



การบำบัดขั้นต้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

โดยแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ

Pretreatment of Phenolics in Palm Oil Mill Wastewater by the

Thermophilic *Bacillus thermoleovorans* Strain A2

for Enhancement of Biogas Production

พันธิดา จันทรโท

Panthida Chantho

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Master of Science in Environmental Management

Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การบำบัดขี้ดินของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยแบคทีเรียทนร้อน <i>Bacillus thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ
ผู้เขียน	นางพันธ์ธิดา จันทร์โท
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ดร.อรมาศ สุทธินน)	.....ประธานกรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลรัตน์ ชีวะเศรษฐกรรม)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฉันทวี สุขสาโรจน์)
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรงค์พันธ์ มุสิกวงค์)	.....กรรมการ (ดร.วิยดา กวานเขียน)
	.....กรรมการ (ดร.อรมาศ สุทธินน)
	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรงค์พันธ์ มุสิกวงค์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

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

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณ  
บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร.อรมาศ สุทธินน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางพันธิธิดา จันทร์โท)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางพันธุธิดา จันทร์โท)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การบำบัดขี้ดินสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยแบคทีเรียทนร้อน <i>Bacillus thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ
ผู้เขียน	นางพันธธิดา จันทรโท
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2556

### บทคัดย่อ

สารประกอบฟีนอลิกมีความเป็นพิษและมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ การตกค้างของสารกลุ่มนี้ในน้ำเสียจากระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม สามารถเป็นตัวยับยั้งกระบวนการสร้างกรดอินทรีย์และการสร้างก๊าซมีเทนในระบบก๊าซชีวภาพได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดขี้ดินของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้แบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะใช้อากาศ และเปรียบเทียบการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียที่ผ่านและไม่ผ่านการบำบัด จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ A2 สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากความเข้มข้นเริ่มต้น 1,434 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สูงที่สุดร้อยละ 60 (อัตราการย่อยสลายเท่ากับ 3.56 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ในวันที่ 10 ของการทดลอง ภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 7 ในน้ำเสียที่ไม่มีการเจือจาง การบำบัดน้ำเสียขี้ดินเป็นเวลา 10 วัน สามารถลดสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดในน้ำเสียได้สมบูรณ์ ได้แก่ ferulic acid, *p*-coumaric acid และ phenol แต่ยังคงพบกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกดังนี้ gallic acid > 4-hydroxybenzoic acid > protocatechuic acid > ผลรวมของ caffeic acid, syringic acid และ vanillic acid การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดเป็นเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน มีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนเท่ากับ 18.78, 86.68 และ 123.04 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมชีโอดี และให้ปริมาณก๊าซมีเทนร้อยละ 49.3, 70.4 และ 64.9 ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด (11.35 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมชีโอดี และร้อยละ 24.6) นอกจากนี้กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดในน้ำเสียได้สมบูรณ์ แต่ยังคงตรวจพบสาร gallic acid ในทุกชุดการทดลอง และยังคงเหลือสาร phenol อีกทั้งสาร protocatechuic acid ในน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัด 2 วัน และ 6 วัน (เฉพาะสาร phenol) ซึ่งชนิดของหม้อนุพันธ์แทนที่ในวงแหวนอะโรมาติก และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกมีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายสารกลุ่มนี้

<b>Thesis Title</b>	Pretreatment of Phenolics in Palm Oil Mill Wastewater by the Thermophilic <i>Bacillus thermoleovorans</i> Strain A2 for Enhancement of Biogas Production
<b>Author</b>	Mrs. Panthida Chantho
<b>Major Program</b>	Environmental Management
<b>Academic Year</b>	2013

### ABSTRACT

Phenolics exhibit toxicity and antimicrobial activity. The presence of these compounds in palm oil mill wastewater (POMW) can act as acetogenesis and methanogenesis inhibitors during biogas production. The objectives of this work were to study the optimum conditions for POMW pretreatment using the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2 under aerobic condition and to compare the potential use of pre-treated and non-pretreated POMW as substrates for biogas production. According to the results, the maximum degradation efficiency (60%) and rate (3.56 mg/L/h) from the initial of 1,434 mg/L phenolics was obtained when strain A2 was incubated with undiluted POMW at 60 °C and pH =7 for 10 days. The complete removal of some phenolics including ferulic acid, *p*-coumaric acid and phenol was found in a 10-day pretreated POMW, while some of them (gallic acid > 4-hydroxybenzoic acid > protocatechuic acid > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid) still remained in this sample. The biogas production from 2-, 6- or 10-day pretreated POMW gave BMP value of 18.78, 86.68 and 123.04 mL CH<sub>4</sub>/g COD with methane content of 49.3%, 70.4% and 64.9%, respectively, which higher than that from non-pretreated POMW (11.35 mL CH<sub>4</sub>/g COD and 24.6%). In addition, the complete reduction of some phenolics was further observed during biogas production excluding gallic acid (still detected in all POMW samples), protocatechuic acid and phenol (still found in non-, 2-, and 6-day pretreated POMW (only phenol)). It was suggested that the extent of microbial degradability depended on the type of substitutions on aromatic ring and initial concentration of phenolics.

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(13)
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ	(16)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.2.1 ปาล์มน้ำมัน	3
1.2.2 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	3
1.2.3 น้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	4
1.2.4 สารประกอบฟีนอลิกและความเป็นพิษ	7
1.2.5 การย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิก	11
1.2.6 แบคทีเรียจีส <i>Bacillus</i> และการนำมาใช้ประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อม	14
1.2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก	16
1.2.8 การใช้ประโยชน์น้ำเสียเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ	18
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	21
1.4 ขอบเขตการวิจัย	21
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	22
1.6 กรอบแนวคิดการวิจัย	23
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย	24
2.1 ภาพรวมวิธีดำเนินงานวิจัย	24
2.2 การเก็บตัวอย่างน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	25
2.3 การวิเคราะห์ลักษณะน้ำเสีย	25
2.3.1 การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทั่วไปของน้ำเสีย	25

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณและการจำแนกชนิดของสารประกอบ ฟีนอลิกในน้ำเสีย	26
2.4 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย	27
2.5 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นในน้ำเสียโดย <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2	28
2.6 การผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้น	31
2.7 วิธีวิเคราะห์	34
2.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมด (Total phenolics)	34
2.7.2 การจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มเด่น	35
2.7.3 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย	35
2.7.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ	36
บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	37
3.1 การศึกษาลักษณะน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	37
3.1.1 ข้อมูลทั่วไปของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	37
3.1.2 ลักษณะน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	38
3.2 การศึกษาชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	40
3.3 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดย <i>Bacillus thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2	46
3.3.1 สภาพที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย	46
3.3.2 ประสิทธิภาพและอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย	51
3.4 การศึกษาปริมาณและชนิดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่ผ่าน การบำบัดด้วย <i>Bacillus thermoleovorans</i> strain A2	54
3.4.1 ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในการบำบัดน้ำเสีย ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu	54
3.4.2 ศึกษาชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียด้วยเทคนิค HPLC	55



## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	59
3.5.1 ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมและร้อยละของก๊าซมีเทน	59
3.5.2 ศักยภาพการผลิตก๊าซมีเทนโดยการทดสอบค่า Biochemical methane potential (BMP)	64
3.5.3 การศึกษาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกภายหลังจาก การผลิตก๊าซชีวภาพ	65
3.5.4 ลักษณะน้ำเสียของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก และผลิตก๊าซชีวภาพ	69
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	72
4.1 สรุปผลการทดลอง	72
4.1.1 ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากกระบวนการ สกัดน้ำมันปาล์ม	72
4.1.2 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโดย <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2	72
4.1.3 ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมและศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทน	73
4.1.4 ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกก่อนและหลังการผลิตก๊าซชีวภาพ	73
4.2 ข้อเสนอแนะและแนวทางประยุกต์ใช้	74
บรรณานุกรม	76
ภาคผนวก	84
ภาคผนวก ก    สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	85
ภาคผนวก ข    กราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin–Ciocalteu	88
ภาคผนวก ค    กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC	91
ภาคผนวก ง    สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์	98
ประวัติผู้เขียน	102

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ลักษณะน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ	6
1.2	การแบ่งกลุ่มย่อยของสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในพืช	7
1.3	ชนิดสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผลปาล์มน้ำมัน	9
1.4	การใช้แบคทีเรียชนิด <i>Bacillus</i> เพื่อประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม	15
2.1	วิธีการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทั่วไปของน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	26
2.2	รายละเอียดการวิเคราะห์ลักษณะน้ำเสียก่อน ระหว่าง และหลังการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก	31
2.3	รายละเอียดการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติน้ำเสียก่อน ระหว่าง และหลังจากการผลิตก๊าซชีวภาพ	34
3.1	ข้อมูลทั่วไปของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	38
3.2	ลักษณะน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ศึกษาในงานวิจัย	40
3.3	ปริมาณ (ร้อยละ) ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu	45
3.4	การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (%) โดย <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 ภายใต้สภาวะที่ อุณหภูมิ, พีเอช และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกันหลังจากบ่มตัวอย่างระยะเวลา 10 วัน	48
3.5	จำนวนจุลินทรีย์เฉลี่ยในวันที่ 0 และวันที่ 10 เมื่อบ่มตัวอย่างในอาหาร CFMM ที่มีกลูโคสหรือฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	53
3.6	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด หลังการบำบัดด้วย <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 ที่ระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน	58
3.7	ลักษณะน้ำเสียที่ก่อนและหลังการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกเป็นระยะเวลา 2 วัน, 6 วัน หรือ 10 วัน และมีการเติมหัวเชื้อแอนแอโรบิกเพื่อนำไปผลิตก๊าซชีวภาพ	61

### รายการตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.8	ประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซมีเทน โดยการทดสอบจากค่า BMP	65
3.9	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมดก่อนและหลังการผลิตก๊าซชีวภาพ วิเคราะห์โดยวิธี Folin-Ciocalteu	66
3.10	ลักษณะน้ำเสียในจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเปรียบเทียบกับน้ำเสีย หลังการผลิตก๊าซชีวภาพ	70
ข.1	การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 20-200 มิลลิกรัมต่อลิตร	89
ค.1	การเตรียมสารละลายมาตรฐานรวม ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร	93

## รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ปริมาณโดยเฉลี่ยในการเกิดของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบ (ต่อตันทะลายปาล์มสด) ข้อมูลจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 5 โรงงานในประเทศไทย	5
1.2	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยจุลินทรีย์ (A) การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกผ่านวิถีเมทา (Meta pathway) (B) การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกผ่านวิถีอโธ (Ortho pathway))	12
1.3	วิธีการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรควิโนน	13
1.4	ขั้นตอนการเกิดก๊าซชีวภาพจากสารอินทรีย์	19
1.5	กรอบแนวคิดการวิจัย	23
2.1	ภาพรวมของการดำเนินงานวิจัย	24
2.2	ลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	25
2.3	ลักษณะของโคโลนี (A) และการเจริญของแบคทีเรีย <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (B)	28
2.4	การเลี้ยง <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 ร่วมกับน้ำเสีย (A) น้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดด้วย <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 (B)	30
2.5	ลักษณะกาคตะกอนแอนแอโรบิกแบคทีเรีย (A) ขวดซีรัมสี่ขาขนาด 120 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำเสียและกาคตะกอนแอนแอโรบิกแบคทีเรีย ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปิดด้วย septum และ aluminum crimp cap (B) ระบบการผลิตก๊าซชีวภาพขนาดเล็กแบบแบทช์ซึ่งมีการวัดปริมาตรก๊าซชีวภาพสะสม ด้วยการแทนที่น้ำ (C) และหลอดเก็บก๊าซชีวภาพและ Gas tight syringe เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-TCD (D)	33
3.1	โครมาโตแกรมของชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โรงงาน A (A), โรงงาน B (B) และ โรงงาน C (C)	42
3.2	ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทั้ง 3 แห่ง	43

### รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.3	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในระหว่างการบ่มน้ำเสียที่ผ่าน/ ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อพร้อมกับ <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 เป็น ระยะเวลา 10 วัน	52
3.4	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วย <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 ที่ระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu	55
3.5	โครมาโตแกรมของชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย ก่อน (A) และหลังผ่านการบำบัด 2(B), 6(C) และ 10 (D) วัน	56
3.6	ปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพสะสมของระบบที่ใช้ น้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่าน การบำบัดที่ระยะเวลา 2, 6 หรือ 10วัน	62
3.7	ปริมาณ (ร้อยละ) ก๊าซมีเทนที่เป็นองค์ประกอบในก๊าซชีวภาพที่ผลิตจาก น้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัด 2, 6 หรือ 10 วัน	63
3.8	ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียก่อนและหลังการผลิตก๊าซ ชีวภาพ, (A) น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด; (B) น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด 2 วัน; (C) น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด และ (D) น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด 10 วัน	68
4.1	แนวทางการประยุกต์ใช้แบคทีเรียทนร้อนในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก จากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำตาล	75
ข.1	กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิครวม	90
ค.1	กราฟมาตรฐานของ Gallic acid	93
ค.2	กราฟมาตรฐานของ Protocatechuic acid	94
ค.3	กราฟมาตรฐานของ 4-Hydroxybenzoic acid	94
ค.4	กราฟมาตรฐานของ Caffeic acid	95
ค.4	กราฟมาตรฐานของ Syringic acid	95
ค.5	กราฟมาตรฐานของ Vanillic acid	96
ค.6	กราฟมาตรฐานของ <i>p</i> -Coumaric acid	96

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
ค.7	กราฟมาตรฐานของ Ferulic acid	97
ค.8	กราฟมาตรฐานของ phenol	97

### คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

มก./ล.	= มิลลิกรัมต่อลิตร
มล.	= มิลลิลิตร
BMP	= Biochemical methane potential
CFMM	= Carbon free mineral medium
CFU/mL	= Colony forming unit per milliliter
GC-TCD	= Gas chromatography - thermal conductivity detector
HPLC	= High performance liquid chromatography
MLSS	= Mixed liquor suspended solids
MLVSS	= Mixed liquor volatile suspended solids
POMW	= Palm oil mill wastewater

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

เนื่องจากความต้องการน้ำมันปาล์มเพื่อใช้เป็นอาหารและพลังงานในรูปแบบของไบโอดีเซล ทำให้อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศไทย อย่างไรก็ตามในกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ (Crude palm oil) แบบใช้น้ำหรือแบบมาตรฐานก่อให้เกิดปริมาณน้ำเสียจำนวนมาก โดยทั่วไปการสกัดน้ำมันปาล์มดิบจำนวน 1 ตัน ต้องใช้น้ำ 5-7.59 ตัน และปริมาณน้ำมากกว่า 50% ของน้ำที่ใช้ทั้งหมดกลายเป็นน้ำเสีย (Najafpour *et al.*, 2006) ลักษณะน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มมีสีน้ำตาลคล้ำ ซึ่งมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในปริมาณสูง และยากแก่การกำจัด เช่น รงควัตถุพวกแอนโทไซยานิน แคโรทีน ลิกนิน สารประกอบพวกเมลานอยดิน (Melanoidin) กัม (Gum) แทนนิน และสารโพลีฟีนอล (พุนสุข ประเสริฐสรพรพ์ และคณะ, 2544) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกปนเปื้อนในน้ำเสียและน้ำทิ้ง (น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด) ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้นตั้งแต่ 5 -1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส, 2547; Alam *et al.*, 2009; Cordova-Rosa *et al.*, 2009; Limkhuansuwan *et al.*, 2010) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในผลปาล์ม ได้แก่ (1) gallic acid, (2) protocatechuic acid, (3) 4-hydroxybenzoic acid, (4) caffeic acid, (5) vanillic acid, (6) syringic acid, (7) *p*-coumaric acid และ (8) ferulic acid (Neo *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกสกัดออกมาจากผลปาล์มระหว่างกระบวนการผลิตและตกค้างอยู่ในน้ำเสียว่าประกอบด้วยสารชนิดใดบ้าง และมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่หลังจากผ่านกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแล้ว ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาวิธีการบำบัดน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของสารย่อยสลายยากกลุ่มดังกล่าว เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) และมีความเป็นพิษกับพืช (Phytotoxicity) บางชนิดในสิ่งแวดล้อม (DellaGreca *et al.*, 2001, Mekki *et al.*, 2007, Estevinho *et al.*, 2008)

ในปัจจุบันโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบส่วนใหญ่มีการนำระบบก๊าซชีวภาพมาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย โดยมีการใช้ระบบก๊าซชีวภาพร่วมกับการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีอื่นหลังจากผ่านการผลิตก๊าซชีวภาพ เช่น การใช้ระบบก๊าซชีวภาพร่วมกับบ่อปรับเสถียร (Stabilization pond) หรือการใช้



ระบบก๊าซชีวภาพร่วมกับบ่อฝัง (Oxidation pond) เพื่อนำก๊าซชีวภาพซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทดแทนไปผลิตเป็นกระแสไฟฟ้าใช้ภายในโรงงานและจำหน่ายให้แก่การไฟฟ้าส่วนภูมิภาค โดยนำเสียดังกล่าวมาผลิตซึ่งมีอุณหภูมิสูงประมาณ 70 - 80 องศาเซลเซียสจะถูกลดอุณหภูมิลงไว้ในบ่อปรับอุณหภูมิเพื่อให้มีอุณหภูมิลดลงประมาณ 40 - 55 องศาเซลเซียสก่อนนำน้ำเสียดังกล่าวเข้าสู่ระบบก๊าซชีวภาพ โดยทั่วไปก๊าซชีวภาพสามารถผลิตได้ประมาณ 0.3 - 0.5 ลูกบาศก์เมตรต่อกิโลกรัมซีโอดีที่ถูกกำจัด องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ ได้แก่ ก๊าซมีเทน ( $\text{CH}_4$ ) เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ประมาณร้อยละ 50 - 80 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2555) ทั้งนี้ระบบก๊าซชีวภาพเป็นวิธีการจัดการน้ำเสียที่มีประสิทธิภาพ และเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับโรงงานอีกทางหนึ่ง อย่างไรก็ตามสารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรด (Acidogen) จุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทน (Methanogen) และสารประกอบกลุ่มนี้อาจถูกดูดซับในภาคตะกอนของระบบก๊าซชีวภาพ ทำให้กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพลดลง ซึ่งส่งผลต่อปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพโดยรวมและปริมาณก๊าซมีเทนที่ผลิตขึ้น (Sayadi *et al.*, 2000; Dhouib *et al.*, 2005; Hernandez and Edyvean, 2008) ที่ผ่านมายังไม่มีรายงานวิจัยที่ศึกษาปริมาณและชนิดของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่มีผลต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสถานะไร้อากาศ ดังนั้นจากปัญหาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกส่งผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย และการผลิตก๊าซชีวภาพ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาวิธีการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มก่อนเข้าสู่ระบบก๊าซชีวภาพ รวมทั้งศึกษาผลของปริมาณและชนิดของสารกลุ่มนี้ที่มีต่อการผลิตก๊าซชีวภาพ

การบำบัดสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธีทางชีวภาพ ถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพเนื่องจากสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ ต้นทุนไม่สูง และไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำแบคทีเรียเทอร์มอมาใช้ในการบำบัดสารมลพิษในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียสำคัญที่สามารถย่อยสลายสารมลพิษในสถานะไร้อากาศที่อุณหภูมิสูง ได้แก่ Thermophilic bacilli ด้วยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลาย มีศักยภาพในการย่อยสลายสารมลพิษได้หลายชนิด และมีความทนทานในช่วงอุณหภูมิกว้าง (Mutzel *et al.*, 1996) ทั้งนี้กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส สามารถลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดี และทำให้การแพร่ผ่านของออกซิเจนดีขึ้น (Müller *et al.*, 1998) งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาวิธีการบำบัดขั้นต้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ก่อนเข้าสู่ระบบการผลิตก๊าซชีวภาพ โดยใช้แบคทีเรียเทอร์มอ *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เนื่องจากน้ำเสียที่ออกจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง จึงเลือกใช้แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในช่วง

อุณหภูมิสูงระหว่าง 55-70 องศาเซลเซียส และมีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก พร้อมทั้งศึกษาผลของปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่มีต่อการผลิตก๊าซชีวภาพโดยรวม และปริมาณก๊าซมีเทน ซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวมีความจำเป็นในการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อบำบัดน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ย่อยสลายยาก และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการพัฒนาพลังงานทดแทนในรูปก๊าซชีวภาพในภาคอุตสาหกรรมต่อไป

## 1.2 การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 1.2.1 ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของโลก และเป็นพืชน้ำมันที่สำคัญของประเทศไทย แหล่งปลูกปาล์มน้ำมันที่สำคัญในปัจจุบันอยู่ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งได้แก่ ประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย มีพื้นที่ปลูกประมาณ 23, 22 และ 3 ล้านไร่ ตามลำดับ สำหรับประเทศไทยการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันยังคงถือเป็นนโยบายหลักของชาติ โดยรัฐบาลมีเป้าหมายให้มีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันเพิ่มอีกประมาณ 5 ล้านไร่ เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันปาล์มเพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศและการส่งออก ทั้งด้านการบริโภค อุปโภค และพลังงาน (น้ำอ้อย ศรีประสมและคณะ, 2551)

### 1.2.2 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบ่งได้เป็น 3 รูปแบบ (พูนสุข ประเสริฐสรรพและคณะ, 2554) ได้แก่

1) กระบวนการผลิตแบบไม่ใช้น้ำ หรือแบบแห้ง โดยการใช้ความร้อนในการอบผลปาล์ม ซึ่งวิธีนี้จะใช้เวลานาน เหมาะสมกับโรงงานขนาดเล็ก ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ น้ำมันดิบที่เรียกว่า น้ำมันกะเทย เป็นน้ำมันจากส่วนเปลือกและส่วนในของเมล็ดผสมกัน ฉะนั้นของเสียจากกระบวนการผลิตนี้ คือ กากปาล์มเพียงอย่างเดียวไม่ก่อให้เกิดน้ำเสีย

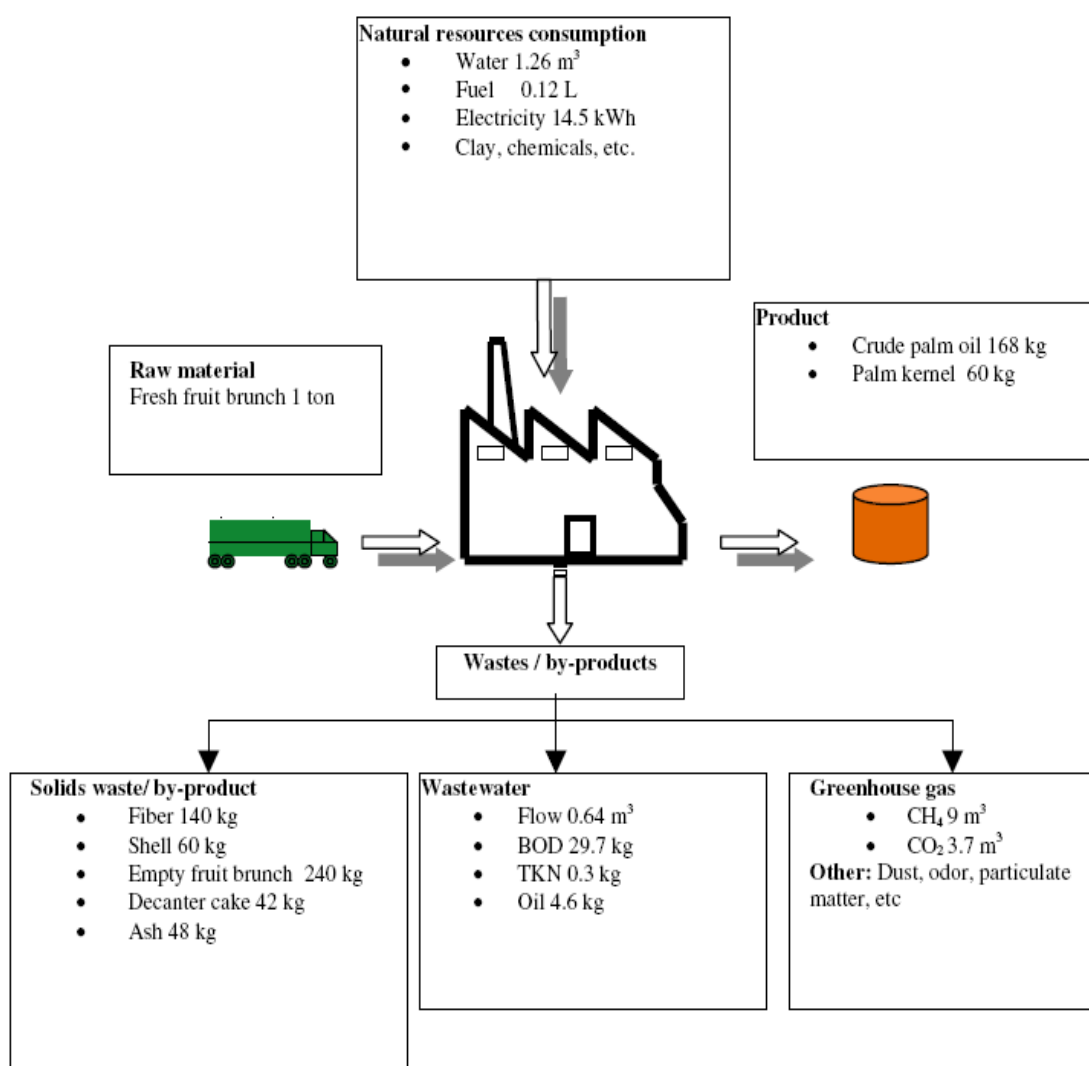
2) กระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม โดยการทอดผลปาล์มในน้ำมันภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำผลปาล์มที่ได้เข้าเครื่องหีบแบบเกลียว ซึ่งกระบวนการผลิตนี้จะได้น้ำมันผสมกันทั้งส่วนเปลือกและส่วนในของเมล็ด และไม่ก่อให้เกิดน้ำเสียเช่นกัน

3) กระบวนการผลิตแบบใช้น้ำ หรือแบบมาตรฐาน เป็นกระบวนการที่มีการใช้กันมากในอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการใช้ไอน้ำในการอบทะลายปาล์มและผลปาล์มของเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตประเภทนี้มีทั้งของเสียในรูปของแข็ง ได้แก่ กะลาปาล์ม เส้นใยปาล์ม และทะลายปาล์มเปล่า ของเสียเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นชีวมวล หรือเป็นเชื้อเพลิงในกระบวนการผลิต และน้ำเสียซึ่งส่วนใหญ่มาจาก 2 ขั้นตอน ได้แก่ น้ำทิ้งจากหม้อนึ่งผลปาล์มและน้ำทิ้งจากหม้อดีแคนเตอร์ น้ำเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตแบบนี้จะมีปริมาณมากกว่าร้อยละ 50 ของน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต และมีอุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปการจัดการน้ำเสียเหล่านี้ทำโดยการบำบัดหรือนำไปใช้ในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับศักยภาพในการจัดการน้ำเสียของแต่ละโรงงาน

### 1.2.3 น้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

แม้ว่ากระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบไม่มีการเติมสารเคมี อย่างไรก็ตามโรงงานเหล่านี้มีการผลิตของเสียปริมาณมาก เช่น มลพิษอากาศ วัสดุเศษเหลือ และปัญหาน้ำเสียที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง (รูปที่ 1.1) ซึ่งในกระบวนการผลิตแบบใช้น้ำพบว่ามีการใช้น้ำในกระบวนการสกัดน้ำมันประมาณ 1.0 -1.3 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด และก่อให้เกิดน้ำเสียประมาณร้อยละ 50 -79 ของน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิตทั้งหมด (Chavalparit *et al.*, 2006) ในปี 2005 ประเทศมาเลเซียมีผลผลิตจากปาล์มน้ำมัน 14.8 ล้านตัน (โดยเฉลี่ยต่อปี) ก่อให้เกิดน้ำเสีย ประมาณ 53 ล้านลูกบาศก์เมตร โดยน้ำเสียส่วนใหญ่เกิดจาก 3 ขั้นตอน คือ clarification คิดเป็นร้อยละ 60, sterilization คิดเป็นร้อยละ 36 และ hydrocyclone คิดเป็นร้อยละ 4 ของน้ำเสียทั้งหมดจากกระบวนการผลิต (Singh *et al.*, 2010) น้ำเสียเหล่านี้จะมีองค์ประกอบของเศษเส้นใยที่หลุดรอดจากกระบวนการผลิต, คาร์โบไฮเดรต, ไนโตรเจน, กรดอินทรีย์อิสระ และแร่ธาตุต่างๆ ลักษณะน้ำเสียมีอุณหภูมิสูง มีความเป็นกรด และมีสีน้ำตาลดำ โดยทั่วไปรายงานว่ามีค่า total suspended solid (TSS), oil and grease, chemical oxygen demand (COD) และ biochemical oxygen demand (BOD) สูง ดังแสดงในตารางที่ 1.1 สีน้ำตาลคล้ำของน้ำเสีย เกิดจากมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในปริมาณสูง และยากแก่การกำจัด เช่น รงควัตถุพวกแอนโทไซยานิน แคโรทีน ลิกนิน สารประกอบพวกเมลานอยดิน กัม แทนนิน และสารโพลีฟีนอล (พุนสุข ประเสริฐสุพรรณ และคณะ, 2544) สารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบอยู่ในผลปาล์ม และถูกสกัดออกมาระหว่างกระบวนการผลิต เมื่อผ่านกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อในการสกัดน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำหรือแบบมาตรฐานจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase ทำให้สารประกอบฟีนอลิกไม่ถูกย่อยสลาย และตกค้างออกมากับน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม (Sundram *et al.*, 2003) จากการศึกษาที่ผ่านมา

พบว่ามีการประกอบพืชนอกดินปนเปื้อนในน้ำเสียและน้ำทิ้ง (น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด) ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้นตั้งแต่ 5 -1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส, 2547; Alam *et al.*, 2009; Cordova-Rosa *et al.*, 2009; Limkhansuwan *et al.*, 2010 ) ซึ่งสาเหตุส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดสีในน้ำเสียมาจากกระบวนการ โพลีเมอร์ไรซ์และปฏิกิริยาออกโต-ออกซิเดชันของสารประกอบพืชนอกดินภายใต้สภาวะใช้ออกซิเจน (Sundram *et al.*, 2003 ; Othman *et al.*, 2008, Limkhansuwan *et al.*, 2010)



รูปที่ 1.1 ปริมาณโดยเฉลี่ยในการเกิดของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบ (ต่อตันทะลายปาล์มสด) ข้อมูลจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 5 โรงงานในประเทศไทย

ที่มา : Chavalparit *et al.* (2006)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ ปริมาณน้ำที่ใช้ในกระบวนการสกัดน้ำมันจากผลปาล์ม ในกรณีที่โรงงานมีกำลังการผลิตเท่ากัน หากมีการใช้น้ำปริมาณน้อยอาจมีผลทำให้ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าในกระบวนการที่มีการใช้น้ำปริมาณมาก และชนิดของสายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน รวมไปถึงฤดูกาลที่อาจส่งผลต่อปริมาณน้ำในบ่อพักเก็บน้ำเสีย ตามประกาศของกระทรวงอุตสาหกรรมฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2539) ออกตามความในพระราชบัญญัติโรงงาน พ.ศ. 2535 เรื่อง กำหนดคุณลักษณะของน้ำทิ้งออกจากโรงงานอุตสาหกรรมต้องมีสารประกอบฟีนอลิกไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2544) ทั้งนี้ลักษณะน้ำเสียที่มีสีคล้ำและกำจัดยาก ทำให้โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบโดยส่วนใหญ่ไม่สามารถปล่อยน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ และในฤดูฝนอาจเกิดปัญหาน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วเอ่อล้นลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ

#### ตารางที่ 1.1 ลักษณะน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ

พารามิเตอร์	ค่าเฉลี่ย*
pH	4.05-4.62
Oil and grease	15-25,00
Biochemical oxygen demand (BOD)	50,000-60,000
Chemical oxygen demand (COD)	80,000-150,000
Total solids	49,000-88,500
Suspended solid	18,500-52,000
Total volatile solids	4.200-82,000
Ammonical nitrogen	23-61
Organic carbon	550-1,400
color	Dark brown
Total phenolics	> 1,000

\* หน่วยเป็น มก. /ล. ยกเว้น pH

ที่มา: พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ (2543), Singh *et al.* (2010), Alam *et al.* (2009) และ Cordova-Rosa *et al.* (2009)

### 1.2.4 สารประกอบฟีนอลิกและความเป็นพิษ

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds, Phenolics, Phenols) เป็นสารอินทรีย์ที่พบได้ในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การผลิตสี เรซิน ปีโตรเคมี และพบมากในอุตสาหกรรมที่ใช้พืชเป็นวัตถุดิบ เช่น อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันมะกอก และอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม สารในกลุ่มนี้มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) สร้างพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group, -OH) เป็นโครงสร้างทางเคมีพื้นฐาน อาจแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้ (Bulasundrum *et al.*, 2006)

1) โมเลกุลฟีนอลิกอย่างง่าย (Simple phenolic acid) คือ สารประกอบฟีนอลิกที่มีวงแหวนอะโรมาติก สร้างพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่หรือมากกว่านั้น หรือสร้างพันธะกับหมู่คาร์บอกซิลิก (Carboxylic group, -COOH) เช่น gallic acid, procatechuic acid และ vanillic acid เป็นต้น

2) โพลีฟีนอล (Polyphenols) คือ สารประกอบฟีนอลิกที่มีวงแหวนอะโรมาติกมากกว่า 2 วง มาสร้างพันธะกัน อาจมีหมู่เคมีอื่นๆ มาแทนที่ในวงแหวนอะโรมาติก มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนเกาะกันจนเป็นสารประกอบโพลิเมอร์ขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (High molecular weight polymer) เช่น tannin, flavonoids, และ lignin เป็นต้น โพลีฟีนอลยังมีการจัดกลุ่มย่อย เช่น diphenol คือสารประกอบฟีนอลิกที่มีวงอะโรมาติกสร้างพันธะกัน 2 วง , triphenol คือสารประกอบฟีนอลิกที่มีวงอะโรมาติกสร้างพันธะกัน 3 วง

นอกจากนั้นสารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะที่พบในพืช ยังสามารถแบ่งกลุ่มย่อยจากสูตรโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 การแบ่งกลุ่มย่อยของสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในพืช

Class	Structure
Simple phenolics, benzoquinones	C6
Hydroxybenzoic acids	C6-C1
Acetophenones, phenylacetic acids	C6-C2
Hydroxycinnamic acids, phenylpropanoids	C6-C3
(coumarins, isocoumarins, chromones, chromenes)	

ตารางที่ 1.2 การแบ่งกลุ่มย่อยของสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในพืช (ต่อ)

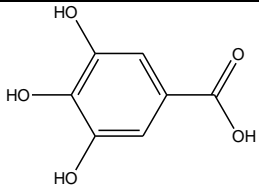
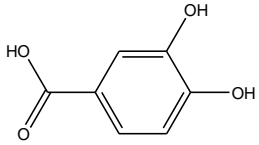
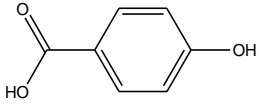
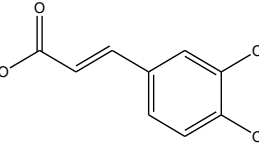
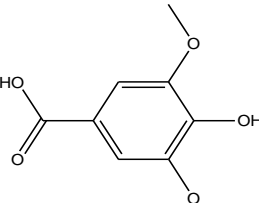
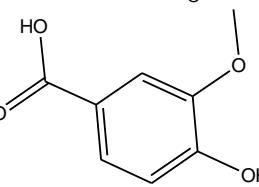
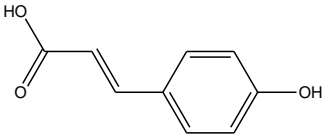
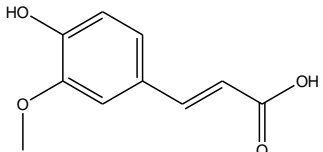
Class	Structure
Napthoquinones	C6-C4
Xanthones	C6-C1-C6
Stilbenes, anthraquinones	C6-C2-C6
Flavonoids, isoflavonoids	C6-C3-C6
Lignans, neolignans	(C6-C3) <sub>2</sub>
Biflavonoids	(C6-C3-C6) <sub>2</sub>
Lignins	(C6-C3) <sub>n</sub>
Condensed tannins (proanthocyanidins or flavolans)	(C6-C3-C6) <sub>n</sub>

ที่มา : Balasundrum (2006)

จากรายงานการศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นโมเลกุลฟีนอลิกอย่างง่ายในผลปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน ได้แก่ วิธี soluble free โดยการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลน้ำมันปาล์มด้วย 70% เอทานอล:อะซิโตน ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) นำส่วนใสที่แยกได้ไประเหยออกให้เหลือเพียงเล็กน้อยและปรับพีเอช 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นกำจัดไขมันด้วยเฮกเซนและสกัดอีกครั้งด้วย ไดเอทิล-เอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 1:1 นำไปกรองด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส และระเหยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร วิธี esterified โดยการนำเนื้อผลปาล์มไปไฮโดรไลซ์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ผ่านก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้อง และปรับพีเอช 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก กำจัดไขมันด้วยเฮกเซน และสกัดอีกครั้งด้วย เอทิล-เอทิลอะซิเตต เช่นเดียวกับวิธี soluble free แต่นำไประเหยภายใต้สูญญากาศ และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร และ วิธี insoluble-bond นำเนื้อผลปาล์มไปสกัดด้วย 70% เอทานอล:อะซิโตน ในอัตราส่วน 1:1(v/v) เช่นเดียวกับวิธี soluble free และนำส่วนใสไปไฮโดรไลซ์ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ผ่านก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้อง เช่นเดียวกับวิธี esterified และปรับพีเอช 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และกำจัดไขมันด้วยเฮกเซน และสกัดอีกครั้งด้วย เอทิล-เอทิลอะซิเตต ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร ตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ด้วยวิธี estrified และวิธี insoluble-bond จากผลปาล์มน้ำมัน 8 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 1.3 ได้แก่ (1) gallic acid, (2) protocatechuic

acid, (3) *p*-hydroxybenzoic acid, (4) caffeic acid, (5) vanillic acid, (6) syringic acid, (7) *p*-coumaric acid และ (8) ferulic acid (Neo *et al.*, 2010)

ตารางที่ 1.3 ชนิดสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผลปาล์มน้ำมัน

สารประกอบฟีนอลิก	สูตรโครงสร้างทางเคมี
Gallic acid	
Protocatechuic acid	
4-Hydroxybenzoic acid	
Caffeic acid	
Syringic acid	
Vanillic acid	
<i>p</i> -Coumaric acid	
Ferulic acid	

ที่มา : Neo *et al.*, (2010)



สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดจัดเป็น Priority pollutant ของ U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) มีความเป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำและระบบนิเวศน์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และมีผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ (Torrecilla, 2010; Assas *et al.*, 2009; Othman *et al.*, 2008; DeGraeve *et al.*, 1980; Michalowicz *et al.*, 2007; Gernjak *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดที่พบในพืช เช่น protocatechuic acid, *p*-hydroxibenzoic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, ellagic acid, cinnamic acid และ flavonoids มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย โดยทั่วไปแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถทนทานความเข้มข้นของสารดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้นสูงได้ สารประกอบฟีนอลิกที่มีความเข้มข้นสูงจะเป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรีย โดยจะทำให้สูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งยับยั้งการทำหน้าที่ของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียตายเมื่อความเข้มข้นของประกอบฟีนอลิกสูง (Heipieper *et al.*, 1992) จากรายงานที่ผ่านมามีพบว่าสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญและการทำงานของแบคทีเรียหลายชนิด (Antibacterial activity) เช่น *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lentus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* และ *Escherichia coli* (Estevinho *et al.*, 2008) สารประกอบฟีนอลิกความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิด Mesophile ได้ (Müller *et al.*, 1998) นอกจากนี้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทน (Methanogen) และจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรด (Acidogen) โดยสารประกอบฟีนอลิก เช่น phenol และ caffeic acid เป็นพิษต่อกระบวนการย่อยสลายสับสเตรทของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศ ในระบบก๊าซชีวภาพ และอาจเกิดการคุดซับในกากตะกอนของระบบก๊าซชีวภาพ ทำให้การย่อยสลายทางชีวภาพลดลง ส่งผลต่อปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพโดยรวมและปริมาณก๊าซมีเทนที่ผลิตขึ้น (Sayadi *et al.*, 2000; Dhouib *et al.*, 2005; Hernandez and Edyvean, 2008)

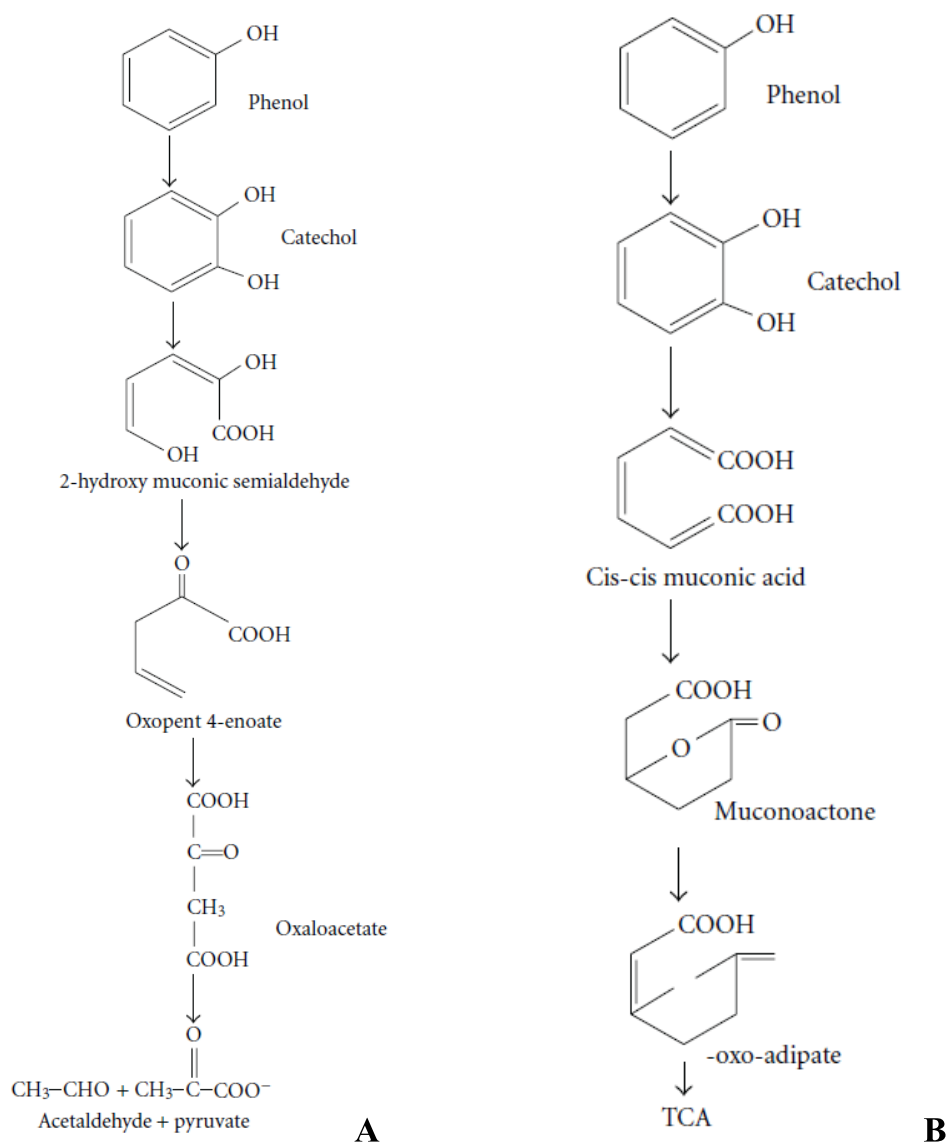
นอกจากสารประกอบฟีนอลิกจะมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียแล้ว ยังได้มีการศึกษาความเป็นพิษต่อพืช *Ankistrodesmus braunii* CCAP 202.7a ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียว (Green algae) ในอาหาร bold basal medium (BBM) ที่มีส่วนผสมของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ซึ่งมีสารประกอบฟีนอลิก เช่น protocatechuic acid, vanillic acid, tyrosol, ferulic acid และ *p*-coumaric acid พบว่าสารประกอบฟีนอลิกความเข้มข้น  $10^{-3}$  โมลาร์ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายหลังจาก 4 วันของการทดลอง (DellaGreca *et al.*, 2001) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียนั้นมีความเป็นพิษต่อพืชทดลอง และอาจเกิดการซึมเปื้อนในชั้นใต้ดิน

มีการศึกษาผลกระทบจากการปล่อยน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกที่ไม่ได้ผ่านการบำบัด พบว่ามีการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลิกในดินที่มีความลึก 1.2 เมตร หลังจากที่ดินนั้นปนเปื้อนน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกเป็นเวลา 4 เดือน และหลังจากนั้นเป็นเวลา 1 ปีพบว่ามีความเป็นพิษกับพืช โดยการทดสอบความเป็นพิษที่มีต่อการงอกของเมล็ดวินเทอร์เครส (Winter cress) หรือ *Cruciferae brassicaceae* ซึ่งเป็นพืชที่มีความอ่อนไหวต่อสารพิษเมื่อมีการสะสมในระยะยาว พบว่าการเจริญของเมล็ดในดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลิกจะเกิดหลังจาก 72 ชั่วโมง ซึ่งช้ากว่าในดินที่ไม่มีการปนเปื้อน ซึ่งใช้เวลาเพียงแค่ 24 ชั่วโมง (Mekki *et al.*, 2007)

### 1.2.5 การย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิก

การบำบัดสารประกอบฟีนอลิกจากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมเป็นปัญหาสำคัญ เนื่องจากเป็นสารมลพิษสำคัญที่พบได้ทั้งในน้ำและดิน โดยทั่วไปการย่อยสลายทางชีวภาพของสารดังกล่าวเป็นการย่อยสลายที่สมบูรณ์ได้สารประกอบอย่างง่าย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และสารอนินทรีย์อื่นๆ และไม่เกิดสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Cordova-Rosa *et al.*, 2009)

การย่อยสลายสารฟีนอลโดยจุลินทรีย์ในสภาวะใช้อากาศ อาศัยการทำงานของเอนไซม์ phenol hydroxylase และการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 1 หมู่ในตำแหน่งออร์โธในวงแหวนอะโรมาติกเกิดเป็น catechol จากนั้นจะเข้าสู่วิถีเมทา (รูปที่ 1.2A) และวิถีอโท (รูปที่ 1.2B) จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ออนุพันธ์อื่นที่สร้างพันธะกับวงแหวนอะโรมาติกย่อยสลายได้ยากขึ้น เนื่องจากเกิดการขัดขวางในขั้นตอนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ phenol hydroxylase ที่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลเพื่อเข้าสู่วิถีการย่อยสลายสารประกอบฟีนอล การศึกษาที่ผ่านของ Mahiuddin *et al.* (2011) ได้ศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลโดย *Pseudomonas fluorescens* PU1 พบว่าการย่อยสลายผ่านวิถีเมทาจะเกิดขึ้นได้เร็วกว่าวิถีอโท

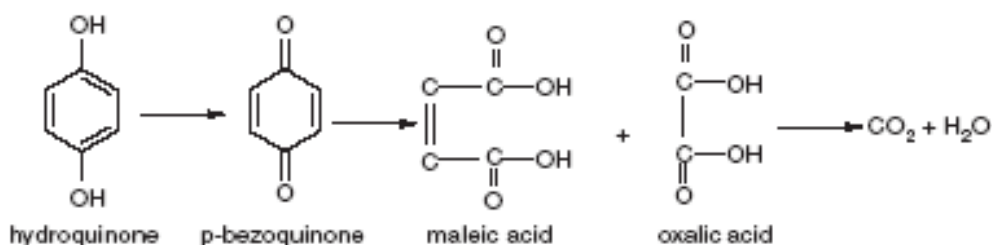


**รูปที่ 1.2** การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยจุลินทรีย์ (A) การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกผ่านวิถีเมทา (Meta pathway) (B) การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกผ่านวิถีออโท (Ortho pathway)

ที่มา : Mahiuddin *et al.* (2011)

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้รายงานวิธีการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น การศึกษาวิธีการย่อยสลายของไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) ซึ่งเป็นโมโนฟีนอลิกอย่างง่าย โดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) เป็นสารออกซิไดซ์ (Oxidizer) เพื่อเร่งปฏิกิริยาร่วมกับเอนไซม์ของ *Serratia marcescens* AB 90027 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก การย่อยสลายจะเกิดการกระตุ้น (Ring activation) ขึ้นที่หมู่ไฮดรอกซิลก่อน ได้สาร

ผลิตภัณฑ์เป็นพารา-เบนโซควิโนน (*p*-Benzoquinone) จากนั้นจะเข้าสู่ปฏิกิริยาการแตกวงพารา-เบนโซควิโนน ได้สารประกอบ 2 ตัว คือ กรดมาลิก (Maleic acid) และกรดออกซาลิก (Oxalic acid) ก่อนจะเข้าสู่เมแทบอลิซึมทั่วไปของสิ่งมีชีวิต (Leitao *et al.*, 2007; Nair *et al.*, 2008) (รูปที่ 1.3) นอกจากนั้นพบว่า การทดลองข้างต้นสามารถลดค่าซีไอดี ได้ถึงร้อยละ 96 วิธีการดังกล่าวยังสามารถใช้ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกตัวอื่น ๆ เช่น โมเลกุลฟีนอลิกอย่างง่าย ได้แก่ phenol, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillin, salicylic acid, *p*-chlorophenol, *p*-nitrophenol, *o*-aminophenol และ *p*-aminophenol, diphenols ได้แก่ catechol, hydroquinone and resorcinol และ triphenols ได้แก่ phloroglucinol ได้เช่นกัน (Yao *et al.*, 2006)



รูปที่ 1.3 วิธีการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรควิโนน

ที่มา : Yao *et al.* (2006)

มีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งแบคทีเรียและราสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ และในดินได้ ดังเช่น

การใช้ *Pseudomonas pictorum* (NCIM2077) ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกจากโรงงานอุตสาหกรรม 3 โรงงาน คือ โรงงานปิโตรเคมี, โรงงานผลิตเครื่องหนัง และ โรงงานผลิตสารโพลีเมอร์ โดยตรงเซลล์บน alginate พบว่าสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 89.72, 90.18, และ 91.95 จากความเข้มข้นเริ่มต้น 506, 489 และ 758 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การตรงเซลล์บน activated carbon ร่วมกับ alginate สามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 97.43, 97.75 และ 94.06 ตามลำดับ (Murugesan *et al.*, 2005)

มีรายงานว่า *Lactobacillus plantarum* ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก สามารถลดสัดส่วนของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่ม high molecular weight fraction และ low molecular weight fraction ได้ร้อยละ 58 และ ลดสีได้ร้อยละ 55 ตามลำดับ (Lamia *et al.*, 2003) นอกจากนั้น Limkhuansuwan *et al.* (2010) รายงานการใช้เชื้อแบคทีเรียสาย

พันธุ์นี้ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกและสีในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถบำบัดสารประกอบฟีนอลิกจากความเข้มข้นเริ่มต้น 33.64 มิลลิกรัมต่อลิตร และสีได้ร้อยละ 34 และ 15.88 ตามลำดับ ภายใต้อุณหภูมิ 30 °C

การศึกษาวิจัยโดยใช้ *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 ในการย่อยสลายสารฟีนอลและสารอนุพันธ์ของฟีนอลในดินที่ปนเปื้อน พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลายสาร 4-nitrophenol > 4-chlorophenol > phenol ทั้งนี้สารดังกล่าวถือเป็นปัญหามลพิษที่สำคัญในดินและสิ่งแวดล้อม (Unell *et al.*, 2008)

การใช้ *Geotricum candidum* ซึ่งเป็นราที่มีการนำมาใช้ในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าสามารถลดค่าซีไอดี ได้สูงสุดร้อยละ 75 จากค่าซีไอดี เริ่มต้น 45,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดสีในน้ำเสียได้ร้อยละ 65 สามารถย่อยสลาย caffeic acid 2.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และลด ferulic acid 1.7 มิลลิกรัมต่อลิตรได้อย่างสมบูรณ์ สามารถย่อยสลายสาร hydroxytyrosol และ tyrosol จาก 3,450.7 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 439.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 613.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 114.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และย่อยสลาย vanillic acid ได้จากความเข้มข้น 191 เหลือ 6.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 6 วัน (Asses *et al.*, 2009)

### 1.2.6 แบคทีเรียจีโนส *Bacillus* และการนำมาใช้ประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อม

แบคทีเรียทนร้อน (Thermophilic bacteria) คือแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิสูงตั้งแต่ 55-70 องศาเซลเซียส ได้แก่ แบคทีเรียในจีโนส *Bacillus*, *Thermus* และ *Clostridium* สามารถคัดแยกเชื้อได้จากสิ่งแวดล้อมหลากหลายประเภท เช่น ดิน, น้ำ, น้ำทะเล, ดินตะกอน และแหล่งที่มีอุณหภูมิสูง เช่น น้ำพุร้อน (Mutzel *et al.*, 1996; Markossian *et al.*, 2000) และพื้นที่บริเวณทะเลทราย (Mohamed *et al.*, 2006) ดังแสดงในตารางที่ 1.4 ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทนร้อน คือ มีความเสี่ยงน้อยต่อการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นและมีความทนทานในช่วงอุณหภูมิกว้าง (Mutzel *et al.*, 1996) กลุ่มแบคทีเรียสำคัญที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษในสภาวะใช้อากาศ ที่อุณหภูมิสูงที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Thermophilic bacilli ซึ่งสามารถเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลาย และมีศักยภาพในการย่อยสลายสารมลพิษได้หลายชนิด จึงได้มีการนำแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อมในการศึกษาที่ผ่านมา เช่น การย่อยสลายสารฟีนอลโดยแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ซึ่งคัดแยกได้จากบริเวณน้ำพุร้อน พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้เจริญและย่อยสลายสารฟีนอลได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส, พีเอช 6.5 (Feitkenhauer *et al.*, 2001; Milo *et al.*, 1999) แบคทีเรียทน

ร้อน เช่น *Bacillus thermoglucosidasius* สายพันธุ์ A7 (Duffner *et al.*, 2000) และ *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 (Mutzel *et al.*, 1996) สามารถย่อยสลายสารฟีนอลและครีซอลได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ภายในเวลา 12 ชั่วโมง จากความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิโมลาร์ และ Mohamed *et al.* (2006) ได้คัดเลือกแบคทีเรียทนร้อนในจินัส *Bacillus* จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและสารปิโตรเลียมในทะเลทรายในประเทศคูเวตซึ่งมีอุณหภูมิสูงประมาณ 60 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลายสารประกอบพวก polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) และ heterocyclic NOS-polyaromatic ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ทำให้เกิดการดูดซับในเม็ดทรายได้สูง จึงเกิดปัญหาการปนเปื้อนของสารดังกล่าว ในขณะที่พบ mesophilic bacteria ในบริเวณนั้นเช่นกันแต่พบว่าไม่สามารถย่อยสลายการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมได้ นอกจากแบคทีเรียจินัส *Bacillus* ที่นำมาใช้ในการย่อยสลายสารพิษแล้ว ยังมีการศึกษาของ El-naas *et al.* (2009) ได้ใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas putida* ที่ตรึงบน polyvinyl alcohol (PVA) gel พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลายสารฟีนอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ถึงแม้จะมีการใช้แบคทีเรียในจินัสอื่นในการย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อมแต่ส่วนใหญ่ยังเป็นการย่อยสลายที่อุณหภูมิปานกลาง จากประสิทธิภาพของแบคทีเรียทนร้อนที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีอุณหภูมิ และองค์ประกอบของสารอินทรีย์สูง

#### ตารางที่ 1.4 การใช้แบคทีเรียจินัส *Bacillus* เพื่อประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม

ชนิดของแบคทีเรีย	แหล่งที่คัดแยก	สารพิษที่ย่อยสลาย	อ้างอิง
<i>Bacillus thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2	น้ำพุร้อน	ฟีนอล	Mutzel <i>et al.</i> (1996)
<i>Bacillus thermoglucosidasius</i> สายพันธุ์ A7	น้ำพุร้อน	ฟีนอลและครีซอล	Duffner <i>et al.</i> (2000)
แบคทีเรียทนร้อนในจินัส <i>Bacillus</i>	ทะเลทราย	polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) และ heterocyclic NOS-polyaromatic	Mohamed <i>et al.</i> (2006)

### 1.2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นปัญหาที่สำคัญของระบบบำบัดน้ำเสีย และกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสีย เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แต่มีแบคทีเรียหลายชนิดที่มีความทนทานและสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของสาร เป็นต้น

**1.2.7.1 อุณหภูมิ** การย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิก จะมีประสิทธิภาพดีนั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวมีทั้งกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิปานกลาง (Mesophile) และอุณหภูมิสูง (Thermophile) และบางชนิดสามารถปรับตัวได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง

**1.2.7.2 พีเอช** สภาพความเป็นกรด-ด่าง เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญและย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสภาวะกรด-ด่างที่ต่างกัน

**1.2.7.3 ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิก** การใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกนั้น ควรคำนึงถึงความเข้มข้นเริ่มต้นซึ่งมีผลต่อการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความอ่อนไหวต่อระดับความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน

Suhaila *et al.* (2010) ได้ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรีย *Rhodococcus* UKM-P ย่อยสลายสารฟีนอลได้ดีและเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 – 40 องศาเซลเซียส แต่สามารถย่อยสลายสารฟีนอลที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 21 ชั่วโมง โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7 ในขณะที่พีเอชต่ำกว่า 6 และพีเอชสูงกว่า 8 แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ แต่ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารฟีนอลจะลดลง

การย่อยสลายสารฟีนอลโดยแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้เจริญและย่อยสลายสารฟีนอลได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และไม่พบการเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส และมากกว่า 70 องศาเซลเซียส (Feitkenhauer *et al.*, 2001; Mutzel *et al.*, 1996) รวมทั้งมีการศึกษาและรวบรวมข้อมูลสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ IHI-91 เพื่อใช้ในการไฮโดรไลซ์กรดไขมันที่มีในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการ

เจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้ คือ 65 องศาเซลเซียส และไม่เกิน 75 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิต่ำที่สามารถเจริญได้ในช่วง 37 – 50 องศาเซลเซียส (Becker, 2010)

Ayed and Hamdi (2003) ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก และคัดแยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก มาทดสอบการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกและสีในน้ำเสีย โดยการปรับสภาวะต่างๆ ในการย่อยสลายทางชีวภาพให้เหมาะสม เช่น ค่าพีเอช ระยะเวลา เป็นต้น พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีได้ร้อยละ 58 ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 46 และลดค่าซีโอดีได้ ร้อยละ 55 ที่พีเอช 3.5 ระยะเวลา 10 วัน นอกจากนี้ Tziotios *et al.* (2007) ศึกษาการใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเนื้อมะกอกมาย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าแบคทีเรียสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกและซีโอดีได้ร้อยละ 82-90 ในน้ำเสียที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 20, 50 และ 100 ในระยะเวลา 11, 22 และ 30 วัน ตามลำดับ ซึ่งการศึกษารั้งนี้ ได้มีการประยุกต์ใช้จริงในโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 500 ลิตร ความจุอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 60 และลดค่าซีโอดี ได้ร้อยละ 70 ในเวลา 27 ชั่วโมง ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกได้

มีรายงานการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกจากน้ำเสียโรงงานถ่านหินในประเทศอินเดีย โดยใช้แบคทีเรียร่วมกันสองชนิดคือ *Alcaligenes faecalis* และ *Enterobacter species* พบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ที่ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการย่อยสลายตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 10 และย่อยสลายสารฟีนอลได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 45 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ได้แก่ *p*-hydroxybenzoic acid ที่มีการย่อยสลายระหว่างการย่อยสลายสารฟีนอลอีกด้วย (Thomas *et al.*, 2002)

งานวิจัยของ Juárez *et al.* (2008) ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก โดยใช้ *Azobacter chroococcum* พบว่าสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น protocatetic acid และ *p*-hydroxybenzoic acid สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของ *A. chroococcum* ที่ระดับความเข้มข้นของสารดังกล่าวเท่ากับ 0.3% (w/v) เมื่อทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง พบการย่อยสลายของ protocatetic acid ที่ 48 ชั่วโมง และ *p*-hydroxybenzoic acid ที่ 72 ชั่วโมง โดยสารทั้งสองสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่สารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น เช่น syringic acid, *p*-coumaric acid, syringaldehyde ไม่มีการย่อย



สลาย ทั้งนี้อัตราในการย่อยสลายขึ้นอยู่กับชนิด โครงสร้างและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก โดยสารประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างอย่างง่ายจะถูกแบคทีเรียใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ง่ายกว่า

### 1.2.8 การใช้ประโยชน์น้ำเสียเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยทั่วไปนิยมใช้บ่อหมักแบบไร้อากาศเรียงติดต่อกันหลายบ่อ ในขณะที่บางโรงงานอาจมีการนำระบบบำบัดแบบเติมอากาศมาใช้ร่วมกับระบบแบบไร้อากาศ ในปัจจุบันน้ำเสียจากกระบวนการผลิตถูกนำไปใช้ประโยชน์เพื่อผลิตพลังงานทดแทนในรูปก๊าซชีวภาพ ตามความต้องการพลังงานทดแทนที่มากขึ้น เพื่อใช้เองภายในโรงงานหรือจำหน่ายซึ่งถือเป็นการเพิ่มรายได้ช่องทางหนึ่ง และเป็นการบำบัดน้ำเสียที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Angelidaki *et al.*, 2009; Esposito *et al.*, 2012) ผลผลิตจากการผลิตก๊าซชีวภาพที่นำมาใช้ประโยชน์ คือ ก๊าซมีเทน ( $\text{CH}_4$ ) และก๊าซไฮโดรเจน ( $\text{H}_2$ ) นอกจากนี้ยังมีก๊าซอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบในก๊าซชีวภาพ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) และ ก๊าซไนโตรเจน ( $\text{N}_2$ ) ซึ่งมีปริมาณเพียงเล็กน้อย ของเสียที่นำมาผลิตก๊าซชีวภาพมีหลายประเภท เช่น ของเสียจากการเกษตร ขยะอินทรีย์ และน้ำเสียที่มีค่าความสกปรกมากหรือค่าซีโอดี สูง ประมาณ 50,000-150,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Gelegenis *et al.*, 2007)

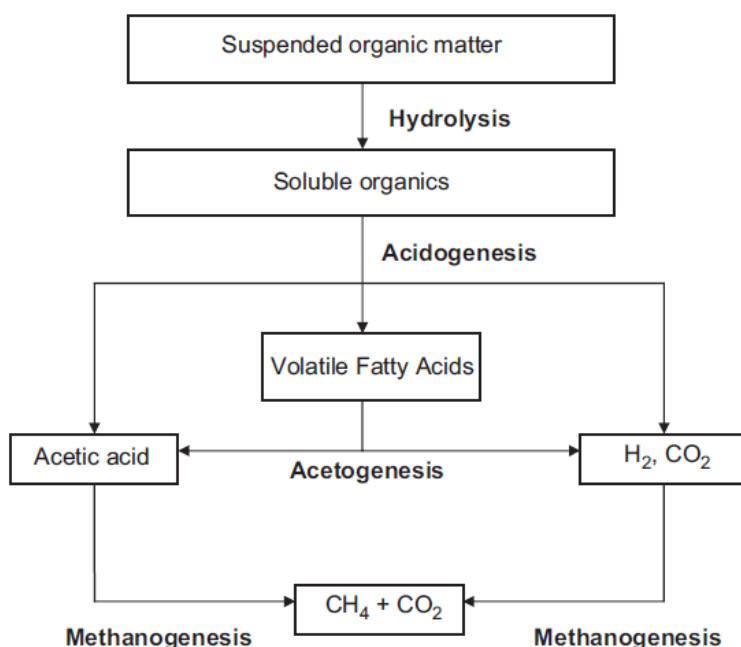
การย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกาศมีความสำคัญในการเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นก๊าซชีวภาพ ซึ่งจะเกิดเป็นก๊าซมีเทนร้อยละ 60-70 กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ (รูปที่ 1.4) อาศัยปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

1) Hydrolysis ในขั้นแรกจุลินทรีย์หลายชนิดที่อยู่ร่วมกันในระบบจะย่อยสลายสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มักจะไม่สามารถละลายน้ำให้แตกตัวเป็นสารอินทรีย์เชิงเดี่ยวที่เป็นอนุโมลเริ่มต้น (building blocks) ของชีวโมเลกุลต่าง ๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน โดยอาศัยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้น โดยจุลินทรีย์ในระบบ เพื่อการเปลี่ยนสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เล็กลง และละลายน้ำได้ดีขึ้น

2) Acidogenesis ในขั้นตอนนี้แบคทีเรียประเภทสร้างกรด (Acidogenic bacteria) สามารถย่อยสลายสารละลายอินทรีย์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ให้เป็นกรดอินทรีย์โมเลกุลสั้น ๆ ที่ระเหยได้ง่าย หรือ volatile fatty acid (VFA) เช่น valeric acid, butyric acid และ propionic acid เป็นต้น ขั้นตอนนี้เป็นปฏิกิริยาการสร้างกรดอินทรีย์

3) Acetogenesis จุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งคือ กลุ่มสร้างกรดอะซิติก (Acetogenic bacteria) มีย่อยสลายกรดอินทรีย์จากขั้นตอนปฏิกิริยาสร้างกรด ได้เป็น acetic acid, formic acid ขั้นตอนนี้เรียกว่า ปฏิกิริยาการสร้างกรดอะซิติกเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซมีเทน ในขั้นตอนนี้หากเกิดการสร้างกรดมากเกินไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตมีเทนไม่ทัน จะทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน

4) Methanogenesis ขั้นตอนการสร้างก๊าซมีเทน โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทน (Methanogens) จะใช้กรดอะซิติกที่ได้จากขั้นตอนการสร้างกรดอะซิติก เปลี่ยนเป็นมีเทน ( $\text{CH}_4$ ) และคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) การสร้างมีเทนจะเกิดขึ้นได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Farhad *et al.*, 2010)



รูปที่ 1.4 ขั้นตอนการเกิดก๊าซชีวภาพจากสารอินทรีย์

ที่มา : Appels *et al.* (2008)

การศึกษาของ Sidik *et al.* (2013) ใช้กระบวนการหมักร่วมของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มกับมูลวัวในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic digestion) ที่อุณหภูมิ 28-34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน โดยการแปรผันสัดส่วน น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม : มูลวัว ดังนี้ 100 : 0, 0 : 100, 60 : 40, 70 : 30 และ 80 : 20 พบว่า การใช้สัดส่วน 100 : 0 และสัดส่วน 0 : 100 จะเริ่มผลิตก๊าซชีวภาพในวันที่ 10 และวันที่ 15 และเมื่อสิ้นสุดการหมักในวันที่ 21 มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ได้ร้อยละ 46.3 และ 17.1 จากปริมาณซีโอดีเริ่มต้น 8,215 มิลลิกรัมต่อลิตร และ

68,900 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซชีวภาพสะสม 717 มิลลิลิตร และ 443 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซมีเทนร้อยละ 44.1 และ 40.5 ตามลำดับ และหมักร่วมระหว่างน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม: มูลวัวในสัดส่วน 60 : 40 และ 80 : 20 พบว่าในวันที่ 21 มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ได้ร้อยละ 21 และ 67 จากปริมาณซีโอดีเริ่มต้น 30,300 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 28,100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซชีวภาพสะสมได้ 864 มิลลิลิตร และ 1,504 มิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซมีเทนได้ร้อยละ 46.1 และ 50 ตามลำดับ การหมักร่วมที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ในการศึกษาคือ การใช้ น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม : มูลวัวในสัดส่วน 70 : 30 ในวันที่ 21 ของการหมักร่วมพบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ได้ร้อยละ 75 จากปริมาณซีโอดี เริ่มต้น 29,100 มิลลิกรัมต่อลิตรและมีปริมาณก๊าซชีวภาพสะสม 1,875 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในผลิตก๊าซมีเทนร้อยละ 61.1 เมื่อวัดค่าอัตราส่วนคาร์บอน : ไนโตรเจน (C:N ratio) พบว่าในการใช้สัดส่วน 70 : 30 อยู่ในช่วง 20 -30 : 1 ตามคำแนะนำ (Yadvika *et al.*, 2004)

การศึกษาผลของสารยับยั้งการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนของระบบการผลิตก๊าซชีวภาพในน้ำเสียจากโรงงานผลิตไวน์และโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกที่มีการปนเปื้อนน้ำมันมะกอกที่ผ่านการเจือจางพบว่า การปนเปื้อนของน้ำมันมะกอกในน้ำเสยร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ไม่ส่งผลต่อการผลิตก๊าซชีวภาพ แต่เอทานอล 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และฟีนอล 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์สร้างกรดและจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทน ทำให้การกำจัดซีโอดีและประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพลดลง (Camarillo and Rincon, 2009)

การศึกษการบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ซึ่งมีภาวะบรรทุกสารอินทรีย์และสารประกอบฟีนอลิกปริมาณค่อนข้างสูง จึงมีการนำระบบบำบัดแบบสองขั้นตอนมาประยุกต์ใช้ คือการบำบัดแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนควบคู่กันโดยใช้ยีสต์ *Candida tropicalis* ATCC 32546 และใช้หางน้านมซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการผลิตชีสมาเป็นสับสเตรทร่วมในกระบวนการบำบัดแบบใช้ออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า สามารถลดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียได้ร้อยละ 54 จากความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้น 700 มิลลิกรัมต่อลิตร และการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนในระบบก๊าซชีวภาพทำให้มีผลผลิตก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 68-75 และสามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 93 (Martinez-Garzia *et al.*, 2007)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษากำจัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกโดยใช้ราไทรอท *Pleurotus ostreatus* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยทำการทดสอบด้วย 1) การเจือจางน้ำเสียให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 50 และนำไป

มาเชื้อ 2) น้ำเสียที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 50 และนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส และ 3) น้ำเสียที่ไม่ได้ผ่านการเจือจางและนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส พบว่าชุดการทดลองที่ 1 สามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้ ร้อยละ 66.66 ใช้เวลา 19 วัน ชุดที่ 2 สามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 64.71 ใช้เวลา 21 วัน และชุดที่ 3 สามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 78.3 ใช้เวลา 21 วัน โดยที่น้ำเสียมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 1,035 มิลลิกรัมต่อลิตร การทดสอบค่าซีโอดีที่ละลายน้ำ (dissolved COD) ของน้ำเสียในแต่ละการทดลองพบว่าลดลง ร้อยละ 10, 12 และ 9 ตามลำดับ การศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ขนาด 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส น้ำเสียที่ผ่านการให้ความร้อนและผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกด้วย *P. ostreatus* มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพโดยได้ปริมาตรรวม 1,171 มิลลิเมตร เกิดก๊าซมีเทนร้อยละ 82 ใช้เวลา 14 วัน ส่วนน้ำเสียที่ไม่ผ่านการปรับสภาพใดๆ สามารถผลิตก๊าซชีวภาพในปริมาตรรวมเพียงแค่ 221 มิลลิเมตร เกิดก๊าซมีเทนร้อยละ 71 ใช้เวลา 20 วัน ส่วนน้ำเสียที่ผ่านการให้ความร้อนแต่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้ *P. ostreatus* สามารถผลิตก๊าซชีวภาพในปริมาตรรวม 1,162 มิลลิเมตร ใช้เวลา 18 วัน เกิดก๊าซมีเทนเพียงร้อยละ 12 เท่านั้น (Fountoulakis *et al.*, 2002) จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่ามีความจำเป็นในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธีทางชีวภาพก่อนการนำน้ำเสียเข้าสู่กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพสะสมและก๊าซมีเทนให้สูงขึ้น

### 1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำเสียของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม โดยใช้แบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะใช้อากาศ

2) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นด้วยแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 โดยศึกษาเปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ยังไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก

### 1.4 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics) และการจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มเด่นที่ปนเปื้อนในน้ำเสียของกระบวนการสกัดน้ำมัน

ปาล์มโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu reagent และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ตามลำดับ ใช้ตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 3 โรงงานในจังหวัดสตูล , กระบี่ และ สุราษฎร์ธานี ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้ตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด โดยใช้แบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก พีเอช และอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกโดยแบคทีเรีย และศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นให้คงเหลือความเข้มข้นต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ยังไม่ได้ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกโดยวิเคราะห์ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสม และปริมาณก๊าซมีเทน

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มเด่นที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

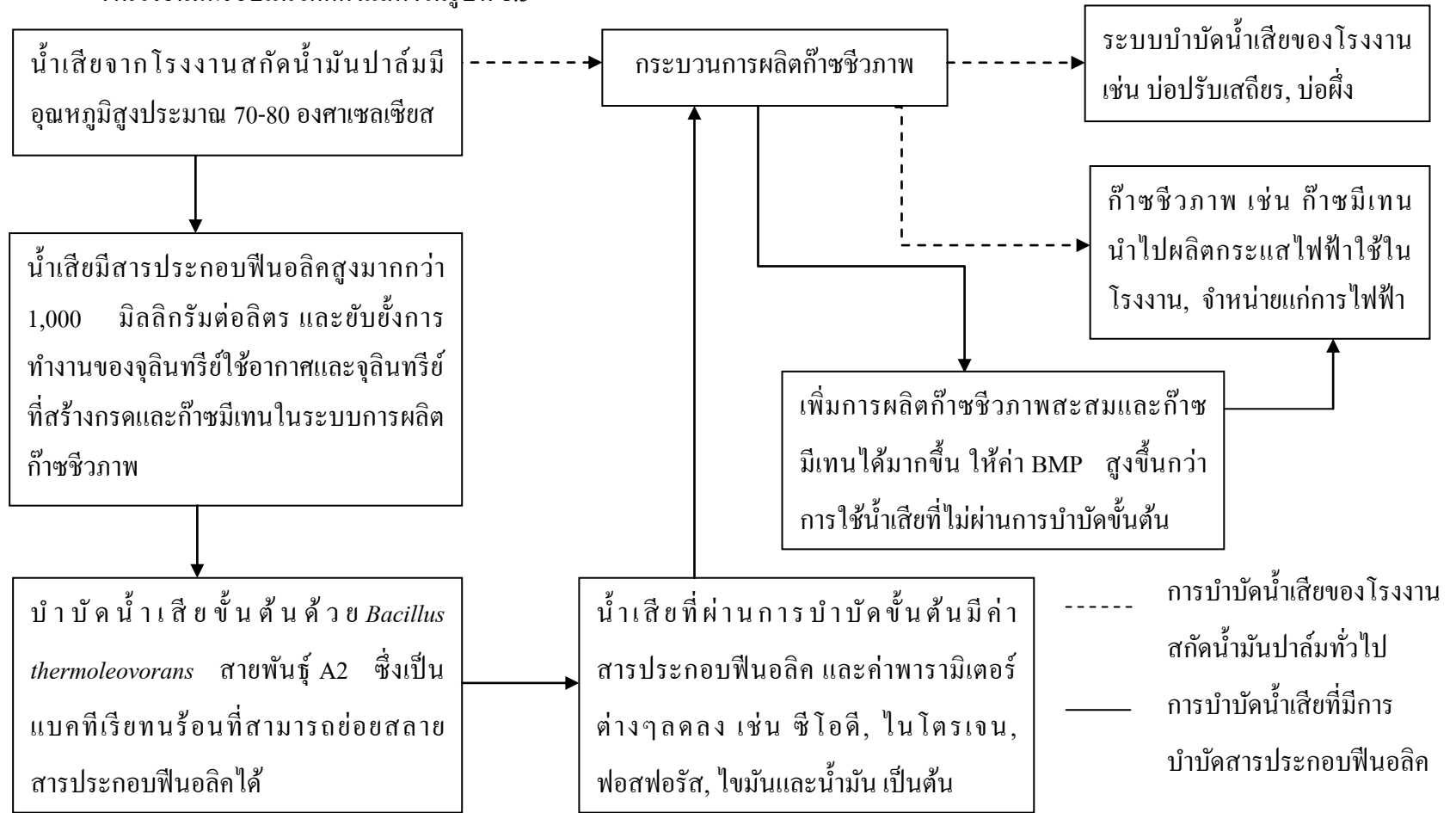
1.5.2 ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้แบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะใช้ออกซิเจน

1.5.3 ทราบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ และปริมาณก๊าซมีเทนโดยใช้น้ำเสียของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้น

1.5.4 สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย และการเพิ่มผลผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสีย

1.6 กรอบแนวคิดการวิจัย

งานวิจัยนี้มีกรอบแนวคิดดังแสดงในรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย

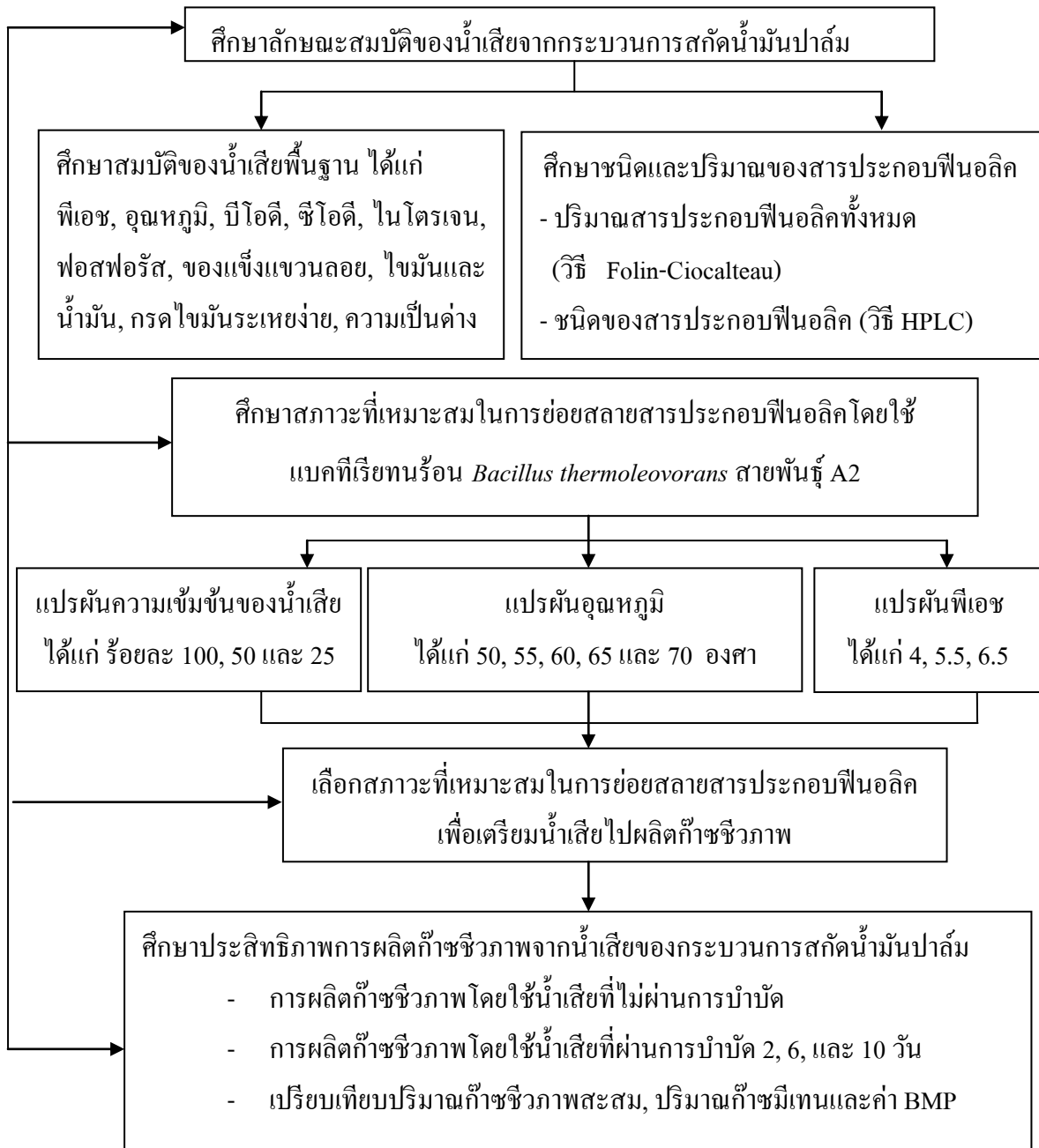


## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1 ภาพรวมของวิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีภาพรวมของวิธีดำเนินงานวิจัยดังแสดงในรูปที่ 2.1

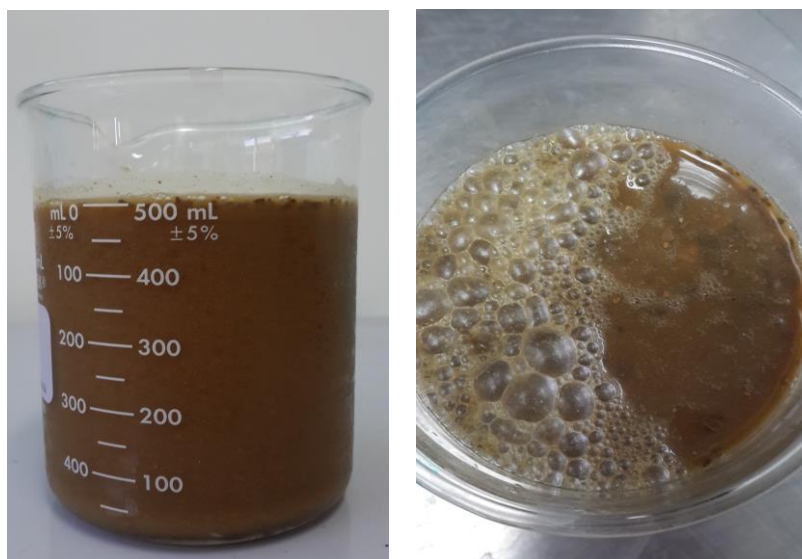


รูปที่ 2.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย



## 2.2 การเก็บตัวอย่างน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม โรงงานละ 1 ครั้ง โดยเก็บจากท่อของน้ำเสียที่ออกจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มก่อนจะปล่อยน้ำเสียลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 3 แห่ง โรงงานที่ 1 จังหวัดสตูล (Mill A) เก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคม, โรงงานที่ 2 จังหวัดกระบี่ (Mill B) เก็บตัวอย่างในเดือนกันยายน และ โรงงานที่ 3 จังหวัดสุราษฎร์ธานี (Mill C) เก็บตัวอย่างในเดือนธันวาคม ซึ่งเป็นช่วงที่โรงงานกำลังมีการผลิตน้ำมันปาล์มดิบ เก็บตัวอย่างน้ำเสียในขวดโพลีเอทิลีนขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ชั่วคราวและรักษาลักษณะของน้ำเสียให้คงที่ตลอดการทดลอง นำน้ำเสียมาผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกำจัดตะกอนแขวนของแข็งที่อยู่ในน้ำเสียก่อนนำมาทดลอง ลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

## 2.3 การวิเคราะห์ลักษณะของน้ำเสีย

### 2.3.1 การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทั่วไปของน้ำเสีย

วิเคราะห์ลักษณะสมบัติทั่วไปของน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มทั้ง 3 แห่ง ตามวิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสียใน Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ดังพารามิเตอร์ต่อไปนี้: ออกซิเจนละลายในน้ำ (Dissolved oxygen, DO) บีโอดี (Biological oxygen demand, BOD) ซีโอดี (Chemical

oxygen demand, COD) ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total suspended solids, TSS) ไขมันและน้ำมัน (Oil and grease) ค่ากรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acid, VFA) และค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 วิธีการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทั่วไปของน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์*	วิธีวิเคราะห์
ออกซิเจนละลายในน้ำ	Azide Modification
บีโอดี	5 – day BOD Test
ซีโอดี	Open Reflux Method
ไนโตรเจน	Kjeldahl Method
ฟอสฟอรัส	Persulfate / Ascorbic Acid Method
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด	Total Suspended Solids Dried at 103-105 °C
น้ำมันและไขมัน	Soxhlet extraction method
กรดไขมันระเหยง่าย	Titration Method
ค่าความเป็นด่าง	Titration Method

\* วิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการด้านสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม

## 2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณและการจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย

### 2.3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมด (Total phenolics)

นำน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มของ 3 โรงงานทั้งก่อนและหลังการทดลองย่อยสลายทางชีวภาพ และการผลิตก๊าซชีวภาพมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมดที่ละลายอยู่ในน้ำเสียด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (ดัดแปลงจาก Ergul *et al.*, 2011) ตามวิธีการในข้อ 2.7.1

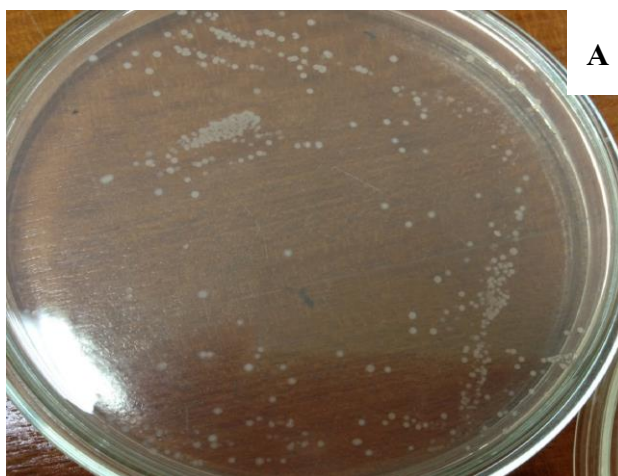
### 2.3.2.2 การจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มเด่น

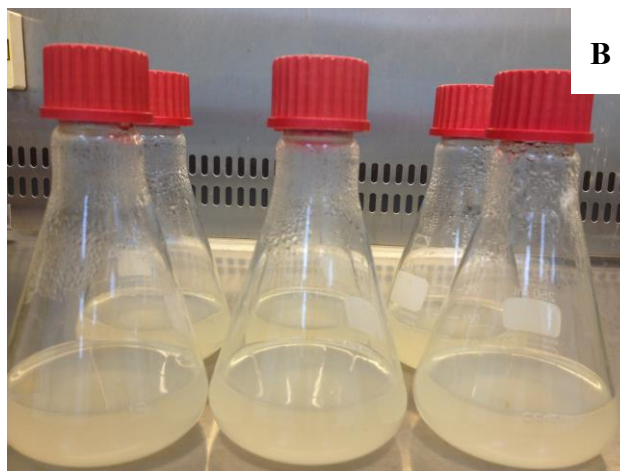
นอกจากการวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดตามข้อ 2.3.2.1 แล้ว มีการจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มเด่นในน้ำเสียของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) การเตรียมตัวอย่างน้ำเสียทำโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอนของแข็ง และ

เจือจาง 5 เท่า ก่อนกรองด้วย nylon syringe filter ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งต่อดัวย detector ชนิด diode array detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ตามวิธีการในข้อ 2.7.2 จากนั้นนำปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง HPLC มาคิดรวมกันเพื่อคำนวณว่าชนิดและปริมาณของสารที่วิเคราะห์ด้วยวิธีนี้คิดเป็นร้อยละเท่าไรเมื่อเทียบจากการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ในข้อ 2.3.2.1

#### 2.4 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

งานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรียทนร้อนชนิด *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 (รูปที่ 2.3 A และ B) ซึ่งคัดแยกจากน้ำพุร้อนในประเทศไอร์แลนด์ (Mutzel *et al.*, 1996) ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว carbon free mineral medium (CFMM) ที่มีการเติมฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย นำไปบ่มและเขย่าด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วง Late-log phase เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่ยังมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยนำแบคทีเรียมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหาร CFMM 2 ครั้ง ละลายเซลล์ด้วยอาหาร CFMM และปรับความขุ่นของเชื้อ (Optical density, OD<sub>580</sub>) ให้ได้เท่ากับ 1.0 ก่อนนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มต่อไป





รูปที่ 2.3 ลักษณะของโคโลนีและการเจริญของแบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในอาหารแข็ง (A) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (B)

## 2.5 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นในน้ำเสียโดย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2

การทดลองนี้เลือกใช้น้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มเป็นน้ำเสียต้นแบบที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกถูกสกัดออกมาจากผลปาล์มในระหว่างกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน (แบบใช้น้ำ) จึงมีการตกค้างของกลุ่มสารดังกล่าวอยู่ในน้ำเสีย จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 3 แห่ง ตรวจพบความเข้มข้นสูงที่สุดในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1,503 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่น้ำเสียจากโรงงานในจังหวัดกระบี่และสตูลมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1,206-1,280 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเลือกตัวอย่างน้ำเสียจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นตัวแทนในการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิก การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพขั้นต้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้แบคทีเรียทนร้อนชนิด *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 โดยสภาวะที่สนใจศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิก อุณหภูมิ และพีเอช ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยดังกล่าวส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพ ดังนั้นจึงมีการแปรผันปัจจัยดังกล่าวให้มีความใกล้เคียงกับการนำไปประยุกต์ใช้งานจริง ดังรายละเอียดดังนี้

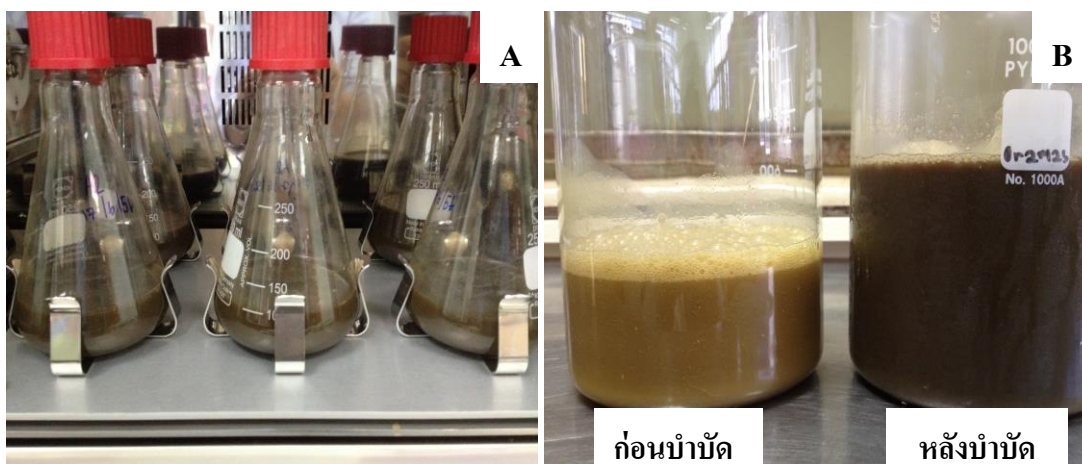
(1) ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก โดยการแปรผันความเข้มข้นของน้ำเสียที่ใช้ในการทดลอง ทำการเปรียบเทียบผลของการใช้น้ำเสียที่ไม่ผ่านการเจือจาง ซึ่งถือว่ามีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกร้อยละ 100 เปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียร้อยละ 50 และร้อยละ 25

(2) อุณหภูมิ โดยการแปรผันอุณหภูมิในการศึกษา ได้แก่ 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส

(3) พีเอช โดยการแปรผันค่าพีเอช ได้แก่ พีเอช 4, พีเอช 5.5, พีเอช 6.5 และ พีเอช 7

ในการศึกษาผลของปัจจัยดังกล่าว ดำเนินการทดลองในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเสียปริมาตร 4 มิลลิลิตร และหัวเชื้อ *B.thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่เตรียมได้จากข้อ 2.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ใช้หัวเชื้อร้อยละ 20 โดยปริมาตร) ทำการทดลองชุดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง นำประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกไปวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One Way ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistic base เวอร์ชัน 17.0 (S/N 5066845) เพื่อดูความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 95$ )

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมแล้วนำมาศึกษาผลของการมีและไม่มีจุลินทรีย์ท้องถิ่นในน้ำเสีย ร่วมกับการเติมแบคทีเรียที่ร้อนที่มีต่อประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก โดยบรรจุน้ำเสียที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อ *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่เตรียมได้จากข้อ 2.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มตัวอย่างในตู้บ่มตัวอย่างที่ให้อัตราเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที (รูปที่ 2.4 A และ B) ศึกษาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด ทำการทดลองชุดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดที่เหลืออยู่ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu เก็บตัวอย่างจนกว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายสารดังกล่าวคงที่



รูปที่ 2.4 การเลี้ยง *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ร่วมกับน้ำเสีย (A) ลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดด้วย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 (B)

นำชุดตัวอย่างที่สามารถบำบัดสารประกอบฟีนอลิกได้สูงที่สุดไปวิเคราะห์การลดลงของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มเด่นแต่ละชนิดด้วยเครื่อง HPLC นอกจากนั้นตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ลักษณะน้ำเสียอื่น ๆ เช่น พีเอช ซีโอดี ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เป็นต้น ดังตารางที่ 2.2 รวมทั้งวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดทั้งก่อนและหลังการบำบัดด้วยวิธี total plate count ตามวิธีการในข้อ 2.7.3

เตรียมชุดควบคุมการทดลองเพื่อศึกษาการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกโดยอาศัยจุลินทรีย์ท้องถิ่นในน้ำเสียแต่เพียงอย่างเดียว (ไม่มีการเติมเชื้อทนร้อน) และชุดควบคุมการลดลงโดยปัจจัยทางกายภาพ-เคมี (Abiotic losses) ประกอบด้วยน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (ไม่มีการเติมเชื้อทนร้อน)

**ตารางที่ 2.2** รายละเอียดการวิเคราะห์ลักษณะน้ำเสียก่อน ระหว่าง และหลังการบำบัด สารประกอบฟีนอลิก

พารามิเตอร์	ก่อนการ บำบัด สารประกอบ ฟีนอลิก	ระหว่างการ บำบัด สารประกอบ ฟีนอลิก	หลังการ บำบัด สารประกอบ ฟีนอลิก
พีเอช	✓	-	✓
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	✓	-	✓
บีโอดี (มก./ล.)	✓	-	✓
ซีโอดี (มก./ล.)	✓	-	✓
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด(มก./ล.)	✓	-	✓
ไนโตรเจน (มก./ล.)	✓	-	✓
ฟอสฟอรัส (มก./ล.)	✓	-	✓
สารประกอบฟีนอลิกรวม (มก./ล.)	✓	✓	✓
ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก (มก./ล.)	✓	-	✓
จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/mL)	✓	-	✓

## 2.6 การผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้น

ทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้น โดยการบ่มตัวอย่างน้ำเสียร่วมกับแบคทีเรียที่เรียกหมักในสถานะที่มีพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดจากหัวข้อ 2.5 เป็นระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่คงเหลือในน้ำเสียหลังการบำบัดมีค่าแตกต่างกัน คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เหลืออยู่ประมาณร้อยละ 80, 60 และ 40 ของความเข้มข้นเริ่มต้น ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อทดสอบว่าเมื่อมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกคงเหลือในน้ำเสียที่ใช้เป็นสับสเตรทแตกต่างกัน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพแตกต่างกันหรือไม่ โดยพิจารณาจากปริมาตรของก๊าซชีวภาพสะสม ร่วมกับปริมาณมีเทนที่ถูกผลิตขึ้น ชุดการทดลองข้างต้นถูกเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำเสียที่ยังไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก

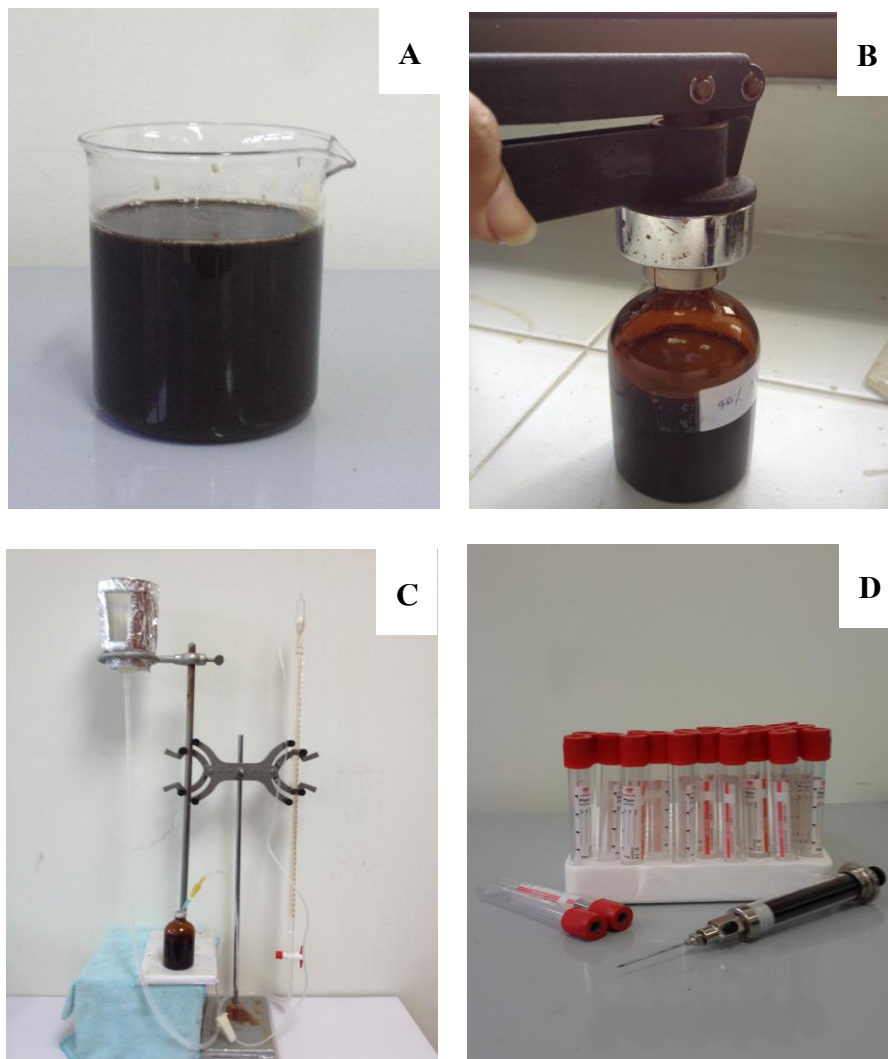
การผลิตก๊าซชีวภาพทดลองโดยนำน้ำเสียที่ผ่านและไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้นมาผสมกับกากตะกอนแอนแอโรบิกแบคทีเรียที่ได้จากระบบผลิตก๊าซชีวภาพของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแห่งหนึ่งในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (รูปที่ 2.5A) ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้งาน โดยกากตะกอนดังกล่าวมีค่าอัตราส่วนระหว่าง MLSS : MLVSS ซึ่งเป็นค่าของแข็งแขวนลอย (MLSS) และของแข็งแขวนลอยระเหย (MLVSS) ประมาณ 0.7 เป็นไปตามคำแนะนำในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (Activated sludge process) ในช่วง 0.7-0.9 (Jenkins *et al.*, 2004) ระบบการผลิตก๊าซชีวภาพใช้กากตะกอนเริ่มต้นร้อยละ 30 ของน้ำเสียทั้งหมด คิดเป็นปริมาตร 18 มิลลิลิตร ในปริมาตรรวมของระบบทั้งหมด 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ และเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.24 กรัม (Beccari *et al.*, 1996) ลงในขวดซีรัมปริมาตร 120 มิลลิลิตร ที่มีการใส่ก๊าซออกซิเจนออกให้หมดด้วยการ flush ก๊าซไนโตรเจนประมาณ 1 นาที ปิดขวดให้สนิทด้วยจุกยางและ Aluminum crimp cap นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 2.5 (B) จากนั้นวัดปริมาตรก๊าซชีวภาพสะสมที่เกิดขึ้นโดยการแทนที่น้ำทุกๆ 2 วัน ดังรูปที่ 2.5 (C)

การเก็บตัวอย่างก๊าซชีวภาพโดยใช้หลอดเก็บก๊าซ ดังรูปที่ 2.5 (D) เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของก๊าซชีวภาพ ได้แก่ ก๊าซมีเทน, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์, และก๊าซไนโตรเจนด้วยเครื่อง Gas chromatography-thermal conductivity detector (GC-TCD) ทุกๆ 7 วันตามวิธีการในข้อ 2.7.4 จากนั้นทดสอบศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทน (Biochemical methane potential) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{BMP (มิลลิลิตรมีเทน/กรัมซีไอดี)} = \frac{\text{ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมสูงสุด (มิลลิลิตรมีเทน)}}{\text{ซีไอดีเริ่มต้นของน้ำเสีย (กรัมซีไอดีทั้งหมด)}}$$

นำค่า BMP ที่ได้ในแต่ละระบบมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One Way ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistic base เวอร์ชัน 17.0 (S/N 5066845) เพื่อศึกษาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 95$ )





**รูปที่ 2.5** ลักษณะทางกายภาพของกากตะกอนแอนแอโรบิกแบคทีเรีย (A) ขวดซีรัมสีชาขนาด 120 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำเสียและกากตะกอนแอนแอโรบิกแบคทีเรียปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง และ aluminum crimp cap (B) ระบบการผลิตก๊าซชีวภาพขนาดเล็กแบบกะซึ่งมีการวัดปริมาตรก๊าซชีวภาพสะสมด้วยการแทนที่น้ำ (C) และหลอดเก็บก๊าซชีวภาพ และ Gas tight syringe เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-TCD (D)

การผลิตก๊าซชีวภาพทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ชั่วโมง และวัดค่าพารามิเตอร์ เช่น ปริมาณของแข็งทั้งหมด ซีไอดี อุณหภูมิ พีเอช ความเป็นด่าง กรดไขมันระเหยได้ในการผลิตก๊าซชีวภาพดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 รายละเอียดการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติน้ำเสียก่อน ระหว่าง และหลังจากการผลิตก๊าซชีวภาพ

พารามิเตอร์	ก่อนการผลิต ก๊าซชีวภาพ	ระหว่างการผลิต ก๊าซชีวภาพ	หลังการผลิต ก๊าซชีวภาพ
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (มก./ล.)	✓	-	✓
ซีโอดี (มก./ล.)	✓	-	✓
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	✓	-	✓
พีเอช	✓	-	✓
ความเป็นด่าง (มก./ล.)	✓	-	✓
กรดไขมันระเหยได้ (มก./ล.)	✓	-	✓
ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น(มิลลิลิตร)	✓	✓	✓
องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ (ร้อยละ)	✓	✓	✓
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด(มก./ล.)	✓	-	✓
ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก (มก./ล.)	✓	-	✓

## 2.7 วิธีวิเคราะห์

### 2.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมด (Total phenolics)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำเสียด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (ดัดแปลงจาก Ergul *et al.*, 2011) โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอน ทำการเจือจาง 20 เท่า เติมตัวอย่างน้ำทิ้งที่เจือจางแล้ว 200 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย Folin–Ciocalteu’s phenol ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใช้น้ำกลั่นที่ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank และคำนวณค่าความเข้มข้นที่ได้โดยการคูณด้วยอัตราส่วนการเจือจาง (Dilution factor)

### 2.7.2 การจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มเด่น

การจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มเด่นในน้ำเสียโดยใช้เครื่อง HPLC ต่อกับ Detector ชนิด Diode array detector (DAD) (Agilent 1100) ใช้คอลัมน์ RP-18 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร หนา 5 ไมโครเมตร โดยใช้สภาวะการจำแนกสารตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Asses *et al.* (2009) ดังนี้: ปริมาณตัวอย่างน้ำเสีย 20 ไมโครลิตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) 0.1% phosphoric acid ในน้ำ (A) และ 50% acetonitrile ในน้ำ (B) เป็นเวลา 45 นาที เป็นการรันแบบปรับสัดส่วน เริ่มที่ตัวทำละลาย B 20% และเพิ่มเป็น 50% ในเวลา 30 นาที หลังจากนั้นชะด้วยตัวทำละลาย A 50% ภายใน 10 นาที และลดลงเหลือ 20% จนกว่าจะสิ้นสุดการรัน ใช้อุณหภูมิของ Oven เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.5 มิลลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นของ Detector 280 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย (1) gallic acid, (2) protocatechuic acid, (3) 4-hydroxybenzoic acid, (4) caffeic acid, (5) vanillic acid, (6) syringic acid, (7) *p*-coumaric acid (8) ferulic acid และ (9) phenol ตรวจสอบ retention time ของสารแต่ละชนิดด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง (Standard addition) จากนั้นนำปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง HPLC มาคิดรวมกันเพื่อคำนวณว่าชนิดและปริมาณของสารที่วิเคราะห์ด้วยวิธีนี้คิดเป็นร้อยละเท่าไรเมื่อเทียบจากการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ในข้อ 2.3.2.1

### 2.7.3 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย

วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียโดยวิธี total plate count โดยการนำตัวอย่างน้ำเสียไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างและแขวนลอยเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ก่อนนำไปวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย (CFU ต่อ มิลลิเมตร) โดยนำสารละลายเซลล์มาเจือจางโดยวิธี 10-fold dilution ทำการเปิดสารละลายเซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนอาหารแข็ง จากนั้นใช้เทคนิค Spread plate กลี๋ยให้สารละลายเซลล์ทั่วถึงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีการเติมกลูโคสร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย นำตัวอย่างไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี และคำนวณจำนวนแบคทีเรียบนอาหารแข็งโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (CFU/mL)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนี} \times \text{ระดับการเจือจาง}}{\text{ปริมาตรสารละลายเซลล์ที่ใส่ใน plate (mL)}}$$

#### 2.7.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ

วิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพด้วย GC-TCD (Agilent รุ่น 7890) โดยใช้คอลัมน์ HP plot Q (0.53 mm. I.D.) ที่มีก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซตัวพาที่อัตราการไหล 9 psi ใช้อุณหภูมิของ Oven เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที อุณหภูมิของ Detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส

## บทที่ 3

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 3.1 การศึกษาลักษณะน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

##### 3.1.1 ข้อมูลทั่วไปของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การศึกษานี้ผู้มเก็บตัวอย่างน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มก่อนจะปล่อยน้ำเสียลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน จำนวน 3 แห่ง ในภาคใต้ของประเทศไทย บริเวณจังหวัดสตูล (โรงงาน A) จังหวัดกระบี่ (โรงงาน B) และจังหวัดสุราษฎร์ธานี (โรงงาน C) ที่มีกำลังการผลิตอยู่ที่ 20-60 ตันทะลายปาล์มสดต่อชั่วโมง (ตารางที่ 3.1) พบว่าทั้ง 3 โรงงาน ใช้ผลปาล์มสุกเป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกัน แต่สามารถแบ่งผลผลิตได้เป็น 2 รูปแบบ นั่นคือ โรงงาน A มีผลิตภัณฑ์เป็นน้ำมันปาล์มดิบเพียงอย่างเดียว ในขณะที่โรงงาน B และ C มีผลิตภัณฑ์เป็นน้ำมันปาล์มดิบและเมล็ดในปาล์มอบแห้ง นอกจากนี้ทั้ง 3 โรงงานใช้กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานหรือแบบใช้น้ำ ซึ่งมีปริมาณการใช้น้ำในกระบวนการผลิตแตกต่างกันตามกำลังการผลิต โดยโรงงาน C มีปริมาณการใช้น้ำ 4.33 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด มากกว่าโรงงาน A ที่ใช้น้ำเท่ากับ 1.18 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้น้ำก่อให้เกิดน้ำเสียออกมาปริมาณมาก โดยน้ำเสียส่วนใหญ่มาจากการทำความสะอาดน้ำมันปาล์มดิบ (Clarification) และการนึ่งผลปาล์มสดเพื่อสกัดน้ำมัน (Sterilization) ปริมาณน้ำเสียของทั้ง 3 โรงงานอยู่ในช่วง 240 ถึง 500 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน สำหรับระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทั้ง 3 โรงงานสามารถแบ่งออกได้ 2 แบบ คือ บ่อปรับเสถียร ในโรงงาน A ลักษณะเป็นบ่อดินเรียงต่อเนื่องกัน 4 บ่อ และอีกระบบหนึ่งคือ ระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศ (Anaerobic pond) ร่วมกับระบบบ่อปรับเสถียร (Stabilization pond) ซึ่งพบในโรงงาน B และ C โดยน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มจะถูกปล่อยลงบ่อพัก เพื่อลดอุณหภูมิน้ำเสียก่อนจะเข้าสู่ระบบบ่อย่อยสลายแบบไร้อากาศเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพได้พร้อมกัน 2 บ่อ หลังจากนั้นน้ำเสียจะถูกปล่อยเข้าสู่ระบบบ่อปรับเสถียรอีก 4 บ่อต่อไป

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลทั่วไปของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ข้อมูลทั่วไป	โรงงาน A	โรงงาน B	โรงงาน C
ที่ตั้ง (จังหวัด)	สตูล	กระบี่	สุราษฎร์ธานี
กำลังการผลิต (ตันทะลายปาล์มสด/ชั่วโมง)	20	60	45
ชนิดวัตถุดิบ	ผลปาล์มสุก	ผลปาล์มสุก	ผลปาล์มสุก
ผลิตภัณฑ์	น้ำมันปาล์มดิบ	น้ำมันปาล์มดิบและ เมล็ดในปาล์มอบแห้ง	น้ำมันปาล์มดิบและ เมล็ดในปาล์มอบแห้ง
ปริมาณการใช้น้ำ (ลบ.ม./ตันทะลายปาล์มสด)	1.18	-	4.33
ปริมาณน้ำเสีย (ลบ.ม./ วัน)	350*	500*	240*
ระบบบำบัดน้ำเสีย	บ่อบำบัดเสถียร	การย่อยสลายแบบไร้อากาศ/บ่อบำบัดเสถียร	การย่อยสลายแบบไร้อากาศ/บ่อบำบัดเสถียร
จำนวนบ่อบำบัดน้ำเสีย (บ่อ)	4	2/4	2/4

- ไม่มีข้อมูล

\*ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม (2554)

### 3.1.2 ลักษณะน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนั้น ได้เลือกจุดเก็บตัวอย่างที่เหมือนกัน ทั้ง 3 โรงงานคือ บริเวณจุดปล่อยน้ำเสียจากระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ โดยน้ำเสียนั้นยังไม่ได้ผ่านการบำบัดใดๆ ลักษณะทั่วไปของน้ำเสียจะมีอุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส มีสีน้ำตาลเข้ม หลังจากที่น้ำเสียเหล่านี้ถูกปล่อยจากระบวนการผลิตจะมีบ่อบำบัดน้ำเสียหรือส่งผ่านไปยังหอระบายความร้อน เพื่อระบายความร้อนให้น้ำเสียมีอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 40-55 องศาเซลเซียส และส่งน้ำเสียเข้าสู่ระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศ ที่ใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพ สำหรับโรงงาน A ซึ่งไม่มีระบบการผลิตก๊าซชีวภาพ มีการระบายความร้อนโดยใช้บ่อกักเก็บน้ำเสีย จำนวน 1 บ่อ ก่อนปล่อยลงสู่บ่อบำบัดเสถียรต่อไป เมื่อนำน้ำเสียทั้ง 3 โรงงาน มาวิเคราะห์ลักษณะน้ำเสีย

ทั่วไป และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่าทั้ง 3 โรงงานมีลักษณะน้ำเสียที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3.2 โดยน้ำเสียจากโรงงาน A มีอุณหภูมิค่าที่สุคประมาณ 56 องศาเซลเซียส ในขณะที่โรงงาน B และ C มีอุณหภูมิใกล้เคียงกันคือ 72 องศาเซลเซียส และ 76 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากการออกแบบระยะท่อส่งน้ำเสียจากระบวนการผลิตลงสู่บ่อพักน้ำของโรงงาน A มีระยะทางไกลกว่าโรงงาน B และ C ทำให้น้ำเสียจากโรงงาน A มีอุณหภูมิต่ำกว่าอีก 2 โรงงาน ส่วนค่าพีเอชนั้นทั้ง 3 โรงงานมีความใกล้เคียงกันคืออยู่ระหว่าง 4.17 - 4.67 นอกจากนี้ น้ำเสียจากโรงงาน A มีค่า ซีไอดี สูงที่สุดเท่ากับ 91,626 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่โรงงาน B และโรงงาน C ที่มีค่าซีไอดี ใกล้เคียงกันคือ 78,261 และ 77,647 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับพารามิเตอร์อื่นๆ เช่น บีไอดี ในโรงงาน A และโรงงาน B มีค่าใกล้เคียงกันคือ 35,655 และ 35,866 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าบีไอดีของโรงงาน C มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 48,700 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมดของโรงงาน C มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 29,183 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมดในโรงงาน A และ B มีค่าเท่ากับ 22,600 และ 11,200 มิลลิกรัมต่อ ลิตร ค่าไขมันและน้ำมันของโรงงาน A มีค่าสูงสุดเท่ากับ 17,380 มิลลิกรัมต่อลิตร มากกว่าโรงงาน C มีค่าเท่ากับ 13,370 มิลลิกรัมต่อลิตร และในโรงงาน B มีค่าไขมันและน้ำมันน้อยสุดเท่ากับ 8,588 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ค่าซีไอดี บีไอดี ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และค่าไขมันและน้ำมันพบว่ามี ความใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งรายงานลักษณะน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีค่าพีเอช ในช่วง 4.05-4.62, ค่าซีไอดีอยู่ในช่วง 80,000-150,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีไอดีอยู่ในช่วง 50,000-60,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมดอยู่ในช่วง 18,000-52,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าไขมันและน้ำมันอยู่ในช่วง 15-2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2543; Singh *et al.*, 2010 และ Alam *et al.*, 2009) ส่วนค่าฟอสฟอรัสของโรงงาน B และ C มีค่า ใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 320-348 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าค่าฟอสฟอรัสของโรงงาน A เท่ากับ 181 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามค่าไนโตรเจน ของโรงงาน A และ C มีค่าเท่ากับ 1,302 และ 1,067 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าโรงงาน B มีค่าเท่ากับ 571 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมด (Total phenolics) ใน น้ำเสียทั้ง 3 โรงงานด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าน้ำเสียของโรงงาน C มีค่าความเข้มข้นของ สารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด คือ  $1,503 \pm 51$  มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่โรงงาน A และ B มีค่า ใกล้เคียงกันเท่ากับ  $1,280 \pm 64$  และ  $1,206 \pm 26$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ตรวจ พบในการศึกษาคั้งนี้สอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาของ Alam *et al.* (2009) ที่รายงานความเข้มข้น

ของสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ตั้งอยู่ในประเทศมาเลเซีย

ตารางที่ 3.2 ลักษณะน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ศึกษาในงานวิจัย

พารามิเตอร์*	โรงงาน A	โรงงาน B	โรงงาน C
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	56	72	76
พีเอช	4.17	4.56	4.67
ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ล.)	0	0	0
ซีไอดี (มก./ล.)	91,626	78,261	77,647
บีไอดี (มก./ล.)	35,655	35,866	48,700
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (มก./ล.)	22,600	11,200	29,183
ฟอสฟอรัส (มก./ล.)	181	348	320
ไนโตรเจน (มก./ล.)	1,302	571	1,067
น้ำมันและไขมัน (มก./ล.)	17,380	8,588	13,370
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มก./ล.)	1,280±64	1,206±26	1,503±51

\* ทุกพารามิเตอร์ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 1 ซ้ำ ยกเว้นสารประกอบฟีนอลิกทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ

### 3.2 การศึกษาชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เนื่องจากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในข้อ 3.1.2 ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu เป็นการวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่ตกค้างในน้ำเสีย แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดได้ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษารายละเอียดดังกล่าวเพิ่มเติมด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ผลการทดลองพบว่าน้ำเสียจาก 3 โรงงานให้ลักษณะโครมาโตแกรมที่ใกล้เคียงกัน คือ ตรวจพบพีคที่มีค่าอัตราส่วนระหว่างสัญญาณที่เกิดจากสารสนใจ (Analyte) กับสัญญาณรบกวน (Noise) หรือ Signal to noise ratio เท่ากับ 3 ขึ้นไป จำนวน 15 พีค แต่มีความแตกต่างกันที่ขนาดความสูงและพื้นที่ใต้กราฟ (รูปที่ 3.1 A-C) เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่ง retention time (RT) ของพีคที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสียกับสารละลายมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก สามารถระบุชนิดของสารได้ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ (1) gallic acid, (2) protocatechuic acid, (3) 4-hydroxybenzoic acid,

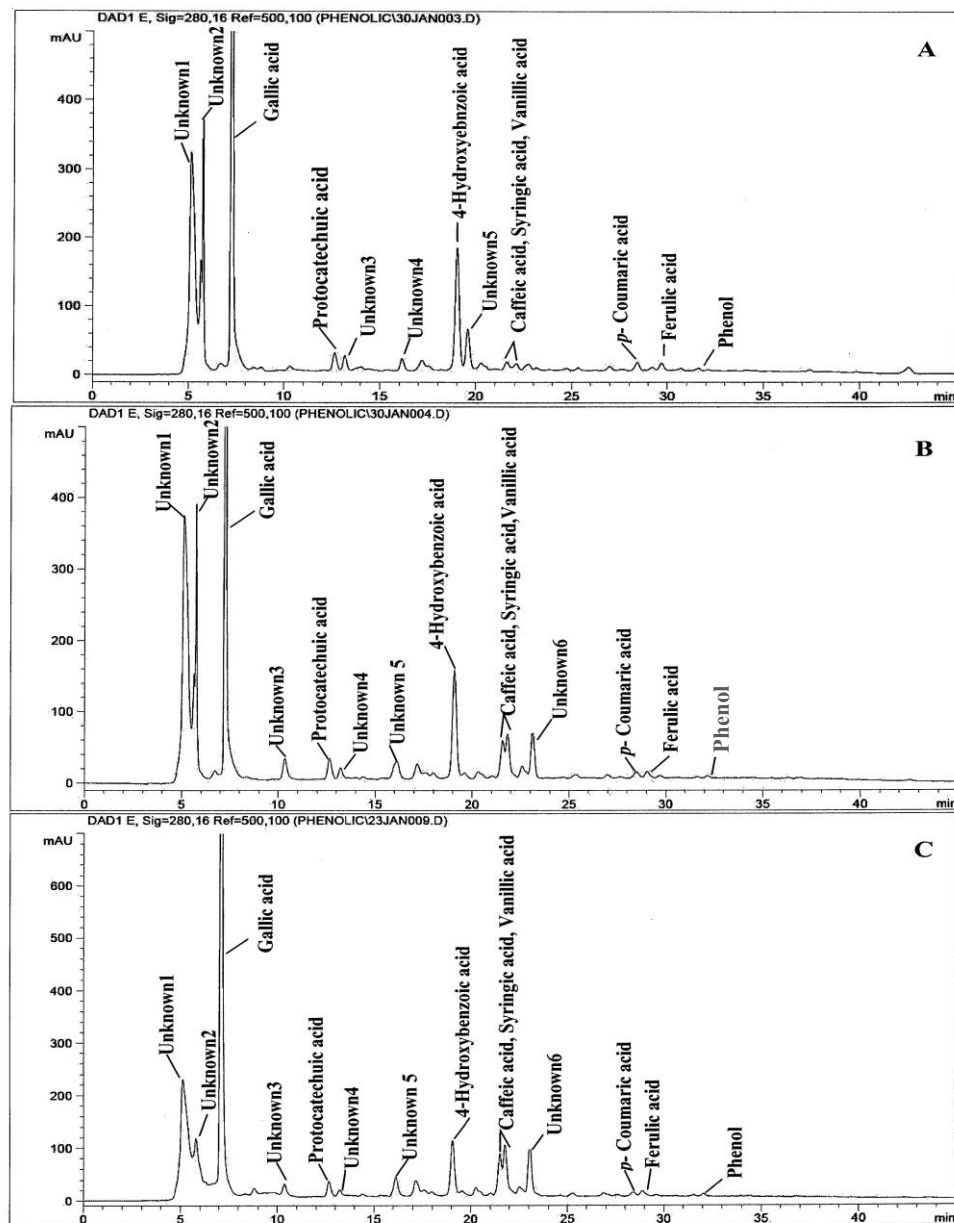


(4) caffeic acid, (5) vanillic acid, (6) syringic acid, (7) *p*-coumaric acid (8) ferulic acid และ (9) phenol โดยพีคของสาร(4) (5) และ (6) นั้น มี retention time ที่ใกล้เคียงกันมากไม่สามารถแยกออกจากกันภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนั้นยังมีพีคที่ไม่สามารถระบุชนิดของสาร (Unknown) ได้อีกประมาณ 6 ชนิด (พีค) ซึ่งพีค Unknown เหล่านี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารประกอบฟีนอลิกหรือไม่ เนื่องจากเครื่อง HPLC ที่ต่อกับดีเทคเตอร์ชนิด diode array detector (DAD) มีคุณสมบัติในการวิเคราะห์สารได้หลายประเภท เช่นสารประกอบที่มีหมู่ Amine (-NH<sub>2</sub>), Ethylene (-C=C-), Ketone (=C=O) และ Aldehyde (-CHO) เป็นต้น

ทั้งนี้สารประกอบฟีนอลิกทั้ง 9 ชนิดที่พบในน้ำเสียจัดอยู่ในกลุ่ม simple phenolics acid ทั้งหมด ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีวงแหวนอะโรมาติก 1 วง สร้างพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่หรือมากกว่านั้น และสารข้างต้นยังเป็นชนิดเดียวกับที่เป็นองค์ประกอบในผลปาล์มน้ำมัน ยกเว้นสารฟีนอล (Neo *et al.*, 2010; Maisarah *et al.*, 2013) จึงกล่าวได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ตกค้างในน้ำเสียเกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการสกัดน้ำมันจากผลปาล์มสดทำให้สารกลุ่มนี้ถูกสกัดออกมาด้วย กอปรกับคุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น gallic acid, caffeic acid, protocatechuic acid, ferulic acid เป็นสารที่มีสี ได้แก่ สีเหลือง หรือสีน้ำตาล จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสีน้ำตาลเข้มเมื่อรวมกับสารสีอื่น ๆ เช่น แทนนิน แคลโรทีนอยด์ แอนโทไซยานิน กัม เป็นต้น อย่างไรก็ตามการตรวจพบสารฟีนอลซึ่งไม่เป็นองค์ประกอบของผลปาล์ม อาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกเมื่อผ่านความร้อนในกระบวนการนึ่งผลปาล์ม นอกจากนี้การย่อยสลายลิกนินซึ่งเป็นสารที่พบในน้ำเสียผ่านกระบวนการ wet oxidation ทำให้เกิดสารตัวกลางที่เป็นสารประกอบฟีนอลิกอีกด้วย (Klinke *et al.*, 2001)

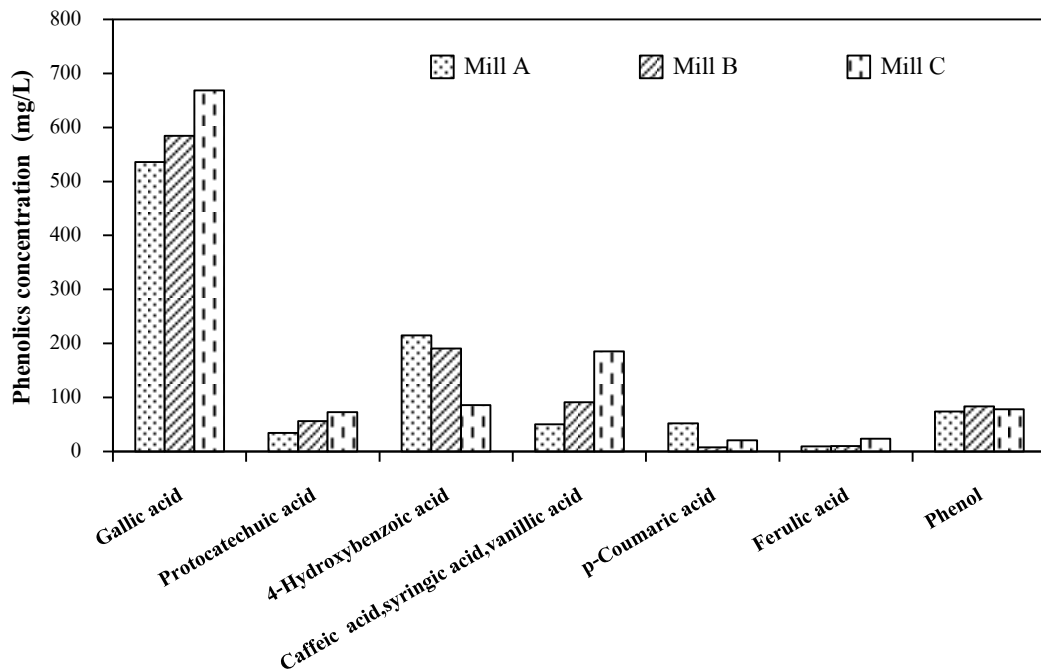
นอกจากการจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกแล้ว ผู้วิจัยศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำเสียแต่ละโรงงานมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 9 ชนิดแตกต่างกัน ดังรูปที่ 3.1 และรูปที่ 3.2 สำหรับสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากที่สุดคือน้ำเสียจากทั้ง 3 โรงงาน ได้แก่ gallic acid ซึ่งพบสูงสุดในโรงงาน C มีความเข้มข้นถึง 668 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าน้ำเสียจากโรงงาน A และโรงงาน B ที่มีความเข้มข้นของ gallic acid ใกล้เคียงกันคือ 535 และ 584 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบรองลงมาในแต่ละโรงงานนั้นมีความแตกต่างกัน โดยสามารถสรุปลำดับชนิดและปริมาณ(มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่พบในโรงงาน A ได้แก่ gallic acid (535) > 4-hydroxybenzoic acid (215) > phenol (74) > *p*-coumaric acid (52) > caffeic acid+syringic

acid+vanillic acid (50) > protocatechuic acid (34) > ferulic acid (9) โรงงาน B ได้แก่ gallic acid (584) > 4-hydroxybenzoic acid (190) > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid (91) > phenol (82) > protocatechuic acid (56) > ferulic acid (9) > *p*-coumaric acid (7) และโรงงาน C ได้แก่ gallic acid (668) > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid (185) > 4-hydroxybenzoic acid (86) > phenol (78) > protocatechuic acid (72) > ferulic acid (23) > *p*-coumaric acid (20)



รูปที่ 3.1 โครมาโตแกรมของชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในน้ำเสียของโรงงาน A (A), โรงงาน B (B) และโรงงาน C (C)

ทั้งนี้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจพบในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากรายงานการวิจัยของ Neo *et al.* (2010) ที่รายงานปริมาณ (โดยน้ำหนักแห้งของผลปาล์มน้ำมัน) ของสาร 4-hydroxybenzoic acid ในผลปาล์มน้ำมันมากที่สุดแต่กลับพบสาร gallic acid ในผลปาล์มน้ำมันน้อยที่สุด และมีสารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ ตามลำดับดังนี้; 4-hydroxybenzoic acid > ferulic acid > *p*-coumaric acid > syringic acid > vanillic acid > caffeic acid > protocatechuic acid > gallic acid อย่างไรก็ตามในรายงานวิจัยของ Maisarah *et al.* (2013) ศึกษาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในผลปาล์มน้ำมันพันธุ์ เทเนอร์ 2 สายพันธุ์ คือ PP24 และ PP99 โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วน คือ ในเส้นใยของผลปาล์มน้ำมัน (Mesocarp fiber) และในน้ำมันปาล์มดิบ (Crude palm oil) พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (โดยน้ำหนักแห้งของผลปาล์มน้ำมัน) ที่เป็นองค์ประกอบในทั้ง 2 ส่วน มากที่สุดคือ syringic acid โดยที่สายพันธุ์ PP24 มีสารชนิดนี้มากกว่าสายพันธุ์ PP99 ส่วนชนิดสารประกอบฟีนอลิกที่พบเป็นองค์ประกอบน้อยที่สุด คือ *p*-coumaric acid ซึ่งสามารถลำดับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบ ได้แก่ syringic acid > vanillic acid > gallic acid > ferulic acid > 4-hydroxybenzoic acid > caffeic acid > *p*-coumaric acid



รูปที่ 3.2 ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทั้ง 3 แห่ง

ดังนั้นสายพันธุ์ของปาล์มน้ำมันจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในน้ำเสียนั้นแตกต่างกัน ในกรณีของประเทศไทยพบว่ามีกรปลูกปาล์มน้ำมันหลายสายพันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นลูกผสมข้ามสายพันธุ์ (Progeny test cross) เช่น ลูกผสมระหว่างสายพันธุ์เทเนอรักับสายพันธุ์คูรา (อรรรัตน์ วงศ์ศรี และคณะ, 2548) จึงทำให้ผลปาล์มน้ำมันที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มใช้เป็นวัตถุดิบมีความหลากหลาย ส่งผลให้ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในน้ำเสียนั้นแตกต่างกัน นอกจากนั้นความแตกต่างของชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก อาจมีสาเหตุมาจากปัจจัยอื่น ๆ เช่น อายุของผลปาล์ม น้ำมัน ฤดูกาลในการเก็บเกี่ยว ปริมาณการใช้น้ำ วิธีการสกัดน้ำมันปาล์ม ช่วงเวลาและอัตราการผลิต เป็นต้น

หากเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่วัดได้จากเครื่อง HPLC กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วัดได้จากวิธีการ Folin-Ciocalteu ดังตารางที่ 3.3 พบว่าโรงงาน A, B และ C มีปริมาณสาร gallic acid ที่วัดได้จากเครื่อง HPLC มากที่สุดเท่ากับ 535, 584, และ 668 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 41.8, 48.4 และ 44.4 ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วัดได้จากวิธีการ Folin-Ciocalteu ซึ่งพบความเข้มข้น 1,280, 1,206 และ 1,503 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ ที่พบในโรงงาน A อยู่ในช่วงร้อยละ 0.7-16.8 และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจาก HPLC คิดเป็นร้อยละ 73 ของการวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ส่วนโรงงาน B พบสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ อยู่ในช่วงร้อยละ 0.6-15.8 และเมื่อรวมปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจาก HPLC คิดเป็นร้อยละ 84.5 ของการวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu สำหรับโรงงาน C พบสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ อยู่ในช่วงร้อยละ 1.5-12.3 และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC คิดเป็นร้อยละ 75.4 ของการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ Folin-Ciocalteu

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการศึกษานี้ สามารถจำแนกชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกได้ถึงร้อยละ 73.0 – 84.5 ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วัดได้โดยวิธี Folin-Ciocalteu ดังนั้นการใช้เทคนิค HPLC ในสภาวะนี้จึงสามารถใช้ระบุชนิดเด่นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียได้

ตารางที่ 3.3 ปริมาณ (ร้อยละ) ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

สารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณจาก HPLC เปรียบเทียบกับวิธี Folin-Ciocalteu*(ร้อยละ)		
	โรงงาน A	โรงงาน B	โรงงาน C
Gallic acid	41.8	48.4	44.4
Protocatechuic acid	2.6	4.6	4.8
4-Hydroxybenzoic acid	16.8	15.8	5.7
Caffeic acid, Syringic acid และ Vanillic acid	3.9	7.5	12.3
<i>p</i> -Coumaric acid	4.0	0.6	1.5
Ferulic acid	0.7	0.8	1.5
Phenol	5.8	6.8	5.2
รวมทั้งหมด	73.0	84.5	75.4

\*ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu: โรงงาน A เท่ากับ 1,280 มิลลิกรัมต่อลิตร, โรงงาน B เท่ากับ 1,206 มิลลิกรัมต่อลิตร และ โรงงาน C เท่ากับ 1,503 มิลลิกรัมต่อลิตร

การปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่ถูกปล่อยมาจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มถือเป็นปัญหาที่สำคัญเนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญและการทำงานของแบคทีเรีย (Estevinho *et al.*, 2008) จากการศึกษาของ Müller *et al.* (1998) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิด mesophile ได้ นอกจากนั้นทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์สร้างกรดและจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทน ทำให้การกำจัดชีโอดีและประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพลดลง (Camarillo and Rincon, 2009) เพราะฉะนั้นการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะในโรงงานที่มีการนำน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มมาผลิตก๊าซชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยรวมและผลผลิตก๊าซมีเทนที่ดีขึ้น

### 3.3 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโดย *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2

เนื่องจากน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มที่ปล่อยออกมาจากกระบวนการผลิตนั้นมีอุณหภูมิสูง งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำเสียโดยใช้แบคทีเรียเทอร์มอโรน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่คัดแยกจากน้ำพุร้อนในประเทศไอร์แลนด์ (Mutzel *et al.*, 1996) และเป็นแบคทีเรียที่เฉพาะเจาะจงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก (Phenols-degrading bacteria) โดยเลือกตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดคือโรงงาน C เป็นตัวแทนในการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารดังกล่าว

#### 3.3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย

การทดลองนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียด้วย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 โดยแปรผันสภาวะต่างๆ ที่ใกล้เคียงกับลักษณะทั่วไปของน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม คือ มีอุณหภูมิสูงประมาณ 55-70 องศาเซลเซียส มีพีเอชในช่วง 4.17-4.67 และสภาวะที่ *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เจริญได้ดี ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.5 จึงได้มีการแปรผันปัจจัยในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ 1) อุณหภูมิแบ่งเป็น 5 ช่วง คือ 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส, 2) พีเอชแบ่งเป็น 4 ช่วง คือ พีเอช 4, พีเอช 5.5, พีเอช 6.5 และ พีเอช 7 และ 3) ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโดยการเจือจางน้ำเสียด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำเสียร้อยละ 100 (ไม่เจือจาง), ร้อยละ 50 และ ร้อยละ 25 ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นประมาณ  $1.23 \times 10^5$  CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ร่วมกับน้ำเสีย 4 มิลลิลิตร (หัวเชื้อร้อยละ 20 โดยปริมาตร) บ่มตัวอย่างตามสภาวะที่แปรผันข้างต้น เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 วัน ผลการทดลองจากชุดตัวอย่างถูกนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการปรับสภาวะให้เหมือนกับชุดตัวอย่าง แต่ไม่มีการเติม *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เพื่อศึกษาการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดจากจุลินทรีย์ท้องถิ่นในน้ำเสียและปัจจัยทางกายภาพ-เคมี (Abiotic factors) อื่น ๆ

จากผลการทดลองในจากตารางที่ 3.4 แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และน้ำเสียที่ไม่ผ่านการเจือจาง ดังจะเห็นได้จากการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกร้อยละ 61 หลังจากการทดลอง 10 วัน ซึ่งมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความ

เชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ ) ผลที่ได้มีความใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Mutzel *et al.* (1996) และ Müller *et al.* (1998) รายงานว่า *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 สามารถเจริญและย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ฟีนอล และคริสคอลในอาหารเหลว CFMM ได้ดีที่สุดในสภาวะที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.5 อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะดังกล่าวสายพันธุ์ A2 สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียได้เพียงร้อยละ 44 เนื่องจากน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มประกอบด้วยกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิด รวมทั้งสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นจึงอาจส่งผลให้สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแตกต่างจากการทดลองในอาหารเหลวที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกเพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของน้ำเสียมีผลต่อการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก นั่นคือเมื่อเจือจางน้ำเสียให้มีความเข้มข้นร้อยละ 50 และร้อยละ 25 ทำให้การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก (ร้อยละ 32-49) น้อยกว่าน้ำเสียที่ไม่ได้เจือจาง (ร้อยละ 52-61) ในทุกค่าพีเอชที่แตกต่างกัน (4, 5.5 และ 7) เนื่องจากการเจือจางน้ำเสียทำให้ค่าสารอินทรีย์ลดลง ซึ่งส่งผลต่อการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของแบคทีเรียทนร้อน การปรากฏอยู่ของสารอินทรีย์ย่อยสลายง่ายที่แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสมช่วยในการลดกระบวนการยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียอันเกิดจากความเข้มข้นสูงของสารประกอบฟีนอลิกได้ (Basha *et al.*, 2010) ในขณะที่การศึกษาของ Fountoulakis *et al.* (2002) ใช้ราไวท์รอต *Pleurotus ostreatus* ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก โดยเปรียบเทียบน้ำเสียที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสซึ่งมีการเจือจางน้ำเสียร้อยละ 50 และน้ำเสียที่ไม่ผ่านการเจือจางพบว่าราไวท์รอตสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ใกล้เคียงกันคือร้อยละ 66.7 และ 64.7 ภายในระยะเวลา 19 และ 21 วันตามลำดับ อาจมีสาเหตุมาจากราสามารถขยายชีวมวลผ่านการเจริญของเส้นใยทำให้สามารถเจริญในสภาวะที่มีสารอาหารจำกัดได้ดีกว่าแบคทีเรีย (Basha *et al.*, 2010) ดังนั้นการลดลงของสารอินทรีย์ในน้ำเสียจึงไม่ส่งผลต่อการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในการศึกษานี้มากนัก

การศึกษาภายใต้อุณหภูมิ 50, 55 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของน้ำเสีย และพีเอชไม่มีผลต่อการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกในแต่ละชุดการทดลอง โดยที่อุณหภูมิข้างต้นมีการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกในช่วงร้อยละ 21-30, 36 -51 และร้อยละ 30-39 ตามลำดับ หลังจากการทดลอง 10 วัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ ) (ยกเว้นที่ อุณหภูมิ 55 พีเอช 7 และน้ำเสียที่ไม่เจือจาง) นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีการปนเปื้อนที่มีลักษณะคล้ายราลอยบนผิวหน้าของน้ำเสียทั้งในชุด

ตัวอย่างและชุดควบคุมหลังจากบ่มตัวอย่าง 10 วัน เนื่องจากอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อาจมี จุลินทรีย์อื่นในน้ำเสียที่สามารถเจริญได้ดีกว่า *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 แสดงให้เห็นว่าที่ สภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของ *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2

สำหรับชุดควบคุมทั้ง 36 สภาวะ พบการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกคิดเป็น ร้อยละ 1.8 - 9.9 เห็นได้ว่าจุลินทรีย์ท้องถิ่นและปัจจัยทางกายภาพ-เคมีอื่น ๆ ส่งผลต่อการลดลงของ สารประกอบฟีนอลิกน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตัวอย่าง

**ตารางที่ 3.4** การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (%) โดย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ภายใต้ สภาวะที่ อุณหภูมิ, pH และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน หลังจากบ่มตัวอย่างระยะเวลา 10 วัน

สภาวะ	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเข้มข้นเริ่มต้นของ สารประกอบฟีนอลิก ในน้ำเสีย (มก./ล.)	การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (%)	
				ชุดควบคุม	ชุดตัวอย่าง
1	50	4	1,344 <sup>1</sup>	3.2	22±1 <sup>g</sup>
2			498 <sup>2</sup>	4.8	21±8 <sup>g</sup>
3			296 <sup>3</sup>	9.9	21±7 <sup>g</sup>
4		5.5	1,354 <sup>1</sup>	3.0	25±3 <sup>f,g</sup>
5			660 <sup>2</sup>	7.8	28±1 <sup>e,f</sup>
6			356 <sup>3</sup>	2.6	28±7 <sup>e,f</sup>

เจือจางน้ำเสียให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกร้อยละ 100<sup>1</sup>(ไม่เจือจาง), ร้อยละ 50<sup>2</sup>, ร้อยละ 25<sup>3</sup>

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันหมายความว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



**ตารางที่ 3.4** การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (%) โดย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ภายใต้สภาวะที่ อุณหภูมิ, pH และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน หลังจากบ่มตัวอย่างระยะเวลา 10 วัน (ต่อ)

สภาวะ	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเข้มข้นเริ่มต้นของ สารประกอบฟีนอลิก ในน้ำเสีย (มก./ล.)	การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (%)	
				ชุดควบคุม	ชุดตัวอย่าง
7		7	1384 <sup>1</sup>	5.7	30±3 <sup>c</sup>
8	50		662 <sup>2</sup>	4.4	27±6 <sup>e,f</sup>
9			328 <sup>3</sup>	7.9	27±3 <sup>e,f</sup>
10		4	1,357 <sup>1</sup>	4.9	39±1 <sup>d,e</sup>
11			765 <sup>2</sup>	7.5	39±2 <sup>d,e</sup>
12			389 <sup>3</sup>	6.0	33±6 <sup>d,e</sup>
13		5.5	1292 <sup>1</sup>	4.9	41±1 <sup>d</sup>
14	55		780 <sup>2</sup>	3.6	39±5 <sup>d,e</sup>
15			359 <sup>3</sup>	7.8	38±1 <sup>d,e</sup>
16		7	1286 <sup>1</sup>	3.1	51±3 <sup>b,c</sup>
17			760 <sup>2</sup>	3.3	39±3 <sup>d</sup>
18			348 <sup>3</sup>	1.8	36±10 <sup>d,e</sup>
19		4	1401 <sup>1</sup>	3.7	52±2 <sup>b,c</sup>
20	60		782 <sup>2</sup>	2.5	34±1 <sup>d,e</sup>
21			421 <sup>3</sup>	3.7	32±6 <sup>d,e</sup>

เจือจางน้ำเสียให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกร้อยละ 100<sup>1</sup>(ไม่เจือจาง), ร้อยละ 50<sup>2</sup>, ร้อยละ 25<sup>3</sup>

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันหมายความว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ 3.4** การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (%) โดย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ภายใต้สภาวะที่ อุณหภูมิ, pH และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน หลังจากบ่มตัวอย่างระยะเวลา 10 วัน (ต่อ)

สภาวะ	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเข้มข้นเริ่มต้นของ สารประกอบฟีนอลิก ในน้ำเสีย (มก./ล.)	การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (%)	
				ชุดควบคุม	ชุดตัวอย่าง
22	60	5.5	1428 <sup>1</sup>	6.5	52±1 <sup>b,c</sup>
23			679 <sup>2</sup>	7.7	48±3 <sup>b,c</sup>
24			422 <sup>3</sup>	3.2	44±11 <sup>c,d</sup>
25		7	1415 <sup>1</sup>	4.8	61±2 <sup>a</sup>
26		778 <sup>2</sup>	8.7	49±3 <sup>b,c</sup>	
27		401 <sup>3</sup>	8.0	46±10 <sup>c,d</sup>	
28		65	6.5	1,206	4.8
29	70	4	1409 <sup>1</sup>	3.2	28±5 <sup>e,f</sup>
30			767 <sup>2</sup>	3.8	30±6 <sup>e</sup>
31			439 <sup>3</sup>	6.1	37±3 <sup>d,e</sup>
32		5.5	1457 <sup>1</sup>	3.0	36±3 <sup>d,e</sup>
33		788 <sup>2</sup>	4.2	34±2 <sup>d,e</sup>	
34		490 <sup>3</sup>	4.0	29±6 <sup>e,f</sup>	
35		7	1395 <sup>1</sup>	3.0	39±4 <sup>d,e</sup>
36	787 <sup>2</sup>	4.5	28±5 <sup>e,f</sup>		
37	460 <sup>3</sup>	1.8	30±14 <sup>e</sup>		

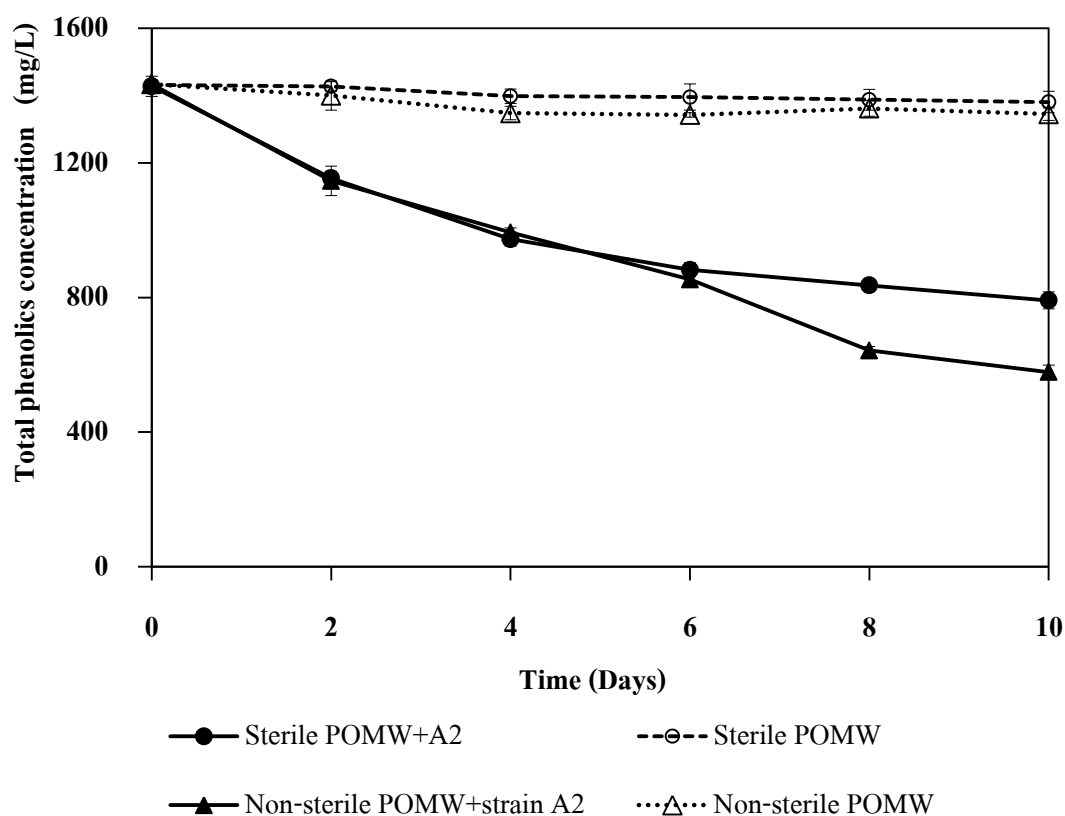
เจือจางน้ำเสียให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกร้อยละ 100<sup>1</sup>(ไม่เจือจาง), ร้อยละ 50<sup>2</sup>, ร้อยละ 25<sup>3</sup>

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันหมายความว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

### 3.3.2 ประสิทธิภาพและอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย

เนื่องจากน้ำเสียที่ใช้ในการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกโดยเชื้อยีสต์ร้อนข้างต้นเป็นน้ำเสียที่ยังไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีอยู่ในน้ำเสีย จึงมีการทดสอบโดยใช้น้ำเสียที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อยืนยันว่าการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกเกิดจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียยีสต์ร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เป็นหลัก โดยมีชุดควบคุมคือน้ำเสียที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและไม่มีการเติมแบคทีเรียยีสต์ร้อน เพื่อศึกษาการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดจากปัจจัยทางกายภาพ-เคมี (Abiotic factor) อื่น ๆ โดยเปรียบเทียบกับชุดตัวอย่างที่ใช้น้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีการเติมและไม่เติมแบคทีเรียยีสต์ร้อน ซึ่งศึกษาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 7 บ่มตัวอย่างที่ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 วัน จากรูปที่ 3.3 พบว่าในระยะเวลา 6 วันแรก น้ำเสียทั้ง 2 ชนิดที่มีการเติมเชื้อยีสต์ร้อน มีประสิทธิภาพและอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกใกล้เคียงกัน โดยที่น้ำเสียที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นลดสารประกอบฟีนอลิกได้ประมาณร้อยละ 38 และ 40 ตามลำดับ และมีอัตราการย่อยสลายคิดเป็น 3.79 และ 4.03 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากวันที่ 6 ของการทดลองพบการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นในน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมากกว่าน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยในวันที่ 10 พบว่าน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ คงเหลือสารประกอบฟีนอลิกประมาณ 578 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 60 และมีอัตราการย่อยสลายคิดเป็น 3.56 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกคงเหลือประมาณ 791 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 44 ของการลดลง และมีอัตราการย่อยสลายคิดเป็น 2.65 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อาจมีสาเหตุมาจากกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้สารประกอบบางชนิดที่เป็นแหล่งอาหารในน้ำเสียเกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างหรือเกิดการทำลาย ส่งผลต่อการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายของแบคทีเรียยีสต์ร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาจำนวนแบคทีเรียยีสต์ในชุดตัวอย่างน้ำเสียดังกล่าว ในวันที่ 10 ของการทดลอง ที่พบว่าจำนวนแบคทีเรียยีสต์ที่ย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ( $10^3 \times 10^5$  CFU/mL) มีจำนวนมากกว่าน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ( $80 \times 10^5$  CFU/mL) (ตารางที่ 3.5) นอกจากนี้จำนวนแบคทีเรียยีสต์ในอาหารที่เติมกลูโคสมากกว่าอาหารที่เติมฟีนอลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เนื่องจากแบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ได้ง่ายกว่าการใช้สารฟีนอล

อัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่ารายงานของ Mutzel *et al.* (1996) พบว่า *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 มีอัตราการย่อยสลายสารฟีนอลเท่ากับ 7.84 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากความเข้มข้นเริ่มต้น 470 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร CFMM อัตราการย่อยสลายที่แตกต่างกันมีผลมาจากองค์ประกอบในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิด รวมทั้งสารประกอบอื่น ๆ ในน้ำเสียที่อาจเป็นตัวยับยั้ง (Inhibitor) กิจกรรมการย่อยสลายของสายพันธุ์ A2 ในขณะที่การทดลองของ Mutzel *et al.* (1996) ศึกษาเฉพาะสารฟีนอลเพียงชนิดเดียวในอาหารเหลว CFMM อีกทั้งความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่สูงกว่าการทดลองอื่น ๆ ก็ส่งผลต่ออัตราการย่อยสลายเช่นเดียวกัน จึงทำให้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพและอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในแต่ละการทดลองเป็นไปได้ยาก



รูปที่ 3.3 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในระหว่างการบ่มน้ำเสียที่ผ่าน/ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และมีการเติม/ไม่เติมแบคทีเรียทร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เป็นระยะเวลา 10 วัน

สำหรับชุดตัวอย่างที่เป็นน้ำเสียไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่เติมแบคทีเรียทอร์ออน ในวันที่ 10 ของการทดลอง พบการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกน้อยมากประมาณร้อยละ 6.2 ผลการทดลองสอดคล้องกับตารางที่ 3.5 ซึ่งไม่พบจำนวนจุลินทรีย์ชนิดใดในชุดตัวอย่างดังกล่าวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงว่าจุลินทรีย์ท้องถิ่นไม่สามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการศึกษานี้ เช่นเดียวกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่เติมแบคทีเรียทอร์ออน พบการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกประมาณร้อยละ 3.5 ซึ่งอาจเกิดจากการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกโดยปฏิกิริยาทางกายภาพ-เคมี เช่น การออกซิเดชันโดยแสง (Photooxidation)

**ตารางที่ 3.5** จำนวนจุลินทรีย์เฉลี่ยในวันที่ 0 และวันที่ 10 เมื่อบ่มตัวอย่างในอาหาร CFMM ที่มีกลูโคสหรือฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชุดตัวอย่าง	อาหารที่ใช้บ่มเชื้อ*	วันที่ 0	วันที่ 10
		(x 10 <sup>5</sup> CFU/mL)	(x 10 <sup>5</sup> CFU/mL)
Non-sterile POMW	CFMM+Glucose	0.9	0
Non-sterile POMW+ Strain A2	CFMM+Glucose	1.66	123
	CFMM+Phenol	1.13	103
Sterile POMW	CFMM+Glucose	0	0
Sterile POMW+ Strain A2	CFMM+Glucose	1.36	100
	CFMM+Phenol	1.03	80

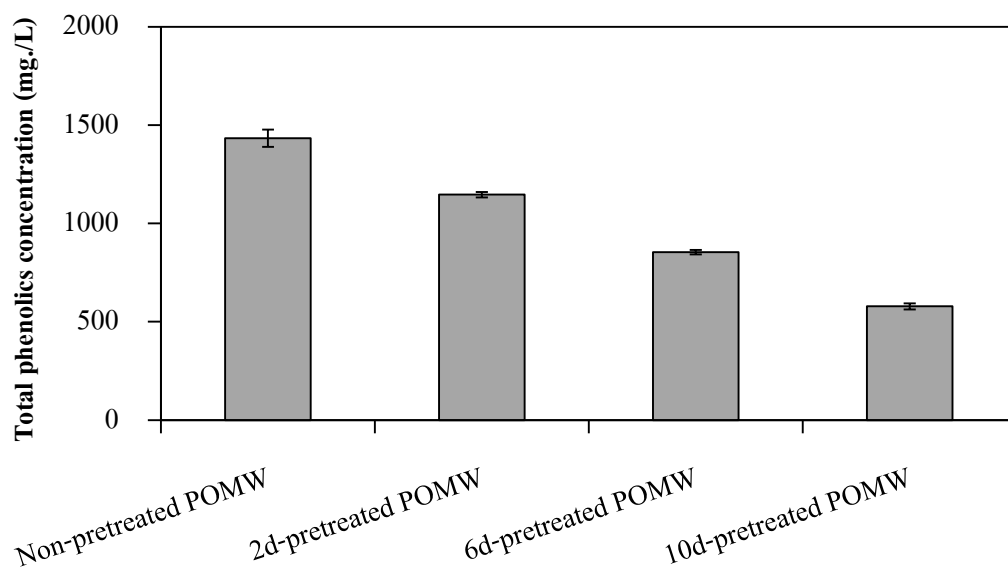
- \* 1) อาหารแข็ง CFMM ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด  
 2) อาหารแข็ง CFMM ที่มีฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก

### 3.4 การศึกษาปริมาณและชนิดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วย *Bacillus - thermoleovorans* สายพันธุ์ A2

จากสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโดย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 7 จึงทำการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ได้แก่ 2 วัน, 6 วัน หรือ 10 วัน เพื่อติดตามปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิก โดยวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และวัดปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่พบในน้ำเสียด้วยเทคนิค HPLC รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณซีไอดี และค่าพีเอช เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพในการทดลองต่อไป

#### 3.4.1 ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมดในน้ำเสียด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

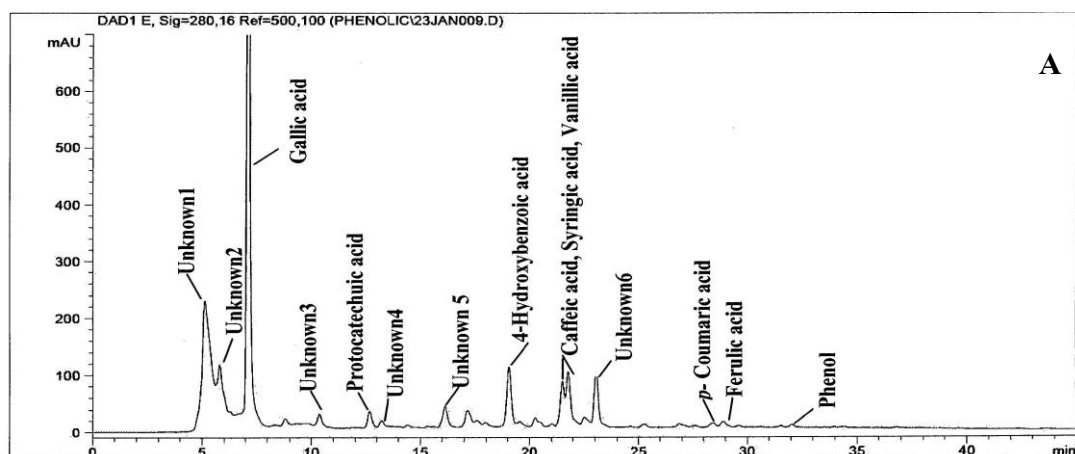
การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียเริ่มต้นก่อนบำบัดมีค่าเท่ากับ 1,434 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อบำบัดน้ำเสียเป็นเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน พบว่าสารประกอบฟีนอลิคลดลงเหลือ 1,146 , 854 และ 578 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 3.4) ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ลดลงคิดเป็นร้อยละ 20, 40 และ 60 ตามลำดับ และการบำบัดลดค่าซีไอดีจากเริ่มต้นเท่ากับ 77,647 มิลลิกรัมต่อลิตร คงเหลือ 47,407, 28,519 และ 17,037 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 39, 63 และ 78 เนื่องจาก *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ใช้สารประกอบฟีนอลิกและสารอินทรีย์อื่น ๆ ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน จึงส่งผลให้ความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกและซีไอดีลดลงตามระยะเวลาที่ใช้ในการบำบัด อย่างไรก็ตามเมื่อระยะเวลาในการบำบัดมากขึ้น ทำให้ค่าพีเอชในน้ำเสียสูงขึ้นจากพีเอช 7 เป็นพีเอช 7.2, 7.7 และ 8.1 ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจากสารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่ที่พบในน้ำเสียเป็นกลุ่ม simple phenolics acid ถูกย่อยสลายเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ หรือถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ทำให้  $H^+$  ในน้ำเสียลดลง ส่งผลให้ค่า  $OH^-$  สูงกว่า  $H^+$  ค่าพีเอชจึงสูงขึ้น

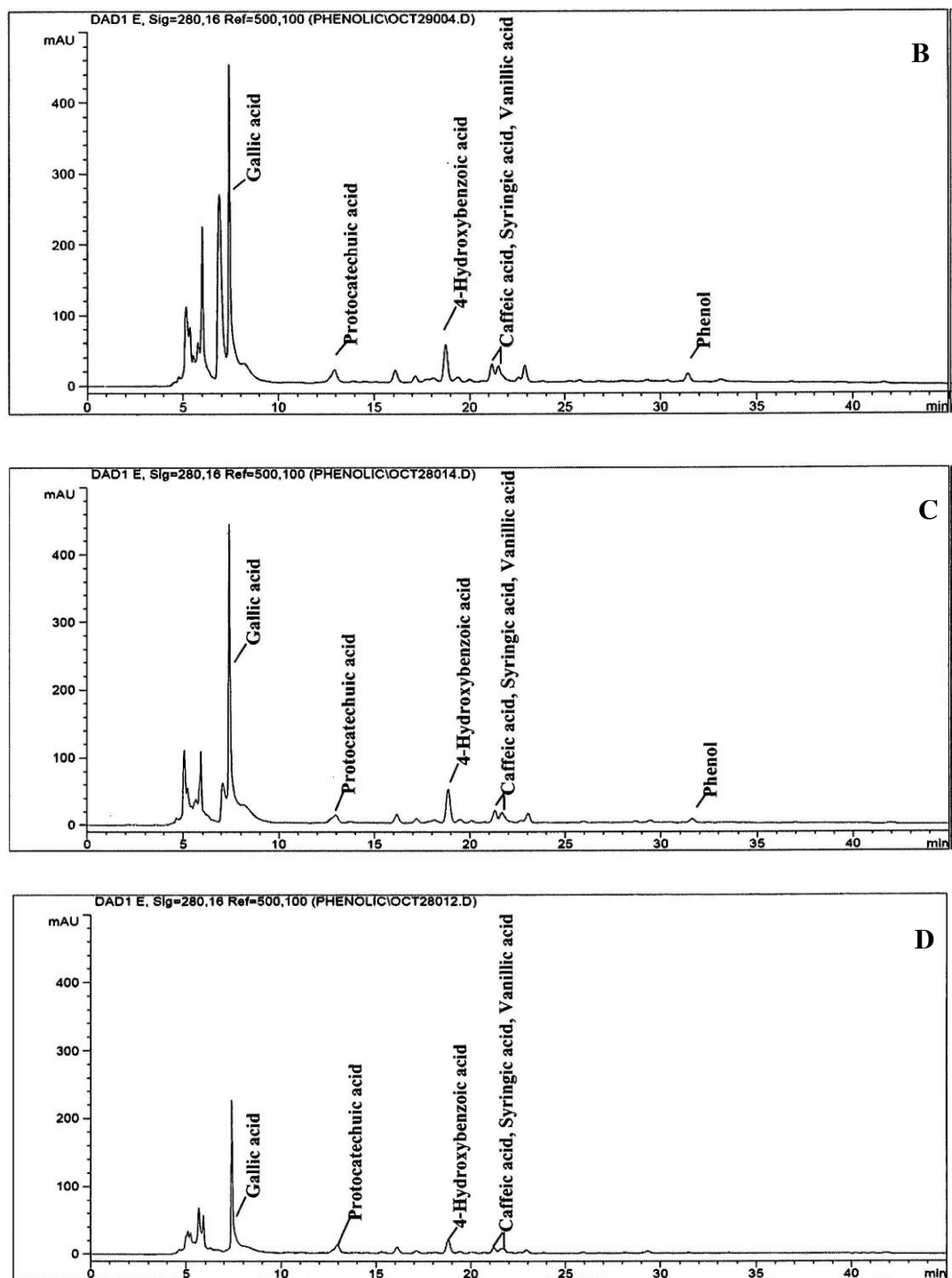


รูปที่ 3.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดในน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดด้วย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่ระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

### 3.4.2 ศึกษาชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียด้วยเทคนิค HPLC

การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียก่อนและหลังจากการบำบัดโดยใช้แบคทีเรียทอร์อน วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC แสดงในโครมาโตแกรมรูปที่ 3.5





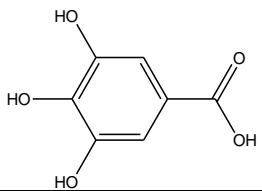
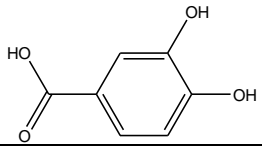
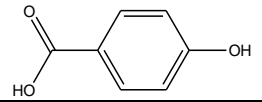
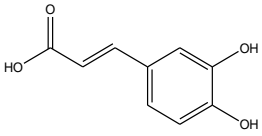
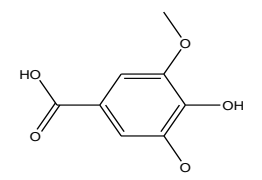
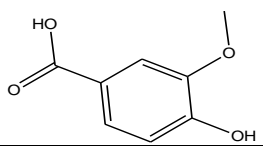
รูปที่ 3.5 โครมาโตแกรมของชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียก่อน (A) และหลังผ่านการบำบัด 2(B), 6 (C), และ 10 (D) วัน



ก่อนการบำบัดตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ gallic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, p-coumaric acid, ferulic acid และ phenol และหลังจากการบำบัดพบว่าสามารถแบ่งสารประกอบฟีนอลิกได้ 2 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 3.6 คือ กลุ่มที่ย่อยสลายได้แต่ไม่สมบูรณ์ซึ่งยังคงตรวจพบสารกลุ่มนี้หลังการบำบัดน้ำเสียเป็นเวลา 10 วันในปริมาณมากไปน้อยตามลำดับดังนี้ gallic acid > protocatechuic acid > 4-hydroxybenzoic acid > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid ทั้งนี้พบการลดลงของสารดังกล่าวอยู่ในช่วงร้อยละ 28.0-76.2, 29.4-82.7 และ 65.3-93.5 หลังจากการบำบัดน้ำเสียเป็นเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน ตามลำดับกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ถูกย่อยสลายได้ง่ายซึ่งไม่สามารถตรวจพบสารกลุ่มนี้หลังจากการบำบัดน้ำเสียเป็นเวลา 2-10 วัน เรียงลำดับปริมาณที่ตรวจพบจากมากไปน้อย ได้แก่ phenol > p-coumaric acid > ferulic acid และพบการลดลงของสารดังกล่าวอยู่ในช่วงร้อยละ 48.1-100, 76.6-100 และ 100 หลังจากการบำบัดน้ำเสียเป็นเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน ตามลำดับ โดยเมื่อผ่านการบำบัดน้ำเสียไป 2 วัน ไม่สามารถตรวจพบสาร p-coumaric acid และ ferulic acid ในขณะที่ยังคงตรวจพบสาร phenol จนถึงวันที่ 6 ของการบำบัดประมาณร้อยละ 76.6 แต่หลังจากวันที่ 10 ของการทดลองไม่สามารถตรวจพบสารดังกล่าว

ทั้งนี้ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดโดยแบคทีเรียทนร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ความเข้มข้นเริ่มต้นและโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น กระบวนการย่อยสลายสารฟีนอลิกภายใต้สภาวะที่มีอากาศเริ่มต้นจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยอาศัยเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลส เดิมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่ตำแหน่งเมทาเพื่อเปลี่ยนฟีนอลให้อยู่ในรูปของสารตัวกลาง คือ แคตคอล (Catechol) จากนั้นจะเข้าสู่ปฏิกิริยาการแตกวง (Ring cleavage) ซึ่งมี 2 วิธี คือ วิธีเมทา และวิธีออโทที่ได้ผลิตภัณฑ์สารตัวกลางที่แตกต่างกัน ดังนั้นหากมีหมู่อนุพันธ์อื่น ๆ แทนที่ในวงแหวนอะโรมาติกจะทำให้การย่อยสลายทางชีวภาพเกิดได้ยากขึ้น จากการศึกษาของ Basha *et al.* (2010) และ Hernandez and Edyvean (2008) รายงานว่าชนิดของหมู่อนุพันธ์แทนที่ในวงแหวนอะโรมาติก มีส่วนสำคัญที่ทำให้สารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความเป็นพิษและส่งผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์แตกต่างกันตามลำดับ คือ COOH > OH > CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของผู้วิจัย คือ เมื่อบำบัดน้ำเสียเป็นระยะเวลา 10 วัน ยังคงการตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่แทนที่ -COOH ในวงแหวนอะโรมาติก เช่น gallic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, syringic acid และ vanillic acid ในขณะที่สารประกอบฟีนอลิกที่ไม่มีหมู่แทนที่ดังกล่าวในวงแหวนอะโรมาติก เช่น เช่น p-coumaric acid, ferulic acid และ phenol ถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า

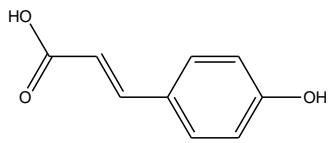
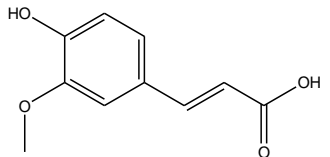
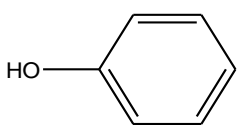
ตารางที่ 3.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด หลังจากบำบัดด้วย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่ระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน

ชนิดและ โครงสร้าง สารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด (มก./ล.)			
	Non-pretreated POMW	2d-pretreated POMW	6d-pretreated POMW	10d-pretreated POMW
Gallic acid 	668	196	192	74
Protocatechuic acid 	72	33	36	24
4-Hydroxybenzoic acid 	85	61	60	25
Caffeic acid 	185	44	32	12
Syringic acid 				
Vanillic acid 				

Detection limit (มิลลิกรัมต่อลิตร) : Gallic acid, Caffeic acid +Syringic acid +Vanillic acid, *p*-Coumaric acid และ Ferulic acid = 0.25 ; Protocatechuic acid = 0.5; Phenol = 1

ND : Not detected

ตารางที่ 3.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดหลังจากบำบัดด้วย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่ระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน

ชนิดและโครงสร้าง สารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด (มก./ล.)			
	Non-pretreated POMW	2d-pretreated POMW	6d-pretreated POMW	10d-treated POMW
<p><i>p</i>-Coumaric acid</p> 	20	ND	ND	ND
<p>Ferulic acid</p> 	23	ND	ND	ND
<p>Phenol</p> 	77	40	18	ND

Detection limit (มิลลิกรัมต่อลิตร) : Gallic acid, Caffeic acid +Syringic acid +Vanillic acid, *p*-Coumaric acid และ Ferulic acid = 0.25 ; Protocatechuic acid = 0.5; Phenol = 1

ND: Not detected

### 3.5 ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

#### 3.5.1 ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมและร้อยละก๊าซมีเทน

สารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่สร้างกรด (Acidogen) และจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทน (Methanogen) ในระบบก๊าซชีวภาพ และอาจเกิดการดูดซับในกากตะกอนแอนแอโรบิกของระบบก๊าซชีวภาพ ทำให้การย่อยสลายทางชีวภาพลดลง ส่งผลต่อปริมาณการผลิต

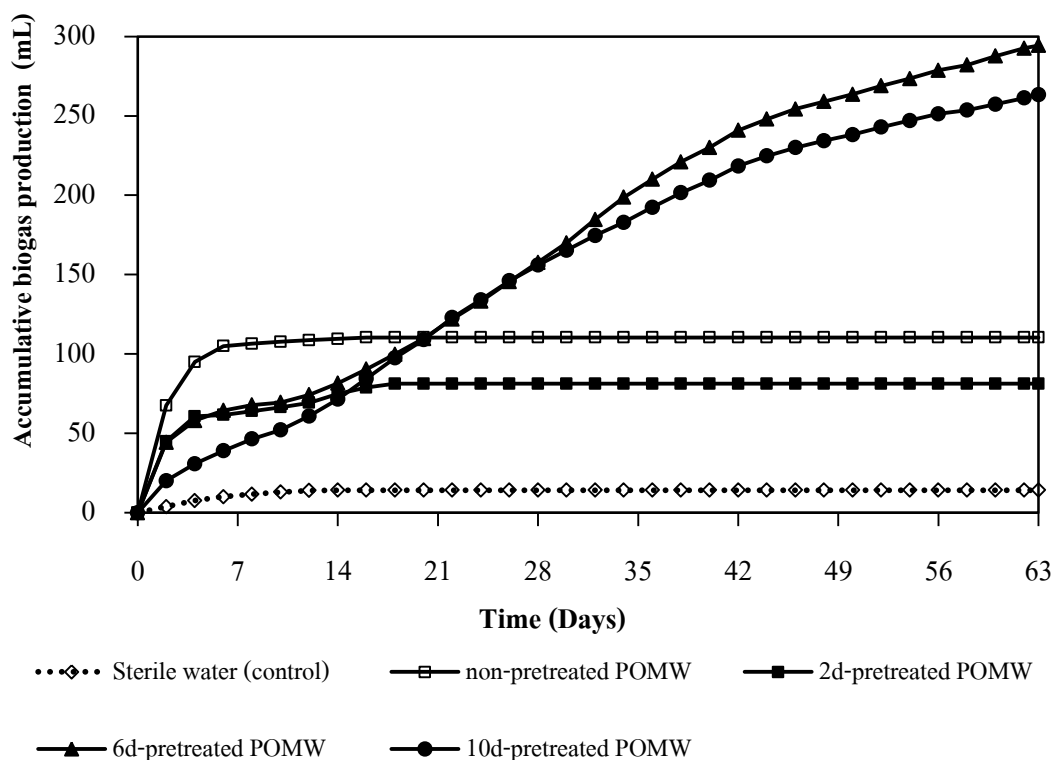
ก๊าซชีวภาพสะสมและปริมาณก๊าซมีเทน (Sayadi *et al.*, 2000; Dhouib *et al.*, 2005; Hernandez and Edvean, 2008) ดังนั้นจึงนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดในระยะเวลาแตกต่างกัน ได้แก่ 2, 6 หรือ 10 วัน ที่มีการลดลงของสารประกอบฟีนอลิคร้อยละ 20, 40 และ 60 ตามลำดับ มาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตก๊าซชีวภาพ โดยหมักร่วมกับหัวเชื้อแอนแอโรบิกที่เก็บมาจากระบบก๊าซชีวภาพของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีค่าซีโอดีเท่ากับ 17,246 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า MLSS : MLSS ที่เหมาะสมในการใช้เป็นแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ประมาณ 0.7 และตรวจพบสารประกอบฟีนอลิคตกค้างในหัวเชื้อประมาณ 263 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์ลักษณะน้ำเสียก่อนและหลังผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน และเติมหัวเชื้อแอนแอโรบิกในอัตราส่วนหัวเชื้อต่อน้ำเสียร้อยละ 30 (ปรับพีเอชเท่ากับ 7) ก่อนนำไปทดสอบการผลิตก๊าซชีวภาพ พบค่าซีโอดี ในโตรเจน อัตราส่วน C:N กรดไขมันระเหยง่าย (VFA) และค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) ลดลงตามระยะเวลาในการบำบัดที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3.7) โดยมีค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 16.7, 29.6 และ 58.3 เมื่อใช้ระยะเวลาบำบัดเท่ากับ 2, 6 หรือ 10 วัน ตามลำดับ จากความเข้มข้นเริ่มต้น 39,452 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดค่าในโตรเจนได้ร้อยละ 3.0, 20.9 และ 33.0 จากความเข้มข้นเริ่มต้น 1,278 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงส่งผลต่ออัตราส่วน C : N ให้เปลี่ยนแปลงจาก 30.9 ลดลงเหลือ 26.5, 27.5 และ 19.2 ตามลำดับ ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวอยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซชีวภาพที่เคยศึกษามาก่อนหน้านี้ประมาณ 20-30:1 (Yadvika *et al.*, 2004) นอกจากนี้พบค่ากรดไขมันระเหยง่ายลดลงร้อยละ 25.9, 50.0 และ 63.9 เมื่อใช้เวลากการบำบัด 2, 6 หรือ 10 วันตามลำดับ จากความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2,660 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกทั้งน้ำเสียนี้อีกทั้งมีค่าความเป็นด่างลดลงร้อยละ 3.6, 18.3 และ 24.4 ตามลำดับ จากความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2,740 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ค่ากรดไขมันระเหยง่ายที่ยังคงเหลือในน้ำเสียก่อนและหลังผ่านการบำบัด ยังคงมีค่าสูงกว่ารายงานที่ผ่านมา ในขณะที่ทุกชุดการทดลองมีค่าความเป็นด่างอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ดังรายงานของ (Hammer, 1996) เสนอแนะว่าโดยทั่วไประบบการผลิตก๊าซชีวภาพที่มีการย่อยสลายแบบไร้อากาศนั้น ควรมีค่ากรดไขมันระเหยง่ายอยู่ในช่วง 200-800 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าความเป็นด่างอยู่ในช่วง 2,000 -3,500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3.7 ลักษณะน้ำเสียก่อนและหลังผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน และมีการเติมหัวเชื้อแอนแอโรบิก ก่อนนำไปผลิตก๊าซชีวภาพ

ระบบการผลิต ก๊าซชีวภาพ	ค่าซีโอดี (มก./ล.)	ไนโตรเจน (TKN, มก./ล.)	อัตราส่วน C:N	VFA (มก./ล.)	Alkalinity (มก./ล.)
Non-pretreated POMW	39,452	1,278	30.9	2,660	2,740
2d-pretreated POMW	32,877	1,239	26.5	1,970	2,640
6d-pretreated POMW	27,763	1,010	27.5	1,330	2,240
10d-pretreated POMW	16,438	857	19.2	960	2,070

เมื่อนำน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกเป็นระยะเวลา 2 วัน, 6 วัน หรือ 10 วันมาผลิตก๊าซชีวภาพ โดยศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพสะสมทุก ๆ 2 วัน และวิเคราะห์ปริมาณก๊าซมีเทนด้วย GC-TCD ทุก ๆ 7 วัน สามารถตรวจพบพีคของก๊าซไนโตรเจน ก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ retention time เท่ากับ  $1.144 \pm 0.011$  นาที,  $1.210 \pm 0.010$  นาที และ  $1.410 \pm 0.009$  นาที ตามลำดับ ซึ่งมีชุดควบคุมคือการใช้หัวเชื้อแอนแอโรบิกผสมกับน้ำกลั่น แทนการใช้น้ำเสีย พบการผลิตก๊าซชีวภาพสะสมได้ 14.3 มิลลิลิตร ในช่วงเวลา 14 วันของการทดลองและไม่มีการผลิตก๊าซชีวภาพเพิ่มขึ้นอีกตลอดระยะเวลาการทดลอง (รูปที่ 3.6) สำหรับชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดและผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 2 วัน มีประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพใกล้เคียงกัน นั่นคือ สามารถผลิตก๊าซชีวภาพสะสมได้ 104.4 และ 81.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณก๊าซมีเทนเป็นองค์ประกอบสูงสุดร้อยละ 24.6 และ 49.3 ในวันที่ 14 ของการทดลอง (รูปที่ 3.6 และ 3.7) อย่างไรก็ตามหลังจากวันที่ 16 และ 18 พบค่าพีเอชลดลงเหลือเท่ากับ 5.1 และ 5.3 ซึ่งอัตราการสร้างกรดจากแบคทีเรียกลุ่ม acidogen สูงกว่าการเปลี่ยนจากกรดเป็นก๊าซมีเทน โดยแบคทีเรียกลุ่ม methanogen เนื่องจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ตกค้างในน้ำเสียยังมีปริมาณสูงและมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ทำให้ไม่มีการผลิตก๊าซชีวภาพเพิ่มขึ้นอีกในทั้งสองชุดการทดลอง เนื่องจากค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซชีวภาพควรอยู่ในช่วง 6.7-7.4 (Hammer, 1996) ส่วนชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดเป็นระยะ 6

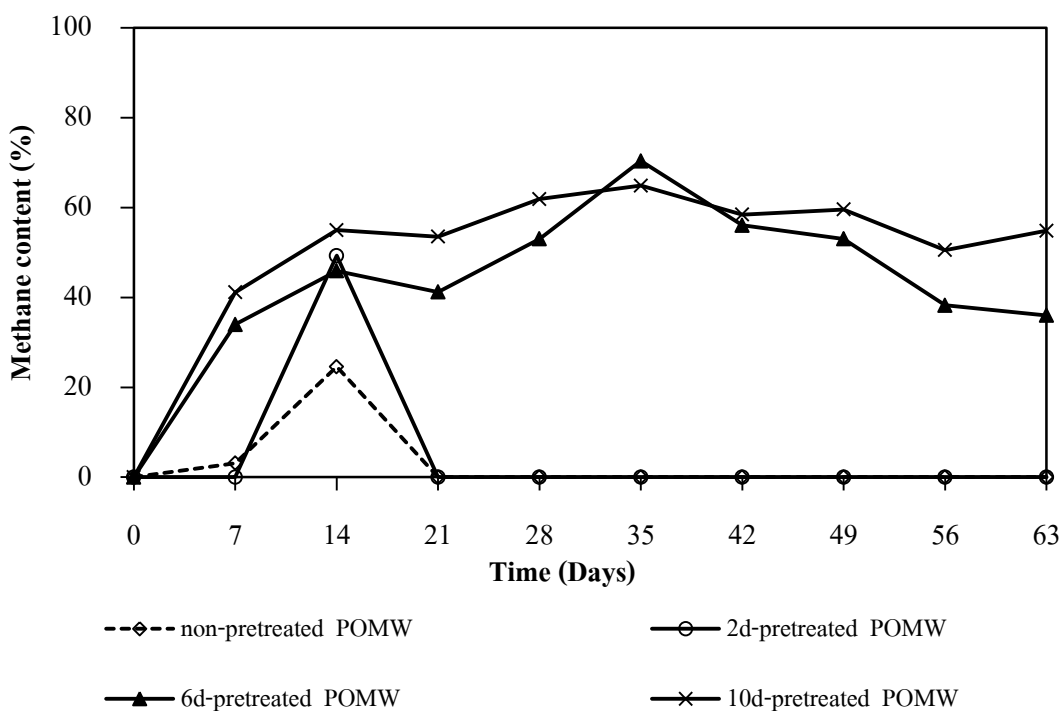
หรือ 10 วันมีประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพไม่แตกต่างกันและดีกว่าสองชุดการทดลองข้างต้น โดยที่สามารถผลิตก๊าซชีวภาพสะสมตลอดการทดลอง (63 วัน) ได้เท่ากับ 294.3 และ 263.5 มิลลิลิตร และมีปริมาณก๊าซมีเทนเป็นองค์ประกอบสูงสุดถึงร้อยละ 70.4 และ 64.9 ตามลำดับ ในวันที่ 35 ของการทดลอง จากนั้นปริมาณก๊าซมีเทนค่อย ๆ ลดลงเหลือประมาณร้อยละ 36.0 และ 54.8 ตามลำดับ และทั้งสองระบบมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่ากับ 7.7 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 3.6 ปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพสะสมของระบบที่ใช้ น้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดที่ระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน (n=2)

จากผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Martinez-Garzia *et al.* (2007) ใช้ยีสต์ *Candida tropicalis* สายพันธุ์ ATCC 32456 บำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกได้ร้อยละ 54 จากความเข้มข้นเริ่มต้น 700 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดไปผลิตก๊าซชีวภาพสามารถเพิ่มปริมาณก๊าซมีเทนได้ถึงร้อยละ 68-75 และ Fountoulakis *et al.* (2002) ใช้ราไวท์รอต *Pleurotus ostreatus* บำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกเช่นกัน สามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 78.3 จากความเข้มข้นเริ่มต้น 1,035 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซชีวภาพสะสมได้ทั้งหมด 1,171 มิลลิลิตร

และให้ปริมาณก๊าซมีเทนร้อยละ 82 ในขณะที่น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดให้การผลิตก๊าซชีวภาพ สะสมได้เพียง 221 มิลลิลิตร และมีปริมาณก๊าซมีเทนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 71 จากการศึกษาี้ และรายงานที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกเป็น สับสเตรทในการผลิตก๊าซชีวภาพ ทำให้ปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพสะสม รวมทั้งปริมาณก๊าซ มีเทนเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าการใช้น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด



รูปที่ 3.7 ปริมาณ (ร้อยละ) ก๊าซมีเทนที่เป็นองค์ประกอบในก๊าซชีวภาพที่ผลิตจากน้ำเสียที่ไม่ผ่าน และผ่านการบำบัดที่ระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน (n=2)

สำหรับผลของสารประกอบฟีนอลิกต่อการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียของโรงงานสกัด น้ำมันปาล์มยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน แต่มีรายงานการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียของโรงงาน สกัดน้ำมันปาล์มแห่งหนึ่งในประเทศมาเลเซีย ใช้บ่อที่มีขนาด (กว้าง x ยาว x ลึก) เท่ากับ 29.6 x 60.0 x 5.8 เมตร บรรจุน้ำเสียปริมาตร 7,500 ลูกบาศก์เมตร มีระยะเวลาเก็บกักน้ำเสีย 40 วัน สามารถผลิตก๊าซมีเทนโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วงร้อยละ 35-70 (Yacob *et al.*, 2006)

### 3.5.2 ศักยภาพการผลิตก๊าซมีเทนโดยการทดสอบค่า Biochemical methane potential

#### (BMP)

การรายงานค่า BMP เป็นการทดสอบศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนของสารตั้งต้น โดยคำนวณจากปริมาณกรัมของชีโอดีที่สามารถเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทนได้ การเปรียบเทียบค่า BMP ระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ ที่ใช้น้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน ดังแสดงในตารางที่ 3.8 หลังจากการผลิตก๊าซชีวภาพพบว่าชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดมีประสิทธิภาพการกำจัดชีโอดีเริ่มต้นจาก 39,452 มิลลิกรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 36,436 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 7.6 ของการลดลง ในขณะที่ชุดการทดลองจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 2 วัน, 6 วัน หรือ 10 วัน พบว่ามีค่าชีโอดีลดลงเหลือ 26,535, 13,465 และ 9,307 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นประสิทธิภาพในการกำจัดชีโอดีร้อยละ 19.2, 51.4 และ 76.0 ตามลำดับ และเมื่อนำค่าชีโอดีเริ่มต้นก่อนการผลิตก๊าซชีวภาพ (ตารางที่ 3.7) มาคำนวณร่วมกับปริมาตรก๊าซมีเทนของแต่ละชุดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ค่า BMP พบว่าน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 2 วัน มีค่า BMP เท่ากับ 11.35 และ 19.20 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมชีโอดี ส่วนน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 6 วัน หรือ 10 วันมีค่า BMP เท่ากับ 86.68 และ 123.03 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมชีโอดี ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่า BMP ในชุดการทดลองจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัด 2 วันมีความแตกต่างกับชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด 6 วัน หรือ 10 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

จากการทดสอบค่า BMP แสดงให้เห็นว่าชุดการทดลองจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก 10 วัน แม้มีการผลิตก๊าซชีวภาพสะสมและปริมาณก๊าซมีเทนน้อยกว่า แต่ให้ค่าศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนต่อกรัมชีโอดีสูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด 6 วัน เนื่องจากมีปริมาณชีโอดีเริ่มต้นต่ำกว่านั่นเอง จากผลการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ค่าชีโอดีในน้ำเสียลดลง และในชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด 10 วัน มีอัตราส่วน C:N ต่ำกว่าค่าแนะนำเพียงเล็กน้อย แต่สารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพถูกบำบัดออกไปมากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ จึงทำให้ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพดีที่สุด และค่า BMP จากน้ำเสียทั้ง 2 ชุดการทดลองมีค่าสูงกว่ารายงานที่ผ่าน



มาของ Fountoulakis *et al.* (2002) ศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้ราไวท์รอต *Pleurotus ostreatus* พบว่ามีค่า BMP เท่ากับ 52.37 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดี ทั้งนี้ค่า BMP ที่แตกต่างกันมีสาเหตุมาจากค่าซีโอดีเริ่มต้นของน้ำเสีย ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่แตกต่างกัน หากมีค่าดังกล่าวสูงจะส่งผลให้ค่า BMP ต่ำลง

ตารางที่ 3.8 ประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซมีเทนโดยการทดสอบจากค่า BMP

ชนิดของน้ำเสีย	ก๊าซชีวภาพ สะสม (มล.)	ร้อยละ มีเทน	ปริมาตร มีเทน(มล.)	ซีโอดี เริ่มต้น* (กรัม.ซีโอดี)	BMP (มล.มีเทน/ กรัม.ซีโอดี)
Non-pretreated POMW	109.5	24.6	26.9	2.37	11.35 <sup>a</sup>
2d-pretreated POMW	75.0	49.3	37.0	1.97	18.78 <sup>a</sup>
6d-pretreated POMW	204.4	70.4	143.9	1.66	86.68 <sup>b</sup>
10d-pretreated POMW	187.6	64.9	121.8	0.99	123.03 <sup>c</sup>

\* ค่าซีโอดีเริ่มต้น (กรัม.ซีโอดี) ของแต่ละชุดการทดลอง มีที่มาจากให้นำข้อมูลในตารางที่ 3.7 มาคำนวณกับปริมาตรน้ำเสียที่ใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตก๊าซชีวภาพเท่ากับ 60 มิลลิลิตร  
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันหมายความว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

### 3.5.3 การศึกษาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกหลังการผลิตก๊าซชีวภาพ

การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียทนร้อนที่ระยะเวลาแตกต่างกัน คือ 2, 6 หรือ 10 วัน ทำให้สารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้นในน้ำเสียก่อนการผลิตก๊าซชีวภาพมีความเข้มข้นแตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลานานขึ้น มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้นก่อนการผลิตก๊าซชีวภาพลดลงตามระยะในการบำบัด และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมลดลงใน

ทุกชุดการทดลอง แสดงว่ากระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพสามารถลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดได้อีก โดยการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดเมื่อเริ่มต้นการผลิตก๊าซชีวภาพ 1,080 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการผลิตก๊าซชีวภาพลดลงเหลือ 772 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 28.5 ส่วนในชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 2 วัน , 6 วัน หรือ 10 วัน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดเมื่อเริ่มต้นการผลิตก๊าซชีวภาพ 805, 572 และ 428 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดการผลิตก๊าซชีวภาพมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดลดลงเหลือ 683, 354 และ 269 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 15.2, 38.1 และ 37.1 (ตารางที่ 3.9) การศึกษาที่ผ่านมาของ Hernandez and Edyvean (2008) รายงานว่าการผลิตก๊าซชีวภาพในสับสเตรทสังเคราะห์ที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิก เช่น phenol, catechol, gallic acid, caffeic acid, 4-hydroxybenzoic acid, tyrosol และ protocatechuic acid และใช้หัวเชื้อแอนแอโรบิกจากระบบบำบัดน้ำเสีย พบการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกร้อยละ 63.85 ในระยะเวลาการทดลอง 40 วัน จากความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 800 - 1600 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสารประกอบฟีนอลิกที่เหลือส่วนหนึ่งถูกออกซิเดชันเมื่อสัมผัสอากาศ (Autoxidation) และถูกดูดซับโดยตะกอนแอนแอโรบิก

ตารางที่ 3.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดก่อนและหลังการผลิตก๊าซชีวภาพวิเคราะห์โดยวิธี Folin-Ciocalteu

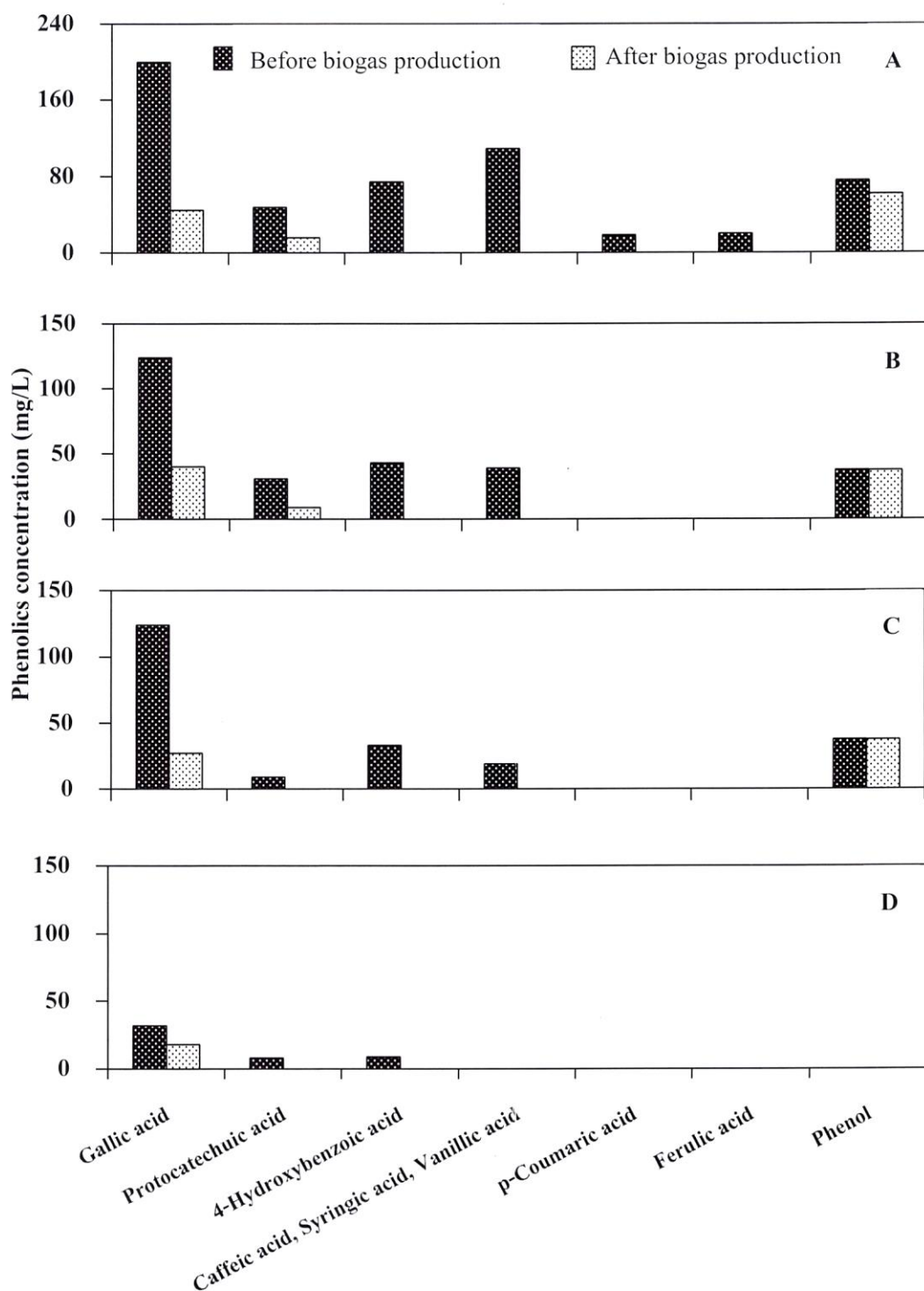
ชนิดของน้ำเสีย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มก./ล.)	
	เริ่มต้นผลิตก๊าซชีวภาพ	หลังการผลิตก๊าซชีวภาพ
Non-pretreated POMW	1,080	772
2d-pretreated POMW	805	683
6d-pretreated POMW	572	354
10d-pretreated POMW	427	269

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดในน้ำเสียด้วยเทคนิค HPLC ทั้งก่อนและหลังการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้น้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 2, 6

หรือ 10 วัน พบว่าก่อนการผลิตก๊าซชีวภาพในชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดมี สารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) ทั้งหมด 9 ชนิด ดังนี้ gallic acid (200) > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid (109) > phenol (76) > 4-hydroxybenzoic acid (74) > protocatechuic acid (47) > ferulic acid (20) > *p*-coumaric acid (18) และหลังจากผลิตก๊าซชีวภาพไม่สามารถตรวจพบสารประกอบฟีนอลิก 6 ชนิด ได้แก่ 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, ferulic acid และ *p*-coumaric acid แสดงว่าสารดังกล่าวถูกย่อยสลายผ่านกระบวนการไร้อากาศในระหว่างการผลิตก๊าซชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามยังมีสารประกอบฟีนอลิกที่ยังคงเหลืออยู่ในน้ำเสียดังกล่าวคือ phenol > gallic acid > protocatechuic acid โดยสารทั้ง 3 ชนิด มีการลดลงร้อยละ 19.7, 64.6, และ 78.0 ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.8 A

ในชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด 2 หรือ 6 วัน ก่อนการผลิตก๊าซชีวภาพพบ สารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) 7 ชนิดที่เหมือนกัน (ไม่พบสาร *p*-coumaric acid และ ferulic acid) โดยในน้ำเสียบำบัด 2 วันพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ได้แก่ gallic acid (124) > 4-hydroxybenzoic acid (43) > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid (39) > phenol (38) > protocatechuic acid (31) และในน้ำเสียบำบัด 6 วัน ได้แก่ gallic acid (124) > phenol (37) > 4-hydroxybenzoic acid (33) > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid (19) > protocatechuic acid (9) เมื่อผ่านกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดในน้ำเสียดังกล่าวได้สมบูรณ์และไม่สามารถตรวจพบได้คือ 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, syringic acid และ vanillic acid อีกทั้งไม่ตรวจพบสาร protocatechuic acid ในน้ำเสียบำบัด 6 วัน ทั้งนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลิกที่ยังคงเหลืออยู่ในน้ำเสียบำบัด 2 วัน ตามลำดับ คือ gallic acid > phenol > protocatechuic acid โดยสารทั้ง 3 ชนิดมีการลดลงร้อยละ 67.7, 1.4 และ 70.0 ตามลำดับ ส่วนในน้ำเสียบำบัด 6 วันคงเหลือ gallic acid และ phenol ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดมีการลดลงร้อยละ 78.2 . และ 0.5 ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.8 B-C

สำหรับชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด 10 วัน ก่อนการผลิตก๊าซชีวภาพพบ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) 3 ชนิด (ไม่พบสาร *p*-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid และ phenol) ได้แก่ gallic acid (32) > 4-hydroxybenzoic acid (9) > protocatechuic acid (8) หลังการผลิตก๊าซชีวภาพไม่สามารถตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกข้างต้น ยกเว้น gallic acid ซึ่งมีการลดลงร้อยละ 44.5 ดังรูปที่ 3.8 D



รูปที่ 3.8 ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสี้ยวเมื่อก่อนและหลังการผลิตก๊าซชีวภาพวิเคราะห์โดย HPLC โดยที่ (A) น้ำเสี้ยวที่ไม่ผ่านการบำบัด; (B) น้ำเสี้ยวที่ผ่านการบำบัด 2 วัน; (C) น้ำเสี้ยวที่ผ่านการบำบัด 6 วัน และ (D) น้ำเสี้ยวที่ผ่านการบำบัด 10 วัน

จากผลการศึกษาพบว่าหลังการผลิตก๊าซชีวภาพยังคงตรวจพบสาร gallic acid ในทุกชุดการทดลอง และยังคงเหลือสาร protocatechuic acid ในชุดการทดลองจากน้ำที่ไม่ผ่านการบำบัดและบำบัด 2 วัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากายการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยแบคทีเรียทนร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในหัวข้อ 3.4.2 แสดงให้เห็นว่าสารทั้ง 2 ชนิดที่มีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่อนุพันธ์คาร์บอกซิลิก (-COOH) แทนที่ในวงแหวนอะโรมาติก ส่งผลต่อการเจริญและทำงานของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ (แบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ A2) และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในระบบก๊าซชีวภาพ ทำให้การย่อยสลายทางชีวภาพภายใต้ 2 สภาวะนี้ลดลง นอกจากนี้ยังพบความเข้มข้นของสาร phenol คงเหลือใกล้เคียงกับก่อนการผลิตก๊าซชีวภาพในชุดการทดลองจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัด 2 หรือ 6 วัน เนื่องจากสาร phenol มีผลยับยั้งกระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนโดยรวม โดยมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระดับที่แตกต่างกันทั้งในกระบวนการ hydrolysis คือย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่เป็นสารโมเลกุลเล็ก และขั้นตอน acetogenesis ซึ่งจุลินทรีย์สร้างกรดเปลี่ยนสารอินทรีย์เป็นกรดอินทรีย์โมเลกุลเล็ก รวมถึงขั้นตอน methanogenesis ที่ใช้จุลินทรีย์สร้างมีเทน (Hernandez and Edyvean, 2008)

### 3.5.4 ลักษณะน้ำเสียก่อนและหลังผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกและการผลิตก๊าซชีวภาพ

น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยแบคทีเรียทนร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่เวลาแตกต่างกัน คือ 2, 6 หรือ 10 วัน จากนั้นนำไปใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตก๊าซชีวภาพ ส่งผลให้ลักษณะน้ำเสียแตกต่างกันไปจากเดิม ดังแสดงในตารางที่ 3.10 จากการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าของแข็งแขวนลอยในน้ำเสียก่อนบำบัดเท่ากับ 29,183 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อผ่านการบำบัดและการผลิตก๊าซชีวภาพลดลงคิดเป็นร้อยละ 69.7-81.9 ค่าไขมันและน้ำมันในน้ำเสียก่อนบำบัดมีค่าเท่ากับ 13,370 เมื่อผ่านการบำบัดและสิ้นสุดการผลิตก๊าซชีวภาพสามารถลดลงคิดเป็นร้อยละ 91.0 – 98.3 ซึ่งจะส่งผลต่อการบำบัดหลังจากกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพเนื่องจากไขมันและน้ำมันก็เป็นปัญหาหนึ่งในการบำบัดน้ำเสีย ส่วนค่าฟอสฟอรัสและค่าไนโตรเจนในน้ำเสียก่อนบำบัดเท่ากับ 320 และ 1,067 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อผ่านการบำบัดและสิ้นสุดการผลิตก๊าซชีวภาพมีค่าเพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียไม่ผ่านและผ่านการบำบัด 2 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 507 และ 381, 1,159 และ 1,107 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด 6 วัน และ 10 วัน มีค่าลดลงคิดเป็นร้อยละ 30.0 และ 38.4, 32.5 และ 39.1 ตามลำดับ ค่าไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากการผสมหัวเชื้อแอนแอโรบิกในการผลิตก๊าซชีวภาพ

ตารางที่ 3.10 ลักษณะน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มเปรียบเทียบกับลักษณะน้ำเสียหลังการผลิตก๊าซชีวภาพ

พารามิเตอร์*	POMW	น้ำเสียหลังการผลิตก๊าซชีวภาพ			
		Non-pretreated POMW	2d-pretreated POMW	6d-pretreated POMW	10d-pretreated POMW
ซีไอดี	77,647	36,436	26,535	13,465	9,307
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด	29,183	8,825	8,325	5,610	5,283
ฟอสฟอรัส (TP)	320	507	381	224	197
ไนโตรเจน(TKN)	1,067	1,159	1,107	720	650
ไขมันและน้ำมัน	13,370	1,208	812	440	224
ความเป็นด่าง	1,730	3,960	3,340	2,910	2,540
กรดไขมันระเหยง่าย	3,600	4,200	3,400	2,670	1,980
พีเอช	4.67	5.1	5.3	7.7	7.7

\* หน่วย : มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นพีเอช

เมื่อพิจารณาค่าซีไอดี ของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนบำบัดเท่ากับ 77,647 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังสิ้นสุดการผลิตก๊าซชีวภาพพบค่าซีไอดีในชุดการทดลองต่าง ๆ ลดลงตามระยะเวลาในการบำบัดน้ำที่เพิ่มขึ้น โดยน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดมีค่าลดลงคิดเป็นร้อยละ 53.0 และน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดที่ระยะเวลา 2 วัน, 6 วัน หรือ 10 วัน มีค่าลดลงคิดเป็นร้อยละ 65.8 - 88.0 ซึ่งในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดที่ระยะเวลา 10 วัน ยังคงเหลือค่าซีไอดี 9,307 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถนำไปเป็นสับสเตรทในผลิตก๊าซชีวภาพในครั้งต่อไป และน้ำเสียก่อนบำบัดมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.67 เมื่อผ่านการบำบัดและนำไปผลิตก๊าซชีวภาพในชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียที่ไม่ผ่าน และผ่านการบำบัด 2 วัน มีค่าพีเอชลดลงเท่ากับ 5.1 และ 5.3 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ไม่เหมาะสมในการสร้างก๊าซมีเทน ตามรายงานของ Hammer (1996) ซึ่งเสนอว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิต

ก๊าซชีวภาพควรอยู่ในช่วง 6.7-7.4 นอกจากนี้ทั้ง 2 ชุดการทดลองมีค่าความเป็นด่างเท่ากับ 3,960 และ 3,340 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่พบการสะสมของกรดไขมันระเหยง่ายเท่ากับ 4,200 และ 3,400 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงไม่สามารถควบคุมสมดุลของบัพเฟอร์ทำให้ค่าพีเอชลดลง และส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบก๊าซชีวภาพ และอาจทำให้ระบบล้มเหลวในที่สุด (Schoen *et al.*, 2009) จึงเป็นสาเหตุให้ชุดการทดลองข้างต้นผลิตก๊าซชีวภาพได้น้อยกว่าชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด 6 วัน หรือ 10 วัน (รูปที่ 3.6 และ 3.7) ซึ่งมีค่าพีเอชของระบบเท่ากับ 7.7 มีค่าความเป็นด่างเท่ากับ 2,910 และ 2,540 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่ากรดไขมันระเหยง่าย 2,670 และ 1,980 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ





## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 4.1 สรุปผลการทดลอง

##### 4.1.1 ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสี้ยวจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดในน้ำเสี้ยวของโรงงาน A, B และ C ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu มีความเข้มข้นเท่ากับ  $1,280 \pm 64$ ,  $1,206 \pm 26$  และ  $1,503 \pm 51$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถระบุชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสี้ยวด้วยเทคนิค HPLC ได้จำนวน 9 ชนิด ตามลำดับปริมาณ ได้แก่ gallic acid > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid > 4-hydroxybenzoic acid > phenol > protocatechuic acid > ferulic acid > *p*- coumaic acid

##### 4.1.2 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสี้ยวโดย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกด้วยแบคทีเรียทนร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 โดยการแปรผัน 1) อุณหภูมิ ได้แก่ 50, 55, 60 และ 70 องศาเซลเซียส 2) ค่าพีเอชเท่ากับ 4, 5.5 และ 7 และ 3) ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสี้ยวร้อยละ 100 (ไม่เจือจาง), 50 และ 25 พบว่าสภาวะที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด คือ การใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และการใช้น้ำเสี้ยวที่ไม่ผ่านการเจือจางและไม่ได้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสี้ยวก่อนทดลอง ซึ่งลดสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 60 และมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับ 3.56 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากความเข้มข้นเริ่มต้น 1,434 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวันที่ 10 ของการทดลอง ในขณะที่น้ำเสี้ยวที่ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกลดลงร้อยละ 44 และมีอัตราการย่อยสลาย 2.65 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสี้ยวที่พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสี้ยวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ( $10^3 \times 10^5$  CFU/mL) มีจำนวนมากกว่าน้ำเสี้ยวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ( $80 \times 10^5$  CFU/mL) ส่วนชุดตัวอย่างน้ำเสี้ยวที่ไม่ผ่านและผ่านการฆ่าเชื้อแต่ไม่เติมเชื้อทนร้อนลดสารประกอบฟีนอลิกได้น้อยมากประมาณร้อยละ 3.5-6.2 และไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ท้องถิ่นในน้ำเสี้ยว แสดงว่าปัจจัยทางกายภาพ-เคมีอื่น ๆ ส่งผลต่อการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกน้อย

การบำบัดน้ำเสียด้วยแบคทีเรียทนร้อนภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเป็นระยะเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน ลดสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 20, 40 และ 60 ตามลำดับ โดยกลุ่มสารที่ย่อยสลายได้แต่ไม่สมบูรณ์ซึ่งยังคงตรวจพบสารกลุ่มนี้หลังการบำบัดน้ำเสียเป็นเวลา 10 วันในปริมาณมากไปน้อย ดังนี้ gallic acid > 4-hydroxybenzoic acid > protocatechuic acid > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid มีการลดลงอยู่ในช่วงร้อยละ 66.7-93.5 ส่วนกลุ่มสารที่ถูกย่อยสลายได้ง่ายซึ่งไม่สามารถตรวจพบสารกลุ่มนี้หลังจากการบำบัดน้ำเสียเป็นเวลา 2 – 10 วัน เรียงตามปริมาณที่ตรวจพบ ได้แก่ phenol > *p*-coumaric acid > ferulic acid มีการลดลงอยู่ในช่วงร้อยละ 87.0-100 เมื่อน้ำเสียถูกบำบัด 2 วัน ไม่สามารถตรวจพบสาร *p*-coumaric acid และ ferulic acid ในขณะที่ยังคงตรวจพบสาร phenol จนถึงวันที่ 6 แต่หลังจากวันที่ 10 ของการทดลองไม่สามารถตรวจพบสารดังกล่าว

#### 4.1.3 ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมและศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทน

การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียทนร้อน พบว่าชุดการทดลองจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกเป็นเวลา 6 วัน ให้ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมสูงสุดคือ 204.4 มิลลิลิตร ประกอบด้วยปริมาณก๊าซมีเทนสูงสุดร้อยละ 70.4 ในวันที่ 35 ของการทดลอง และมีค่า BMP เท่ากับ 86.68 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดี รองลงมาคือ น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด 10 วัน ให้ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมสูงสุด 187.6 มิลลิลิตร มีองค์ประกอบของก๊าซมีเทนร้อยละ 64.9 แต่ให้ค่า BMP สูงที่สุดเท่ากับ 123.03 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดี ส่วนน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกเป็นเวลา 2 วัน ให้ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสม 110.4 และ 81.3 มิลลิลิตรตามลำดับ มีปริมาณก๊าซมีเทนร้อยละ 24.6 และ 49.3 และให้ค่า BMP น้อยที่สุดเท่ากับ 11.35 และ 18.78 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดี ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำเสียสามารถผลิตก๊าซชีวภาพสะสมสูงสุดได้เพียง 14.3 มิลลิลิตร

#### 4.1.4 ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกก่อนและหลังการผลิตก๊าซชีวภาพ

กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพสามารถลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัด 2, 6 หรือ 10 วันได้ร้อยละ 28.5, 15.2, 38.1 และ 37.1 จากความเข้มข้นเริ่มต้น 1,080, 805, 572 และ 428 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ก่อนการผลิตก๊าซชีวภาพในชุดการทดลองจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดมีสารประกอบฟีนอลิก ดังนี้ gallic acid > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid > phenol > 4-hydroxybenzoic acid > protocatechuic acid > ferulic acid > *p*-coumaric acid ในขณะที่น้ำเสียบำบัด 2 วันพบสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ gallic acid > 4-hydroxybenzoic acid > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid > phenol > protocatechuic acid

และในน้ำเสียบำบัด 6 วัน ได้แก่ gallic acid > phenol > 4-hydroxybenzoic acid > caffeic acid + syringic acid + vanillic acid > protocatechuic acid ส่วนน้ำเสียบำบัด 10 วัน ได้แก่ gallic acid > 4-hydroxybenzoic acid > protocatechuic acid หลังการผลิตก๊าซชีวภาพในระบบไร้อากาศยังคงตรวจพบสาร gallic acid ในทุกชุดการทดลอง และยังคงเหลือสาร phenol อีกทั้งสาร protocatechuic acid ในน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัด 2 วัน และ 6 วัน (เฉพาะสาร phenol) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยแบคทีเรียที่ร้อนในสภาวะใช้อากาศ

#### 4.2 ข้อเสนอแนะและแนวทางประยุกต์ใช้

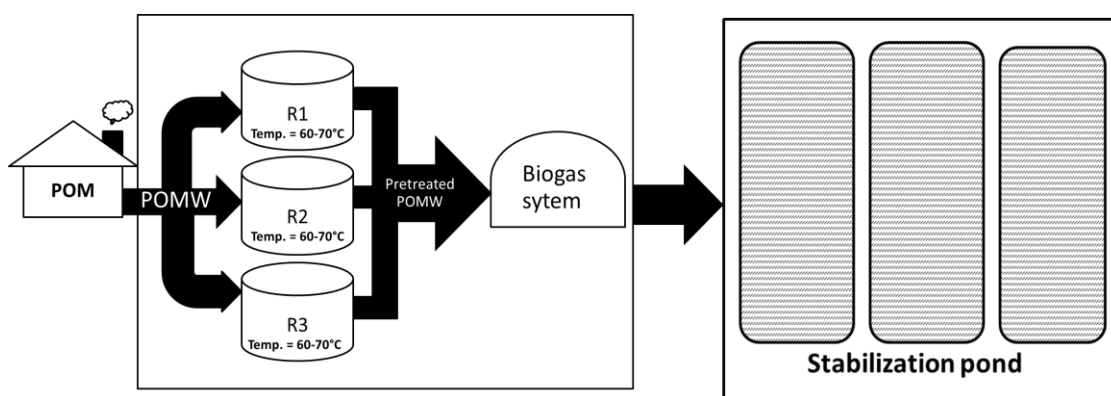
1) เนื่องจากการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC สามารถจำแนกชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกได้ประมาณร้อยละ 73.0 – 84.5 ของสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดที่วัดได้โดยวิธี Folin-Ciocalteu โดยยังคงพบสาร unknown ในโครมาโตแกรมภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้ การศึกษาต่อไปอาจมีการตรวจสอบฟีด unknown ว่าเป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ หรือไม่ หรืออาจใช้เทคนิค Liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS) เพื่อให้วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกมากขึ้น

2) การศึกษานี้ได้ทำการทดลองในระบบกะ (Batch system) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ระบบที่มีความต่อเนื่อง (Continuous system) ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นและการผลิตก๊าซชีวภาพ เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้จริงในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

3) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมว่าระบบบำบัดน้ำเสียประเภทใดที่ใช้ร่วมกับระบบการผลิตก๊าซชีวภาพและมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกที่เหลือได้ดี

4) ควรมีการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกโดยแบคทีเรียที่ร้อน โดยใช้น้ำเสียที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยเฉพาะน้ำเสียที่มีชนิดของสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกันหรือมีความเข้มข้นสูงขึ้น และใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดในการผลิตก๊าซชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเทคโนโลยีบำบัดน้ำเสียและการใช้ประโยชน์จากน้ำเสียในการผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป

5) แนวทางการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่เรียทนร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนเข้าสู่ระบบการผลิตก๊าซชีวภาพและระบบบ่อบำบัดเสถียรทำได้โดยเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นและจำนวนถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (R1-R3) เพื่อลดระยะเวลาในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกและรองรับปริมาณน้ำเสียให้มีความเหมาะสมในแต่ละโรงงาน ซึ่งโรงงานอาจมีการนำกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการผลิตก๊าซชีวภาพมาใช้เป็นพลังงานในการควบคุมอุณหภูมิของถังปฏิกรณ์ให้อยู่ในช่วง 60 - 70 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 แนวทางการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่เรียทนร้อนในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

## บรรณานุกรม

- กรมควบคุมมลพิษ. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก :[http://www.pcd.go.th/info\\_serv/reg\\_std\\_water04](http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water04).  
(วันที่ ค้นข้อมูล : 9 เมษายน 2555).
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก  
:[http://www.dede.go.th/dede/index.php?option=com\\_content&view=article&id=141&Itemid=122&lang=th](http://www.dede.go.th/dede/index.php?option=com_content&view=article&id=141&Itemid=122&lang=th). (วันที่ค้นข้อมูล : 21 มิถุนายน 2555).
- กรมโรงงานอุตสาหกรรม. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก :[http://reg.diw.go.th/water/Report\\_Record.asp?Date\\_Audit=29/1/2556&id\\_sys=1&facreg=+09501308139](http://reg.diw.go.th/water/Report_Record.asp?Date_Audit=29/1/2556&id_sys=1&facreg=+09501308139) (วันที่ค้นข้อมูล : 12 ธันวาคม 2556).
- ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส. 2547. การกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยการใช้  
เอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากใบยางพารา, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์หาบัณฑิต สาขาการ  
จัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- น้ำอ้อย ศรีประสมและธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2551. สหสัมพันธ์แบะอัตราพันธุกรรมของลักษณะ  
ทางลำดับในระยะกล้าปาล์มน้ำมัน. วารสารหาคไหญ่วิชาการ. 2:109-115.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ. 2543. การผลิตน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำที่ใ้เครื่องdecanter และคุณลักษณะ  
น้ำเสียจากแหล่งต่างๆจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดสุราษฎร์ธานีและกระบี่.  
วารสารสงขลานครินทร์.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพและอรรัญ หันพงศกิตติคุณ. 2554. การประยุกต์ใ้เอนไซม์ทางการค้าและ  
จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการเก็บเกี่ยวน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. รายงาน  
วิจัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.
- อรรรัตน์ วงศ์ศรี, ชูจิต มามีวัฒนะ, ศิริชัย มามีวัฒนะ, ชุมพล เขาวนะ, วราวุธ ชูธรรมรัช, และชาย  
โฆรวิศ. 2554. โครงการวิจัยปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันรอบที่ 2 ของกรมวิชาการเกษตร:  
ระยะที่ 1 (ปี 2545-48). ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี, สำนักวิจัยและพัฒนาการ  
เกษตรกร เขตที่ 7.
- Alam, Md. Z., Ameem, E. S., Muyibi, S. A. and Kabbashi, N. A. 2009. The factors affecting the  
performance of activated carbon prepared from oil palm empty fruit bunches for  
adsorption of phenol. *Chemical Engineering Journal*. 155: 191–198.

- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P. and Lier, J.B.van. 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*. 59.5 : 927-934.
- APHA, AWWA and WEF. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th edition. American Public Health Association, Washington DC.
- Asses, N., Ayed, L., Marouani, L. and Hamdi, M. 2002. Decolorization of fresh and stored-black olive oil mill wastewater by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*. 38: 361-365.
- Asses, N., Ayed, L., Bouallagui, H., Sayadi, S. and Hamdi, M. 2009. Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63: 407–413.
- Balasundrum, N., Sundram, K. and Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-product : Antioxidant activity, occurrence, and potential use. *Food Chemistry* 99: 191-203.
- Basha, K. M., Rajendran, A. and Thangavelu, V. 2010. Recent advances in the biodegradation of phenol: A review. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*. 1: 219-234.
- Beccaru, M., Bonemazzi, F., Majone, M. and Riccardi, C. 1996. Interaction between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents. *Water Research*. 30: 183-189.
- Becker, P., 2010. Understanding and optimization the microbial degradation olive oil : A case study with the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. 377-386.
- Camarillo, R., and Rincón, J., 2009. Effect of inhibitory compounds on the anaerobic digestion performance of diluted wastewaters from the alimentary industry. *Chemical Engineering Journal*. 193-194 : 68-76.
- Cordova-Rosa, S. M., Dams, R. I., Cordova-Rosa, E. V., Radetski, M. R., Corra, A. X. R. and Radetski, C. M. 2009. Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*. 164: 61–66.

- Chavalparit, O., Rulkens, W.H., Mol, A.P.J. and Khaodhair, S. 2006. Option for environmental sustainability of the crude palm oil industry in Thailand through enhancement of industrial ecosystems. *Environment, Development and Sustainability*. 8: 271-287.
- DellaGreca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L. and Temussi, F. 2001. Phytotoxicity of Low-Molecular-Weight Phenols from Olive Mill Waste Waters. *Environmental Contamination and Toxicology*. 67 : 352-359.
- DeGraeve, G. M., Geiger, D. L., Meyer, J. S. and Bergman, H. L. 1980. Acute and embryolarval toxicity of phenolic compounds to aquatic biota. *Environmental contamination and toxicology*. 9: 556-568.
- Dhouib, A., Ellouz, M., Aloui, F. and Sayadi S. (2005). Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 405-411.
- Duffner, F.M., Kirchner, U., Bauer, M.P. and Müller, R., 2000. Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7 : cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene* 256:215-221.
- El-Naas, M. H., Al-Muhtaseb, S.A. and Makhlof, S. 2009. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Hazardous Materials*. 164:720-725.
- Ergul, F.E., Sagin, s., Ongen, G. and Sukan. F.V., 2011. Dephenolization and decolorization of olive mill wastewater through sequential batch and co-culture application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 107-114.
- Esposito, G., Frunzo, L., Liotta, F., Panico, A. and Pirozzi, F. 2012. Bio-Methane potential test to measure the biogas production from the digestion and Co-digestion of complex organics substrates. *The Open Environment Engineering Journal*. 5: 1-8.
- Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.D. and Pereira, E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*. 46 : 3774-3779.

- Farhad, S., Yoo, Y. and Hamdullahpur, F. 2010. Effects of fuel processing methods on industrial scale biogas-fuelled solid oxide fuel cell system for operating in wastewater treatment plants. *Journal of Power Source.s* 195: 1446–1453.
- Feitkenhauer, H., Schnicke, S. Müller, R. and Märkl, H. 2001. Detrmination of kinetic paramerters of the phenol-degrading thermophile *Bacillus thermoleovorans* sp.A2. *Apply Microbiology and Biotethanol*. 57: 744-750.
- Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E., Aggelis, G.G., Lyberatos, G. 2002. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 36: 4735-4744.
- Gelegenis, J., Georgakakis, D., Angelidaki, I. and Mavris, V. 2007. Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. *Renewable Energy*. 32: 2147–2160.
- Gernjak, W., Krutzler, T., Glaser, A., Malato, S., Caceres, J., Bauer, R. and Fernandez-Alba, A.R. 2003. Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. *Chemosphere*. 50: 71-78.
- Hernandez, J.E. and Edyvean, R.G.J. 2008. Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compound in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous materials*. 160: 20-28.
- Hammer, M.J., 1996. Water and wastewater technology. 3<sup>rd</sup> edition. Prentice Hall International, Intercorpetate.
- Jenkins, D., Richard, M.G. and Daigger, G.T. 2004. Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and Other Solids Separation Problems. 3<sup>rd</sup> edition. International Water Association Publishing, London.
- Juárez, M.J.B., Zafra-Gómez, A., Lonzón-Toro, B., Ballesteros-García, O.A., Naralón, A., González, J. and Vilchez, J.L. 2008. Gas chromatographic-mss spectrometric study of the degradation of phenolic compounds in wastewater olive oil by *Azotobacter Chroococcum*. *Biosource technology*. 99: 2392-2398.
- Klinkle, H.B., Thomsen, A.B. and Ahring, B.K. 2001. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on growth and ethanol production by *Thermoanaerobacter mathranii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57:631-638.



- Laminar, A. and Moktar, H., 2003. Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry*. 39: 59-65.
- Leitao, A.L., Duarte, M.P. and Oliveira, J.S. 2007. Degradation of phenol by a halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 59: 220-225.
- Limkhuansuwan, V. and Chaiprasert, P. 2010. Decolorization of molasses meladinoids and palm oil mill effluent phenolic compounds by fermentative lactic acid bacteria. *Journal of Environmental Sciences*. 22(8): 1209-1217.
- Mahiuddin, Md., Fakhruddin, A. N. M. and Mahin., A.A., 2012. Degradation of Phenol via Meta Cleavage Pathway by *Pseudomonas fluorescens* PU1. *Microbiology*. 2012:1-6.
- Maisarah, M.H., Noriham, A. and Zainon, M.N. 2013. Quantification of Polyphenolic Acids and Antioxidant Capacity of Palm Puree from Different Tenera Breeds of *Elaeis Guineensis*. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 3(4): 349-353.
- Manafi, M., Mehrnia, M. R. and Sarrafzadeh, M. H., 2011. Phenol removal from synthetic wastewater by *Alcaligenes Faecalis*: online monitoring. *International Journal of Chemical and Environment Engineering*. Volume 2, No.2 : 103-107.
- Mark j. Hammer. 1996. *Water and wastewater technology*. 3<sup>rd</sup> edition, Prentice Hall International, Inc. U.S.A.
- Markossian, S., Becker, P., MärklGarabed, H. and Antranikian. G. 2000. Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an icelandic hot spring. *Extremophiles*. 4: 365-371.
- Martinez-Garzia, G., Johnson, A.C., Bachmann, R.T., Williams, C.J., Burgoyne, A. and Edyvean, R.G.J. 2007. Two-stage biological treatment of olive mill wastewater with whey as co-substrate. *Internal Biodeterioration and Biodegradation*. 59: 273-282.
- Mekki, A., Dhouib, A. and Sayadi, S. 2007. Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters. *Journal of Environmental Management* .84: 134-140.
- Michalowicz, J. and Duda, W. 2007. Phenols – Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*. 16: 346-362.

- Milo, R.E., Duffner, F.M. and Muller R. 1999. Catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic, phenol-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain A2 has unexpected low thermal stability. *Extremophiles* 3: 185-190.
- Mohamed, M.E., Al-Dousary, M., Hamzah, R.Y. and Fuchs, G. 2006. Isolation and characterization of indigenous thermophilic bacteria active in natural attenuation of bio-hazardous petrochemical pollutant. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 58: 213–223.
- Moody, L., Burns, R., Wu-Haan, W., and Spajis, R. 2009. Use of Biochemical Methane Potential (BMP) assays for predicting and enhancing anaerobic digester performance. *Agricultural Engineering*. 44: 930-934.
- Müller, R., Antranikian, G., Maloney, S. and Sharp, R. 1998. Thermophilic degradation of environmental pollutants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 61:155-169.
- Murugesan, T. and Sheeja, R.Y., 2005. A correlation for the mass transfer coefficients during the biodegradation of phenolic effluents in a packed bed reactor. *Separation and Purification Technology*. 42: 103-110.
- Mutzel, A., Reinscheid, U.M., Antranikian, G. and Müller, R. 1996. Isolation and characterization of a thermophilic bacillus strain, that degrades phenol and cresols as sole carbon source at 70 °C. *Apply Microbiology and Biotechnology*. 46: 593-596.
- Najafpour, G.D., Zinatizadeh, A.A.L., Mohamed, A.R., Isa, M.H. and Nasrollahzadeh, H. 2006. High-rate anaerobic digestion of palm oil mill effluent in an upflow anaerobic sludge-fixed film bioreactor. *Process Biochemistry*. 41:370-379.
- Nair, I. C., Jayachandran, K. and Shashidhar, S. 2008. Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology*. 7: 4951–4958.
- Neo, Y-P., Ariffin, A., Tan, Ch-P. and Tan, T-A., 2010. Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts. *Food Chemistry*. 122: 353-359.
- Othman, N. B., Ayed, L., Assas, N., Kachouri, F., Hammami, M. and Hamdi, M. 2008. Ecological removal of recalcitrant phenolic compounds of treated olive oil mill wastewater by *Pediococcus pentosaceus*. *Bioresource Technology*. 2996-3001.

- Rupani, P. F., Singh, R.P., Ibrahim, M.H. and Esa, N. 2010. Review of current palm oil mill effluent (POME) treatment methods. *World Applied Sciences Journal*. 10(10): 1190-1201.
- Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M., and Aloui, F. 2000. Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*. 35: 725-735.
- Schoen, M.A., Sperl, S.S., Fadermaier, M. Goberna, M., Franke-Whittle, I., Insam, H., Ablinger, J. and Wett, B. 2009. Population dynamics at digester overload conditions. *Biosource Technology*. 100(23):5648-55.
- Sidik, U.H., Razali, F.B., Alwi, S.R.W. and Maigari, F. 2013. Biogas production through Co-digestion of palm oil mill effluent with cow manure. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*. 21(1):79-84.
- Singh, R.P., Ibrahim, M.H., Esa, N. and Iliyana, M.S. 2010. Composting of waste from palm oil mill : a sustainable waste management practice. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 9: 331-344.
- Sundram, K., Sambanthamurthi, R., and Tan, Y.A. 2003. Palm fruit chemistry and nutrition. Asia Pacific. *Journal of Clinical Nutrition*. 12: 355–362.
- Torrecilla. J.S.. 2010. Phenolic Compound in Olive Oil Mill Wastewater. Department of chemical Engineering, Universidad Complutense de Madrid, Spain: 357-365.
- Thomas, S., Sarfaraz, S., Mishra, L.C. and Iyengar, L. 2002. Degradation of phenol compounds by a defined denitrifying bacteria culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 18: 57-63.
- Tziotzios, G., Michailakis, S. and Vayenas, D.V. 2007. Aerobic biological treatment of olive mill wastewater by olive pulp bacteria. *International biodeterioration and biodegradation*. 60 : 209-214.
- Unell, M., Nordin, k., Jernberg, C., Stemström, J. and Jansson, J.K. 2008. Degradation of Mixures of phenolic compounds by *Arthrobacter chlorophenilicus* A6. *Biodegradation*. 19: 495-505.

- Yacob, S., Hassan, A.H., Shirai, Y., Wakisaka, M. and Subash, S. 2006. Baseline study of methane emission from anaerobic ponds of palm oil mill effluent treatment. *Science of the Total Environment*. 366 : 187-196.
- Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T.R., Kohli, S. and Rana, V., 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques. *Bioresource technology*. 95(1):1-10.
- Yao, R.S., Sun, M., Wang, C.-L. and Deng, S.-S. 2006. Degradation of phenolic compounds with hydrogen peroxide catalyzed by enzyme from *Serratia marcescens* AB 90027. *Water Research*. 40 : 3091-3098.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## ภาคผนวก ก

## สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

- แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	1.0 กรัม
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	0.42 กรัม
- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	0.18 กรัม
- แมกนีเซียมคลอไรด์เฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.1 กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.1 กรัม
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.4 กรัม
- เฟอร์รัสซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1 มิลลิกรัม

นำอาหารเหลวดังกล่าวนี้มาเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และแหล่งธาตุอาหาร (Trace elements) 10 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 ลิตรประกอบด้วย

- nitrilotriacetic acid	1.5 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	3.0 กรัม
- แมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ( $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.5 กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0 กรัม
- เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.19 กรัม
- โคบอลต์ซัลเฟตหรือโคบอลต์คลอไรด์ ( $\text{CoSO}_4$ or $\text{CoCl}_2$ )	0.1 กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.1 กรัม
- ซิงค์ซัลเฟต ( $\text{ZnSO}_4$ )	0.1 กรัม
- คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.1 กรัม
- อะลูมิเนียมโพแทสเซียมไดซัลเฟต ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ )	0.01 กรัม
- กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0.01 กรัม
- โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.01 กรัม

โดยละลายใน nitrilotriacetic acid ปรับ pH 6.5 ด้วย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์  
เติมสารละลายวิตามิน (Vitamin solution) 10 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 ลิตรประกอบด้วย

- Biotin 2 มิลลิกรัม, folic acid	2 มิลลิกรัม
----------------------------------	-------------

- pyridoxine.HCl	10 มิลลิกรัม
- thiamine HCl	5 มิลลิกรัม
- riboflavine	5 มิลลิกรัม
- nicotinic acid	5 มิลลิกรัม
- calcium panthothenate,	5 มิลลิกรัม
- B12	0.01 มิลลิกรัม
- p-aminobenzoic acid	5 มิลลิกรัม
- thioctic acid	1 มิลลิกรัม

เตรียมอาหาร CFMM ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมแหล่งธาตุอาหารและวิตามินที่ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองตำรับรูป micro filter อย่างละ 10 มิลลิลิตร ต่ออาหาร CFMM 1 ลิตร



**ภาคผนวก ข**

**กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก Folin–Ciocalteu**

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin–Ciocalteu

ข.1 กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin–Ciocalteu

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

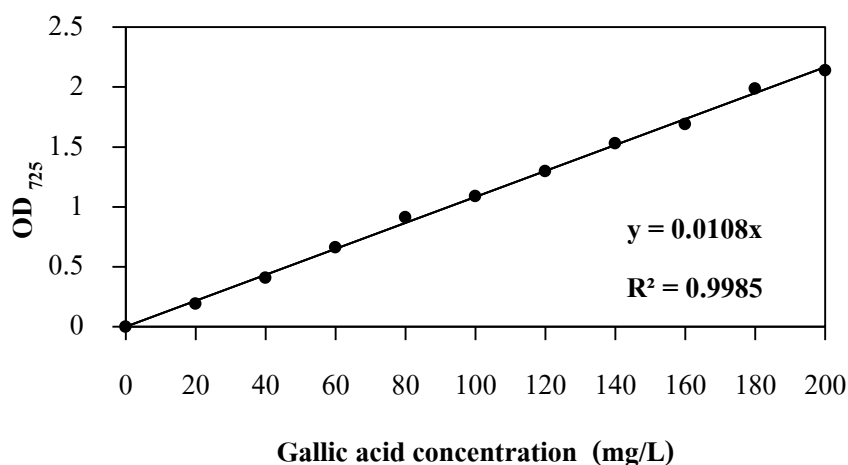
เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิก ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง gallic acid monohydrate (Sigma) 0.55 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิก มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 -200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิก ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำกลั่นตามปริมาณดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข.1

ตารางภาคผนวกที่ ข.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 20-200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (มก./ล.)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน (มล.)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มล.)
20	0.2	4.8
40	0.4	4.6
60	0.6	4.4
80	0.8	4.2
100	1.0	4.0
120	1.2	3.8
140	1.4	3.6
160	1.6	3.4
180	1.8	3.2
200	2.0	3.0

### การสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายกรดแกลลิก ความเข้มข้น 20-200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน Folin-Ciocalteu phenol reagents ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติม 1 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ใช้ น้ำกลั่นที่ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้มาสร้างกราฟ มาตรฐานของกรดแกลลิก (รูปภาคผนวกที่ ข.1)



รูปภาคผนวกที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ภาคผนวก ก  
กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิก  
ด้วยเทคนิค HPLC

## ภาคผนวก ก

### กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยเทคนิค HPLC

#### ก.1 กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยเทคนิค HPLC

##### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ของ Gallic acid 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง Gallic acid 10 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลาย Methanol:DI water (60:40) และเตรียมสารละลายเข้มข้นของ Protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, Feruic acid และ Phenol ด้วยวิธีเดียวกัน

เตรียมสารละลายมาตรฐานรวมโดยการเปิดสารละลายเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของสารทุกตัวปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติม Methanol:DI water (60:40) จนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ละลายมาตรฐานรวมความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (1)$$

$C_1$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายเข้มข้นของสารแต่ละชนิด (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$V_1$  คือ ปริมาตรของสารละลายเข้มข้น (มิลลิลิตร)

$C_2$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)

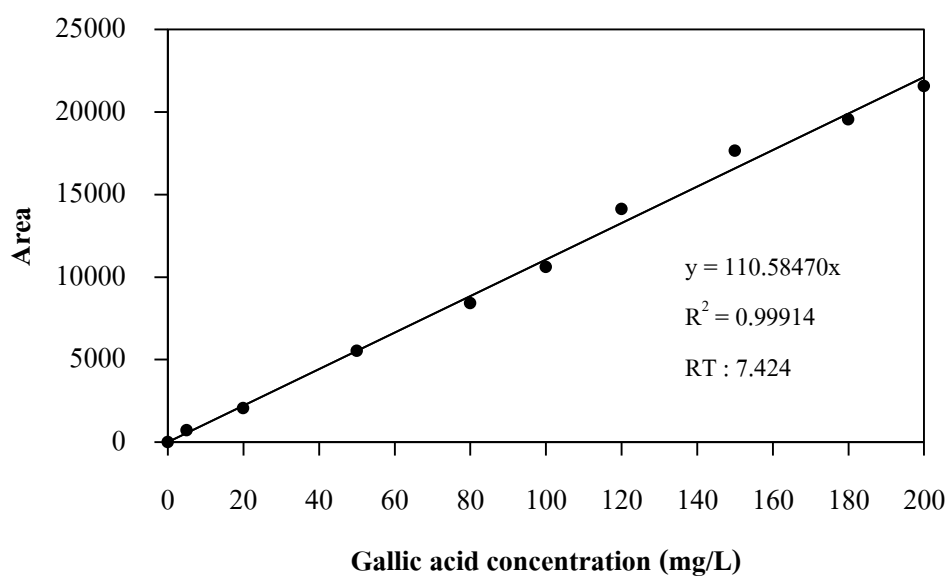
$V_2$  คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานรวม (มิลลิลิตร)

การสร้างกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานรวม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ Gallic acid , Protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, Feruic acid และ Phenol ให้ได้ความเข้มข้น 5, 20, 50, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยคำนวณจากสมการ (1) ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ก.1

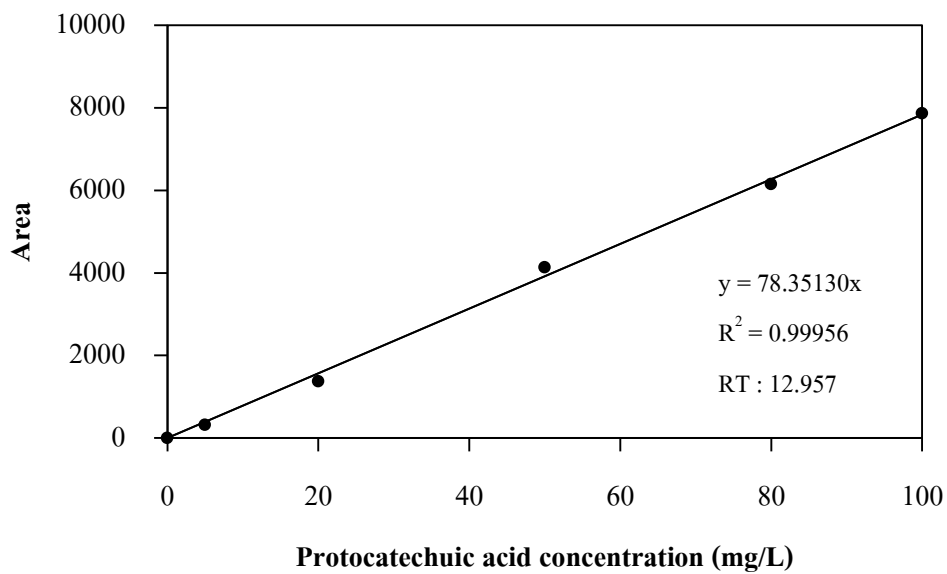
ตารางภาคผนวกที่ ค.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานรวม ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (มก./ล.)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานรวม (มล.)	ปริมาตรตัวทำละลาย (มล.)
5	0.1	1.9
20	0.4	1.6
50	1.0	1.0
80	1.6	0.4
100	2	0

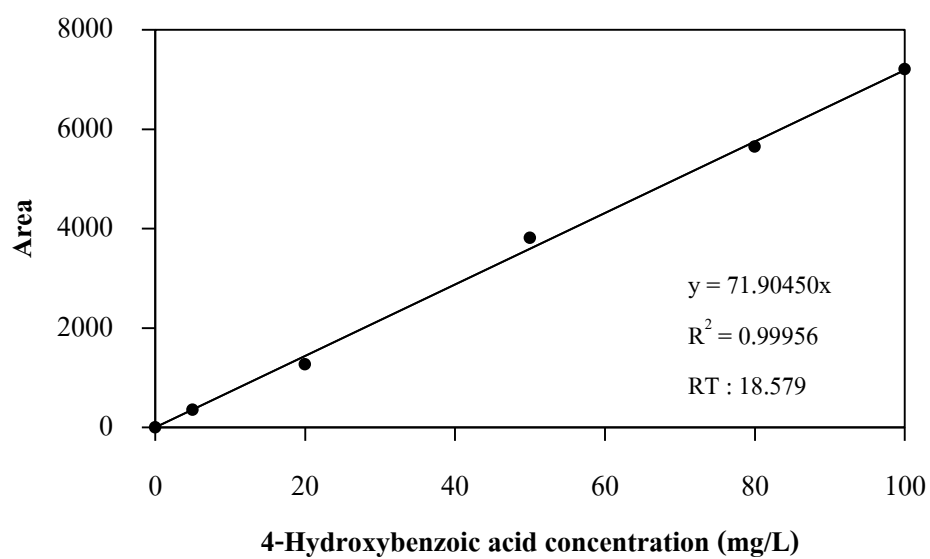
เนื่องจากเมื่อทำการวัดตัวอย่างด้วย HPLC ความเข้มข้นของ Gallic acid สูงกว่ากราฟมาตรฐานจึงเพิ่มระดับความเข้มข้น ของ Gallic acid ที่ระดับความเข้มข้น 120, 150, 180 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้กราฟมาตรฐานรวมดังแสดงในรูปภาคผนวกที่ ค.1-ค.9



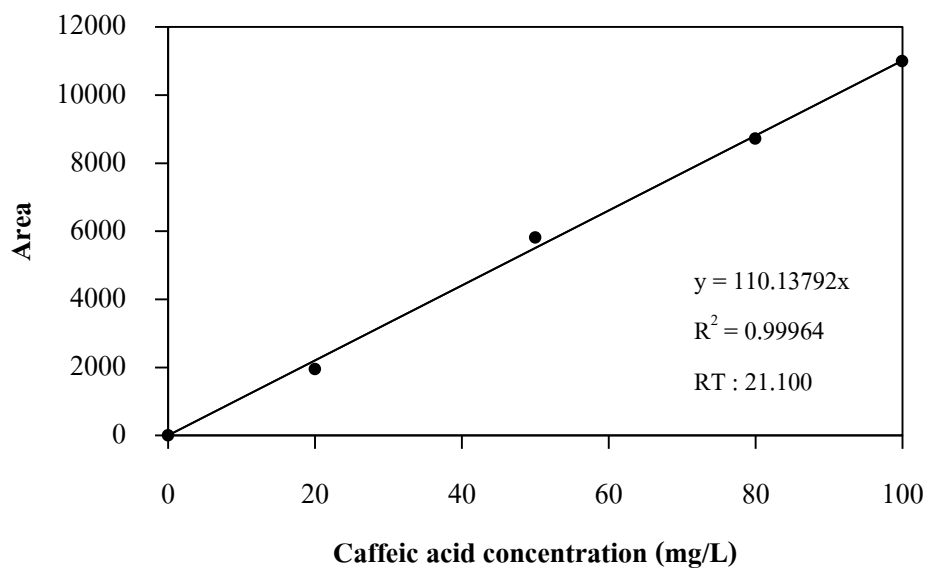
รูปภาคผนวกที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid



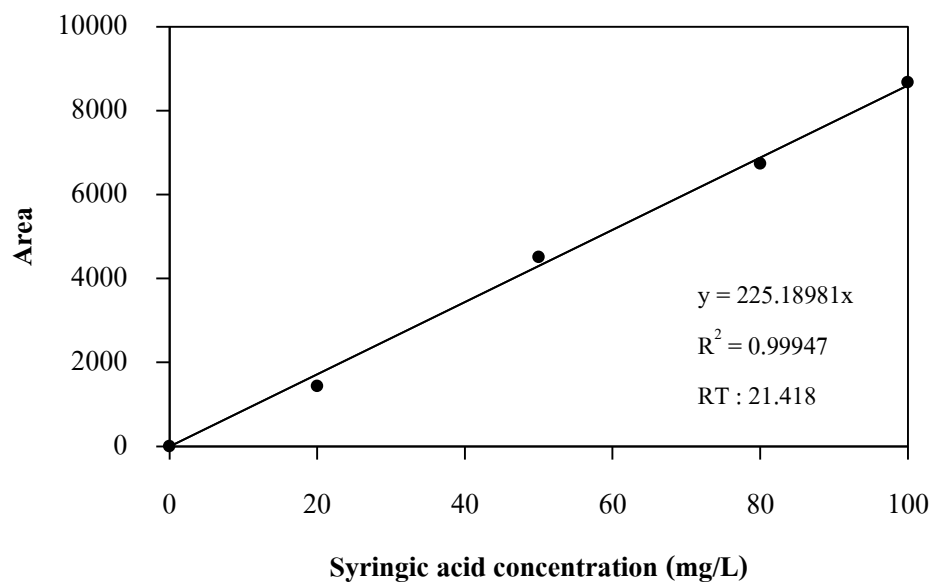
รูปภาคผนวกที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของ Protocatechuic acid



รูปภาคผนวกที่ ค.3 กราฟมาตรฐานของ 4-Hydroxybenzoic acid

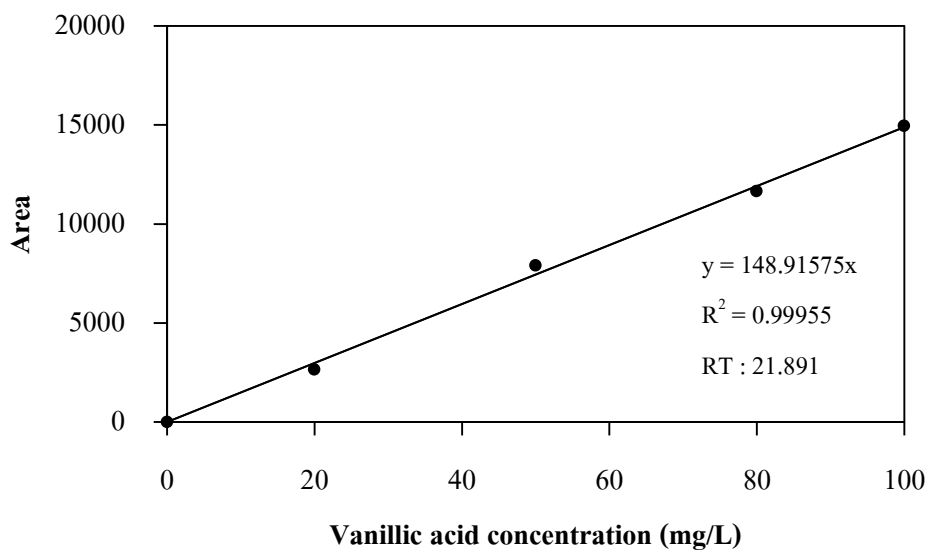


รูปภาคผนวกที่ ค.4 กราฟมาตรฐานของ Caffeic acid

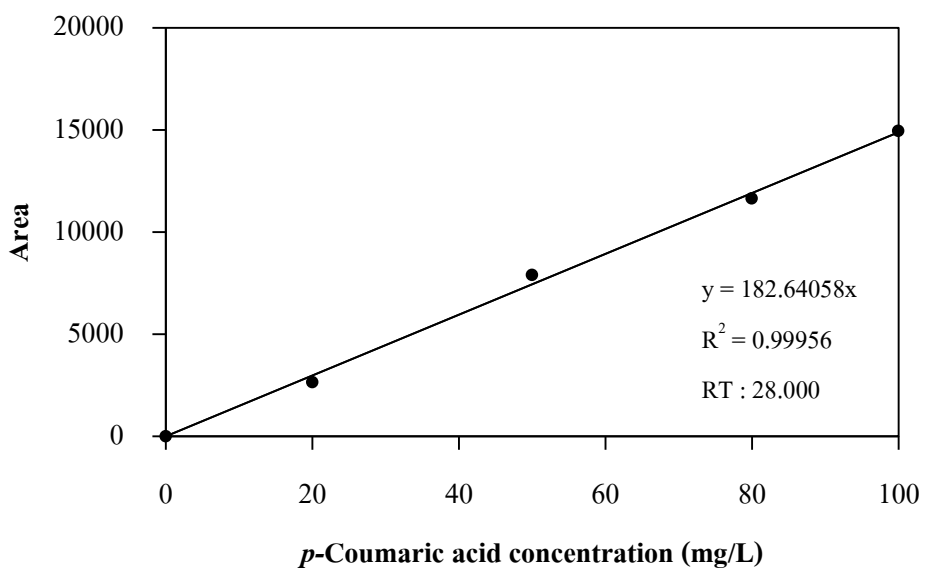


รูปภาคผนวกที่ ค.5 กราฟมาตรฐานของ Syringic acid

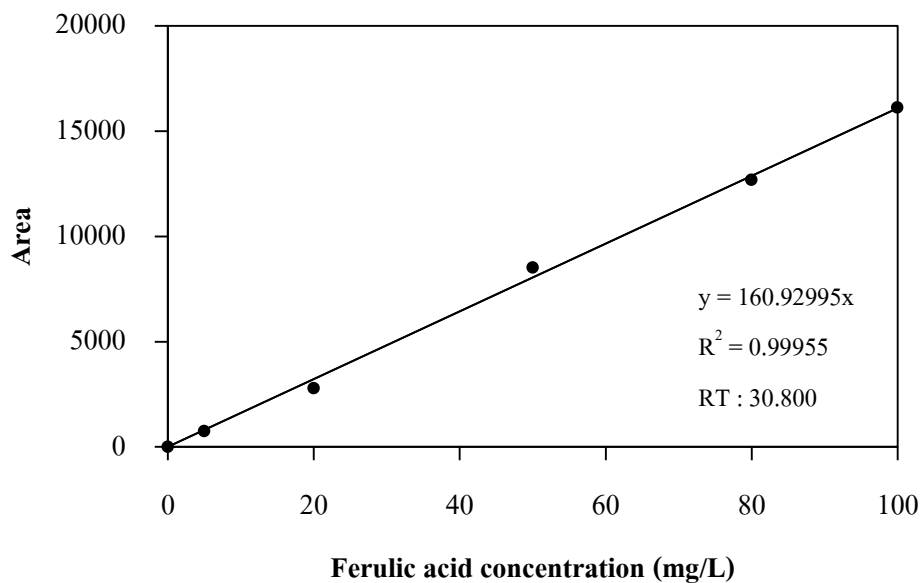




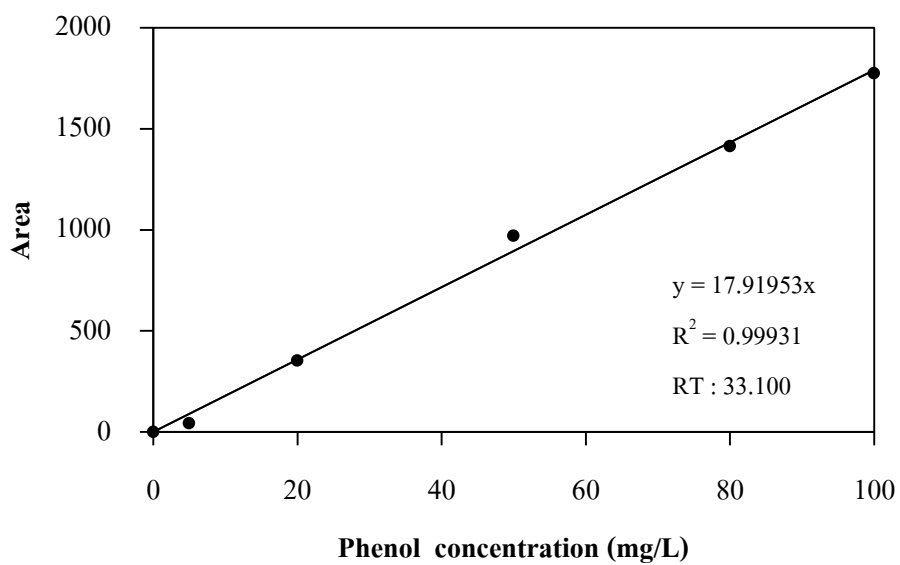
รูปภาคผนวกที่ ค.6 กราฟมาตรฐานของ Vanillic acid



รูปภาคผนวกที่ ค.7 กราฟมาตรฐานของ *p*-Coumaric acid



รูปภาคผนวกที่ ค.8 กราฟมาตรฐานของ Ferulic acid



รูปภาคผนวกที่ ค.9 กราฟมาตรฐานของ Phenol

ภาคผนวก ง  
สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์

ภาคผนวก ง  
สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์

ง.1 สารเคมี

- Ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Ammonium hydroxide ( $\text{NaOH}$ )	บริษัท Merck (Germany)
- Sodium chloride ( $\text{NaCl}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Potassium hydroxide( $\text{KOH}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	บริษัท J.T. Baker (U.S.A)
- Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Magnesium chlorideheptahydrate ( $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Calcium chloride dihydrate ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Potassium chloride ( $\text{KCl}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Ferrous sulfate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Nitrilotriacetic acid ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_6$ )	บริษัท Sigma-Aldrich (Germany)
- Magnesium sulfate heptahydrate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Manganese(II) sulfate dehydrate ( $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Cobalt(II) sulfate ( $\text{CoSO}_4$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Copper(II) sulfate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Aluminum potassium sulfate ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Sodium molybdate dihydrate ( $\text{Na}_2\text{MoO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Biotin( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ )	บริษัท Sigma-Aldrich (U.S.A.)
- Folic acid ( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$ )	บริษัท Sigma-Aldrich (U.S.A.)
- Pyridoxine( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ )	บริษัท Sigma-Aldrich (U.S.A.)
- Thiamine ( $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$ )	บริษัท Sigma-Aldrich (Germany)
- Riboflavin ( $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ )	บริษัท Sigma-Aldrich (U.S.A.)
- Nicotinic acid ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)
- Panthothenic acid ( $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_5$ )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)

- Vitamin B12 (C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P)	บริษัท Sigma-Aldrich (U.S.A)
- Anthranilic acid (C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> )	บริษัท Fluka Analytical (China)
- Lipoic acid (C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)
- Phenol (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH)	บริษัท Sigma-Aldrich (U.S.A.)
- Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	บริษัท Ajax Finechem (Australia)
- Gallic acid (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)
- 4- Hydroxybenzoic acid (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)
- Protocatechuic acid (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)
- Caffeic acid (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)
- Vanillic acid (C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)
- <i>p</i> -Coumaric acid (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)
- Syringic acid (C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)
- Ferulic acid (C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> )	บริษัท Sigma-Aldrich (Singapore)
- Folin-ciocalteau's phenol	บริษัท Sigma-Aldrich (U.S.A.)
- Yeast Extract	บริษัท Becton Dickinson and Company (France)
- Tryptone	บริษัท Becton Dickinson and Company (France)
- Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	บริษัท J.T.Baker (China)
- Acetonitrile (CH <sub>3</sub> CN)	บริษัท J.T.Baker (China)
- Phosphoric acid (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	บริษัท J.T.Baker (China)
- Sodium carbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	บริษัท Fisher Chemical (U.S.A.)

## ง.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น RL 150	บริษัท Russell
- เครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง รุ่น PB-1502	บริษัท Mettler Toledo (Switzerland)
- เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204	บริษัท Mettler Toledo (Switzerland)
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325	บริษัท Tomy (Japan)
- ตู้เขี่ยเชื้อ laminar flow รุ่น Microflow	บริษัท MDH Limited (England)

