

# รายงานฉบับสมบูรณ์

การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1  
ตรึงบนวัสดุเหลือใช้ปาล์มน้ำมัน

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

ดร.อรมาศ สุทธิรัตน์  
นางสาววิชญา แก้วทิพย์  
คณะกรรมการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนพัฒนานักวิจัย ประจำปี 2553

## รายละเอียดโครงการ

**ชื่อโครงการ (ภาษาไทย):** การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ตรึงบนวัสดุเหลือใช้ปาล์มน้ำมัน  
**(ภาษาอังกฤษ):** Phenol degradation by mixed culture of *Methylobacterium* sp.NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 immobilized on oil palm residues

### **ชื่อคณะผู้วิจัย:**

หัวหน้าโครงการวิจัย : ดร.อรมาศ สุทธินนท์

คณะกรรมการจัดการสิ่งแวดล้อม ม.สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 โทรศัพท์: 074-286-829

ผู้ร่วมโครงการวิจัย : นางสาววิชญา แก้วทิพย์

คณะกรรมการจัดการสิ่งแวดล้อม ม.สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 โทรศัพท์: 074-286-839

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท

เขตปทุมวัน แขวงวังใหม่ กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์: 02-2185087

**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก:** เงินรายได้ ม.สงขลานครินทร์ ประเภท ทุนพัฒนานักวิจัย ประจำปี 2553  
เป็นจำนวนเงิน 110,000 บาท

**ระยะเวลาตลอดโครงการ:** 2 ปี ตั้งแต่ เมษายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือน เมษายน พ.ศ. 2554

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้จัดสรรทุนอุดหนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปี 2553 ให้แก่คณะผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย ที่ช่วยอนุเคราะห์เชื่อมต่อเครือข่ายที่เรียกสำหรับการทดลองตลอดจนการให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการแก้ไขปัญหาจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี อีกทั้งนางสาวปิยะมาศ คงแถม สำหรับความช่วยเหลือเรื่องเทคนิคการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ขอขอบคุณบริษัทลาภทวีปาล์ม จำกัด และบริษัทน้ำมันพีชบริสุทธิ จำกัด ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย และวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการด้วยดีเสมอมา และหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ที่อำนวยความสะดวกในการใช้พื้นที่สำหรับทำงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นพัฒนาวิธีการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 เพื่อกำจัดฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว carbon free mineral medium (CFMM) และในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยเลือกใช้วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ ทะลายเปล่า (Empty fruit bunches: EFB) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (Pericarp fiber: PF) มาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ จากผลการศึกษาการสังเคราะห์ exopolysaccharide (EPS) พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์บน EFB และ PF คือ 6 และ 8 วัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวัสดุตรึงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าเซลล์ตรึงบน EFB และ PF สามารถลดปริมาณฟีนอลที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้ใกล้เคียงกันคือ 98% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม เซลล์ตรึงบน EFB มีอัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงกว่า เนื่องจากวัสดุมีความเป็นรูพรุนสูง เซลล์เกาะติดได้ดี ลดข้อจำกัดในการแพร่ผ่านของสาร และดูดซับฟีนอลน้อยจึงเลือกเซลล์ตรึงบน EFB มาทดสอบการกำจัดฟีนอลที่ความเข้มข้นในช่วง 10 -5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์อิสระบำบัดฟีนอลได้สูงกว่าเซลล์ตรึงเล็กน้อย และที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปเซลล์ตรึงสามารถกำจัดฟีนอลได้สูงกว่าเซลล์อิสระ จากผลการนำเซลล์ตรึงมากำจัดฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีฟีนอลปนเปื้อนประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลและการปรับตัวในน้ำทิ้งที่ถูกเจือจางสามารถกำจัดฟีนอลได้สูงสุด 72% และสามารถดลสีในน้ำทิ้งได้ประมาณ 25% ในขณะที่เซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านวิธีการดังกล่าวกำจัดฟีนอลได้เพียง 35% ภายในเวลา 7 นอกจากนี้เซลล์ตรึงบน EFB สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง และเก็บไว้ได้นาน 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4°C โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลเท่ากับเซลล์ตรึงที่เพิ่งเตรียมใหม่

## ABSTRACT

This research aims to develop an immobilized mixed of *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK on oil palm residues for phenol degradation in CFMM liquid medium and palm oil mill effluent (POME). The oil palm residues such as empty fruit bunch (EFB) and pericarp fiber (PF) were selected as immobilizing materials in this study. The results showed that the optimum incubation period for bacterial immobilization on EFB and PF were 6 and 8 days, respectively. Comparing between these two immobilized bacteria, the phenol removal efficiencies were almost similar in which bacteria immobilized on EFB and PF were able to remove 98% of 30 mg/L phenol in liquid medium after 24 hr incubation. However, the bacteria immobilized on EFB provided higher phenol degradation rate and was selected as supporting material for further experiments, since its high porous structure could promote the attachment of bacteria as well as reduce mass transfer limitations and phenol adsorption on material. It was found that at lower phenol concentration than 30 mg/L, immobilized bacteria had lower degradation ability than those of suspended cells. Meanwhile the degradation ability of immobilized bacteria was greater at 30 mg/L or higher concentrations. The immobilized bacteria were later tested with POME contaminated with 30 mg/L phenols. Approximately 72% of phenols in POME was removed and 25% decolorization was obtained after immobilized bacteria were activated in CFMM containing phenol and acclimated in diluted POME, whereas non-activated and non-acclimated immobilized cells had lower removal efficiency of 35% after 7 days incubation. Moreover, the immobilized bacteria could be repeatedly used at least 10 times both in CFMM and POME, and stored at 4 °C for 4 weeks with the comparable phenol removal efficiency comparing to the freshly prepared inoculums.

## สารบัญ

	หน้า
รายละเอียดโครงการ	i
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iii
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูป	viii
1. บทนำ	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. ขอบเขตการวิจัย	2
4. การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
4.1 แหล่งกำเนิดฟีนอล	2
4.2 คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี และความเป็นพิษของฟีนอล	4
4.3 อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม	5
4.4 กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของฟีนอล	8
4.5 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล	9
4.6 แบคทีเรียสกุล <i>Methylobacterium</i> และ <i>Acinetobacter</i>	11
4.7 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)	12
4.8 การใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลายสารมลพิษ	14
4.9 การย่อยสลายฟีนอลโดยใช้เซลล์ตรึง	15
5. วิธีดำเนินการวิจัย	
5.1 ภาพรวมของการดำเนินงานวิจัย	18
5.2 น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	19
5.3 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย	19
5.4 ศึกษาการผลิต extracellular polymeric substance (EPS) ของแบคทีเรีย	20
5.5 การตรึงเซลล์แบคทีเรีย	21
5.6 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	24
5.7 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	26
5.8 วิเคราะห์	29

	หน้า
6. ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	
6.1 การผลิต extracellular polymeric substance (EPS) ของแบคทีเรียแต่ละชนิด	31
6.2 การพัฒนาเซลล์ตรึงบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	33
6.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM	39
6.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	46
7. สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	
7.1 สรุปผลการทดลอง	53
7.2 ข้อเสนอแนะ	55
8. บรรณานุกรม	56
9. ภาคผนวก	66

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	ความเข้มข้นของฟีนอลในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ	3
ตารางที่ 2	คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของฟีนอล	4
ตารางที่ 3	คุณลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	7
ตารางที่ 4	ปริมาณสารอาหารโดยเฉลี่ยในวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	8
ตารางที่ 5	จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล	10
ตารางที่ 6	การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล <i>Methylobacterium</i>	11
ตารางที่ 7	การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล <i>Acinetobacter</i>	12
ตารางที่ 8	วิธีวิเคราะห์คุณลักษณะของวัสดุ	21
ตารางที่ 9	การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	29
ตารางที่ 10	คุณสมบัติของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์	35
ตารางที่ 11	ประสิทธิภาพการตรึงเซลล์บน EFB และ PF ที่ระยะเวลาการตรึงเซลล์ 6 และ 8 วัน ตามลำดับ	37
ตารางที่ 12	อัตราการย่อยสลายจำเพาะของฟีนอล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	44
ตารางที่ 13	องค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อน และหลังการบำบัดด้วยเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล	49
ตารางที่ 14	ปริมาณฟีนอลที่ลดลง (%) โดยใช้เซลล์ตรึงด้วยวิธีต่าง ๆ	51



## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1	กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	6
รูปที่ 2	ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (a) เส้นใยปาล์มน้ำมัน (b)	7
รูปที่ 3	วิถีการย่อยสลายฟีนอล (a) วิถีออโท (Ortho-Pathway) (b) วิถีเมทา (Meta-Pathway)	9
รูปที่ 4	วิธีการตรึงเซลล์	14
รูปที่ 5	ลักษณะบ่อบำบัดน้ำเสีย (a) และลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (b)	19
รูปที่ 6	แบคทีเรีย <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 (a) และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 (b) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM	20
รูปที่ 7	วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน (a) ทะลายปาล์มน้ำมัน (b) เส้นใยปาล์มน้ำมัน	22
รูปที่ 8	ทดสอบการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงในขวดแก้วฝาเกลียวแล้วปมตัวอย่าง ที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	25
รูปที่ 9	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A <sub>606</sub> จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 เพื่อเกาะติดบน EFB	32
รูปที่ 10	ลักษณะพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 250x-500x; เส้นใยปาล์มน้ำมัน (a-b) และทะลายปาล์มน้ำมัน (c-d)	34
รูปที่ 11	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A <sub>606</sub> แสดงการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย ระหว่างการตรึงเซลล์บน EFB และ PF เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียง อย่างเดียวไม่มีเซลล์	36
รูปที่ 12	การเกาะติดของเซลล์ในวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 3000x-10000x; เส้นใยปาล์มน้ำมัน (a-b) และทะลายปาล์มน้ำมัน (c-d)	38
รูปที่ 13	ปริมาณฟีนอลที่เหลือหลังจากถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB และ PF เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (วัสดุตรึงที่ไม่มีเซลล์) ใช้ความเข้มข้นฟีนอล เริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	39

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
รูปที่ 14	ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของสัดส่วนเซลล์ตรึงบน EFB ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) โดยมีเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	40
รูปที่ 15	ปริมาณฟีนอลที่เหลือหลังจากถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ (free cells) โดยทดลองที่ความเข้มข้นฟีนอล 10 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นฟีนอล 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นฟีนอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง และความเข้มข้นฟีนอล 500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง	42
รูปที่ 16	ค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB และเซลล์อิสระที่ฟีนอลความเข้มข้นต่าง ๆ	43
รูปที่ 17	ปริมาณฟีนอลที่ถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB หลังจากผ่านการใช้งานแล้ว 10 ครั้ง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติมฟีนอล	45
รูปที่ 18	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิว EFB และเซลล์ที่ถูกตรึง วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM ที่กำลังขยาย 10000x-15000x; ก่อนการย่อยสลายฟีนอล (a) และหลังการนำกลับ มาใช้ย่อยสลายฟีนอลซ้ำจำนวน 5 ครั้ง (b)	46
รูปที่ 19	ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ของเซลล์ตรึงบน EFB โดยการแปรผันปริมาณของเซลล์ตรึงที่สัดส่วนต่าง ๆ	47
รูปที่ 20	ปริมาณฟีนอลที่ถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการใช้ซ้ำจำนวน 10 ครั้ง ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	53
รูปที่ ข.1	ค่าคงที่อัตราการย่อยฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	69

## 1. บทนำ

ฟีนอลเป็นสารเคมีที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ในอุตสาหกรรม การผลิตยารักษาโรค อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันมะกอก อุตสาหกรรมผลิตเรซิน อุตสาหกรรมกระดาษ ฟอกเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Leitao et al., 2007) ฟีนอลเป็น สารที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน์ แม้ในปริมาณความเข้มข้นเพียงเล็กน้อย (Van-Schie and Young, 2000; Ahmaruzzaman, 2008) ฟีนอลเป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่ถูกกำหนดอยู่ใน priority pollutants ของ USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) โดย USEPA ได้กำหนดค่า มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมให้มีปริมาณฟีนอลสูงสุดไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจาก อุตสาหกรรมดังกล่าวข้างต้น ยังพบปัญหาการปนเปื้อนของฟีนอลในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมหลักที่สำคัญในภาคใต้ โดยฟีนอลเป็นสารประกอบอยู่ในผลของปาล์มน้ำมัน เมื่อ ผ่านกระบวนการหนึ่งมาเชื่อในการสกัดน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำหรือแบบมาตรฐานฟีนอลจึงถูกสกัดออกมา ปนเปื้อนในน้ำเสีย นอกจากนี้ฟีนอลยังเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายลิกนินผ่านกระบวนการ wet oxidation (Kongjan et al., 2010) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอล ในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มในระดับความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 5 ถึง 1,200 มิลลิกรัม ต่อลิตร (ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส, 2547; Alam et al., 2009; Cordova-Rosa et al., 2009) ซึ่งความเข้มข้น ของสารประกอบฟีนอลที่พบมีปริมาณสูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งอุตสาหกรรม ตามประกาศ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ.2539) กำหนดไว้ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อ ลิตร อีกทั้งอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มยังมีการปล่อยของเสียปริมาณมากในรูปของวัสดุเศษเหลือที่ เกิดจากกระบวนการสกัดน้ำมัน เช่น ทะลายปาล์มเปล่า (Empty fruit bunches: EFB) เส้นใยปาล์ม น้ำมัน (Pericarp fiber: PF) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาวิธีการบำบัดฟีนอลออกจากน้ำทิ้งพร้อม ทั้งศึกษาทางเลือกในการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

วิธีการบำบัดฟีนอลทางชีวภาพนับเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถย่อยสลายสารมลพิษได้อย่าง สมบูรณ์ ประหยัด และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Banerjee et al., 2001) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ บำบัดทางกายภาพและเคมี อย่างไรก็ตามจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์อิสระ (Suspended cells) สามารถทนต่อความเข้มข้นของฟีนอล หรือสารมลพิษอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียได้ที่มีความเข้มข้นต่ำ (Ruiz-Ordaz et al., 2001) จึงทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารมลพิษลดลง งานวิจัยนี้จึงสนใจนำ เซลล์ตรึงมาใช้ในการบำบัดฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย เนื่องจากเซลล์ตรึงมีความทนทานต่อความเข้มข้น ของสารพิษที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย และมีอัตราการอยู่รอดสูงแม้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Obuekwe et al., 2001) ทั้งนี้เลือกใช้การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ EFB และ PF ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำของเสียมาใช้ประโยชน์และยังเป็นการกำจัดของเสียอีกทางหนึ่ง ด้วย นอกจากนี้การนำวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นวัสดุตรึง ยังเป็นการลด ค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อสารเคมี หรือการสังเคราะห์วัสดุตรึงที่มีราคาแพง และลดความเสี่ยงจากความเป็น พิษของสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์วัสดุตรึง รวมทั้งยังสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ ซึ่งช่วยลด

ระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพ ง่าย ราคาถูก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสารฟีนอลออกจากน้ำเสียและน้ำทิ้งจากภาคอุตสาหกรรมต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการตรึงเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันในการย่อยสลายฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

## 3. ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งใช้แบคทีเรียเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 โดยตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด ได้แก่ ทะลายปาล์ม น้ำมันและเส้นใยปาล์มน้ำมัน ศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุและการเกาะติดของจุลินทรีย์ในวัสดุตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM) รวมทั้งศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุตรึง ด้วยการวิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรียศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่สุด นำเซลล์ตรึงบนวัสดุที่คัดเลือกได้ไปศึกษาผลของความเข้มข้นของฟีนอลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยศึกษาผลของการกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอลและการปรับตัวของเซลล์ตรึงในน้ำทิ้งที่เจือจางก่อนนำไปใช้งาน และการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

## 4. การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 4.1 แหล่งกำเนิดฟีนอล

ฟีนอล และอนุพันธ์ของฟีนอล เป็นสารมลพิษหรือสารเคมีอันตรายที่พบในน้ำเสียของอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น โรงกลั่นปิโตรเลียม โรงงานปิโตรเคมี โรงงานถ่านหิน โรงงานผลิตน้ำมันมะกอก โรงงานผลิตถ่านหิน (Aksu, 2005; Yan et al., 2006; Bai et al., 2007) สารกำจัดศัตรูพืช อุตสาหกรรมผลิตยา เยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสีเคลือบเงา และอื่น ๆ (Rao and Viraraghavan, 2002; Aleksieva et al., 2002; Jung et al., 2001; Diez et al., 1999) ซึ่งมักจะมีฟีนอลปนเปื้อนในความเข้มข้นตั้งแต่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึงหลายร้อยมิลลิกรัมต่อลิตร (Prieto et al., 2002; Shetty et al., 2007; Nair et al., 2007; Pan and Kurumada, 2008) (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของฟีนอลในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น

แตกต่างกันตั้งแต่ 5 ถึงมากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธรรมศักดิ์ศรี สุขใส, 2547; Alam et al., 2009; Cordova-Rosa et al., 2009) เมื่อโรงงานอุตสาหกรรมปล่อยน้ำทิ้งสู่สิ่งแวดล้อม อาจส่งผลกระทบต่อมนุษย์ พืชและสัตว์ เช่นเดียวกันเมื่อมนุษย์กินสัตว์และพืชที่มีฟินอลปนเปื้อน อาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน อัมพาตหรืออาจเสียชีวิตจากการล้มเหลวของระบบทางเดินหายใจ หรือหัวใจหยุดเต้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องกำจัดฟินอลให้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

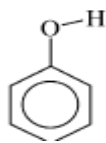
#### ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของฟินอลในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ

อุตสาหกรรม	ความเข้มข้นฟินอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
เยื่อกระดาษและกระดาษ	268	Sharma and Gupta (2012)
สิ่งทอ	12.3	Kunz et al. (2001)
น้ำมันมะกอก	3000-10,000	Knupp et al. (1996); Robards and Ryan (1998)
ถ่านหิน	4-4780	Parkhurst et al. (1979)
ผลิตภัณฑ์พลาสติก	1200->10,000	Patterson (1985); Kavitha and Palanivelu (2004)
กลั่นน้ำมันปิโตรเลียม	33.5	Pfeffer (1979)
สกัดน้ำมันปาล์ม	>1000	Alam et al. (2009)

#### 4.2 คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี และความเป็นพิษของฟีนอล

ฟีนอลเป็นสารกึ่งของแข็งที่ปราศจากสี มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว เมื่อละลายน้ำแล้วมีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน อาจเรียกว่า กรดคาร์บอลิก ฟีนอลละลายได้ดีในเอทานอล ไตเอทิลอีเทอร์และคลอโรฟอร์ม ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของฟีนอล

คุณสมบัติ	ค่า
สูตรโมเลกุล	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH
สูตรโครงสร้าง	
น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)	94.11
จุดเดือด (°C)	40.9
จุดหลอมเหลว (°C)	181.75
ความสามารถในการละลายน้ำ (r.t.)	9.3 g phenol/100 ml H <sub>2</sub> O
ค่าการแตกตัวของกรด (pKa)	9.89
ความสามารถในการติดไฟในอากาศ (vol%)	1.7 (ต่ำสุด) 8.6 (สูงสุด)
จุดวาบไฟ (°C)	79 (closed cup)
อุณหภูมิที่สารลุกติดไฟได้เอง(°C)	715

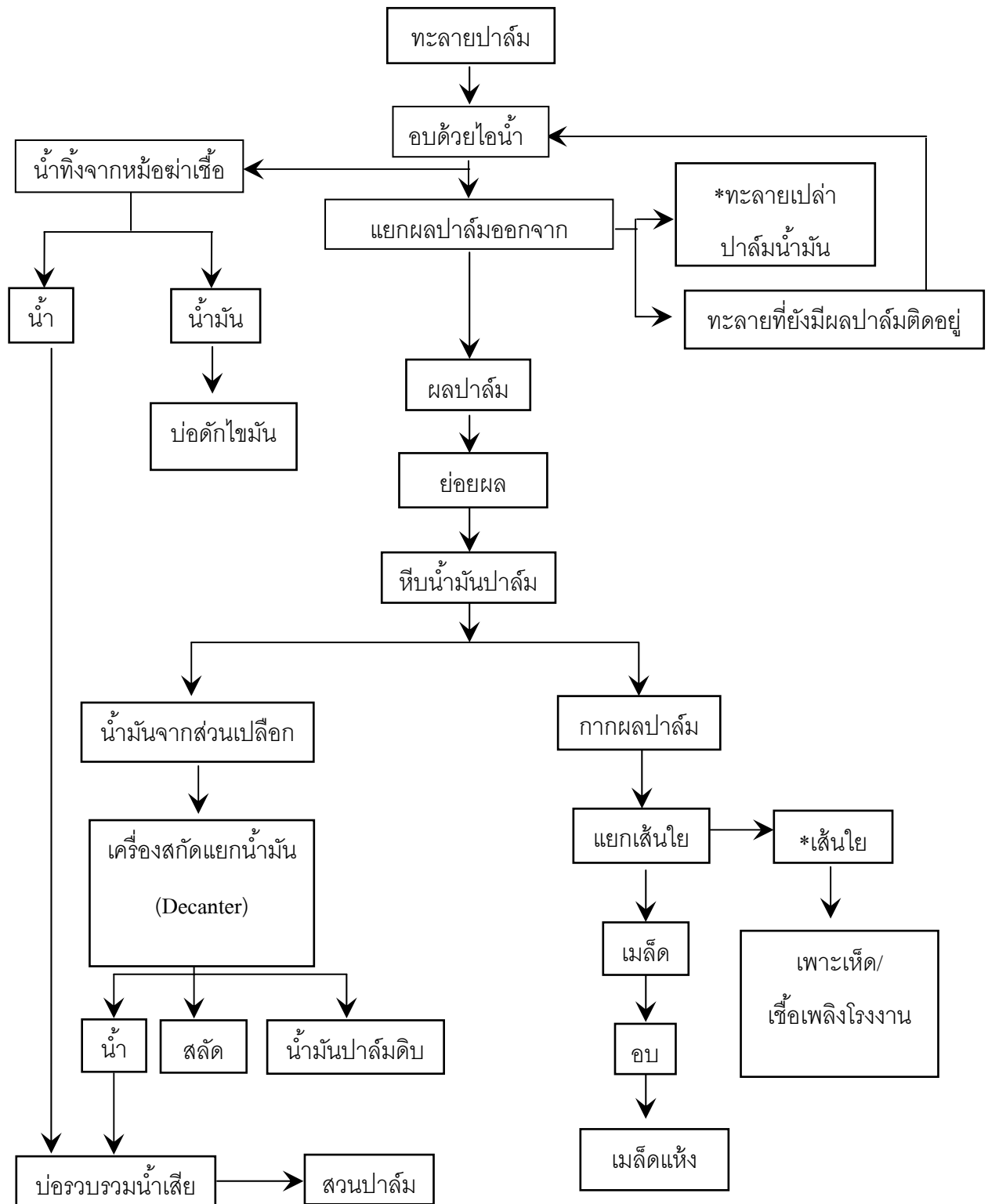
ที่มา: Busca et al. (2008)

ฟีนอลมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและต่อระบบนิเวศน์ ในระดับความเข้มข้นฟีนอลต่ำหรือเจือจางมากๆ จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Shetty et al., 2007) และในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 2-5 จะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในทันที ถ้าความเข้มข้นฟีนอลเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตก โปรตีนในเซลล์ตกตะกอน ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำลายโครงสร้างของเซลล์ ทำให้การผ่านเข้าออกของสารในเซลล์ผิดปกติ เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตาย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและคณะ, 2547; Seymour, 2001) สำหรับมนุษย์เมื่อฟีนอลโดนผิวหนังจะถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว หากสัมผัสร่างกายจะเกิดการกัดกร่อนเนื้อเยื่ออย่างรุนแรง และเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะมีผลต่อตับ ไต ปอด และระบบเลือด อาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ (Busca et al., 2008) ความเข้มข้นของฟีนอลสูงกว่า 50 ppb มีความเป็นพิษต่อสัตว์ พืช และสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำ และหากมนุษย์กิน กินฟีนอล 1 กรัม

ทำให้เสียชีวิตได้ (Seetharam and Saville, 2003) และที่ระดับความเข้มข้นฟีนอลระหว่าง 10 และ 240 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าบริโภคฟีนอลอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน อาจทำให้ท้องเสีย ปัสสาวะมีสีเข้ม (Barker et al., 1978) ทั้งนี้ฟีนอลยังมีผลต่อระบบประสาท และอวัยวะที่สำคัญ เช่น ม้าม ตับอ่อน และไต (Manahan, 1994) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลยังส่งผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน์ (Gonzalez et al., 1990)

#### 4.3 อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม

อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่ก่อให้เกิดรายได้ และการจ้างงานในภาคใต้ของประเทศไทย และมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ ซึ่งมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว และมีการเพาะปลูกเพิ่มมากขึ้น จากข้อมูลการสำรวจในปี พ.ศ.2551 พบว่ามีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันรวมทั้งประเทศประมาณ 2,834,600 ไร่ (ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี, 2551) และมีโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทั้งหมดจำนวน 66 โรงงาน (กรมส่งเสริมสหกรณ์, 2555) กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มสามารถแบ่งตามการผลิตได้ 2 แบบ คือ 1) การผลิตแบบมาตรฐานหรือแบบใช้น้ำ และ 2) การผลิตแบบไม่ใช้น้ำหรือแบบแห้ง ซึ่งกระบวนการทั้ง 2 แบบก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือจำนวนมาก เช่น ทะลายปาล์ม เปล่า (empty fruit bunch) กะลาผลปาล์ม (palm shell) เส้นใยปาล์ม (pericarp fiber) และกากเนื้อปาล์ม (palm kernel cake) (รูปที่ 1) นอกจากนี้การสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานมีการใช้น้ำในการผลิตมาก มีรายงานว่ากระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ 1 ตันต้องการใช้น้ำ 5 – 5.7 ตัน และน้ำที่ใช้ในการผลิตมากกว่าร้อยละ 50 กลายเป็นน้ำทิ้ง (palm oil mill effluent, POME) (Wu et al., 2009) ปริมาณน้ำทิ้งส่วนใหญ่มาจากขั้นตอนการอบทะลายปาล์มในรูปน้ำทิ้งจากหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ (sterilizer condensate) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent) น้ำทิ้งจากหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อมีประมาณ 200 ลิตรต่อ 10 ตันทะลายปาล์ม (พูนสุข ประเสริฐสรรพและคณะ, 2533) โดยในน้ำทิ้งจะประกอบด้วย BOD, COD, ของแข็งแขวนลอย, น้ำมัน และไขมัน (oil and grease) ในปริมาณสูง (ตารางที่ 3) และพบว่าน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูง เช่น รงควัตถุพวกแอนโทไซยานิน แคโรทีน แทนนิน สารประกอบพวกเมลานอยดิน สารประกอบพวกกำมะถัน และโพลีฟีนอล เป็นต้น (พูนสุข ประเสริฐสรรพและคณะ, 2544) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ทำให้น้ำทิ้งมีสีน้ำตาลเข้มถึงน้ำตาลปนดำ ทั้งนี้ฟีนอลและสารที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอลเป็นสารที่พบเป็นองค์ประกอบอยู่ในผลปาล์มปริมาณ 0.006 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อกรัมผลปาล์ม เมื่อผ่านกระบวนการหนึ่งฆ่าเชื้อผลปาล์มที่ใช้ความร้อนและความดันสูง จะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase เป็นผลให้ฟีนอลไม่ถูกย่อยสลายและปนเปื้อนออกมากับน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม (Sundram et al., 2003) นอกจากนี้ฟีนอลยังเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายลิกนินผ่านกระบวนการ wet oxidation อีกด้วย (Kongjan et al., 2010)



หมายเหตุ \* วัสดุที่นำมาใช้ตรึงเซลล์

รูปที่ 1 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

ที่มา: ดัดแปลงจากพูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ (2533)



### ตารางที่ 3 คุณลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	ค่า
Temperature (°C)	80-90
pH	4.7
Biochemical Oxygen Demand BOD <sub>3</sub> ; 3days at 30 °C (mgL <sup>-1</sup> )	25,000
Chemical Oxygen Demand (mgL <sup>-1</sup> )	50,000
Total Solids (T.S) (mgL <sup>-1</sup> )	40,500
Total Suspended Solids (T.S.S) (mgL <sup>-1</sup> )	18,000
Total Volatile Solids (T.V.S ) (mgL <sup>-1</sup> )	34,000
Oil and Grease (O&G) (mgL <sup>-1</sup> )	4,000
Ammonia-Nitrate (NH-N)(mgL <sup>-1</sup> )	35
Total Kjeldahl nitrogen (TKN) (mgL <sup>-1</sup> )	750

ที่มา : Rupani et al. (2010)

สำหรับวัสดุเศษเหลือในรูปของแข็ง เช่น ทะลายเปล่า และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 2) มีการผลิตประมาณ  $40 \times 10^6$  ตันต่อปี โดยมีการนำวัสดุเศษเหลือไปเป็นเชื้อเพลิงในหม้อหนึ่งไอน้ำ (Alam et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นด้วย เช่น การเพาะเห็ด หมักปุ๋ย เป็นต้น ทั้งนี้ในวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันพบปริมาณสารอาหารต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4



(a)



(b)

รูปที่ 2 วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน (a) ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (b) เส้นใยปาล์มน้ำมัน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sridhar et al. (2009)

#### ตารางที่ 4 ปริมาณสารอาหารโดยเฉลี่ยในวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

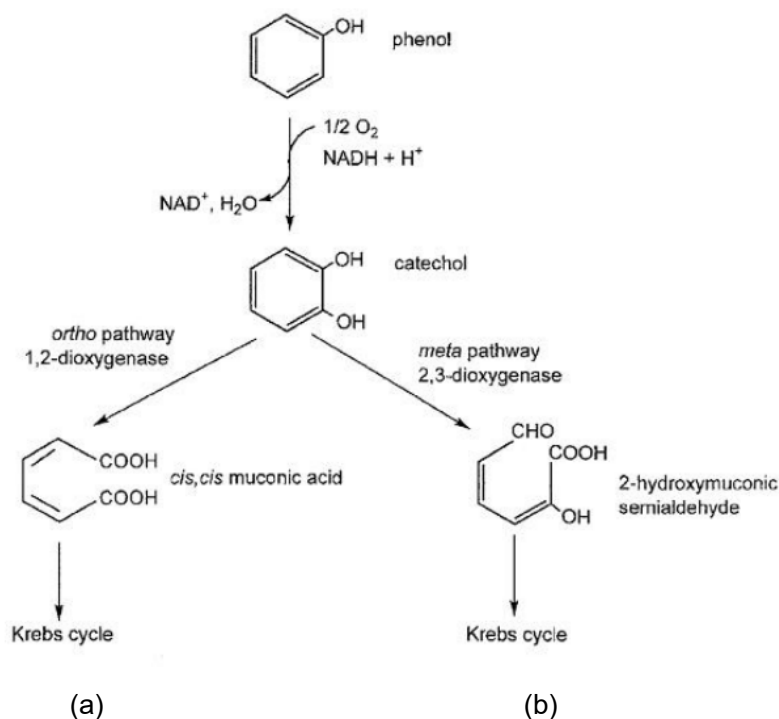
วัสดุเศษ เหลือ	Water content (%)	N	P (kg/tdry residue )	K	Mg
EFB	60	8	0.6	24.1	1.8
PF	20	23	0.1	2	0.4

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

งานวิจัยนี้สนใจนำวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม 2 ชนิด ได้แก่ ทะลายปาล์มน้ำมัน และเส้นใยปาล์มน้ำมัน ใช้เป็นวัสดุตั้งเซลล์แบคทีเรีย โดยเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำของเสียมาใช้ประโยชน์และยังเป็นการกำจัดของเสียอีกทางหนึ่งด้วย นอกจากนี้การนำวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันมาใช้เป็นวัสดุตั้ง ยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อสารเคมีเพื่อการสังเคราะห์วัสดุตั้งที่มีราคาแพง

#### 4.4 กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของฟีนอล

การย่อยสลายทางชีวภาพของฟีนอลโดยจุลินทรีย์สามารถเกิดขึ้นได้ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (aerobic condition) และไม่มีอากาศ (anaerobic condition) แต่โดยทั่วไปพบว่ากระบวนการย่อยสลายฟีนอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศเกิดขึ้นได้อย่างแพร่หลายมากกว่า (Melo et al., 2005) ทั้งนี้เนื่องจากฟีนอลสามารถยับยั้งกระบวนการย่อยสลายสารมลพิษของจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ใช้อากาศได้ง่าย (Grady et al., 1999) ซึ่งกระบวนการย่อยสลายฟีนอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศพบได้ 2 วิธี คือ วิธีเมทา (meta-pathway) และวิธีออร์ทอ (ortho-pathway) โดยเริ่มต้นจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิจีเนชัน (oxygenation) โดยเอนไซม์ฟีนอล ไฮดรอกซิเลส (phenol hydroxylase) เปลี่ยนฟีนอลให้อยู่ในรูปของสารตัวกลาง คือ แคตคอลล (catechol) จากนั้นจะเข้าสู่ปฏิกิริยาการแตกวงของแคตคอลล (ring cleavage) หากย่อยสลายผ่านวิธีเมทาได้สารตัวกลางคือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกแอซิด (2-hydroxymuconic acid) โดยเอนไซม์แคตคอลล 1,2 ไดออกซิจีเนส (1,2-dioxygenase) หรือผ่านวิธีออร์ทอได้สารตัวกลางเป็น ซิส-ซิสมิวโคนิกแอซิด (cis,cis-muconic acid) โดยเอนไซม์แคตคอลล 2,3 ไดออกซิจีเนส (2,3 dioxygenase) ดังแสดงในรูปที่ 3 ก่อนจะเข้าสู่วัฏจักร Krebs และเมทาบอลิซึมทั่วไปของสิ่งมีชีวิต (Van-Schie และ Yung, 2000) ในการย่อยสลายทางชีวภาพที่สมบูรณ์ได้สารประกอบอย่างง่าย เช่น CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O และสารอนินทรีย์อื่นๆ (Nair et al., 2008)



รูปที่ 3 วิธีที่ย่อยสลายฟีนอล (a) วิธีออร์ทอ (Ortho-Pathway) (b) วิธีเมทา (Meta-Pathway)

ที่มา : Van-Schie และ Yung (2000)

#### 4.5 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล

ฟีนอลเป็นสารพิษที่ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในระดับความเข้มข้นฟีนอลสูง ๆ ซึ่งมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ไวต่อสารนี้ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการย่อยสลายและมีความทนทานต่อฟีนอล จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรีย รา และยีสต์ สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ใช้ฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ ตารางที่ 5 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ซึ่งคัดแยกจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ จีโนส *Acinetobacter*, *Candida* และ *Pseudomonas* เป็นต้น

ตารางที่ 5 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายพีนอล

จุลินทรีย์	แหล่งที่มาของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Pseudomonas Putida</i>	Wastewater treatment plant	Movahedyan et al. (2009)
<i>Candida parapsilopsis</i>	Industrial chemistry effluent	Rigo and Alegre (2004)
ESDSPB1, ESDSPB2 and ESDSPB3	Coke processing wastewater	Chakraborty et al. (2010)
<i>Acinetobacter</i> , <i>Kelibsiella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> and <i>Shigella</i>	Lake Parishan	Kafilzadeh et al. (2010)
<i>Streptococcus epidermis</i>	Oil contaminated soil	Mohite et al. (2010)
<i>Proteobac teria</i> PH002	East River, New York, N.Y.	Van-Schie et al. (1998)
<i>Azoarcus</i> CR23	Rain forest, Costa Rica	
<i>Thauera</i> FL05	Orange grove, Florida	
RWC-Cr1 and ISC-Tra	Wastewater treatment plant and industrial oil- contaminated soil.	Mailin and Firdausi (2006)
<i>Candida tropicalis</i> and <i>Alcaligenes faecalis</i>	Amazonian rain forest soil	Bastos et al. (2000)
<i>Acinetobacter</i>	Activated sludge	Hao et al. (2002)
	Rhizosphere of duckweed	Yamaga et al. (2010)
	Wastewater treatment plant at Alexandria, Egypt	Abd-El-Haleem et al. (2002)

#### 4.6 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* และ *Acinetobacter*

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มีลักษณะโคโลนีเป็นสีชมพูเข้ม จัดเป็นแบคทีเรียประเภท facultative methylotrophs ที่สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายและพบในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไป เช่น ในดินและเนื้อเยื่อพืช (Aken et al., 2004; Lidstrom and Chistoserdova, 2002) ทั้งนี้พบได้ง่ายบริเวณราก (rhizosphere) และในต้นพืช (endosphere) ที่มีความสามารถในการดูดซับหรือบำบัดสารมลพิษ (Dourado et al., 2011) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้หลายชนิด เช่น เมทานอล (methanol) และเมทิลเอมีน (methylamine) รวมทั้ง C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> และ C<sub>4</sub> (Lidstrom and Chistoserdova, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้ในการบำบัดสารมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม เช่น Cyanide, formamide, formaldehyde และ phenol เป็นต้น ดังตัวอย่างแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*

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

แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* พบได้แพร่หลายในธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน สิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ และจากผิวหนังมนุษย์ แบคทีเรียสกุลนี้มีความน่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและในด้านในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นที่รู้จักในการย่อยสลายสารมลพิษได้หลากหลายชนิด เช่น biphenyl, chlorinated biphenyl, amino acids (aniline), phenol, benzoate, crude oil, acetonitrile, phosphate และ heavy metals (Abdel-El-Haleem, 2003) (ตารางที่ 7) เนื่องจากมีความสามารถในการใช้สารประกอบหลากหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เช่น ฟีนอล (phenol) และเบนโซเอท (benzoate) เป็นต้น ทำให้เพาะเลี้ยงได้ง่ายในอาหารเหลว (Caposio et al.,

2002; Cui et al., 2008) รวมทั้งมีความสามารถในการผลิต emulsifying agents ทำให้สารมลพิษที่ละลายน้ำได้น้อย (low solubility) ถูกย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Marin et al., 1995)

#### ตารางที่ 7 การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter*

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

จากการศึกษาของ Khongkhaem et al.(2011) การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 โดยวิธีตรึงเซลล์แบบกักขัง (entrapment) ในซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ถึง 80-85 % ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยกว่า 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 10 วันนอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลได้เป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์เดี่ยวแต่ละชนิด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงสนใจใช้แบคทีเรียเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ในการย่อยสลายฟีนอล

#### 4.7 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)

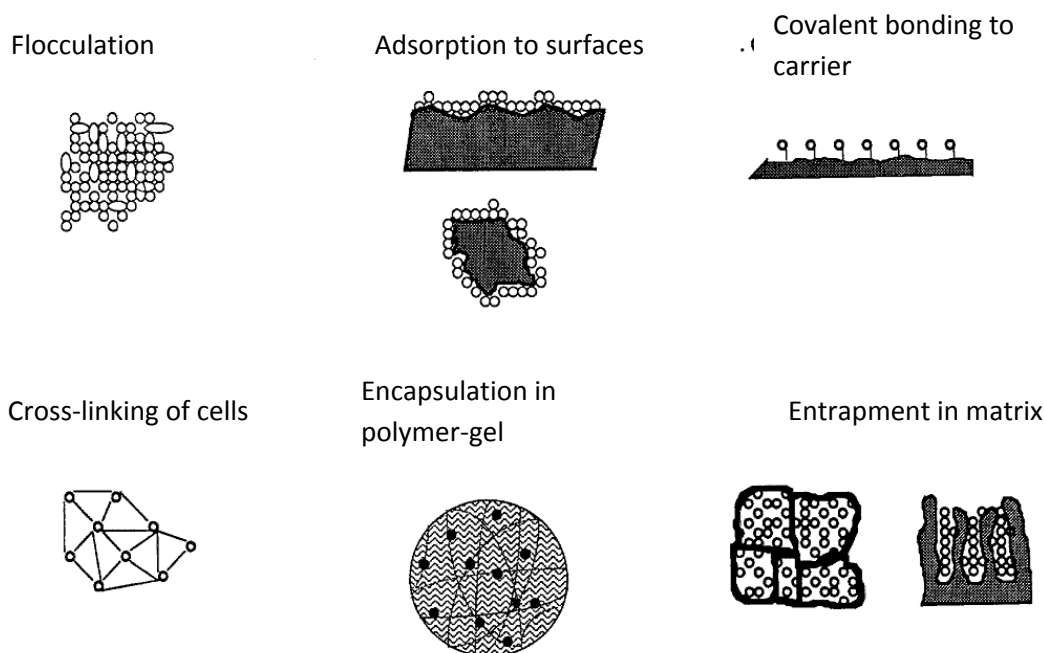
การบำบัดสารมลพิษด้วยวิธีการเติมจุลินทรีย์ลงไปในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน (bioaugmentation) ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน โดยจุลินทรีย์ที่เติมลงไปอาจเป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีในพื้นที่นั้น (indigenous microorganisms) หรือเรียกอีกอย่างว่าเทคนิค autochthonous bioaugmentation หรืออาจเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างถิ่น (exogenous microorganisms) เพื่อเร่งกระบวนการย่อยสลายสารมลพิษ วิธีการนี้มีข้อดี คือ สามารถควบคุมกระบวนการบำบัดสารมลพิษ โดยการกำหนดชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายสารมลพิษแต่ละชนิด และมีความทนทานต่อสารมลพิษนั้นๆ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารมลพิษส่วนใหญ่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อม และมี

การศึกษากิจกรรมการย่อยสลายสารมลพิษในห้องปฏิบัติการแล้ว (Obuekwe and Al-Muttawa, 2001; Cunningham et al., 2000) ที่ผ่านมามีรายงานการใช้ทั้งเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในการบำบัดสารมลพิษ อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์ตรึงสามารถทนทานต่อความเข้มข้นของสารมลพิษที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ และสามารถป้องกันเซลล์จากผลการเปลี่ยนแปลงของ pH และอุณหภูมิ ทั้งนี้ยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้และเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน ซึ่งช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ (Aksu and Bulbul, 1999; Kourkoutas et al., 2004)

กระบวนการตรึงเซลล์จุลินทรีย์สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ (1) การเกาะติด/ดูดซับของเซลล์บนวัสดุด้วยวิธีธรรมชาติ (self-attachment/adsorption immobilization) และ (2) การตรึงแบบสังเคราะห์ (artificial immobilization) เช่น การกักขังเซลล์ในพอลิเมอร์ (entrapment within polymers) การสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์กับวัสดุตรึง (covalent bonding) เป็นต้น (Cohen et al., 2001) (รูปที่ 4) การเกาะติด/ดูดซับเป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่าย โดยให้เซลล์ดูดซับกับวัสดุที่เป็นตัวตรึงด้วยแรง Electrostatic interactions, Covalent bond formation หรือ Hydrophobic interactions ซึ่งมีแรงดูดซับค่อนข้างอ่อน อาจมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายในระหว่างการใช้งาน และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ เป็นต้น (Cheetham et al., 1979) การตรึงเซลล์โดยให้จุลินทรีย์ดูดซับหรือยึดเกาะกับวัสดุนั้น เซลล์จะมีการสร้าง biofilm ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกันอยู่บนผิวหน้าของวัสดุ เป็นสารพอลิเมอร์ที่เซลล์สร้างขึ้นแล้วขับออกมาภายนอกเซลล์โดยส่วนใหญ่จะเป็นสารพวก extracellular polymeric substance หรือ exopolysaccharide (EPS) ซึ่งมีองค์ประกอบ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ดีเอ็นเอ และไขมันซึ่งสัดส่วนจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะแวดล้อม (Rosche et al., 2009) โดย biofilm ดังกล่าวนั้นมีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์สามารถยึดเกาะกับผิวหน้าของวัสดุได้ดียิ่งขึ้น สำหรับจุลินทรีย์ที่มีการสร้าง biofilm มีหลายชนิด ส่วนใหญ่ biofilm จะมีลักษณะเป็นเส้นสาย (filament) มีส่วนช่วยสำคัญที่ทำให้เซลล์ยึดเกาะกับวัสดุได้ดียิ่งขึ้น (Davey et al., 1991) อย่างไรก็ตามเทคนิคการเกาะติดของเซลล์ด้วยวิธีธรรมชาติเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และสามารถขยายขนาดเพิ่มจำนวนเซลล์ตรึงได้ง่ายกว่าการตรึงแบบสังเคราะห์ นอกจากนี้การตรึงเซลล์แบบกักขังยังมีข้อจำกัดเรื่องการแพร่ผ่านของสารได้น้อยกว่าอีกด้วย (Lee and Palsson, 1994)

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ คือ การคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ ซึ่งต้องเป็นวัสดุที่มีความเป็นรูพรุนสูง มีพื้นที่ผิวมากเพื่อใช้ในการเกาะติด ไม่ละลายน้ำ มีความแข็งแรง ทนต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ-เคมี การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ และแรงกระแทกกระเทือน เนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องทำในภาวะปลอดเชื้อ จึงต้องทนต่อความร้อน ความดันได้สูง นอกจากนี้วัสดุที่ใช้ไม่ควรเป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม ไม่ดูดซับสารพิษที่ปนเปื้อน และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ วัสดุที่นำมาใช้สามารถเตรียมได้ง่ายและมีเทคนิคการตรึงที่ไม่ยุ่งยาก ประหยัดค่าใช้จ่าย มีความคงทนในการนำไปใช้งาน และเก็บรักษาไว้ได้นาน (Kourkoutas et al., 2004) ที่ผ่านมามีการนำวัสดุจากธรรมชาติและวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ได้แก่ natural zeolite, rice chaff, rubber

wood meal, coconut husk meal, ฟางข้าว, ไยบวบ หรือวัสดุที่เป็นโพลิเมอร์ เช่น calcium alginate, polyvinyl alcohol (PVA) หรือวัสดุสังเคราะห์ เช่น ซิลิกา เป็นต้น ซึ่งวัสดุแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน มีรายงานว่า การใช้วัสดุจากธรรมชาติจำพวก organic material มีข้อดี คือ ปริมาณสารอาหารในวัสดุอาจช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ตรึง (Santos et al., 2005) วัสดุที่ใช้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ วัสดุสามารถย่อยสลายได้ตามกลไกทางกายภาพ-เคมี ซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดวัสดุที่มีการดูดซับสารมลพิษอีกทางหนึ่ง และมีราคาไม่แพง



รูปที่ 4 วิธีการตรึงเซลล์

ที่มา: Cassidy et al. (1996)

#### 4.8 การใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลายสารมลพิษ

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิค self-attachment immobilization และวัสดุจากธรรมชาติมาใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย เช่น Obuekwe and Al-Muttawa (2001) พบว่าเซลล์แบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. และแบคทีเรียแกรมลบ (ยังไม่ได้จำแนกชนิด) ซึ่งคัดแยกจากบ่อน้ำมันในประเทศคูเวต ถูกตรึงบนขี้เลื่อย (sawdust), styroform และรำข้าวสาลี (wheat bran) สามารถรักษาประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน หลังจากเก็บเซลล์ตรึงไว้นาน 6 สัปดาห์ที่ 45 องศาเซลเซียส และพบว่าเซลล์มีการสร้าง extracellular structure เรียกว่า เส้นใย exopolysaccharide เพื่อให้เซลล์เกาะติดบนวัสดุได้ดีขึ้น และช่วยป้องกันเซลล์จากสารมลพิษ โดยเส้นใยดังกล่าวสามารถมองเห็นภายใต้กล้อง SEM นอกจากนี้จากรายงานของ Pattanasupong et al. (2004) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่ตรึงบนไยบวบ (Loofa sponge) มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายและขจัดความเป็นพิษของยากำจัดศัตรูพืช คือ Carbendazim (MBC) และ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) โดยสารทั้ง



สองชนิดสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 5.5 และ 1.5 วันตามลำดับ พบว่าที่พีเอชอยู่ในช่วง 6-9 และอุณหภูมิ 15-37 องศาเซลเซียสเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารชนิดนี้ไม่แตกต่างกัน อีกทั้ง Suttinun et al. (2010) ศึกษาวิธีการย่อยสลายสารไตรคลอโรเอทิลีน (trichloroethylene: TCE) แบบโคเมแทบอลิซึม (co-metabolism) โดย *Rhodococcus* sp. L4 ตรึงบนวัสดุจากพืชที่มีน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ เมล็ดยี่ห่วย เปลือกส้ม และใบตะไคร้ พบว่าเซลล์ที่ตรึงในเมล็ดยี่ห่วยมีประสิทธิภาพในการยึดเกาะการย่อยสลาย TCE ได้ดีกว่าวัสดุชนิดอื่น และสามารถทนต่อ TCE ที่ความเข้มข้นสูง นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ในการย่อยสลาย TCE ได้ใหม่ หลังนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salts นาน 12 ชั่วโมง และจากรายงานของ Kasamsuk and Khanongnuch (2007) ใช้เซลล์แบคทีเรีย *Coriolus versicolor* RC3 ตรึงบนแกลบ (rice chaff) ไม้ยางพารา (rubber wood meal) กาบมะพร้าว (coconut husk meal) และฟางข้าวสับ (chopped rice straw) ย่อยสลายสีในน้ำเสียอุตสาหกรรมสิ่งทอ พบว่าเซลล์ตรึงบนแกลบมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีได้ดีที่สุด ซึ่งย่อยสลายสีได้ 80% ในเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ 2 ครั้ง นอกจากนี้มีการใช้ zeolite ตรึง *Pseudomonas* sp. ADP เพื่อใช้ย่อยสลาย atrazine โดยสามารถย่อยสลายสารดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 10 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Stelting et al., 2010)

#### 4.9 การย่อยสลายฟีนอลโดยใช้เซลล์ตรึง

จากการศึกษาที่ผ่านมามีการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนฟีนอลโดยใช้เซลล์ตรึงบนวัสดุต่าง ๆ เช่น การใช้โพลียูรีเทนโฟม (polyurethane foam) ตรึง *Acinetobacter* sp. พบว่าเซลล์ที่มีการตรึงจะสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของฟีนอล 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 19.7 มิลลิกรัม/ลิตร/ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม (เซลล์อิสระ) ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นของฟีนอล 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร (Adav et al., 2007)

Ying et al. (2007) ใช้ polyvinyl alcohol (PVA) ตรึงเซลล์ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ PD 12 ซึ่งคัดแยกเชื้อจากกากตะกอนเร่ง (Activated sludge) ของระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตสารเคมี โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายฟีนอล ได้แก่ ความเข้มข้นของฟีนอล พีเอช และอุณหภูมิ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายฟีนอลคือ 7.2 และเซลล์ทนต่อความเข้มข้นฟีนอลได้สูงถึง 500 มิลลิกรัม/ลิตร การตรึงเซลล์ช่วยป้องกันแบคทีเรียเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พีเอช และสามารถเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 50 วัน

Liu et al. (2009) ทำการตรึงเซลล์ *Acinetobacter* sp. XA05 และ *Sphingomonas* sp. FG03 บน polyvinyl alcohol (PVA) โดยใช้เชื้อที่แยกจากกากตะกอนเร่ง (Activated sludge) พบว่าเซลล์ที่ไม่ตรึงบน PVA มีอัตราการย่อยสลายฟีนอล (phenol degradation rate) 0.95 มิลลิกรัมฟีนอล/ชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่ตรึงบน PVA มีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 1.20 มิลลิกรัมฟีนอล/ชั่วโมง และเซลล์ตรึงสามารถทนอุณหภูมิและพีเอชได้ในช่วงกว้างที่มากกว่าเซลล์อิสระ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองอยู่ในช่วง 20-40

องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟีนอล 800 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเซลล์ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งยังสามารถลดปริมาณฟีนอลได้ 93% หลังจากเก็บไว้ 50 วัน แต่เซลล์อิสระจะมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลลดลง หลังจากเก็บไว้ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการตรึงเซลล์สายพันธุ์ XA05 และ FG03 สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างน้อย 20 ครั้ง

Santos et al. (2009) ศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง *Aureobasidium pullulans* FE13 (คัดแยกเชื้อได้จากน้ำเสียของโรงงานเหล็กกล้า) ในอัลจินตพบว่าเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้ 20.45 มิลลิกรัม/ลิตร/ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์อิสระมีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 18.35 มิลลิกรัม/ลิตร/ชั่วโมง โดยเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้มากกว่าเซลล์อิสระ

Lee et al. (2009) ใช้เม็ดบีดตรึงกากตะกอนเร่ง (Activated sludge) ซึ่งได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเหล็ก พบว่าเซลล์ตรึงมีการย่อยสลายฟีนอลได้ที่ช่วงพีเอชที่กว้างและที่ความเข้มข้นของฟีนอลสูง โดยมีอัตราการย่อยสลายมากกว่า 95% ภายในเวลา 28 ชั่วโมง โดยเซลล์อิสระถูกยับยั้งการย่อยสลายที่ความเข้มข้นของฟีนอล 3,000 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ในขณะที่เซลล์ตรึงไม่ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นดังกล่าว

EI-Naas et al. (2009) ทำการตรึง *Pseudomonas putida* บน polyvinyl alcohol (PVA) พบว่าเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7 ซึ่งลดปริมาณฟีนอลได้ 95% โดยเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลได้จนถึงความเข้มข้นของฟีนอล 75 มิลลิกรัม/ลิตร

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

Yordanova et al. (2009) ศึกษาการตรึง *Aspergillus awamori* สายพันธุ์ NRRL3112 บน polyacrylonitrile membrane พบว่าเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 1.16 และ 6.25 มิลลิกรัม/ชั่วโมง ตามลำดับ

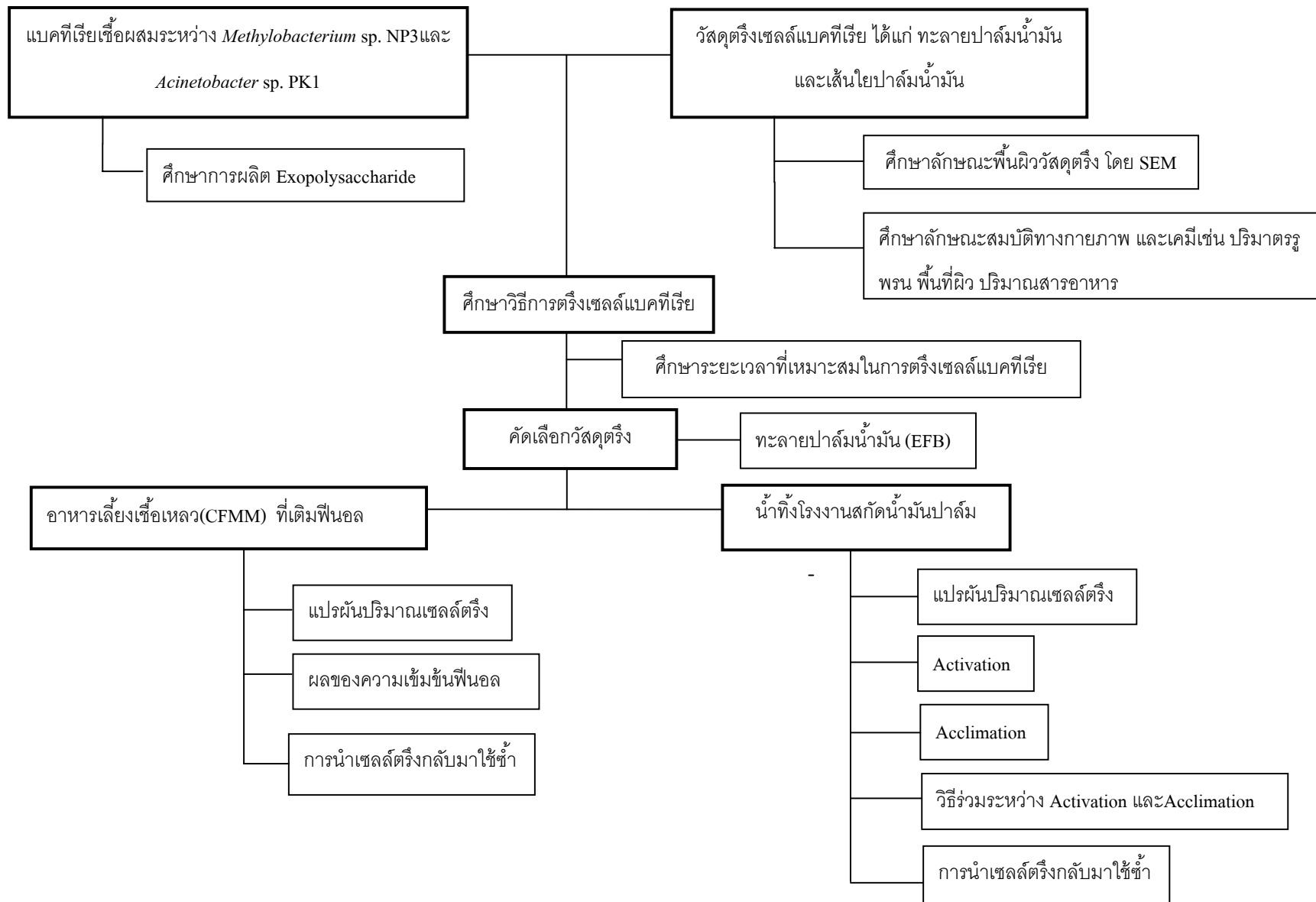
Khongkhaem et al. (2011) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 โดยวิธีตรึงเซลล์แบบกักขัง (entrapment) ในซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ถึง 80-85 % ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยกว่า 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 10 วัน อย่างไรก็ตามเนื่องจากการสังเคราะห์ซิลิ

ภาคต้องมีการใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีเป็นสารตั้งต้น และมีขั้นตอนเฉพาะในการผลิต ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่าย มีประสิทธิภาพ ราคาถูก และสามารถขยายขนาดเพิ่มจำนวนได้ง่าย เพื่อความสะดวกในการนำไปประยุกต์ใช้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจใช้เทคนิคการตรึงเซลล์แบบที่เรียกวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน เพื่อให้เซลล์ตรึงมีความทนทานต่อสารฟีนอลและอนุพันธ์ของฟีนอลที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้ง การใช้วัสดุพิเศษเหล็สดังกล่าว เป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้ประโยชน์ของเสีย และการกำจัดของเสีย อีกทั้งขั้นตอนการตรึงเซลล์ไม่ยุ่งยาก และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตวัสดุสังเคราะห์ได้

## 5. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

### 5.1 ภาพรวมของงานวิจัย

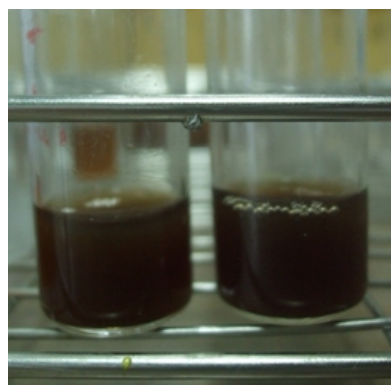


## 5.2 น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำเสียบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแห่งหนึ่งในจังหวัดสตูล (รูปที่ 5) โดยระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเป็นแบบบ่อปรับเสถียร (บ่อดิน) ซึ่งมีจำนวน 4 บ่อ นำตัวอย่างน้ำทิ้งกรองด้วยผ้าขาวบาง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดลอง



(a)

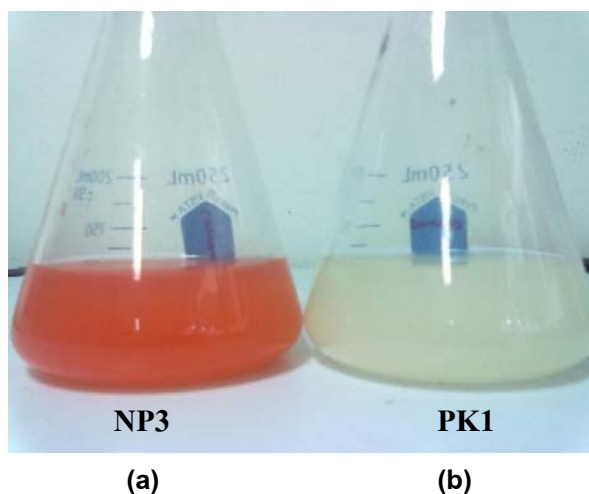


(b)

รูปที่ 5 ลักษณะบ่อบำบัดน้ำเสีย (a) และลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (b)

## 5.3 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

งานวิจัยนี้ใช้จุลินทรีย์เชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 (รูปที่ 6a) ซึ่งคัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน (นันท์ธรร เกษราช, 2550) และ *Acinetobacter* sp. PK1 (รูปที่ 6b) คัดแยกจากอาหารที่มีการเจริญเติบโตของ *Methylobacterium* sp. NP3 (ปิยะมาศ คงแฉม, 2552) เลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด แยกกันในอาหารเหลว carbon free mineral medium (CFMM) ที่มีการเติมฟีนอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วง late-log phase เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่ยัง active มากที่สุด โดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีการเจริญเท่ากัน หลังจากนั้นนำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร CFMM นำเซลล์ที่ได้ไปวัดค่า OD<sub>578</sub> ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 1.0 (Khongkham et al., 2011) โดยมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10<sup>8</sup> CFU/มิลลิลิตร ซึ่งค่า OD<sub>578</sub> กับการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียไม่สัมพันธ์กับการผสมสัดส่วนเซลล์ 1:1 ไม่ได้แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้เซลล์จุลินทรีย์ที่ได้จะนำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไปโดย 1) นำเซลล์ทั้งสองชนิดมาผสมกันในสัดส่วน 1:1 เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์



รูปที่ 6 แบคทีเรีย (a) *Methylobacterium* sp. NP3 และ (b) *Acinetobacter* sp. PK1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

#### 5.4 ศึกษาการผลิต extracellular polymeric substance (EPS) ของแบคทีเรีย

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการผลิต extracellular polymeric substance หรือ exopolysaccharide (EPS) ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่งทำหน้าที่เสมือนกาวช่วยให้แบคทีเรียยึดติดกับวัสดุตั้งได้ดี วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นวัสดุตั้งเซลล์คือ ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (empty fruit bunch: EFB) ทดลองโดยการนำหัวเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (ตั้งแยกแบคทีเรียแต่ละชนิด) ที่เตรียมได้จากข้อ 5.3 มาบ่มร่วมกับชิ้นส่วน EFB ที่เตรียมตามข้อ 5.5.1 ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) โดยไม่มีการให้แหล่งคาร์บอนใดๆ เพิ่ม เพื่อให้เซลล์อยู่ในภาวะอดอาหาร (carbon starvation) ซึ่งช่วยกระตุ้นการสร้าง EPS ของเซลล์ (Sanin et al., 2003) ทั้งนี้ใช้หัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ( $OD_{578}=1.0$ ) มาบ่มร่วมกับวัสดุปริมาณ 0.5 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 22 มิลลิลิตร สัดส่วนปริมาณหัวเชื้อ และวัสดุตั้งดังกล่าว ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของวัสดุตั้งได้อย่างอิสระ และช่วยให้วัสดุตั้งสัมผัสกับเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวได้ดี เตรียมชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (triplicate) จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นแยกเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแล้วออกจากเซลล์อิสระที่เหลืออยู่ในอาหารเหลว โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง GF/C ขนาด 45 มิลลิเมตร ล้างเซลล์ตั้งด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาทดสอบการสร้าง EPS ด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay ตามวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman (1993) ในหัวข้อ 5.8.3

เตรียมชุดควบคุมประกอบด้วยวัสดุเศษเหลือ EFB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave และไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย

## 5.5 การตรึงเซลล์แบคทีเรีย

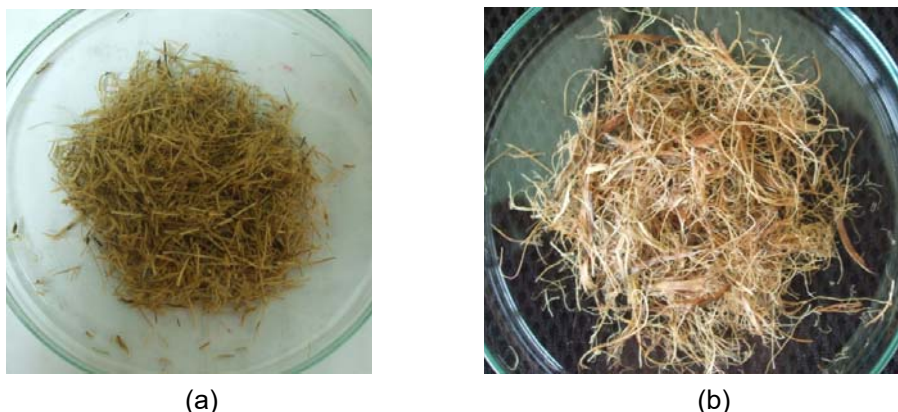
### 5.5.1 การเตรียมวัสดุตรึงเซลล์

เตรียมวัสดุตรึงเซลล์จากวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด ที่ได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดสตูล ได้แก่ เส้นใยปาล์มน้ำมัน (pericarp fiber: PF) และทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (empty fruit bunch: EFB) (รูปที่ 7) โดยนำวัสดุมาตากให้แห้ง แล้วเตรียมขนาดของวัสดุที่ต้องการโดย 1) นำวัสดุมาตัดหรือบด แล้วร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 500 ไมโครเมตรถึง 1 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้ขนาดของวัสดุทั้ง 2 ชนิดที่มีความใกล้เคียงกัน 2) การทดลองย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เลือกใช้วัสดุทะลายปาล์มน้ำมัน โดยการตัดวัสดุให้มีขนาด 1×1×1 เซนติเมตร เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้งาน

นำวัสดุไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำมาล้างฆ่าเชื้อซ้ำอีก เพื่อต้องการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความคงทนในวัสดุก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์ นอกจากนี้ยังศึกษาคุณลักษณะอื่นๆ ของวัสดุดังตารางที่ 8

#### ตารางที่ 8 วิธีวิเคราะห์คุณลักษณะของวัสดุ

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



รูปที่ 7 วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน (a) ทะลายปาล์มน้ำมัน (EFB) (b) เส้นใยปาล์มน้ำมัน (PF)

### 5.5.2 การตรึงเซลล์บนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

การตรึงแบคทีเรียบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน อาศัยเทคนิคการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุด้วยวิธีธรรมชาติ (self-attachment immobilization) โดยศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์บน PF และ EFB ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณการสร้าง extracellular polymeric substance หรือ exopolysaccharide (EPS) ของแบคทีเรียบนวัสดุตรึงแต่ละชนิด ทั้งนี้เพื่อให้เกิดการเกาะติดของแบคทีเรียบนวัสดุอย่างดีเพียงพอ และเซลล์ไม่หลุดออกจากวัสดุ เมื่อมีการนำมาใช้หรือใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่อง ขั้นตอนการตรึงเซลล์อ้างอิงจาก Suttinun et al. (2010) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่เตรียมได้จากข้อ 5.3 บ่มร่วมกับวัสดุแต่ละชนิดแยกกันในอัตราส่วน 1:10 (w/v) โดยไม่มีการให้แหล่งคาร์บอนใดๆ เพิ่ม เพื่อให้เซลล์อยู่ในภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอน (carbon starvation) ซึ่งช่วยกระตุ้นการสร้าง EPS ของเซลล์ (Sanin et al., 2003) ทั้งนี้ใช้หัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ( $OD_{578}=1.0$ ) มาบ่มร่วมกับวัสดุปริมาณ 0.5 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 22 มิลลิลิตร สัดส่วนปริมาณหัวเชื้อและวัสดุตรึงดังกล่าว ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของวัสดุตรึงได้อย่างอิสระ และช่วยให้วัสดุตรึงสัมผัสกับเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวได้ดี เตรียมชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (triplicate) จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแล้วออกจากเซลล์อิสระที่เหลืออยู่ในอาหารเหลว โดยการกรองด้วย GF/C ขนาด 45 มิลลิเมตร ล้างเซลล์ตรึงด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาทดสอบการสร้าง EPS ด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay ตามวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman (1993) ในหัวข้อ 5.8.3 เก็บตัวอย่างจนกว่าการสร้าง EPS จะคงที่ ซึ่งถือเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุแต่ละชนิด จากผลการทดลอง พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์บนวัสดุเศษเหลือ EFB คือ 6 วันและบน PF คือเวลา 8 วัน ก่อนนำเซลล์ตรึงไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพินอลในขั้นตอนต่อไป เตรียมชุดควบคุมประกอบด้วยวัสดุเศษเหลือ EFB และ PF ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave และไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย



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

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

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

### 5.5.3 คัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์

คัดเลือกวัสดุตรึงระหว่างเซลล์ตรึงบน EFB และเซลล์ตรึงบน PF โดยนำเซลล์ตรึงแต่ละชนิดที่เตรียมจากข้อ 5.5.2 มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพีนอลตามวิธีการข้อ 5.6 โดยใช้ความเข้มข้นของพีนอลเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณพีนอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 5.8.2 ซึ่งคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีนอลได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากข้อมูลการลดลงของพีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบกับผลการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ (%) และการวิเคราะห์ลักษณะเซลล์ตรึงบนวัสดุด้วยกล้อง SEM จากผลการทดลองพบว่าชิ้นส่วน EFB เป็นวัสดุที่เหมาะสมมากกว่า PF ในการตรึงเซลล์ จึงคัดเลือกเซลล์ตรึงบน EFB ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

เตรียมชุดควบคุม เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพและเคมีต่อการลดลงของพีนอล (abiotic controls) เช่น การดูดซับของพีนอลบนวัสดุตรึง โดยชุดควบคุมประกอบด้วยชิ้นส่วนของ

EFB และ PF ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธี Autoclave ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีฟีนอลความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

## 5.6 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

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

### 5.6.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล

ศึกษาผลของปริมาณเซลล์ตรึงบน EFB ต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล โดยแปรผัน ปริมาณเซลล์ตรึง ดังนี้ 0.5, 1.5 และ 3.0 กรัม ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลวเท่ากับ 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) เริ่มต้นเติมเซลล์ตรึงตามปริมาณข้างต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีฟีนอลความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 22 มิลลิลิตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อตาม วิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 5.8.2 จำนวนเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง จากผลการทดลองพบว่า การเติมเซลล์ตรึงในปริมาณดังกล่าวข้างต้นให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลใกล้เคียงกัน จึงเลือกเติม ปริมาณเซลล์ตรึง 1 กรัม (1:10 w/v) ไปใช้ศึกษาขั้นต่อไป

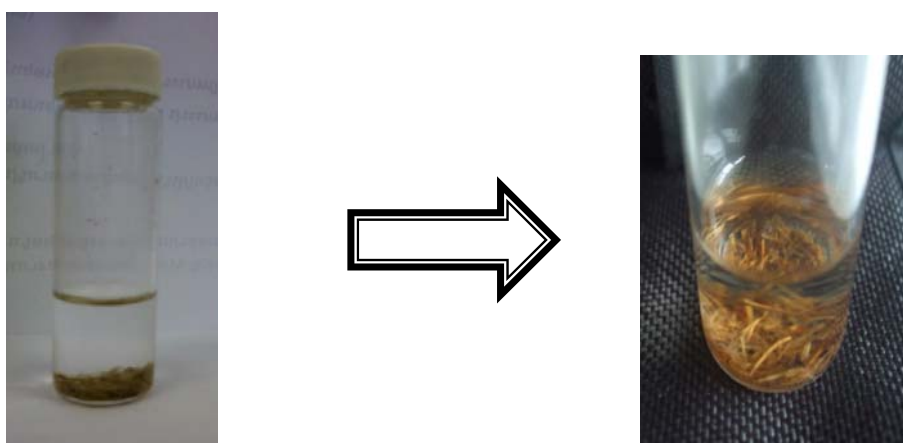
เตรียมชุดควบคุม เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพ และเคมีต่อการลดลงของฟีนอล (abiotic controls) เช่น การดูดซับของฟีนอลบนวัสดุตรึง โดยชุดควบคุมประกอบด้วย ชิ้นส่วนปาล์ม น้ำมันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีฟีนอลความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

### 5.6.2 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

นำเซลล์ตรึงบน EFB มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในระบบกะ (batch) ซึ่ง ใช้ สัดส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว CFMM เท่ากับ 1:10 (w/v) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อเซลล์ตรึงบน EFB ปริมาณ 0.5 กรัม ทดสอบในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 22 มิลลิลิตร (รูปที่ 8) แปรผันความเข้มข้นของฟีนอลตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำไปจนถึงความเข้มข้นสูง ได้แก่ 10, 30, 50, 100, 500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 8) เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 5.8.2 จำนวนเปอร์เซ็นต์ และอัตราการย่อยสลายฟีนอลของ

เซลล์ตรึง ซึ่งผลที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์อิสระ ( $10^8$  CFU/ มิลลิลิตร) (แบบที่เรียกชื่อผสมจากข้อ 5.3)

เตรียมชุดควบคุม เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพ และเคมีต่อการลดลงของฟีนอล (abiotic controls) เช่น การดูดซับของฟีนอลบนวัสดุตรึง โดยชุดควบคุมประกอบด้วย ชิ้นส่วนพอลิเมอร์ น้ำมันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีการแปรผันปริมาณฟีนอลตามที่ต้องการศึกษา



**รูปที่ 8** ทดสอบการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงในขวดแก้วฝาเกลียวแล้วบ่มตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

### 5.6.3 ศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

นำเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอล ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจากข้อ 5.6.1 มากรองด้วย GF/C ขนาด 45 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานแล้วไปทดสอบการย่อยสลายฟีนอลซ้ำ ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลือ จากนั้นทำการทดลองซ้ำขั้นตอนเดิม โดยนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ 10 ครั้ง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง ว่าสามารถนำกลับมาใช้งานซ้ำอย่างต่อเนื่องได้หรือไม่ และประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลหลังการใช้งานแล้วลดลงหรือไม่

## 5.7 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

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

### 5.7.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล

ศึกษาผลของปริมาณเซลล์ตรึงบน EFB ต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล โดยการแปรผันปริมาณเซลล์ตรึง 3, 9 และ 18 กรัม (ขนาด 1×1×1 เซนติเมตร) ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุน้ำทิ้ง 30 มิลลิลิตร ที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำทิ้งด้วยการ Autoclave เพื่อให้ได้สัดส่วน 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ซึ่งน้ำทิ้งมีปริมาณฟีนอลปนเปื้อนประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลือในน้ำทิ้งตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 5.8.2 เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ตรึงที่สัดส่วน 3:10 (w/v) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลสูงที่สุด จึงเลือกใช้สัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำเสียดังกล่าวในการทดลองต่อไป

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

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

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงบน EFB ในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้ง จึงนำเซลล์ตรึงไปผ่านขั้นตอนการกระตุ้นด้วยฟีนอล หรือ การปรับตัวด้วยการเจือจางน้ำทิ้ง หรือวิธีการร่วมระหว่างการกระตุ้นและการปรับตัวดังนี้

#### 5.7.2.1 การกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอล

เนื่องจากกระบวนการตรึงเซลล์แบบเกาะติดที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ ต้องอาศัยระยะเวลาในการบ่มเซลล์ร่วมกับวัสดุไว้ถึง 6 วัน เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์เส้นใย EPS ในการยึดติดกับผนังของวัสดุตรึง EFB ซึ่งในกระบวนการดังกล่าว ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนใดๆ ดังนั้น ทำให้เซลล์อยู่ในภาวะ

ขาดอาหาร และอาจส่งผลต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้ง จึงทดลองนำเซลล์ตรึงมากระตุ้นในอาหารเหลวที่มีการเติมฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการชักนำ และรักษาการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ก่อนนำไปใช้ จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาทดสอบการย่อยสลาย ฟีนอลในน้ำทิ้งที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกเอาตะกอนดินและเศษวัสดุที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งออก และผ่านการนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น ( $T_0$ ) และเวลาสุดท้าย ( $T_7$ ) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 5.8.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงเปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงที่ยังไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล

นอกจากนั้นทดสอบการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วย (กรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกเอาตะกอนดิน และเศษวัสดุที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งออก) เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 7 วัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 5.8.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง

### 5.7.2.2 การปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง

เพื่อลดความพิษจากกลุ่มของสารประกอบฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำทิ้ง ซึ่งอาจมีผลยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียตรึง จึงทดลองนำเซลล์ตรึงมาเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง โดยมีการปรับความเข้มข้นของน้ำทิ้งให้เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ทั้งนี้ เพื่อให้เวลาเซลล์ตรึงมีการปรับตัวก่อนนำไปทดสอบด้วยน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการเจือจาง ใช้สัดส่วนน้ำทิ้งที่ฆ่าเชื้อแล้วต่ออาหารเหลว CFMM 25, 50 และ 100% (v/v) ตามลำดับ โดยบ่มตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 5.8.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นชิ้นส่วน EFB ที่ปราศจากเซลล์

### 5.7.2.3 วิธีร่วมระหว่างการกระตุ้นและการปรับตัวของเซลล์ตรึง

ใช้วิธีการข้อ 5.7.2.1 ร่วมกับวิธีการข้อ 5.7.2.2 โดยนำเซลล์ตรึงมากระตุ้นในอาหารเหลวที่มีการเติมฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ตรึงมาเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง โดยมีการปรับความเข้มข้นของน้ำทิ้งให้เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ใช้สัดส่วนน้ำทิ้งที่ฆ่าเชื้อแล้วต่ออาหารเหลว CFMM 25, 50 และ 100% (v/v) ตามลำดับ โดยบ่มตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที

ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 5, 7 และ 10 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ในหัวข้อ 5.8.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นชิ้นส่วน EFB ที่ปราศจากเซลล์

จากการทดลอง 5.7.2.1 ถึง 5.7.2.3 เตรียมชุดควบคุมการทดลองทางกายภาพ และเคมีต่อการลดลงของฟีนอล (abiotic controls) เช่น การดูดซับของฟีนอลบนวัสดุตรึง โดยชุดควบคุมประกอบด้วยชิ้นส่วน EFB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

### 5.7.3 ศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

นำเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลในน้ำที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจากข้อ 5.7.2.1 มากรองด้วย GF/C (ขนาด 45 มิลลิเมตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานแล้วไปทดสอบการย่อยสลายฟีนอลซ้ำในน้ำที่ความเข้มข้นฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุน้ำที่ 30 มิลลิลิตร และมีเซลล์ตรึงปริมาณ 9 กรัม จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลือ จากนั้นทำการทดลองซ้ำขั้นตอนเดิมโดยนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ 10 ครั้ง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงว่าสามารถนำกลับมาใช้งานซ้ำอย่างต่อเนื่องได้หรือไม่ และประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลหลังการใช้งานแล้วลดลงหรือไม่

## 5.8 วิธีวิเคราะห์

### 5.8.1 การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

วิเคราะห์ลักษณะน้ำทิ้งด้วยวิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสียใน Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) โดยวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่อไปนี้ดังแสดงในตารางที่ 9

### ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

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

#### 5.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค colorimetric method

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

#### 5.8.3 วิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย

วิเคราะห์การผลิต exopolysaccharide ของแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิค Alcian blue adsorption assay เนื่องจากสี alcian blue จะย้อมติดเฉพาะ exopolysaccharide ที่เซลล์ผลิต ซึ่งไม่ย้อมติดเซลล์ และวัสดุตรึง ใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman (1993) โดยการเติม 1% สารละลายสี alcian blue ลงในตัวอย่างเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเซลล์ตรึงที่บ่มทุก 24 ชั่วโมง นำไปเขย่าที่ 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และกรองเอาเซลล์ตรึงออกด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำส่วนที่เป็นอาหารเหลว (supernatant) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 606 นาโนเมตร ค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงในอาหารเหลว หลังจากสี alcian blue ถูกดูดซับโดย exopolysaccharide จะแปรผันตามค่า exopolysaccharide ที่เซลล์ผลิตขึ้น ณ เวลาต่างนั้นๆ โดยเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างในระยะเริ่มต้นตรึงเซลล์ ( $T_0$ )

#### 5.8.4 การนับจำนวนแบคทีเรีย และวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

การสกัดและนับจำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนวัสดุพิเศษละลายพอลิเมอร์น้ำมัน ทำตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Pattanasupong et al. (2004) ขั้นตอนแรกสกัดเซลล์แบคทีเรียให้หลุดออกจากวัสดุตรึงก่อนโดยเติมอาหารเหลว CFMM ลงในหลอดแก้วที่บรรจุเซลล์ตรึงแบคทีเรีย ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เพื่อให้เซลล์สามารถหลุดออกจากวัสดุตรึงได้ง่าย นำไป sonicate ด้วยเครื่อง Ultrasonic bath เป็นเวลา 2 นาที และเขย่าด้วยเครื่อง vortex 2 นาที จากนั้นทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์และแขวนลอยเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ก่อนนำไปวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ (1) นับจำนวนแบคทีเรีย (CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง) นำสารละลายเซลล์มาเจือจางเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี 10-fold dilution และนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี total plate count โดยการ Spread plate ซึ่งใช้ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำในห้องเป็นเวลา 3-5 วัน มา นับจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณค่า CFU ต่อกรัมวัสดุ และ (2) วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยนำสารละลายเซลล์ใส่ใน crucible นำไปชั่งน้ำหนัก และอบที่อุณหภูมิต่ำ 103-105 องศาเซลเซียส ซ้ำมาจนเซลล์แห้งและน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก นำน้ำหนักเซลล์ที่ได้มาหาส่วนต่างระหว่างน้ำหนักของสารละลายเซลล์ก่อนอบและน้ำหนักของสารละลายเซลล์หลังอบ ซึ่งจะได้เป็นปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด (Grothe et al., 1999) ผลการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าประมาณ 1.09-1.13 กรัมต่อมิลลิลิตร

#### 5.8.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นในน้ำทิ้ง

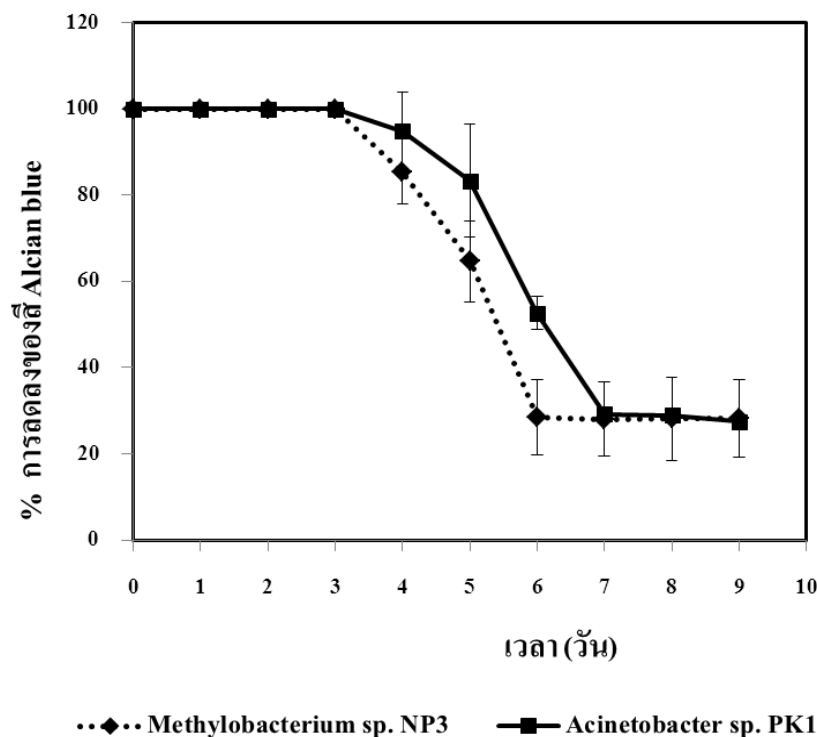
วิเคราะห์ความเข้มข้นโดยใช้วิธีมาตรฐานของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งก่อนและหลังบำบัดนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดของแข็งแขวนลอย จนได้ตัวอย่างที่ใส นำตัวอย่างส่วนใสเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเจือจาง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



## 6. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

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

การศึกษานี้สนใจตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมันโดยอาศัยการเกาะติดด้วยวิธีธรรมชาติ (self-attachment immobilization) โดยอาศัยการสังเคราะห์ EPS ของเซลล์ (Vandevivere and Kirchman, 1993; Obuekwe and Al-Muttawa, 2001; Olofsson et al., 2003; Suttinun et al., 2010) ผู้วิจัยจึงเริ่มจากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิต EPS ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ในภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอน (carbon starvation) โดยนำแบคทีเรียแต่ละชนิด บ่มร่วมกับชิ้นส่วนทะเลาะเปล่าปาล์มน้ำมัน (empty fruit bunch; EFB) เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาปริมาณการผลิต EPS ของแบคทีเรียแต่ละชนิด ทั้งนี้วิเคราะห์การผลิต EPS โดยใช้วิธี Alcian blue adsorption assay ตามวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman (1993) ปริมาณ EPS ที่ผลิตขึ้นคิดจากการลดลงของค่า absorbance ที่ 606 นาโนเมตร ในสารละลายตัวอย่าง เนื่องจากสีจะถูกดูดซับโดย EPS ที่เซลล์ผลิตขึ้นมา กำหนดให้  $A_{606}$  ของวันที่เริ่มต้นทดลอง ( $T_0$ ) มีค่า baseline เท่ากับ 100% จากผลการทดลองในรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าในช่วง 3 วันแรก ค่าสีที่  $A_{606}$  ในสารละลายตัวอย่างของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง แต่หลังจากวันที่ 3 ถึงวันที่ 6 พบการลดลงของสีที่  $A_{606}$  ประมาณ 70% ในตัวอย่างของ *Methylobacterium* sp. NP3 แสดงว่าเซลล์มีการผลิต EPS เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และรวดเร็วในช่วง 3 วันดังกล่าว หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีที่  $A_{606}$  เริ่มคงที่ ซึ่งแสดงว่าเซลล์มีอัตราการผลิต EPS คงที่หลังจากวันที่ 6 ในขณะที่ *Acinetobacter* sp. PK1 สามารถลดสีได้ประมาณ 50% ในช่วงวันที่ 3 ถึง 6 และมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีคงที่ประมาณ 70% หลังจากวันที่ 7 นอกจากนี้พบว่า *Methylobacterium* sp. NP3 มีอัตราในการสังเคราะห์เส้นใย EPS ได้เร็วกว่า *Acinetobacter* sp. PK1 อย่างไรก็ตาม ชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุตรึงเพียงอย่างเดียว (ปราศจากเซลล์) มีการลดลงของสี alcian blue น้อยมาก ประมาณ 0-5% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยทางกายภาพ (abiotic factors) อื่นๆ เช่น การเกาะติดของสีบริเวณขวดทดลอง เป็นต้น



รูปที่ 9 เปอร์เซนต์การลดลงของสี Alcian blue ที่  $A_{606}$  จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 เพื่อเกาะติดบน EFB

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

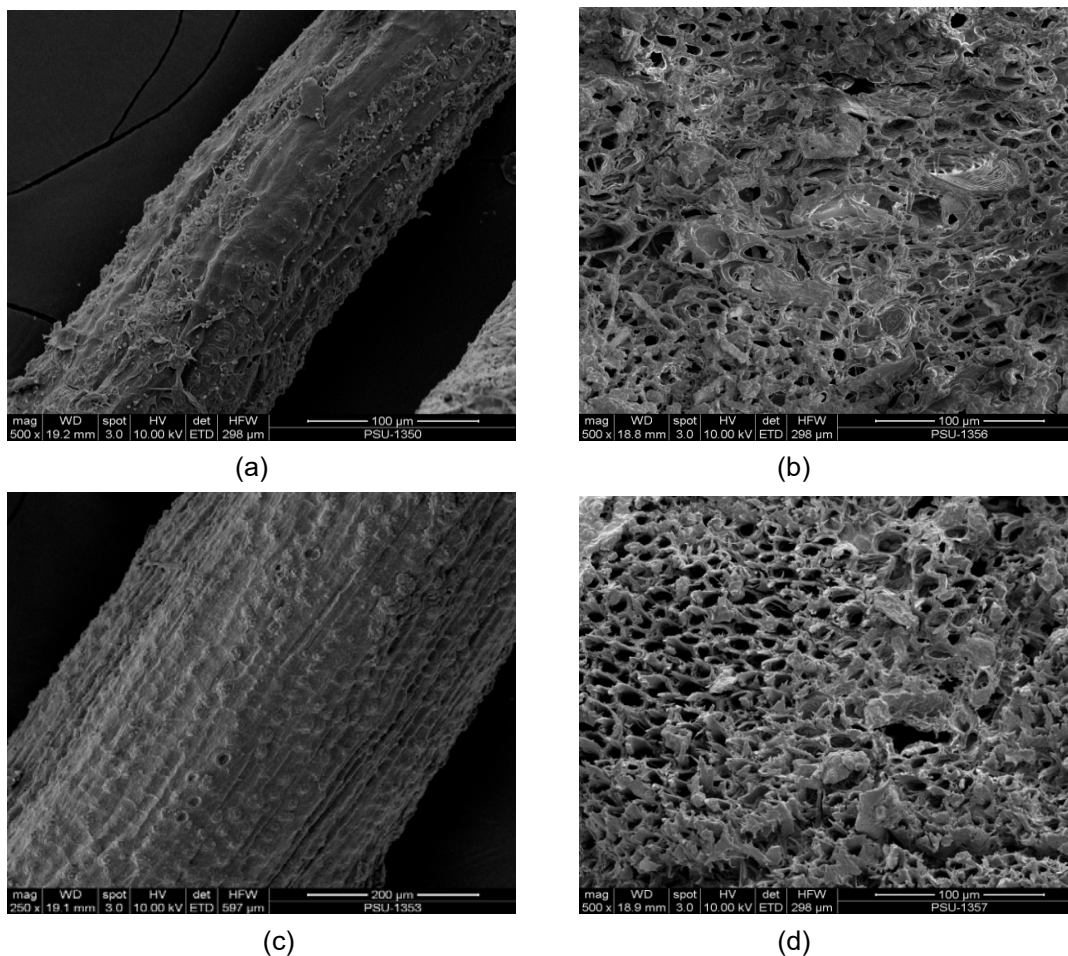
(Haseley et al., 1997; Kunii et al., 2001) ในขณะที่ *Methylobacterium* ผลิต EPS ที่มีลักษณะเป็น slime สีชมพู ซึ่งมีองค์ประกอบหลักจำพวก  $\alpha$ -(1,3)-galactan polysaccharide (Verhoef et al., 2003) เป็นต้น

## 6.2 การพัฒนาเซลล์ตรึงบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

### 6.2.1 คุณสมบัติของวัสดุตรึงเซลล์

การทดลองนี้ใช้วัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ได้แก่ เส้นใยปาล์ม น้ำมัน (pericarp fiber: PF) และทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (empty fruit bunch: EFB) ซึ่งเป็นวัสดุพิเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม การใช้วัสดุตรึงเซลล์ดังกล่าว เป็นทางเลือกหนึ่งในการนำของเสียมาใช้ประโยชน์ และยังเป็นการจัดของเสียอีกทางหนึ่งด้วย นอกจากนี้ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อ หรือสังเคราะห์วัสดุตรึงเซลล์ที่มีราคาแพง รวมทั้งมีวิธีการเตรียมวัสดุ และขั้นตอนการตรึงเซลล์ที่ไม่ยุ่งยาก จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุทั้ง 2 ชนิด โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงให้เห็นดังรูปที่ 10 พบว่าลักษณะพื้นผิวของวัสดุทั้งสองชนิดประกอบด้วยโครงสร้างซับซ้อน พื้นผิวก่อนข้างขรุขระ มีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายรังผึ้งดังรูปที่ 10 (a-d) โดยส่วนใหญ่พบจำนวนของรูพรุนในทะลายปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 10 c-d) มากกว่าเส้นใยปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 10 a-b) เล็กน้อย

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของวัสดุดังกล่าว (ตารางที่ 10) พบว่าวัสดุ PF (2.16%) มีปริมาณสารอาหารไนโตรเจนมากกว่า EFB (0.91%) ในขณะที่วัสดุทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณฟอสฟอรัสใกล้เคียงกัน คือประมาณ 0.21-0.22% อีกทั้งมีปริมาณคาร์บอนรวมทั้งหมด 35.93% ใน PF และ 41.49% ใน EFB อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารอาหารที่มีในวัสดุ อาจส่งผลโดยตรงต่อปริมาณการผลิต และองค์ประกอบของ EPS ที่เซลล์สร้างขึ้น ทั้งนี้ปริมาณและองค์ประกอบของ EPS มีผลต่อศักยภาพในการเกาะติดของแบคทีเรียบนพื้นผิววัสดุ นอกจากนี้พบว่ามีวัสดุทั้ง 2 ชนิด มีคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนเฉลี่ย (average pore diameter) และพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area) ใกล้เคียงกัน นั่นคือ มีค่าประมาณ 4.24 (EFB) และ 5.01 (PF) nm และ 4.17 (EFB) และ 5.45 (PF)  $m^2g^{-1}$  ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม EFB มีค่าปริมาตรรูพรุนทั้งหมด (total pore volume) มากกว่า PF ถึง 64 เท่า โดย EFB มีค่าปริมาตรรูพรุนทั้งหมด 0.44  $cc g^{-1}$  ในขณะที่ PF มีค่าปริมาตรรูพรุนทั้งหมดเท่ากับ 0.0068  $cc g^{-1}$  ซึ่งค่าที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับภาพถ่าย SEM ซึ่งเห็นว่า EFB มีจำนวนรูพรุนสูงกว่า PF และจากการศึกษาประจุของพื้นผิววัสดุทั้งสองโดย zeta potential analyzer พบว่าให้ค่าประจุลบ ประมาณ -25.23 mV (EFB) และ -25.30 mV (PF)



รูปที่ 10 ลักษณะพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันสองโดย SEM กำลังขยาย 250x-500x; เส้นใยปาล์ม น้ำมัน (a-b) และทะเลายปาล์มน้ำมัน (c-d)

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

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

#### ตารางที่ 10 คุณสมบัติของวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์

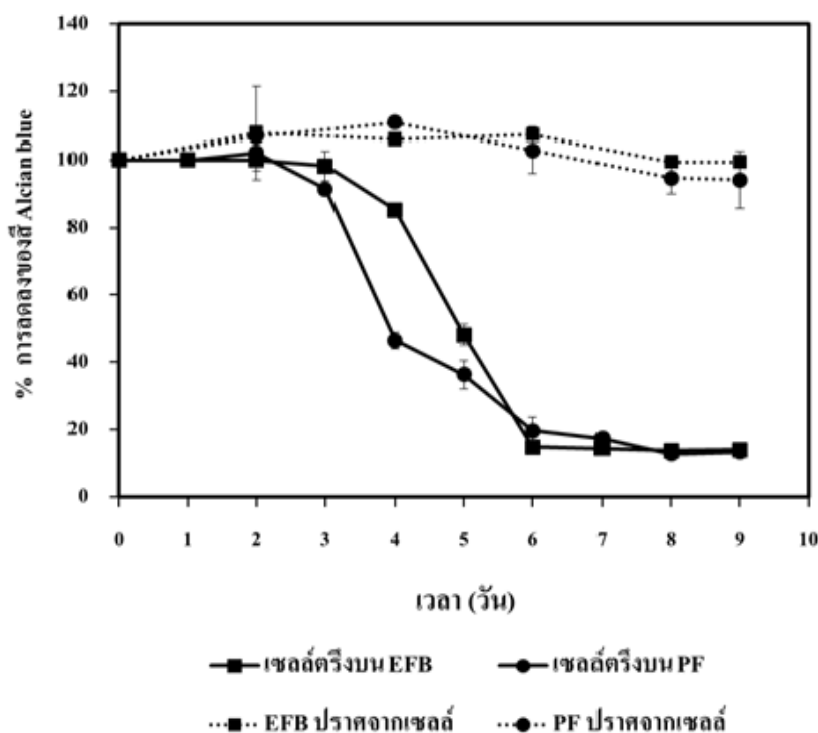
องค์ประกอบ	ชนิดของวัสดุ	
	ทะเลาะเปล่าปาล์มน้ำมัน (EFB)	เส้นใยปาล์มน้ำมัน (PF)
Nitrogen (%):	0.91	2.16
Phosphorus (%):	0.22	0.21
TOC (%):	41.49	35.93
Total pore volume ( $\text{cc g}^{-1}$ )	0.44	0.0068
Specific surface area ( $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ )	4.17	5.45
Average pore diameter (nm)	4.24	5.01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

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

#### 6.2.2 การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

การทดลองนี้จึงสนใจศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึง โดยพิจารณาจากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้วิธี Alcian blue adsorption assay จากผลการทดลองในรูปแบบที่ 11 แสดงให้เห็นว่า ในช่วง 3 วันแรก เซลล์มีการผลิต EPS ในวัสดุทั้ง 2 ชนิด ในปริมาณน้อยประมาณ 1-8% หลังจากวันที่ 3 พบว่าเซลล์แบคทีเรียผลิต EPS เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยในวันที่ 6 มีปริมาณ EPS ที่ผลิตขึ้นจากเซลล์ที่ตรึงบนวัสดุทั้ง 2 ประมาณ 80% หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีที่  $A_{606}$  เริ่มคงที่ในตัวอย่างเซลล์ตรึงบน EFB ซึ่งแสดงว่าเซลล์มีอัตราการผลิต EPS คงที่นับจากวันที่ 6 ในขณะที่เซลล์ตรึงบน PF ยังคงผลิต EPS อย่างต่อเนื่องจนเริ่มคงที่ในวันที่ 8 อย่างไรก็ตาม ชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุตรึงเพียงอย่างเดียว (ปราศจากเซลล์) มีการลดลงของสี Alcian blue น้อยมากประมาณ 0-5% ทั้งนี้สีที่ลดลงอาจเนื่องมาจากปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ (abiotic factor) เช่น การเกาะติดของสีบริเวณขวดทดลอง

หรือเกิดจากกระบวนการโฟโตออกซิเดชัน (photo oxidation) เป็นต้น ดังนั้นจึงตรึงเซลล์ในช่วงเวลา 6 และ 8 วัน สำหรับเซลล์ตรึงบน EFB และ PF ตามลำดับ ก่อนนำเซลล์ตรึงไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพีนอลในน้ำเสีย ซึ่งช่วยลดการหลุดของเซลล์จากวัสดุตรึงระหว่างการนำไปใช้



**รูปที่ 11** เปอร์เซนต์การลดลงของสี Alcian blue ที่  $A_{606}$  จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย ระหว่างการตรึงเซลล์บน EFB และ PF เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์

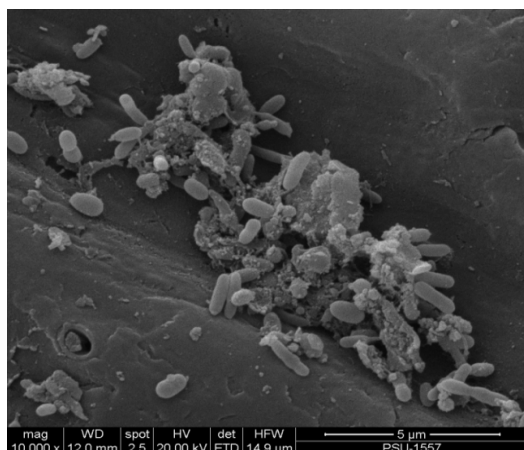
จากการศึกษาประสิทธิภาพของการตรึงเซลล์ โดยการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เกาะติดกับวัสดุ และเซลล์อิสระที่ยังคงหลงเหลืออยู่ในอาหารเหลว ดังตารางที่ 11 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการตรึงเซลล์บน EFB เท่ากับ 17% ในขณะที่การตรึงเซลล์บน PF มีประสิทธิภาพน้อยกว่า ซึ่งมีค่าประมาณ 6% ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย SEM ที่แสดงว่าลักษณะแบคทีเรียที่ถูกตรึงบน EFB (รูปที่ 12 c-d) มีการจับตัวอย่างหนาแน่นมากกว่าแบคทีเรียที่ถูกตรึงบน PF (รูปที่ 12 a-b) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก EFB มีลักษณะพื้นผิวที่มีความซับซ้อน และมีความเป็นรูพรุนสูง ซึ่งช่วยในการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกาะติดของเซลล์ในวัสดุได้มากกว่า PF ดังจะเห็นได้จากคุณสมบัติค่า total pore volume ที่สูงมากกว่าหลายเท่า (ตารางที่ 10) อย่างไรก็ตาม ปริมาณ และอัตราการผลิต EPS ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีกด้วย เช่น องค์ประกอบของวัสดุ เช่น ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพการตรึงเซลล์บน EFB และ PF ที่ระยะเวลาการตรึงเซลล์ 6 และ 8 วัน

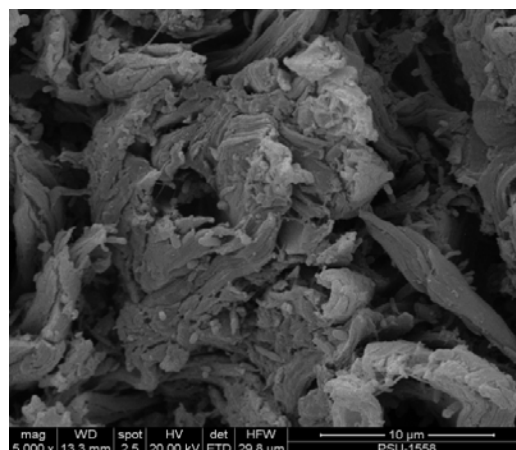
ชนิดของเซลล์ ตรึง	จำนวนเซลล์ทั้งหมด ในวัสดุ (0.5 กรัม) ( $\times 10^{10}$ CFU)	จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน อาหารเหลว CFMM (5 mL) ( $\times 10^{10}$ CFU)	ประสิทธิภาพ การตรึงเซลล์ (%)
เซลล์ตรึงบน EFB	1.14	5.65	17
เซลล์ตรึงบน PF	1.81	28.4	6

จากผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งพบว่าในระหว่างกระบวนการตรึงเซลล์แบบเกาะติด (Attachment immobilization) เซลล์แบคทีเรียที่ถูกดูดซับบนผิววัสดุจะมีการสังเคราะห์โครงสร้างขึ้นมาภายนอกเซลล์จำพวก EPS เช่น Quek et al. (2006) รายงานว่าเซลล์ตรึง *Rhodococcus* sp. F92 บน polyurethane foam สามารถย่อยสลายอัลเคนในผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมได้ดี โดยเซลล์มีการผลิตเส้นใยจำพวก EPS ซึ่งสามารถตรวจพบโดยการส่องด้วย SEM เส้นใยเหล่านี้ทำหน้าที่ในการสร้าง monolayer ที่แข็งแรงคงทน และบางเซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ภายในเส้นใย ซึ่งช่วยให้เกิดการเกาะติดกับพื้นผิววัสดุตรึงได้ดีขึ้น จากการศึกษาของ Obuekwe and Muttawa (2001) รายงานว่าเซลล์ *Arthrobacter* sp. ที่ตรึงบนรำข้าว สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้ และพบว่าเซลล์มีการสร้าง EPS ในการยึดเกาะกับวัสดุตรึง นอกจากนั้นจากการศึกษาของ Prieto et al. (2002) รายงานว่าเซลล์ตรึง *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 บน Biolite® และ diatomaceous earth ในระบบ packed-bed reactor สามารถย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียโรงงานผลิตเรซินได้ดี และพบว่าเซลล์มีการสร้าง EPS เป็นโครงข่ายของเส้นใยที่มีลักษณะเป็นไบโอฟิล์ม เพื่อห่อหุ้มเซลล์ และยึดเกาะกับวัสดุตรึง

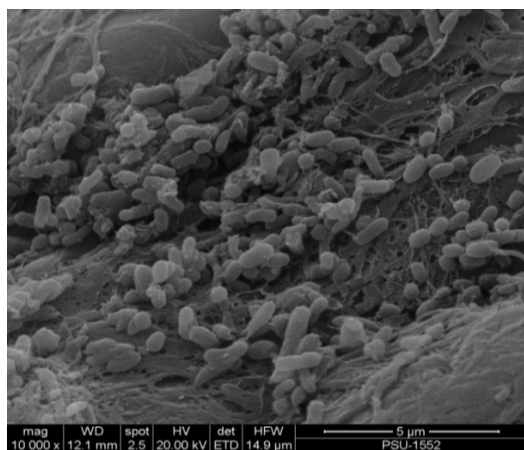
ทั้งนี้กระบวนการดูดซับ (Adsorption) ของเซลล์แบคทีเรียระหว่างการเกาะติดบนวัสดุตรึงเกิดขึ้นได้จากหลายกระบวนการ เช่น โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างกลุ่ม hydrophobic บนพื้นผิวของวัสดุ และโครงสร้างพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย (Cohen, 2001) และ/หรือความแตกต่างของประจุบนพื้นผิว (Surface charge) ของวัสดุและแบคทีเรีย จากผลการวิเคราะห์ประจุในการทดลองนี้ (ตารางที่ 10) พบว่าพื้นผิวของแบคทีเรียและวัสดุตรึงทั้ง 2 ชนิด มีประจุลบ อย่างไรก็ตาม ค่าระดับประจุที่แตกต่างกันอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของกลไกการดูดซับที่เกิดขึ้นระหว่างการตรึงเซลล์



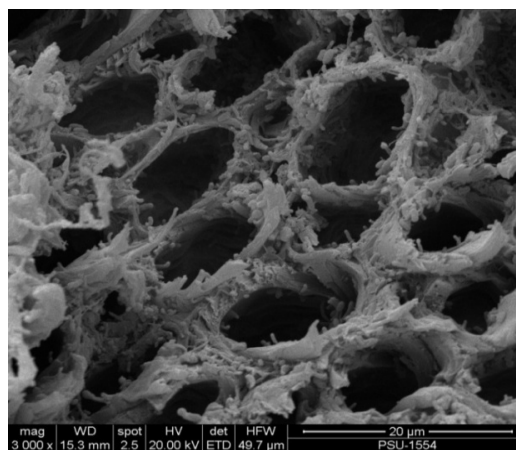
(a)



(b)



(c)



(d)

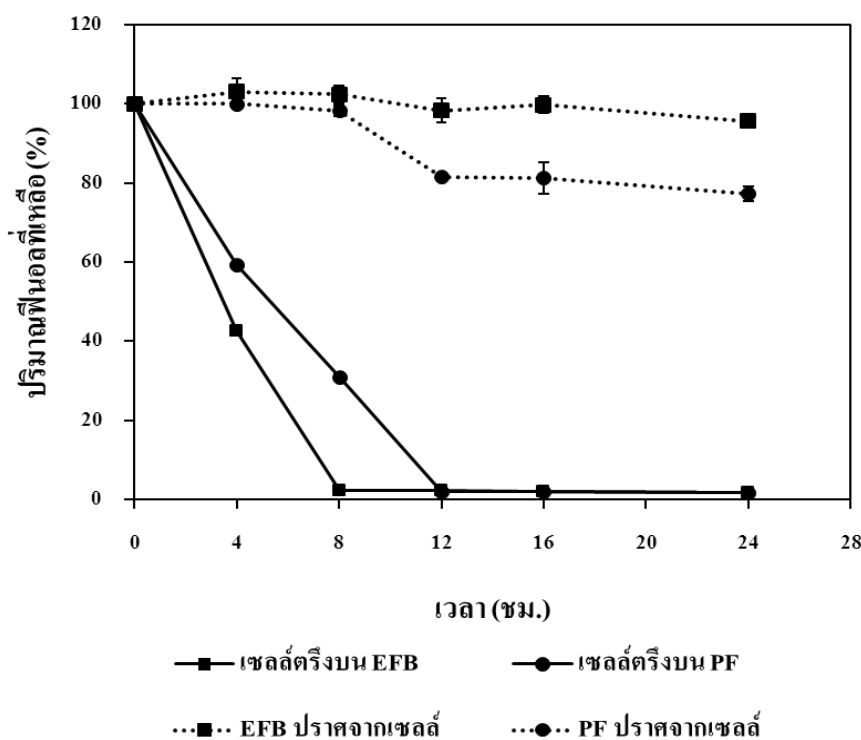
รูปที่ 12 การเกาะติดของเซลล์ในวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 3000x-10000x; เส้นใยปาล์มน้ำมัน (a-b) และละลายปาล์มน้ำมัน (c-d)

### 6.2.3 การคัดเลือกวัสดุตั้งเซลล์

การคัดเลือกชนิดของวัสดุตั้งระหว่าง EFB และ PF เพื่อเลือกเซลล์ตั้งที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่สุด พบว่าเซลล์ตั้งบน EFB และเซลล์ตั้งบน PF สามารถลดปริมาณฟีนอลที่ความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 98% ภายในเวลา 8 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 13) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ตั้งบน EFB มีอัตราการกำจัดฟีนอลสูงกว่าเซลล์ตั้งบน PF นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุม ซึ่งประกอบด้วยวัสดุตั้งแต่ละชนิดที่ปราศจากเซลล์ พบว่าชิ้นส่วน EFB ดูดซับฟีนอลได้น้อยกว่าชุดควบคุม PF ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของวัสดุที่แตกต่างกัน เช่น ปริมาณรูพรุนทั้งหมด พื้นที่ผิว ปริมาณคาร์บอน อาจมีผลต่อการดูดซับปริมาณฟีนอลที่แตกต่างกัน ซึ่งการดูดซับของฟีนอลโดยวัสดุตั้งนี้ อาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลทาง



ชีวภาพโดยแบคทีเรียต่ำลง เนื่องจากมวลของสารที่ถูกดูดซับไว้ ทำให้สารถูกกำจัดได้ยากขึ้น เพราะฉะนั้น จากผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกใช้เซลล์ตรึงบน EFB มาใช้ทดสอบในขั้นต่อไป เนื่องจากวัสดุดังกล่าว มีประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์สูงกว่า PF ซึ่งช่วยส่งเสริมการย่อยสลายฟีนอลโดยจุลินทรีย์ได้ดี และดูดซับฟีนอลน้อย จึงมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสีย



รูปที่ 13 ปริมาณฟีนอลที่เหลือหลังจากถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB และ PF เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (วัสดุตรึงที่ไม่มีเซลล์) ใช้ความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

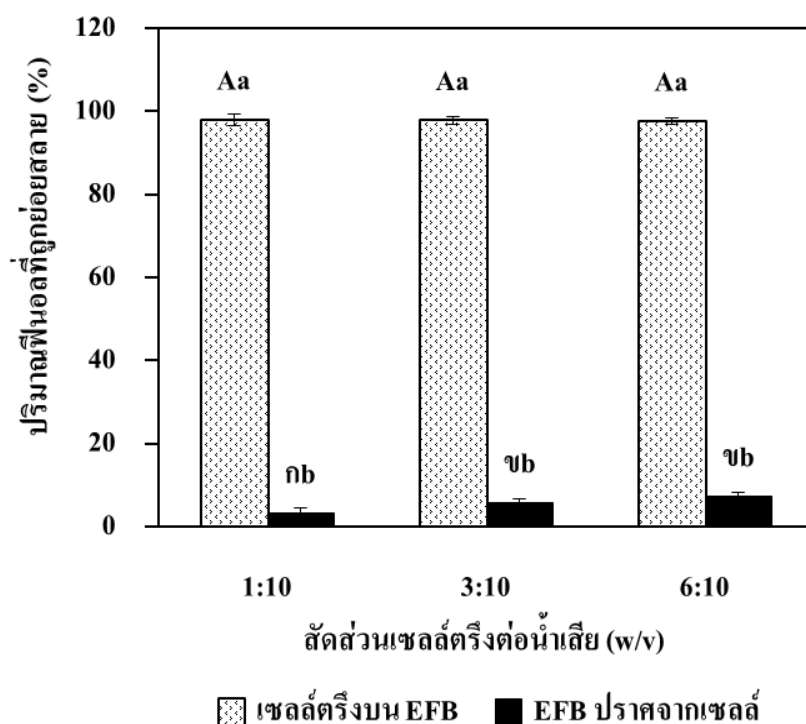
### 6.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

#### 6.3.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล

ศึกษาปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสม ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่สุด โดยแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงบน EFB 0.5, 1.5 และ 3.0 กรัม เพื่อให้ได้สัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว CFMM เท่ากับ 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) และใช้ความเข้มข้นของฟีนอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมเซลล์ตรึง 0.5 กรัม (1:10 w/v) ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลสูงถึง 98% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 14) ดังนั้นการเติมเซลล์ตรึงเพิ่มขึ้นเป็น 1.5 และ 3.0 กรัม จึงไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าปริมาณเซลล์ 0.5 กรัม หรือ

สัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว 1:10 มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเพียงพอในการย่อยสลายมวลของฟีนอลที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งปริมาณเซลล์ที่มากเกินไป อาจทำให้เกิดข้อจำกัดในการแพร่ผ่านของสารฟีนอล และออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ตรึง รวมถึงการเติมปริมาณเซลล์ตรึงเพิ่มขึ้น อาจทำให้เกิดการดูดซับของฟีนอลในเซลล์ และวัสดุตรึงมากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อความยั่งยืนในการย่อยสลายฟีนอลทางชีวภาพได้ ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุปราศจากเซลล์มีฟีนอลลดลงประมาณ 3-7% ซึ่งเกิดจากปัจจัยทาง abiotic จะเห็นว่าเมื่อมีปริมาณวัสดุมากขึ้นจะทำให้ปริมาณฟีนอลถูกกำจัดมากขึ้น และสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว 1:10 (w/v) มีการกำจัดฟีนอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว 3:10 และ 6:10 (w/v)

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

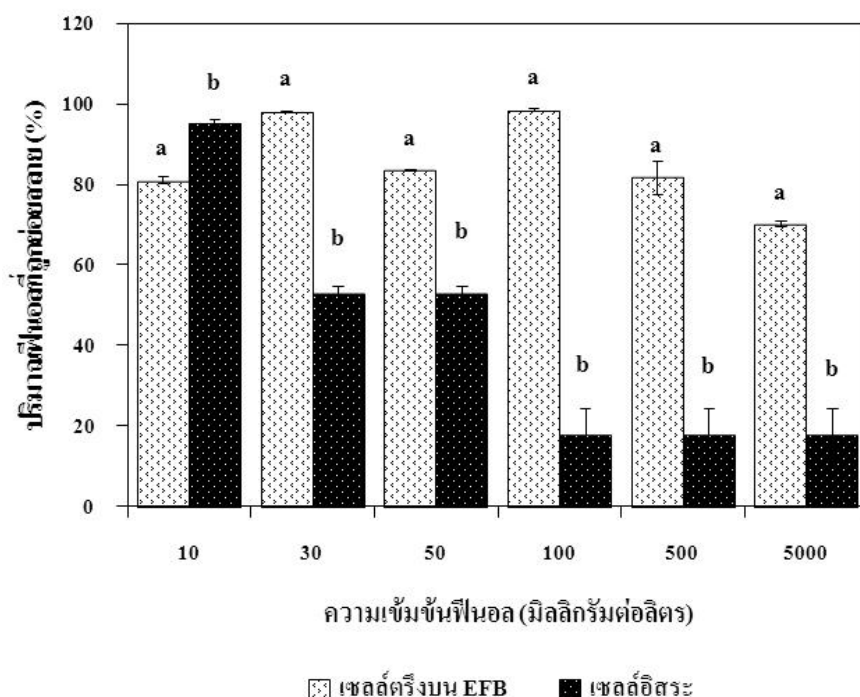


รูปที่ 14 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของสัดส่วนเซลล์ตรึงบน EFB ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) โดยมีความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

หมายเหตุ: เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ของเซลล์ตรึงบน EFB มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่แตกต่างกัน, เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างเซลล์ตรึงบน EFB และชุดควบคุม EFB ปราศจากเซลล์ในแต่ละสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กแตกต่างกัน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลว 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ของ EFB ปราศจากเซลล์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาไทยแตกต่างกัน (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $P < 0.05$ )

### 6.3.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

นำเซลล์ตรึงบน EFB โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อเซลล์ตรึงบน EFB ปริมาณ 0.5 กรัม มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีการแปรผันความเข้มข้นฟีนอลตั้งแต่ 10, 30, 50, 100, 500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ( $10^8$  CFU/มิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้นฟีนอลดังกล่าวข้างต้น ในด้านประสิทธิภาพของเปอร์เซ็นต์การลดลงของฟีนอล (% phenol removal) ค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอล (first-order degradation rate constant:  $k_1$ ) และอัตราการย่อยสลายฟีนอลจำเพาะสูงสุด (maximum specific degradation rate:  $k_2$ ) ซึ่ง  $k_1$  และ  $k_2$  เป็นพารามิเตอร์ที่ช่วยให้สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสองระบบได้ชัดเจนขึ้น ในกรณีปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเซลล์ตรึง และเซลล์อิสระอาจไม่เท่ากัน จากผลการทดลอง (รูปที่ 15, 16 และ ตารางที่ 12) แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์อิสระสามารถบำบัดฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์ตรึง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยสามารถลดปริมาณฟีนอลได้ 95% และ 80% ตามลำดับ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า  $k_1$  เท่ากับ 0.38 และ 0.31  $h^{-1}$  และมีค่า  $k_2$  เท่ากับ 0.0010 และ 0.0013 มิลลิกรัมฟีนอลต่อมิลลิกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นฟีนอลเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 30–5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงสามารถกำจัดฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์อิสระซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยเซลล์ตรึงมีค่าการย่อยสลายฟีนอลประมาณ 70-98% มีค่า  $k_1$  และค่า  $k_2$  อยู่ในช่วงระหว่าง 0.0019-0.048  $h^{-1}$  และ 0.0007–0.0360 มิลลิกรัมฟีนอลต่อมิลลิกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 17-52% ซึ่งมีค่า  $k_1$  และค่า  $k_2$  อยู่ในช่วงระหว่าง 0.0017–0.03  $h^{-1}$  และ 0.0001–0.0060 มิลลิกรัมฟีนอลต่อมิลลิกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

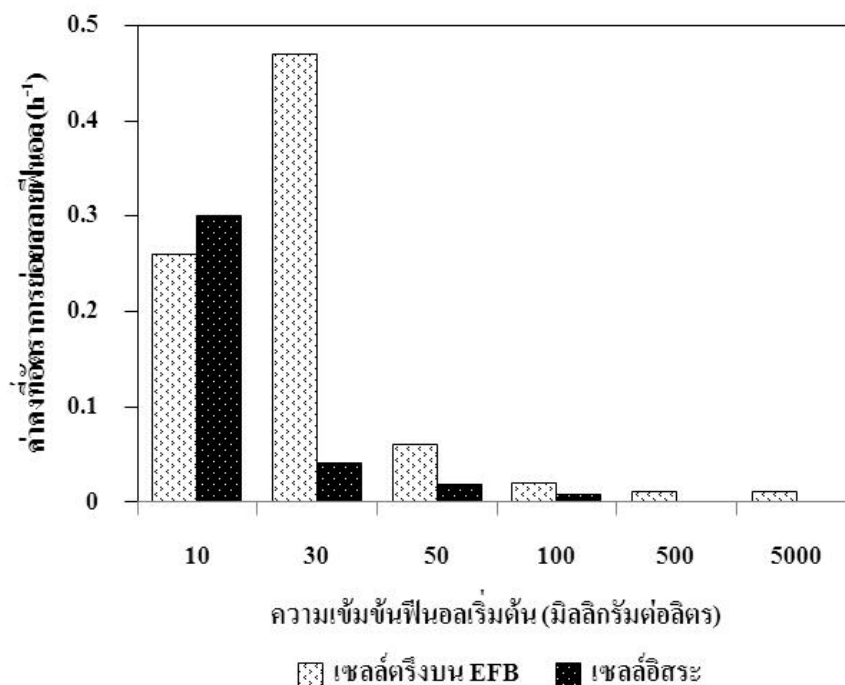


รูปที่ 15 ปริมาณฟีนอลที่เหลือหลังจากถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ (free cells) โดยทดลองที่ความเข้มข้นฟีนอล 10 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นฟีนอล 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นฟีนอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เวลา 96 ชั่วโมง และ ความเข้มข้นฟีนอล 500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง

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

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึง และเซลล์อิสระในการกำจัดฟีนอลในเชิง % การกำจัด ค่า  $k_1$  และ  $k_2$  มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน นั่นคือ เมื่อความเข้มข้นฟีนอลต่ำประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์อิสระมีค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงกว่าเซลล์ตรึง อาจเป็นไปได้ว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวมวลของฟีนอลจะแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ตรึงได้น้อยและช้า เนื่องจากเซลล์ตรึงมีข้อจำกัดในการแพร่ผ่านของสาร (Wang et al., 2007; Passos et al., 2010) ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถสัมผัสกับฟีนอลได้โดยตรง จึงทำให้การกำจัดฟีนอลที่ความเข้มข้นดังกล่าวเกิดขึ้นได้ดีกว่า แต่เมื่อความเข้มข้นฟีนอลสูงกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์อิสระมีค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอลต่ำกว่าเซลล์ตรึง (รูปที่ 16) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการเจริญหรือการทำงานหรือมีความเป็นพิษ

ต่อเซลล์อิสระ ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลลดลง ในขณะที่เซลล์ตรึงมีวัสดุตรึงทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากความเข้มข้นฟีนอลสูงได้ จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์อิสระ



รูปที่ 16 ค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB และเซลล์อิสระที่ฟีนอลความเข้มข้นต่าง ๆ

ผลการศึกษามีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งรายงาน bahwa เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าเซลล์อิสระ เช่น จากการศึกษาการใช้โพลียูรีเทน โฟม (polyurethane foam) ตรึง *Acinetobacter* sp. พบว่าเซลล์ที่มีการตรึงจะสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของฟีนอล 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 19.7 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้ตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม (เซลล์อิสระ) ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นของฟีนอล 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Adav et al., 2007) จากการศึกษาการตรึงเซลล์ *Acinetobacter* sp. XA05 และ *Sphingomonas* sp. FG03 บน polyvinyl alcohol (PVA) โดยใช้เชื้อที่แยกจากกากตะกอนเร่ง (Activated sludge) ซึ่งได้ทำการศึกษาการย่อยสลายฟีนอลเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึง พบว่าเซลล์ที่ไม่ตรึงบน PVA (เซลล์อิสระ) มีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 0.95 มิลลิกรัมฟีนอลต่อชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่ตรึงบน PVA มีอัตราการย่อยสลายฟีนอล 1.20 มิลลิกรัมฟีนอลต่อชั่วโมง (Liu et al., 2009) และจากรายงานการใช้เม็ดบีดตรึงกากตะกอนเร่ง พบว่าเซลล์ตรึงมีการย่อยสลายฟีนอลได้ที่ช่วงความเข้มข้นของฟีนอล 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายมากกว่า 95% ในเวลา 28 ชั่วโมง ทั้งนี้เซลล์อิสระถูกยับยั้งการย่อยสลายที่ความเข้มข้นของฟีนอล 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในขณะที่เซลล์ตรึงไม่ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น

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

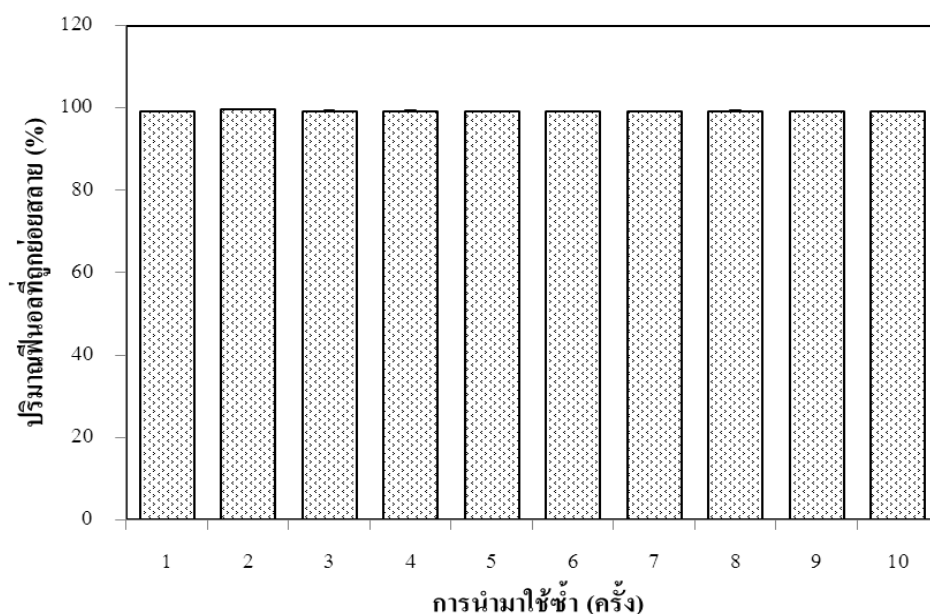
### ตารางที่ 12 อัตราการย่อยสลายจำเพาะของฟีนอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

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

#### 6.3.3 การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

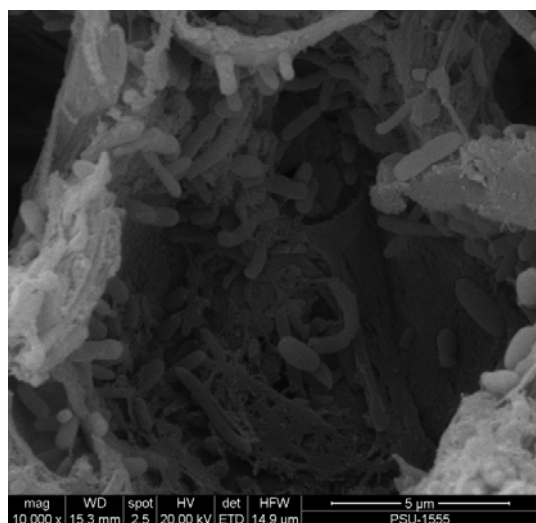
เมื่อนำเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทดสอบการนำกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงว่าสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลค่อนข้างคงที่ประมาณ 98% ภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อผ่านการใช้ซ้ำ 10 ครั้ง (รูปที่ 17) ทั้งนี้เซลล์ตรึงยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้เท่ากับเซลล์ตรึงที่เพิ่งใช้งานครั้งแรก ซึ่งช่วยลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ และจากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิววัสดุและเซลล์ตรึงหลังจากการใช้ซ้ำ ด้วยเทคนิค SEM แสดงให้เห็นว่าวัสดุมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย และยังมีปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงหลงเหลืออยู่บนวัสดุ ดังรูปที่ 18 นอกจากนี้ผลการทดสอบการเก็บเซลล์ตรึงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ตรึงที่เก็บไว้สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 90% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง แสดงว่าเซลล์ตรึงที่เก็บรักษาไว้ยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ใกล้เคียงกับเซลล์ตรึงที่เพิ่งเตรียมใหม่

อาจมีสาเหตุมาจากเซลล์ตรึงมีความเสถียร และวัสดุตรึงสามารถปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม รวมทั้งจากการปนเปื้อนได้ดี ในขณะที่การเก็บเซลล์ตรึงที่อุณหภูมิห้องอาจมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่าย เนื่องจากแบคทีเรีย และเชื้อราหลายชนิดสามารถเจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิห้อง

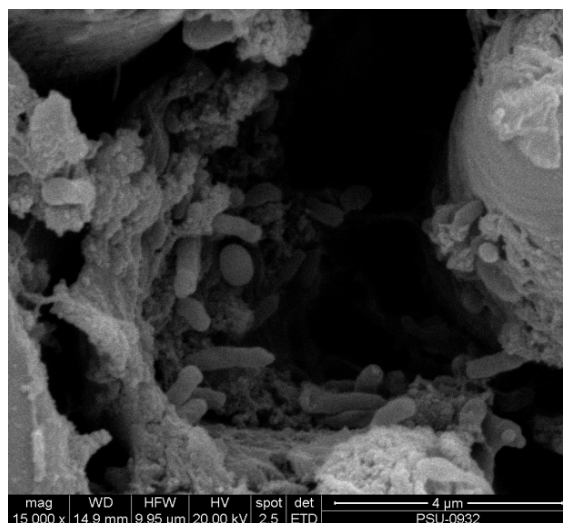


รูปที่ 17 ปริมาณฟีนอลที่ถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB หลังจากผ่านการใช้งานแล้ว 10 ครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติมฟีนอล

จากการศึกษาของ Obuekwe and Al-Muttawa (2001) พบว่าเซลล์แบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. ตรึงบนขี้เลื่อย Styrofoam และรำข้าวสาลี สามารถรักษาประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน หลังจากเก็บเซลล์ตรึงไว้นาน 6 สัปดาห์ที่ 45 องศาเซลเซียส Liu et al. (2009) รายงานว่าเซลล์ตรึง *Acinetobacter* sp. XA05 และ *Sphingomonas* sp. FG03 บน polyvinyl alcohol (PVA) สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งยังสามารถลดปริมาณฟีนอลได้ 93% หลังจากเก็บไว้ 50 วัน แต่เซลล์อิสระจะมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลลดลงหลังจากที่เก็บไว้ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการตรึงเซลล์สายพันธุ์ XA05 และ FG03 สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างน้อย 20 ครั้ง จากรายงานของ Ying et al. (2007) ใช้ polyvinyl alcohol (PVA) ในการตรึงเซลล์ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ PD 12 พบว่าสามารถเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 50 วัน นอกจากนี้การศึกษาของ Ahmad et al. (2012) พบว่าเซลล์ตรึง *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ AQ5NOL1 ใน gellan gum สามารถรักษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลโดยนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 45 ครั้ง



(a)



(b)

รูปที่ 18 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิว EFB และเซลล์ที่ถูกตรึงวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM ที่กำลังขยาย 10000x-15000x; ก่อนการย่อยสลายฟีนอล (a) และหลังการนำกลับมาใช้ย่อยสลายฟีนอลซ้ำจำนวน 5 ครั้ง (b)

#### 6.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบน EFB ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

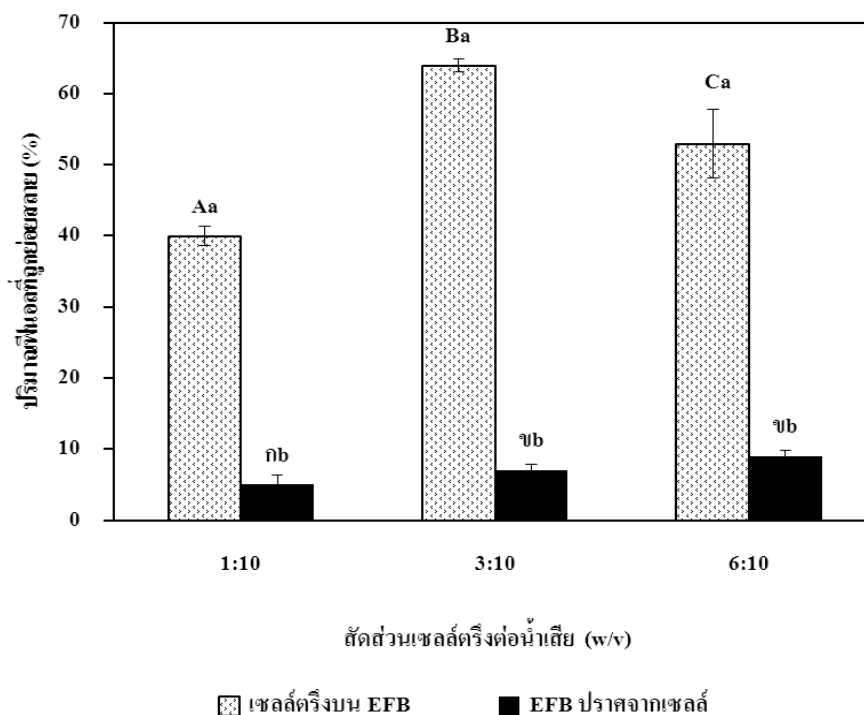
การทดลองนี้เลือกใช้น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นน้ำเสียต้นแบบที่มีการปนเปื้อนของฟีนอล ปาล์มน้ำมันถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มดิบก่อให้เกิดน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์สูง มีสีคล้ำ ซึ่งส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจากสารประกอบฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสีย ซึ่งสารประกอบฟีนอลถูกสกัดออกมาจากผลปาล์มในระหว่างกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน (แบบใช้น้ำ) จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพ ราคาถูก และไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในการจัดการปัญหาน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม

##### 6.4.1 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล

เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำทิ้งมีปริมาณสารอินทรีย์ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งมีการเพิ่มขนาดของวัสดุที่ใช้ตรึงให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้งานบำบัดน้ำเสีย จึงต้องทำการแปรผันปริมาณของเซลล์ตรึงต่อสัดส่วนน้ำทิ้งเพิ่มเติม โดยการแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้ง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ทดสอบในน้ำทิ้งที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาว่าปริมาณเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้งที่อัตราส่วนใดมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้



ดีที่สุด ผลการทดลองพบว่าสัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทึง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) สามารถย่อยสลายฟีนอลได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ 40%, 64% และ 53% ตามลำดับ (รูปที่ 19) ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าปริมาณเซลล์ตรึง 3 กรัม หรือสัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทึง 3:10 (w/v) มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเหมาะสมเพียงพอในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทึง เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหาร CFMM พบว่าสัดส่วนเซลล์ตรึงที่เหมาะสมสำหรับน้ำทึงที่มีปริมาณมากกว่าความต้องการในอาหารเหลว ซึ่งใช้เพียงสัดส่วน 1:10 (w/v) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในการทดลองนี้มีการเพิ่มขนาดของวัสดุตรึงที่ใช้จาก 0.5-1 มิลลิเมตรเป็น 1x1x1 เซนติเมตร ซึ่งขนาดที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลต่อปริมาณการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุ และอัตราการแพร่ผ่านของสารเข้าสู่เซลล์ตรึง และอีกปัจจัยหนึ่ง ได้แก่ องค์ประกอบของน้ำทึง อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง ดังนั้นจึงนำอัตราส่วนของเซลล์ตรึงต่อน้ำทึงที่ 3:10 (w/v) มาศึกษาในการทดลองต่อไป สำหรับชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพและเคมีต่อการลดลงของฟีนอล (abiotic controls) พบว่าชุดควบคุม EFB ปราศจากเซลล์ดูดซับฟีนอลได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่สัดส่วน EFB ต่อน้ำทึง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) คือ 3, 7 และ 9% ตามลำดับ (รูปที่ 19) ซึ่งที่สัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทึง 1:10 (w/v) มีการกำจัดฟีนอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทึง 3:10 และ 6:10 (w/v)



รูปที่ 19 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทึงโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเซลล์ตรึงบน EFB โดยการแปรผันปริมาณของเซลล์ตรึงที่สัดส่วนต่างๆ

**หมายเหตุ:** เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างสัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้ง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ของเซลล์ตรึงบน EFB มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่แตกต่างกัน, เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างเซลล์ตรึงบน EFB และชุดควบคุม EFB ปราศจากเซลล์ในแต่ละสัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กแตกต่างกัน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างสัดส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้ง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ของ EFB ปราศจากเซลล์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัวอักษรภาษาไทยแตกต่างกัน (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $P < 0.05$ )

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

##### 6.4.2.1 การกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอล

ศึกษาผลการกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้ง โดยการนำเซลล์ตรึงบน EFB มากระตุ้นด้วยฟีนอลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร CFMM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้การกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอลจะเป็นการชักนำ และรักษาการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ก่อนนำไปใช้ เนื่องจากในขั้นตอนการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ต้องอาศัยระยะเวลาในการบ่มเซลล์ร่วมกับวัสดุไว้ถึง 6 วัน เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์เส้นใย EPS ในการยึดติดกับผนังของวัสดุตรึง ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนใดๆ ดังนั้นทำให้เซลล์อยู่ในภาวะขาดแคลนอาหาร และอาจส่งผลต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้ง จากการทดลองพบว่าเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลสามารถลดปริมาณฟีนอลในน้ำทิ้งได้ 64% ภายในเวลา 7 วัน ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดฟีนอลได้สูงกว่าเซลล์ตรึงที่ยังไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งลดฟีนอลได้เพียง 35% (ตารางที่ 13)

นอกจากนั้นผลการทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเซลล์ตรึงบน EFB ยังสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 71% ภายในเวลา 7 วัน ซึ่งสูงกว่าการใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อเล็กน้อย อาจเป็นผลเสริมมาจากจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ที่มีอยู่เดิมในน้ำทิ้ง

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

สลายฟีนอล โดยใช้ฟีนอล รวมทั้งสารอินทรีย์อื่นๆ ในน้ำทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโต

**ตารางที่ 13** องค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อน และหลังการบำบัดด้วยเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล

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

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

\*\* น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จังหวัดสตูลเก็บตัวอย่างวันที่ 29 มีนาคม 2554

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งก่อนและหลังการบำบัดดังตารางที่ 13 พบว่า ปริมาณ COD ลดลงประมาณ 87 % จากความเข้มข้นเริ่มต้น 10,296 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือประมาณ 1,355 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณ BOD ลดลงประมาณ 92% จาก 725 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 61.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นข้อดีของการบำบัดน้ำทิ้งด้วยเซลล์ตรึงบน EFB ด้วยวิธีการนี้ ทั้งนี้พบว่าค่า pH หลังการบำบัดเท่ากับ 7.94 ค่า TKN, TP และ Oil & Grease หลังการบำบัดเท่ากับ 64, 16.2 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้น นอกจากค่า COD แล้ว พบว่าค่าพารามิเตอร์อื่นมีค่าอยู่ในเกณฑ์ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง นอกจากนั้นพบว่าหลังการบำบัดสามารถลดความเข้มข้นของสีที่เกิดจากสารประกอบฟีนอลลงได้ประมาณ 25% (ตารางที่ 13) อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการบำบัดฟีนอลลดลง เมื่อเทียบกับ

การศึกษาในอาหารเหลว CFMM เนื่องจากในองค์ประกอบของน้ำทิ้งยังมีสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ รวมอยู่ด้วย ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของเซลล์ตรึง ในขณะที่การศึกษาในอาหารเหลวมีเฉพาะฟีนอลเพียงชนิดเดียว

#### 6.4.2.2 การปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง

ศึกษาผลการปรับตัวของเซลล์ตรึงด้วยการเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง โดยการนำเซลล์ตรึงบน EFB มาย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งที่มีการปรับความเข้มข้นของน้ำทิ้งให้เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ เพื่อให้เวลาเซลล์ตรึงมีการปรับตัวก่อนนำไปทดสอบด้วยน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการเจือจาง เนื่องจากในน้ำทิ้งยังมีอนุพันธ์ของฟีนอลเป็นองค์ประกอบด้วย ซึ่งอนุพันธ์ของฟีนอลบางชนิดแม้ว่าจะมีความเข้มข้นต่ำ ก็อาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์ตรึง และสามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์ได้ โดยใช้สัดส่วนน้ำทิ้งที่ฆ่าเชื้อแล้วต่ออาหารเหลว CFMM 25, 50 และ 100% (v/v) ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าที่สัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 25% เซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 13, 23 และ 29% ที่เวลา 1, 3 และ 5 วัน และสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 50% เซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 29, 50 และ 51% ที่เวลา 1, 3 และ 5 วัน และสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 100% เซลล์ตรึงสามารถลดฟีนอลได้ 30, 41, 52 และ 54% ภายในระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน (ตารางที่ 14) ซึ่งที่สัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว 25% มีประสิทธิภาพการกำจัดฟีนอลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 50% และ 100% ณ วันสิ้นสุดการทดลอง และเมื่อใช้เซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการปรับตัว พบว่าเซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 35% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำทิ้งมีผลยับยั้งการทำงานของเซลล์ตรึง จึงทำให้เซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการปรับตัวมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลลดน้อยกว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการปรับตัวด้วยการเลี้ยงในน้ำทิ้งเจือจางก่อน

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

ตารางที่ 14 ปริมาณฟีนอลที่ลดลง (%) โดยใช้เซลล์ตรึงด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธี	สัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM	*ปริมาณฟีนอลที่ลดลง (%)	เวลาที่ใช้ในการย่อยสลายฟีนอล (วัน)
Non-activation	100: 0	35 <sup>A</sup>	7
Activation	100: 0	64 <sup>B</sup>	7
Acclimation	25:75	29 <sup>a</sup>	5
	50: 50	51 <sup>b</sup>	5
	100:0	53 <sup>Cb</sup>	7
Activation and Acclimation	25: 75	52 <sup>a</sup>	5
	50: 50	65 <sup>b</sup>	7
	100: 0	72 <sup>D b</sup>	10

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

#### 6.4.2.3 ผลการกระตุ้นร่วมกับการปรับตัวของเซลล์ตรึง

ศึกษาผลการกระตุ้นและการปรับตัวของเซลล์ตรึง โดยการนำเซลล์ตรึงบน EFB มากระตุ้นด้วยฟีนอลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจาง โดยมีการปรับความเข้มข้นของน้ำทิ้งให้มากขึ้นอย่างช้าๆ ใช้สัดส่วนน้ำทิ้งที่ฆ่าเชื้อแล้วต่ออาหารเหลว CFMM 25, 50 และ 100% (v/v) ตามลำดับ จากการทดลอง พบว่าหลังการกระตุ้นด้วยฟีนอลแล้วนำเซลล์ตรึงไปปรับตัวในน้ำทิ้งที่เจือจางตั้งแต่ 25-100% พบว่าเซลล์ตรึงลดฟีนอลได้เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยในสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 25% เซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 52% ภายในเวลา 5 วัน จากนั้นเลี้ยงในสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 50% เซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 66% เป็นเวลา 5 วัน และสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 100% เซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 72% ภายในระยะเวลา 10 วัน (ตารางที่ 14)

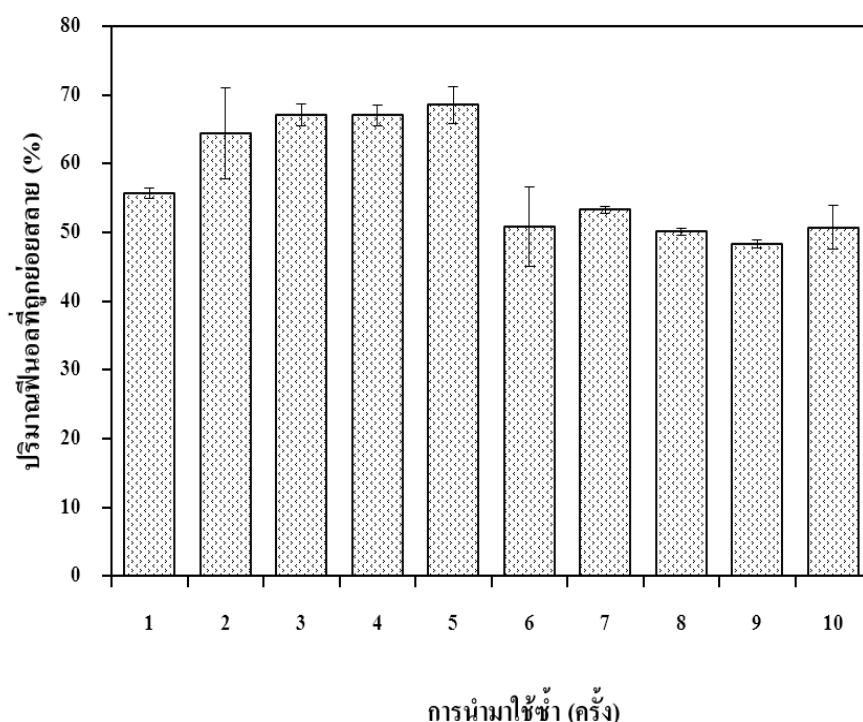
ในขณะที่สัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว 25% มีประสิทธิภาพการกำจัดฟีนอลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสัดส่วนน้ำทิ้งต่ออาหารเหลว CFMM 50% และ 100% และเมื่อใช้เซลล์ตรึงที่ยังไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล และไม่ผ่านการปรับตัวด้วยการเจือจางน้ำทิ้ง พบว่าเซลล์ตรึงลดฟีนอลได้ 35% อาจเนื่องมาจากเซลล์ตรึงขาดการกระตุ้นเพื่อชักนำ และรักษาการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ จึงทำให้เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลน้อยกว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการกระตุ้น และการปรับตัว จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว โดยใช้สถิติ one way-ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีการเตรียมเซลล์ตรึงก่อนนำไปใช้ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ 1) ไม่ผ่านการกระตุ้นและการปรับตัว (Non-activation and non-acclimation) 2) วิธีการกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอล (Activation) 3) วิธีการปรับตัวเซลล์ตรึงในน้ำทิ้งเจือจาง (Acclimation) และ 4) วิธีร่วมระหว่างการกระตุ้นและการปรับตัว (Activation and acclimation) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงที่ถูกกระตุ้นหรือปรับตัวแล้วในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีค่าต่ำกว่าการบำบัดฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟีนอล ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีทั้งฟีนอล อนุพันธ์ของฟีนอล และสารมลพิษอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งด้วย ซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง จากงานวิจัยนี้พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลในอาหารเหลวเกือบ 100% ในขณะที่สามารถย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งได้ประมาณ 64-72% ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย Limkhansuwan and Chaiprasert (2010) รายงานว่าพบการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลิก 33.64 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และพบว่า lactic acid bacteria สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ประมาณ 44% จากผลการศึกษาศักยภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเซลล์ตรึงบน EFB ในงานวิจัยนี้ พบว่าความเข้มข้นฟีนอลที่เหลือในน้ำทิ้งยังมีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม ซึ่งกำหนดให้มีปริมาณฟีนอลสูงสุดไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม สามารถนำน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้ว มาผ่านการบำบัดซ้ำอีกครั้ง หรืออาจมีการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลในระบบบำบัดแบบกึ่งกะ (Fed batch system) หรือระบบที่มีความต่อเนื่อง (Continuous system) ซึ่งอาจทำให้ค่าความเข้มข้นฟีนอลในน้ำทิ้งลดลงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งได้

#### 6.4.3 การนำเซลล์ตรึงมาใช้ซ้ำเพื่อบำบัดน้ำทิ้ง

เมื่อนำเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอล มาทดสอบการย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งซ้ำ เพื่อดูประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงว่าสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง และยังคงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลได้เหมือนกับการใช้ครั้งแรกหรือไม่ ซึ่งจะทำให้ช่วยลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ พบว่าสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง โดยเซลล์

ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 50-68% ภายในเวลา 7 วัน (รูปที่ 20) โดยพบว่าประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำย่อยสลายฟีนอลในน้ำทิ้งมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการย่อยสลายฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟีนอล อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง รวมทั้งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพื้นผิววัสดุตรึง ซึ่งอาจทำให้เซลล์ตรึงเกิดความเสียหาย และหลุดออกจากวัสดุได้ เมื่อมีการนำมาใช้ซ้ำหลายๆ ครั้ง



รูปที่ 20 ปริมาณฟีนอลที่ถูกย่อยสลายโดยเซลล์ตรึงบน EFB ที่ผ่านการใช้ซ้ำจำนวน 10 ครั้ง ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

## 7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

### 7.1 สรุปผลการทดลอง

#### การผลิต EPS ของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ทั้ง 2 ชนิด มีการผลิต EPS ในระหว่างการตรึงเซลล์บนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ซึ่งพบว่า *Methylobacterium* sp. NP3 มีอัตราในการสังเคราะห์เส้นใย EPS ได้เร็วกว่า *Acinetobacter* sp. PK1 และเมื่อนำแบคทีเรียผสม 2 ชนิด มาตรึงบน

วัสดุ EFB และ PF พบว่าเซลล์แบคทีเรียผลิต EPS บน EFB และ PF ได้คงที่ในวันที่ 6 และวันที่ 8 ตามลำดับ โดยปริมาณ EPS ที่ผลิตขึ้นมีจำนวนเพิ่มขึ้นประมาณ 80% เมื่อเทียบกับเริ่มต้นทดลอง ดังนั้นจึงทำการตรึงเซลล์ที่ระยะเวลา 6 และ 8 วัน บน EFB และ PF ตามลำดับ เพื่อให้เซลล์มีการเกาะติดกับวัสดุได้ดีเพียงพอ และป้องกันการหลุดของเซลล์ตรึง เมื่อมีการนำไปใช้

#### การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

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

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

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

#### การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียตรึงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาผลของการกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ตรึงลดฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ 64% ภายในเวลา 7 วัน ในขณะที่เซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลสามารถกำจัดฟีนอลได้เพียง 35% และจากการศึกษาผลของการ



ปรับตัวเซลล์ตรึงในน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจางก่อนนำไปใช้ พบว่าเซลล์ตรึงหลังการปรับสภาพสามารถลดปริมาณฟีนอลในน้ำทิ้งที่ไม่ได้เจือจางได้ 54% ภายในเวลา 7 วัน นอกจากนี้จากการย่อยสลายฟีนอลด้วยวิธีร่วมระหว่างการกระตุ้น และการปรับตัวของเซลล์ตรึง พบว่าลดปริมาณฟีนอลได้ 72% ภายในเวลา 10 วัน และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการบำบัดน้ำทิ้งได้อย่างน้อย 10 ครั้ง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 50–69%

ดังนั้น ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเตรียมเซลล์ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน EFB และ PF สามารถทำได้โดยการบ่มเซลล์แบคทีเรียร่วมกับวัสดุ โดยให้อัตราการเขย่าประมาณ 130 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 6 และ 8 วัน ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เซลล์ตรึงที่เตรียมได้ควรนำไปผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หรือผ่านการปรับตัวในน้ำทิ้งที่เจือจาง หรือวิธีร่วมระหว่าง 2 วิธีการดังกล่าว เพื่อชักนำและรักษาการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายฟีนอล รวมทั้งให้เซลล์ปรับตัวมีความทนทานต่อสารประกอบฟีนอล และอนุพันธ์ของฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนนำไปใช้งาน นอกจากนี้ยังสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง ซึ่งช่วยประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่

## 7.2 ข้อเสนอแนะ

1) ควรศึกษาหรือคัดเลือกวัสดุชนิดอื่นๆ มาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์เพิ่มเติม หรือศึกษาการปรับปรุงสภาพพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน เช่น สมบัติในเชิง hydrophobic interaction เพื่อเพิ่มความสามารถในการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุ

2) จากการศึกษานี้ได้ทำการทดลองในระบบกะ (batch system) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลเบื้องต้น ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยระบบที่มีความต่อเนื่อง (continuous system) เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้จริงในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

3) ควรศึกษาแนวทางการนำเซลล์ตรึงไปประยุกต์ใช้บำบัดน้ำทิ้ง เช่น เตรียมเซลล์ตรึงใส่ในภาชนะซึ่งทำเป็นลักษณะท่อนลอยในบ่อน้ำทิ้ง หรือพัฒนาเป็นระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุเซลล์ตรึง เป็นต้น

## 8. บรรณานุกรม

- ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส. 2547. การกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากใบยางพารา, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์หาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. Seymour, 2001
- นันทธร เการาช. 2550. การคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่เรี่ยทนต่อตัวทำลายจากดิน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกุล. 2533. กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือทิ้ง และคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วารสารสงขลานครินทร์. 12: 169-176.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ, อรัญ หันพงศ์กิตติกุลและโสภา จันทโสภา. 2544. เปรียบเทียบน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการทางชีวภาพ ทางเคมี และทางกายภาพ. วารสารสงขลานครินทร์. 23: 807-819.
- ปิยะมาศ คงแถม. 2552. การตรึงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนซิลิกาเพื่อใช้ย่อยสลายฟีนอล, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์หาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Abd-El-Haleem, D., Zaki, S., Zaki, E and Moawad, H. 2002. Isolation and molecular characterization of Egyptian phenol degrader isolates. *Microbial Ecology* 43: 217-224.
- Abdel-El-Haleem, D. 2003. *Acinetobacter* : environmental and biotechnological Applications. *African Journal of Biotechnology* 2 : 71-74.
- Adav, S. S., Chen, M. Y., Lee, D.J. and Ren, N. Q. 2007. Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic. *Chemosphere* 67: 1566–1572.
- Ahmad, S. A., Shamaan, N. A., Koon, G. B., Shukor, M. Y. A. and Syed, M. A. 2012. Enhanced phenol degradation by immobilized *Acinetobacter* sp. strain AQ5NOL 1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 347-352.
- Ahmaruzzaman, Md. 2008. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 143: 48–67.

- Aken, V. B., Yoon, J. M. and Schnoor, J. L. 2004. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Applied Environmental Microbiology* 1:508-517.
- Aksu, Z. and Bulbul, G. 1999. Determination of the effective diffusion coefficient of phenol in Calcium alginate-immobilized *P. putida* beads. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 344–348.
- Aksu, Z. 2005. Application of biosorption for removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry* 40: 997-1026.
- Alam, Md. Z., Muyibi, S. A., Mansor, M. F. and Wahid, R. 2007. Activated carbons derived from oil palm empty fruit bunches: Application to environmental problems. *Journal of Environmental Sciences* 19: 103-108.
- Alam, Md. Z., 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.
- Aleksieva Z, Ivanova, D. and Godjevargova, T. 2002. Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57[J]. *Process Biochemistry* 37: 1215-1219.
- Ali, S., Fernandez-Lafuente, R. and Cowan, D. A. 1998. Meta-pathway degradation of phenolics by thermophilic *Bacilli*. *Enzyme and Microbial Technology* 23 : 462– 468.
- APHA, AWWA and WEF. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21<sup>th</sup> edition. American Public Health Association. Washington DC.
- Attanun, T. and Chanchroensuk, J. 1999. Soil and plant analysis. Department of geology, Faculty of agriculture, Kasertsart University, Bangkok, Thailand.
- Bai, J., Wen, J.P., Li, H.M. and Jiang, Y. 2007. Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and m-cresol using *Alcaligenes faecalis*. *Process Biochemistry* 42: 510-517.
- Banerjee, I., Modak, M. J., Bandopadhyay, K., Das, D. and Maiti, R. B. 2001. Mathematical model for evaluation of mass transfer limitations in phenol biodegradation by immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology* 87: 211–223.
- Barker, E.L., Peter, E.B., Petrecia, H.F. and Grant, S.K. 1978. Phenol poisoning due to contaminated drinking water. *Archives of Environmental Health* 33: 89-94.
- Bastos, A. E. R., Moon, D. H., Rossi, A., Trevors, J. T. and Tsai, S. M. 2000. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Archives of Microbiology* 174: 346–352.

- Bureau of Industrial Environment Technology, Department of Industrial Works and Ministry of Industry. 1997. Environmental Management Guideline for the Palm Oil Industry. Environmental Advisory Assistance for Industry.
- Busca, G., Berardinelli, C. and Arrighi, L. 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *Journal of Hazardous Materials* 160: 265–288.
- Campos, G. M., Pereira, P. and Roseiro, C. J. 2006. Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilized *Fusarium oxysporum* CCMI 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCMI 908. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 848–854.
- Caposio, P., Pessione, E., Giuffrida, G., Conti, A., Landolfo, S., Giunta, C. and Gribaudo, G. 2002. Cloning and characterization of two catechol 1,2-dioxygenase genes from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Research in Microbiology* 153 : 69–74.
- Cassidy, M. B., Lee, H. and Trevors, J.T. 1996. Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilized *Fusarium oxysporum* CCMI 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCMI 908. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 848–854.
- Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Patel, T.N. and Tiwari, K.K. 2010. Biodegradation of phenol by native microorganisms isolated from coke processing wastewater. *Journal of Environmental Biology* 31 : 293-296.
- Cheetham, P. S. J., Blunt, K. W. and Bucke, C. 1979. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. *Biotechnology Bioengineering* 21: 2155-2168.
- Cohen, Y. 2001. Biofiltration-the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology* 77: 257–274.
- Cordova-Rosa, S. M., Dams, R. I., Cordova-Rosa, E. V., Radetski, M. R., Corra, A. X. R. and Radetski, C. M. 2009. Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Journal of Hazardous Materials* 164: 61–66.
- Cui, Z.C., Hu, Y.H., Yin, Y. and Qi, Y.Y. 2008. Isolation and characterization of a Carbamazepine-degrading strain of *Acinetobacter* sp. HY-7 from activated sludge. *Journal of Biotechnology* 136S : S678–S707.
- Cunningham, J. A., Kellner, J. D., Bridge, P.J., Trevenen, C. L., Mcleod, D. R. and Davies, H. D. 2000. Disseminated bacille Calmette-Guérin infection in an infant with a novel deletion in the interferon-gamma receptor gene. *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* 4:791-794.

- Diez M C, Mom M L, Videla, S. 1999. Adsorption of phenolic compounds and color from bleached kraft mill effluent using allophonic compounds[J]. *Water Resources* 33: 125-130.
- Dourado, M. N., Ferreira, A. Araujo, W. L., Azevedo, J. L. and Lacava, P. T. 2011. The diversity of endophytic Methylophilic bacteria in an oil-contaminated and an oil-free mangrove ecosystem and their tolerance to heavy metals. *Biotechnology Research International* 2012 Article ID 759865,doi:10.1155/2012/759865.
- El-Naas, M.H., Al-Muhtaseb, S.A. and Makhlof, S. 2009. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Hazardous Materials* 164: 720–725.
- Fang-yao, M., Ming-zhang, H., Dan-mei, L., Ya-wen, L., Pei-shun, H., Hai, Y. and Guo-qing, S. 2007. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Environmental Sciences* 19 : 1257–1260.
- Ghodake, G., Jadhav, S., Dawkar, V. and Govindwar, S. 2009. Biodegradation of diazo dye Direct brown MR by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM2890. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63 : 433–439.
- González, D.M., Moreno, E., Sarmiento, J.Q. and Ramos-Cormenzana, A. 1990. Studies on anti bacterial activity of wastewaters from olive oil mills (Alpechin): Inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere* 20: 423-432.
- Gonzalez, G., Herrera, G., Garcia, M. T. and Pena, M. 2011. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology* 80 : 137-142.
- Grady, Jr., C. P. L., Daigger, G. T. and Lim, H. C. 1999. *Biological Wastewater Treatment*, seconded. Marcel Dekker Inc, New York.
- Grothe, E., Young, M. M. and Chisti, Y. 1999. Fermentation optimization for the production of poly ( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 132-141.
- Hao, O. J., Kim, M. H., Seagren, E. A. and Kim, H. 2002. Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter* species. *Chemosphere* 46: 797–807.
- Haseley, S. R., Holst, O. and Brade, H. 1997. Structural studies of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter*. *European Journal of Biochemistry* 247:815-819.

- Ignatov, V.O., Khorkina, A.N., Shchyogolev, Y. S., Singirtsev, N.I., Bunin, D.V., Tumaikina, A.Y. and Ignatov, V.V. 1999. Comparison of the electro optical properties and specie respiratory activity of *Acinetobacter calcoaceticum* A-122. *FEMS Microbiology Letters* 173 : 453–457.
- Jung, M. W., Ahn, K. H., Lee, Y., Kim, K. P., Rhee, J. S., Park, J. T. and Paeng, K. J. 2001. Adsorption characteristics of phenol and chlorophenols on granular activated carbons (GAC). *Microchemical Journal* 70: 123-131.
- Kafilzadeh, F., Farhangdoost, M. S. and Tahery, Y. 2010. Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. *African Journal of Biotechnology* 9: 6721-6726.
- Kasamsuk, T. and Khanongnuc, C. 2007. Immobilization of *Coriolus versicolor* RC3 on natural carrier for textile wastewater decolorization. Available on website [http://202.28.92.69/inter/images/Fervaap2007/Oral-Poster\\_Pre/Fullpaper/ORAL/O4-10.pdf](http://202.28.92.69/inter/images/Fervaap2007/Oral-Poster_Pre/Fullpaper/ORAL/O4-10.pdf).
- Kavitha, V. and Palanivelu, K. 2004. The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton process for the degradation of phenol. *Chemosphere* 55: 1235-1243.
- Khongkhaem, P., Intasiri, A. and Luepromchai, E. 2011. Silica immobilized *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 degrade high concentrations of phenol. *Letters in Applied Microbiology* 52: 448–455.
- Knupp, G., Rücker, G., Ramos-Cormenzana, A., Garrido Hoyos, S., Neugebauer, M. and Ossenkop, T. 1996. Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38: 277-282.
- Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B. and Angelidaki, I. 2010. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering* 105: 899–908.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, M.I., Marchant, R. and Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* 21: 377–397.
- Kunii Y. and Chikatsu, H. 2001. On the Application of 3 Million Consumer Pixel Camera to Digital Photogrammetry, Videometrics and Optical Methods for 3D Shape Measurement, Proceeding of SPIE 4309 :278-287.
- Kunz, A., Reginatto, V. and Durán, N. 2001. Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*-ozone. *Chemosphere* 44: 281-287.

- Lee, G.M. and Palsson, B.O. 1994. Monoclonal antibody production using free-suspended and entrapped hybridoma cells. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 12: 509-533.
- Lee, S. Y., Chun, Y. N. and Kim, S. I. 2009. Characteristics of phenol degradation by immobilized activated sludge. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 15: 323–327.
- Leitao, A.L., Duarte, M.P. and Oliveira, J.S. 2007. Degradation of phenol by a halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59 : 220-225.
- Li, J. and Gu, D.J. 2007. Complete degradation of dimethyl isophthalate requires the biochemical cooperation between *Klebsiella oxytoca* Sc and *Methylobacterium mesophilicum* Sr Isolated from Wetland sediment. *Science of the Total Environment* 380 : 181–187.
- Lidstrom, E. M. and Chistoserdova, L. 2002. Plants in the Pink: Cytokinin Production by *Methylobacterium*. *American Society for Microbiology* 184 : 1818.
- Limkhuansuwan, V. and Chairprasert, P. 2010. Decolorization of molasses melanoidins and palm oil mill effluent phenolic compounds by fermentative lactic acid bacteria. *Journal of Environmental Sciences* 22: 1209–1217.
- Liu, Y. J., Zhang, A. N. and Wang, X. C. 2009. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochemical Engineering Journal* 44 : 187–192.
- Lu, Y., Yan, L, Wang, Y., Zhou, S., Fu, J. and Zhang, J. 2009. Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials* 165: 1091–1097.
- Mailin, M. and Firdausi, R. 2006. High performance phenol degrading microorganisms isolated from wastewater and oil-contaminated soil. *Malaysian Journal of Microbiology* 2: 32-36.
- Manahan, S.E. 1994. Environmental chemistry. Boca Raton. FL: CRC Press
- Marín, M., Pedregosa, A., Ríos, S., Ortiz, L.M. and Laborda, F. 1995. Biodegradation of diesel and heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: its possible applications on bioremediation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 95 : 269–285.
- Melo, J. S., Kholi, S., Patwardhan, A. W. and D'Souza, S. F. 2005. Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. *Process Biochemistry* 40: 625–628.
- Mitsui, R., Omori, M., Kitazawa, H. and Tanaka, M. 2005. Formaldehyde-Limited Cultivation of a Newly Isolated Methylophilic Bacterium, *Methylobacterium* sp. MF1: Enzymatic Analysis Related to C<sub>1</sub> Metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99 : 18–22.

- Mohite, B. V., Jalgaonwala, R. E., Pawar, S. and Morankar, A. 2010. Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 7 (RESEARCH ARTICLE).
- Movahedian, H., Khorsandi, H., Salehi, R. and Nikaeen, M. 2009. Detection of phenol degrading bacteria and *Pseudomonas Putida* in activated sludge by polymerase chain reaction. *Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering* 6: 115-120.
- Nair, I. C., Jayachandran, K. and Shashidhar, S. 2008. Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology* 7: 4951–4958.
- Obuekwe, C. O., Hourani, G. and Radwan, S.S. 2001. High-temperature hydrocarbon biodegradation activities in Kuwaiti desert soil samples. *Folia Microbiologica* 46: 535-539.
- Obuekwe, C. O. and Al-Muttawa, E. M., 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. *Biotechnology Letters* 23: 1025–1032.
- Parkhurst, B. R., Bradshaw, A. S., and Forte, J. L. 1979. An evaluation of the acute toxicity to aquatic biota of a coal conversion effluent and its major components. *Environmental Contamination and Toxicology* 23: 349-356.
- Passos, C. T. d., Michelon, M., Burkert, J. F. de M., Kalil, S. J. and Burkert, C. A. V. 2010. Biodegradation of phenol by free and encapsulated cells of a new *Aspergillus* sp. isolated from a contaminated site in southern Brazil. *African Journal of Biotechnology* 40 : 6716-6720.
- Pattanasupong, A., Nagase, H., Sugimoto, E., Hori, Y., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M. and Miyamoto, K. 2004. Degradation of Carbendazim and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by Immobilized Consortium on Loofa Sponge. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98: 28–33.
- Patterson, J. W. 1985. Industrial wastewater treatment technology . Butterworths, Boston.
- Pfeffer, F. M. 1979. The 1977 screening survey for measurement of organic priority pollutants in petroleum refinery wastewaters. ASTM Spec. *Technical Publications* 181-190.
- Prieto, M. B., Hidalgo, A, Rodriguez-Fernandez, C., Serra, J.L and Llama, M.J. 2002. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier. *Applied Microbiology Biotechnology* 58: 853-859.



- Quek, E., Ting, Y. P. and Tan, H. M. 2006. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. *Bioresource Technology* 97: 32–38.
- Rao, J., R. and Viaraghavan, T., 2002. Biosorption of phenol from aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass[J]. *Bioresour Technology* 85: 163-171.
- Rigo, M. and Alegre, R. M. 2004. Isolation and selection of phenol-degradation microorganisms from industrial wastewaters and kinetics of the biodegradation. *Folia Microbiologica* 49: 41-45.
- Robards, K. and Ryan, D. 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst* 123:31R-44R.
- Rosche, B., Li, X. Z., Hauer, B., Schmid, A. and Buehler, K. 2009. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis. *Trends in Biotechnology* 27: 636–643.
- Ruiz-Ordaz, N., Ruiz-Lagunéz, J. C., Castanon-Gonzalez, J. H., Hernandez-Manzano, E., Cristiani-Urbina, E. and Galindez-Mayer, J. 2001. Phenol Biodegradation Using a Repeated Batch Culture of *Candida tropicalis* in a Multistage Bubble Column. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 43:19-25.
- Rupani, P. F., Singh, R. P., Ibrahim, M. H. and Esa, N.2010. Review of Current Palm Oil Mill Effluent (POME) Treatment Methods : Vermicomposting as a Sustainable Practice. *World Applied Sciences Journal* 11: 70-81.
- Sanin, S. L., Sanin, F. D. and Bryers, J. D. 2003. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry* 38: 909- 914.
- Santos, J. C., Mussatto, S. I., Dragone, G., Converti, A. and Siva, S. S. 2005. Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. *Biochemistry Engineer Journal* 23: 1-9.
- Santos, V. L., Monteiro, A. S., Braga, D. T., and Santoro, M. M. 2009. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. *Journal of Hazardous Materials* 161: 1413–1420.
- Seetharam, G. B and Saville, B. A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Research* 37: 436–440.
- Sharma, N. and Gupta, V. C. 2012. Comparative Biodegradation Analysis of Phenol from Paper & Pulp Industrial Effluent by Free and Immobilized Cells of *Aspergillus Niger*. *International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE 30 IACSIT Press, Singapore.*

- Shetty, K. V., Ramanjaneyulu, R. and Srinikethan, G. 2007. Biological phenol removal using immobilized cells in a pulsed plate bioreactor: Effect of dilution rate and influent phenol concentration. *Journal of Hazardous Materials* 149: 452–459.
- Sridhar, M. K. C. and AdeOluwa, O. O. 2009. Palm Oil Industry Residues. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation Part III* 341-355.
- Stelting, S., Burns, R. G., Sunna, A. Visnovsky, G. and Bun, C. 2010. Immobilization of *Pseudomonas* sp. strain ADP: a stable inoculant for the bioremediation of atrazine. 19<sup>th</sup> World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World 1–6 August, Brisbane, Australia. Published on DVD.
- Stepnowski, P., Blotevogel, H. K. and Jastorff, B. 2004. Extraction of carotenoid produced during methanol waste biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 53: 127-132.
- Sundram, K., Sambanthamurthi, R. and Tan, Y. A. 2003. Palm fruit chemistry and nutrition. Asia Pacific. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 12 :355-362.
- Suttinun, O., Muller, R. and Luepromchai, E. 2010. Trichloroethylene co-metabolic degradation by *Rhodococcus* sp. L4 immobilized on plant materials rich in essential oils. *Applied Environmental Microbiology* 76: 4684-4690.
- Vandevivere, P., and Kirchman, D. L. 1993. Attachment stimulate exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Applied Environmental Microbiology* 59: 3280-3286.
- Van-Schie, P. M., and Young, L. Y. 1998. Isolation and Characterization of Phenol-Degrading Denitrifying Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology* 64 : 2432-2438.
- Van Schie, P. M. and Young, R. J. 2000. Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation Journal* 4: 1-18.
- Verhoef, R., Waard, P., Schols, H. A., Siika-aho, M. and Voragen, A. G. J. 2003. *Methylobacterium* sp. isolated from a Finnish paper machine produces highly pyruvated galactan exopolysaccharide. *Carbohydrate Research* 338: 1851-1859.
- Wang, X., Gai, Z., Yu, B., Feng, J., Xu, C., Yuan, Y., Lin, Z. and Xu, P. 2007. Degradation of Carbazole by Microbial Cells Immobilized in Magnetic Gellan Gum Gel Beads. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6421–6428.
- Wu, Y. T, Mohammad, W. A., Jahim, Md. J. and Anuar, N. 2009. A holistic approach to managing palm oil mill effluent (POME): Biotechnological advances in the sustainable reuse of POME. *Biotechnology Advances* 27:40–52.

- Yamaga, F., Washio, K. and Morikawa, M. 2010. Sustainable Biodegradation of Phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 Isolated from the Rhizosphere of Duckweed *Lemna aoukikusa*. *Environmental Science & Technology* 44: 6470–6474.
- Yan, J., Jianping, W., Bai, J., Daoquan, W. and Zongding, H., 2006. Phenol biodegradation by the yeast *Candida tropicalis* in the presence of m-cresol. *Journal of Biochemistry Engineering* 29: 223-227.
- Ying, W., Ye, T., Bin, H., Hua-bing, Z., Jian-nan, B. and Bao-li, C. 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. *Journal of Environmental Sciences* 19: 222-225.
- Yordanova, G., Ivanova, D., Godjevargova, T. and Krastanov, A. 2009. Biodegradation of phenol by immobilized *Aspergillus awamori* NRRL 3112 on modified polyacrylonitrile membrane . *Biodegradation* 20: 717-726.
- Zhao, G., Zhou, L., Li, Y., Liu, X., Ren, X., Liu, X. 2009. Enhancement of phenol degradation using immobilized microorganisms and organic modified montmorillonite in a two- phase partitioning bioreactor. *Journal of Hazardous Materials* 169 : 402– 410.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

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

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดังกล่าว ซึ่งมีค่า pH 7 หนึ่งมาเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเติมสารละลายความเข้มข้นสูง (Stock solution) ของสารต่อไปนี้อย่างละ 1 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูป micro filter

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

## ภาคผนวก ข

### วิธีวิเคราะห์

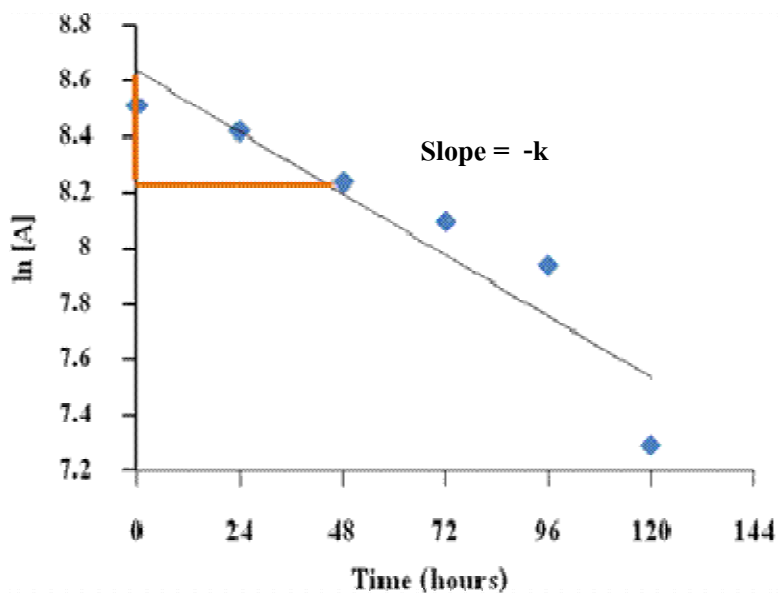
#### 1. ศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุตั้ง และเซลล์ตั้ง โดย Scanning electron microscopy

การศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ทำโดยนำชิ้นส่วนของวัสดุมาติดบนแท่นวางตัวอย่าง (Stub) แล้วนำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่อง Sputter coater และส่องดูด้วยเครื่อง SEM สำหรับการศึกษาลักษณะเซลล์ตั้งทั้งก่อนและหลังทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล โดยดองรักษาสภาพตัวอย่างก่อนฉาบทองด้วย 2.5% glutaraldehyde ( $C_5H_8O_2$ ) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หรือ 4% formaldehyde เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง นำตัวอย่างมา Fix ครั้งที่ 2 ด้วย 1%  $OsO_4$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ขจัดน้ำออกด้วยเอทานอลเป็นเวลา 10 นาที นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying (การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้อำนาจดำเนินการโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

#### 2. ศึกษาพื้นที่ผิวเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของรูพรุน และปริมาตรรูพรุนของวัสดุโดยเครื่อง Surface area analyzer

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

#### 3. ตัวอย่างการคำนวณค่าคงที่อัตราการย่อยสลายฟีนอล (phenol degradation rate constant: k



รูปที่ ข.1 ค่าคงที่อัตราการย่อยพินอลของเซลล์ตรึงบน EFB ที่ความเข้มข้นพินอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

คำนวณหาค่าคงที่,  $k$

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

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

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

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

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