



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การย่อยสลายฟีนอลและกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงาน

สกัดน้ำมันปาล์มโดยแบคทีเรียและเชื้อราตรึงบน

วัสดุเหลือใช้ปาล์มน้ำมัน

โดย ดร.อรมาศ สุทธินุ่น

วันที่ 15 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การย่อยสลายฟีนอลและกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

โดยแบคทีเรียและเชื้อราตรึงบนวัสดุเหลือใช้ปาล์มน้ำมัน

หัวหน้าโครงการวิจัย: ดร.อรมาศ สุทธินุ่น

คณะกรรมการจัดการสิ่งแวดล้อม ม.สงขลานครินทร์

นักวิจัยที่ปรึกษา: ผศ.ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480087

ชื่อโครงการ : การย่อยสลายฟีนอลและกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยแบคทีเรียและเชื้อราตรึงบนวัสดุเหลือใช้ปาล์มน้ำมัน

ชื่อนักวิจัย : ดร.อรมาศ สุทธิบุญ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, **ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา :** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

อีเมล : oramas.s@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี 6 เดือน ตั้งแต่วันที่ 15 มิถุนายน พ.ศ. 2554 ถึงวันที่ 15 ธันวาคม พ.ศ. 2556

บทคัดย่อ : งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกราไวท์รอตที่มีศักยภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดแล้ว และพัฒนาหัวเชื้อราไวท์รอตที่ถูกตรึงด้วยวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อให้ราตรึงมีความทนทานต่อสารประกอบฟีนอลและเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีออกจากน้ำทิ้ง จากผลการคัดเลือกราไวท์รอต 10 สายพันธุ์พบว่าราไวท์รอตสายพันธุ์ unknown 04 (*Trametes hirsuta* AK4) มีอัตราการเจริญสูงที่สุด และราก่อนกลมสามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลความเข้มข้น 261 มก./ล.ในน้ำทิ้งที่เจือจาง 2 เท่า ได้สูงสุดถึง 64.7% และ 66.5% หลังจากวันที่ 7 ของการทดลองในระบบแบทช์ จึงคัดเลือกสายพันธุ์นี้มาตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า (empty fruit bunch: EFB) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (pericarp fiber: PF) พบว่าราไวท์รอตที่ถูกตรึงบน PF เป็นเวลา 6 วันสามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งที่เจือจาง 2 เท่าได้สูงสุดเท่ากับ 94% และ 80.6% หลังจากวันที่ 8 ของการศึกษา ในระหว่างการบำบัดน้ำทิ้งด้วยราตรึงบน PF สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก 2 ชนิด ได้แก่ Laccase และ Manganese peroxidase โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสอดคล้องกับการลดลงของสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้ง เมื่อนำราตรึงด้วย PF มาศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งด้วยวิธีการ 1) การเจือจางน้ำทิ้ง 2) การเติมแหล่งอาหารร่วม 3) การบำบัดแบบสองขั้นตอน และ 4) การปรับตัวของเซลล์ตรึง พบว่าการบำบัดแบบสองขั้นตอนโดยใช้น้ำทิ้งที่ถูกบำบัดขั้นต้นเป็นเวลา 8 ชั่วโมงด้วยแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบน EFB และบำบัดต่อด้วยราไวท์รอตที่ถูกตรึงบน PF สามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลความเข้มข้น 461 มก./ล.ในน้ำทิ้งที่ไม่เจือจางได้สูงสุดถึง 87.1% และ 82.2% หลังจาก 8 วันของการทดลอง การศึกษาในระบบต่อเนื่องด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด internal loop airlift ขนาด 3 ลิตร พบว่าปริมาณแบคทีเรียตรึง 90 กรัม และระยะเวลาเก็บน้ำ 48 ชั่วโมงให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลสูงที่สุดคือ 60% ภายในระยะเวลา 5 วัน การบำบัดต่อในขั้นที่สองด้วยราตรึง ทำให้น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นและเจือจางจนได้ความเข้มข้น 25 %, 50% และไม่เจือจาง ลดสารประกอบฟีนอลและสี เพิ่มได้อีกประมาณ 16%-35% และ 19%-27% ตามลำดับ

คำหลัก : น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม; การกำจัดสี; สารประกอบฟีนอล; แบคทีเรียย่อยสลายฟีนอล; ราไวท์รอต

Abstract

Project Code: MRG5480087

Project Title: Phenol degradation and decolorization of palm oil mill effluent by bacteria and fungi immobilized on oil palm residues

Investigator: Oramas Suttinun, Ph.D., **Mentor:** Asst. Prof. Ekawan Luepromchai, Ph.D.

E-mail Address: oramas.s@psu.ac.th

Project Period: 2 .5 years from June 15, 2011 to December 15, 2013

Abstract: This research aims to screen for a potential white rot fungus capable of decolorizing and removing phenolics in the treated palm oil mil effluent (POME) and to develop an inoculum of a selected white rot fungus immobilized on oil palm residues for enhancing their tolerance to phenolics and their color removal efficiency. Among ten fungal isolates, unknown 04 (identified as *Trametes hirsuta* AK4) showed the highest growth rate with 64.7% decolorization and 66.5% dephenolisation after incubating with 50% diluted POME (phenolics concentration was 261 mg/L) for 7 days. This isolate was then chosen for the immobilization study. The two oil palm residues, namely empty fruit bunch (EFB) and pericarp fiber (PF) were utilized as immobilizing matrices. The results showed that a 6-day-old culture immobilized on PF could provide the highest decolorization (94%) and dephenolization (80.6%) after 8 days of incubation with 50% diluted POME. During the biodegradation experiment, the activities of two ligninolytic enzymes i.e. laccase and manganese peroxidase were detected and were found to be correlated with the reduction of color and phenolics. To enhance the efficiency of PF-immobilized fungus, four approaches were evaluated: 1) dilution of treated POME; 2) addition of nutrients (as co-substrate); 3) two-stage treatment system; and 4) adaptation of immobilized fungus. The most effective decolorization (87.1%) and dephenolization (82.2%) were found when a two-stage batch operation was applied. This was performed by pretreatment of the undiluted POME (phenolics concentration was 461 mg/L) with mixed culture of *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 immobilized on EFB for 8 hours following the elimination of remaining phenolics and color using PF-immobilized AK4 for another 8 days. When a 3-L internal loop airlift bioreactor containing 90 g immobilized bacteria with 48 hours HRT were continuously operated for 5 days, the maximum phenolics removal reached 60%. The treated effluent was diluted and sequentially fed to the second reactor containing immobilized AK4. By using 25%, 50% diluted POME or undiluted POME; these methods were able to reduce about 16%-35% of phenolics and 19%-27% of color from the treated effluent.

Keywords: Palm oil mill effluent; decolorization; phenolic compounds; phenol-degrading bacteria; white rot fungi

Executive summary

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย): การย่อยสลายฟีนอลและกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยแบคทีเรียและเชื้อราตรึงบนวัสดุเหลือใช้ปาล์มน้ำมัน

(ภาษาอังกฤษ): Phenol degradation and decolorization of palm oil mill effluent by bacteria and fungi immobilized on oil palm residues

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันความต้องการใช้น้ำมันปาล์มในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหาร สบู่ ส่วนผสมน้ำมันหล่อลื่น อุตสาหกรรมทำแผ่นดีบุก เวชภัณฑ์ สี เป็นต้น เนื่องจากปาล์มน้ำมันให้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ให้น้ำมันด้วยกัน จึงมีการนำน้ำมันปาล์มไปใช้ทดแทนน้ำมันพืชอื่น ๆ ได้เป็นอย่างดีและมีราคาถูก อย่างไรก็ตามผลจากการขยายตัวของการผลิตที่เพิ่มขึ้นก็ก่อให้เกิดมลพิษ และของเสียออกสู่สิ่งแวดล้อมทั้งในรูปของแข็ง ได้แก่ ทะลายเปล่า เส้นใย และกะลาปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ยังมีปริมาณน้ำเสียคิดเป็น 2.5 ถึง 3.0 เท่าของปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ (Cheah et al., 1988) น้ำเสียส่วนใหญ่เกิดจาก กระบวนการผลิตในขั้นตอนการอบทะลายปาล์มในรูปน้ำเสียจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ และน้ำเสียจากเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำมันจากน้ำสลัดจ์ ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง มีสีคล้ำ ยากแก่การกำจัด (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ , 2533) สีนํ้าตาลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ ส่วนประกอบของ รงควัตถุจำพวกแอนโทไซยานิน แทนนิน แคโรทีน เมลานอยดิน กัม และสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับน้ำมันและไอน้ำ จากรายงานที่ผ่านมาตรวจพบปริมาณของสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอยู่ในช่วงตั้งแต่ 6 ถึงมากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส, 2547; Limkhunsuwan and Chaiprasert, 2010; Alam et al., 2009) ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ.2539) ซึ่งกำหนดให้น้ำทิ้งจากโรงงานมีสารประกอบฟีนอลได้ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สารประกอบฟีนอลเป็นสารที่มีผลยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและต่อระบบนิเวศในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอล และกำจัดสีออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

การใช้วิธีการทางชีวภาพในการบำบัด หรือย่อยสลายสารมลพิษในน้ำเสียนับเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ราคากถูก และไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามความสำเร็จของวิธีการนี้ค่อนข้างเฉพาะเจาะจง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารพิษ ประเภทของจุลินทรีย์ และเทคนิควิธีการที่เลือกใช้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาและพัฒนาวิธีการย่อยสลายสาร มลพิษที่มีความเหมาะสมกับสภาพน้ำเสียในพื้นที่นั้น ๆ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถย่อยสลาย สารประกอบ ฟีนอลได้ (Van Schie and Young, 2000) อย่างไรก็ตามสารประกอบฟีนอลอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและราบางชนิด (Shetty et al., 2007; Fountoulakis et al., 2002) นอกจากนั้นพบว่าประสิทธิภาพในการบำบัดสารมลพิษลดลงเมื่อนำ เซลล์จุลินทรีย์ ไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียซึ่งมีการปนเปื้อนของสารมลพิษหลากหลายชนิด ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารมลพิษได้ดีขึ้น จึงมีการศึกษาวิจัยการนำเทคนิคการตรึงเซลล์ (cell immobilization) มาใช้ในการบำบัดสารมลพิษอย่างกว้างขวาง พบว่าเซลล์ตรึงมีข้อดีหลายประการ เช่น ช่วยปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษของสารมลพิษ ช่วยรักษาแอกทิวิตีของเอนไซม์ให้คงที่ (Junter and Jouenne, 2004) สามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อพีเอช และอุณหภูมิในช่วงที่กว้างกว่าเซลล์อิสระ โครงการวิจัยนี้สนใจศึกษาพัฒนาการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุ เศษเหลือปาล์มน้ำมัน เพื่อให้จุลินทรีย์มีความ ทนทาน ต่อความเป็นพิษของ สารประกอบ ฟีนอล และ สารมลพิษต่าง ๆ ที่เป็น

ส่วนประกอบในน้ำทิ้งได้ดีขึ้น รวมทั้งเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสี จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเลือกใช้วัสดุธรรมชาติในการตรึงเซลล์นั้น ยังมีรายงานการวิจัยค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะการเลือกใช้วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม เช่น ชิ้นส่วนทะลาย ปาล์มเปล่า และเส้นใยปาล์มน้ำมัน มาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ นอกจากเป็นการช่วยกำจัดของเสียอีกทางหนึ่งแล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ของเสีย และลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อ หรือสังเคราะห์วัสดุตรึงที่มีราคาแพง ทั้งยังช่วยลดความเสี่ยงจากความเป็นพิษของสารเคมีที่เป็นส่วนผสมในวัสดุสังเคราะห์ต่อจุลินทรีย์ที่ ถูกตรึง การเลือกใช้ราไวทროทและแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากพื้นที่ในประเทศไทย ช่วยให้จุลินทรีย์มีความคุ้นเคย ทนทานในสิ่งแวดล้อม โดยเลือกใช้ แบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 เพื่อย่อยสลายฟีนอลในขั้นแรก แล้วจึงใช้ ราไวทროท ในการบำบัดสีจากน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัด สารประกอบ ฟีนอลแล้ว เพื่อช่วยในการลดพิษของสารประกอบฟีนอลต่อราไวทროท นอกจากนี้ศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการนำกลับมาใช้ซ้ำ ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพง่าย ราคาถูก และสามารถนำไปใช้ได้จริงในการบำบัดสี และสารมลพิษจากภาคอุตสาหกรรมต่อไป

2.วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.2.1 เพื่อคัดเลือกราไวทროทที่มีศักยภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลออกจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
- 1.2.2 เพื่อพัฒนาวิธีการ ตรึงราไวทโรทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่าและเส้นใยปาล์มน้ำมัน
- 1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย และราไวทโรทที่ถูกตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

3.ขอบเขตและวิธีการวิจัย

3.1 การคัดเลือกราไวทโรทที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและกำจัดสีออกจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
คัดเลือกรา ไวทโรททั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) *Coriolus versicolor* 2) *Trametes* sp. 3) *Pleurotus ostreatus* 4) *Pycnoporus sanguineus* 5) *Lentinus edodes* 6) *Ganoderma lucidum* 7) Unknown 01 8) Unknown 02 9) Unknown 03 และ 10) Unknown 04 ทำโดยวิธีการทดสอบบนอาหารแข็งที่มีการเติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสัดส่วนต่าง ๆ และทดสอบในน้ำทิ้งที่มีการเจือจาง 2 เท่า

3.2 การศึกษาการตรึงเซลล์และคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสม

นำราไวทโรทที่คัดเลือกได้ 1 สายพันธุ์ มาศึกษาการตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า และเส้นใยปาล์มน้ำมัน ศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุ และการเกาะติดของราไวทโรทบนและภายในช่องว่างของวัสดุตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) รวมทั้งศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกาะติดของราไวทโรทบนวัสดุตรึง โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งที่เจือจาง 2 เท่า รวมทั้งวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกไนโนไลติก

3.3 การเพิ่มประสิทธิภาพของราตรึงในการ กำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิก ออกจากน้ำทิ้งในระบบแบบพัช

ทำ โดยการแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง การปรับตัวของเซลล์ตรึง การบำบัดแบบ 2 ขั้นตอน และการเติมแหล่งอาหารร่วม เปรียบเทียบคุณลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังบำบัด

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลและสีออกจากน้ำทิ้งในระบบแบบต่อเนื่อง

ทำการขยายขนาดการศึกษาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร จำนวน 2 ถัง แบบต่อเนื่องกัน ซึ่งถังแรกใช้แบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบนทะเลลายปาล์มเปล่าบำบัดสารประกอบฟีนอลขั้นต้น โดยการศึกษาปริมาณแบคทีเรียตรึง และระยะเวลาการกักเก็บน้ำทิ้งที่เหมาะสม น้ำที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นถูกป้อนไปสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพถังที่ 2 ที่บรรจุราไวทร็อทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันปาล์มเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอล เปรียบเทียบคุณลักษณะของน้ำทิ้งก่อนและหลังการบำบัด

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

นำเซลล์ตรึงที่ใช้งานแล้วกลับมาใช้ซ้ำทั้งในระบบแบทช์และระบบต่อเนื่อง ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพว่าเซลล์ที่ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้กี่ครั้ง ทั้งนี้พิจารณาจากความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอล และการกำจัดสี

4. สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบศักยภาพของราไวทร็อท 10 สายพันธุ์ ในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยทดสอบบนอาหารแข็ง Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ที่มีการเติมน้ำทิ้งในสัดส่วนต่าง ๆ และการทดสอบในน้ำทิ้งที่มีการเจือจาง 2 เท่าในระบบแบทช์ พบว่าราไวทร็อทสายพันธุ์ Unknown 04 ซึ่งถูกระบุสายพันธุ์คือ *Trametes hirsuta* AK4 เป็นราที่มีอัตราการเจริญสูง มีความทนทานต่อสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้ง และยังสามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 50% ได้ถึง 64.7% และ 66.5% ตามลำดับ จากเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นประมาณ 9,333 หน่วยสีและสารประกอบฟีนอล 261 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงคัดเลือกสายพันธุ์ นี้เพื่อใช้ในการศึกษาการตรึงบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมันได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่าและเส้นใยปาล์มน้ำมัน จากการทดลองพบว่า ราไวทร็อท สายพันธุ์ AK4 ที่ถูกตรึงสามารถเจริญยึดเกาะบริเวณผิวหน้าและภายในช่องว่างของวัสดุตรึงได้ดีและเมื่อนำราตรึงไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% พบว่าระยะเวลาการตรึงมีผลต่อการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอล โดยราไวทร็อทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 6 วันให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งสูงที่สุดคือ 94% และ 80.6% ตามลำดับ โดยตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกโนไลติกที่เกี่ยวข้องต่อการย่อยสลายของสีและสารประกอบฟีนอล ได้แก่เอนไซม์ Laccase และ Manganese peroxidase สูงสุดเท่ากับ 510 และ 3,046 ยูนิตต่อลิตร ทั้งนี้การลดลงของสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งเกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพและการดูดซับของวัสดุตรึงร่วมกับเส้นใยรา เมื่อนำราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 6 วัน มาศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการเจือจาง (ความเข้มข้น 100%) ด้วยวิธีการ 1) การแปรผันความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่ระดับต่างๆ 2) การเติมแหล่งอาหารร่วม 3) การบำบัดแบบสองขั้นตอน และ 4) การปรับตัวของเซลล์ตรึง พบว่าการบำบัดแบบสองขั้นตอนโดยขั้นต้นจะใช้แบคทีเรียผสม ระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนทะเลลายปาล์มเปล่าบำบัดน้ำทิ้งที่ไม่เจือจางเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง และบำบัดต่อด้วยราตรึงบนเส้นใยปาล์มอีก 8 วัน ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลสูงสุดคือ 87.1% และ 82.2% ตามลำดับ จากเริ่มต้นที่น้ำทิ้งมีความเข้มข้น 19,000 หน่วยสี และมีสารประกอบฟีนอล 461 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดสามารถลด COD ได้ 54.8% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 22,488

มิลลิกรัมต่อลิตร และทำให้ค่า TKN, TP, Oil & Grease และ TSS มีค่าใกล้เคียงค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง ซึ่งผลการทดลองในระบบแบบซ์ ถูกนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการออกแบบการทดลองในระบบต่อเนื่อง

การศึกษาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตรจำนวน 2 ถัง ในระบบต่อเนื่อง ทำการศึกษาโดยการบำบัดน้ำขึ้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมที่ถูกตรึงบนทะเลลายปาล์มเปล่า ซึ่งมีการแปรผันปริมาณแบคทีเรียตรึงตั้งแต่ 60-110 กรัมต่อลิตร และระยะเวลากักเก็บน้ำระหว่าง 24-48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณแบคทีเรียตรึงที่เหมาะสมคือ 90 กรัม โดยให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลประมาณ 60% ในขณะที่ระยะเวลากักเก็บน้ำ 48 ชั่วโมงให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลสูงสุดคือ 60% ในระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยให้อัตราการย่อยสลายค่อนข้างคงที่ น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขึ้นต้นนี้ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้น 25 % และถูกป้อนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพถังที่ 2 ซึ่งบรรจุราไวหรือที่ที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มพบว่าขึ้นตอนนี้ลด

สารประกอบฟีนอลและสีได้อีก 35 % และ 27 % ในวันที่ 9 ของการทดลอง จากปริมาณสารประกอบฟีนอลเริ่มต้น 28 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้น 4,500 หน่วยสี เมื่อป้อนน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขึ้นต้นที่เจือจางจนได้ความเข้มข้น 50% ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลเริ่มต้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นประมาณ 9,000 หน่วยสี พบว่าราตรึงยังมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลและสีในน้ำทิ้งประมาณ 30% และ 20% ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน การทดลองในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขึ้นต้นและไม่เจือจาง ราตรึงสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งได้ 16% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 124 มิลลิกรัมต่อลิตร และกำจัดสีของน้ำทิ้งได้ 19% จากความเข้มข้นประมาณ 17,733 หน่วยสี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 7 วัน

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้โดยการสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ซึ่งสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่ปรึกษางานวิจัย สำหรับคำแนะนำ แนวทางการดำเนินงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ทางผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และ ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติ ด้านการจัดการ ของเสียอันตราย ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้พื้นที่ในการทำงานวิจัย คำแนะนำ และการอำนวยความสะดวก ในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ทางด้านวิทยาศาสตร์ ตั้งแต่เริ่มต้นจนโครงการแล้วเสร็จ

อรมาศ สุทธินนท์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
Executive summary	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(12)
รายการรูป	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ขอบเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม	4
2.2 สีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	7
2.3 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล	10
2.4 แบคทีเรียสกุล <i>Methylobacterium</i> และ <i>Acinetobacter</i>	11
2.5 ราไทรอธและเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินไลติก (Ligninolytic enzyme)	12
2.6 การตรึงราไทรอธเพื่อย่อยสลายสารมลพิษ	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
3.1 น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	23
3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีนอล	23
3.3 การตรึงแบคทีเรียบนชิ้นส่วนทะลายปาล์มเปล่า	24
3.4 ราไทรอธและการเตรียมหัวเชื้อรา	24
3.5 การศึกษาในระบบกะ	25
3.6 การศึกษาในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่อเนื่อง	29
3.7 วิธีการวิเคราะห์	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย	35
4.1 ลักษณะทางกายภาพของราไทรอธ	35
4.2 การคัดเลือกราไทรอธที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบ	37
ฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	
4.3 การตรึงราไทรอธบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	43
4.4 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้ง	58
4.5 การนำราไทรอธกลับมาใช้งานซ้ำ	76
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	87
5.1 สรุปผลการทดลอง	87

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.2 ข้อเสนอแนะ	88
เอกสารอ้างอิง	89
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	99
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบ	100
พินอลิคทั้งหมดและสี่	
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อจำแนกสายพันธุ์	103
ราไวท์รอต Unknown04	
ภาคผนวก ง ผลผลิต (Output) ที่ได้จากโครงการ	105

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	ลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง	7
2.2	จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล	10
2.3	การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล <i>Methylobacterium</i>	11
2.4	การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล <i>Acinetobacter</i>	12
2.5	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ราไทรอทในการย่อยสลายสารมลพิษ	14
2.6	งานวิจัยที่ศึกษาการตรึงราไทรอทบนวัสดุต่างๆ เพื่อกำจัดสีย้อม	21
3.1	วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติของวัสดุ	27
3.2	วิธีวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	32
4.1	ลักษณะโคโคไนส์และเส้นใยของราไทรอทจำนวน 10 สายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้	35
4.2	ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 50%โดยราไทรอทในรูปแบบก้อนกลม 10 สายพันธุ์ ที่ระยะเวลา 8 วัน	43
4.3	องค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	44
4.4	ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยราไทรอท <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มน้ำมันและเส้นใย ปาล์มน้ำมันในระยะเวลาการตรึงต่างๆ	58
4.5	ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ด้วยราไทรอท <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันด้วยวิธีต่างๆ	73
4.6	คุณลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังบำบัดแบบสองขั้นตอน ด้วยแบคทีเรียตรึงและราไทรอท <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน	75
4.7	องค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้ในการศึกษา	78
4.8	คุณลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังการบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงในถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการแปรผันระยะเวลากักเก็บน้ำทิ้งเท่ากับ 12-48 ชั่วโมง	82
4.9	คุณลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังการบำบัดด้วยราไทรอทตรึง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	86
ข.1	การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรด Gallic ความเข้มข้น 20-200 mg/L	100
ข.2	การเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 50-500 หน่วยสี	101

รายการรูป

รูปที่	หน้า	
2.1	กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	5
2.2	วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	6
2.3	ระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	6
2.4	โครงสร้าง monocyclic phenols	8
2.5	ตัวอย่างโครงสร้าง polycyclic phenols หรือ polyphenols	8
2.6	ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction)	9
2.7	ตัวอย่างราไทร์อท	13
2.8	กลไกการทำงานของเอนไซม์ lignin peroxidase	15
2.9	กลไกของเอนไซม์ Laccase ในการออกซิไดซ์ phenolic aromatic compound และ Non-phenolic aromatic compound	16
2.10	กลไกการทำงานของเอนไซม์ Manganese peroxidase	17
2.11	การตรึงเซลล์	20
3.1	ลักษณะบ่อบำบัดน้ำเสีย	23
3.2	ลักษณะสีของอาหารแข็ง	26
3.3	วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่ถูกตัดจนได้ขนาดตามต้องการ	27
3.4	รูปแบบของระบบตัวกรองชีวภาพแบบ internal loop airlift	30
3.5	การเตรียม ราไทร์อทตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันในกล่องพลาสติก	30
3.6	รูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้บรรจุราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน	31
4.1	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราไทร์อท 10 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง	38
4.2	อาหารแข็ง SDA ที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	39
4.3	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 50% ของราไทร์อท 10 สายพันธุ์	40
4.4	การกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไทร์อท 10 สายพันธุ์	41
4.5	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งเมื่อเติมราก่อนกลม สายพันธุ์ Unknown 04 ในน้ำทิ้งความเข้มข้น 50%	42
4.6	ลักษณะพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 200x	44
4.7	ราไทร์อท <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนทะเลลายปาล์มเปล่าระยะเวลา 0 วัน	46
4.8	ลักษณะการยึดเกาะของราไทร์อท <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนทะเลลายเปล่าปาล์มน้ำมัน	47
4.9	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกและสีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไทร์อทสายพันธุ์ <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนทะเลลายเปล่าปาล์มน้ำมัน	49
4.10	กิจกรรมเอนไซม์ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50%	50

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า	
4.11	น้ำหนักแห้งของราไทรอทสายพันธุ์ <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ถูกตรึงรวมกับ น้ำหนักแห้งของทะเลสาบปาล์มเปล่าที่ระยะเวลาการตรึง 2-10 วัน	51
4.12	รูปร่างของราไทรอท <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน	53
4.13	ลักษณะการยึดเกาะของราไทรอท <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์ม	53
4.14	ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิก (A) และสี (B) ในน้ำทิ้งโรงงาน สกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไทรอทสายพันธุ์ <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน	55
4.15	กิจกรรมเอนไซม์ Laccase (A), Manganese Peroxidase (B) ในน้ำทิ้งโรงงาน สกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไทรอทสายพันธุ์ <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน	56
4.16	น้ำหนักแห้งของราไทรอทสายพันธุ์ <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใย ปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน	57
4.17	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 25%- 100% ของราไทรอท สายพันธุ์ <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน	61
4.18	การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 25%	62
4.19	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วม C และ N ต่างๆ	64
4.20	การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วม C และ N ต่างๆ	65
4.21	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียย่อยสลาย ฟีนอลที่ระยะเวลา 4- 72 ชม. และบำบัดต่อโดยใช้ราไทรอทสายพันธุ์ <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน	68
4.22	การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วย แบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลและบำบัดต่อด้วยราไทรอทสายพันธุ์ <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน	70
4.23	การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่บำบัดด้วยราไทรอทสายพันธุ์ <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับตัว	72
4.24	การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดด้วย ราไทรอทสายพันธุ์ <i>Trametes hirsuta</i> AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน แบบไม่ปรับตัว (A) และแบบปรับตัว (B)	73
4.25	ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลของราตรึงหลังจากการใช้งานซ้ำ	77

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า	
4.26	ระบบตัวกรองชีวภาพที่บรรจุเซลล์ตรึงและน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	79
4.27	ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงในระบบตัวกรองชีวภาพที่แปรผันปริมาณแบคทีเรียตรึง	80
4.28	ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลในระบบตัวกรองชีวภาพที่บรรจุแบคทีเรียตรึงปริมาณ 90 กรัม โดยแปรผันระยะเวลาที่เก็บน้ำ	81
4.29	ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอล (A) และสี (B) ของราไวท์รอตที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นและเจือจางจนได้ความเข้มข้น 25% ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	83
4.30	ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอล (A) และสี (B) ของราไวท์รอตที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นและเจือจางจนได้ความเข้มข้น 50% ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	84
4.31	ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอล (A) และสี (B) ของราไวท์รอตที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นและไม่เจือจางในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	85
ข.1	กราฟมาตรฐานของกรด Gallic	101
ข.2	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์	102
ง.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1-4 บน 18S rDNA ของราไวท์รอต Unknown 04	104

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เนื่องจากความต้องการใช้น้ำมันปาล์มในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามผลจากการขยายตัวของการผลิตที่เพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดมลพิษและของเสียออกสู่สิ่งแวดล้อมทั้งในรูปวัสดุเหลือใช้ในรูปแบบของแข็ง ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า เส้นใย และกะลาปาล์มน้ำมัน ที่มีการผลิตออกสู่สิ่งแวดล้อมจำนวนมาก หากมีการจัดการที่เหมาะสมและสามารถนำวัสดุเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ ก็จะช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่วัสดุเศษเหลือ และช่วยในการจัดการของเสียได้อีกทางหนึ่งด้วย นอกจากนั้นในการสกัดน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำ (แบบมาตรฐาน) ยังผลิตน้ำเสียออกมาปริมาณมาก มีรายงานว่าในการผลิตน้ำมันปาล์มดิบ (crude palm oil) 1 ตัน ต้องใช้น้ำประมาณ 5-5.7 ตัน และน้ำที่ใช้ในการผลิตมากกว่า 50 กลายมาเป็นน้ำทิ้ง (palm oil mill effluent: POME) (Ahmad *et al.*, 2003) น้ำเสียส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการผลิตในขั้นตอนการอบทะลายปาล์มในรูปน้ำเสียจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ และน้ำเสียจากเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำมันจากน้ำสลัดจ์ ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง มีสีคล้ำ ยากแก่การกำจัด สีนํ้าตาลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ ส่วนประกอบของรงควัตถุพวกแอนโทไซยานิน แทนนิน แคโรทีน เมลานอยดิน และกัม (พุนสุข ประเสริฐสุรพร และคณะ, 2533) นอกจากนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลและอนุพันธ์ของฟีนอลซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับน้ำมันและไอน้ำ ทั้งนี้ในผลปาล์มน้ำมันนอกจากจะมีน้ำมันเป็นองค์ประกอบหลักแล้ว ยังมีสารประกอบอื่น ๆ ที่ละลายได้ดีในน้ำมัน หรือนํ้ารวมอยู่ด้วย (Sundram *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2007) สารประกอบฟีนอลเป็นสารที่พบเป็นองค์ประกอบอยู่ในผลปาล์มปริมาณ 0.006 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อกรัมผลปาล์ม หรือ มี total phenolic content เท่ากับ 83.97 กรัมต่อลิตร gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัมสารสกัดจากผลปาล์ม ซึ่งสารประกอบฟีนอลนี้จะถูกปล่อยออกมาระหว่างกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อในการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน ในขั้นตอนนี้จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidases เป็นสาเหตุให้สารประกอบฟีนอลไม่ถูกย่อยสลาย (Sundram *et al.*, 2003) นอกจากนี้ฟีนอลยังเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายลิกนินผ่านกระบวนการ wet oxidation (Kongjan *et al.*, 2010) จากรายงานที่ผ่านมาตรวจพบปริมาณของสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอยู่ในช่วงตั้งแต่ 30 ถึงมากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (พินิตา โต๊ะสูง, 2555; Limkhunswan and Chaiprasert, 2010; Alam *et al.*, 2009) ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ.2539) กำหนดให้น้ำทิ้งจากโรงงานมีสารประกอบฟีนอลได้ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สารประกอบฟีนอลเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและยับยั้งการเจริญเติบโตและกิจกรรมของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (Sayadi *et al.*, 2000) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอล และกำจัดสื่อกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

การใช้วิธีการทางชีวภาพในการบำบัดหรือย่อยสลายสารมลพิษในน้ำเสียนับเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ราคาถูก และไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ (Van Schie and Young, 2000) อย่างไรก็ตามสารประกอบฟีนอลอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและราบางชนิด (Shetty *et al.*, 2007; Fountoulakis *et al.*, 2002)

นอกจากนั้นพบว่าประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการบำบัดสารมลพิษลดลงเมื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียซึ่งมีการปนเปื้อนของสารมลพิษหลากหลายชนิด ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารมลพิษได้ดีขึ้น จึงมีการนำเทคนิคการตรึงเซลล์ (cell immobilization) มาใช้ในการบำบัดมลพิษ พบว่าเซลล์ตรึงมีข้อดีหลายประการ เช่น ช่วยปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษของสารมลพิษ ช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ให้คงที่ (Junter and Jouenne, 2004) สามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อพีเอช และอุณหภูมิในช่วงที่กว้างกว่าเซลล์อิสระ โครงการวิจัยนี้สนใจศึกษาพัฒนาการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน เพื่อต้องการให้จุลินทรีย์มีความทนทานต่อความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอล รวมทั้งสารมลพิษอื่นที่เป็นส่วนประกอบในน้ำทิ้ง และเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสี โดยเลือกใช้แบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 เพื่อย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในขั้นแรก แล้วจึงใช้ราไทรอพในการบำบัดสี ออกจากน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลแล้ว เพื่อช่วยในการลดพิษของสารประกอบฟีนอลที่มีต่อรา นอกจากนี้ศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการนำกลับมาใช้ซ้ำ ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพ ง่าย ราคาถูก และสามารถนำไปใช้ได้จริงในการบำบัดสี และสาร มลพิษจากภาคอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.2.1 เพื่อคัดเลือกราไทรอพที่มีศักยภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลออกจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
- 1.2.2 เพื่อพัฒนาวิธีการ ตรึงราไทรอพบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่าและเส้นใยปาล์มน้ำมัน
- 1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย และราไทรอพที่ถูกตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1.3.1 การ คัดเลือกราไทรอพที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและกำจัดสีออกจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
คัดเลือกรา ไทรอพทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) *Coriolus versicolor* 2) *Trametes* sp. 3) *Pleurotus ostreatus* 4) *Pycnoporus sanguineus* 5) *Lentinus edodes* 6) *Ganoderma lucidum* 7) Unknown 01 8) Unknown 02 9) Unknown 03 และ 10) Unknown 04 ทำโดยวิธีการทดสอบบนอาหารแข็งที่มีการเติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสัดส่วนต่าง ๆ และทดสอบในน้ำทิ้งที่มีการเจือจาง 2 เท่า
- 1.3.2 การศึกษาการตรึงเซลล์และคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสม
นำราไทรอพที่คัดเลือกได้ 1 สายพันธุ์ มาศึกษาการตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า และเส้นใยปาล์มน้ำมัน ศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุ และการเกาะติดของราไทรอพบนและภายในช่องว่างของวัสดุตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron

microscope: SEM) รวมทั้งศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในเกาะติดของราไวท์รอตบนวัสดุจริง โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการกำจัดและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งที่เจือจาง 2 เท่า รวมทั้งวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก

1.3.3 การเพิ่มประสิทธิภาพของราตรึงในการ กำจัดและสารประกอบฟีนอลิก ออกจากน้ำทิ้งในระบบแบบทซ์

ทำ โดย 1) การแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง 2) การปรับตัวของเซลล์ตรึง 3) การบำบัดแบบ 2 ขั้นตอน และ 4) การเติมแหล่งอาหารร่วม เปรียบเทียบคุณลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังบำบัด

1.3.4 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลและสีออกจากน้ำทิ้งในระบบแบบต่อเนื่อง

ทำการขยายขนาดการศึกษาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร จำนวน 2 ถัง แบบต่อเนื่องกัน ซึ่งถังแรกใช้แบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าบำบัดสารประกอบฟีนอลขั้นต้น โดยการศึกษาปริมาณแบคทีเรียตรึง และระยะเวลาการกักเก็บน้ำทิ้งที่เหมาะสม น้ำที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นถูกป้อนไปสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพถังที่ 2 ที่บรรจุราไวท์รอตที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันน้ำมันเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดและสารประกอบฟีนอล เปรียบเทียบคุณลักษณะของน้ำทิ้งก่อนและหลังการบำบัด

1.3.5 การศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

นำเซลล์ตรึงที่ใช้งานแล้วกลับมาใช้ซ้ำทั้งในระบบแบบทซ์และระบบต่อเนื่อง ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพว่าเซลล์ที่ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้กี่ครั้ง ทั้งนี้พิจารณาจากความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอล และการกำจัดสี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ของราไวท์รอตที่มีศักยภาพในการกำจัดและสารประกอบฟีนอลได้ดี รวมทั้งทราบวัสดุจริงที่เหมาะสมจากวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

1.4.2 ทราบวิธีการตรึง และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรึงราไวท์รอตบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

1.4.3 ทราบประสิทธิภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลของราไวท์รอตที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน เพื่อประโยชน์ในการนำเซลล์ตรึงไปประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.4.4 ทราบปริมาณแบคทีเรียผสมและระยะเวลากักเก็บน้ำทิ้งที่เหมาะสม รวมถึงประสิทธิภาพในการกำจัดและสารประกอบฟีนอลของราไวท์รอตที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.4.5 ผลการวิจัยที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อเป็นแนวทางให้แก่ภาคอุตสาหกรรมในการพัฒนาวิธีการ/เทคโนโลยี ในกระบวนการกำจัดสี และบำบัดสารมลพิษจากโรงงานอุตสาหกรรมด้วยวิธีการทางชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดให้ดีขึ้น โดยเฉพาะการกำจัดสีและบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ และสามารถนำความรู้ และเทคนิคดังกล่าวไปใช้เป็นต้นแบบ / กรณีศึกษาสำหรับการบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้

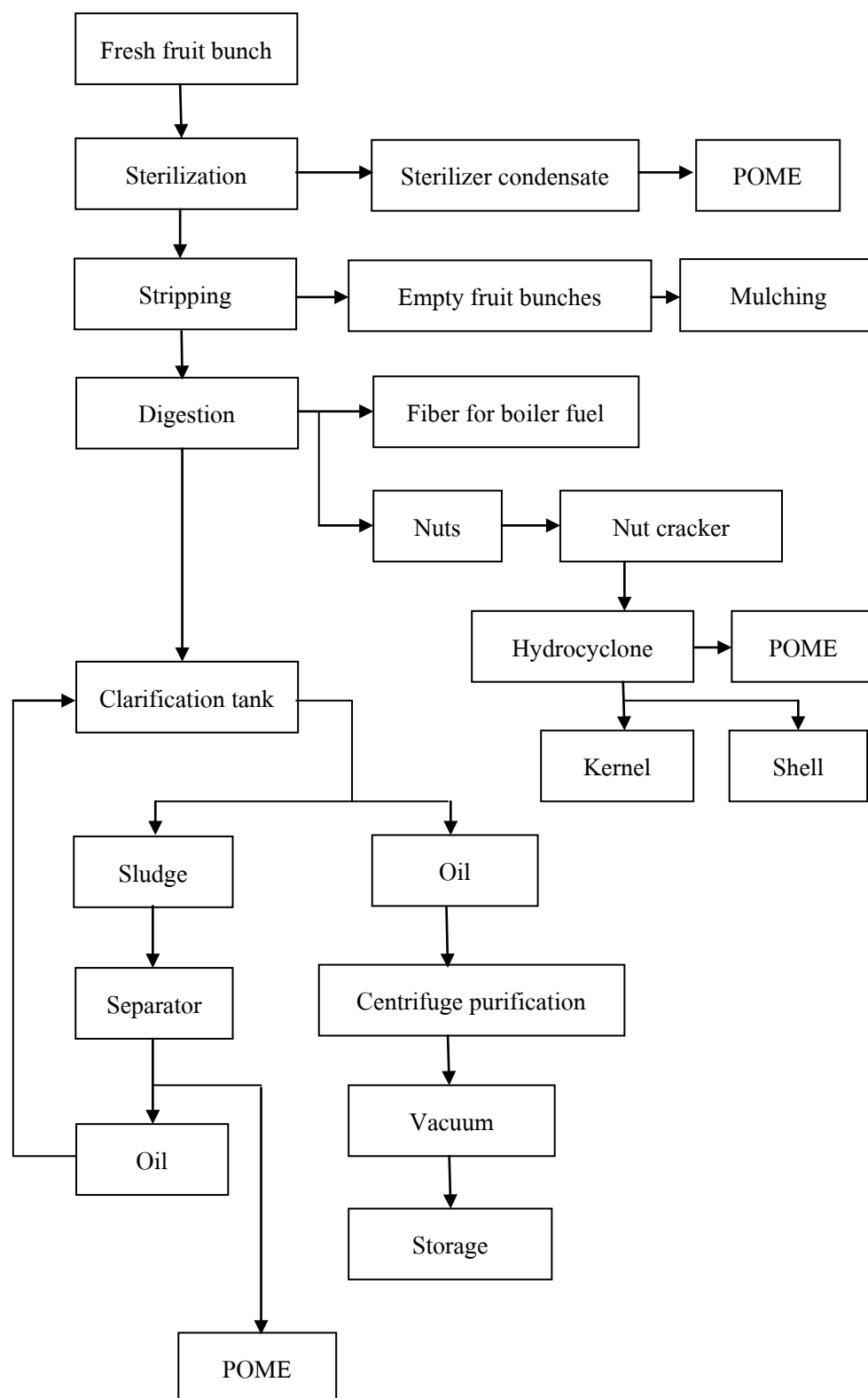
บทที่ 2

ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ของเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม

อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มมีการแบ่งกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มตามการผลิตได้ 2 แบบ คือ 1) การผลิตแบบไม่ใช้น้ำหรือแบบแห้ง และ 2) การผลิตแบบมาตรฐานหรือแบบใช้น้ำ ซึ่งกระบวนการสกัดแบบมาตรฐานสามารถรองรับวัตถุดิบได้ในปริมาณมากและได้น้ำมันปาล์มดิบที่มีคุณภาพ กระบวนการสกัดแบบใช้น้ำแบ่งย่อยเป็น 2 ลักษณะ คือ เครื่องสกัดแยกน้ำมันแบบสกรู (decanter) และเครื่องสกัดแยกน้ำมันแบบหมุนเหวี่ยง (seperator) โดยทั่วไปขั้นตอนในการสกัดน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำจะเริ่มจากการอบทะลายปาล์มสดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียส ความดัน 40-50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40-60 นาที ดังแสดงในรูปที่ 1.1 ซึ่งการอบผลปาล์มจะช่วยยับยั้งปฏิกิริยาไลโปไลซิส (lipolysis) ที่ส่งผลให้เกิดกรดไขมันอิสระและเกิดกลิ่นหืน และนอกจากนี้จะทำให้ทะลายปาล์มเกิดความอ่อนนุ่ม ขั้วของผลปาล์มหลุดออกจากทะลายได้อย่างสะดวกง่ายต่อการย่อยและการบีบอัด ทะลายปาล์มที่ผ่านการนึ่งจะถูกป้อนเข้าเครื่องแยกผลปาล์ม ส่วนของทะลายปาล์มจะถูกลำเลียงออก ส่วนผลปาล์มที่ที่แยกได้จะเข้าสู่เครื่องย่อยผลปาล์ม โดยทำการกวนผลปาล์มให้เส้นใยแยกจากเมล็ดและให้เซลล์น้ำมันเกิดการแตกตัว จากนั้นจะถูกป้อนเข้าเครื่องบีบอัดแบบเกลียว (screw press) น้ำมันจะถูกแยกออกจากน้ำ เศษเส้นใย และสิ่งสกปรกอื่นๆ โดยการใช้เครื่อง decanter หรือเครื่อง separator แต่น้ำมันดินที่ได้โดยส่วนใหญ่ยังคงมีสิ่งเจือปนอยู่โดยเฉพาะอนุภาคของแข็งจึงต้องผ่านเข้าเครื่องแยกเหวี่ยงความเร็วสูง แล้วจึงผ่านไปยังเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อกำจัดความชื้น และจะถูกลำเลียงไปเก็บในถังเก็บน้ำมันขนาดใหญ่ เพื่อรอเข้าสู่กระบวนการทำบริสุทธิ์หรือเตรียมจำหน่าย (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533)

จากกระบวนการเหล่านี้อาจให้เกิดวัสดุเศษเหลือจำนวนมาก ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า กะลาผลปาล์ม เส้นใยปาล์ม และกากเนื้อปาล์ม (palm kernel cake) ดังแสดงในรูปที่ 1.2 โดยเฉพาะทะลายปาล์มเปล่า และเส้นใยปาล์มซึ่งมีปริมาณมากถึง 9.0×10^5 และ 6.0×10^5 ตันต่อปี (Chavalparit *et al.*, 2006) นอกจากนั้น การสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานยังมีการใช้น้ำในการผลิตมาก มีรายงานว่ากระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ 1 ตันต้องการใช้น้ำ 5 – 5.7 ตัน และน้ำที่ใช้ในการผลิตมากกว่าร้อยละ 50 กลายเป็นน้ำเสียและถูกบำบัดเป็นน้ำทิ้ง (palm oil mill effluent, POME) (Wu *et al.*, 2009) ปริมาณน้ำทิ้งส่วนใหญ่มาจากการขั้นตอนการอบทะลายปาล์มในรูปน้ำทิ้งจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (sterilizer condensate) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent) โดยน้ำทิ้งจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อมีประมาณ 200 ลิตรต่อ 10 ตันทะลายปาล์ม (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533)



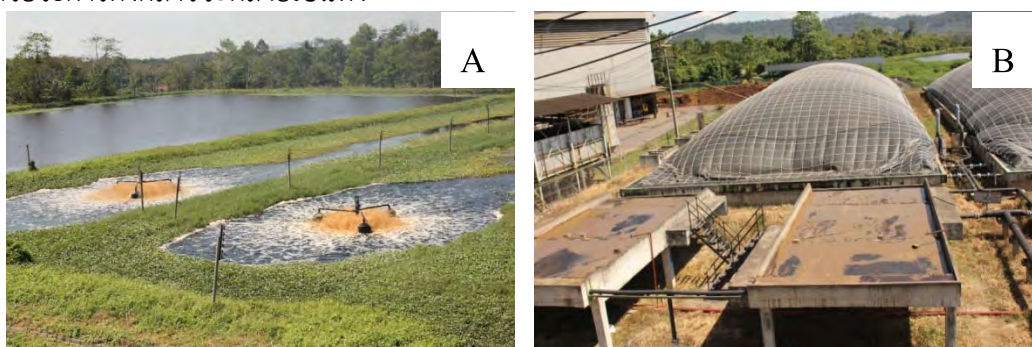
รูปที่ 2.1 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม
ที่มา : Lam and Lee (2011)

วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มมีการนำไปเป็นเชื้อเพลิงในหม้อหนึ่งไอน้ำ (Alam *et al.*, 2007) นอกจากนั้นยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ประเภทอื่นด้วย เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของวัสดุในการเพาะเห็ด หรือการทำปุ๋ยหมัก เป็นต้น



รูปที่ 2.2 วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ทะลายปาล์มเปล่า (A), เส้นใยปาล์ม (B) และกะลาผลปาล์ม (C)

น้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มจะถูกรวบรวมและบำบัดด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนิยมใช้ชุดบ่อไร้อากาศร่วมกับบ่อเติมอากาศ และบ่อผึ่ง (oxidation pond) ดังแสดงในรูปที่ 1.3 A ซึ่งใช้พื้นที่มาก มักก่อให้เกิดปัญหากลิ่นรุนแรง มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ต่ำ และยังก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกส่งผลกระทบต่อสภาวะโลกร้อน ทำให้โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีการพัฒนาระบบในการบำบัดน้ำเสียมาใช้ระบบถังปฏิกรณ์ไร้ออกซิเจนแบบปิด (closed anaerobic tank system) และระบบบ่อหมักไร้อากาศ (รูปที่ 1.3 B) ซึ่งทำให้เกิดการใช้ประโยชน์ของน้ำเสียในรูปแบบของก๊าซชีวภาพ (biogas) ซึ่งสามารถใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าใช้ในโรงงานและบางส่วนยังขายให้กับภาครัฐ น้ำเสียที่ผ่านกระบวนการบำบัดด้วยวิธีการดังกล่าวจะกลายเป็นทิ่ง



รูปที่ 2.3 ระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีบ่อผึ่ง (A) และ ระบบบ่อหมักไร้อากาศ (B)

น้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูงซึ่งมีค่า BOD, COD, ของแข็งแขวนลอย, น้ำมัน และไขมัน (oil and grease) ในปริมาณสูง น้ำทิ้งมีสีคล้ำ มีองค์ประกอบของสารย่อยสลายยาก (พูนสุข ประเสริฐสรรพและคณะ, 2544) โดยทั่วไปลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแสดงดังตารางที่ 2.1 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับคุณลักษณะของน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงาน ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 ปีพุทธศักราช 2539 จะพบว่าน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีค่าสูงกว่ามาตรฐานกำหนดไว้ ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องบำบัดให้ได้ตามมาตรฐานก่อนที่จะปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

ตารางที่ 2.1 ลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง

พารามิเตอร์	*น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	**ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง
pH	3.5-4.8	5.5-9.0
BOD ₅ (mg/L)	22,000-25,000	≤60
COD (mg/L)	30,000-55,000	≤400
TKN (mg/L)	660-890	≤200
TSS (mg/L)	36,500-42,600	-
Oil & Grease (mg/L)	1,300-4,700	≤15

ที่มา : * Ma *et al.* (2000), Bhatia *et al.* (2007)

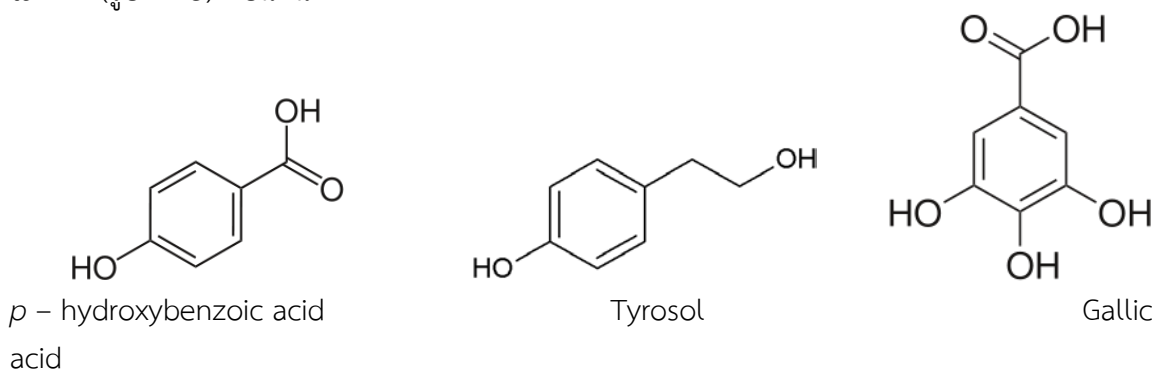
** ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2539) ลงวันที่ 14 มิถุนายน 2539 เรื่อง กำหนดคุณลักษณะของน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงาน ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 52 ง ลงวันที่ 27 มิถุนายน 2539

2.2 สีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

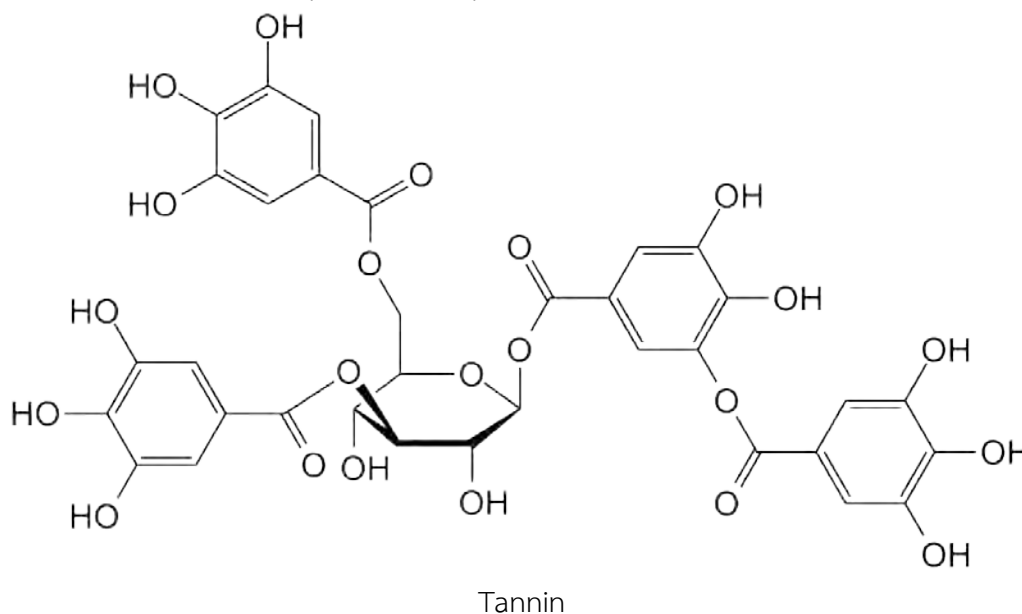
น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสีน้ำตาลคล้ำเป็นสีจริงซึ่งละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ เกิดจากสารประกอบจำพวกแอนโทไซยานิน แคโรทีน เมลานอยดิน ลิกนิน แทนนิน และโพลีฟีนอล (Hartley, 1977; Hwang *et al.*, 1978; Barker and Worgan, 1981) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในพืชรวมถึงปาล์มปาล์มน้ำมัน ซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ ฟีนอลและอนุพันธ์ของฟีนอล หรือสารประกอบฟีนอล (phenols, phenolics, phenolic compounds) เป็นสารที่พบเป็นองค์ประกอบอยู่ในผลปาล์มปริมาณ 0.006 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อกรัมผลปาล์ม หรือมี total phenolic content เท่ากับ 83.97 กรัมต่อลิตร gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัมสารสกัดจากผลปาล์ม (Sundram *et al.*, 2003) โดยพบการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 1 ถึงมากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (จินตนา แก้วบริสุทธิ์, 2541 ; ธรรมศักดิ์ ศรีสุกใส, 2547; Alam *et al.*, 2009) และจากการศึกษาของ Chantho *et al.* (2013) พบว่าน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลรวมถึง 1,206 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อนำน้ำเสียดังกล่าวมาศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid

Chromatography, HPLC) สามารถตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกถึง 8 ชนิด ได้แก่ gallic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid และ ferulic acid โดยแต่ละชนิดมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 8.4-134 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่า *p*-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากที่สุดในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

สารประกอบฟีนอลมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของเบนซีน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH-group) ต่ออยู่เป็นหลัก และอาจมีหมู่แทนที่ต่างๆ แทนที่ในตำแหน่ง ออโท (*ortho*) เมตา (*meta*) หรือ พารา (*para*) ได้อีก สารประกอบฟีนอลพื้นฐาน คือ ฟีนอล (phenol) ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ สารประกอบฟีนอลิกสามารถพบได้ในผักและผลไม้หลายชนิด และสามารถแบ่งประเภทตามจำนวนวงแหวนฟีนอลได้ 3 ชนิด คือ (i) monocyclic phenols มีวงแหวนฟีนอลอยู่ 1 วง สามารถพบทั่วไปในพืช เช่น tyrosol, gallic acid และ *p*-hydroxybenzoic acid เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 1.4 (ii) dicyclic phenols มีวงแหวนฟีนอล 2 วง เช่น flavonoids และ lignans เป็นต้น (iii) polycyclic phenols หรือ polyphenols เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีวงแหวน ฟีนอลมากกว่า 2 วง เช่น lignins และ tannin (รูปที่ 1.5) เป็นต้น

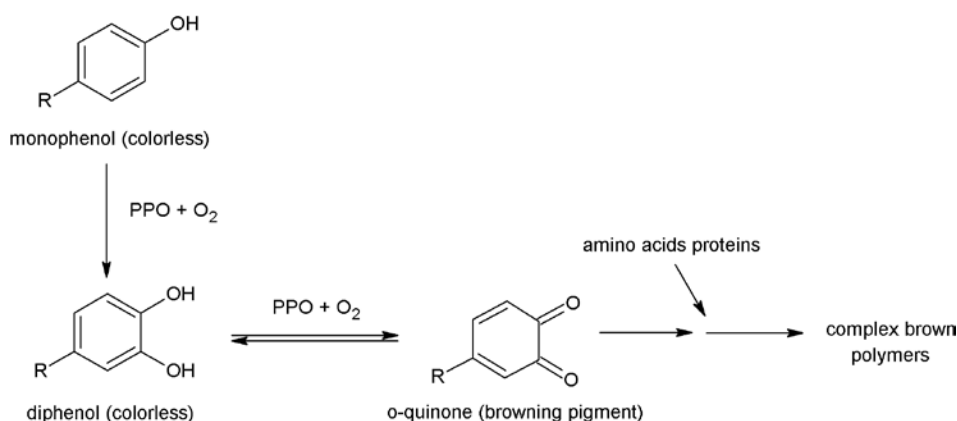


รูปที่ 2.4 โครงสร้าง monocyclic phenols เช่น *p*-hydroxybenzoic acid, Tyrosol และ Gallic acid



รูปที่ 2.5 ตัวอย่างโครงสร้าง polycyclic phenols หรือ polyphenols เช่น Tannin

สารประกอบฟีนอลที่มีการตกค้างในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนี้ เกิดจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม เมื่อเซลล์ผลปาล์มถูกทำลายจากการให้ความร้อนในขั้นตอนของการนึ่งด้วยไอน้ำ เกิดการแตกตัวขององค์ประกอบสารอินทรีย์จากขั้นตอนการหีบอัด ทำให้สารประกอบฟีนอลที่อยู่ในผลปาล์มถูกสกัดออกมาพร้อมกับน้ำมันและไอน้ำ ซึ่งสารประกอบฟีนอลจะละลายอยู่ในเฟสของน้ำได้ดีกว่าเฟสของน้ำมัน ทำให้สารประกอบฟีนอลปนเปื้อนมากับน้ำเสียจากกระบวนการผลิต และยังส่งผลต่อการเกิดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยสารประกอบฟีนอลที่ถูกสกัดออกมาสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase, PPO) เกิดเป็นสารออร์โท-ไดฟีนอล (o-diphenol) ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น ออร์โท-ควิโนน (o-quinones) ซึ่งมีสีน้ำตาล และจะรวมตัวกันเป็นสารโมเลกุลใหญ่มีสีน้ำตาล ที่เรียกว่า เมลานิน (melanin) ซึ่งมีโครงสร้างซับซ้อน ยากต่อการคั้นตัว ปฏิกิริยานี้เรียกว่า ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสีน้ำตาลคล้ำ



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction)

ที่มา : Sapers and Milller (1993)

มีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบางชนิด มีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) มีความเป็นพิษต่อพืช (phytotoxicity) และต่อต้านกระบวนการออกซิเดชัน (antioxidation) ส่งผลให้การย่อยสลายทางชีวภาพเกิดขึ้นได้น้อย และจะยิ่งลดน้อยมากขึ้นหากมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลที่มากขึ้น (Torrecilla, 2010) ส่วนสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีผลทำให้ออกซิเจนที่สัมผัสผิวหน้าของน้ำลดลง ขัดขวางการเจริญของสิ่งมีชีวิตในน้ำที่มีการใช้ออกซิเจน ลดการทะลุผ่านของแสงแดดลงสู่ใต้น้ำ ทำให้พืชที่อยู่ในน้ำเกิดการสังเคราะห์แสงลดน้อยลง และนอกจากนี้สีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังก่อให้เกิดทัศนียภาพที่ไม่ดีอีกด้วย (Park *et al.*, 2007; Wang, 2008) และจากข้อกำหนดคุณลักษณะของน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงานตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 ปีพุทธศักราช 2539 ระบุลักษณะของน้ำทิ้งที่จะต้องมีการบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยกระบวนการต่างๆ แล้วในบ่อน้ำทิ้งก็ยังคงพบการปนเปื้อนของฟีนอลสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน รวมทั้งสีที่ยังไม่ได้ตามเกณฑ์มาตรฐานจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาระบบการบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อให้มีค่าตามมาตรฐานและสามารถปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้

การกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียและน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีการทางกายภาพ เช่น การกรองด้วยเมมเบรน (Ahmand *et al.*, 2006) การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ (Santhy and Selvapathy, 2005) วิธีการทางเคมี เช่น การตกตะกอนด้วยสารเคมี (Kim *et al.*, 2003) การออกซิเดชันทางเคมี ซึ่งวิธีเหล่านี้มีความยุ่งยากในการใช้งานและดูแลรักษา ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานค่อนข้างสูง ทั้งยังเป็นการเพิ่มสารเคมีเข้าสู่ระบบสิ่งแวดล้อม ดังนั้นวิธีการทางชีวภาพโดยอาศัยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา โดยเฉพาะกลุ่มราไวท์รอฟ ซึ่งสามารถกำจัดสารที่ย่อยสลายยากได้อย่างสมบูรณ์ จึงเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยม เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ต้นทุนไม่สูงมาก และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

2.3 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอล

ฟีนอลเป็นสารพิษที่ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในระดับความเข้มข้นฟีนอลสูงๆ ซึ่งมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ไวต่อสารนี้ อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีนอล และมีความทนทานต่อฟีนอล จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรีย รา และยีสต์ สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ใช้ฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ ตารางที่ 1.5 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ ซึ่งคัดแยกจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ จินัส *Acinetobacter*, *Candida* และ *Pseudomonas* เป็นต้น

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล

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

2.4 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* และ *Acinetobacter*

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มีลักษณะโคโลนีเป็นสีชมพูเข้ม จัดเป็นแบคทีเรียประเภท facultative methylothropes ที่สามารถเจริญได้ง่าย และพบในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไป เช่น ในดิน และเนื้อเยื่อพืช (Aken et al., 2004; Lidstrom and Chistoserdova, 2002) ทั้งนี้พบได้ง่ายบริเวณราก (rhizosphere) และในต้นพืช (endosphere) ที่มีความสามารถในการดูดซับ หรือบำบัดสารมลพิษ (Dourado et al., 2011) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้หลายชนิด เช่น เมทานอล (methanol) และเมทิลเอมีน (methylamine) รวมทั้ง C_2 , C_3 และ C_4 (Lidstrom and Chistoserdova, 2002) นอกจากนั้น มีรายงานการนำแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้ในการบำบัดสารมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม เช่น ไซยาไนด์ (Cyanide) ฟอรัมาไมด์ (formamide) ฟอรัมาลดีไฮด์ (formaldehyde) และฟีนอล (phenol) เป็นต้นดังตัวอย่างแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*

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

แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* พบได้แพร่หลายในธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน สิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ และจากผิวหนังมนุษย์ แบคทีเรียสกุลนี้มีความน่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ และในด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นที่รู้จักในการย่อยสลายสารมลพิษได้หลากหลายชนิด (ตารางที่ 2.4) เนื่องจากมีความสามารถในการใช้สารประกอบหลากหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เช่น ฟีนอล (phenol) และเบนโซเอท (benzoate) เป็นต้น ทำให้เพาะเลี้ยงได้ง่ายในอาหารเหลว (Caposio et al., 2002 ; Cui et al., 2008) รวมทั้งมีความสามารถในการผลิต emulsifying agents ทำให้สารมลพิษที่ละลายน้ำได้น้อย (low solubility) ถูกย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Marin et al., 1995)

ตารางที่ 2.4 การย่อยสลายสารมลพิษโดยแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter*

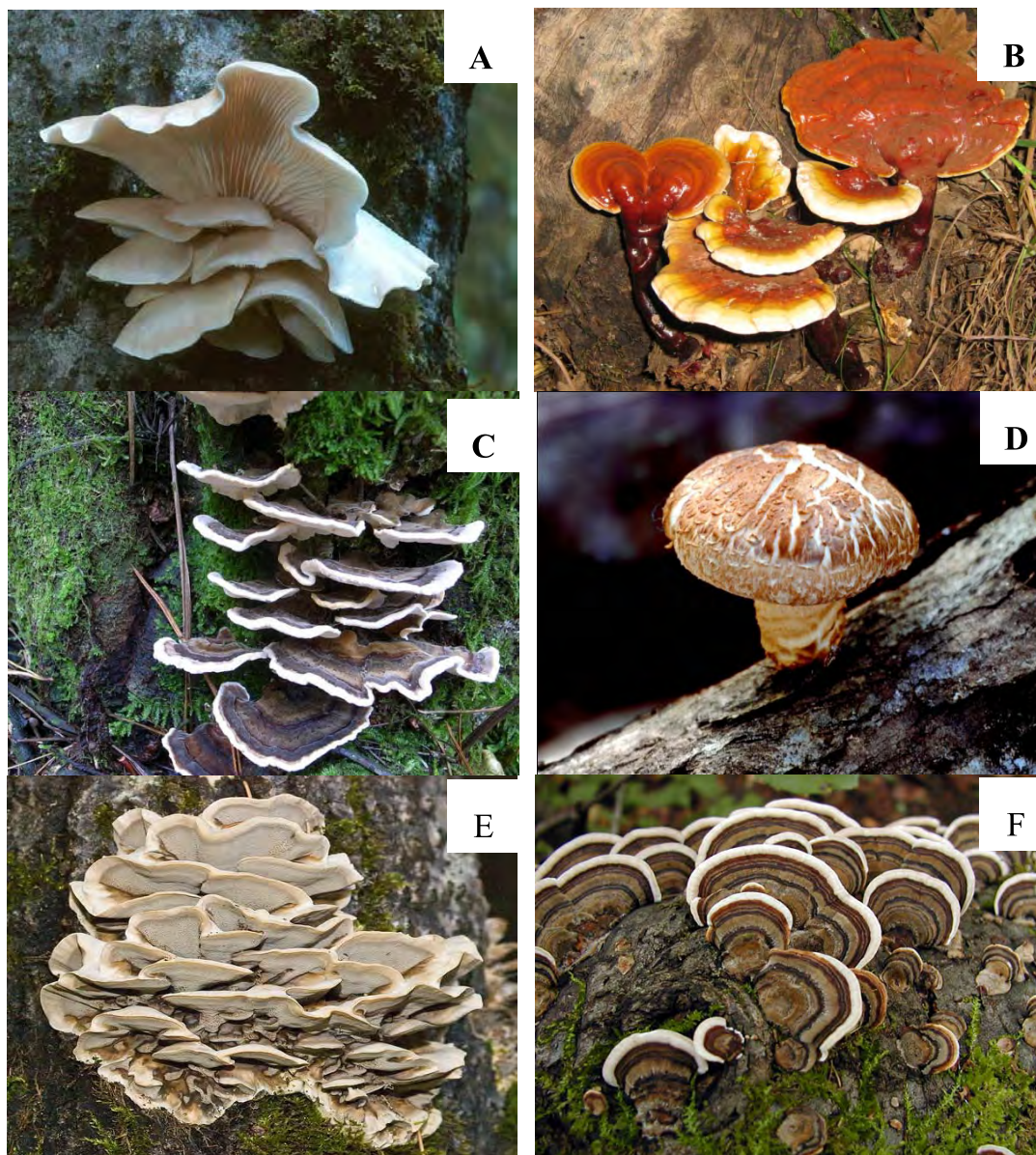
สายพันธุ์แบคทีเรีย	สารมลพิษที่ย่อยสลาย	อ้างอิง
<i>Acinetobacter radioresistens</i> USTB-04	methyl parathion	Fang-yao et al. (2007)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> MM5	diesel และ heating Oil	Marin et al. (1995)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCIM 2890	diazo dye direct brown MR	Ghodake et al. (2009)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

จากการศึกษาของ Khongkhaem et al. (2011) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 โดยวิธีตรึงเซลล์แบบกักขัง (entrapment) ในซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 80-85% ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้เกือบ 100% ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยกว่า 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลได้เป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์เดียวแต่ละชนิด

2.5 ราไทรอธและเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติก (Ligninolytic enzyme)

ราไทรอธเป็นกลุ่มของราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติก (ligninolytic enzyme) ที่สามารถย่อยสลายได้ทั้งเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่เป็นองค์ประกอบในพืช โดยสามารถย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้เร็วกว่าเซลลูโลส นอกจากนี้รากลุ่มนี้บางชนิดยังย่อยสลายลิกนินได้อย่างสมบูรณ์ได้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ราไทรอธจัดเป็นราใน Class Basidiomycetes ลักษณะทั่วไปของรากลุ่มนี้ คือเป็นราที่ไม่มีคลอโรฟิลล์จึงไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ ต้องอาศัยอาหารจากสิ่งมีชีวิตหรือพืช มีรูปร่างแบบเส้นใย (Filament) และลักษณะเซลล์เป็นแบบหลายเซลล์ (multicellular) โดยการเจริญจะไปเพิ่มความยาวออกที่ส่วนปลาย (apical growth) แต่ละส่วนของเส้นใยสามารถเจริญเป็นหน่วยใหม่ได้ ภายในเส้นใยถูกแบ่งออกเป็นส่วนๆ ด้วยผนังกัน (septum) ราไทรอธเป็นราที่มีความสำคัญในการย่อยสลายไม้ให้เป็นสีขาวได้ ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่มีสีน้ำตาล ทำให้เหลือส่วนที่เป็นเซลลูโลสเห็นเป็นลักษณะของชั้นเส้นใยที่มีสีอ่อนจางลงกว่าเดิมคล้ายถูกฟอกสี นอกจากเซลลูโลสแล้วราไทรอธยังสามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลสูงได้ (Akhtar et al., 1999) ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำราไทรอธมาใช้ในการเปลี่ยนแปลงสารประกอบบางชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับลิกนิน เพื่อลดความเป็นพิษไม่ให้เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ยาฆ่าแมลง (pesticides), สีย้อมสังเคราะห์ (synthetic dye), polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), carbontetrachloride และ pentachlorophenol (PCP) เป็นต้น (Gao et al., 2010) ดังแสดงในตารางที่ 2.5 ราในกลุ่มนี้ได้แก่

Coriolus versicolor, *Trametes* sp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus* และ *Lentinus edodes* เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.7



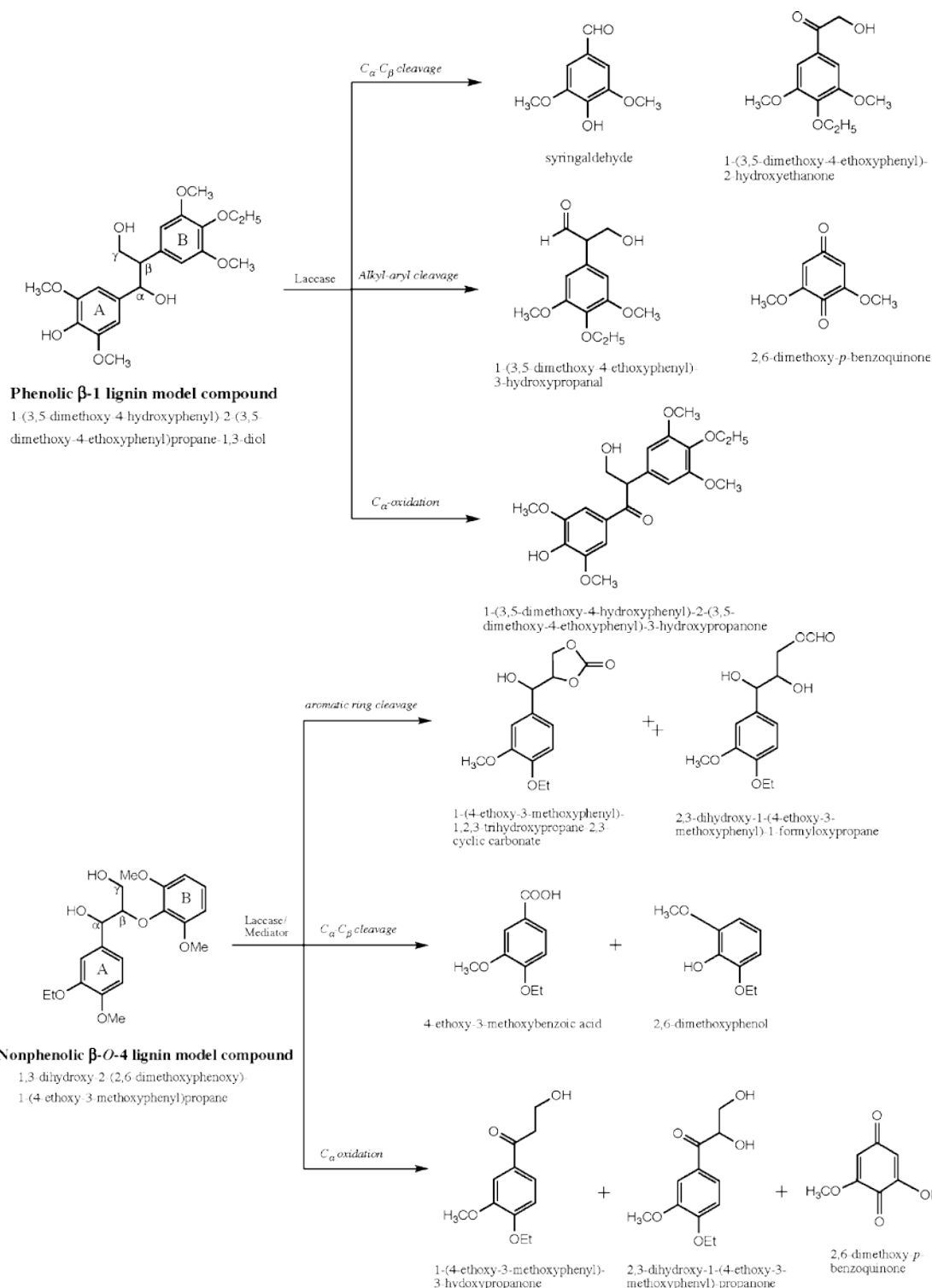
รูปที่ 2.7 ตัวอย่างราไทรอท *Pleurotus ostreatus* (A), *Ganoderma lucidum* (B), *Trametes* sp. (C), *Lentinus edodes* (D), *Bjerkandera adusta* (E) และ *Trametes versicolor* (F)

ตารางที่ 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ราไทรอทในการย่อยสลายสารมลพิษ

ราไทรอธ	สารมลพิษ	อ้างอิง
<i>Bjerkandera adusta</i>	PAHs	Valentin <i>et al.</i> (2007)
	TNT	Eilers <i>et al.</i> (1999)
	Daunomycin producing	waste Kornilowicz <i>et al.</i> (2006)
<i>Irpex lacteus</i>	PAHs	Baborova <i>et al.</i> (2006)
	Synthetic dyes	Svobodova <i>et al.</i> (2008)
<i>Lentinus tigrinus</i>	PAHs	Valentin <i>et al.</i> (2006)
<i>Trametes versicolor</i>	Trichloroethylene (TCE)	Marcro-Urrea <i>et al.</i> (2008)
	Synthetic dyes	Gavril and Hodson (2007)
	Polysaccharide	Zhu <i>et al.</i> (2005)
<i>Phlebia radiata</i>	TNT	Aken <i>et al.</i> (1999)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Phenolics in wastewater	Aggelis <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete</i>	PAHs (anthracene)	Mohammadi <i>et al.</i> (2009)
<i>chrysosporium</i>	Molasses wastewater	Vahabzadeh <i>et al.</i> (2004)
	Textile wastewater	Gomaa <i>et al.</i> (2008)

เอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายลิกนิน ประกอบด้วยเอนไซม์ประเภท เปอร์ออกซิเดส (peroxidases) และออกซิเดส (oxidases) หลายชนิด เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidases) แลคเคส (laccases, p-diphenol oxidase) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidases) และเอนไซม์ออกซิเดสที่ให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 -producing oxidases) เอนไซม์ในกลุ่มนี้แต่ละตัวจะมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน จัดเป็นเอนไซม์ที่ผลิตและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ lignin modifying enzymes, auxiliary enzymes และ feedback type enzyme ซึ่งราไทรอธแต่ละสายพันธุ์จะสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน (Leonowicz *et al.*, 1999) การย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์จากรากลุ่มนี้อาจเกิดกลไกหลายๆ แบบรวมกัน เช่น การทำให้วงแหวนอะโรมาติกแตกออกโดยการเติมออกซิเจน (oxidative fission) หรือเกิดออกซิเดชันที่หมู่แอลฟาไฮดรอกซิล (α -hydroxyl) การเติมน้ำที่ส่วนแอลฟาคาร์บอนิล (α -carbonyl) และการตัดพันธะเอริลอีเทอร์ (aryl ether) เป็นต้น

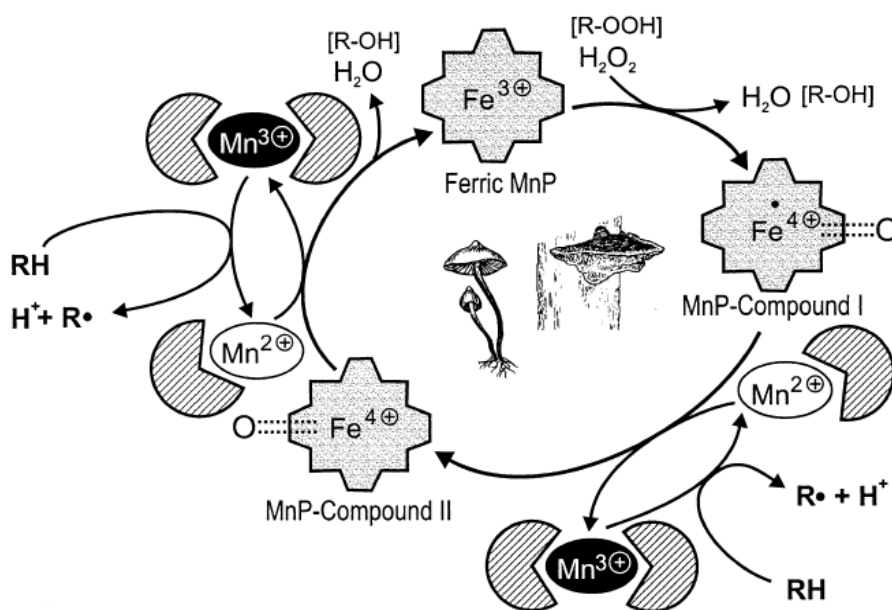
Lignin peroxidase (LiP) (EC 1.11.10.14) เป็น Ligninolytic enzyme ตัวแรกที่มีการค้นพบและพบบ่อยใน *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* และ *Bjerkandera* sp. จัดเป็นเอนไซม์ที่มี Ferric heme เป็นตัวให้อิเล็กตรอน สามารถ reduce โมเลกุลของออกซิเจนได้สาร hydrogen peroxidase และ superoxide (Bacocchi *et al.*, 2002) กระบวนการทำงานของ LiP เริ่มจาก LiP ถูกออกซิไดส์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทำให้ LiP ขาดอิเล็กตรอนอยู่ในสถานะที่ไม่เสถียร จึงต้องดึงอิเล็กตรอนจากสับสเตรท เพื่อให้ตัวเองอยู่ในสถานะที่เสถียร (Aurora and Gill, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 LiP เป็นเอนไซม์ที่เป็นตัว oxidant ที่แรงและไม่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทตัวใดตัวหนึ่ง แต่เป็นเอนไซม์



รูปที่ 2.9 กลไกของเอนไซม์ Laccase ในการออกซิไดซ์ phenolic aromatic compound และ non-phenolic aromatic compound
 ที่มา : Wong (2008)

Manganese peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13) เป็นเอนไซม์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับโครงสร้างของลิกนิน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) Manganese dependent peroxidase เป็น

extracellular enzyme ที่นอกจากต้องการ H_2O_2 ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิไดส์ลิกนิน แล้วยังต้องการ Mn^{2+} เป็น co-factor ด้วย (2) Manganese independent peroxidase เป็น extracellular enzyme ที่ต้องการ H_2O_2 ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิไดส์ลิกนิน แต่ไม่ต้องการ Mn^{2+} สับสเตรทหลักของ Manganese peroxidase เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำและส่วนใหญ่เป็นพวกกรดอินทรีย์ ในกลไกการย่อยสลายลิกนินจะมี Mn(II) ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยปฏิกิริยาจะเริ่มจาก MnP ถูกออกซิไดซ์โดย H_2O_2 ต่อมา MnP ที่ขาดอิเล็กตรอนจะอยู่ในสถานะไม่เสถียรจึงรับอิเล็กตรอนจาก Mn(II) เกิดเป็น Mn(III) ที่เข้าไปร่วมกับ organic acid chelator เช่น oxalate, malonate, lactate เกิดเป็น chelated- Mn(III) ไปออกซิไดส์ลิกนิน (Crecchio *et al.*, 1995) ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 กลไกการทำงานของเอนไซม์ Manganese peroxidase
ที่มา : Hofrichter (2002)

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำราไวท์รอมมาใช้ในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ซึ่งเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมหลักของประเทศแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ที่มีโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกกระจายอยู่ทั่วไป (Fountoulakis *et al.*, 2002) ทั้งนี้มีรายงานว่าลักษณะน้ำเสียและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วของโรงงานดังกล่าวมีลักษณะคล้ายกับน้ำเสียและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องมีดังนี้

Annibale *et al.* (2004) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิก, สี และซีโอดี ของน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอกของรา *Panus tigrinus* โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอกที่มีความเข้มข้นสูงและความเข้มข้นต่ำ ซึ่งมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 5.5 กรัมต่อลิตรและ 2.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับและมีความเข้มข้นของสีเท่ากับ 27,000 หน่วยสีและ 25,00 ตามลำดับ หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลาที่ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 13 วัน พบว่าในน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอกที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและซีโอดีสูงทำให้เชื้อรา *P. tigrinus* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทำให้ไม่เกิดการลดลงของสารประกอบฟีนอล, สี และซีโอดี แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีน

นอลิกที่สูงจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราไวท์รอต แต่ถ้ามีการกำจัดของแข็งแขวนลอยในน้ำเสียรวมทั้งเติมแหล่งอาหารร่วมคือ 0.5% sucrose และ 0.1% yeast extract จะทำให้เกิดการลดลงของสารประกอบฟีนอลและสีเท่ากับ 88% และ 33% ซึ่งต่างจากน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้นต่ำที่มีการเจริญเติบโตของ *P. tigrinus* และสามารถลดสารประกอบฟีนอลได้มากกว่า 89% รวมทั้งลดสีได้ถึง 72.4% ในน้ำเสียความเข้มข้นต่ำที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วม

Ergul *et al.* (2009) ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกที่ไม่ผ่านการเจือจาง ไม่เติมสารอาหาร และไม่มีการปรับปรุงมาก่อนโดยการใช้ราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes versicolor* FPRL 28A INI ที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพ พบว่าสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้ถึง 78% จากการทดลองแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่ และลดสารดังกล่าวได้ 39% ในการเลี้ยงแบบคงที่โดยใช้ น้ำทิ้งที่ไม่เจือจาง ส่วนการเลี้ยงในสภาวะของถังหมักแบบให้อากาศอย่างต่อเนื่องพบว่าสารประกอบฟีนอลิกถูกลดลง 70% และสามารถลดสีได้ 18% ในวันที่ 8 ของการเลี้ยง โดยมีอัตราการให้อากาศที่ 0.25 vvm ทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ชนิดต่างๆ ด้วยเครื่อง GC-MS และตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก คือ laccase และ manganese peroxidase (MnP) จากสภาวะดังกล่าว คือ 762.14 ± 42.11 และ 97.80 ± 8.11 U/L ตามลำดับ

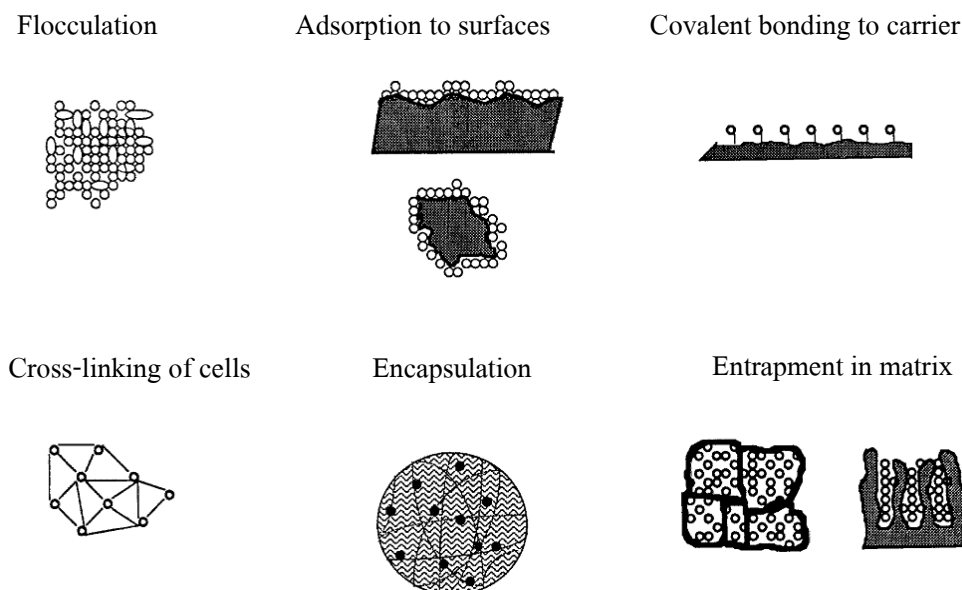
Lakhatar *et al.* (2010) ได้ศึกษาการคัดเลือกราไวท์รอต *Lentinus edodes* ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลวเพื่อย่อยสลายสารโพลีฟีนอล (Polyphenols) ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าราไวท์รอต *Lentinus edodes* สายพันธุ์ Le119, Le212, Le122 และ Le118 เป็นสายพันธุ์ที่มีการเจริญสูงสุดในอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) ที่มีการเติม 10% และ 20% ของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อราไวท์รอตทั้ง 4 สายพันธุ์ไปศึกษาการลดสีและสารประกอบฟีนอลิกของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่า *L.edodes* Le119 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยสามารถลดสีและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดภายในระยะเวลา 30 วัน ได้ 65% และ 75 % ตามลำดับ และให้กิจกรรมของเอนไซม์ laccase สูงสุดที่ 1.5 U/ml ในวันที่ 15 นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลด monomeric phenols ได้ถึง 75% โดยคิดจากค่าเฉลี่ยการลดลงของ monomeric phenols แต่ละตัวที่ศึกษา

นอกจากการศึกษารการใช้ราไวท์รอตในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกแล้ว ยังพบว่ามีการศึกษาในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอีกด้วย โดยที่ Rakamthong and Prasertsan (2011) ได้ศึกษาการลดลงของสีและฟีนอลจากตัวอย่างน้ำทิ้งบ่อสุดท้ายของระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแบบบ่อหมักไร้อากาศโดยเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ATCC24725 โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) เติมน้ำทิ้งลงในน้ำทิ้ง (2) เติมน้ำทิ้งลงในน้ำทิ้งที่ผสมกับน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ในอัตราส่วน 1:1 และ (3) ชุดควบคุม คือ น้ำทิ้งเพียงอย่างเดียว พบว่าเชื้อที่เติมลงในน้ำทิ้งที่ผสมกับน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ สามารถบำบัดสีและฟีนอลได้ดีกว่าน้ำทิ้งที่มีการเติมน้ำทิ้งเพียงอย่างเดียว โดยสามารถลดสีและฟีนอลในน้ำทิ้งได้ถึง 83.4 % และ 61.2 % ตามลำดับ อีกทั้งมีการศึกษาศักยภาพของราไวท์รอตในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลของน้ำทิ้งชนิดต่างๆ ในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อขยายขนาดของการบำบัด โดย Manzanares *et al.* (1995) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติกและการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานกระดาษที่เจือจาง 30% ของราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes versicolor* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการป้อนน้ำทิ้งอย่างต่อเนื่องและมีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมลงไป ในน้ำทิ้ง พบว่าราไวท์รอตสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถกำจัดสีน้ำทิ้งได้ 90% ในระยะเวลา 9 วัน นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลและ COD ได้ 90% และ 69% ตามลำดับ และพบว่า *T. versicolor* สามารถสร้างเอนไซม์ Laccase และ manganese

peroxidase สูงสุดเท่ากับ 700 และ 25 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 10 และ 7 ของการศึกษา ซึ่งผล การศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Eugul *et al.* (2009) ทดลองกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้ง โรงงานสกัดน้ำมันมะกอกโดยใช้ *T. versicolor* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Continuous stirred tank reactor (CSTR) ขนาด 1.2 ลิตร โดยใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกที่เจือจาง 2 เท่า และน้ำทิ้งไม่เจือจาง ซึ่งแปรผันอัตราการให้อากาศที่ 0.1-1.0 vvm. พบว่าในน้ำทิ้งที่เจือจาง 2 เท่า ราไวทรอกกำจัดสารประกอบฟีนอลได้สูงสุดคือ 74% เมื่อบ่มราไวทรอกพร้อมกับน้ำทิ้งเป็นระยะเวลา 10 วัน ในสภาวะที่ให้อากาศ 0.25 vvm. และยังสามารถกำจัดสีน้ำทิ้งได้ 21% นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase และ manganese peroxidase สูงสุดคือ 1,550 และ 128 ยูนิตต่อลิตรซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารประกอบฟีนอลและสีในน้ำทิ้ง

2.6 การตรึงราไวทรอกเพื่อย่อยสลายสารมลพิษ

การตรึง (immobilization) หมายถึง เทคนิคที่ใช้ตรึงเซลล์ ออร์แกนเนล เอนไซม์ หรือโปรตีนอื่นๆ ซึ่ง อาจเป็นการตรึงทางกายภาพหรือเคมีไว้บนวัสดุช่วยพยุงที่เป็นของแข็ง หรือตรึงภายในเนื้อสารที่เป็นของแข็ง หรือถูกกักไว้โดยแผ่นเยื่อ เพื่อเพิ่มความคงตัวและทำให้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่หรือใช้อย่างต่อเนื่องได้ กระบวนการตรึงเซลล์จุลินทรีย์สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ (1) การเกาะติด/ดูดซับของเซลล์บนวัสดุด้วย วิธีธรรมชาติ (self-attachment immobilization) (2) การตรึงแบบสังเคราะห์ (artificial immobilization) เช่น การกักขังเซลล์ในพอลิเมอร์ (entrapment within polymers) การสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์ กับวัสดุตรึง (covalent bonding) เป็นต้น (Cohen *et al.*, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 อย่างไรก็ตาม เทคนิคการเกาะติดของเซลล์ด้วยวิธีธรรมชาติเป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่าย มีประสิทธิภาพ และสามารถขยาย ขนาดเพิ่มจำนวนเซลล์ตรึงได้ง่ายกว่าการตรึงแบบสังเคราะห์ นอกจากนั้นการตรึงเซลล์แบบกักขังยังมีข้อจำกัด เรื่องการแพร่ผ่านของสารอีกด้วย (Lee and Palsson, 1994) ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงใน การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ คือ การคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ ซึ่งต้องเป็นวัสดุที่มีความเป็นรูพรุนสูง มีพื้นที่ผิวมากเพื่อ ใช้ในการยึดจับ ไม่ละลายน้ำ มีความแข็งแรง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ -เคมี เช่น แรง กระแทกกระเทือน การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ พีเอช และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เนื่องจากการตรึงเซลล์ ต้องทำในภาวะปลอดเชื้อ จึงต้องทนต่อความร้อน ความดันได้สูง นอกจากนั้นวัสดุที่ใช้ไม่ควรเป็นอันตรายต่อ เซลล์และสิ่งแวดล้อม และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ (Kourkoutas *et al.*, 2004)



รูปที่ 2.11 การตรึงเซลล์
ที่มา : Cassidy *et al.* (1996)

แนวโน้มการนำเซลล์ตรึงมาใช้ประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อมได้เพิ่มจำนวนมากขึ้น สำหรับการตรึงราไวท์รอกที่มีข้อดี คือ ง่ายต่อการแยกแยะระหว่างเซลล์ตรึงที่มีลักษณะเป็นของแข็ง และน้ำเสียซึ่งเป็นของเหลว สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ง่าย ลดการอุดตันในระบบที่มีการไหลอย่างต่อเนื่อง (continuous-flow systems) (Tieng and Sun, 2000) นอกจากนี้การตรึงเซลล์ราไวท์รอกยังช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ และมีความคงทนต่อสภาวะแวดล้อม เช่น พีเอช และความเข้มข้นของสารที่เป็นพิษ (Shin *et al.*, 2002) โดยทั่วไปการตรึงราไวท์รอกนิยมใช้การตรึงทั้ง 2 แบบ คือ การเกาะติด และการกักขัง ซึ่งจะมีการเลือกใช้วัสดุตรึงที่แตกต่างกันไปทั้งวัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ การตรึงแบบกักขัง นิยมใช้ natural polymeric gels เช่น agar, carrageenan, alginate chitosan เป็นต้น และ synthetic polymers เช่น polyacrylamine, polyurethane, polyvinyl alcohol เป็นต้น (Katzbauer *et al.*, 1995) สำหรับการตรึงแบบการเกาะติด นิยมใช้วัสดุตรึงในรูปของ synthetic foams เช่น polyurethane foam และ nylon sponge นอกจากนี้วัสดุจากธรรมชาติจำพวก organic material เช่น เปลือกเมล็ดทานตะวัน(Rodriguez *et al.*, 2008) แกลบ(Li and Jia, 2008) และซังข้าวโพด (Tychanowicz *et al.*, 2004) สามารถนำมาใช้ในการตรึงราไวท์รอกแบบเกาะติด ซึ่งวัสดุดังกล่าวสามารถเป็นแหล่งอาหารให้แก่รา และช่วยกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินไลติกอีกด้วย เนื่องจากวัสดุเหล่านี้มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับสภาวะในธรรมชาติที่ราเจริญได้ดี (Rodriguez *et al.*, 2004) นอกจากนี้การนำวัสดุเศษเหลือจากการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเกษตรมาเป็นวัสดุตรึงรา นับเป็นวิธีหนึ่งในการกำจัดของเสียและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

การนำราไวท์รอกที่ถูกตรึงมาใช้ในการบำบัดสารมลพิษโดยเฉพาะในการกำจัดสีย้อม ซึ่งเป็นสารมลพิษที่เกิดจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ หากไม่มีการจัดการที่เหมาะสม อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมใกล้เคียงได้ จึงมีการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงของราไวท์รอกในการกำจัดสีย้อมดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 งานวิจัยที่ศึกษาการตรึงราไวท์รอกบนวัสดุต่างๆ เพื่อกำจัดสีย้อม

วัสดุตรึง	ราไวท์รอก	สีย้อม	อ้างอิง
Nylon sponge	<i>Pycnopus cinnabarinus</i>	Remazol Brilliant Blue R	Schliephake and Lonergan (1996)
Corncob	<i>P. chrysosporium</i>	RBBR, Methyl Violet Congo Red	Tychanowicz <i>et al.</i> (2004)
Alginate beads	<i>P. chrysosporium</i>	Acid orange, Acid red 114, Vat Magenta	Radha <i>et al.</i> (2005)
Na- alginate beads	<i>F. troglia</i>	Acid Black 52	Park <i>et al.</i> (2006)
Stainless steel Sponges	<i>T. pubescens</i>	Reactive Black 5	Enayatzamir <i>et al.</i> (2008)
Sunflower seed shells	<i>T. pubescens</i>	Reactive Black 5	Rodriguez <i>et al.</i> (2009)

นอกจากการศึกษาใช้เซลล์ตรึงของราไวท์รอกในการกำจัดสีย้อมแล้ว ยังพบว่ามีมีการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงของราไวท์รอกในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมประเภทอื่น ๆ อีกด้วย ดังเช่น Kim and Shoda (1999) ศึกษาการกำจัดสีจากน้ำตาลโดยใช้เส้นใยอิสระ และเส้นใยที่ถูกตรึงบน polyurethane foam ของ *Geotrichum candidum* Dec 1 ในการกำจัดสีแบบกึ่งกะ (semi-bath culture) มีการกำจัดสีร้อยละ 80 และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีความคงตัวตลอด 4 สัปดาห์ ส่วนการใช้เส้นใยที่ถูกตรึงยังมีความคงตัวในการกำจัดสีและกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตลอด 8 สัปดาห์ และ Annibale *et al.* (1998) ทดลองใช้เส้นใยของ *Lentinus edodes* ที่ถูกตรึงบนฟองน้ำเพื่อบำบัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าสารอินทรีย์ทั้งหมด (TOC) ลดลงจากในรอบที่ 1, 2 และ 3 (รอบละ 8 วัน) ถึง 73%, 88% และ 75% ตามลำดับ ลดสารประกอบฟีนอลิกได้ 83.5%, 88.5% และ 78% ในขณะที่สีของน้ำทิ้งลดลง 75%, 72% และ 34% จากการศึกษาของ Bajpai *et al.* (1993) พบว่าการเติมกลูโคสเป็นแหล่งสับสเตรทร่วมลงในน้ำทิ้งโรงงานฟอกเยื่อไม้ ทำให้ราไวท์รอก *Tremetes viricolor* สามารถลดสีของน้ำทิ้งได้มากกว่า 80% ภายในเวลา 3 วัน นอกจากนั้นโสภารัตน์ รัตนพันธุ์ (2547) ศึกษาการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยใช้เส้นใยของ *Lentinus* spp. ที่ตรึงบนฟองน้ำ พบว่าสามารถลด COD ได้ในช่วง 30%-50% ลดสีได้ 17%-58% ลดฟีนอลได้ 4%-75% และลดของแข็งทั้งหมดได้ 6%-56% จากนั้นยังศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าการเติมยูเรีย 0.05% มีความเหมาะสมทำให้ประสิทธิภาพของ *Lentinus strigosus* ST-S-3 สูงสุด โดยค่า COD ลดลง 64.17% และกำจัดสีได้ 43.03% และยังพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ laccase และ manganese peroxidase (MnP) สูงที่สุดอีกด้วย

จะเห็นได้ว่าการตรึงเซลล์มีข้อดี คือ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของราไวท์รอกในการกำจัดสี และสารประกอบฟีนอลได้ดีขึ้น และสามารถนำไปใช้งานได้ง่าย งานวิจัยนี้จึงสนใจใช้เทคนิคการตรึงราไวท์รอกบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน เพื่อให้เซลล์ตรึงมีความทนทานต่อสารอินทรีย์ต่าง ๆ และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลที่ตกค้างในน้ำทิ้ง รวมทั้งช่วยจำลองสภาพแวดล้อมที่ราเจริญได้ดีในธรรมชาติ และกระตุ้น

การสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสีและสารประกอบฟีนอล การใช้วัสดุดังกล่าวซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้ประโยชน์ และกำจัดของเสีย นอกจากนั้นราตรังที่ผ่านการใช้งานแล้ว ยังถือเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการบำบัดน้ำทิ้ง โดยอาจนำราตรังไปทำปุ๋ย หรือสกัดสารที่มีมูลค่า เช่น เอนไซม์หรือสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นการกำจัดของเสียอีกทางหนึ่งด้วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำเสียบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแห่งหนึ่งในจังหวัดสตูล (รูปที่ 3.1) ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเป็นแบบบ่อปรับเสถียร (บ่อดิน) มีจำนวน 4 บ่อ โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และกรองด้วยผ้าขาวบางก่อนนำมาทดลอง



รูปที่ 3.1 ลักษณะบ่อบำบัดน้ำเสีย (A) และลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (B)

3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีนอล

ใช้จุลินทรีย์เชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 ซึ่งคัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน (นันทธร เภราาช, 2550) และ *Acinetobacter* sp. PK1 คัดแยกจากอาหารที่มีการเจริญเติบโตของ *Methylobacterium* sp. NP3 (ปิยะมาศ คงแถม, 2552) และได้มีการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสมพบว่าสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีกว่าเชื้อบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว (ปิยะมาศ คงแถม, 2552) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว carbon free mineral medium (CFMM) ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารดังต่อไปนี้ (ต่อ 1 ลิตรอาหารเหลว) ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) 3.0 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 2.2 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.8 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ซึ่งได้จากการเตรียม สารละลายความเข้มข้นสูง (Stock Solution) ของ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 กรัมต่อมิลลิลิตร และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 กรัมต่อมิลลิลิตร (ปิยะมาศ คงแถม, 2552) โดยเติมฟีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด (เพาะเลี้ยงแยกกัน) บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหาร

CFMM 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปวัดค่า OD₅₇₈ ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 1.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร นำจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมาผสมในสัดส่วน 1: 1 เพื่อนำไปใช้ตรึงบนชิ้นส่วนวัสดุเศษเหลือปาล์ม น้ำมันต่อไป

3.3 การตรึงแบคทีเรียบนชิ้นส่วนทะเลสาปาล์มเปล่า

เตรียมวัสดุตรึง และทำการตรึงแบคทีเรียเชื่อมผสมตามวิธีการใน อรมาศ สุทธินุ่น และวิชาญ แก้วทิพย์ (2555) ดังรายละเอียดดังนี้

3.3.1 การเตรียมวัสดุตรึงแบคทีเรีย

นำวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่คัดเลือกได้จากการศึกษาที่ผ่านมา คือ ทะเลสาปาล์มเปล่า มาใช้ในการตรึงแบคทีเรียผสมที่เตรียมไว้ โดยนำวัสดุมาตากให้แห้ง หลังจากนั้นนำมาตัด /บด แล้วร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 500 ไมโครเมตรถึง 2 มิลลิเมตรสำหรับการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และเพิ่มขนาดของวัสดุเป็น 1x1x1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้งานในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำมา autoclave ซ้ำอีกสองครั้ง วัสดุที่เตรียมได้ในขั้นตอนนี้จะนำไปใช้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์ต่อไป

3.3.2 การตรึงแบคทีเรียบนชิ้นส่วนทะเลสาปาล์มเปล่า

ใช้วิธีการตรึงแบคทีเรียบนชิ้นส่วนทะเลสาปาล์มเปล่าโดยอาศัยเทคนิคการเกาะติดของเซลล์บนวัสดุด้วยวิธีธรรมชาติ (self- attachment immobilization) ขั้นตอนการตรึงเซลล์อ้างอิงจาก อรมาศ สุทธินุ่น และวิชาญ แก้วทิพย์ (2555) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์บนทะเลสาปาล์มเปล่า ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณการสร้าง exopolysaccharide ของแบคทีเรียบนวัสดุตรึง ทั้งนี้เพื่อให้เกิดการเกาะติดของแบคทีเรียบนวัสดุอย่างดีพอ และเซลล์ไม่หลุดออกจากวัสดุเมื่อมีการนำมาใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่อง ทดสอบ ด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay (ดัดแปลงจาก Vandevivere and Kirchman,1993) พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงแบคทีเรียบนชิ้นส่วนทะเลสาปาล์มเปล่า คือ 6 วัน

3.4 ราไวท์รอตและการเตรียมหัวเชื้อรา

การศึกษานี้ใช้ราไวท์รอตรวมทั้งสิ้นจำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งได้จากห้องปฏิบัติการของหน่วยงานต่าง ๆ จำนวน 6 สายพันธุ์ และได้จากการคัดแยกโดยอนุกุล เกียรติขวัญบุตร จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) *Coriolus versicolor* 2) *Trametes* sp. 3) *Pleurotus ostreatus* 4) *Pycnoporus sanguineus* (ห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)) 5) *Lentinus edodes* 6) *Ganoderma lucidum* (ศูนย์เพาะเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตร) และราไวท์รอตอีก 4 สายพันธุ์ ทำการคัดแยกจากเห็ดตามธรรมชาติที่เจริญบนเนื้อไม้ในท้องถิ่น จ.สงขลา ได้แก่ Unknown 01, Unknown 02, Unknown 03 และ Unknown 04 คัดแยกเชื้อราโดยทำการตัดเนื้อเยื่อเห็ดให้เป็นชิ้นเล็กพอประมาณใช้มีดและคีมคีบ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคีบเนื้อเยื่อเห็ดแช่ใน HgCl₂ 0.05 % เป็นเวลาประมาณ 5 นาทีจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อเห็ดมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลาประมาณ 5 นาที ล้างเนื้อเยื่อเห็ดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการ

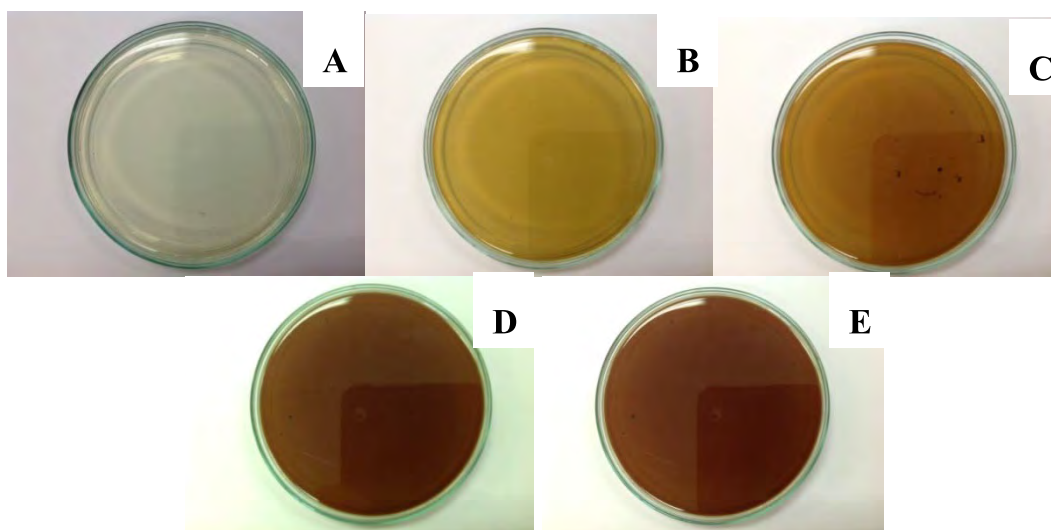
ฆ่าเชื้อแล้ว ทำการตัดเอาเนื้อเยื่อภายในเห็ดด้วยวิธี Aseptic technique ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีกครั้ง วางชิ้นเนื้อเยื่อเห็ดบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วันพร้อมทั้งสังเกตและทำการตัดชิ้นวันที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่ไม่ต้องการออกไป เพื่อให้ได้โคโลนีของราที่บริสุทธิ์ นำเส้นใยของราไวท์รอตทั้ง 10 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งPDA บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยของราไวท์รอตเจริญเต็มผิวหน้าของอาหารแข็งเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

3.5 การศึกษาในระบบกะ

3.5.1 การคัดเลือกราไวท์รอตที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้ราไวท์รอตเซลล์อิสระ

(1) ศึกษาผลความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่มีต่อการเจริญของราไวท์รอตบนอาหารแข็ง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำทิ้งหรือผลของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งและการเติมสับสเตรทร่วมที่มีต่อการเจริญของราไวท์รอตเซลล์อิสระในรูปแบบของราก่อนกลม (fungal pellet) โดยการแปรผันความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่ 25% 50% และ 100% ซึ่งใช้วิธีการเจือจางน้ำทิ้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเติมลงในอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ซึ่งเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบของ Dextrose, Yeast extract และ Peptone (ภาคผนวก ก) เนื่องจากอาหารแข็งSDA เป็นอาหารเลี้ยงราที่ทราบแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แน่นอน รวมทั้งเป็นอาหารแข็งที่มีความใส ไม่มีสี (รูปที่ 3.2A) จึงเลือกใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งทดลองโดยการตัดเส้นใยของราที่เจริญบน PDA ด้วย cork borer เบอร์ 4 (Ø 0.8 cm) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วเลี้ยงบนอาหารแข็ง ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Lakhatar *et al.* (2010) ดังนี้ 1) SDA 2) SDA + 25% POME 3) SDA + 50% POME 4) SDA + 100% POME และ 5) 100% POME (รูปที่ 2.3)ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง และตรวจวัดการเจริญของราไวท์รอต โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารแข็งทุก ๆ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.2 ลักษณะสีของอาหารแข็ง SDA (A), SDA + 25% POME (B), SDA + 50% POME (C), SDA + 100% POME (D) และ 100% POME Agar (E)

(2) ศึกษาความสามารถของราไวท์รอฟในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้ง

เตรียมราไวท์รอฟทั้ง 10 สายพันธุ์ ในรูปแบบราก้อนกลม โดยตัดเส้นใยของราไวท์รอฟที่ถูกเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA ด้วย cork borer เบอร์ 4 ($\varnothing$ 0.8 cm) นำชิ้นส่วนที่ตัดใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Extract Broth (GYEB) ซึ่งมีองค์ประกอบของ Glucose และ Yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บ่มอุณหภูมิห้อง เขย่าที่ 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-7 วัน กรองแยกราก้อนกลมออกจากอาหารเหลว ซึ่งราก้อนกลม 5 กรัม ใส่ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เจือจาง 2 เท่า (50% POME) และผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 80 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สีและสารประกอบฟีนอลิก คัดเลือกราวไวท์รอฟที่มีศักยภาพสูงสุดในการกำจัดสีและประกอบฟีนอลิกเพื่อใช้ในการศึกษาการตรึงเซลล์ต่อไป

3.5.2 การตรึงราไวท์รอฟบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

(1) การเตรียมวัสดุตรึงราไวท์รอฟ

นำวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด ได้แก่ เส้นใยปาล์มน้ำมัน (pericarp fiber: PF) และ ทะลายปาล์มน้ำมัน (empty fruit bunch : EFB) (รูปที่ 3.3) มาใช้ในการตรึงราไวท์รอฟที่คัดเลือกจากข้อ 2.5.2 ได้แก่ Unknown 04 (*Trametes hirsuta* AK4) โดยนำวัสดุมาตากให้แห้ง นำทะลายปาล์มน้ำมันมาตัดให้ได้ขนาดประมาณ 2.5 x 2.5 x 2 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำเส้นใยปาล์มน้ำมันและทะลายปาล์มน้ำมันที่ตัดแล้วมาล้างทำความสะอาด และฆ่าเชื้อแบบเปียก (wet sterilization) โดยการนำวัสดุตรึงใส่ในภาชนะที่มีฝาปิด เติมน้ำให้ท่วมวัสดุ แล้วให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งช่วยกำจัดสิ่งตกค้างอยู่ในวัสดุตรึงให้ชะออกมาในน้ำก่อนนำไปใช้งาน จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำมาผ่านการฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้ง ล้างทำความสะอาดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

จนแห้งวัสดุที่เตรียมได้ในขั้นตอนนี้จะนำไปใช้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์ต่อไป นอกจากนี้วัสดุทั้ง 2 ชนิดถูกนำมาศึกษาคุณลักษณะต่างๆของวัสดุดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติของวัสดุ

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์
Nitrogen	อ้างอิงจาก Attanun and Juncharoensuk (1999)
Phosphorus	อ้างอิงจาก Attanun and Juncharoensuk (1999)
Total Organic Compound (TOC)	TOC analyzer (Solid sample module-SSM-5000A, Shimadzu)/NCE-EHWM, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Scanning electron microscopy (SEM)	WI-RES-SEM-Quanta-001 และ WI-RES-SEM-001 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



รูปที่ 3.3 วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันที่ถูกตัดจนได้ขนาดตามต้องการ (A) ทะลายปาล์มน้ำมัน (EFB) (B) เส้นใยปาล์มน้ำมัน (PF)

(2) การตรึงราไวธอร์ทอบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

เตรียมอาหารเหลว GYEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้เย็น นำทะลายปาล์มเปล่าที่เตรียมไว้ไปชั่งน้ำหนัก ฆ่าเชื้อ แล้วใส่ลงไปในขวดอาหารเหลว 15 กรัมต่อขวด ส่วนเส้นใยปาล์มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะใส่เส้นใยปาล์ม 10 กรัมต่อขวด จากนั้นตัดเส้นใยของราไวธอร์ทที่เจริญบน PDA ด้วย cork borer เบอร์ 4 (Ø 0.8 ซม.) แล้วเขียนเส้นใยของราไวธอร์ทไปวางบนชิ้นส่วนของทะลายปาล์มและเส้นใยปาล์มในขวดอาหารเหลว ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บ่มในสภาวะคงที่ อุณหภูมิห้อง โดยแปรผันระยะเวลาการตรึงที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน เพื่อศึกษาระยะเวลาการตรึงที่เหมาะสมของแต่ละวัสดุ ก่อนนำไปบำบัดน้ำทิ้ง

(3) การคัดเลือกวัสดุตรึงราไวธอร์ท

นำเซลล์ตรึงของราไวธอร์ทบนวัสดุตรึงทั้ง 2 ชนิดจากข้อ 2.6.2 มาเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง และเจือจาง 2 เท่า (50% POME) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวด

รูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที และตั้งไว้ให้เย็น บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในอุณหภูมิห้อง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งทุก ๆ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์สี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics) กิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินไลติกที่เกี่ยวข้องกับการลดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้ง ได้แก่ แลคเคส หรือ p-diphenol oxidase แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส นอกจากนั้นวิเคราะห์ น้ำหนักแห้งก่อนและหลังจากบำบัดน้ำทิ้งของราที่ถูกตรึงร่วมกับวัสดุตรึง นำข้อมูลที่ได้มาคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมกับการตรึงรา ซึ่งสามารถลดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้สูงสุด กำหนดให้มีชุดควบคุมการทดลอง 2 ชุดการทดลอง โดยชุดแรกใช้วัสดุตรึงแต่ละชนิดที่ผ่านการฆ่าเชื้อใส่ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เจือจาง 2 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ส่วนชุดที่ 2 ใช้ราไทรอพท์ที่ตรึงบนวัสดุตรึงแต่ละชนิดเป็นระยะเวลา 10 วัน ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที แล้วใส่น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เจือจาง 2 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการบ่มในสภาวะและเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับชุดทดลองตัวอย่าง วิเคราะห์สีและปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เพื่อศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพ-เคมีต่อการลดลงของสีและสารประกอบฟีนอลิกของวัสดุทั้ง 2 ชนิด เช่น การดูดซับโดยวัสดุตรึงและการดูดซับของวัสดุตรึงร่วมกับเส้นใยของราไทรอพท์ จากนั้นเซลล์ตรึงบนวัสดุที่เหมาะสมจะถูกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป จากผลการศึกษาพบว่าเส้นใยปาล์ม น้ำมันเป็นวัสดุตรึงที่เหมาะสมและระยะเวลาการตรึงที่ 6 วัน สามารถลดสารสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งได้ดีที่สุด จึงเลือกมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.3 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของราไทรอพท์ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

(1) การแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง

นำราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันตามวิธีการในข้อ 2.6.2 มาเติมในน้ำทิ้งที่มีการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 25 %, 50% และ 100% (น้ำทิ้งที่ไม่เจือจาง) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในอุณหภูมิห้องเขย่า 120 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สี สารประกอบฟีนอลิกรวม และ pH

(2) การเติมแหล่งอาหารร่วม

นำราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันตามวิธีการในข้อ 2.6.2 มาเติมน้ำทิ้งปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีการเติมกลูโคส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนร่วม และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม (Gomathi *et al.*, 2012) โดยแบ่งชุดการทดลองดังนี้ 1) POME+กลูโคส 1% w/v 2) POME+แอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v 3) POME+กลูโคส 1% w/v+แอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v บ่มตัวอย่างในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สี สารประกอบฟีนอลิกรวม และ pH เปรียบเทียบกับน้ำทิ้งที่ไม่เติมแหล่งอาหารร่วม

(3) การบำบัดแบบสองขั้นตอน

นำราตรึงบนเส้นใยพอลิเมอร์ตามวิธีการในข้อ 2.6.2 มาเติมน้ำทิ้งปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบนทะเลสาบพอลิเมอร์แล้ว ตามวิธีการของพินดา โต๊ะสุ (2555) โดยแปรผันระยะเวลาการบำบัดขั้นต้นที่ 4, 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง บ่มตัวอย่างในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สี สารประกอบฟีนอลิกรวม และ pH เปรียบเทียบผลการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกและบำบัดสีกับน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้น

(4) การปรับตัวของเซลล์ตรึงตรึง

เตรียมราตรึงบนเส้นใยพอลิเมอร์ตามวิธีการในข้อ 2.6.2 จากนั้นเทอาหารเหลวออกและเติมน้ำทิ้งที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้น 25% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 วัน เทน้ำทิ้งออกและทำซ้ำวิธีการเดิมด้วยการเติมน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 50% และ 100% ตามลำดับ ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สี สารประกอบฟีนอลิกรวมและ pH เปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการปรับตัว

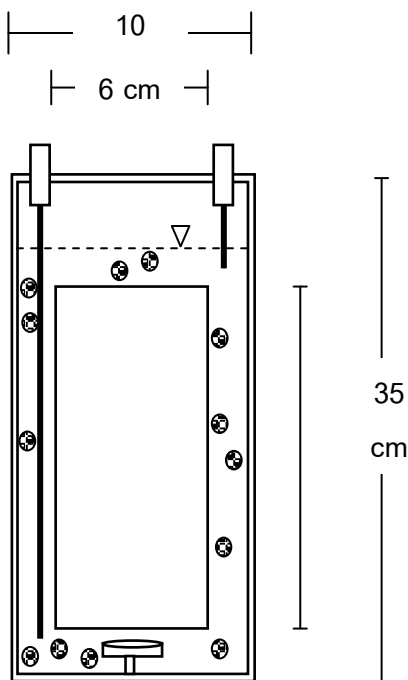
3.5.4 การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

เตรียมราตรึงบนเส้นใยพอลิเมอร์ตามวิธีการในข้อ 3.5.2 จากนั้นเทอาหารเหลวออกและเติมน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมตรึงบนทะเลสาบพอลิเมอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในอุณหภูมิห้องเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 6-8 วัน ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์สี สารประกอบฟีนอลรวม เทน้ำทิ้งออก ศึกษาการใช้ราตรึงซ้ำโดยให้ราตรึงพักตัวเป็นระยะเวลา 3-5 วัน เพื่อให้ราเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จากนั้นตัดราตรึงออกเป็นชิ้นเล็กๆ และดึงราตรึงบางส่วนออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วจึงเติมน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นแล้วเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดอีกครั้ง ทำซ้ำจนราตรึงไม่สามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งได้

3.6 การศึกษาในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่อเนื่อง

3.6.1 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึง

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงในระบบตัวกรองชีวภาพ โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็กชนิด Internal loop airlift ทำด้วยแก้วสูง 35 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ซม. ความจุน้ำ 2.8 ลิตร มีฝาปิดด้านบน โดยฝาปิดมีการเจาะรู เพื่อใช้ต่อสายยางให้น้ำเข้า-น้ำออก และให้อากาศ ใช้ปั๊มที่มีแรงดันเพียงพอกับการให้เซลล์ตรึงเคลื่อนที่ในระบบตัวกรองชีวภาพได้ (รูปที่ 3.4) ก่อนนำเซลล์ตรึงไปใช้ต้องผ่านการกระตุ้นด้วยฟีนอลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แปรผันการบรรจุเซลล์ตรึงปริมาณ 60, 90 และ 110 กรัมต่อน้ำทิ้ง 1.5 ลิตร และระยะเวลากักเก็บน้ำ (Hydraulic retention time : HRT) 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ กัน วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความเข้มข้นที่เหลืออยู่ เพื่อคัดเลือกปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสม แล้วนำมาแปรผันระยะเวลากักเก็บน้ำเพื่อเปรียบเทียบที่ 12 และ 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาระยะเวลากักเก็บน้ำที่เหมาะสม



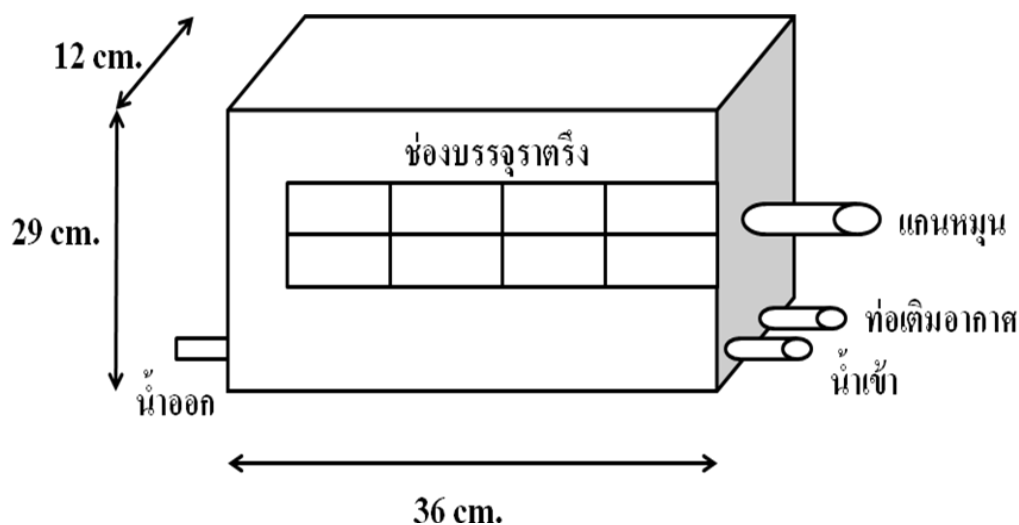
รูปที่ 3.4 รูปแบบของระบบตัวกรองชีวภาพแบบ internal loop airlift

3.6.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกและกำจัดสีของราไทรอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลของราตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการป้อนน้ำทิ้งอย่างต่อเนื่อง โดยเตรียมราไทรอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันตามวิธีการในข้อ 3.5.2 (2) ซึ่งเปลี่ยนสถานะจากขูดรูปชมพูขนาด 500 มิลลิกรัม เป็นก้อนพลาสติกขนาด 8x10x4 ซม. ดังแสดงในรูปที่ 3.5 เป็นระยะเวลา 6 วัน จึงย้ายราตรึงมาใส่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 36x29x12 ซม. ซึ่งทำด้วยสแตนเลสและแก้ว ซึ่งภายในมีช่องสำหรับบรรจุราตรึง และมีท่อเข้า-ออก รวมถึงระบบการกระจายอากาศภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ดังแสดงในรูปที่ 3.6 ทำการปล่อยน้ำทิ้งซึ่งผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียตรึงแล้ว ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยใช้ระยะเวลาพักเก็บน้ำที่ 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ กัน วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล และความเข้มข้นที่เหลืออยู่



รูปที่ 3.5 การเตรียมราไทรอทตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันในกล่องพลาสติก



รูปที่ 3.6 รูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้บรรจุราตรึงบนเส้นใยพาล์มน้ำมัน

3.6.3 การศึกษาประสิทธิภาพการนำราตรึงกลับมาใช้ซ้ำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ตรึงราไวท์รอตและบรรจุในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2 ปล่อยน้ำทิ้งซึ่งผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียตรึง และเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้น 25% ปริมาตร 1.5 ลิตร เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้ระยะเวลาพักเก็บน้ำที่ 96 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7-9 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความเข้มข้นที่เหลืออยู่ จากนั้นปล่อยน้ำทิ้งออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพและปล่อยให้ราตรึงพักตัวเป็นระยะเวลา 2 วัน พร้อมสเปรย์น้ำเพื่อให้ความชื้นแก่ราตรึง ปล่อยน้ำทิ้งซึ่งผ่านการบำบัดขั้นต้น และเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้น 50% ควบคุมสถานะและเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับข้างต้น แล้วจึงทำซ้ำวิธีการเดียวกับข้างต้นโดยใช้น้ำที่ ผ่านการบำบัดขั้นต้น และมีความเข้มข้น 100% (ไม่เจือจาง)

3.7 วิธีการวิเคราะห์

3.7.1 วิเคราะห์ลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันพาล์ม

ตัวอย่างน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันพาล์มถูกนำมาวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้งด้วยวิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสียใน Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2005) ตามพารามิเตอร์ ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 วิธีวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์
Temperature (°C)	Thermometer
pH	pH meter
BOD ₅ (mg/L)	Azide modification method
COD (mg/L)	Closed reflux titration
DO (mg/L)	Azide modification method
TP (mg/L)	Persulfate digestion/ Ascorbic Acid Method
TKN (mg/L)	Macro Kjeldahl Method
TSS (mg/L)	Dried at 103-105 °C
Oil & Grease (mg/L)	Partition – Gravimetric Method

3.7.2 การศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุตรึง และราตรึง โดย SEM

ในการศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ทำโดยนำชิ้นส่วนเศษเหลือปาล์มน้ำมันมาติดบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) แล้วนำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่อง sputter coater และส่องดูด้วยด้วยเครื่อง SEM (Scanning Electron Microscope) สำหรับการศึกษาลักษณะราที่ถูตรึง (ก่อน และหลังทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดปาล์มน้ำมัน) ต้องเตรียมตัวอย่างก่อนฉาบทองเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างด้วย 2.5% glutaraldehyde (C₅H₈O₂) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หรือ 4% formaldehyde เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง นำตัวอย่างมา Fix ครั้งที่ 2 ด้วย 1% OsO₄ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ขจัดน้ำออกด้วยเอทานอลเป็นเวลา 10 นาที นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying (การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้ดำเนินการโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

3.7.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก

เอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก (ligninolytic enzyme) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายลิกนิน ประกอบด้วยเอนไซม์ประเภทเปอร์ออกซิเดส (peroxidases) และออกซิเดส (oxidases) หลายชนิด เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidases) แลคเคส (laccases หรือ p-diphenol oxidase) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidases) ราไวท์รอตแต่ละสายพันธุ์จะสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน (Leonowicz *et al.*, 1999) การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์สามารถทำได้ดังนี้

1) การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของ laccase (Lac) หรือ p-diphenol oxidase (ดัดแปลงจาก Rodriguez, 1999) โดยเติมสารเคมีดังต่อไปนี้ลงใน cuvette

- H ₂ O	1000 µl
- 0.2 mM ABTS	500 µl (เตรียม 1 mM)
- 20 mM NaOAc buffer pH 5	500 µl (เตรียม 0.1 M)

จากนั้นใช้ Micropipette ตูด crude enzyme 500 μl ใส่ลงใน cuvette ผสมให้เข้ากันโดยกลับ cuvette ไปมา 2-3 ครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 436 nm ทันที โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 0 และ 60 วินาที แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดย 1 Unit ของ laccase คือ ปริมาณเอนไซม์ laccase ที่ใช้ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น (ABTS) 1 μM ภายในเวลา 1 นาที

2) การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของ manganese peroxidase (MnP) (ดัดแปลงจาก Heinfling, 1998) โดยเติมสารเคมีดังต่อไปนี้ลงใน cuvette

- H_2O	750 μl
- 1 mM 2, 6-dimethoxyphenol	500 μl (เตรียม 5 mM)
- 0.1 M NaOAc buffer pH 4.5	250 μl (เตรียม 1 M)
- 0.1 mM H_2O_2	250 μl (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
- 1 mM MnSO_4	250 μl

จากนั้นใช้ micropipette ตูด crude enzyme 500 μl ใส่ลงใน cuvette ผสมให้เข้ากันโดยกลับ cuvette ไปมา 2-3 ครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 469 nm ทันที โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 0 วินาที และ 60 วินาที แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดย 1 Unit ของ manganese peroxidase คือ ปริมาณเอนไซม์ manganese peroxidase ที่ใช้ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น (2,6-dimethoxyphenol) 1 μM ภายในเวลา 1 นาที

3) การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของ lignin peroxidase (ดัดแปลงจาก Levin *et al.*, 2005) โดยเติมสารเคมีดังต่อไปนี้ลงใน cuvette

- H_2O	750 μl
- 10 mM veratryl alcohol	500 μl
- 0.25 M d-tartaric acid pH 2.5	500 μl
- 4 mM MnSO_4	250 μl

จากนั้นใช้ micropipette ตูด crude enzyme 500 μl ใส่ลงใน cuvette ผสมให้เข้ากันโดยกลับ cuvette ไปมา 2-3 ครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 nm ทันที โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 0 วินาที และ 60 วินาที แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดย 1 Unit ของ lignin peroxidase คือ ปริมาณเอนไซม์ lignin peroxidase ที่ใช้ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น (veratryl alcohol) 1 μM ภายในเวลา 1 นาที

การคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic ตามสูตรดังนี้

$$\text{Enzyme activity} = \frac{(\Delta \text{ Abs/min}) \times \text{total volume (2.5 ml)} \times 10^6}{\epsilon \times \text{sample volume (0.5 ml)}}$$

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

ϵ คือ Extinction co-efficient

- Lac	=	29,300	$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- MnP	=	27,500	$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$$- \text{LiP} = 9,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

3.7.4 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของราร่วมกับวัสดุตรึง

วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของวัสดุตรึงและรา (ดัดแปลงจาก AOAC, 1995) โดยอบถ้วยฟรอยด์ที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ข้ามคั้นจนน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งน้ำหนักของถ้วยฟรอยด์ นำราที่ตรึงบนวัสดุตรึงทั้งสองชนิดใส่ลงในถ้วยฟรอยด์ นำไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ข้ามคั้นจนน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง นำน้ำหนักวัสดุตรึงและราที่ได้มาหาส่วนต่างระหว่างน้ำหนักของวัสดุตรึงและราก่อนอบและหลังอบ ซึ่งจะได้เป็นปริมาณน้ำหนักแห้งของวัสดุตรึงและราทั้งหมด

3.7.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดใช้วิธี Modification of the Folin-Ciocalteu method (Ergul *et al.*, 2011) โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที เพื่อกำจัดตะกอน ทำการเจือจาง 5 เท่าด้วยน้ำกลั่น เติมตัวอย่างน้ำทิ้งที่เจือจางแล้ว 200 ไมโครลิตร ลงใน Folin-Ciocalteu phenol reagents ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ที่ความเข้มข้น 0- 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) ใช้ น้ำกลั่นที่ทำปฏิกิริยา Folin-Ciocalteu phenol reagents และสารละลาย sodium carbonate เช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank

3.7.6 การวิเคราะห์สีน้ำทิ้ง (APHA, AWWA and WEF, 2005)

การวิเคราะห์สีของตัวอย่างน้ำทิ้งสามารถทำได้โดยการนำตัวอย่างน้ำทิ้งมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 7 นาที เพื่อกำจัดตะกอน จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างน้ำทิ้ง 20 เท่าด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น Blank และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแพลตตินัมโคบอลต์ในช่วง 0-500 หน่วยสี (ภาคผนวก ข) เพื่อคำนวณเป็นหน่วยสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

บทที่ 4 ผลการวิจัย

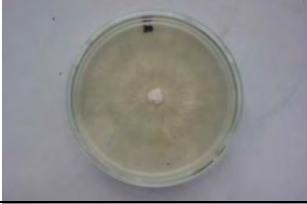
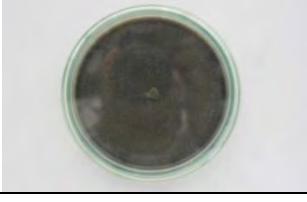
4.1 ลักษณะทางกายภาพของราไทรอ

ในงานวิจัยนี้ใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มราไทรอ 10 สายพันธุ์ ซึ่งมาจากการคัดแยกจากเห็ดตามธรรมชาติในพื้นที่จังหวัดสงขลา โดยผู้วิจัยคัดแยกด้วยตนเองจำนวน 4 สายพันธุ์ ให้รหัสเป็น Unknown 01, Unknown 02, Unknown 03 และ Unknown 04 ส่วนราไทรออีก 6 สายพันธุ์เป็นราไทรอที่มีรายงานถึงประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกและสีของน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอกซึ่งมีคุณลักษณะใกล้เคียงกับน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้แก่ *Coriolus versicolor*, *Trametes* sp., *Pleurotus ostreatus* และ *Pycnoporus sanguineus* ได้รับจากห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ส่วนราไทรออีก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lentinus edodes* และ *Ganoderma lucidum* ได้รับจากศูนย์เพาะเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตร โดยราไทรอทั้ง 10 สายพันธุ์ มีลักษณะของโคโลนีและเส้นใยที่แตกต่างกันดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของราไทรอจำนวน 10 สายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ราไทรอ	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Unknown 01	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยบาง พู สีขาว ใต้โคโลนีมีสีส้ม ขอบโคโลนีกลม	
Unknown 02	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ไม่ฟู สีขาว โคโลนีเรียบติดผิวหน้าอาหารแข็ง	
Unknown 03	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา สีขาว พู ขอบโคโลนีกลม	

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของราไทรอทจำนวน 10 สายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (ต่อ)

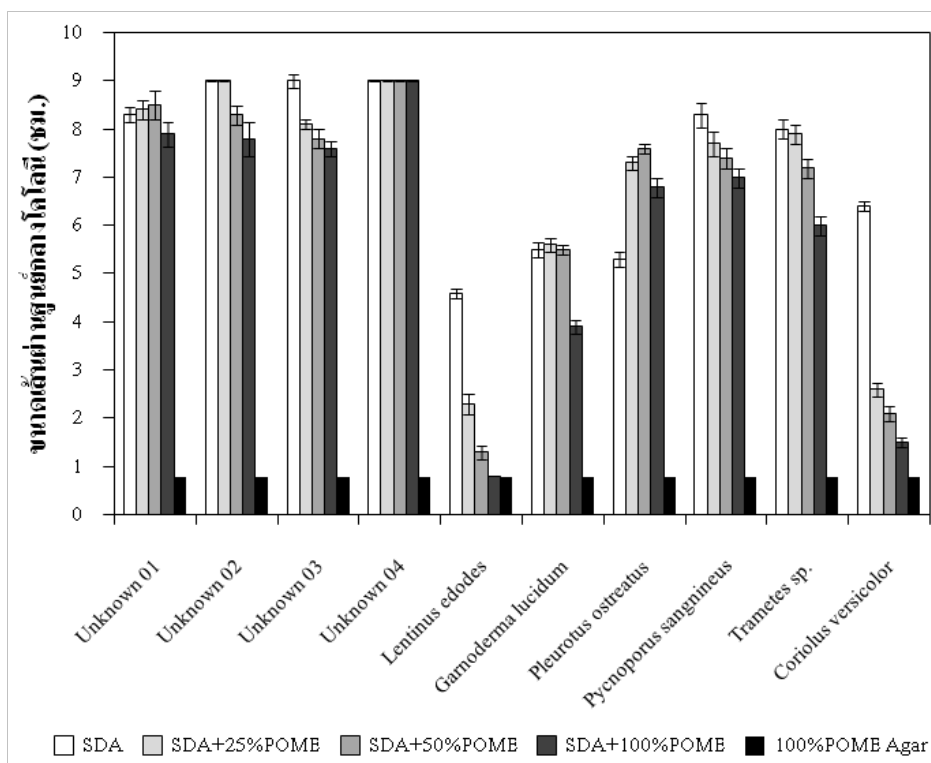
ราไทรอท	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Unknown 04	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา สีขาว ฟู ขอบโคโลนีกลม	
<i>Lentinus edodes</i>	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยบาง ฟู สีขาว ขอบโคโลนีกลม	
<i>Ganoderma lucidum</i>	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ไม่ฟู สีขาว โคโลนีเรียบติดผิวหน้า อาหารแข็ง	
<i>Pleurotus ostretus</i>	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ฟู สี ขาว ขอบโคโลนีไม่กลม	
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ไม่ฟู สีขาว ใต้โคโลนีมีสีน้ำตาลเข้ม ขอบโคโลนีเรียบ	
<i>Trametes</i> sp.	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ไม่ ฟู สีขาว โคโลนีเรียบติดผิวหน้า อาหารแข็ง	
<i>Coriolus versicolor</i>	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยหนา ไม่ฟู สีดำ ขอบโคโลนีกลม	

เมื่อนำราไทรอธทั้ง 10 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง และวัดอัตราการเจริญจากขนาดของโคโลนีพบว่าราไทรอธสายพันธุ์ Unknown 01, Unknown 03, Unknown 04 และ *Pycnoporus sanguineus* เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญสูงสุด โดยใช้ระยะเวลา 6 วันในการเจริญเต็มผิวหน้าอาหารแข็งบนจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร และนอกจากนี้ยังพบว่า ราไทรอธสายพันธุ์ *Ganoderma lucidum* เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับราไทรอธอีก 9 สายพันธุ์ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพียง 5 เซนติเมตร เมื่อบ่มไว้เป็นระยะเวลา 9 วัน ราไทรอธทั้ง 10 สายพันธุ์ถูกนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.2 การคัดเลือกราไทรอธที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

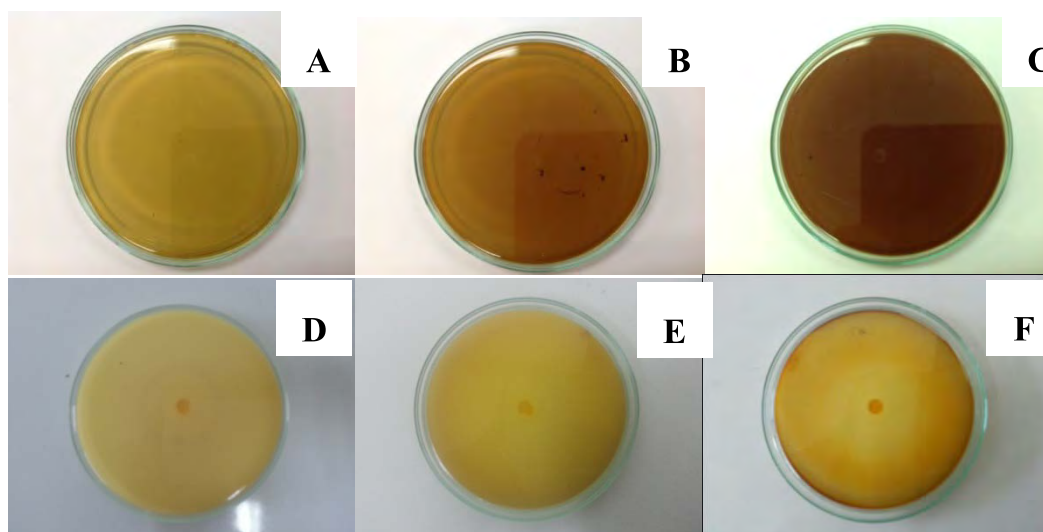
4.2.1 ผลความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่มีต่อการเจริญของราไทรอธบนอาหารแข็ง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำทิ้งหรือผลของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งและการเติมสับสเตรทร่วมที่มีต่อการเจริญของราไทรอธเซลล์อิสระในรูปแบบของราก่อนกลม (Fungal pellet) เนื่องจากการใช้เพียงน้ำทิ้งผสมกับวุ้นที่ใช้เตรียมอาหารแข็งไม่สามารถเป็นแหล่งคาร์บอนให้ราไทรอธทุกชนิดเจริญได้ การทดลองนี้จึงศึกษาการเจริญของราไทรอธบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ซึ่งเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบของ Dextrose, Yeast extract และ Peptone (ภาคผนวก ก) และมีการผสมน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 25%, 50% และ 100% เพื่อศึกษาความทนทานของราไทรอธต่อสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในน้ำทิ้ง โดยวัดอัตราการเจริญของเส้นใยราบนอาหารแข็ง พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มส่งผลต่ออัตราการเจริญของราไทรอธบางสายพันธุ์ ได้แก่ Unknown 02, Unknown 03, *Lentinus edodes*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes* sp. และ *Coriolus versicolor* โดยระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่สูงขึ้นจะทำให้อัตราการเจริญของราไทรอธสายพันธุ์ดังกล่าวลดลง ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และที่ความเข้มข้นสูงสุดพบว่าราไทรอธสายพันธุ์ *Lentinus edodes* ไม่สามารถเจริญบนอาหารแข็งได้ แต่สามารถเจริญได้ในอาหารแข็งที่มีความเข้มข้นของน้ำทิ้ง 25% และ 50% ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของโสภารวรรณ รัตนพันธุ์ (2547) ที่เลี้ยงราไทรอธ *Lentinus* sp. บนอาหารแข็งที่เติมน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าความเข้มข้นของน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ที่สูงขึ้นจะยังยั้งการเจริญของราไทรอธ *Lentinus* sp. เนื่องจากปริมาณสารยับยั้งที่มีในน้ำทิ้ง ได้แก่ สารประกอบอะโรมาติกในกลุ่มของโมโนฟีนอล สารประกอบฟีนอลิก ชนิดอื่น ๆ รวมถึงลิกนิน และแทนนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในผลปาล์มน้ำมัน และยังมีรายงานพบองค์ประกอบเหล่านี้ในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของราไทรอธด้วยเช่นกัน (Annibale et al., 1999; Fadil et al., 2003; Dias et al., 2004) ในขณะที่ราไทรอธสายพันธุ์ Unknown 01 *Ganoderma lucidum* และ *Pleurotus ostretus* สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็งที่เติมน้ำทิ้งความเข้มข้น 25% และ 50% ได้ใกล้เคียงกับอาหารแข็งที่ไม่เติมน้ำทิ้ง (ในกรณี *Pleurotus ostretus* เจริญได้ดีกว่าไม่เติมน้ำทิ้ง) โดยที่ *Ganoderma lucidum* และ *Pleurotus ostretus* มีอัตราการเจริญช้ากว่า Unknown 01 อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำทิ้งเป็น 100% ส่งผลให้อัตราการเจริญลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำทิ้งสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารร่วมให้ราไทรอธเจริญได้ แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำทิ้งสูงขึ้นทำให้สารยับยั้งบางชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสียมีความเข้มข้นสูงตามไปด้วย จึงมีผลยับยั้งการเจริญของราไทรอธบางสายพันธุ์ได้



รูปที่ 4.1 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราไทรอท 10 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง SDA, SDA+25%POME, SDA+50%POME, SDA+100%POME และ 100%POME agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

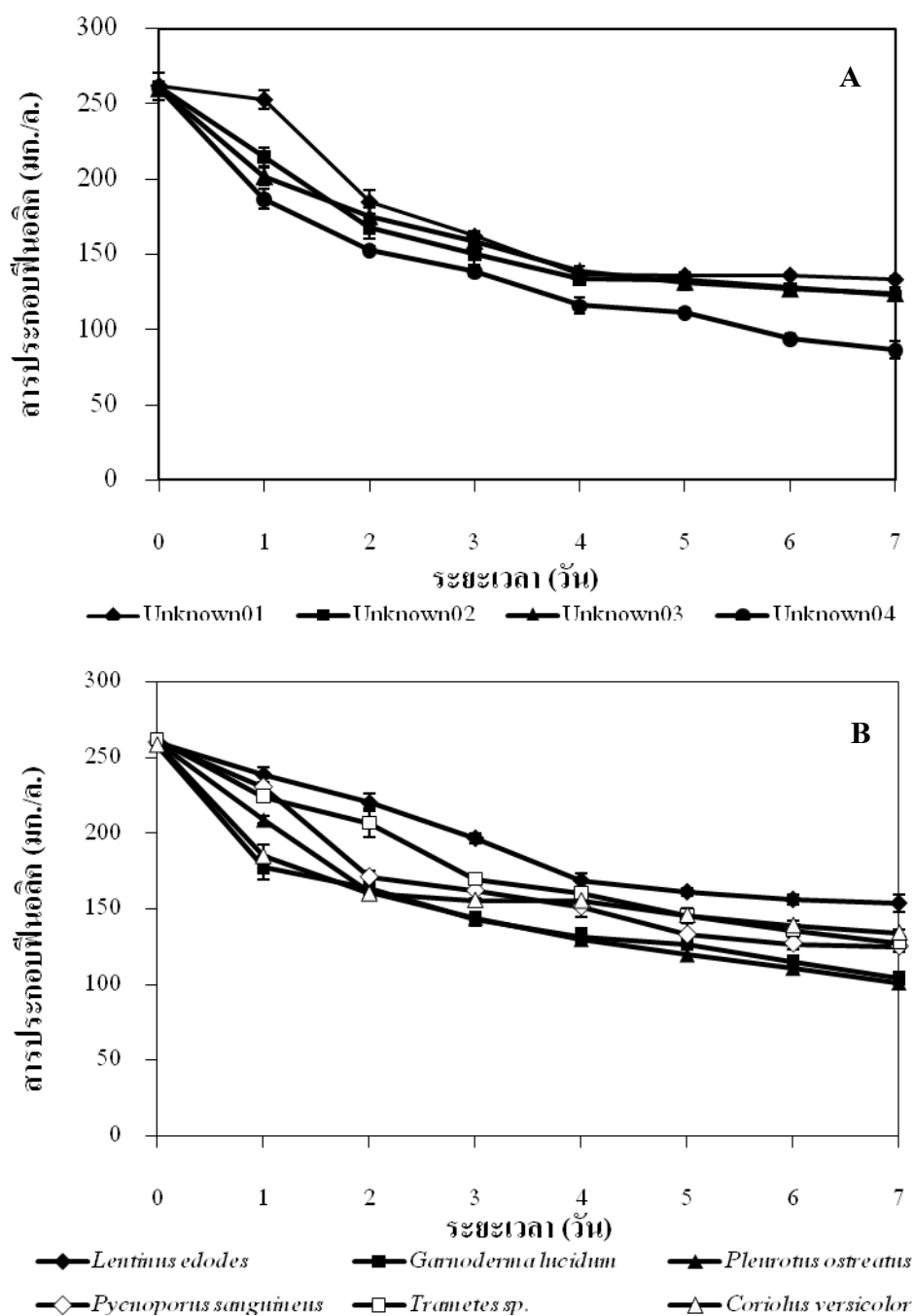
อย่างไรก็ตามราไทรอทสายพันธุ์ Unknown 04 เป็นเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถเจริญเต็มผิวหน้าของอาหารแข็ง SDA ที่มีการเติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทุกความเข้มข้น แสดงให้เห็นว่าราไทรอทสายพันธุ์ดังกล่าวมีความทนทานต่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่มีในน้ำทิ้ง และไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของราไทรอทสายพันธุ์นี้ และเมื่อสังเกตสีของอาหารแข็งที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังจากเลี้ยงราไทรอทสายพันธุ์ Unknown 04 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าราไทรอทสายพันธุ์ดังกล่าวเจริญเต็มผิวหน้าของอาหารแข็งและยังพบว่าสีของอาหารแข็งมีความเข้มของสีลดลงโดยเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเข้มเป็นสีน้ำตาลอ่อนในทุกความเข้มข้นของน้ำทิ้งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมซึ่งเป็นอาหารแข็งที่เติมน้ำทิ้งทุกระดับความเข้มข้นแต่ไม่เติมหัวเชื้อของราไทรอท ดังแสดงในรูปที่ 3.2 การเปลี่ยนแปลงของสีเป็นตัวบ่งชี้ถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ที่ราไทรอทสร้างขึ้นเพื่อย่อยสลายสารสีต่าง ๆ ตลอดการเจริญเติบโตของเส้นใยจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงผลของสารประกอบฟีนอลิกที่มีต่อการเจริญของราไทรอทและการลดลงของสีในน้ำทิ้งที่เติมลงไปในการอาหารแข็ง แต่ไม่สามารถแสดงถึงการลดลงของสารประกอบ ฟีนอลิกในอาหารแข็งได้ จึงต้องมีการทดสอบศักยภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้ง เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกเพื่อนำไปใช้ในการตรึงเซลล์ต่อไป



รูปที่ 4.2 อาหารแข็งSDA ที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 25% (A), 50% (B) และ100% (C) และการเจริญของราไทรอร์ทสายพันธุ์Unknown 04 บนอาหารแข็งSDA ที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 25% (D), 50% (E) และ100% (F) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน

4.2.2 ศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งของราไทรอร์ท

จากการศึกษาในอาหารแข็ง SDA ที่เติมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ทำให้ทราบอัตราการเจริญและความความหนาของราแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำทิ้งหรือสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามวิธีการข้างต้นยังไม่สามารถใช้คัดเลือกราไทรอร์ทที่มีศักยภาพสูงสุดในการลดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งได้เนื่องจากข้อจำกัดของการวิเคราะห์สีและสารประกอบฟีนอลิกที่ลดลงในตัวกลางที่เป็นของแข็ง จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาในน้ำทิ้งเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ผลการคัดเลือกที่ถูกต้องแม่นยำที่สุด โดยทำการเลี้ยงราไทรอร์ทเซลล์อิสระในรูปแบบวุ้นก้อนกลม (fungal pellet) ทั้ง 10 สายพันธุ์ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีการเจือจาง 2 เท่า (50%POME) เพื่อลดความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอลิกที่อาจมีผลยับยั้งการเจริญของราไทรอร์ทเซลล์อิสระ (Alaoui *et al.*, 2008) ผลการทดลองพบว่าราไทรอร์ททั้ง 10 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้ง โดยสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้จากความเข้มข้น 266 มก. /ล. เหลือเพียง 86 -153 มก. /ล. คิดเป็น 48.1-66.5% ในระยะเวลา 7 วันของการบ่มในอุณหภูมิห้อง และมีการเขย่า 80 รอบต่อนาที (รูปที่ 4.3A และB)

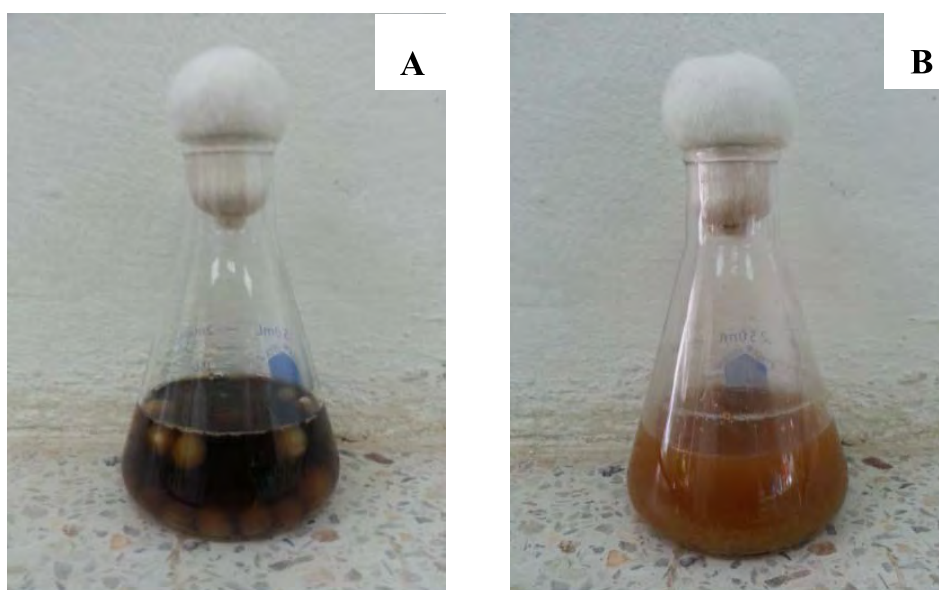


รูปที่ 4.3 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์ รอท 10 สายพันธุ์ ที่บ่มในอุณหภูมิห้อง เช้า 80 รอบต่อนาที (A) Unknown 01, Unknown 02, Unknown 03 และ Unknown 04 (B) *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostretus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes sp.* และ *Coriolus versicolor*

สำหรับประสิทธิภาพในการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าราไวท์รอท 9สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีออกจาก 50%POME โดยสามารถลดสีได้จาก 9,333 หน่วยสี เหลือ 3,266-8,900 หน่วยสี คิดเป็น 3.1-64.7% ในระยะเวลา 7 วันของการบ่ม ดังแสดงในรูปที่ 4.4A และ B ยกเว้นราไวท์รอท

รูปที่ 4.4 การกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอต 10 สายพันธุ์ ที่บ่มใน อุณหภูมิห้อง เชย้า 120 รอบต่อนาที (A) Unknown 01, Unknown 02, Unknown 03 และ Unknown 04 (B) *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostretus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes* sp. และ *Coriolus versicolor*

ตัวอย่างลักษณะสีของน้ำทิ้งก่อนและหลังจากการบำบัดด้วยราไวท์รอตสายพันธุ์ Unknown 04 เป็น ระยะเวลา 7 วัน ซึ่งสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีในน้ำทิ้งได้อย่างชัดเจน โดยเริ่มต้นการทดลองสีของน้ำ ทิ้งความเข้มข้น 50% ยังมีสีน้ำตาลคล้ำ แต่เมื่อบำบัดด้วยราไวท์รอตในรูปแบบของราก่อนกลม สีของน้ำทิ้งจะ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน (รูปที่ 4.5 A และ B) เนื่องจากราไวท์รอตมีการสร้างเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยสลายสาร ที่ทำให้เกิดสีในน้ำทิ้งเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต และสีบางส่วนถูกดูดซับไว้ในเส้นใยของราไวท์ รอตจึงทำให้สีของน้ำทิ้งเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม อย่างไรก็ตามเนื่องจากราก่อนกลมมีการดูดซับสีไว้บางส่วน และเมื่อเลี้ยงราก่อนกลมในน้ำทิ้งระยะหนึ่งเซลล์จะมีการแตกตัว ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้ง จึงเป็นข้อจำกัดของการที่จะนำราไวท์รอตในรูปแบบราก่อนกลมไปใช้ในระบบบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานสกัด น้ำมันปาล์ม



รูปที่ 4.5 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งเมื่อเติมราก่อนกลม สายพันธุ์ Unknown 04 ในน้ำทิ้งความ เข้มข้น 50% ในวันที่ 0 (A) และวันที่ 7 (B) ของการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เชย้า 80 รอบต่อนาที

เมื่อนำค่าการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกและสีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัด ด้วยราก่อนกลมทั้ง 10 สายพันธุ์ เป็นระยะเวลา 7 วันมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟิ นอลิก พบว่าราไวท์รอตสายพันธุ์ Unknown 04 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัด สารประกอบฟีนอลิกและสีในน้ำทิ้งความเข้มข้น 50% ถึง 66.5% และ 64.7% ตามลำดับ เมื่อนำมา เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกของราอีก 9 สายพันธุ์และวิเคราะห์ทาง สถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 5.2 ซึ่ง

ผลการทดลองการคัดเลือกราไทรอทที่มีศักยภาพในการกำจัดและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ทั้งในแบบอาหารแข็งและในน้ำทิ้ง พบว่าราไทรอทสายพันธุ์ Unknown 04 เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วกว่าสายพันธุ์อื่น มีความทนทานต่อความเข้มข้นฟีนอลิกสูงกว่าสายพันธุ์อื่น และยังมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากผลการวิเคราะห์ระบุเอกลักษณ์ของราไทรอทสายพันธุ์ Unknown 04 ด้วยวิธีทางด้านชีววิทยาโมเลกุล (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Trametes hirsuta* ถึง 99% (ภาคผนวก ค) จึงระบุสายพันธุ์ของราไทรอทสายพันธุ์ Unknown 04 เป็น *Trametes hirsuta* AK4 ราสายพันธุ์ดังกล่าวจึงถูกคัดเลือกไปใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งนำเทคนิคการตรึงเซลล์มาประยุกต์ใช้เพื่อให้ราไทรอทมีความทนทานต่อสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งและใช้งานได้นานขึ้น

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพการกำจัดและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% โดยราไทรอทในรูปแบบก้อนกลม 10 สายพันธุ์ ที่ระยะเวลา 8 วัน

ราไทรอท	การลดลงของสารประกอบ	การลดลงของสี	
		ฟีนอลิก (%)	(%)
Unknown 01		48.8±2.4 ^d	16.1±3.5 ^d
Unknown 02		53.2±2.1 ^c	3.1±4.5 ^e
Unknown 03		52.4±1.7 ^c	28.2±4.2 ^c
Unknown 04		66.5±1.5 ^a	64.7±4.7 ^a
<i>Lentinus edodes</i>		40.8±2.2 ^e	28.5±5.5 ^c
<i>Ganoderma lucidum</i>		59.4±1.4 ^b	40.4±3.6 ^b
<i>Pleurotus ostretus</i>		61.6±0.7 ^b	36.9±5.1 ^b
<i>Pycnoporus sanguineus</i>		51.8±1.8 ^c	22.9±5.6 ^{c, d}
<i>Trametes</i> sp.		51.3±0.5 ^{c, d}	32.4±3.2 ^c
<i>Coriolus versicolor</i>		48.1±1.1 ^d	0.0±0.0 ^e

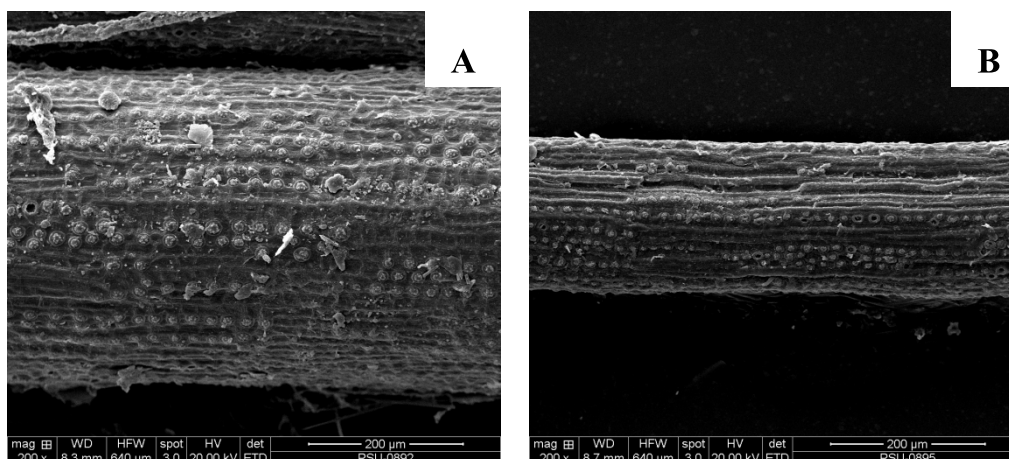
หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.3 การตรึงราไทรอทบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

4.3.1 คุณสมบัติของวัสดุตรึง

การทดลองนี้ใช้วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า (empty fruit bunch: EFB) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (pericarp fiber: PF) ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม การใช้วัสดุตรึงเซลล์ดังกล่าว เป็นทางเลือกหนึ่งในการนำของเสียมาใช้ประโยชน์ และยังเป็นทางเลือกของเสียอีกทางหนึ่งด้วย นอกจากนี้ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อ หรือ

สังเคราะห์วัสดุตรงเซลล์ที่มีราคาแพง รวมทั้งมีวิธีการเตรียมวัสดุ และขั้นตอนการตรึงเซลล์ที่ไม่ยุ่งยาก จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุทั้ง 2 ชนิด โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงให้เห็นดังรูปที่ 4.6 พบว่าลักษณะพื้นผิวของวัสดุทั้งสองชนิดประกอบด้วยโครงสร้างซับซ้อน พื้นผิวก่อนข้างขรุขระ



รูปที่ 4.6 ลักษณะพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันส่องโดย SEM กำลังขยาย 200x; ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (A) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (B)

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ -เคมีของวัสดุดังกล่าว (ตารางที่ 4.3) พบว่าวัสดุ EFB มีปริมาณสารอาหารไนโตรเจน (0.90%) และฟอสฟอรัส (0.11%) มากกว่า PF เล็กน้อย (0.63% และ 0.04% ตามลำดับ) โดยวัสดุทั้งสองมีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมทั้งหมดใกล้เคียงกัน คือ 36.21% ใน EFB และ 39.58% ใน PF และจากการศึกษาของพินดา โต๊ะสูง (2555) พบว่าวัสดุทั้ง 2 ชนิด มีคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนเฉลี่ย (Average pore diameter) และพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area) ใกล้เคียงกัน นั่นคือ มีค่าประมาณ 4.24 (EFB) และ 5.01 (PF) nm และ 4.17 (EFB) และ 5.45 (PF) $m^2 g^{-1}$ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 องค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

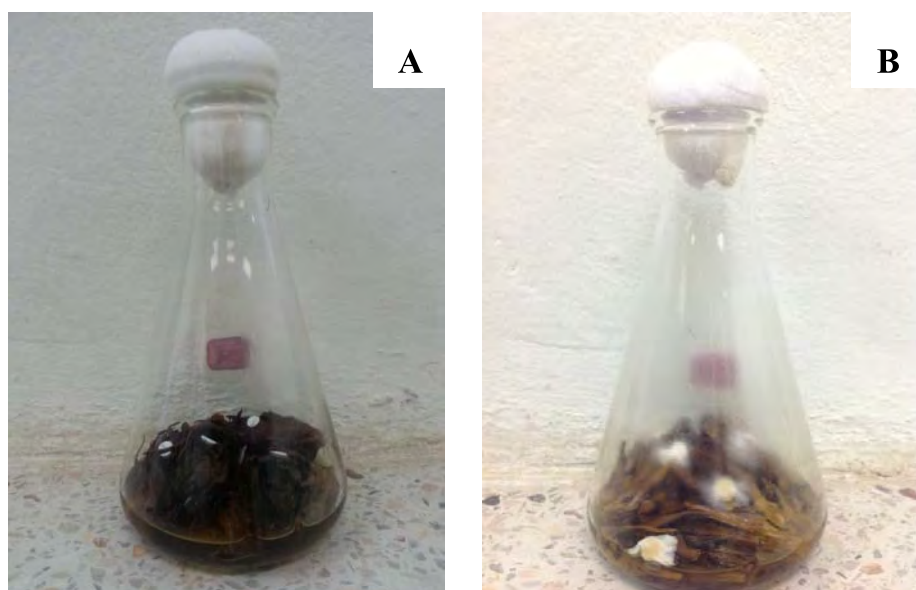
องค์ประกอบ	วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน	
	ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน (EFB)	เส้นใยปาล์มน้ำมัน (PF)
Nitrogen (%)	0.90	0.63
Phosphorus (%)	0.11	0.04
TOC (%)	36.21	39.58

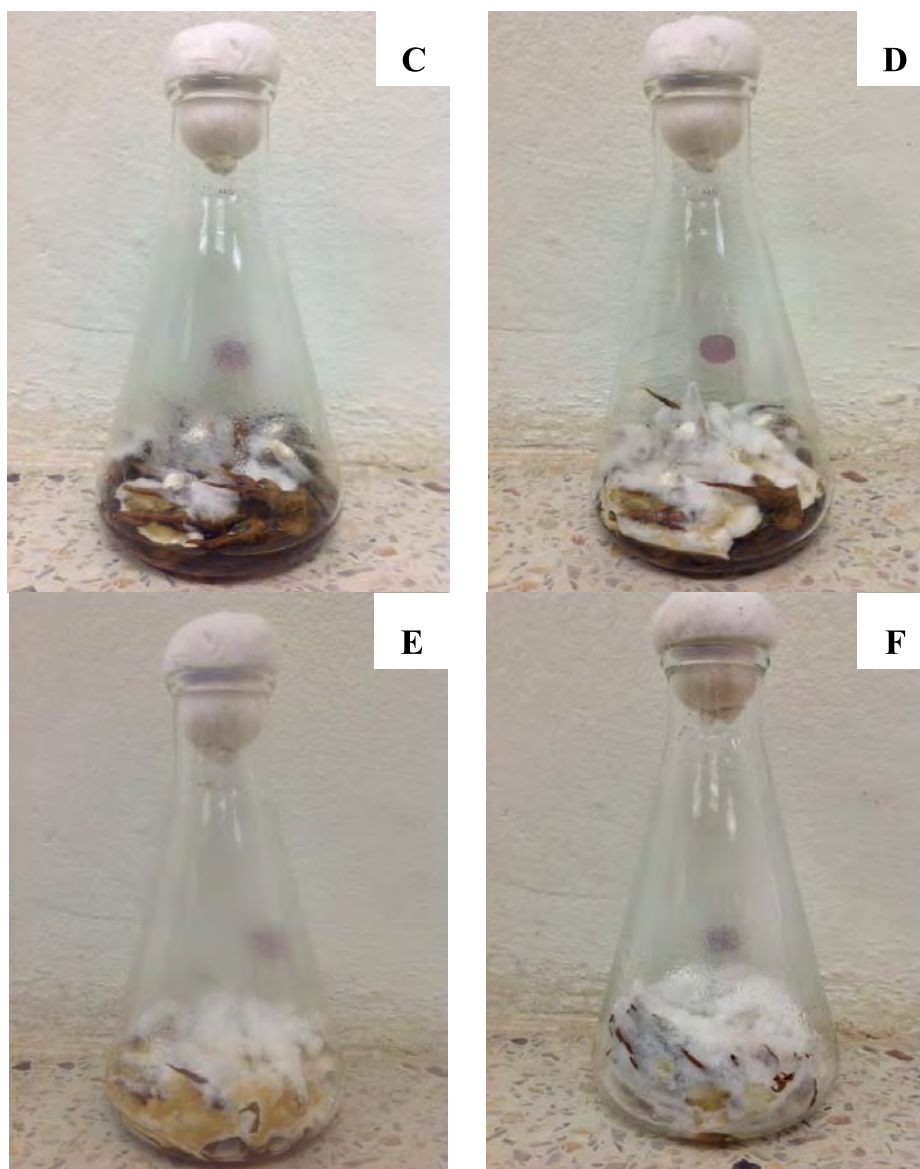
วัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันทั้ง 2 ชนิด ยังมีสารจำพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งจะมีสัดส่วนที่แตกต่างกันตามชนิดของพืช (Ahmed *et al.*, 2001) จากการศึกษาของ Khalil, *et al.* (2007) พบว่าในทะลายปาล์มเปล่ามีองค์ประกอบ

ของเซลลูโลส 49.6% เฮมิเซลลูโลส 18% และลิกนิน 21.2% และการศึกษาของ วีรยุทธ์ จวนซ้าย (2554) ทำการศึกษาองค์ประกอบของเส้นใยปาล์มน้ำมันพบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลส 28.91% เฮมิเซลลูโลส 21.56% และลิกนิน 23.63% นอกจากนี้ในการศึกษาของ Han and May (2012) พบว่าในทะลายปาล์มเปล่า มีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกประมาณ 6-7 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยที่ทะลายปาล์มเปล่าที่แห้งจะมี สารประกอบฟีนอลิกที่สูงกว่าทะลายปาล์มเปล่าสด ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะเป็นแหล่งอาหารให้ราไวทรอทใช้ในการเจริญเติบโต และยังมีคุณสมบัติเป็นสารเหนียวสำหรับการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติกให้สูงขึ้น (Xavier, 2001)

4.3.2 การตรึงราไวทรอทบนทะลายปาล์มเปล่า

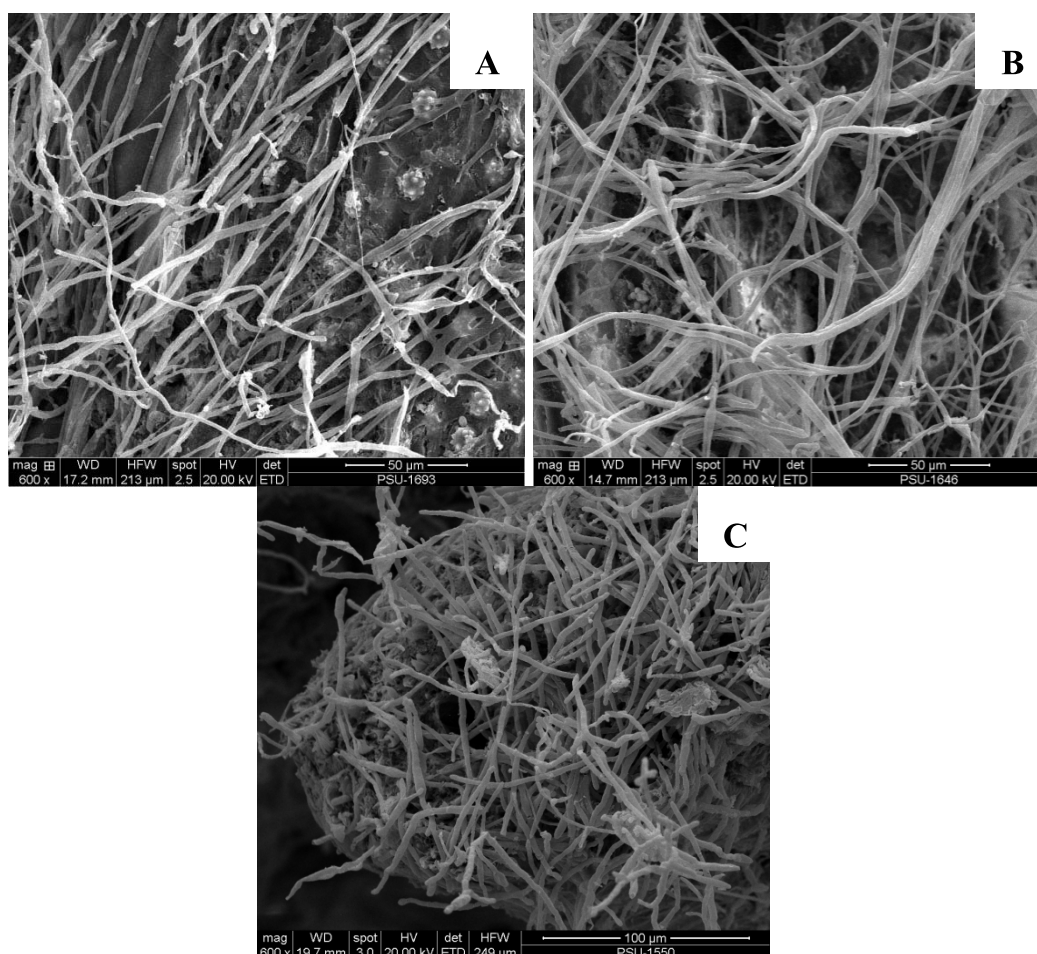
เมื่อนำราไวทรอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ผ่านการคัดเลือกมาเตรียมเป็นหัวเชื้อโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA จนเจริญเต็มผิวหน้า แล้วจึงนำมาตรึงกับทะลายปาล์มเปล่าซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม โดยทะลายปาล์มเปล่านี้จะถูกตัดแต่งเป็นชิ้นเล็ก และผ่านการล้างทำความสะอาดรวมถึงการฆ่าเชื้อก่อนที่จะนำมาตรึงเพื่อกำจัดจุลินทรีย์อื่นๆที่อาจตกค้างและปนเปื้อนในวัสดุตรึง โดยมีการแปรผันระยะเวลาในการตรึงเป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน เพื่อศึกษาระยะเวลาการตรึงที่เหมาะสม ซึ่งพิจารณาจากประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากการทดลองพบว่าราไวทรอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 สามารถเจริญเติบโตบนชิ้นส่วนทะลายปาล์มได้ดี โดยจะเจริญคลุมผิวหน้าของทะลายปาล์มเปล่า ดังแสดงในรูปที่ 4.7





รูปที่ 4.7 ราไทรอธ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตึ่งบนทะลายปาล์มเปล้าระยะเวลา 0 วัน (A), 2 วัน (B), 4 วัน (C), 6 วัน (D), 8 วัน (E) และ 10 วัน (F) เมื่อบ่มในอุณหภูมิห้อง สภาวะคงที่

เมื่อนำชิ้นส่วนของ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตึ่งบนทะลายปาล์มเปล้ามาส่องด้วย SEM เพื่อดูลักษณะการเกาะติดของเส้นใยราไทรอธกับวัสดุตึ่ง พบว่าเส้นใยของ *Trametes hirsuta* AK4 มีการยึดเกาะบริเวณผิวหน้าของวัสดุตึ่งได้ดี และเมื่อใช้ระยะเวลาการตึ่งที่มากขึ้นจะทำให้ปริมาณเส้นใยของ *Trametes hirsuta* AK4 มีความหนาแน่นมากยิ่งขึ้น (รูปที่ 4.8A และ B) นอกจากนี้ยังพบว่าราไทรอธมีการสร้างเส้นใยเกาะติดวัสดุเข้าไปภายในช่องว่างระหว่างรูพรุนของวัสดุตึ่งดังแสดงในรูปที่ 4.8C

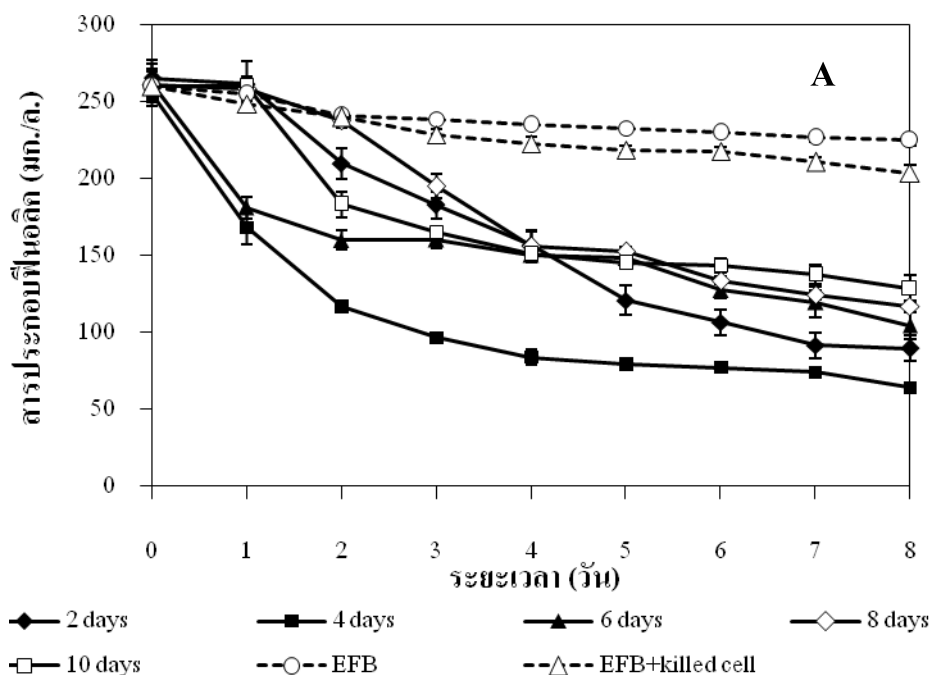


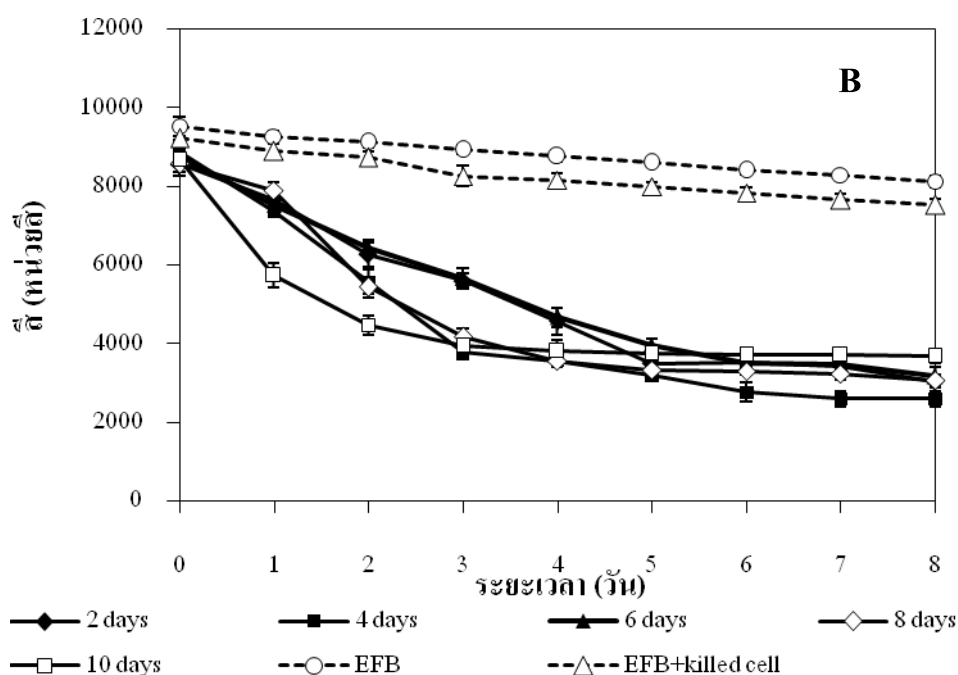
รูปที่ 4.8 ลักษณะการยึดเกาะของราไวท์รอต *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายเปล่าปาล์มน้ำมัน หลังจากการตรึงเซลล์ 2 วัน (A), 4 วัน (B) และการเกาะติดของเส้นใยระหว่างช่องว่างรูพรุนของทะลายปาล์มเปล่า (C) เมื่อส่องโดยSEM กำลังขยาย 600X

เมื่อนำเซลล์ตรึงของราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงเป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน มาทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการเติม 50%POME ปริมาตร 100 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเซลล์ตรึง พบว่ามีอัตราการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกและสีอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงเป็นระยะเวลา 4 วันสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้สูงสุด โดยสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกจากความเข้มข้น 255 มก./ล. เหลือเพียง 64 มก./ล. คิดเป็น 75% ของการลดลง ในขณะที่ราตรึงอายุ 2, 6, 8 และ 10 วัน สามารถลดสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในช่วง 50-66% ในวันที่ 8 ของการบ่มราตรึงและน้ำทิ้งร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.9A โดยเซลล์ที่ถูกตรึงเป็นระยะเวลา 4 วัน และ 6 วัน จะมีอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการบ่มเซลล์ตรึงร่วมกับน้ำทิ้ง และอัตราการย่อยสลายลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม ส่วนเซลล์ตรึงที่ระยะเวลา 2, 8 และ 10 วัน เริ่มย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกหลังจากบ่มร่วมกับน้ำทิ้งเป็นระยะ 2 วัน และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความหนาแน่นของเส้นใยราไวท์รอตที่ตรึงอยู่บนทะลายปาล์มเปล่า นั่นคือเมื่อระยะเวลาการตรึงน้อยทำให้มีปริมาณเส้นใยน้อย ราจึงใช้เวลาในการ

บำบัดในช่วงแรกนาน และเมื่อระยะเวลาการตรึงที่มากขึ้นทำให้เส้นใยราไวทรรพปกคลุมอย่างหนาแน่นก็ส่งผลต่อพื้นที่ผิวสัมผัสและการถ่ายเทมวลสารระหว่างเซลล์ตรึงกับน้ำที่ลดน้อยลง ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกลดต่ำลง

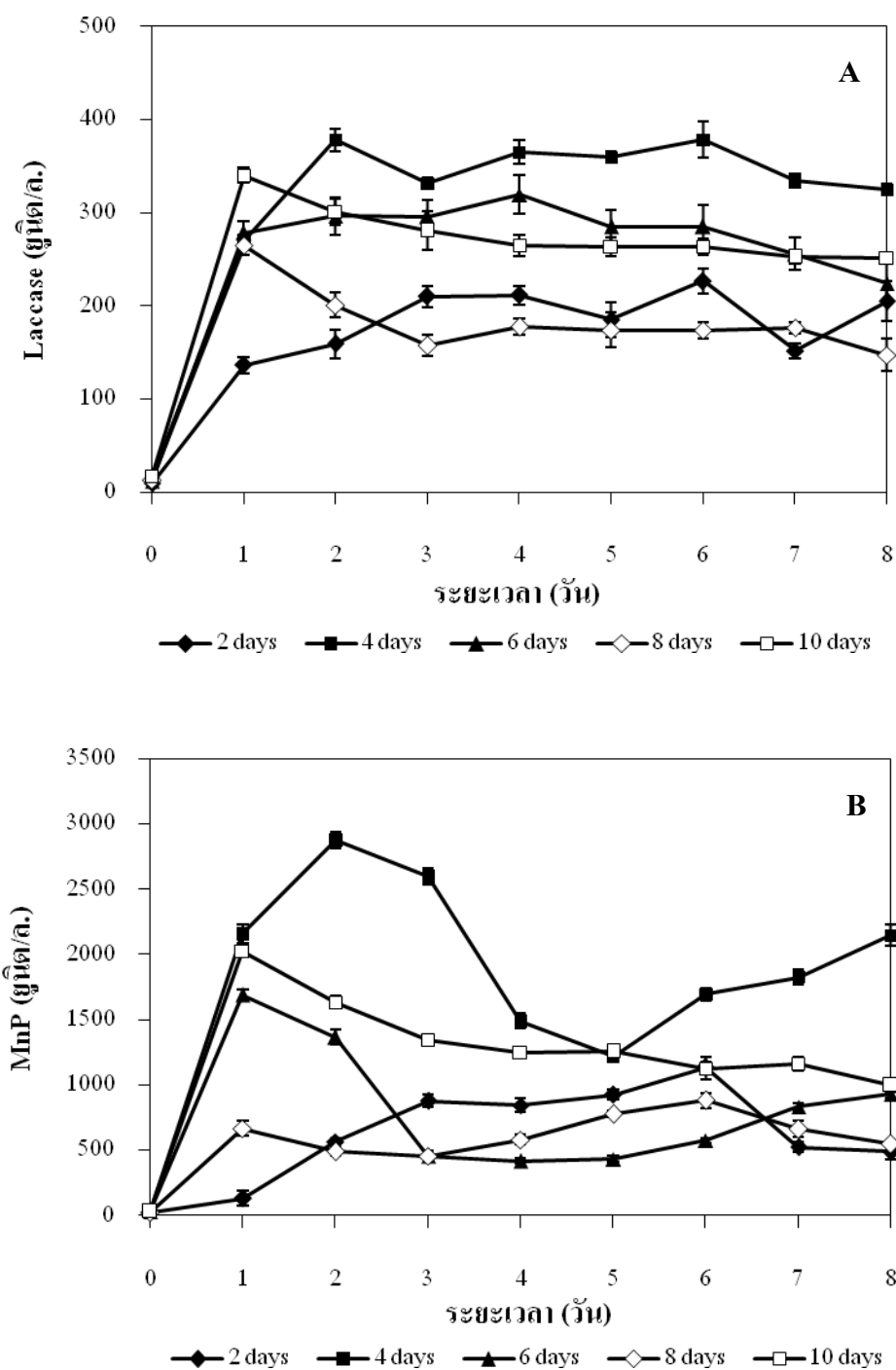
นอกจากนั้นเซลล์ตรึงอายุ 4 วันยังสามารถลดสีได้สูงสุด โดยสามารถลดสีใน 50%POME จาก 8,866 หน่วยสี เหลือเพียง 2,600 หน่วยสี คิดเป็น 70.5% ของการลดลง ในขณะที่ราตรึงอายุ 2, 6, 8 และ 10 วัน สามารถลดสีอยู่ในช่วง 57-64% ในวันที่ 8 ของการบ่มเชื้อและน้ำทิ้งร่วมกัน (รูปที่ 4.9B) นอกจากนี้ชุดควบคุมที่ประกอบด้วยทะเลสาบปลาที่ปราศจากราตรึง ซึ่งแสดงปริมาณการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกและสีโดยปัจจัยทางกายภาพและเคมี (abiotic factor) พบว่าทะเลสาบปลาที่มีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกและสีไว้ 13% และ 14.6% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ประกอบด้วยทะเลสาบปลาที่มีราตรึง ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งเป็นตัวแทนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสีที่ลดลงเป็นผลมาจากการดูดซับโดยทะเลสาบปลา และ /หรือการดูดซับโดยเส้นใยของรา มีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกและสีไว้ 21.5% และ 18.4% ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Lakhtar *et al.* (2012) ซึ่งใช้เส้นใยของราไวทรรพ *Lentinus edodes* ในการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าการสะสมของสารประกอบที่ทำให้เกิดสีในเส้นใยของราไวทรรพสายพันธุ์ดังกล่าวประมาณ 10% ของสีเริ่มต้น





รูปที่ 4.9 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกและสีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

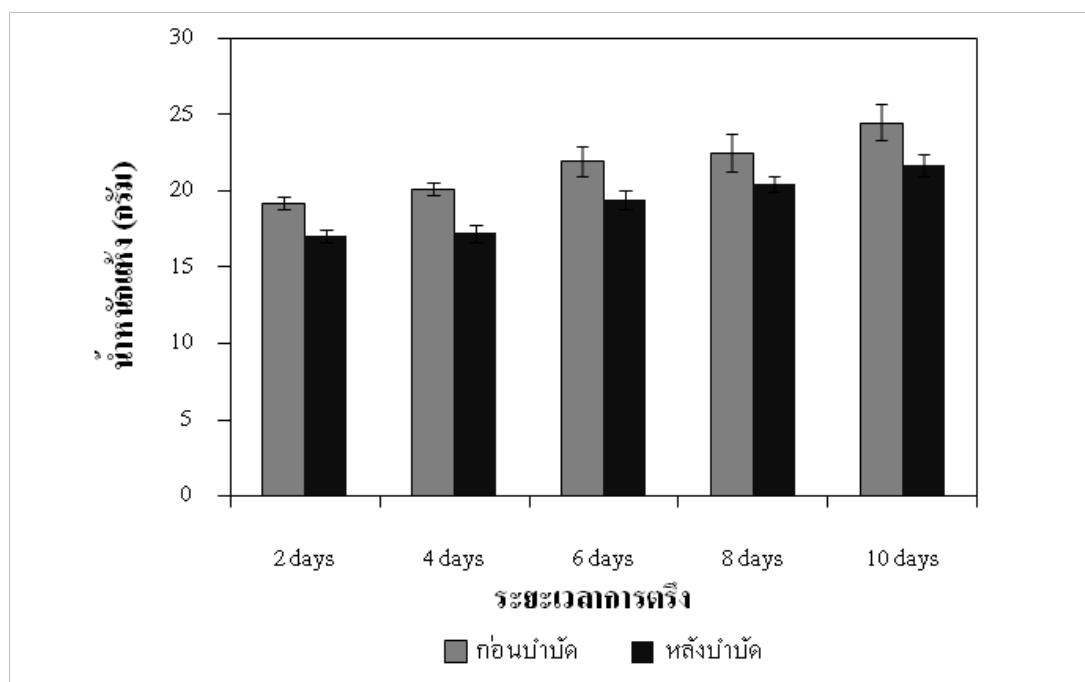
ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินไลติก ได้แก่ Laccase, Manganese Peroxides (MnP) และ Lignin Peroxides (LiP) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกและกำจัดสี (Sadayi and Ellouz, 1995) พบว่าสามารถตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์ของ Laccase และ Manganese Peroxides เท่านั้น ส่วน Lignin Peroxides ไม่มีการตรวจพบ ทั้งนี้ราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 อาจไม่สามารถสร้างเอนไซม์ LiP ได้หรือสร้างได้ในปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้เมื่อนำมาบ่มร่วมกับน้ำเสีย ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรวจพบมีลักษณะสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกและสี โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase สูงที่สุดเท่ากับ 378 ยูนิต/ล. และ MnP สูงที่สุดเท่ากับ 2,877 ยูนิต/ล. ในราตรีงที่มีอายุ 4 วัน (รูปที่ 4.10A และ B) อีกทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองค่อนข้างสูงในช่วง 1-2 วันแรกของการบ่มตัวอย่าง ดังนั้นในช่วงระยะเวลานี้จึงพบอัตราการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกและสีสูงเช่นกันโดยเฉพาะในราที่มีอายุการตรึง 4 วัน



รูปที่ 4.10 กิจกรรมเอนไซม์ Laccase (A), Manganese Peroxidase (B) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ต้งบนทะเลลายเปล่าปาล์มน้ำมัน ระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

จากการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของเซลล์ต้ง *Trametes hirsuta* AK4 บนทะเลลายเปล่าปาล์ม เพื่อวัด การเจริญของราไวท์รอต ซึ่งพิจารณาจากน้ำหนักแห้งของเส้นใยราไวท์รอตรวมกับทะเลลายเปล่าปาล์มน้ำมัน ก่อน นำไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าระยะเวลาการต้งที่สูงขึ้นจะทำให้เซลล์ต้งมีน้ำหนักแห้งเพิ่ม

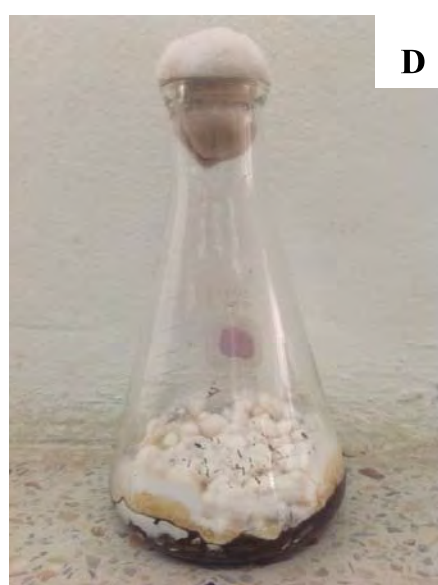
มากขึ้น โดยเซลล์ตรึงของ *Trametes hirsuta* AK4 บนทะลายปาล์มเปล่าที่ระยะเวลาการตรึง 2-10 วัน มีน้ำหนักแห้งของเส้นใยรวมกับทะลายปาล์มเพิ่มขึ้นถึง 19.21- 24.46 กรัม จากเริ่มต้นที่มีน้ำหนักวัสดุตรึงและหัวเชื้อราประมาณ 15 กรัม เนื่องจากราไวท์รอตใช้อาหารเหลว GYEB เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และความชื้นสำหรับการเจริญเติบโต กระทั่งราสร้างเส้นใยที่เพิ่มมากขึ้นจนเจริญเต็มวัสดุตรึง แต่เมื่อนำเซลล์ตรึงไปบำบัดน้ำทิ้งความเข้มข้น 50% พบว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการบำบัดกลับมีปริมาณน้ำหนักแห้งลดลงจากเดิมเป็น 17.04-21.62 กรัม ดังแสดงในรูปที่ 4.11 ทั้งนี้อาจมาจากทะลายปาล์มมีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสซึ่งอาจถูกย่อยสลายไปบางส่วนโดยราไวท์รอตเพื่อเป็นแหล่งอาหารทำให้น้ำหนักแห้งของราไวท์รอตรวมกับทะลายปาล์มเปล่าลดลง

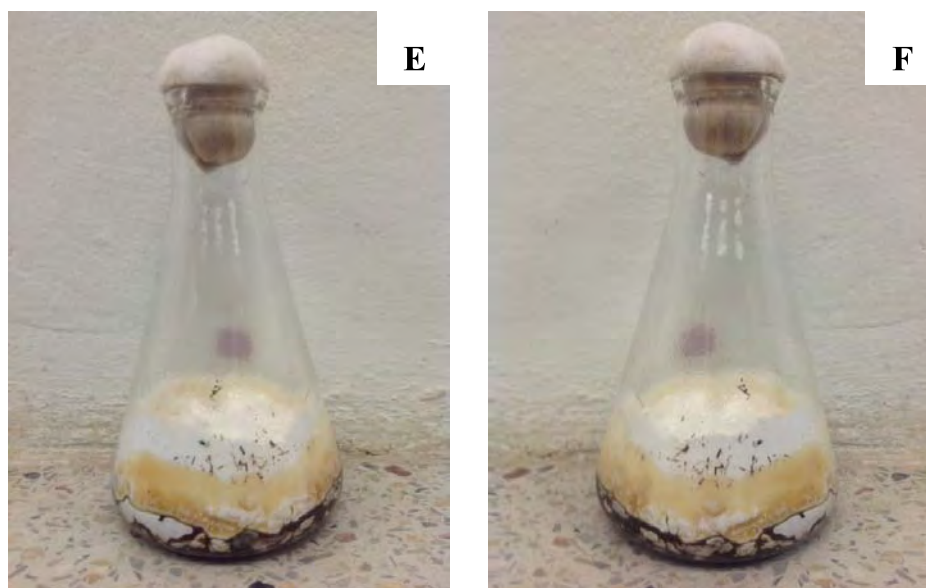


รูปที่ 4.11 น้ำหนักแห้งของราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงรวมกับน้ำหนักแห้งของทะลายปาล์มเปล่าที่ระยะเวลาการตรึง 2-10 วัน ก่อนและหลังนำไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50%

4.3.3 การตรึงราไวท์รอตบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

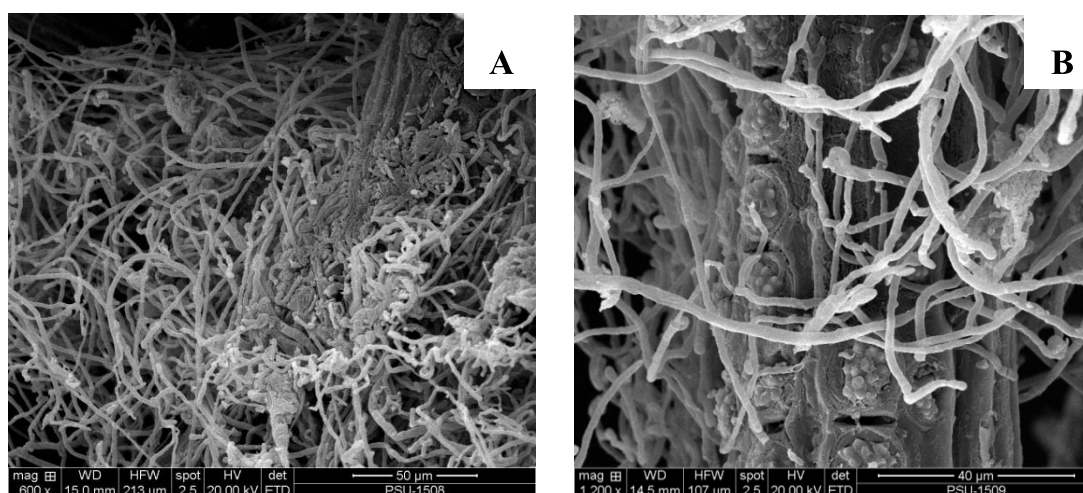
สำหรับการตรึงราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 บนเส้นใยปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากการสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกัน ที่ผ่านการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อแล้ว โดยแปรผันระยะเวลาการตรึงที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน พบว่า *Trametes hirsuta* AK4 สามารถเจริญเติบโตคลุมผิวหน้าของเส้นใยปาล์ม และการยึดเกาะของเส้นใยกับเส้นใยปาล์มน้ำมันจนเป็นก้อนแน่นเช่นเดียวกับการตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า ดังแสดงในรูปที่ 4.12





รูปที่ 4.12 รูปร่างของรา *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 0 วัน (A), 2 วัน (B), 4 วัน (C), 6 วัน (D), 8 วัน (E) และ 10 วัน (F) เมื่อบ่มในอุณหภูมิห้อง สภาวะคงที่

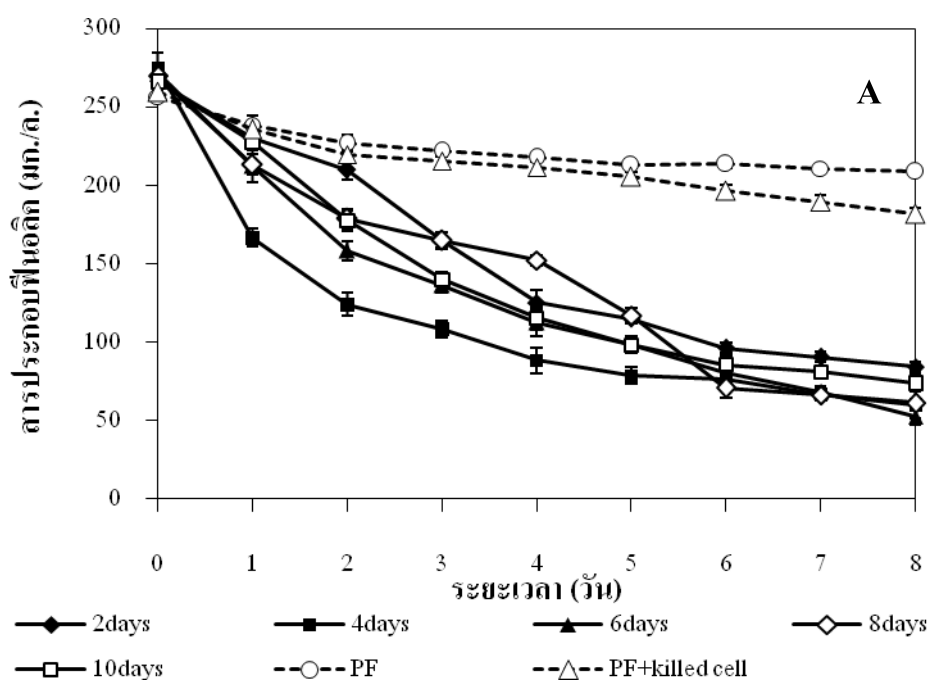
เมื่อนำชิ้นส่วนของเซลล์ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันมาส่องด้วย SEM พบว่า เส้นใยของ *Trametes hirsuta* AK4 มีการเจริญเติบโตกระจายเต็มผิวหน้าของวัสดุตรึง (เส้นใยปาล์มน้ำมัน) (รูปที่ 4.13A) และสามารถเจริญเข้าไประหว่างช่องว่างของวัสดุตรึงและยึดเกาะกับวัสดุได้ดี (รูปที่ 4.13)

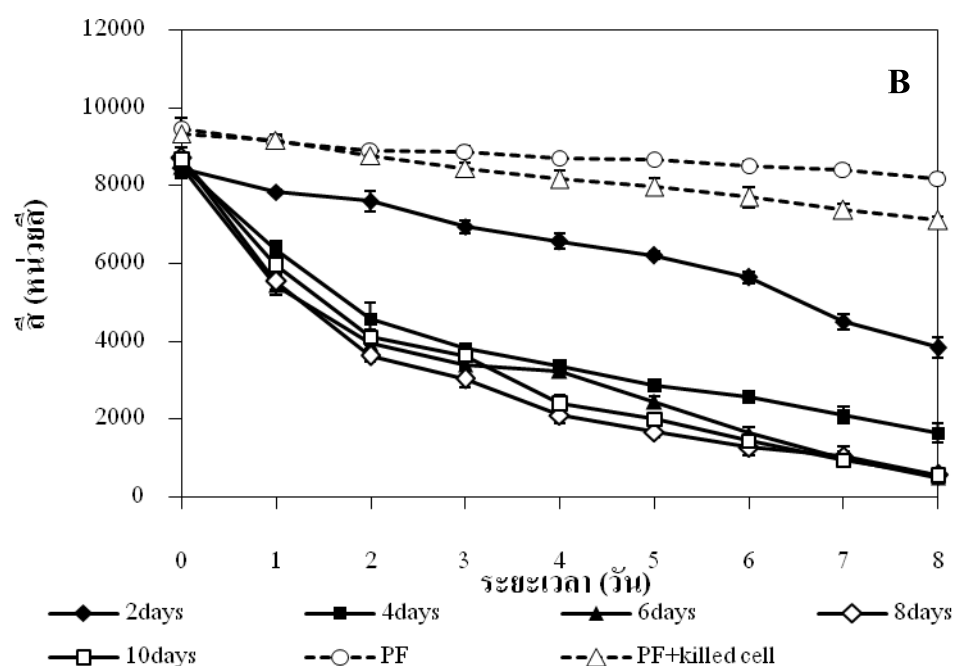


รูปที่ 4.13 ลักษณะการยึดเกาะของรา *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน หลังจากการตรึงเซลล์ 6 วัน (A) และการยึดเกาะในช่องว่างของวัสดุตรึง (B) เมื่อส่องโดยSEM กำลังขยาย 600X-1,200X

เมื่อนำเซลล์ตรึงของรา *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน มาทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้ง

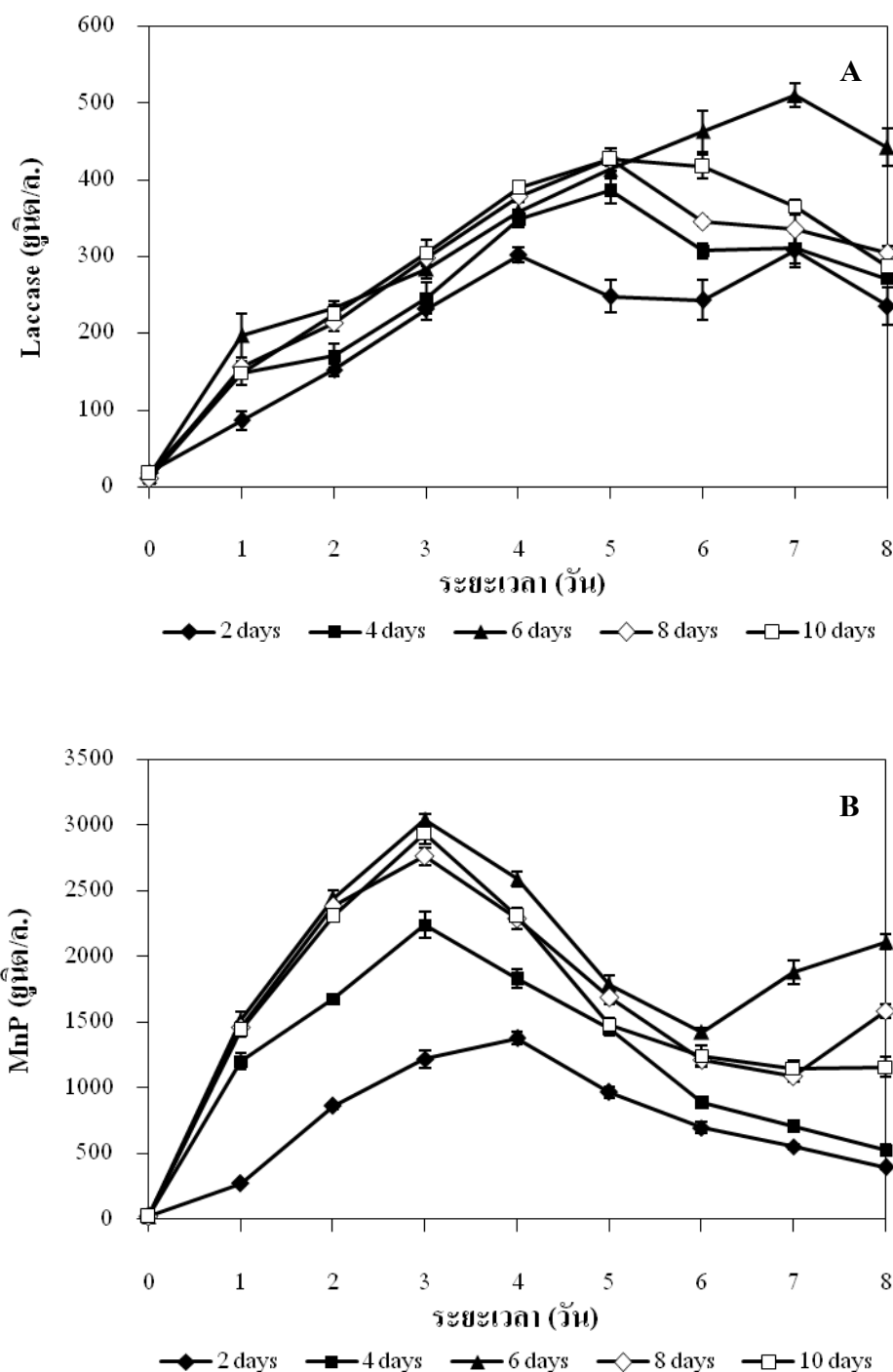
โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการเติม 50%POME ปริมาตร 100 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเซลล์ตรึง พบว่ามีอัตราการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกและสีอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ตรึงที่ระยะเวลา 4, 6 และ 8 วันสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกได้ใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกจากความเข้มข้น 269-275 มก./ล. เหลือเพียง 52-61 มก./ล. โดยคิดเป็น 77-80% ของการลดลง ในขณะที่ราตรึงอายุ 2 และ 10 วันสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในช่วง 68-72% ในวันที่ 8 ของการบ่มเชื้อและน้ำทิ้งร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.14A สำหรับประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้ง พบว่าเซลล์ตรึงที่ระยะเวลาตั้งแต่ 6 วัน เป็นต้นไป สามารถลดสีได้สูงสุดและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถลดสีใน 50%POME จาก 8,466-8,700 หน่วยสี เหลือเพียง 500 หน่วยสี คิดเป็น 93-94% ของการลดลง ในขณะที่ราตรึงอายุ 2 และ 4 วันสามารถลดสีอยู่ในช่วง 54% และ 80% ตามลำดับ ในวันที่ 8 ของการบ่มเชื้อราตรึงกับน้ำทิ้งน้ำทิ้งร่วมกัน (รูปที่ 4.14B) และนอกจากนี้พบว่าชุดควบคุมที่มีเส้นใยปาล์มน้ำมันเพียงอย่างเดียวมีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกและสีไว้ถึง 18.8% และ 13.7% ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมที่มีเส้นใยปาล์มน้ำมันร่วมกับเส้นใยราที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกและสีไว้สูงกว่าชุดควบคุมที่มีทะเลลายปาล์มเปล่าร่วมกับเส้นใยราถึง 30% และ 23.9% ตามลำดับ ซึ่งราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกและสีรวมถึงการดูดซับด้วยวัสดุตรึงร่วมกับเส้นใยราได้สูงกว่าราตรึงบนทะเลลายปาล์มเปล่า





รูปที่ 4.14 ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิก (A) และสี (B) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

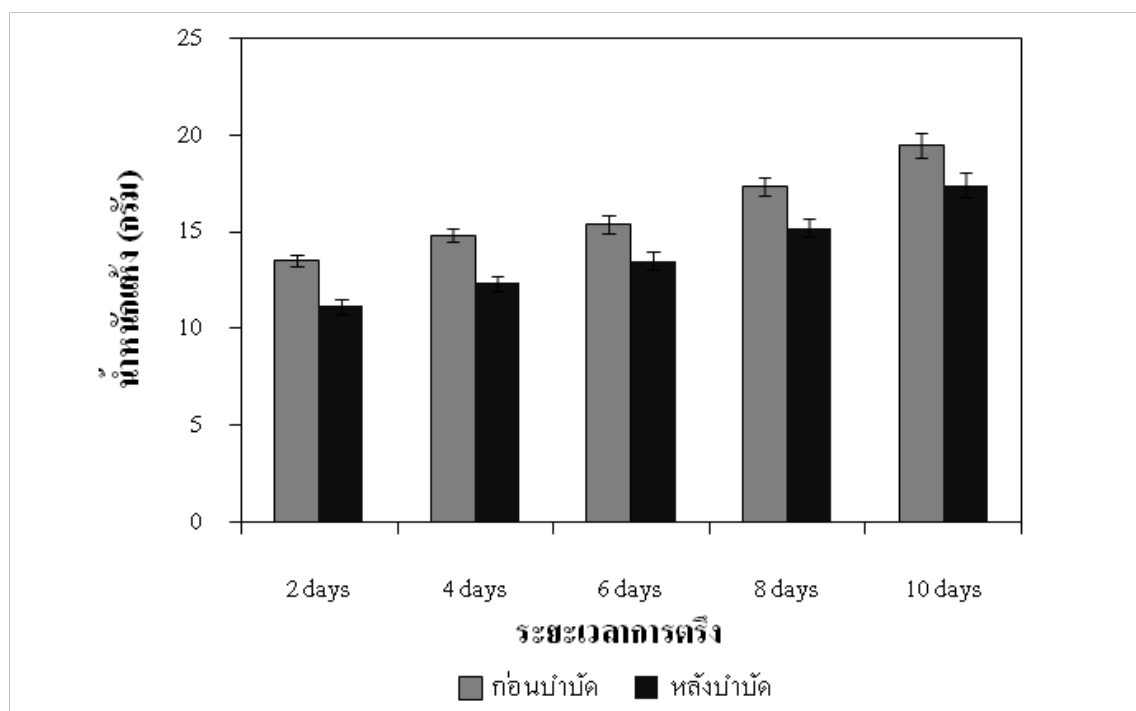
ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน พบว่ามีความสอดคล้องกับเซลล์ตรึง *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า คือ ตรวจพบเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase และ MnP เท่านั้น โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase ที่พบสูงที่สุดเท่ากับ 510 ยูนิต/ล. และ MnP สูงที่สุดเท่ากับ 3,046 ยูนิต/ล. ในราไวท์รอสที่มีอายุการตรึง 6 วัน บนเส้นใยปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 4.15A และ B) ผลการศึกษาสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการกำจัดสีและและสารประกอบฟีนอลิกที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามกิจกรรมเอนไซม์ Laccase และ MnP ที่ตรวจพบในราไวท์รอสที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันมีค่าสูงกว่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ตรวจพบในเซลล์ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า ทั้งนี้ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นมีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของราไวท์รอส โดยผลการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติกที่ตรวจพบจากการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาของ Ergul et al. (2009) ซึ่งใช้ *Trametes versicolor* ในการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase ที่สูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ MnP เท่ากับ 1,550 ยูนิต/ล. และ 128 ยูนิต/ล. ตามลำดับในวันที่ 7 และ 8 ของการบ่มราไวท์รอสที่ไม่ผ่านการปรับตัวในน้ำทิ้งที่เจือจาง 2 เท่า สายพันธุ์ของราไวท์รอสที่แตกต่างกันในแต่ละการศึกษาจะให้ผลกิจกรรมเอนไซม์ที่ต่างกัน



รูปที่ 4.15 กิจกรรมเอนไซม์ Laccase (A), Manganese Peroxidase (B) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 50% ของราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

จากการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของเซลล์ตรึง *Trametes hirsuta* AK4 บนเส้นใยปาล์มน้ำมันก่อนนำไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อวัดการเจริญของราไวท์รอต ซึ่งพิจารณาจากน้ำหนักแห้งของเส้นใยราไวท์รอตร่วมกับเส้นใยปาล์มน้ำมัน พบว่าระยะเวลาการตรึงที่สูงขึ้นจะทำให้เซลล์ตรึงมีน้ำหนักแห้งเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับการตรึงราไวท์รอตบนทะลายปาล์มเปล่า โดยเซลล์ตรึงของ *Trametes hirsuta*

AK4 บนเส้นใยปาล์มน้ำมันที่ระยะเวลาการตรึง 2-10 วัน มีน้ำหนักแห้งของเส้นใยราไทรอธและเส้นใยปาล์มเพิ่มขึ้นถึง 13.55 – 19.49 กรัม จากเริ่มต้นที่มีวัสดุตรึงรวมกับหัวเชื้อราประมาณ 10 กรัม แต่เมื่อนำเซลล์ตรึงไปบำบัดน้ำทิ้งความเข้มข้น 50% พบว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการบำบัดกลับมีปริมาณน้ำหนักแห้งลดลงจากเดิมเป็น 11.16 – 17.44 กรัม ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลไกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบในเส้นใยปาล์มน้ำมันถูกย่อยสลายด้วยราไทรอธเพื่อเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโต ค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยราไทรอธร่วมกับวัสดุตรึงนอกจากจะบอกอัตราการเจริญของราไทรอธแล้ว ยังสามารถใช้เป็นพารามิเตอร์เบื้องต้นที่ทดสอบได้ง่าย เพื่อจะใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาเติมวัสดุตรึงหรือเปลี่ยนเซลล์ตรึงใหม่ เพื่อคงประสิทธิภาพในการบำบัดเมื่อนำราไทรอธไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียด้วยระบบขยายขนาด



รูปที่ 4.16 น้ำหนักแห้งของราไทรอธสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันระยะเวลา 2-10 วัน ก่อนและหลังนำไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50%

จากประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกของราไทรอธ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าและเส้นใยปาล์มน้ำมันที่มีอายุการตรึงแตกต่างกัน สามารถสรุปประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% ดังแสดงในตารางที่ 3.4 จากตารางจะพบว่าราไทรอธ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เป็นระยะเวลา 6 วัน ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดถึง 94% และ 80% ตามลำดับ เนื่องจากเส้นใยปาล์มมีขนาดเล็ก มีช่องว่างระหว่างเส้นใยปาล์มให้ราเจริญเข้าไปได้ง่าย และมีพื้นที่ผิวสัมผัสสูง ทำให้เกิดการถ่ายเทมวลสารระหว่างเซลล์ตรึงกับน้ำทิ้งได้ดี รวมถึงวัสดุดังกล่าวยังสามารถเป็นตัวเหนียวน้ำให้สร้างเอนไซม์ Laccase และ MnP สูง ทำให้ราตรึงกำจัดสารประกอบฟีนอลิกและสีในน้ำทิ้งได้ดี จึงคัดเลือกราไทรอธ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เป็นระยะเวลา 6 วัน เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยราไทรอธ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าและเส้นใยปาล์มน้ำมัน ในระยะเวลาการตรึงต่างๆ

วัสดุตรึง	ระยะเวลาการตรึง (วัน)	การลดลงของ	
		สารประกอบฟีนอลิก (%)	สี (%)
ทะลายปาล์มน้ำมัน	2	65.9±4.6 ^c	64.5±2.5 ^d
	4	74.7±0.9 ^b	70.5±2.9 ^c
	6	59.8±4.8 ^d	63.9±4.3 ^d
	8	55.0±2.2 ^{d, e}	64.1±1.6 ^d
	10	50.4±5.0 ^e	57.6±2.2 ^e
เส้นใยปาล์มน้ำมัน	2	68.2±1.2 ^{b, c}	54.5±1.6 ^e
	4	78.0±2.7 ^a	80.7±2.8 ^b
	6	80.6±2.2 ^a	94.0±1.1 ^a
	8	75.1±3.5 ^{a, b}	93.4±0.4 ^a
	10	72.0±1.6 ^b	93.4±1.0 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.4 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้ง

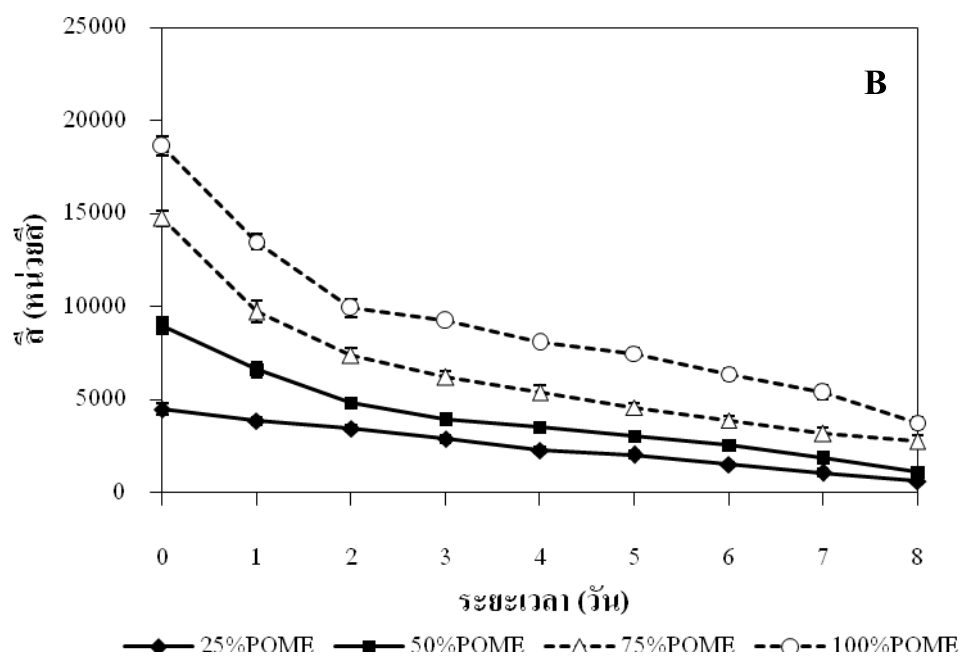
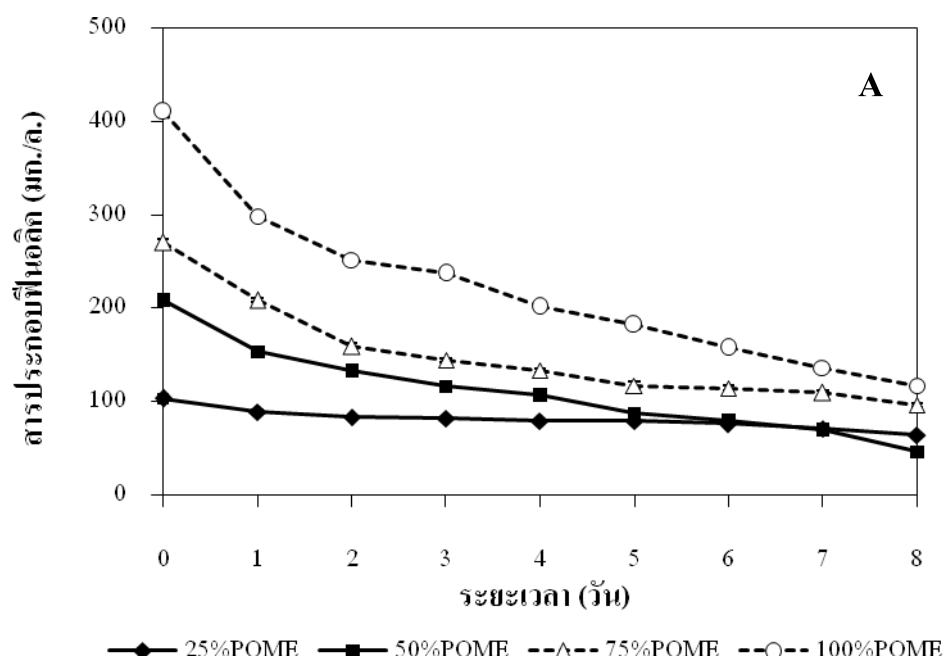
เมื่อได้คัดเลือกวัสดุตรึงและระยะเวลาการตรึงที่เหมาะสมซึ่งได้แก่ ราที่ถูตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เป็นระยะเวลา 6 วัน จากการทดลองข้างต้นโดยทดสอบกับน้ำทิ้งที่เจือจางความเข้มข้น 50% การศึกษาต่อไปนี้จะสนใจเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งที่ยังไม่ผ่านการเจือจางด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ 1) การแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง 2) การเติมสารอาหารร่วม 3) การบำบัดแบบสองขั้นตอน และ 4) การปรับตัวของเซลล์ตรึง เพื่อเป็นแนวทางในการประเมินศักยภาพของราตรึงเมื่อถูกนำไปใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในระบบบำบัดน้ำเสียจริง

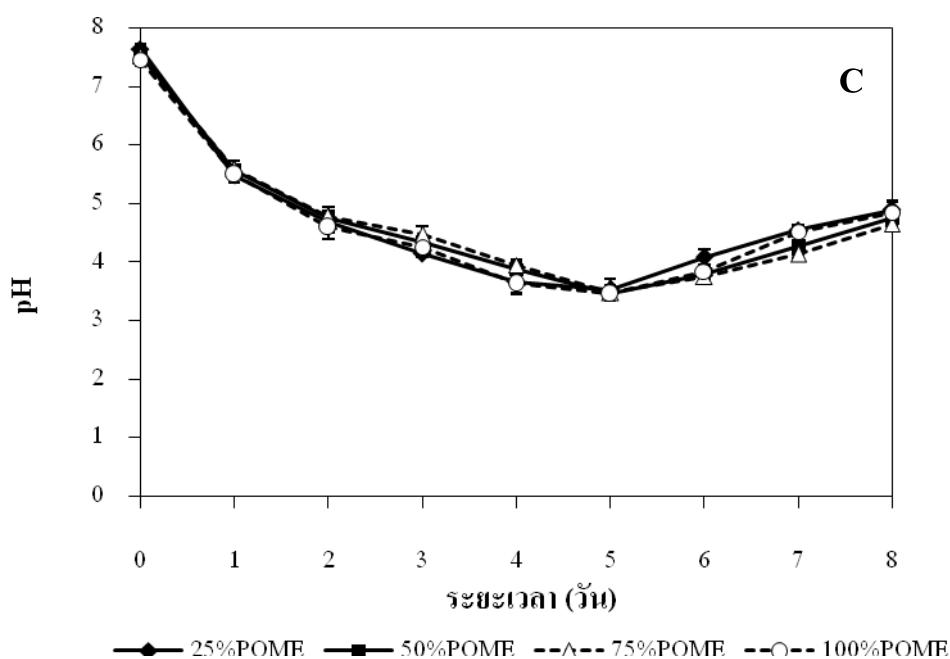
4.4.1 การแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกที่ไม่ผ่านการเจือจางมีผลยับยั้งการเจริญของราไทรอธ (Ahmadi *et al.*, 2006) ผู้วิจัยจึงเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกัน โดยการแปรผันน้ำทิ้งด้วยน้ำกลั่นให้ได้ระดับความเข้มข้น 25%, 50% 75% และ 100% (ไม่เจือจาง) พบว่าราตรึงสามารถลดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งได้อย่างต่อเนื่องทุกระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้ง ดัง

แสดงในรูปที่ 4.17A ทั้งนี้การทดสอบด้วยน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้นต่ำจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกลดลง โดยที่ระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้ง 25% ราไวท์รอตจึงสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิกได้เพียง 37% ซึ่งต่ำกว่าน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 50%, 75% และน้ำทิ้งที่ไม่เจือจาง ซึ่งราไวท์รอตสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิกได้ถึง 64% -77% เนื่องจากการลดความเข้มข้นของน้ำทิ้งทำให้สารอาหารและสารอินทรีย์อื่นๆในน้ำทิ้งถูกเจือจางด้วยเช่นกัน ทำให้มีผลต่อการเจริญของราไวท์รอต และส่งผลให้เกิดการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกต่ำในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้นต่ำ ในงานวิจัยของ Ahmadi *et al.* (2006) ใช้ราไวท์รอตสายพันธุ์ *Phanerochaete chrysosporium* ที่ถูกตรึงบนใยบวบ เพื่อกำจัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าราไวท์รอตสายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้ในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้นสูง จึงต้องเติมสารอาหารร่วม เช่น กลูโคส แอมโมเนียมซัลเฟต และ yeast extract ลงในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 20 -50% จึงทำให้ราไวท์รอตสายพันธุ์ดังกล่าวย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งได้ ส่วนประสิทธิภาพในการกำจัดสีของน้ำทิ้งนั้นให้ผลที่ใกล้เคียงกันคือเซลล์ตรึงสามารถกำจัดสีได้อย่างต่อเนื่อง เมื่อบ่มราตรึงกับน้ำทิ้งร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 5.17B จะเห็นได้ว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอยู่ในช่วง 79.7% - 87.8% ในวันที่ 8 ของการบ่ม เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดสีในน้ำทิ้งถูกย่อยสลายไป อย่างไรก็ตามในน้ำทิ้งยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ทำให้เกิดสีรวมอยู่ด้วย เช่น สารประกอบจำพวกแอนโทไซยานิน แคโรทีน เมลานอยดิน ลิกนิน แทนนิน (Hartley, 1977; Hwang *et al.*, 1978; Barker and Worgan, 1981) ซึ่งเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลสูง โครงสร้างซับซ้อน สามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก เช่น Laccase, MnP และ LiP ที่สร้างจากราไวท์รอตทำให้สีในน้ำทิ้งลดความเข้มลง (Asses *et al.*, 2009)

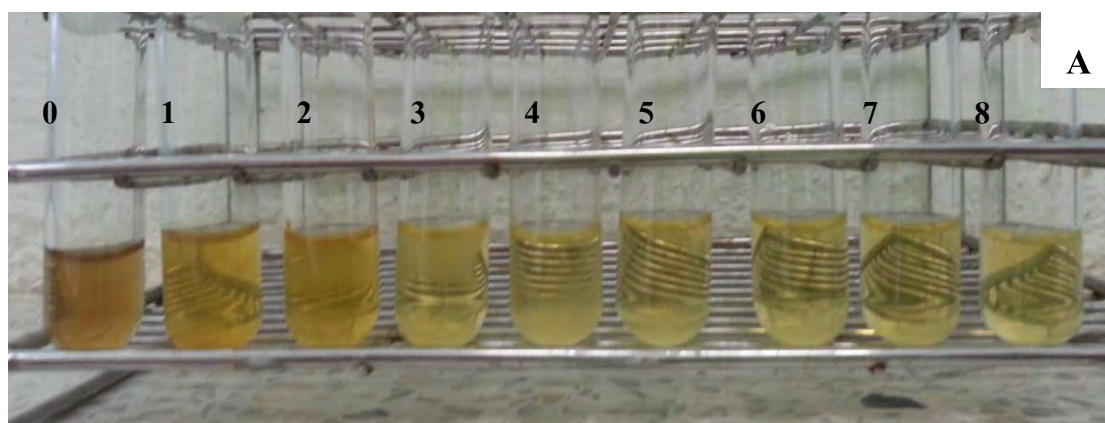
นอกจากการตรวจวัดสีและสารประกอบฟีนอลิกแล้ว การทดลองนี้ยังศึกษาการเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำทิ้งตลอดการบำบัดด้วยราไวท์รอตที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เนื่องจาก pH มีผลต่อปฏิกิริยา polymerization ของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งซึ่งจะทำให้สีเข้มขึ้น จากการศึกษาพบว่าเริ่มต้น pH ของน้ำทิ้งทุกอัตราการเจือจางอยู่ในช่วงที่เป็นกลางประมาณ 7.5 แต่เมื่อบ่มราตรึงร่วมกับน้ำทิ้งจะพบว่า pH ของน้ำทิ้งจะลดลงอยู่ในช่วงของกรดประมาณ 3.4-3.5 ในวันที่ 5 ของการบ่มเซลล์ตรึงร่วมกับน้ำทิ้งและหลังจากวันที่ 6 ของการบ่ม pH ของน้ำทิ้งจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 5.17C การลดลงของ pH นี้อาจมีเป็นผลมาจากการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโดยราไวท์รอต ซึ่งทำให้เกิดกรดอินทรีย์ขึ้นในน้ำทิ้ง สอดคล้องกับการทดลองของ Assas *et al.* (2002) ซึ่งใช้รา *Geotrichum candidum* ในการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ซึ่งมีการรายงานค่า pH ของน้ำทิ้งจะลดลงอยู่ในช่วงที่เป็นกรด เกิดจากการที่ราไวท์รอตใช้น้ำตาลและสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง ทำให้เกิดกรดอินทรีย์ซึ่งเป็นสารตัวกลางก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายผ่านวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) อย่างไรก็ตามค่า pH ที่สูงขึ้นในช่วงท้ายของการทดลอง อาจมีสาเหตุมาจากการย่อยสลายสารต่อกลางต่อไปเป็นสารชนิดอื่น หรือเกิดการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกและสารอินทรีย์อื่นๆ อย่างสมบูรณ์ จึงทำให้กรดอินทรีย์เปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Leonowicz *et al.*, 2001) และนอกจากนี้ยังมีการรายงานค่า pH ที่ลดลงช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสีได้ดี (Kim and Shoda, 1999) เนื่องจากเป็นค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างเอนไซม์ของราไวท์รอตซึ่งอยู่ในช่วง 3.5-5.5 (Boyle, 2006)

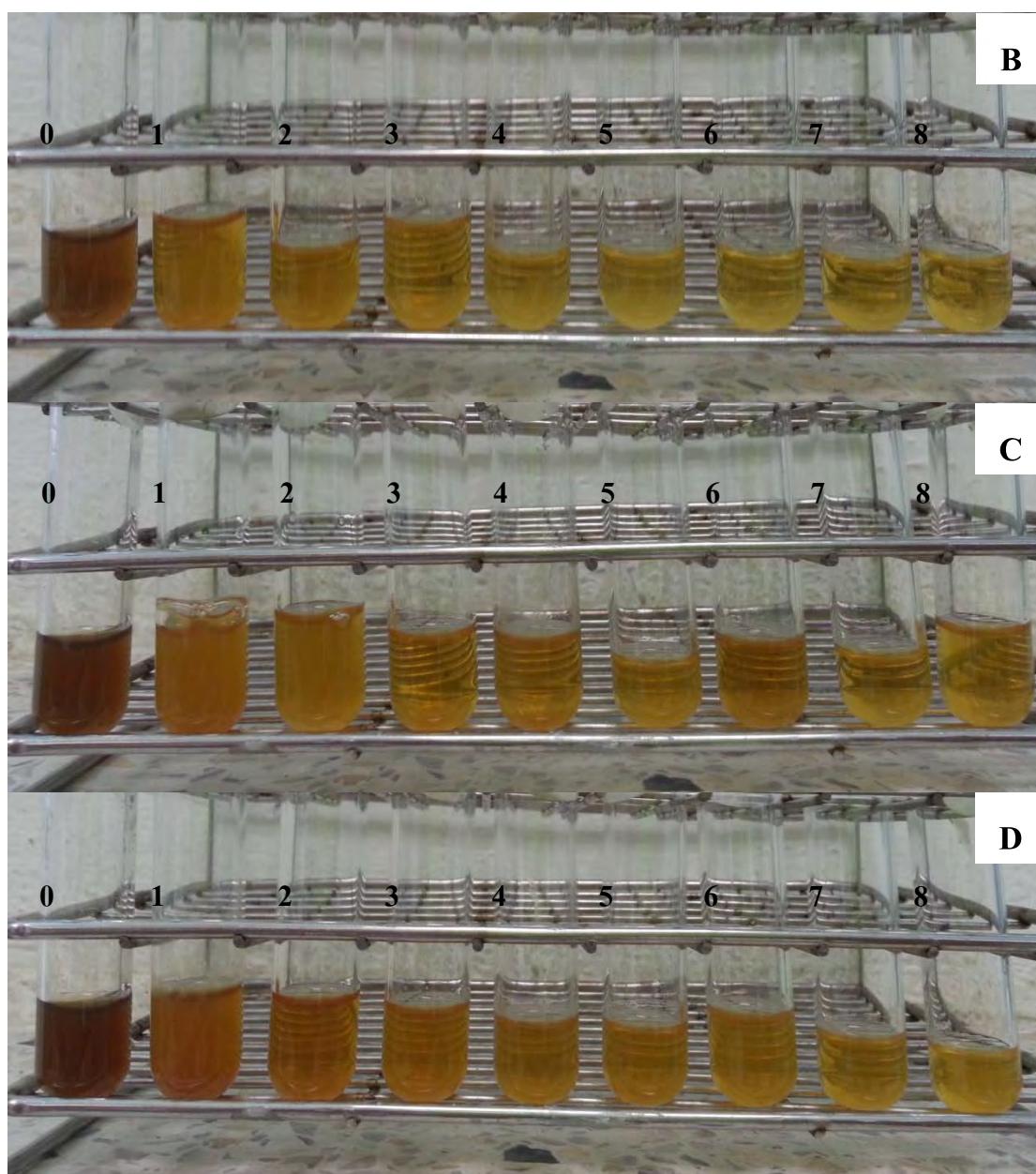




รูปที่ 4.17 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 25%- 100% ของราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เช้า 120 รอบต่อนาที

การลดลงของสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งเริ่มต้นมีสีน้ำตาลคล้ำ และเมื่อนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นทำให้ความเข้มของสีลดลงตามอัตราการเจือจาง หลังจากนำมาบำบัดด้วยราไวท์รอตสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน พบว่าสีของน้ำทิ้งจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลคล้ำเป็นสีเหลืองที่มีความเข้มสีแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.18A-D





รูปที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 25% (A), 50% (B), 75% (C) และ 100% (D) ที่ผ่านการบำบัดด้วยราไทรอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์ม น้ำมัน บ่มเป็นระยะเวลา 0-8 วัน

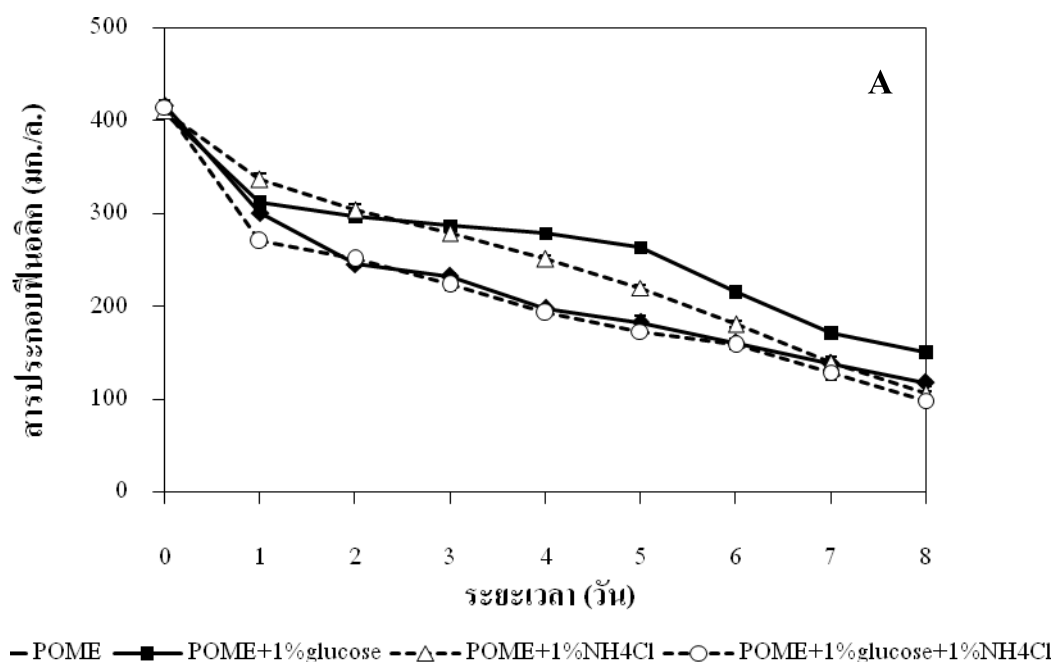
4.4.2 การเติมแหล่งอาหารร่วม

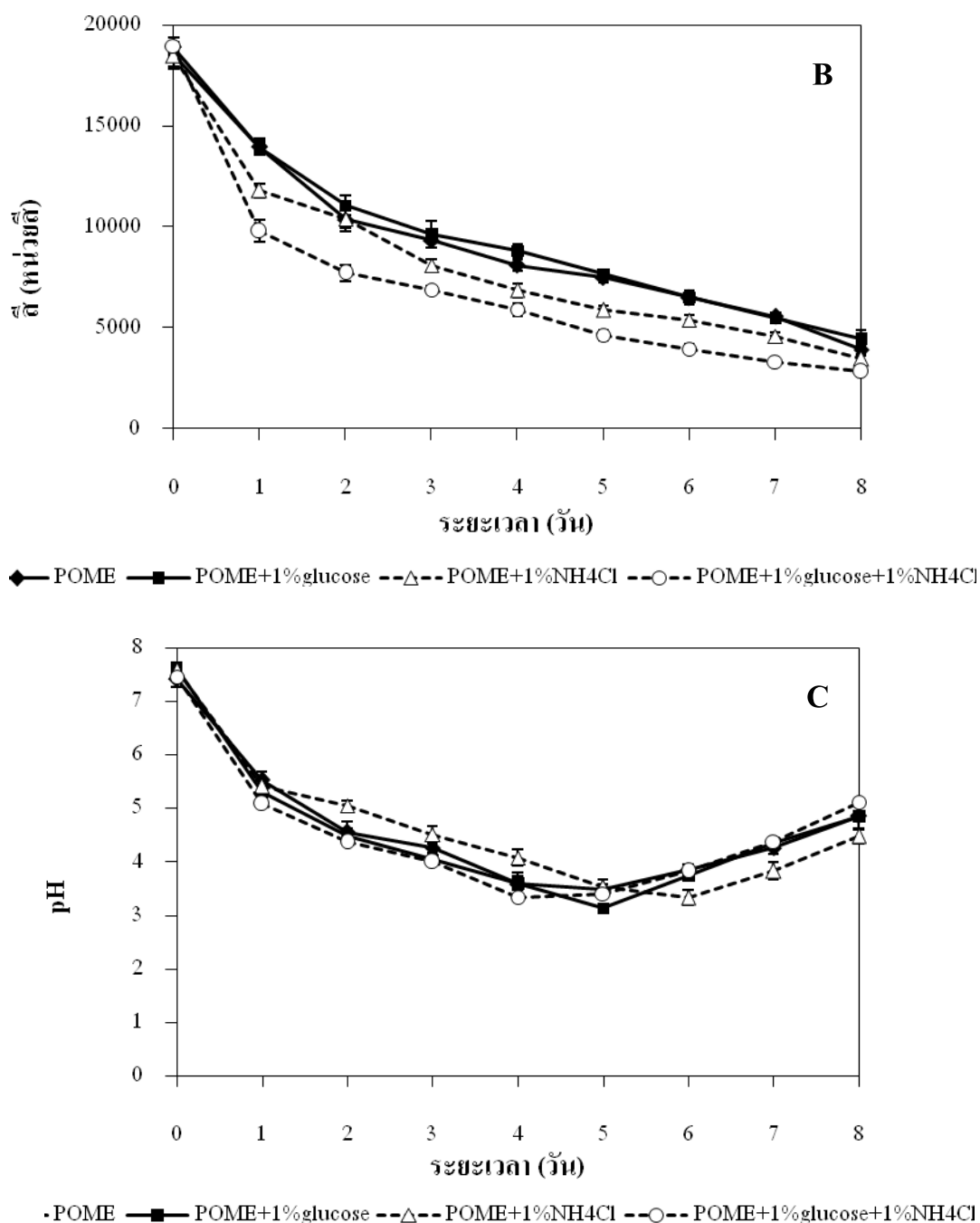
เมื่อนำเซลล์ตรงของราไทรอทมาศึกษาการเติมแหล่งอาหารร่วมโดยการเติมน้ำตาลกลูโคส (1% w/v) หรือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (1% w/v) และน้ำตาลกลูโคส (1% w/v) ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ (1% w/v) ลงในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 100% (ไม่ผ่านการเจือจาง) เพื่อเป็นการเพิ่มเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนให้กับราไทรอท พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคส ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกลดลงเหลือ 62.9% ต่ำกว่าน้ำทิ้งที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิกได้ 71.4% ในวันที่

8 ของการบ่มราตรึงร่วมกับน้ำทิ้ง ส่วนการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ เพียงอย่างเดียว และการเติมน้ำตาลกลูโคส ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ ส่งผลให้กำจัดฟิโนลิกได้เพิ่มขึ้นเป็น 74.0% และ 76.1% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.19A ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมส่งผลให้การสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติกดีขึ้น (Swamy and Ramsay, 1999)

ส่วนประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำทิ้งนั้นให้ผลสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟิโนลิก โดยที่น้ำทิ้งที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส เซลล์ตรึงสามารถกำจัดได้ 75% (รูปที่ 5.19B) ซึ่งต่ำกว่าน้ำทิ้งที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคสซึ่งสามารถกำจัดได้ถึง 79.2% ส่วนการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ เพียงอย่างเดียวและการเติมน้ำตาลกลูโคสร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ ส่งผลให้กำจัดได้เพิ่มขึ้นเป็น 81.1% และ 85.0% ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Gomathi, *et al.* (2012) ซึ่งทำการศึกษาการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานกระดาษด้วยราตรึงของ *Phanerochaete chrysosporium* พบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนร่วม เช่น น้ำตาลซูโครส จะทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดต่ำกว่าการไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม เนื่องจากราไวทรอสสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารได้ง่ายกว่าการใช้สารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง จึงเลือกที่จะใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้ในการเจริญแทนการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายยากกว่า เช่น สารประกอบฟิโนลิก หรือรงควัตถุอื่น ๆ ในน้ำทิ้ง ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องเติมแหล่งคาร์บอนร่วมในการบำบัดสีของน้ำทิ้ง

นอกจากนี้ น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วมและไม่เติมแหล่งอาหารร่วมมีการลดลงของ pH โดยลดลงจากประมาณ 7.5 มาเป็น 3.1-3.5 ในวันที่ 5 ของการบ่มราตรึงร่วมกับน้ำทิ้ง และค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 6-8 ของการบ่ม จนอยู่ในช่วง 4.8-5.1 น้ำทิ้งที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v จะมีการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่ช้ากว่าการเติมสารชนิดอื่นดังแสดงในรูปที่ 4.19C การเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำทิ้งที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วมให้ผลสอดคล้องกับการเฝ้าระวังความเข้มข้นน้ำทิ้ง

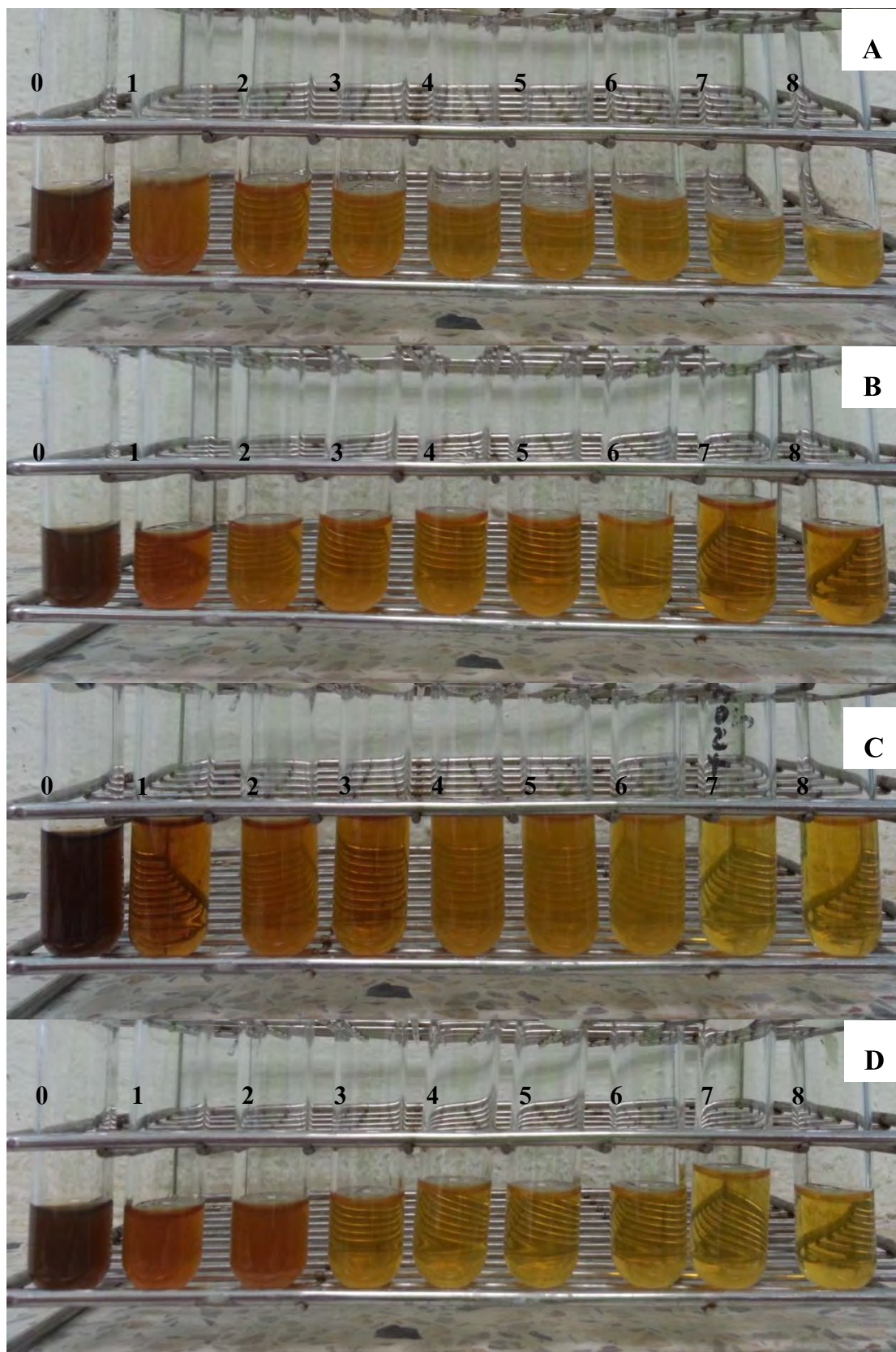




รูปที่ 4.19 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีการเติมแหล่งอาหารร่วม C และ N ต่างๆ ของราไทรอธ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

ลักษณะการลดลงของสีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังจากบำบัดด้วยราไทรอธสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เมื่อนำมาเติมกลูโคสหรือแอมโมเนียมคลอไรด์เพื่อเป็นแหล่งอาหารร่วมของราไทรอธลงในน้ำทิ้ง พบว่าสีของน้ำทิ้งจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลคล้ำเป็นสีเหลืองที่มีความ

เข้มสีแตกต่างกัน และความเข้มสีลดลงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.20A-D เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งที่มีการแปรผันความเข้มข้น



รูปที่ 4.20 การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (A), น้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% w/v (B) , น้ำทิ้งที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v (C) และน้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% w/v ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ 1% w/v (D) ที่ผ่านการบำบัดด้วยราไทรออสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

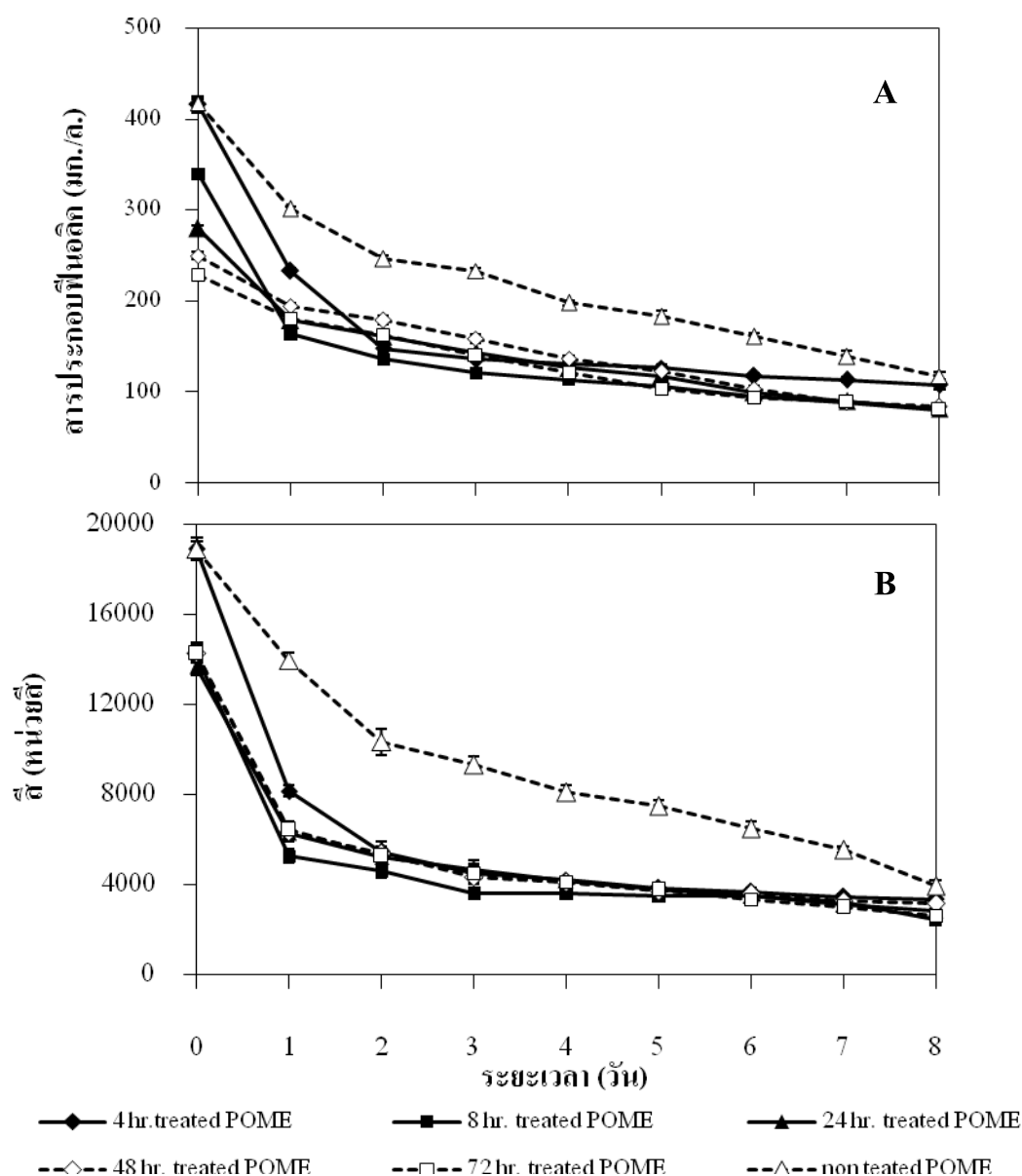
4.4.3 การบำบัดน้ำทิ้งแบบสองขั้นตอน

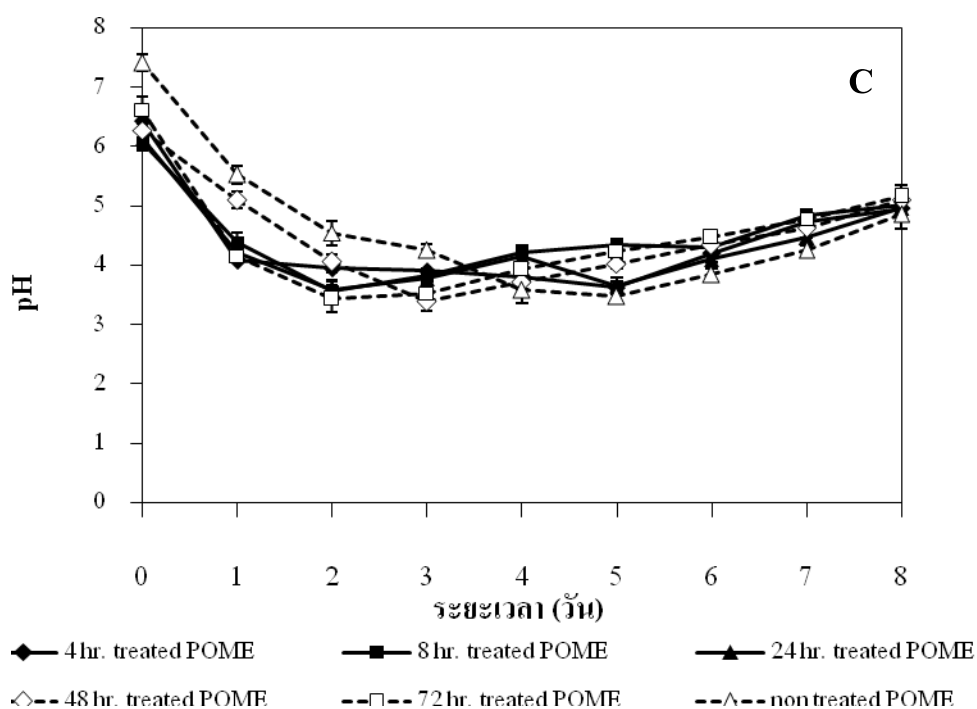
จากการศึกษาของพนิดา ไตะสุ (2555) ใช้แบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอล (phenol-degrading bacteria) มาตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันเพื่อประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนของฟีนอล ได้แก่ น้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าเซลล์ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าที่ผ่านการกระตุ้นโดยการเลี้ยงในอาหาร carbon free mineral medium (CFMM) ที่มีการเติมฟีนอล 10 มก./ล. สามารถลดปริมาณฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ 64 % ภายในเวลา 7 วัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำผลการศึกษาดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการบำบัดด้วยราไทรออสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นการบำบัดแบบ 2 ขั้นตอน โดยขั้นต้น (Pretreatment) บำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยแบคทีเรียผสมที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าตามวิธีการของพนิดา ไตะสุ (2555) โดยต้องการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกขั้นต้นให้มีความเข้มข้นลดลง เพื่อลดความเป็นพิษของสารประกอบดังกล่าวที่อาจส่งผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของราไทรออส แล้วจึงนำน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นมาบำบัดต่อด้วยราไทรออส *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมที่ถูกตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า ซึ่งแปรผันระยะเวลาการบำบัดที่ 4, 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งลดลงเหลือ 90%, 75%, 60% 55% และ 50% ตามลำดับ จากเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งประมาณ 461 มก./ล. และมีอน้ำที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นแล้วมาบำบัดต่อด้วยเซลล์ตรึงของราไทรออส *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน พบว่าราไทรออสที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิกที่เหลือได้อย่างรวดเร็วหลังจากการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึงเป็นเวลา 1 วัน และค่อยๆ ลดอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม ซึ่งเหลือสารประกอบฟีนอลิก อยู่ในช่วง 81.6-84.7 มก./ล. คิดเป็น 81.6-82.2% ในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียตรึงเป็นระยะเวลา 8-72 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.21A การลดลงของสารประกอบฟีนอลิกของน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นจะลดลงอย่างรวดเร็วกว่าน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้นในช่วง 4 วันแรกของการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึง ซึ่งน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นเพียง 8 ชั่วโมงให้ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกใกล้เคียงกับระยะเวลาการบำบัดขั้นต้นที่นานกว่า ดังนั้นการบำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นด้วยแบคทีเรียตรึงเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงจึงเพียงพอและเหมาะสมสำหรับการบำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นก่อนที่จะบำบัดด้วยราไทรออสที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันต่อไป

สำหรับประสิทธิภาพของราไทรออสตรึงในการกำจัดสีน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นแล้ว พบว่าน้ำทิ้งที่ผ่านบำบัดขั้นต้นมีสีเริ่มต้นที่ไม่เท่ากัน เนื่องจากการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกและสารสีอื่น ๆ ไปบางส่วนโดยแบคทีเรียตรึง รวมทั้งการดูดซับสีของทะลายปาล์มเปล่าในระหว่างการบำบัดขั้นต้น ทำให้น้ำทิ้งซึ่งมีค่าความเข้มสีเริ่มต้นประมาณ 14,000 หน่วยสี ถูกกำจัดให้ลดลงประมาณ 25% ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของพนิดา ไตะสุ (2555) และเมื่อผ่านการบำบัดด้วยราตรึงจะพบว่าสีของน้ำทิ้งจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1-2 ของการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึง ดังแสดงในรูปที่ 4.21B และค่อย ๆ ลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม โดยลดลงเหลือ 2,433-3,366 หน่วยสี คิดเป็น 79.7-87.1% ซึ่งสีของน้ำทิ้งจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลคล้ำเป็น

สีเหลืองที่มีความเข้มสีแตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 4.22 และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดสีของราตรึงในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นกับน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้นพบว่า ราตรึงสามารถกำจัดสีในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นได้สูงกว่าในช่วงแรกของการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึงและค่อนข้างคงที่ตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่มจนสิ้นสุดการศึกษา จะเห็นได้ว่าการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำทิ้งเพียงบางส่วน สามารถส่งเสริมอัตราการย่อยสลายสารสีโดยราไวท์รอตในขั้นตอนต่อมาให้เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกมีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ในราไวท์รอตหลายชนิด ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ราไวท์รอตยังไม่สามารถกำจัดสีในน้ำเสียที่มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก เป็นต้น

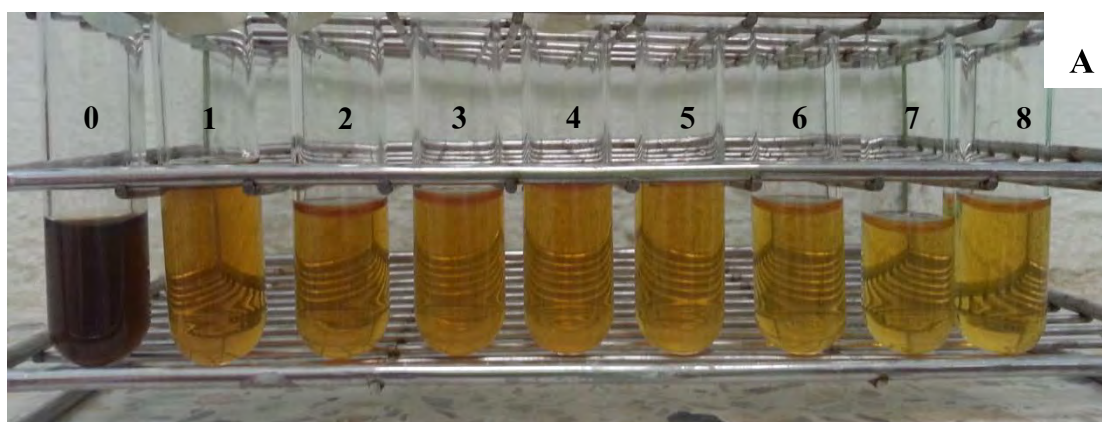
ค่า pH ของน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นมีค่าที่ใกล้เคียงกันโดยอยู่ในช่วงที่เป็นกลางแต่นำมาบำบัดต่อด้วยราตรึง pH ของน้ำทิ้งจะลดลงอยู่ในช่วงที่เป็นกรดประมาณ 3.5-3.9 ในวันที่ 3 ของการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึง ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งเกิดเป็นกรดอินทรีย์จึงส่งผลให้น้ำทิ้งมี pH ลดลง แต่เมื่อวันที่ 4 ของการบ่ม pH จะปรับตัวเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม pH ของน้ำทิ้งจะอยู่ที่ 4.9-5.1 ดังแสดงในรูปที่ 4.22C โดยผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการทดลองการแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้งและการเติมอาหารร่วม

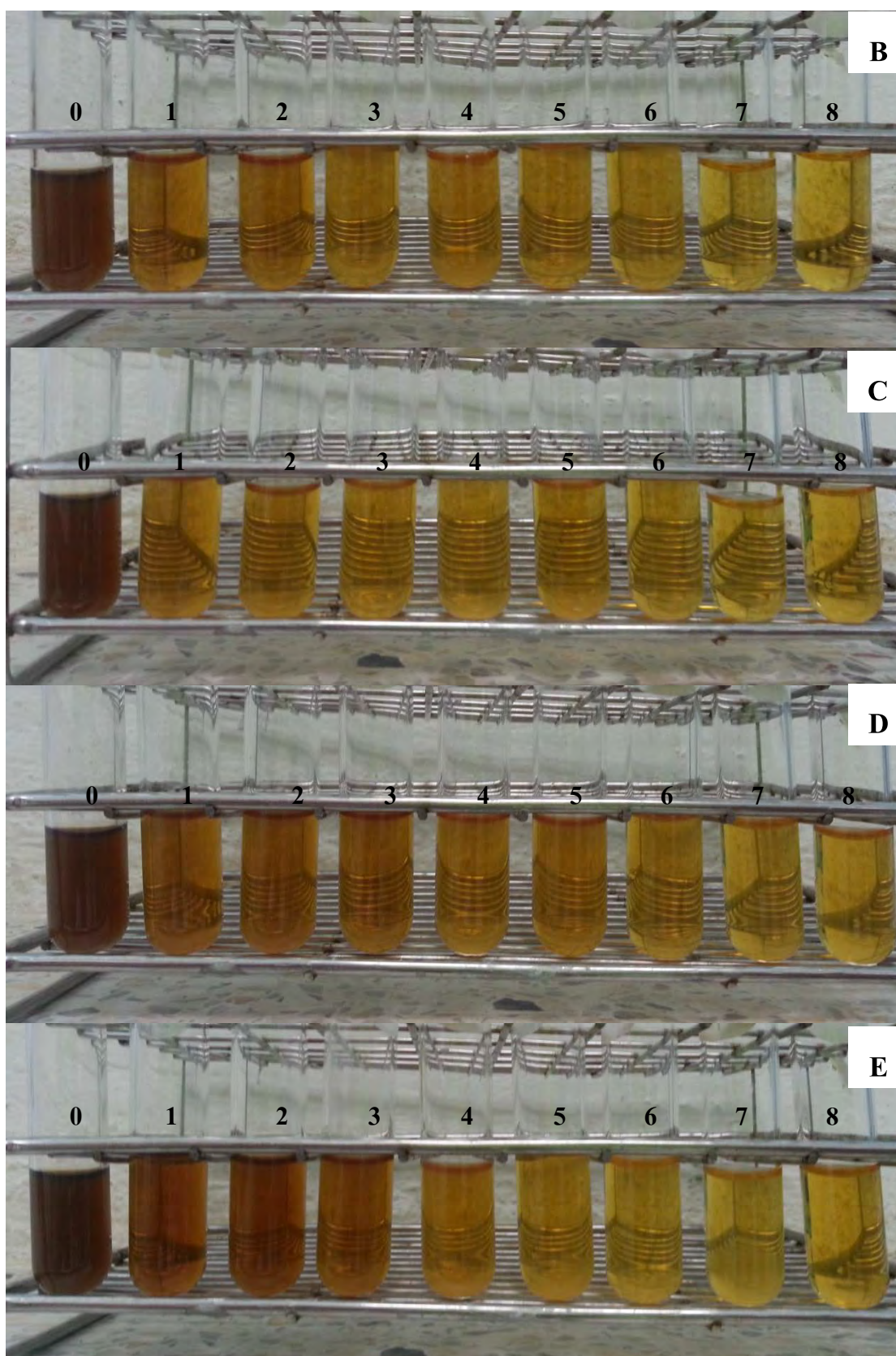




รูปที่ 4.21 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลเป็นระยะเวลา 4- 72 ชม. และบำบัดต่อโดยใช้ราไทรอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

สีของน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 มีความเข้มข้นสีที่ลดลงเล็กน้อย แต่น้ำทิ้งยังคงมีสีน้ำตาลคล้ำ หลังจากบ่มน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นร่วมกับราตรึงสีของน้ำทิ้งมีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 4.22 ซึ่งการบำบัดแบบสองขั้นตอนให้ผลของสีที่ลดลงมากกว่าการทดลองการแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้งและการเติมอาหารร่วม







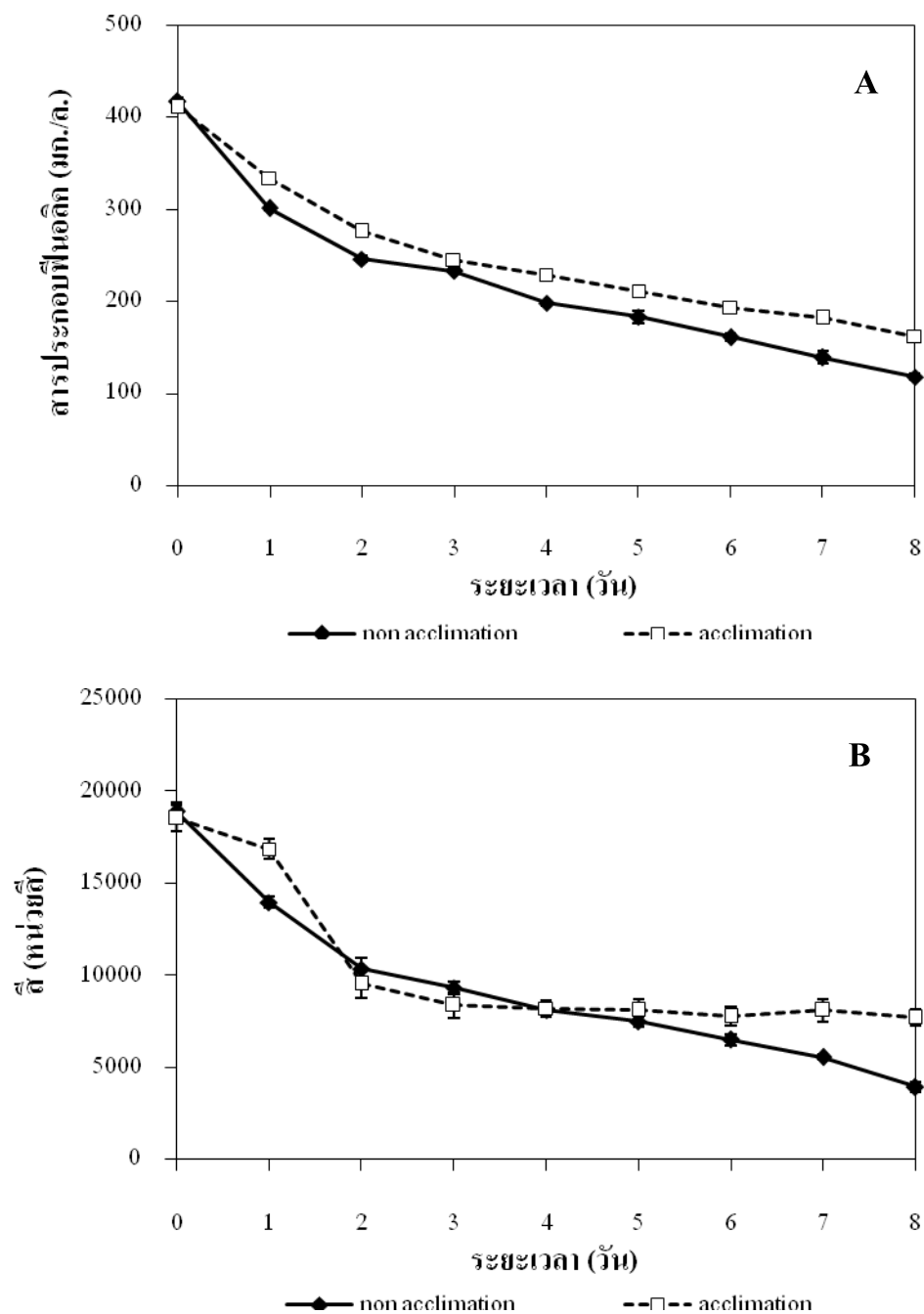
รูปที่ 4.22 การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลที่ระยะเวลา 4 ชม. (A), 8 ชม. (B) , 24 ชม. (C), 48 ชม. (D), 72 ชม. (E) และบำบัดต่อด้วยราไทรออสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เปรียบเทียบกับน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัด (F) เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 0-8 วัน

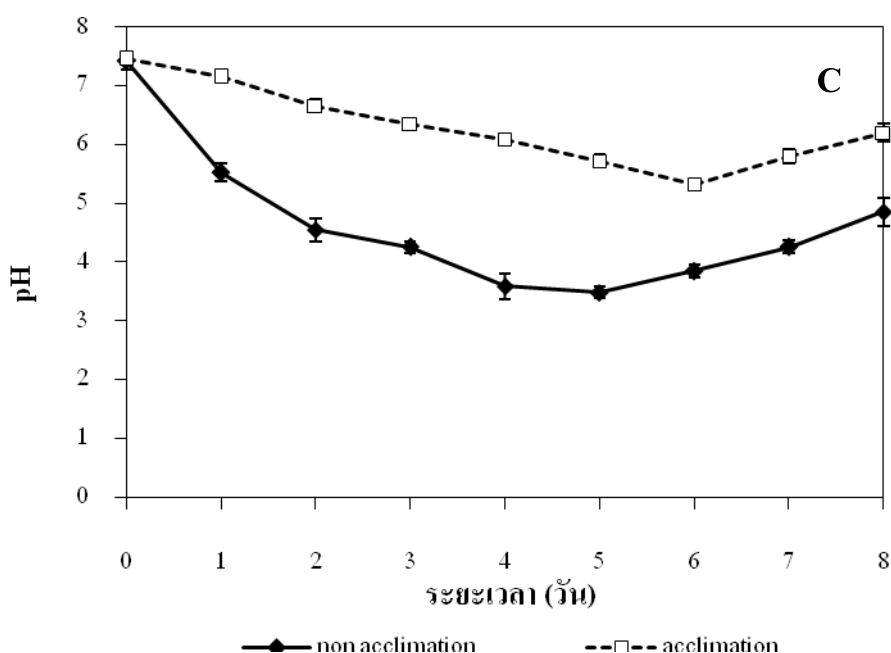
4.4.4 การปรับตัวของเซลล์ตรึง

ราไทรออสที่ถูตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 6 วันถูกนำมาศึกษาการปรับตัว ของเซลล์ตรึง โดยการเลี้ยงเซลล์ตรึงในน้ำทิ้งจากความเข้มข้นต่ำไปจนความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลา 3 วันในแต่ละความเข้มข้น เพื่อให้ราตรึงมีการปรับสภาพตามความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่สูงขึ้น โดยศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกเปรียบเทียบกับราตรึงที่ไม่ผ่านการปรับตัว พบว่าราตรึงที่มีการปรับตัวให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกเพียง 60.3% เมื่อบ่มราตรึงร่วมกับน้ำทิ้งเป็นเวลา 8 วัน ซึ่งต่ำกว่าราตรึงที่ไม่ผ่านการปรับตัวที่ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกถึง 71.4% ดังแสดงในรูปที่ 4.23A

ประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้งของราไทรออสที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันแบบผ่านการปรับตัวจะกำจัดสีได้อย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 3 ของการบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึง และค่อนข้างจะคงที่จนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม ซึ่งต่างจากราตรึงแบบไม่ปรับตัวซึ่งมีการกำจัดสีน้ำทิ้งอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 8 ของการบ่ม ดังแสดงในรูปที่ 4.23B ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกที่ลดลงของราตรึงที่ผ่านการปรับตัวอาจเกิดจากระยะเวลาของราตรึงที่มากขึ้นในช่วงที่ปรับตัวทำให้เส้นใยราที่เจริญมีความหนาแน่นมากขึ้นจึงส่งผลให้การแพร่ผ่านของสารและออกซิเจนลดน้อยลง สารประกอบฟีนอลิกและสีในน้ำทิ้งจึงถูกกำจัดได้น้อยลง ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวแตกต่างกับการทดลองของ Lu et al., (2009) ซึ่งใช้ราไทรออส *Phanerochaete chrysosporium* ตรึงบนเศษไม้และถูกทำให้แห้งด้วย vacuum freeze desiccators เพื่อการเก็บรักษา ราตรึงไว้ได้เป็นระยะเวลา 9 เดือนแล้วนำราตรึงที่เก็บรักษาไว้มาผ่านการกระตุ้นด้วยสารฟีนอลและปรับตัวในน้ำทิ้งของโรงงานถ่านหินที่เจือจาง 50% ก่อนใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งที่ไม่ได้เจือจาง พบว่าสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิกได้ถึง 87.05% ในระยะเวลาการบ่ม 6 วัน ทั้งนี้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากชนิดของราไทรออส ระยะเวลาในการตรึงเซลล์ และองค์ประกอบของน้ำเสียที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่บำบัดด้วยราไทรออสที่ผ่านการปรับตัว มีการเปลี่ยนแปลง pH เพียงเล็กน้อย โดยลดลงจาก 7.46 เหลือ 5.33 ในวันที่ 6 ของการบ่มร่วมกันของราตรึงกับน้ำทิ้ง และ pH

เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 7 และ 8 ของการบ่ม ดังแสดงในรูปที่ 4.23C ซึ่งแตกต่างจากราตรังแบบไม่ปรับตัวที่มี การลดลงของ pH อย่างต่อเนื่องและปรับสูงขึ้นในวันที่ 6 ถึง 8 ของการบ่ม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ pH ส่งผล ต่อการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยราไวท์รอก โดยราไวท์รอกสามารถเจริญและย่อยสลายสารได้ดีในช่วง 3.5- 5.5 (Boyle, 2006)

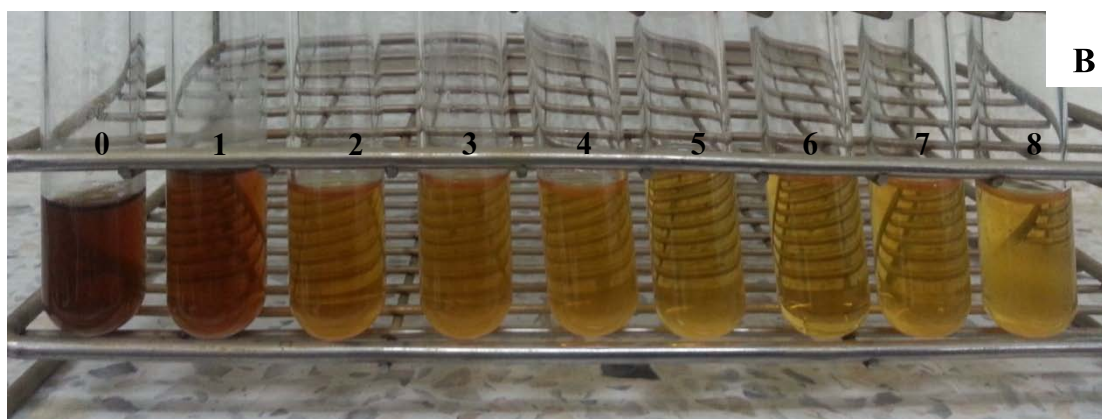




รูปที่ 4.23 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิก (A) การกำจัดสี (B) และการเปลี่ยนแปลง pH (C) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่บำบัดด้วย *Trametes hirsuta* AK4 ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับตัว บ่มในอุณหภูมิห้อง เขย่า 120 รอบต่อนาที

สำหรับลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยราไวท์รอสายพันธุ์ *Trametes hirsute* AK4 ที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันแบบที่ผ่านการปรับตัว มีการลดลงของสีที่ต่ำกว่าการทดลองการแปรผันความเข้มข้นน้ำทิ้ง การเติมอาหารร่วม และการบำบัดแบบสองขั้นตอนน้ำทิ้งมีการเปลี่ยนแปลงจากสีน้ำตาลคล้ำเป็นสีเหลืองที่มีระดับความเข้มสีที่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 4.24A และ B





รูปที่ 4.24 การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดด้วยราไทรออสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน แบบไม่ปรับตัว (A) และแบบปรับตัว (B)

จากการทดลองในการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของราไทรออสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน ด้วยวิธีต่างๆ พบว่าการบำบัดแบบสองขั้นตอนโดยการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบนทะลายปาล์มเปล่าเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง แล้วบำบัดต่อด้วยราไตรังจะทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกสูงถึง 82.2% และให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีสูงถึง 87% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 เนื่องจากการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมจะย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้ง ซึ่งช่วยลดความเป็นพิษที่จะเกิดขึ้นต่อราไตรัง ทำให้ราไตรังสามารถเจริญและย่อยสลายสารอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดสีในน้ำทิ้งได้ดี

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยราไทรออสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันด้วยวิธีต่างๆ

วิธีการศึกษา	การลดลงของ สารประกอบฟีนอลิก (%)	การลดลงของสี (%)
การเจือจางความเข้มข้นน้ำทิ้ง		
- 25%POME	37.5±4.4 ^g	85.9±3.2 ^{a,b}
- 50%POME	77.8±1.3 ^b	87.8±1.6 ^a
- 75%POME	64.3±1.2 ^e	81.2±1.8 ^{c,d}
- 100%POME	71.4±0.8 ^d	79.7±1.0 ^{d,e}
การเติมแหล่งอาหารร่วม		
- POME	71.4±0.8 ^d	79.7±1.0 ^{d,e}
- POME+1%glucose	62.9±0.8 ^e	77.1±1.1 ^e
- POME+1%NH ₄ Cl	74.0±0.9 ^c	81.1±0.7 ^{c,d}
- POME+1%glucose+1%NH ₄ Cl	76.1±0.8 ^{b,c}	85.0±0.9 ^{b,c}

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยราไวท์รอต *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันด้วยวิธีต่างๆ (ต่อ)

วิธีการศึกษา	การลดลงของ	การลดลงของสี
สารประกอบฟีนอลิก	(%)	(%)
การบำบัดแบบสองขั้นตอนนี้		
- 4 hr. Treated POME	76.4±0.7 ^{b,c}	82.2±1.4 ^c
- 8 hr. Treated POME	82.2±0.8 ^a	87.1±1.0 ^a
- 24 hr. Treated POME	81.9±0.6 ^a	84.8±0.6 ^{b,c}
- 48 hr. Treated POME	81.6±0.6 ^a	83.2±1.1 ^{b,c}
- 72 hr. Treated POME	82.0±1.0 ^a	79.7±1.0 ^{d,e}
- Non-treated POME	71.4±0.8 ^d	79.7±1.0 ^{d,e}
การปรับตัวของเซลล์ตรึง		
- Non Acclimation	71.4±0.8 ^d	79.7±1.0 ^{d,e}
- Acclimation	60.3±0.7 ^f	58.3±3.5 ^f

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแบบสองขั้นตอนนี้ซึ่งให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกถูกนำมาวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้งเปรียบเทียบกับน้ำทิ้งก่อนการบำบัด พบว่า pH ของน้ำทิ้งหลังบำบัดลดลงจาก 7.56 เหลือเพียง 5.03 ปริมาณ COD ลดลง 54.8% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 22,488 มก./ล. ส่วนค่า TKN, TP, Oil & Grease และ TSS มีค่าเท่ากับ 251, 11.7, 17 และ 240 มก./ล. คิดเป็น 79-99% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง เนื่องจากราไวท์รอตสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารได้และนอกจากนั้นพบว่าหลังการบำบัดสามารถกำจัดสีในน้ำทิ้งได้ 87% และกำจัดสารประกอบฟีนอลิกได้ 82% เมื่อวิเคราะห์ด้วย Folin ciocalteu's และ 88.3% เมื่อวิเคราะห์ด้วย 4-aminoantipyrine ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกตามมาตรฐานน้ำทิ้ง (APHA, AWWA and WEF, 2005) ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 คุณลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังบำบัดแบบสองขั้นตอนด้วยแบคทีเรียไตรังและราไทรอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

พารามิเตอร์	*ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง	**ก่อนบำบัด	***หลังบำบัด
pH	5.5-9.0	7.56	5.03
COD (มก./ล.)	400	22,488	10,144
TKN (มก./ล.)	200	1,212	251
TP (มก./ล.)	-	221	11.7
Oil & Grease (มก./ล.)	15	620	17
TSS (มก./ล.)	-	24,900	240
Total phenolics (มก./ล.)			
- 4-aminoantipyrine****	1	74.3	8.6
- Folin ciocalteu*****	-	475	81
Color (หน่วยสี)	ไม่พึงรังเกียจ	18,600	2,400

ที่มา: *ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2539) ลงวันที่ 14 มิถุนายน 2539 เรื่องกำหนดคุณลักษณะของน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงาน ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 52 ง ลงวันที่ 27 มิถุนายน 2539

** น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จังหวัดสตูลเก็บตัวอย่างวันที่ 30 ตุลาคม 2555

***น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และบำบัดต่อด้วยราไทรอทที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน

****4-aminoantipyrine ไม่สามารถวัดสารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งพาราได้

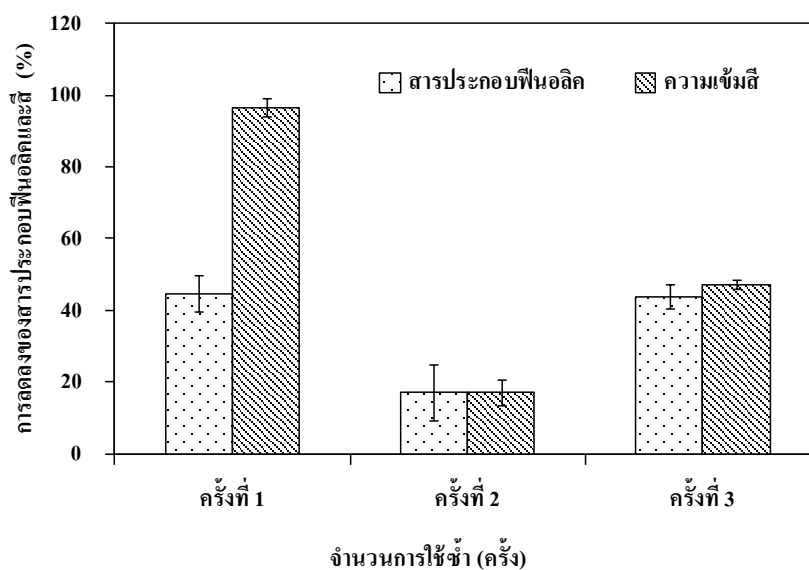
*****วิเคราะห์ด้วย Modification of the Folin-Ciocalteu method (Ergul *et al.*, 2011)

น้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเริ่มต้นมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก 1,206 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chantho *et al.*, 2013) และเมื่อผ่านระบบบำบัดน้ำเสียด้วยระบบแบบบ่อปรับเสถียร (บ่อดิน) ซึ่งมีจำนวน 4 บ่อ สามารถบำบัดสารอินทรีย์ในรูปของ BOD และ COD ได้ส่วนหนึ่ง รวมถึงสารประกอบฟีนอลิกให้เหลือ 475 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำทิ้งบ่อสุดท้าย ซึ่งยังมีค่าสูงกว่ามาตรฐาน และยังคงมีสีน้ำตาลคล้ำ เมื่อนำตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำเสียบ่อสุดท้ายมาทดสอบในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำทิ้งถูกบำบัดต่อการบำบัดน้ำทิ้งแบบสองขั้นตอนโดยบำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบนทะลายปาล์มน้ำมัน เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง แล้วบำบัดต่อด้วยราไทรอท *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน เป็นวิธีการที่มีศักยภาพสูงที่สุดในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยกระบวนการบำบัดที่เกิดขึ้นมีสาเหตุจากการย่อยสลายทางชีวภาพจากเอนไซม์ที่แบคทีเรียและราไทรอทสร้างขึ้นรวมกับกลไกในการดูดซับร่วมกันของวัสดุตรึงและเส้นใยราที่นำมาใช้ ทำให้สารอินทรีย์และองค์ประกอบอื่นๆในน้ำทิ้งมีค่าลดลง แม้ว่าจะยังไม่สามารถทำให้คุณลักษณะน้ำทิ้งบางพารามิเตอร์บรรลุตามค่ามาตรฐานที่กำหนด อย่างไรก็ตามความรู้ที่ได้จากผลการทดลองนี้ มีความจำเป็นในการนำไปพัฒนาต่อยอดในระบบขยายขนาดด้วยถึงปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งมีขนาดใหญ่

ขึ้นและสามารถบำบัดน้ำทิ้งได้อย่างต่อเนื่อง รวมทั้งการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในระบบขยายขนาดก็เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการบำบัดสารประกอบฟีนอลและสีด้วยวิธีการที่นำเสนอในรายงานฉบับนี้ได้ เพื่อเป้าหมายที่สำคัญนั้นคือคุณลักษณะน้ำทิ้งบรรลุตามค่ามาตรฐานที่กำหนด

4.5 การนำราตรึงกลับมาใช้งานซ้ำ

เมื่อนำราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมัน มาทดสอบการย่อยสลายสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งซ้ำ เพื่อดูประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง และยังคงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งได้เหมือนกับการใช้ครั้งแรกหรือไม่ ซึ่งช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ รวมถึงสามารถบ่งบอกประสิทธิภาพการใช้งานอย่างต่อเนื่องได้ในเบื้องต้น ในขั้นแรกเตรียมน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ถูกตรึงบนทะเลสาปาล์ม เมื่อผ่านการบำบัดขั้นต้นแล้วคงเหลือสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งประมาณ 158 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นสีเท่ากับ 12,800 หน่วยสี จากนั้นนำน้ำทิ้งดังกล่าวมาบำบัดด้วยราตรึง พบว่าในการใช้งานครั้งที่ 1 ราตรึงสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและสีในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นได้ถึง 44.3% และ 96.1% ตามลำดับ เมื่อบ่มราตรึงร่วมกับน้ำทิ้งเป็นระยะเวลา 8 วัน จากนั้นเทน้ำทิ้งที่เหลือออก พักราตรึงไว้เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงเติมน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นแล้วอีกครั้ง ถือเป็นการใช้งานครั้งที่ 2 พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและสีลดลงจากการใช้งานครั้งที่ 1 เหลือเพียง 17.2% และ 17.1% ตามลำดับ เมื่อบ่มน้ำทิ้งร่วมกับราตรึงเป็นเวลา 8 วัน แล้วเทน้ำทิ้งออก ปล่อยให้ราตรึงพักตัว 5 วัน แล้วจึงเติมน้ำทิ้งลงไปอีกครั้ง พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและสี เพิ่มขึ้นจากการใช้งานครั้งที่ 2 เป็น 43.8% และ 43.3% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.25 ทั้งนี้ประสิทธิภาพการนำราตรึงกลับมาใช้ซ้ำมีประสิทธิภาพต่ำลง อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายสีและสารประกอบฟีนอลของราตรึง รวมทั้งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพื้นผิววัสดุตรึง และการสะสมของสารประกอบฟีนอลที่ถูกดูดซับไว้โดยเส้นใยปาล์มน้ำมันซึ่งอาจทำให้ราตรึงเกิดความเสียหาย เมื่อมีการนำมาใช้ซ้ำหลายครั้ง อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าราตรึงมีศักยภาพในการนำมาใช้งานอย่างต่อเนื่องได้ หากมีการศึกษาวิธีการและระยะเวลาการพักตัวอย่างเหมาะสมก่อนนำไปใช้งานซ้ำ



รูปที่ 4.25 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลของราตริงหลังจากการใช้งานซ้ำ

4.6 การศึกษาในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่อเนื่อง

4.6.1 คุณลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ในจังหวัดสตูล พบว่าปริมาณ COD, BOD และ TSS มีค่าสูง คือ 22,488, 1,356 และ 24,900 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่า TKN, Oil & Grease และ TP เท่ากับ 1,212, 620 และ 221 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ตรวจพบ Phenols ประมาณ 74.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิเคราะห์ด้วยวิธี 4-aminoantipyrine) หรือ 475 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin ciocalteu reagent) ซึ่งมีค่าสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งที่กำหนดไว้ (ตารางที่ 3.7) ดังนั้นน้ำทิ้งดังกล่าวมีความจำเป็นต้องได้รับการบำบัดให้ผ่านเกณฑ์มาตรฐานก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

ตารางที่ 4.7 องค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้ในการศึกษา

พารามิเตอร์	*ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง	**น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
pH	5.5-9.0	7.5
BOD (มก./ล.)	ไม่เกิน 60 มก./ล.	1,356
COD (มก./ล.)	ไม่เกิน 400 มก./ล.	22,488
TKN (มก./ล.)	ไม่เกิน 200 มก./ล.	1,212
TP (มก./ล.)	-	221
TSS (มก./ล.)	ไม่เกิน 50 มก./ล.	24,900
Oil & Grease (มก./ล.)	ไม่เกิน 15 มก./ล.	620
Phenols (มก./ล.)		
- วิธี 4-aminoantipyrine	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	74.3
- วิธี Folin ciocalteu reagent	-	475

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

** น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จังหวัดสตูล เก็บตัวอย่างวันที่ 29 ตุลาคม 2555

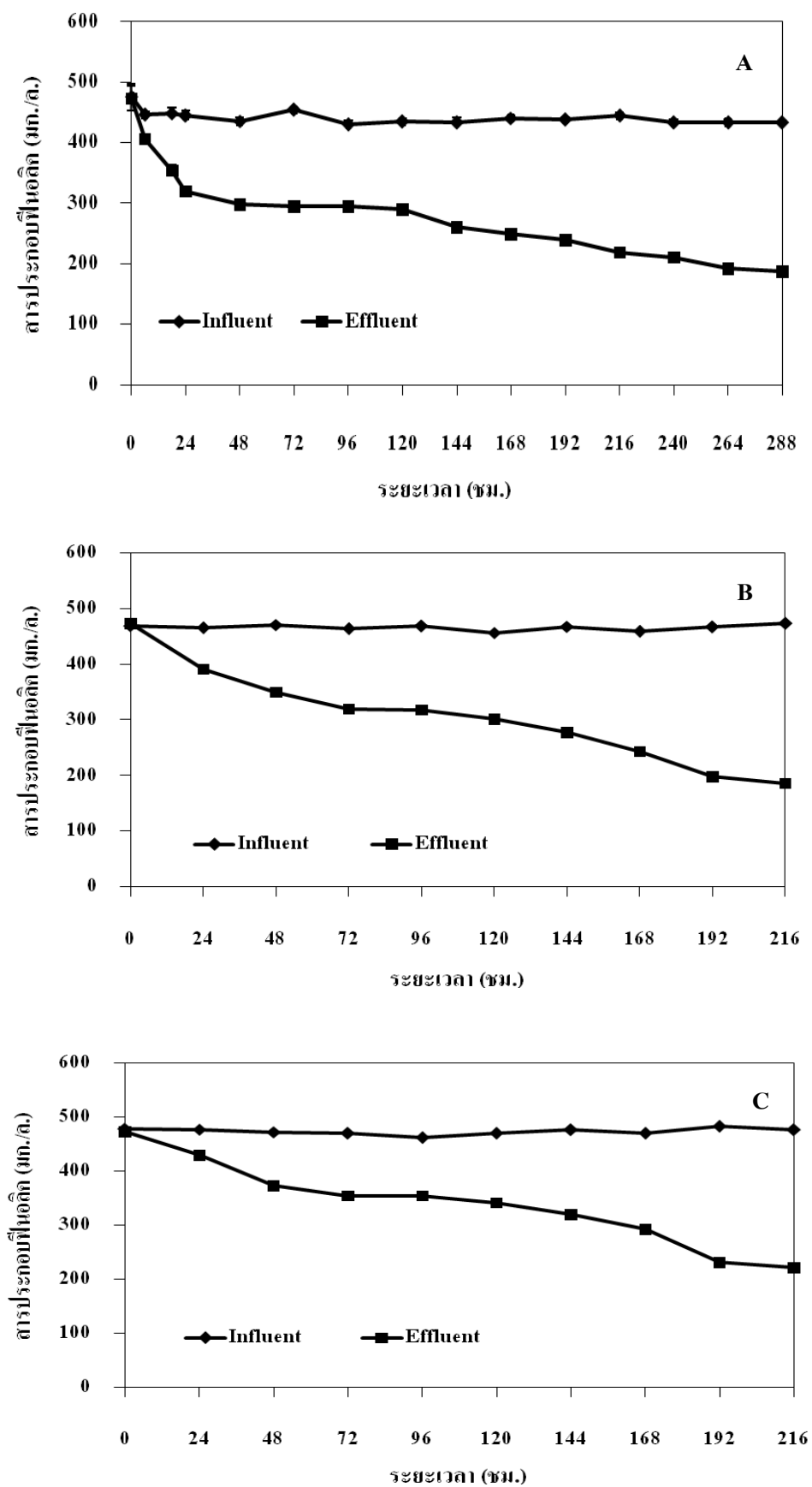
4.6.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของแบคทีเรียตรึงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกของแบคทีเรียตรึงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นการขยายขนาดการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยแบคทีเรียผสมที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า โดยนำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีสารประกอบฟีนอลเริ่มต้นประมาณ 475 มิลลิกรัมต่อลิตร มาบำบัดด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Internal loop airlift ซึ่งแปรผันปริมาณแบคทีเรียตรึง 60, 90 และ 110 กรัม และใช้ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 24.0 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.26 ระบบตัวกรองชีวภาพที่บรรจุเซลล์ตรึงและน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

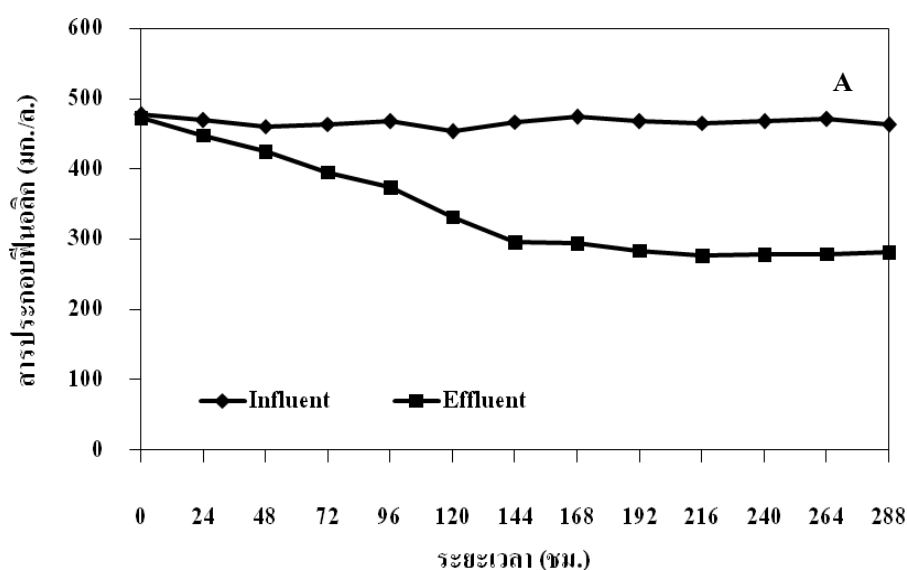
จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียตรึงในระบบตัวกรองชีวภาพมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลเริ่มต้นประมาณ 475 มก./ล. โดยปริมาณแบคทีเรียตรึง 60 กรัมมีอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และค่อยๆ ลดลงทีละน้อยจนเมื่อเวลาผ่านไป 288 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการบำบัดประมาณ 60% เหลือสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งเพียง 187.3 มก./ล. ดังแสดงในรูปที่ 4.27A ส่วนระบบตัวกรองชีวภาพที่เติมแบคทีเรียตรึง 90 กรัม มีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะเวลา 170 ชั่วโมง ให้ประสิทธิภาพในการบำบัดที่ค่อนข้างคงที่ เหลือสารประกอบฟีนอล 185.9 มก./ล. ให้ประสิทธิภาพการบำบัดประมาณ 60% (รูปที่ 4.27B) ส่วนปริมาณแบคทีเรียตรึงที่ 110 กรัมพบว่าแบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในช่วง 180 ชั่วโมงแรก สามารถลดปริมาณสารประกอบฟีนอลได้อย่างต่อเนื่องประมาณ 52.7% หลังจากชั่วโมงที่ 184-216 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลเริ่มคงที่และลดลงได้ 53.2% เหลือสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งประมาณ 221 มก./ล. ดังแสดงในรูปที่ 4.27C ซึ่งผลจากการแปรผันปริมาณแบคทีเรียตรึงนี้พบว่า ปริมาณแบคทีเรียตรึงที่ 90 กรัมให้ประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลในน้ำทิ้งสูงสุด และใช้ระยะเวลาน้อยที่สุดคือ 180 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียตรึงที่เติมลงใน ถังปฏิกรณ์ ชีวภาพนี้ส่งผล ต่อการกระจายตัว และ ประสิทธิภาพ การย่อยสลายฟีนอล ปริมาณแบคทีเรียตรึงที่น้อยเกิดการกระจายตัวได้ดีจึงย่อยสลายฟีนอลได้อย่างรวดเร็วในช่วงแรก แต่ประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อป้อนน้ำทิ้งอย่างต่อเนื่อง ปริมาณแบคทีเรียตรึงที่มากเกินไปจะลดการกระจายตัวของแบคทีเรียตรึง ทำให้เริ่มต้นย่อยสลายสารประกอบฟีนอลไม่ทันก ดังนั้นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการบำบัดสูงและใช้ระยะเวลาในการบำบัดน้อยจึงต้องศึกษาปริมาณแบคทีเรียตรึงที่ เหมาะสม ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่า ปริมาณแบคทีเรียตรึงที่ 90 กรัมเป็นปริมาณที่เหมาะสมกับระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ จึง เลือกใช้ปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวในการศึกษาถัดไป

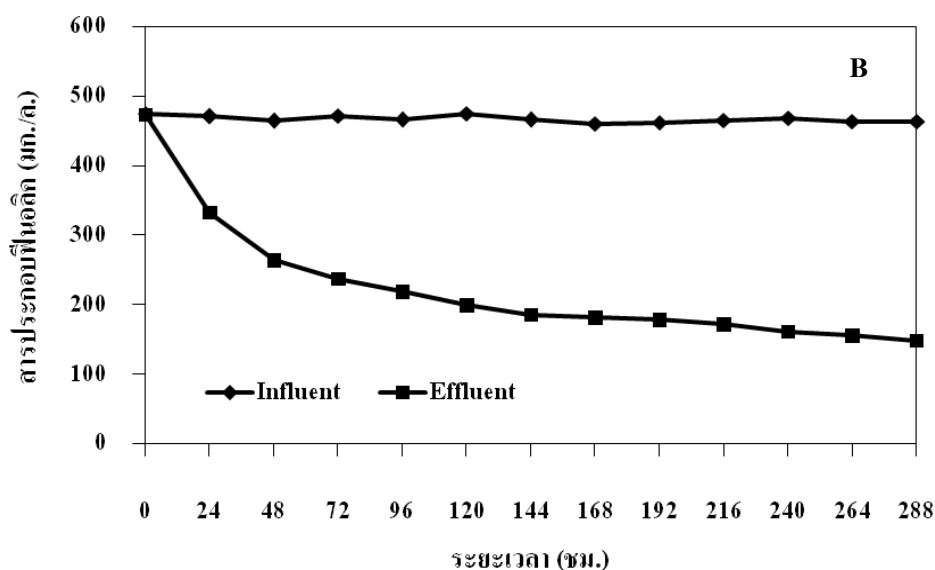


รูปที่ 4.27 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงในระบบตัวกรองชีวภาพที่แปรผัน

ปริมาณแบคทีเรียตรึง 60 กรัม (A), 90 กรัม (B) และ 110 กรัม (C)

เมื่อทราบปริมาณแบคทีเรียตรึงที่เหมาะสมแล้วจึงนำปริมาณแบคทีเรียตรึงที่เหมาะสม คือ 90 กรัม มาศึกษาระยะเวลาการกักเก็บน้ำ (Hydraulic retention time : HRT) โดยแปรผันค่า HRT เท่ากับ 12 และ 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลกับ HRT = 24 ชั่วโมงจากการศึกษาที่ผ่านมา ผลการศึกษาพบว่าเมื่อลด HRT ให้เหลือ 12 ชั่วโมง ทำให้แบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งลดลง เหลือสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งประมาณ 281 มก./ล. ทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดเหลือเพียงประมาณ 40% ที่ระยะเวลา 144 ชั่วโมง และค่อนข้างคงที่จนถึงระยะเวลา 288 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.28A ซึ่งการลด HRT ให้สั้นลง ทำให้ระยะเวลาที่น้ำทิ้งอยู่ในระบบตัวกรองชีวภาพลดลง ส่งผลให้แบคทีเรียตรึงย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งได้ลดลง แต่เมื่อเพิ่ม HRT เป็น 48 ชั่วโมง พบว่ามีประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลใกล้เคียงกับ HRT 24 ชั่วโมง ประมาณ 60% ตั้งแต่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งเหลือเพียง 148 มก./ล. ดังแสดงในรูปที่ 4.28B ดังนั้นการเพิ่มระยะเวลากักเก็บน้ำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจาก 24 ชั่วโมงเป็น 48 ชั่วโมง ส่งผลให้อัตราในการบำบัดสารประกอบฟีนอลสูงขึ้น การเลือกใช้ระยะเวลากักเก็บน้ำที่เหมาะสมเป็นข้อมูลที่สำคัญ สำหรับการนำแบคทีเรียตรึงไปใช้ในระบบ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นหรือนำไปใช้จริงกับระบบบำบัดน้ำเสีย ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เนื่องจากช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย และเวลาในการบำบัด





รูปที่ 4.28 ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลในระบบตัวกรองชีวภาพที่บรรจุแบคทีเรียตรึงปริมาณ 90 กรัม โดยแปรผันระยะเวลากักเก็บน้ำ 12 ชั่วโมง (A) และ 48 ชั่วโมง (B)

นอกจากประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลแล้ว ยังพบว่าระบบตัวกรองชีวภาพที่บรรจุแบคทีเรียตรึงปริมาณ 90 กรัม โดยแปรผันระยะเวลากักเก็บน้ำที่ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ให้ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งที่แตกต่างกัน เมื่อเพิ่มระยะกักเก็บน้ำจาก 12 ชั่วโมง เป็น 24 และ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียตรึงสามารถกำจัดสารอินทรีย์ในรูปของ COD ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสได้มากขึ้นตามลำดับ โดยมีการลดลงของ COD อยู่ในช่วง 65%-71% ไนโตรเจนลดลงประมาณ 85%-95% และกำจัดฟอสฟอรัสได้ถึง 87% -90% ดังแสดงในตารางที่ 4.8

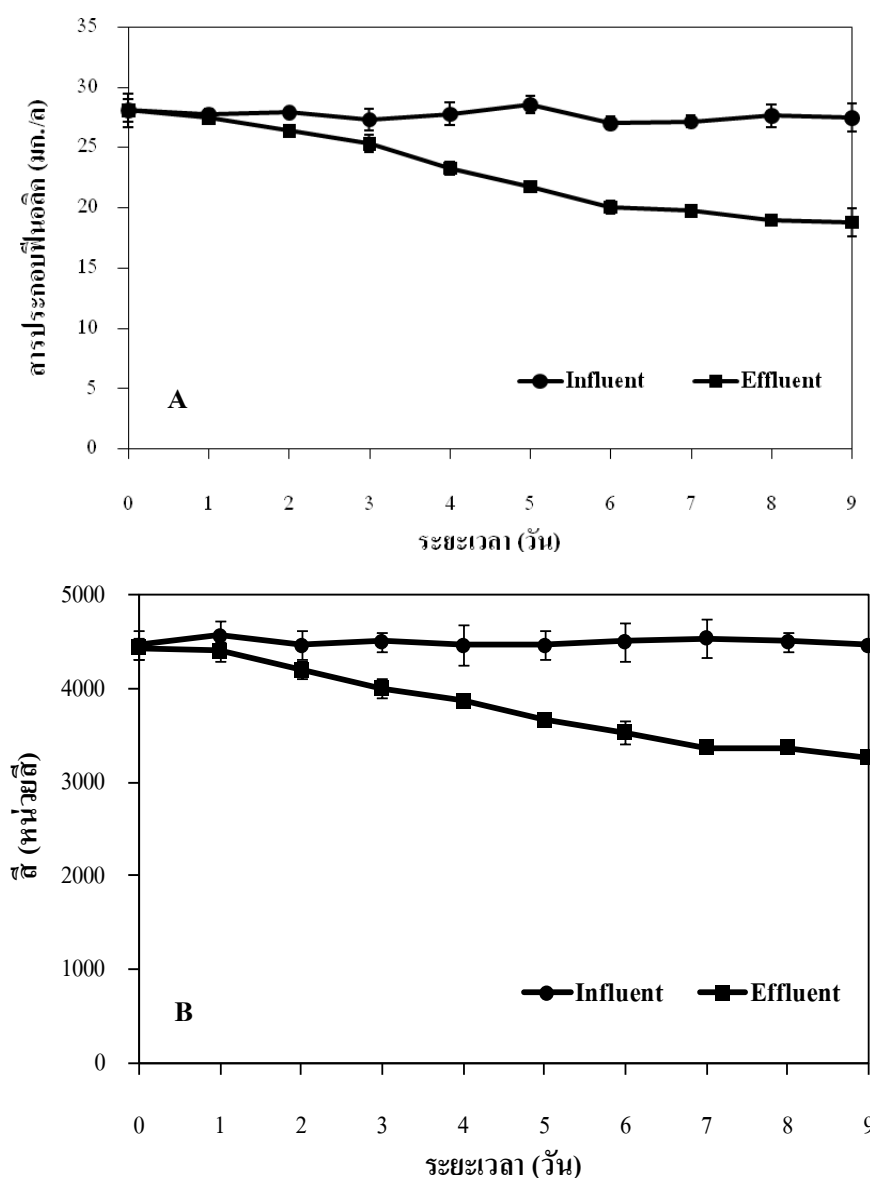
ตารางที่ 4.8 คุณลักษณะน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังการบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการแปรผันระยะเวลากักเก็บน้ำทิ้งเท่ากับ 12-48 ชั่วโมง

พารามิเตอร์	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด		
		ระยะเวลากักเก็บน้ำ (ชั่วโมง)		
		12	24	48
COD (มก. /ล.)	22,488	7,893	7,245	6,499
TKN (มก. /ล.)	1,212	181	125	60
TP (มก. /ล.)	221	28	26	22

4.6.3 การศึกษาประสิทธิภาพการ บำบัด สารประกอบฟีนอล และสี ของราไทรอทอดริงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

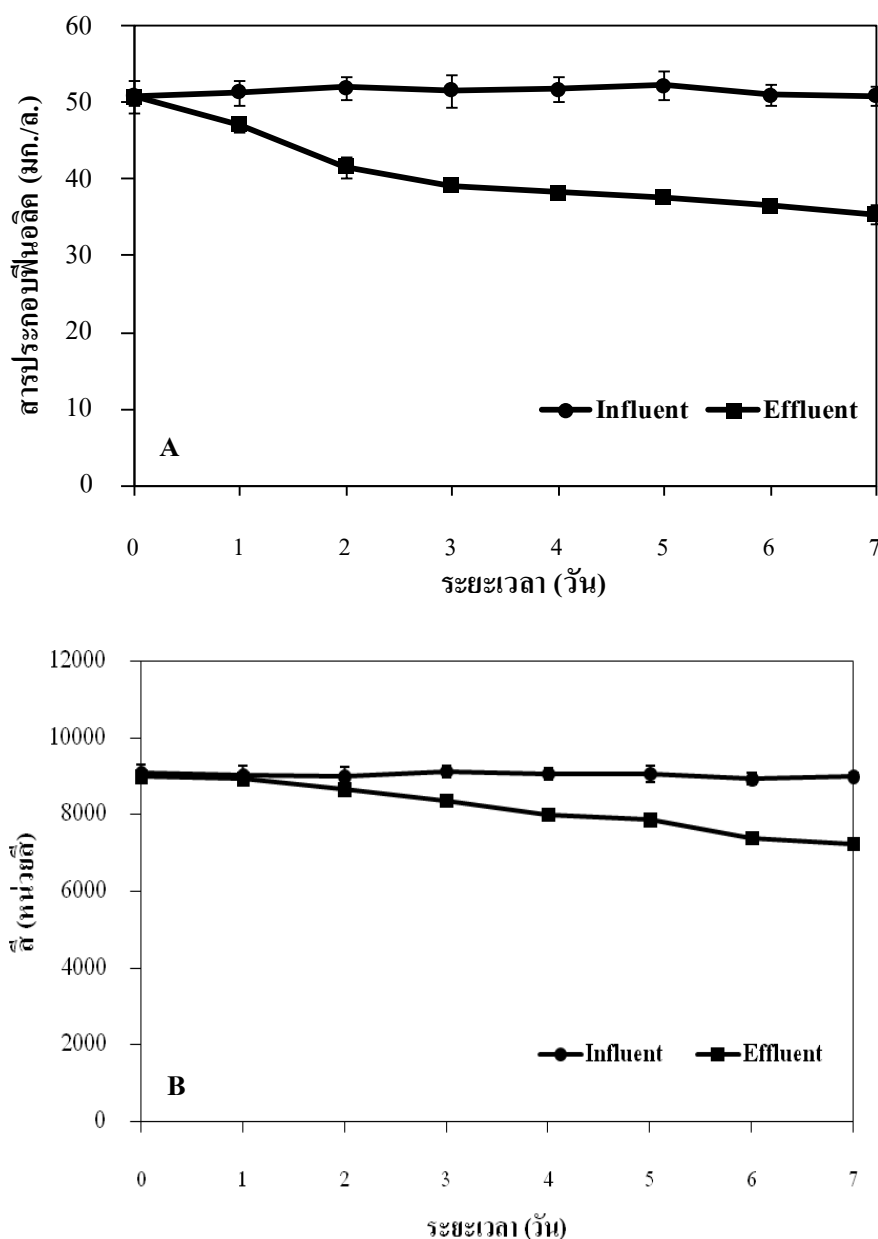
การศึกษาประสิทธิภาพของราไทรอทอดริงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นการศึกษาศักยภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมตรึงบนทะลายปาล์มเปล่า ซึ่ง

น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นแล้วยังคงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลเหลืออยู่ประมาณ 95 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนนำน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดเข้าไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีการเจือจางน้ำทิ้งให้มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 25% จนถึง 100% (ไม่เจือจาง) เพื่อศึกษาการปรับตัวของราไตรังต่อความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของน้ำเสีย และความเป็นไปได้ในการนำราไตรังมาใช้งานอย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มต้นใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นและเจือจางจนได้ความเข้มข้น 25% ทำให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลเริ่มต้นที่ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นอยู่ที่ 4,500 หน่วยสี เมื่อทำการป้อนน้ำทิ้งดังกล่าวเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีราไวท์รอตริงบนเส้นใยปาล์มอย่างต่อเนื่อง พบว่าราไตรังสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ประมาณ 35% และยังสามารถกำจัดสีของน้ำทิ้งได้ 27% ดังแสดงในรูปที่ 4.29A และ B



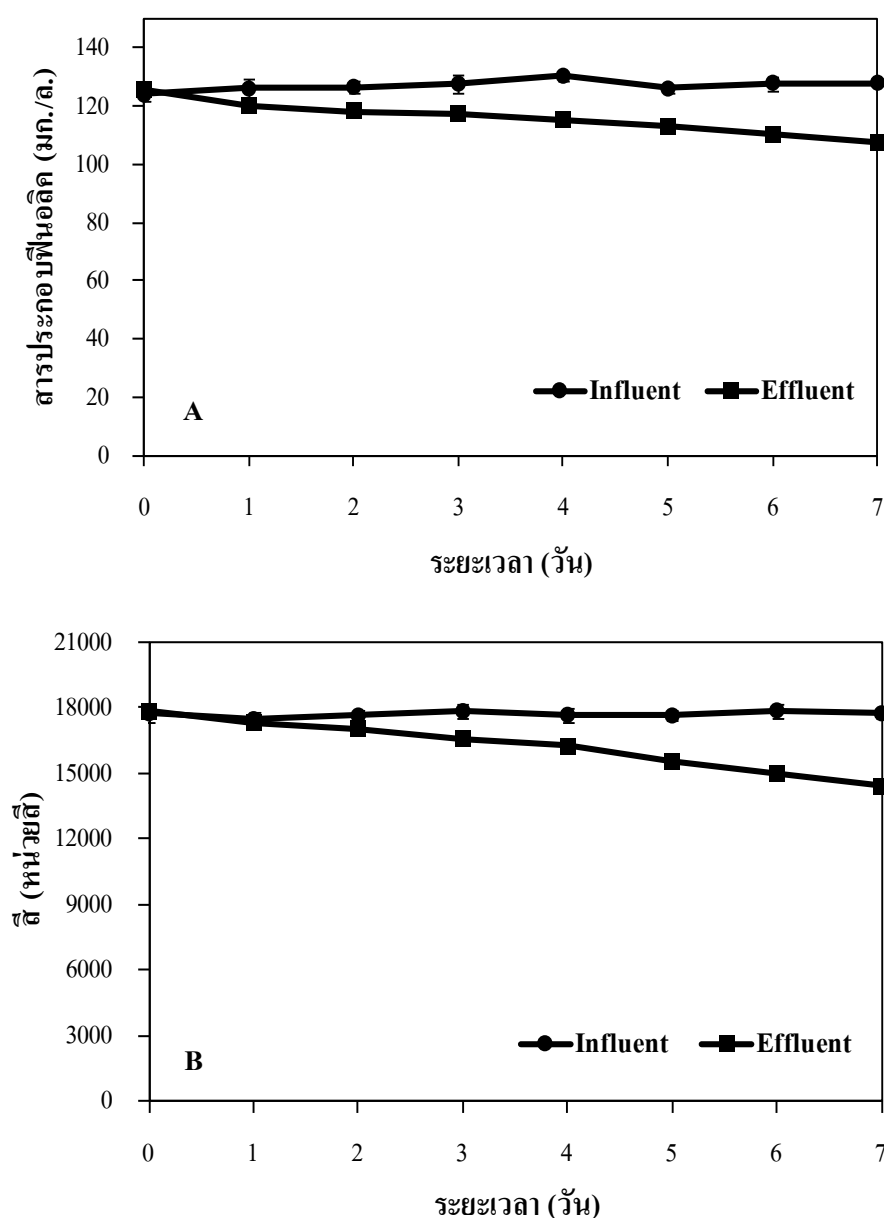
รูปที่ 4.29 ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอล (A) และสี (B) ของราไวท์รอตที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นและเจือจางจนได้ความเข้มข้น 25% ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เมื่อประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 25% เริ่มคงที่จึงหยุดการป้อนน้ำทิ้ง จากนั้นพักไว้ 2 วันพร้อมสเปรย์น้ำเพื่อเพิ่มความชื้นให้กับก้อนราตริง แล้วทำการป้อนน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นที่เชื้อจางจนได้ความเข้มข้น 50% ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลเริ่มต้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นสีประมาณ 9,000 หน่วยสี เมื่อป้อนน้ำเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอย่างต่อเนื่องพบว่าราตริงยังมียประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลและสีในน้ำทิ้ง โดยน้ำทิ้งที่ออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาณสารประกอบฟีนอล 35 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 30% ของการลดลง และมีความเข้มข้นสีลดลงเหลือเพียง 7,200 หน่วยสี คิดเป็น 20% ของการลดลง ในระยะเวลา 7 วันของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.30A และ B



รูปที่ 4.30 ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอล (A) และสี (B) ของราไวท์รอตที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นและเจือจางจนได้ความเข้มข้น 50% ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เมื่อประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลและสีของราไวท์รอตในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50% เริ่มคงที่ จึงทำการหยุดป้อนน้ำทิ้ง ปล่อยให้ราตรึงพักตัวเป็นระยะเวลา 2 วัน พร้อมสเปรย์น้ำกลั่นเล็กน้อยเพื่อเพิ่มความชื้นให้ราที่ผ่านการใช้งานแล้ว หลังจากนั้นจึงปล่อยน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นและไม่เจือจาง พบว่าราตรึงสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งได้ 16% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 124 มิลลิกรัมต่อลิตร และราตรึงสามารถกำจัดสีของน้ำทิ้งได้ 19% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 17,733 หน่วยสี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.31A และ B



รูปที่ 4.31 ประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบฟีนอล (A) และสี (B) ของราไวท์รอตที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นและไม่เจือจางในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

อย่างไรก็ตาม สีของน้ำทิ้งหลังผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยแบคทีเรียผสมและ บำบัดด้วย ไรโอโทรทรีริงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นระยะเวลา 7 วัน ยังคงมีสีน้ำตาลคล้ำ อาจเป็นผลมาจากระยะเวลาเก็บกักที่ไม่นานเพียงพอต่อการย่อยสลายสารสีที่ย่อยสลายได้ยาก การวิจัยในอนาคตควรมุ่งเน้นศึกษาหาระยะเวลาเก็บกักที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดสารสีในน้ำทิ้งต่อไป นอกจากนี้ระบบดังกล่าวทำให้คุณลักษณะของน้ำทิ้งก่อนและหลังบำบัดในแต่ละขั้นตอน เปลี่ยนแปลงไป ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ซึ่งลดค่า COD ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งที่เจือจางจนได้ความเข้มข้น 25% และ 50% ได้ประมาณ 27%-29%, 25%-29% และ 34%-51% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.9 คุณลักษณะน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังการบำบัดด้วยไรโอโทรทรีริงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

พารามิเตอร์	ก่อนบำบัด		หลังบำบัด	
	ความเข้มข้นน้ำทิ้งหลังเจือจาง		ความเข้มข้นน้ำทิ้งหลังเจือจาง	
	25%	50%	25%	50%
COD (มก. /ล.)	1,625	3,250	1,185	2,293
TKN (มก. /ล.)	15	30	10.6	22.4
TP (มก. /ล.)	5.5	11	2.7	7.3

จากผลการทดลองทั้งในระบบแบคทีเรียและระบบต่อเนื่อง มีความจำเป็นในการพัฒนาต่อยอดในระบบขยายขนาดด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งมีขนาดใหญ่ขึ้นและสามารถบำบัดน้ำทิ้งได้อย่างต่อเนื่อง รวมทั้งการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในระบบขยายขนาดก็เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกและสีด้วยวิธีการที่นำเสนอในรายงานฉบับนี้ได้ ซึ่งอาจมีการพัฒนาระบบบำบัดจนสามารถปล่อยน้ำทิ้งสู่แหล่งน้ำธรรมชาติโดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมต่อไปในอนาคต

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การคัดเลือกราไทรอฟที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การคัดเลือกราไทรอฟ 10 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการลดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยทดสอบบนอาหารแข็ง Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ที่มีการเติมน้ำทิ้งและในน้ำทิ้งที่มีการเจือจาง 2 เท่า ราไทรอฟสายพันธุ์ Unknown 04 ซึ่งถูกระบุสายพันธุ์คือ *Trametes hirsuta* AK4 เป็นราที่มีอัตราการเจริญสูง มีความทนทานต่อสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้ง และยังสามารถกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 50% ได้ถึง 64.7% และ 66.5% ตามลำดับ จากเดิมที่มีความเข้มสีประมาณ 9,333 หน่วยสีและสารประกอบฟีนอล 261 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงคัดเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5.1.2 การตรึงราไทรอฟบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน

ราไทรอฟ *Trametes hirsuta* AK4 ที่ถูกตรึงบนวัสดุพิเศษเหลือปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่าและเส้นใยปาล์มน้ำมัน สามารถเจริญยึดเกาะบริเวณผิวหน้าและภายในช่องว่างของวัสดุตรึงได้ดีและเมื่อนำราตรึงไปบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 50% พบว่าการแปรผันระยะเวลาการตรึงมีผลต่อการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอล โดยราไทรอฟที่ตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 6 วันให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้น 50% สูงที่สุดคือ 94% และ 80.6% ตามลำดับ และมีความแตกต่างกับชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ซึ่งการลดลงของสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งเกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพและการดูดซับของวัสดุตรึงร่วมกับเส้นใยรา โดยตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกที่เกี่ยวข้องต่อการย่อยสลายของสีและสารประกอบฟีนอลได้แก่เอนไซม์ Laccase และ Manganese peroxidase สูงสุดเท่ากับ 510 และ 3,046 ยูนิตต่อลิตร จึงคัดเลือกราตรึงบนเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 6 วัน

5.1.3 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้ง

การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านการเจือจาง (ความเข้มข้น 100%) ด้วยวิธีการ 1) การแปรผันความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่ระดับต่างๆ 2) การเติมแหล่งอาหารร่วม 3) การบำบัดแบบสองขั้นตอน และ 4) การปรับตัวของเซลล์ตรึง พบว่าการบำบัดแบบสองขั้นตอนโดยขั้นต้นจะใช้แบคทีเรียผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนทะลายปาล์มเปล่ามาบำบัดน้ำทิ้งที่ไม่เจือจางเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง และบำบัดต่อด้วยราตรึงบนเส้นใยปาล์มอีก 8 วัน ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลสูงสุดคือ 87.1% และ 82.2% ตามลำดับ จากเดิมที่น้ำทิ้งมีความเข้มสี 19,000 หน่วยสี และมีสารประกอบฟีนอล 461 มิลลิกรัมต่อลิตร และนอกจากนี้ น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดสามารถลด COD ได้ 54.8% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 22,488 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำให้ค่า TKN, TP, Oil & Grease และ TSS มีค่าใกล้เคียงค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง

5.1.4 การศึกษาในระบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่อเนื่อง

การศึกษาในระบบต่อเนื่องด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด airlift ขนาด 3 ลิตร จำนวน 2 ถัง พบว่า ปริมาณแบคทีเรียตรึง 90 กรัม และระยะเวลาที่เก็บน้ำ 48 ชั่วโมงให้ประสิทธิภาพในการบำบัด สารประกอบฟีนอลสูงที่สุดคือ 60% ภายในระยะเวลา 120 ชั่วโมง การบำบัดต่อในขั้นที่สองด้วยราตรึง ทำให้น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นและเจือจางจนได้ความเข้มข้น 25 %, 50% และไม่เจือจาง ลดสารประกอบฟีนอล และสีเพิ่มได้อีกประมาณ 16%-35% และ 19%-27% ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาหรือคัดเลือกวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมันชนิดอื่นๆ เช่น ทะลายปาล์มที่ผ่านการบีบอัด มาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์เพิ่มเติม เพราะโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบางแห่งจะนำทะลายปาล์มเปล่าไปบีบอัดเพื่อสกัดน้ำมันออกมา ทำให้ลักษณะทางกายภาพของทะลายปาล์มเปล่าเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม
2. การประยุกต์ใช้ราไทรอเทรียม โดยอาศัยราสายพันธุ์ที่สามารถทนทานและย่อยสลาย สารประกอบฟีนอลได้ร่วมกับราสายพันธุ์ที่สามารถกำจัดสีได้ดี เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงช่วยลดขั้นตอนและจำนวนถังปฏิกรณ์ในการบำบัดน้ำทิ้ง
3. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในระบบขยายขนาดเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งได้อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอัตราการให้อากาศ และระยะเวลากักเก็บน้ำ เป็นต้น
4. การศึกษาวิธีการใช้ประโยชน์จาก ชีวมวลของราที่ใช้งานแล้ว ได้แก่ การสกัดสารที่มีมูลค่า เช่น โปรตีน เอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระ หรือนำ ราตรึงไปทำปุ๋ยหมัก เป็นทางเลือกหนึ่งในการกำจัดของเสีย และนำวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้ให้เกิดประโยชน์

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2555. มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม (ออนไลน์). (15 กรกฎาคม 2555). Available from: <http://www.pcd.go.th>
- จินตนา แก้วบริสุทธิ์. 2541. การปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยกระบวนการดูดซับในชั้นตริง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธรรมศักดิ์ ศรีสุใส. 2547. การกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากไບซาฟารา , วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พินดา โต๊ะสุ. 2555. การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอริญ หันพงศ์กิตติกุล . 2533. กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือทิ้ง และคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม . วารสารสงขลานครินทร์. 12: 169-176.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ, อริญ หันพงศ์กิตติกุลและโสภา จันทโสภา. 2544. เปรียบเทียบน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการทางชีวภาพ ทางเคมี และทางกายภาพ. วารสารสงขลานครินทร์. 23: 807-819.
- วีรยุทธ์ จวนซ้าย. 2554. การผลิตและการเพิ่มมูลค่าของปุ๋ยหมักจากวัสดุเศษเหลือโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม , วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน. 2540. คู่มือการจัดการสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม. กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 80 น.
- โสภารวรรณ รัตนพันธุ์. 2547. การบำบัดและการกำจัดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเส้นใยเห็ด *Lentinus spp.*, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsaou, V. and Papanikolaou, S. 2003. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research*. 37: 3,897–3,904.
- Ahmad, A.L., Chong, M.F., Bhatia, S. and Ismail, S. 2006. Drinking water from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. *Desalination*. 191: 35-44.
- Ahmad, A.L., Ismail, S., and Bhatia, S. 2003. Water recycling from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. *Desalination*. 157:87-95.

- Ahmaadi, M. Vahabzadeh, F., Bonakdarpour, B., Mehranian, M. and Mofarrah, E. 2006. Phenolic removal in olive mill wastewater using loof-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 119-127.
- Aken, B.V., Hofrichter, M., Scheibner, K., Hatakka, A.I., Naveau, H. and Agathos, S.N. 1999. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation*. 10: 83– 91.
- Akhtar, M., Kirk, T.K. and Blanchette R.A., 1999. Advances in Applied and Fundamental Research, Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, pp.187-192. USA.
- 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.
- Alam, Md. Z., Muyibi, S. A., Mansor, M. F. and Wahid, R. 2007. Activated carbons derived from oil palm empty fruit bunches: Application to environmental problems. *Journal of Environmental Sciences*. 19: 103-108.
- Alaoui, S.M. Merzouki, M., Penninckx, M.J. and Benlemlih, M. 2008. Relationship between cultivation mode of white rot fungi and their efficiency for olive oil mill wastewater treatment. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11: 1-8.
- Annibale, A.D., Crestini, C., Vinciguerra, V. and Sermanni, G.G. 1998. The biodegradation of recalcitrant effluent from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology*. 61: 209-218.
- Annibale, A.D., Stazi, S.R. Vinciguerra, V., Mattia, E.D. and Sermanni, G.G. 1999. Characterization of immobilized laccase from *Lentinus edodes* and its use in olive mill wastewater treatment. *Process Biochemistry*. 34: 697-706.
- Annibale, A.D., Ricci, M., Quarantino, D., Federici, and Fenice, M. 2004. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology*. 155: 596–603.
- APHA, AWWA and WEF. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th edition. American Public Health Association. Washington DC.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995, Official Methods of Virginia, USA
- Assas, N., Ayed, L., Marouani, L. and Hamdi, M. 2002. Decolorization of fresh and stored-blank olive mill wastewater by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*. 38: 361-365.
- Attanun, T. and Chanchroensuk, J. 1999. Soil and plant analysis. Department of geology, Faculty of agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

- Aurora, D.S., and Gill, P.K., 2001, Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*. 77: 89-91.
- Baborova, P., Moder, M., Baldrian, P., Cajthamlova, K. and Cajthaml, T. 2006. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology*. 157: 248– 253.
- Baclocchi, E., Bietti, M., Francesca Gerini, M. and Lanzalunga O., 2002, The mediation of veratryl alcohol in oxidations promoted by lignin peroxidase: the lifetime of veratryl alcohol radical cation. *Biochemical and biophysical research communications*. 293: 832-835.
- Bajpai, P., Mehna, A. and Bajpai, P.K. 1993. Decolorization of kraft bleach plant effluent with the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Process Biochemistry*. 28: 387-384.
- Baker, T.W. and Worgan, J.T. 1981. The utilization of palm oil processing effect as substrate of microbial protein by fungus *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Applied Microbiology*. 11: 234-240.
- Bhatia, S., Othman, Z., and Ahmad, A.L. 2007. Coagulation-flocculation process for POME treatment using *Moringa oleifera* seeds extract: Optimization studies. *Chemical Engineering Journal*. 133: 205-212.
- Boyle, D. 2006. Effects of pH and cyclodextrins on pentachlorophenol degradation (mineralization) by white-rot fungus, *Journal of Environmental Management*. 80: 380–386.
- Cassidy, M.B., Lee, H. and Trevors, J.T. 1996. Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilized *Fusarium oxysporum* CCMI 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCMI 908. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 848–854.
- 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. Proceeding of the 2nd International Conference on Environmental Engineering, Science and Management. March 27-29. Pullman Khon Kaen Raja Orchid Hotel, 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: 281-287.
- Cohen, Y. 2001. Biofiltration-the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*. 77: 257–274.

- Crecchio, C., Ruggiero, P. and Pizzigallo, M.D. 1995. Polyphenoloxidases Immobilized in Organic Gel: Properties and Application in the Detoxification of Aromatic Compounds. *Biotechnology and Bioengineering*. 48: 585-591.
- Dias, A.A., Bezerra, R.M. and Pereira, A.N. 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and de phenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*. 92: 7-13
- Eilers, A., Rungeling, E., Stundl, U.M. and Gottschalk, G. 1999. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome P-450. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53: 75–80.
- Enayatzamir, K., Alikhani, H.A. and Rodríguez Couto S. 2008. Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*. 164(1): 296-300.
- Ergul, F.E., Sagin, S., Ongen, G. and Sukan F.V. 2009. Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 63: 1-6.
- Ergul, F.E., Sagin, S., Ongen, G. and Sukan F.V. 2011. Dephenolization and decolorization of olive mill wastewater through sequential batch and co-culture application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 107-114.
- Fadil, K. Chahlaoui, A. Ouahbi, A. Zaid, A. and Borja, R. 2003. Aerobic biodegradation and detoxification of wastewater from the olive oil industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 51: 37-41
- Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N. and Kornaros, M.E. 2002. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*. 36: 4,735-4,744.
- Gao, D., Du, L., Yang, J., Wu, W.N. and Liang, H. 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30(1): 70-77.
- Gavril, M. and Hodson, P.V. 2007. Chemical evidence for the mechanism of the biodecoloration of Amaranth by *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 103–124.
- Gomaa, O.M., Linz, J.E. and Reddy, C.A. 2008. Decolorization of Victoria blue by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 2,349–2,356.
- Gomathi, V., Cibichakravarthy, B., Ramanathan, A., Nallapeta, S., Ramanjaneya, V., Mula, R. and Jayasimha Rayalu, D. Decolourization of paper mill effluent by immobilized cell of *Phanerochaete chrysosporium*. *International Journal of Plant Animal and Environmental Sciences*. 2: 141-146.

- Hartley, C.W.S. 1977. Oil palm selection and breeding in the oil palm. Longman. Inc., New York. pp. 195-310.
- Hatakka, A. 2001. Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M, Steinbüchel A, editors. Biopolymers. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; pp. 129–180.
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbaure, M. and Szewzyk, U., 1998, Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(8): 2,788-2,793.
- Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 454-466.
- Hwang, T.K. Ong, S.M., Scow, C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm mill effluent. *Planter*. 54: 749-756.
- Katzbauer, B., Narodoslawsky, B. and Moser, A. 1995. Classification system for immobilization techniques. *Bioprocess Engineering*. 12: 173–179.
- Khalil, H.P.S.A., Mohamad, H, Kang, C.W., Fuaad, N.A. 2007. Agro-hybrid composite: the effects on mechanical and physical properties of oil palm fiber (EFB)/glass hybrid reinforced polyester composites. *Journal of Reinforced Plastic Composites*. 26(2): 203-218
- Kim, S., Park, C., Kim, T-H., Lee, J. and Kim, S-W. 2003. COD Reduction and decolorization of textile effluent using a combined process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95: 120-105.
- Kim, S.J. and Shoda, M. 1999. Batch decolorization of molasses by suspended and immobilized fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88: 586-589.
- Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B. and Angelidaki, I. 2010. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering* 105: 899–908.
- Kornilowicz-Kowalska, T., Ginalska, G., Belcarz, A. and Iglík, H. 2006. Microbial conversion of daunomycin wastes in unsteril soil inoculated with *Bjerkandera adusta* R59. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 70: 497–504.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, M.I., Marchant, R. and Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 21: 377–397.
- 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.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas, Wasilewska, M., Cho, N-S., Hofrichter, M., and Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 21: 175–185.
- Levin, L., Papinutti, L. and Forchiassin, F., 2004. Evaluation of argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzyme and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*. 94: 169-176.
- Li, K., Xu, F., and Eriksson, K.E. 1998. Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of non-phenolic lignin model compound. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 2,654-2,660.
- Li, X. and Jia, R. 2008. Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull *Schizophyllum* sp. F17 under solid-state condition in a continuous flow packed-bed bioreactor. *Bioresource Technology*. 99: 85–92.
- Limkhuanuwan, V. and Chaiprasert, P. 2010. Decolorization of molasses melanoidins and palm oil mill effluent phenolic compounds by fermentative lactic acid bacteria. *Journal of Environmental Sciences*. 22: 1,209–1,217.
- Lu, Y., Yan, L., Wang, Y., Zhou, S., Fu, J. and Zhang, J. 2009. Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials* 165: 1091–1097.
- Ma, A. N., 2000. Environmental Management for the Oil Palm Industry. *Palm Oil Development* 30: 1-10.
- Marco-Urrea, E., Parella, T., Gabarrell, X., Caminal, G., Vicent, T. and Adinarayana Reddy, C. 2008. Mechanistics of trichloroethylene mineralization by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Chemosphere*. 70: 404–410.
- Mohammadi, A. and Nasernejad, B. 2009. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. *Journal of Hazardous Materials*. 161: 534–537.
- Ng Mei Han and Choo Yuen May. 2012. Determination of Antioxidants in Oil Palm Empty Fruit Bunches. *American Journal of Applied Sciences*. 9(11): 1,862-1,867.
- Obuekwe, C. O. and Al-Muttawa, E. M., 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. *Biotechnology Letters*. 23: 1,025–1,032.

- Park, C., Lee, B., Han, E.J., Lee, J. and Kim, S. 2006. Decolorization of Acid Black 52 by fungal immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 371–374.
- Park, C., Lee, M., Lee, B., Kim, S., Chase, H., Lee, J. and Kim, S. 2007. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. *Biochemical Engineering Journal*. 36:59-65.
- Radha, K.V., Regupathi, I., Arunagiri, A. and Murugesan, T. 2005. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Process Biochemistry*. 40: 3,337–3,345.
- Rakamthong, C. and Prasertsan, P. 2011. Decolorization and phenol removal of anaerobic palm oil mill effluent by *Phanerochaete chrysosporium* ATTC 24725. TIChE International conference 2011, November 10-11, Songkhla, Thailand.
- Rodrigues, Y., Clarissa, F.S., Dasio, R.M. and Vazquez-Duhalt, R., 1999, Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*. 38: 27-32.
- Rodriguez Couto, S. 2009. Dye removal by immobilised fungi: a review. *Biotechnology Advance*. 64: 167–172.
- Rodriguez Couto, S., Osma J.F., and Toca Herrera, J.L. 2008. Effective-cost production of laccase: reutilisation of a natural adsorbent. 4th European Meeting on Oxizymes, Helsinki. Finland.
- Rodriguez Couto, S., Sanroman, M.A., Hofer, D. and Gübitz, G.M. 2004. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorisation of dyes from a leather factory. *Engineering in Life Sciences*. 4: 233–237.
- Ruttimann-Johnson, C. and Lamar, R.T. 1997. Binding of pentachlorophenol to humic substances in soil by the action of white rot fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 29: 1143–1148.
- Santhy, K. and Selvapathy. P. 2005. Removal of reactive dyes from wastewater by adsorption on coir pith activated carbon. *Bioresource Technology*. 97(11): 1,329-1,336.
- Sapers, G.M. and Miller, R.L. 1993. Control of enzymatic browning in pre-peeled potatoes by surface digestion. *Journal of Food Science*. 58: 1,076-1,078.
- Schliephage, K. and Lonergan, G.T. 1996. Laccase variation during dye decolorisation in a 200 L packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*. 18: 881–886.
- Shin, M., Nguyen, T. and Ramsay, J. 2002. Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:218–223.
- Sundram, K., Sambanthamurthi R. and Tan, Y.A. 2003. Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 12: 355-362.

- Svobodov, K., Majcherczyk, A., Novotn, C. and Kues, U. 2008. Implication of mycelium associated Laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresource Technology*. 99: 463–471.
- Tekre, M., Mswaka, A.Y., Vauya, R.Z. and Read, J.S. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 28: 420-426.
- Tieng, YP. and Sun, G. 2000. Use of polyvinyl alcohol as a cell entrapment matrix for copper biosorption by yeast cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 75: 541– 546.
- Torrecilla, J.S. 2010. Phenolic compounds in olive mill wastewater, olive and olive oil .in health and disease prevention. Amsterdam.
- Tychanowicz, G.K., Zilly, A., Marques de Souza, C.G. and Peralta, RM. 2004. Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. *Process Biochemistry*. 39:855–859.
- Vahabzadeh, F., Mehranian, M. and Saatari, A.R. 2004. Color removal ability of *Phanerochaete chrysosporium* in relation to lignin peroxidase and manganese peroxidase produced in molasses wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20: 859–864.
- Valentin, L., Feijoo, G., Moreira, M.T. and Lema, J.M. 2006. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 58: 15–21.
- Valentin, L., Lu-Chau T.A., Lopez, C., Feijoo, G., Moreira, M.T. and Lema, J.M. 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *Process Biochemistry*. 42: 641–648.
- Wang, S. 2008. A comparative study of Fenton and Fenton-like reaction kinetics in decolourisation of wastewater. *Dyes Pigments*. 76: 714-720
- Wesenberg, D., 2003, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22: 161-187.
- Wong, W.S. 2008. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 157(2): 174-209.
- Wu, Y. T., Mohammad, W. A., Jahim, Md. J. and Anuar, N. 2009. A holistic approach to managing palm oil mill effluent (POME): Biotechnological advances in the sustainable reuse of POME. *Biotechnology Advances*. 27: 40–52.
- Xavier, A.M.R.B., Evtuguin, D.V., Ferreira, R.M.P. and Amado, F.L. 2001. Laccase production for lignin oxidative activity. Proceeding of 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, 4-8 June, Helsinki, Finland.

- Zhu, Y.X., Sun, H.Y. and Cao, G.L. 2005. The comparative study on decoloration efficiency of polysaccharide from wildness *Pleurotus ostreatus*. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*. 22: 1,070–1,073

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato infusion	4.0	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20.0	กรัมต่อลิตร
Bacteriological agar	15.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Difco) 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุขวด ปิดจุกด้วยสำลี ครอบด้วยกระดาษ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเทลงใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ก.2 Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Yeast extract	2.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	10.0	กรัมต่อลิตร
Dextrose	40.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัม ต่อลิตร

นำ Yeast extract 2 กรัม Peptone 10 กรัม และ Agar 15 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บน hot plate คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงเติม dextrose 40 กรัม ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 5.0-5.5 ถ้า pH ต่ำเกินไปให้ปรับด้วย 1N NaOH แต่ถ้า pH สูงเกินไปให้ปรับด้วย 1 N HCl บรรจุขวด ปิดจุกด้วยสำลี ครอบด้วยกระดาษ นำไปนึ่งด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเทลงใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ก.3 Glucose Yeast Extract Broth (GYEB)

Yeast extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	100.0	กรัมต่อลิตร

นำ Yeast extract 10 กรัม และ Glucose 100 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บน hot plate คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุขวด ปิดจุกด้วยสำลี ครอบด้วยกระดาษ นำไปนึ่งด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสี

ข.1 กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

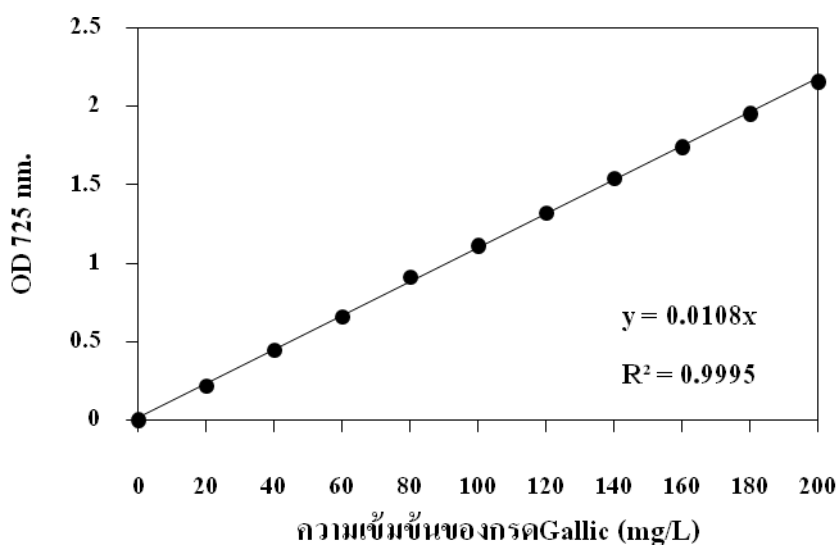
เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรด Gallic ความเข้มข้น 500 mg/L โดยชั่ง Gallic acid monohydrate (Sigma) 0.55 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานของกรด Gallic มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 -200 mg/L โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานของกรด Gallic ความเข้มข้น 500 mg/L และเติมน้ำกลั่นตามปริมาตรดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข.1

ตารางภาคผนวกที่ ข.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดGallic ความเข้มข้น 20-200 mg/L

ความเข้มข้น (mg/L)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน (mL)	ปริมาตรน้ำกลั่น (mL)
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

ปิเปตสารละลายกรดGallic ความเข้มข้น 20-200 mg/L ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน Folin-Ciocalteu phenol reagents ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติม 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 200 g/L ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm ใช้ น้ำกลั่นที่ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank นำค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของกรดGallic (รูปภาคผนวกที่ ข.1)



รูปภาคผนวกที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของกรด Gallic

ข.2 กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สี

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

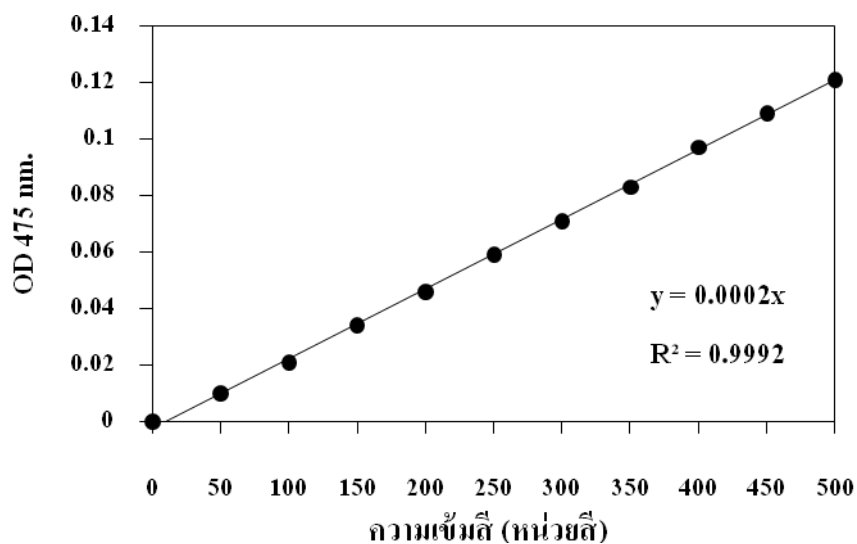
เตรียมสารละลายมาตรฐานแพลททินัมโคบอลต์ความเข้มข้น 500 หน่วยสี โดยชั่ง potassium chloroplatinate 0.1246 กรัม และ cobalt (II) chloride 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่มีกรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานแพลททินัมโคบอลต์ความเข้มข้น 500 หน่วยสี จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่ได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50-500 หน่วยสี โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐาน และเติมน้ำกลั่นตามปริมาตรดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข.2

ตารางภาคผนวกที่ ข.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแพลททินัมโคบอลต์ความเข้มข้น 50-500 หน่วยสี

ความเข้มข้น (หน่วยสี)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน (mL)	ปริมาตรน้ำกลั่น (mL)
50	0.5	4.5
100	1.0	4.0
150	1.5	3.5
200	2.0	3.0
250	2.5	2.5
300	3.0	2.0
350	3.5	1.5
400	4.0	1.0
450	4.5	0.5
500	5.0	0.0

การสร้างกราฟมาตรฐาน

นำสารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์ความเข้มข้น 50-500 หน่วยสีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์ (รูปภาคผนวกที่ ข.2)



รูปภาคผนวกที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแพลทตินัมโคบอลต์

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อจำแนกสายพันธุ์ราไวท์รอต Unknown 04

ค.1 วิธีการวิเคราะห์

การเพาะเลี้ยงและเก็บตัวอย่างเชื้อรา

เลี้ยงราไวท์รอต Unknown04 บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4-16 สัปดาห์ ทำการเก็บเส้นใยของราไวท์รอตบริเวณผิวหน้าของอาหารแข็งในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการสกัด DNA

เติม Extraction buffer (1% CTAB, 0.7 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) ลงในตัวอย่าง บดตัวอย่างในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2 มิลลิลิตร ปริมาตรโดยการเติม Extraction buffer 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างส่วนใสในหลอดหลอดใหม่ที่มี phenol-chloroform-isoamyl alcohol เขย่าให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างบนไปยังหลอดใหม่ที่มี 7.5 M ammonium acetate จากนั้น DNA จะถูกตกตะกอนด้วย Ethanol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทั้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ตกตะกอน DNA จะถูกล้างด้วย 70% Ethanol ที่เย็น และถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตกตะกอน DNA จะถูกละลายด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0)

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR และการทำ DNA sequencing จะใช้ primer ของ the internal transcribed spacer region (ITS) โดยเฉพาะ ITS4 และ ITS5 (White et al., 1990; Bunyard et al., 1994; Landvik 1996) การเพิ่มปริมาณ DNA ถูกทำใน 50 µl ของส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย 10 mM ของ dNTP (1 µl), 10 µM ของไพรเมอร์แต่ละตัว (1 µl), 10% ของ dilution buffer (5 µl), 25 mM ของ Mg (5 µl), 4 M ของ enhancer (5 µl) และ 60-62% ของ น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (30.8 µl), 0.2 µl ของ Taq DNA polymerase kit จาก FERMENTAS และ 10-50 ng ของ genomic DNA template (1 µl) ทำปฏิกิริยาโดยใช้ PCR Model MJ Research DYAD ALD ในหลอดขนาด 200 µl (95°C, 0.5 min; 52°C, 1 min; 72°C, 1.5 min; 35 cycles). PCR products (7 µl aliquots) ถูกทดสอบโดยวิธี electrophoresis ใน 1% agarose gels กับ 0.003% ethidium bromide ใน 0.5xTBE buffer (0.044 M Boric acid, 1.1 mM EDTA, 0.045 M Tris, pH 8) เพื่อการทำให้บริสุทธิ์

การทำบริสุทธิ์ DNA และการทำ DNA sequencing

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ NucleoSpin® Extract Kit (Macherey-Nagel, Germany) และศึกษาลำดับเบสโดยบริษัท MacroGen โดยใช้ไพรเมอร์ตัวเดียวกับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

การวิเคราะห์ Phylogenetic

ลำดับเบสจะถูกตรวจสอบด้วยโปรแกรม BioEdit 7.0.9.1 (Hall 1999) ลำดับเบสที่สอดคล้องกันของ DNA แต่ละส่วนจะถูกจัดตำแหน่งโดย Clustal W 1.6 (Thompson et al., 1994) จากนั้นตรวจสอบกับฐานข้อมูล Genbank หา accession number เพื่อประกอบกันเป็น Phylogenetic tree และ BLAST ข้อมูลหาความคล้ายกันมากที่สุด

ค.2 ผลการวิเคราะห์

จากการวิเคราะห์ทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของราไทรอท Unknown04 พบว่าเมื่อนำตัวอย่างเชื้อรามาสกัด DNA และเพิ่มจำนวน DNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) และทำ DNA sequencing เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-4 บน 18S rDNA พบว่าบริเวณดังกล่าวมี 605 นิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในรูปภาคผนวก ค. 1 และเมื่อนำลำดับ นิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1-4 บน 18S rDNA ของราไทรอท Unknown04 มีความใกล้เคียงกับราไทรอทสายพันธุ์ *Trametes hirsuta* ถึง 99% จึงสามารถระบุสายพันธุ์ของราไทรอท Unknown04 ว่าเป็น *Trametes hirsuta* AK4

```
TTCCGGGGGGGGGGCTCGGAAGGATCATTAACGAGTTTTGAAATGGGTTGTTGCTGGCCTTCC
GAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGTTGGCGTGGGTTTCTAG
CCTCCGGGCTGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTACACTACAACTCTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGT
CTAACGCATCTTAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGG
TATTCGGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGAAATTCTCAACCCATAAGTCCTTGTGATCTATGGGCT
TGGATTTGGAGGCTTGCTGGCCCTAGCGGTGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTGATTCCGTGCGGATC
GGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGCGTTTTGGCAAGCTTCTAACCCTCCATTAG
GACAATCTTCAACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTT
```

รูปภาคผนวกที่ ค.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1-4 บน 18S rDNA ของราไทรอท Unknown 04

ภาคผนวก ง

ง.1 ผลผลิต (Output) ที่ได้จากโครงการ

การนำเสนอผลงานวิจัยรูปแบบปากเปล่าในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

Kietkwanboot, A., Hanh, T-M., and Suttinun, O. Decolorization and Biodegradation of Phenolic Compounds in Palm Oil Mill Effluent by White Rot Fungi Immobilized on Oil Palm Residues. Proceedings of the 2nd International Conference on Environmental Engineering, Science and Management, March 27-29, 2013, Pullman Khon Kaen Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand.

การเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Kietkwanboot, A., Hanh, T-M., and Suttinun, O. Potential of immobilized *Trametes hirsuta* AK4 for phenolic compounds and color removal from treated palm oil mill effluent (In preparation)