



การกำจัดสีของน้ำทิ้งสุดท้ายโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการทางชีวภาพและวิธีการ
ทางกายภาพ

**Decolorization of Palm Oil Mill Final Effluent by Biological and Physical
Treatment**

ชนิดา ระกำทอง

Chanida Rakamthong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University**

2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การกำจัดสีของน้ำทิ้งสุดท้ายโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการทางชีวภาพ และวิธีการทางกายภาพ
ผู้เขียน	นางสาวชนิดา ระกำทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ)ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกุล)
กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ)
กรรมการ (ดร.สมพงษ์ โอทอง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวชนิดา ระกำทอง)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวชนิดา ระกำทอง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การกำจัดสีของน้ำทิ้ง สุกสุดท้าย โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วย วิธีการทางชีวภาพ และวิธีการทางกายภาพ
ผู้เขียน	นางสาวชนิดา ระกำทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2555

บทคัดย่อ

น้ำทิ้งจากบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ไม่สามารถปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ เนื่องจาก มีสีน้ำตาลคล้ำ และมีสารประกอบฟีนอล ดังนั้นจึงศึกษาหาวิธีการกำจัดสี และการบำบัดขั้นต่อไป จากผลการวิเคราะห์ลักษณะน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่า มีพีเอช 9.5 ปริมาณสารอินทรีย์ (ซีโอดี) 1,586 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งทั้งหมด 3,840 มิลลิกรัมต่อลิตร สารประกอบฟีนอล 43.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ (2,417 หน่วยสี)

จากการศึกษาความเป็นไปได้ ในการใช้ เชื้อรากำจัดสี ในน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของ โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยเลี้ยงเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 บนอาหาร แข็งที่เตรียมจากการผสมน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายกับน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ (เพื่อเป็นแหล่งอาหาร) ในอัตราส่วน 1:0 1:1 2:1 และ 3:1 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วัน พบว่า *P. chrysosporium* ATCC 24725 ทำให้อาหารแข็งที่มี น้ำทิ้งผสมเกิดการจางสี แต่ไม่พบการเจริญ และการจางสีบนอาหารแข็งที่มีน้ำทิ้งบ่อสุดท้าย เพียงอย่างเดียว ส่วนเชื้อราที่แยกได้จากน้ำทิ้ง ดีแคนเตอร์ พบว่ามีการเจริญแต่ไม่พบการจางสีบนอาหารแข็งที่มีน้ำทิ้ง

เมื่อทดสอบ การ กำจัดสี และสารประกอบฟีนอล ในอาหารเหลว โดยการเลี้ยง *P. chrysosporium* ATCC 24725 ในน้ำทิ้งสุดท้ายที่มีการผสมน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ในอัตราส่วน 1:0 1:1 2:1 และ 3:1 ภายใต้สภาวะให้อากาศบนเครื่องเขย่า (130 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน พบว่า ที่อัตราส่วน 1:1 เชื้อสามารถกำจัดสีได้มากที่สุดเท่ากับ 50.2 เปอร์เซ็นต์ และกำจัด สารประกอบฟีนอลได้ 52.4 เปอร์เซ็นต์ หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 9 วัน นอกจากนี้ ยังศึกษาผล ของการให้อากาศและไม่ให้อากาศต่อการกำจัดสี พบว่า การกำจัดสี (64.6 เปอร์เซ็นต์) พบเฉพาะ ในสภาวะที่มีการให้อากาศหลังการทดลอง 3 วัน และเชื้อสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ 51.2 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการกำจัดสปีด้วยวิธีการทางกายภาพ เมื่อศึกษาผลของ การเติม เถ้าปาล์ม ปริมาณต่างๆ (1, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์) ในน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และเขย่า (125 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าปริมาณเถ้าปาล์มที่เหมาะสม คือ 20 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 8 ชั่วโมง สามารถลดค่าสีได้ 57.9 เปอร์เซ็นต์ และกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ 55.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยเถ้าปาล์มใน ปริมาณที่เหมาะสมมาบำบัดต่อโดยใช้กากชานอ้อย เป็นตัวดูดซับสี พบว่าสามารถลดค่าสีได้ 25.3 เปอร์เซ็นต์ และกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ 21.8 เปอร์เซ็นต์ หลังการ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลา 10 ชั่วโมง

Thesis Title	Decolorization of Palm Oil Mill Final Effluent by Biological and Physical Treatment
Author	Ms. Chanida Rakamthong
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2012

ABSTRACT

The final pond effluent of palm oil mill could not be discharged to natural waterway due to its dark brown color and the presence of phenolic compounds. Therefore, investigation to decolorize and further treatment is needed. The final effluent had pH 9.5 and contained 1,586 mg/L COD, 3,840 mg/L total solid, 43.01 mg/L total phenol and had dark brown color (2,417 color unit).

Feasibility study of using fungi for decolorization of the final effluent from palm oil mill was conducted. *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 were cultivated on agar plate containing the mixture of the final effluent and decanter effluent (as a nutrient source) in the ratio of 1:0, 1:1, 2:1 and 3:1 and incubated at room temperature (30 ± 2 °C) for 30 days. Decolorization occurred only on agar plates with the mixed effluent in the presence of *P. chrysosporium* ATCC 24725. Neither growth nor decolorization occurred on agar plate containing only the final effluent.

In liquid culture, *P. chrysosporium* ATCC 24725 was cultivated in the final effluent supplemented with the decanter effluent in the ratio of 1:0, 1:1, 2:1 and 3:1 under aerobic condition on a shaker (130 rpm) at room temperature for 15 days. The mixture ratio of 1:1 gave the maximum decolorization of 50.2% and phenol removal of 52.4% after 9 days cultivation. Studies on the effect of aeration and no aeration condition revealed that the decolorization (64.6%) occurred only under aeration condition after 3 days cultivation with phenol removal of 51.2%.

For decolorization by physical method, the effect of palm ash concentration was tested on a shaker (125 rpm) for 48 h at room temperature. The optimum values were 20% (w/v) palm ash and 8 h reaction time. The color removal efficiency was 57.9% with phenol removal of

(8)

55.5%. Using sugarcane bagasse as color adsorbent, the decolorization was 25.3% and phenol removal of 21.8% after 10 h incubation time at room temperature.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จะเสร็จสมบูรณ์ ไม่ได้หากไม่ได้รับ ความช่วยเหลือของผู้มี พระคุณหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร .พูนสุข ประเสริฐสรทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาแนวทางในการทำวิจัยและการทำ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ นอกจากนี้ยังคอยเป็นกำลังใจในการศึกษาและการใช้ชีวิต แนะนำแนวทางใน การดำเนินชีวิต และคอยให้สติเสมือนเป็นคุณแม่ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร .อรัญ หันพงศ์กิตติกุล ประธานคณะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร .สมพงษ์ โอทอง กรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะ อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความรู้ทั้งในห้องเรียนและนอกห้องเรียน ให้ข้อคิดและความห่วงใยในการทำวิจัยเสมอมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของคณะอุตสาหกรรมเกษตร ทุกคนที่ช่วยเหลือในการทำวิจัยและในการดำเนินการต่าง ๆ

ขอขอบคุณโครงการทักษะนักอุตสาหกรรมเกษตร จากศูนย์พันธูวิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช .) รวมทั้งบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์สำหรับทุนอุดหนุนการค้นคว้าวิจัย ขอขอบคุณ คณะอุตสาหกรรมเกษตรสำหรับสถานที่ทำการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ คุณพ่อ น้องสาว ครอบครัว และผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจสำคัญในการศึกษาโดยตลอด และยังคงคอยให้คำแนะนำคำปรึกษาความห่วงใย ทำให้ข้าพเจ้ามีวันนี้ได้ ขอขอบคุณเพื่อนๆของข้าพเจ้า สำหรับกำลังใจ ขอขอบคุณ ดร.พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์ และพี่ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรมสำหรับความช่วยเหลือใน การทำวิจัย และช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง และทุกๆท่านที่มีได้กล่าวได้ทั้ง หมดที่มีส่วนช่วยให้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ชนิดา ระกำทอง

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จะเสร็จสมบูรณ์ ไม่ได้หากไม่ได้รับ ความช่วยเหลือของผู้มี พระคุณหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร .พูนสุข ประเสริฐสรทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาแนวทางในการทำวิจัยและการทำ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ นอกจากนี้ยังคอยเป็นกำลังใจในการศึกษาและการใช้ชีวิต แนะนำแนวทางใน การดำเนินชีวิต และคอยให้สติเสมือนเป็นคุณแม่ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร .อรัญ หันพงศ์กิตติคุณ ประธานคณะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร .สมพงษ์ โอทอง กรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะ อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความรู้ทั้งในห้องเรียนและนอกห้องเรียน ให้ข้อคิดและความห่วงใยในการทำวิจัยเสมอมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของคณะอุตสาหกรรมเกษตร ทุกคนที่ช่วยเหลือในการทำวิจัยและในการดำเนินการต่าง ๆ

ขอขอบคุณโครงการทักษะนักอุตสาหกรรมเกษตร จากศูนย์พันธูวิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช .) รวมทั้งบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์สำหรับทุนอุดหนุนการค้นคว้าวิจัย ขอขอบคุณ คณะอุตสาหกรรมเกษตรสำหรับสถานที่ทำการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ คุณพ่อ น้องสาว ครอบครัว และผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจสำคัญในการศึกษาโดยตลอด และยังคงคอยให้คำแนะนำคำปรึกษาความห่วงใย ทำให้ข้าพเจ้ามีวันนี้ได้ ขอขอบคุณเพื่อนๆของข้าพเจ้า สำหรับกำลังใจ ขอขอบคุณ ดร.พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์ และพี่ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรมสำหรับความช่วยเหลือใน การทำวิจัย และช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง และทุกๆท่านที่มีได้กล่าวได้ทั้ง หมดที่มีส่วนช่วยให้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ชนิดา ระกำทอง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
LIST OF TABLES	(12)
LIST OF FIGURES	(14)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
แหล่งที่มาและลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	2
การเกิดสีน้ำตาลในน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	6
การกำจัดสีด้วยวิธีการทางชีวภาพ	7
การกำจัดสีด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ-ทางเคมี	15
วัตถุประสงค์	20
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	21
วัสดุและอุปกรณ์	21
วิธีการวิเคราะห์	22
วิธีการทดลอง	25
1. ศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	25
2. ผลของการใช้น้ำทิ้งดีแคนเตอร์เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญและการกำจัดสีโดยเชื้อรา <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725	26
2.1 การทดสอบบนอาหารแข็ง	26
2.2 การทดสอบในอาหารเหลว	26

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
2	วิธีการทดลอง (ต่อ)	
	3. ผลของการให้อากาศต่อการกำจัดสีของน้ำทิ้งบ่อสุดท้าย	26
	4. การกำจัดสีของน้ำทิ้งสุดท้ายด้วยวิธีการทางกายภาพ	27
	4.1 ผลของปริมาณเถ้าปาล์ม	27
	4.2 ผลของการกำจัดสีในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยเถ้าปาล์มร่วมกับกาก ชานอ้อย	27
3	ผลการทดลองและวิจารณ์	28
	1. องค์ประกอบของน้ำทิ้งสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมัน ปาล์ม	28
	2. ผลของการใช้น้ำทิ้งดีแคนเตอร์เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญและการกำจัด สีโดยเชื้อรา <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725	29
	2.1 การทดสอบบนอาหารแข็ง	29
	2.2 การทดสอบในอาหารเหลว	33
	3. ผลของการให้อากาศต่อการกำจัดสีของน้ำทิ้งบ่อสุดท้าย	39
	4. การกำจัดสีของน้ำทิ้งสุดท้ายด้วยวิธีการทางกายภาพ	41
	4.1 ผลของปริมาณเถ้าปาล์ม	41
	4.2 ผลของการกำจัดสีในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยเถ้าปาล์มร่วมกับกาก ชานอ้อย	45
4	บทสรุปและข้อเสนอแนะ	49
	เอกสารอ้างอิง	52
	ภาคผนวก	57
	ประวัติผู้เขียน	63

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Characteristics of effluent from various steps during palm oil extraction and mixed effluent of a palm oil mill	5
2. Composition of the mineral in sterilizer condensate and mixed effluent of a palm oil mill	5
3. Ligninolytic enzymes and reaction	10
4. Characteristics and chemical composition of the final pond effluent and decanter effluent of a palm oil mill	29
5. Effect of mixing ratio of final effluent : decanter effluent on mycelial growth during cultivation of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 on agar plate at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 days	31
6. Effect of ratio of final effluent : decanter effluent on decolorization during cultivation of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 on agar plate at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 days	31
7. Profile of dry cell weight of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 during cultivation in the final effluent : decanter effluent of 1:0, 1:1, 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 days	34
8. Profile of color removal of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 during cultivation in the final effluent : decanter effluent of 1:0, 1:1, 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 days	35
9. Profile of phenol removal of <i>P. chrysosporium</i> ATCC 24725 during cultivation in the final effluent : decanter effluent of 1:0, 1:1, 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 days	37
10. Profile of COD removal of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 during cultivation in the final effluent : decanter effluent of 1:0, 1:1, 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 days	38

LIST OF TABLES (CONTINUED)

Table	Page
11. Comparison on color, COD and phenol removal efficiency during cultivation <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 in the final effluent : decanter effluent of 1:0, 1:1, 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 days	39
12. Comparison on color, COD and phenol removal efficiency in the final effluent from palm oil mill under aeration condition and no aeration condition	41
13. Effect of palm ash concentration on color, phenol and COD removal of final effluent of palm oil mill after 8 h incubation time	42
14. Effect of sugarcane bagasse on color, phenol and COD removal of final effluent of palm oil mill after 10 h incubation time	47
15. Summary of palm oil mill final effluent treated by biological and physical methods	50
Table-Appendix	
1. Preparation of standard color solution at the concentration range of 0 – 500 color unit	57

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Palm oil milling process	4
2. Laccase-catalyzed redox cycles for substrates oxidation in the absence (a) or in the presence (b) of chemical mediators	11
3. Catalytic mechanism of lignin peroxidase	11
4. Step movement of molecular adsorption by activated carbon	17
5. Adsorption process	18
6. Effect of final effluent : decanter effluent ratio at 1:0 (a), 1:1 (b), 2:1 (c) and 3:1 (d) on growth and decolorization during cultivation of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 on agar plate at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 days	32
7. Time course of pH changes during cultivation of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 in final effluent : decanter effluent of 1:0 (a), 1:1 (b), 2:1 (c) and 3:1 (d) on a shaker (130 rpm)	33
8. Time course of decolorization during cultivation <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 in the final effluent: decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$.	35
9. Time course of phenol removal during cultivation of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 in the final effluent: decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$	37
10. Time course of COD removal during cultivation of <i>P. chrysosporium</i> ATCC 24725 in the final effluent: decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$	38
11. Effect of aeration on color removal (a), phenol removal (b) and COD removal (c) of the final effluent of palm oil mill	40

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure		Page
12.	Effect of palm ash concentration and incubation time on decolorization of final effluent from palm oil mill	42
13.	Comparison on color of final effluent before treating with 0, 1, 5, 10, 15 and 20 % (w/v) palm ash	43
14.	Effect of palm ash concentration and incubation time on phenol removal from final effluent of palm oil mill	43
15.	Effect of palm ash concentration and incubation time on COD removal from final effluent of palm oil mill	44
16.	Effect of sugarcane bagasse and incubation time on decolorization (a), phenol removal (b) and COD removal (c) from final effluent of palm oil mill	46
Figure-Appendix		
1.	Standard curve of standard color solution by platinum cobalt standard (OD ₄₇₅) method	59
2.	Standard curve of standard phenol solution (OD ₇₀₀)	60

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันทั่วโลกตื่นตัวมากขึ้นเกี่ยวกับปัญหาด้านพลังงานและสิ่งแวดล้อม ในประเทศไทยปาล์มน้ำมันถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมาก เพราะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ ทั้งทางด้านการบริโภค อุปโภค และด้านพลังงาน และยังมีความสำคัญทาง เศรษฐกิจเพิ่มขึ้นเมื่อมีการสนับสนุนการผลิตไบโอดีเซลจากปาล์มน้ำมัน ในปี พ.ศ. 2546 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์ม น้ำมันทั้งหมดประมาณ 2,100,000 ไร่ (ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และคณะ, 2548) มีโรงงานสกัดน้ำมัน ปาล์ม 66 โรง และมีแนวโน้มการผลิตน้ำมันปาล์มสูงขึ้นเรื่อยๆ วัสดุเศษเหลือก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจากกระบวนการผลิตทำให้มีวัสดุเศษเหลือที่เป็นของแข็ง ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า เส้นใยปาล์ม กะลาผลปาล์ม กากเนื้อผลปาล์ม และส่วนที่เป็นของเหลว ได้แก่ น้ำทิ้ง (palm oil mill effluent, POME) ความแตกต่างของปริมาณวัสดุเศษ เหลือเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับคุณภาพของวัตถุดิบ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ, 2542)

ปริมาณน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของประเทศไทยมีค่าเฉลี่ย 2.5 - 3.5 ลูกบาศก์เมตรต่อหนึ่งตันของน้ำมันปาล์มที่ผลิตได้ น้ำทิ้งมีสีน้ำตาลคล้ำ พีเอช 4.05 - 4.62 บีโอดี 50,000 - 60,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโอดี 80,500 - 115,000 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดไขมันระเหย (ในรูปกรดอะซิติก) 3,100 - 5,800 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นด่าง (ในรูปแคลเซียมคาร์บอเนต) 68 - 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไขมัน 16 - 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็ง ทั้งหมด 49,000 - 88,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งระเหยได้ 42,000 - 82,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งแขวนลอย 18,500 - 52,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียและสารอินทรีย์เท่ากับ 27 - 61 และ 550 - 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533) เนื่องจากระหว่างการสกัดน้ำมันปาล์ม ไม่มีการเติมสารเคมีในกระบวนการผลิต สีน้ำตาลคล้ำที่ปรากฏเกิดจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและโครงสร้างของสารอินทรีย์ต่างๆ ในปาล์มน้ำมัน เช่น ลิกนิน และสารประกอบฟีนอล จากลักษณะดังกล่าวทำให้น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นปัญหาใหญ่ต่อสิ่งแวดล้อม และแม้ว่าน้ำทิ้งจะผ่านการบำบัดแล้วก็ยังคงมีสีน้ำตาลคล้ำทำให้ไม่สามารถปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ จึงมีความพยายามในการกำจัดสีเหล่านี้หลายวิธีทั้งวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2544)

การกำจัดสีน้ำทิ้งมีทั้งวิธีการทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อเสียต่างกัน วิธีการทางกายภาพและทางเคมี แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีมากกว่าและใช้เวลาน้อยกว่าแต่ก็มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง (Kapdan *et al.*, 2002) ต้องการพลังงานสูงในการเดินระบบ และยังก่อให้เกิดสารอันตรายที่จำเป็นต้องมีค่าใช้จ่ายในการกำจัดอีกมาก (Couto, 2009) ส่วนวิธีทางชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์นั้น แม้ว่าจะสามารถออกแบบได้ง่าย ราคาต่ำ (Tripathi *et al.*, 2007) และยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Zahrim *et al.*, 2009) แต่ก็ต้องใช้ระยะเวลาในการกำจัดสีมากกว่า (Vanbulle *et al.*, 2008)

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาวิธีการกำจัดสี น้ำทิ้งสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ผ่านการบำบัดแล้ว แต่ไม่สามารถปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้เนื่องจากปัญหาเรื่องสีไม่เป็นที่ยอมรับตามข้อกำหนดของมาตรฐานน้ำ ทิ้งอุตสาหกรรม ด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 และวิธีการทางกายภาพ-ทางเคมี โดยใช้วัสดุเศษเหลือของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มคือ ใต้อาบน้ำร่วมกับกากขานอ้อย มาเป็นตัวดูดซับทางกายภาพ-ทางเคมี เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดสีน้ำทิ้งสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การตรวจเอกสาร

1. แหล่งที่มาและลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในระดับโลกและระดับประเทศของไทย เนื่องจากปาล์มน้ำมัน เป็นพืชน้ำมันชนิดเดียวที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่มากกว่าพืชน้ำมันอื่นๆทุกชนิด และสามารถผลิตได้เฉพาะในเขตพื้นที่ปลูก จำกัดประเภทร้อนชื้นเท่านั้น (ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และคณะ , 2548) ปาล์มน้ำมันยังเป็นพืชเศรษฐกิจของภาคใต้ ปลูกมากที่จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ปลูกเล็กน้อยที่จังหวัดสงขลา กรรมวิธีในการผลิตน้ำมันปาล์มอาจจำแนกเป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ การผลิตแบบไม่ใช้น้ำ และแบบใช้น้ำ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533)

1.) การผลิตแบบไม่ใช้น้ำ ใช้ความร้อนที่ได้จากไฟในการอบผลปาล์ม ใช้เวลาในการอบ 48 ชั่วโมงซึ่งนานกว่าการอบไอน้ำมาก ผลปาล์มจะถูกส่งไปยังเครื่องหีบแบบเกลียวอัด (screw press) น้ำมันที่ได้ถูกทำให้ร้อนและผ่านเข้าเครื่องกรองแบบอัดหลายชั้น (filter press) เพื่อขจัดสิ่งเจือปนออก วิธีนี้เหมาะกับโรงงานขนาดเล็ก กระบวนการผลิต ไม่สลับซับซ้อน ได้ น้ำมันดิบเป็นน้ำมันกะเทย คือน้ำมันผสมทั้งส่วนเปลือกและเมล็ดใน คุณภาพจะดีขยกว่าน้ำมัน

จากส่วนเปลือกเพียงอย่างเดียว วัสดุเศษเหลือมีเพียงอย่างเดียว คือกากปาล์ม จะไม่มีน้ำเสียเลยเป็น การลดปัญหาและค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับการกำจัดน้ำเสียไปได้

2.) การผลิตแบบใช้น้ำ แบ่งย่อยเป็น 2 ลักษณะ คือแบบใช้เครื่องสกัดแยกน้ำมัน (decanter) (Figure 1) และแบบไม่ใช้เครื่องสกัดแยกน้ำมัน น้ำที่มาจากขั้นตอนการอบทะลาย ปาล์ม ในรูปน้ำที่จากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำที่จากเครื่องสกัดแยกน้ำมัน น้ำที่จากหม้อฆ่าเชื้อมี ประมาณ 200 ลิตรต่อ 10,000 กิโลกรัมทะลายปาล์ม (การอบ 1 ครั้ง) (หรือ 10 % ของน้ำมันที่ผลิต ได้) คิดเป็นร้อยละ 2 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ของทะลายปาล์ม การนึ่งทะลายปาล์มหรือผลปาล์มมี จุดประสงค์เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (โดยเฉพาะเอนไซม์ไลเปสซึ่งถูกทำลายได้ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ช่วยให้ข้าวผลปาล์มหลุดร่วงง่ายในขั้นตอนการแยก และทำให้เมล็ดน้ำมันม ี สะดวกต่อการหีบ และช่วยลดความชื้น การย่อยผลปาล์มในเครื่องย่อย (digester) ต้องมีการเติมน้ำ ร้อน (60-70 องศาเซลเซียส) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 ใช้เวลาในการย่อย 15 นาที เนื่องจากน้ำร้อน ทำหน้าที่เป็นตัวสกัดน้ำมันจึงต้องมีการพ่นน้ำร้อนเข้าไปในขั้นตอนการหีบน้ำมันด้วย น้ำมันที่ ร้อนจะถูกส่งไปยังเครื่องสกัดแยกน้ำมันเพื่อแยกน้ำกับสิ่งเจือปน (สลัดจ์) ออกจากน้ำมัน

ลักษณะของน้ำทิ้งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำทิ้ง ได้แก่ น้ำทิ้งจากบ่อ รวมน้ำเสีย น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (Table 1) ซึ่งโดยภาพรวมจะ เห็นว่าน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสีน้ำตาล มีสารแขวนลอยที่มีลักษณะคอลลอยด์ มีค่า พีเอชต่ำ (พีเอช 4-4.6) มีค่าบีโอดีสูงและปริมาณของแ ซิงสูง (ประมาณ 60,000 และ 50,000 – 88,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) (พูนสุข ประเสริฐสรรพ, 2542) นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุต่าง ๆ ที่สำคัญ ดังแสดง Table 2 จะเห็นว่าแร่ธาตุที่มีมากที่สุดคือ โพแทสเซียม (K) ซึ่งมีสูงถึง 1645 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีแมกนีเซียม (Mg) และแคลเซียม (Ca) ในปริมาณ 970 และ 110 มิลลิกรัมต่อ ลิตร ตามลำดับ (Hwang *et al.*, 1987)

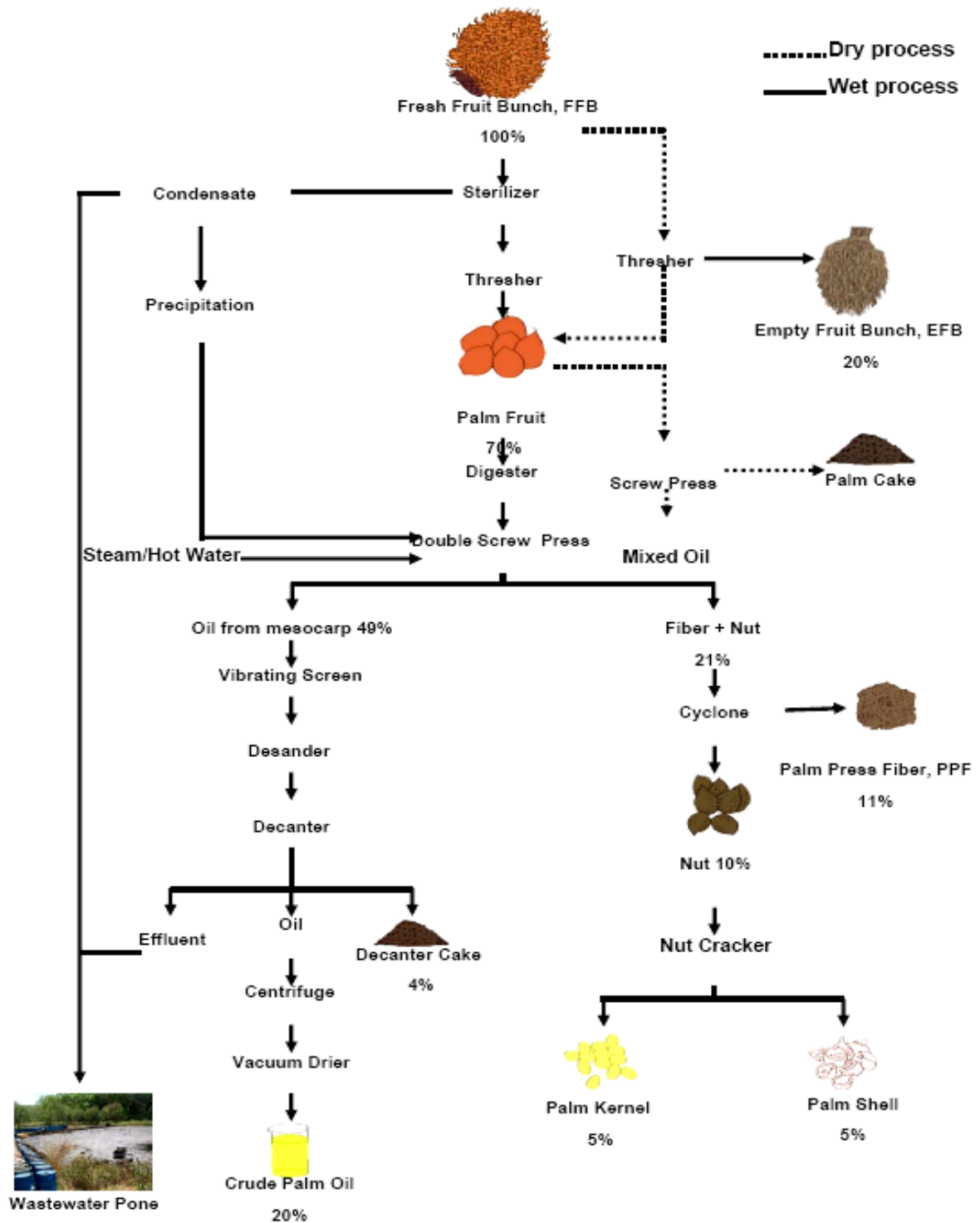


Figure 1. Palm oil milling process

ที่มา : พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์ (2552)

Table 1. Characteristics of effluent from various steps during palm oil extraction and mixed effluent of a palm oil mill

Parameters ^a	Sterilizer condensate	Decanter effluent	Mixed effluent
Color	Dark Brown	Brown	Brown-Blackish Brown
pH	4.05-4.62	4.84-5.35	4.61-4.89
BOD	54,750-60,000	22,800-41,985	21,000-45,375
COD	80,523-115,934	45,360-80,146	38,246-67,567
Total solids (TS)	49,063-88,508	26,367-76,733	25,634-47,242
Suspended solids (SS)	18,500-52,000	2,600-6,100	2,900-20,300
Nitrogen			
- ammonia	27-61	7-66.3	22-23
- organic	551-1,172	22-1,287	518

^aExcept for color and pH all other parameters are in mg/L

ที่มา : ดัดแปลงจากพูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ (2533)

Table 2. Composition of the mineral in sterilizer condensate and mixed effluent of a palm oil mill

Mineral	Mixed effluent		Sterilizer condensate	
	Dry wt basis (ppm)	Wet wt basis (%)	Dry wt basis (ppm)	Wet wt basis (%)
N	689	1.73	944	1.83
P	160	0.31	152	0.36
K	1645	3.19	1300	3.09
Na	31	0.06	22	0.05
Mg	970	1.88	1020	2.42
Ca	110	0.21	140	0.33
Fe	50	0.10	18	0.04
Zn	13	0.025	15	0.035

ที่มา : Hwang และคณะ (1987)

2. การเกิดสีน้ำตาลในน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

สีของน้ำสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ (ปนัดดา ปลั่งกลาง, 2535 อ้างโดยพนาเมฆตรง, 2544)

2.1 สีแท้หรือสีจริง (true color) หมายถึง สีที่ละลายจนกลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ ซึ่งเกิดจากสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายซากประเภทกรดฮิวมิก (humic acid) และกรดฟุลวิก (fulvic acid) ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากการย่อยสลายพืชต่าง ๆ กรดอินทรีย์เหล่านี้ มีความคงตัวสูงมาก จนไม่สลายตัวอีกต่อไปแล้ว ดังนั้นการกำจัดสีแท้ๆ ออกจากน้ำจึงกระทำไม่ได้ ยก สาเหตุหนึ่งอาจเนื่อง มาจากสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นอนุภาคคอลลอยด์ที่มีประจุลบ ทำให้ไม่สามารถตกตะกอนแยกออกจากน้ำได้ง่ายๆ โดยการตกตะกอน (สันติ สกลไชย, 2546)

น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ แล้วยังคงมีสีน้ำตาลเป็นสีแท้หรือสีจริง จากการสลายตัวของพืช และสารอินทรีย์จัดเป็นสารกลุ่มฮิวมิก (humic material) เป็นสารที่เกิดจากการสลายตัวของสิ่งมีชีวิต ลิกนินและแทนนินในพืชเกิดการสลายตัวแล้วรวมตัวกันเกิดเป็นโพลีเมอร์ของฟีนอลิก แล้วจึงเกิดปฏิกิริยาต่อไปเป็นสารในกลุ่มฮิวมิก หากพิจารณาความสามารถในการละลายสามารถแบ่งฮิวมิกเป็น 2 ประเภท คือ กรดฮิวมิก (ละลายได้ในสภาวะต่าง) และกรดฟุลวิก โดยทั่วไปเมื่อน้ำมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของสีจะเพิ่มมากขึ้น คาดว่าสีในน้ำทิ้งส่วนที่ผ่านการบำบัดทางชีวภาพแล้วและมีพีเอชช่วงต่ำ (พีเอช 8-9) น่าจะเป็นกรดฮิวมิกเนื่องจากน้ำ ทิ้งมีค่าพีเอชสูง (Corroll, 1985 อ้างโดยโสภารรณ รัตนพันธุ์ , 2547)

2.2 สีปรากฏ (apparent color) หมายถึง สีของน้ำที่สามารถกำจัดออกได้โดยวิธีทางกายภาพ เช่น ตกตะกอนหรือกรอง เป็นต้น การกำจัดสีปรากฏออกไปจะทำให้เห็นสีแท้ของน้ำได้ (ถ้ามี)

กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มไม่มีการเติมสารเคมี ดังนั้นสีน้ำตาลของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและโครงสร้างของสารอินทรีย์ต่างๆ ในปาล์มน้ำมัน ที่ผ่านความร้อนในขั้นตอนการนึ่งปาล์ม และการแตกตัวขององค์ประกอบจากขั้นตอนการหีบอัด ได้แก่ รงควั ตฤพวอกแอนโทไซยานิน (anthocyanins) และแคโรทีน (carotene) ที่อยู่ในส่วน pericarp ของผลปาล์ม ซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับน้ำมันหรือไอน้ำ เนื่องจากเซลล์ผลปาล์มถูกทำลาย (Hartley, 1977 อ้างโดยโสภารรณ รัตนพันธุ์, 2547) โดยแคโรทีนกระจายอยู่ในน้ำทิ้งได้เพราะมีน้ำมันเป็นตัวค้ำจุนและอยู่ในรูปหยดน้ำมันเล็กๆ (droplet) ในน้ำทิ้ง ส่วนแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุสีม่วงแดง จะละลายน้ำมีสีต่างกันตามพีเอชของตัวกลาง คือ พีเอชเป็นกลางจะมีสีม่วง พีเอชเป็นกรดมีสีแดง และพีเอชเป็นด่างมีสีน้ำเงิน แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับ

เหล็กจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สารประกอบพอลิฟีนอล (polyphenol) เป็นตัวหลักที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลคล้ำถึงดำ และยังมีแทนนิน เพกติน และโพลีแอลกอฮอล์ โดยแทนนินแพร่กระจายออกมาและเกิดเป็นคอลลอยด์ เมื่อทำปฏิกิริยากับแคลเซียมและแมกนีเซียมกลายเป็นตะกอนสีน้ำตาลแดง ทำให้น้ำขุ่น และแทนนินยังสามารถทำปฏิกิริยากับเหล็กเกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีน้ำตาลคล้ำได้ด้วย (พนา เมฆตรง, 2544) นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้ง น้ำตาล เพกติน และเพนโตแซน (pentosan) รวมทั้งโปรตีนทั้งในส่วนน้ำทิ้งและสลัดจ์ จึงมีความเป็นไปได้ว่าสีของน้ำทิ้งส่วนหนึ่งเกิดจากสารประกอบเมลานอยดิน (melanoidin) (Hwang *et al.*, 1978 อ้างโดยโสภารรณ รัตนพันธุ์, 2547) เป็นสารประกอบสีน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymic browning reaction หรือ maillard reaction) ระหว่างน้ำตาลและกรดอะมิโนภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูง นอกจากนี้สารประกอบเมลานอยดินอาจเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของกรดไขมันอิสระที่ไม่อิ่มตัวในน้ำทิ้งจากดีแคนเตอร์ ได้สารประกอบอัลดีไฮด์ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนได้เป็นสารสีน้ำตาลคล้ำ (พนา เมฆตรง, 2544) และสิ่งแปลกปลอมอีกอย่าง คือ สารประกอบพวกกัม (gum) มีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิฟายเออร์ (emulsifier) ระหว่างน้ำทิ้งกับน้ำมันที่แยกออกไม่หมด ซึ่งเมื่อ ได้รับความร้อนในขั้นตอนการผลิต จะเกิดสีน้ำตาลคล้ำขึ้นและสามารถรวมตัวกับเกลือของโลหะ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และทองแดง ทำให้เกิดความคงตัวของสีในน้ำทิ้ง (โสภารรณ รัตนพันธุ์, 2547)

3. การกำจัดสีด้วยวิธีการทางชีวภาพ

วิธีทั่วไปในการกำจัดสิ่งปนเปื้อน ประกอบด้วย การกำจัดวัสดุที่ไม่ต้องการผ่านการตกตะกอนและการกรอง ตามมาด้วยการบำบัดโดยใช้วิธีการทางเคมี เช่น การทำให้เป็นตะกอน การทำให้เป็นกลาง ก่อนที่จะนำไปบำบัดต่อไป ซึ่งวิธีการเหล่านี้อาจไม่ได้ยืนยันว่าเป็นวิธีการบำบัดที่เหมาะสม (Asamudo *et al.*, 2005) การกำจัดสีในน้ำทิ้ง ส่วนใหญ่ใช้วิธีการทางกายภาพหรือเคมี แม้ว่าวิธีดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพแต่ก็มีข้อบกพร่อง เช่น ต้นทุนสูง (Kapdan *et al.*, 2002) ก่อให้เกิดสารอันตรายที่จำเป็นต้องมีค่าใช้จ่ายในการกำจัดอีกมาก (Couto, 2009) และต้องการพลังงานสูง ในการเดินระบบ ดังนั้นวิธีการย่อยสลายโดยใช้จุลินทรีย์เป็นทางเลือกที่ดีกว่า (Kim and Shoda, 1999) เนื่องจากสามารถออกแบบได้ง่าย ราคาต่ำ (Tripathi *et al.*, 2007) และยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Zahrim *et al.*, 2009)

3.1 เชื้อรากลุ่มไวท์รอต

ราไวท์รอต (white rot fungi) เป็นกลุ่มเชื้อเห็ดราที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน ซึ่งเป็นไบโอโพลิเมอร์ที่อยู่ในไม้เนื้อแข็ง และของไม้พี ไซน็ดัน ทำหน้าที่ป้องกันการเข้าทำลายเนื้อไม้จากจุลินทรีย์ การย่อยสลายลิกนินของเชื้อเห็ดราในกลุ่ม White-rot fungi สามารถทำได้โดยการสร้างเอนไซม์แบบไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific) ออกมานอกเซลล์ ซึ่งระบบการย่อยสลายทางชีวภาพของเอนไซม์จะเป็นแบบ free-radical base เพราะว่าระบบการย่อยสลายนี้สามารถทำให้เกิดการ oxidize และ reduce กับสารเคมีหลายชนิดโดยไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นจึงทำให้เอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายสารตกค้างที่อยู่ในธรรมชาติได้หลายชนิด ระบบการย่อยสลายของเอนไซม์ต้องการส่วนประกอบหลายอย่าง ที่ค่อนข้างจะซับซ้อน มีลักษณะเฉพาะและมีปฏิกิริยาเกิดขึ้นมากมาย การย่อยสลายลิกนินของเชื้อเห็ดราจะเกิดขึ้นในขณะที่เกิดกระบวนการ secondary metabolism ในสถานะที่จำกัดแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนของเชื้อเห็ดรา เพื่อเปลี่ยนลิกนินให้เป็นแหล่งพลังงาน และเชื้อเห็ดราจะทำการย่อยลิกนินที่อยู่ รอบเซลล์โลสออกไปก่อนที่จะนำเซลล์โลสไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน ดังนั้นจึงทำให้เชื้อเห็ดราในกลุ่มนี้มีความสามารถย่อยสลายลิกนินและสารพิษที่ตกค้างในธรรมชาติที่มีความคงตัว และอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นาน ซึ่งรวมถึงสารโพลิเมอร์สังเคราะห์ หรือสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน เช่น โพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) และสารประกอบพวคฟีโนลิก เป็นต้น (Baldrian, 2008) ซึ่งส่วนใหญ่ ราไวท์รอต จัดอยู่ใน basidiomycota เช่น *Phanerochaete chrysosporium* หรือ *Coriolus versicolor* แต่บางส่วนจัดอยู่ใน ascomycota เช่น *Xylaria polymorpha* หรือ *X. hypoxylon* (Gadd, 2001) เชื้อรากลุ่มไวท์รอต เป็นที่รู้จักกันดีในความสามารถที่โดดเด่นในการผลิต extracellular oxidative enzyme ได้แก่ laccase, lignin peroxidase และ manganese peroxidase มีผลในการย่อยสลายของสีหลายชนิด (Erkurt et al., 2007) และยังสามารถเข้าไปทำลายวงแหวนโพลิเมอร์ที่ซับซ้อนของลิกนินด้วย (พิมพ์ชนก เต็งเจริญ, 2546) โดยเชื้อราไวท์รอตหลัก ๆ ที่ใช้ในการย่อยสลายลิกนินและการกำจัดสี ได้แก่ *P. chrysosporium* หรือ *Trametes (Coriolus) versicolor* (Kapdan et al., 2000)

การศึกษาที่พิสูจน์ให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อเห็ดราจำพวก White-rot fungi เช่น *Daedalea elegans*, *Polyporus giganteus*, and *Lenzites betulina* ในการย่อยสลายลิกนินที่เป็นของเสียจากการเกษตรและอุตสาหกรรม อาทิ ข้าวฟ่าง ชางข้าวโพด ขี้เลื่อย และชานอ้อย พบว่า *Daedalea elegans* สามารถย่อยสลายลิกนินที่เป็นของเสียจากการเกษตรและอุตสาหกรรมได้ดีที่สุด 92.9% ใน 90 วัน เมื่อเทียบกับเชื้อตัวอื่น โดยใช้วัตถุดิบเหล่านี้เป็นสับสเตรคของเชื้อได้เป็นอย่างดี (Fasidi, 2009) โดย white rot fungi ต่างชนิดกันจะผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดรวมกัน โดยมีทั้ง Laccase, LiP และ MnP ขึ้นอยู่กับการเจริญบนสับสเตรค

P. chrysosporium เป็นราไวท์รอตที่มีประสิทธิภาพและมีการนำมาศึกษามากที่สุด ซึ่งแม้ว่าจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่มีเฉพาะลิกนิน แต่สามารถย่อยสลายลิกนินและสารปนเปื้อนที่มีพิษในสิ่งแวดล้อม เช่น คีโคที สารประกอบที่มีวงแหวน อะโรมาติกเป็นองค์ประกอบ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 2 เอนไซม์ คือเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Gadd, 2001) เชื้อราไวท์รอตส่วนใหญ่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่ 27 – 30 องศาเซลเซียส แต่เป็นข้อยกเว้นสำหรับเชื้อรา *P. chrysosporium* ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 37 – 40 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าจะไม่มีการกำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกำจัดสัแต่รายงานการกำจัดส่วนใหญ่ก็จะมีค่าอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ราไวท์รอต เจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดเหมือนราเส้นใยทั่วไป พิเศษที่เหมาะสมต่อการกำจัดอยู่ในช่วง 4 – 5.5 เชื้อรา *P. chrysosporium* ส่วนใหญ่จะหลั่งเอนไซม์ LiP และ MnP ในปี 2006 Ichiro Kamei และคณะ (2006) ได้ทำการทดลองย่อยสลายอนุพันธ์ของสารประกอบ polychlorinated biphenyl (PCB) เช่น 4,4'-dichlorobiphenyl (4,4'-DCB) โดยเชื้อ *P. chrysosporium* โดยการย่อยสลายเกิดขึ้นได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด ซึ่งกลไกการย่อยสลายของเชื้อ *P. chrysosporium* นั้นจะเปลี่ยน 4,4'-DCB ไปเป็น 3-hydroxy-4,4'-DCB และ 4-hydroxy-3,4'-DCB ผ่านทาง National Institutes ของ 4-chlorine โดยที่ 3-Hydroxy-4,4'-DCB จะเปลี่ยนไปเป็น 3-methoxy-4,4'-DCB , 4-chlorobenzoic acid; 4-chlorobenzaldehyde และ 4-chlorobenzyl alcohol ในอาหาร ซึ่งในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด จำเป็นสำหรับการสร้าง 4-chlorobenzoic acid, 4-chlorobenzaldehyde และ 4-chlorobenzyl alcohol จาก 3-hydroxy-4,4'-DCB ที่มีการแสดงออกร่วมกันของ secondary metabolism นอกจากนี้แล้วยังใช้เชื้อ *P. chrysosporium* มาใช้ในการย่อยสลาย polychlorinated biphenyl (PCB) ชนิดอื่นๆอีก เช่น Delor 103 ,105 และ Aroclor 1242 , 1254 ,1242, 1248, and 1260 โดยให้ผลการย่อยสลายสารพิษอยู่ในช่วง 34 ถึง 73 เปอร์เซ็นต์ทั้งนี้เพราะมีเอนไซม์ Manganese peroxidase (MnP) และ Lignin peroxidase (LiP) ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายพิษได้ดีที่สุดตัวหนึ่งที่นิยมนำมาทำการศึกษา

3.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัด

เชื้อราในกลุ่มไวท์รอตสามารถผลิต เอนไซม์นอกเซลล์กลุ่มลิกนินโนไลติก (ligninolytic enzymes or ligninolytic or lignin modified or lignin degrading enzymes) ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน แต่เอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกำจัดได้แก่ เอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Table 3) และเนื่องจากเอนไซม์กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่ำจึงสามารถเกิดปฏิกิริยากับสับสเตรตได้เป็นวงกว้าง เช่น ลิกนิน

สารประกอบฟีนอลิกที่มีคลอรีนในโครงสร้าง โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และสี่
สังเคราะห์

Table 3. Ligninolytic enzymes and reaction

Enzyme	Substrate, mediator	Reaction
Lignin Peroxidase, LiP	Veratryl alcohol	Aromatic ring oxidised to cation radical
Manganese Peroxidase, MnP	Mn, organic acids aschelators, thiols, unsaturated fatty acids	Mn(II) oxidized to Mn(III); chelated Mn(III) oxidized phenolic compounds to phenoxy radicals
Laccase	Phenols, mediators e.g. hydroxybenzotriazole or ABTS	Phenols are oxidized to phenoxy radical

ที่มา : ดัดแปลงจาก Couto (2009)

3.2.1 แลคเคส (Laccase)

เอนไซม์แลคเคส (benzenediol : oxygen oxidoreductase ; EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทสที่มีมัดคอปเปอร์ในโครงสร้าง (มีคอปเปอร์ 4 อะตอมขึ้นไป) ซึ่งมีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ออกซิเจนได้อย่างสมบูรณ์ได้เป็นน้ำ และมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน 1 อิเล็กตรอนของสารประกอบฟีนอลไปเป็น cation radical (Gadd, 2001) ซึ่งเอนไซม์แลคเคสอาจจะทำปฏิกิริยาโดยตรงกับส่วนที่เป็นสารประกอบฟีนอลของลิกนิน หรืออาจต้องการสารตัวกลาง (mediator compound) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นร่วม เช่น ออกซิเจน และ ABTS (2,2'-azinobis-(3)-ethylbenzothiazoline-6-sulphate) (Breen and Singleton, 1999 อ้างโดยพจนีย์ โลมรัตน์, 2549) กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคสแสดงดัง Figure 2

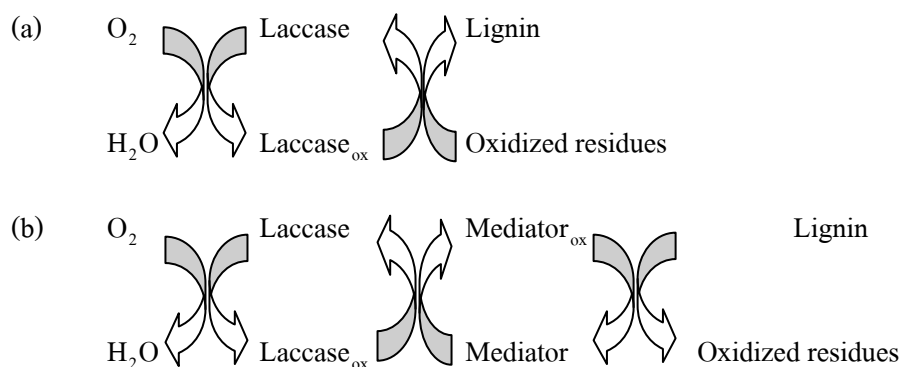


Figure 2. Laccase-catalyzed redox cycles for substrates oxidation in the absence (a) or in the presence (b) of chemical mediators

ที่มา : ตัดแปลงจาก Riva (2006)

3.2.2 ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin Peroxidase; LiP)

เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.14) สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล สารประกอบเอมีนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน สารประกอบอีเทอร์ที่เป็นวงแหวน และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนและมีโมเลกุลขนาดใหญ่ (Breen and Singleton, 1999 อ้างโดยพจนีย์ โลมรัตน์, 2549) ซึ่ง LiP ออกซิไดซ์พันธะ $C_\alpha - C_\beta$ ทำให้วงแหวนลิกนินเปิดออก โดยมี H_2O_2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา LiP สามารถออกซิไดซ์ nonphenolic aromatic ของลิกนินโดยมี veratryl alcohol (VA) เป็นสารตัวกลาง ได้เป็น cation radical (พิมพ์ชนก เต็งเจริญ, 2546) กลไกการทำงานของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสแสดงดัง Figure 3

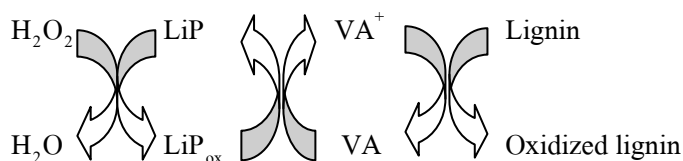


Figure 3. Catalytic mechanism of lignin peroxidase.

ที่มา : Gadd (2001)

3.2.3 แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese Peroxidase)

เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีสองชนิด คือ Manganese Peroxidase (MnP; EC 1.11.1.13) และ Manganese Independent Peroxidase (MIP; EC 1.11.1.7) ซึ่ง MIP เป็น heme peroxidase ตัวใหม่ที่พบใน ligninolytic activity โดยจะพบในสถานะที่ไม่มี Mn(II) และ veratryl

alcohol แมงกานีสเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถย่อยสลายโครงสร้างที่ไม่ใช่ฟีนอลิก เนื่องจากต้องการสารที่มีกลุ่มฟีนอลิกอิสระในวงแหวนอะโรมาติกเป็น สับสเตรต จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจาก Mn (II) ไปเป็น Mn (III) โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีดังนี้ (Gadd, 2001)



โสภา จันทภาโส (2542) ศึกษาการกำจัดสีของน้ำทิ้งจากดีแคเนเตอร์ที่ผ่านการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกแล้ว โดยเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 และ *Coriolus versicolor* พบว่าการเลี้ยง *P. chrysosporium* ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เชื้อผลิตเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้สูงสุดเท่ากับ 1.41 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (เชื้อเริ่มผลิตเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ตั้งแต่วันที่ 4 ของการทดลอง) แต่ไม่พบแอกทิวิตีของเอนไซม์แลคเคส สามารถลดความเข้มข้นสีน้ำทิ้งได้ร้อยละ 6.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง มีค่าเท่ากับ 13.69 กรัมต่อลิตร ส่วนการเลี้ยง *C. versicolor* ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เชื้อผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงสุดเท่ากับ 6.6 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (เชื้อเริ่มผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง) แต่ไม่พบแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส สามารถลดความเข้มข้นสีน้ำทิ้งได้ร้อยละ 3.3 น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเท่ากับ 11.38 กรัมต่อลิตร

โสภาวรรณ รัตนพันธุ์ (2547) ศึกษาการบำบัดและกำจัดสีของน้ำทิ้งดีแคเนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยเส้นใยเห็ด *Lentinus* spp. น้ำทิ้งมีค่าพีเอช 4.5 ซีโอดี 87,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และฟีนอล 3.95 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการเลี้ยงเห็ดสกุล *Lentinus* จำนวน 12 สายพันธุ์ ประกอบด้วยเห็ด 3 ชนิด คือ *L. polychrous* (เห็ดกระด้าง) *L. strigosus* (เห็ดขนขาว) และ *L. squarrosulus* (เห็ดหูกวาง) แบบอาหารแข็งที่เตรียมจากน้ำทิ้งดีแคเนเตอร์ที่เจือจางและไม่เจือจาง พบว่าเชื้อเจริญได้ทุกความเข้มข้น แต่การเลี้ยงเส้นใยแบบเหลวในน้ำที่ พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้เฉพาะในน้ำทิ้งที่เจือจางซึ่งมีค่าซีโอดีเท่ากับ 43,500 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเพิ่มการเจริญของเส้นใยโดยการตรึงเส้นใยบนฟองน้ำและใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น และพบว่าเห็ดสายพันธุ์ *L. strigosus* ST-S-3 ที่ถูกตรึงสามารถลดซีโอดี สี ฟีนอล และของแข็งทั้งหมดได้ร้อยละ 68.19, 51.15, 62.68 และ 61.80 ตามลำดับ หลังการเลี้ยงเชื้อ 15 วัน ที่สภาวะพีเอชเริ่มต้นน้ำทิ้ง 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และระดับการให้อากาศในถังหมัก air-lift 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) และเมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ CMCase ไซลานเนส แลคเคส และแมงกานีส

เปอร์ออกซิเดสทั้ง 2 ประเภท (MnP กับ MnIP) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 75.45, 89.00, 82.20 และ 138.18 กับ 136.82 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการกำจัดสีด้วยจุลินทรีย์

3.3.1 ผลของสารอาหาร

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารสำหรับการเจริญเติบโตมีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในเชื้อรากลุ่มไวท์รอต ซึ่งการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาออกเซลล์ขึ้นอยู่กับแหล่งของสารอาหารทั้งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยเอนไซม์จะถูกผลิตในช่วง secondary metabolism ภายใต้สภาวะที่จำกัดไนโตรเจน (D'Souza-Ticlo *et al.*, 2006)

Kapdan และคณะ (2000) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน ผลของแหล่งไนโตรเจน และผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (TOC/N ratio) ต่อการกำจัดสีข้อมฟ้าด้วยเชื้อรา *C. versicolor* MUCL พบว่ากลูโคสและยูเรีย เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด และที่ TOC/N ratio สูงหรือที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำมีประสิทธิภาพสูงมากในการกำจัดสี เมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำ (17 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยที่ค่า TOC/N ratio ระหว่าง 112 และ 22 มีประสิทธิภาพการกำจัดสี 99 - 100 % เป็นเวลา 6 วัน

Dawen และคณะ (2007) เปรียบเทียบการใช้อาหารที่จำกัดคาร์บอนหรือไนโตรเจนเพื่อเลี้ยง *P. chrysosporium* BKM-F-1767 (ATCC 24725) สำหรับใช้กำจัดสีข้อม reactive brilliant red ภายใต้สภาวะไม่ปลอดเชื้อ โดยอาหารที่จำกัดคาร์บอนมีความเข้มข้นของ glucose และ ammonium tartrate เท่ากับ 5.5 และ 4.06 กรัมต่อลิตร ($n(C)/n(N) = 56/2.2$ (in mmol/l)) ตามลำดับ ในขณะที่อาหารที่จำกัดไนโตรเจนมีความเข้มข้นของ glucose และ ammonium tartrate เท่ากับ 11 และ 0.203 กรัมต่อลิตร ($n(C)/n(N) = 28/44$ (in mmol/l)) ตามลำดับ พบว่า หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การกำจัดสีจากอาหารที่จำกัดคาร์บอนและไนโตรเจน เท่ากับ 24 % และ 51 % ตามลำดับ ส่วนการกำจัดสีที่สูงสุดจากอาหารที่จำกัดคาร์บอนเท่ากับ 35 % หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่การกำจัดสีสูงสุดจากอาหารที่จำกัดไนโตรเจนเท่ากับ 92 % หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 148 ชั่วโมง และนอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่จำกัดไนโตรเจนปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย ทำให้การกำจัดสีลดลง ดังนั้นอาหารที่จำกัดไนโตรเจนเหมาะสมกว่าในสภาวะที่ไม่ปลอดเชื้อ

โศภาวรรณ รัตนพันธุ์ (2547) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการลดสีของน้ำทิ้งดีเคเนเตอร์ แหล่งไนโตรเจนที่ศึกษา 3 ชนิด คือ ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยเส้นใยเห็ด *Lentinus* spp. ที่ถูกตรึงบนฟองน้ำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่ายูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่พบการลดซีโอดีสูงถึงร้อยละ 43.59 – 58.94 และพบการลดสีในน้ำทิ้งสูงสุดร้อยละ 43.59 เมื่อไม่มีการเติมไนโตรเจน ซึ่งเมื่อพิจารณาการลดซีโอดีคู่กับการลดค่าสีจึงเลือกยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน จากนั้นแปรผันความเข้มข้นของยูเรียเป็นร้อยละ 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าการเติมยูเรียที่ความเข้มข้นต่ำร้อยละ 0.05 – 0.1 มีประสิทธิภาพการบำบัดและกำจัดสีถึงร้อยละ 40.52 – 44.05 ขณะที่การเติมยูเรียที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (ร้อยละ 0.2 – 0.4) ส่งเสริมการเจริญของเส้นใย แต่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของสีในน้ำทิ้ง และจากการเติมยูเรียที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เมื่อคำนวณผลในรูป COD : N ได้เท่ากับ 54 : 1 เป็นสถานะที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งดีแคนเตอร์

Urairuj และคณะ (2003) ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสและแอมโมเนียมทาร์ทเรตต่อการผลิตเอนไซม์ manganese independent peroxidase (MIP) ของ *Xylariaceae* CMUX144 โดยแปรผันค่าความเข้มข้นของกลูโคสเป็นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแปรผันค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมทาร์ทเรตเป็นร้อยละ 0.000, 0.025, 0.050 และ 0.075 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ MIP ได้สูงสุด 195.6 ยูนิตต่อลิตร ที่ความเข้มข้นกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมทาร์ทเรต 0.75 กรัมต่อลิตร และพบว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารที่ไม่มีการเติมกลูโคสและแอมโมเนียมทาร์ทเรต

3.3.2 ผลของพีเอชเริ่มต้น

Asgher และคณะ (2008) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการกำจัดสีสังเคราะห์ ด้วยเชื้อรากลุ่มไวท์รอต *Coriulus versicolor* IBL – 04 ที่พีเอช 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 10 วัน พบว่าสามารถกำจัดสีได้ 91.8 %, 88.87 % และ 71.8 % ที่พีเอช 5, 4.5 และ 4 ตามลำดับ โดยเอนไซม์ที่เชื้อราปล่อยออกมาเพื่อย่อยสลายสี ได้แก่ เอนไซม์แลคเคส, เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส เท่ากับ 288 IU/ml, 125 IU/ml และ 48 IU/ml ตามลำดับ

Srikanlayanukul และคณะ (2007) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการกำจัดสีย้อม Orange II ด้วยเชื้อราไวท์รอตกลุ่มทนร้อน *C. versicolor* RC3 โดยศึกษาที่พีเอช 3.5, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0, 24, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง พบว่า การกำจัดสีที่เหมาะสมอยู่ในช่วงพีเอช 5.5 ถึง 7.0 โดยที่พีเอช 6.5 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง มีอัตราการกำจัดสีเร็วที่สุด (ประมาณมากกว่า 60 % โดยดูจากกราฟเนื่องจากไม่ได้รายงานผลเป็นตัวเลข) และที่พีเอช 6.0 และ 6.5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถกำจัดสีได้มากที่สุด (ประมาณมากกว่า 90 %)

Guimarães และคณะ (2005) ศึกษาการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานน้ำตาล โดยใช้ *P. chrysosporium* ATCC 24725 พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 4.5 สามารถกำจัดสีได้ 55 %

Kissi และคณะ (2001) ศึกษาการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอก โดยใช้ *P. chrysosporium* พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 4.5 สามารถกำจัดสี ฟีนอลและ COD ได้ 55 %, (มากกว่า) 50 % และ (มากกว่า) 55 %

Urairuj และคณะ (2003) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ MIP โดยใช้ *Xylariaceae* CMUX144 ในอาหาร lignin-modifying enzyme basal (LB) โดยศึกษาที่พีเอช 3.0, 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 8.0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 5 วัน พบว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 4.0 – 6.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยที่พีเอช 5.5 พบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อพีเอชของอาหารมากกว่า 6.5

3.3.3 ผลของอุณหภูมิ

เชื้อราในกลุ่มไว ทร็อทเป็นเชื้อราที่พบตามธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นพวก mesophiles โดยปกติจะสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 – 35 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ การผลิตเอนไซม์ และการกำจัดสีที่ 25 – 37 องศาเซลเซียส (Asgher *et al.*, 2008) แต่ก็มีข้อยกเว้นสำหรับบางตัว เช่น *P. chrysosporium* ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 37 – 40 องศาเซลเซียส (Gadd, 2001)

Asgher และคณะ (2008) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดสีสังเคราะห์ ด้วยเชื้อราในกลุ่มไวทร็อท *C. versicolor* IBL – 04 ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 4.5 บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 วัน พบว่าสามารถกำจัดสีได้สูงสุดถึง 91.9 % ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงสุดเท่ากับ 380 IU/ml

Kissi และคณะ (2001) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอก ด้วย *P. chrysosporium* ที่อุณหภูมิ 20, 28 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสสามารถกำจัดสี ฟีนอลและ COD ได้ 49 %, 47 % และ 45 %

Urairuj และคณะ (2003) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ MnP ด้วย *Xylariaceae* CMUX144 ในอาหาร lignin-modifying enzyme basal (LB) โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 45 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง (32-34 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 5 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียสไม่พบการเจริญ และกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 122 ยูนิตต่อลิตรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4. การกำจัดสีด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ-ทางเคมี

วิธีการดูดซับสีและสิ่งปนเปื้อนในน้ำเสียทางกายภาพ-ทางเคมี เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ให้ผลได้ดี เนื่องจากสามารถใช้ในการกำจัดสีได้หลายประเภท การกำจัดสีจริงในน้ำเสียหรืออนุภาคขนาดเล็กนั้น วัสดุที่นำมาใช้ควรมีลักษณะสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม เช่น สารดูดติดผิวจะต้องมีพื้นที่ผิวจำเพาะสูง ขนาดรูพรุนที่มีขนาดใหญ่ หรือมีองค์ประกอบของซิลิกาที่เป็นโครงร่างตาข่ายเป็นจำนวนมาก (สันติ สกลไชย, 2546) ตัวดูดซับที่นิยมนำมาใช้อย่างกว้างขวางคือ ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) เพราะมีประสิทธิภาพในการดูดซับได้อย่างดีเยี่ยม (Abdullah *et al.*, 2005) แต่ยังมีข้อจำกัดในการใช้เนื่องจากมีราคาสูงมากสำหรับการนำมาใช้บำบัดน้ำเสีย (Hameed *et al.*, 2007) ปัจจุบันจึงมีความสนใจมากขึ้นในการนำวัสดุเศษเหลือจากชีวมวลหรือพวกลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นตัวดูดซับสีและสิ่งปนเปื้อนที่อยู่ในน้ำทิ้ง (Zhang *et al.*, 2013) เช่น เปลือกส้มและกล้วย กากชานอ้อย ขี้เลื่อย แกลบ ถั่วไม้ ถั่วปาล์ม

4.1 กลไกการดูดซับ

กระบวนการดูดติดผิวหรือดูดซับ คือ การที่สารจากสถานะหนึ่งเข้าไปจับติดที่ผิวของสารอีกสถานะหนึ่ง หรือที่ผิวร่วม (interface) ของสารสถานะนั้น การดูดซับเกิดขึ้นระหว่าง 2 สถานะใดๆ ก็ได้ เช่น ของเหลว-ของเหลว, ก๊าซ-ของเหลว, ก๊าซ-ของแข็ง, ของเหลว-ของแข็ง สารที่ถูกดูดติดที่ผิว เรียกว่า ตัวถูกดูดซับ (adsorbate) ส่วนสารที่เป็น phase ซึ่งทำหน้าที่ดูดติดที่ผิว เรียกว่า ตัวดูดซับ (adsorbent) (สันติ สกลไชย, 2546)

การที่สารละลายเกิดกระบวนการดูดติดผิวกับของแข็งสามารถเกิดจากสาเหตุดังนี้

(1) สารละลายอยู่ในสภาพที่เรียกว่า lyophobic คือการที่สารละลายนั้นพร้อมที่จะแยกตัวออกจากสารละลาย

(2) สารละลายนั้นมีความพร้อมที่จะเข้าไปสู่ผิวของแข็งในอัตราสูง คือการที่สารละลายนั้นชอบตัวทำละลายมากน้อยอย่างไร ในกรณีที่ตัวละลายคือน้ำ ถ้าสารละลายอยู่ในสภาพที่ชอบน้ำ (hydrophilic) โอกาสที่จะแยกตัวออกจากน้ำโดยการดูดติดผิวมีน้อย ถ้าไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โอกาสที่จะแยกออกจากน้ำโดยการดูดติดผิวก็มีมากกว่า

ขั้นตอนที่เกิดขึ้นระหว่างการดูดติดผิวของสารละลายโดยสารดูดซับที่มีรูพรุน มี 3 ขั้นตอน (Figure 4 and Figure 5) ดังนี้ (สันติ สกลไชย, 2546)

(1) การขนส่งทั้งก้อน (Bulk Transport) หรือการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของตัวถูกดูดซับเข้าหาตัวดูดซับ คือการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของตัวถูกละลายในของเหลว จะถูกส่งไปยังพื้นที่ผิวหน้าของชั้นของเหลวบางๆ ที่ห่อหุ้มตัวดูดซับ เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นเร็วที่สุด

(2) การขนส่งชั้นฟิล์ม (Film Transport) เมื่อโมเลกุลของตัวถูกดูดซับมาอยู่ที่พื้นผิวชั้นของเหลวที่ห่อหุ้มตัวดูดซับแล้ว โมเลกุลของตัวถูกดูดซับจะเกิดการแพร่ผ่านชั้นฟิล์มของน้ำ (Film diffusion) เข้าสู่ผิวหน้าของตัวดูดซับ เป็นขั้นตอนหนึ่งที่ยำกั้อัตราการดูดซับ

(3) การขนส่งภายในอนุภาค (Intraparticle Transport) เป็นการแพร่ของโมเลกุลของตัวถูกดูดซับเพื่อแทรกตัวเข้าสู่ช่องว่าง หรือโพรงรูพรุนของตัวดูดซับ (Pore Diffusion) จึงจะเกิดการดูดซับขึ้นภายใน เป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่ยำกั้อัตราการดูดซับ

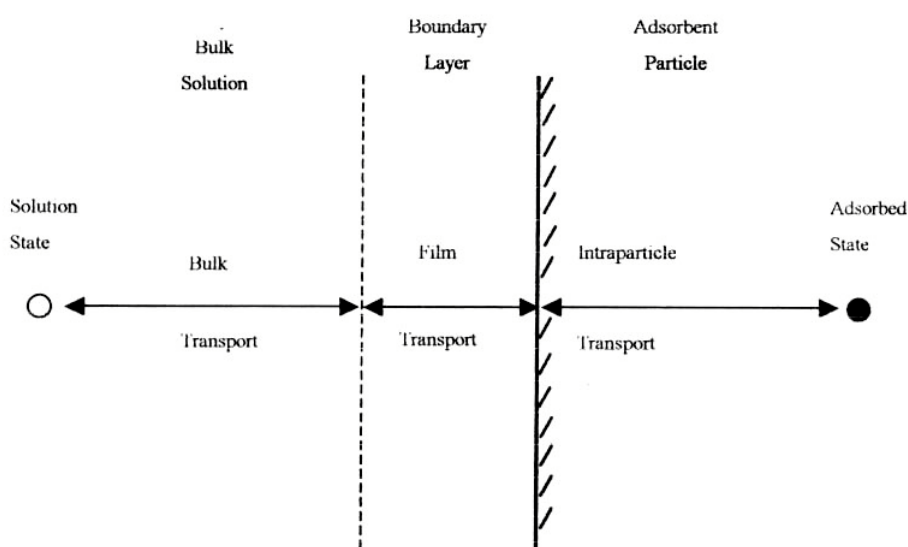


Figure 4. Step movement of molecular adsorption by activated carbon

ที่มา : Eckenfelder (1981) อ้างโดยสันติ สกลไชย (2546)

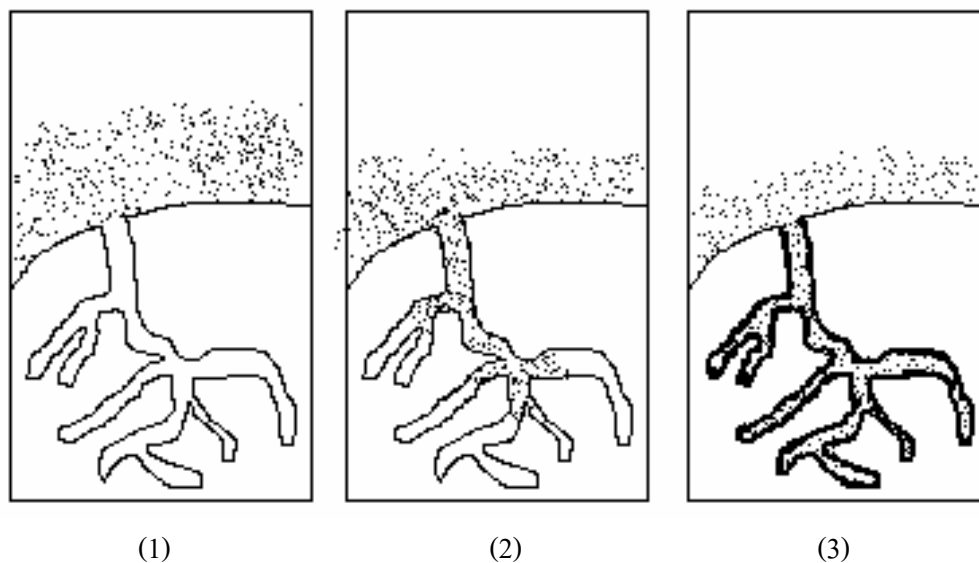


Figure 5. Adsorption process

ที่มา : รัตนาภรณ์ ไชยาพงศ์พิพัฒน์ (2549)

4.2 ประเภทของการดูดซับ

กลไกการดูดซับ ของสารประกอบอินทรีย์เกิดจากแรงรวมตัว (Binding Force) หลายชนิดระหว่างโมเลกุลของสารอินทรีย์และพื้นที่ผิวของตัวดูดซับ การดูดซับสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่จะมาเป็นตัวดูดซับและตัวถูกดูดซับ (สันติ สกลไชย, 2546 และรัตนาภรณ์ ไชยาพงศ์พิพัฒน์, 2549) ได้แก่

4.2.1 การดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption)

เกิดขึ้นเนื่องจากการดูดซับด้วยแรงแวลเดออร์วาล (Van der waals forces) ซึ่งเป็นแรงดึงดูดอย่างอ่อนระหว่างโมเลกุลของตัวถูกดูดซับและตัวดูดซับ โดยตัวที่ถูกดูดซับและตัวดูดซับจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีใด ๆ สามารถผันกลับได้ (reversible) การดูดซับแบบนี้เป็นการดูดซับหลายชั้น (Multilayered) คือแต่ละชั้นของโมเลกุลจะเกิดอยู่บนชั้นของโมเลกุลที่ดูดซับก่อนหน้า โดยจำนวนชั้นของโมเลกุลจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของตัวถูกดูดซับเพิ่มขึ้น

4.2.2 การดูดซับทางเคมี (Chemical adsorption)

เกิดจาก พันธะทางเคมีระหว่างโมเลกุลของตัวถูกดูดซับและตำแหน่งดูดซับ (Adsorption site) ที่ผิวของตัวดูดซับ การดูดซับทางเคมีบางครั้งจะต้องการพลังงานเข้าร่วมด้วย เรียกว่า การดูดซับด้วยการกระตุ้น (Activated adsorption) การดูดซับทางเคมีต่างจากการดูดซับทาง

กายภาพ เนื่องจาก เป็นการดูด ติดผิวแบบชั้นเดียว (Monolayered) ไม่สามารถผันกลับได้ (Irreversible) และพันธะที่เกิดขึ้นแข็งแรงกว่า

4.2.3 การดูดซับแบบแลกเปลี่ยน (Exchange Adsorption) หรือการดูดซับด้วย ประจุ (Ionic adsorption)

เกิดขึ้นเมื่อตัวดูดซับกับตัว ถูกดูดซับมีประจุ เป็นการดูดซับระหว่างตัวถูกดูดซับ กับตัวดูดซับที่พื้นผิวด้วยแรงของประจุที่ตรงข้ามกัน (Electrical attraction) หรือเกิดเนื่องจากการ แทนที่ของประจุที่ผิวของตัวดูดซับด้วยไอออนของตัวถูกดูดซับ ทำให้ไอออนของตัวถูกดูดซับติด อยู่ที่พื้นผิวตัวดูดซับในตำแหน่งที่มีประจุตรงข้ามกัน ไอออนที่มีประจุสูงจะถูกดูดติดได้ดีกว่าพวก ที่มีประจุน้อย ๆ และไอออนที่มีขนาดเล็ก

4.2.4 การดูดซับแบบเจาะจง (Specific Adsorption)

เกิดขึ้นเนื่องจากแรงยึดเหนี่ยวของโมเลกุลตัวถูกดูดซับกับตัวดูดซับที่มีหมู่ ฟังก์ชันนัลอยู่บนผิว แต่ไม่ทำให้ตัวดูดซับเปลี่ยนโครงสร้างไป การดูดซับชนิดนี้จะมีพลังงานใน การยึดเหนี่ยวอยู่ระหว่างพลังงานของการดูดซับทางกายภาพและการดูดซับทางเคมี

4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับ

ความสามารถและอัตราเร็วในการดูดซับขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ (สันติ สกล ไชย, 2546 และวิวรรณ ขจรเกียรติกุล, 2539)

4.3.1 ธรรมชาติของสารที่ถูกดูดซับ (Nature of Adsorbate)

การดูดซับจะเพิ่มขึ้นเมื่อความสามารถในการละลายของตัวถูกละลายมีค่าลดลง เพราะก่อนที่จะเกิดกระบวนการดูดซับ จะมีการทำลายพันธะของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย ตัว ถูกละลายจะถูกดึงออกจากตัว ทำละลาย และขนาดของโมเลกุลของตัวถูกละลายแปรผกผันกับ อัตราการดูดซับ โมเลกุลที่มีขนาดเล็กจะเกิดการดูดซับได้รวดเร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่

4.3.2 ธรรมชาติของโมเลกุลที่เป็นตัวดูดซับ (Nature of the Adsorption)

พื้นที่ผิวและ โครงสร้างของรูพรุน (Surface area and Pore structure) ของตัวดูดซับ มีผลต่อความสามารถของการดูดซับ โดย เมื่อพื้นที่ผิวของโมเลกุลที่เป็นตัวดูดซับมากขึ้น ความสามารถจะเพิ่มขึ้น ด้วย และ โครงสร้างของรูพรุนมีส่วนช่วยให้พื้นที่ผิวมีความสามารถในการ ดูดซับเพิ่มขึ้น เพราะโมเลกุลของสารที่ถูกดูดซับสามารถเข้าไปในรูพรุน ของโมเลกุลของตัวถูกดูด ซับได้ทำให้สามารถดูดซับได้มากขึ้น

4.3.3 ขนาดและพื้นที่ผิวของตัวดูดซับ (Size and Surface Area)

หาก โมเลกุลที่เป็นตัวดูดซับไม่มีรูพรุน พื้นที่ผิวจะเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดลดลง ทำให้ ความสามารถในการดูดซับเพิ่มขึ้น

4.3.4 พีเอช (pH)

ค่าพีเอชมีอิทธิพลต่อการแตกตัวของไอออนและการละลายน้ำของสารต่างๆ ซึ่งไฮโดรเจนไอออนและไฮดรอกซิลไอออนเป็นไอออนที่สามารถดูดติดผิวได้ดี อัตราการดูดซับจะเร็วและมากหากค่าพีเอชลดลง เพราะ H^+ เพิ่มขึ้น ค่าพีเอชที่เหมาะสมของสีแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของตัวถูกดูดซับและตัวดูดซับ ด้วย ในสภาวะที่เป็นกรด มีความสามารถในการดูดซับสีได้มาก เพราะมีการเพิ่มผิวของตัวดูดซับที่เป็นประจุบวกมากขึ้น ในขณะที่สีซึ่งเป็นตัวถูกดูดซับจะเป็นประจุลบ และเมื่อมีการดูดซับเพิ่มขึ้น ผิวของตัวดูดซับ จะกลายเป็นประจุบวกมากขึ้น ทำให้พีเอชมีแนวโน้มสูงขึ้นด้วย

4.3.5 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิมิผลต่ออัตราเร็วและขีดความสามารถในการดูดติดผิว คือ อัตราเร็วของการดูดติดผิวจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ แต่ขีดความสามารถในการดูดติดผิวจะมีค่าลดลงที่อุณหภูมิสูง เพราะการดูดซับเป็นปฏิกิริยาคายความร้อน (Exothermic)

4.3.6 ความปั่นป่วน (Mixing Speed)

อัตราดูดติดผิวอาจขึ้นอยู่กับขั้นตอนการขนส่งผ่านฟิล์ม (Film Transport) และการแพร่เข้าสู่โพรง (Pore Diffusion) ในระบบที่มีความปั่นป่วนต่ำ ฟิล์มของของเหลวที่อยู่ล้อมรอบตัวดูดซับจะมีความหนามากเพราะไม่ถูกรบกวน จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเข้าไปหาตัวดูดซับทำให้ Film Transport เป็นตัวควบคุมการดูดซับ แต่ถ้ามีความปั่นป่วนสูงความหนาของชั้นฟิล์มจะลดลงทำให้โมเลกุลเคลื่อนเข้าสู่ตัวดูดซับได้เร็วขึ้น การแพร่เข้าสู่โพรงจึงเป็นตัวกำหนดอัตราเร็วในการดูดซับ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
2. เพื่อศึกษาการกำจัดสีน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725
3. เพื่อศึกษาการกำจัดสีน้ำทิ้งบ่อสุดท้าย ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการทางกายภาพ-ทางเคมี โดยใช้เถ้าปาล์มและกากชานอ้อยเป็นตัวดูดซับ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัสดุดิบ

น้ำทิ้งบ่อสุดท้ายได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ทักษิณปาล์ม (2521) จำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี และน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ได้รับความอนุเคราะห์จาก ห้างหุ้นส่วนจำกัด เพิ่มเกียรติปาล์ม จังหวัดสตูล บรรจุในแกลลอนขนาด 10 ลิตร และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

เถาปาล์ม ได้จากกระบวนการเผาไหม้เส้นใยปาล์มเพื่อใช้เป็น เชื้อเพลิงในหม้อน้ำสำหรับนำไปใช้ในกระบวนการนึ่งทะลายปาล์ม ของ โรงงานสกัดน้ำ มันปาล์ม ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ทักษิณปาล์ม (2521) จำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี บรรจุกระสอบขนาด 25 กิโลกรัม เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)

กากชานอ้อย ได้จากการบีบเอาน้ำอ้อยออก ได้รับความอนุเคราะห์จากร้านขายน้ำอ้อย บริเวณ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ นำมาตากแดดให้แห้งแล้ว บรรจุกระสอบขนาด 25 กิโลกรัม เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

2. เชื้อจุลินทรีย์

Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725 เก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ก่อนเก็บใส่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลอง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (ดัดแปลงจากโสภา จันทภาโส, 2542)

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์ค่าซีไอดี ค่าสี ค่าสารประกอบฟีนอล และกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Dic-3450 Lynge บริษัท Labogene
2. ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น UML 500 บริษัท Sanyo
3. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) รุ่น SS 325 บริษัท Tomy
4. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น HK-7E Tokyo TOA Electronic
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP210-s บริษัท Sartorius
6. เครื่องย่อยซีไอดี รุ่น Spectroquant TR 320 บริษัท Merck
7. เครื่องผสม (Vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท LAB-Line Instrument, Inc
8. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) รุ่น HS 115 บริษัท Ika Labotechnic
9. เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น RO5 บริษัท Ika Labotechnic
10. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
11. เครื่องให้อากาศ รุ่น Regent Air pump 9500
12. เครื่องวัดการไหลของอากาศ (Flow meter) บริษัท Dwyer
13. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectrouant Pharo 300 บริษัท Merck

วิธีการวิเคราะห์

1. ค่าสี

นำตัวอย่างน้ำทิ้งหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำส่วนใสมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วนำน้ำตัวอย่างที่ความเจือจางเหมาะสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร เปรียบเทียบหน่วยสี กับสารละลายมาตรฐานคลอโรเฟลทดีเน ท (APHA AWWA and WEF, 1998)

2. สารประกอบฟีนอล (Substances Reducing Folin's Phenol)

นำตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 5 มิลลิลิตร เติมโพลินส์ฟีนอล 0.1 มิลลิลิตร และน้ำยาคาร์บอน-ทาร์เทรต 1.0 มิลลิลิตร รอให้เกิดสี 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร เทียบหาความเข้มข้นฟีนอลจากกราฟมาตรฐาน ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่างแต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง (ดัดแปลงจากวิธีการของ APHA AWWA และ WEF, 1998)

3. ค่าซีโอดี (Chemical oxygen demand, COD)

เปิดน้ำตัวอย่างปริมาตรที่เหมาะสมจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 มิลลิลิตรใส่ขวดสำหรับวิเคราะห์ซีโอดี เติมเมอร์คิวรัสซัลเฟต (HgSO_4) 0.4 กรัม ใส่ลูกแก้ว 3-5 เม็ด เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 10 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริกเอเจนต์ (sulfuric reagent) 30 มิลลิลิตร นำขวดซีโอดีไปต่อกับ reflux condenser บนเตาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น ในที่มีด แล้วนำมาไทเทรตกับ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ โดยใช้ Ferroin เป็นอินดิเคเตอร์และใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างเป็นชุดควบคุม โดยจุดยุติจะได้สารละลายสีน้ำตาลแดง (APHA, AWWA and WPCF, 1988)

4. การวิเคราะห์ค่าของแข็งทั้งหมด (Total solid, TS) และของแข็งแขวนลอย (Suspended, SS)

วิเคราะห์หาค่าของแข็งทั้งหมดและของแข็งแขวนลอยในน้ำทิ้งจากบ่อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์โดยวิธีมาตรฐาน (APHA, AWWA and WPCF, 1988)

5. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ตามวิธีการของ Kjeldahl (A.O.A.C, 1990)

การวิเคราะห์ข้อ 1-5 แสดงรายละเอียดในภาคผนวก

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

6.1 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ตามวิธีการของ Leontievsky และคณะ (2001) ดังนี้

นำสารละลาย 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulphonate (ABTS) 1 มิลลิโมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5 0.1 โมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร ตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ABTS เป็น 0.2 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรรวม 2.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร นาน 1 นาที ชุดการทดลองควบคุมใช้ตัวอย่างเอนไซม์ต้มแทนเอนไซม์ปกติ หักลบค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายใน 1 นาทีของชุดควบคุมออกจากตัวอย่างแล้วจึงคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ จากสูตร

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิต/มล.)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times 2.5 \times 10^6}{\epsilon \times D}$$

ϵ_{436}

เมื่อ $\Delta A/\text{min}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายในเวลา 1 นาที

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างเอนไซม์

ϵ_{436} เท่ากับ $29300 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที

6.2 กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) ตามวิธีการของ Heinfling และคณะ (1998)

นำสารละลาย 2,6 dimethoxyphenol (2,6 DMP) 5 มิลลิโมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.01 โมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร ตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.75 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ 2,6 DMP เป็น 1 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ แมงกานีสซัลเฟต 1 มิลลิโมลาร์ และเดมิไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร (ทันทีก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง) ปริมาตรรวม 2.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 469 นาโนเมตร นาน 1 นาที ชุดการทดลองควบคุมใช้ตัวอย่างเอนไซม์ต้มแทนเอนไซม์ปกติ หักลบค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายใน 1 นาที ของชุดควบคุมออกจากตัวอย่าง แล้วจึงคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จากสูตร

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ MnP (ยูนิต/มล.)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times 2.5 \times 10^6 \times D}{\epsilon_{469}}$$

เมื่อ $\Delta A/\text{min}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายในเวลา 1 นาที

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างเอนไซม์

ϵ_{469} เท่ากับ $27500 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที

6.3 กิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) (Buswell *et al.*, 1995 อ้างโดยโสภาวรรณ รัตนพันธุ์, 2547)

นำสารละลาย veratryl alcohol 10 มิลลิโมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ *D*-tartaric acid บัฟเฟอร์ 0.25 โมลาร์ พีเอช 3 0.5 มิลลิลิตร เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.75 มิลลิลิตร

จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ veratryl alcohol เป็น 2 มิลลิโมลาร์ D-tartaric acid บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ และเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร (ทันทีก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง) ปริมาตรรวม 2.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร นาน 1 นาที ชุดการทดลองควบคุมใช้ตัวอย่างเอนไซม์คัมแทนเอนไซม์ปกติ หักลบค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายใน 1 นาที ของชุดควบคุมออกจากตัวอย่าง แล้วจึงคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จากสูตร

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ LiP (ยูนิต/มล.)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times 2.5 \times 10^6 \times D}{\epsilon_{310}}$$

เมื่อ $\Delta A/\text{min}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายในเวลา 1 นาที

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างเอนไซม์

ϵ_{310} เท่ากับ $9300 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตเกิดผลิตภัณฑ์ veratryldehyde 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที

7. การวิเคราะห์น้ำหมักแห้ง

กรองตัวอย่างน้ำทิ้งและเส้นใย ของเชื้อราผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 1) ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเส้นใยบนกระดาษกรองวางบนจานแก้ว ปล่อยให้แห้งที่ทราบน้ำหนักแน่นอน อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 45 นาที ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน กรณีน้ำหนักเส้นใยแห้งของเชื้อที่ถูกตรึงบนตัวกลาง ต้องนำน้ำหนักแห้งของตัวกลางในน้ำทิ้ง (ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ) หักลบออกจากน้ำหนักตัวกลางรวมกับเส้นใย ซึ่งเป็นน้ำหนักของเส้นใยสุทธิ (AOAC., 1999)

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

วิเคราะห์คุณลักษณะ ของน้ำทิ้งสุดท้าย และน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์ค่า chemical oxygen demand (COD), total solid (TS), suspended solid (SS), สารประกอบฟีนอล โดยใช้วิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำ

เสี่ย (APAH, AWWA and WCPF, 1985) วิเคราะห์ค่าสีโดยใช้วิธีเปรียบเทียบ กับแพลทตินัม โคบอลต์มาตรฐาน (Platinum Cobalt Standard) (ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และอุษา วิเศษสุนัน, 2535)

2. ผลของการใช้น้ำทิ้งดีแคนเตอร์เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญและ การกำจัดสี โดยเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725

2.1 การทดสอบบนอาหารแข็ง

นำน้ำทิ้งป้อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ผสมกัน ในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 2:1 และ 3:1 เติมผงวุ้นร้อยละ 1.5 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเตรียมเป็นอาหารแข็ง จากนั้นเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยการถ่ายเส้นใยเชื้อรา *P. chrysosporium* ATCC 24725 ลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตัดเส้นใยราที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน บริเวณขอบโคโลนี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร (โดยใช้ cork borer เจาะวุ้น) จำนวน 1 ชิ้น วางบนอาหารแข็งที่มีน้ำทิ้งในอัตราส่วนต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่ง เส้นใยเจริญ สังเกตและบันทึกการเจริญของเส้นใยและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันเป็นเวลา 30 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำโดยเปรียบเทียบกับอาหารแข็งที่ไม่วางเชื้อรา (ชุดควบคุม) คัดเลือกรากที่สามารถเจริญและกำจัดสีของน้ำทิ้งที่อัตราส่วนที่เหมาะสม

2.2 การทดสอบในอาหารเหลว

นำน้ำทิ้งป้อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ผสมกัน ในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 2:1 และ 3:1 (ไม่ฆ่าเชื้อ) เตรียมเชื้อเริ่มต้น โดยเลี้ยง *P. chrysosporium* ATCC 24725 บนอาหารพีดีเอ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เจาะเส้นใยของเชื้อรามาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร (โดยใช้ cork borer เจาะวุ้น) จำนวน 2 ชิ้น ลงในอาหารที่มีน้ำทิ้งป้อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ผสมกันด้วยอัตราส่วนต่างๆ ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร พลาสติกละ 60 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า 130 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 วัน นำไปวัดการเจริญ พีเอช ค่าสี สารประกอบฟีนอล ค่าซีไอดี และกิจกรรมของเอนไซม์ แลคเตส, แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส เลือกอัตราส่วน ของน้ำทิ้งป้อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่เหมาะสมที่เชื้อสามารถเจริญและ กำจัดสีน้ำทิ้งได้ (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมเชื้อราเป็นชุดควบคุม)

3. ผลของการให้อากาศต่อการกำจัดสีของน้ำทิ้งบ่อสุดท้าย

ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการกำจัดสี ของน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัด น้ำมันปาล์ม โดยทดสอบในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำทิ้งสุดท้าย (ไม่ฆ่าเชื้อ) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ให้อากาศด้วยเครื่องให้อากาศขนาดเล็ก ผ่านเครื่องวัด อัตราการไหลของอากาศ (Flow meter) ในอัตรา 2.5 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที (สุรศักดิ์ บุญรุ่ง, 2555) ที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ ไม่มีการให้อากาศ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน นำไปวัดค่าพีเอช ค่าสี สารประกอบฟีนอล และค่าซีโอดี

4. การกำจัดสีของน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายด้วยวิธีการทางกายภาพ

4.1 ผลของปริมาณถ้ำปาล์ม

ศึกษาการกำจัดสีของน้ำทิ้ง บ่อสุดท้ายโดยเติมถ้ำปาล์มปริมาณ 1, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงในน้ำทิ้งสุดท้าย ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า 125 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง นำไปวัดพีเอช ค่าสี และค่าสารประกอบฟีนอล เลือกปริมาณถ้ำปาล์มที่เหมาะสมที่สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งได้ ไปใช้ในการทดลองต่อไป (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมถ้ำปาล์มเป็นชุดควบคุม)

4.2. ผลของการกำจัดสีในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยถ้ำปาล์มโดยใช้กากชานอ้อย

นำตัวอย่างน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยถ้ำปาล์มในปริมาณที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 4.1) มาบำบัดต่อด้วยกากชานอ้อยโดยนำตัวอย่างน้ำ ทิ้งส่วนใสที่แยกถ้ำปาล์มออก แล้วปริมาตร ฟลาสก์ละ 400 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เป็นน้ำทิ้งสุดท้ายที่ยังไม่ได้ผ่านการบำบัด ด้วยถ้ำปาล์ม เก็บตัวอย่างนำไปวัดพีเอช ค่าสี และค่าสารประกอบฟีนอล

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. องค์ประกอบของน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีความแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่มาของน้ำทิ้ง คุณภาพของวัตถุดิบ กระบวนการผลิต ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง ตำแหน่งที่สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง และวิธีการเก็บรักษา เป็นต้น โดยลักษณะทางกายภาพของน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายที่ใช้ทดลองนี้ มีลักษณะค่อนข้างใส ไม่มีไขมันลอยที่ผิวน้ำ มีสารแขวนลอยน้อยมาก เนื่องจากเป็นน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายก่อนถูกนำไปใช้รดน้ำดินปาล์มน้ำมันในสวนของเกษตรกร และเป็นน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยการนำไปผลิตก๊าซชีวภาพแล้ว ส่วนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลดำขุ่น มีไขมันลอยที่ผิวน้ำเล็กน้อย น้ำทิ้งบ่อสุดท้าย มีค่าพีเอชเป็น 9.5 ซึ่งแตกต่างจากน้ำทิ้งส่วนอื่นของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีสภาพเป็นกรด ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศมีการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้สารประกอบพวกแอมโมเนีย รวมทั้งการใช้กรดไขมันเป็นสารอาหารของจุลินทรีย์ ทำให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น ในขณะที่น้ำทิ้งดีแคนเตอร์มีค่าความเป็นกรดสูง (มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.3) เนื่องจากน้ำมันบางส่วนมีการ แตกตัวเป็นกรดไขมัน โดยทั่วไปเมื่อน้ำทิ้งมีค่า พีเอชเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของสีจะเพิ่มขึ้นด้วย (Corroll, 1985 อ้างโดยโสภารรณ รัตนพันธุ์, 2547) โดยมีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำเมื่อวัดค่าสีโดยใช้วิธีเปรียบเทียบแพลทตินัมโคบอลต์มาตรฐานมีค่า 2,417 หน่วยสี เนื่องจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มไม่มีการเติมสารเคมี สีน้ำตาลที่เกิดขึ้นจึงเป็นสีที่แท้จริง เกิดจากการสลายตัวของพืชและสารอินทรีย์ ที่มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและโครงสร้างในผลปาล์มน้ำมันที่ผ่านความร้อนในขั้นตอนการนึ่งปาล์ม และ ขั้นตอนการหีบอัด ได้แก่ รงควัตถุพวก กแอนโทไซยานิน และแคโรทีน ที่อยู่ในส่วน pericarp ของผลปาล์ม (Hartley, 1977 อ้างโดยโสภารรณ รัตนพันธุ์, 2547) สารประกอบพวกโพลีฟีนอล เป็นตัวหลักที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลคล้ำถึงดำ (Mebirouk *et al.*, 2007) ลิกนินและแทนนินในพืชเกิดการสลายตัวแล้วรวมตัวกันเกิดเป็นโพลีเมอร์ของฟีนอลิก แล้วจึงเกิดปฏิกิริยาต่อไปเป็นสาร อินทรีย์ในกลุ่มฮิวมิก ดังนั้นสีของน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายที่ผ่านการบำบัด มาแล้วและมีพีเอชช่วง ที่เป็นด่าง (พีเอช 8-9) น่าจะเป็นกรดฮิวมิกเนื่องจากน้ำทิ้งมีค่าพีเอชสูง นอกจากนี้สีน้ำตาลยังเกิดจาก สารประกอบพวกเมลานอย ดิน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา การเกิดสีน้ำตาลที่ไม่ใช่เอนไซม์ ระหว่างน้ำตาลและกรดอะมิโนภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูง จากผลการวิเคราะห์น้ำทิ้ง บ่อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ แสดงใน Table 4 จะเห็นว่า น้ำทิ้งบ่อสุดท้ายมีค่าซีไอดี 1,586 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าของแข็งทั้งหมด 3,840 มิลลิกรัม

ต่อลิตร มีค่าของแข็งแขวนลอย 2,170 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารประกอบฟีนอล 43.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ มีค่าซีไอดี 95,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าของแข็งทั้งหมด 64,600 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าของแข็งแขวนลอย 27,332 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารประกอบฟีนอล 700 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าซีไอดีบ่งบอกถึงปริมาณสารอินทรีย์ ซึ่งน้ำทิ้งดีแคนเตอร์มีมากกว่าน้ำทิ้ง บ่อสุดท้ายเกือบ 60 เท่า ในขณะที่ค่าของแข็งทั้งหมดและปริมาณฟีนอลมีมากกว่าถึง 16 เท่า จะเห็นว่าน้ำทิ้งดีแคนเตอร์เป็นทั้งแหล่งของสารอาหารให้กับเชื้อราที่ใช้ในการกำจัดสี และเป็นแหล่งของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจากการมีฟีนอลปริมาณสูง ดังนั้น จึงต้องมีการศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสม

Table 4. Characteristics and chemical composition of the final anaerobic pond and decanter effluent of a palm oil mill

Parameters ^a	Final Effluent	Decanter Effluent
Appear color	Dark-brown	Dark-brown
Color (OD ₄₇₅)	2,417	20,000
pH	9.5	4.3
COD	1,586	95,000
Total solids (TS)	3,840	64,600
Suspended solids (SS)	2,170	27,332
Total phenol	43.01	700
Total nitrogen	277	1,101

^aExcept for color and pH, all other parameters are in mg/L

2. ผลของการใช้น้ำทิ้งดีแคนเตอร์เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญและการกำจัดสีโดยเชื้อรา

2.1 การทดสอบบนอาหารแข็ง

ในการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อรามาใช้ในการกำจัดสีในน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เนื่องจากสารอาหารมีความจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อราและสารอาหารที่มีในน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายมีน้อยรวมทั้งเป็นสารอาหารชนิดที่ย่อยสลายได้ยาก ดังนั้นจึงต้องมีการเพิ่มสารอาหาร หากมีการเติมสารอาหารทางการค้าจะเป็นการสิ้นเปลืองและไม่คุ้มค่ารวมทั้งอาจเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงทดลองนำน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นแหล่งของสารอาหารให้กับเชื้อราในการทดลองครั้งนี้

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 บนอาหารแข็งที่มีน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ผสมกัน ในอัตราส่วน 1:0 1:1 2:1 และ 3:1 ซึ่งมีค่าซีไอดีเริ่มต้นเป็น 3,333 37,866 32,933 และ 28,533 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และบ่มงานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วัน พบว่าเชื้อรา *P. chrysosporium* ATCC 24725 ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายที่ไม่เติมน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ (อัตราส่วน 1:0) แต่เจริญได้ดีในน้ำทิ้งสุดท้ายที่มีการเติมน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่ อัตราส่วน 1:1, 2:1 และ 3:1 เชื้อราเจริญเป็นคราบสีขาวแผ่เต็มบริเวณผิวหน้า ของอาหารแข็ง โดยในแต่ละอัตราส่วนมีอัตราการเจริญแตกต่างกัน (Table 5) ที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 เชื้อราเริ่มเจริญตั้งแต่วันที่ 4 ของการเลี้ยง และที่อัตราส่วน 3:1 เชื้อราเริ่มเจริญตั้งแต่วันที่ 5 ของการเลี้ยง เมื่อสังเกตการกำจัดสีของน้ำทิ้งในงานอาหาร (Figure 6a) พบว่าที่อัตราส่วน 1:0 เชื้อราไม่เจริญจึงไม่มีการจางสีของอาหารแข็งน้ำทิ้ง แต่ที่อัตราส่วน 1:1 2:1 และ 3:1 เชื้อราเจริญและเกิดการจางสีอาหารแข็ง ของน้ำทิ้ง และมีระดับการจางสีแตกต่างกัน (Table 6) โดยที่อัตราส่วน 1:1 มีการจางสีของอาหารแข็งของน้ำทิ้งเพียงเล็กน้อยซึ่งไม่แตกต่างกับชุดควบคุมที่มีสีน้ำตาลเข้มมากนั้ก (Figure 6b) แต่สำหรับที่อัตราส่วน 2:1 และ 3:1 เชื้อราเจริญได้ดีและทำให้เกิดการจางสีของอาหารแข็ง ของน้ำทิ้งมากและมีสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีสีน้ำตาลเข้ม (Figure 6c, 6d) ที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 เชื้อรา *P. chrysosporium* ATCC 24725 ทำให้สีจางลงตั้งแต่วันที่ 6 ของการเลี้ยง และที่อัตราส่วน 3:1 การจางสีเริ่มตั้งแต่วันที่ 7 ของการเลี้ยง การจางสีของอาหารน้ำทิ้งนี้เกิดขึ้นหลังจากเชื้อรามีการเจริญ เนื่องจากเชื้อมีการใช้สารอาหารในการเจริญ ซึ่ง สารอาหารเหล่านี้ได้จากสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง เมื่อองค์ประกอบที่ทำให้เกิดสีในน้ำทิ้ง เช่น สารประกอบฟีนอล ถูกดึงไปใช้เป็น สารอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อจึงเกิดการจางสีของอาหารน้ำทิ้ง

จากผลการทดลองถึงแม้ว่าการใช้น้ำทิ้งดีแคนเตอร์เป็นสารอาหาร จะทำให้สีของอาหารเพิ่มขึ้น แต่ก็ทำให้เชื้อราสามารถเจริญได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อเชื้อรามีการเจริญจึงมีการจางสีของอาหารน้ำทิ้งได้

Table 5. Effect of ratio of final effluent : decanter effluent on mycelial growth of *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 cultivated on agar plate at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 days

Days	Colony size (cm) of <i>P. chrysosporium</i> ATCC 24725 on agar plate for 30 days					
	0 – 5	6 – 10	11 – 15	16 – 20	21 – 25	26 – 30
Ratio						
1:0	-	-	-	-	-	-
1:1	1.5	1.8	3.9	6.4	8.9	8.9
2:1	2.0	2.6	5.0	6.8	8.9	8.9
3:1	2.2	3.0	5.2	7.0	8.9	8.9

(-) -Negative result

Table 6. Effect of ratio of final effluent : decanter effluent on decolorization during cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 on agar plate at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 days

Days	Level of Decolorization					
	0 – 5	6 – 10	11 – 15	16 – 20	21 – 25	26 – 30
Ratio						
1:0	-	-	-	-	-	-
1:1	-	+	+	+	++	++
2:1	-	+	++	+++	++++	++++
3:1	-	+	++	+++	++++	+++++

(+) -Positive result; Increasing decolorization level, (-) -Negative result

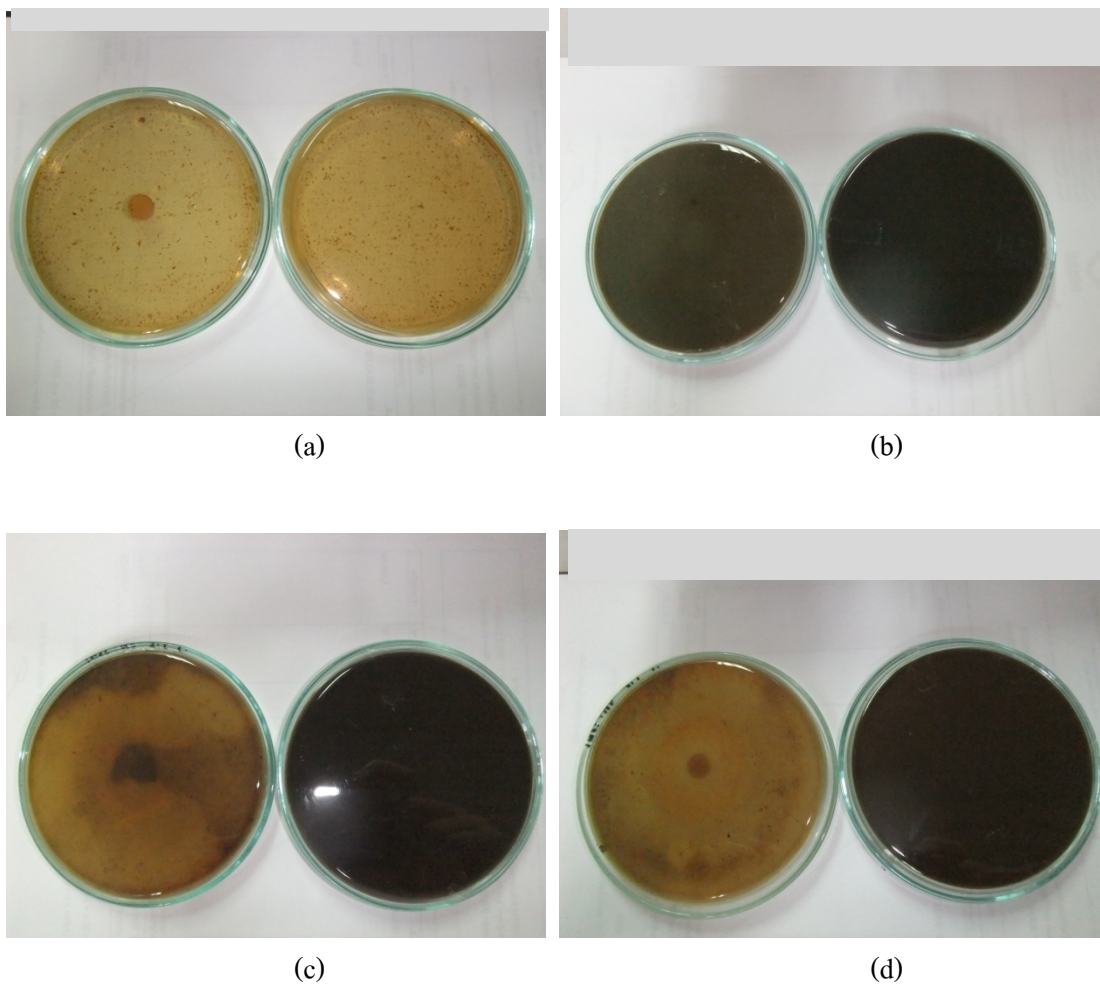


Figure 6. Effect of final effluent : decanter effluent of 1:0 (a), 1:1 (b), 2:1 (c) and 3:1 (d) on growth and decolorization during cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 on agar plate at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 days

2.2 การทดสอบในอาหารเหลว

น้ำทิ้งบ่อสุดท้ายผสม น้ำทิ้งดีแคนเตอร์ในอัตราส่วน 1:0 1:1 2:1 และ 3:1 โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9.5 5.7 7.2 และ 7.9 ตามลำดับ (Figure 7) แสดงว่า การเติมน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ในน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายมีผลให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงตามลำดับ ค่าพีเอชมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา (Gadd, 2001) จากการทดลองน้ำทิ้งมีค่า พีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.7 – 9.5 ในสถานะที่น้ำทิ้งเป็นด่างเชื้อราเจริญได้ไม่ดี (Table 7) และไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ จึงทำให้ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ในการทดลองครั้งนี้

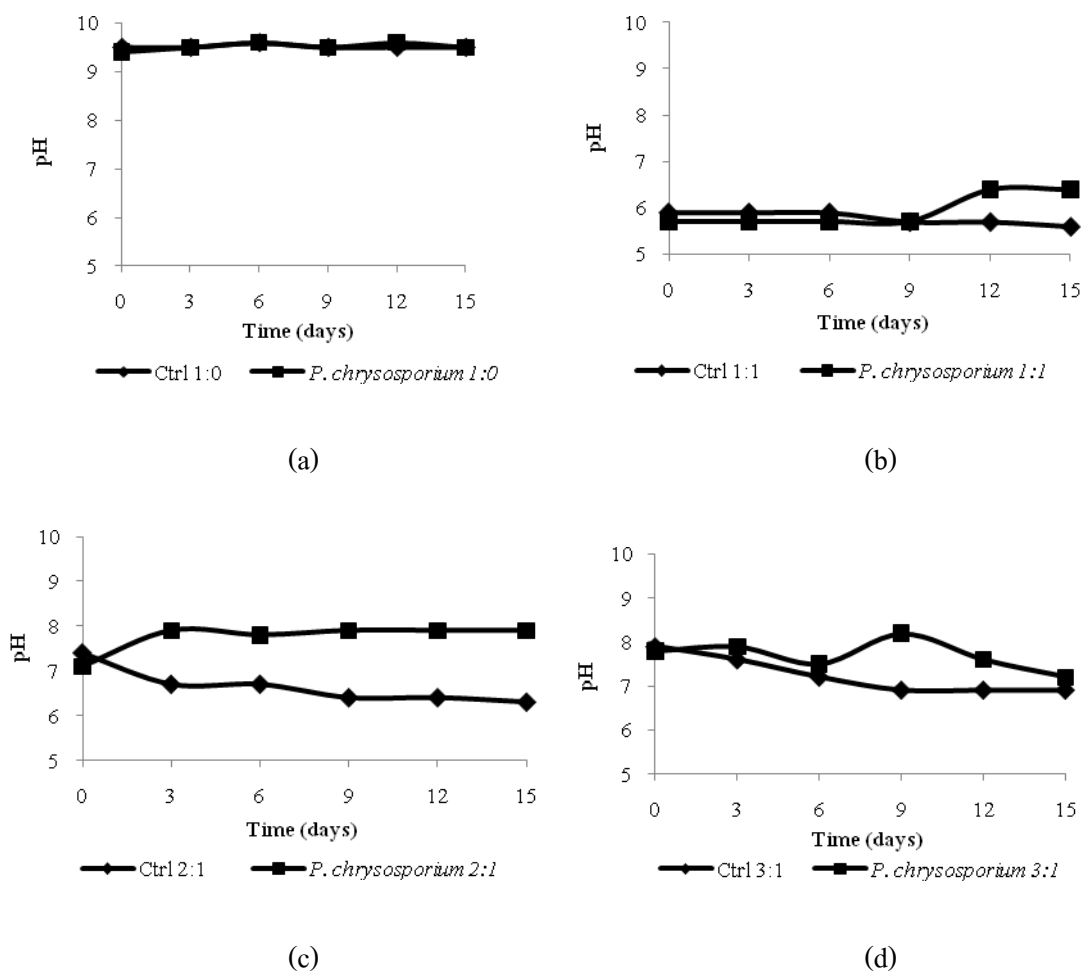


Figure 7. Time course of pH changes during cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 in POME : decanter effluent of 1:0 (a), 1:1 (b), 2:1 (c) and 3:1 (d) on a shaker (130 rpm)

Table 7. Profile of dry cell weight of *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 during cultivation in the final effluent: decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 days

Days	Dry Cell Weight (g/L)					
	0	3	6	9	12	15
Ratio						
1:0	0	0	0	0	0	0
1:1	0	0.9	0.11	0.13	0.16	0.16
2:1	0	0.5	0.7	0.8	0.8	0.9
3:1	0	0.6	0.8	0.8	0.9	0.9

เมื่อเลี้ยง *P. chrysosporium* ATCC 24725 ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า (130 รอบต่อนาที) เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้ง พบว่า จากการสังเกตด้วยตาเปล่า การเติมน้ำทิ้งดีแคนเตอร์เพิ่มขึ้น (น้ำทิ้งบ่อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ที่อัตราส่วน 1:1 2:1 และ 3:1) มีผลให้สีของน้ำทิ้งทุกการทดลองเพิ่มขึ้น และทำให้ค่าสีเพิ่มขึ้นโดยมีค่าสีเริ่มต้นของ น้ำทิ้งบ่อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ที่อัตราส่วน 1:0 1:1 2:1 และ 3:1 เท่ากับ 2,697 20,916 15,167 และ 10,333 PtCo ตามลำดับ (Table 8) แต่เมื่อทดลองแล้วทุกชุดการทดลองน้ำทิ้งที่ได้มีลักษณะใสขึ้น มีตะกอนน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด จะเห็นว่าในวันที่ 3 น้ำทิ้งที่อัตราส่วน 3:1 ที่มีการเลี้ยงเชื้อ มีสีเข้มน้อยลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่น้ำทิ้งอัตราส่วนเดียว แต่ยังคงมีสีเข้มกว่าชุดการทดลองที่อัตราส่วน 1:0 (ชุดควบคุม) ในวันที่ 6 น้ำทิ้งที่อัตราส่วน 2:1 และ 1:1 สีเข้มน้อยลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่น้ำทิ้งอัตราส่วน 2:1 แต่ยังคงมีสีเข้มกว่าชุดการทดลองที่อัตราส่วน 1:0 เมื่อนำไปวัดค่าสีพบว่าที่อัตราส่วน 1:0 1:1 2:1 และ 3:1 ชุดควบคุมทุกชุดมีค่าสีเพิ่มขึ้น ส่วนชุดที่มีการเลี้ยงเชื้อมีค่าหน่วยสีลดลงตั้งแต่วันที่ 3 ของการเลี้ยงซึ่งมีค่าลดลงร้อยละ 6.7, 45, 12 และ 20 ตามลำดับ นั่นคือ การลดสีมากที่สุดที่อัตราส่วน 1:1 (Figure 8) ซึ่งกลไกการกำจัดสีด้วยเชื้อรา มี 2 ประเภท คือ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่ม ลิคไนโนไลติก เรียกว่า Biodegradation ซึ่งเป็นกลไกหลักในการกำจัดสีโดยเชื้อรากลุ่มไวท์รอต และการดูดซับสีของเชื้อรา เรียกว่า Biosorption การดูดซับด้วยเชื้อรา มีข้อดี โดยเฉพาะในน้ำเสียที่มีสารพิษมาก (Srikanlayanukul, 2007)

Table 8. Profile of color removal of *P. chrysosporium* ATCC 24725 during cultivation in the final effluent: decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 days

Days	Color (PtCo)					
	0	3	6	9	12	15
Ratio						
1:0	2,697	2,508	2,994	3,209	2,994	2,589
1:1	20,916	11,504	16,314	10,458	13,177	12,549
2:1	15,167	13,347	14,105	13,195	11,224	10,617
3:1	10,333	8,266	8,679	8,473	9,713	9,609

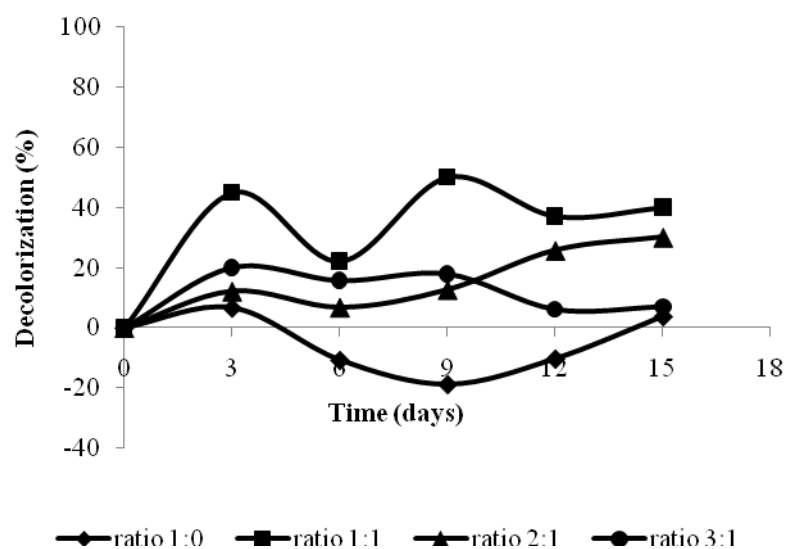


Figure 8. Time course of decolorization during cultivation *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 in the final effluent: decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบด้วยสารประเภท chitin, chitosan, β -glucan, lipid และ phospholipids ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิล ($R-COOH$), หมู่อะมิโน (R_2NH , $R-NH_2$), phosphates, lipids, melanin, sulphates ($R-OSO_3$) และ hydroxides (OH) จึงมีคุณสมบัติในการดูดซับ (Lacina *et al.*, 2003) ซึ่งระดับการดูดซับขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ ในเชื้อราบาง ชนิดกลไกการกำจัดสีมีเพียงการดูดซับ แต่สำหรับเชื้อรากลุ่มไวท์รอตมีการดูดซับและการย่อยสลาย โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการดูดซับสีไว้บนเส้นใยของเชื้อรา (Gadd, 2001) และการดูดซับโดยจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่สนับสนุนการเจริญ และการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ (Srikanlayanukul, 2007)

สำหรับปริมาณฟีนอล ค่าฟีนอลเริ่มต้นของน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่อัตราส่วน 1:0 1:1 2:1 และ 3:1 เท่ากับ 104, 918, 599 และ 471 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 9) หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15 วัน ปริมาณฟีนอลลดลง เท่ากับ 101 597 485 และ 452 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หรือลดลง 2.8, 35, 19 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1:1 ค่าซีไอดีเริ่มต้นของน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายและน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ ที่อัตราส่วน 1:0 1:1 2:1 และ 3:1 เท่ากับ 3,333 37,866 32,933 และ 28,533 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 10) แต่เมื่อทดลองเป็นเวลา 15 วัน ค่าซีไอดีลดลง เท่ากับ 3,599 16,661 18,772 และ 16,264 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่อัตราส่วน 1:0 ค่าซีไอดีค่อนข้างคงที่ ส่วนที่อัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 3:1 ค่าซีไอดีลดลงเท่ากับ 56, 43 และ 43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1:1

ในทุกชุดการทดลอง ค่าสารประกอบฟีนอล (Figure 9) และค่าซีไอดี (Figure 10) เริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง ยกเว้นที่น้ำทิ้งอัตราส่วน 1:0 ที่มีค่าฟีนอลและค่าซีไอดีเพิ่มขึ้น ในระหว่างการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำทิ้งจะเกิดปฏิกิริยาแบบ auto-oxidation ของสารประกอบฟีนอลและแทนนินในน้ำทิ้ง สีของน้ำทิ้งจึงมีสีคล้ำขึ้นและยังทำให้ยากต่อการกำจัดสีด้วยวิธีการทางชีวภาพ (Assas *et al.*, 2002) การที่สารประกอบฟีนอลลดลงมีความสัมพันธ์กับการใช้และการลดลงของสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งด้วย (Garcia *et al.*, 2000)

Table 9. Profile of phenol removal of *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 during cultivation in the final effluent: decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 days

Days	Phenol (mg/L)					
	0	3	6	9	12	15
Ratio						
1:0	104	97	110	115	107	101
1:1	918	817	450	597	423	597
2:1	599	515	569	515	479	485
3:1	471	457	466	400	438	452

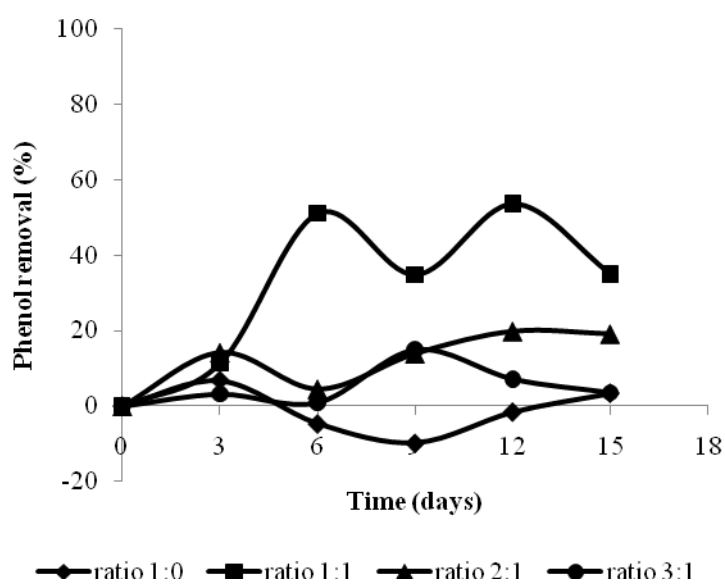


Figure 9. Time course of phenol removal during cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 in the final effluent: decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Table 10. Profile of COD removal of *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 during cultivation in the final effluent: decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 days

Days	COD (mg/L)					
	0	3	6	9	12	15
Ratio						
1:0	3,333	3,933	3,833	3,966	3,399	3,599
1:1	37,866	31,807	19,312	18,554	19,690	16,661
2:1	32,933	27,664	30,628	25,029	21,077	18,772
3:1	28,533	26,536	24,824	20,544	15,693	16,264

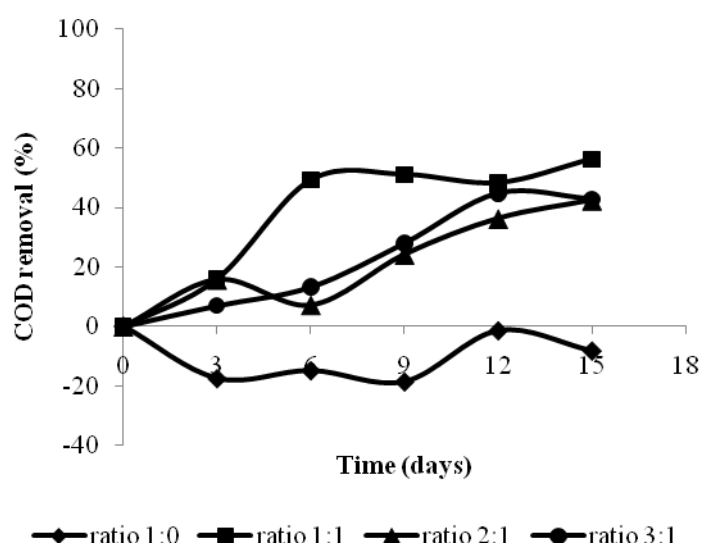


Figure 10. Time course of COD removal during cultivation of *P. chrysosporium* ATCC 24725 in the final effluent : decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

จากผลการทดลองใน Table 11 จะเห็นว่าถึงแม้ว่าในแต่ละอัตราส่วน การลดลงของสีลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในแต่ละอัตราส่วน แต่ค่าที่ได้หลังจาก การเพิ่มน้ำทิ้งดีแคแวนเตอร์ของทุกชุดการทดลอง (อัตราส่วน 1:1, 2:1 และ 3:1) มีมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเพิ่มน้ำทิ้งดีแคแวนเตอร์ (อัตราส่วน 1:0)

Table 11. Comparison on color, COD and phenol removal efficiency during cultivation

Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725 in the final effluent : decanter effluent of 1:0 1:1 2:1 and 3:1 on a shaker (130 rpm) at $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 15 days

Ratio	1:0		1:1		2:1		3:1	
	0	15	0	15	0	15	0	15
Days								
Color (PtCo)	2,697	2,589	20,916	12,549	15,167	10,617	10,333	9,609
COD (mg/L)	3,333	3,599	37,866	16,661	32,933	18,772	28,533	16,264
Phenol (mg/L)	104	101	918	597	599	485	471	452

3. ผลของการให้อากาศต่อการกำจัดสีของน้ำทิ้งบ่อสุดท้าย

ทดลองกำจัดสีของน้ำทิ้งสุดท้ายด้วยเชื้อธรรมชาติที่มีอยู่ในน้ำทิ้งโดยการให้อากาศ เพื่อเร่งการเจริญของกลุ่มเชื้อที่ต้องการอากาศ ใช้ อัตรา การไหลของอากาศที่ 2.5 vvm ที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการให้อากาศ พบว่า ชุดการทดลองที่มีการให้อากาศมีการกำจัดสี 64.62 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 3 วันของการทดลอง ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่มีการให้อากาศไม่มีการกำจัดสีและยังมีค่าสีเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (Figure 11a) นอกจากนี้ชุดการทดลองที่มีการให้อากาศยังสามารถลดสารประกอบฟีนอล สารประกอบฟีนอล 51.19 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 7 วัน (Figure 11b) ส่วนสารอินทรีย์ (ซีไอดี) ลดลง 34.83 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 6 วันของการทดลอง (Figure 11c) และจาก Table 12 เปรียบเทียบให้เห็นค่าที่ได้หลังจากการทดลอง กำจัดสีด้วยการให้อากาศกับการไม่ให้อากาศ

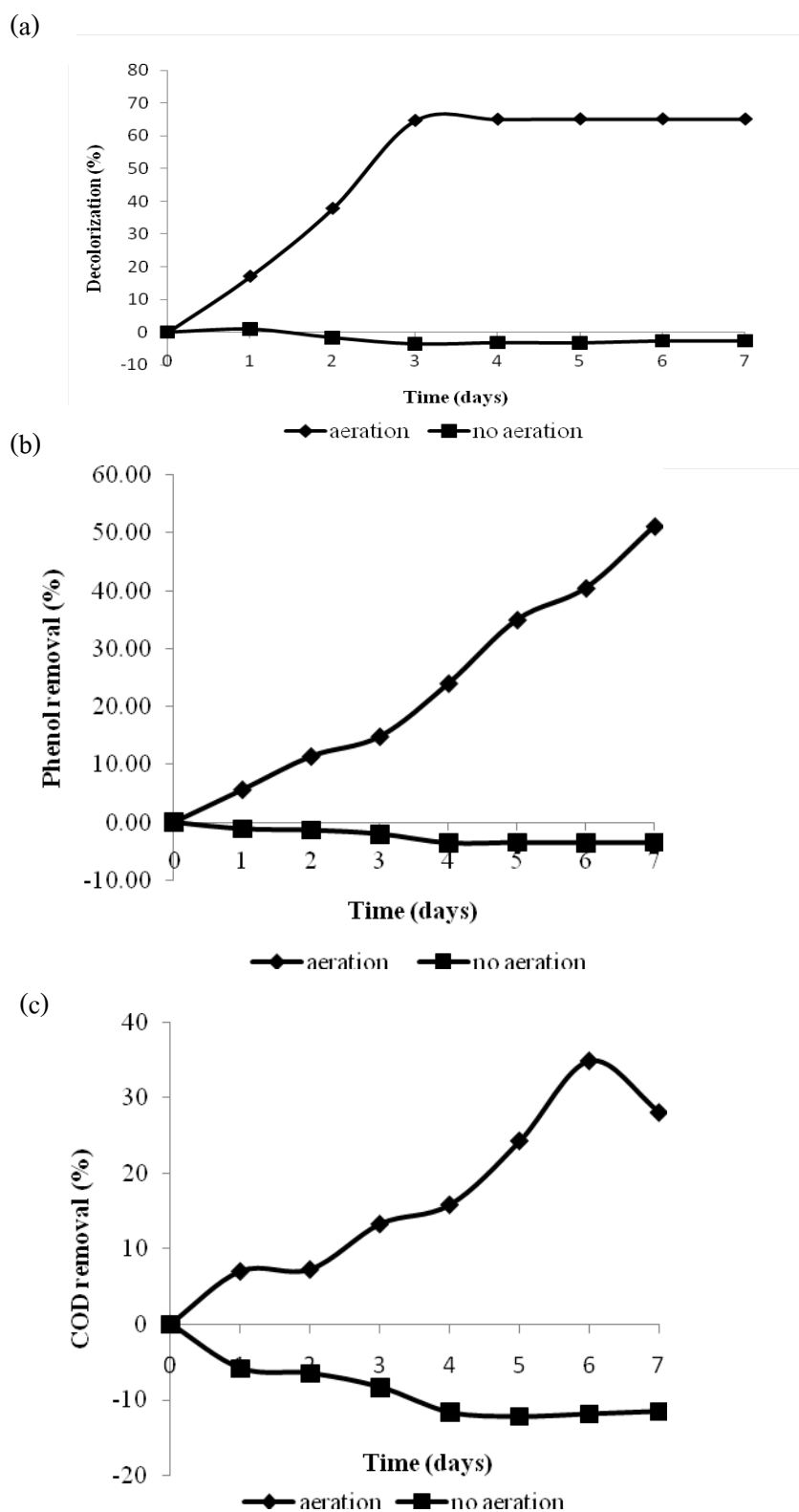


Figure 11. Effect of aeration on color removal (a), phenol removal (b) and COD removal (c) of the final effluent of palm oil mill

Table 12. Comparison on color, COD and phenol removal efficiency in final effluent from palm oil mill under aeration condition and no aeration condition

Days	Aeration			No aeration		
	Color (PtCo)	Phenol (mg/L)	COD (mg/L)	Color (PtCo)	Phenol (mg/L)	COD (mg/L)
0	2,697	64	2,456	2,700	65	2,478
1	2,238	60	2,284	2,673	65	2,626
2	1,699	57	2,259	2,727	65	2,651
3	970	54	2,137	2,808	66	2,676
4	970	49	2,063	2,781	67	2,750
5	943	42	1,867	2,781	66	2,755
6	943	38	1,596	2,754	67	2,750
7	943	31	1,768	2,754	66	2,750

4. การกำจัดสีของน้ำทิ้งสุดท้ายด้วยวิธีการทางกายภาพ

4.1 ผลของปริมาณเถ้าปาล์ม

ทดลองเติมเถ้าปาล์มที่ปริมาณต่างๆในน้ำทิ้งสุดท้าย โดยมีชุดการทดลองที่ไม่มี การเติมเถ้าปาล์มเป็นชุดควบคุม หลังการทำปฏิกิริยา 8 ชั่วโมง (Table 13) พบว่า การเพิ่มเถ้าปาล์ม ปริมาณ 1, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีความสามารถในการกำจัดสี 22.5, 32.8, 36.0 52.6 และ 57.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 12) การกำจัดสีเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่ม ตามปริมาณเถ้าปาล์ม ที่เพิ่มขึ้น (Figure 13) นอกจากการกำจัดสีแล้วเถ้าปาล์มยังสามารถลดสารประกอบฟีนอล โดยลด ได้ 4.4, 23.8, 36.2, 52.8 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 14) และลดซีไอดีได้ 13, 21, 35, 48 และ 52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Figure 15)

Table 13. Effect of palm ash concentration on color, phenol and COD removal of final effluent of palm oil mill after 8 h incubation time

Palm ash conc.	0 %	1 %	5 %	10 %	15 %	20 %
Color (PtCo)	2,670	2,104	1,807	1,726	1,267	1,132
Phenol (mg/L)	60	61	50	42	31	29
COD (mg/L)	1,427	1,379	1,253	1,031	825	761

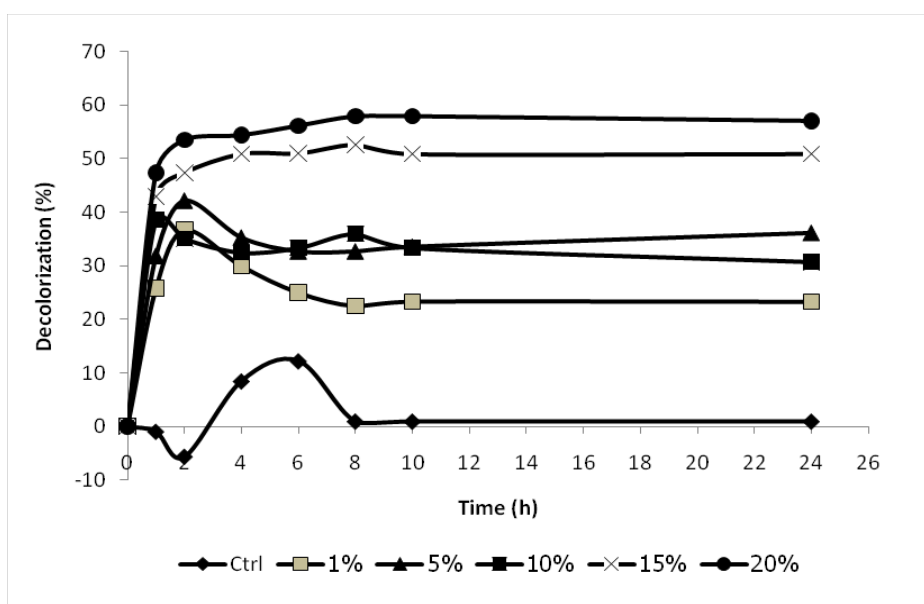


Figure 12. Effect of palm ash concentration and incubation time on decolorization of final effluent of palm oil mill



Figure 13. Comparison on color of final effluent before by using 0, 1, 5, 10,15 and 20 % (w/v) palm ash, respectively

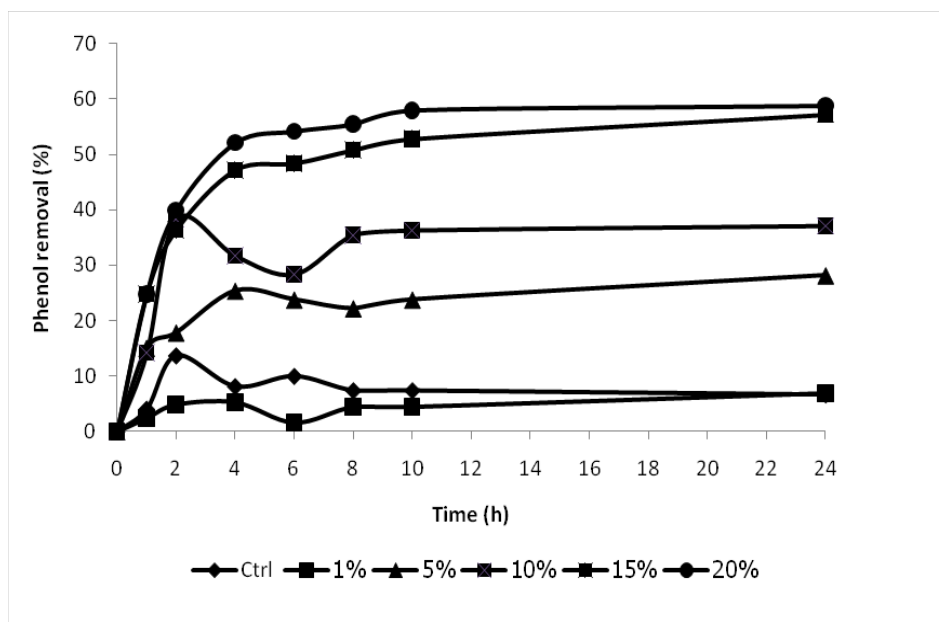


Figure 14. Effect of palm ash concentration and incubation time on phenol removal of final effluent of palm oil mill

เถ้าปาล์มจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มผ่านการใช้อุณหภูมิสูงทำให้สารระเหยถูกปล่อยออกมาจึงเกิดรูพรุนเป็นจำนวนมาก ทำให้เถ้าปาล์มมีคุณสมบัติเป็นตัวดูดซับ นอกจากนี้ องค์ประกอบส่วนใหญ่ของเถ้าปาล์มคือสารประกอบของออกไซด์ เช่น ซิลิกอนไดออกไซด์ (SiO₂) 44.84 เปอร์เซ็นต์ อะลูมิเนียมออกไซด์ (Al₂O₃) 1.12 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมออกไซด์ (CaO) 12.01 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) 3.22 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมออกไซด์ (K₂O) 4.99 เปอร์เซ็นต์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₃) 1.66 เปอร์เซ็นต์ (พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์, 2552) จึงมีคุณสมบัติเป็นตัวดูดซับที่ดี

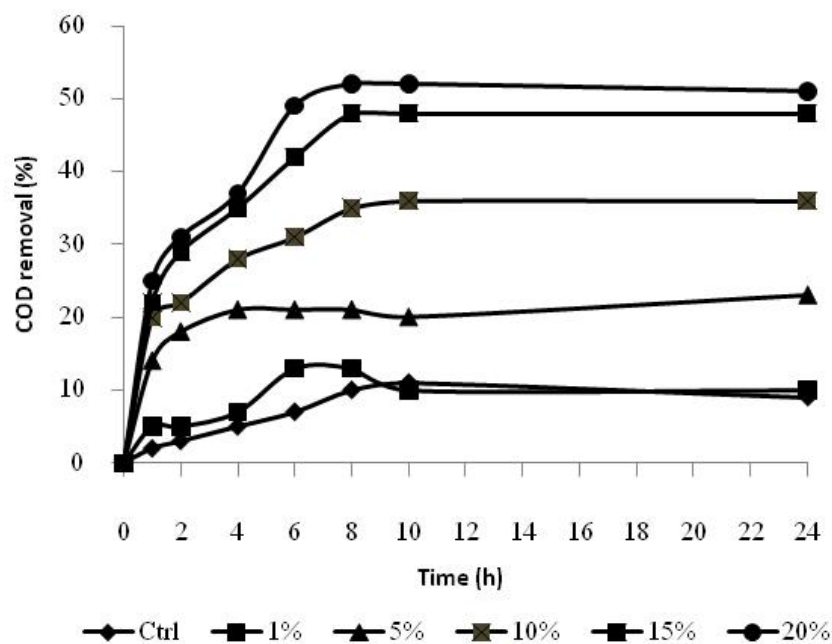


Figure 15. Effect of palm ash concentration and incubation time on COD removal of final effluent of palm oil mill

สำหรับค่าพีเอช (pH) เริ่มต้นของแต่ละชุดการทดลอง โดยที่เถ้าปาล์มปริมาณ 1 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีค่าพีเอชเท่ากับ 9.02 9.09 9.08 9.09 และ 9.08 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมเถ้าปาล์ม (ชุดควบคุม) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8.98 การที่เถ้าปาล์มแสดงคุณสมบัติเป็นด่างเมื่ออยู่ในสารละลายเนื่องจากที่บนผิวมีหมู่ฟังก์ชันออกไซด์ที่เป็นด่าง โดยเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนเป็นส่วนประกอบ เช่น หมู่ควินิน (Quinines) หมู่ฟีนอล (Phenols) และหมู่คาร์บอกซิเลต (Carboxylates) เป็นต้น ทำให้สามารถดูดซับสารปนเปื้อนจาก

สารละลาย หมู่ฟังก์ชันประเภทนี้มักพบในถ่านกัมมันต์ที่ เตรียมจากการกระตุ้นด้วยไอน้ำหรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิสูงมากประมาณ 1,000-1,200 องศาเซลเซียส ผลิตจากวัตถุคิบจำพวกกะลามะพร้าว ถ่านหิน หรือวัสดุชีวมวลที่มีองค์ประกอบธาตุคาร์บอนไม่สูงมากนัก (รัตนภรณ์ ไชยาพงศ์พิพัฒน์, 2549)

4.2 ผลของการกำจัดสีในน้ำทิ้งหลังการบำบัดด้วยถ่านปาล์มโดยใช้กากชานอ้อย

น้ำทิ้งที่ใช้ทดลองเป็นน้ำทิ้งสุดท้ายที่ผ่านการกำจัดสีด้วยถ่านปาล์ม 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยแยกถ่านปาล์มออกแล้วนำน้ำทิ้งมาแช่กับกากชานอ้อยที่ตากแห้งมาแล้ว โดยน้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมกากชานอ้อยเป็นชุดควบคุม พบว่า ที่ระยะเวลา 10 ชั่วโมงของการทดลอง ค่าสีลดลง 25.3 เปอร์เซ็นต์ (Figure 16a) และค่าสารประกอบฟีนอลลดลง 21.8 เปอร์เซ็นต์ (Figure 16b) การที่กากชานอ้อยไม่สามารถลดสีและสารประกอบฟีนอลได้มากเท่าที่ควร อาจเนื่องมาจากรูปแบบการนำมาใช้เนื่องจากแก่นนำไปตากแห้งแล้วนำมาใช้ทดลอง เพราะมีรายงานว่าอุณหภูมิที่ใช้มีส่วนในการเพิ่มพื้นที่ผิวและจำนวนรูพรุนของตัวดูดซับ สำหรับค่าซีไอดี พบว่า การใช้กากชานอ้อยสามารถลดค่าซีไอดีได้ 13 เปอร์เซ็นต์ (Figure 16c) Table 14 แสดงการเปรียบเทียบผลของการลดลงของสี ฟีนอล และค่าซีไอดี หลังจากทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

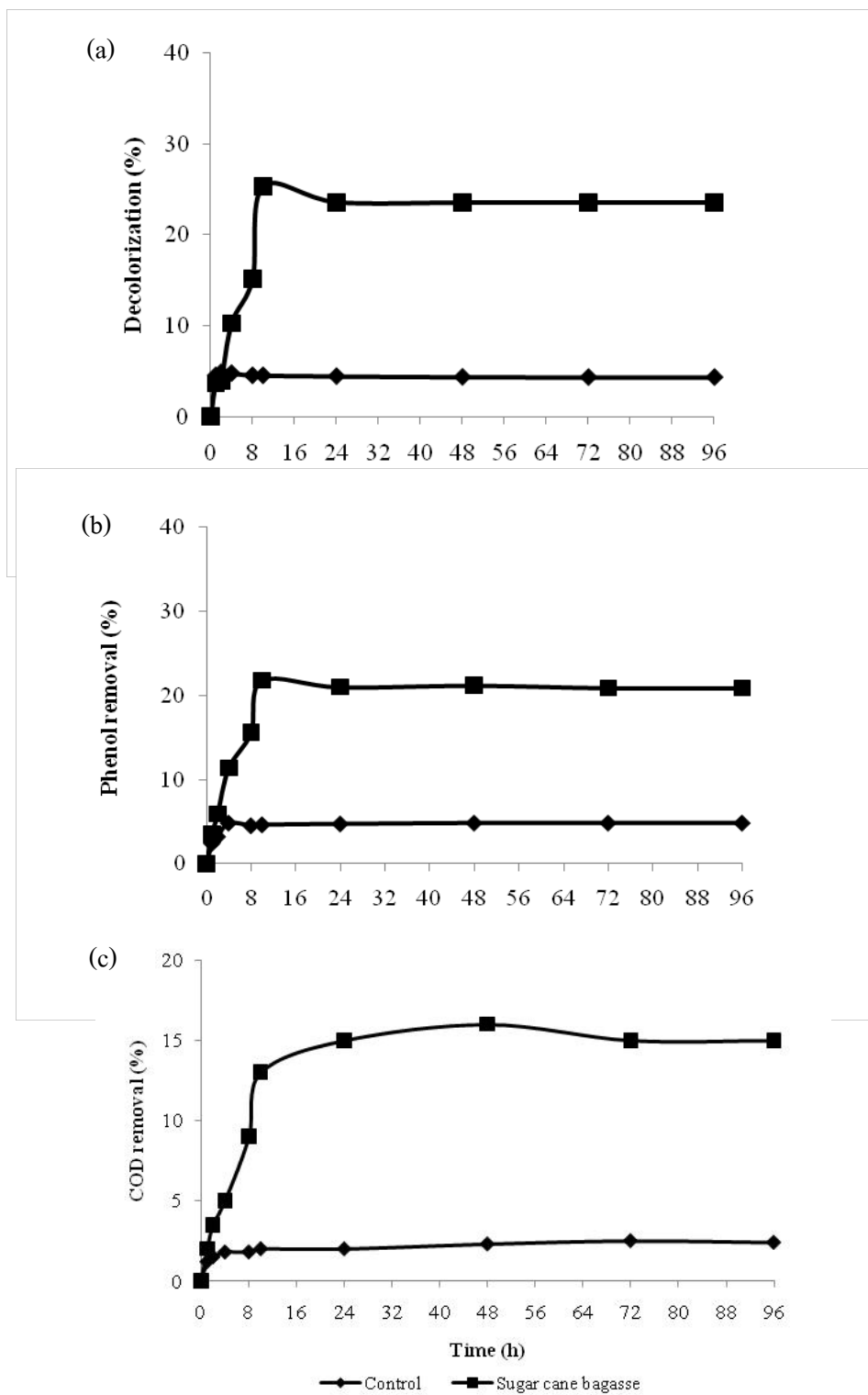


Figure 16. Effect of sugarcane bagasse and incubation time on decolorization (a), phenol removal (b) and COD removal (c) of final effluent of palm oil mill

Table 14. Effect of sugar cane bagasse on color, phenol and COD removal of final effluent of palm oil mill after 10 h incubation time

	Control (Palm ash 20%)	Sugar cane bagasse
Color (PtCo)	1,087	849
Phenol (mg/L)	28	23
COD (mg/L)	746	662

บทที่ 4

บทสรุป และข้อเสนอแนะ

ลักษณะน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม น้ำทิ้งมีลักษณะค่อนข้างใส มีสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำ (2,417 PtCo) ไม่มีไขมันลอยที่ผิวน้ำ มีค่าพีเอชเท่ากับ 9.5 มีปริมาณสารอินทรีย์ (ซีไอดี) ปริมาณของแข็ง และค่าสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 1,586, 3,840 และ 43.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในการศึกษาที่นำเชื้อรามาใช้ในการกำจัดสี ของน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทั้งในอาหารน้ำทิ้งแข็งและอาหารน้ำทิ้งเหลว โดยใช้น้ำทิ้งดีแคนเตอร์เป็นแหล่งสารอาหารในอัตราส่วนต่างๆ เชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 สามารถกำจัดอาหารน้ำทิ้งแข็งได้ และในอาหารน้ำทิ้งเหลว เชื้อสามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลได้ 50.2 และ 52.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการ ศึกษาผลของเชื้อธรรมชาติใน ระบบให้อากาศต่อการกำจัดสี ในสภาวะที่มีการให้อากาศ สามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลได้ 64.6 และ 51.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการกำจัดสีด้วยวิธีการทางกายภาพ โดยใช้เถ้าปาล์มและกากชานอ้อยเป็นตัวดูดซับ ปริมาณเถ้าปาล์มที่เหมาะสมคือ 20 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 8 ชั่วโมง สามารถลดสีได้ถึง 57.9 เปอร์เซ็นต์ และกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ 55.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาบำบัดต่อด้วยการใช้กากชานอ้อย เป็นตัวดูดซับ สามารถกำจัดสีได้ 25.3 เปอร์เซ็นต์ และกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ 21.8 เปอร์เซ็นต์ Table 15 แสดงการเปรียบเทียบการกำจัดสีด้วยวิธีทางชีวภาพและกายภาพ โดยเปรียบเทียบการลดลงของค่าสี ฟีนอล และซีไอดี

Table 15. Summary of palm oil mill final effluent by biological and physical treatment

Parameter	Final effluent	<i>P. chrysosporium</i> ATCC 24725 (ratio 1:0)	Aeration	Palm ash (20%) only	Palm ash (20%) + Sugar cane bagasse
Color (PtCo)	2,417	2,589	943	1,132	849
Phenol (mg/L)	43.01	101	31	29	23
COD (mg/L)	1,586	3,599	1,768	761	662

ข้อเสนอแนะ

1. การกำจัดสีน้ำทิ้งที่ทดสอบบนอาหารแข็งเห็นได้ชัดเจนที่อาหารน้ำทิ้งแข็งที่มีน้ำทิ้งบ่อสุดท้าย และน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ผสมกันที่อัตราส่วน 3:1 (จากสีอาหารที่เป็นสีน้ำตาลเข้มเป็นสีส้มน้ำตาล) แต่ในการทดสอบในอาหารน้ำทิ้งเหลวยังเห็นผลไม่ชัดเจน ดังนั้นควรศึกษาการกำจัดสีน้ำทิ้งสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยนำน้ำทิ้งดีแคนเตอร์มาเป็นสารอาหารให้เชื้อรา ต่อไป โดยอัตราส่วนน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่ใช้ควรน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองนี้ที่อัตราส่วน 3:1 คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์)
2. ถึงแม้ว่าน้ำทิ้งที่ได้จากการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพจะมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการทางกายภาพหรือวิธีการทางเคมี แต่ก็ยังมีมิตรกับสิ่งแวดล้อมและไม่ก่อให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งที่ต้องหาทางกำจัดอีก ดังนั้นจึงควรหาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดกำจัดสีด้วยวิธีการทางชีวภาพต่อไป
3. การกำจัดสีน้ำทิ้งด้วยเถ้าปาล์มถือว่ามีประสิทธิภาพมาก จึงควรมีการศึกษาการใช้เถ้าปาล์มในรูปแบบต่างๆ เช่น การนำเถ้าปาล์มใส่ถุงแล้ววางเป็นชั้นๆ กับการกรองน้ำเพื่อให้น้ำทิ้งที่ต้องการกำจัดสีผ่านโดยไม่เกิดการอุดตันหรืออัดแน่นจนน้ำผ่านไม่ได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีมากขึ้น
4. ในการนำกากขานอ้อยมาใช้เป็นตัวดูดซับแม้ว่าจะสามารถดูดซับสีได้ แต่ในระหว่างการทดลองเกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์เนื่องจากกากขานอ้อยตากแห้งที่นำมาใช้ยังคงมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบจึงเกิดการหมัก ดังนั้นควรนำกากขานอ้อยไปแช่น้ำก่อนนำไปตากแห้งเพื่อเป็นการกำจัดน้ำตาล แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลอง หรืออาจนำจี๊เถ้าของกากขานอ้อย (กากขานอ้อยที่ผ่านการเผามาแล้ว) มาใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ , ชัยรัตน์ นิลนนท์ , ชีรพงศ์ จันทรมนิม , ประกิจ ทองคำ และสมเกียรติ สี
สนอง. 2548. เส้นทางการผลิตปาล์มน้ำมัน. คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา.
- ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และอุษา วิเศษสุน . 2535. กลุ่มวิเคราะห์น้ำเสีย . พิมพ์ครั้งที่ 2. วิศวกร
สิ่งแวดล้อมไทย. กรุงเทพมหานคร.
- พจนีย์ โลมรัตน์. 2549. การกำจัดสีข้อมและโลหะหนักในน้ำเสียจากการข้อมใหม่โดยก้อนเห็ดเหลือ
ทิ้ง *Pleurotus ostreatus*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พนา เมฆตรง. 2544. การกำจัดสีในน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้โอโซน . โครงการสาขาวิชา
วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกุล. 2533. กระบวนการ
ผลิตการใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือทิ้ง และคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมัน
ปาล์ม. วารสารสงขลานครินทร์ 12 (2): 169-176.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ . 2542. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานน้ำมัน . ใน การใช้
ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือ . ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ พอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรม
เกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ, อรัญ หันพงศ์กิตติกุล และโสภา จันทภาโส . 2544. เปรียบเทียบการกำจัดสี
ของน้ำทิ้ง โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการทางชีวภาพ ทางเคมี และทางกายภาพ. วารสาร
สงขลานครินทร์ 23 (ฉบับพิเศษ): 807-819.
- พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์. 2552. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมัน
ปาล์มโดยเชื้อ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. วิทยานิพนธ์
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- รัตนารณ ไซยาพงศ์พิพัฒน์. 2549. การบำบัดซีโอดีจากน้ำเสียโรงพิมพ์ออฟเซตโดยใช้ถ้ำน้ำใล้อย.
วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระ
จอมเกล้าธนบุรี.

- วิวรรณ ขจรเกียรติกุล. 2539. การใช้ถังกรองดูดซับในการบำบัดสีจากน้ำเสียโรงงานฟอกย้อมสิ่งทอในการบำบัดขั้นสุดท้าย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- สันติ สกลไชย. 2546. การกำจัดสี ซีโอดีและลิกนินในน้ำเสียของโรงงานผลิตเยื่อกระดาษด้วยถ้ำไม้. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุบัติน นิมรัตน์. 2548. จุลชีววิทยาของน้ำเสีย . พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บริษัท แอคทีฟ พรินท์ จำกัด.
- สุรศักดิ์ บุญรุ่ง. 2555. การพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำทิ้งหลังการผลิตก๊าซชีวภาพของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- โสภา จันทภาโส. 2542. ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสารแวนิลอยและน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดย ใช้เอนไซม์และการลดความเข้มข้นของสี . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- โสภารวรรณ รัตนพันธุ์. 2546. การบำบัดและการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเส้นใยเห็ด *Lentinus* spp. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Abdullah, A.G., Salleh, M.A., Mazlina, S., Noor, M.J., Osman, M.R., Wagiran, R. and Sobri, S. 2005. Azo dye removal by adsorption using waste biomass: sugarcane bagasse. *International Journal of Engineering and Technology* 2(1): 8 – 13.
- Asamudo, N. U., Daba, A. S. and Ezeronye, O. U. 2005. Bioremediation of textile effluent using *Phanerochaete chrysosporium*. *African Journal of Biotechnology* 4(13): 1548 – 1553.
- Asgher, M., Batool, Sh., Bhatti, H.N., Noreen, R., Rahman, S.U. and Asad, M.J. 2008. Laccase mediated decolorization of vat dyes by *Coriolus versicolor* IBL-04. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62: 465 – 470.
- Couto, S.R. 2009. Dye removal by immobilized fungi. *Biotechnology Advances* 27: 227 – 235.
- Dawen, G., Xianghua, W. and Yi, Q. 2007. Comparative study on using carbon or nitrogen limited medium to culture white rot fungi for reactive brilliant red dye K-2BP

- decolorization under non-sterile conditions. *Science in China Series B: Chemistry* 50(5): 718 – 724.
- D'Souza-Ticlo, D., Verma, A. K., Mathew, M. and Raghukumar, C. 2006. Effect of nutrient nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC #2a, isolated from mangrove wood. *Indian Journal of Marine Sciences* 35(4): 364 – 372.
- Erkurt, E. A., Ünyayar, A. and Kumbur, H. 2007. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry* 42: 1429 – 1435.
- Hameed, B.H., Ahmad, A.A. and Aziz, N. 2007. Isotherms, kinetics and thermodynamics of acid dye adsorption on activated palm ash. *Chemical Engineering Journal* 133: 195 – 203.
- Hwang, T.K., Ong, S.M., C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm oil mill effluents. *Planter*. 54: 749-756.
- Gadd, G.M. 2001. *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press, Nework.
- Garcia, G., Pena, J., Venceslada B., Martin, M., Santos, M. and Gomez, R. 2000. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 35: 751–758.
- Guimarães, C., Porto, P., Oliveira, R. and Mota, M. 2005. Continuous decolourization of a sugar refinery wastewater in a modified rotating biological contactor with *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam disks. *Process Biochemistry* 40: 535 - 540.
- Kapdan, I.K and Kargi, F. 2002. Biological decolorization of textile dyestuff containing wastewater by *Coriolus versicolor* in a rotating biological contactor. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 195 – 199.
- Kim, S. J. and Shoda, M. 1999. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. *Biotechnology and Bioengineering* 60(1).

- Kissi, M., Mountadar, M., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P. and Sannia, G. 2001. Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 221 – 226.
- Lacina, C., Germain, G. and Spiros, N.A. 2003. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *African Journal of Biotechnology* 2(12): 620 – 630.
- Mebirouk, M., Sbai, L., Lopez, M. and Gonzalez, J. 2007. The absorption of polyphenols from olive oil mill wastewaters by sawdust and biodegradation by the fungus *Phanerochaeta chrysosporium*. *Grasas y Aceites* 58(4): 366 – 371.
- Riva, S. 2006. Laccase : blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24(5): 219 - 226.
- Srikanlayanukul, M. 2007. Decolorization of Textile Wastewater from Batik Dyeing in Repeated Batch System Using Immobilized *Coriolus versicolor* RC3. Doctor of Philosophy in Biotechnology. Chiang Mai University.
- Srikanlayanukul, M., Kitwechkun, W., Watanabe, T. and Khanongnuch, C. 2008. Decolorization of orange II by immobilized thermotolerant white rot fungus *Coriolus versicolor* RC3 in packed-bed bioreactor. *Biotechnology* 7(2): 280 – 286.
- Tripathi, A.K., Harsh, N.S.K. and Gupta, N. 2007. Fungal treatment of industrial effluents : a mini-review. *Life Science Journal* 4(2): 78 – 81.
- Urairuj, C., Khanongnuch, C. and Lumyong, S. 2003. Ligninolytic enzymes from tropical endophytic Xylariaceae. *Fungal Diversity* 13: 209 – 219.
- Vanhulle, S., Trovaslet, M., Enaud, E., Lucas, M., Taghavi, S., Lelie, D., Aken, B., Foret, M., Onderwater, R.C.A., Wesenberg, D., Agathos, S.N., Schneider, Y. and Corbisier, A. 2008. Decolorization, Cytotoxicity, and Genotoxicity Reduction During a Combined Ozonation/Fungal Treatment of Dye-Contaminated Wastewater. *Environmental Science and Technology* 42(2): 584 – 589.

- Zahrim, A.Y., Rachel, F.M., Menaka, S., Su, S.Y., Melvin, F. and Chan, E.S. 2009. Decolourisation of anaerobic palm oil mill effluent via activated sludge-granular activated carbon. *World Applied Sciences Journal* 5: 126 – 129.
- Zhang, Z., O'Hara, I.M., Kent, G.A. and Doherty, W. 2013. Comparative study on adsorption of two cationic dyes by milled sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products* 42: 41 – 49.

ภาคผนวก

1. การวัดสีโดยวิธีการเปรียบเทียบแพททินัมโคบอลต์มาตรฐาน (Platinum cobalt standard) (APHA, AWWA and WEF, 1998)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทตินเนท

ละลายโพแทสเซียมคลอโรแพลทตินเนท 0.1246 กรัม และผลึกโคบอลต์สคัลโลไรด์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นอยู่ 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของสีเท่ากับ 500 หน่วยสี (color units) จากสารละลายมาตรฐานนี้ นำมาเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นของสีตั้งแต่ 0 – 500 หน่วยสี ได้ตามตารางภาคผนวกที่ 1

Table-Appendix 1 Preparation of standard color solution concentration 0 – 500 color unit

Standard color solution conc. (color unit)	Volume of standard color solution 500 unit (ml)
0	-
10	0.5
20	1.0
30	1.5
40	2.0
50	2.5
100	5.0
150	7.5
200	10.0
250	12.5
300	15.0
350	17.5
400	20.0
450	22.5
500	25.0

จาก Table-Appendix 1 เตรียมสารละลายสีมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเปิดสารละลายมาตรฐาน (500 หน่วยสี) ตามปริมาตรที่กำหนดของแต่ละความเข้มข้น แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 25 มิลลิลิตร ก็จะได้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

หลังจากนั้นนำสารละลายสีมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance : ABS) ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ก็จะได้เป็นกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (color units) กับค่าการดูดกลืนแสง

การวัดสีของตัวอย่าง

นำตัวอย่างนำมาแยกโดยใช้เครื่องแยกเหวี่ยง (Centrifugator) ที่มีความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ของแข็งที่แขวนลอยอยู่ตกตะกอนจนหมดได้น้ำใส นำน้ำใสนั้นใส่ในเซลล์วัดการวัดการดูดกลืนแสง และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank กรณีที่สีของน้ำมีความเข้มข้นมากจะต้องทำการเจือจางตัวอย่างน้ำก่อนด้วยน้ำกลั่น ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง จากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เมื่อนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ก็จะทราบค่าสีของตัวอย่างได้

การคำนวณค่าสี

หน่วยสี (color units) = C x D

เมื่อ C = ค่าสีที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (color units)

D = อัตราการเจือจางตัวอย่าง (dilution rate)

การคำนวณร้อยละการลดลงหรือเพิ่มขึ้นความเข้มสีในน้ำตัวอย่าง

$$\text{ร้อยละความเข้มสีที่เปลี่ยนแปลง} = \frac{\{(C_F \times D_F) - (C_B \times D_B)\}}{C_B \times D_B} \times 100 = A$$

เมื่อ C_B = ค่าสีตัวอย่างน้ำเริ่มต้นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน

C_F = ค่าสีตัวอย่างน้ำหลังการกำจัดสีแล้วที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน

D_B = อัตราการเจือจางตัวอย่างน้ำเริ่มต้น

D_F = อัตราการเจือจางตัวอย่างหลังการกำจัดสีแล้ว

การแปลความหมายจากค่าที่ได้

+A หมายถึง น้ำที่ผ่านการกำจัดสีแล้วมีความเข้มของสีมากกว่าเดิมร้อยละ A

-A หมายถึง น้ำที่ผ่านการกำจัดสีแล้วมีความเข้มของสีมากกว่าเดิมร้อยละ A

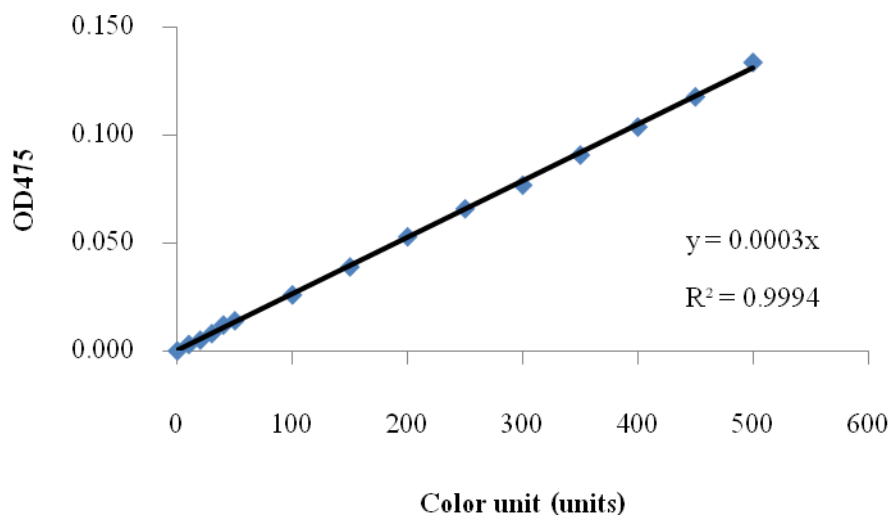


Figure-Appendix 1. Standard curve of standard color solution by platinum cobalt standard (OD₄₇₅) method

2. สารฟีนอลอิสระ (Substances Reducing Folin's Phenol) วิเคราะห์โดยตัดแปลงจากวิธีการของ APHA AWWA และ WEF (1998)

เครื่องมือ

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

สารเคมี

1. น้ำยาคาร์บอนต-ทาร์เทรต

ละลาย Na₂C₄H₄O₆·2H₂O จำนวน 12 กรัม ด้วยน้ำกลั่นต้มเดือด 750 มิลลิลิตร

ทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องก่อนปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. น้ำยาฟอลินส์ฟีนอล

วิธีการ

1. นำตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 5 มิลลิลิตร

2. เติมฟอลินส์ฟีนอล 0.1 มิลลิลิตร

3. เติมน้ำยาคาร์บอนต-ทาร์เทรต 1.0 มิลลิลิตร

4. รอให้เกิดสี 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร เทียบหาความเข้มข้นฟีนอลจากกราฟ

มาตรฐาน ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่างแต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ฟีนอล (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

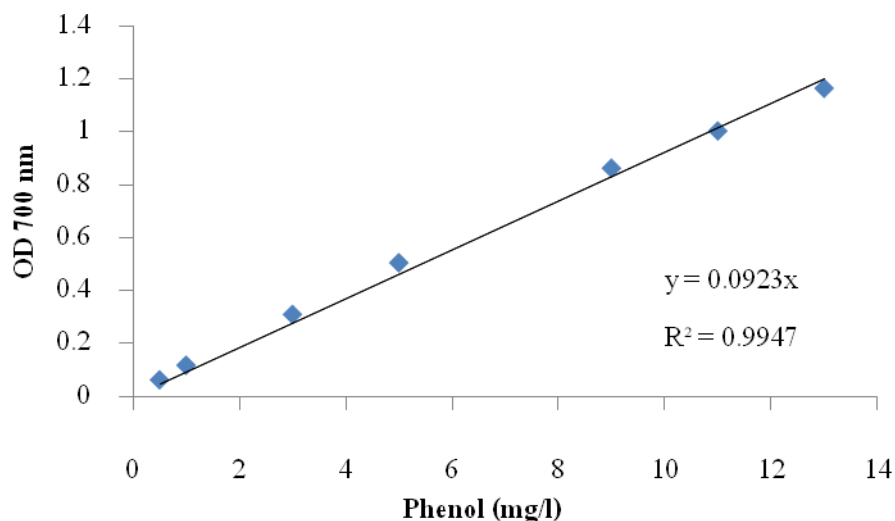


Figure-Appendix 2. Standard curve of standard phenol solution (OD₇₀₀)

3. การวิเคราะห์ค่าซีโอดี (Chemical oxygen Demand, COD) (APHA, AWWA and WPCF, 1988)

การหาปริมาณน้ำตัวอย่าง

เปิดน้ำเสีย x มิลลิตรใส่ในพลาสติก (เริ่มจากปริมาณน้อยๆ) เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิตร เติมน้ำกลั่นฟริกเข้มข้น 30 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน สังเกตให้สีของสารละลายเป็นสีส้มเหมือนสีของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (K₂Cr₂O₇)

วิธีการ

เปิดน้ำตัวอย่างปริมาตรที่เหมาะสมจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 มิลลิตร ใส่ขวดสำหรับวิเคราะห์ซีโอดี เติมน้ำกลั่นฟริกเข้มข้น (HgSO₄) 0.4 กรัม ใส่ลูกแก้ว 3-5 เม็ด เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง เติมน้ำกลั่นโพแทสเซียมไดโครเมต (K₂Cr₂O₇) 10 มิลลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นฟริกเข้มข้น (sulfuric reagent) 30 มิลลิตร นำขวดซีโอดีไปต่อกับ reflux condenser บนเตาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในที่มืด แล้วนำมาไทเทรตกับ Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ โดยใช้ Ferroin เป็นอินดิเคเตอร์และใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างเป็นชุดควบคุม โดยจุดยุติจะได้สารละลายสีน้ำตาลแดง

การคำนวณ

$$\text{ค่าซีโอดี (mg/L)} = \frac{[(a-b) \times N \times 8,000]}{\text{ml Sample}}$$

ml Sample

a : ปริมาตรของ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ที่ใช้ในการไทเทรตชุดควบคุม

b : ปริมาตรของ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ที่ใช้ในการไทเทรตน้ำตัวอย่าง

N : นอร์มัลลิตีของ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$

4. การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid, TS) (APHA, AWWA and WPCF, 1988)

นำถ้วย crucible มาล้างให้สะอาด นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมาวางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักของถ้วย จากนั้นเปิดน้ำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วย นำไปประเหยแห้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมาวางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก นำค่าน้ำหนักถ้วยที่มีตะกอนอยู่ลบด้วยน้ำหนักถ้วยในตอนแรก จะได้น้ำหนักของแข็ง

$$\text{Total solid (mg/L)} = \frac{[\text{mg Solid} \times 1,000]}{\text{ml Sample}}$$

ml Sample

5. การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended solid, SS) (APHA, AWWA and WPCF, 1988)

นำกระดาษกรองสำหรับการหาของแข็งแขวนลอยวางในกรวยกรอง (gooch crucible) ผ่านน้ำกลั่นลงไป ใช้เครื่องดูดอากาศดูดให้แห้ง นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมาวางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาวางในกรวยกรองแล้วเปิดน้ำตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดอากาศดูดให้แห้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมาวางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก นำกระดาษกรองหลังจากการอบครั้งที่สองซึ่งมีของแข็งแขวนลอยอยู่ลบน้ำหนักกระดาษกรองจะได้ปริมาณของแข็งแขวนลอย

$$\text{Suspended solid (mg/L)} = \frac{[\text{mg Solid} \times 1,000]}{\text{ml Sample}}$$

ml Sample

6. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ตามวิธีของ A.O.A.C (1990)

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสามารถวิเคราะห์ได้ตามวิธีของ Kjeldahl ซึ่งเป็นการให้ความร้อนพร้อมกับการใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นมีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อเปลี่ยนสารประกอบไนโตรเจนให้อยู่ในรูปของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นใช้ด่างพร้อมกับการกลั่นด้วยไอน้ำ และดักจับแอมโมเนียมที่กลั่นออกมาแล้วนำไปไทเทรตมี 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนการย่อย

นำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดย่อย จากนั้นใส่สารผสม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ K_2SO_4 ปริมาณ 5 กรัม เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 20 มิลลิลิตร วางหลอดย่อยในเตาย่อย แล้วประกอบสายขงระหว่างฝาครอบขวดใส่ด่างและเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย เปิดสวิตช์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อย แล้วตั้งอุณหภูมิที่ 200 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 400 องศาเซลเซียส ย่อยต่ออีก 60 นาที จนได้สารละลายใส ปล่อยให้เย็น นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วใช้น้ำกลั่นล้างหลอดย่อยให้หมด สารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้กลั่นต่อไป

ขั้นตอนการกลั่นและไทเทรต

จัดอุปกรณ์การกลั่นและเปิดสวิตช์ให้ความร้อน เปิดน้ำหล่อเย็นและเครื่องควบแน่น จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้น 4%) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ที่เดิมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มอยู่ในสารละลายกรด จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้มา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เข้มข้น 40%) ลงไป 20 มิลลิลิตร กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่น ไทเทรตสารละลายที่ได้ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.02 N จนได้สารละลายสีม่วงคำนวณค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ปริมาณกรด} \times \text{นอร์มัลลิตี} \times 14}{\text{ปริมาณตัวอย่าง}}$$

