นาคคนอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ ให้มุมมอง แง่คิด รวมถึงช่วยแก้ปัญหาและอุปสรรคต่างๆในการทำวิจัย ตรวจแก้ไขความถูกต้องเรียบร้อย ตลอดจนให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมาจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม-พวอ. ระดับปริญญาโท

ขอขอบคุณ สถานีทดสอบพันธุ์สัตว์ เทพา จังหวัดสงขลา และ สถานีพัฒนาอาหารสัตว์ สุราษฎร์ธานี ที่ให้ความกรุณาในการนำหญ้าซิกแนลเลื้อยมาใช้ประกอบการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสุภาวดี ปลอดอินทร์ ที่คอยช่วยเหลือในการทำวิจัยในส่วนของแปลงทดลอง

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ คุณธีรยุทธ์ สุภาเพ็ชร คุณแสงเจริญ วิศิษฏ์ไพบูลย์ คุณศุภศักดิ์ หนูมาก และคุณสิฐินันท์ พรหมมณี ที่ช่วยเหลือในหลาย ๆ ขั้นตอนของการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวของผู้วิจัย ที่สนับสนุนดูแลในทุก ๆ ด้าน และเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดมาจนทำให้การศึกษาระดับปริญญาโทสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พลิษฐ์ จารุจารีต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(13)
รายการรูป	(15)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.2.1 ลักษณะทั่วไปของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	3
1.2.2 สารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	4
1.2.3 วิถีการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค	5
1.2.4 การบำบัดสารประกอบฟีนอลิคด้วยวิธีการทางชีวภาพ	6
1.2.5 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* และ *Acinetobacter*	8
1.2.5.1 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*	8
1.2.5.2 แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter*	10
1.2.6 การบำบัดสารมลพิษโดยรากพืช (Rhizoremediation)	11
1.2.6.1 กลไกการบำบัดสารมลพิษของพืช	11
1.2.6.2 การบำบัดสารมลพิษของพืชร่วมกับแบคทีเรีย	13
1.2.7 ลักษณะทั่วไปของหญ้าซิกแนล	16
1.2.8 การติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในดินโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE	17
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	20
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	21
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	22

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 2 วิธีดำเนินงานวิจัย	23
2.1 ภาพรวมขั้นตอนวิธีดำเนินการวิจัย	24
2.2 น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	25
2.3 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย	25
2.4 การเตรียมหญ้าซิกแนลเลื้อย	26
2.5 การศึกษาในโรงเรือนเพาะปลูก	27
2.5.1 การเตรียมดิน	27
2.5.2 ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช	28
2.5.3 ค่าความจุความชื้นของดิน	28
2.5.4 ปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิคจากรากญ้าซิกแนลเลื้อย	29
2.5.5 การศึกษาวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมแบคทีเรีย	30
2.5.6 การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้ง	31
2.6 การศึกษาในแปลงทดลอง	34
2.6.1 การเตรียมแปลงทดลอง	34
2.6.2 ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช	35
2.6.3 ค่าความจุความชื้นของดิน	36
2.6.4 การปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อย	36
2.6.5 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิค และสีของน้ำทิ้ง	37
2.6.5.1 การบำบัดในระบบที่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า	37
2.6.5.2 การบำบัดในระบบที่ไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า	38
2.6.6 การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัด	39
2.7 วิธีวิเคราะห์	41
2.7.1 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในน้ำทิ้ง	41
2.7.2 การวิเคราะห์สีในน้ำทิ้ง	41
2.7.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าซิกแนลเลื้อย	41
2.7.4 การเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย	42

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7.5 การหาค่าความจุความชื้นของดิน	43
2.7.6 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล	44
2.7.7 การศึกษาความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในดิน	44
2.7.7.1 การเก็บตัวอย่างดิน	44
2.7.7.2 การสกัด DNA จากตัวอย่างดิน	45
2.7.7.3 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)	45
2.7.7.4 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)	46
2.7.7.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	46
2.7.8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและเส้นใยของหญ้าซิกแนลเลื้อย	47
2.7.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ	47
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	48
3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่ปล่อยจากรากหญ้าซิกแนลเลื้อย	48
3.2 การศึกษาวิธีการเติมแบคทีเรีย	49
3.3 การเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย	52
3.4 การศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งในโรงเรือนเพาะชำ	53
3.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิค	53
3.4.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล	58
3.4.3 การจำแนกชนิดและศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแบคทีเรียในดินโดยวิธี PCR-DGGE	60
3.4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน	60
3.4.3.2. การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	61
3.4.3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธี DGGE	62

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.4 การเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย	66
3.4.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าซิกแนลเลื้อย	68
3.4.6 ลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังการบำบัด	69
3.4.7 ลักษณะเนื้อดินก่อนและหลังการบำบัดน้ำทิ้ง	71
3.5 การบำบัดน้ำทิ้งในแปลงทดลอง	72
3.5.1 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสี ในระบบที่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า	72
3.5.2 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสี ในระบบที่ไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า	75
3.5.3 การเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย	78
3.5.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในหญ้าซิกแนลเลื้อย	79
3.5.5 ปริมาณโปรตีนและเส้นใยของหญ้าซิกแนลเลื้อย	80
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	82
4.1 สรุปผลการทดลอง	82
4.1.1 การเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าซิกแนลเลื้อย	82
4.1.2 ประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้ง ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายในโรงเรือนเพาะปลูก	82
4.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิค ในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในแปลงทดลอง	83
4.2 ข้อเสนอแนะ การประยุกต์ใช้และแนวทางการจัดการด้านสิ่งแวดล้อม	84
บรรณานุกรม	86
ภาคผนวก	99
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	100
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคและสี	102

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ค ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสี	107
ภาคผนวก ง การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในดิน	110
ประวัติผู้เขียน	115

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง	4
1.2	การใช้จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในการบำบัดสารฟีนอล	8
1.3	การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*	9
1.4	การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter*	10
1.5	ตัวอย่างการศึกษาที่ใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน	16
2.1	แสดงองค์ประกอบและกลไกการบำบัดของชุดการทดลองต่าง ๆ	33
2.2	แสดงพารามิเตอร์และช่วงเวลาที่ตรวจวัด	34
3.1	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลของชุดการทดลองต่าง ๆ	51
3.2	ปริมาณน้ำหนักแห้งของหญ้าซิกแนลเลื้อยในชุดการทดลอง ที่มีการเติมและไม่เติมแบคทีเรีย	53
3.3	ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลในดินของชุดการทดลองต่าง ๆ	59
3.4	แบคทีเรียกลุ่มเด่นจากโปรไฟล์ของเจล DGGE หลังจากการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Gen Bank	65
3.5	ปริมาณน้ำหนักแห้งของหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้ง เปรียบเทียบกับที่รดด้วยน้ำประปาหลังจากวันที่ 60 ของการทดลอง	67
3.6	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ถูกรดด้วยน้ำประปาหลังจากวันที่ 60 ของการทดลอง	69
3.7	ลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อน และหลังการบำบัดด้วยชุดการทดลองต่าง ๆ	70
3.8	ลักษณะเนื้อดินก่อนและหลังการบำบัดน้ำทิ้งด้วยชุดการทดลองที่ปลูกหญ้า และมีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้า	71
3.9	ปริมาณน้ำหนักแห้งของหญ้าซิกแนลเลื้อยในแปลงทดลองที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้ง เปรียบเทียบกับแปลงทดลองควบคุมที่รดด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงาน หลังจากวันที่ 78 ของการทดลอง	79
3.10	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าซิกแนลเลื้อยในแปลงทดลอง ที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับแปลงทดลองควบคุมที่รดด้วยน้ำ จากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงาน หลังจากวันที่ 78 ของการทดลอง	80

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.11	ปริมาณสารอาหารโปรตีนและเส้นใยที่พบในหญ้าซิกแนลเลื้อย ในแปลงทดลองที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับแปลงทดลองควบคุม ที่รดด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงาน หลังจากวันที่ 30 ของการทดลอง	81
ข.1	การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid ความเข้มข้น 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร	103
ข.2	การเตรียมสารละลายมาตรฐานของแพลทตินัมโคบอลท์ ที่ความเข้มข้น 50-500 หน่วยสี	105
ค.1	ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิค	108
ค.2	ประสิทธิภาพการบำบัดสี	109

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิคชนิดต่าง ๆ phenol (A); flavonoids (B); melanins (C)	5
1.2	วิถีการย่อยสลายฟีนอล (a) วิถีออโท (Ortho-Pathway) (b) วิถีเมทา (Meta-Pathway)	6
1.3	ความสัมพันธ์ระหว่างพืชและแบคทีเรียในการบำบัดดิน ที่ปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอน	13
1.4	ลักษณะของหญ้าซิกแนลเลื้อย	17
2.1	ภาพรวมขั้นตอนวิธีดำเนินการวิจัย	24
2.2	แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ (A) *Methylobacterium* sp. NP3 และ (B) *Acinetobacter* sp. PK1	26
2.3	หญ้าซิกแนลเลื้อยที่ปลูกในกระบะสำหรับเตรียมหญ้าก่อนการทดลอง	27
2.4	ลักษณะเม็ดดินก่อนร่อนด้วยตะแกรง (A) และหลังผ่านการร่อนด้วยตะแกรง (B)	28
2.5	หญ้าซิกแนลเลื้อยจำนวน 5 ต้น ที่เริ่มปลูกในกระถาง ก่อนนำไปไว้ภายในโรงเรือนเพาะปลูกพืช	29
2.6	ลักษณะภายนอกโรงเรือน (A) ลักษณะภายในโรงเรือนเพาะปลูก (B) ของคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	30
2.7	การเติมแบคทีเรียลงสู่บริเวณรากหญ้า (A) และ การเติมแบคทีเรียลงในดิน (B)	31
2.8	ชุดการทดลองที่มีการปลูกหญ้าในกระถางและวางบนภาชนะรองกระถาง เพื่อเก็บตัวอย่างน้ำชะในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิค และสีภายใต้โรงเรือนเพาะปลูก	32
2.9	การเตรียมแปลงทดลองขนาด 1 x 2 ตารางเมตร บริเวณพื้นที่ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	35
2.10	หญ้าซิกแนลเลื้อยที่เริ่มปลูกในแปลงทดลองที่มีการคลุมด้วยตาข่ายกรองแสง (A) และหญ้าซิกแนลเลื้อยที่มีอายุ 15 วันหลังจากปลูกในแปลงทดลอง ก่อนที่จะถูกรดด้วยน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (B)	37
2.11	การบำบัดน้ำทิ้งในแปลงทดลองที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยในระบบที่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า	38

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
2.12	การบำบัดน้ำทิ้งในแปลงทดลองที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยในระบบที่ไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า	39
2.13	ส่วนต่าง ๆ ของอุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดในแปลงทดลอง	40
2.14	แปลงทดลองบำบัดน้ำทิ้งที่มีดินเพียงอย่างเดียว (A) และแปลงทดลองที่ประกอบด้วยดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยและเติมแบคทีเรีย (B)	40
2.15	ลักษณะของราก (A) ใบ (B) และลำต้น (C) ของหญ้าซิกแนลเลื้อยหลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 วัน	42
2.16	ลักษณะหญ้าซิกแนลเลื้อยส่วนลำต้นก่อน (A) และหลังอบไล่ความชื้นที่ 80 องศาเซลเซียส (B)	43
3.1	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบบริเวณรากหญ้าซิกแนลเลื้อยในชุดการทดลองต่าง ๆ	49
3.2	ลักษณะการแผ่กระจายของหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ปลูกในกระถาง (A) และลักษณะรากของหญ้าซิกแนลเลื้อย (B)	51
3.3	ประสิทธิภาพการบำบัดสีของชุดการทดลองต่าง ๆ โดยไม่มีการชะล้างอนุภาคดิน (A) และมีการชะล้างอนุภาคดิน (B)	55
3.4	ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคของชุดการทดลองต่าง ๆ โดยไม่มีการชะล้างอนุภาคดิน (A) และมีการชะล้างอนุภาคดิน (B)	56
3.5	สีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนบำบัด (A) และหลังจากผ่านการบำบัดโดยดินที่ปลูกหญ้า (B), ดินเพียงอย่างเดียว (C), ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (D), ดินที่มีการเติมแบคทีเรีย (E) และดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียลงไปบริเวณรากหญ้า (F)	57
3.6	ลักษณะสีของดินก่อน (A) และหลังชะล้างดินด้วยน้ำประปา (B)	58

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.7	Genomic DNA ของแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน เรียงลำดับดังนี้; ดินก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัดน้ำทิ้ง (ช่องวิ่งที่ 1-3), ดินที่ปลูกหญ้าก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัดน้ำทิ้ง (ช่องวิ่งที่ 4-6) ดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากพืช ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัดน้ำทิ้ง (ช่องวิ่งที่ 7-9), ดินที่มีการเติมแบคทีเรีย ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัดน้ำทิ้ง (ช่องวิ่งที่ 10-12), แบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Methylobacterium* sp. NP3 (ช่องวิ่งที่ 13) และแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. PK1 (ช่องวิ่งที่ 14)	60
3.8	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จาก Genomic DNA รูป (A) เรียงตามลำดับดังนี้; marker 100 bp - 1.5 kb DNA ladder (ช่องวิ่งที่ 1), ดินก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 2-4), ดินที่ปลูกหญ้าก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 5-7), ดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้า ก่อน-ระหว่างการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 8-9), แบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Methylobacterium* sp. NP3 (ช่องวิ่งที่ 10) , แบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. PK (ช่องวิ่งที่ 11) และรูป (B) เรียงตามลำดับดังนี้; marker 100 bp -1.5 kb DNA ladder (ช่องวิ่งที่ 1), ดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียบริเวณราก หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 2), และดินที่เติมแบคทีเรีย ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 3-5)	61
3.9	โปรไฟล์ของ DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ใช้เกรเดียนท์ของความเข้มข้น denaturant 30 – 70 % เรียงลำดับดังนี้; ดิน ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 1-3) ดินที่ปลูกหญ้า ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 4-6) ดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียลงไปบริเวณรากพืช ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 7-9) ดินที่มีการเติมแบคทีเรีย ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 10-12) *Methylobacterium* sp. NP3(ช่องวิ่งที่ 13) และ *Acinetobacter* sp. PK1 (ช่องวิ่งที่ 14)	64

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.10	การเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อยก่อนปลูกในกระถาง (A) และหญ้าซิกแนลเลื้อยหลังผ่านการบำบัดน้ำทิ้งเป็นระยะเวลา 60 วัน (B)	67
3.11	ปริมาณ สี (A) สารประกอบฟีนอลิค (B) และ COD (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังจากการบำบัดด้วยชุดการทดลองต่างๆ ในแปลงทดลองในระบบที่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า	74
3.12	สีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนบำบัด (A) ผ่านการบำบัดโดยดิน (B) และดินที่ปลูกหญ้า (C)	75
3.13	ปริมาณ สี (A) สารประกอบฟีนอลิค (B) และ COD (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังจากการบำบัดด้วยชุดการทดลองต่างๆ ในแปลงทดลองในระบบที่ไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า	77
3.14	สีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนบำบัด (A) ผ่านการบำบัดโดยดิน (B) ผ่านการบำบัดโดยดินที่ปลูกหญ้า (C) และผ่านการบำบัดโดยดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณราก (D)	78
ข.1	กราฟมาตรฐานของ Gallic acid	104
ข.2	กราฟมาตรฐานของแพลทตินัมโคบอลท์	106

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

POME	= Palm oil mill effluent
CFU	= Colony forming unit
CFMM	= Carbon free mineral medium
mg GAE/L	= milligram Gallic acid equipvalent per Litre
MPN	= Most probable number
WHC	= Water holding capacity
COD	= Chemical oxygen demand
TKN	= Total Kjeldahl nitrogen
TP	= Total phosphorus
PCR	= Polymerase chain reaction
DGGE	= Denaturing gradient gel electrophoresis
TBE	= Tris - Boric acid - EDTA

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

อุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันปาล์มถือเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญและจำเป็นต่อการอุปโภคบริโภคของมนุษย์ ไม่ว่าจะเป็นน้ำมันปาล์มดิบ (Crude palm oil) ที่ใช้ในการประกอบอาหารซึ่งถือเป็นผลผลิตหลัก หรือน้ำมันไบโอดีเซลซึ่งใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นวัตถุดิบในการผลิตก็ตาม ล้วนส่งผลให้เกิดอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันปาล์มขึ้นอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มมักก่อให้เกิดของเสียในรูปของน้ำเสียเป็นส่วนใหญ่และกลายเป็นน้ำทิ้งถึง 50 % (Ahmad *et al.*, 2003) ซึ่งมีสารประกอบอินทรีย์ค่อนข้างสูง มีสีคล้ำ ทำให้ระดับออกซิเจนในน้ำลดลงและส่งผลกระทบต่อพืชและสัตว์น้ำ (Park *et al.*, 2007) นอกจากนี้น้ำเสียยังมีองค์ประกอบของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิคซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่พบในผลปาล์ม สารกลุ่มนี้เป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้น้ำเสียเกิดสีคล้ำ (Sayadi *et al.*, 2000) ทั้งยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) ส่งผลให้การย่อยสลายทางชีวภาพในระบบบำบัดน้ำเสียลดลง (Mosse *et al.*, 2011) รวมถึงมีความเป็นพิษต่อพืชบางชนิดในสิ่งแวดล้อม (Phytotoxicity) (Mekki *et al.*, 2007) จากรายงานที่ผ่านมาพบปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มตั้งแต่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึงสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Alam *et al.*, 2009; Cordova-Rosa *et al.*, 2009; Limkhuansuwan *et al.*, 2010; Chantho *et al.*, 2013; Kietkwanboot *et al.*,2015; Tosu *et al.*, 2015) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ท้องถิ่นในระบบบำบัดน้ำเสียอาจถูกยับยั้งการทำงานหรือไม่มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค จึงทำให้ตรวจพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสูงเกินกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งกำหนดให้น้ำทิ้งมีสารประกอบฟีนอลิคได้ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2539) อีกทั้งน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วยังมีค่าซีโอดี และสีสูงกว่าค่ามาตรฐาน ฯ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว เพื่อให้สามารถปล่อยน้ำทิ้งสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ หรือเพื่อประโยชน์ในการนำน้ำที่บำบัดแล้วกลับมาใช้ประโยชน์ในภาคการเกษตรอีกทางหนึ่ง

การบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การกรองด้วยเมมเบรน การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ และการตกตะกอนด้วยสารเคมี ซึ่งวิธีเหล่านี้มีความยุ่งยากในการใช้งานและดูแลรักษาระบบ รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานค่อนข้างสูง และยังอาจก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม ข้อจำกัดดังกล่าวจึงนำไปสู่ทางเลือกในการใช้วิธีการทางชีวภาพในการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิค โดยอาศัยจุลินทรีย์และ/หรือพืช ซึ่งมีข้อดี คือ สามารถย่อยสลายสารมลพิษได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ จึงเป็นวิธีการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งถือเป็นการแก้ไขปัญหาที่ยั่งยืนไม่มีผลกระทบย้อนกลับมายังสิ่งแวดล้อม อีกทั้งค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีการอื่น การบำบัดสารมลพิษด้วยพืชร่วมกับจุลินทรีย์ เป็นวิธีการที่น่าสนใจ เนื่องจากมีขั้นตอนไม่ซับซ้อน ค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาระบบต่ำ พืชบางชนิดมีศักยภาพในการปลดปล่อยสารประกอบอินทรีย์ออกมาทางรากพืช (Root exudates) เช่น น้ำตาล, กรดอะมิโน, กรดอินทรีย์, เอนไซม์, คาร์โบไฮเดรต, สารประกอบฟีนอลิค และสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ (Fletcher and Hegde 1995; Van Hecke *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006) ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญและทำหน้าที่เป็นตัวชักนำการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์บริเวณรากพืช ทำให้การย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนเกิดขึ้นได้ดี (Leigh *et al.*, 2002; Chouychai *et al.*, 2009) โดยทั่วไปจุลินทรีย์บริเวณรากพืชอาจเป็นชนิดที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ หรืออาจใช้วิธีการเติมจุลินทรีย์ (Bioaugmentation) จากแหล่งอื่นเพื่อเพิ่มปริมาณและอัตราการย่อยสลายก็ได้ (Gerhardt *et al.*, 2010) วิธีการบำบัดสารมลพิษด้วยพืชร่วมกับจุลินทรีย์นอกจากสามารถเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์ และสารอาหารในดินผ่านทางรากพืชและกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์แล้ว ยังทำให้ออกซิเจนแพร่ผ่านในดินได้ดีโดยอาศัยรากพืช ซึ่งจะส่งผลต่อโครงสร้างและคุณภาพโดยรวมของดิน อีกทั้งรากพืชยังช่วยลดการถูกชะล้างพังทะลายของดินอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามวิธีการบำบัดทางชีวภาพนั้นมีข้อจำกัดที่ใช้เวลาในการบำบัดนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการบำบัดทางกายภาพและเคมี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแล้ว โดยอาศัยการเติมแบคทีเรียลงไปบริเวณรากของพืชวงศ์หญ้าชนิดหญ้าซิกแนลเลื้อย (*Brachiaria humidicola*) เนื่องจากมีรายงานว่าพืชกลุ่มนี้สามารถปลดปล่อยสารประกอบอินทรีย์ชนิดฟีนอลิคออกมาทางราก (Gopalakrishnan *et al.*, 2007; Subbarao *et al.*, 2008) จึงคาดว่าจะช่วยส่งเสริมการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายสารสีและสารประกอบฟีนอลิคของจุลินทรีย์ท้องถิ่นและจุลินทรีย์ที่เติมสู่รากพืชได้ดี อีกทั้งพืชที่เลือกใช้เป็นพืชอาหารสัตว์และสามารถปลูกในที่ลุ่มน้ำขังได้ดี จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาปลูกเพื่อบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานสกัด

น้ำมันปาล์ม สำหรับแบคทีเรียที่ใช้เติม ได้แก่ แบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ (Phenol-degrading bacteria) ที่ให้อัตราการย่อยสลายสารฟีนอลสูงกว่าสายพันธุ์เดียวเมื่อทำงานร่วมกัน (Khongkhaem *et al.*, 2011) โดยวิธีการนี้ช่วยเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคและสารสี ทำให้อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพเกิดเร็วขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพ ราคาไม่แพง และสะดวกในการประยุกต์ใช้บำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียจากภาคอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถใช้งานร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียที่มีอยู่เดิมได้

1.2 ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 ลักษณะทั่วไปของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ในกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มดิบ 1 ตัน มีน้ำเสียออกมาประมาณ 2.5 - 3 ตัน (Borja and Banks, 1994) โดยน้ำเสียมีอุณหภูมิสูงประมาณ 80 – 90 องศาเซลเซียส มีค่า pH อยู่ในช่วง 4 -4.5 และค่า Biochemical oxygen demand (BOD) ประมาณ 21,500 – 28,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าน้ำเสียชุมชนถึง 100 เท่า (Ma *et al.*, 1993) นอกจากนี้พบว่าค่า Chemical oxygen demand (COD) อยู่ในช่วง 45,000 – 65,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า Total Kjeldahl nitrogen (TKN) ประมาณ 500 - 800 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า Total suspended solid (TSS) ประมาณ 15,660 – 23,560 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าน้ำมันและไขมัน (Oil and grease) อยู่ในช่วง 1,077 – 7,582 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกทั้งตรวจพบสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วความเข้มข้น 30 ถึงมากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Alam *et al.*, 2009; Cordova-Rosa *et al.*, 2009; Limkhuansuwan *et al.*, 2010; Chantho *et al.*, 2013; Kietkwanboot *et al.*, 2015; Tosu *et al.*, 2015) (ตารางที่ 1.1) ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น แอนโทไซยานิน แคโรทีน เมลานอยดิน ลิกนิน และแทนนิน รวมถึงสารประกอบฟีนอลิคเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำทิ้งมีสีน้ำตาลคล้ำ (Hartley, 1977; Hwang *et al.*, 1978; Barker and Worgan, 1981)

ตารางที่ 1.1 คุณลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง

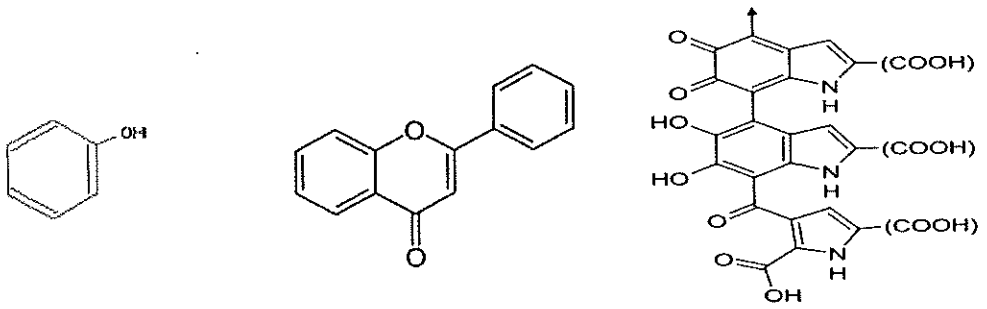
พารามิเตอร์	น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)
pH	4.15 - 4.45	5.5 - 9.0
BOD_5	21,500 – 28,500	≤ 60
COD	45,000 – 65,000	≤ 400
TKN	500 - 800	≤ 200
TSS	15,660 – 23,560	-
Oil & Grease	1,077 – 7,582	≤ 15
Phenolic compounds	30 ถึงมากกว่า 1,000	1
Color	สีน้ำตาลคล้ำ	ไม่เป็นที่พึงรังเกียจ

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ (2539); Alam *et al.* (2009); Cordova-Rosa *et al.* (2009); Limkhuansuwan *et al.* (2010); Chantho *et al.* (2013); Kietkwanboot *et al.* (2015); Tosu *et al.* (2015)

1.2.2 สารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

สารประกอบฟีนอลิค (Phenols, phenolics, phenolic compounds) มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH-group) ต่ออยู่เป็นหลัก สารกลุ่มนี้เกิดได้ทั้งจากการสังเคราะห์ของพืชและการสังเคราะห์ของมนุษย์เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น สีย้อม และ Beta hydroxy acid (BHA) เป็นสารที่ใช้ในทางการแพทย์ (Hunger and Ed, 2003) ซึ่งมีอยู่ในส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืช ทั้งในส่วนของ ลำต้น ผล ราก ใบ และเปลือก โดยมีลักษณะเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่และมีปริมาณแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช (Bodini *et al.*, 2010) สารประกอบฟีนอลิคแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ตามจำนวนวงแหวนอะโรมาติก ได้แก่ 1) Monocyclic phenols เป็นโครงสร้างที่มีวงแหวนอะโรมาติก 1 วง สามารถพบได้ทั่วไปในพืช เช่น Phenol (รูปที่ 2.1 A), catechol, hydro-quinone และ p-hydroxycinnamic acid 2) Dicyclic phenols เป็นสารที่มีวงแหวนอะโรมาติก 2 วง เช่น Flavonoids (รูปที่ 2.1 B), และ Lignans 3) Polycyclic phenols หรือ Polyphenol คือกลุ่มของสารที่มีวงแหวนอะโรมาติกมากกว่า 2 วง ได้แก่ Lignin, gallic acid ,

melanins (รูปที่ 2.1 C) และ tannins ทั้งนี้ตรวจพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแตกต่างกันไปในแต่ละโรงงานซึ่งมีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง ฯ เนื่องจากสารดังกล่าวมีความเข้มข้นสูงและมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี จึงส่งผลต่อการเกิดเป็นสีน้ำตาลในน้ำเสีย ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Enzymatic browning reaction) ในกรณีที่สารประกอบฟีนอลิคปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำได้ เมื่อมีระดับความเข้มข้นเพียงแค่ 5 - 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (Brown *et al.*, 1967) ทั้งยังมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดทางชีวภาพ (Meyer *et al.*, 1984) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิคบางชนิดมีความเป็นพิษสูงและสามารถแพร่เข้าสู่ร่างกาย โดยซึมผ่านทางผิวหนังได้ง่าย ทำให้เกิดอาการปวดหัว หน้ามืด ยกตัวอย่างเช่น ไอของสารฟีนอลซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิคชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างอย่างง่าย อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจและตา ในขณะที่สารฟีนอลในสถานะของแข็งอาจทำให้ผิวหนังถูกเผาไหม้หากมีการสัมผัสในปริมาณมาก



(A) (B) (C)

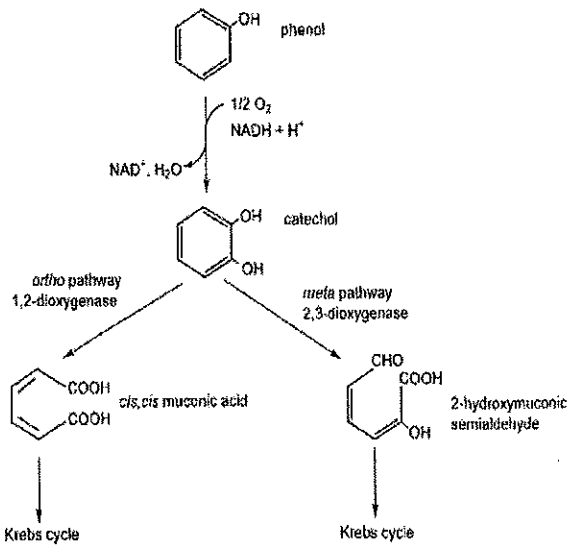
รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิคชนิดต่าง ๆ Phenol (A); Flavonoids (B); Melanins (C)

ที่มา : Quideau *et al.* (2011)

1.2.3 วิถีการย่อยสลายของสารประกอบฟีนอลิค

การย่อยสลายทางชีวภาพของสารฟีนอลโดยจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียและราสามารถย่อยสลายได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศจะมีประสิทธิภาพการย่อยสลายที่สูงกว่า (Contreras *et al.*, 2008) ซึ่งกระบวนการย่อยสลายฟีนอล

ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเกิดได้ 2 วิถี คือ วิถีเมทา (meta-pathway) และวิถีออโท (ortho-pathway) โดยขั้นตอนแรกเริ่มจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิจิเนชั่น (oxygenation) โดยเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลส (phenol hydroxylase) ไปเปลี่ยนฟีนอลให้อยู่ในรูปของสารตัวกลาง คือ เคติคอล (catechol) จากนั้นจะเข้าสู่ปฏิกิริยาการแตกวงของเคติคอล (ring cleavage) หากย่อยสลายผ่านวิถีเมทาได้สารตัวกลางคือ 2-ไฮดรอกซิมูโคนิค เอซิด (2-hydroxymuconic acid) โดยเอนไซม์เคติคอล 1,2 ไดออกซิจีเนส (1,2-dioxygenase) หรือผ่านวิถีออโทได้สารตัวกลางเป็น ซิส-ซิสมูโคนิค เอซิด (cis,cis-muconic acid) โดยเอนไซม์เคติคอล 2,3 ไดออกซิจีเนส (2,3 dioxygenase) ดังแสดงในรูปที่ 2 หลังจากนั้นเข้าสู่วัฏจักร Krebs และเมทาบอลิซึมทั่วไปของสิ่งมีชีวิต (Van Schie and Yung, 2000) ดังรูปที่ 1.2



(a) (b)

รูปที่ 1.2 วิถีการย่อยสลายฟีนอล (a) วิถีออโท (Ortho-Pathway) (b) วิถีเมทา (Meta-Pathway)
ที่มา : Van Schie and Yung (2000)

1.2.4 การบำบัดสารประกอบฟีนอลิคด้วยวิธีการทางชีวภาพ

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากภาคอุตสาหกรรม โดยอาศัยวิธีการทางกายภาพ ทางเคมี และ/หรือทางชีวภาพ (Merkl *et al.*, 2005) การบำบัดทางกายภาพนั้นมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น การดูดซับโดยถ่านกัมมันต์ (Activated carbon)

การกรองโดยใช้เมมเบรน (Membrane) ซึ่งมีหลักการ คือ การแยกของแข็งออกจากของเหลวโดยมีการนำน้ำที่มีการปนเปื้อนสารมลพิษมากรองผ่านแผ่นกรองชนิดต่าง ๆ ข้อดีของวิธีการนี้ คือ สามารถกำจัดสารแขวนลอยได้ดี แต่ไม่สามารถกำจัดสารที่ละลายปนมากับน้ำได้ อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายสูง ส่วนการบำบัดทางเคมี เช่น การทำให้เกิดตะกอน (Precipitation) และการสะเทิน (Neutralization) ซึ่งมีหลักการ คือ การใช้สารเคมีเติมลงไปในน้ำเพื่อเปลี่ยนรูปของสารมลพิษให้อยู่ในรูปที่สามารถกำจัดได้ง่ายและปรับสภาพให้เป็นกลาง ตามลำดับ ข้อดีของวิธีการนี้ คือ สามารถกำจัดสารมลพิษได้อย่างรวดเร็ว แต่มีข้อเสีย คือ ก่อให้เกิดสารตกค้างในระบบบำบัด อีกทั้งค่าใช้จ่ายสูง ส่วนวิธีการทางชีวภาพนั้นมีหลักการ คือ การใช้สิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ และ/หรือพืช ในการบำบัดสารมลพิษ ซึ่งเป็นวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเพราะจะไม่เหลือสารตกค้างในระบบบำบัด จึงไม่ทำลายระบบนิเวศน์ รวมถึงต้นทุนและค่าดำเนินการไม่สูงอีกด้วย ทั้งเป็นวิธีที่มีการยอมรับและถูกนำมาใช้ในการบำบัดสารมลพิษอย่างแพร่หลายเทคนิคในการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพซึ่งเป็นที่นิยมใช้ ได้แก่ การเติมปัจจัยที่จำกัด (Limiting factor) เช่น สารอาหาร หรืออากาศสู่พื้นที่ปนเปื้อนหรือเรียกว่าการกระตุ้นทางชีวภาพ (Biostimulation) เพื่อส่งเสริมการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ในพื้นที่ (Indigenous microorganisms) และอีกหนึ่งเทคนิค ได้แก่ การเติมจุลินทรีย์ (Bioaugmentation) เพื่อบำบัดสารมลพิษ ซึ่งอาจเป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่น (Indigenous) ที่มีในพื้นที่นั้น หรืออาจเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างถิ่น (Exogenous) เพื่อเร่งกระบวนการย่อยสลายสารมลพิษ วิธีการนี้มีข้อดี คือ สามารถควบคุมกระบวนการบำบัดสารมลพิษโดยการกำหนดชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายสารมลพิษที่สนใจ อีกทั้งจุลินทรีย์ที่เติมมักมีความทนทานต่อสารมลพิษนั้น ๆ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารมลพิษส่วนใหญ่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อม และผ่านการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษในห้องปฏิบัติการแล้ว (Cunningham *et al.*, 2000; Obuekwe and Al-Muttawa, 2001) จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาของ Movahedyan *et al.*(2009) ศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลโดยใช้ *Pseudomonas Putida* ซึ่งคัดแยกมาจากตะกอนของน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมการน้ำมันและโรงงานอุตสาหกรรมปิโตรเลียม จำนวน 10 โคโลนี กำหนดให้เป็น B1-B10 จากนั้นเลี้ยงเชื้อใน mineral salts medium (MS medium) โดยเลี้ยงเชื้อแยกกัน เป็นเวลา 7 วัน และทำการทดลองโดยเติมสารฟีนอลสังเคราะห์ลงไปที่ความเข้มข้น 200 - 900 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการติดตามตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลโดยวิธี 4-aminoantipyrine ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร พบว่า B5, B6 และ B9 สามารถสลายสารฟีนอลได้อยู่ในช่วง 500-600 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 48 ชั่วโมง นอกจากนั้นมีการใช้จุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและราหลากหลายสายพันธุ์ในการย่อยสลายสารฟีนอล เช่น *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Fusarium* และ *Graphium* ดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 การใช้จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในการบำบัดสารฟีนอล

ชนิดจุลินทรีย์	สายพันธุ์	อ้างอิง
Bacteria	*Alcaligenes faecalis*	Yan Jiang *et al.* (2007)
	Alcaligenes xylosoxidans Y234	Sung Ho *et al.* (1997)
	Arthobacter sp.	Kar *et al.* (1997)
	Arthrobacter citreus	Chandrakant *et al.* (2005)
	Arthrobacter chlrophenolicus A6	Unell *et al.* (2007)
	Pseudomonas putida	Annadurai *et al.* (2008)
	Pseudomonas sp. EGD-AKN5	Bhardwaj *et al.* (2015)
	Sphingomonas sp. GY2B	Gong *et al.* (2015)
	Arthrobacter sp. W1	Shi *et al.* (2015)
Fungi	*Candida tropicalis*	Sunil S *et al.* (2007)
	Candida tropicalis NICM 3556	Yan *et al.* (2007)
	Fusarium sp.	Varma *et al.* (2009)
	Graphium sp.FIB4	Weijian Cai *et al.* (2007)
	Candida tropicalis	Chen *et al.* (2002)

1.2.5 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* และ *Acinetobacter*

1.2.5.1 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ประเภท Facultative methylotrophs ลักษณะโดยทั่วไปมีสีชมพู เจริญเติบโตได้ง่าย ทั้งยังสามารถเจริญเติบโตได้ภายใต้สภาวะที่มี Methanol และ Methylamine พบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดินและเนื้อเยื่อพืช (Lidstrom and Chistoserdova, 2002; Aken *et al.*, 2004) ทั้งปากใบ (Stomata) บริเวณรากพืช (Rhizosphere) มีรายงานการใช้แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในการบำบัดสารมลพิษหลายชนิด เช่น Methanolic, Formaldehyde และ Phenol ดังแสดงในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 การย่อยสลายสารมลพิษชนิดต่าง ๆ โดยแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*

สายพันธุ์	สารมลพิษ	อ้างอิง
Methylobacterium sp. MF1	formaldehyde	Mitsui *et al.* (2005)
Methylobacterium sp BJ 001	nitro-substituted explosives	Aken *et al.* (2004)
Mixed culture of *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1	phenol	ปิยะมาศ คงแขม, (2552)
Mixed culture of *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1	phenol	Tosu *et al.* (2015)
Methylobacterium organophilum CZ-2	Polycyclic aromatic hydrocarbons	Zuniga *et al.* (2013)

จากรายงานของ Campos *et al.* (2006) ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. RXM CCMI 908 ที่ตรึงโดยใช้ Calcium alginate ในการบำบัด Formamide ที่ปนเปื้อนมาจากอุตสาหกรรมโลหะหนัก ผลการศึกษาที่ได้คือแบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพการบำบัดสูงสุดถึง 84%

Li and Gu (2007) ศึกษาการใช้ *Methylobacterium mesophilicum* Sr ในรูปแบบเซลล์อิสระเพื่อการย่อยสลาย dimethyl isophthalate ที่มีการปนเปื้อนมาจากกระบวนการผลิต dimethyl isophthalate ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารมลพิษดังกล่าวสูงถึง 87% ภายในเวลา 7 วัน

ปิยะมาศ คงแขม (2552) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 โดยวิธีตรึงเซลล์แบบกักขังในซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ถึง 80-85 % ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยกว่า 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 10 วัน อย่างไรก็ตามเนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ซิลิกาค่อนข้างมีความยุ่งยาก และอัตราในการย่อยสลายฟีนอลค่อนข้างต่ำ

พนิดา โต๊ะสู (2555) ได้ศึกษาวิธีการตรึงเซลล์เพื่อย่อยสลายสารฟีนอลโดยทำการตรึงแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนทะลายปาล์มเปล่า และเส้นใยปาล์ม ผลปรากฏว่าการตรึงแบคทีเรียผสมบนทะลายปาล์มเปล่ามีอัตราการ

ย่อยสลายสารฟีนอลสูงกว่าการตรึงบนเส้นใยปาล์มจึงเลือกการตรึงเซลล์บนทะลายปาล์มเปล่ามาทดสอบการบำบัดสารฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีความเข้มข้นประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลมีประสิทธิภาพการบำบัดสูงสุด 72% ภายในเวลา 7 วัน งานวิจัยนี้จึงสนใจนำเซลล์แบคทีเรียผสมดังกล่าวมาประยุกต์ใช้โดยการเติมลงไปบริเวณรากพืชเพื่อบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.2.5.2 แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter*

แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ประเภทต้องการออกซิเจน (Aerobic bacteria) ในการเจริญ พบได้แพร่หลายในธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน สิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ และจากผิวหนังมนุษย์ แบคทีเรียสกุลนี้สามารถย่อยสลายสารมลพิษได้หลากหลายชนิด เช่น Biphenyl, Phenol, Benzoate และ Crude oil (Juni, 1978) ทั้งยังมีความสามารถในการผลิต Emulsifying agents ทำให้สารมลพิษที่ละลายน้ำได้น้อย (Low solubility) ถูกย่อยสลายได้ง่ายขึ้น และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส (Lipase) ที่ทำให้การย่อยสลายไขมันเกิดได้ง่ายขึ้น (Navon-Venezia *et al.*, 1995 ; Barkay *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 1999) มีรายงานการใช้แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* ในการบำบัดสารมลพิษหลายชนิด เช่น Diesel oil, Dye และ Phenol ดังแสดงในตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 การย่อยสลายสารมลพิษชนิดต่าง ๆ โดยแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter*

สายพันธุ์แบคทีเรีย	สารมลพิษที่ย่อยสลาย	อ้างอิง
Acinetobacter calcoaceticus MM5	diesel และ heating Oil	Marin *et al.* (1995)
Acinetobacter calcoaceticus NCIM 2890	diazo dye	Ghodake *et al.* (2009)
Acinetobacter calcoaceticum A-122	p-nitrophenol (PNP)	Ignatov *et al.* (1999)
Acinetobacter sp. HY-7	carbamazepine	Cui *et al.* (2008)
Acinetobacter sp. PD12	phenol	Ying *et al.* (2007)

นอกจากนี้งานวิจัยของ Fang-yao *et al.* (2007) ศึกษาการย่อยสลายสาร Methyl parathion ที่มีแหล่งปนเปื้อนมาจากยาฆ่าแมลง โดยใช้แบคทีเรีย *Acinetobacter radioresistens* USTB-04 โดยทำการแปรผันชนิดและปริมาณแหล่งอาหารของแบคทีเรียเพื่อทดสอบอัตราในการบำบัดพบว่า การเติม Phosphate ปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตรทำให้อัตราการย่อยสลายเกิดขึ้นเร็วที่สุด ภายใน 2 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารอื่นๆ ที่ใช้เวลา 4 วันในการย่อยสลายสารดังกล่าวจากความเข้มข้น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chen *et al.* (2011) ศึกษาการบำบัด Victoria Blue R ซึ่งเป็นสีชนิดหนึ่งที่พบในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและโรงงานเครื่องสำอาง โดยใช้แบคทีเรีย *Acinetobacter calcoaceticus* YC210 ซึ่งทดสอบในระบบกะ (Batch) ผลปรากฏว่าประสิทธิภาพการบำบัดสีข้างต้นสูงถึง 94.5% ใช้เวลา 2.5 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 5-7

1.2.6 การบำบัดสารมลพิษโดยรากพืช (Rhizoremediation)

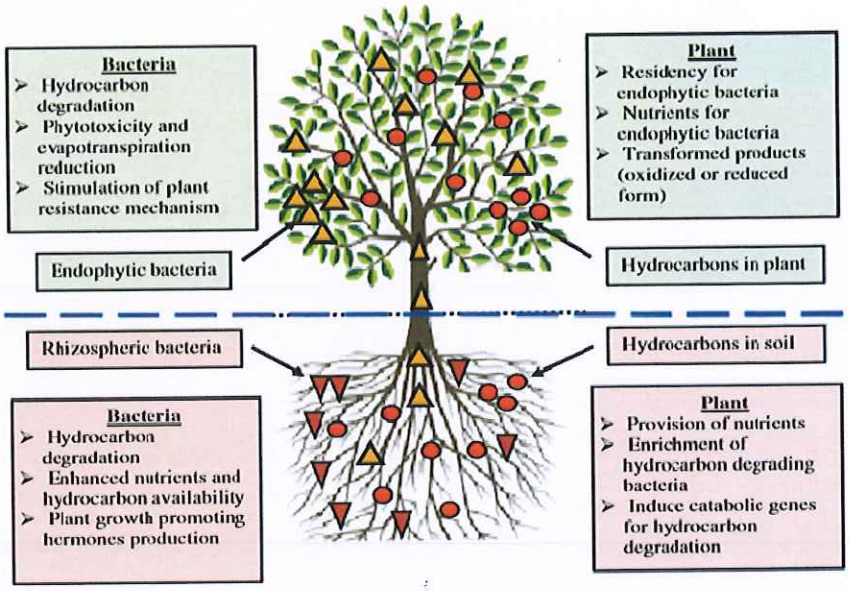
1.2.6.1 กลไกการบำบัดสารมลพิษของพืช

กลไกการบำบัดสารมลพิษโดยพืช (Phytoremediation) นั้น มีด้วยกันหลายรูปแบบ ได้แก่ การสกัด/สะสมโดยพืช (Phytoextraction หรือ Phytoaccumulation) คือ การดูดซับและย้ายตำแหน่งของสารปนเปื้อนในดินโดยรากพืชไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของพืช และการทำให้เสถียรโดยพืช (Phytostabilization) เป็นการใช้พืชเพื่อลดการแพร่กระจายการปนเปื้อนโดยการดูดซับ การสะสม หรือการตกตะกอนซึ่งเกิดขึ้นบริเวณรากพืช โดยรากพืชอาจมีการผลิตสารบางชนิดที่ช่วยลดการละลายน้ำของสารมลพิษทำให้กระจายตัวได้น้อยลง ทั้งนี้กลไกทั้ง 2 รูปแบบข้างต้นเป็นกระบวนการที่สำคัญในการบำบัดโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม ส่วนกลไกในการบำบัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่สำคัญ ได้แก่ การย่อยสลายโดยพืช (Phytodegradation) เกิดขึ้นได้ทั้งภายในต้นพืชหรือบริเวณรากพืช โดยอาศัยการทำงานของพืชร่วมกับจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารมลพิษ ซึ่งพืชสามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น dehalogenase, nitroreductase, peroxidase, lactase และ nitrilase เพื่อสร้างความจำเพาะในการบำบัดสารมลพิษแต่ละชนิด (Cunningham *et al.*, 1995) และการบำบัดโดยรากพืช (Rhizoremediation) ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการที่สำคัญเช่น การกรองโดยรากพืช (Rhizofiltration) และการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์บริเวณรากพืช (Rhizodegradation หรือ Root-zone biodegradation) อย่างไรก็ตามการบำบัดดินและน้ำที่ปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์บริเวณรากพืช ถือเป็นกลไกที่สำคัญในการใช้พืชเพื่อบำบัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Gaskin and

Bentham, 2010) ปัจจุบันวิธีการนี้ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น โดยนำมาใช้บำบัดสารมลพิษชนิดต่างๆ เช่น ปิโตรเลียม ยาฆ่าแมลง โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เบนซีน โทลูอีน เอทธิลเบนซีน และไซลีน เนื่องจากมีขั้นตอนไม่ซับซ้อน ต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาระบบต่ำ และยังสามารถเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์ สารอาหาร และออกซิเจนในดินผ่านทางพืช และกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ ซึ่งจะส่งผลต่อโครงสร้างและคุณภาพโดยรวมของดิน อีกทั้งรากพืชยังช่วยลดการถูกชะล้างพังทลายของดินอีกด้วย

การย่อยสลายสารมลพิษที่เกิดขึ้นบริเวณรากพืชจะอาศัยการทำงานของพืชร่วมกับจุลินทรีย์บริเวณรากพืชเป็นสำคัญ โดยพืชให้สารอาหารและพื้นที่สำหรับส่งเสริมการเจริญและอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน แบคทเรียเหล่านี้ทำให้สารเปลี่ยนรูปมีความเป็นพิษน้อยลง อีกทั้งพืชบางกลุ่มมีศักยภาพปลดปล่อยสารบางประเภทออกมาทางรากพืช ได้แก่ น้ำตาล กรดอินทรีย์ คาร์โบไฮเดรต และสารอินทรีย์อื่น ๆ เช่น เทอร์ปีน ฟลาโวนอยด์ และสารที่มีองค์ประกอบของลิกนิน (Singer *et al.*, 2003; Kumar *et al.* 2006; Sun *et al.*, 2010) ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญและชักนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ท้องถิ่นและจุลินทรีย์ที่เติมสู่บริเวณรากพืชได้ดี ในขณะที่แบคทีเรียช่วยลดความเป็นพิษในดินด้วยการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนอย่างสมบูรณ์ (Mineralization) ช่วยให้ธาตุอาหารในดินอยู่ในรูปพร้อมใช้มากขึ้น ซึ่งจะลดความเป็นพิษต่อพืชและการคายระเหยของพืช และกระตุ้นการผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืช ในบางกรณีอาจเพิ่มชีวภาพพร้อมใช้ (Bioavailability) ของสารไฮโดรคาร์บอนด้วยการผลิตสารลดแรงตึงผิวทำให้การละลายน้ำของสารเพิ่มขึ้น (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2013) (รูปที่ 1.3) นอกจากนี้สารตัวกลางที่ได้จากการย่อยสลายสารฟลาโวนอยด์โดยจุลินทรีย์บริเวณรากพืช เช่น resorsinol, phloroglucinol phenylacetic acid, cinnamic acid และ protocatechuic acid ทำให้จุลินทรีย์ปรับตัวได้ดีและย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนผ่านวิถีการย่อยสลายแบบเดียวกันได้ดีเช่นกัน (Kim *et al.*, 2008) ตัวอย่างแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth-promoting bacteria) เช่น *Enterobactor* sp. สามารถสร้างสารอินทรีย์จำเพาะ ได้แก่ Siderophore ซึ่งช่วยรีดิวซ์ธาตุเหล็กจาก Fe (III) เป็น Fe (II) ซึ่งถูกดูดซึมโดยพืชได้ง่ายกว่า (Katiyar and Goel, 2004) และแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase มีบทบาทยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Pythium ultimum* ในแตงกวาและโรคเน่าเละในมันฝรั่งจากเชื้อ *Erwinia carotovora* (Glick *et al.*, 2007) นอกจากนี้แบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่ช่วยควบคุมเชื้อก่อโรคพืช (Marques *et al.*, 2010)การศึกษาของ Fletcher and Hegde (1995) ซึ่งตรวจสอบการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิคจากรากพืชจำนวน 17 ชนิด ที่ใช้ในการบำบัดสารพีซี

บี (polychlorinated biphenyls; PCBs) โดยสารประกอบฟีนอลิคช่วยส่งเสริมการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ย่อยสลายสารพีซีบีผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมร่วม พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่วัดได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและระยะเวลาในการเจริญของพืช โดยพืชบางชนิดปลดปล่อยสารข้างต้นต่ำกว่าระดับสับสเตรทที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในขณะที่พืชบางชนิดมีแนวโน้มในการปลดปล่อยสารในระดับที่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งต้น Crabapple (*Malus fusca*) ปล่อยสารดังกล่าวมากที่สุด เท่ากับ 2.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่หญ้า 2 ชนิด คือ Big bluestem (*Andropogon gerardi*) และ Indian grass (*Sorghastrum nutans*) ผลิตน้อยที่สุด คือ 0.48 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างพืชและแบคทีเรียในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอน
ที่มา: Khan *et al.* (2013)

1.2.6.2 การบำบัดสารมลพิษของพืชร่วมกับแบคทีเรีย

โดยทั่วไปจุลินทรีย์บริเวณรากพืชมีอยู่แล้วตามธรรมชาติ แต่ปริมาณจุลินทรีย์ในดินปนเปื้อนสารมลพิษมักมีจำนวนน้อย ซึ่งอาจจะไม่เพียงพอต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนจึงต้องอาศัยการเติมจุลินทรีย์ (Gerhardt *et al.*, 2010) เพื่อช่วยเพิ่มชีวมวลและความต้านทานของพืชต่อความเครียดในสภาวะที่มีการปนเปื้อน รวมทั้งช่วยเพิ่มอัตราการปรับตัว ด้วยการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันของพืชและจุลินทรีย์ การย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนด้วยจุลินทรีย์

บริเวณรากพืชจึงมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้จุลินทรีย์หรือการใช้พืช (ไม่เติมจุลินทรีย์) บำบัดเพียงอย่างเดียว (Afzal *et al.*, 2012)

จากรายงานที่ผ่านมามีตัวอย่างการใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียในการบำบัดสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ดังตารางที่ 1.5 นอกจากนี้การศึกษาของ Gaskin and Bentham, (2010) ใช้หญ้าท้องถิ่นออสเตรเลีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cymbopogon ambiguous*, *Brachiaria decumbens* และ *Microlaena stipoides* ในการบำบัดสารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีส่วนผสมของดีเซล (Diesel) และน้ำมันผสม (Oil mixture) ในบริเวณเหมืองแห่งหนึ่ง โดยการประเมินปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด (Total petroleum hydrocarbon; TPH), กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในดิน (Soil lipase activity) และปริมาณจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน พบว่าการลดลงของ TPH จะแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด โดยระบบที่มีการปลูกพืชจะกำจัด TPH ได้ดีกว่า มีค่า soil lipase activity สูงกว่า และตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่ไม่มีพืช และพบว่าพืชเหล่านี้สามารถกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้โดยไม่ต้องมีการเติมสารอาหารเพิ่มในดิน

รายงานของ Korda *et al.* (1997) ศึกษาการเติมแบคทีเรีย *Pseudomonas fluoresens* และ *P. aureofaciens* บริเวณรากของข้าวบาร์เลย์ เพื่อย่อยสลายฟีแนนทรีน พบว่าสามารถลดปริมาณของฟีแนนทรีนในดินจาก 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เหลือ 400 - 900 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภายใน 28 วัน ในขณะที่ข้าวบาร์เลย์ที่ไม่เติมแบคทีเรียสามารถลดปริมาณของฟีแนนทรีนในดินเหลือ 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในเวลาเท่ากันและการเติมแบคทีเรียยังทำให้ข้าวบาร์เลย์เจริญได้ดีขึ้น

Johnson *et al.* (2003) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อนสาร Chrysene โดยใช้หญ้า Ryegrass สำหรับปศุสัตว์ และใช้การเติมเชื้อ *R. leguminosarum* โดยมีชุดการทดลองดังนี้ (1) ดิน (2) ดินกับพืช (3) ดินกับพืช และแบคทีเรีย ซึ่งมีความเข้มข้นของสารปนเปื้อนเริ่มต้นเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อผ่านไป 180 วัน ผลปรากฏว่าในชุดการทดลองที่ 3 ความเข้มข้นคงเหลือประมาณ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ความเข้มข้นคงเหลือประมาณ 330 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Dams *et al.* (2007) พบว่าการเติม *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 3972 ลงสู่ดินที่ปลูกข้าวสาลี (*T. aestivum*) ช่วยในการบำบัดสาร Pentachlorophenol (PCP) ที่มาจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษและใช้รักษาสภาพเนื้อไม้ในการทำแนวรั้วได้ดีกว่าระบบที่มีการปลูกพืชเพียงอย่างเดียว โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน สามารถลดความเข้มข้นของสาร PCP จาก 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เหลือประมาณ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่เติม

แบคทีเรีย คือ ดิน หรือ ดินและพืช ลดเหลือ 90 และ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้พบปริมาณของจุลินทรีย์บริเวณรากพืชสูงกว่าในดิน รวมทั้งแบคทีเรียยังมีบทบาทในการปกป้องพิษของสาร PCP ที่มีต่อการเจริญของพืช

นอกจากนี้เทคนิคการเติมจุลินทรีย์เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดโดยตรง ดังเช่นรายงานของ Afzal *et al.* (2012) ทดลองเติมแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่น *Pantoea* sp. ITSI10, *Pantoea* sp. BTRH79 และ *Pseudomonas* sp. MixRI75 ทั้งเติมแบบสายพันธุ์เดี่ยวและเติมร่วมกัน เพื่อย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยเปรียบเทียบวิธีการเติมแบคทีเรีย 2 รูปแบบได้แก่ การเคลือบกับเมล็ดพืช และการเติมลงสู่ดิน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ร่วมกันในดินทำให้ความสามารถในการย่อยสลาย การเจริญของพืชและจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ดีกว่า ดังนั้นการใช้วิธีการร่วมระหว่างการเติมแบคทีเรียในดินและการใช้พืชช่วยส่งเสริมการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่ตกค้างในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการใช้จุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียวอาจไม่สามารถย่อยสลายสารได้อย่างสมบูรณ์ ปัจจุบันจึงมีการศึกษาการเติมกลุ่มจุลินทรีย์ (Microbial consortia) ลงไปในบริเวณรากพืชเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้การสเปรย์แบคทีเรียชนิด *Pseudomonas fluorescens* และ *P. aeruginosa* บนใบของต้น Chickpea และการเติมแบคทีเรียในดินดินที่ปลูกพืชดังกล่าว ส่งผลให้มีการชักนำการผลิตเอนไซม์ Phenylalanine ammonialyase (PAL) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปสาร L-phenylalanine เป็นสารประกอบฟีนอลิค เช่น tannic, gallic, caffeic, chlorogenic และ cinnamic acids ซึ่งเป็น Secondary metabolite ที่ผลิตในพืชและมีความสำคัญต่อการต้านทานโรคพืชที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotinia sclerotiorum* อย่างไรก็ตามพบว่าการเติม *P. fluorescens* มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการผลิตสารประกอบฟีนอลิคดีกว่า แต่ระดับความต้านทานโรคของ PAL ในพืชที่เติม *P. aeruginosa* สูงกว่า อีกทั้งการสเปรย์แบคทีเรียบนใบพืชส่งผลให้กิจกรรมของ PAL เกิดขึ้นได้เร็วกว่าการเติมในดิน (Basha *et al*, 2006) จากผลการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าทั้งวิธีการและระยะเวลาในการเติมแบคทีเรีย ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดสารมลพิษในดิน

ตารางที่ 1.5 ตัวอย่างการศึกษาที่ใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน

ชนิดพืช	สายพันธุ์แบคทีเรีย	สารมลพิษ	อ้างอิง
Maize	*P. putida* MUB1	Hydrocarbon	Chouychai *et al.* (2012)
Italian ryegrass	*Pseudomonas* sp. strain ITRI53	Hydrocarbon	Afzal *et al.* (2011)
Alfalfa	*Pseudomonas* sp. strain ITRI53	Hydrocarbon	Teng *et al.* (2011)
Barley	P.*aureofaciens* และ *P. aureofaciens*	Hydrocarbon	Anokhina *et al.* (2004)
Rice	*Acinetobacteria* sp.	Hydrocarbon	Li *et al.* (2008)
Wheat	*Pseudomonas* sp. GF3	Phenanthrene	Sheng and Gong (2006)
Barmultra grass	*P. putida* PCL1444	Naphthalene	Kuiper *et al.* (2001)

1.2.7 ลักษณะทั่วไปของหญ้าซิกแนลเลื้อย

กลุ่มหญ้าซิกแนล ประกอบด้วย หญ้าซิกแนลตั้ง (*Brachiaria brizantha*) หญ้าซิกแนลนอน (*Brachiaria decumbens*) และหญ้าซิกแนลเลื้อย (*Brachiaria humidicola*) จัดเป็นพืชอาหารสัตว์เขตร้อน หญ้าซิกแนลเลื้อยสามารถอยู่รอดได้ในดินที่มีความเป็นกรด มีลักษณะลำต้นเลื้อยและสานกันหนาแน่น มีรากตามข้อ สูงประมาณ 40-50 เซนติเมตร ดังรูปที่ 1.4 แหล่งเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา ประเทศไทยนำเข้ามาจากฮ่องกงเมื่อปี พ.ศ. 2499 ติดเมล็ดค่อนข้างน้อย การปลูกใช้เมล็ด 2 กิโลกรัมต่อไร่ หรือใช้หน่อปักชำ เติบโตได้ดีในที่มีปริมาณน้ำฝนประมาณ 1,500 มิลลิเมตรตลอดปี ทนต่อสภาพน้ำท่วมขังได้ดีพอสมควร เจริญเติบโตได้ดีในดินหลายชนิด แม้กระทั่งดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ปลูกร่วมกับถั่วลายได้ดีกว่าถั่วอื่น ๆ และมีระยะการเก็บเกี่ยว 45-60 วัน โดยมีผลผลิตน้ำหนักแห้ง (Dry matter) ของหญ้า 2.7 ตันต่อไร่ต่อปี (ฉายแสง ไผ่แก้ว และคณะ, 2535) โดยส่วนใหญ่เกษตรกรใช้เป็นอาหารสำหรับแพะ และสามารถนำไปใช้เป็นซับสเตรทในการผลิตก๊าซชีวภาพได้อีกด้วย ซึ่งหญ้าชนิดนี้สามารถปลดปล่อยสารจากรากที่สามารถยับยั้งกระบวนการไนตริฟิเคชั่น เรียกว่า Biological nitrification inhibitors (BNI) สารประกอบเหล่านี้ได้แก่ methyl-*p*-coumarate และ methyl ferulate (Gopalakrishnan *et al.*, 2007; Subbarao *et al.*, 2007) จากการเปรียบเทียบกับหญ้าซิกแนลและพืชอาหารสัตว์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Melinis minutiflora* ที่ปลูกใน

ตู้ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Growth chamber) เป็นเวลา 60 วัน พบว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยมีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการไนตริฟิเคชั่นและช่วยตรึงไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมมากกว่าพืชอีก 2 ชนิด อีกทั้งพบว่าจำนวน Ammonium oxidizing bacteria (AOB) และการปล่อย N_2O จากดินน้อยกว่าพืชอีก 2 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองใช้สารจากรากพืช (Root exudates) และสารสกัดจากดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ยับยั้งการเจริญของ AOB ในขณะที่สารจากรากหญ้าชนิดอื่นไม่ยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ กล่าวได้ว่าคุณสมบัติข้างต้นเป็นกลไกหนึ่งในการปรับตัวของหญ้าซิกแนลเลื้อยที่เก็บรักษาและใช้ไนโตรเจนอย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (Ishikawa *et al.*, 2003)

รูปที่ 1.4 ลักษณะของหญ้าซิกแนลเลื้อย
ที่มา: http://nutrition.dld.go.th

1.2.8 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ในดินโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE

การศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction - Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) เริ่มต้นขึ้นจากการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในดิน (Muyzer *et al.*, 1993) โดยเทคนิคนี้สามารถใช้ศึกษาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 200 คู่เบส (Base pair) และสูงสุดไม่เกิน 500 คู่เบส (Smalla, 1998) ซึ่งสามารถศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างได้โดยตรง เป็นการลดปัญหาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารใน

ห้องปฏิบัติการได้ ทำให้สามารถประเมินความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้อย่างละเอียดและสมบูรณ์มากขึ้นกว่าวิธีดั้งเดิม (Mohlenhoff *et al.*, 2000) การใช้เทคนิค PCR เป็นการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (Template DNA), Thermostable DNA polymerase, Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) รวมถึง Oligonucleotide primers และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เทคนิค PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90 - 95 องศาเซลเซียส (2) ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50 - 55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม (3) ขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก Primer ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ อุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70 - 75 องศาเซลเซียส การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 20 - 30 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ Amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก สำหรับเทคนิค DGGE นั้น อาศัยหลักการแยกความแตกต่างกันของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าในแนวตั้งโดยมีตัวกลางเป็นเจลพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide gel) โดยแยกดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกันได้แม้ว่าขนาดความยาวของดีเอ็นเอจะเท่ากัน ซึ่งอาศัยหลักความแตกต่างของความเข้มข้นของสารที่มีความสามารถในการแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturant) ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นของสาร (Gradient) จากส่วนบนของแผ่นเจลที่มีความเข้มข้นต่ำไปสู่ส่วนล่างของแผ่นเจลที่มีความเข้มข้นสูง รวมไปถึงการใช้อุณหภูมิค่อนข้างสูงในการสลายพันธะ ระหว่างคู่เบส G - C ซึ่งเป็นการจับกันโดยใช้พันธะไฮโดรเจน จากความเข้มข้นหรือปริมาณของคู่เบส G - C ที่มีในดีเอ็นเอแต่ละคู่ที่แตกต่างกันนี้ซึ่งทำให้การเคลื่อนที่ในตัวกลางดังกล่าวที่แตกต่างกันจึงทำให้มองเห็นลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจลที่แตกต่างกัน (ดวงหทัย สิงห์คะ และ วสุ ปฐมอารีย์, 2554) ตัวอย่างงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในดินมีดังนี้

Wartiainen *et al.* (2007) ศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในดินบริเวณรากของข้าวสายพันธุ์ Paddy-nifH ทำการสกัดดีเอ็นเอจากดินโดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ซึ่งใช้สภาวะดังนี้ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที annealing ที่ 94องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที ทำซ้ำ 35 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทดสอบหา Genomic DNA โดยใช้ 2 % agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide 15 นาที จากนั้นนำขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่น นำเจลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ Denaturing gradient gel electrophoresis โดยใช้ 8% polyacrylamide gel ความเข้มข้นของยูเรียและฟอร์มาไมด์ 45% - 60% ใช้กระแสไฟที่

75 Volt อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide ระยะเวลา 15 นาที และนำแผ่นเจลล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV จากนั้นตัดเจลในบริเวณที่สนใจไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่าผลจากการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของลำดับเบสกับฐานข้อมูลอยู่ในช่วง 90 ถึง 100 % เป็นแบคทีเรียกลุ่มของ *Azoarcus* หลายสายพันธุ์

Xu *et al.* (2009) ศึกษาชนิดของแบคทีเรียบริเวณรากถั่วเหลืองโดยแปรผันดินที่ใช้ปลูกถั่วเหลืองที่แตกต่างกันและประเมินว่าระหว่างดินที่มีสีดำและดินที่มีสีน้ำตาลคล้ำแต่ปลูกพืชชนิดเดียวกันจะมีความแตกต่างกันทางโครงสร้างของแบคทีเรียหรือไม่ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากดินโดยทำตามวิธีการของ Cahyani et al. 2003 จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ซึ่งใช้สภาวะดังนี้ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และ extension ที่ 68 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที ทำซ้ำ 25 รอบ โดยใช้ไพรเมอร์ 357f- GC และ 517r จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทดสอบหา Genomic DNA โดยใช้ 2 % agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide 15 นาที จากนั้นนำขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่น นำเจลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ Denaturing gradient gel electrophoresis โดยใช้ 8% polyacrylamide gel ความเข้มข้นของยูเรียและฟอร์มาไมด์ 30% - 70% ใช้กระแสไฟที่ 100 Volt อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide ระยะเลา 15 นาที และนำแผ่นเจลล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV จากนั้นตัดเจลในบริเวณที่สนใจไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่า ในดินที่มีสีดำเจอกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความหลากหลายกว่าดินที่มีสีน้ำตาลคล้ำ โดยตรวจพบแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Proteobacteria*, *Actinobacteria* และ *Bacteroidetes*

Maqbool *et al.* (2012) ศึกษาการบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมที่มีความเข้มข้น 2,541 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยวิธีการเติมแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนได้ 2 รูปแบบคือ เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงบน Sodium alginate และ Diatomite สู่รากพืชชนิด *Sesbania cannabina* ทำการศึกษาเปรียบเทียบการบำบัดและติดตามตรวจสอบโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์เมื่อระยะเวลาผ่านไป 120 วัน พบว่าชุดการทดลองที่เติมเซลล์อิสระมีสารไฮโดรคาร์บอนคงเหลือ 673 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงมีสารไฮโดรคาร์บอนคงเหลือ 867 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อีกทั้งการติดตามตรวจสอบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียโดยวิธีการ PCR-DGGE เริ่มต้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากดินโดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ซึ่งใช้สภาวะดังนี้ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที annealing ที่ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

เวลา 10 นาที ทำซ้ำ 30 รอบ โดยใช้ไพรเมอร์ 968f- GC และ 1401r จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทดสอบหา Genomic DNA โดยใช้ 1.2 % agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide 15 นาที จากนั้นนำขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่น นำเจลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ Denaturing gradient gel electrophoresis โดยใช้ 8% polyacrylamide gel ความเข้มข้นของยูเรียและฟอร์มาไมด์ 30% - 50% ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กระแสไฟที่ 25 Volt ระยะเวลา 20 นาทีแรก หลังจากนั้นเพิ่มกระแสไฟเป็น 150 Volt ระยะเวลา 270 นาที และนำแผ่นเจลย้อมด้วย ethidium bromide ระยะเลา 15 นาที และนำแผ่นเจลล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV จากนั้นตัดเจลในบริเวณที่สนใจไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่า แบคทีเรียกลุ่มเด่น คือ *Gramella echinicola* AY608409 ซึ่งมีความเหมือนกันของลำดับเบส ถึง 100 % เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล Gen bank

Katia *et al.*(2003) ทำการศึกษาหา *Paenibacillus spp.* บริเวณรากพืช เริ่มจากทำการสกัดดีเอ็นจากดินโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปจากนั้นนำดีเอ็นเอที่เข้าสู่ขั้นตอน Polymerase chain reaction โดยมีสภาวะ Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำ 35 รอบ โดยใช้ primer PAEN515f (specific primer), 1401r และ 968 f GC นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทดสอบหา Genomic DNA โดยใช้ 1 % agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide 15 นาที จากนั้นนำขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่น นำเจลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ Denaturing gradient gel electrophoresis โดยใช้ 6% polyacrylamide gel ความเข้มข้นของยูเรียและฟอร์มาไมด์ 45% - 60% ใช้กระแสไฟที่ 100 Volt อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide ระยะเลา 15 นาที และนำแผ่นเจลล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV จากนั้นตัดเจลในบริเวณที่สนใจไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่า เจอแบคทีเรียในกลุ่มของ *Paenibacillus spp.* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายที่ต้องการศึกษา

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1 เพื่อศึกษาวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ลงสู่บริเวณรากของหญ้าซิกแนลเลื้อย

1.3.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของหญ้าซิกแนลเลื้อยร่วมกับการเติมแบคทีเรียในดินและบริเวณรากของหญ้าซิกแนลเลื้อย ในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.3.3 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดินที่ใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาการทำงานร่วมกันของพืชและแบคทีเรียท้องถิ่นในดินรวมถึงแบคทีเรียที่เติมสู่รากพืช โดยพืชที่ใช้ ได้แก่ หญ้าซิกแนลเลื้อย และแบคทีเรียที่ใช้ ได้แก่ แบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสารฟีนอล คือ *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

1.4.1 การศึกษาในระดับโรงเรือนเพาะปลูก (Greenhouse) โดยการปลูกหญ้าในกระถาง ศึกษาวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมแบคทีเรีย โดยประเมินจากปริมาณการอยู่รอดของแบคทีเรียหลังจากการเติมโดยวิธี Most probable number (MPN) แล้วศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้งในชุดการทดลองต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์จากน้ำชะ (Leachates) ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรแบคทีเรียในดินโดยวิธี Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) และตรวจวัดการเจริญเติบโตของพืชโดยวิเคราะห์ในรูปแบบของน้ำหนักแห้ง อีกทั้งศึกษาตรวจสอบปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในพืชที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับพืชที่ถูกรดด้วยน้ำประปา ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติของดินรวมทั้งลักษณะน้ำทิ้งก่อนและหลังการบำบัด

1.4.2 การศึกษาในแปลงทดลอง (Field experiment) โดยเลือกชุดการทดลองที่ให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคสูงที่สุดในโรงเรือนเพาะปลูก มาทดลองในแปลงปลูกพืชขนาด 1 x 2 ตารางเมตร ในบริเวณพื้นที่ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ทำการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสี และตรวจวัดการเจริญเติบโตของต้นหญ้า รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิคที่พบในพืชและปริมาณสารอาหารเปรียบเทียบกับพืชที่ถูกรดด้วยน้ำจากแหล่งน้ำผิวดินเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการใช้พืชหลังผ่านการบำบัดน้ำทิ้งเป็นอาหารสัตว์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถคัดเลือกวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมแบคทีเรียลงสู่ดินและรากพืชเพื่อเตรียมพร้อมพืชก่อนนำไปใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.5.2 ทราบประสิทธิภาพของการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยวิธีการเติมแบคทีเรียลงสู่ดินและบริเวณรากพืช ซึ่งเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการ/ระบบที่สามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับระบบบำบัดน้ำทิ้งที่มีอยู่เดิมของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

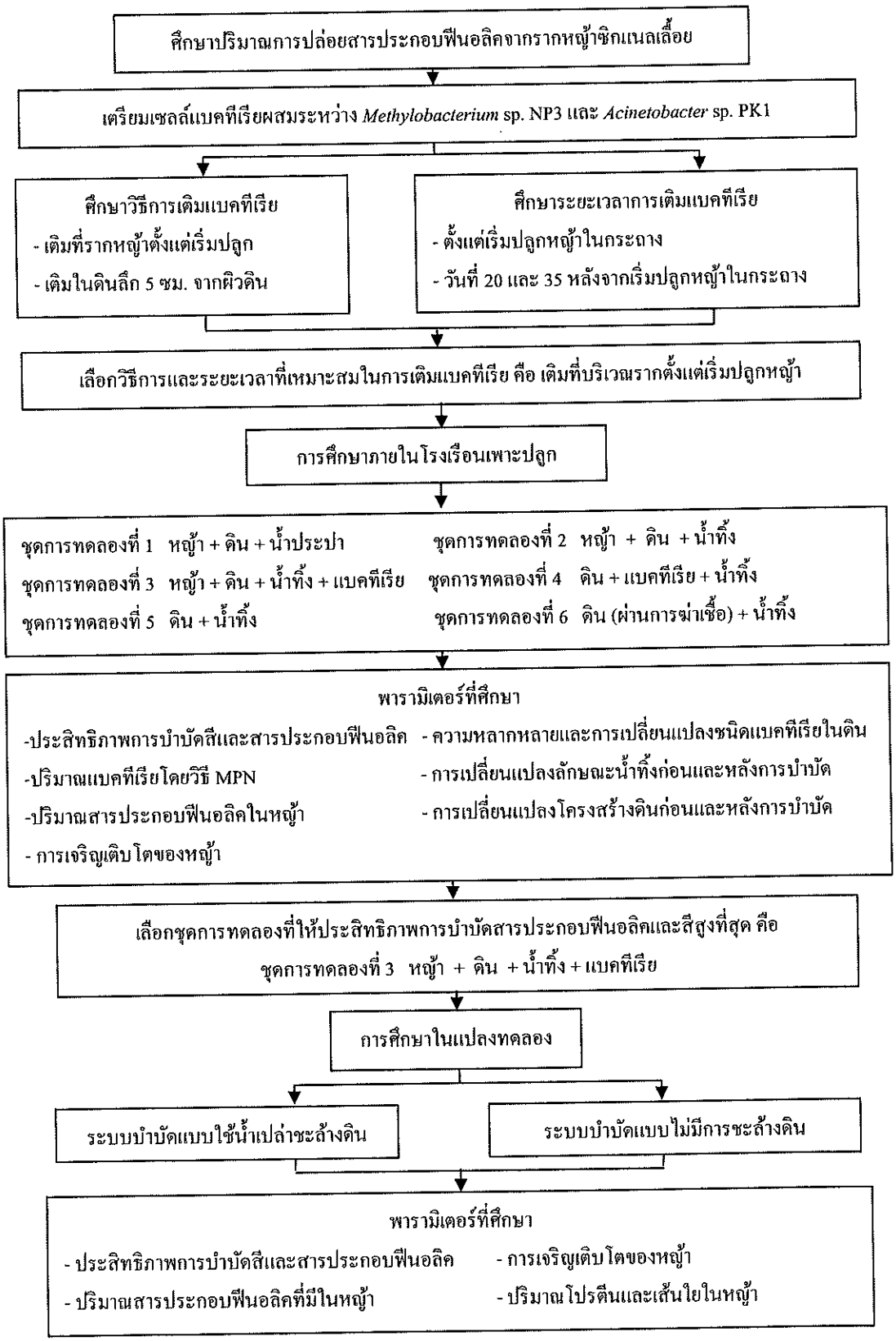
1.5.3 ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในระหว่างการบำบัดน้ำทิ้งสามารถใช้ประกอบการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบบำบัดที่พัฒนาขึ้นได้ ตลอดจนการทำนายประสิทธิภาพของระบบดังกล่าว

บทที่ 2

วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 ภาพรวมขั้นตอนวิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำงานร่วมกันของพืชและแบคทีเรียดินรวมถึงแบคทีเรียที่เติมบริเวณรากพืช โดยพืชที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ หญ้าซิกแนลเลื้อย (*Brachiaria humidicola*) และแบคทีเรียที่เติม ได้แก่ แบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล (Phenol-degrading bacteria) คือ *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ขั้นตอนแรกทำการศึกษาภายในโรงเรือนโดยปลูกหญ้าในกระถาง ศึกษาวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมแบคทีเรีย โดยประเมินจากปริมาณการอยู่รอดของแบคทีเรียหลังจากการเติมโดยวิธี Most probable number (MPN) จากนั้นนำวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมแบคทีเรียไปใช้ในการทดลองถัดไป คือ การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้งในชุดการทดลองต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์จากน้ำชะ (Leachates) และติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรจุลินทรีย์ในดินโดยวิธี Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) รวมถึงตรวจวัดการเจริญเติบโตของหญ้าโดยวิเคราะห์ในรูปของน้ำหนักแห้ง และศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่มีในพืชที่ผ่านการบำบัดเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ผ่านการบำบัด รวมทั้งศึกษาลักษณะเนื้อดินและคุณลักษณะน้ำทิ้งทั้งก่อนและหลังการบำบัด และเลือกชุดการทดลองที่ให้ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีสูงที่สุดไปทดลองขยายขนาดในแปลงทดลอง ในพื้นที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสีสารประกอบฟีนอลิค และค่าซีโอดี รวมทั้งพารามิเตอร์อื่น ๆ ได้แก่ การเจริญเติบโตของหญ้าสารประกอบฟีนอลิคที่มีในพืช ตลอดจนปริมาณโปรตีนและเส้นใยในหญ้าที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับหญ้าที่ผ่านการรดด้วยน้ำจากแหล่งน้ำผิวดิน ซึ่งสามารถแสดงภาพรวมขั้นตอนวิธีดำเนินงานวิจัยดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ภาพรวมขั้นตอนวิธีดำเนินการวิจัย

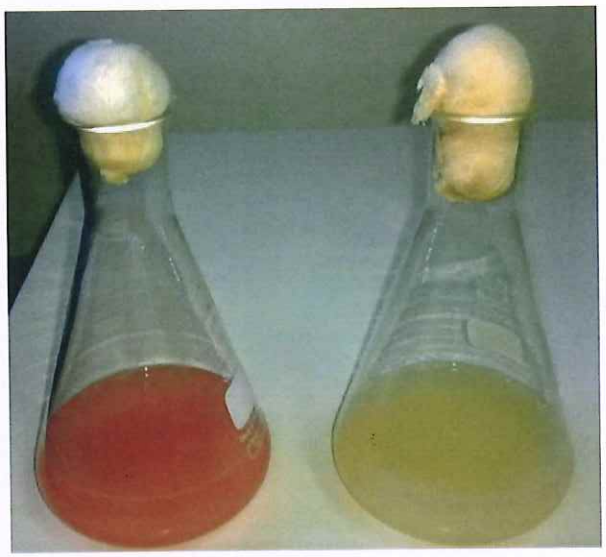
2.2 น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ตัวอย่างน้ำทิ้งที่ใช้ในการศึกษานี้นำมาจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 1 แห่ง ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยเก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียลำดับสุดท้าย (Treated palm oil mill effluent) ซึ่งผ่านระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานที่เป็นระบบบำบัดแบบมีบ่อก๊าซชีวภาพร่วมกับบ่อปรับเสถียร การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งใช้วิธีการแบบจ้วง (Grab sampling) แล้วเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งบรรจุในภาชนะขนาด 5 ลิตร และทำการวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำทิ้งตามวิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสียใน Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) โดยวัดค่าพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ Chemical oxygen demand (COD), Total kjeldahl nitrogen (TKN) , Total phosphorus (TP) และสีในน้ำทิ้ง ซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานแพลตตินัมโคบอลต์เพื่อเปรียบเทียบเป็นค่าหน่วยสี สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมด (Total phenolics) ใช้วิธีการ Folin-Ciocalteau (Ergul *et al.*, 2011) ดังรายละเอียดในวิธีการข้อ 2.7.1 นำน้ำเสียเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงลักษณะของน้ำทิ้งตลอดการทดลอง ทำการกรองน้ำทิ้งด้วยผ้าขาวบางเพื่อคัดแยกส่วนที่เป็นอนุภาคแขวนลอยออกจากน้ำทิ้งก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

2.3 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

ใช้แบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 ซึ่งคัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน (นันท์ธร เภาราช, 2550) และ *Acinetobacter* sp. PK1 คัดแยกได้จากอาหารที่มีการเจริญของ *Methylobacterium* sp.NP3 (ปิยะมาศ คงแขม, 2552) ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล (Phenol-degrading bacteria) ที่ให้อัตราการย่อยสลายฟีนอลเมื่อทำงานร่วมกันสูงกว่าการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเพียงอย่างเดียว (Khongkhaem *et al.*, 2011) การเลี้ยงเชื้อและเตรียมหัวเชื้อทำตามวิธีการของ Khongkham *et al.* (2011) ดังนี้ เลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด แยกกันในอาหารเหลว carbon free mineral medium (CFMM) ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้น 0.4 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 2.2 A และ B) จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว (Late log phase) เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มีกิจกรรมสูงที่สุด โดยนำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และแยกส่วนน้ำใสทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วย 0.85 % NaCl 2 ครั้ง จากนั้น

ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร CFMM และเติมฟีนอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้เป็นตัวชักนำการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิค บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาปั่นแยกและล้างเซลล์ตามวิธีการข้างต้น แล้วนำเซลล์ที่ได้ละลายในอาหาร CFMM และวัดค่า OD_{578} ให้ได้ค่าเท่ากับ 1.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^8 colony forming unit (CFU)/มิลลิลิตร นำเซลล์ทั้งสองชนิดมาผสมกันในสัดส่วน 1 : 1 เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อไป



(A) (B)

รูปที่ 2.2 แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Methylobacterium* sp. NP3 (A) และ *Acinetobacter* sp. PK1 (B)

2.4 การเตรียมหญ้าซิกแนลเลื้อย

พันธุ์หญ้าซิกแนลเลื้อย (*Brachiaria humidicola*) ได้รับการสนับสนุนจากสถานีวิจัยทดสอบพันธุ์สัตว์เทพา อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา โดยนำต้นหญ้ามาปลูกในกะบะเพาะปลูกพืชขนาด 24 x 68 x 18 เซนติเมตร (กว้าง x ยาว x สูง) แล้วนำกระบะไปไว้ในโรงเรือน (รูปที่ 2.3)เพื่อใช้เป็นที่พักต้นหญ้าให้มีการเจริญจนเกิดต้นอ่อนที่แตกแขนงใหม่จากส่วนข้อของต้นแม่ ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 30 วัน ในระยะ 2 สัปดาห์แรกทำการรดน้ำทุกวัน หลังจากนั้นรดน้ำ 2 วันต่อ

ครั้ง จากนั้นจึงคัดเลือกต้นหญ้าที่มีขนาด 20 - 30 เซนติเมตรซึ่งเป็นส่วนที่แตกแขนงใหม่ ไปใช้ในการศึกษาในกระถางภายในโรงเรือนเพาะปลูกและในแปลงทดลองต่อไป

รูปที่ 2.3 หญ้าซิกแนลเลื้อยที่ปลูกในกระบะสำหรับเตรียมหญ้าก่อนการทดลอง

2.5 การศึกษาในโรงเรือนเพาะปลูก

2.5.1 การเตรียมดิน

ดินที่ใช้ในการศึกษาในโรงเรือนเพาะปลูกเก็บจากบริเวณโดยรอบบ่อน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นโรงงานเดียวกับที่เก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง และเป็นชุดดินเดียวกับดินที่ใช้ศึกษาในแปลงทดลอง ณ โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งดินดังกล่าวจัดเป็นชุดดินระแงะ (จำเป็น อ่อนทอง, 2551) วิธีการเตรียมดินก่อนนำมาใช้ในการทดลองทำโดยนำดินมาร่อนด้วยตะแกรง (Sieve) ซึ่งมีช่องเปิดของตะแกรงร่อน (Sieve opening) ขนาด 2 มิลลิเมตร (Gaskin and Bentham, 2010) เพื่อปรับขนาดอนุภาคดินให้มีความเท่ากันอย่างสม่ำเสมอและทำให้ดินมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ดังรูปที่ 2.4 และวิเคราะห์คุณสมบัติของดินทั้งก่อนและหลังการบำบัดน้ำทิ้ง ได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน และค่าความจุความชื้นในดิน (Water holding capacity; WHC) ตามวิธีการในข้อ 2.7.4

(A) (B)

รูปที่ 2.4 ลักษณะเม็ดดินก่อนร่อนด้วยตะแกรง (A) และหลังผ่านการร่อนด้วยตะแกรง (B)

2.5.2 ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช

ทำการศึกษาปริมาตรน้ำที่ต้องเติมเพื่อรักษาระดับความชื้นที่ร้อยละ 60 ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของหญ้าซิกแนลเลื้อย (วิโรจน์ รักเกียรติสกุล, 2556)โดยนำตัวอย่างดิน 1 หน่วย (กระถาง) ปริมาณ 2,500 กรัม ใส่ลงในกระถางทดลอง จากนั้นเติมน้ำประปาลงไปจนดินอิ่มตัวและมีน้ำชะไหลออกมาจากกระถาง แล้วทำการวัดความชื้นของดินด้วย Moister meter ทุก ๆ 1 วัน และเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน พบว่าระดับความชื้นลดลงเหลือต่ำกว่าร้อยละ 60 จึงเติมน้ำประปาลงไปในดินเพื่อรักษาระดับความชื้นให้เท่ากับร้อยละ 60 ซึ่งต้องใช้น้ำปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาตรน้ำที่ต้องเติมลงในลงในกระถางเมื่อเวลาผ่านไปทุก 3 วัน เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

2.5.3 ค่าความจุความชื้นของดิน

การคำนวณหาปริมาตรน้ำทิ้ง/น้ำประปาที่ใช้รดในแต่ละกระถาง ทำได้โดยการพิจารณาจากค่า WHC ซึ่งจากการทดสอบดินที่ใช้สำหรับการทดลองภายในโรงเรือนตามวิธีการในข้อ 2.7.4 มีค่า WHC เท่ากับ 22.5 % นั่นหมายความว่า ดิน 100 กรัม สามารถอุ้มน้ำไว้ได้ 22.5 มิลลิลิตร หากปริมาณดินที่ใช้ในการทดลอง 1 กระถาง เท่ากับ 2,500 กรัม ดังนั้นปริมาตรน้ำที่ใช้รดต่อ 1 กระถาง เท่ากับ 562.5 มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้เป็นน้ำชะออกมาจากกระถาง น้ำที่ใช้รดต้องมีปริมาตรสูงกว่าค่า WHC งานวิจัยนี้จึงใช้น้ำทิ้งปริมาตร 650 มิลลิลิตร ต่อ 1 กระถาง

2.5.4 ปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิคจากรากหญ้าซิกแนลเลื้อย

หลังจากเตรียมความพร้อมของหญ้าซิกแนลเลื้อยในกระบะเพาะปลูกพืชแล้ว นำหญ้าที่มีความสูงประมาณ 20-30 เซนติเมตร จากส่วนที่แตกแขนงใหม่ซึ่งมีอายุใกล้เคียงกัน จำนวน 5 ต้น ปลูกลงในกระถางขนาด 20 x 19 เซนติเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลางปากกระถาง x สูง) ที่บรรจุดินปริมาณ 2,500 กรัม ดังรูปที่ 2.5 จำนวนต้นหญ้าที่เหมาะสมได้มาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของวิโรจน์ รักเกียรติสกุล (2556) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ 1) ดิน 2) ดินที่มีการปลูกหญ้า 3) ดินที่มีการปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ บริเวณรากพืชตั้งแต่เริ่มปลูก ทำการวัดปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิคจากรากของหญ้าซิกแนลเลื้อย ทำโดยรดน้ำต้นหญ้าโดยใช้น้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้ให้คลอรีนระเหยออกไปเป็นระยะเวลา 30 นาทีก่อนนำมาใช้งาน โดยเริ่มต้นรดน้ำตั้งแต่วันแรกที่ย้ายหญ้าลงปลูกในกระถางและทุก ๆ 5 วัน เป็นระยะเวลา 45 วัน โดยปริมาตรน้ำที่ใช้รดต้นหญ้าเท่ากับ 650 มิลลิลิตร เพื่อให้น้ำชะที่มีการปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลิคไหลออกมาจากกระถาง ตามวิธีการของ Fletcher and Hegde (1995) ที่วางไว้ภายในโรงเรือนเพาะปลูกพืชที่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมือนกันตลอดการทดลอง (รูปที่ 2.6 A และ B) จากนั้นจึงวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในน้ำชะ ตามวิธีการในข้อ 2.7.1 ซึ่งนำผลการทดลองที่ได้นำไปใช้ในการออกแบบระยะเวลาการเติมแบคทีเรียในการทดลองถัดไป

รูปที่ 2.5 หญ้าซิกแนลเลื้อยจำนวน 5 ต้นที่เริ่มปลูกในกระถาง ก่อนนำไปไว้ภายในโรงเรือเพาะปลูก

(A)

(B)

รูปที่ 2.6 ลักษณะภายนอกโรงเรือน (A) ลักษณะภายในโรงเรือนเพาะปลูก (B) ของคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.5.5 การศึกษาวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมแบคทีเรีย

นำหญ้าซิกแนลเลื้อยที่เตรียมไว้ในกระบะเพาะปลูกพืชจำนวน 5 ต้น ซึ่งเป็นจำนวนต้นหญ้าที่เหมาะสมจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (วิโรจน์ รักเกียรติสกุล, 2556) ปลูกลงในกระถางขนาด 20 x 19 เซนติเมตร (เส้นผ่าศูนย์กลางปากกระถาง x สูง) ที่บรรจุดินปริมาณ 2,500 กรัมเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.5.4 หลังจากนั้นพักต้นหญ้าในกระถางประมาณ 15 วัน เพื่อให้

ลำต้นมีความแข็งแรงและมีความพร้อมต่อการใช้งาน การศึกษาวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมแบคทีเรีย มีการแปรผันดังนี้ 1) การเติมแบคทีเรียบริเวณรากตั้งแต่เริ่มปลูกหญ้า (วันที่ 0) ดังรูปที่ 2.7 A 2) การเติมแบคทีเรียในดินลึกประมาณ 5 เซนติเมตรจากผิวดินบริเวณรอบ ๆ ต้นหญ้า (Afzal *et al.*, 2013) ณ วันที่ 0 (เริ่มปลูกหญ้า), วันที่ 20 และ วันที่ 35 ตามลำดับ ดังรูปที่ 2.7 B สำหรับวิธีการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เติมทำตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยใช้แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลผสม 2 สายพันธุ์ที่มีค่า OD_{578} เท่ากับ 1 ในปริมาตรเท่ากัน คือ 50 มิลลิลิตร เพื่อให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง (Afzal *et al.*, 2013) การเลือกวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมนั้นประเมินจากปริมาณสูงสุดของแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลโดยวิธี Most probable number (MPN) ตามวิธีการในข้อ 2.11.6 การทดลองนี้มีชุดควบคุม ได้แก่ 1) ดิน 2) ดินที่ปลูกหญ้าแต่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย โดยทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (กระถาง)

(A) (B)

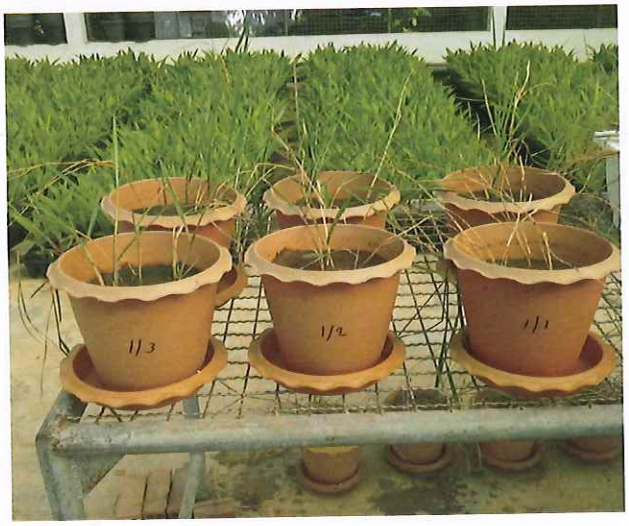
รูปที่ 2.7 การเติมแบคทีเรียลงสู่บริเวณรากหญ้า (A) และ การเติมแบคทีเรียลงในดิน (B)

2.5.6 การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้ง

เตรียมต้นหญ้าซิกแนลเลื้อยให้พร้อมในกระถางตามวิธีการข้างต้น แล้วศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งด้วยชุดการทดลองต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1 ซึ่งประกอบด้วยดินที่มีการปลูกหญ้า ดินที่มีการปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียผสมซึ่งได้คัดเลือกวิธีการเติมบริเวณรากตั้งแต่เริ่มต้นปลูกหญ้า เนื่องจากเป็นรูปแบบที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ

2.5.5 ดินที่มีการเติมแบคทีเรียผสม ดิน และดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้การนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่อยู่ในดินก่อนนำไปใช้ในการทดลอง ส่วนชุดควบคุม ได้แก่ ดินที่ปลูกหญ้าที่ถูกรดด้วยน้ำประปา เพื่อเป็นชุดควบคุมการเจริญเติบโตของหญ้าและปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิคจากรากหญ้าโดยชุดการทดลองที่ไม่ได้ถูกรดด้วยน้ำทิ้ง เตรียมชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ก่อนการรดน้ำทิ้งทำการปรับระดับความชื้นให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหญ้าที่ร้อยละ 60 โดยการใช้น้ำประปาปริมาตร 100 มิลลิลิตรรดต้นหญ้า (ตามข้อ 2.5.2) หลังจากผ่านไป 3 วัน ใช้น้ำทิ้งรดหญ้าปริมาตร 650 มิลลิลิตร รอจนน้ำชะจากชุดการทดลองต่าง ๆ ไหลออกมาสู่ภาชนะที่ใช้รองกระถางดังรูปที่ 2.8 ทำการเก็บตัวอย่างน้ำชะและนำไปวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสีที่เหลืออยู่ในน้ำชะตามวิธีการในข้อ 2.7.1 และ 2.7.2 ทำการรดน้ำทิ้งซ้ำเป็นระยะเวลา 60 วัน โดยทดสอบทั้งในระบบที่มีและไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำประปา จากนั้นคำนวณประสิทธิภาพของการบำบัดสารดังกล่าวในแต่ละครั้งที่รดน้ำทิ้งดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลิค / สี (\%)} = \frac{\text{(ความเข้มข้นก่อนบำบัด – ความเข้มข้นหลังบำบัด)}}{\text{ความเข้มข้นก่อนบำบัด}} \times 100$$



รูปที่ 2.8 ชุดการทดลองที่มีการปลูกหญ้าในกระถางและวางบนภาชนะรองกระถางเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำชะในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีภายใต้โรงเรือนเพาะปลูก

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบและกลไกการบำบัดของชุดการทดลองต่าง ๆ

ชุดการทดลอง	องค์ประกอบ	กลไกการบำบัด*
1	ดิน + หญ้า + น้ำประปา	ชุดควบคุม
2	ดิน + หญ้า + น้ำทิ้ง	1+3+4
3	ดิน + หญ้า + แบคทีเรีย + น้ำทิ้ง	1+2+3+4
4	ดิน + แบคทีเรีย + น้ำทิ้ง	1+2+3
5	ดิน + น้ำทิ้ง	1+3
6	ดิน (ผ่านการฆ่าเชื้อ) + น้ำทิ้ง	3

หมายเหตุ : *กลไกการบำบัดหมายเลข 1 แทนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ดินในธรรมชาติ, หมายเลข 2 แทนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่เติมบริเวณรากพืช, หมายเลข 3 แทนการดูดซับโดยอนุภาคดิน, หมายเลข 4 แทนการบำบัดโดยอาศัยพืชและจุลินทรีย์บริเวณรากพืช

นอกจากนั้นวิเคราะห์ลักษณะน้ำทิ้งจากค่าซีโอดี ปริมาณสารอาหาร ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน (TKN) และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (TP) และตรวจสอบปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าตามวิธีการในข้อ 2.7.3 รวมถึงวิเคราะห์การเจริญของต้นหญ้าตามวิธีการข้อ 2.7.4 ทั้งก่อนและหลังการบำบัดน้ำทิ้ง สำหรับพารามิเตอร์ทางชีวภาพที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอลวิเคราะห์โดยวิธี MPN ตามวิธีการข้อ 2.7.6 ตลอดจนวิเคราะห์ความหลากหลายและติดตามการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดินโดยวิธี Polymerase chain reaction - Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) ตามวิธีการข้อ 2.7.7 โดยรายละเอียดช่วงระยะเวลาในการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในน้ำทิ้ง ผลของน้ำทิ้งต่อการเจริญเติบโตของหญ้า การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในพืช และการเปลี่ยนแปลงทั้งเชิงปริมาณและชนิดของประชากรแบคทีเรียทั้งก่อน-ในระหว่าง-และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 2.2 พารามิเตอร์และช่วงเวลาที่ตรวจวัด

พารามิเตอร์ (หน่วย)	ก่อนการทดลอง	ระหว่างการทดลอง	หลังการทดลอง
1. สารประกอบฟีนอลิค (มก.ต่อ ล.)	√	√	√
2. สี (หน่วยสี)	√	√	√
3. COD (มก.ต่อ ล.)	√	-	√
4. TKN (มก.ต่อ ล.)	√	-	√
5. TP (มก.ต่อ ล.)	√	-	√
6. น้ำหนักแห้งของหญ้า (กรัม)	√	√	√
7. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในหญ้า (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)	√	-	√
8. จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอล (log MPN / ดิน 1 กรัม)	√	√	√
9. โครงสร้างดิน	√	-	√
10.การศึกษาความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดิน	√	√	√

2.6 การศึกษาในแปลงทดลอง

เมื่อได้ชุดการทดลองที่สามารถบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ดีที่สุดจากการศึกษาในโรงเรือนเพาะปลูก ได้แก่ ชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากตั้งแต่เริ่มปลูก จึงนำองค์ประกอบของชุดการทดลองดังกล่าว ไปศึกษาขยายขนาดในแปลงทดลอง (Field experiment) ณ บริเวณพื้นที่ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

2.6.1 การเตรียมแปลงทดลอง

เตรียมแปลงทดลองขนาด 1 x 2 ตารางเมตร ดังรูปที่ 2.9 โดยการยกร่องดินให้มีความสูงจากระดับพื้นดิน 30 เซนติเมตร จำนวน 8 แปลง ซึ่งประกอบด้วย 1) แปลงที่ปลูกหญ้าและ

มีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากตั้งแต่เริ่มปลูกหญ้า จำนวน 2 แปลง 2) แปลงชุดควบคุมที่มีการปลูกหญ้า (ไม่เติมแบคทีเรีย) จำนวน 2 แปลง 3) แปลงชุดควบคุมดินเพียงอย่างเดียวที่ไม่มีการปลูกหญ้า จำนวน 2 แปลง และ 4) แปลงชุดควบคุมที่ปลูกหญ้าโดยใช้น้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงานในการรดหญ้าเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของหญ้าที่ไม่ได้ถูกรดด้วยน้ำทิ้งจำนวน 2 แปลง

รูปที่ 2.9 การเตรียมแปลงทดลองขนาด 1 x 2 ตารางเมตร บริเวณพื้นที่ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

2.6.2 ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช

ทำการแบ่งพื้นที่แปลงทดลองออกเป็น 72 หน่วย (~16 x 16 ซม.) และเก็บตัวอย่างดินที่เป็นตัวแทนจำนวน 3 จุดด้วย Soil core เพื่อศึกษาปริมาตรน้ำที่ต้องเติมเพื่อรักษาระดับความชื้นที่ร้อยละ 60 ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย โดยนำตัวอย่างดิน 1 หน่วย (~16 x 16x 30 ซม.) ปริมาตร 7,680 ลบ.ซม. ใส่ลงในกระถางทดลอง จากนั้นเติมน้ำประปาลงไปจนดินอิ่มตัวและมีน้ำชะไหลออกมาจากกระถาง ทำการวัดความชื้นของดินด้วย Moister meter ทุกๆ 1 วัน และเมื่อเวลาผ่านไป 3 วันพบว่าระดับความชื้นลดลงเหลือต่ำกว่าร้อยละ 60 จึงเติมน้ำประปาลงไปเพื่อรักษาระดับความชื้นให้เท่ากับร้อยละ 60 ซึ่งต้องใช้น้ำปริมาตรเท่ากับ 190 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาตรน้ำที่ต้องเติมลงในแปลงทดลองเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ประมาณ 14 ลิตรต่อแปลง

2.6.3 ค่าความจุความชื้นของดิน

จากการทดสอบหาค่าความจุความชื้นของตัวอย่างดินในแปลงทดลองจากข้อ 2.7.5 มีค่าเท่ากับ 20.85 % ซึ่งหมายความว่า ดิน 100 กรัม สามารถอุ้มน้ำได้ 20.85 มิลลิลิตร ซึ่งดิน 1 หน่วย มีน้ำหนัก 8,900 กรัม แสดงว่าปริมาตรน้ำที่ต้องใช้ต่อดิน 1 หน่วย เท่ากับ (20.85/100) x 8,900 หรือเท่ากับ 1,856 มิลลิลิตร และปริมาตรน้ำที่ต้องใช้ต่อดิน 1 แปลง (72 หน่วย) เท่ากับ 133.60 ลิตรดังนั้นปริมาตรน้ำที่ต้องใช้จึงต้องสูงกว่า 133.60 ลิตร เพื่อให้ได้เป็นน้ำชะออกมา งานวิจัยนี้จึงใช้ปริมาตรน้ำ 138 ลิตรต่อ 1 แปลงทดลอง

2.6.4 การปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อย

ทำการแบ่งพื้นที่ในแปลงทดลองออกเป็นหลุมขนาด 277 ตารางเซนติเมตร จำนวน 72 หลุม นำหญ้าซิกแนลเลื้อยจากสถานีวิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์เทพา จังหวัดสงขลา โดยคัดเลือกต้นหญ้าที่มีความยาว 20-30 เซนติเมตร ปลูกลงในหลุมที่เตรียมไว้หลุมละ 5 ต้น ซึ่งเป็นจำนวนต้นหญ้าที่เหมาะสมจากการศึกษาก่อนหน้านี้ รวมทั้งสิ้นแปลงละ 360 ต้น นำตาข่ายกรองแสงในระดับ 70 % มาใช้คลุมแปลงปลูกหญ้าทั้งหมดเพื่อช่วยลดอุณหภูมิจากแสงอาทิตย์ให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของหญ้าดังรูปที่ 2.10 A รดน้ำหญ้าด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงาน วันละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 15 วัน จนหญ้ามีความแข็งแรงและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในแปลงปลูก ดังรูปที่ 2.10 B จากนั้นจึงทำการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งต่อไป

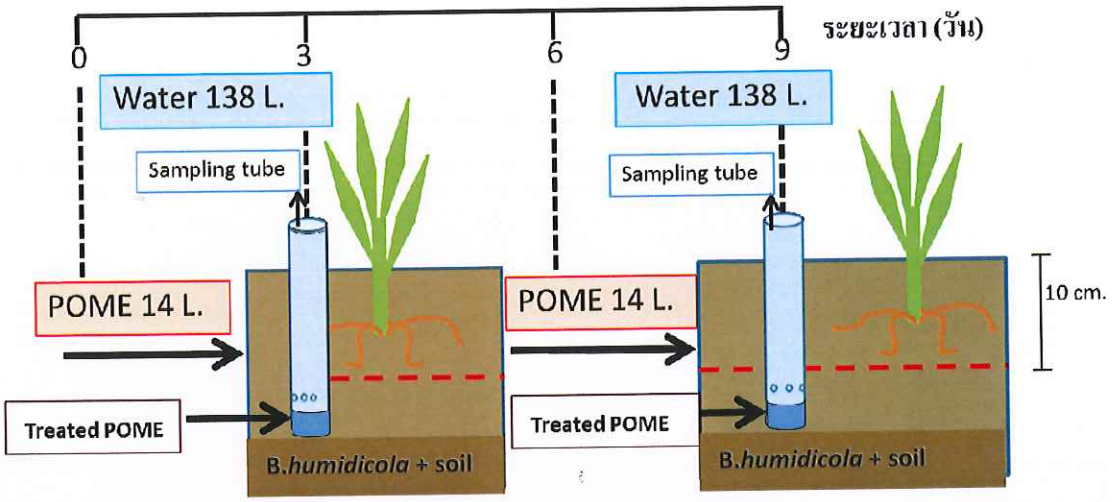
(A) (B)

รูปที่ 2.10 หญ้าซิกแนลเลื้อยที่เริ่มปลูกในแปลงทดลองที่มีการคลุมด้วยตาข่ายกรองแสง (A) และหญ้าซิกแนลเลื้อยที่มีอายุ 15 วันหลังจากปลูกในแปลงทดลอง ก่อนที่จะถูกรดด้วยน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (B)

2.6.5 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีของน้ำทิ้ง

2.6.5.1 การบำบัดในระบบที่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า

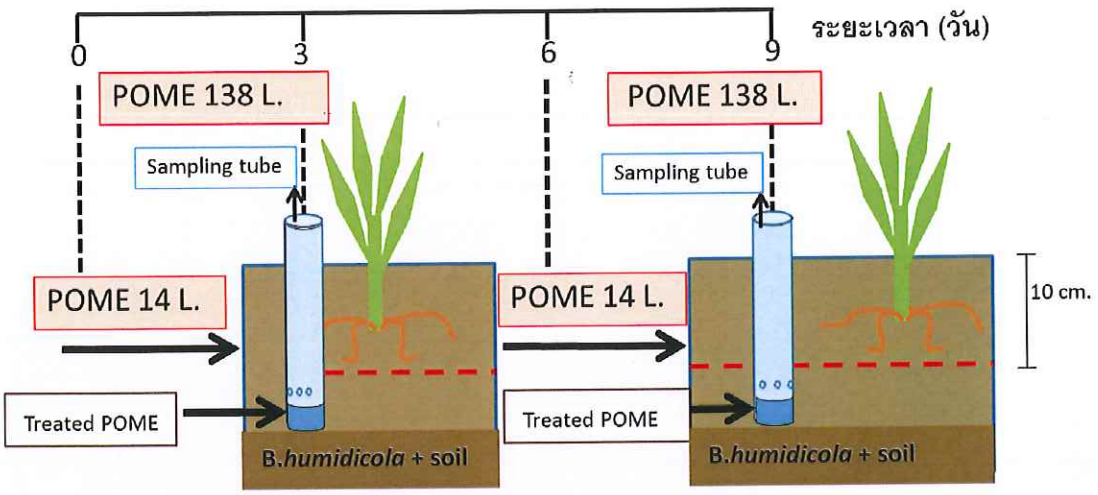
หลังจากปลูกหญ้าในแปลงทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน จึงนำน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดจากบ่อบำบัดลำดับสุดท้ายของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 14 ลิตร มารดแปลงทดลอง เพื่อรักษาระดับความชื้นให้ได้ร้อยละ 60 ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย โดยใช้ระยะเวลาในการบำบัดจำนวน 3 วัน แล้วรดน้ำหญ้าด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงานปริมาตร 138 ลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำชะตามวิธีการในข้อ2.6.6 เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค สี และ COD ที่คงเหลือในน้ำทิ้ง ซึ่งสามารถสรุปปริมาณน้ำที่ใช้รดหญ้าและระยะเวลาเก็บตัวอย่างน้ำชะดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 การบำบัดน้ำทิ้งในแปลงทดลองที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยในระบบที่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า

2.6.5.2 การบำบัดในระบบที่ไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า

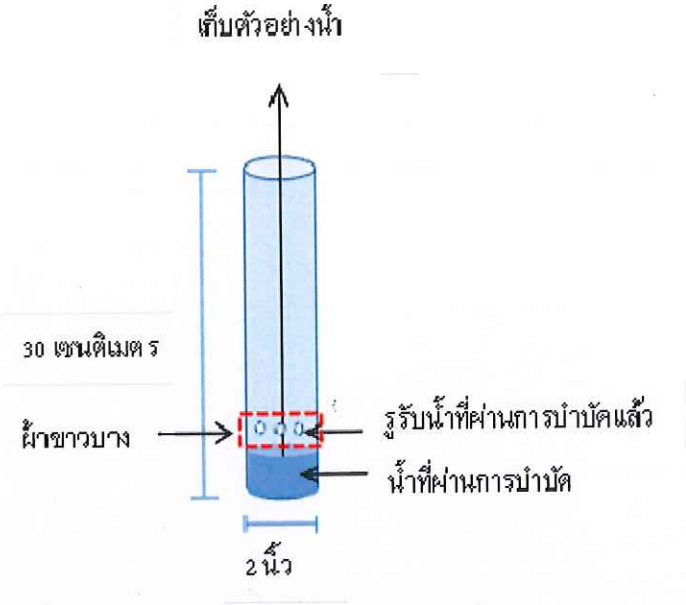
การใช้น้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มรดแปลงทดลองโดยไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า เนื่องจากต้องการทราบปริมาณน้ำทิ้งที่มากที่สุดที่สามารถบำบัดโดยแปลงทดลอง ทำโดยการรดน้ำทิ้งปริมาณ 14 ลิตรในแปลงปลูกหญ้าที่มีอายุ15 วัน (นับจากวันแรกที่ปลูกในแปลงทดลอง) เพื่อรักษาระดับความชื้นให้ได้ร้อยละ 60 ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย หลังจากผ่านไป 3 วัน จึงรดน้ำทิ้งปริมาตร 138 ลิตร ซึ่งเป็นปริมาตรที่สูงกว่าค่าความจุความชื้นของดิน จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำชะที่ผ่านการบำบัดตามวิธีการในข้อ 2.6.6 แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค สี และค่า COD ที่คงเหลือในน้ำทิ้ง ซึ่งสามารถสรุปปริมาณน้ำที่ใช้รดหญ้าและระยะเวลาเก็บตัวอย่างน้ำชะดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 การบำบัดน้ำทิ้งในแปลงทดลองที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยในระบบที่ไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า

2.6.6 การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัด

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยแปลงทดลองต่าง ๆ โดยการฝังท่อพีวิซี (Poly vinyl chloride; PVC) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว ยาว 30 เซนติเมตร ทำการเจาะรูส่วนล่างของท่อและพันผ้าขาวบางไว้โดยรอบเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเศษดิน (รูปที่ 2.13) นำท่อปักลงในดินลึกลงไป 15 เซนติเมตร จากผิวดินซึ่งเป็นระดับที่ต่ำกว่าบริเวณรากหญ้าที่มีความลึกจากผิวดินเฉลี่ย 10 เซนติเมตร แปลงละ 3 จุด ซึ่งมีระยะห่างจุดละประมาณ 66 เซนติเมตร ให้ครอบคลุมบริเวณส่วนปลายทั้ง 2 ด้านและส่วนกลางของแปลงทดลอง (รูปที่ 2.14) ทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้หลอดเข็มฉีดยา (Syringe) ดูดตัวอย่างน้ำชะจากท่อพีวีซีโดยผ่านสายยางซิลิโคน เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค สี และค่า COD ที่คงเหลือในน้ำทิ้ง



รูปที่ 2.13 ส่วนต่าง ๆ ของอุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดในแปลงทดลอง

(A) (B)

รูปที่ 2.14 แปลงทดลองบำบัดน้ำทิ้งที่มีดินเพียงอย่างเดียว (A) และแปลงทดลองที่ประกอบด้วยดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยและเติมแบคทีเรีย (B)

2.7 วิธีวิเคราะห์

2.7.1 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในน้ำทิ้ง

การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (Total phenolics) ในน้ำทิ้งดัดแปลงจากวิธีการ Folin-Ciocalteau (Ergul *et al.*, 2011) โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที เพื่อกำจัดตะกอน ทำการเจือจาง 5 เท่า จากนั้น เติมตัวอย่างน้ำทิ้งที่เจือจางแล้ว 200 ไมโครลิตร ลงใน Folin–Ciocalteau phenol reagents ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย Sodium carbonate ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid โดยใช้น้ำกลั่นที่มีการเตรียมเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น Blank

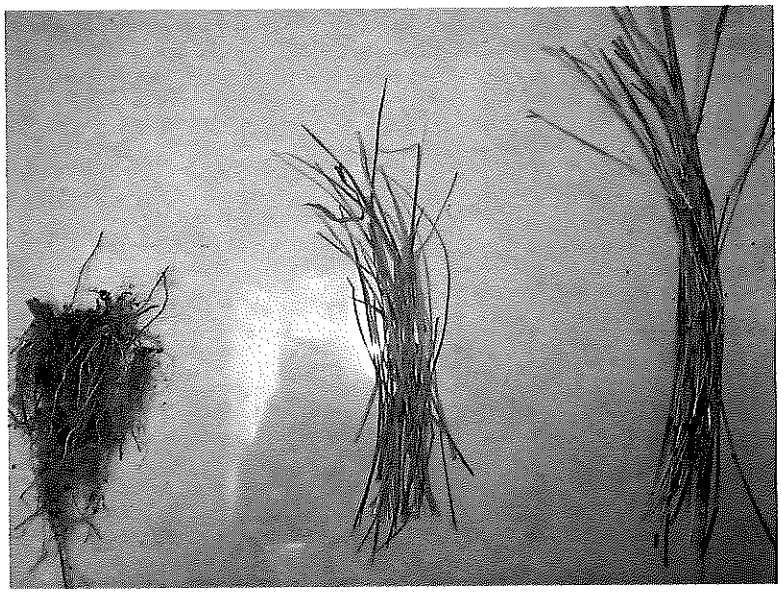
2.7.2 การวิเคราะห์สีในน้ำทิ้ง

การวิเคราะห์สี ในน้ำทิ้ง (APHA, AWWA and WEF, 2005) โดยการนำตัวอย่างน้ำทิ้งมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 7 นาที เพื่อกำจัดตะกอน จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างน้ำทิ้งตามความเหมาะสม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแพลตตินัมโคบอลต์ในช่วง 0-500 หน่วยสี เพื่อคำนวณเป็นหน่วยสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

2.7.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าซิกแนลเลื้อย

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในหญ้าตามวิธีการของ Proestos and Komaitis (2007) เริ่มจากนำหญ้ามาเก็บไว้ในที่มืดในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน และแบ่งหญ้าออกเป็น 3 ส่วน คือ ราก ใบ และ ลำต้น (รูปที่ 2.15) บดตัวอย่างพืชให้ละเอียดและอบไล่ความชื้นที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำพืชมา 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายร่วมดังนี้: เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 60 : 40 (v/v), อะซีโตนต่อน้ำในอัตราส่วน 60 : 40 (v/v) และเอทิลอะซิเตท ต่อน้ำในอัตราส่วน 60 : 30 (v/v) โดยผสมตัวทำละลายข้างต้นชนิดละ 40

มิลลิลิตรและตัวอย่างพืชให้เข้ากันในหลอดทดลอง จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวไปสกัดด้วยวิธี Ultrasound-assist extraction (UAE)โดยใช้เครื่อง Sonicator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามวิธีของ Vinatoru *et al.* (1997) แล้วใช้ปิเปตดูดสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร และทำการเจือจาง 5 เท่า จากนั้นนำตัวอย่างน้ำทิ้งที่เจือจางแล้ว 200 ไมโครลิตร ไปตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิคโดยวิธี Folin-Ciocalteau นำผลการศึกษาที่ได้มาเปรียบเทียบกันหลังจากผ่านการบำบัดด้วยชุดการทดลองต่าง ๆ



(A) (B) (C)

รูปที่ 2.15 ลักษณะของราก (A) ใบ (B) และลำต้น (C) ของหญ้าซิกแนลเลื้อยหลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 วัน

2.7.4 การเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย

ทำการตรวจวัดการเจริญของพืชตามวิธีการของ Dams *et al.* (2007) โดยนำหญ้ามาล้างด้วยน้ำเพื่อเอาดินที่เกาะส่วนต่าง ๆ ออกให้หมด แบ่งหญ้าออกเป็นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ราก ใบ และลำต้น นำตัวอย่างหญ้าที่ผ่านการบดด้วยเครื่องปั่น (Blender) แล้วในแต่ละส่วนไปอบไล่ความชื้นที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (รูปที่ 2.16) จากนั้นวัดน้ำหนักแห้งของหญ้า

จนมีค่าคงที่ รายงานผลในหน่วย กรัม (g) เปรียบเทียบกันก่อนและหลังจากผ่านการบำบัดด้วยชุดการทดลองต่าง ๆ

(A) (B)

รูปที่ 2.16 ลักษณะหญ้าซิกแนลเลื้อยส่วนลำต้นก่อน (A) และหลังอบไล่ความชื้นที่ 80 องศาเซลเซียส (B)

2.7.5 การหาค่าความจุความชื้นของดิน

ค่าความจุความชื้นของดิน Water holding capacity (WHC) คือ ความสามารถอุ้มน้ำสูงสุดของดิน ดังนั้นการทราบค่านี้จะทำให้สามารถคำนวณปริมาตรน้ำทิ้งที่ต้องใช้รดชุดการทดลองต่าง ๆ เพื่อให้มีน้ำชะไหลออกมาจากกระถาง ซึ่งทำให้สามารถวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิค สี และค่าซีโอดีที่เหลืออยู่ในน้ำทิ้งหลังจากผ่านการบำบัดด้วยชุดการทดลองต่าง ๆ ได้ การหาค่าความจุความชื้นของดินทำตามวิธีการของ สายพิณ ไชยนันทน์ (2546) โดยตักดินตัวอย่างใส่ในท่อกลวงซึ่งปลายท่อด้านหนึ่งหุ้มด้วยผ้าขาวบางใส่ดินลงไปจนเกือบเต็ม กระแทกเบา ๆ เพื่อให้ดินอัดตัวกัน วางท่อด้านที่มีผ้าขาวบางหุ้มในจานรอง จากนั้นเติมน้ำลงในจานรองตั้งไว้ให้น้ำซึมผ่านผ้าขาวบางเข้าไปในดินในท่อจนดินอุ้มน้ำเต็มที่ โดยสังเกตได้จากมีเยื่อน้ำชั้นบาง ๆ บนผิวหน้าดินในท่อและยกท่อดินไปวางบนกระดาษซับ ใช้กระจกนาฬิกาปิดด้านบนของท่อไว้ไม่ให้น้ำระเหยออกไป ตั้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นตักดินไปชั่งจดบันทึกน้ำหนัก หลังจากชั่งแล้วตั้งดินทิ้งไว้จนดินแห้ง ชั่งน้ำหนักจนไม่มีการเปลี่ยนแปลงจดบันทึก (น้ำหนักดินแห้ง) ผลต่างของการชั่งครั้งแรกกับครั้งที่สอง คือ น้ำซับ (น้ำที่ดินสามารถดูดซับไว้ได้) จากนั้นนำดินไปอบที่

อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่โถดูดความชื้น (Desiccator) น้ำหนักที่หายไปหลังการอบ คือ น้ำหนักของน้ำเยื่อ ซึ่งนำมาคำนวณค่าความจุความชื้นของดินได้ ดังนี้

$$\% \text{ ความจุความชื้นของดิน} = \frac{(\text{น้ำหนักน้ำซับ} - \text{น้ำหนักน้ำเยื่อ})}{\text{น้ำหนักดินแห้ง}} \times 100$$

2.7.6 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล

การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลโดยวิธี Most probable number (MPN) ดัดแปลงจากวิธีการของ Wrenn and Venosa (1996) เริ่มจากการเจือจางตัวอย่างดินครั้งละ 10 เท่า (10-fold dilution) โดยใช้อาหารเหลว CFMM 9 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่างดิน 1 กรัม ทำการเจือจางจนได้ระดับการเจือจางเท่ากับ 10^{-6} - 10^{-8} เติมสารละลายฟีนอล 100 ไมโครลิตรจากสารละลายเข้มข้น (Stock solution) 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล (พนิดา โต๊ะสู, 2555) นำตัวอย่างใส่ลงใน 96 wells plate หลุมละ 150 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำฉุงพลาสติกมาห่อหุ้มเพลทและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียจากตาราง MPN

2.7.7 การศึกษาความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในดิน

2.7.7.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณโดยรอบหญ้าที่ปลูกในกระถางภายใต้โรงเรือนเพาะปลูก โดยเก็บลึกลงไปจากผิวดินประมาณ 5 เซนติเมตร (Bodini *et al.*, 2010) ด้วย Cork borer เบอร์ 5 จุดละ 1 กรัม ทั้งหมด 4 จุด รวมทั้งหมดเป็น 4 กรัมในแต่ละชุดการทดลอง ทำซ้ำชุดการทดลองละ 3 กระถาง เก็บรักษาตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ด้านชีววิทยาโมเลกุล

2.7.7.2 การสกัด DNA จากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินของแต่ละชุดการทดลองมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำดินจำนวน 1 กรัม มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Soil DNA Kit (OMEGA, USA) ทำตามตอนขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยขั้นตอนสำคัญในการสกัดดีเอ็นเอ คือ การทำให้เซลล์แตก การแยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอและการตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นทำการตรวจสอบ Genomic DNA ภายใต้เครื่อง Gel electrophoresis โดยเตรียมอะกาโรสเจล (Agarose gel) ความเข้มข้น 1.5 % ในบัฟเฟอร์ Tris-boric acid-EDTA (TBE) ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจนผงอะกาโรสละลายหมด และทิ้งให้สารละลายเย็นลงจนเหลืออุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในถาดเตรียมเจลจากนั้นเสียบหวีลงไป ปล่อยให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 60 นาที จากนั้นวางแผ่นวุ้นลงในแชมเบอร์อิเล็กโทรโฟรีซีส เทบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมแผ่นวุ้น หยอดตัวอย่างลงในช่องวิ่งบนแผ่นวุ้นช่องวิ่งละ 3 ไมโครลิตร โดยช่องวิ่งแรกให้หยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน 3 ไมโครลิตร จากนั้นเปิดสวิตซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านแผ่นวุ้นและบัฟเฟอร์ TBE โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที และนำแผ่นเจลไปล้างด้วยน้ำกลั่น 1 นาที จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล

2.7.7.3 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

หลังจากทำการตรวจสอบ Genomic DNA นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำ PCR ดัดแปลงจาก Wu *et al.* (2012) โดยจะเป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น ใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยารวม 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วยส่วนผสมต่าง ๆ คือ แม่แบบดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร Go Taq® Green Master Mix 15 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ 341F+GC คู่กับ 534R ซึ่งเป็นไพรเมอร์สำหรับแบคทีเรียทั่วไป (Universal primer) เติมไพรเมอร์ชนิดละ 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำปลอดประจุ (ปลอดเชื้อ) จนได้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรุ่น TC-5000 ของบริษัท Techne (UK) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 1) Denaturing เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 2) Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สาย

เดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ คู่สม และ 3) Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก Primer ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เมื่อสิ้นสุดการทำพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ (cycle) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรสที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้เจลความเข้มข้น 1.5 % โดยชั่งผง agarose 1.5 กรัม ละลายใน บัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามวิธีข้างต้นในข้อ 2.7.7.2 โดยเปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.7.7.4 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

การวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE ดัดแปลงจากวิธีการของ Katia *et al.* (2003)โดยใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 30-70% (100% denaturant ประกอบด้วย 7M urea และ 40% formamide) เมื่อนำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดเตรียมเจลแล้ว เสียบหวีลงไประหว่างกระจกทั้งสองแผ่น ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งไว้ 4-5 ชั่วโมง ให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว นำชุดเจลใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ประมาณ 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนได้อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสีติดตาม (loading dye) ในอัตราส่วน 5:1 หยอดลงในช่องวิ่งปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากนั้นเปิดสวิตซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านชุดเจลและบัฟเฟอร์ TAE โดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4.5 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที และนำแผ่นเจลไปล้างด้วยน้ำกลั่น 1 นาที จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องตรวจสอบเจล แล้วตัดแถบดีเอ็นเอเด่นออกจากเจล นำไปทำพีซีอาร์ซ้ำโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ไม่มี GC-clamp สำหรับขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์รวมถึงการโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ดังรายละเอียดในภาคผนวก ง (ห้องปฏิบัติการภาควุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

2.7.7.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ส่งวิเคราะห์ที่ 1st BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย

ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd. โดยใช้ระบบ LI-COR ® NEN 4200 Global IR2 DNA sequencing และเครื่อง ABI® PRISM DNA Sequencer ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากนั้นนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn ซึ่งเป็นฐานขอมูลภายใต้ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

2.7.8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและเส้นใยของหญ้าซิกแนลเลื้อย

เก็บตัวอย่างหญ้าก่อนบำบัดและหญ้าที่ผ่านการบำบัดด้วยน้ำทิ้ง/รดด้วยน้ำประปา/น้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงาน ปริมาณตัวอย่างละ 50 กรัม เพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน และเส้นใย ตามวิธีการมาตรฐานของ AOAC (2000) และ AOAC (2005) ตามลำดับ (ศูนย์พัฒนาอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อการส่งออก (ADCET)) คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จากนั้นนำค่าปริมาณโปรตีนและเส้นใยในแต่ละแปลงทดลองมาเปรียบเทียบกัน

2.7.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้โปรแกรม SPSS ซึ่งนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่โดยใช้สถิติ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

บทที่ 3

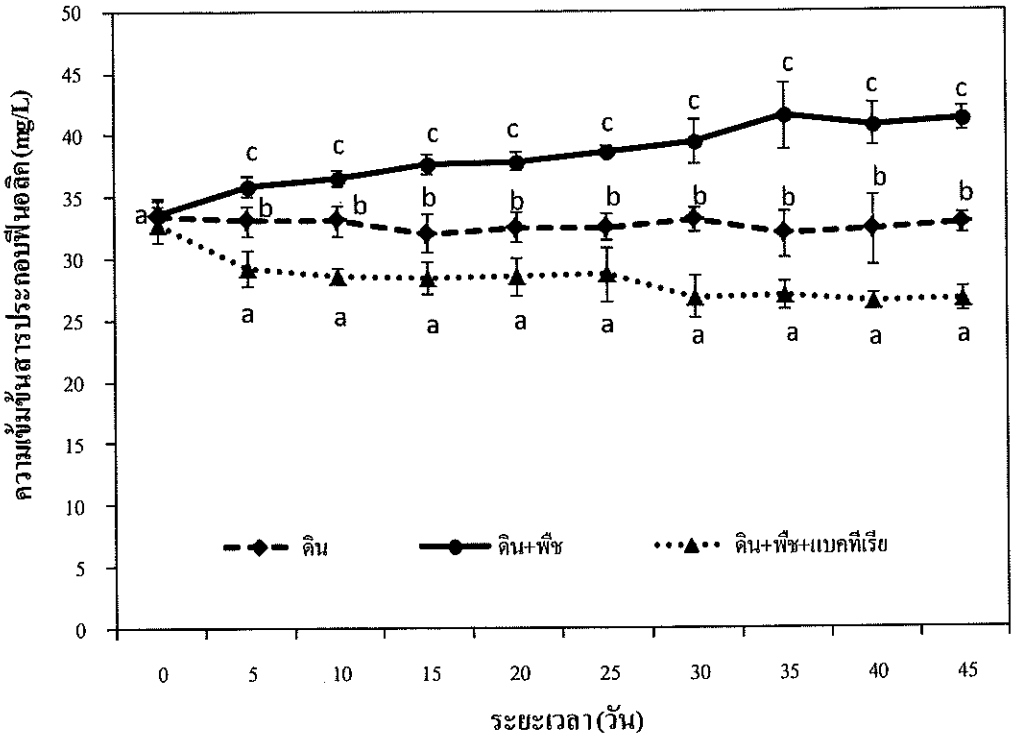
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่ปล่อยจากรากหญ้าซิกแนลเลื้อย

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่ปลดปล่อยจากรากหญ้าซิกแนลเลื้อย ทำโดยการวัดปริมาณสารดังกล่าวที่ปนเปื้อนออกมากับน้ำชะ (Leached phenolics) หลังจากรดน้ำชุดทดลองต่าง ๆ ด้วยน้ำประปา เริ่มต้นตั้งแต่วันแรกที่ปลูกหญ้าในกระถาง จนถึงระยะเวลา 45 วัน โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ดังนี้ 1) ดิน 2) ดินที่ปลูกหญ้า 3) ดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียผสม 2 สายพันธ์ระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ผลการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินเพียงอย่างเดียว ตรวจพบสารประกอบฟีนอลิคค่อนข้างคงที่ในช่วงระยะเวลาที่ศึกษา คือ อยู่ในช่วงระหว่าง 31.91 – 33.82 mg gallic acid equipvalent (GAE)/L (รูปที่ 3.1) ส่วนชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อย มีการปล่อยสารประกอบฟีนอลิคเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องอยู่ในช่วง 33.32 – 41.51 mg GAE/L ในขณะที่ชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยและมีการเติมแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ลงไปบริเวณรากของหญ้าซิกแนลเลื้อย ตรวจพบสารประกอบฟีนอลิคเริ่มต้นประมาณ 26.46 mg GAE/L และมีปริมาณลดลงจนเหลือ 32.82 mg GAE/L ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญนับตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยมีการปล่อยสารประกอบฟีนอลิคออกมาทางรากอย่างต่อเนื่อง และปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นตามอายุของต้นหญ้า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fletcher and Hegde (1995) ทำการตรวจสอบการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิคจากรากพืชจำนวน 17 ชนิดประกอบด้วย Staghorn, Sumac, Eupatorium, Perennial sunflower, Barberry, Kudzu, Licorice, Asparagus, Mulbery, Osage orange, Big bluestem, Indian grass, Tall fescue, Crabapple, Rose, Stephanandra และ Cottonwood hybrid ที่ใช้ในการบำบัดสารพีซีบี (Polychlorinated biphenyls) ผ่านกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพแบบเมแทบอลิซึมร่วมพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่วัดได้มีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและระยะเวลาในการเจริญเติบโตหรืออายุของพืช ซึ่งพบสารประกอบฟีนอลิคที่ปล่อยออกมาทางรากพืชเหล่านี้อยู่ในช่วง 0.48 - 2.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้การลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียผสมซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ (Phenol-degrading bacteria) นั้น

ยืนยันได้ว่าการเติมแบคทีเรียที่มีความจำเพาะเจาะจงดังกล่าวสู่ดินมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ จากผลการศึกษาปริมาณการปล่อยสารประกอบฟีนอลิคจากรากหญ้าซิกแนลในส่วนนี้ ได้นำไปใช้ออกแบบระยะเวลาในการเติมแบคทีเรียในการทดลองถัดไป



รูปที่ 3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในดินของชุดการทดลองต่าง ๆ
โดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่างๆ ณ เวลาที่เก็บตัวอย่างเท่ากัน

3.2 การศึกษาวิธีการเติมแบคทีเรีย

การศึกษาวิธีการเติมแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ลงสู่ดิน แบ่งเป็น (1) การเติมแบคทีเรียบริเวณรากตั้งแต่เริ่มต้นปลูกหญ้าในกระถาง (2) การเติมแบคทีเรียในดินตั้งแต่เริ่มต้นปลูกหญ้าในกระถาง และ (3) การเติมแบคทีเรียในดินหลังจากปลูกไปแล้วเป็นเวลา 20 วัน และ (4) การเติมแบคทีเรียในดินหลังจากปลูก

ไปแล้วเป็นเวลา 35 วัน ซึ่งพิจารณาจากปริมาณการปล่อยสารประกอบฟีนอลิคจากรากพืชที่แตกต่างกันจากการทดลองก่อนหน้านี้ในข้อ 3.1 การเลือกวิธีการเติมที่เหมาะสมทำโดยการประเมินหาจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลที่สูงที่สุดโดยวิธีการ Most probable number (MPN) ในช่วงระยะเวลา 0 - 45 วัน การทดลองนี้มีชุดควบคุม คือ ดินเพียงอย่างเดียว และดินที่ปลูกพืชแต่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลทั้งหมดในดิน พบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากของหญ้าซิกแนลเลื้อยตั้งแต่เริ่มปลูกหญ้า (RT_0) มีปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องสูงที่สุดอยู่ในช่วง 8.71 – 10.81 log MPN / ดิน 1 กรัม โดยมีปริมาณแบคทีเรียสูงที่สุด ณ วันที่ 45 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียในดินตั้งแต่วันที่ 0 วันที่ 20 และวันที่ 35 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 8.71 – 10.78, 8.71-10.71 และ 8.71 – 10.74 log MPN / ดิน 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่มีดินเพียงอย่างเดียวและชุดการทดลองที่ปลูกหญ้าแต่ไม่มีการเติมแบคทีเรียนั้นมีปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ คือมีค่าอยู่ในช่วง 8.71 – 8.81 log MPN / ดิน 1 กรัม และ 8.71 – 9.10 log MPN / ดิน 1 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) แสดงว่าการเติมแบคทีเรียที่รากมีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียสูงกว่าการเติมในดิน และปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุกชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของวิโรจน์ รักเกียรติสกุล (2556) รายงานว่าแบคทีเรียย่อยสลายสารฟีนอลในดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยเริ่มต้นเท่ากับ 2.5 log MPN /ดิน 1 กรัม และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 5.2 log MPN /ดิน 1 กรัม ในวันที่ 60 ในขณะเดียวกันชุดควบคุมที่มีดินเพียงอย่างเดียว (ไม่ได้ปลูกหญ้า) พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น เท่ากับ 2.5 log MPN /ดิน 1 กรัม และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 4.3 log MPN /ดิน 1 กรัม รวมทั้งการศึกษาของ Afzal *et al.* (2013) รายงานว่าการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ *Burkholderia phytofirmans* PsJN ที่รากของข้าวไร (Ryegrass) แบคทีเรียมีโอกาสเจริญอยู่ใกล้บริเวณรากที่สามารถปล่อยสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน และกรดอินทรีย์ ที่ช่วยในการเจริญและการแข่งขันของจุลินทรีย์ จึงช่วยส่งเสริมการบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลให้มีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ที่เติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าซิกแนลเลื้อย จึงมีโอกาสสัมผัสกับสารประกอบฟีนอลิคที่ปล่อยมาจากราก เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ และเมื่อหญ้าเจริญเพิ่มขึ้นส่วนของรากจะแผ่ขยายไปทั่วกระถาง (ดังรูปที่ 3.2 A และ B) ซึ่งสามารถเป็นตัวนำพาแบคทีเรียที่เจริญเกาะติดอยู่บริเวณรากให้กระจายไปได้ทั่วพื้นที่ ในขณะที่การเติมในดินทำให้โอกาสที่แบคทีเรียสัมผัสกับสารอินทรีย์ที่ปล่อยออกมาทางรากได้น้อยกว่า และการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียเป็นไปได้ยาก รวมถึงอัตราการแข่งขันของจุลินทรีย์ท้องถิ่นอื่น ๆ ในดิน อาจส่งผลต่อความอยู่รอดของแบคทีเรียที่ถูกเติม ดังนั้นจึงเลือกวิธีการเติมแบคทีเรียที่

รากตั้งแต่เริ่มปลูกหญ้าไปใช้ในการทดสอบการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในโรงเรือนเพาะชำต่อไป

(A) (B)

รูปที่3.2 ลักษณะการแผ่กระจายของหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ปลูกในกระถาง (A) และลักษณะรากของหญ้าซิกแนลเลื้อย (B)

ตารางที่ 3.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลของชุดการทดลองต่าง ๆ (n = 3)

ชุดการทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย (log MPN / ดิน 1 กรัม)					
	วันที่ 0	วันที่ 5	วันที่ 15	วันที่ 25	วันที่ 35	วันที่ 45
S	8.71±1.16[a]	8.71±1.16[a]	8.71±1.16[a]	8.71±1.25[a]	8.81±1.17[a]	8.81±1.17[a]
SG	8.71±1.16[a]	8.71±1.16[a]	8.71±1.26[a]	8.74±1.36[a]	8.91±1.17[a]	9.10±1.36[a]
ST_{20}	8.71±1.16[a]	10.32±1.40[b]	10.52±1.23[b]	10.60±1.46[b]	10.64±0.00[b]	10.71±1.53[b]
ST_{35}	8.71±1.16[a]	10.34±1.71[b]	10.53±0.00[b]	10.57±1.46[b]	10.60±1.4 6[b]	10.74±0.00[b]
ST_0	8.71±1.16[a]	10.28±1.46[b]	10.47±1.53[b]	10.57±1.46[b]	10.68±1.53[b]	10.78±1.60[b]
RT_0	8.71±1.16[a]	10.60±1.46[c]	10.64±1.74[c]	10.71±1.53[c]	10.75±1.81[c]	10.81±1.60[c]

หมายเหตุ : ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณน้ำหนักแห้งที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ ณ เวลาเดียวกัน โดยกำหนดให้ S = ดิน, SG = ดินที่ปลูกหญ้า, RT_0 = ดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียบริเวณรากของหญ้าซิกแนลเลื้อยตั้งแต่เริ่มปลูก, ST_0 = ดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียในดินตั้งแต่เริ่มปลูกหญ้า, ST_{20} = ดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียในดินที่ระยะเวลา 20 วันหลังจากปลูกหญ้า, ST_{35} = ดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียในดินที่ระยะเวลา 35 วันหลังจากปลูกหญ้า

3.3 การเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย

การศึกษาการเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย ทำโดยการเก็บตัวอย่างหญ้าตั้งแต่เริ่มปลูก (วันที่ 0) วันที่ 25 และวันที่ 45 พบว่าในวันเริ่มต้นทำการทดลองหญ้าซิกแนลเลื้อยมีปริมาณน้ำหนักแห้งเท่ากับ 3.35 กรัม และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 45 วัน พบว่าทุกชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของหญ้าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ โดยชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียบริเวณรากของหญ้าซิกแนลเลื้อยตั้งแต่เริ่มปลูกหญ้า (RT_0) มีปริมาณน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเท่ากับ 23.30 กรัม (ตารางที่ 3.2) ผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันได้ว่าวิธีการเติมแบคทีเรียดังกล่าวนอกจากจะเอื้อให้มีการเจริญและอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียมากที่สุดแล้ว ยังช่วยให้พืชเจริญได้ดีอีกด้วย จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าทุกชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียทั้งในดินและรากของหญ้าซิกแนลเลื้อย มีผลทำให้การเจริญเติบโตของพืชสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ดังเช่นการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดมีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ หรือเรียกว่า Plant growth-promoting bacteria เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter* sp. สามารถสร้างสารอินทรีย์ที่จำเพาะเจาะจงกับธาตุเหล็ก ได้แก่ ซิเดอร์โรฟอร์ (Siderophore) ซึ่งช่วยรีดิวซ์ธาตุเหล็กจาก Fe (III) ให้เป็น Fe (II) ซึ่งอยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดซึมไปใช้ได้ง่ายกว่า (Katiyar and Goel, 2004) อีกทั้งจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Azospirillum* sp., *Rhizobium sp.* และ *Bacillus* sp. สามารถผลิตฮอร์โมนพืช (Phytohormones) เช่น Auxin และ Gibberellins ซึ่งช่วยกระตุ้นการยืดตัวและการขยายของเซลล์พืช (Bottini *et al.*, 2004) เป็นต้น

ตารางที่ 3.2 ปริมาณน้ำหนักแห้งของหญ้าซิกแนลเลื้อยในชุดการทดลองที่มีการเติมและไม่เติมแบคทีเรีย (n = 3)

ชุดการทดลอง	น้ำหนักแห้ง (กรัม) : กระถาง		
	วันที่ 0	วันที่ 25	วันที่ 45
SG	3.35±0.25[a]	10.07±1.12[a]	18.04±1.37[a]
ST_{20}	3.35±0.25[a]	12.39±1.17[b]	21.58±1.41[b]
ST_{35}	3.35±0.25[a]	12.66±1.10[b]	22.54±1.30[b]
ST_0	3.35±0.25[a]	13.57±1.05[b]	22.67±1.27[b]
RT_0	3.35±0.25[a]	16.46±1.28[c]	23.30±1.30[b]

หมายเหตุ : ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณน้ำหนักแห้งที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่างๆ ณ เวลาเดียวกัน โดยกำหนดให้ SG = หญ้า, RT_0 = หญ้าที่เติมแบคทีเรียบริเวณรากตั้งแต่เริ่มปลูก, ST_0 = หญ้าที่เติมแบคทีเรียในดินตั้งแต่เริ่มปลูก, ST_{20} = หญ้าที่เติมแบคทีเรียในดินที่ระยะเวลา 20 วันหลังจากปลูกหญ้า, ST_{35} = หญ้าที่เติมแบคทีเรียในดินที่ระยะเวลา 35 วันหลังจากปลูกหญ้า

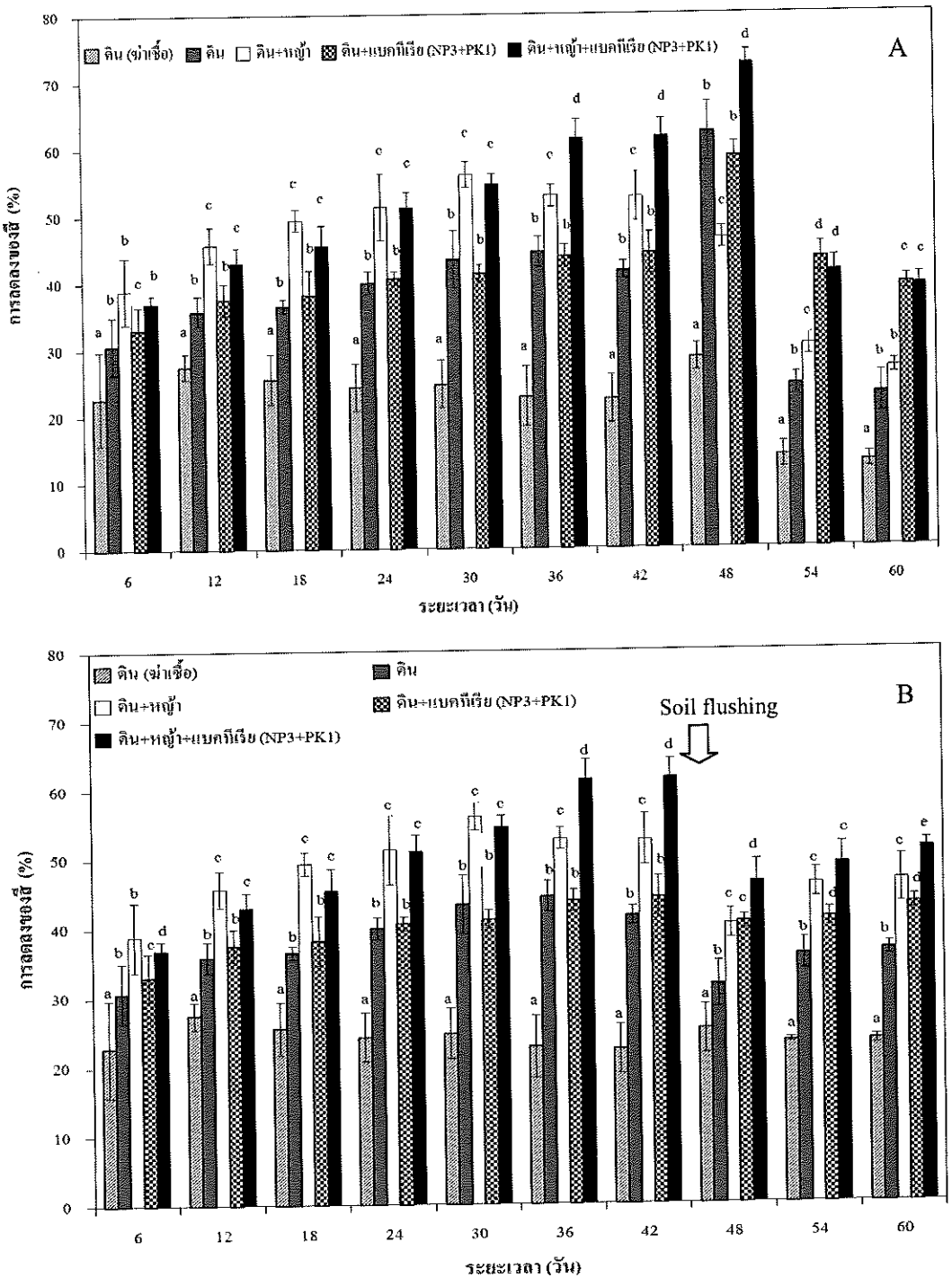
3.4 การศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งในโรงเรือนเพาะชำ

3.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิค

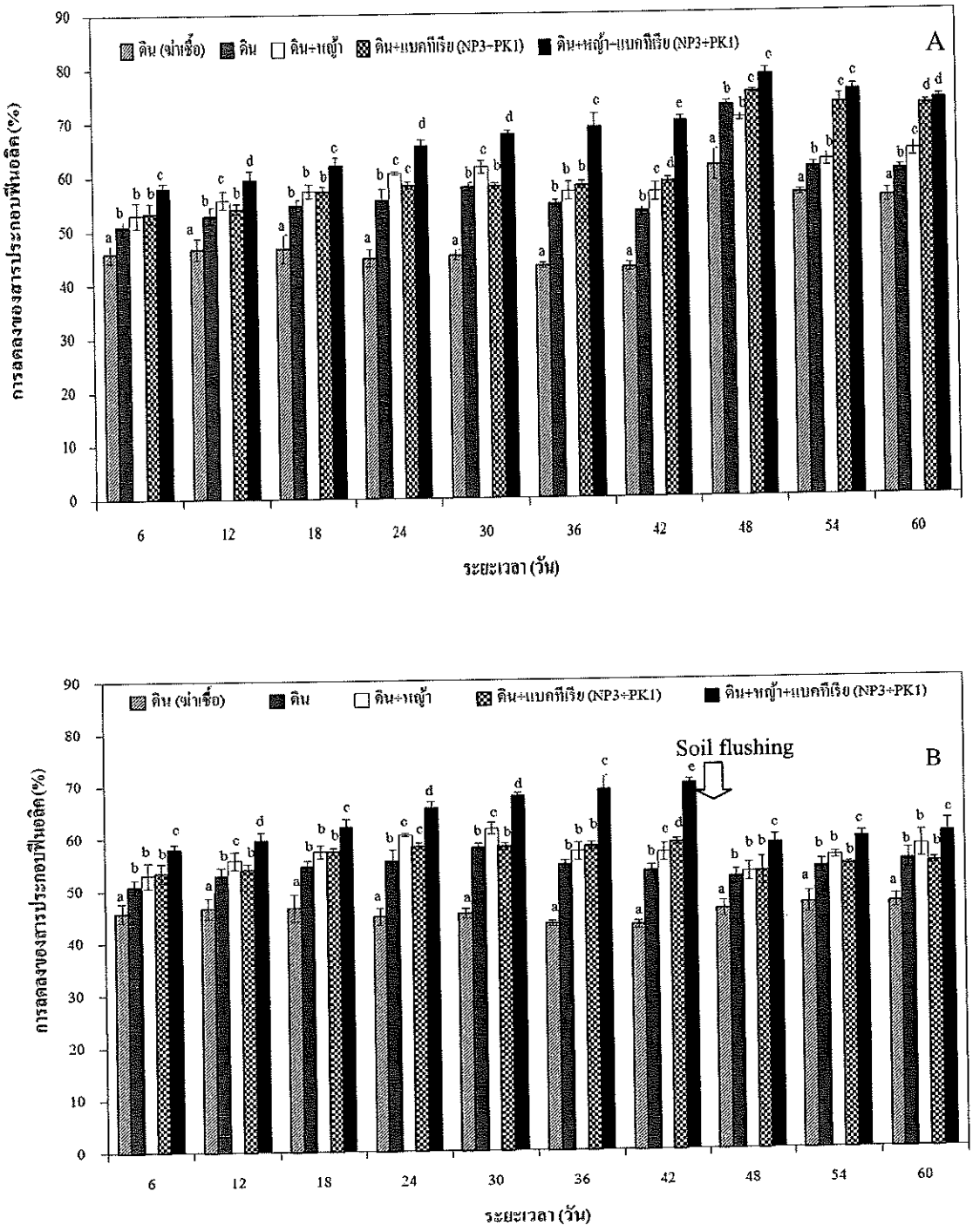
การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียในขั้นตอนนี้ทำในกระถางที่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมในโรงเรือนเพาะชำ ซึ่งแบ่งชุดการทดลองได้ ดังนี้ 1) ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอน้ำ 2) ดิน 3) ดินที่ปลูกหญ้า 4) ดินที่มีการเติมแบคทีเรีย และ 5) ดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากพืช หลังจากรดน้ำทิ้งลงไปในกระถางทุกๆ 6 วัน เป็นระยะเวลา 60 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเข้มสีและปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (Total phenolics) ที่ปนเปื้อนออกมากับน้ำชะ โดยพบว่าก่อนทำการทดสอบน้ำทิ้งมีค่าสีเริ่มต้น 4,438 หน่วยสี และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคเริ่มต้นเท่ากับ 168.17 mg GAE/ L เมื่อผ่านการรดน้ำทิ้งซ้ำ

ทั้งหมด 8 ครั้ง ณ วันที่ 48 พบว่า ชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าสามารถบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ดีที่สุด โดยสามารถบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 48 ได้ร้อยละ 36-72 และร้อยละ 57- 78 ตามลำดับ รองลงมาคือสภาวะที่มีการเติมแบคทีเรียลงไปในดิน สามารถลดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ร้อยละ 33 - 58 และร้อยละ 53-72 สำหรับประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคของชุดการทดลองที่มีพืชเพียงอย่างเดียว อยู่ในช่วงร้อยละ 38-56 และ 52-64 ในขณะที่ดินเพียงอย่างเดียว ลดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ร้อยละ 30-62 และ 50-60 อย่างไรก็ตามชุดการทดลองที่มีดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งจำลองกลไกการดูดซับสารมลพิษโดยอนุภาคของดินนั้น สามารถลดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้น้อยที่สุดร้อยละ 22-28 และ 45-55 (รูปที่ 3.3 A และ 3.4 A)โดยสีของน้ำทิ้งก่อนบำบัดมีสีดำคล้ำและหลังจากผ่านการบำบัดด้วยชุดการทดลองต่าง ๆ แล้วทำให้น้ำทิ้งมีสีเหลืองใส (รูปที่ 3.5 A-F) จากผลการศึกษาให้ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีต่ำกว่างานวิจัยของวิโรจน์ รักเกียรติสกุล (2556) และ Phonepaseuth (2014) ที่พบว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้สูงร้อยละ 92.6 และบำบัดสีได้สูงถึงร้อยละ 95.3 อาจเนื่องด้วยลักษณะน้ำทิ้งที่แตกต่างกัน เช่น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเริ่มต้น รวมทั้งปริมาณน้ำทิ้งที่ใช้รดหญ้าในการศึกษานี้มีปริมาณมากกว่า และไม่มีการชะล้างดิน ตลอดจนระยะเวลาในการบำบัดที่สั้นกว่า

หลังจากการเติมน้ำทิ้งซ้ำครั้งที่ 9 และ 10 ณ วันที่ 54 และ 60 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดสีของทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 3.3A) เนื่องจากการสะสมของสารอินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิคที่เป็นองค์ประกอบของน้ำทิ้งที่มีการรดซ้ำหลายครั้ง มีผลยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ส่งผลให้การย่อยสลายทางชีวภาพในระบบบำบัดน้ำเสียลดลง (Mosse *et al.*, 2011) กอปรกับดินที่ผ่านการบำบัดมาแล้วนั้นมีสีดำคล้ำซึ่งเกิดจากการดูดซับสีของสารอินทรีย์และสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งเอาไว้ ส่งผลให้กลไกการดูดซับ (Sorption) ของอนุภาคดินเกิดขึ้นได้น้อยลง จึงทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีลดลง ในขณะที่ประสิทธิภาพของการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคค่อนข้างคงที่ถึงแม้จะมีการรดน้ำทิ้งซ้ำหลายครั้งก็ตาม แสดงว่าแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีนอลในดินยังคงทำงานได้อย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 3.3 A)



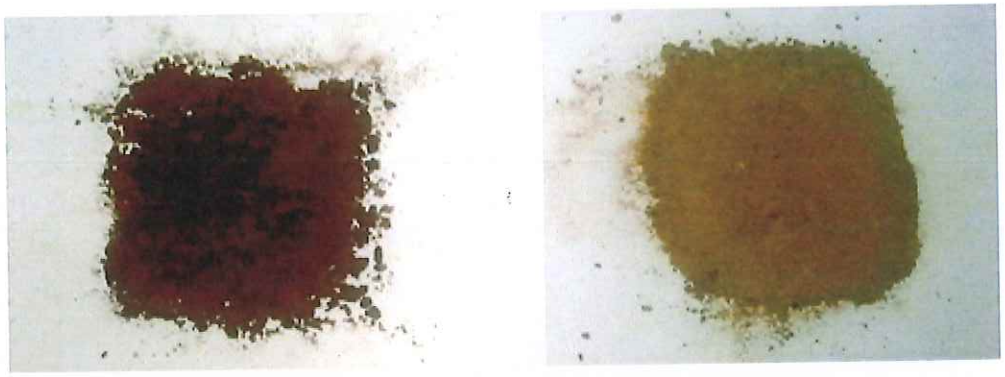
รูปที่ 3.3 ประสิทธิภาพการบำบัดสีของชุดการทดลองต่าง ๆ โดยไม่มีการชะล้างอนุภาคดิน (A) และมีการชะล้างอนุภาคดิน (B) โดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ ณ เวลาเดียวกัน



รูปที่ 3.4 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคของชุดการทดลองต่างๆ โดยไม่มีการชะล้างดิน (A) และมีการชะล้างดิน (B) โดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารประกอบฟีนอลิคที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่างๆ ณ เวลาเดียวกัน

รูปที่ 3.5 สีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนบำบัด (A) และหลังจากผ่านการบำบัดโดยดินที่ปลูกหญ้า(B), ดินเพียงอย่างเดียว (C), ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (D), ดินที่มีการเติมแบคทีเรีย (E) และดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียลงไปบริเวณรากหญ้า (F)

เนื่องจากปัญหาการดูดซับสีของน้ำทิ้งดังที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นในการทดลองถัดไปจึงทำการชะล้างดิน (Soil flushing) ในกระถางด้วยน้ำประปา เพื่อลดรงควัตถุที่มีสีคล้ำจากน้ำทิ้งซึ่งเกาะติดอยู่กับอนุภาคดิน โดยคาดว่าจะทำให้ดินสามารถดูดซับสารอินทรีย์จากน้ำทิ้งซ้ำได้อีก ผลการทดลองพบว่าหลังจากทำการชะล้างดินในกระถางสีของดินมีสีน้ำตาลอ่อนลงเมื่อเปรียบเทียบกับดินก่อนทำการชะล้างซึ่งมีน้ำตาลคล้ำ (รูปที่ 3.6 A และ B) หลังจากชะล้างดินในกระถางด้วยน้ำประปาแล้วทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีของทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่ไม่มีการชะล้างดิน (รูปที่ 3.4 B) อย่างไรก็ตามพบว่าการชะล้างดินไม่ส่งเสริมให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากกลไกการดูดซับมีผลต่อการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคน้อยกว่าการบำบัดสี (รูปที่ 3.5 B) ดังนั้นผลการศึกษาในขั้นตอนนี้แสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลบริเวณรากหญ้าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้สูงที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ โดยการลดลงของสีและสารประกอบฟีนอลิคเกิดขึ้นได้โดยผ่านกระบวนการต่างๆ ร่วมกัน ได้แก่ การย่อยสลายทางชีวภาพโดยแบคทีเรียที่เติมกับแบคทีเรียท้องถิ่นในดิน กลไกการทำงานของพืช และการดูดซับของอนุภาคดิน เป็นต้น



(A) (B)

รูปที่ 3.6 ลักษณะสีของดินก่อน (A) และหลังชะล้างดินด้วยน้ำประปา (B)

3.4.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล

ศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลในดินของชุดการทดลองต่าง ๆ ที่ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้ง ได้แก่ 1) ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2) ดิน 3) ดินที่ปลูกหญ้า 4) ดินที่มีการเติมแบคทีเรีย 5) ดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้า โดยทำการเก็บตัวอย่างดินตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 0), ในระหว่างการบำบัดน้ำทิ้ง ณ วันที่ 30 และเมื่อสิ้นสุดการบำบัดน้ำทิ้ง ณ วันที่ 60 และทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลโดยวิธีการ MPN พบว่า ชุดการทดลองที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้า มีปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องสูงที่สุด อยู่ในช่วง 10.64 - 10.84 log MPN / ดิน 1 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ (ตารางที่ 3.3) รองลงมา ได้แก่ ชุดการทดลองดินที่ปลูกหญ้ามีปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลอยู่ในช่วง 10.57 - 10.71 log MPN / ดิน 1 กรัม และชุดการทดลองดินที่มีการเติมแบคทีเรียมีปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอล อยู่ในช่วง 10.52 -10.71 log MPN / ดิน 1 กรัม ส่วนชุดการทดลองที่มีดินเพียงอย่างเดียวมีปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายสลายฟีนอยู่ในช่วง 8.71-8.91 log MPN / ดิน 1 กรัม ในขณะที่ดินผ่านการฆ่าเชื้อมีปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลต่ำสุด อยู่ในช่วง 7.30 - 7.61 log MPN / ดิน 1 กรัม ซึ่งปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจพบในดินฆ่าเชื้ออาจเนื่องมาจากแบคทีเรียบางชนิดที่มีความทนทานต่อการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และมีการเจริญเติบโตขึ้นมาได้โดยใช้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของวิโรจน์ รักเกียรติสกุล (2556) รายงานว่าปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลหลังผ่านการบำบัดน้ำทิ้ง

ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพิ่มสูงขึ้นในทุกชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่มีดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเลื้อยมีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 3.11 log MPN /ดิน 1 กรัม และหลังผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นเท่ากับ 8.29 log MPN /ดิน 1 กรัม เช่นเดียวกันกับผลการทดลองของ Phonepaseuth (2014) ที่ใช้หญ้าซิกแนลเลื้อยในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์และพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยพบปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 5.89 log CFU/ดิน 1 กรัม และหลังผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 35 วัน พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 7.52 log CFU/ดิน 1 กรัม

จากการบำบัดน้ำทิ้งด้วยชุดการทดลองต่าง ๆดังที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บริเวณรากของหญ้าซิกแนลเลื้อยตั้งแต่เริ่มปลูกหญ้านั้น เมื่อผ่านการบำบัดน้ำทิ้งเป็นระยะเวลา 60 วัน มีปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลสูงที่สุด เนื่องจากหญ้าซิกแนลเลื้อยมีการปล่อยสารประกอบฟีนอลิคออกมาทางรากอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ปริมาณแบคทีเรียยังสอดคล้องกับผลการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคที่พบว่าชุดการทดลองดังกล่าวให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสูงที่สุด เนื่องจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์หลายชนิดโดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิคชนิดต่าง ๆ ซึ่งแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและเพิ่มจำนวน จึงทำให้พบปริมาณแบคทีเรียมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ

ตารางที่ 3.3 ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลในดินของชุดการทดลองต่าง ๆ (n = 3)

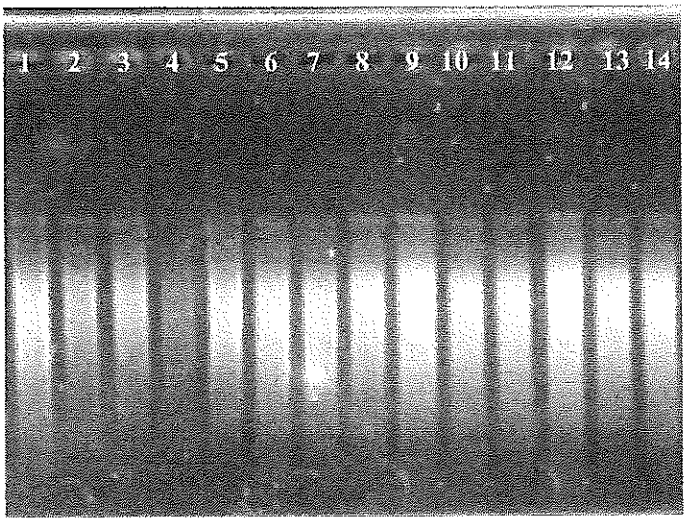
ชุดการทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย (log MPN/ดิน 1 กรัม)		
	วันที่ 0	วันที่ 30	วันที่ 60
ดิน (ฆ่าเชื้อ)	7.30 ±1.06[a]	7.55±1.16[a]	7.61±1.60[a]
ดิน	8.71±1.16[a]	8.71±1.26[a]	8.91±1.17[a]
ดิน+หญ้า	10.57±1.16[b]	10.64±1.74[b]	10.71±1.60[b]
ดิน+แบคทีเรีย	10.52±1.06[b]	10.57±1.53[b]	10.71±1.60[b]
ดิน+หญ้า+แบคทีเรีย	10.64±1.16[c]	10.71±1.23[c]	10.84±1.53[c]

หมายเหตุ : ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณแบคทีเรียที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ

3.4.3 การจำแนกชนิดและศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชาคมแบคทีเรียในดินโดยวิธี PCR-DGGE

3.4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

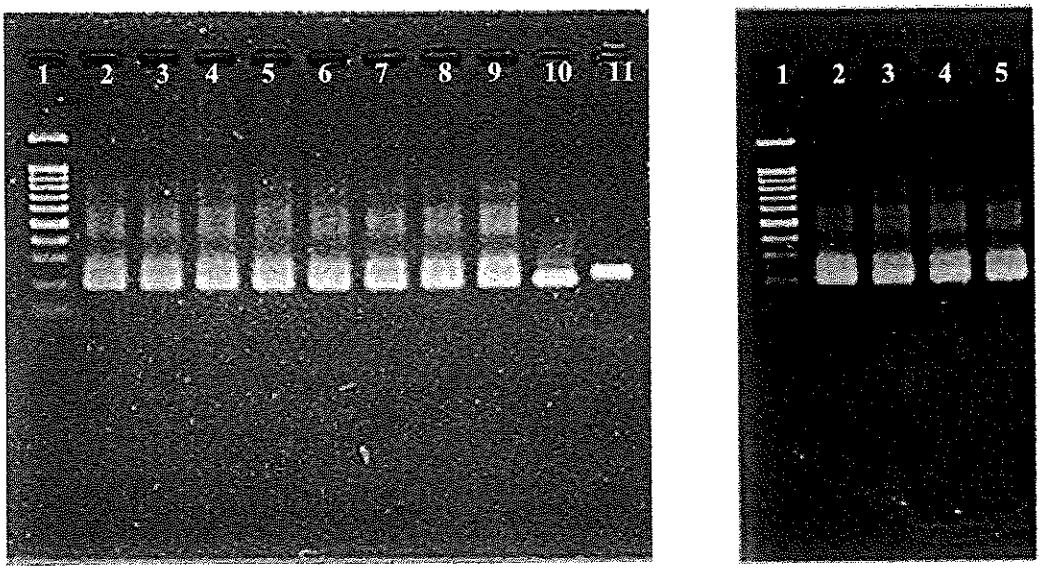
เพื่อศึกษาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียในดิน และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในขณะที่มีการบำบัดน้ำทิ้งว่ามีลักษณะอย่างไร จึงทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินของชุดการทดลองต่าง ๆ โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างเป็น 3 ช่วงระยะเวลา คือ ก่อนการบำบัด (วันที่ 0) ระหว่างการบำบัด (วันที่ 30) และหลังสิ้นสุดการบำบัด (วันที่ 60) จากการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (OMEGA, USA) สามารถสกัดดีเอ็นเอได้จากตัวอย่างดินซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจนดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 Genomic DNA ของแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน เรียงลำดับดังนี้; ดิน ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัดน้ำทิ้ง (ช่องวิ่งที่ 1-3), ดินที่ปลูกหญ้า ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัดน้ำทิ้ง (ช่องวิ่งที่ 4-6) ดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณราก ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัดน้ำทิ้ง (ช่องวิ่งที 7-9), ดินที่มีการเติมแบคทีเรีย ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัดน้ำทิ้ง (ช่องวิ่งที่ 10-12) , แบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Methylobacterium* sp. NP3 (ช่องวิ่งที่ 13) และแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. PK1 (ช่องวิ่งที่ 14)

3.4.3.2. การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR)

หลังจากสกัดดีเอ็นเอแล้ว จึงทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นที่สนใจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพรเมอร์ (DNA primers) ได้แก่ 341f-gc และ 534r ตามวิธีของ Wu *et al.* (2012) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 200 คู่เบส ไพรเมอร์ชนิดนี้เป็นแบบUniversal primer นั่นคือสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ที่ตำแหน่ง 16S rDNA ของแบคทีเรียทั่วไป เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยเครื่องอิเลคโทรโฟเรซิสพบว่า มีแถบผลิตภัณฑ์ขนาด 200 คู่เบส อย่างชัดเจน จากตัวอย่างดินของทุกชุดการทดลอง รวมทั้งจากตัวอย่างแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 2 สายพันธ์ ดังรูปที่ 3.8



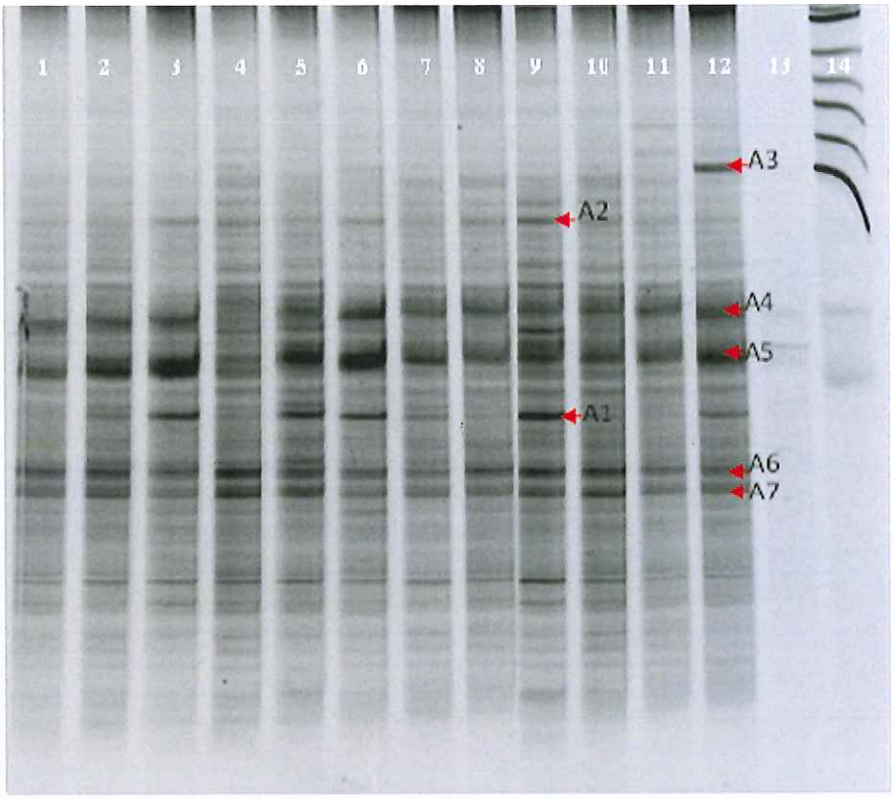
(A) (B)

รูปที่ 3.8 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จาก Genomic DNA รูป (A) เรียงตามลำดับดังนี้; marker 100 bp - 1.5 kb DNA ladder (ช่องวิ่งที่ 1), ดิน ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 2-4), ดินที่ปลูกหญ้าก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 5-7), ดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้า ก่อน-ระหว่างการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 8-9), แบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Methylobacterium* sp. NP3 (ช่องวิ่งที่ 10), แบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. PK (ช่องวิ่งที่ 11) และรูป (B) เรียงตามลำดับดังนี้; marker 100 bp -1.5 kb DNA ladder (ช่องวิ่งที่ 1), ดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียบริเวณราก หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 2), และดินที่เติมแบคทีเรีย ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 3-5)

3.4.3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธี DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากขั้นตอนก่อนหน้านี้มาจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE พบว่าในดินมีแบคทีเรียหลากหลายชนิด ดังจะเห็นได้จากมีจำนวนแถบดีเอ็นเอบนเจล DGGE หลายแถบ (รูปที่ 3.9) ซึ่งตั้งอยู่บนสมมติฐานที่ว่าแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบที่ปรากฏบนเจลมาจากแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว จากนั้นทำการเลือกแถบดีเอ็นเอเด่นบนเจลของ DGGE ทั้งหมด 7 แถบตามตำแหน่ง A1-A7 ในรูปที่ 3.9 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยคาดว่าแถบดีเอ็นเอเด่นจะเป็นแบคทีเรียชนิดหลักที่มีบทบาทสำคัญในการบำบัดน้ำทิ้ง หลังจากได้ข้อมูลลำดับเบสแล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn ซึ่งเป็นฐานขอมูลภายใต้ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเด่นจากแถบของดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้ ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank พบว่าแบคทีเรียที่จัดจำแนกได้ส่วนใหญ่มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่พบในดินและพืช (ตารางที่ 3.4) ได้แก่ *Methylobacterium populi* (แถบ A4) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิคได้ ยกตัวอย่างเช่น 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Van Aken *et al.*, 2004) และ *Agrococcus jenensis* (แถบ A5) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินและพืชโดยทั่วไป (Groth *et al.*, 1996)ส่วน *Thiophaeococcus mangrovi* (แถบ A6) พบในดินทรายสีดำบริเวณบึงน้ำ (Divyasree *et al.*, 2014) รวมถึง *Nocardioides mesophilus* (แถบ A7) เป็นแบคทีเรียที่พบในดินเช่นกัน (Dastager *et al.*, 2010) จะเห็นได้ว่าแถบดีเอ็นเอทั้ง 4 แถบข้างต้น (แถบ A4, A5, A6 และA7) พบในตัวอย่างดินของทุกชุดการทดลองอย่างสม่ำเสมอตั้งแต่ก่อนบำบัดจนถึงสิ้นสุดการบำบัดน้ำทิ้ง แสดงว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถทนทานต่อองค์ประกอบในน้ำเสียภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองได้เป็นอย่างดีจึงตรวจพบตลอดการทดลอง สำหรับแถบดีเอ็นเอ A1 ได้แก่ *Paenibacillus polymyxa* ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอเด่นที่พบว่ามีความเข้มมากขึ้นในช่วงสิ้นสุดการทดลองของทุกชุดการทดลอง โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าสังเกตเห็นแถบที่เข้มขึ้นมากที่สุด จึงคาดว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เนื่องจากความเข้มขึ้นของแถบดีเอ็นเอที่สังเกตเห็น แสดงถึงปริมาณของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในดินอันเนื่องมาจากการใช้สารอินทรีย์จากน้ำทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวน ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพการบำบัดน้ำทิ้งที่รายงานไว้ในการทดลองข้างต้น ในขณะที่แถบดีเอ็นเอ A2 ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Sphingomonas oryziterrae* (A2) พบว่ามีบทบาทสำคัญเช่นกัน เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอนี้เข้มขึ้น

ในช่วงสุดท้ายของการทดลอง แต่จะสังเกตได้ชัดเจนเฉพาะชุดการทดลองที่มีการปลูกหญ้าเท่านั้น ทั้งที่มีการเติมและไม่เติมแบคทีเรีย แสดงว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับบริเวณรากพืช จากรายงานที่ผ่านมาพบแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดในดินและบริเวณรากพืช เช่น รากของต้นข้าว เป็นต้น (Timmusk *et al.*,2005; Chung *et al.*, 2011) ส่วนแถบดีเอ็นเอ A3 ได้แก่ *Flavobacterium haoranii* ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอเด่นชัดในตัวอย่างดินหลังจากการบำบัดน้ำทิ้งในชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียในดิน มีรายงานว่าแบคทีเรียดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินและในน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตดอกไม้ไฟ (Zhang *et al.*, 2010) แม้ว่าผลการศึกษาด้วยเทคนิค DGGE อาจไม่สามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรียผสมที่ถูกเติมลงสู่รากหญ้าเป็นแบคทีเรียเด่นที่มีบทบาทสำคัญในการบำบัดน้ำทิ้งหรือไม่ แต่ในบรรดาแบคทีเรียข้างต้นที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าแถบดีเอ็น A4 ซึ่งตรวจพบตลอดการทดลองเป็นแบคทีเรียในจีนัสเดียวกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylobacterium* sp. NP3 ที่ถูกเติมลงไปบริเวณรากหญ้า จึงคาดว่าแบคทีเรียที่ถูกเติมจะสามารถทนทานต่อองค์ประกอบของน้ำเสียได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามการศึกษาความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรแบคทีเรียในดินมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ เช่น การเก็บตัวอย่างดินเพื่อสกัดดีเอ็นเออาจไม่ได้เป็นตัวแทนของแบคทีเรียทั้งหมดเพราะตัวอย่างดินที่ใช้มีปริมาณน้อย และการติดตามแบคทีเรียที่ถูกเติมก็ทำได้ยาก เนื่องจากการศึกษานี้ทำการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าจึงไม่สามารถระบุจุดหรือบริเวณดินที่มีแบคทีเรียที่ถูกเติมอยู่รอดหรือเจริญอยู่ได้ นอกจากนี้ในตัวอย่างดินที่ใช้บำบัดน้ำทิ้งมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่เป็นตัวยับยั้งในการสกัดดีเอ็นเอ เช่น สารฮิวมิค จึงอาจเป็นอุปสรรคต่อการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้งหมดในดิน (ตารางที่ 3.4)



รูปที่ 3.9 โปรไฟล์ของ DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ใช้เกรเดียนท์ของความเข้มข้น denaturant 30-70% เรียงลำดับดังนี้; ดิน ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 1-3), ดินที่ปลูกหญ้า ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 4-6), ดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณราก ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 7-9), ดินที่มีการเติมแบคทีเรีย ก่อน-ระหว่าง-หลังการบำบัด (ช่องวิ่งที่ 10-12), แบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Methylobacterium* sp. NP3 (ช่องวิ่งที่ 13) และแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. PK1 (ช่องวิ่งที่ 14)

ตารางที่ 3.4 แบคทีเรียกลุ่มเด่นจากโปรไฟล์ของเจล DGGE หลังจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

ลำดับของแถบดีเอ็นเอ	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Similarity (%)	แหล่งที่พบ/มลพิษที่ย่อยสลาย	เอกสารอ้างอิง
A1	*Paenibacillus polymyxa* strain DSM 36	NR117733.2	100	ดิน,รากพืช	Timmusk *et al.*, 2005
A2	*Sphingomonas oryziterrae* strain YC6722	NR108219.1	100	รากต้นข้าว	Chung *et al.*, 2011
A3	*Flavobacterium haoranii* strain LQY-7	NR117422.1	92	ดิน,น้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตดอกไม้ไฟ / cypermethrin	Zhang *et al.*, 2010
A4	*Methylobacterium populi* strain BJ001	NR114899.1	99	เนื้อเยื่อ,ใบของต้นป่อปล่าร์ / 2,4-dichlorophenoxyacetic acid	Van Aken *et al.*,2004
A5	*Agrococcus jenensis* strain DSM 9580	NR026275.1	91	ดิน, ส่วนต่างๆของพืช / diaminobutyric acid	Groth *et al.*, 1996
A6	*Thiophaeococcus mangrovi* strain JA304	NR042643.1	94	ดินทรายสีดำบริเวณบึงน้ำ	Divyasree *et al.*, 2014
A7	*Nocardioides mesophilus* strain MSL 22	NR116027.1	98	ดินทั่วไป	Dastager *et al.*, 2010

3.4.4 การเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย

ศึกษาการเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อยโดยการหาน้ำหนักแห้งของส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ ก่อนการรดด้วยน้ำทิ้งหญ้ามีลักษณะของราก ลำต้นและใบ ดังตารางที่ 3.5 และมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดเท่ากับ 4.88 กรัม แบ่งเป็นน้ำหนักราก 1.55 กรัม น้ำหนักลำต้น 2.18 กรัม และน้ำหนักใบ 1.13 กรัม หลังจากนำหญ้าไปใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งเป็นเวลา 60 วัน ภายใต้ 3 สภาวะ ได้แก่ 1) ดินที่ปลูกหญ้าและรดด้วยน้ำประปา 2) ดินที่ปลูกหญ้าและรดด้วยน้ำทิ้ง และ 3) ดินที่ปลูกหญ้ามีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากและรดด้วยน้ำทิ้ง จะเห็นได้ว่าส่วนรากมีการขยายแผ่ไปทั่วทั้งกระถาง (รูปที่ 3.2 A และ B) ส่วนลำต้นมีขนาดใหญ่และสูงเพิ่มขึ้น ส่วนใบมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นดังรูปที่ 3.10 A และ B เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักแห้งพบว่าหญ้าที่รดด้วยน้ำประปาซึ่งเป็นชุดทดลองควบคุมมีปริมาณน้ำหนักแห้งสูงที่สุด คือ มีน้ำหนักรวมเพิ่มขึ้นเป็น 17.30 กรัม (ราก 4.68 กรัม ลำต้น 7.75 กรัม และใบ 4.87 กรัม) (ตารางที่ 3.5) สำหรับหญ้าที่เติมแบคทีเรียบริเวณรากมีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกับหญ้าที่ถูกรดด้วยน้ำประปา ซึ่งมีน้ำหนักแห้งรวมเท่ากับ 17.01 กรัม (ราก 4.63 กรัม ลำต้น 7.71 กรัม และใบ 4.66 กรัม) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Afzal *et al.* (2013) พบว่าการเติมแบคทีเรีย *Burkholderia phytofirmans* PsJN ที่เมล็ดของหญ้า Ryegrass เพื่อใช้บำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล ช่วยส่งเสริมกระบวนการย่อยสลายและลดพิษที่เกิดจากสารประกอบนี้ที่มีต่อพืช จึงทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีกว่าระบบที่ไม่เติมแบคทีเรีย ส่วนหญ้าที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียซึ่งถูกรดด้วยน้ำทิ้ง พบว่ามีน้ำหนักแห้งต่ำที่สุดซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (กับ 2 ชุดการทดลองข้างต้น โดยมีน้ำหนักแห้งรวมเท่ากับ 15.96 กรัม (ราก 4.30 กรัม ลำต้น 7.26 กรัม และใบ 4.39 กรัม) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับวิจัยที่ผ่านมาของ Phonepaseuth (2014) พบว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ผ่านการบำบัดทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีปริมาณน้ำหนักแห้งต่ำกว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยที่รดด้วยน้ำประปา

ผลการทดลองแสดงว่าการใช้น้ำทิ้งรดหญ้าซิกแนลเลื้อยสามารถทำให้หญ้าเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกับการใช้น้ำประปา แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิคชนิดต่าง ๆ เช่น Gallic acid, Protocatechuic acid, 4-Hydroxybenzoic acid, Caffeic acid, Syringic acid, Vanillic acid, *p*-Coumaric acid, Ferulic acid และ phenol (พันธ์ธิดา จันทร์โท, 2557) ซึ่งจัดเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Low-molecular weight hydrocarbons) มีรายงานว่าความเป็นพิษของสารกลุ่มนี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Kirk *et al.*, 2005) จึงทำให้หญ้าซิกแนลเลื้อยที่รดด้วยน้ำทิ้งมีโอกาสในการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ นอกจากนี้ Coniglio *et al.*

(2008) พบว่าความเข้มข้นของสารฟีนอลเท่ากับ 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลต่อการเจริญของรากต้นผักกาดก้านขาว (*Brassica napus*) แต่ถ้าความเข้มข้นเท่ากับหรือมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะลดอัตราการเจริญของราก เนื่องจากการตายของเซลล์ส่วนหนึ่งซึ่งเกิดจากความเป็นพิษของสารฟีนอล

(A) (B)

รูปที่ 3.10 การเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อยก่อนปลูกในกระถาง (A) และหญ้าซิกแนลเลื้อยหลังผ่านการบำบัดน้ำทิ้งเป็นระยะเวลา 60 วัน (B)

ตารางที่ 3.5 ปริมาณน้ำหนักแห้งของหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับที่รดด้วยน้ำประปาหลังจากวันที่ 60 ของการทดลอง (n = 3)

ชุดการทดลอง	ราก	ลำต้น	ใบ	รวม
		(กรัม)		
หญ้า + น้ำทิ้ง	4.30±0.05 [a]	7.26±0.08 [a]	4.39±0.07 [a]	15.96±0.06 [a]
หญ้า + แบคทีเรีย+น้ำทิ้ง	4.63±0.05 [a]	7.71±0.02 [a]	4.66± 0.05 [a]	17.01±0.04 [a]
หญ้า + น้ำประปา	4.68±0.06 [a]	7.75±0.03 [a]	4.87±0.03 [a]	17.30±0.04 [a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณน้ำหนักแห้งที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ

3.4.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าซิกแนลเลื้อย

โดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิคหลากหลายชนิดถูกพบเป็นองค์ประกอบสำคัญของลิกนินในผนังเซลล์ของพืชอาหารสัตว์ ดังนั้นสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าจึงมีผลต่อคุณภาพในเชิงโภชนาการและความสามารถในการย่อยได้ (Digestibility) ของหญ้านั้น ๆ (Djurdjevic *et al.*, 2005) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิคชนิดมวลโมเลกุลต่ำยังเป็นสาเหตุหนึ่งของรสขมในหญ้าอาหารสัตว์อีกด้วย ซึ่งอาจทำให้การกินอาหารของสัตว์ลดลง (Wang *et al.*, 1998) การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่มีในหญ้าที่ใช้บำบัดน้ำทิ้งเพื่อจะได้ทราบว่าน้ำทิ้งและการเติมแบคทีเรียในรากหญ้ามีผลต่อการสะสมสารประกอบฟีนอลิคในส่วนประกอบต่าง ๆ ของหญ้ามากน้อยเพียงใด และมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ต่อได้หรือไม่เมื่อพิจารณาร่วมกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ปริมาณโปรตีน และเส้นใย จากการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคที่มีในหญ้าซิกแนลเลื้อยก่อนนำมาใช้ทดลองบำบัดน้ำทิ้งพบสารประกอบดังกล่าวสะสมอยู่ในส่วนต่าง ๆ โดยอยู่ในส่วน ราก ลำต้น และใบ เท่ากับ 3.77, 4.91 และ 3.83 mg GAE/g dry weight ตามลำดับ คิดเป็นสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมด 12.52 mg GAE /g dry weight (ตารางที่ 3.6) หลังจากใช้หญ้าบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ใช้หญ้าบำบัดน้ำทิ้งมีสารประกอบฟีนอลิครวมในส่วนประกอบต่าง ๆ สูงกว่าหญ้าที่รดด้วยน้ำประปาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยหญ้าที่ไม่เติมแบคทีเรียและรดด้วยน้ำทิ้งมีสารประกอบฟีนอลิครวมเท่ากับ 17.17 mg GAE / g dry weight ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Phonepaseuth (2014) พบว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูงกว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ถูกรดด้วยน้ำประปา

โดยในส่วนของหญ้าที่เติมแบคทีเรียและรดด้วยน้ำทิ้งมีสารประกอบฟีนอลิคสูงกว่าหญ้าที่ไม่เติมแบคทีเรีย คือ 19.19 mg GAE / g dry weight ในขณะที่หญ้าซึ่งรดด้วยน้ำประปาซึ่งเป็นชุดควบคุม มีสารประกอบฟีนอลิครวมเท่ากับ 15.21 mg GAE / g dry weight ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วงที่มีรายงานก่อนหน้านี้ โดย Djurdjevic *et al.* (2005) ศึกษาสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าอาหารสัตว์ 2 ชนิด ได้แก่ *Chrysopogon gryllus* และ *Festuca vallesiaca* พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมดของส่วนประกอบต่างๆ ที่อยู่เหนือพื้นดินเช่น ใบ และลำต้นอยู่ในช่วง 12-22.5 mg GAE /g dry weight ซึ่งความสามารถในการย่อยได้ของหญ้านอกจากจะขึ้นอยู่กับปริมาณ โครงสร้าง และการจัดเรียงตัวของลิกนินและสารประกอบฟีนอลิคแล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดของสารประกอบฟีนอลิคอีกด้วย โดยงานวิจัยดังกล่าวตรวจพบสารประกอบฟีนอลิคหลากหลายชนิด เช่น p-coumaric acid, ferulic acid,

vanillic acid, p-hydroxybenzoic acid และ syringic acid เป็นต้น จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิคที่เป็นองค์ประกอบในน้ำทิ้งอาจมีการสะสมในต้นหญ้า แต่ยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าการเติมแบคทีเรียมีผลอย่างไรต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่มีในหญ้า อย่างไรก็ตามปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิคในพืชขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของหญ้า (Djurdjevic *et al.*, 2005) รวมถึงสภาพแวดล้อมที่ปลูกหญ้า นอกจากนี้องค์ประกอบและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคเริ่มต้นในน้ำเสีย อาจส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในส่วนต่าง ๆ ของหญ้าแตกต่างกันอีกด้วย ดังจะเห็นได้ว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าที่รดด้วยน้ำประปาพบมากในส่วนใบ สำหรับหญ้าที่ใช้บำบัดน้ำทิ้งทั้งที่เติมและไม่เติมแบคทีเรียพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากในลำต้น เป็นต้น

ตารางที่ 3.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ถูกรดด้วยน้ำประปา ณ วันที่ 60 ของการทดลอง (n = 3)

ชุดการทดลอง	ราก	ลำต้น	ใบ	รวม
		(mg GAE / g dry weight)		
หญ้า + น้ำประปา	3.63±0.20 [a]	5.05±0.42 [a]	6.53±0.72 [a]	15.21±0.52 [a]
หญ้า + น้ำทิ้ง	5.05±0.42 [b]	6.12±0.70 [a]	5.99±0.50 [b]	17.17±0.81 [b]
หญ้า + แบคทีเรีย+น้ำทิ้ง	3.83±0.53 [a]	8.28±0.88 [b]	7.07±0.72 [c]	19.19±0.71 [c]

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ

3.4.6 ลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังการบำบัด

น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนการบำบัดมีค่า COD, ปริมาณไนโตรเจน (TKN) และปริมาณฟอสฟอรัส (TP) เท่ากับ 1,881, 90.1 และ 12.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากผ่านการบำบัดน้ำทิ้งซ้ำจำนวน 8 ครั้ง ณ วันที่ 54 พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลบริเวณรากหญ้า (ดิน+หญ้า+แบคทีเรีย) มีการลดลงของค่า COD, TKN และ TP มากที่สุด โดยลดลงเหลือเท่ากับ 518, 6.46 และ 5.11 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นการลดลงร้อยละ 74,

94 และ 58 ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ ชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลในดินที่ไม่มีการปลูกหญ้า (ดิน+แบคทีเรีย) ลดค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวได้คิดเป็นร้อยละ 67, 82 และ 73 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินเพียงอย่างเดียวลดได้ร้อยละ 53, 48 และ 54 ตามลำดับ และชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินที่มีการปลูกหญ้าพบการลดลงร้อยละ 51, 18 และ 52 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งจำลองกลไกการดูดซับสารมลพิษโดยอนุภาคของดินนั้น มีการลดลงของค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวต่ำที่สุด โดยคงเหลือเท่ากับ 1,330, 73.7 และ 6.01 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นการลดลงร้อยละ 29, 18 และ 50 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.7) ผลการศึกษาข้างต้นพบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้า ซึ่งสามารถบำบัดค่า COD, TKN และ TP ได้ดีที่สุด มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสีและฟีนอลิคที่บำบัดได้สูงที่สุดเช่นกัน เนื่องจากสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสีย ได้แก่ รงควัตถุจำพวก คาโรทีนอยด์ แทนนิน ลิกนิน กัม สารประกอบฟีนอลิค และอื่น ๆ ถูกกำจัดออกไป รวมทั้งระบบมีการใช้ประโยชน์จากสารอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัสจึงทำให้ค่าดังกล่าวลดลง

ตารางที่ 3.7 ลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังการบำบัดด้วยชุดการทดลองต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 60 วัน (n= 1)

ชุดการทดลอง	COD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	TKN (มิลลิกรัมต่อลิตร)	TP (มิลลิกรัมต่อลิตร)
น้ำทิ้งก่อนบำบัด	1,881	90.1	12.2
น้ำทิ้งหลังบำบัด			
ดิน (Sterile soil)	1,330	73.7	6.01
ดิน	880	46.1	5.58
ดิน+หญ้า	912	40.5	5.77
ดิน+แบคทีเรีย	616	15.7	3.19
ดิน+หญ้า+แบคทีเรีย	518	6.46	5.11

3.4.7 ลักษณะเนื้อดินก่อนและหลังการบำบัดน้ำทิ้ง

การศึกษาลักษณะเนื้อดิน (Soil texture) เลือกวิเคราะห์เฉพาะชุดการทดลองที่สามารถบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีได้สูงที่สุด ได้แก่ ชุดการทดลองที่มีการปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้า ผลการศึกษาพบว่าลักษณะเนื้อดินก่อนและหลังการบำบัดไม่มีความแตกต่างกัน โดยลักษณะเนื้อดินก่อนบำบัดมีสัดส่วนของดินเหนียว (Clay) ดินทรายแป้ง (Silt) และดินทราย (Sand) ร้อยละ 18.69 , 24.87 และ 56.44 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.8) เมื่อผ่านการบำบัดน้ำทิ้งเป็นระยะเวลา 60 วัน แล้วทำการวิเคราะห์ลักษณะเนื้อดินหลังบำบัด พบว่าสัดส่วนดินเหนียว (Clay), ดินทรายแป้ง (Silt) และดินทราย มีค่าเท่ากับร้อยละ 19.78 , 24.52 และ 55.70 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ กุสุมาลย์ ล่องแก้ว (2557) รายงานว่าลักษณะเนื้อดินก่อนและหลังการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการบำบัดโดยใช้ดิน (Land treatment) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งจากผลการทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้ดินบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนั้นไม่ได้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อดินจึงไม่ทำให้เกิดการรบกวนหรือมีกระทบต่อระบบนิเวศน์ในดินอย่างที่เคยมีอยู่ตามธรรมชาติก่อนที่จะมีการบำบัด

ตารางที่ 3.8 ลักษณะเนื้อดินก่อนและหลังการบำบัดน้ำทิ้งด้วยชุดการทดลองที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้า (n = 1)

ลักษณะเนื้อดิน	ก่อนบำบัด (ร้อยละ)	หลังบำบัด (ร้อยละ)
ดินเหนียว (Clay)	18.69	19.78
ดินทรายแป้ง (Silt)	24.87	24.52
ดินทราย (Sand)	56.44	55.70

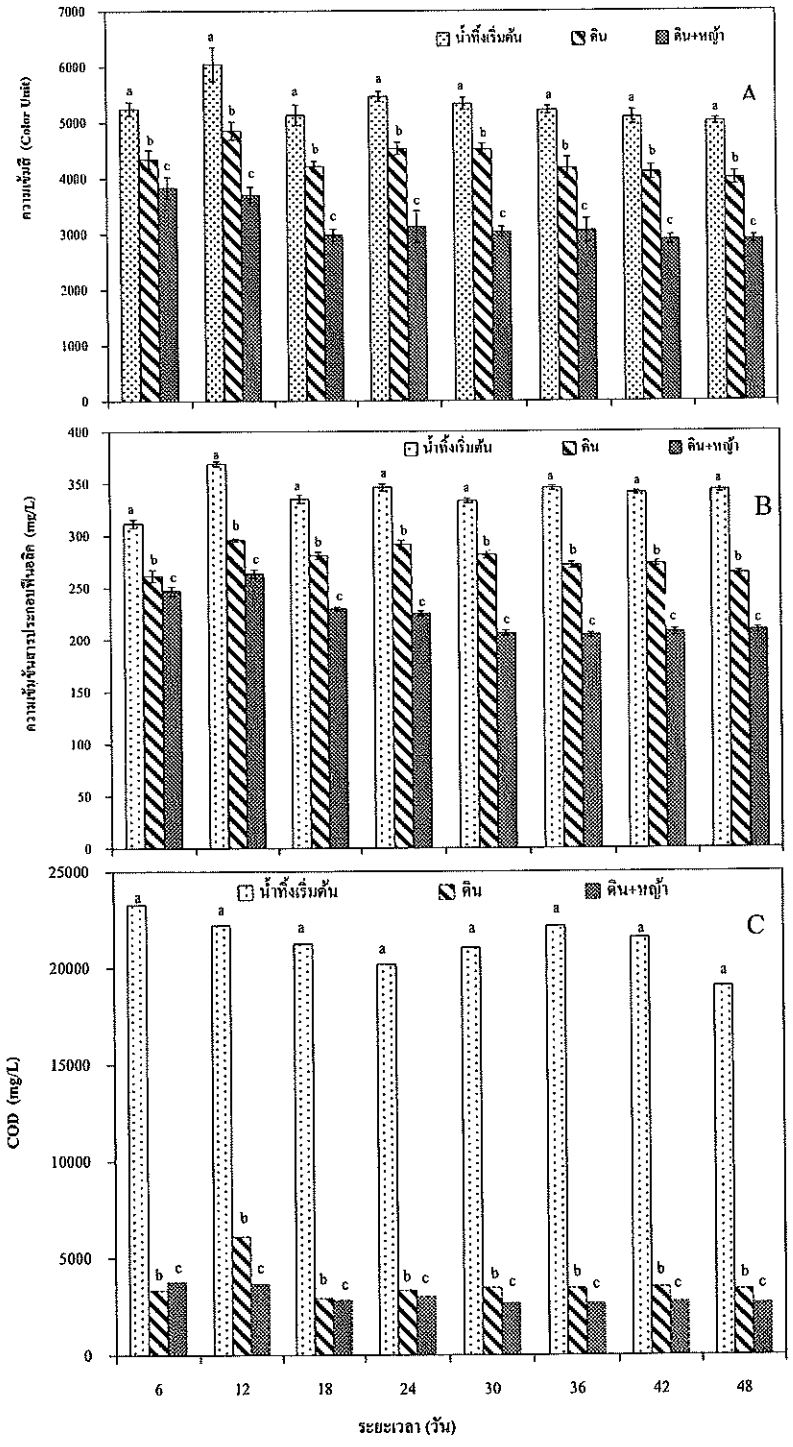
3.5 การบำบัดน้ำทิ้งในแปลงทดลอง

3.5.1 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในระบบที่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า

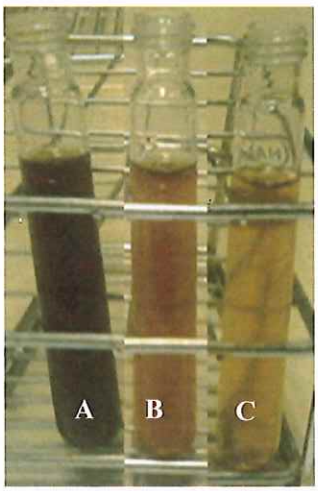
การศึกษาในแปลงทดลองบริเวณพื้นที่ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อเป็นการขยายขนาดของระบบบำบัดที่ได้มีการทดสอบในโรงเรือนก่อนหน้านี้ การใช้พื้นที่ของโรงงานซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดน้ำเสียทำให้ลดขั้นตอนการขนส่งน้ำเสียมายังแปลงทดลอง และทำให้ผู้วิจัยได้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงลักษณะของน้ำเสียที่เกิดขึ้นในแต่ละวัน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในการประยุกต์ใช้ระบบบำบัดที่ต้องการศึกษา ในขั้นแรกเริ่มต้นทดสอบโดยการใช้ดินที่ปลูกหญ้าซิกแนลเพียงอย่างเดียว ยังไม่มีการเติมแบคทีเรีย เพราะต้องการศึกษาความเป็นไปได้ก่อนว่าหากมีการเพิ่มขนาดของระบบโดยใช้ปริมาณดินและหญ้าเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนที่ได้ศึกษาในโรงเรือน และรดน้ำทิ้งอย่างต่อเนื่องโดยมีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่าเป็นระยะในแปลงทดลองกลางแจ้ง ซึ่งไม่ได้มีการควบคุมสภาพแวดล้อมภายนอกเหมือนกับในโรงเรือนเพาะชำ จะมีผลต่อการเจริญของพืชและประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งอย่างไร โดยการนำน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดลำดับสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมารดหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ปลูกในแปลงทดลอง ใช้ระยะเวลาบำบัด (Retention time) ในแต่ละครั้งที่รดน้ำทิ้งนาน 3 วัน จากนั้นใช้น้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงานเป็นตัวชะสารประกอบอินทรีย์ที่ตกค้างในดินก่อนที่จะรดน้ำทิ้งในรอบใหม่ทุกครั้ง แล้วนำน้ำที่ถูกชะออกมาจากแปลงทดลองมาวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิค สี และค่า COD ที่เหลืออยู่ นอกจากนี้ในขณะที่มีการบำบัดน้ำทิ้งจะต้องใช้น้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินในการรักษาระดับความชื้นในดินที่ 60 % ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมกับการเจริญของหญ้าซิกแนลตลอดการทดลอง ดังแสดงวิธีการรดน้ำและการเก็บตัวอย่างน้ำชะในบทที่ 2 วิธีการวิจัย หัวข้อ 2.6.5.1

จากการเก็บตัวอย่างน้ำชะทุก ๆ 6 วัน เป็นระยะเวลา 48 วัน รวมเป็นการรดน้ำทั้งหมด 8 ครั้ง พบว่าแปลงทดลองที่ปลูกหญ้าสามารถบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้สูงที่สุดอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ 26 - 43% (รูปที่ 3.11 A) และ 20 - 40 % (รูปที่ 3.11 B) ตามลำดับ จากความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคและสีเริ่มต้นในน้ำทิ้งประมาณ 311 - 369 mg GAE/L และ 5,009 - 6,047 หน่วยสี และชุดการทดลองดังกล่าวยังสามารถลดค่า COD ได้ถึง 83 - 87% จาก COD เริ่มต้นประมาณ 19,057 -23,768 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 3.10 C) ซึ่งประสิทธิภาพการบำบัดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ในขณะที่แปลงทดลองควบคุมซึ่งมีดินเพียงอย่างเดียวไม่ปลูกหญ้าลดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้งได้

ประมาณ 16 - 23 % และ 17 - 20 % ซึ่งมีประสิทธิภาพในการบำบัดต่ำกว่าแปลงทดลองที่ปลูกหญ้า จะเห็นได้ว่าลักษณะสีของน้ำทิ้งก่อนบำบัดเป็นสีดำคล้ำ ส่วนน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดโดยดินเพียงอย่างเดียวมีสีน้ำตาลอ่อน แต่น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดโดยดินที่ปลูกหญ้ามีสีเหลืองใส ดังรูปที่ 3.12 A - C อย่างไรก็ตามพบว่าแปลงทดลองควบคุมสามารถบำบัดค่า COD ได้ใกล้เคียงกับแปลงทดลองที่มีหญ้าซิกแนล คือประมาณ 83 - 87 % แสดงว่าค่า COD ที่ถูกบำบัดออกไปอาจเป็นสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ ที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอลิคและรงควัตถุที่ให้สีในน้ำทิ้ง ดังนั้นพืชจึงมีบทบาทสำคัญในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในน้ำทิ้ง และการลดลงของสารดังกล่าวยังเนื่องมาจากการทำงานของจุลินทรีย์ในดินและการดูดซับโดยอนุภาคดินร่วมด้วย ซึ่งกลไกในการบำบัดน้ำทิ้งมีความสอดคล้องกับการศึกษาในโรงเรือนเพาะชำก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพการบำบัดน้ำทิ้งในแปลงทดลองยังคงต่ำกว่าการบำบัดในโรงเรือนเพาะชำ อาจมีสาเหตุมาจากความเป็นเนื้อเดียวกันของดินในแปลงทดลองมีน้อยกว่าการทดลองภายในโรงเรือนเพาะปลูก เนื่องจากดินที่ใช้สำหรับการทดลองภายในโรงเรือนเพาะปลูกต้องผ่านตะแกรงร่อนก่อนนำมาใช้งาน จึงอาจส่งผลต่อกลไกการดูดซับของดิน นอกจากนี้ยังมีสาเหตุจากปัจจัยอื่น ๆ เช่น การควบคุมปริมาณแสงอาทิตย์ ลักษณะน้ำทิ้ง อัตราการเจริญของหญ้า เป็นต้น



รูปที่ 3.11 ปริมาณสี (A) สารประกอบฟีนอลิค (B) และ COD (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ก่อนและหลังจากการบำบัดด้วยชุดการทดลองต่างๆในแปลงทดลองในระบบที่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า โดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิค, สี และ COD ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่างๆ ณ เวลาเดียวกัน



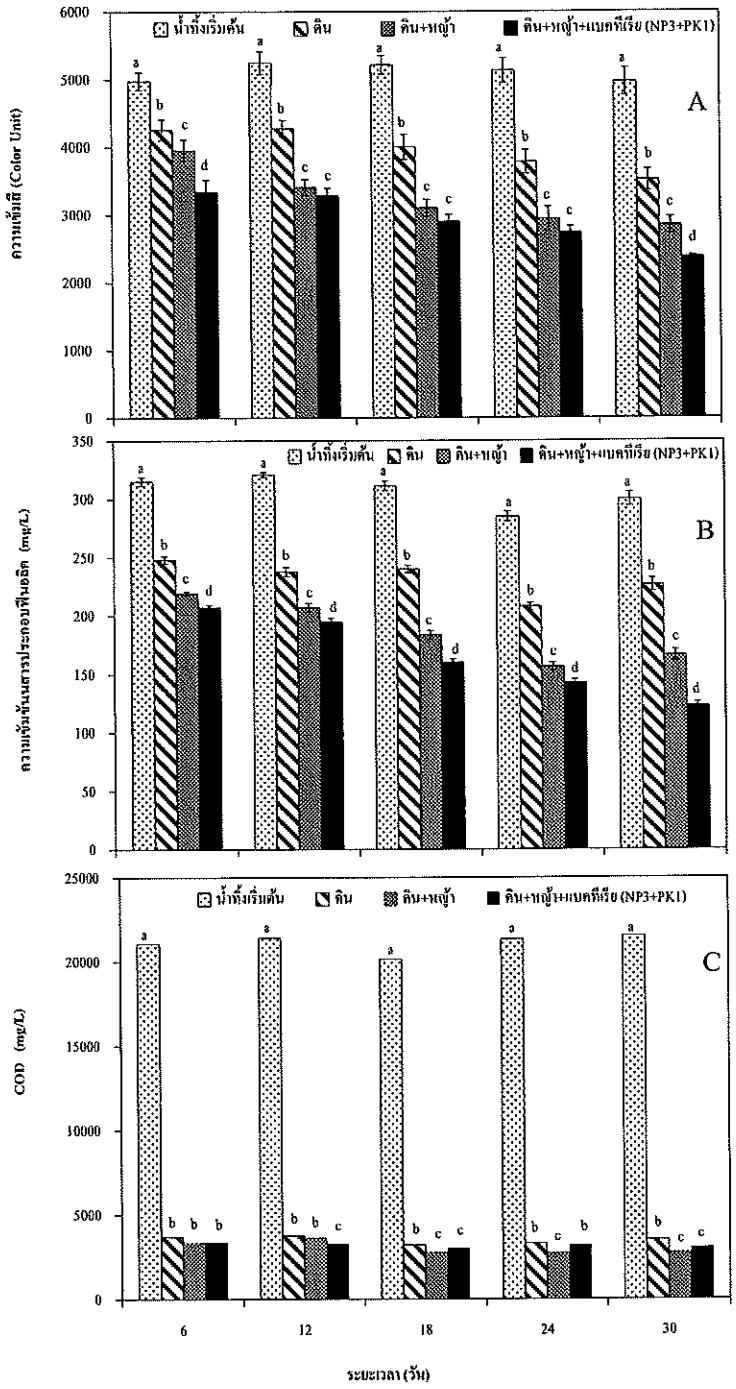
รูปที่ 3.12 สีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนบำบัด (A), ผ่านการบำบัดโดยดิน (B) และดินที่ปลูกหญ้า (C)

3.5.2 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสีในระบบที่ไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า

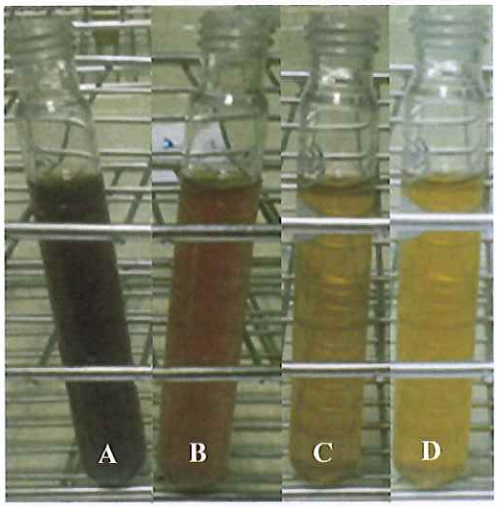
เพื่อจำลองวิธีการบำบัดน้ำทิ้งให้มีความใกล้เคียงกับการใช้งานจริงของโรงงาน การทดลองนี้จึงเน้นการใช้ประโยชน์ของน้ำทิ้งให้ได้มากที่สุด เพื่อศึกษาว่าแปลงทดลองสามารถรองรับปริมาตรน้ำทิ้งได้อย่างต่อเนื่องสูงที่สุดเท่าไหร่โดยที่ไม่มีการชะด้วยน้ำเปล่า และเพิ่มแปลงทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมบริเวณรากหญ้าเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดให้มากที่สุดด้วย ดังนั้นในระหว่างที่มีการรดแปลงทดลองด้วยน้ำทิ้ง จึงใช้น้ำทิ้งในการชะสารอินทรีย์ที่ตกค้างในดินออกมาเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำชะ รวมถึงใช้น้ำทิ้งในการรักษาระดับความชื้นในดินที่ 60% ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมกับการเจริญของหญ้าซิกแนลตลอดการทดลอง จากการเก็บตัวอย่างน้ำชะทุก ๆ 6 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน รวมเป็นการรดน้ำทั้งหมด 5 ครั้ง พบว่า แปลงทดลองที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าสามารถบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้สูงที่สุดและบำบัดได้อย่างต่อเนื่องตั้งแต่ 30-52 % (รูปที่ 3.12 A) และ 34-56 % (รูปที่ 3.12 B) ตามลำดับ จากความเข้มข้นของสีและสารประกอบฟีนอลิคเริ่มต้นในน้ำทิ้งประมาณ 4,961 - 5,242 หน่วยสี และ 285-330 mg GAE/L ทั้งนี้ประสิทธิภาพที่บำบัดได้มีความแตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการศึกษาในโรงเรือนเพาะชำที่พบว่าการเติมแบคทีเรียช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการบำบัดให้เพิ่มขึ้น และชุดการทดลองดังกล่าว

ยังสามารถลดค่า COD ได้ถึง 83-87 % จาก COD เริ่มต้นประมาณ 19,243 - 22,654 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 3.12 C) ในขณะที่แปลงทดลองที่ปลูกหญ้าแต่ไม่เติมแบคทีเรียลดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ประมาณ 23-45 % (รูปที่ 3.13 A) และ 29-48 % (รูปที่ 3.13 B) ตามลำดับ ส่วนแปลงทดลองควบคุมซึ่งมีดินเพียงอย่างเดียวไม่ปลูกหญ้าสามารถลดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งได้ประมาณ 17-28% และ 20-29% ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการบำบัดต่ำกว่าแปลงทดลองที่ปลูกพืช อย่างไรก็ตามพบว่าแปลงทดลองควบคุมสามารถบำบัดค่า COD ได้ใกล้เคียงกับแปลงทดลองที่มีหญ้าซิกแนล คือ ประมาณ 82-83% โดยลักษณะสีของน้ำทิ้งก่อนบำบัดเป็นสีดำคล้ำ ส่วนน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดโดยดินเพียงอย่างเดียวมีสีน้ำตาลอ่อน แตกต่างกับดินที่ปลูกหญ้า และดินที่ปลูกหญ้าซึ่งมีการเติมแบคทีเรียบริเวณราก ที่น้ำทิ้งหลังการบำบัดมีสีเหลืองใสดังรูปที่ 3.14 A-D

จะเห็นได้ว่าแม้ว่าจะมีการใช้น้ำทิ้งตลอดการทดลองโดยไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า แต่ทุกชุดการทดลองสามารถบำบัดน้ำทิ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่ากันกับระบบที่มีการชะด้วยน้ำเปล่า ทั้งนี้พบว่าระบบที่มีการปลูกหญ้าที่เติมแบคทีเรียบริเวณรากซึ่งมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งดีที่สุดมีศักยภาพในการรองรับน้ำทิ้งประมาณ 0.025 ลูกบาศก์เมตรต่อตารางเมตรต่อวัน แม้ว่างานวิจัยนี้จะยังไม่สามารถทำให้คุณลักษณะน้ำทิ้งบางพารามิเตอร์เป็นไปตามค่ามาตรฐานที่กำหนด เช่น COD ≤ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารประกอบฟีนอลิค ≤ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิเคราะห์ด้วยวิธี 4-aminoantipyrine) อย่างไรก็ตามความรู้ที่ได้จากผลการทดลองนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลที่จำเป็นในการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยให้สามารถบำบัดน้ำทิ้งได้อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโดยใช้พืชและแบคทีเรียต่อไป



รูปที่ 3.13 ปริมาณ สี (A) สารประกอบฟีนอลิค (B) และ COD (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังจากการบำบัดด้วยชุดการทดลองต่างๆในแปลงทดลองในระบบที่ไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า โดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิค, สี และ COD ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่างๆ ณ เวลาเดียวกัน



รูปที่ 3.14 สีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนบำบัด (A) ผ่านการบำบัดโดยดิน (B) ผ่านการบำบัดโดยดินที่ปลูกหญ้า (C) และผ่านการบำบัดโดยดินที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรียบริเวณราก (D)

3.5.3 การเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อย

เริ่มต้นก่อนบำบัดน้ำทิ้งพบว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดเท่ากับ 4.80 กรัม แบ่งเป็นน้ำหนักราก 1.56 กรัม น้ำหนักลำต้น 2.15 กรัม และน้ำหนักใบ 1.09 กรัม หลังจากนำหญ้าไปใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งเป็นเวลา 78 วัน ภายใต้ 2 สภาวะการบำบัดข้างต้น คือ ระบบที่มีและไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า ทำให้หญ้าที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียมีน้ำหนักแห้งรวมเพิ่มขึ้นเป็น 16.58 กรัม โดยมีน้ำหนักแต่ละส่วน คือ ราก ลำต้น และใบ เท่ากับ 4.56, 7.57 และ 4.44 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3.9) อย่างไรก็ตามหญ้าที่มีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากตั้งแต่เริ่มปลูกในแปลงทดลองมีน้ำหนักแห้งสูงกว่าหญ้าที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย โดยมีน้ำหนักแห้งรวมเท่ากับ 17.29 กรัม ซึ่งมีน้ำหนักแต่ละส่วน คือ ราก ลำต้น และใบ เท่ากับ 4.31, 7.42 และ 4.16 กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับหญ้าซิกแนลเลื้อยในแปลงควบคุมที่ไม่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งและรดด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงาน พบว่าหญ้าในแปลงควบคุมมีน้ำหนักมากกว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยใน 2 ชุดการทดลองข้างต้นที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้ง โดยหญ้าในแปลงควบคุมมีน้ำหนักแห้งรวมเท่ากับ 20.04 กรัม ซึ่งปริมาณน้ำหนักแห้งของทั้ง 3 ชุดการทดลองข้างต้นพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าการใช้น้ำทิ้งรดหญ้าซิกแนลเลื้อยสามารถทำให้หญ้าเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกับน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดิน แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมี

องค์ประกอบของสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิคชนิดต่าง ๆ ที่อาจส่งผลต่อการเจริญของพืช จึงทำให้หญ้าซิกแนลเลื้อยที่รดด้วยน้ำทิ้งมีโอกาสในการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ ผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการศึกษาในโรงเรือนเพาะชำ โดยพบว่าส่วนของลำต้นมีปริมาณน้ำหนักแห้งมากที่สุด

ตารางที่ 3.9 ปริมาณน้ำหนักแห้งของหญ้าซิกแนลเลื้อยในแปลงทดลองที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับแปลงทดลองควบคุมที่รดด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงาน หลังจากวันที่ 78 ของการทดลอง (n = 3)

ชุดการทดลอง	ราก	ลำต้น	ใบ	รวม
		(กรัม)		
หญ้า + น้ำทิ้ง	4.56±0.05 [a]	7.57±0.04 [a]	4.44±0.08 [a]	16.58±0.17 [a]
หญ้า + แบคทีเรีย+น้ำทิ้ง	4.31±0.02 [a]	7.42±0.07 [a]	4.16±0.07 [a]	17.29±0.17 [a]
หญ้า + น้ำผิวดิน	5.46±0.05 [a]	9.98±0.51 [b]	4.59±0.03 [a]	20.04±0.59 [a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณน้ำหนักแห้งที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ

3.5.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในหญ้าซิกแนลเลื้อย

จากสมมติฐานที่ว่าน้ำทิ้งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิคในพืชหรือไม่ซึ่งจากการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคในหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ปลูกในแปลงทดลองก่อนการรดด้วยน้ำทิ้งพบสารประกอบดังกล่าวสะสมอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของต้นหญ้าแตกต่างกัน โดยพบอยู่ในส่วน ราก ลำต้น และใบ เท่ากับ 3.63, 5.31 และ 4.04 mg GAE/g dry weight ตามลำดับ (ตารางที่ 3.10) คิดเป็นสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมด 12.99 mg GAE /g dry weight หลังจากนำหญ้าไปใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งเป็นเวลา 78 วัน ภายใต้ 2 สภาวะการบำบัดข้างต้น คือ ระบบที่มีและไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า ทำให้หญ้าที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียมีสารประกอบฟีนอลิคอยู่ในส่วนต่าง ๆ เพิ่มขึ้น โดยพบอยู่ในส่วน ราก ลำต้น และใบ เท่ากับ 4.17, 9.62 และ 8.21 mg GAE /g dry weight ตามลำดับ คิดเป็นสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมด 22.22 mg GAE /g dry weight ในขณะที่หญ้าที่มีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากตั้งแต่เริ่มปลูกในแปลงทดลอง พบว่ามีสารประกอบ

ฟีนอลิครวมเท่ากับ 18.04 mg GAE /g dry weight ซึ่งต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียและชุดการทดลองควบคุมซึ่งเป็นหญ้าที่รดด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดิน ที่มีสารประกอบฟีนอลิครวมเท่ากับ 19.12 mg GAE /g dry weight ทั้งนี้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) อีกทั้งพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในลำต้นสูงที่สุดซึ่งแสดงถึงความเชื่อมโยงกับปริมาณลิกนินของผนังเซลล์พืชที่มีปริมาณสูงในส่วนลำต้นของหญ้า อย่างไรก็ตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในหญ้ายังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ชนิดของหญ้า รวมถึงสภาพแวดล้อมที่ปลูกหญ้า นอกจากนี้องค์ประกอบและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคเริ่มต้นในน้ำทิ้ง อาจส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่พบในหญ้าแตกต่างกัน

ตารางที่ 3.10 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในต้นหญ้าซิกแนลเลื้อยในแปลงทดลองที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับแปลงทดลองควบคุมที่รดด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงาน หลังจากวันที่ 78 ของการทดลอง (n = 3)

ชุดการทดลอง	ราก	ลำต้น	ใบ	รวม
		(mg GAE /g dry weight)		
หญ้า + แบคทีเรีย+น้ำทิ้ง	4.91±0.84 [a]	6.93±0.30 [a]	6.19±0.61 [a]	18.04±1.76 [a]
หญ้า + น้ำผิวดิน	3.83±0.20 [b]	8.41±0.42 [b]	6.86±0.72 [b]	19.12±1.34 [b]
หญ้า + น้ำทิ้ง	4.17±0.42 [a]	9.62±0.70 [c]	8.21±0.50 [c]	22.22±1.62 [c]

หมายเหตุ : ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ

3.5.5 ปริมาณโปรตีนและเส้นใยของหญ้าซิกแนลเลื้อย

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารสัตว์ จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารและเส้นใยในต้นหญ้าทั้งก่อนและหลังการบำบัดน้ำทิ้งไปแล้วเป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นแปลง

ทดลองที่รดด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดิน พบว่าหญ้าซิกแนลเลื้อยก่อนนำมาบำบัดน้ำทิ้งมีปริมาณโปรตีนและเส้นใย (Crude fiber) ร้อยละ 0.87 และ 10.54 (ตารางที่ 3.11) ซึ่งถือว่าต้นหญ้าที่นำมาใช้ยังมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับคุณภาพหญ้าอาหารสัตว์แนะนำที่ต้องมีค่าดังกล่าวไม่ต่ำกว่าร้อยละ 7 (Weiss *et al.*, 1999) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากต้นหญ้าที่นำมาใช้ยังมีอายุน้อย อย่างไรก็ตามหลังจากใช้หญ้าที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งทั้งสองสภาวะข้างต้นแล้ว พบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเป็นร้อยละ 1.78 แต่มีปริมาณเส้นใยต่ำลงเล็กน้อยประมาณร้อยละ 9.37 สำหรับหญ้าที่มีการเติมแบคทีเรีย พบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเป็นร้อยละ 6.84 และมีปริมาณเส้นใยร้อยละ 8.32 ในขณะที่หญ้าในแปลงทดลองควบคุมที่รดด้วยน้ำเปล่าจากบ่อเก็บน้ำผิวดินมีปริมาณโปรตีนและไฟเบอร์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 2.53 และ 12.87 ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าช่วยส่งเสริมให้หญ้ามีปริมาณโปรตีนสูงกว่าหญ้าที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียและหญ้าที่ไม่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้ง และยังพบว่าเส้นใยของหญ้าที่มีการเติมแบคทีเรียหลังบำบัดน้ำทิ้งมีค่าลดลง ทำให้สัตว์สามารถย่อยได้ง่ายขึ้น (ค่า Digestibility สูงขึ้น) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ทำให้หญ้าถูกใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ง่ายขึ้น เพราะฉะนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำหญ้าซิกแนลเลื้อยที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งมาใช้เป็นพืชอาหารสัตว์ โดยอาจใช้เป็นหญ้าอาหารสัตว์ร่วมหรือหญ้าอาหารสัตว์ยามขาดแคลน และอาจใช้เป็นหญ้าอาหารสัตว์ร่วมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรอื่น ๆ เช่น ทางใบปาล์มน้ำมันสับ หรือกากถั่วเหลือง ซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูง เพื่อขจัดปัญหาปริมาณโปรตีนที่มีค่าต่ำกว่าหญ้าอาหารสัตว์แนะนำโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนในต้นหญ้ายังขึ้นอยู่กับแร่ธาตุที่พืชได้รับจากน้ำทิ้ง เช่น ไนโตรเจน (ฉายแสง ไผ่แก้ว และคณะ, 2547) ซึ่งในส่วนของชุดการทดลองที่รดด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินต้นหญ้าไม่ได้รับแร่ธาตุดังกล่าวจึงส่งผลให้มีปริมาณโปรตีนที่น้อยกว่าชุดการทดลองที่รดด้วยน้ำทิ้ง

ตารางที่ 3.11 ปริมาณสารอาหารโปรตีนและเส้นใยที่พบในต้นหญ้าซิกแนลเลื้อยในแปลงทดลองที่ถูกรดด้วยน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับแปลงทดลองควบคุมที่รดด้วยน้ำจากบ่อเก็บน้ำผิวดินของโรงงาน หลังจากวันที่ 30 ของการทดลอง (n = 1)

ชุดการทดลอง	Protein (%)	Crude fiber (%)
หญ้า + น้ำทิ้ง	1.78	9.37
หญ้า + น้ำผิวดิน	2.53	12.87
หญ้า + แบคทีเรีย+น้ำทิ้ง	6.84	8.32

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง

4.1.1 การเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าซิกแนลเลื้อย

หญ้าซิกแนลเลื้อยปล่อยสารประกอบฟีนอลิคออกมาทางรากอย่างต่อเนื่องอยู่ในช่วง 33.32 - 41.51 mg GAE/L โดยปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นตามอายุของต้นหญ้าตลอดระยะเวลาการศึกษา 45 วัน การเติมแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายสารฟีนอลนั้นมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิคบริเวณรากหญ้า ดังจะเห็นได้จากปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่ลดลงในชุดการทดลองที่ปลูกหญ้าและมีการเติมแบคทีเรีย อีกทั้งพบว่าการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าซิกแนลเลื้อยตั้งแต่เริ่มปลูก มีปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องสูงที่สุดอยู่ในช่วง 8.71 - 10.81 log MPN / ดิน 1 กรัม โดยมีปริมาณแบคทีเรียสูงที่สุด ณ วันที่ 45 วิธีการนี้ที่ช่วยให้แบคทีเรียเจริญและอยู่รอดได้ดีกว่าการเติมแบคทีเรียในดินตั้งแต่วันที่ 0 วันที่ 20 และวันที่ 35 ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียอยู่ในช่วง 8.71 - 10.78, 8.71 - 10.71 และ 8.71 - 10.74 log MPN / ดิน 1 กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียทั้งบริเวณรากของหญ้าซิกแนลเลื้อยและในดิน มีผลทำให้การเจริญเติบโตของพืชสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย

4.1.2 ประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายในโรงเรือนเพาะปลูก

การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้พืชร่วมกับแบคทีเรีย เมื่อผ่านการรดน้ำทิ้งซ้ำทั้งหมด 8 ครั้ง ภายในระยะเวลา 48 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินที่ปลูกหญ้าร่วมกับการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าสามารถบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ดีที่สุด โดยสามารถบำบัดสีและ

สารประกอบฟีนอลิคได้ร้อยละ 36 - 72 และร้อยละ 57 - 78 ตามลำดับ รองลงมาคือสภาวะที่มีการเติมแบคทีเรียในดิน สามารถลดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ร้อยละ 33 - 58 และร้อยละ 53 - 72 สำหรับประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคของชุดการทดลองที่มีพืชเพียงอย่างเดียวอยู่ในช่วงร้อยละ 38 - 56 และ 52 - 64 ในขณะที่ดินเพียงอย่างเดียว ลดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้ร้อยละ 30 - 62 และ 50 - 60 ส่วนชุดการทดลองที่มีดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งจำลองกลไกการดูดซับสารมลพิษโดยอนุภาคของดินนั้น สามารถลดสีและสารประกอบฟีนอลิคได้น้อยที่สุดร้อยละ 22 - 28 และ 45 - 55 หลังจากการเติมน้ำทิ้งซ้ำครั้งที่ 9 และ 10 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดสีของทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตามการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า ช่วยให้ระบบกลับมาบำบัดสีได้ใกล้เคียงกับการบำบัดก่อนหน้านี้ ผลการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำทิ้งมีความสอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ นั่นคือชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าพบปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลสูงที่สุด ตลอดระยะเวลาทดลอง 60 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 10.64 - 10.84 log MPN/ดิน 1 กรัม และจากการศึกษาความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์ในดินโดยเทคนิค PCR-DGGE พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินและส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น *Methylobacterium populi*, *Agrococcus jenensis*, *Thiophaeococcus mangrovi* และ *Nocardioides mesophilus* นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง เนื่องจากตรวจพบแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียดังกล่าวอย่างสม่ำเสมอตลอดระยะเวลาการทดลอง อีกทั้งพบว่าน้ำทิ้งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อยเพียงเล็กน้อย โดยพบว่าน้ำหนักแห้งของหญ้าที่รดด้วยน้ำทิ้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำหนักแห้งของหญ้าที่รดด้วยน้ำเปล่า อย่างไรก็ตามการใช้หญ้าทั้งที่เติมและไม่เติมแบคทีเรียบำบัดน้ำทิ้งส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในส่วนต่าง ๆ ของหญ้าเพิ่มสูงขึ้นกว่าหญ้าที่รดด้วยน้ำเปล่า

4.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในแปลงทดลอง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิคในแปลงทดลอง พบว่า เมื่อมีการขยายขนาดของระบบบำบัดเพิ่มขึ้น หญ้าซิกแนลสามารถบำบัดน้ำทิ้งได้อย่างต่อเนื่องในระบบที่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า โดยให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิค ร้อยละ 26 - 43 และ 20 - 40 ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทดสอบการปลูกหญ้า

ร่วมกับการเติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้าในระบบที่ไม่มีการชะล้างดินด้วยน้ำเปล่า ยังคงให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสูงเท่าเทียมกับระบบที่มีการชะล้างดินแต่สามารถเพิ่มปริมาตรของน้ำที่รดได้มากกว่า โดยที่ประสิทธิภาพในการบำบัดสีและสารประกอบฟีนอลิค เท่ากับร้อยละ 30 - 52 และ 34 - 56 ตามลำดับ จากความเข้มข้นของสีและสารประกอบฟีนอลิคเริ่มต้นในน้ำทิ้งประมาณ 4,961 - 5,242 หน่วยสี และ 285 - 330 mg GAE/L ตามลำดับ โดยที่ระบบดังกล่าวสามารถรองรับน้ำได้เท่ากับ 0.025 ลูกบาศก์เมตรต่อตารางเมตรต่อวัน สำหรับการเจริญเติบโตของพืชนั้นพบว่าน้ำทิ้งไม่ได้ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของหญ้า โดยทั้งหญ้าที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งและหญ้าที่รดด้วยน้ำผิวดินมีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการเจริญเติบโตของหญ้าภายในโรงเรือน อีกทั้งพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าที่ไม่เติมแบคทีเรียและผ่านการบำบัดน้ำทิ้งเท่ากับ 22.22 mg/g dry weight ซึ่งมีค่าสูงกว่าหญ้าที่รดด้วยน้ำผิวดินที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเท่ากับ 19.12 mg/g dry weight อย่างไรก็ตามแปลงทดลองที่เติมแบคทีเรียบริเวณรากหญ้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในหญ้าน้อยที่สุดเท่ากับ 18.04 mg/g dry weight และมีความแตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การศึกษาความเป็นไปในการนำหญ้าที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งไปใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและเส้นใย พบว่า หญ้าที่เติมแบคทีเรียซึ่งผ่านการบำบัดน้ำทิ้งมีปริมาณโปรตีน ร้อยละ 6.84 ซึ่งมีค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับหญ้าที่ไม่เติมแบคทีเรียซึ่งผ่านการบำบัดน้ำทิ้งและหญ้าที่รดด้วยน้ำผิวดิน โดยมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมกับการเป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีค่าไม่ต่ำกว่าร้อยละ 7 แต่พบว่า ชุดการทดลองดังกล่าวมีปริมาณเส้นใย ร้อยละ 8.32 ซึ่งมีค่าต่ำที่สุด โดยปริมาณเส้นใยที่น้อยกว่าจะทำให้สัตว์สามารถย่อยได้ง่ายขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ประโยชน์จากหญ้าซิกแนลเลื้อยหลังผ่านการบำบัดน้ำทิ้งเป็นพืชอาหารสัตว์

4.2 ข้อเสนอแนะ การประยุกต์ใช้และแนวทางการจัดการด้านสิ่งแวดล้อม

4.2.1 ควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้หญ้าซิกแนลร่วมกับการเติมแบคทีเรียให้สามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิคและสีที่เหลืออยู่และมีอัตราในการบำบัดสูงขึ้น ทำให้ระยะเวลาในการบำบัดลดลง ซึ่งอาจทำได้โดยการเพิ่มปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่เติมบริเวณรากหญ้า

4.2.2 ควรศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของหญ้าซิกแนลเลื้อยระหว่างการบำบัดน้ำทิ้ง เช่น อัตราการรดน้ำทิ้ง การเติมปุ๋ย การเติมจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย

สารประกอบฟีนอลิค สี และช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant growth-promoting bacteria) เป็นต้น

4.2.3 การศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์หญ้าที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งนอกเหนือจากการใช้เป็นหญ้าอาหารสัตว์ เนื่องจากในปัจจุบันโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่ใช้ระบบผลิตก๊าซชีวภาพในการบำบัดน้ำเสีย การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำชีวมวลของหญ้าที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งมาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตก๊าซชีวภาพก็เป็นแนวทางหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจจากผู้ประกอบการ

4.2.4 แนวทางการประยุกต์ใช้ระบบที่ปลูกหญ้าร่วมกับการเติมแบคทีเรียในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม อาจทำโดยการบำบัดเช่นเดียวกับในรูปแบบแปลงทดลองตามที่ผู้วิจัยได้ทำการทดลองให้มีลักษณะต่อเนื่องกันในแนวราบ โดยอาจมีการศึกษาและพัฒนาเพิ่มเติมวิธีการรวบน้ำกลับมาใช้ประโยชน์หรือเพื่อบำบัดซ้ำ อย่างไรก็ตามการควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น แสงแดด ปริมาณฝน และการปรับขนาดอนุภาคดินก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ควรคำนึงถึงในการพัฒนาระบบดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

4.2.5 แนวทางการจัดการด้านสิ่งแวดล้อมภายหลังการบำบัด อาจนำหญ้าซิกแนลเลื้อยไปปลูกรอบบ่อปรับเสถียร เนื่องจากหญ้าซิกแนลเลื้อยมีรากที่แผ่ขยายได้ดีจึงสามารถช่วยในการยึดเกาะของหน้าดิน ลดการพังทลายของหน้าดิน ซึ่งจะทำให้บ่อปรับเสถียรมีความแข็งแรงมากขึ้น และลดโอกาสที่น้ำจากบ่อปรับเสถียรจะล้นออกไปในบริเวณใกล้เคียงในฤดูฝนได้อีกด้วย และในส่วนของดินที่ผ่านการบำบัดน้ำทิ้งซึ่งมีการดูดซับสารมลพิษจากน้ำทิ้งที่รดลงไปนั้นนอกจากวิธีการใช้น้ำเปล่าในการชะล้างดินแล้วยังสามารถปล่อยให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ท้องถิ่นร่วมกับจุลินทรีย์ที่มีการเติมลงไปในดินโดยอาจมีการเพิ่มระยะเวลาในการบำบัดให้เหมาะสมเนื่องจากการย่อยสลายทางชีวภาพต้องใช้ระยะเวลาที่นานกว่าวิธีการบำบัดด้านอื่น ๆ และทำการติดตามตรวจสอบคุณภาพของดินก่อนที่จะนำออกไปสู่สิ่งแวดล้อม

บรรณานุกรม

กรมควบคุมมลพิษ 2539 สืบค้นจาก http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water04. (วันที่สืบค้นข้อมูล : 20 พฤศจิกายน 2556)

ฉายแสง ไผ่แก้ว, ศุภชัย อุดชาชน, พิมพาพร พลเสน และบุญชู ชมพูสอ. 2535. ศึกษาผลผลิตหญ้าอาหารสัตว์จากการปลูกหญ้ารูซี่และหญ้าซิกแนลนอนร่วมกันและเมื่อปลูกเดี่ยว. รายงานผลงานวิจัยประจำปี พ.ศ. 2535: 150.

ฉายแสง ไผ่แก้ว, วีระพล พูนพิพัฒน์, รัชดาวรรณ พูนพิพัฒน์ และเสน่ห์ กุลนะ. 2547. ผลของอัตราปุ๋ย และระยะเวลาการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่มีต่อผลผลิตและส่วนประกอบทางเคมีของหญ้าเนเปียร์แคระในพื้นที่จังหวัดสุโขทัย. รายงานผลงานวิจัยประจำปี พ.ศ. 2547.

ดวงหทัย สิงห์คะ และ วสุ ปฐมอารีย์. 2554. เทคนิค Denaturing Gradient Gel Eiectrophoresis หลักการและการประยุกต์ใช้ทางจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม. KKU Science Journal 39:321-333.

นันท์ธร เภาราช. 2550. การคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียทนต่อตัวทำละลายจากดิน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยะมาศ คงแขม. 2552. การตรึงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนซิลิกาเพื่อใช้ย่อยสลายฟีนอล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พนิดา โต๊ะสู. 2555. การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สายพิณ ไชยนันท์. 2546. *จุลินทรีย์ในดิน*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วิโรจน์ รักเกียรติสกุล.2556.การใช้แบคทีเรียในดินร่วมกับหญ้า *Brachiaria* spp. สำหรับขจัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม,วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อนุกูล เกียรติขวัญบุตร. 2556. การกำจัดสีและการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยราไวท์รอทที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน,

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Afzal, M., Yousaf, S., Reichenauer, T. G., Sessitsch, A., 2012. The inoculation method affetcs colonization and performance of bacterial inoculant strains in the phytoremediation of soil contaminated with diesel oil. *Int. J. Phytorem.* 14, 35–47.

Afzal, M., S. Khan, S. Iqbal, M. Sajjad Mirza, Qaiser M. Khan. 2013. Inoculation method affects colonization and activity of *Burkholderia phytofirmans* PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85:331-336.

Ahmad, L, Ismail, S., Bhatia, S. 2003. Water recycling from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. *Desalination.* 157:87-95.

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.

Alam, Md. Z., Ameem, 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. *Chem Eng J.* 155:191–198.

Annadurai, G., Ling, L. Y., and Lee, J.F., 2008. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance phenol degradation by *Pseudomonas putida. Journal Hazard. Mater.,* 151:171-178.

Anokhina, T.O., Kochetkov, V.V., Zelenkova, N.F., Balakshina, V.V., and Boronin, A. M., 2004. Biodegradation of Phenanthrene by Pseudomonas Bacteria BearingRhizospheric Plasmids in Mmodel Plant-microbeAssociation. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 40:568-572.

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis: Ash in Animal Feed. Association of Official Analytical Chemists. EUA.

AOAC. 2005. Official method of analysis of AOAC international. 18th Association of Official Analytical Chemists.

APHA, AWWA and WEF. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th edition. American Public Health Association. Washington DC.

Association of Official Analytical Chemisists (AOAC), 1995, Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., AOAC International, Arlington, Virginia, USA

Barkay, T. S. Navon-Venezia, E.Z. Ron, E. Rosenberg. 1999. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2697–2702.

Baker, T.W. and Worgan, J.T. 1981. The utilization of palm oil processing effect as substrate of microbial protein by fungus *Aspergillus oryzae. Eur. J. Appl. Micbiol.* 11:234-240.

Bamforth, S.M., and Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 723–736.

Banerjee, A. and A. K. Ghoshal. 2011 .Phenol degradation performance by isolated *Bacillus cereus* immobilized in alginate. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65:1052-1060.

Basha SA, Sarma B.K., 2006. Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea. *Folia Microbiol.* 51: 463-468.

Bhardwaja, P., Sharmab, A., Sagarkara, S., Kapleya, A. 2015. Mapping atrazine and phenol degradation genes in Pseudomonas sp. EGD-AKN5. *Applied Biochemistry Engineering.* 102:125-134

Bodini S.F, A.R. Cicalini, F. Santori. 2010. Rhizosphere dynamics during phytoremediationof olive mill wastewater.*Bioresource Technology.* 102: 4383-4389.

Borja, C.J., Banks. 1994. Anaerobic digestion of palm oil mill effluent using up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Biomass Bioenergy.* 6: 381–389.

Bottini R., Cassan, F., and Picolli P. 2004.Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnology*, 234-239.

Brown, V. M., Jordan D. H. M., and Tiller B A., 1967. The effect of temperature on the acute toxicity of phenol to rainbow trout in hard water. *Water Research.* 1:: 587–597.

Cahyani V.R., K. Matsuya, S. Asakawa, M. Kimura.2003. Succession and phylogenetic composition of bacterial communities responsible for the composting process of rice straw estimated by PCR–DGGE analysis. *Soil Science and Plant Nutrition*,pp. 619–630

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. *Enzymeand Microbial Technology* 38:848–854.

Cecilia, L.F., S.L. Amigot., M. Gaggiotti., L.A. Romero, and J.C. Basilico. 2007. Forage Quality: Techniques for Testing. Fresh produce. 1:121-131.

Chandrakant, K., Aravind, M. Manjunath N. and Yun,D.J. 2005. Phenol degradation by Immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. *Biodegradation.*, 17:47-55.

Chantho, P., Musikavong, C. Suttinun, O. 2013. Pretreatment of phenolic compounds in palm oil mill wastewater by the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2 for enhancement of biogas production, in Proceedings of the 2nd International Conference on Environmental Science & Engineering and Management, Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen, Thailand, March 27-29

Chen, K.C., Y.H. Lin, W.H. Chen and Y.C. Liu. 2002. Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. *Enzyme and Microbial Technology* 31:490–497.

Chen, C.C., Chen, C.Y. , Cheng, C.Y. , Teng, P. and Chung Y. 2011.Decolorization characteristics and mechanism of Victoria Blue R removal by *Acinetobacter calcoaceticus* YC210. *Journal of Hazardous Materials* 196:166–170.

Chouychai, W., Tongkukiatkul, A., Upatham, S., Lee, H., Pokethitiyook, P. and M. Kruatrachue. 2009. Plant - Enhanced Phenanthrene and Pyrene Biodegradation in Acidic Soil. *Journal of Environmental Biology*. 30:139-144.

Chouychai, W., Thongkukiatkul, A., Upatham, S., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., and Lee, H., 2012. Effect of corn plant on survival and phenanthrene degradation capacity of Pseudomonas sp. UG14Lr in two soils. *Int. J. Phytorem.* 14:585–595.

Chung E.J, Jo EJ, Yoon HS, Song GC, Jeon CO, Chung YR. 2011.*Int J Syst Evol Microbiol.* Oct;61(Pt 10):2389-94.

Coniglio, M.S., Busto, V.D., Gonzáles, P.S., Medina, M.I., Milrad, S. and Agostini, E. 2008. Application of *Brassica napus* hairy root cultures for phenol removal from aqueous solutions, *Chemosphere*, 72, 7, pp. 1035–1042.

Contreras, E.M., Albertario, M.E., Bertola, N.C., and Zaritzky, N.E., 2008. Modelling phenol biodegradation by activated sludges evaluated through respirometric techniques. *Journal Hazard. Mater.* 258:366–374.

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* 136:678–707.

Cunningham, S.D., Berti, W.R. and Huang, J.W. 1995. Phytoremediation of Contaminated Soils. *Tibtech.* 15:393–397.

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.

Dams, R.I., Paton, G., and KillhamK. 2007.Bioaugmentation of pentachlorophenol in soil and hydroponic system. *Int Biodeterior Biodegrad.* 60:171–177.

Dastager, S. G., Lee, J.-C., Pandey, A. & Kim, C.-J. 2010.*Nocardioides mesophilus* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60: 2288–2292.

Divyasree, B., Lakshmi, K. V. N. S., Sasikala, C. and Ramana, C. V. 2014. *Thiophaeococcus fuscus* sp. nov., isolated from a lagoon. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 8): 2528-2533

Djurdjevic, L., Mitrovic, M., Pavlovic P., Perisic S.and Macukanovic, J. M.2005. Total phenolics and phenolic acids content in low (*Chrysopogon gryllus*) and mediocre quality (*Festuca vallesiaca*) forage grasses of Deliblato Sands meadow-pasture communities in Serbia. *Sci.,* 50, *(2):* 54–59

Ergul, F.E., Sagin, s., Ongen, G. and Sukan. F.V. 2011. Dephenolization and decolorization of olive mill wastewater through sequential batch and co-culture application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 27:107-114.

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.

Fletcher, J. S. and Ramesh, S. H. 1995. Release of phenols by perennial palnt root and their potential importance in bioremediation. *Chemosphere* 31: 3009-3016.

Gaskin, E.S.and Bentham, H.R. 2010. Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses. *Science of the Total Environment.* 408:3683-3688.

Gerhardt, E.K., Huang, X-D., Glick, R.B. and Greenberg, M.B. 2010. Phytoremediation and Rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant sicence.* 176:20-30.

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.

Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. and Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Europian Journal of Plant Pathology.* 119: 329 - 339.

Gong ,B., Wu, P., Huang, Z., Li, Y., Dang Z., Ruan, B., Kang C., Zhu, N. 2016. Enhanced degradation of phenol by Sphingomonas sp. GY2B with resistance towards suboptimal environment through adsorption on kaolinite. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 148 :388-394

Gopalakrishnan, S., Subbarao, G.V., Nakahara, K., Yoshihashi, T., Ito, O. and Maeda, I . 2007. Nitrification inhibitors from theroot tissues of Brachiaria humidicola, a tropical grass. *Journal Agriculgure Food Chem* 55:1385–1388

Groth, I., Schumann, P., Weiss, N., Martin, K. and Rainey, F. A.1996. *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of *Actinomycetes* with diaminobutyric acid in the cell wall. *Int J Syst Bacteriol* 46, 234-239.

Hartley, C.W.S. 1977. Oil palm selection and breeding In The Oil Palm. *Longman. Inc., New York.* pp. 195-310.

Hunger, K., Ed. 2003. Industrial Dyes. Chemistry, Properties, Applications. Weinheim: Wiley-VCH: 115-120.

Hwang, T.K., Ong, S.M., Scow, C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm mill effluent. *Planter*. 54:749-756.

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.

Ishikawa, T., Subbarao GV, Ito O. and Okada K. 2003. Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. Plant Soil 255:413–419

Johnson, D.L., Maguire, K.L., Anderson, D.R., McGrath, S.P. 2003. Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biol. Biochem.* 36:33–38.

Juni, E. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. Ann. Rev. Microbiol. 1978. 32 : 349–371.

Kar, S., Swaminathan, T. and Baradarajan, A. 1997. Biodegradation of phenol and cresol isomer mixtures by *Arthrobacter*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13:659-663.

Katia, R., A. d. Silva, J. F. Salles , L. Seldin, J. D. van Elsas. 2003. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *Microbiological Methods*. 54: 213– 231.

Katiyar, V. and Goel, R., 2004. Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. *Plant Growth Regul.* 42:239–244.

Khan, S., M. and Afzal , S. Iqbal, Q.M. Khan. 2013. Plant–bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils.*chemosphere* 90:1317-1332.

Khongkhaem, P., Intasiri, A. and Luepromchai, E. 2011.Silica-immobilized *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 degrade high concentrations of Phenol. *Applied Microbiology* 52:448–455.

Kietkwanboot, A., Tran H.T., and Suttinun, O. 2015. Simultaneous dephenolization and decolorization of treated palm oil mill effluent by oil palm fiber-immobilized *Trametes hirsuta* strain AK 04 .*Microbiology and Biotechnology* ., 27: pp.107-114.

Kim, S. J., Kweon, O. Jones, R. Edmondson, R. and Cerniglia, C. 2008. Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biodegradation* 19:859–881.

Kirk, J.L., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T. 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution* 133, 455-465.

Korda, A., Santas, P. and Tenente, A. 1997. Petroleum Hydrocarbon Bioremediation : Sampling and Analytical Techniques in Situ Treatment and Commercial Microorganisms Currently Used. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 677–686. *Der Pharma Chemica*, 3:190-196.

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.

Kuiper, I., Bloemberg, G .V. and Lugtenberg, B.J. J ., 2001. Selection of a plant - bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbondegrading bacteria. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 14:1197–1205.

Kumar, P., Ranganath, S. Sengupta, K. and Weimin, H. 2006. Cooperative multitarget tracking with efficient split and merge handling.*Circuits and Systems for Video Technology, IEEE Transactions on* 12:1477–1490.

Leigh, M.B., Fletcher, J.S., Fu, X., and Schmitz, F.J. 2002. Root turnover: an important substrate of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants. *Environ Science Technology* 36:1579–1583.

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.

Li, J.H., Gao, Y., Wu, S.C., Cheung, K.C., Wang, X.R. and Wong, M.H., 2008. Physiological and biochemical responses of rice *(Oryza sativa)* to phenanthrene and pyrene. *International Journal Phytorem.* 10:106–118.

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.

Ma, A.N., Cheah, S.A. and Chow, M.C. 1993. Current status of palm oil processing waste management. *Bioresource Technology.* 52:133-144.

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.

Maqbool, F., Wang, Z. Xu, Y. Zhao, J. Gao, D. Zhao, Y. Bhatti, and Xing, B. 2012. Rhizodegradation of petroleum hydrocarbons by Sesbania cannabina in bioaugmented soil with free and immobilized consortium. *Journal of Hazardous Materials* 237– 238, 262– 269.

Marques, A.P.G.C., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A.O.S.S. and Castro, P.M.L. 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biology and Biochemistry.* 42:1229–1235.

Mekki, A., Dhouib, A. and Sayadi, S. 2007. Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters. *Journal of Environmental Management* 84:134–140.

Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C. 2005. *Environmental Pollution.* 138:86-91.

Meyer, J.S., Marcus, M.D. and Bergman, H.L. 1984. Inhibitory interactions of aromatic organics during microbial degradation. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 3(4): 583–587.

Mitsui, R., Omori, M., Kitazawa, H. and Tanaka, M. 2005. Formaldehyde-Limited Cultivation of a Newly Isolated Methylotrophic Bacterium, *Methylobacterium* sp. MF1: Enzymatic Analysis Related to C_1 Metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99: 18–22.

Mohlenhoff, P., Muller, L., Gorbushina, A.A. and Petersen, K. 2001. Molecular approach to the characterisation of fungal communities: method for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiology Letters.* 195:169-173.

Mosse, K.P.M., Patti, A.F., Christen, E.W., and Cavagnaro, R. 2011. Review: winery wastewater quality and treatment options in Australia. *Australian Society of Viticulture and On ecology.* 17:111-122.

Movahedyan, H., H. Khorsandi, R. Salehi and M. Nikaeen, 2009. Detection of phenol degrading bacteria and *Pseudomonas putida* in activated sludge by polymerase chain. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.*, 6(2): 115-120.

Muyzer, G., De Waal, E.C., Uiterlinden, A.G. 1993. Pro®ling of complex microbial populations by denaturing gradientgel electro-phoresis analysis of polymerase chain reaction-amplied genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:695-700.

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

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.

Pacwa-Plociniczak, M., Pzaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z. and Cameotra, S.S. 2011.Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.*12, 633–654.

Park, C., Lee, M. Lee, B. Kim, S. Chase, H. Lee, J. and Kim, S. 2007. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii. Biochem. Eng. Journal* 36:59-65.

Phonepaseuth, P. 2014. Removal of phenolic compounds and color from palm mill effluent by using grasses and their rhizosphere bacteria. Master's Thesis Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Proestos, C. and M. Komaitis. 2007. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT* 41 : 652–659.

Quideau, S., Deffieux, D. Douat-Casassus, C._ and Pouysegu. L. 2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities and Synthesis. *Chemical International Education* 50 : 586 – 621.

Said, M., Ahmad, A. and Mohammad, A. 2013. Removal of phenol during ultrafiltration of Palm oil mill effluent (POME): Effect of pH, ionic strength, pressure and temperature Rajkumar, M., Ae, N. and Freitas, H. (2009). Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*. 77: 153-160.

Sayadi, S., Allouch N., Jaoua M. and Aloui F. 2000. Detrimental effects ofhigh molecular-mass polyphenols on olive mill wastewaters biotreatments, *Process Biochem*. 35: 725–735.

Shen, C.C., Wu, J.Y. Chen, C.Y. Chen and T.L. 1999. Lipase Production by *Acinetobacter radioresistens* in the presence of a nonwoven fabric. *Biotechnology. Prog.* 15 : 919–922.

Sheng, X.F. and Gong, J.X., 2006. Increased degradation of phenanthrene in soil by *Pseudomonas* sp. GF3 in the presence of wheat. *Soil Biol. Biochem.* 38: 2587–2592.

Shi, S., Qu, Y., Zhou, H., Mac Q., Ma, F.2015. Characterization of a novel cometabolic degradation carbazole pathway by a phenol-cultivated Arthrobacter sp. W1. *Bioresource Technology.* 193: 281-287

Singer, A.C., Smith, D., Jury, W.A., Hathuc, K., Crowley, D.E., 2003. Impact of the plant rhizosphere and augmentation on remediation of polychlorinated biphenyl contaminated soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:1998–2004.

Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W.E. and Forney, L. 1998. Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology.* 64: 1220-1225.

Subbarao, G.V., Wang, H.Y., Ito, O., Nakahara, K. and Berry W.L. 2007. NH_4^+ triggers the synthesis and release of BNI (biological nitrification inhibition) compounds in *B. humidicola* roots. *Plant Soil.* 290: 245–257.

Subbarao, G., et al. 2008. Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as inhibitors of nitrification. *Plant and Soil.* 313 (1): 89-99.

Sun, T. R., Cang, L., Wang, Q. Y., Zhou, D. M., Cheng, J. M. and Xu, H., 2010. Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil. *J. Hazard. Mater.* 176, 919–925.

Sungho, Y., kim S. H., Yoo, Y. Je. and Yoo, I.S. 1997. Microbial adaptation in the degradation of phenol by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234. *Korean J. Chem. Eng.*, 14:37-40.

Sunil, S. A., Chen M.Y., Lee D.J. and Ren, N.Q. 2007. Degradation of phenol by Aerobic Granules and Isolated Yeast *Candida tropicalis. Biotechnol. Bioeng.*, 96:844-852.

Teng, Y., Shen, Y., Luo, Y., Sun, X., Sun, M., Fu, D., Li, Z. and Christie, P. 2011. Influence of Rhizobium meliloti on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *alfalfa* in an aged contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 186, 1271–1276.

Timmusk, S., Grantcharova, N. and Wagner, E.G.H. 2005. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Appl. Environ. Microbiol. 71,* 7292-7300.

Tosu, P., Luepromchai, E. and Suttinun, O. 2015 Activation and immobilization of phenol-degrading bacteria on oil palm residues for enhancing phenols degradation in treated palm oil mill effluent. *Environmental Engineering Research*. 20(2): pp.141-148.

Unell, M., Nordin, K., Jernberg, C., John Stenstrom. & Janet, K Jansson. 2007. Degradation of mixtures of phenolic compounds by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Biodegradation.*, 19:495-505.

Van Hecken, M.M., Treonis, A.M. and Kaufman, J.R., 2005. How does the fungal endophyte Neotyphodium coenophialum affect tall fescue (*Festuca arundinacea*) rhizodeposition and soil microorganisms. *Plant Soil* 275: 101–109.

Van Schie, P. M. and Young, R . 2000. Biodegradation of phenol : mechanisms and applications. *Bioremediation Journal* 4: 1-18.

Varma, R.J. and Gaikwad, B.G. 2009. Biodegradation and phenol tolerance by recycled cells of *Candida tropicalis* NCIM 3556. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 63(4):539-542.

Vinatoru, M. et al., (1997). The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4(2): 135-139.

Wang, R., LI, D. and Bourne, S. 1998. Can 2000 years of herbal medicine history help us solve problemsin the year 2000 Biotechnology in the feed industry: Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium,Kentucky, USA, 273-291.

Wartiainen, I., Eriksson, T. Zheng, T. and Rasmussen, W. 2007. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy-nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphereand bulk soil. *Applied soil ecology* 39 : 65-75.

Weijian, C., Li, J. and Zhang, Z. 2007. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. *Journal Hazard. Mater.*, 148:38-42.

Weiss, W.P., Eastridge, M.L. and Underwood, J .F. 1999. Forages for Dairy Cattle. Ohio State University Extension.

Wrenn, B.A. and Venosa, A.D., 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probablenumber procedure. *Canadian Journal of Microbiology* 42 : 252–258.

Wu, Y., Lu, L. Wang, Lin, B. Zhu, L. Cai, X. Yan, and Jia, Z. 2012. Impact of different polymerase chain reaction (PCR) strategies on denaturing gradient gel electrophoresis-

based analysis of bacterial communities in soils/sediments from the Northern Jiangsu Oil Field, China. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75, 1431–1439.

Xu, Y., Wang, G. Jin, J. Liu, J. Zhang, Q. and Liu, X. 2009. Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type soybean genotype, and their growth stage. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 919–925

Yan, J., Wen, J. Lan, L. and Hu, Z. 2007. Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by the yeast *Candida tropicalis. Biodegradation.*, 18:719-729.

Yan, J., J. Wen., J. Bai., X. Jia. & Z. Hu. 2007. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis. J. Hazard. Mater.,* 147:672-676.

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.

Zhang, J., Jiang, R.B., Zhang, X.X., Hang, B.J., HE, J. and Li, S.P.. 2010. *Flavobacterium haoranii* sp. nov., a cypermethrin-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 2882-2886.

Zuniga, C., Morales, M. and Revah, S. 2013. Polyhydroxyalkanoates accumulation by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 during methane degradation using citrate or propionate as cosubstrates. *Bioresource Technology* 129 : 686–689.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อในรูปแบบของเหลว carbon free mineral medium (CFMM) ซึ่งประกอบรวมด้วยสารเคมีดังนี้ ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

- แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) 3.0 กรัม
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 2.2 กรัม
- โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.8 กรัม

ผสมสารข้างต้นกับน้ำกลั่นให้ละลายจนหมดจากนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อต้มน้ำแรงดันสูง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นสารเติมละลาย 3 ชนิด ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ต่อ CFMM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ดัง (รายละเอียดด้านล่าง)

- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร
- เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 0.05 กรัมต่อมิลลิลิตร
- แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.05 กรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคและสี

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคและสี

ข.1 กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสาร Gallic acid monohydrate ปริมาณ 0.55 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร โดยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามสัดส่วน ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข.1

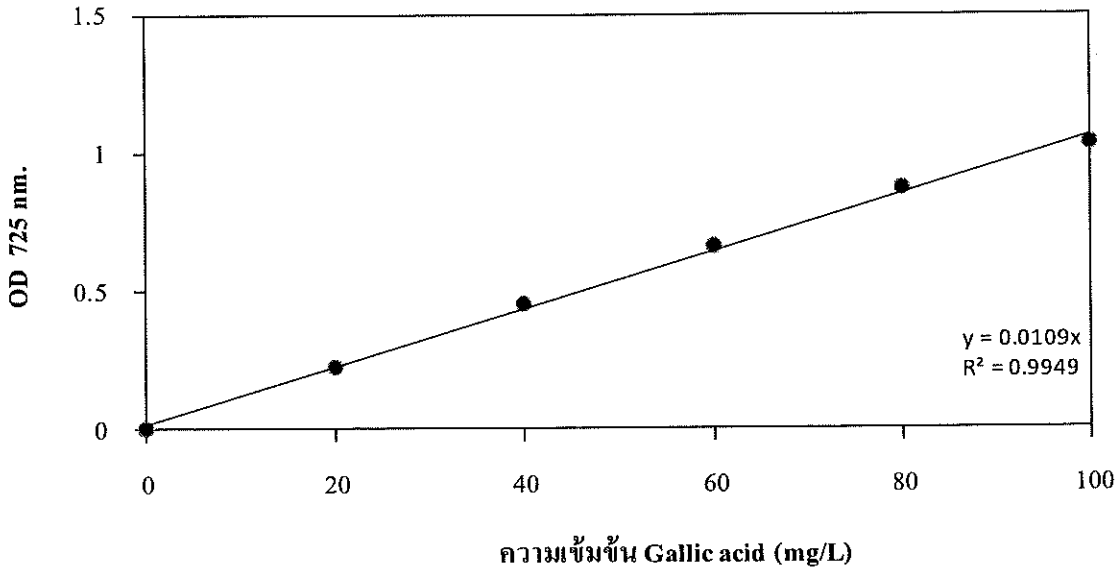
ตารางผนวกที่ ข.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid ความเข้มข้น 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรสารละลามาตรฐาน (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
20	0.2	4.8
40	0.4	4.6
60	0.6	4.4
80	0.8	4.2
100	1.0	4.0

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid ความเข้มข้น 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตรความเข้มข้นละ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติม Folin-Coicalteau phenol reagents ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย

Sodium carbonate ที่มีความเข้มข้น 200 g/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ 725 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวกที่ ข.1)



รูปภาคผนวกที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid

ข.2 กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สี

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

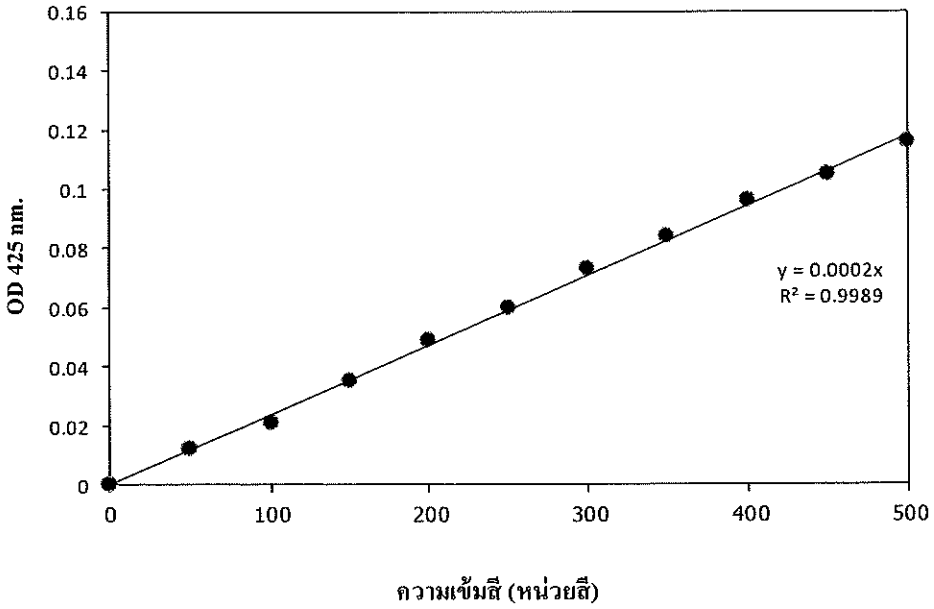
เตรียมสารละลายมาตรฐานของแพลทตินัมโคบอลท์ ที่ความเข้มข้น 500 หน่วยสี โดยชั่งสาร potassium chloroplatinate ปริมาณ 0.1246 กรัม และ cobolt (II) chloride ปริมาณ 0.1 กรัม นำมาละลายในกรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 – 500 หน่วยสี ตามสัดส่วน ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข.2

ตารางผนวกที่ ข.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของแพลทตินัมโคบอลท์ ที่ความเข้มข้น 50-500 หน่วยสี

ความเข้มข้น (หน่วยสี)	ปริมาตรสารละลามาตรฐาน (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
50	0.5	4.5
100	1.0	4.0
150	1.5	3.5
200	2.0	3.0
250	2.5	2.5
300	3.0	2.0
350	3.5	1.5
400	4.0	1.0
450	4.5	0.5
500	5.0	0

การสร้างกราฟมาตรฐาน

นำสารละลายมาตรฐานของแพลทตินัมโคบอลท์ ที่ความเข้มข้น 50-500 หน่วยสี มาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 425 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวกที่ ข.2)



รูปภาคผนวกที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของแพลทตินัมโคบอลท์

ภาคผนวก ค
ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสี

ภาคผนวก ค

ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคและสี

ค.1 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิค

จากการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิคจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายในโรงเรือนเพาะชำพบว่าชุดการทดลองที่ให้ประสิทธิภาพการบำบัดสูงที่สุด คือ ชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียบริเวณรากตั้งแต่เริ่มปลูก โดยมีประสิทธิภาพการบำบัด ณ ระยะเวลาต่าง ๆ ดังตารางผนวกที่ ค.1

ตารางผนวกที่ ค.1 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิค

ระยะเวลา (วัน)	ประสิทธิภาพการบำบัด (%)			เฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
6	58.64135	56.84315	58.34165	57.94205	0.963402
12	57.74225	60.73926	60.13986	59.54046	1.585865
18	61.63836	61.03896	63.73626	62.13786	1.416329
24	66.73326	65.53446	64.33566	65.53446	1.198801
30	68.23176	67.03296	67.93206	67.73226	0.623876
36	70.02997	66.13386	70.62937	68.93107	2.440918
42	70.62937	70.02997	69.13087	69.93007	0.754229
48	78.79656	79.36962	76.79083	78.319	1.10562
54	76.50429	75.35816	74.21203	75.35816	0.935813
60	73.35243	74.49856	72.77937	73.54345	0.714739

ค.2 ประสิทธิภาพการบำบัดสี

จากการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสีจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายในโรงเรือนเพาะชำพบว่าชุดการทดลองที่ให้ประสิทธิภาพการบำบัดสูงที่สุดคือ ชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินที่ปลูกหญ้าและเติมแบคทีเรียบริเวณรากตั้งแต่เริ่มปลูก โดยมีประสิทธิภาพการบำบัด ณ ระยะเวลาต่าง ๆ ดังตารางผนวกที่ ค.2

ตารางที่ ค.2 ประสิทธิภาพการบำบัดสี

ระยะเวลา (วัน)	ประสิทธิภาพการบำบัด (%)			เฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
6	38.19742	36.90987	35.62231	36.90987	1.287554
12	40.77253	42.70386	45.27897	42.91845	2.26087
18	42.06008	47.85407	46.56652	45.49356	3.042371
24	48.49785	51.71674	53.00429	51.07296	2.32117
30	56.22317	53.00429	54.29184	54.50644	1.620136
36	62.66094	63.30472	58.1545	61.37339	2.806158
42	63.9485	62.01717	58.79828	61.58798	2.601793
48	75.16335	70.58818	71.89537	72.54897	1.924135
54	38.56197	41.82995	43.79074	41.39422	2.156757
60	37.25478	41.17636	39.21557	39.21557	1.600977

ภาคผนวก ง
การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในดิน

ภาคผนวก ง

การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในดิน

ง.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่น

ตัดชิ้นเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอเด่นใส่ลงในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร แช่ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมาในน้ำให้มากที่สุด เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์เหมือนกับที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสำหรับทำ DGGE แต่ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่ใช้ไม่ต้องเชื่อมต่อด้วย GC-clamp บริเวณ หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะ ดังนี้

1. Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 ซ้ำ จำนวน 30 รอบ		
6. Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 7 นาที

ทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ จากนั้นโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR

ง.2 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR

ตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยตรวจสอบดีเอ็นเอ บนอะกาโรสเจล 2% และตัดเจลบริเวณที่พบชิ้นผลิตภัณฑ์ตามขนาดที่คาดหวัง เติมบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที ที่ เทส่วนใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000

รอบ/นาที นาน 30 วินาที ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที และเก็บสารละลายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

ง.3 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

- ไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3 ไลเกทเข้า pGEM-T Easy vector ด้วยเอนไซม์ไลเกส (ligase) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

2X Ligation buffer	5 ไมโครลิตร
pGEM-T Easy vector	1 ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.2.4.1	3 ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase	1 ไมโครลิตร

ทำไลเกทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ถึง 18 ชั่วโมง

- ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพิเทนต์เซลล์ *E.coli* JM109

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยวิธี Calcium chloride โดยเลี้ยง *E.coli* สายพันธุ์ JM109 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ψb บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ψb ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จนกระทั่งมีค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 ถึง 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ψb ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ถ่ายเชื้อลงหลอดเซนติฟิวจ์ปลอดเชื้อ แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) นำตะกอนเซลล์มาเติมสารละลาย TfbI ที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำตะกอนเซลล์มาเติมสารละลาย TfbII ที่เย็นปริมาตร 4 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บคอมพิเทนต์เซลล์ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพิเทนต์เซลล์ *E.coli* JM109 ด้วยวิธี heat shock โดยนำคอมพิเทนต์เซลล์มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที แช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที เติมอาหารเหลว SOC ลงในหลอดปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

ง.4 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

ใช้วิธี Blue/White selection โดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E.coli* JM109 ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร X-gal ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและ IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ หลังจากเกลี่ยเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง

ง.5 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด Presto™ Mini Plasmid Kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่เครื่องเขย่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 5 ทำซ้ำ 2 รอบ เติมบัฟเฟอร์ PD1 ที่เติม RNase แล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายเติมบัฟเฟอร์ PD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 15 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที ดูดส่วนน้ำใสใส่ PD column ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทสารละลายใสทิ้ง พลาสมิดจะอยู่บนแผ่นกรองของคอลัมน์ เติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที ทิ้งสารละลายใส เติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที ทิ้งส่วนสารละลายใส ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บสารละลายใสที่ -20 องศาเซลเซียส

ง.6 ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy	1 ไมโครลิตร
10X buffer	1 ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Eco*RI	1 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	7 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลซียส นาน 2-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 2% เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นายพลิษฐ์ จารุจารีต

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5510920018

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

พลิษฐ์ จารุจารีต, เอกวัล ลือพร้อมชัย, กรกช นาคคนอง และ อรมาศ สุทธินุ่น. 2557 การกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิคออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยการเติมแบคทีเรียบริเวณรากพืช. การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 13 วันที่ 26–28 มีนาคม ณ โรงแรมเดอะ ทวิน ทาวเวอร์ รองเมือง กรุงเทพมหานคร.