



การตรึงแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 บนเมล็ดวัสดุ
พอรุนจากเถ้าแกลบ เพื่อการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิก
ในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Immobilization of Thermophilic *Bacillus thermoleovorans* Strain A2 on
Rice Husk Ash Pellets for Biodegradation of Phenolic Compounds in
Palm Oil Mill Wastewater

จริยาภรณ์ ดาสันทัต

Jariyaporn Dasantat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การตรึงแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 บนเมล็ดวัสดุ
พอรุนจากเถ้าแกลบ เพื่อการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิก
ในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Immobilization of Thermophilic *Bacillus thermoleovorans* Strain A2 on
Rice Husk Ash Pellets for Biodegradation of Phenolic Compounds in
Palm Oil Mill Wastewater

จริยาภรณ์ ดาสันทัต

Jariyaporn Dasantat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรึงแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 บนเมล็ดวัสดุ
 พรุณจากเถาวัลย์ เพื่อการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย
 จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ผู้เขียน นางสาวจริยาภรณ์ ดาสันทัต

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
 (ดร.อรมาศ สุทธิบูรณ์)

.....ประธานกรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)

.....
 (ดร.ไชยวัฒน์ รงค์สยามานนท์)

.....กรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑล เลิศคณาวณิชกุล)

.....กรรมการ
 (ดร.อรมาศ สุทธิบูรณ์)

.....กรรมการ
 (ดร.ไชยวัฒน์ รงค์สยามานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
 ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

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

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร.อรมาศ สุทธินน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(ดร.ไชยวัฒน์ รงค์สยามานนท์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....

(นางสาวจริยาภรณ์ ดาสน์ทัด)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวจริยาภรณ์ ดาสันทัต)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตรึงแบคทีเรียทนร้อน <i>Bacillus thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 บนเมล็ดวัสดุ พรุณจากเถาแกลบ เพื่อการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
ผู้เขียน	นางสาวจริยาภรณ์ ดาสันทัต
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่สามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ (phenol-degrading bacteria) ตรึงบนเมล็ดวัสดุพรุณจากเถาแกลบ เพื่อกำจัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อปริมาณการผลิต exopolysaccharide (EPS) ในระหว่างกระบวนการตรึงเซลล์ ทำให้ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ที่แบคทีเรียเกาะยึดกับวัสดุตรึงได้ดี เมื่อตรึงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสและทริปโตเฟนความเข้มข้น 0.1% พบการสังเคราะห์ EPS สูงที่สุด โดยปริมาณ EPS เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นการทดลอง 45% ในวันที่ 6 ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) การบ่มตัวอย่างนานขึ้นพบว่าแบคทีเรียสร้าง EPS ได้คงที่ ดังนั้นจึงถือว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ คือ 6 วัน การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพแบบใช้อากาศในระบบกะ พบว่าเซลล์ตรึงบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ในช่วงอุณหภูมิ (60-70 องศาเซลเซียส) และค่าพีเอชที่กว้าง (4 และ 7) โดยที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และพีเอช 7 ลดสารประกอบฟีนอลิกได้สูงที่สุด 59% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร หลังจากวันที่ 10 ของการทดลอง ซึ่งมีความแตกต่างกับชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับ 3.55 มิลลิกรัม/ลิตร/ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์อิสระลดสารประกอบฟีนอลิกได้ 35% ที่สภาวะเดียวกันและประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์ตรึงสูงกว่าเซลล์อิสระเกือบทุกสภาวะการทดลอง อีกทั้งเซลล์ตรึงยังนำกลับมาใช้ซ้ำเพื่อการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้หลายครั้ง โดยหลังการใช้ซ้ำจำนวน 6 ครั้ง พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดลดลงมากกว่า 50% ของการใช้จำนวนครั้งแรก นอกจากนี้การทดลองเดินระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดมีตัวกลาง (Packed bed bioreactor) ขนาด 1 ลิตร ที่บรรจุเซลล์ตรึงปริมาณ 100 กรัม/ลิตร และใช้ระยะเวลาพักเก็บน้ำเสียที่ 12 ชั่วโมง โดยทดลองที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และพีเอช 7 พบว่าเซลล์ตรึงบำบัดสารประกอบฟีนอลิกได้ 13% จากความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิก 1,553 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมีความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียโดยระบบดังกล่าวต่อไป อย่างไรก็ตามผลจากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงมีศักยภาพในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมที่มีสารประกอบฟีนอลิกปนเปื้อนได้

Thesis Title	Immobilization of Thermophilic <i>Bacillus thermoleovorans</i> Strain A2 on Rice Husk Ash Pellets for Biodegradation of Phenolic Compounds in Palm Oil Mill Wastewater
Author	Miss Jariyaporn Dasantat
Major Program	Environmental Management
Academic Year	2015

ABSTRACT

In this study, thermophilic phenol-degrading bacteria, *Bacillus thermoleovorans* strain A2 were immobilized on rice husk ash pellets for removal of phenolic compounds in palm oil mill wastewater (POMW). The effects of different carbon and/or nitrogen sources and concentrations on the production of bacterial exopolysaccharide (EPS) were studied during cell immobilization process. This was done to determine the optimum immobilization period for formation of well-attached cells. The maximum EPS content was found when the bacteria were grown on mineral medium containing 0.1% glucose and 0.1% tryptone. Under this condition, the amount of yielded EPS was found to be 45% after 6 days of incubation. This was significantly higher than in all other conditions ($p \leq 0.05$). Longer incubation resulted in a constant EPS synthesis. Therefore, the incubation of bacterial cells with rice husk ash pellets for 6 days was considered as an optimum immobilization period. In batch system, the immobilized bacteria was able to aerobically degrade phenolic compounds in POMW over a wide range of temperatures (60-70 °C) and pH values (4 and 7) but the optimum conditions were found at 65 °C and pH 7. The maximum efficiency of the removal of phenolic compounds was 59% from an initial concentration of 1,500 mg/L, which was significantly different from all other treatments ($p \leq 0.05$) after 10 days of incubation. The degradation rate of 3.55 mg/L/h was achieved. Under this condition, the free cells were able to remove only 35% phenolic compounds. The immobilized cells were more effective in removing phenolic compounds than free cells under almost all conditions. In addition, this immobilized bacterium could be reused for several application cycles. The degrading activity tended to decrease more than 50% after application over 6 cycles. The start up of a continuous POME treatment system in a 1-L packed bed bioreactor with 100 g/L immobilized cells at hydraulic retention time (HRT) of 12 hours was operated at 65 °C and pH 7. This bioreactor could remove 13% phenolic compounds from an initial concentration of 1,553 mg/L. Further study is needed in order to achieve better removal efficiency in the reactor. Nevertheless, the results from this study showed the potential of the immobilized bacterium for removal of industrial wastewater containing phenolic compounds.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ช่วยเหลือเป็นอย่างดี
 ยิงจากหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.อรมาศ สุทธิสุนัน อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ
 ดร.ไชยวัฒน์ รงค์สยามนทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ ให้มุมมอง แง่คิด
 รวมถึงช่วยแก้ปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ในการทำวิจัย ตรวจสอบแก้ไขความถูกต้องเรียบร้อย ตลอดจนให้
 กำลังใจผู้วิจัยตลอดมาจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณ
 คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
 ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสง และรองศาสตราจารย์ ดร.มณฑล เลิศคณาวนิชกุล ที่กรุณาเสียสละเวลา มา
 เป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนวิจัยเพื่อ
 วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ที่ให้คำแนะนำในการ
 ใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการด้วยดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณเพื่อนๆ
 คุณวรารัณดา ณ พัทลุง คุณพันธ์ธิดา จันทร์โท คุณอนุกุล เกียรติขวัญบุตร คุณพลิชฐ์ จารูรัตน์
 ช่วยเหลือในหลายๆ ขั้นตอนของการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวผู้วิจัย ที่สนับสนุนดูแลในทุกๆ ด้าน และเป็น
 กำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดมาจนทำให้การศึกษาระดับปริญญาโทสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

จริยาภรณ์ ดาสันทัต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.2.1 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	3
1.2.2 น้ำเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม	4
1.2.3 การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	6
1.2.4 คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี และความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอลิก	8
1.2.5 การย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิก	9
1.2.6 แบคทีเรียทนร้อนจีโนส Bacillus และการใช้ประโยชน์ในด้าน	12
สิ่งแวดล้อม	
1.2.7 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ และการใช้ประโยชน์ในการบำบัดสารมลพิษ	14
1.2.8 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้เซลล์ตรึง	20
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	24
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย	25
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	25
บทที่ 2 วิธีดำเนินงานวิจัย	26
2.1 ภาพรวมขั้นตอนวิธีดำเนินงานวิจัย	26
2.2 การเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	28
2.3 การวิเคราะห์ลักษณะของน้ำเสีย	28
2.4 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย	29
2.5 ศึกษาวิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย	30
2.5.1 การเตรียมวัสดุตรึงเซลล์	30

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.2 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้าง EPS ของแบคทีเรีย	31
2.6 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบพีนอลิกโดยใช้เซลล์ตรึงเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในระบบกะ	33
2.6.1 ศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ	35
2.7 การทดลองเดินระบบต่อเนื่องในการบำบัดสารประกอบพีนอลิก	35
2.8 วิธีการวิเคราะห์	37
2.8.1 การวิเคราะห์สารประกอบพีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics)	37
2.8.2 การวิเคราะห์การผลิต EPS ของแบคทีเรีย	37
2.8.3 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพีนอล	37
2.8.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	38
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	39
3.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้าง exopolysacchride (EPS) ของแบคทีเรีย	39
3.1.1 สภาวะที่มีการเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอน	40
3.1.2 สภาวะที่มีการเติมเฉพาะแหล่งไนโตรเจน	41
3.1.3 สภาวะที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	47
3.1.4 สภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	49
3.2 วัสดุตรึงเซลล์	53
3.3 การย่อยสลายสารประกอบพีนอลิกในน้ำเสียของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบโดยเซลล์ตรึงในระบบกะ	54
3.3.1 ลักษณะน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	54
3.3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบพีนอลิกในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	56
3.3.3 อัตราการย่อยสลายสารประกอบพีนอลิกในน้ำเสียโดยเซลล์ตรึง	61
3.3.4 การย่อยสลายสารประกอบพีนอลิกโดยเซลล์ตรึงในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อ	62

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ	64
3.5 การทดลองเดินระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุเซลล์ตรึงในการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	66
3.4.1 ระยะเวลาที่เก็บน้ำเสีย 12 ชั่วโมง	66
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	68
4.1 สรุปผลการทดลอง	68
4.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้าง EPS ของแบคทีเรีย	68
4.1.2 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้เซลล์ตรึงในระบบกะ	69
4.1.3 การทดลองเดินระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีเซลล์ตรึงในการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	70
4.2 ข้อเสนอแนะ	70
บรรณานุกรม	72
ภาคผนวก	88
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมเลี้ยงเชื้อ	89
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก	92
ประวัติผู้เขียน	95

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1.1	ลักษณะน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบ	5
ตารางที่ 1.2	คุณสมบัติของวัสดุรีดรีเจนชนิดต่างๆที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ	20
ตารางที่ 2.1	วิธีวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทั่วไปของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	29
ตารางที่ 2.2	คุณสมบัติของเม็ดวัสดุพูนจากแก้วกลบที่ใช้ในการศึกษา	31
ตารางที่ 2.3	สถานะของแหล่งคาร์บอนและ/หรือไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษาการสร้าง EPS ของเซลล์แบคทีเรีย <i>Bacillus thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2	33
ตารางที่ 3.1	การลดลงของสี Alcian blue (%) ในขณะตรึงเซลล์ภายใต้สถานะที่มีแหล่งอาหารเฉพาะคาร์บอนหรือไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว สถานะที่มีแหล่งไนโตรเจนร่วมกับแหล่งคาร์บอน และไม่เติมแหล่งอาหารทั้ง 2 ประเภท	52
ตารางที่ 3.2	ลักษณะน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา	55
ตารางที่ 3.3	การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (%) หลังบ่มเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของแบคทีเรีย <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 ร่วมกับน้ำเสียเป็นระยะเวลา 10 วัน ณ อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน	59
ตารางที่ 3.4	จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ที่ตรวจพบในน้ำเสีย ณ วันที่ 6 ของการบำบัด หลังจากการนำเซลล์ตรึงมาใช้ซ้ำในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	65

รายการรูป

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1.1	ไดอะแกรมแสดงกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	4
รูปที่ 1.2	ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันมะกอก การผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ และการผลิตไวน์	8
รูปที่ 1.3	วิธีการย่อยสลายฟีนอล (a) วิถีออโธ (Ortho-pathway) (b) วิถีเมทา (Meta-pathway)	10
รูปที่ 1.4	วิธีการย่อยสลายสาร 3, 5-xyleneol, m-cresol และ p-cresol โดยแบคทีเรีย <i>Pseudomonas putida</i>	11
รูปที่ 1.5	เทคนิคการตรึงเซลล์ในรูปแบบต่างๆ	16
รูปที่ 1.6	วัฏจักรการสร้างฟิล์มชีวภาพ	18
รูปที่ 1.7	ตัวอย่างวัสดุที่ใช้บำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ ได้แก่ เซรามิกสังเคราะห์ (A) และ ไบโอบอล (B)	19
รูปที่ 2.1	ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย	27
รูปที่ 2.2	บ่อรวบรวมน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม (A) และลักษณะสีของน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มที่นำมาใช้ในการทดลอง (B)	28
รูปที่ 2.3	เม็ดวัสดุพูนจากถ้ำกลบขนาด 0.5 เซนติเมตร	30
รูปที่ 2.4	เม็ดวัสดุพูนจากถ้ำกลบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) การย้อมสี EPS ของเซลล์ตรึงด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay (B)	32
รูปที่ 2.5	ลักษณะทั่วไปของถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Packed bed (A) และถังปฏิกรณ์ที่บรรจุเซลล์ตรึงปริมาณ 100 กรัมและน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 1 ลิตร (B)	36
รูปที่ 3.1	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A_{606} จากการผลิต EPS ของ <i>B. thermoleovorans</i> สายพันธุ์ A2 ในสถานะที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ในปริมาณร้อยละ 0.01, 0.05 และ 0.1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์ โดยกำหนดให้ IC = เซลล์ตรึงแบคทีเรีย A2, Glc = กลูโคส และ Material only = วัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์จุลินทรีย์	41
รูปที่ 3.2	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A_{606} จากการผลิต EPS ของ	44

- เซลล์แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ ทริปโตน (A) ยีสต์สกัด (B) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (C) โดยแปรผันให้มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.01, 0.05 และ 0.1 โดยกำหนดให้ IC = เซลล์ตรึงแบคทีเรีย A2, Try = ทริปโตน, YE = ยีสต์สกัด, $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ = แอมโมเนียมคลอไรด์ และ Material only = วัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์จุลินทรีย์
- รูปที่ 3.3 เปรอ์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A_{606} จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนร่วม ได้แก่ ทริปโตนร้อยละ 0.1 ร่วมกับยีสต์สกัดร้อยละ 0.05, ทริปโตนร้อยละ 0.1 ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 0.1 และยีสต์สกัดร้อยละ 0.05 ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 0.1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์ โดยกำหนดให้ IC = เซลล์ตรึงแบคทีเรีย A2, Try = ทริปโตน, YE = ยีสต์สกัด, $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ = แอมโมเนียมคลอไรด์ และ Material only = วัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ 46
- รูปที่ 3.4 เปรอ์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A_{606} จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ กลูโคสร้อยละ 0.1 ร่วมกับทริปโตนร้อยละ 0.1, กลูโคสร้อยละ 0.1 ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 0.1 และกลูโคสร้อยละ 0.1 ร่วมกับยีสต์สกัดร้อยละ 0.05 (w/v) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์ โดยกำหนดให้ IC = เซลล์ตรึงแบคทีเรีย A2, Glc คือ กลูโคส, Try = ทริปโตน YE = ยีสต์สกัด $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ = แอมโมเนียมคลอไรด์ และ Material only = วัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ 48
- รูปที่ 3.5 เปรอ์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A_{606} จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์ โดยกำหนดให้ IC without C/N = เซลล์ตรึงแบคทีเรีย A2 ในสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และ Material only without C/N = วัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน 50

- รูปที่ 3.6 ลักษณะพื้นผิวของวัสดุก่อนการตรึงเซลล์ (A) และการเกาะติดของแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 บนเม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบ โดยการสร้างเส้นใย EPS (ดังแสดงโดยลูกศร) ในสภาวะอาหารที่เหมาะสมที่สุด คือ กลูโคสและทริปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.1 (w/v) ณ วันที่ 6 ของการทดลอง (B) เมื่อส่องด้วย SEM กำลังขยาย 500x – 15000x 54
- รูปที่ 3.7 การลดลงของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโดยเซลล์ตรึง ณ เวลาต่าง ๆ ที่สภาวะเหมาะสมที่สุด คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ วัสดุตรึงปราศจากเซลล์และเซลล์ตรึงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยกำหนดให้ Material only = วัสดุตรึงปราศจากเซลล์, Autoclaved IC = เซลล์ตรึงที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธี Autoclave และ IC = เซลล์ตรึง 62
- รูปที่ 3.8 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในระหว่างการบ่มน้ำเสียที่ผ่าน/ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและมีการเติม/ไม่เติมแบคทีเรียตรึง *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยกำหนดให้ non-sterile POME = น้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ, sterile POME = น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และ IC = เซลล์ตรึง 63
- รูปที่ 3.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ลดลงโดยแบคทีเรียตรึงบนเม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบที่ผ่านการใช้ซ้ำจำนวน 8 ครั้ง ในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 65
- รูปที่ 3.10 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเซลล์ตรึงในเม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 1 ลิตร ที่เดินระบบแบบต่อเนื่อง และใช้ระยะเวลาพักเก็บน้ำเสีย 12 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ Influent = น้ำเข้า, Effluent = น้ำออก และ DO = ค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 67

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

น้ำมันปาล์มเป็นหนึ่งในน้ำมันที่มีการใช้ภายในประเทศสูง ทั้งต่อการบริโภค เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะการผลิตไบโอดีเซลซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทดแทน อย่างไรก็ตามในกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบต้องใช้น้ำในปริมาณมาก สำหรับบดทะลายปาล์มและสกัดน้ำมันออกจากผลปาล์ม ซึ่งก่อให้เกิดเป็นน้ำเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์มในปริมาณมาก (Chavalparit *et al.*, 2006) การสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้วัตถุดิบ 1 ตันทะลายปาล์มสดจะมีน้ำเสียเกิดขึ้นถึงประมาณ 1.0-1.3 ลูกบาศก์เมตร (พูนสุข ประเสริฐสุรพร และอรัญญา หันพวงศกิตติกุล, 2554) ปัจจุบันการใช้อบหมักไร้อากาศเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพร่วมกับบ่อปรับเสถียรมีบทบาทสำคัญในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เนื่องจากสามารถรับอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ได้สูง รวมทั้งก๊าซมีเทนที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนภายในโรงงานหรือจำหน่ายได้อีกด้วย (Poh and Chong, 2009; Kaewmai *et al.*, 2013) โดยทั่วไปน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ประมาณ 12-16 ลูกบาศก์เมตร (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2549) มีก๊าซมีเทน (CH_4) เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ประมาณ 35-70% (Yacob *et al.*, 2006) โดยน้ำเสียจากกระบวนการผลิตจะถูกพักเพื่อลดอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าสู่ระบบผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป ทั้งนี้ในน้ำเสียเหล่านี้มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น รงควัตถุจำพวกแอนโทไซยานิน แคโรทีน ลิกนิน แทนนิน และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งก่อให้เกิดสีน้ำตาลในน้ำเสีย (Barker *et al.*, 1981; Zahrim *et al.*, 2009) สารประกอบฟีนอลิกที่ตกค้างอยู่ในน้ำเสียเกิดจากเซลล์ผลปาล์มถูกทำลายในระหว่างกระบวนการสกัดน้ำมัน (Hartley *et al.*, 1977) พบสารกลุ่มนี้ตกค้างในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้นอยู่ในช่วงตั้งแต่ 1,000-1,661 มิลลิกรัมต่อลิตร (Alam *et al.*, 2009; Cordova-Rosa *et al.*, 2009; พันธธิดา จันทร์โท, 2557; กุสุมาลย์ ล่องแก้ว, 2557)

กลุ่มสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี คงทนในสิ่งแวดล้อม และมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์และพืชบางชนิด (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996; D'Annibale *et al.*, 2004; Bakhshi *et al.*, 2011; Kiliç *et al.*, 2012) รวมถึงอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ในระบบนิเวศ และสุขภาพของมนุษย์ (Ahamad and Kunhi, 2011) มีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกมีผลในการยับยั้งการเจริญและการทำงานของแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทน

จึงส่งผลต่อปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพและปริมาณก๊าซมีเทน ในระบบก๊าซชีวภาพที่ใช้ น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำเสียใกล้เคียงกับน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Sayadi *et al.*, 2000; Dhouib *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 2008) จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำเสีย เพราะจะช่วยลดผลกระทบของสารประกอบฟีนอลิกที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพ โดยสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพและก๊าซมีเทน ช่วยเพิ่มรายได้ให้แก่โรงงาน อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่จะตกค้างไปยังระบบบำบัดน้ำเสีย

การบำบัดสารประกอบฟีนอลิกทางชีวภาพเป็นวิธีการบำบัดที่มีประสิทธิภาพสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีความเป็นพิษน้อยลงหรือไม่มีพิษได้อย่างสมบูรณ์ (Ramírez *et al.*, 2001) ราคาไม่แพง และไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม การนำแบคทีเรียทนร้อนมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีอุณหภูมิสูงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม Thermophilic bacilli ที่สามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลาย การศึกษาที่ผ่านมา รายงานว่าแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้หลายชนิด และมีความทนทานอยู่รอดในช่วงอุณหภูมิสูงประมาณ 55-70 องศาเซลเซียส และพีเอชตั้งแต่ 5-8 (Mutzel *et al.*, 1996; Duffner and Müller, 1998) จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้บำบัดน้ำเสียที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงเช่นเดียวกับน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากผลการวิจัยของ Chantho *et al.* (2013) รายงานว่าเซลล์อิสระของแบคทีเรียทนร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ร้อยละ 44 จากความเข้มข้นเริ่มต้น 1,206 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นแล้วมาเป็นสับสเตรทในการผลิตก๊าซชีวภาพพบว่าปริมาณของก๊าซชีวภาพเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 42 และมีองค์ประกอบของก๊าซมีเทนประมาณร้อยละ 63 ในขณะที่น้ำเสียซึ่งไม่ผ่านการบำบัดมีปริมาณของก๊าซมีเทนร้อยละ 36

ดังนั้นการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นในน้ำเสียก่อนนำเข้าสู่ระบบก๊าซชีวภาพสามารถเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณพลังงานทดแทนในโรงงานได้ แต่อย่างไรก็ตามการนำเซลล์อิสระไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลิกยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ปัญหาความทนทานต่อความเข้มข้นสูงของสารประกอบฟีนอลิกและการใช้งานซ้ำอย่างต่อเนื่อง ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการย่อยสลายของจุลินทรีย์ลดลง ปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์ตรึงบนตัวกลางชนิดต่างๆ มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียเพราะเซลล์ที่ถูกตรึงไว้ในวัสดุมีความทนทานต่อความเข้มข้นของสารพิษต่างๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียได้ดีกว่าเซลล์อิสระ เซลล์สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม รวมทั้งยังสามารถนำเซลล์ตรึงมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง (Obuekwe and Al-Muttawa. 2001; Zhao *et al.*, 2009) ดังนั้นเพื่อปรับปรุงเซลล์ให้มีความทนทานต่อความเข้มข้น

ของสารประกอบฟีนอลิก และคงประสิทธิภาพการย่อยสลายในระยะยาว งานวิจัยนี้จึงสนใจใช้แบคทีเรียทนร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ตรึงบนเม็ดวัสดุพูนจากเถ้าแกลบ (Rice hush ash pellets) เพื่อบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยวัสดุตรึงนี้มีความพรุนตัวสูงเหมาะกับการอยู่อาศัยของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อการบำบัดน้ำเสีย และราคาไม่แพง คาดว่าความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะสามารถใช้เซลล์ตรึงในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกได้อย่างมีประสิทธิภาพและต่อเนื่อง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มและอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่มีสารประกอบฟีนอลิกตกค้างได้

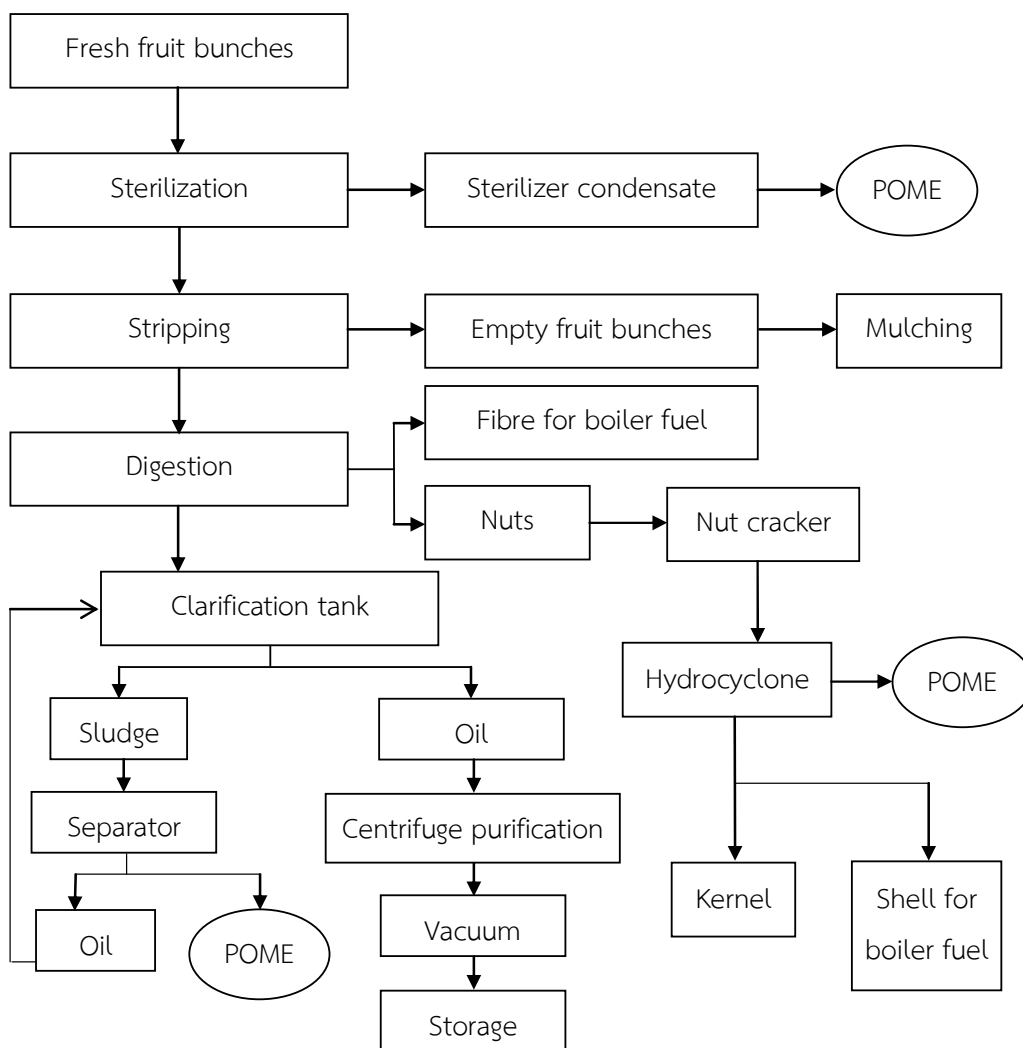
1.2 ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มสามารถแบ่งได้ 3 แบบ ได้แก่ กระบวนการผลิตแบบใช้น้ำหรือแบบมาตรฐาน กระบวนการผลิตแบบอย่างผลปาล์ม และกระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม (รณชัย ไชยศรี, 2550) ในกระบวนการผลิตทั้งหมดนี้มีเพียงกระบวนการผลิตแบบใช้น้ำเท่านั้นที่ก่อให้เกิดน้ำเสียขึ้น ในขณะที่กระบวนการผลิตแบบอย่างผลปาล์ม ซึ่งจัดเป็นการผลิตแบบไม่ใช้น้ำหรือแบบแห้ง โดยใช้ความร้อนในการอบผลปาล์ม ส่วนการผลิตแบบทอดผลปาล์มนั้นจะใช้น้ำมันปาล์มเป็นตัวสกัดน้ำมันออกจากผลปาล์มโดยตรงจึงไม่ก่อให้เกิดน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมัน

กระบวนการผลิตแบบใช้น้ำหรือแบบมาตรฐาน มีการใช้น้ำหรือไอน้ำ ในการอบทะลายปาล์ม หรือผลปาล์ม ซึ่งในกระบวนการผลิตนี้จะมีปริมาณน้ำเสียมาก สำหรับขั้นตอนทั่วไปของการสกัดน้ำมันปาล์ม แบบใช้น้ำเริ่มจากการอบทะลายปาล์มสดด้วยไอน้ำอุณหภูมิประมาณ 140 องศาเซลเซียส ความดัน 40-60 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ประมาณ 40-60 นาที ขั้นตอนนี้ช่วยให้ผลปาล์มนุ่มหลุดออกจากทะลายปาล์มได้ง่าย และทำให้เนื้อเยื่อของผลปาล์มยุ่ยง่ายต่อการสกัดน้ำมัน และยังเป็นการยับยั้งปฏิกิริยาไลโปไลซิส (Lipolysis) ที่ทำให้เกิดกรดไขมันอิสระในผลปาล์ม จากนั้นส่งทะลายปาล์มที่ผ่านการอบแล้วไปยังเครื่องแยกผลปาล์ม แล้วส่งต่อผลปาล์มเข้าเครื่องย่อยผลปาล์ม ขณะย่อยมีการเติมน้ำลงไปด้วยเล็กน้อย จากนั้นป้อนเข้าเครื่องหีบแบบอัดเกลียว (screw press) เพื่อแยกน้ำมันออกจากเมล็ดในและเส้นใย น้ำมันที่ได้จากเครื่องหีบ กรองแยกเส้นใยผ่านตะแกรงแบบสั่น จากนั้นแยกกรวดทรายแบบไฮโดรไซโคลอน น้ำมันส่วนนี้จะเข้าสู่เครื่องเหวี่ยงแยกความเร็วสูงเพื่อกำจัดอนุภาคของแข็งก่อนผ่านการไล่ความชื้นและนำไปเก็บในถังเก็บ เพื่อรอการทำบริสุทธิ์หรือเตรียมจำหน่ายโรงงานกลั่นน้ำมันบริสุทธิ์ต่อไป (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และอรรณู หันพงศ์กิตติกุล. 2554) ดังแสดงในรูปที่ 1.1 กระบวนการผลิตแบบนี้จัดเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถ

ให้ผลผลิตของน้ำมันเท่ากับ 0.2 ตันต่อทะเลาะปาล์มน้ำมัน กระบวนการนี้มีกำลังการผลิตสูงได้น้ำมันที่มีมาตรฐาน (รณชัย ไชยศรี, 2550)



รูปที่ 1.1 ไดอะแกรมแสดงกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

ที่มา : Lam and Lee (2011)

1.2.2 น้ำเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) เป็นหนึ่งในพืชที่มีประโยชน์หลากหลายในประเทศเขตร้อน ในการผลิตน้ำมันปาล์มมีน้ำเสียเกิดขึ้นปริมาณมาก (Najafpour *et al.*, 2006) โดยกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มจากผลปาล์มสดสำหรับการผลิตน้ำมันปาล์มดิบ 1 ตัน มีอัตราการใช้น้ำ

ในกระบวนการผลิตประมาณ 5-7.5 ตัน และมีปริมาณน้ำเสียเกิดขึ้นประมาณร้อยละ 50 ของปริมาณน้ำที่ใช้ในการผลิตทั้งหมด (Rupani *et al.*, 2010) น้ำเสียที่เกิดขึ้นมาจาก 3 ขั้นตอน ได้แก่ การนึ่งอบผลปาล์ม (sterilization) การแยกน้ำมัน (clarification) และวิธี hydrocyclones โดยก่อให้เกิดน้ำเสียประมาณร้อยละ 36, 60 และ 4 ตามลำดับ จากผลผลิตปาล์มน้ำมันในประเทศมาเลเซีย 14.8 ล้านตัน (โดยเฉลี่ยต่อปี) (Sethupathi, 2004) น้ำเสียทั้งหมดจะไหลไปรวมกันเป็นน้ำเสียรวมในบ่อรวบรวมน้ำเสีย โดยลักษณะของน้ำเสียจากขั้นตอนต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ลักษณะน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบ

พารามิเตอร์ *	น้ำเสียจากหม้อนึ่งอบผลปาล์ม	น้ำเสียจากเครื่องสกัดแยกน้ำมัน	บ่อรวบรวมน้ำเสีย
สี	น้ำตาลดำ	น้ำตาล	น้ำตาลคล้ำ
พีเอช	5.12	4.61	4.05-4.62
อุณหภูมิ	30-88	36-77	30-75
ซีไอดี	65,969	38,246	80,000-150,000
บีไอดี	31,620	21,000	50,000-60,000
ของแข็งทั้งหมด (Total solids)	54,546	25,634	49,000-88,500
ของแข็งระเหย (Volatile solids)	44,354	23,056	4,200-82,000
ของแข็งแขวนลอย (Suspended solids)	2,600	2,900	18,500-52,000
แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (Ammonia nitrogen)	43	23	23-61
น้ำมันและไขมัน (Oil and grease)	20-1,165	4.7	15-2,500
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics)	-	-	>1,000

หมายเหตุ : * ค่าทุกค่ามีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้น พีเอชและสี

- ไม่พบรายงานการศึกษา

ที่มา : พูนสุข ประเสริฐสรณ์ (2543); ธนาวัฒน์ รักกมล (2549); Alam *et al.* (2009) และ Limkhuanuwan and Chaiprasert. (2010)

ลักษณะของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากกิจกรรมต่างๆ เหล่านี้ จะเห็นว่า น้ำเสียจากบ่อรวบรวมน้ำเสียมีค่าของแข็งทั้งหมด (Total solids) น้ำมันและไขมัน (Oil and grease) ซีโอดี (Chemical oxygen demand, COD) บีโอดี (Biochemical oxygen demand, BOD) สูงและ น้ำเสียจากทุกขั้นตอนมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง โดยน้ำเสียประกอบด้วยคอลลอยด์สีน้ำตาล น้ำมัน สารแขวนลอยอินทรีย์ความเข้มข้นสูง และมีค่าเป็นกรดเนื่องจากมีกรดอินทรีย์รูปแบบซับซ้อน (Wu *et al.*, 2010) และมีองค์ประกอบของอินทรีย์วัตถุสูง เช่น ลิกนิน แทนนิน และสารประกอบ ฟีนอลิก โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นส่วนประกอบในผลปาล์ม ถูกสกัดออกมาในช่วงกระบวนการ นึ่งอบผลปาล์ม ซึ่งเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (Polyphenoloxidases, PPO) ทำให้สารประกอบฟีนอลิกไม่ถูกย่อยสลาย จึงปนเปื้อนลงสู่น้ำเสียที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการ สกัดน้ำมันปาล์ม (Sundram *et al.*, 2003) สารประกอบฟีนอลิกสามารถส่งผลกระทบต่อการศึกษาในน้ำทิ้ง ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Autooxidation) และพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) (Assas *et al.*, 2002) โดยสารประกอบฟีนอลิกที่ปนเปื้อนในน้ำเสียเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เปลี่ยนโมโนฟีนอล (Monophenols) เป็นออร์โท-ไดฟีนอล (o-diphenol) และออกซิเดชันต่อไปเป็น ออร์โท-ควิโนน (o-quinones) ซึ่ง ก่อให้เกิดสีน้ำตาล และมีการรวมตัวกันเป็นพอลิเมอร์เกิดเป็นสารโมเลกุลใหญ่ โครงสร้างซับซ้อน เรียกว่า สารประกอบนี้ว่า เมลานิน (Melanin) (Tomás-Barberán and Espín, 2001)

1.2.3 การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

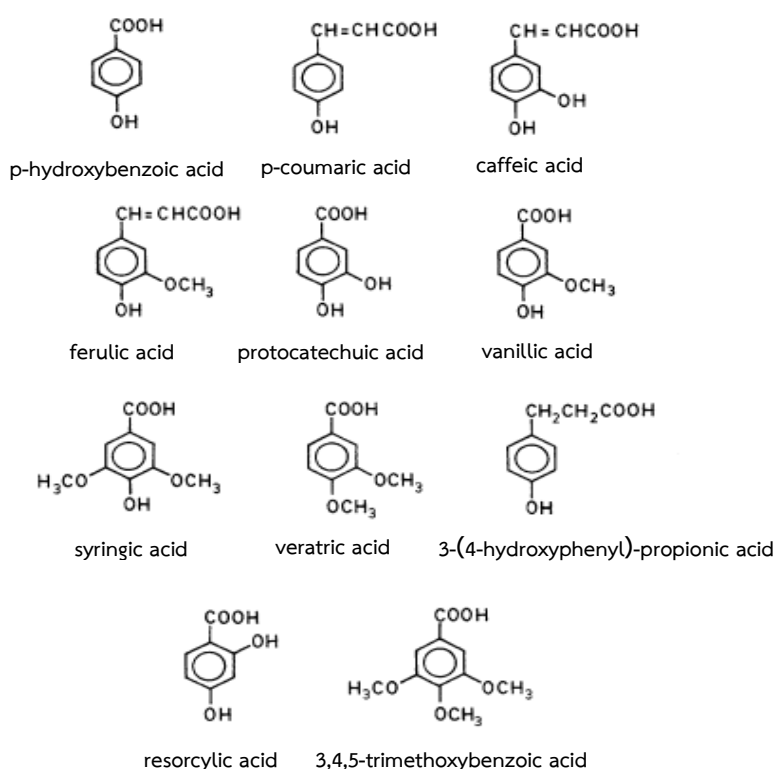
กระบวนการบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ ระบบบ่อหมักไร้อากาศร่วมกับบ่อปรับเสถียร ระบบบ่อหมักไร้อากาศร่วมกับบ่อเติมอากาศและบ่อผึ่ง (Oxidation pond) การบำบัดทางกายภาพร่วมกับเคมี และการกรองด้วยเมมเบรน (Membrane filtration) (Wu *et al.*, 2009; Kaewmai *et al.*, 2013) ในปัจจุบันโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีการนำ ระบบรวบรวมก๊าซชีวภาพจากบ่อหมักไร้อากาศมาใช้เพิ่มขึ้น เนื่องจากระบบดังกล่าวช่วยลดภาระ ความสกปรกของสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีส่วนช่วยในการลดผลกระทบ ด้านมลภาวะทางน้ำได้อีกทางหนึ่ง และกระบวนการหมักแบบไร้อากาศมีศักยภาพสูงในการย่อยสลาย อินทรีย์วัตถุเพื่อสร้างก๊าซชีวภาพ โดยน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มซึ่งมีอุณหภูมิสูงและมีน้ำมัน ปนอยู่ด้วย จะถูกกำจัดน้ำมันและไขมันออกก่อน โดยใช้ปอดักไขมันซึ่งกักน้ำเสียเอาไว้ทำให้อุณหภูมิลดลง และทำให้ไขมันลอยตัวขึ้นสู่ผิวบนของบ่อ จากนั้นกวาดชั้นไขมันออกเป็นระยะๆ น้ำเสียที่ผ่านการแยกน้ำมันและลดอุณหภูมิลงแล้วจะนำเข้าสู่บ่อหมักไร้อากาศของระบบก๊าซชีวภาพต่อไป

กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพเริ่มต้นด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ในขั้นแรก จุลินทรีย์หลายชนิดที่อยู่ร่วมกันในระบบจะสลายสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มักจะไม่ละลายน้ำ ให้แตกตัวเป็นสารอินทรีย์เชิงเดี่ยวที่เป็นอนุโมเลกุลเริ่มต้น (Building blocks) ของชีวโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน โดยอาศัยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ในระบบ เพื่อการเปลี่ยนสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เล็กลง และละลายน้ำได้ดีขึ้น เพื่อให้แบคทีเรียประเภทสร้างกรด (Acidogenic bacteria) สามารถย่อยสลายสารละลายอินทรีย์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ให้เป็นกรดอินทรีย์โมเลกุลสั้นที่ระเหยได้ง่าย หรือ volatile fatty acid (VFA) เช่น valeric acid, butyric acid และ propionic acid เป็นต้น ขั้นตอนนี้เรียกว่า Acidogenesis หรือปฏิกิริยาการสร้างกรดอินทรีย์ และมีจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งคือ กลุ่มสร้างกรดอะซิติก (Acetogenic bacteria) มาย่อยสลายกรดอินทรีย์เหล่านี้ได้เป็น acetic acid และ formic acid ขั้นตอนนี้เรียกว่า acetogenesis หรือปฏิกิริยาการสร้างกรดอะซิติก เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซมีเทน และสุดท้ายแบคทีเรียสร้างมีเทน (Methanogens) มาเปลี่ยนเป็นมีเทน (CH_4) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ขั้นตอนนี้อาศัยปฏิกิริยา methanogenesis หรือปฏิกิริยาการสร้างมีเทน ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นได้จะต้องอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Farhad *et al.*, 2010) ก๊าซชีวภาพที่ได้เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic digestion) มีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ก๊าซมีเทน (CH_4) ประมาณร้อยละ 60-70 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ประมาณร้อยละ 28-38 ก๊าซอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) และไนโตรเจน (N_2) ประมาณร้อยละ 2 เป็นต้น จะเห็นว่าก๊าซชีวภาพจะประกอบด้วยก๊าซมีเทนเป็นหลัก ซึ่งก๊าซมีเทนเป็นก๊าซที่ให้ค่าพลังงานความร้อนสูงโดยสามารถให้พลังงานความร้อนได้สูงถึงประมาณ 9,000 กิโลแคลอรีต่อลูกบาศก์เมตร ซึ่งมีคุณสมบัติติดไฟได้ จึงสามารถนำก๊าซชีวภาพไปใช้ประโยชน์ในรูปของพลังงานได้ เช่น เผาเพื่อใช้ประโยชน์จากความร้อนโดยตรง หรือเป็นเชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้า เป็นต้น (กรมอุตสาหกรรม, 2549; Linke, 2006)

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ากระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ ถูกยับยั้งโดยสารอะโรมาติกที่มีความเข้มข้นสูง เช่น สารประกอบฟีนอลิก และกรดไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก (Camarillo and Rincon, 2009) ซึ่งเป็นน้ำเสียที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกซึ่งปนเปื้อนในน้ำเสียส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพ จึงมีความจำเป็นต้องบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนเข้าสู่ระบบผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพ

1.2.4 คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี และความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างทางเคมีพื้นฐานประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่แทนที่สำคัญคือ หมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่อย่างน้อยหนึ่งหมู่ และอาจมีหมู่แทนที่ต่างๆ แทนที่ในตำแหน่งอื่นๆ ได้อีก โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มกรดฟีนอลิก (simple phenolic acid) เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีวงอะโรมาติกสร้างพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่หรือมากกว่านั้น เช่น gallic acid, protocatechuic acid และ vanillic acid เป็นต้น กลุ่มที่สอง คือ โพลีฟีนอล (polyphenols) เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีวงอะโรมาติกมากกว่าสองวงมาสร้างพันธะกัน อาจมีหมู่เคมีอื่นๆ มาแทนที่ในวงอะโรมาติก จนเกิดเป็นโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนเกาะกันจนเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight polymer) (Balasundrum *et al.*, 2006) ตัวอย่างโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก ดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันมะกอก การผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ และการผลิตไวน์

ที่มา : Heredia *et al.* (2001)

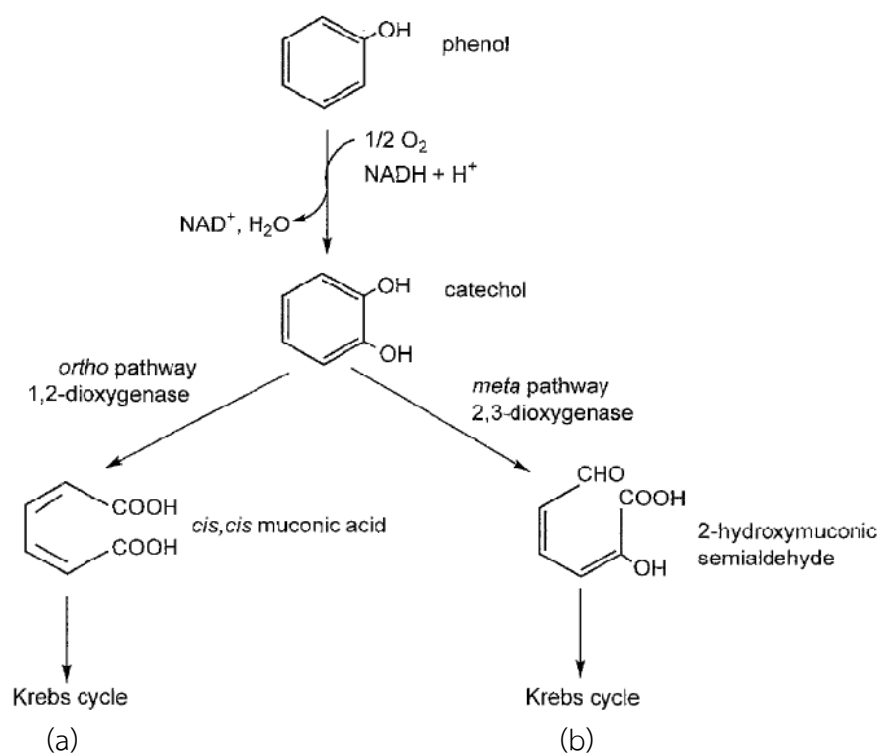
สารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นสารมลพิษอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อมได้ตามธรรมชาติหรือเกิดจากการกระทำของมนุษย์ (Arutchelvan *et al.*, 2005) แหล่งที่มาหลักของการปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลิกในสิ่งแวดล้อมคือ น้ำเสียจากอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ปิโตรเลียม เกษกรรม การผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ (Pishgar *et al.*, 2011) และพบมากในอุตสาหกรรมที่ใช้พืชเป็นวัตถุดิบ เช่น อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันมะกอก และสกัดน้ำมันปาล์ม (Limkhuan suwan and Chaiprasert, 2010) ความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอลิกส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นในระบบนิเวศแหล่งน้ำ เช่น สาหร่าย แบคทีเรีย และสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง อีกทั้งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อปัจจัยต่างๆ ในระบบนิเวศ เช่น การละลายของออกซิเจน ความเค็ม ความกระด้างของน้ำ อุณหภูมิ และมีผลต่อองค์ประกอบที่มีชีวิต (biotic factor) ได้แก่ การลดสถานะเจริญพันธุ์ ยับยั้งการเจริญเติบโตของตัวอ่อน (Babich and Davis, 1981) เป็นต้น

สำหรับความเป็นพิษต่อสุขภาพสามารถแพร่เข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังได้ง่าย และสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังจัดเป็นสารก่อมะเร็ง (จุลณีย์ แสงระวี, 2547) ดังนั้นสารประกอบฟีนอลิก จึงถูกจัดเป็นสารมลพิษที่อันตรายมากที่สุดประเภทหนึ่งที่ USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) ได้เสนอให้ควบคุมคุณภาพของน้ำที่ใช้ตามครัวเรือนให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงสุดไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อลิตร และมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลต่อลิตร ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดชอบอุณหภูมิปานกลางได้ (mesophiles) (Mutzel *et al.*, 1996) นอกจากนี้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้จุลินทรีย์พบว่ามีการชะลอตัวหรือยับยั้งการย่อยสลายของสารดังกล่าวเกิดขึ้น เช่น น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก (Feitkenhauer *et al.*, 2001) ซึ่งมีสาเหตุจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากสารกลุ่มนี้เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนภายในเยื่อหุ้มเซลล์ จึงส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ลดลง ดังนั้นทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดทางชีวภาพลดลง (Keweloh *et al.*, 1990) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Borja *et al.* (1996) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกที่มีต่อกลุ่มจุลินทรีย์สร้างกรดอะซิติกและมีเทน พบว่าสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่ม Ortho-diphenols เช่น caffeic และ protocatechuic acids กลุ่ม monophenolic เช่น p-coumaric และ p-hydroxybenzoic acids ซึ่งพบในน้ำเสียประเภทนี้ มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่ม จึงส่งผลให้ปริมาณการผลิตก๊าซมีเทนลดลง

1.2.5 การย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิก

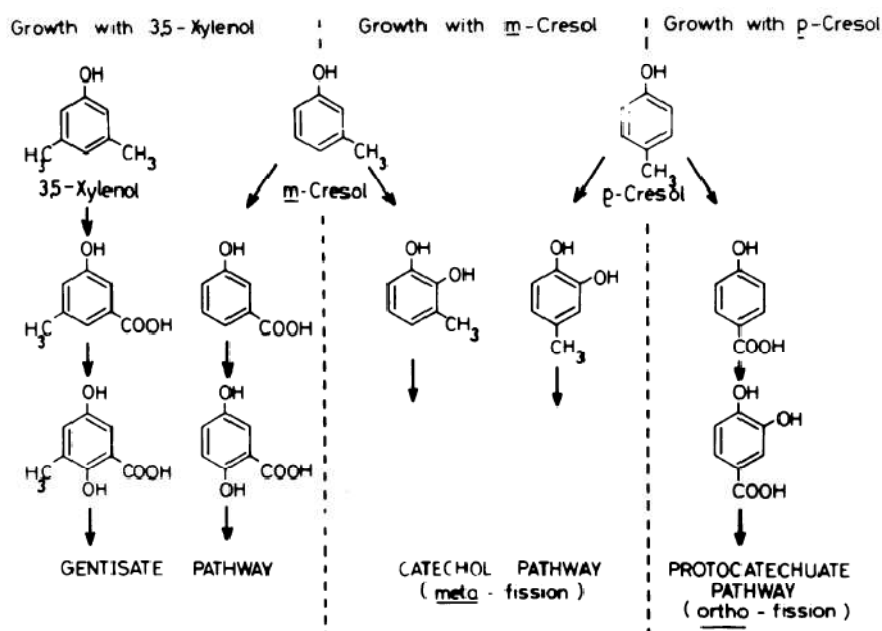
การบำบัดสารประกอบฟีนอลิกสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีการทางกายภาพและเคมี เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) การดูดซับ (adsorption) การเกิด

ออกซิเดชันทางเคมี (chemical oxidation) เป็นต้น วิธีการเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง และอาจมีการก่อตัวของสารอันตรายเกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากสามารถลดค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ และสามารถเกิดกระบวนการเปลี่ยนรูปของสารอินทรีย์ไปเป็นสารอนินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) (Loh *et al.*, 2000) จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้สารประกอบฟีนอลิกและอนุพันธ์เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน สำหรับการเจริญที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันภายใต้สภาวะใช้และไร้ออกซิเจน (Ahmad and Kunhi, 2011) ซึ่งการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบกลุ่มนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของสาร เป็นต้น แต่โดยทั่วไปกระบวนการย่อยสลายสารฟีนอลซึ่งเป็นอนุพันธ์ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างอย่างง่ายของสารประกอบฟีนอลิกภายใต้สภาวะใช้อากาศ เกิดขึ้นได้อย่างแพร่หลายมากกว่า (Melo *et al.*, 2005) กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของสารฟีนอลภายใต้สภาวะใช้อากาศมี 2 วิธี คือ วิธีเมตา (meta-pathway) และวิธีออร์โธ (ortho-pathway) ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 วิธีการย่อยสลายฟีนอล (a) วิธีออร์โธ (Ortho-pathway) (b) วิธีเมตา (Meta-pathway)
ที่มา : Van Schie *et al.* (2000)

ในขั้นแรกของการย่อยสลายสารดังกล่าวภายใต้สภาวะใช้อากาศ โมเลกุลของออกซิเจนจะถูกใช้โดยเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลส (phenol hydroxylase) เพื่อเติมกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ในตำแหน่งที่สอง และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกิดเป็นแคตคอลล (catechol) ต่อมาเกิดการแตกวงของแคตคอลล (ring cleavage) ซึ่งสามารถเกิดได้ 2 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งออร์โทและเมตา หากย่อยสลายผ่านวิถีเมตาได้สารตัวกลางคือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกแอซิด (2-hydroxymuconic acid) โดยเอนไซม์ 2,3 ไดออกซิจีเนส (2,3-dioxygenase) หรือผ่านวิถีออร์โท (ortho-pathway) ได้สารตัวกลางเป็น ซิส-ซิสมิวโคนิกแอซิด (cis,cis-muconic acid) โดยเอนไซม์ 1,2 ไดออกซิจีเนส (1,2 dioxygenase) ก่อนจะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (krebs cycle) และเมแทบอลิซึมทั่วไปของสิ่งมีชีวิต (Van Schie *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ แบบอาศัยออกซิเจน โดย Hopper and Taylor (1975) ได้ทำการศึกษาวิธีการย่อยสลายสาร 3,5-xyleneol, m-cresol และ p-cresol โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* พบว่าวิธีการย่อยสลายเริ่มจากการเติมออกซิเจนเข้าสู่โมเลกุลเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างเกิดเป็นแคตคอลล จากนั้นเอนไซม์ 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase และ 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase ทำให้เกิดการแตกวงของสารแคตคอลล ซึ่งสามารถเกิดได้ 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งออร์โทและเมตา ซึ่งการแตกวงของแคตคอลลที่ตำแหน่งต่างกันั้น ส่งผลให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่ต่างกัน ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ และเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 วิธีการย่อยสลายสาร 3, 5-xyleneol, m-cresol และ p-cresol โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas putida*

ที่มา : Hopper and Taylor (1975)

1.2.6 แบคทีเรียทนร้อนจี้นัส *Bacillus* และการใช้ประโยชน์ในด้านสิ่งแวดล้อม

จุลินทรีย์ทนร้อนสามารถแบ่งกลุ่มได้จากลักษณะการเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิ 70 ถึง 110 องศาเซลเซียส แยกได้เป็น 2 กลุ่มคือ 1) กลุ่มอาร์เคีย (archaea) เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 103-110 องศาเซลเซียส เช่น จี้นัส *Pyrobaculum* และ *Pyrodictium* เป็นต้น และ 2) กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 55-70 องศาเซลเซียส เช่น แบคทีเรียในจี้นัส *Bacillus Thermus* และ *Clostridium* โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถคัดแยกได้จากสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น ดิน น้ำเสีย ทะเลสาบ น้ำทะเล ดินตะกอน และในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง เช่น น้ำพุร้อน เป็นต้น (Müller *et al.*, 1998) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทนร้อน มีข้อดีในการช่วยลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Mutzel *et al.*, 1996) และสภาวะการย่อยสลายในอุณหภูมิสูงเป็นประโยชน์ต่อการดูดซึมและการละลายของสารอินทรีย์ ช่วยให้อัตราเมแทบอลิซึมและเอนไซม์มีความเสถียรสูง (Duffner and Müller, 1998) จึงได้มีการนำแบคทีเรียทนร้อนมาใช้ประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อมมากขึ้น แบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่โดดเด่นด้านศักยภาพการย่อยสลายสารมลพิษในสิ่งแวดล้อม และมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายได้แก่ Thermophilic bacilli พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษได้หลากหลายชนิด เช่น สารฟีนอล สารเบนโซเอท สารครีซอล และกลุ่มสารประกอบอะโรมาติกอื่นๆ (Ali *et al.*, 1998)

ดังเช่นการศึกษาที่ผ่านมาใช้ *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างน้ำและโคลนจากน้ำพุร้อนในประเทศไอซ์แลนด์ เป็นเชื้อแกรมบวก รูปแท่งกลุ่มใช้อากาศ เจริญเติบโตได้ในช่วงพีเอช 5-8 และช่วงอุณหภูมิ 55-70 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ A2 สามารถใช้ฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยสามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 94 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเท่ากับ 6 พร้อมทั้งสามารถเจริญเติบโตและย่อยสลายไอโซเมอร์ของสารครีซอลได้ จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรีย A2 เกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของสารฟีนอลผ่านวิถีเมตา (meta-pathway) (Mutzel *et al.*, 1996) โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารฟีนอลและครีซอล คือ phenol hydroxylase และ catechol 2,3-dioxygenase (Duffner and Müller, 1998) ในการย่อยสลายสารฟีนอลซึ่งเป็นหนึ่งในอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิก พบว่า *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 มีอัตราการเจริญสูงกว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) เช่น *Pseudomonas putida* ถึง 4 เท่า โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rates) ที่ 2.8 ต่อชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของสารฟีนอล 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของสารฟีนอล 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะอยู่ที่ 1 ต่อชั่วโมง และพบว่าในระบบหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch) ที่ระดับความเข้มข้นของสารฟีนอล 470 มิลลิกรัม

ต่อลิตร แบคทีเรียจะเข้าสู่ช่วง lag phase ภายใน 1 วัน และระดับความเข้มข้นของสารฟีนอล 94 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียจะเข้าสู่ช่วง lag phase อย่างรวดเร็วเพียงไม่กี่ชั่วโมง ดังนั้นในระบบหมักแบบกึ่งกะแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และสอดคล้องกับปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงขึ้น และสารชีวมวลที่เซลล์ผลิตขึ้นนั้นเมื่อนำมาตรวจวัดด้วยวิธี Thin-layer chromatography พบการปล่อย EPS โดยแบคทีเรีย A2 ซึ่งประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ (enzyme kinetics) ในแบคทีเรียชนิดนี้ซึ่งใช้สารฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิต (yield coefficient, $Y_{x/s}$) 0.8-1 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมฟีนอล ซึ่งสูงกว่าผลผลิตของแบคทีเรียชนิดชอบอุณหภูมิปานกลาง ($Y_{x/s}$ เท่ากับ 0.4-0.52 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมฟีนอล) (Feitkenhauer *et al.*, 2001)

พันธ์ริตา จันทรโท (2557) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดขั้นต้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้แบคทีเรียเทอร์มอโรน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 และเปรียบเทียบการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียที่ผ่านและไม่ผ่านการบำบัด จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ A2 (หัวเชื้อเริ่มต้นประมาณ $OD_{580}=1.0$) สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากความเข้มข้นเริ่มต้น 1,434 มิลลิกรัมต่อลิตรได้สูงสุดที่ร้อยละ 60 ในวันที่ 10 ของการทดลอง และมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับ 3.56 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ภายใต้ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7 ในน้ำเสียที่ไม่มีการเจือจาง และน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นเป็นเวลา 10 วัน สามารถลดสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดในน้ำเสียได้สมบูรณ์ ได้แก่ ferulic acid, *p*-coumaric acid และ phenol แต่ยังคงพบกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกดังนี้ gallic acid > 4-hydroxybenzoic acid > protocatechuic acid > ผลรวมของ caffeic acid, syringic acid และ vanillic acid การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดเป็นเวลา 2, 6 หรือ 10 วัน มีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนเท่ากับ 18.78, 86.68 และ 123.04 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดี และให้ปริมาณก๊าซมีเทนร้อยละ 49.3, 70.4 และ 64.9 ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด (11.35 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดี และร้อยละ 24.6)

นอกจากนี้แบคทีเรียเทอร์มอโรน *Bacillus thermoglucosidasius* สายพันธุ์ A7 (Duffner *et al.*, 2000) มีการศึกษาว่าสามารถย่อยสลายสารฟีนอลและสารครีซอลได้ โดย Annweiler *et al.* (2000) ได้ศึกษาการย่อยสลายสารเนฟทาลีน (naphthalene) โดยแบคทีเรียเทอร์มอโรน *Bacillus thermoleovorans* ซึ่งย่อยสลายสารเนฟทาลีนได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และมีความสามารถในการย่อยสลายได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มชอบอุณหภูมิปานกลาง ซึ่งมีข้อจำกัดในการย่อยสลายสารปนเปื้อนที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) เช่น เนฟทาลีน เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงช่วยเพิ่มค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน ซึ่งช่วยขจัดออกซิเจนที่ละลายลดลงเนื่องจากน้ำเสียมียค่า BOD สูงหรือมีสารอินทรีย์มาก

(Margesin and Schinner, 2001) จากประสิทธิภาพของแบคทีเรียทนร้อนที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีอุณหภูมิ และองค์ประกอบของสารอินทรีย์สูง

การนำแบคทีเรียทนร้อนจีส bacilli มาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายสารมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม ดังเช่นการศึกษาของ Hamed *et al.* (2013) ได้คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ในวงศ์ *Bacillaceae* จากโคลนบริเวณแท่นกลั่นน้ำมันในประเทศตุนิเซีย เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้งจากโรงกลั่นน้ำมัน พบว่าในระบบแบทช์ที่มีการเจือจางน้ำเสีย แบคทีเรียทั้งสี่สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus licheniformis* STK08, *Geobacillus stearothermophilus* STM04, *Lysinibacillus sphaericus* STZ75 และ *Bacillus firmus* STS84 สามารถลดสารไฮโดรคาร์บอนได้สูงสุดภายใน 18 วัน ที่ร้อยละ 98, 87, 80 และ 72 ตามลำดับ และสามารถลดค่าซีโอดีได้สูงสุดที่ร้อยละ 78, 78, 82 และ 75 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์การเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่า *B. licheniformis* STK08 และ *G. stearothermophilus* STM04 สามารถเจริญเติบโตภายใต้ระดับความเค็ม 120 กรัมต่อลิตรที่ 55 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Chebbi *et al.* (2014) ได้คัดเลือกแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ CAN55 จากตัวอย่างน้ำเสียของอุตสาหกรรมผลิตฟอสเฟตในประเทศตุนิเซีย พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลายสาร 1-decanethiol และ decyl disulfide ได้ที่ร้อยละ 83 และ 39 ตามลำดับ ภายใน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่ไม่มีการเติมยีสต์สกัดสามารถย่อยสลายสาร dodecanethiol ได้ที่ร้อยละ 70 ภายใน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และพบว่ายังสามารถย่อยสลายสาร 1-heptanethiol และ cyclohexylmercaptan ได้ ซึ่งเชื่อที่คัดเลือกได้นี้อาจเป็นประโยชน์สำหรับการบำบัดทางชีวภาพในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสาร mercaptan

1.2.7 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ และการใช้ประโยชน์ในการบำบัดสารมลพิษ

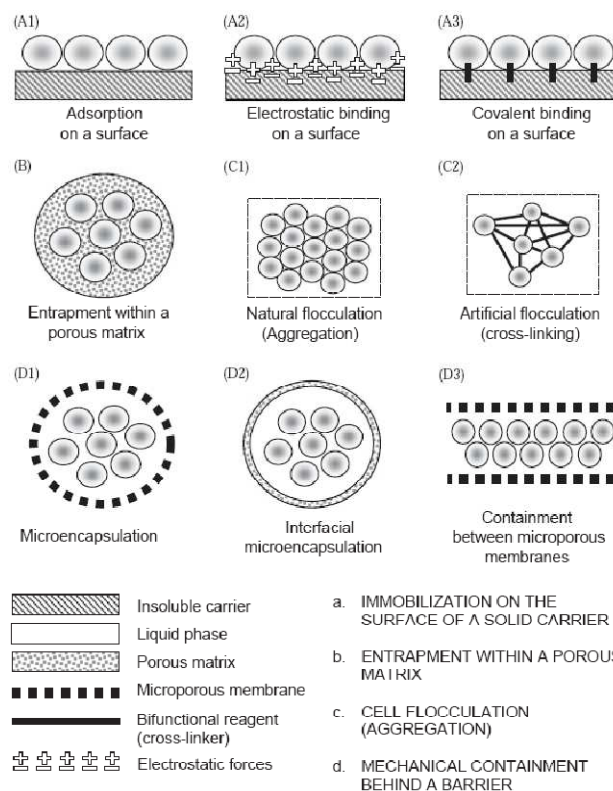
การบำบัดสารมลพิษในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความนิยม เนื่องจากสามารถลดสารปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม กระบวนการดังกล่าวอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ในพื้นที่ หรือจุลินทรีย์ที่เติมลงสู่บริเวณปนเปื้อนเพื่อลดความเป็นพิษของสารเหล่านั้นในสิ่งแวดล้อม องค์ประกอบพื้นฐานที่สำคัญในการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ ได้แก่ ชนิดและคุณสมบัติของจุลินทรีย์ รวมไปถึงปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญและวิถิเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์เหล่านั้น (อลิสวา วังโน, 2550) โดยทั่วไปมีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ แต่ที่ระดับความเข้มข้นสูงอาจเกิด

ปัญหาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Prieto *et al.*, 2002) ทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตก โปรตีนในเซลล์ตกตะกอน ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำลายโครงสร้างของเซลล์ ทำให้การผ่านเข้าออกของสารในเซลล์ผิดปกติ อันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตาย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544) การใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ (cell immobilization) เป็นอีกวิธีการหนึ่งในการปกป้องเซลล์จากความเสียหายข้างต้นและรักษาอัตราการเจริญของเซลล์อย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีการนำมาใช้ในการบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนในน้ำเสียอย่างแพร่หลาย พบว่าข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงคือ เซลล์มีความคงทนต่อสารพิษได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ความหนาแน่นของเซลล์สูงส่งผลให้มีอัตราการย่อยสลายสารพิษสูง อัตราการไหลภายในระบบเพิ่มขึ้นส่งผลดีต่อการแลกเปลี่ยนออกซิเจนและการถ่ายโอนมวล และการเร่งปฏิกิริยามีความเสถียร (Lee *et al.*, 1994) สามารถป้องกันเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงของพีเอช อุณหภูมิ และยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ นอกจากนี้สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน ซึ่งช่วยลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ (Kourkoutas *et al.*, 2004) เทคนิคในการตรึงเซลล์สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท (รูปที่ 1.5) ตามกลไกทางกายภาพ ได้แก่ (เอ็ม น้อยเลิศ, 2555; Kourkoutas *et al.*, 2004)

1) การยึดเกาะหรือดูดซับบนพื้นผิวพาหะที่ไม่ละลายน้ำ อาจแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ กระบวนการดูดซับหรือยึดเกาะ (Adsorption/attachment method) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยเซลล์มีการดูดซับพาหะด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals force) และ hydrophobic interaction การตรึงวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่มีข้อเสียคือ แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนทำให้สูญเสียเซลล์ได้ง่าย อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของ พีเอช ค่าความแรงไอออน (ionic strength) การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศ และการแบ่งเซลล์ รวมทั้งอัตราการดูดซับเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยของตัวนำค่อนข้างต่ำ ตัวอย่างสารหรือวัสดุที่ใช้เป็นตัวดูดซับเซลล์ด้วยวิธีนี้ ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ (เซลลูโลส) พอลิเมอร์สังเคราะห์ วัสดุเซลลูโลส (ไม้และแกลบ) และสารอินทรีย์ (เซรามิกพูนและแก้วพูน) เป็นต้น วิธีที่สอง คือ Covalent binding method เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับ Activated support โดยสารพาหะจะเชื่อมต่อกับหมู่อะตอมซึ่งเป็นส่วนประกอบของผิวเซลล์ เช่น หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หรือหมู่ฟีนอลของโปรตีน ข้อดีของวิธีนี้คือ เซลล์จะเชื่อมอยู่กับผิวหน้าตัวพาหะอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัว และการรั่วไหลของเซลล์น้อย แต่ข้อเสียคือ ในการสร้างพันธะโควาเลนต์จำเป็นต้องใช้สารตัวนำที่มีการตัดแปลงโดยใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยา ซึ่งมักเป็นพิษต่อเซลล์ ตัวอย่างสารที่ใช้เป็นตัวยึดเซลล์ เช่น activated porous silica bead, zirconia ceramic และ agarose bead เป็นต้น

2) การกักขัง (Entrapment) จุลินทรีย์จะถูกกักไว้ในช่องว่างของวัสดุที่เป็นรูพรุนหรือการจำกัดจุลินทรีย์ไว้ในเมทริกซ์ที่เป็นของแข็งหรือมีรูพรุน เช่น เมมเบรน เจลที่มีความเสถียร (Scott, 1987; Couto, 2009) เจลพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น คาราจีแนน (carrageenan) อัลจิเนต

(alginate) ไคโตซาน (chitosan) เป็นต้น และพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น โพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) โพลียูรีเทน (polyurethane) โพลีไวนิล (polyvinyl) เป็นต้น (Katzbauer *et al.*, 1995) ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นการกักขังเซลล์ภายใต้เครือข่ายที่แข็งแรง เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์หลุดออกจากเมทริกซ์ในขณะที่มีการถ่ายเทสารอาหารและเมแทบอลิต์ (metabolite) การกักขังเซลล์ในวัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติเป็นที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ แต่พบว่ามีข้อจำกัดเรื่องความแข็งแรงเชิงกลของวัสดุและขนาดพื้นที่รองรับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้น ก่อให้เกิดการแตกร้าวของวัสดุทำให้เซลล์หลุดออกจากวัสดุตรึง (Couto, 2009) ในขณะที่วัสดุพอลิเมอร์สังเคราะห์อาจเกิดความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ นอกจากนี้การตรึงเซลล์แบบกักขังยังมีข้อจำกัดเรื่องการแพร่ผ่านของสาร การกระจายของก๊าซและของเหลวภายในวัสดุ ซึ่งมีผลต่อกิจกรรมเมแทบอลิซึมของเซลล์ (Lee and Palsson, 1994; Cassidy *et al.*, 1996)



รูปที่ 1.5 เทคนิคการตรึงเซลล์ในรูปแบบต่างๆ

ที่มา : Kourkoutas *et al.* (2004)

3) การรวมตะกอน (Aggregation) สามารถแบ่งได้เป็น การรวมตะกอนเซลล์โดยธรรมชาติและการใช้สารช่วยจับกลุ่มอนุภาคทำให้เกิดตะกอน เช่น การเชื่อมเซลล์ (แบบไขว้)

เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวกไบ (bi-) หรือมัลติฟังก์ชันนอลรีเอเจนต์ (multifunctional reagent) เช่น glutaraldehyde และ toluene disocyanate เป็นต้น ซึ่งเป็นการเชื่อมเซลล์ภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรงทำให้เซลล์ตายได้ จึงเหมาะกับการตรึงในกรณีที่ต้องการใช้ปฏิกิริยาเชิงเดี่ยวเท่านั้น

4) การกักไว้ในตัวกัน (Containment) เป็นการกักเซลล์ไว้ระหว่างตัวกันที่สามารถเข้าถึงได้ เช่น ตัวกรองเมมเบรนที่มีรูพรุนระดับไมโครเมตร หรือการกักขังเซลล์ไว้ในไมโครแคปซูล (microcapsule) หรือการตรึงเซลล์บนพื้นผิวที่เกิดปฏิกิริยาของของเหลวสองชนิดที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน การตรึงประเภทนี้เหมาะต่อสภาวะที่มีการถ่ายโอนสารค่อนข้างต่ำ

จากเทคนิคการตรึงเซลล์ข้างต้น พบว่ากระบวนการดูดซับหรือยึดเกาะของเซลล์ด้วยวิธีธรรมชาติเป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่าย มีประสิทธิภาพ สามารถขยายขนาดเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ง่ายกว่าการตรึงแบบกักขัง การเจริญเติบโตของเซลล์และกิจกรรมทางชีวเคมีสูง เนื่องจากเซลล์มีการสร้างฟิล์มชีวภาพ (Biofilms) ยึดเกาะบนวัสดุซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ที่เซลล์สร้างขึ้นแล้วขับออกภายนอกเซลล์ โดยส่วนใหญ่จะเป็นสารพวก extracellular polymeric substances หรือ exopolysaccharides (EPS) ซึ่งมีองค์ประกอบ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ดีเอ็นเอ และไขมัน (Lee and Palsson, 1994; Rosche *et al.*, 2009; Robledo-Ortiz *et al.*, 2010) ทั้งนี้สภาวะในการผลิต EPS ของเซลล์จุลินทรีย์มีผลต่อปริมาณและองค์ประกอบที่ทำให้ศักยภาพในการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุแตกต่างกัน (รูปที่ 1.6) และจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณการผลิต EPS โดยแบคทีเรีย ซึ่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญและการสร้าง EPS โดยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนั้นๆ นอกจากนี้ไนโตรเจนจำเป็นต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ EPS (Gandhi *et al.*, 1997; วรรัตน์ วงศ์ศุภชาติ, 2551) โดยมีการศึกษาถึงสภาวะของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิต EPS ของแบคทีเรียดังนี้

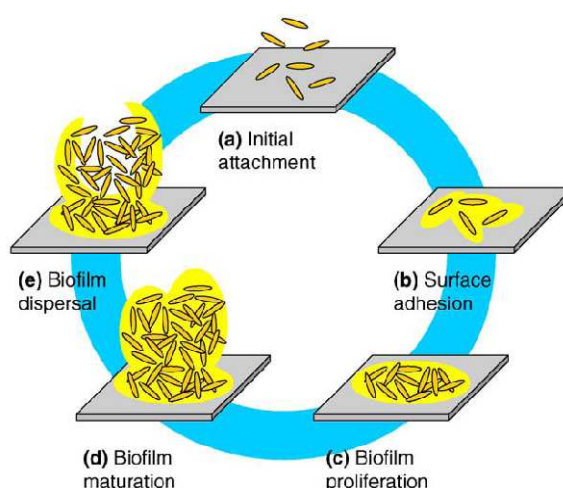
การผลิต EPS ของแบคทีเรียทนร้อน *Geobacillus* สายพันธุ์ 4004 พบว่ามีการผลิต EPS สูงถึง 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่มี sucrose หรือ trehalose เป็นแหล่งคาร์บอน โดยไม่มีการเติมไนโตรเจน และในระหว่างการเจริญเติบโตพบว่าเซลล์มีการเพิ่มผลผลิตของ biopolymer เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ EPS (Moriello *et al.*, 2003)

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิต EPS มีรายงานการศึกษาถึงการใช้ทั้งแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น การศึกษาของ Himanslm *et al.* (1997) ศึกษาการผลิต EPS ของ *Bacillus megaterium* โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมออกซาลेट แอมโมเนียมไนเตรต ไตรแอมโมเนียมซิเตรต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟส โซเดียมไนเตรต โพแทสเซียมไนเตรต และยูเรีย

พบว่า *Bacillus megaterium* สามารถผลิต EPS ได้สูงสุดเมื่อใช้ แอมโมเนียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสามารถผลิต EPS ได้ 11.70 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ Ko *et al.* (2000) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต EPS โดยจุลินทรีย์ *Hahella chejuensis* โดยศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนดังต่อไปนี้ เปปโตน, ยีสต์สกัด, ผงมอลต์, ทริปโตน, ซอยโตน (soytone), เคซีน (casein), NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl และ $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ ในอาหาร yeast extract malt extract glucose (YMG) พบว่าผลผลิต EPS ของเชื้อในสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์มีค่าสูงกว่าในสารอนินทรีย์ โดยพบว่าทริปโตนให้ค่าการผลิต EPS สูงที่สุดประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

Liu *et al.* (2009) ศึกษาการผลิต EPS ของแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 ภายใต้อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส พีเอช 8 ระยะเวลา 60 ชั่วโมง พบว่าที่สภาวะอาหารที่มีการเติมซูโครสร้อยละ 3 และยีสต์สกัดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสามารถผลิต EPS ได้สูงสุด ประมาณ 22.82 กรัมต่อลิตร

แต่ทั้งนี้มียางานการศึกษาของ Obuekwe and Al-Muttawa (2001) ทำการตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีธรรมชาติเพื่อประยุกต์ใช้ในการบำบัดทางชีวภาพของสารมลพิษปิโตรเลียม โดยใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนคือ *Arthrobacter* sp. และเชื้อจีส *Bacillus* ซึ่งคัดแยกจากบ่อน้ำมันในประเทศคูเวต ซึ่งผลการศึกษาคุณสมบัติด้านไฮโดรโฟบิกของพื้นผิวแบคทีเรีย และการผลิต EPS บนวัสดุตรึง ได้แก่ ทราช พบว่าแบคทีเรียทั้งสองไม่สามารถผลิต EPS ในระดับที่สามารถตรวจสอบได้ภายใต้สภาวะอาหาร nutrient broth (NB) และ proteose peptone/yeast extract/glucose broth (PYG) แต่พบการผลิต EPS ในอาหาร mineral salts ที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนใดๆ

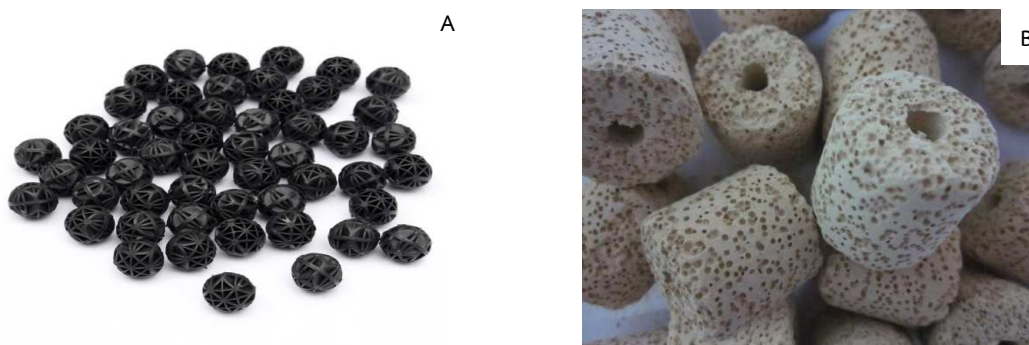


รูปที่ 1.6 วัฏจักรการสร้างฟิล์มชีวภาพ

ที่มา : Rosche *et al.*, (2009)

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคการตรึงเซลล์แบบยึดเกาะมาใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย เช่น Jimenez *et al.* (2012) พบว่าเซลล์แบคทีเรีย *Delftia tsuruhatensis* BM90 ซึ่งคัดแยกจากทะเล Tyrrhenian ในประเทศอิตาลี มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้หลากหลาย จากการตรึงบนเซลล์โลสที่ผ่านการดัดแปลงทางเคมีจนมีรูพรุนระดับมาโครเป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการสร้าง extracellular structure เรียกว่า เส้นใย EPS เช่น พิวไลหรือพิมเบรีย เพื่อให้เซลล์เกาะติดบนวัสดุได้ดีขึ้น โดยเส้นใยดังกล่าวสามารถมองเห็นภายใต้กล้อง Scanning electron microscope (SEM) จากนั้นได้มีการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในระบบแบบกะพบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ถึงร้อยละ 90 ใน 48 ชั่วโมง ซึ่งประสิทธิภาพในการลดสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าเซลล์อิสระถึง 2 เท่า

ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ คือ การคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ โดยวัสดุต้องมีความเป็นรูพรุนสูง พื้นที่ผิวมาก เพื่อให้เซลล์ใช้ในการเกาะติด ไม่ละลายน้ำ ไม่เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ ทนต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ-เคมี เนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องเตรียมในสภาวะปลอดเชื้อ จึงต้องทนต่อความร้อน ความดันได้สูง ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ และสิ่งแวดล้อม วัสดุที่นำมาใช้สามารถเตรียมได้ง่ายเพื่อประสิทธิภาพในการตรึง มีเทคนิคการตรึงที่ไม่ยุ่งยาก ประหยัดค่าใช้จ่าย คงทนต่อการนำไปใช้งานและเก็บรักษาไว้ได้นาน (Brányik *et al.*, 2000; Kourkoutas *et al.*, 2004) สำหรับวัสดุตรึงเซลล์ มีการเลือกใช้วัสดุที่หลากหลายซึ่งแต่ละชนิดมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน โดยวัสดุจากธรรมชาติเป็นวัสดุที่มีข้อดีในส่วนที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และราคาไม่แพง ตัวอย่างชนิดและคุณสมบัติของวัสดุตรึงที่นำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย โดยทั่วไปดังแสดงในรูปที่ 1.7 และตารางที่ 1.2



รูปที่ 1.7 ตัวอย่างวัสดุที่ใช้บำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ ได้แก่ โปโอบอล (A) และ เซรามิกสร้าง (B)
ที่มา : <http://www.aliexpress.com>

ตารางที่ 1.2 คุณสมบัติของวัสดุจริงชนิดต่างๆที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ

คุณสมบัติ	ไบโอบอล	ปะการัง	เซรามิกส์ริง
ความหนาแน่น (g/cm^3)	0.2	1.2	0.7
พื้นที่สำหรับจุลินทรีย์ต่อน้ำหนัก (m^2/kg)	1.3-1.4	18	23
พื้นที่สำหรับจุลินทรีย์ต่อปริมาตร (m^2/litre)	0.2-0.3	13	17.6
พื้นที่ผิว (m^2/g)	0.004	6	1.3

ที่มา : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (2556)

1.2.8 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้เซลล์ตรึง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลิกโดยการใช้เซลล์ตรึงพบว่ามีการตรึงเซลล์โดยการกักขังเซลล์บนเมทริกซ์ต่างๆ และการเกาะติดของเซลล์ด้วยวิธีธรรมชาติ โดยงานวิจัยส่วนใหญ่เน้นการทดสอบสารฟีนอลซึ่งเป็นอนุพันธ์ชนิดหนึ่งของสารประกอบฟีนอลิก ดังตัวอย่างเช่น Chung *et al.* (2003) เปรียบเทียบการย่อยสลายสารฟีนอลโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึง *Pseudomonas putida* CCRC14365 บนแคลเซียมอัลจิเนตเจล พบว่าเซลล์อิสระสามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ไม่เกิน 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การตรึงเซลล์จุลินทรีย์สามารถทนต่อระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นของฟีนอลได้ถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบการยับยั้งการทำงานของเซลล์อิสระโดยสารฟีนอลภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในช่วงความเข้มข้น 100-150 มิลลิกรัมต่อลิตร Wang *et al.* (2007) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Acinetobacter* sp. ที่ได้จากการคัดแยกจากระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศจีน พบว่าการตรึงบนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้สูงประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 9 ชั่วโมง และช่วยป้องกันแบคทีเรียเมื่อมีการเปลี่ยนอุณหภูมิและพีเอช อีกทั้งสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้สูงสุด 20 ครั้ง สามารถเก็บเซลล์ตรึงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 50 วัน และ Ahmad *et al.* (2012) ศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึง *Acinetobacter* sp. AQ5NOL 1 ในเจลแลนแกม พบว่าเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลอย่างสมบูรณ์ภายใน 5, 9 และ 10 วัน ที่ความเข้มข้นของฟีนอล 1,100, 1,500 และ 1,900 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระย่อยสลายสารฟีนอลที่ความเข้มข้น 1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สมบูรณ์ภายใน 10 วัน ที่ส่วนความเข้มข้นที่สูงขึ้นไม่สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์

นอกจากนี้มีการศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลโดยการตรึงเซลล์ *Candida* sp. และ *Pseudomonas* sp. บนถ่านกัมมันต์ พบว่าจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ตรึงบนถ่านกัมมันต์ไม่สามารถทนต่อความเข้มข้นของฟีนอลที่สูงกว่า 1.5 กรัมต่อลิตร แต่เซลล์ตรึงสามารถมีชีวิตรอดที่ความเข้มข้นของฟีนอลสูงประมาณ 15 กรัมต่อลิตร (Ehrhardt and Rehm, 1985) Pazarlioglu *et al.* (2005) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Pseudomonas putida* ที่ถูกตรึงบนหินพัมมิช พบว่าเซลล์ตรึงบนหินพัมมิชสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 1 กรัมต่อลิตร ในเวลา 22 ชั่วโมงและสามารถใช้เซลล์ตรึงซ้ำได้ และ Adav *et al.* (2007) ได้ศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. ซึ่งคัดแยกจากตะกอนจุลินทรีย์ ผลจากการทดสอบแบบกะ เซลล์อิสระมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เซลล์ที่ทำการตรึงบนวัสดุโพลียูรีเทนโฟมโดยวิธีตรึงเซลล์แบบเกาะติด พบว่าเซลล์สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของสารฟีนอล 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับการย่อยสลาย 19.7 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อจบการทดสอบพบว่ามีความเข้มข้นของชีวมวลบนพื้นผิวโพลียูรีเทนโฟมเพิ่มขึ้นถึง 925 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกทั้ง Khongkhaem *et al.* (2011) ศึกษาการตรึงแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 โดยวิธีการตรึงเซลล์แบบกักขัง ในซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงให้สามารถย่อยสลายสารฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงได้ พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นระหว่าง 7,500 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้เซลล์ตรึงยังสามารถย่อยสลายสารฟีนอลอย่างต่อเนื่องได้ถึง 55 วัน

สำหรับการย่อยสลายฟีนอลโดยแบคทีเรียจีส *Bacillus* พบว่ายังไม่มีการศึกษามากนัก ตัวอย่างเช่น การย่อยสลายสารฟีนอลโดยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตโดย *Bacillus Cereus* AKG1 MTCC9817 และ AKG2 MTCC 9818 พบว่าเซลล์ตรึง AKG1 และ AKG2 สามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้มากกว่าร้อยละ 50 ที่ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรภายใน 26 และ 36 วัน ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระมีการย่อยสลายฟีนอลได้เพียงร้อยละ 32 และ 20 ที่ 22 วันและ 30 วันตามลำดับ ซึ่งเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้มากกว่าเซลล์อิสระ แสดงให้เห็นถึงความทนต่อพิษของสารดังกล่าวที่ความเข้มข้นสูงของเซลล์ตรึง และสามารถเก็บเซลล์ตรึงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 30 วัน โดยที่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไม่ลดลง (Banerjee and Ghoshal, 2011)

ส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอนุพันธ์อื่นๆของสารประกอบฟีนอลิกทั้งในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริง มีดังต่อไปนี้ การย่อยสลายสาร 4-chlorophenol โดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง *Alcaligenes* sp. บนแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ

4-chlorophenol ในช่วง 0.4-0.55 มิลลิโมลาร์ เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้เร็วกว่าเซลล์อิสระ (Westmeier and Rehm, 1985) และ Ettayebi *et al.* (2003) ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกโดยเซลล์ตรึง *Candida tropicalis* YMEC14 ในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าสามารถลดโมโนฟีนอลและโพลีฟีนอลได้ถึงร้อยละ 69.2 และ 55.3 ตามลำดับภายใน 24 ชั่วโมง

Khongkhaem *et al.* (2014) ศึกษาการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้แบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ตรึงบนซิลิกา การศึกษาในระบบแบทช์โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ caffeic acid, ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid, catechol และ 3-methylcatechol ที่ความเข้มข้น 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ดี และสามารถกำจัดสารฟีนอลและสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นสูงถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาศึกษาต่อในระบบตัวกรองชีวภาพขนาดเล็กแบบ Internal loop airlift bioreactor โดยใช้แบคทีเรียตรึงปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 5 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 26.7 และ 112 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ที่ร้อยละ 83 และ 60 ตามลำดับ นอกจากนี้ระบบตัวกรองชีวภาพสามารถใช้งานได้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1,200 ชั่วโมง และจากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย โดยใช้เทคนิค SEM พบการเกาะติดของแบคทีเรียภายในซิลิกาตลอดการทดลอง

Tosu *et al.* (2015) ศึกษาการตรึงแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอล (phenol-degrading bacteria) ระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนทะเลสาปาล์มเปล่า ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อกำจัดสารฟีนอลในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าเซลล์แบคทีเรียมีการสร้างเส้นใย EPS เกาะติดบนทะเลสาปาล์มเปล่าในระหว่างกระบวนการตรึง จากผลการกำจัดสารฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว carbon free mineral medium (CFMM) พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพและอัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงกว่าเซลล์อิสระที่ทุกความเข้มข้นของสารฟีนอล โดยเซลล์ตรึงสามารถกำจัดสารฟีนอลได้ที่ความเข้มข้นสูงถึง 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพเซลล์ตรึงบนทะเลสาปาล์มเปล่า ด้วยวิธีการกระตุ้นด้วยฟีนอล การปรับตัว (Acclimatization) และใช้วิธีการร่วมระหว่างการกระตุ้นและการปรับตัว พบว่าการกระตุ้นเซลล์ตรึงด้วยฟีนอลในอาหาร CFMM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาย่อยสลายสารฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม สามารถลดสารดังกล่าวได้ถึงร้อยละ 63.4 จากความเข้มข้นเริ่มต้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลสามารถ

กำจัดได้เพียงร้อยละ 35 นอกจากนี้เซลล์ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง และเก็บไว้ได้นาน 4 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลยังคงเดิม

ในการศึกษาผลของปริมาณเซลล์ตรึงที่แตกต่างกันต่อประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในอาหาร CFMM และในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พนิดา โตะสุ (2555) ได้ทำการแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนทะเลสาบปาล์มเปล่า คือ 0.5, 1.5 และ 3.0 กรัม เพื่อให้ได้สัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหารเหลวเท่ากับ 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมเซลล์ตรึง 0.5 กรัม (1:10 w/v) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลสูงถึงร้อยละ 98 จากความเข้มข้นของสารฟีนอลเริ่มต้นเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบการแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงต่อสัดส่วนน้ำทิ้งเพิ่มเติม เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำทิ้งมีปริมาณสารอินทรีย์ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งมีการเพิ่มขนาดของวัสดุที่ใช้ตรึงให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้งานบำบัดน้ำเสีย โดยทำการแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้ง 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) ทดสอบในน้ำทิ้งที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาอัตราส่วนเซลล์ตรึงต่อน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกที่ดีที่สุด ผลการทดลองพบว่าที่สัดส่วน 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) สามารถลดฟีนอลได้ร้อยละ 40, 64 และ 54 ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองสัดส่วนเซลล์ตรึงต่ออาหาร CFMM พบว่าสัดส่วนของเซลล์ตรึงที่เหมาะสมของน้ำทิ้งมีปริมาณมากกว่าในอาหารเหลว อาจเพราะการเพิ่มขนาดของวัสดุตรึงมีผลต่อปริมาณการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุ อัตราการแพร่ผ่านของสาร และองค์ประกอบของน้ำทิ้งอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึง สำหรับชุดควบคุมคือ ทะเลสาบปาล์มเปล่า ปราศจากเซลล์ เพื่อศึกษาผลทางกายภาพและเคมีต่อการลดลงของฟีนอล (abiotic controls) พบว่าที่สัดส่วน 1:10, 3:10 และ 6:10 (w/v) มีการดูดซับฟีนอลเพียงเล็กน้อยที่ร้อยละ 3, 7 และ 9 ตามลำดับ

อนุกุล เกียรติขวัญบุตร (2556) ศึกษาการคัดเลือกราไวท์รอต 10 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดแล้วทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว จากผลการคัดเลือกพบว่า *Trametes hirsute* สายพันธุ์ AK4 มีอัตราการกำจัดสี และทนทานต่อสารประกอบฟีนอลิกความเข้มข้นสูงที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ดีที่สุด จึงคัดเลือกสายพันธุ์นี้มาตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ทำการศึกษาในระบบบำบัดแบบสองขั้นตอน โดยย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 แล้วจึงบำบัดต่อโดยใช้ราตรึง พบว่าวิธีการนี้สามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกได้สูงสุดถึงร้อยละ 87 และ 82 ตามลำดับ หลังจากการบ่มเป็นระยะเวลา 8 วัน โดยไม่จำเป็น

ต้องมีการเจือจางน้ำเสียและไม่ต้องเติมสารอาหารอื่นๆ แต่อย่างใด และสามารถตรวจพบกิจกรรมของ เอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ Laccase และ Manganese peroxidase

Kietkwanboot *et al.* (2015) ได้ศึกษาการคัดเลือกราไวท์รอตที่มีศักยภาพในการ กำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดแล้ว และ นำมาตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน พบว่าราไวท์รอตที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เป็นเวลา 6 วัน สามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิกและสีในน้ำทิ้งที่เจือจาง 2 เท่าได้สูงสุดที่ร้อยละ 80.6 และ 94 ตามลำดับ หลังวันที่ 8 ของการทดลอง อีกทั้งมีการทดสอบการดูดซับของสารประกอบฟีนอลิกโดย วัสดุตรึงเซลล์และในเส้นใยของรา พบว่าทะเลาะปาล์มเปล่ามีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกและสีไว้ ร้อยละ 13 และ 14.6 ตามลำดับ ในขณะที่ทะเลาะปาล์มที่มีราตรึงและผ่านการฆ่าเชื้อ (heat-killed cells) ซึ่งเป็นตัวแทนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ลดลงเป็นผลมาจากการดูดซับโดยทะเลาะปาล์ม เปล่า และ/หรือการดูดซับโดยเส้นใยของรา มีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกและสีไว้ร้อยละ 21.5 และ 18.4 ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Lakhtar *et al.* (2010) ซึ่งทดลองกำจัดสีในน้ำ ทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก โดยใช้เส้นใยของราไวท์รอต *Lentinus edodes* ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่ามีการสะสมของสารประกอบอินทรีย์ที่ทำให้เกิดสีในเส้นใยของราไวท์รอตประมาณร้อยละ 10 ของสีเริ่มต้น

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาข้างต้น สามารถยืนยันข้อดีและประสิทธิภาพของเซลล์ ตรึงในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกได้เป็นอย่างดี งานวิจัยนี้จึงสนใจใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ แบบที่เรียกว่าแบบเกาะติดบนเม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบ เพื่อให้เซลล์ตรึงมีความทนทานต่อความเข้มข้น ของสารประกอบฟีนอลิกที่ปนเปื้อนในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม การเลือกใช้วัสดุดังกล่าวเพื่อ เป็นการเพิ่มทางเลือกหนึ่งในการใช้ประโยชน์ ลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อสารเคมี และวัสดุสังเคราะห์ และมีขั้นตอนการตรึงเซลล์ที่ไม่ยุ่งยากสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำได้ ซึ่งช่วยลดระยะเวลาและ ค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือไนโตรเจน ต่อประสิทธิภาพการตรึง แบบที่เรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 บนเม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบ

1.3.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงและสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย สารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้แบคทีเรียทนร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่ถูกตรึงบนเม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบ

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus* สายพันธุ์ A2 บนวัสดุตรึง คือ เม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบ โดยศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุ การเกาะติดของแบคทีเรียในวัสดุตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุตรึง ด้วยการวิเคราะห์การผลิต EPS ของแบคทีเรีย โดยศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่มีต่อการผลิต EPS ในระหว่างการตรึงเซลล์ นำเซลล์ตรึงมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยศึกษาผลของอุณหภูมิ พีเอชและค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่มีต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์ตรึงในระบบกะ ตลอดจนศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ระบบกรองชีวภาพที่บรรจุเซลล์ตรึง ในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยทำการแปรผันระยะเวลาที่เก็บน้ำเสีย (Hydraulic retention Time; HRT) ในระบบต่อเนื่อง โดยใช้สภาวะที่มีความเหมาะสมที่สุดจากการศึกษาขั้นตอนก่อนหน้านี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

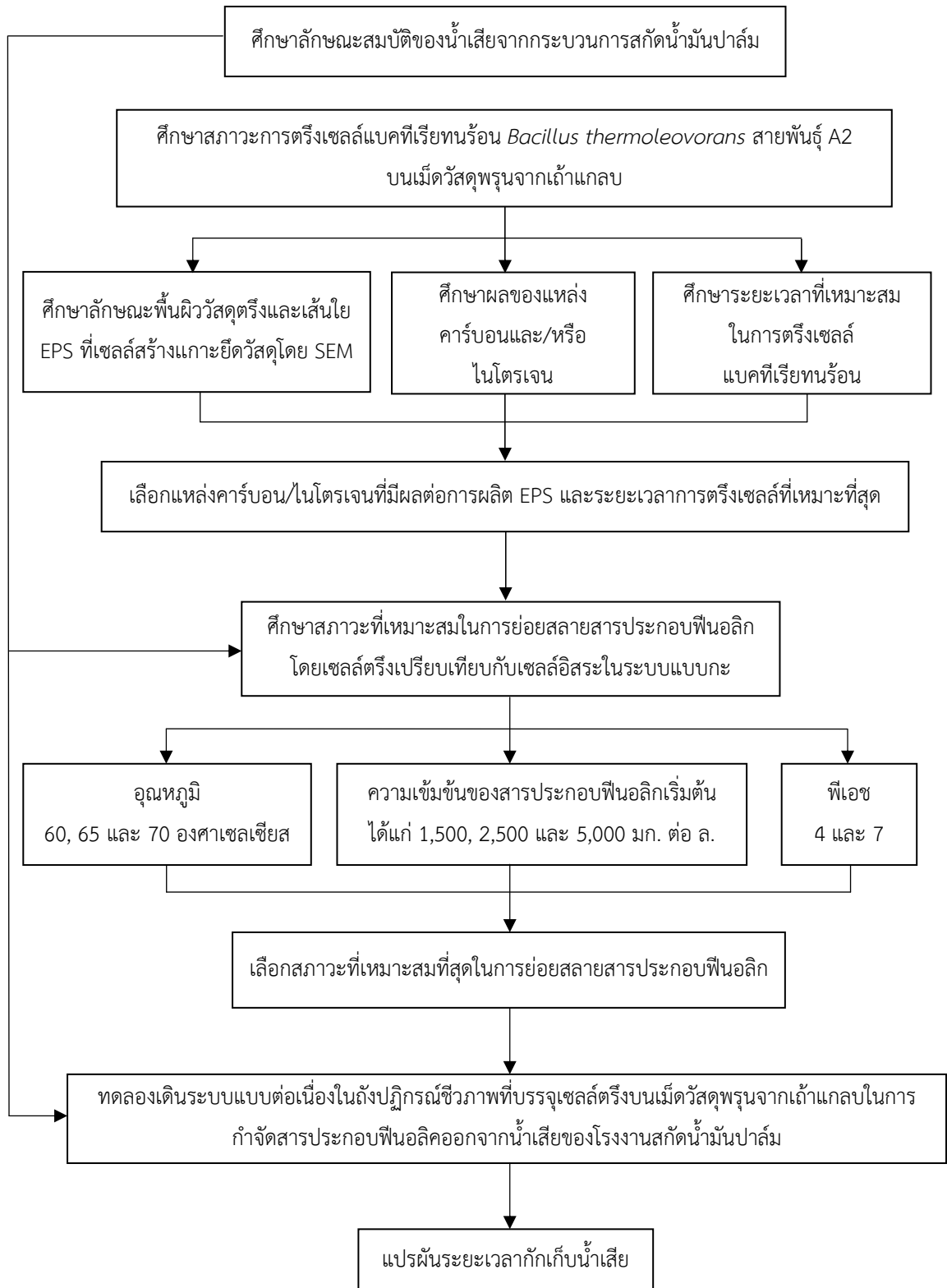
- 1.5.1 ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์แบคทีเรียทนร้อนบนเม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบ
- 1.5.2 ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเซลล์ตรึงบนเม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบ
- 1.5.3 ทราบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงบนเม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบในระบบกรองชีวภาพแบบต่อเนื่อง ในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
- 1.5.4 เพื่อเป็นแนวทางในการนำเซลล์ตรึงไปประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

บทที่ 2

วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 ภาพรวมขั้นตอนวิธีดำเนินงานวิจัย

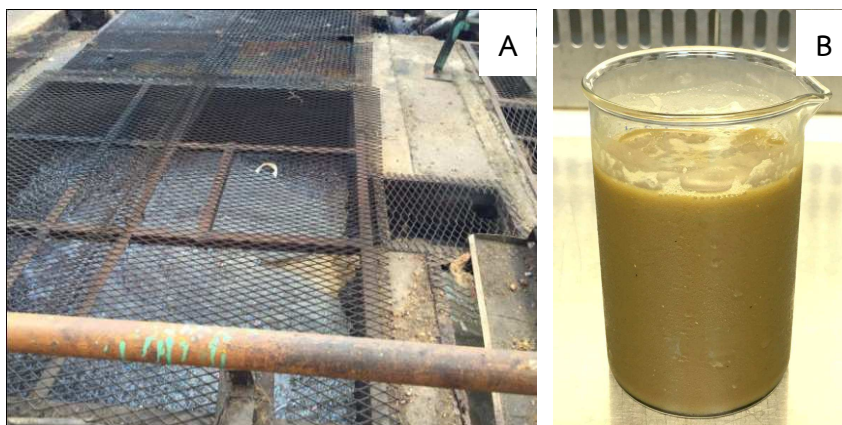
งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 โดยศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือไนโตรเจนต่อปริมาณการสร้าง exopolysaccharides (EPS) ของเซลล์แบคทีเรีย รวมทั้งระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกาะยึดของแบคทีเรียบนวัสดุตรึง ทำการวิเคราะห์ปริมาณการผลิต EPS ของแบคทีเรีย โดยใช้วิธี Alcian blue adsorption assay จากนั้นนำเซลล์ตรึงที่สภาวะของแหล่งคาร์บอนและ/หรือไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิต EPS ได้ดีที่สุด และระยะเวลาการตรึงเซลล์ที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองถัดไป คือ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก โดยเซลล์ตรึงเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในระบบแบบกะ ด้วยการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolics) ทำการแปรผันปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และเลือกสภาวะอุณหภูมิ พีเอชและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ให้ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดในระบบกะ มาทำการทดลองต่อในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Packed bed bioreactor ที่บรรจุเซลล์ตรึงในเม็ดวัสดุพูนจากแก้วกลม เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำเสียของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในระบบต่อเนื่อง โดยแปรผันระยะเวลากักเก็บน้ำเสีย (Hydraulic retention time, HRT) ให้ครอบคลุมระยะเวลาที่เหมาะสมในระบบกะ ทำการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก รวมทั้งพารามิเตอร์น้ำเสียอื่นๆ ซึ่งสามารถแสดงภาพรวมขั้นตอนวิธีดำเนินงานวิจัยดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย

2.2 การเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มของโรงงานในจังหวัดสตูล จำนวน 1 แห่ง โดยเก็บจากบ่อรวบรวมน้ำเสียที่ออกจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มก่อนปล่อยลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (รูปที่ 2.2 A) นำตัวอย่างน้ำเสียกรองตะกอนด้วยผ้าขาวบางเพื่อกำจัดตะกอนแขวนลอยและของแข็งออกจากน้ำเสียก่อนนำไปใช้ในการทดลอง (รูปที่ 2.2 B) และเก็บตัวอย่างน้ำเสียทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาลักษณะของน้ำเสียให้คงที่ตลอดการ



รูปที่ 2.2 บ่อรวบรวมน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม (A) และลักษณะสีของน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มที่นำมาใช้ในการทดลอง (B)

2.3 การวิเคราะห์ลักษณะของน้ำเสีย

วิเคราะห์ลักษณะสมบัติทั่วไปของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ตามวิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสียใน Standard methods for examination of water and wastewater (APHA *et al.*, 2005) ดังพารามิเตอร์ต่อไปนี้: พีเอช (pH) ซีโอดี (Chemical oxygen demand, COD) ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total suspended solids, TSS) ไขมันและน้ำมัน (Oil and grease) ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Folin-Ciocalteu) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 วิธีวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทั่วไปของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
พีเอช	pH meter
ซีโอดี	Open reflux method
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด	Total suspended solids dried at 103-105°C
พอสฟอรัส	Persulfate / Ascorbic acid method
ไนโตรเจน	Kjeldahl method
น้ำมันและไขมัน	Soxhlet extraction method
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด*	Folin-Ciocalteu

หมายเหตุ : *วิธีการดัดแปลงจาก Ergul *et al.* (2011)

2.4 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

งานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ซึ่งคัดแยกจากน้ำพุร้อนในประเทศไอร์แลนด์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก เช่น ฟีนอล และคริสซอลได้ (Mutzel *et al.*, 1996) ทำการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อ จากการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น (Pre-inoculum) ในอาหารเหลว carbon free mineral medium (CFMM) ที่มีการเติมกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ทริปโตนและยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย ดังภาคผนวก ก (Mutzel *et al.*, 1996) บ่มและขยายที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในระยะ Late-log phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและมีปริมาณชีวมวลของเซลล์สูง (พันธ์ธิดา จันทร์โท, 2557) จากนั้นนำแบคทีเรียมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร CFMM และเติมฟีนอลให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้เป็นตัวชักนำการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นและล้างเซลล์ด้วยวิธีการตามข้างต้น สำหรับหัวเชื้อที่ใช้ในการตรึงเซลล์ ทำการละลายเซลล์ในอาหารตามสภาวะที่ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือไนโตรเจนต่อการสร้าง EPS ของแบคทีเรียโดยปรับความขุ่นของเชื้อ (Optical density, OD) ที่ 580 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1.0 ส่วนหัวเชื้อชุดการ

ทดลองเซลล์อิสระ ทำการละลายตะกอนเซลล์ในสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85 ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย

2.5 ศึกษาวิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย

2.5.1 การเตรียมวัสดุตรึงเซลล์

เตรียมเม็ดวัสดุพูนจากเถ้าแกลบ (Rice husk ash pellets) (รูปที่ 2.3) ซึ่งผลิตโดยศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และการสนับสนุนจากสำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติร่วมกับบริษัทสิ่งแวดล้อมพลังงานและเทคโนโลยี จำกัด โดยนำเถ้าแกลบมาผ่านกระบวนการขึ้นรูปเป็นเม็ด โดยใช้น้ำ ไม่ใช่สารเคมี กรด หรือตัวเชื่อมประสานใดๆ อบไล่ไอน้ำ แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิสูง 1,100 องศาเซลเซียส ได้เม็ดวัสดุที่มีลักษณะพูน ซึ่งคุณสมบัติของวัสดุตรึงดังตารางที่ 2.2 ก่อนการทดลองนำวัสดุตรึงขนาด 0.5 เซนติเมตร มาล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัดฝุ่นผงที่ตกค้างอยู่ในวัสดุตรึง นำไปอบจนแห้ง และทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องมือหนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์ และนำไปศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)



รูปที่ 2.3 เม็ดวัสดุพูนจากเถ้าแกลบขนาด 0.5 เซนติเมตร

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของเม็ดวัสดุพูนจากเถ้าแกลบที่ใช้ในการศึกษา

คุณสมบัติ	ค่าที่วิเคราะห์ได้
ความหนาแน่น (g/cm^3)	0.8
พื้นที่สำหรับจุลินทรีย์ต่อน้ำหนัก (m^2/kg)	50*
พื้นที่สำหรับจุลินทรีย์ต่อปริมาตร (m^2/litre)	110*
พื้นที่ผิว (m^2/g)	10**

หมายเหตุ : * คำนวณโดยใช้ขนาดเม็ด ~1.20 เซนติเมตร รูปร่างเป็นทรงกลม กำหนดว่าพื้นที่ที่จุลินทรีย์สามารถเข้าอยู่ได้มากที่สุด ระดับความลึกจากผิวประมาณ 1 มิลลิเมตร

** ค่าวิเคราะห์พื้นที่ผิวด้วยวิธี Surface area porosity analyzer (BET)

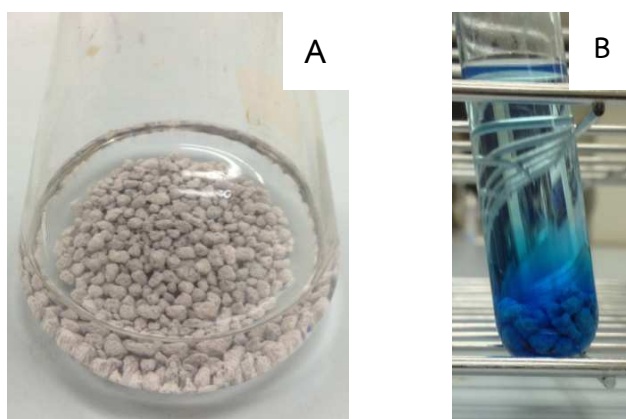
ที่มา : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (2556)

2.5.2 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้าง EPS ของแบคทีเรีย

ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือไนโตรเจนต่อการสร้าง EPS ของแบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 บนวัสดุตรึงเซลล์ คือ เม็ดวัสดุพูนขนาด 0.5 เซนติเมตร โดยอาศัยเทคนิคการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุตรึงด้วยวิธีธรรมชาติ (self-attachment immobilization) ทำการเปรียบเทียบสภาวะต่าง ๆ ดังนี้ 1) อาหาร CFMM ที่มีการเติมเฉพาะแหล่งไนโตรเจนไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน 2) สภาวะอาหาร CFMM ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน 3) สภาวะอาหาร CFMM ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 1 และ 2 และ 4) สภาวะอาหาร CFMM ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน โดยเลือกใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 มาใช้ในการศึกษาดังนี้ แหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส (glucose) สำหรับอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์แตกต่างกัน จึงแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนทั้งอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ ทริปโตน (tryptone), ยีสต์สกัด (yeast extract) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) โดยแปรผันชนิดของคาร์บอนและไนโตรเจน ให้มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.01, 0.05 และ 0.1 (w/v) (Mutzel *et al.*, 1996; Lin and Sung, 2006) เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS

การทดลองเริ่มต้นโดยนำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 2.4 มาบ่มร่วมกับวัสดุตรึงที่เตรียมตามข้อ 2.5.1 ในสภาวะอาหารต่างๆ (รูปที่ 2.4 A) ดังตารางที่ 2.3 ทั้งนี้ใช้หัวเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับวัสดุตรึงปริมาณ 1 กรัม ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สัดส่วนดังกล่าว วัสดุตรึงมีการเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ ช่วยให้เม็ดวัสดุพอรุนสัมผัสกับเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารได้อย่างทั่วถึง เตรียมชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแล้วออกจากเซลล์อิสระที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยการกรอง โดยใช้กระดาษกรอง GF/C ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ล้างเซลล์ตรึงด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85 2 ครั้ง จากนั้นนำมาทดสอบการสร้าง EPS ด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay (รูปที่ 2.4 B) ตามวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman (1993) ดังรายละเอียดหัวข้อ 2.8.2 เก็บตัวอย่างจนกว่าการสร้าง EPS จะคงที่ ซึ่งถือเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แบคทีเรียร่วมกับเม็ดวัสดุพอรุนจากถ้ำเกลือ เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงนำชุดตัวอย่างที่สามารถสร้าง EPS บนเม็ดวัสดุพอรุนได้ดีที่สุดไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ชุดควบคุมการทดลองประกอบด้วยวัสดุตรึงจากถ้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธี Autoclaving บ่มร่วมกับอาหารที่แปรผันตามสภาวะที่ทำการศึกษา โดยไม่มีการเติมแบคทีเรียเพื่อศึกษาการดูดซับของสารละลายสี Alcian blue บนเม็ดวัสดุพอรุน เซลล์ตรึงที่เตรียมได้นำไปศึกษาลักษณะการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)



รูปที่ 2.4 เม็ดวัสดุพอรุนจากถ้ำเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) การย้อมสี EPS ของเซลล์ตรึงด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay (B)

ตารางที่ 2.3 สภาวะของแหล่งคาร์บอนและ/หรือไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษาการสร้าง EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2

แหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งไนโตรเจน		% ความเข้มข้น (w/v)
C	กลูโคส	0.01
N	ทริปโตน	0.05
	ยีสต์สกัด	0.1
	แอมโมเนียมคลอไรด์	
2N	ทริปโตนและยีสต์สกัด	0.1/0.05
	ทริปโตนและแอมโมเนียมคลอไรด์	0.1/0.1
	ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมคลอไรด์	0.05/0.1
C+N	กลูโคสและทริปโตน	0.1/0.1
	กลูโคสและยีสต์สกัด	0.1/0.05
	กลูโคสและแอมโมเนียมคลอไรด์	0.1/0.1
Without C/N	ไม่เติม C และ N	-

2.6 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์ตรึงในระบบกะ

การทดลองนี้เลือกใช้น้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มเป็นน้ำเสียต้นแบบที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นส่วนประกอบในผลปาล์มถูกสกัดออกมาในระหว่างกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน (แบบใช้น้ำ) จึงมีการปนเปื้อนลงสู่น้ำเสียในปริมาณมาก เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในระบบกะ (Batch) โดยใช้เซลล์ตรึงของแบคทีเรียทนร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 จึงแปรผันสภาวะที่สนใจศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช และ ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพ ดังนั้นจึงมีการแปรผันปัจจัยดังกล่าวให้มีความใกล้เคียงกับการนำไปประยุกต์ใช้งานจริง ดังรายละเอียดดังนี้

(1) อุณหภูมิ โดยการแปรผันอุณหภูมิในการศึกษา ได้แก่ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส

(2) พีเอช โดยการแปรผันค่าพีเอช ได้แก่ พีเอช 4 และ พีเอช 7

(3) ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำเสียจริงเป็นค่าเริ่มต้น และทำการเติมสารฟีนอลซึ่งเป็นตัวแทนของสารประกอบฟีนอลิกพื้นฐานที่พบในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากการศึกษาที่ผ่านมา (กุสุมาลย์ ล่องแก้ว, 2557 และ Chantho *et al.*, 2013) เพื่อให้ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารดังกล่าวในน้ำเสียอยู่ในช่วงที่ต้องการศึกษา ได้แก่ 1,500, 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในการศึกษาผลของปัจจัยดังกล่าว ดำเนินการทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเสียปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมเซลล์ตรึง (น้ำหนั้วสดตรึงเซลล์) ปริมาณ 5 กรัม เพื่อศึกษาผลของปัจจัยข้างต้น บ่มตัวอย่างในตู้บ่มตัวอย่างที่ให้อัตราเขย่าที่ 80 รอบต่อนาที ทดลองชุดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก ๆ 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds) เก็บตัวอย่างจนกว่าอัตราการย่อยสลายสารดังกล่าวคงที่ และทำการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนวีสดูตรึงทั้งก่อนและสิ้นสุดการทดลองด้วยวิธี Total plate count ตามวิธีการในข้อ 2.8.3 นำผลการศึกษาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์อิสระ (ใช้หัวเชื้อความเข้มข้นที่ OD₅₈₀ เท่ากับ 0.5 ที่ปริมาตรน้ำเสีย 50 มิลลิลิตร) เพื่อตรวจสอบว่าการใช้เซลล์ตรึงช่วยลดสารประกอบฟีนอลิกที่ระดับความเข้มข้นสูง และเซลล์มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมได้ดีกว่าเซลล์อิสระหรือไม่

การเตรียมชุดควบคุมการทดลอง สำหรับเซลล์ตรึงเพื่อศึกษาการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกโดยปัจจัยอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของแบคทีเรีย (Abiotic loss) ประกอบด้วย เม็ดวีสดูพูนจากแก้วกลบที่ปราศจากเซลล์ (Material only) เพื่อศึกษาการดูดซับของสารประกอบฟีนอลิกโดยตัวเม็ดวีสดูพูนและเซลล์ตรึงที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธี Autoclave (Heat-killed cells) เพื่อศึกษาการดูดซับของสารประกอบฟีนอลิกโดยเส้นใย EPS ที่เซลล์ผลิตขึ้นรวมทั้งการดูดซับโดยตัวเซลล์แบคทีเรีย สำหรับชุดควบคุมของเซลล์อิสระ ใช้น้ำเสียเพียงอย่างเดียวที่ไม่มีการเติมเชื้อทรร้อน ดำเนินการทดลองและทำการศึกษากายใต้ปัจจัยข้างต้น และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds)

นอกจากนี้เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียแล้ว จึงทดลองเพื่อยืนยันว่าการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกในการศึกษาข้างต้น เป็นผลมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียทรร้อนที่ถูกตรึงเป็นหลัก ไม่ใช่การย่อยสลายจากจุลินทรีย์ท้องถิ่น (Indigenous microorganisms) ที่เจริญอยู่ในน้ำเสีย จึงเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของเซลล์ตรึงในน้ำเสียที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมเซลล์ตรึงที่เตรียมได้จากข้อ 2.6 ปริมาณ 5 กรัม ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มตัวอย่างในตู้บ่มตัวอย่างที่ให้อัตราการเขย่าที่ 80 รอบต่อนาที ศึกษาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์ตรึง คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความ

เข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองชุดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก ๆ 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดที่เหลือด้วยวิธี Folin-Ciocalteau เก็บตัวอย่างจนกว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายสารดังกล่าวคงที่

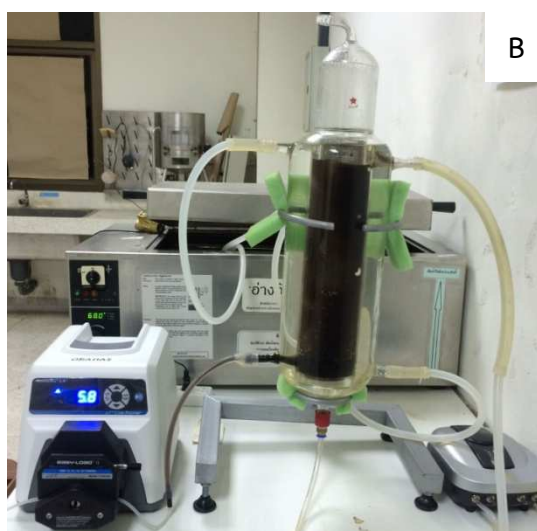
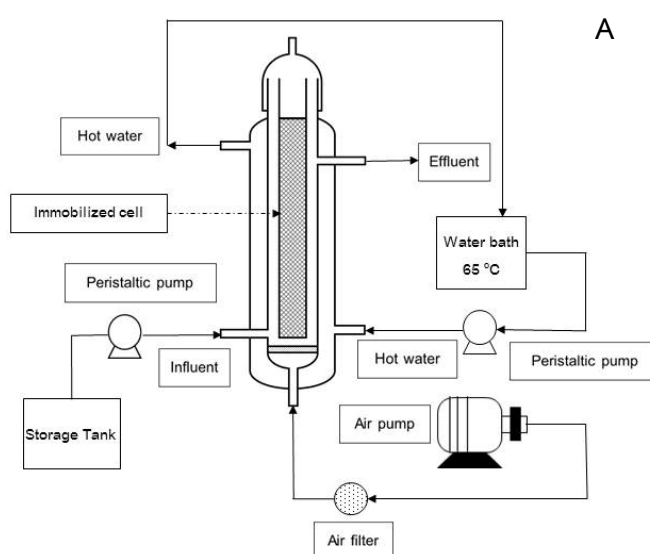
2.6.1 ศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

นำเซลล์ตรึงบนเม็ดวัสดุพอร์นจากถ้ำกลบปริมาณ 5 กรัม ที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่มีพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร มากรองด้วยกระดาษกรองชนิด GF/C ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85 2 ครั้ง นำเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานแล้วมาทดสอบการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกซ้ำในน้ำเสียชุดใหม่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด ดำเนินการทดลองในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเสียปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปบ่มที่ความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 วัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เหลือ และทำการทดลองซ้ำขั้นตอนเดิมโดยนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของเซลล์ตรึงว่าสามารถนำกลับมาใช้งานซ้ำได้ต่อเนื่องหรือไม่ และประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลิกหลังการใช้งานแล้วลดลงหรือไม่ ทดลองซ้ำจนกว่าประสิทธิภาพการบำบัดจะลดลงประมาณร้อยละ 50 ของการใช้งานครั้งแรก

2.7 การทดลองเดินระบบต่อเนื่องในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก

ศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Packed bed (รูปที่ 2.5 A) ที่มีปริมาตรรวมของถังขนาด 1.5 ลิตร และมีปริมาตรการใช้งาน 1 ลิตร ตัวถังทำจากแก้วทรงกระบอกทนความร้อนได้สูงสุด 85 องศาเซลเซียส ถังมีความสูง 55 เซนติเมตร ตัวถังแบ่งออกเป็น 2 ชั้น โดยถังชั้นในเป็นส่วนที่บรรจุวัสดุตรึงเพียงชั้นเดียว (a single large bed) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ความหนาของแก้วชั้นใน 2.2 มิลลิเมตร และชั้นนอกเป็นส่วนที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิ โดยการหล่อด้วยน้ำร้อน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 145 มิลลิเมตร ความหนาของแก้ว 3 มิลลิเมตร การให้อากาศทำโดยปั๊มลมผ่านแผ่นแก้วกระจายอากาศจากด้านล่างของระบบ การเคลื่อนที่ของน้ำเสียจะไหลจากด้านล่างขึ้นสู่ด้านบนของตัวถัง ซึ่งจะถูควบคุมโดยปั๊ม จัดเตรียมระบบดังรูปที่ 2.5 B ทำการทดลองโดยใช้น้ำเสียของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่มีอุณหภูมิ พีเอชและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่เหมาะสมที่สุดจาก

ระบบกะ ได้แก่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร บรรจุเซลล์ตรึงปริมาณ 100 กรัม ในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ปริมาตร 1 ลิตร ควบคุมค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved Oxygen, DO) ให้อยู่ในช่วง 2-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการแปรผันระยะเวลาที่เก็บน้ำเสีย (hydraulic retention time, HRT) ให้ครอบคลุมระยะเวลาที่เหมาะสมในระบบกะ คือ 12 ชั่วโมง ที่อัตราการไหล 1.39 มิลลิเมตร ต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds)



รูปที่ 2.5 ลักษณะทั่วไปของถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Packed bed (A) และถังปฏิกรณ์ที่บรรจุเซลล์ตรึงปริมาณ 100 กรัมและน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 1 ลิตร (B)

2.8 วิธีการวิเคราะห์

2.8.1 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Ergul *et al.* (2011) โดยนำตัวอย่างน้ำเสียมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอน ทำการเจือจางตามความเข้มข้นที่เหมาะสม เติมตัวอย่างน้ำเสียที่เจือจางแล้ว 200 ไมโครลิตร ลงใน Folin-Ciocalteu phenol reagents ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติม 1 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใช้น้ำกลั่นที่ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank และคำนวณค่าความเข้มข้นที่ได้ด้วยการคูณ Dilution factor

2.8.2 การวิเคราะห์การผลิต EPS ของแบคทีเรีย

การวิเคราะห์การผลิต EPS ของแบคทีเรีย ใช้เทคนิค Alcian blue adsorption assay ที่ดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman (1993) โดยการเติมสารละลายสี Alcian blue ร้อยละ 1 ลงในตัวอย่างเซลล์ตรึงที่อาหารเหลว CFMM (หลังจากเก็บตัวอย่างเซลล์ตรึงที่บ่มในระยะเวลาแตกต่างกัน) หลังจากนั้นนำไปเขย่าที่ 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และกรองเอาเซลล์ตรึงออกด้วยกระดาษกรองชนิด GF/C จากนั้นนำส่วนที่เป็นของเหลว (Supernatant) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 606 นาโนเมตร ค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงในอาหารเหลวหลังจากสี Alcian blue ถูกดูดซับโดย EPS จะแปรผันตามปริมาณ EPS ที่เซลล์ผลิตขึ้น ณ เวลาต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างในระยะเริ่มต้นตรึงเซลล์ (สารละลายสี Alcian blue เตรียมโดยละลาย Alcian blue 0.2 กรัม ในกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอชเป็น 2.5)

2.8.3 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล

การสกัดและวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ (phenol-degrading bacteria) ที่ถูกตรึงบนเม็ดวัสดุพอร์นจากถ้ำแกลบ ทำโดยวิธีการดัดแปลงจาก

Pattanasupong *et al.* (2004) ขั้นตอนการสกัดเซลล์แบคทีเรียออกจากวัสดุโดยเติมอาหารเหลว CFMM (ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน) ลงในหลอดแก้วที่บรรจุเซลล์ตรึง ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เพื่อให้เซลล์ดูดซับความชื้นและสามารถหลุดออกจากวัสดุตรึงได้ง่าย นำไป sonicate ด้วยเครื่อง Ultrasonic bath เป็นเวลา 2 นาที และเขย่าด้วยเครื่อง vortex 2 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,500 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์และแขวนลอยเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ก่อนนำไปวิเคราะห์การนับจำนวนแบคทีเรีย (CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง) ด้วยวิธี Total plate count โดยนำสารละลายเซลล์มาเจือจางจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี 10-fold dilution ทำการปิเปตสารละลาย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง จากนั้นใช้เทคนิค Spread plate เกลี่ยสารละลายเซลล์ ให้ทั่วบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีการเติมสารฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ ของแบคทีเรีย นำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวน โคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี และคำนวณแบคทีเรียบนอาหารแข็งต่อกรัมวัสดุ

2.8.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้โปรแกรม SPSS Statistic base ซึ่งนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทาง เดียว (One Way ANOVA) เพื่อศึกษาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้าง exopolysaccharide (EPS) ของแบคทีเรีย

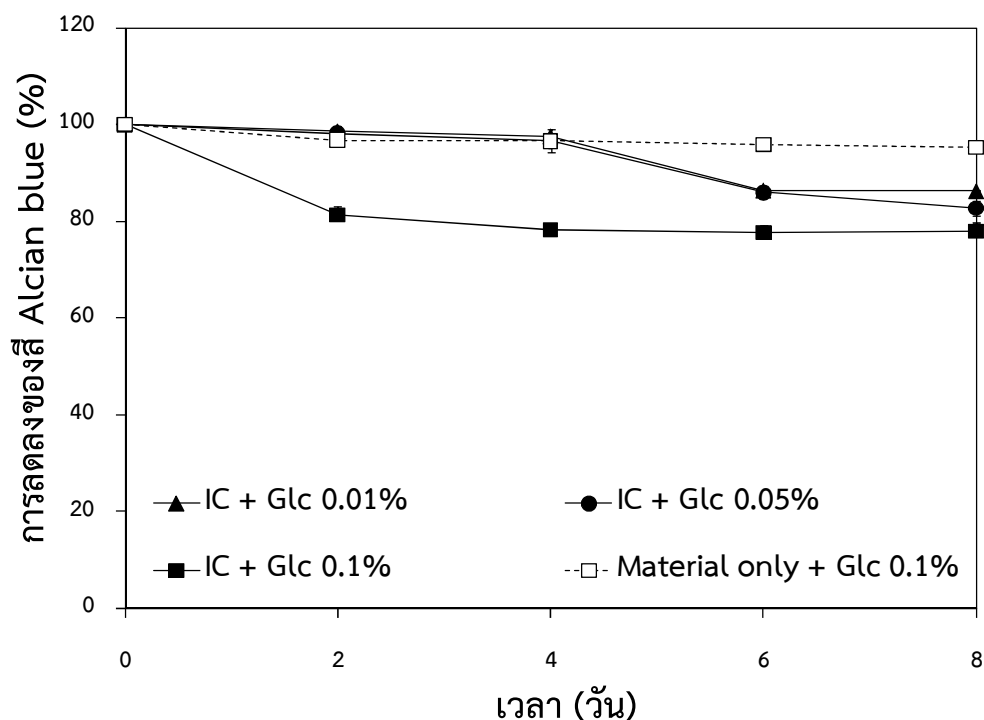
การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือไนโตรเจนต่อการสร้าง EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 โดยอาศัยเทคนิคการเกาะติดของเซลล์ด้วยวิธีธรรมชาติ (self-attachment immobilization) เพื่อให้ทราบชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและ/หรือไนโตรเจนที่ส่งเสริมให้เกิดการสร้างเส้นใย EPS ดีที่สุด รวมทั้งระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกาะติดของแบคทีเรียบนวัสดุจริง ทำการเปรียบเทียบระหว่าง 4 ชุดการทดลอง ดังนี้ 1) สภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนแต่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน 2) สภาพที่มีเฉพาะแหล่งไนโตรเจนไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน 3) สภาพที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 1) และ 2) และ 4) สภาพที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารทั้ง 2 ชนิด โดยชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ กลูโคส (glucose) และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์จำพวก ทริปโตน (tryptone), ยีสต์สกัด (yeast extract) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ซึ่งชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ศึกษานั้นเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 (Mutzel *et al.*, 1996) ทำการแปรผันชนิดของคาร์บอนและไนโตรเจน ให้มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.01, 0.05 และ 0.1 (w/v) ในระหว่างการตรึงเซลล์นำหัวเชื้อแบคทีเรียบ่มร่วมกับวัสดุพูนจากถั่วแกลบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาปริมาณการผลิต EPS ของแบคทีเรีย โดยใช้วิธี Alcian blue adsorption assay (Vandevivere and Kirchman, 1993) ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์กึ่งปริมาณ (semi-quantitative assay) โดยอาศัยการย้อมติดสี Alcian blue ซึ่งสีจะเกาะติดกับประจุลบบน EPS วิธีนี้เป็นการประมาณการปริมาณของ EPS โดยพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสีที่ถูกดูดซับจะแปรผันตามปริมาณ EPS ที่เซลล์ผลิตขึ้นซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลล์ไว้ โดยหลักการนี้คล้ายคลึงกับการดูดซับสี Ruthenium red ของ EPS ในตะกอนสลัดจ์ (Figueroa and Silverstein, 1989) ซึ่งปริมาณ EPS คัดจากการลดลงของค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 606 นาโนเมตร (A_{606}) ของสารละลายตัวอย่างที่เกิดจากสี Alcian blue ถูกดูดซับโดย EPS ที่เซลล์ผลิตขึ้น แต่จะไม่ถูกดูดซับโดยส่วนอื่นๆ ของเซลล์ (Vandevivere and Kirchman, 1993) กำหนดให้ A_{606} ของวันที่เริ่มต้นการทดลอง (T_0) มีค่า baseline เท่ากับร้อยละ 100

3.1.1 สภาวะที่มีการเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่มีการเติมกลูโคส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) โดยไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน ให้ค่าการลดลงของสี Alcian blue ที่ A₆₀₆ มากที่สุด (รูปที่ 3.1) โดยค่าสีลดลงตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 22 แสดงว่าที่สภาวะดังกล่าว แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 สามารถสร้าง EPS ได้อย่างรวดเร็วและสูงที่สุด แต่หลังจากวันที่ 2 พบว่าการลดลงของสีมีค่าคงที่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่การสร้าง EPS คงที่ จึงถือวาระยะเวลา 2 วัน มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นช่วงเวลาในการตรึงเซลล์ที่ทำให้การยึดเกาะมีความแข็งแรง และเซลล์ไม่หลุดง่ายในขณะใช้งาน ในขณะที่ชุดการทดลองที่ความเข้มข้นของกลูโคสร้อยละ 0.05 และ 0.01 ไม่พบการลดลงของสีในช่วง 4 วันแรก และมีการลดลงของสีประมาณร้อยละ 17 และ 14 ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 8 ส่วนชุดการทดลองควบคุม ซึ่งเป็นวัสดุจริงจากถ้ำเกลือเพียงอย่างเดียว (ปราศจากเซลล์) บ่มในสภาวะอาหารเหมือนกับชุดตัวอย่าง พบการลดลงของสีเพียงเล็กน้อยไม่เกินร้อยละ 5 แสดงว่าวัสดุพูนมีการดูดซับสีเพียงเล็กน้อย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ส่งผลให้มีการผลิต EPS มากที่สุด เนื่องจากสภาวะดังกล่าวส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดี จึงทำให้มีการผลิต EPS เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Fleming and Wingender (2001) รายงานว่ากระบวนการผลิต EPS มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อแบคทีเรียถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลูโคสสูง ทำให้จุลินทรีย์มีคาร์บอนในปริมาณที่มากเกินไป เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต โดยคาร์บอนในส่วนที่เหลือจะถูกนำไปใช้ในการผลิต EPS ของเซลล์ (Ye *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเติมแหล่งคาร์บอนเพื่อส่งเสริมการผลิต EPS ของเซลล์ ได้แก่ Maugeri *et al.* (2002) รายงานว่าแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ B3-15 ซึ่งคัดแยกจากน้ำพุร้อนบนเกาะ Vulcano ในประเทศอิตาลี สามารถผลิต EPS ได้ถึง 165 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหาร MD 162 mineral medium ที่มีการเติมกลูโคสร้อยละ 0.6 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับการทดลองของ Cerning *et al.* (1994) ที่ศึกษากระบวนการผลิต EPS ของ *Lactobacillus casei* CG11 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลูโคส กาแลกโทส แล็กโทส ซูโครส มอลโทส และเมลลิโบส (Melibiose) ที่ความเข้มข้น 2, 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อปริมาณการผลิต EPS โดยกลูโคสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดและเชื่อสามารถผลิต EPS ได้สูงที่สุดที่ 160 กรัมต่อลิตร ในขณะที่น้ำตาลกาแลกโทสและแล็กโทสให้ผลผลิต EPS ต่ำที่สุด และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของ EPS ในสภาวะอาหารที่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกลูโคสเป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 86 ในขณะที่ EPS ที่ได้จากการใช้แล็กโทส

เป็นแหล่งคาร์บอนมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงร้อยละ 63 ทั้งนี้ EPS เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ชีวภาพที่ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิกที่สร้างโดยจุลินทรีย์ (Makoto et al., 2006; More et al., 2014) ซึ่งสัดส่วนขององค์ประกอบของ EPS มีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมและชนิดของจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญ (Rosche et al., 2009)



รูปที่ 3.1 เปอร์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A_{606} จากการผลิต EPS ของ *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ในปริมาณร้อยละ 0.01, 0.05 และ 0.1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์ โดยกำหนดให้ IC = เซลล์ตรึงแบคทีเรีย A2, Glc = กลูโคส และ Material only = วัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์จุลินทรีย์

3.1.2 สภาวะที่มีการเติมเฉพาะแหล่งไนโตรเจน

สำหรับสภาวะที่มีการเติมเฉพาะแหล่งไนโตรเจนไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน พบว่าจากการเติมแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิดที่แตกต่างกันที่ความเข้มข้น 3 ระดับ การเติมทริปโตphan ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีที่ A_{606} มากที่สุด (รูปที่ 3.2 A) โดยค่าสีเริ่มลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 6 คิดเป็นร้อยละ 41 แสดงว่า ณ สภาวะดังกล่าว

แบคทีเรียมีการสร้าง EPS ได้สูงที่สุด แต่หลังจากวันที่ 6 พบว่าการลดลงของสีมีค่าคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่การสร้าง EPS คงที่ จึงถือว่าระยะเวลา 6 วัน มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นช่วงเวลาในการตรึงเซลล์ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ความเข้มข้นของทริปโตนร้อยละ 0.05 และ 0.01 พบการลดลงของค่าสีต่อเนื่องในช่วง 6 วัน และมีการลดลงของสีเท่ากันที่ร้อยละ 30 ทั้งสองชุดการทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 8

การเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (w/v) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีที่ A_{606} มากที่สุด (รูปที่ 3.2 B) ซึ่งค่าสีเริ่มลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 6 คิดเป็นร้อยละ 36 และหลังจากวันที่ 6 พบว่าการลดลงของสีมีค่าคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนชุดการทดลองยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (w/v) ค่าสีเริ่มลดลงเล็กน้อยในช่วงเริ่มต้นการทดลองและลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 6 คิดเป็นร้อยละ 33 แต่หลังจากวันที่ 6 พบว่าการลดลงของค่าสีมีค่าคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ชุดการทดลองยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) ไม่พบการลดลงของสีในช่วง 2 วันแรกและมีการลดลงของสีประมาณร้อยละ 26 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

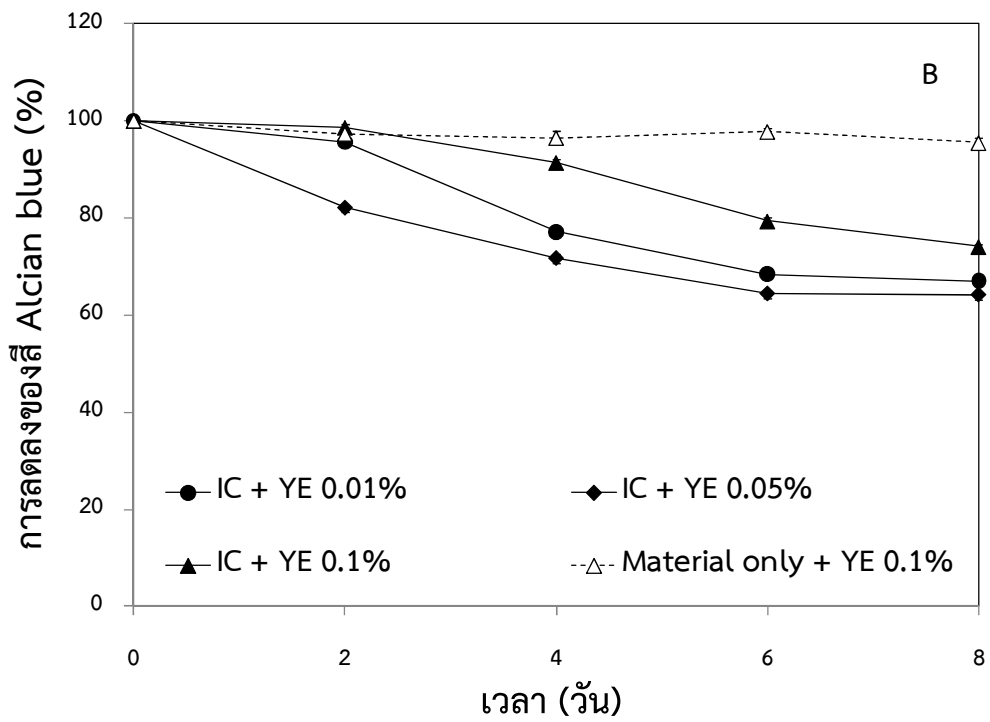
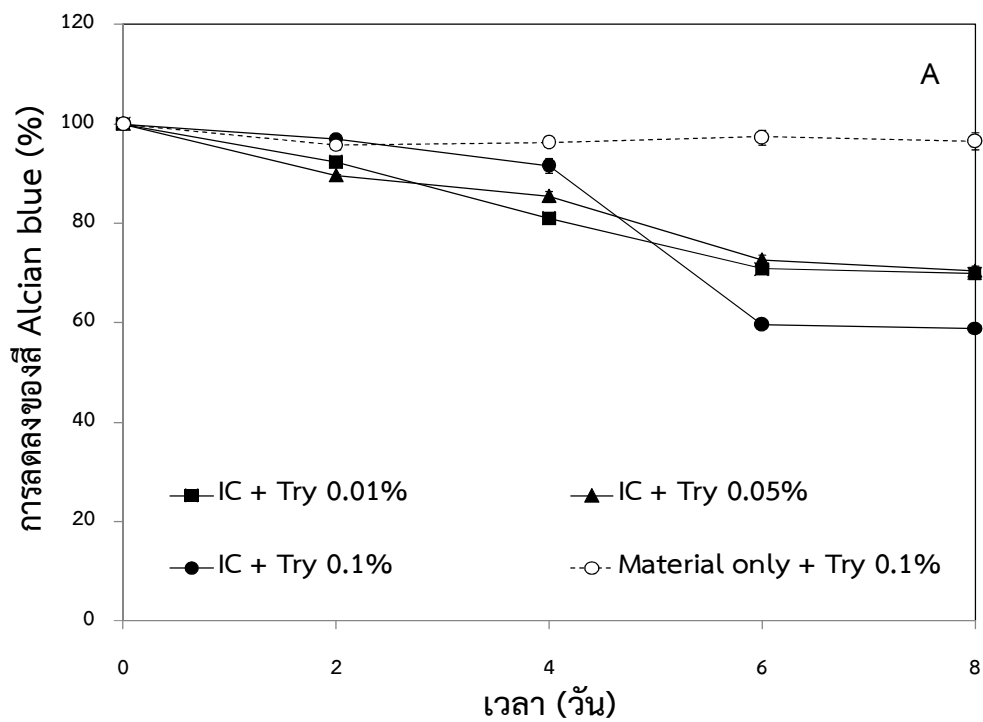
การเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีที่ A_{606} มากที่สุด (รูปที่ 3.2 C) โดยค่าสีเริ่มลดลงอย่างต่อเนื่องหลังวันที่ 2 ของการทดลองและมีการลดลงของสีประมาณร้อยละ 32 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ชุดการทดลองที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ ร้อยละ 0.05 และ 0.01 พบการลดลงของสีอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง และมีการลดลงของสีประมาณร้อยละ 26 และ 22 ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 8 แต่ในสภาวะนี้พบว่าการลดลงของค่าสียังไม่คงที่จนสิ้นสุดการทดลอง

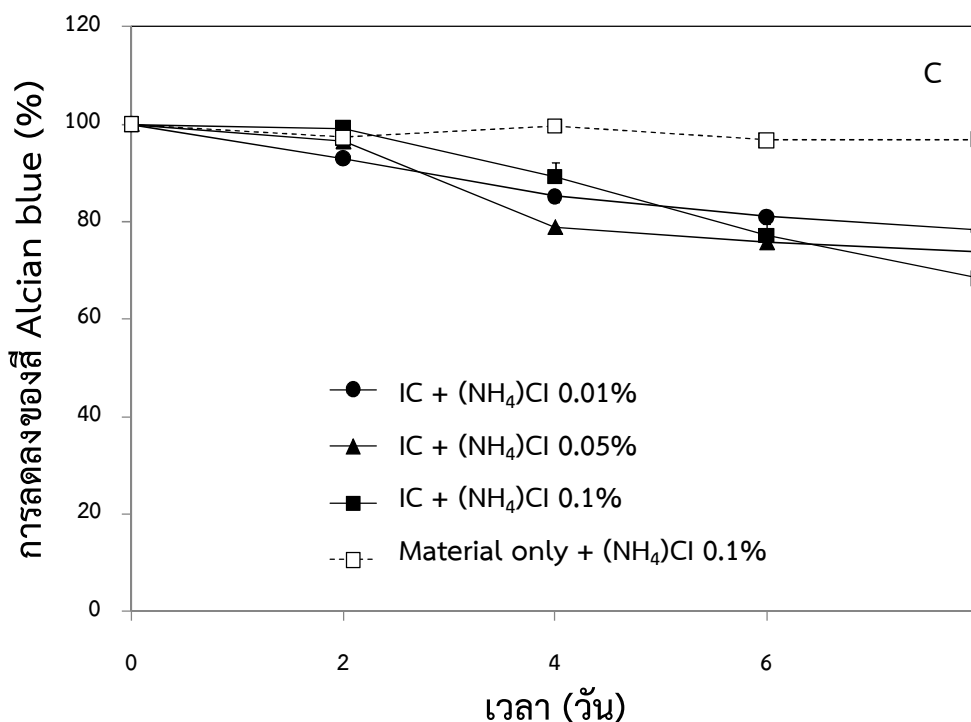
ส่วนชุดควบคุม ซึ่งเป็นวัสดุตรึงจากแก้วเกลบเพียงอย่างเดียว (ปราศจากเซลล์) พบการลดลงของสี alcian blue เพียงเล็กน้อยไม่เกินร้อยละ 5 แสดงว่าปัจจัยที่เป็น Abiotic มีผลต่อการดูดซับของสีน้อยมาก

เมื่อเปรียบเทียบการผลิต EPS จากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด พบว่าชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหารมีผลต่อการผลิต EPS ของแบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 โดยทริปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) ส่งผลให้มีการสร้าง EPS มากที่สุด อาจเนื่องจากทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ซึ่งมีกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิด ที่แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์ได้จากส่วนประกอบในอนินทรีย์ไนโตรเจน จึงทำให้แบคทีเรียเติบโตได้อย่างเต็มที่ และมีการผลิต EPS ได้ดี (Wu *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับรายงานของ Liu *et al.* (2009) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการสร้าง EPS ของ Endophytic bacterium ชนิด *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 ซึ่งชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาได้แก่ beef extract, meat peptone, ยีสต์สกัด, NaNO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, NH_4Cl และ glutamine พบว่า

ยีสต์สกัดเป็นชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่แบคทีเรียมีการสร้าง EPS สูงที่สุด (7.98 กรัมต่อลิตร) เนื่องจากยีสต์สกัดอุดมไปด้วยโปรตีน กรดอะมิโน และวิตามิน ซึ่งช่วยกระตุ้นการสร้าง EPS (Pokhrel 2007) อีกทั้งแหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนยังช่วยส่งเสริมอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียให้สูงขึ้น อันเนื่องมาจากการเติมปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น นอกจากนี้คาร์บอนบางชนิดในกรดอะมิโน และสารตั้งต้นคาร์โบไฮเดรตถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบหรือสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตโพลีแซคคาไรด์ (Farres *et al.*, 1997) ทั้งนี้ Sanin *et al.* (2003) รายงานว่าในภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอน และมีไนโตรเจนเพียงพอ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้าน hydrophobic ของพื้นผิวแบคทีเรีย โดยเมื่อแบคทีเรียอยู่ในภาวะขาดแคลนคาร์บอน เซลล์จึงเปลี่ยนไนโตรเจนไปเป็นโปรตีน และกรดอะมิโน ซึ่งเป็นกลุ่มไม่ชอบน้ำที่เป็นองค์ประกอบใน EPS ทำให้ค่า hydrophobicity ของเซลล์เพิ่มขึ้น และช่วยเพิ่มการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุด้วยเช่นกัน

จากผลการศึกษาปริมาณการผลิต EPS ที่สูงที่สุดในสภาวะที่มีการเติมเฉพาะแหล่งไนโตรเจนไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนในการศึกษานี้ มีปริมาณ EPS ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Suttinun *et al.* (2010) ทำการตรึง *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ L4 บนวัสดุจากพืชที่มีองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย เช่น เมล็ดยี่ห่วย ในสภาวะอาหารที่มีเฉพาะแหล่งไนโตรเจน คือ Calcium nitrate และ Iron (III) nitrate โดยไม่มีการให้แหล่งคาร์บอนใดๆ จากการวิเคราะห์ปริมาณการสร้าง EPS ด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay พบการลดลงของสี ร้อยละ 50 ในวันที่ 4 ของการตรึงเซลล์ หลังจากนั้นการสร้าง EPS มีปริมาณคงที่ตลอดการทดลอง จึงตรึงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 วัน ซึ่งถือเป็นเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ และสามารถตรวจพบเส้นใย EPS มีลักษณะเป็นโครงข่ายไบโอฟิล์มเกาะติดบนวัสดุภายใต้ SEM ทำให้เซลล์ยึดเกาะได้ดี เมื่อนำเซลล์ตรึงไปศึกษาการย่อยสลาย Trichloroethylene (TCE) แบบโคเมแทบอลิซึม (Cometabolic degradation) พบว่าเซลล์ตรึงย่อยสลายสารดังกล่าวอยู่ที่ร้อยละ 50 ในขณะที่การศึกษาที่ผ่านมาของพนิดา ไต่สุ (2555) ได้พัฒนาวิธีการตรึงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ในอาหาร carbon free mineral (CFMM) โดยใช้วัสดุตรึงเซลล์ 2 ชนิดได้แก่ ทะลายเปล่า (empty fruit bunch: EFB) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (pericarp fiber: PF) ทำการศึกษาโดยนำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมร่วมกับวัสดุแยกชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฉพาะแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรตและไม่มีการให้แหล่งคาร์บอน เพื่อให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอน จากผลการทดสอบการสร้าง EPS ด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay พบว่าในวันที่ 6 เซลล์ที่ตรึงบนวัสดุทั้งสองชนิด มีปริมาณ EPS สูงที่สุดถึงร้อยละ 80 ทั้งนี้การผลิต EPS ในปริมาณสูงอาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติของวัสดุที่ใช้ซึ่งเป็นประเภทวัสดุอินทรีย์ (organic material) ที่เซลล์สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้ นอกจากนี้ชนิดของแบคทีเรีย และชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการตรึงเซลล์ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณ EPS แตกต่างกัน

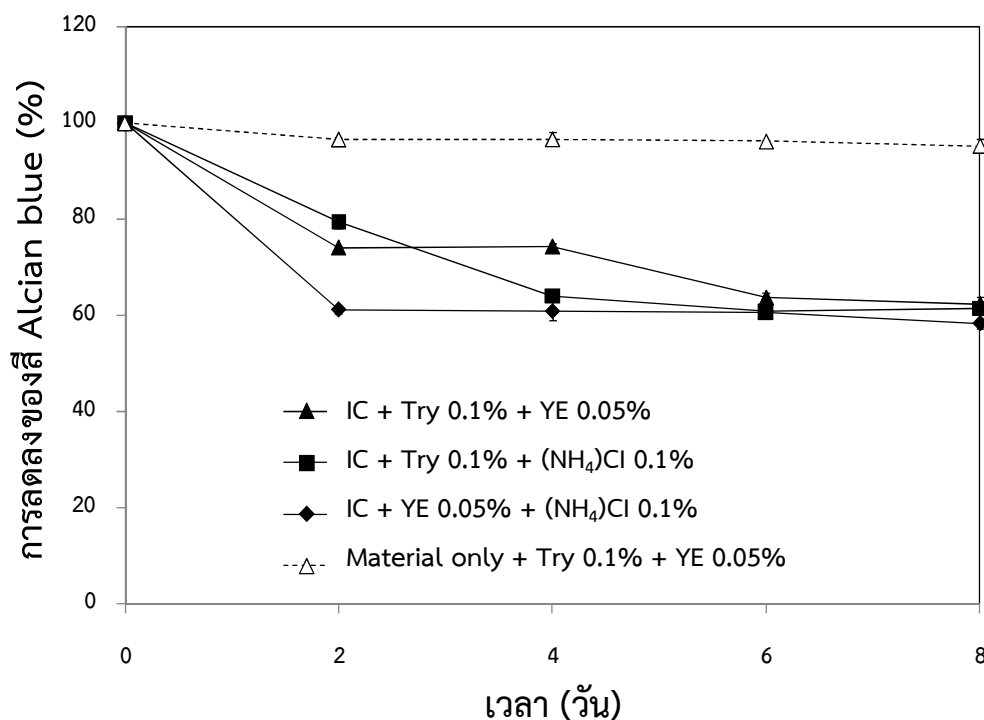




รูปที่ 3.2 เปอร์เซนต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A_{606} จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสถานะที่เติมแหล่งไนโตรเจน คือ ทริปโตน (A) ยีสต์สกัด (B) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (C) โดยแปรผันให้มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.01, 0.05 และ 0.1 โดย IC = เซลล์ตรึงแบคทีเรีย A2, Try = ทริปโตน, YE = ยีสต์สกัด, $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ = แอมโมเนียมคลอไรด์ และ Material only = วัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์จุลินทรีย์

จากนั้นนำความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด ซึ่งทำให้เกิดการสร้าง EPS มากที่สุด ได้แก่ ทริปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (w/v) และแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) มาศึกษาผลของแหล่งอาหารร่วมพบว่าชุดการทดลองที่มียีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.1 (w/v) ให้ค่าเปอร์เซนต์การลดลงของสีที่ A_{606} มากที่สุด (รูปที่ 3.3) โดยค่าสีลดลงตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 42 แสดงว่า ณ สถานะดังกล่าวแบคทีเรียมีการสร้าง EPS ได้อย่างรวดเร็วและสูงที่สุด แต่หลังจากวันที่ 2 พบว่าการลดลงของสีมีค่าคงที่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่การสร้าง EPS คงที่ จึงถือวาระยะเวลา 2 วัน มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นช่วงเวลาในการตรึงเซลล์ที่ทำให้การยึดเกาะมีความแข็งแรง และเซลล์ไม่หลุดง่ายในขณะใช้งาน ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมทริปโตนร่วมกับยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.05 (w/v), ทริปโตนและแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.1 (w/v) พบการลดลงของค่าสีอย่างต่อเนื่อง

ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 6 คิดเป็นร้อยละ 38 และ 39 ตามลำดับ และหลังจากวันที่ 6 พบว่าการลดลงของค่าสีมีค่าคงที่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ชุดควบคุมมีซึ่งเป็นวัสดุตั้งจากแก้วแกลบเพียงอย่างเดียว (ปราศจากเซลล์) มีการลดลงของสีเพียงเล็กน้อยประมาณร้อยละ 5 ซึ่งยืนยันได้ว่าการลดลงของสีโดยส่วนใหญ่มาจากการดูดซับของ EPS ที่เซลล์ผลิตขึ้น



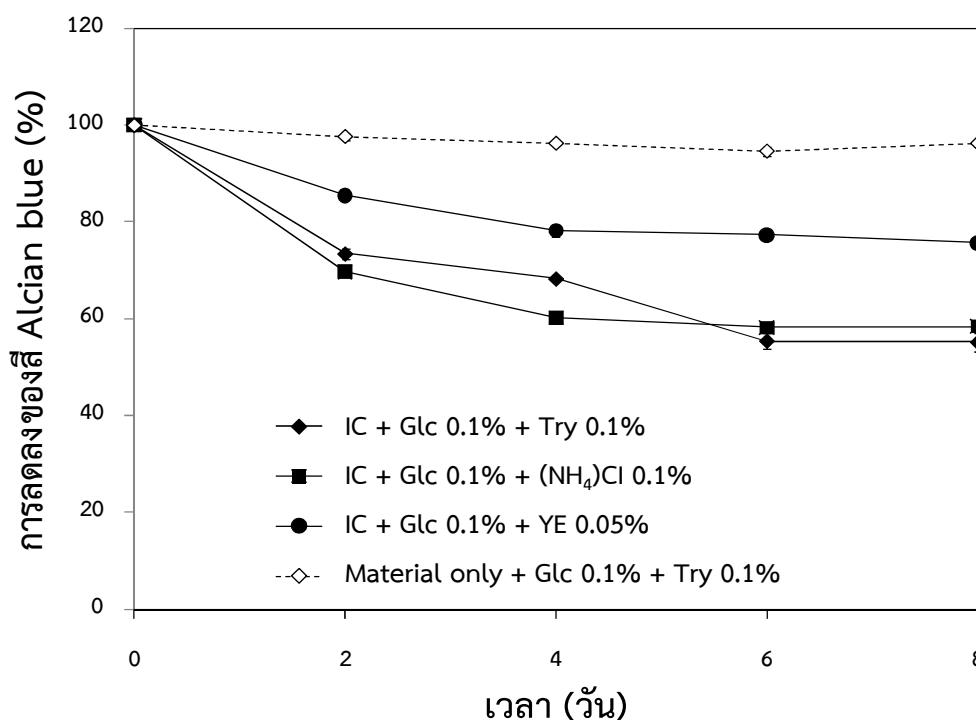
รูปที่ 3.3 เปรี่เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A_{606} จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนร่วม ได้แก่ ทรีปโตน ร้อยละ 0.1 ร่วมกับยีสต์สกัดร้อยละ 0.05, ทรีปโตนร้อยละ 0.1 ร่วมกับ แอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 0.1 และ ยีสต์สกัดร้อยละ 0.05 ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์ โดยกำหนดให้ IC = เซลล์ตั้งแบคทีเรีย A2, Try = ทรีปโตน, YE = ยีสต์สกัด, (NH₄)Cl = แอมโมเนียมคลอไรด์ และ Material only = วัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์จุลินทรีย์

McKellar *et al.* (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อองค์ประกอบของ EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ *Agrobacterium radiobacter* ทำการเปรียบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salts medium (MSM) ที่มีการเติมยีสต์สกัดร่วมกับเปปโตน และอาหารที่มียีสต์สกัดเพียงอย่างเดียว พบว่าในอาหารที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนร่วมระหว่างยีสต์สกัดและเปปโตน ส่งผลให้

องค์ประกอบของ EPS มีน้ำตาลหลัก 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคสและกาแลกโทส แต่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์สกัดเพียงอย่างเดียว พบว่า EPS มีแมนโนสเป็นองค์ประกอบเพียงอย่างเดียว และเมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิต EPS ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมและไม่เติมยีสต์สกัด พบว่าแบคทีเรียมีการผลิต EPS ในอาหารที่มีการเติมยีสต์สกัดได้มากกว่าอาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานผลของแหล่งไนโตรเจนร่วมต่อปริมาณการผลิต EPS

3.1.3 สภาวะที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

เมื่อทราบชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS ของแบคทีเรีย ได้แก่ กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ทริปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) จึงทำการตรึงเซลล์ในอาหารที่มีการเติมทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ พบว่าชุดการทดลองที่เติมแหล่งอาหารร่วมระหว่างกลูโคสและทริปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.1 (w/v) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีที่ A_{606} มากที่สุด (รูปที่ 3.4) โดยค่าสีเริ่มลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 6 คิดเป็นร้อยละ 45 แสดงว่า ณ สภาวะดังกล่าวแบคทีเรียมีการสร้าง EPS อย่างต่อเนื่องและสูงที่สุด แต่หลังจากวันที่ 6 พบว่าการลดลงของสีมีค่าคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่การสร้าง EPS คงที่ จึงถือวาระยะเวลา 6 วัน มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นช่วงเวลาในการตรึงเซลล์ สำหรับชุดการทดลองแหล่งอาหารร่วมกลูโคสและแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.1 (w/v) กลูโคสและยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.05 (w/v) พบการลดลงของค่าสีอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 6 คิดเป็นร้อยละ 42 และ 24 ตามลำดับ และหลังจากวันที่ 6 พบว่าการลดลงของค่าสีมีค่าคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนชุดควบคุม ซึ่งเป็นวัสดุตรึงจากแก้วกลบเพียงอย่างเดียว (ปราศจากเซลล์) พบการลดลงของสีประมาณร้อยละ 6 แสดงว่าปัจจัยด้าน Abiotic อื่นๆ ไม่มีผลต่อการลดลงของสี



รูปที่ 3.4 เปรียบเทียบการลดลงของสี Alcian blue ที่ A₆₀₆ จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ กลูโคสร้อยละ 0.1 ร่วมกับทรีปโตนร้อยละ 0.1, กลูโคสร้อยละ 0.1 ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 0.1 และกลูโคสร้อยละ 0.1 ร่วมกับยีสต์สกัดร้อยละ 0.05 (w/v) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์ โดยกำหนดให้ IC = เซลล์ตรึงแบคทีเรีย A2, Glc คือ กลูโคส, Try = ทรีปโตน YE = ยีสต์สกัด (NH₄)Cl = แอมโมเนียมคลอไรด์ และ Material only = วัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์จุลินทรีย์

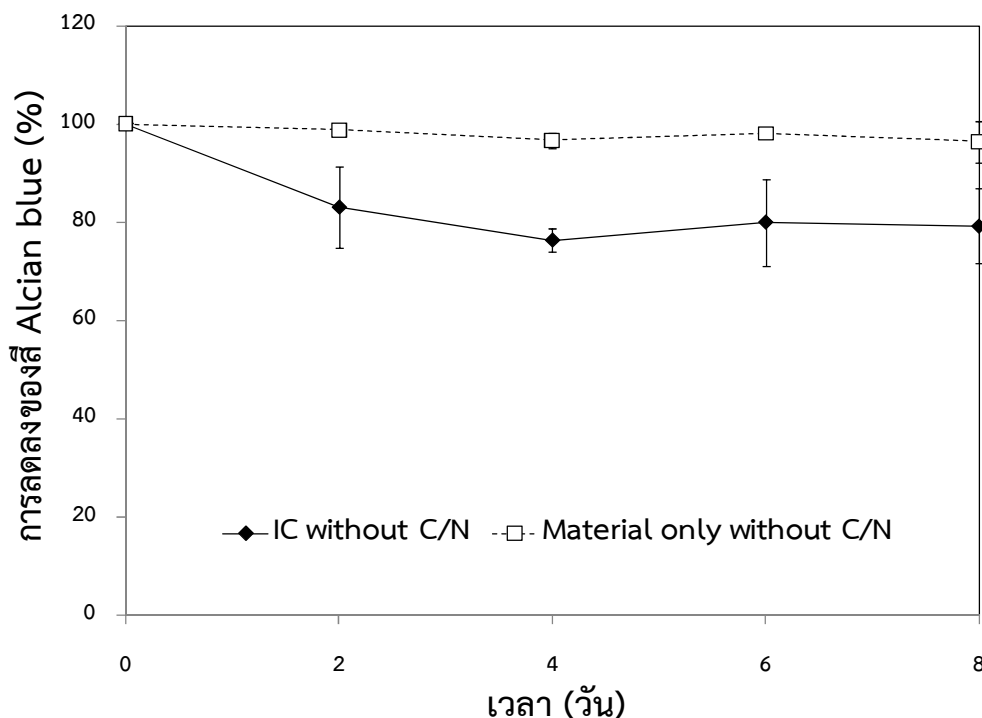
Breedveld *et al.* (1993) รายงานว่าในอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนสูง พบการสร้าง EPS ในอัตราที่สูงขึ้น ซึ่งอิทธิพลขององค์ประกอบในอาหารมีผลต่อกระบวนการสร้าง EPS และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังเช่น แบคทีเรีย *Rhizobium leguminosarum* biovar *Trifolii* สายพันธุ์ TA-1 พบว่าเจริญเติบโตในอาหารซึ่งประกอบด้วยแมนนิทอล (mannitol) 10 กรัมต่อลิตร และกรดกลูตามิก (glutamic acid) 1 กรัมต่อลิตร มีการสร้าง EPS ได้สูงถึง 2 กรัมต่อลิตร และภายใต้สภาวะอาหารที่มีเฉพาะแมนนิทอลไม่มีการเติมกรดกลูตามิก พบว่าแบคทีเรียไม่มีการเจริญเติบโตและมีการสร้าง EPS เพียง 0.8 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mukherjee *et al.* (2011) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิต EPS ของ *Rhizobium* sp. ที่คัดแยกจากปมรากถั่วสายพันธุ์ *Crotalaria saltiana* ซึ่งชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ศึกษาได้แก่ xylose, galactose, fructose, arabinose,

myo-inositol, sucrose, lactose, mannose, mannitol และ glucose ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และชนิดของไนโตรเจนที่ศึกษาได้แก่ KNO_3 , NaNO_3 , L-asparagine และ Glycine ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอาหาร Yeast extract mineral (YEM) พบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เชื้อผลิต EPS มากที่สุด (81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) คือ glucose เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในอาหาร YEM ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน พบการผลิต EPS อยู่ที่ 23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดได้นำมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS โดยแปรผันความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 พบว่า glucose ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 เชื้อสามารถผลิต EPS สูงสุดที่ 96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมานำกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 มาเติมร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการศึกษา พบว่าเมื่อเติม glycine ร่วมกับกลูโคส มีการผลิต EPS อยู่ที่ 108 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นแปรผันความเข้มข้นของ glycine ที่ร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เชื้อสามารถผลิต EPS สูงสุดที่ 108 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ทำการจำแนกองค์ประกอบของ EPS ที่เชื้อผลิตขึ้นพบว่าประกอบด้วยหน่วยโมโนเมอร์ของกลูโคส กาแลคโตส ไฮโลส และแมนโนส เป็นต้น นอกจากนี้ Seo *et al.* (2014) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต EPS ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. CS101 พบว่าสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมซูโครสร้อยละ 5 และยีสต์สกัดร้อยละ 0.25 แบคทีเรียสามารถผลิต EPS ได้มากที่สุด คือ 17.2 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการทดลอง และมีองค์ประกอบที่เป็นน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ฟรุคโตส และ แรมโนส ในอัตราส่วน 2.1:1.1:1.0:0.1 โดยการศึกษาที่ผ่านมารายงานถึงองค์ประกอบของ EPS ของแบคทีเรียทนร้อนในจีนัส *Bacillus* ที่มีความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ 1,2-linked mannose, 1,4-linked glucose, 1,3-linked mannose, 1,6-linked mannose, 1,3,4-linked glucose และ 1,2,6-linked mannose หรือ 1,2-linked mannose, 1,4-linked mannose และ 1,6-linked mannose (Manca *et al.*, 1996)

3.1.4 สภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

สำหรับสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารทั้ง 2 ชนิด พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีที่ A_{606} เริ่มลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 6 คิดเป็นร้อยละ 21 แสดงว่า สภาวะดังกล่าวแบคทีเรียมีการสร้าง EPS ได้อย่างรวดเร็วและสูงที่สุด (รูปที่ 3.5) แต่หลังจากวันที่ 6 พบว่าการลดลงของสีมีค่าคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่การสร้าง EPS คงที่ จึงถือว่าระยะเวลา 6 วัน มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นช่วงเวลาในการตรึงเซลล์ ส่วนชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุตรึงจากแก้วกลบเพียงอย่างเดียว (ปราศจากเซลล์) เพื่อศึกษาการดูดซับของสารละลายสีโดยวัสดุพูนพบการลดลงของสีเพียงร้อยละ 4 จากสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารทั้ง 2 ชนิดพบว่าเซลล์มี

การสร้าง EPS ในระหว่างการทดลองอาจเนื่องมาจากในอาหาร CFMM ที่ใช้ในการศึกษามีองค์ประกอบของแร่ธาตุ วิตามิน และสารประกอบชนิดอื่นๆ ที่เซลล์สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ เช่น วิตามินสามารถถูกใช้เป็น co-factor สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ (Alexander, 1977)



รูปที่ 3.5 เปอร์เซ็นต์การลดลงของสี Alcian blue ที่ A_{606} จากการผลิต EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์ โดยกำหนดให้ IC without C/N = เซลล์ตรึงแบคทีเรีย A2 ในสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนและ Material only without C/N = วัสดุเพียงอย่างเดียวไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

สรุปผลการศึกษาการตรึงเซลล์โดยการสร้าง EPS ของเซลล์แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 พบว่าสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้าง EPS ได้สูงที่สุด คือ สภาวะที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วมระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน ได้แก่ การเติมกลูโคสและทริปโตphan ที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ ร้อยละ 0.1 ซึ่งให้ค่าการลดลงของสีมากที่สุด อยู่ที่ร้อยละ 45 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ในระยะเวลา 6 วัน รองลงมาคือสภาวะการเติมแหล่งไนโตรเจนร่วม 2 ชนิด ได้แก่ การเติมยีสต์สกัดและแอมโมเนียมคลอไรด์

ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.1 ให้ค่าการลดลงของสี Alcian blue ที่ A_{606} มากที่สุดอยู่ที่ร้อยละ 42 ที่ระยะเวลา 2 วัน และสถานะที่มีเฉพาะแหล่งไนโตรเจนไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมทริปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ค่าการลดลงของสีมากที่สุดอยู่ที่ร้อยละ 41 และระยะเวลา 6 วัน ในขณะที่สถานะการเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนแต่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ค่าการลดลงของสีที่ A_{606} มากที่สุดอยู่ที่ร้อยละ 22 ในระยะเวลา 2 วัน ส่วนสถานะที่ทำให้การลดลงของสีน้อยที่สุด ได้แก่ สถานะที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารทั้ง 2 ชนิด พบว่าให้ค่าการลดลงของสีร้อยละ 21 ในระยะเวลา 6 วัน (ตารางที่ 3.1) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมช่วยส่งเสริมให้มีการผลิต EPS ได้เพิ่มขึ้น (Degeest and De vuyst, 2000) ซึ่งเป็นคุณสมบัติในการยึดเกาะบนพื้นผิวของวัสดุในรูปแบบฟิล์มชีวภาพ เปรียบเสมือนกาวยึดเซลล์ให้ติดกับพื้นผิวนั้น (Rosche *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ EPS ของแบคทีเรีย ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช แร่ธาตุ และระดับออกซิเจน (Finore *et al.*, 2014)

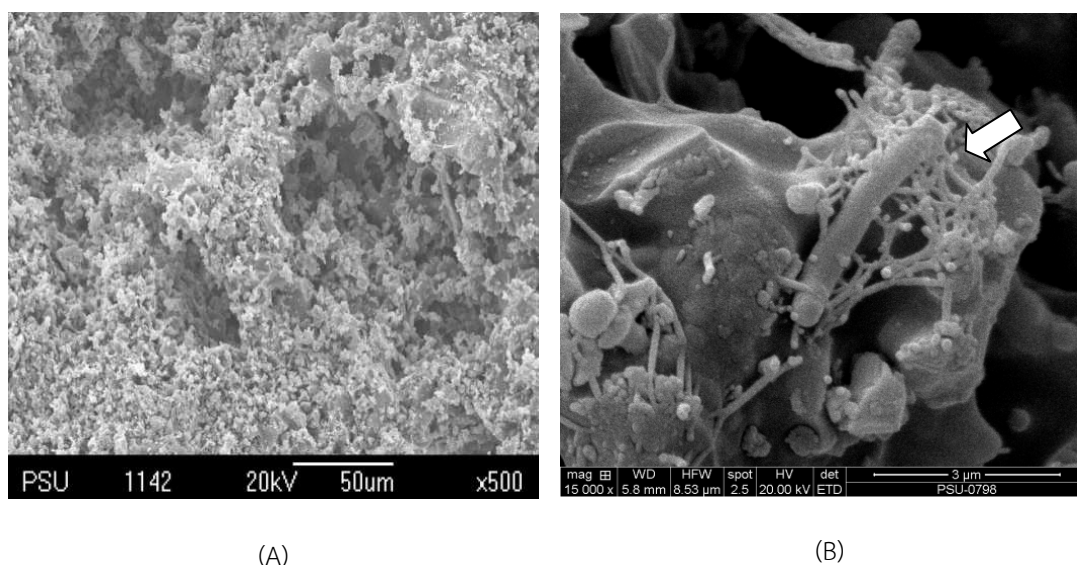
ตารางที่ 3.1 การลดลงของสี Alcian blue (%) ในขณะตรึงเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งอาหารเฉพาะคาร์บอนหรือไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว สภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนร่วมกับแหล่งคาร์บอน และไม่เติมแหล่งอาหารทั้ง 2 ประเภท

แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจน	ความเข้มข้นของแหล่งอาหาร (% w/v)	การลดลงของสี Alcian blue (%)
กลูโคส	0.01	14 ^k
	0.05	17 ^j
	0.1	22 ^{hi}
ทรีปโตน	0.01	30 ^b
	0.05	30 ^f
	0.1	41 ^b
ยีสต์สกัด	0.01	33 ^e
	0.05	36 ^d
	0.1	26 ^g
แอมโมเนียมคลอไรด์	0.01	22 ⁱ
	0.05	26 ^g
	0.1	32 ^{ef}
ทรีปโตนและยีสต์สกัด	0.1/0.05	38 ^{cd}
ทรีปโตนและแอมโมเนียมคลอไรด์	0.1/0.1	39 ^c
ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมคลอไรด์	0.05/0.1	42 ^b
กลูโคสและทรีปโตน	0.1/0.1	45 ^a
กลูโคสและยีสต์สกัด	0.1/0.05	24 ^{gh}
กลูโคสและแอมโมเนียมคลอไรด์	0.1/0.1	42 ^b
ไม่เติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	-	21 ⁱ

หมายเหตุ : ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองต่างๆ

3.2 วัสดุตรึงเซลล์

ผลการศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุ และการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุตรึง โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) พบว่าลักษณะพื้นผิวของวัสดุขรุขระไม่สม่ำเสมอ มีความซับซ้อนของพื้นผิว และความเป็นรูพรุนสูง โดยเม็ดวัสดุพูนนั้นมีพื้นที่ผิวประมาณ 10 ตารางเมตรต่อกรัม และมีพื้นที่สำหรับจุลินทรีย์ต่อปริมาตรประมาณ 110 ตารางเมตรต่อลิตร (รูปที่ 3.6 A) ซึ่งช่วยเพิ่มพื้นที่ในการยึดเกาะของจุลินทรีย์ได้ดีและหลังผ่านกระบวนการตรึงเซลล์โดยการบ่มเซลล์ร่วมกับวัสดุในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ การเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่ประกอบด้วยกลูโคสและทริปโตเฟนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.1 (w/v) ตามลำดับ เป็นเวลา 6 วัน พบว่าเซลล์มีการผลิตเส้นใยจำพวก EPS เกาะติดบนวัสดุ (รูปที่ 3.6 B) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Delftia tsuruhatensis* BM90 บนเซลล์ลูโลสที่ผ่านการดัดแปลงทางเคมีจนมีโครงสร้างรูพรุนแบบ Macropore คือรูพรุนที่มีระดับความกว้างตั้งแต่ 50 นาโนเมตรขึ้นไป หลังผ่านกระบวนการตรึง 8 ชั่วโมงพบว่าเซลล์มีการสร้าง extracellular structure เช่น พิลิหรือพิมเบรีย เพื่อให้เซลล์เกาะติดบนวัสดุได้ดีขึ้น โดยสามารถมองเห็นภายใต้กล้อง SEM (Ergul *et al.*, 2011) และเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุตรึงชนิดอื่นๆ ที่นำมาใช้ตรึงเซลล์เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เช่น เซรามิกส์ริง และ ไบโอบอล ซึ่งมีพื้นที่ผิวประมาณ 1.3 และ 0.004 ตารางเมตรต่อกรัม และพื้นที่สำหรับจุลินทรีย์ต่อปริมาตรอยู่ที่ 17.6 และ 0.3 ตารางเมตรต่อลิตรตามลำดับ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556) แสดงว่าวัสดุตรึงเซลล์จากแก้วเกลบมีพื้นที่ผิวสูงกว่าเซรามิกส์ริงและไบโอบอล ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวทำให้เม็ดพูนจากแก้วเกลบสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ที่มีประสิทธิภาพได้ ดังงานวิจัยของ Quek *et al.* (2006) ศึกษาการตรึง *Rhodococcus* sp. F29 บนโพลียูรีเทนโฟมเพื่อย่อยสลายผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียม รายงานว่าพื้นที่ผิวและปริมาตรของรูพรุนของวัสดุเป็นปัจจัยสำคัญของการตรึงเซลล์ โดยส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างชีวมวลของเซลล์ รวมทั้งอัตราการย่อยสลายสารปิโตรเลียม ซึ่งการมีรูพรุนสูงนั้นส่งผลดีต่อการกระจายตัวของสารอาหารและก๊าซให้กับเซลล์บนวัสดุตรึงเซลล์



รูปที่ 3.6 ลักษณะพื้นผิวของวัสดุก่อนการตรึงเซลล์ (A) และการเกาะติดของแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 บนเม็ดวัสดุพูนจากถั่วแกลบ โดยการสร้างเส้นใย EPS (ดังแสดงโดยลูกศร) ในสภาวะอาหารที่เหมาะสมที่สุด คือ กลูโคสและทริปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.1 (w/v) ณ วันที่ 6 ของการทดลอง (B) เมื่อส่องด้วย SEM กำลังขยาย 500x – 15000x

3.3 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบโดยเซลล์ตรึงในระบบกะ

3.3.1 ลักษณะน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อรวบรวมน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ ซึ่งน้ำเสียยังไม่ผ่านกระบวนการบำบัดใดๆ ลักษณะทั่วไปของน้ำเสียมีสีน้ำตาลเข้ม ชุ่น อุณหภูมิประมาณ 76 องศาเซลเซียส จากการวิเคราะห์ลักษณะน้ำเสียทั่วไป พบว่าค่าพีเอชเท่ากับ 4.7 ค่าซีโอดีเท่ากับ 77,647 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมดเท่ากับ 29,183 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าฟอสฟอรัสเท่ากับ 320 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าไนโตรเจนเท่ากับ 1,067 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าน้ำมันและไขมันเท่ากับ 13,370 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.3) โดยที่ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำเสียพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งรายงานลักษณะน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่ามีอุณหภูมิสูงอยู่ในช่วง 55-90 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.4-5.2, ค่าซีโอดีอยู่ในช่วง 15,000-128,000 มิลลิกรัมต่อลิตร, ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมดอยู่ในช่วง 5,000-54,000 มิลลิกรัม

ต่อลิตร, ค่าฟอสฟอรัสอยู่ในช่วง 94-131 มิลลิกรัมต่อลิตร, ค่าไนโตรเจนอยู่ในช่วง 80-1,400 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าน้ำมันและไขมันอยู่ในช่วง 130-18,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบมีการปนเปื้อนสารอินทรีย์ปริมาณสูง และมีสีน้ำตาลเข้ม ดังนั้นโรงงานจะดำเนินการบำบัดน้ำเสียเหล่านี้ โดยการปล่อยเข้าสู่บ่อพักน้ำเสียหรือส่งผ่านไปยังหอระบายความร้อน เพื่อลดอุณหภูมิของน้ำเสียลงเหลือประมาณ 45-55 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าสู่ระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศที่ใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพ (พันธิธิดา จันทร์โท, 2557)

ตารางที่ 3.2 ลักษณะน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา

พารามิเตอร์	งานวิจัยนี้	งานวิจัยที่ผ่านมา*	
		(1)	(2)
สี	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลแดง	สีน้ำตาล
อุณหภูมิ	76	-	55-90
พีเอช	4.7	4.4-5.2	3.4-5.2
ซีไอดี	77,647	87,748-128,000	15,000-100,000
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด	29,183	21,000-51,900	5,000-54,000
ฟอสฟอรัส	320	-	94-131
ไนโตรเจน	1,067	80-152	180-1,400
น้ำมันและไขมัน	13,370	10,793-17,267	130-18,000
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	1,503	1,274-1,661	-

หมายเหตุ : ค่าทุกค่ามีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นค่าพีเอชและสี, - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์
ที่มา : (1) กุสุมาลย์ ล่องแก้ว (2557) และ (2) Ahmed *et al.*, (2015)

จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics) ในตัวอย่างน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งสามารถตรวจวัดกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีการปนเปื้อนในน้ำเสีย พบว่ามีค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 1,503 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาตรวจพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีค่าสูงอยู่ในช่วง 1,206-1,503 มิลลิกรัมต่อลิตร (พันธิธิดา จันทร์โท, 2557) และการศึกษาของ กุสุมาลย์ ล่องแก้ว (2557) สํารวจการตกค้างของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าน้ำเสียจากโรงงาน

สกัดน้ำมันปาล์มมีการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลอยู่ที่ 1,274 และ 1,661 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Alam *et al.* (2009) รายงานความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศมาเลเซียซึ่งมีค่ามากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียที่ปล่อยออกจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญและการทำงานของแบคทีเรีย ทำให้มีการย่อยสลายทางชีวภาพเกิดขึ้นได้น้อย (Torrecilla, 2010) และแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถทนทานความเข้มข้นของสารดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้นสูงได้ เนื่องจากทำให้สูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และยับยั้งการทำหน้าที่ของโปรตีนซึ่งส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Heipieper *et al.*, 1992) เพื่อที่จะปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้นสูง และรักษาการเจริญของเซลล์อย่างต่อเนื่องในการย่อยสลายทางชีวภาพ เซลล์ตรึงจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลิก การใช้เซลล์ตรึงช่วยให้เซลล์มีความคงทนต่อสารพิษได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ความหนาแน่นของเซลล์สูงส่งผลให้มีอัตราการย่อยสลายสารพิษสูง (Basak *et al.*, 2014) และจากการศึกษาของ Mutzel *et al.* (1996) ได้คัดเลือกแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ซึ่งคัดแยกได้จากบริเวณน้ำพุร้อน พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลายสารฟีนอลและครีซอลได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 94 และ 108 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 12 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียชนิดนี้เจริญและย่อยสลายสารฟีนอลในอาหาร Luria Bertani broth ได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6 (Feitkenhauer *et al.*, 2001) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษการใช้แบคทีเรียทนร้อน *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ซึ่งสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูง และยังมีเฉพาะเจาะจงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก มาตรึงบนเม็ดวัสดุพูนจากแก้วกลบเพื่อบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย และเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้กับน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มซึ่งมีอุณหภูมิสูง

3.3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย (น้ำเสียไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ) ด้วยเซลล์ตรึงของ *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 โดยแปรผันสภาวะต่างๆ ที่ใกล้เคียงกับลักษณะทั่วไปของน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม คือ อุณหภูมิสูงประมาณ 55-76 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.4-5.2 รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมของ *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เจริญและสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสและพีเอช 6 จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Feitkenhauer *et al.* (2001) จึงได้มีการ

แปรผันปัจจัยการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ 1) อุณหภูมิ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส 2) พีเอช 4 และ 7 และ 3) ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้นในน้ำเสียที่มีการเติมสารฟีนอลให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1,500, 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มตัวอย่างตามสภาวะที่แปรผันข้างต้น เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยมีชุดควบคุมที่ปรับสภาวะให้เหมือนกับชุดตัวอย่าง ได้แก่ เม็ดวัสดุพูนจากแก้วกลบเพียงอย่างเดียว ซึ่งใช้ศึกษาการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกจากดูดซับของวัสดุพูน และผลการศึกษานำไปเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการบำบัดของเซลล์อิสระ ใช้ความเข้มข้นของแบคทีเรียเริ่มต้นทั้ง 2 ระบบให้มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ $\sim 6.7 \times 10^5$ CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง (ในกรณีเซลล์ตรึง) หรือต่อมิลลิลิตรอาหารเหลว (ในกรณีเซลล์อิสระ) หรือมีความขุ่นของเชื้อ (Optical density; OD₅₈₀) ประมาณ 0.5

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.3 แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของชุดตัวอย่างเซลล์ตรึง ได้แก่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกร้อยละ 59 หลังจากการทดลอง 10 วัน ซึ่งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ผลที่ได้มีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ Mutzel *et al.* (1996) และ Feitkenhauer *et al.* (2001) พบว่าเซลล์อิสระของ *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เจริญและย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ฟีนอลและครีซอล ได้ดีในอาหาร Luria Bertani broth ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 6 นอกจากนี้ภายใต้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียมีผลต่อการบำบัด โดยเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจาก 1,500 – 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพในการย่อยสลายมีค่าลดลงจากร้อยละ 55 เป็นร้อยละ 37 และร้อยละ 59 เป็นร้อยละ 39 ที่พีเอช 4 และ 7 ตามลำดับ สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียที่พีเอช 7 (ร้อยละ 39-42) สูงกว่าน้ำเสียที่พีเอช 4 (ร้อยละ 28-33) ในวันที่ 10 ของการทดลองและความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประสิทธิภาพการบำบัดเพียงเล็กน้อย ในขณะที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดสูงขึ้นตามไปด้วย โดยน้ำเสียที่พีเอช 4 และ 7 มีประสิทธิภาพการบำบัดอยู่ในช่วงร้อยละ 15-35 และ 22-39 ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกต่ำกว่าการใช้เซลล์ตรึงเกือบทุกสภาวะการทดลอง (ยกเว้นที่อุณหภูมิ พีเอชและความเข้มข้นดังนี้: 60/4/1,500, 70/4/1,500, 70/4/2,500 และ 70/7/1,500) โดยบำบัดได้อยู่ในช่วงร้อยละ 15-35 โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการบำบัดโดยเซลล์อิสระ ได้แก่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่ 1,500 มิลลิกรัม

ต่อลิตร ซึ่งสามารถลดสารดังกล่าวได้ 35% ซึ่งสภาวะดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของเซลล์ตรึง จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียสูงขึ้น ประสิทธิภาพการบำบัดของ เซลล์อิสระมีค่าน้อยลง ในเกือบทุกชุดการทดลอง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์อิสระถูกยับยั้งด้วย สารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้นสูงในขณะที่เซลล์ตรึง (ยกเว้นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 4, 7 ความเข้มข้น 1,500-5,000) ทนต่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกได้ถึง 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งการตรึงเซลล์ช่วยป้องกันความเป็นพิษจากสารประกอบฟีนอลิก โดยไบโอฟิล์มที่เซลล์สร้างขึ้นและ วัสดุตรึงเซลล์ ทำหน้าที่เปรียบเสมือนกันชนป้องกันแบคทีเรียจากการสัมผัสกับความเข้มข้นสูงของ สารประกอบฟีนอลิก ทำให้เซลล์ดูดซับสารประกอบฟีนอลิกมาใช้ในการย่อยสลายอย่างช้าๆ และ ต่อเนื่อง (Kindzierski *et al.*, 1995)

สำหรับประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกของเซลล์ตรึง ซึ่งต่ำกว่าการใช้เซลล์อิสระในบางสภาวะการทดลอง อาจเนื่องมาจากเซลล์อิสระมีการเกาะกลุ่มกันเป็นตะกอน เซลล์โดยการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพโดยรวมของการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก ในน้ำเสีย ดังเช่นรายงานของ Giti *et al.* (2005) ตรวจสอบการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์ ในการย่อยสลายสารฟีนอลของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas putida* ซึ่งทดลองใน microwell plate พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5-0.6 กรัมต่อลิตร เซลล์มีการสร้างไบโอฟิล์มเกาะตัว รวมกันเป็นตะกอนเซลล์ และพบกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารฟีนอลเกิดขึ้นในระบบ นอกจากนี้แม้ว่าประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกของเซลล์ตรึง *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่สูงที่สุดในการศึกษานี้ (ร้อยละ 59) มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมาของ พันธธิดา จันทร์โท (2557) ที่ทดสอบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเซลล์อิสระของแบคทีเรียดังกล่าว ภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบฟีนอลิก 1,415 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งลดสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 61 แต่ทั้งนี้พบว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษามีค่าต่างกัน โดยการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นต่ำกว่า 2 เท่า จึงสามารถ ยืนยันข้อดีของการตรึงเซลล์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและช่วยในการบำบัดสารประกอบ ฟีนอลิกได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

ส่วนชุดควบคุมที่ประกอบด้วยวัสดุตรึงเพียงอย่างเดียว (ปราศจากเซลล์แบคทีเรีย) พบการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกเพียงร้อยละ 3-9 แสดงว่าการลดลงของสารประกอบฟีนอลิก ผ่านการดูดซับด้วยวัสดุตรึงมีปริมาณน้อย ซึ่งยืนยันว่ากลไกหลักในการบำบัดสารดังกล่าวเกิดจาก กิจกรรมของแบคทีเรียตรึง

ตาราง 3.3 การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (%) หลังบ่มเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของแบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ร่วมกับน้ำเสียเป็นระยะเวลา 10 วัน ณ อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน

สภาวะ	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเข้มข้นของ สารประกอบฟีนอลิก ในน้ำเสีย (มก./ล.)	การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (%)	
				เซลล์ตรึง	เซลล์อิสระ
1	60	4	1,500	28±5 ^{efgA}	29±0 ^{CA}
2			2,500	32±2 ^{defA}	23±0 ^{eB}
3			5,000	33±7 ^{defA}	15±1 ^{gB}
4	65	7	1,500	39±16 ^{cdA}	29±0 ^{CB}
5			2,500	42±1 ^{cdA}	30±1 ^{CB}
6			5,000	42±2 ^{cdA}	26±1 ^{dB}
7	70	4	1,500	55±6 ^{abA}	30±1 ^{CB}
8			2,500	46±13 ^{bcA}	27±1 ^{dB}
9			5,000	37±1 ^{cdfA}	26±1 ^{dB}
10	70	7	1,500	59±4 ^{aA}	35±1 ^{aB}
11			2,500	32±3 ^{defA}	27±1 ^{dA}
12			5,000	39±1 ^{cdA}	29±2 ^{CB}
13	70	4	1,500	15±1 ^{hB}	23±1 ^{eA}
14			2,500	19±2 ^{ghA}	26±1 ^{dA}
15			5,000	35±2 ^{deA}	20±0 ^{fB}
16	70	7	1,500	22±8 ^{fghB}	32±1 ^{bA}
17			2,500	37±0 ^{cdeA}	26±2 ^{dB}
18			5,000	39±0 ^{cdA}	23±1 ^{eB}

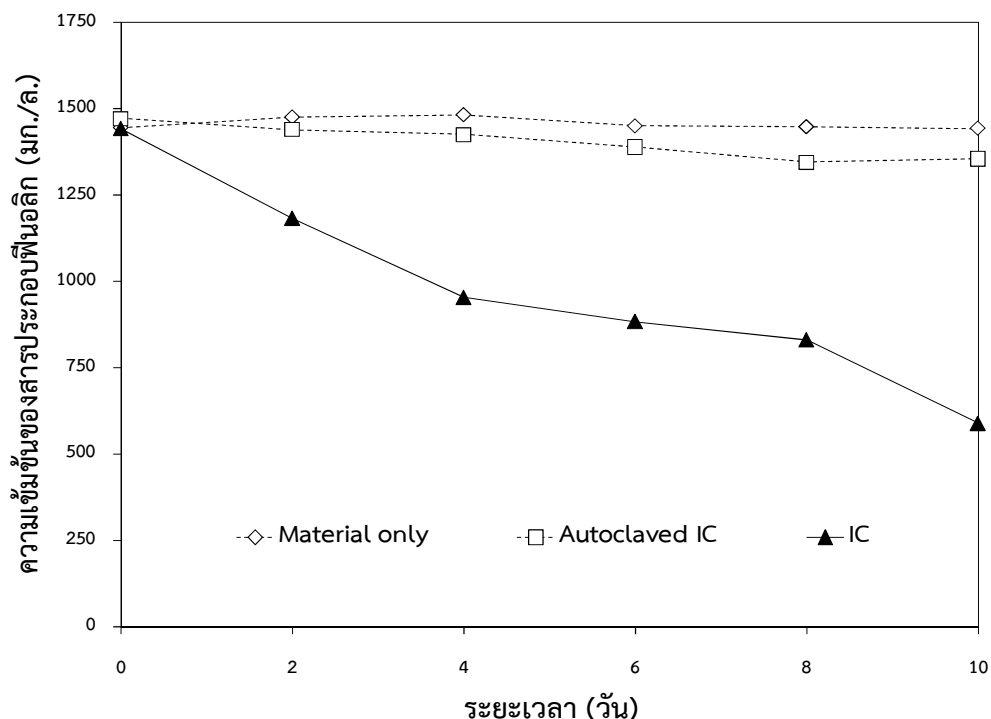
หมายเหตุ : การเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองทั้งหมดในคอลัมน์เดียวกันของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแตกต่างกัน ส่วนตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงถึงการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงลดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียได้ดีกว่าเซลล์อิสระ อีกทั้งยังรักษาความสามารถในการบำบัดได้ดีแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ พีเอช หรือความเข้มข้นของน้ำเสีย เป็นต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์อิสระและส่งผลให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง ในขณะที่การตรึงเซลล์บนวัสดุช่วยป้องกันเซลล์จากความเป็นพิษของสารดังกล่าว และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ที่ตรึงบนวัสดุ เช่น กระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ (Chung *et al.*, 2003) และยังสามารถป้องกันเซลล์จากผลของการเปลี่ยนแปลงพีเอชและอุณหภูมิ (Aksu and Bulbul, 1999) ดังเช่นการศึกษาที่ผ่านมาของ Ying *et al.* (2007) ได้ทำการตรึงเซลล์ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ PD12 ซึ่งคัดแยกจาก activated sludge ที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานในประเทศจีน ทำการตรึงบน polyvinyl alcohol (PVA) และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารฟีนอลโดยเซลล์ตรึงเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารฟีนอล พีเอช และอุณหภูมิ ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารฟีนอลมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายมากกว่าเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงทนต่อความเข้มข้นสารฟีนอลได้สูงถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายฟีนอลคือ 7.2 และเมื่อค่าพีเอชลดต่ำกว่า 7.2 อัตราการย่อยสลายของทั้งเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระลดต่ำลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อค่าพีเอชอยู่ที่ 5.5 ซึ่งอยู่ในสภาวะเป็นกรด กิจกรรมการย่อยสลายสารฟีนอลถูกยับยั้ง แต่เซลล์ตรึงยังสามารถทนต่อช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกตรึง โดยที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส เซลล์อิสระสูญเสียกิจกรรมในการย่อยสลายแต่เซลล์ตรึงยังคงรักษาอัตราการย่อยสลายได้อย่างต่อเนื่อง

Lee *et al.* (2009) ศึกษาเทคนิคการตรึงจุลินทรีย์จาก activated sludge เพื่อการย่อยสลายสารฟีนอล พบว่าเซลล์ที่ตรึงในเรซินสามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ถึงร้อยละ 95 สามารถทนต่อค่าพีเอช ในช่วงที่กว้างกว่าเซลล์อิสระ การย่อยสลายสารฟีนอลในเซลล์อิสระจะถูกยับยั้งเมื่อมีปริมาณฟีนอล 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เซลล์ที่ถูกตรึงไม่ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นดังกล่าว เช่นเดียวกับ Khongkhaem *et al.* (2011) ศึกษาการตรึงเซลล์แบบกักขัง (Entrapment) ในซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ ของเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายสารฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าเซลล์อิสระ โดยที่สามารถย่อยสลายสารฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ถึงร้อยละ 80-85 ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3.3 อัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโดยเซลล์ตรึง

จากสถานะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์ตรึง คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียตรึงลดสารประกอบฟีนอลิกได้อย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 10 จากความเข้มข้นเริ่มต้น 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร คงเหลือประมาณ 648 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 3.7) คิดเป็นประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียได้ร้อยละ 59 และมีอัตราการย่อยสลาย คิดเป็น 3.55 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการศึกษานี้ มีค่าต่ำกว่ารายงานของ Mutzel *et al.* (1996) พบว่าแบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารฟีนอล 470 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร CFMM มีอัตราการย่อยสลาย เท่ากับ 7.84 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจากอัตราการย่อยสลายที่แตกต่างกันนี้ อาจมีผลมาจากการทดลองของ Mutzel *et al.* (1996) ศึกษาในอาหาร CFMM ที่มีสารฟีนอลเพียงชนิดเดียว แตกต่างจากองค์ประกอบของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่มีความเข้มข้นของสารประกอบ ฟีนอลิกสูงรวมทั้งมีสารประกอบฟีนอลิกหลากหลายชนิด สารประกอบตัวอื่นๆ อาจเป็น ตัวยับยั้ง (Inhibitor) กิจกรรมการย่อยสลายของสายพันธุ์ A2 จึงทำให้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ และอัตราการย่อยสลายในแต่ละการทดลองเป็นไปได้ยาก ทั้งนี้การลดลงของสารประกอบฟีนอลิก เป็นผลมาจากความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ A2 เป็นหลัก เนื่องจากชุดควบคุมที่เป็นวัสดุเพียงอย่างเดียวซึ่งเป็นตัวแทนของการดูดซับโดยวัสดุตรึง และเซลล์ตรึง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธี Autoclave เป็นตัวแทนของการดูดซับโดยไบโอฟิล์มที่แบคทีเรียผลิตขึ้นนั้น ลดสารประกอบฟีนอลิกได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นอยู่ในช่วงร้อยละ 3-8 (รูปที่ 3.7) ผลการศึกษา สอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ (phenol-degrading bacteria) ในเซลล์ ตรึงก่อนและหลังการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย โดยบ่มตัวอย่างในอาหาร CFMM ที่มีการเติมฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าจำนวน แบคทีเรียในเซลล์ตรึง มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 ของการทดลองซึ่งมีประมาณ 6.7×10^5 CFU/กรัมวัสดุ เป็น 11.8×10^5 CFU/กรัมวัสดุ หลังสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 10 แสดงว่าแบคทีเรีย บนวัสดุตรึงสามารถใช้สารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต ซึ่ง สอดคล้องกับการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย ที่นำเสนอข้างต้น

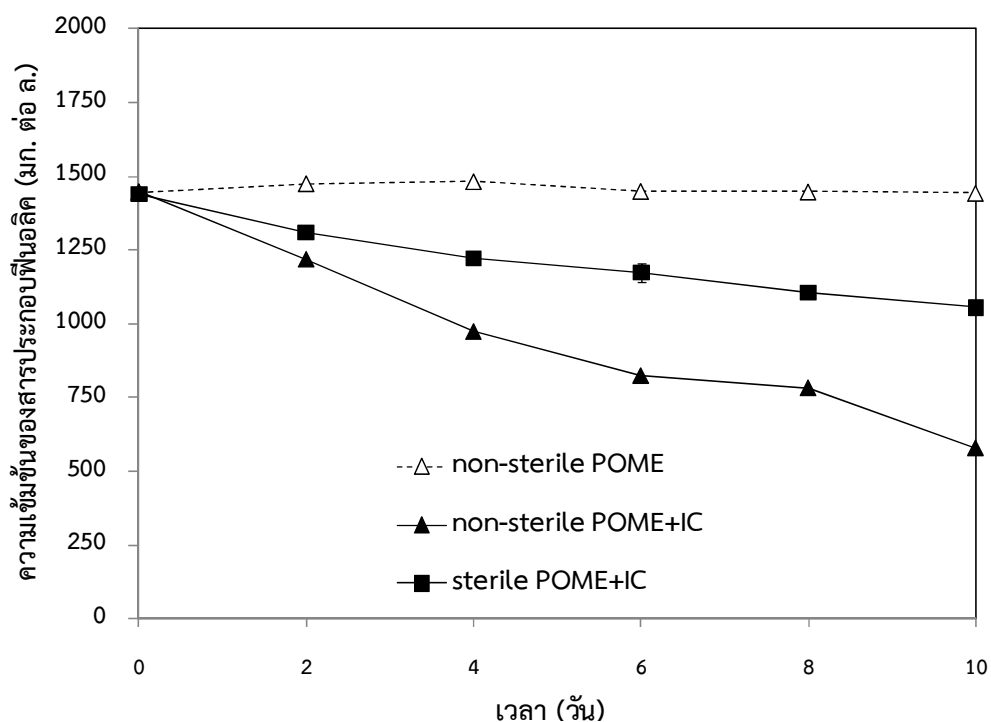


รูปที่ 3.7 การลดลงของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโดยเซลล์ตรึง ณ เวลาต่าง ๆ ที่สภาวะเหมาะสมที่สุด คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ วัสดุตรึงปราศจากเซลล์และเซลล์ตรึงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยกำหนดให้ Material only = วัสดุตรึงปราศจากเซลล์, Autoclaved IC = เซลล์ตรึงที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธี Autoclave และ IC = เซลล์ตรึง

3.3.4 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์ตรึงในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อ

ในการทดสอบการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์ตรึง *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มข้างต้นในข้อ 3.2.2 และ 3.2.3 เป็นน้ำเสียที่ยังไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ท้องถิ่นในน้ำเสีย จึงมีการทดสอบโดยใช้น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อยืนยันว่าการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกนั้นเกิดจากการย่อยสลายโดยเซลล์ตรึง *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เป็นหลัก ซึ่งศึกษาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาก่อนหน้านี้ คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้น 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มตัวอย่างที่ 80 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 วัน จากรูปที่ 3.8 พบการย่อยสลายของสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์ตรึงในน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและ

น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง โดยในวันที่ 10 พบว่าเซลล์ตรึงลดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ คงเหลือประมาณ 630 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 59 และมีอัตราการย่อยสลายคิดเป็น 3.55 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ตรึงลดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ คงเหลือประมาณ 1,055 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 27 และมีอัตราการย่อยสลายคิดเป็น 1.60 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และชุดควบคุมซึ่งเป็นตัวอย่างน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรียตรึง ไม่พบการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกตลอดการทดลอง สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ไม่พบจำนวนแบคทีเรียทนร้อนที่สามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ (phenol-degrading bacteria) ในน้ำเสียนี้ เมื่อบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7



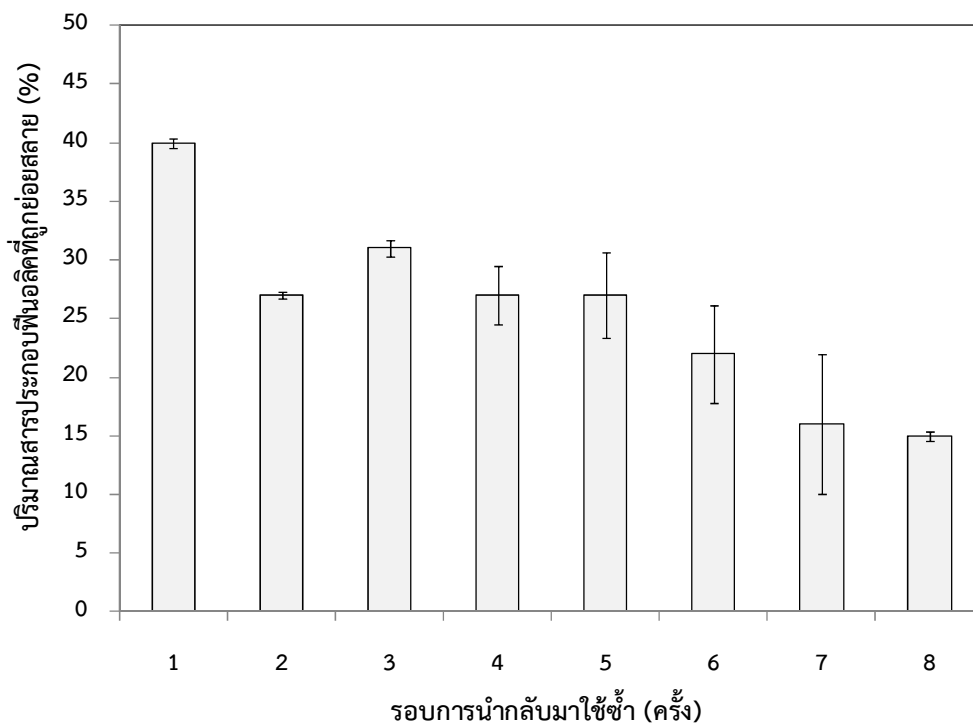
รูปที่ 3.8 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในระหว่างการบ่มน้ำเสียที่ผ่าน/ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและมีการเติม/ไม่เติมแบคทีเรียตรึง *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยกำหนดให้ non-sterile POME = น้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ, sterile POME = น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และ IC = เซลล์ตรึง

เช่นเดียวกับผลการศึกษาของพันธุ์ธิดา จันทร์โท (2557) ที่ไม่พบจำนวนแบคทีเรียทนร้อนที่สามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 7 แสดงว่าจุลินทรีย์ท้องถิ่นไม่สามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการ

ทดลองนี้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกเกิดขึ้นจากการทำงานของเซลล์ตรึงเป็นหลัก และประสิทธิภาพในการบำบัดที่ลดลง เมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อาจมีสาเหตุจากกระบวนการฆ่าเชื้อ ทำให้ลักษณะของสารประกอบบางชนิดที่เป็นแหล่งอาหารในน้ำเสียถูกทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ส่งผลให้แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 นำไปใช้ได้ยากขึ้น (พันธ์ธิดา จันทร์โท, 2557)

3.4 การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของเซลล์ตรึงในการนำกลับมาใช้ซ้ำหลังจากการใช้น้ำเสียครั้งแรก โดยนำเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานแล้ว กรองแยกออกจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัด จากนั้นล้างเซลล์ตรึงด้วย 0.85% NaCl ก่อนนำไปใส่ในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มชนิดใหม่ที่ยังไม่ผ่านการบำบัด (ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ) ทำการทดสอบภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาว่าสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง ซึ่งการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงเป็นการช่วยลดระยะเวลา ค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำจำนวน 8 ครั้ง สามารถลดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียได้ร้อยละ 40, 27, 31, 27, 27, 22, 16 และ 15 ตามลำดับ (รูปที่ 3.9) ภายในระยะเวลา 6 วันของการทดลอง จะเห็นได้ว่าเซลล์ตรึงสามารถใช้งานซ้ำได้ประมาณ 6 ครั้ง โดยที่ยังคงประสิทธิภาพการบำบัดได้มากกว่าร้อยละ 50 ของการใช้ซ้ำครั้งแรก ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่ลดลงหลังจากการนำมาใช้ซ้ำ มีสาเหตุเนื่องมาจากเซลล์ตรึงเกิดการหลุดออกจากวัสดุ หลังจากนำมาใช้ซ้ำหลายๆ ครั้ง ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ในน้ำเสียหลังการใช้ซ้ำของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก เมื่อบ่มตัวอย่างบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีสารฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวจำนวนแตกต่างกัน หลังการใช้ซ้ำครั้งที่ 2, 4, 5, 6, 7 ตั้งแต่ 5×10^3 – 1×10^7 CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 3.4) นอกจากนี้จากการตรวจสอบตัวอย่างน้ำเสียก่อนการทดลองบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย แสดงว่าจุลินทรีย์ท้องถิ่นไม่สามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการศึกษานี้ ดังนั้นผลการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจึงเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียตรึง นอกจากนี้พบว่าลักษณะของวัสดุตรึงยังคงสภาพเดิมหลังผ่านการใช้งานซ้ำทุกครั้งของการทดลอง



รูปที่ 3.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ลดลงโดยแบคทีเรียตรึงบนเม็ดวัสดุพูนจากแก้วกลบที่ผ่านการใช้ซ้ำจำนวน 8 ครั้ง ในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ตารางที่ 3.4 จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ที่ตรวจพบในน้ำเสีย ณ วันที่ 6 ของการบำบัด หลังจากการนำเซลล์ตรึงมาใช้ซ้ำในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

	การนำมาใช้ซ้ำ (ครั้ง)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
จำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย (CFU/มิลลิลิตร)	-	5×10^3	-	19.5×10^6	1×10^7	1.5×10^6	6.5×10^5	-

หมายเหตุ: -, Not detected.

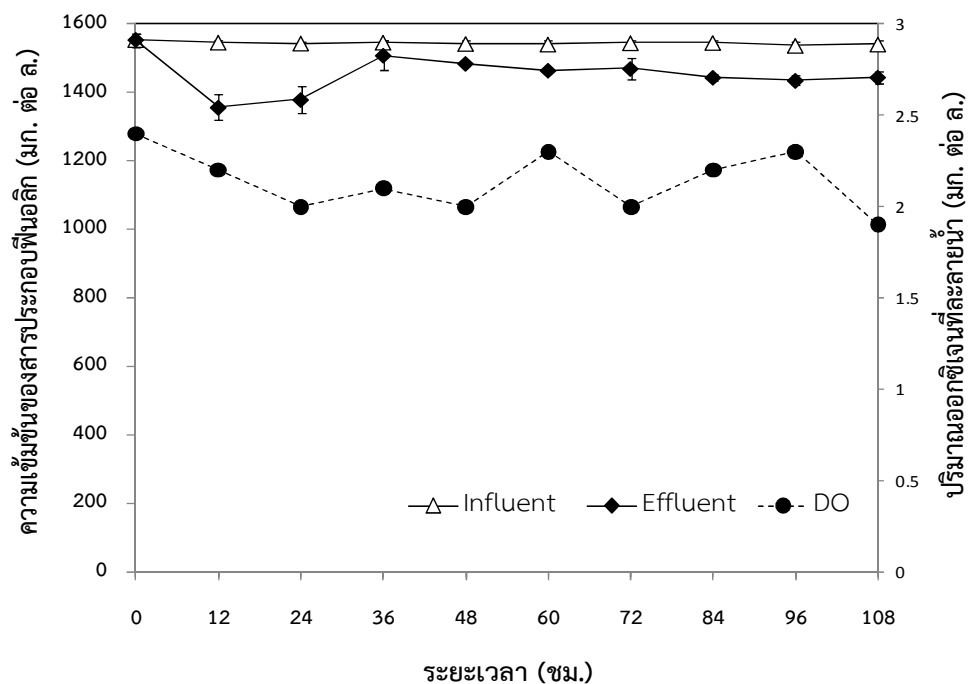
3.5 การทดลองเดินระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุเซลล์ตรึงในการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

3.5.1 ระยะเวลาที่เก็บน้ำเสีย 12 ชั่วโมง

การทดลองนี้เป็นแนวทางในการทดลองเดินระบบแบบต่อเนื่องในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เซลล์ตรึงของแบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Packed bed ซึ่งเป็นรูปแบบชั้นบรรจุหรือชั้นตัวกลางที่ช่วยป้องกันการแตกหักของเม็ดวัสดุพอร์นขณะใช้งาน ตัวถังมีปริมาตรใช้งาน 1 ลิตร โดยศึกษาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในระบบกะก่อนหน้านี้นี้ ได้แก่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และพีเอชของน้ำเสียเท่ากับ 7 ใช้เซลล์ตรึง 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสัดส่วนเดียวกับที่ขยายขนาดจากถังระบบกะ และมีการแปรผันระยะเวลาที่เก็บน้ำเสีย (Hydraulic retention time, HRT) ที่แตกต่างกัน เริ่มต้นกำหนดระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียที่ 12 ชั่วโมง โดยทำการป้อนน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่พีเอชเท่ากับ 7 และควบคุมค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved Oxygen, DO) ให้อยู่ในช่วง 2-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรตลอดการทดลอง เข้าสู่ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุเซลล์ตรึงด้วยอัตราการไหล 1.39 มิลลิตรต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิของระบบที่ 65 องศาเซลเซียส พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียได้ร้อยละ 13 จากความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียเริ่มต้น 1,553 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 3.10 อาจเนื่องมาจากเซลล์ตรึงยังมีประสิทธิภาพสูงในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก แต่เมื่อดำเนินการบำบัดกับน้ำเสียในระบบดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของเซลล์ตรึงลดเหลือร้อยละ 11 และลดลงเหลือเพียงร้อยละ 3 เมื่อบำบัดอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของเซลล์ตรึงค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงร้อยละ 7 ในระยะเวลา 108 ชั่วโมง ของการเดินระบบอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 3.10) ซึ่งหลังจากชั่วโมงที่ 84 พบว่าประสิทธิภาพในการบำบัดมีค่าลดลงและคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 108 ของการทดลอง

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิก พบว่าหลังการบำบัดมีค่าลดลงเล็กน้อย ซึ่งมีความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยแนวทางการพัฒนาให้ระบบบำบัดมีศักยภาพมากขึ้น อาจทำได้โดยศึกษาอัตราส่วนของเซลล์ตรึงต่อ น้ำเสียที่เหมาะสม อัตราการให้อากาศที่เหมาะสม และการเพิ่มระยะเวลาการกักเก็บน้ำเสีย เพื่อเพิ่ม

ระยะเวลาให้เซลล์ตรึงได้สัมผัสกับน้ำเสียนานขึ้นซึ่งอาจส่งผลให้อัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียเพิ่มสูงขึ้น



รูปที่ 3.10 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเซลล์ตรึงในเมมเบรนชีวภาพจากถ้ำแกลบ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 1 ลิตร ที่เดินระบบแบบต่อเนื่อง และใช้ระยะเวลาพักเก็บน้ำเสีย 12 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ Influent = น้ำเข้า, Effluent = น้ำออก และ DO = ค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

อย่างไรก็ตามผลการศึกษางานวิจัยนี้ทั้งในระบบกะและการทดลองเดินระบบแบบต่อเนื่องแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียตรึงบนวัสดุพอร์ซเลนจากถ้ำแกลบมาใช้ในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการตรึงเซลล์แบบเกาะติดเป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์และรักษาการทำงานของเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง อีกทั้งการขยายขนาดเพิ่มจำนวนได้ง่ายกว่าการตรึงแบบกักขังในวัสดุสังเคราะห์ นอกจากนี้วัสดุที่ใช้เป็นวัสดุเหลือทิ้งหรือผลพลอยได้จากการเกษตรที่หาได้ภายในประเทศ ราคาไม่แพง ไม่ก่อให้เกิดสารเคมีที่เป็นพิษต่อแบคทีเรีย จึงมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลิกจากอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง

4.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้าง EPS ของแบคทีเรีย

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างเส้นใย EPS และระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 บนเม็ดวัสดุพูนจากถ้ำเกลือ พบว่าแบคทีเรียมีการผลิต EPS ได้ดีที่สุดในสภาวะอาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่ประกอบด้วยกลูโคสและทริปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) โดยแบคทีเรียสังเคราะห์ปริมาณ EPS เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการทดลองและคงที่ในวันที่ 6 ซึ่งปริมาณ EPS เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 45 เมื่อเทียบกับเริ่มต้นการทดลอง ดังนั้นระยะเวลา 6 วัน จึงเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ เพื่อให้เซลล์มีการเกาะยึดกับวัสดุได้ดี และป้องกันการหลุดของเซลล์ตรงขณะนำไปใช้บำบัดน้ำเสีย ส่วนสภาวะที่มีปริมาณการสังเคราะห์ EPS รองลงมา ได้แก่ การเติมแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิดร่วมกัน คือ การเติมอีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.1 (w/v) มีการสังเคราะห์ EPS ร้อยละ 42 ภายในระยะเวลา 2 วัน ซึ่งการผลิตเส้นใย EPS มีค่าใกล้เคียงกับสภาวะที่มีการเติมเฉพาะแหล่งไนโตรเจนไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน คือ การเติมทริปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) แบคทีเรียสร้างเส้นใย EPS เพิ่มขึ้นร้อยละ 41 ภายในระยะเวลา 6 วัน ส่วนสภาวะที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนแต่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ การเติมกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) แบคทีเรียมีการสังเคราะห์เส้นใย EPS เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นการทดลองเพียงร้อยละ 22 ภายในระยะเวลา 2 วัน ซึ่งไม่แตกต่างจากสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่พบการสร้างเส้นใย EPS ร้อยละ 21 ภายในระยะเวลา 6 วัน แสดงให้เห็นว่าปริมาณการสังเคราะห์เส้นใย EPS ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1.2 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้เซลล์ตรึงในระบบกะ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์ตรึงของแบคทีเรียเทอร์มอฟิล *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 โดยการแปรผันปัจจัยในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ 1) อุณหภูมิ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส 2) พีเอช 4 และ 7 และ 3) ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้นในน้ำเสียที่มีการเติมสารฟีนอลให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1,500, 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสภาวะที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียที่สูงที่สุดโดยเซลล์ตรึง ได้แก่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้นในน้ำเสียเท่ากับ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งลดสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 59 หลังจากวันที่ 10 ของการทดลอง และมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับ 3.55 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลการทดลองสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียเทอร์มอฟิลที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ (phenol-degrading bacteria) ก่อนและหลังการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย โดยพบว่าจำนวนแบคทีเรียดังกล่าวในเซลล์ตรึงมีค่าเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 คือ 6.7×10^5 CFU/กรัมวัสดุ เป็น 11.8×10^5 CFU/กรัมวัสดุ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงว่าแบคทีเรียบิวสตรึงมีการใช้สารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้

ในขณะที่เซลล์อิสระบำบัดสารประกอบฟีนอลิกได้สูงสุดร้อยละ 35 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับเซลล์ตรึง และพบว่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพการบำบัดโดยเซลล์อิสระลดลง ในขณะที่ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกโดยเซลล์ตรึงสูงกว่าเซลล์อิสระเกือบทุกสภาวะการทดลอง แสดงว่าเซลล์ตรึงทำงานได้ดีกว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นเซลล์ตรึงจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้งานในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกที่ปนเปื้อนในน้ำเสียที่มีคุณลักษณะแตกต่างกันได้โดยเฉพาะน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม นอกจากนั้นยังสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำเพื่อการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้หลายครั้ง แม้ว่าหลังจากการใช้ซ้ำพบว่าประสิทธิภาพการบำบัดลดลง โดยหลังการใช้ซ้ำจำนวน 6 ครั้งพบว่าประสิทธิภาพการบำบัดลดลงมากกว่าร้อยละ 50 ของการใช้งานครั้งแรก

อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงสามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่กว้างและมีกิจกรรมอย่างต่อเนื่อง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเซลล์ตรึงไปใช้งานบำบัดน้ำเสียในระบบขยายขนาดต่อไป

4.1.3 การทดลองเดินระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีเซลล์ตรึงในการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

การศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในเมื่อดิวสคูปรุณจากถ้ำแกลบในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Packed bed ขนาด 1 ลิตร ที่บรรจุเซลล์ตรึงปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร ทำการป้อนน้ำเสียอย่างต่อเนื่อง และใช้ระยะเวลาพักเก็บน้ำที่ 12 ชั่วโมง โดยทดลองที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 พบว่าเซลล์ตรึงย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกได้ร้อยละ 13 จากความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้น 1,553 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 ข้อเสนอแนะ

4.2.1 เนื่องจากการศึกษานี้ตรวจวัดเฉพาะปริมาณในการสังเคราะห์ EPS เท่านั้น ซึ่งอาจจะเป็นเพียงปัจจัยหนึ่งในการยึดเกาะของแบคทีเรียในวัสดุตรึง จึงทำให้ในระหว่างการใช้งานและหลังจากการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำตรวจพบแบคทีเรียบางส่วนหลุดออกจากวัสดุตรึง จึงควรศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อกระบวนการตรึงเซลล์เพิ่มเติม เพื่อให้มีการยึดเกาะบนวัสดุอย่างแข็งแรงมากขึ้น เช่น ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า hydrophobicity บริเวณพื้นผิวเซลล์ในสภาวะที่มีแหล่งอาหารต่างๆ หรือ ศึกษาองค์ประกอบของเส้นใย EPS ที่เชื่อผลผลิตขึ้นว่าส่งผลต่อระดับในการเกาะติดของแบคทีเรียบนวัสดุอย่างไร เป็นต้น

4.2.2 การใช้แบคทีเรียร่วม (co-culture) หรือกลุ่มแบคทีเรีย (bacterial consortium) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เนื่องจากในน้ำเสียมีสารอินทรีย์และสารประกอบฟีนอลิกหลากหลายชนิด อาจทำให้อัตราการย่อยสลายสารดังกล่าวเพิ่มขึ้น และสามารถเพิ่มปริมาณการสร้างเส้นใย EPS ในการยึดเกาะวัสดุได้มากขึ้นกว่าการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดียว อันเนื่องมาจากการส่งเสริมเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียร่วมกัน (Simova *et al.*, 2004)

4.2.3 แนวทางการประยุกต์ใช้แบคทีเรียตรึง *B. thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 บนเมื่อดิวสคูปรุณจากถ้ำแกลบ ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีอยู่ก่อนเข้าสู่ระบบการผลิตก๊าซชีวภาพและระบบบ่อปรับเสถียร ทำได้โดยเพิ่มถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อบำบัดสารประกอบฟีนอลิกเบื้องต้นก่อนเข้าสู่ระบบการผลิตก๊าซชีวภาพ โดยอาจนำกระแสไฟฟ้าที่ผลิตได้จากระบบก๊าซชีวภาพมาใช้เป็นพลังงานในการควบคุมอุณหภูมิของถังปฏิกรณ์ในระหว่างการทำงานให้อยู่ในช่วง 60-70 องศาเซลเซียส ซึ่งการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกเบื้องต้นทำให้การผลิต

ก๊าซชีวภาพเพิ่มขึ้น โดยระบบเก็บกักก๊าซชีวภาพ (Biogas capture system) เป็นวิธีการหนึ่งช่วยลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจกออกสู่สิ่งแวดล้อมได้ประมาณร้อยละ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับระบบบำบัดน้ำเสียที่ไม่มีระบบการผลิตก๊าซชีวภาพ (Kaewmai *et al.*, 2013) และปริมาณก๊าซมีเทนที่เพิ่มขึ้น ช่วยเพิ่มรายได้ให้แก่โรงงานอีกด้วย ดังเช่นการศึกษาของ González-González and Cuadros (2015) พบว่าการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นร้อยละ 78 ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกแบบให้อากาศ ก่อนเข้าสู่กระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ (aerobic-anaerobic treatment) ช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตก๊าซมีเทนจาก 0.16 เป็น 0.39 ลูกบาศก์เมตรต่อกิโลกรัมซีไอทีที่ถูกกำจัด ซึ่งมีความคุ้มค่าในเชิงเศรษฐศาสตร์ โดยมีระยะเวลาคืนทุน (the Period of Return of Investment; PRI) อยู่ที่ประมาณ 5.82 ปี และอัตราผลตอบแทนภายใน (Internal rate of return, IRR) อยู่ที่ร้อยละ 15

บรรณานุกรม

- กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2549. การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศเพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพเชิงเศรษฐกิจศาสตร์. นิเวศน์อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม. กรุงเทพฯ.
- กุสุมาลย์ ล่องแก้ว. 2557. การลดสารประกอบฟีนอลิกด้วยระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบและการบำบัดโดยดิน. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จุวัลณีย์ แสงระวี. 2547. ศึกษาความเป็นไปได้ของซังข้าวโพดในการดูดซับสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในน้ำทิ้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธนาวัฒน์ รักกมล. 2549. ประสิทธิภาพของระบบบำบัดเอสปีอาร์ แบบเทอร์โมฟิลิกและมีโซฟิลิกในการบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- ไบโอบอลและเซรามิกส์. 2559. (ออนไลน์). สืบค้นได้จาก <http://www.aliexpress.com> (26 สิงหาคม 2559)
- พูนสุข ประเสริฐทรัพย์. 2543. การผลิตน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำที่ใช้เครื่อง decanter และคุณลักษณะของน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดสุราษฎร์ธานีและกระบี่. รายงานวิจัย. วารสารสงขลานครินทร์นครินทร์.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพและอรัญ หันพงศ์กิตติกุล. 2554. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ทางการค้าและจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการเก็บเกี่ยวน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. รายงานวิจัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.
- พนิดา โต๊ะสุ. 2555. การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พันธิธิดา จันทร์โท. 2557. การบำบัดขั้นต้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการ สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- รณชัย ไชยศรี. 2550. กระบวนการหมักแบบไร้อากาศสองขั้นตอนของน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มในถังปฏิกรณ์ UASB และ UFAF. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากอาหารหมักพื้นบ้านและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2556. ผลงานวิจัย สวทช. คู่เชิงพาณิชย์ ปี 2549-2556. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. ปทุมธานี.
- อนุกุล เกียรติขวัญบุตร. 2556. การกำจัดสีและการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยราไวท์รอตที่ตรึงบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อลิสสา วังใน. 2550. การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- เอ็ม นัยเลิศ. 2555. การผลิตเอนไซม์ไลเปสโดย *Rhodotorula mucilagenosa* และการตรึงเซลล์เพื่อใช้ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- 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.
- Ahamad, P.Y.A. and Kunhi, A.A.M. 2011. Enhanced degradation of phenol by *Pseudomonas* sp. CP4 entrapped in agar and calcium alginate beads in batch and continuous processes. *Biodegradation*. 22: 253-265.
- Ahmad, S.A., Shamaan, N.A., Arif, N.M., Koon, G.B., Shukor, M.Y.A. and Syed, M.A. 2012. Enhanced phenol degradation by immobilized *Acinetobacter* sp. Strain AQ5NOL1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 347-352.
- Ahmed, Y., Yaakob, Z., Akhtar, P. and Sopian, K. 2015. Production of biogas and performance evaluation of existing treatment processes in palm oil mill effluent (POME). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 42: 1260-1278.

- Aksu, Z. and Bulbul, G. 1999. Determination of the effective diffusion coefficient of phenol in ca-alginate-immobilized *P. putida* beads. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 344-348.
- Alam, Md.Z., Ameen, E.S., Muyibi, S.A. and Kabbashi, N.A. 2009. The factors affecting the performance of activated carbon prepared from oil palm empty fruit bunches for adsorption of phenol. *Chemical Engineering Journal*. 155: 191-198.
- Alexander, M. 1977. An introduction to soil microbiology, 2nd Edition. John Wiley and Sons, Inc. New York. 1977: 305-330.
- Ali, S., Lafuente, R.F. and Cowan, D.A. 1998. Meta-pathway degradation of phenolics by thermophilic *Bacilli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 23: 462-468.
- Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Franke, W. and Michaelis, W. 2000. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 518-523.
- APHA, AWWA and WEF. 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21th edition. American Public Health Association. Washington DC.
- Arutchelvan, V., Kanakasabai, V., Nagarajan, S. and Muralikrishnan, V. 2005. Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. B127: 238-243.
- Assas, N., Ayed, L., Marouani, L. and Hamdi, M. 2002. Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewater by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*. 30: 361-365.
- Babich, H. and Davis, D.L. 1981. Phenol: A review of environmental and health risks. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1: 90-109.
- Bakhshi, Z., Najafpour, G., Kariminezhad, E., Pishgar, R., Mousavi, N. and Taghizade, T. 2011. Growth kinetic models for phenol biodegradation in a batch culture of *Pseudomonas putida*. *Environmental Technology*. 32(16): 1835-1841.

- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plant and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential use. *Food Chemistry*. 99: 191-203.
- Banerjee, A. and Ghoshal, A.K. 2011. Phenol degradation performance by isolated *Bacillus cereus* immobilized in alginate. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65: 1052-1060.
- Barker, T.W. and Worgan, J.T. 1981. The utilization of palm oil processing effluent as substrate of microbial protein by fungus *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Applied Microbiology*. 11: 234-240.
- Basak, B., Bhunia, B. and Dey, A. 2014. Studies on the potential use of sugarcane bagasse as carrier matrix for immobilization of *Candida tropicalis* PHB5 for phenol biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 93: 107-117.
- Borja, R., Alba, J. and Banks, C.J. 1996. Impact of the main phenolic compounds of olive mill wastewater on the kinetic of acetoclastic methanogenesis. *Process Biochemistry*. 32: 121-133.
- Brányik, T., Kuncoová, G. and Páca, J. 2000. The use of silica gel prepared by sol-gel method and polyurethane foam as microbial carriers in the continuous degradation of phenol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54: 168-172.
- Breedveld, M.W., Zevenhuizen, L.P.T.M., Canter-Cremers, H.C.J. and Zehnder, A.J.B. 1993. Influence of growth conditions on production of capsular and extracellular polysaccharides by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Microbiology*. 64: 1-8.
- Camarillo, R. and Rincón, J. 2009. Effect of inhibitory compounds on the anaerobic digestion Performance of diluted wastewater from the alimentary industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 84: 1615-1623.
- Cassidy, M.B., Lee, H. and Trevors, J.T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cell: a review. *Journal of Industrial Microbiology*. 16: 79-101.

- Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. and Topisirovic, L. 1994. Carbon source requirement for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied Environmental Microbiology*. 60: 3914-3919.
- Chantho, P., Musikavong, C. and Suttinun, O. 2013. Pretreatment of phenolic compounds in palm oil mill wastewater by the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2 for enhancement of biogas production. The 2nd International Conference on Environmental Science & Engineering and Management. March 27-29, 2013, Khon Kaen, Thailand.
- Chavalparit, O., Rulkens, W.H., Mol, A.P.J. and Khaodhair, S. 2006. Options for environmental sustainability of the crude palm oil industry in Thailand through enhancement of industrial ecosystems. *Environment, Development and Sustainability*. 8: 271-287.
- Chebbi, A., Mnif, S., Mhiri, N., Jlaiel, L., Sayadi, S. and Chamkha, M. 2014. A moderately thermophilic and mercaptan-degrading *Bacillus licheniformis* strain CAN55 isolated from gas-washing wastewater of the phosphate industry, Tunisia. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 94: 207-213.
- Chung, T.P., Tseng, H.Y. and Juang, R.S. 2003. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process Biochemistry*. 38: 1497-1507.
- 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.
- Couto, R.S. 2009. Dye removal by immobilized fungi. *Biotechnology Advances*. 27: 227-235.
- Czaczyk, K. and Myszka, K. 2007. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. *Polish Journal of Environmental Studies*. 16: 799-806.

- D'Annibale, A., Casa, R., Pieruccetti, F., Ricci, M. and Marabottini, R, 2004. *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*. 54: 887-894.
- Degeest, B. and De Vuyst, L. 2000. Correlation of activities of the enzyme α -phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 3519-3527.
- Dhouib, A., Ellouz, M., Aloui, F. and Sayadi S. 2005. Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 405-411.
- Dong, F.M., Wang, L.L., Wang, C.M., Cheng, J.P., He, Z.Q., Sheng, Z.J. and Shen, R.O. 1992. Molecular cloning and mapping of phenol degradation genes from *Bacillus stearothermophilus* FDTP-3 and their expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 2531-2535.
- Duffner, F.M., Kirchner, U., Bauer, M.P. and Müller, R., 2000. Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7 : cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene*. 256: 215-221.
- Duffner, F.M. and Müller, R. 1998. A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2 : nucleotide sequence and analysis of the genes. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 161: 37-45.
- Ehrhardt, H.M. and Rehm, H.J. 1985. Phenol degradation by microorganisms adsorbed on activated carbon. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 21: 32-36.
- Ergul, F.E., Sagin, s., Ongen, G., Sukan. F.V., 2011. Dephenolization and decolorization of olive mill wastewater through sequential batch and co-culture application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 107-114.
- Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamai, L., Tahri-Jouti, M.A., Sendide, K. and Ettayebi M. 2003. Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis*

- under metabolic induction. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 223: 215-219.
- Farhad, S., Yoo, Y., Hamdullahpur, F. 2010. Effects of fuel processing methods on industrial scale biogas-fuelled solid oxide fuel cell system for operating in wastewater treatment plants. *Journal of Power Sources*. 195: 1446-1453.
- Farres, J., Caminal, G. and Lopez-Santin, J. 1997. Influence of phosphate on rhamnose containing exopolysaccharide rheology and production by *Klebsiella* I-714. *Applied Microbiology*. 48: 522-527.
- Feitkenhauer, H., Schnicke, S., Müller, R. and Märkl, H. 2001. Determination of kinetic parameter of the phenol-degrading thermophile *Bacillus thermoleovorans* sp. A2. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 744-750.
- Figuerola, L.A. and Silverstein, J.A. 1989. Ruthenium red adsorption method for measurement of extracellular polysaccharides in sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering*. 33: 941-947.
- Finore, I., Donato, P.D., Mastascusa, V., Nicolaus, B. and Poli A. 2014. Fermentation Technologies for the Optimization of Marine Microbial Exopolysaccharide Production. *Marine Drugs*. 12: 3005-3024.
- Fleming, H.C. and Wingender, J. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*. 43(6): 1-8.
- Gandhi, H.P., Ray, R.M. and Patel R.M. 1997. Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydrate Polymers*. 34: 323-327.
- Giti, E., Mehdi, H. and Nasser, G. 2005. Development of a microtitre plate method for determination of phenol utilization, biofilm formation and respiratory activity by environmental bacterial isolates. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 56: 231-235.
- González-González, A. and Cuadros, F. 2015. Effect of aerobic pretreatment on anaerobic digestion of olive mill wastewater (OMWW): An ecoefficient treatment. *Food and Bioproducts Processing*. 95: 339-345.
- Hartley, C.W.S. 1977. Oil Palm selection and breeding In *The Oil Palm*. Longman. Inc., New York. 195-310.

- Hamed, S.B., Maaroufi, A., Ghram, A., Zouhaier, B.A.G. and Labat, M. 2013. Isolation of four hydrocarbon effluent-degrading *Bacillaceae* species and evaluation of their ability to grow under high-temperature or high-salinity condition. *African Journal of Biotechnology*. 12(14): 1636-1643.
- Heipieper, H.J., Diefenbach, R. and Keweloh, H. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 1847-1852.
- Heredia, J.B.D., Torregrosa, J., Dominguez, J.R. and Peres, J.A. 2001. Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent. *Chemosphere*. 45: 85-90.
- Hernandez, J.E. and Edyvean, R.G.J. 2008. Inhibition of biogas production and biodegradation and biodegradability by substituted phenolic compound in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous materials*. 160: 20-28.
- Himanslm, P.G., Ramesh, M.R. and Rajni, M. 1997. Exopolymer production by *Bacillus species*. *Carbohydrate polymers*. 34: 323-327.
- Hopper, D.J. and Taylor, D.G. 1975. Pathways for the Degradation of *m*-Cresol and *p*-Cresol by *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*. 122: 1-6.
- Jimenez, J.B., Rivas, R.P., Lopez, G.J., Pesciaroli, C., Barghini, P. and Fenice, M. 2012. Immobilization of *Delftia tsuruhatensis* in macro-porous cellulose and biodegradation of phenolic compounds in repeated batch process. *Journal of Biotechnology*. 157: 148-153.
- Kaewmai, R., H-Kittikun, A., Suksaroj, C. and Musikavong, C. 2013. Alternative technologies for the reduction of greenhouse gas emissions from palm oil mills in Thailand. *Environmental Sciences Technology*. 47: 12417-12425.
- Katzbauer, B., Narodoslawsky, B. and Moser, A. 1995. Classification system for immobilization techniques. *Bioprocess Engineering*. 12: 173-170.
- Keweloh, H., Weyrauch, G. and Rehm, HJ. 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 33: 66-71.

- Khongkhaem, P., Intasiri, A. and Luepromchai, E. 2011. Silica immobilized *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 degrade high concentration of phenol. *Letters in Applied Microbiology*. 52: 448-455.
- Kietkwanboot, A., Tran, T.M.H. and Suttinun, O. 2013. Decolorization and biodegradation of phenolic compounds in palm oil mill effluent by white rot fungi immobilized on oil palm residues. The 2nd International Conference on Environmental Science & Engineering and Management. March 27-29, 2013, Khon Kaen, Thailand.
- Kiliç, N.K., Karacakaya, P., Duygu, E. and Dönmez, G. 2012. Biodegradation of phenol by *Synechocystis* sp. In media including triacontanol hormone. *Water and Environment Journal*. 26: 94-99.
- Kindzierski, W.B., Fedorak, P.M., Gray, M.R. and Hrudey, S.E. 1995. Activated carbon and synthetic resins as support material for methanogenic phenol-degrading consortia-comparison of phenol-degrading activities. *Water Environmental Research*. 67: 108-117.
- Ko, SH., Lee, H.S., Park, S.H. and Lee, H.K. 2000. Optimal conditions for the production of exopolysaccharide by marine microorganism *Hahella chejuensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 5: 181-185.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, M.I., Marchant, R. and Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages productions: a review. *Food Microbiology*. 21: 377-397.
- Lakhtar, H., Ismaili-Alaoui, M., Philippoussis, A., Perraud-Gaime, I. and Roussos, S. 2010. Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 64: 167-172.
- Lam, M.K. and Lee, K.T. 2011. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): Win-Win strategies toward better environmental protection. *Biotechnology Advances*. 29: 124-141.

- Lee, G.M. and Palsson, B.O. 1994. Monoclonal antibody production using free-suspended and entrapped hybridoma cells. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 12: 509-533.
- Lee, S.T., Rhee, S.K. and Lee, G.M. 1994. Biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pimelobacter* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41: 652-657.
- 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.
- Limkhuansuwan, V. and Chairasert, P. 2010. Decolorization of molasses melanoidins and plam oil mill effluent phenolic compounds by fermentative lactic acid bacteria. *Journal of Environmental Sciences*. 22: 1209-1217.
- Lin, E.S. and Sung, S.C. 2006. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *International Journal of Food Microbiology*. 108: 182-187.
- Linke, B. 2006. Kinetic study of thermophilic anaerobic digestion of solid wastes from potato processing. *Biomass and Bioenergy*. 30: 892-896.
- Liu, L., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z. and Zeng, X. 2009. Production, Characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers*. 78: 275-281.
- Loh, K.C., Chung, T.S. and Aug, W.F. 2000. Immobilized-cell membrane bioreactor for high-strength phenol wastewater. *Journal of Environmental Engineering*. 126: 75-79.
- Makoto, U., Tomoko, A., Hiroshi, A., Jun, O., Noriyuki, I., Brett, N., Iain, C., Michio, S. and Mutsuyasu, N. 2006. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2. *Carbohydrate Research*. 341: 766-775.
- Manca, M.C., Lama, L., Improta, R., Esposito, E., Gambacorta, A. and Nicolaus, B. 1996. Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3265-3269.

- Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 650-663.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Panico, A., Lama, L., Gambacorta, A. and Nicolaus, B. 2002. A Halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. *Biotechnology letters*. 24: 515-519.
- McKellar, R.C., Geest, V.J. and Cui, W. 2003. Influence of culture and environmental conditions on the composition of exopolysaccharide produced by *Agrobacterium radiobacter*. *Food Hydrocolloids*. 17: 429-437.
- 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.
- Milo, R.E., Duffner, F.M. and Müller R. 1999. Catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic, phenol-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain A2 has unexpected low thermol stability. *Extremophiles* 3: 185-190.
- Mollaei, M., Abdollahpour, S., Atashgahi, S., Abbasi, H., Masoomi, F., Rad, I., Sahebgadam Lotfi, A., Shahbani Zahiri, H., Vali, H. and Akbari Noghbi, K. 2010. Enhanced phenol degradation by *Pseudomonas* sp. SA01: Gaining insight into the novel single and hybrid immobilizations. *Journal of Hazardous Materials* 175: 284-292.
- More, T.T., Yadav, J.S.S., Yan, S., Tyagi, R.D. and Surampalli, R.Y. 2014. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*. 144: 1-25.
- Moriello, S.V., Luma, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, T.L., Gambacorta, A. and Nicolaus, B. 2003. Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism Isolated from a marine hot spring in flegrean areas. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 95-101.
- Mukherjee, S., Ghosh, S., Sadhu, S., Ghosh, P. and Maiti T.K. 2011. Extracellular polysaccharide production by a *Rhizobium* sp. Isolated from legume herb *Crotalaria saltiana* Andr. *Indian Journal of Biotechnology*. 10: 340-345.

- Müller, R., Antranikian, G., Maloney, S. and Sharp, R. 1998. Thermophilic degradation of environmental pollutants. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 61: 155-169.
- Mutzel, A., Reinscheid, U.M., Antranikian, G, and Müller, R. 1996. Isolation and characterization of a thermophilic bacillus strain, that degrades phenol and cresols as sole carbon source at 70 °C. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46: 593-596.
- Nair, I.C., Jayachandran, K. and Shashidhar, S. 2008. Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology* V. 7 pp. 4951-4958.
- Najafpour, G.D., Zinatizadeh, A.A.L., Mohamed, A.R., Hasnain Isa, M. and Nasrollahzadeh, H. 2006. High-rate anaerobic digestion of palm oil mill effluent in an upflow anaerobic sludge-fixed film bioreactor. *Process Biochemistry* 41: 370–379.
- Obuekwe, O.C. and Al-Muttawa, M.E. 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. *Biotechnology Letters*. 23: 1025-1032.
- 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.
- Pazarlioglu, N.K. and Telefoncu, A. 2005. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized pumice particles. *Process Biochemistry*. 40: 1807-1814.
- Pishgar, R., Najafpour, G., Neyra, N.B., Mousavi, N. and Bakhshi, Z. 2011. Anaerobic biodegradation of phenol: comparative study of free and immobilized growth. *Iranica Journal of Energy and Environment*. 24: 348-355.
- Poh, P.E. and Chong, M.F. 2009. Development of anaerobic digestion method for palm oil mill effluent (POME) treatment. *Bioresource Technology* 100: 1-9.
- Pokhrel, C.P. and Ohga, S. 2007. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chemistry*. 105: 641-646.

- Prieto, M.B., Hidalgo A., Rodríguez-Fernández, 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 and 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.
- Ramírez, J.C., Ordaz, R.N., Urbina, C.E. and Mayer, G.J. 2001. Degradation kinetics of phenol by immobilization cells of *Candida tropicalis* in a fluidized bed reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 697-705.
- Ramos-Cormenzana, A., Juárez-Jimenez, B. and Garcia-Pareja, M.P. 1996. Antimicrobial activity of olive mill wastewater (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Internationnal Biodeterioration and Biodegradation*. 38: 283-290.
- Robledo-Ortiz, J.R., Ramírez-Arreola, D.E., Gomez, C., González-Reynoso, O. and González-Núñez, R. 2010. Bacterial immobilization by adhesion onto agave-fiber/polymer foamed composites. *Bioresourc Technology*. 101: 1293-1299.
- 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.
- 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* 10: 1190–1201.
- 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.
- Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M. and Aloui, F. 2000. Deteimantal effects of high molecularmass polyphenols on olive mill oil wastewater biotreatment. *Process Biochemistry* 35: 725-735.
- Scott, D.C. 1987. Immobilized cell: a review of recent literature. *Enzyme and Microbial Technology*. 9: 66-72.

- Seo, E.J., Yoo, S.H., OH, K.W., Cha, J., Lee, H.G. and Park, C.S. 2014. Isolation of an exopolysaccharide-producing bacterium, *Sphingomonas* sp. CS101, which forms an unusual type of sphingan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 68 (5): 1146-1148.
- Sethupathi, S. 2004. Removal Of Residue Oil From Palm Oil Mill Effluent (POME) Using Chitosan. Department of chemical Engineering, Universiti Sains Malaysia, Malaysia: 895-899.
- Simova, E.D. Frengova, G.I. and Beshkova, D.M. 2004. Exopolysaccharides produced by mixed culture of yeast *Rhodotorula rubra* GED10 and yogurt bacteria (*Streptococcus thermophilus* 13a+*Lactobacillus bulgaricus* 2-11). *Applied Microbiology*. 97: 512-519.
- Singh, R.P., Ibrahim, M.H., Esa, N. and Iliyana, M.S. 2010. Composting of waste from palm oil mill: a sustainable waste management practice. *Reviews Environmental Science and Biotechnology* 9: 331–344.
- Sundram, K., Sambanthamurthi, R., and Tan, Y.A. 2003. Palm fruit chemistry and nutrition. *Journal of Clinical Nutrition* 12: 355–362.
- Suttinun, O., Muller, R. and Luepromchai, E. 2010. Trichoroethylene co-metabolic degradation by *Rhodococcus* sp. L4 immobilized on plant materials rich in essential oil. *Applied Environmental Microbiology*. 76: 4684-4690.
- Tomás-Barberán, F.A. and Espín, J.C. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 81: 853-876.
- Torrecilla, J.S. 2010. Phenolic Compound in Olive Oil Mill Wastewater. Department of chemical Engineering, Universidad Complutense de Madrid, Spain. 357-365.
- Tosu, P., Luepromchai, E. and Suttinun, O. 2015. Activation and immobilization of phenol-degrading bacteria on oil palm residues for enhancing phenols degradation in treated palm oil mill effluent. *Environmental Engineering Research*. 20(2): 141-148.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. 2002. Toxicological review of phenol. URL <http://www.epa.gov>

- 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, R.J. 2000. Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation Journal*. 4: 1-18.
- Wang, Y., Tian, Y., Han, B., Zhao, H.B., Bi, J.N. and Cai, B.L. 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. *Journal of Environmental Sciences*. 19: 222–225.
- Westmeier, F. and Rehm, H.J. 1985. Biodegradation of 4-chlorophenol by entrapped *Alcaligenes* sp. A 7-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 22: 301-305.
- Wu, C.Y., Liang, Z.C. and Lu, C.P. 2008. Effect of carbon and nitrogen sources on the production and carbohydrate composition of exopolysaccharide by submerged culture of *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 16: 61-67.
- Wu, T.Y., Mohammad, W.A. and Anuar, N. 2010. Pollution control technologies for the treatment of palm oil mill effluent (POME) through end-of-pipe processes. *Journal of Environmental Management*. 91: 1467–1490.
- Wu, T.Y., Mohammad, W.A., Jahim, J.M. 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.
- Yacob, S., Hassan, M.A., Shirai, Y., Wakisaka, M. and Subash, S. 2006. Baseline study of methane emission from anaerobic ponds of palm oil mill effluent treatment. *Science of Total Environment* 366: 187-196
- Ye, F., Ye, Y. and Li, Y. 2011. Effect of C/N ratio on extracellular polymeric substances (EPS) and physicochemical properties of activated sludge flocs. *Journal of Hazardous Materials*. 188: 37-43.
- 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.
- Zahrim, A.Y., Rachel, F.M., Menaka, S., Su, S.Y., Melvin, F. and Chan, E.S. 2009. Decolourisation of anaerobic palm oil mill effluent via activated sludge-granular activated carbon. *World Applied Sciences Journal* 5: 126-129.

Zhao, G., Zhou, L., Li, Y., Liu, X., Ren, X. and 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
สูตรและวิธีการเตรียมเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดของเหลว carbon free mineral medium (CFMM) ประกอบด้วยสารเคมีดังนี้ (ต่อ 1 ลิตรอาหารเหลว) ได้แก่

- แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	1.0 กรัม
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.42 กรัม
- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.18 กรัม
- แมกนีเซียมคลอไรด์เฮปตะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1 กรัม
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.4 กรัม
- เฟอร์รัสซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1 มิลลิกรัม

แหล่งธาตุอาหารประกอบด้วยสารเคมีดังนี้ (ต่อ 1 ลิตรอาหารเหลว) ได้แก่

- nitrilotriacetic acid	1.5 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3.0 กรัม
- แมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.5 กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0 กรัม
- เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.19 กรัม
- โคบอลต์ซัลเฟตหรือโคบอลต์คลอไรด์ (CoSO_4 or CoCl_2)	0.1 กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1 กรัม
- ซิงค์ซัลเฟต (ZnSO_4)	0.1 กรัม
- คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.1 กรัม
- อะลูมิเนียมโพแทสเซียมไดซัลเฟต ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$)	0.01 กรัม
- กรดบอริก (H_3BO_3)	0.01 กรัม
- โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{MoO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01 กรัม

โดยละลายใน nitrilotriacetic acid ปรับ pH = 6.5 ด้วย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

สารละลายวิตามินประกอบด้วยสารเคมีดังนี้ (ต่อ 1 ลิตรอาหารเหลว) ได้แก่

- Biotin	2 มิลลิกรัม
- folic acid	2 มิลลิกรัม
- pyridoxine HCl	10 มิลลิกรัม
- thiamine HCl	5 มิลลิกรัม
- riboflavine	5 มิลลิกรัม
- nicotinic acid	5 มิลลิกรัม
- calcium panthothenate	5 มิลลิกรัม
- B12	0.01 มิลลิกรัม
- p-aminobenzoic acid	5 มิลลิกรัม
- thioctic acid	1 มิลลิกรัม

เตรียมอาหาร CFMM โดยนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อต้มน้ำแรงดันสูง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมแหล่งธาตุอาหารและสารละลายวิตามินที่ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูป micro filter อย่างละ 10 มิลลิลิตร ต่ออาหาร CFMM 1 ลิตร

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ข.1 กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

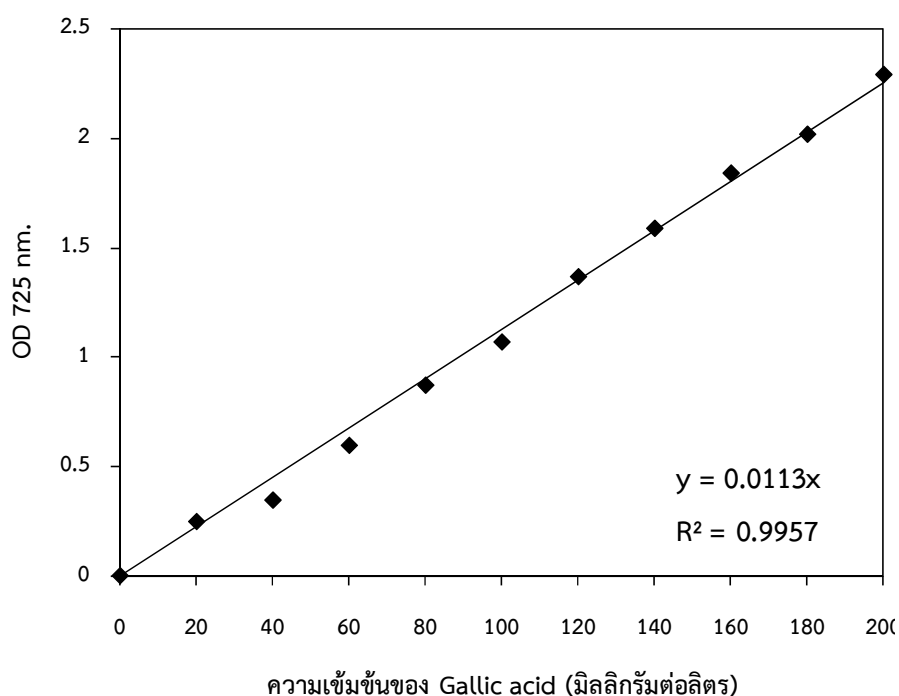
เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสาร Gallic acid monohydrate ปริมาณ 0.55 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามสัดส่วน ดังแสดงในตารางผนวกที่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

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

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

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ปีเปตสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid ความเข้มข้น 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตรความเข้มข้นละ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติม Folin-Coicalteau phenol reagents ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Sodium carbonate ที่มีความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 725 นาโนเมตร โดนใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวกที่ ข.1)



รูปภาคผนวกที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวจรรย์าภรณ์ ดาสันทัต

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5410920002

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการการศึกษา)

รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปี พ.ศ. 2555

การตีพิมพ์และเผยแพร่ผลงาน

จรรย์าภรณ์ ดาสันทัต, ไชยวัฒน์ รงค์สยามานนท์ และอรมาศ สุทธิ์นุ่น. การตรึงแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ A2 บนเม็ดวัสดุพูนจากถ้ำเกลือ เพื่อกำจัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 14. วันที่ 22-27 พฤษภาคม 2558