

การพัฒนากระบวนการกรองชีวภาพสำหรับการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้ง
โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัด



นางสาวปิยะมาศ คงแถม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF BIOFILTRATION SYSTEM FOR TREATMENT OF
PHENOLIC COMPOUNDS IN PALM OIL MILL EFFLUENT AND METHANE PRODUCTION
FROM THE TREATED EFFLUENT

Miss Piyamart Khongkhaem



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาระบบการกรองชีวภาพสำหรับการบำบัด สารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและการ ผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัด
โดย	นางสาวปิยะมาศ คงแถม
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง ดร. อมรารวรรณ อินทศิริ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. อมรารวรรณ อินทศิริ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. อรมาศ สุทธิรัตน์)

ปิยะมาศ คงแถม : การพัฒนาระบบการกรองชีวภาพสำหรับการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัด (DEVELOPMENT OF BIOFILTRATION SYSTEM FOR TREATMENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN PALM OIL MILL EFFLUENT AND METHANE PRODUCTION FROM THE TREATED EFFLUENT) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. อรุณทัย ภิญญาคง, ดร. อมรารวรรณ อินทศิริ, 192 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาให้มีประสิทธิภาพสูง และพัฒนาระบบการกรองชีวภาพที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเพื่อบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอล รวมทั้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซมีเทนโดยใช้น้ำเสียที่ผ่านการกำจัดสารประกอบฟีนอล ทั้งนี้ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลความเข้มข้นสูง การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่เหมาะสม ทำโดยใช้หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า OD_{578} เท่ากับ 3.0 และเตรียมแบคทีเรียตรึงลักษณะสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แบคทีเรียตรึงที่ผลิตขึ้นมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $\sim 10^8$ CFU ต่อกกรัมซิลิกา สามารถย่อยสลาย *m*-cresol, *o*-cresol, caffeic acid, ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid, catechol และ 3-methylcatechol รวมทั้งสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ประมาณ 30 วัน จากนั้นได้พัฒนาระบบการกรองชีวภาพขนาดเล็กแบบ Internal loop Airlift Bioreactor (ILALR) โดยใช้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกา ปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำที่ 2.5 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียตรึงในระบบบำบัดการกรองชีวภาพสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 - 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 100% ระบบการกรองชีวภาพนี้สามารถใช้งานได้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน ต่อมาได้ทดสอบประสิทธิภาพระบบการกรองชีวภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจริงของบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 3 โรงงาน คือ จังหวัดสงขลา (โรงงาน A) จังหวัดสตูล (โรงงาน B) และจังหวัดสุราษฎร์ธานี (โรงงาน C) ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 5.0 ชั่วโมง พบว่าระบบสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียทั้ง 3 แหล่งได้ 67-100 % และระบบการกรองชีวภาพยังสามารถลดค่า COD และสีได้บางส่วน โดยไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารอื่นๆ เพิ่ม ในขั้นต่อมาได้ทดลองนำระบบการกรองชีวภาพไปบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม ซึ่งปกติใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตก๊าซมีเทน แต่มีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถผลิตก๊าซมีเทนและยับยั้งการผลิตก๊าซมีเทน โดยงานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบการผลิตก๊าซมีเทนระหว่างน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล พบว่าค่าศักยภาพการผลิตก๊าซมีเทน (Biochemical Methane Potentials; BMP) ของน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด น้ำเสียเจือจาง 4 เท่า ที่ไม่ผ่านการบำบัด และน้ำเสียเจือจาง 4 เท่า ที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 21, 302-534, 131, และ 347-508 mLCH₄/gCOD ตามลำดับ ดังนั้นระบบการกรองชีวภาพที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตก๊าซมีเทนของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ นอกจากนี้สามารถตรวจนับจำนวนชุดของยีนฟีนอลไฮดรอกซิเลส (*LmPH* gene) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ตลอดระยะเวลาทดลอง แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของระบบบำบัดเกิดจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียตรึงจริง

ภาควิชา จุลชีววิทยา ปลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยา ปลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2557 ปลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ปลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5373926923 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEYWORDS: BIOFILTRATION SYSTEM; PHENOLIC COMPOUNDS; PALM OIL MILL EFFLUENT; METHANE PRODUCTION

PIYAMART KHONGKHAEM: DEVELOPMENT OF BIOFILTRATION SYSTEM FOR TREATMENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN PALM OIL MILL EFFLUENT AND METHANE PRODUCTION FROM THE TREATED EFFLUENT. ADVISOR: EKAWAN LUEPROMCHAI, CO-ADVISOR: ONRUTHAI PINYAKONG, AMARAWAN INTASIRI, 192 pp.

This research aimed to develop a technique for producing high efficiency silica-immobilized bacteria and to develop a biofiltration system containing the immobilized bacteria for treatment of phenolic compounds contaminated wastewater as well as for enhancing biomethanation of wastewater after phenolic compounds removal. The inoculum used in this study was a co-culture of *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1, which is known to degrade high concentrations of phenol. The optimum bacterial immobilization process was to use 3.0 OD₅₇₈ inoculum and to prepare the immobilized silica in square shape with 0.5x0.5x0.5 cm³ dimension, which led to the initial concentration of immobilized cells at 10⁸ CFU/g silica. The immobilized bacteria could degrade *m*-cresol, *o*-cresol, caffeic acid, ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid, catechol and 3-methylcatechol. In addition, the immobilized bacteria could be stored at 4°C for 30 days. The study later developed a small biofiltration unit consisted of an Internal loop Airlift Bioreactor with 25 g/L silica-immobilized bacteria at Hydraulic Retention Time (HRT) of 2.5 h. The immobilized bacteria in biofiltration unit could degrade 100% of 5 – 300 mg/L other phenolic compounds in synthetic wastewater. This biofiltration could be applied continuously for at least 3 months. The following experiment investigated the efficiency of biofiltration system for the treatment of phenol phenolic compounds in wastewater from the final satabilization ponds of 3 factories in Songkhla (plant A), Satun provinces (plant B), and Surattani province (plant C) at HRT of 5.0 h. The biofiltration system could degrade 67-100% of phenolic compounds in wastewater from 3 factories and the biofiltration also partially reduced COD and color without further addition of nutrients. The study later used the biofiltration system for treatment of palm oil mill effluent (POME), which is normally used as substrate of biomethanation. It has been known that phenolic compounds cause harmful effects to methane-producing bacteria and inhibit methane production. This study compared biomethanation between untreated and dephenolized POME. Biochemical Methane Potentials (BMP) in systems with the undiluted untreated POME, untreated dephenolized POME, 4-folds diluted untreated POME, and 4-diluted dephenolized POME were 21, 302-534, 131, and 347-508 mLCH₄/gCOD, respectively. Therefore, the developed biofiltration system could be applied to increase methane yield in palm oil mills. In addition, *LmPH* genes, which involved in phenol degradation of both bacteria were found in the biofiltration system throughout the operation. The results confirmed that the immobilized cells were responsible for the treatment of phenolic compounds in wastewater.

Department: Microbiology

Field of Study: Microbiology

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยดี โดยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง และอาจารย์ ดร.อมรราวรณ อินทศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะ วงศาโรจน์ และอาจารย์ ดร.อรมาศ สุทธิสุนัน เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอาจารย์ ดร.ธิดารัตน์ บุญมี ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการผลิตก๊าซชีวภาพแก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จ ลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.เอกลักษณ์ คาน คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยรัฐนอร์ทดาร์โกลด์ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการเดินทางไปทำงานวิจัย ณ ประเทศสหรัฐอเมริกา

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษา 72 พรรษา ทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ และทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาโทบัณฑิตมหาบัณฑิตไปเสนอผลงานวิชาการในต่างประเทศ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยและให้ความช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้เงินทุนสำหรับงานวิจัยและการไปนำเสนอผลงานในต่างประเทศ และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย (ศสอ.) ที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยและให้ความช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ ตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนและพี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และน้องๆ ที่เป็นแรงบันดาลใจและกำลังใจในการศึกษาตลอดมา รวมถึงคอยสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ต
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	5
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	5
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	7
บทที่ 2	8
ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	8
2.1 ปัญหาการปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลในสิ่งแวดล้อม	8
2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและยีนที่เกี่ยวข้อง.....	9
2.3 การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	16
2.4 การบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม.....	22
2.5 การผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม	28
บทที่ 3	33
ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วย	33
แบบที่เรียตรังบนซิลิกาในระบบแบทช์และระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้น	33

3.1 บทนำ.....	33
3.2 ขั้นตอนงานวิจัย	35
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	35
3.4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	40
บทที่ 4	71
ประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นในการบำบัดสารประกอบฟีนอล	71
ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้าย.....	71
4.1 บทนำ.....	71
4.2 ขั้นตอนงานวิจัย	73
4.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	74
4.4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	79
บทที่ 5	100
ประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นในการบำบัดสารประกอบฟีนอล	100
ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม	100
เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ.....	100
5.1 บทนำ.....	100
5.2 ขั้นตอนงานวิจัย	101
5.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	102
5.4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	108
บทที่ 6	141
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	141
6.1 ข้อสรุป.....	141
6.2 ข้อเสนอแนะ	145

รายการอ้างอิง	147
ภาคผนวก ก.....	158
ภาคผนวก ข.....	160
ภาคผนวก ค.....	161
ภาคผนวก ง	165
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	192



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียอิสระสำหรับย่อยสลายสารประกอบฟีนอล.....	17
ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณการผลิตน้ำมันปาล์มของแต่ละประเทศ.....	23
ตารางที่ 2.3 มาตรฐานคุณภาพน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	23
ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบการบำบัดด้วยวิธีชีวภาพแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน.....	26
ตารางที่ 2.5 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและสีในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดย <i>Lactobacillus plantarum</i> SF5.6	27
ตารางที่ 3.1 จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นของหัวเชื้อและแบคทีเรียในเซลล์ตรึง.....	40
ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของแบคทีเรียตรึง และจำนวนแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา.....	44
ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดยใช้เซลล์ตรึง.....	45
ตารางที่ 3.4 อัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและจำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองต่างๆของวันที่ 3.....	46
ตารางที่ 3.5 อัตราการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่อุณหภูมิต่างๆ	49
ตารางที่ 3.6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการย่อยสลายฟีนอลที่อุณหภูมิต่างๆ	50
ตารางที่ 3.7 การอยู่รอดและแอกทิวิตีของแบคทีเรียที่ถูกตรึงในซิลิกาเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	52
ตารางที่ 3.8 การแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงสำหรับบรรจุลงในถังปฏิกรณ์.....	54
ตารางที่ 3.9 ประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 5.0 ชั่วโมง	59
ตารางที่ 3.10 ประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง	61
ตารางที่ 3.11 ประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง	63
ตารางที่ 3.12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor	64
ตารางที่ 3.13 ต้นทุนการผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 75 กรัม	68
ตารางที่ 3.14 ต้นทุนการผลิตระบบการกรองชีวภาพและค่าไฟฟ้าในการเดินระบบ.....	69

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลการผลิต และระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	80
ตารางที่ 4.2 ลักษณะน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม.....	81
ตารางที่ 4.3 คุณภาพของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดด้วยระบบการกรองชีวภาพที่บรรจุ แบคทีเรียตรึงบนซิลิกา	93
ตารางที่ 4.4 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลโดยใช้ระบบการกรอง ชีวภาพแบบต่างๆ	94
ตารางที่ 5.1 ลักษณะของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม B จังหวัดสตูล.....	110
ตารางที่ 5.2 ลักษณะของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มจังหวัดสุราษฎร์ธานี.....	115
ตารางที่ 5.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลของระบบขวดเขย่าแบบ แบทช์และระบบการกรองชีวภาพ.....	118
ตารางที่ 5.4 ลักษณะทั่วไปของหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิก	125
ตารางที่ 5.5 ลักษณะของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม B จังหวัดสตูล ที่ผ่านการ บำบัดสารประกอบฟีนอล	130
ตารางที่ 5.6 ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากการทดลองและแบบจำลองของ Gompertz ..	133
ตารางที่ 5.7 ลักษณะของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม C จังหวัดสุราษฎร์ธานีก่อน และหลังบำบัดสารประกอบฟีนอล.....	135
ตารางที่ 5.8 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมที่ได้จากการคำนวณด้วยแบบจำลอง Gompertz และ ศักยภาพการผลิตก๊าซมีเทน (Biochemical Methane Potential; BMP).....	138
ตารางที่ 5.9 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อนำน้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการ บำบัดสารประกอบฟีนอล	139
ตารางที่ ๖.1 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ย่อยสลายฟีนอล	168
ตารางที่ ๖.2 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัด สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 9.....	170
ตารางที่ ๖.3 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัด สารประกอบ	171
ตารางที่ ๖.4 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัด สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 14.....	172

ตารางที่ ง.20 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
 สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 107 188

ตารางที่ ง.21 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
 สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 107 189

ตารางที่ ง.22 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยการทดสอบค่า Biochemical
 Methane Potential (BMP) ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบ
 ฟีนอลจากระบบการกรองชีวภาพในระยะยาว 190

ตารางที่ ง.23 การทดสอบความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซมีเทนด้วย
 วิธีการทดสอบ Specific Methanogenic Activity (SMA) ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสีย
 ที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลจากระบบการกรองชีวภาพในระยะยาว 191



สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 วิธีการย่อยสลาย 3,5-xyleneol, <i>m</i> -cresol และ <i>p</i> -cresol โดยแบคทีเรีย.....	11
รูปที่ 2.2 การย่อยสลายฟีนอลแบบใช้ออกซิเจน.....	12
รูปที่ 2.3 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลแบบใช้ออกซิเจน.....	12
รูปที่ 2.4 การย่อยสลายฟีนอลแบบใช้ออกซิเจน ก.วิธีเมทา ข.วิธีออร์โท.....	14
รูปที่ 3.1 ลักษณะทั่วไปของระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor.....	38
รูปที่ 3.2 ซิลิกาที่มีขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยแสดงดังนี้.....	42
รูปที่ 3.3 ซิลิกาที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร โดยแสดงดังนี้.....	42
รูปที่ 3.4 ลักษณะของระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่สร้างขึ้น..	54
รูปที่ 3.5 ระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor.....	55
รูปที่ 3.6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้น้ำกลั่นเดิม.....	56
รูปที่ 3.7 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยง เชื้อเหลว CFMM เติมฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 5.0 ชั่วโมง.....	58
รูปที่ 3.8 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยง เชื้อเหลว CFMM เติมฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง.....	60
รูปที่ 3.9 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยง เชื้อเหลว CFMM เติมสารประกอบฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง.....	62
รูปที่ 3.10 ความเข้มข้นของสีที่เหลืออยู่ (%) เมื่อสารประกอบฟีนอลถูกย่อยสลายด้วยแบคทีเรียตรึง บนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM.....	63
รูปที่ 3.11 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยง เชื้อเหลว CFMM เติมฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมงแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 89 วัน.....	65
รูปที่ 3.12 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อย่อยสลายฟีนอล.....	66
รูปที่ 3.13 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยง เชื้อเหลว CFMM เติมสารประกอบฟีนอล ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง.....	67
รูปที่ 3.14 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อย่อยสลาย สารประกอบ ฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง.....	67
รูปที่ 4.1 บ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรของโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก).....	80

รูปที่ 4.2 การเก็บน้ำเสีย (ก) และลักษณะน้ำเสียที่เก็บมาจากบ่อบำบัดน้ำเสีย (ข).....	81
รูปที่ 4.3 อัตราการย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียจริงที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อจาก.....	84
รูปที่ 4.4 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระบบบำบัดแบบแบทช์เมื่อนำน้ำเสียจาก.....	85
รูปที่ 4.5 ระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุแบคทีเรียตรึง....	87
รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อนำน้ำเสียจากโรงงานประกอบฟีนอล* ในน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข)	88
รูปที่ 4.7 COD ที่เหลืออยู่เมื่อสารประกอบฟีนอลถูกบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อนำน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข).....	89
รูปที่ 4.8 ความเข้มข้นของซีพีที่เหลืออยู่ (%) เมื่อสารประกอบฟีนอลถูกบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อนำน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก).....	90
รูปที่ 4.9 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข)	91
รูปที่ 4.10 ภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานในระบบการกรองชีวภาพเพื่อย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน A เป็นเวลา 70 ชั่วโมง (ก) และโรงงาน B เป็นเวลา 450 ชั่วโมง (ข) โดยกล้อง CLSM ที่กำลังขยาย 20 เท่า.....	92
รูปที่ 4.11 การมีอยู่ของยีน 16S rRNA ในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี PCR.....	95
รูปที่ 4.12 การมีอยู่ของยีน <i>LmPH</i> ที่ประมวลรหัสออนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลสในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี PCR.....	97
รูปที่ 4.13 การตรวจนับจำนวนชุดของยีน 16S rRNA และ <i>LmPH</i> ด้วยเทคนิค Real-time qPCR.....	99
รูปที่ 5.1 ลักษณะระบบผลิตก๊าซชีวภาพแบบขวดซีรัมประกอบด้วย น้ำเสีย ตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกและโซเดียมไบคาร์บอเนต ที่มีการไล่ก๊าซออกซิเจนออกจนหมดและปิดขวดจนสนิท	106
รูปที่ 5.2 การเก็บปริมาณก๊าซชีวภาพด้วยวิธีการแทนที่น้ำ	106
รูปที่ 5.3 โคโรมาโตแกรมแสดงปริมาณสัดส่วนของก๊าซมีเทนในก๊าซชีวภาพทั้งหมด	107
รูปที่ 5.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลที่เหลืออยู่ในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มจากโรงงาน B ที่ผ่านการกรองในชุดที่เติมซิลิกาที่มีแบคทีเรียตรึง 25 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับ.....	111
รูปที่ 5.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลที่เหลืออยู่ในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มจากโรงงาน B ที่ไม่ผ่านการกรองในชุดที่เติมซิลิกาที่มีแบคทีเรียตรึง 25 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับ..	111

รูปที่ 5.6 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อย่อยสลาย.....	112
รูปที่ 5.7 การยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้บำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการกรอง (ก) และไม่ผ่านการกรอง (ข) เป็นเวลา 7 วัน	113
รูปที่ 5.8 ระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 25 กรัมต่อลิตรและน้ำเสียเจือจาง 4 เท่า จากกระบวนการผลิตของโรงงาน C.....	115
รูปที่ 5.9 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียเจือจาง 4 เท่า จากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี.....	116
รูปที่ 5.10 ปริมาณซีไอดีที่เหลืออยู่เมื่อสารประกอบฟีนอลถูกย่อยสลายด้วยแบคทีเรียตรึงในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียเจือจาง 4 เท่า จากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของโรงงาน C.....	116
รูปที่ 5.11 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อย่อยสลาย.....	117
รูปที่ 5.12 ภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานในระบบการกรองชีวภาพเพื่อย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเป็นเวลา 4 เดือน โดยกล้อง CLSM ที่กำลังขยาย 20 เท่า	120
รูปที่ 5.13 การมีอยู่ของยีน 16S rRNA ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลสในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี PCR.....	121
รูปที่ 5.14 การมีอยู่ของยีน <i>LmPH</i> ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลสในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี PCR.....	122
รูปที่ 5.15 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน <i>LmPH</i> และ 16S rRNA ด้วยเทคนิค Real-time qPCR ในระบบการกรองชีวภาพเมื่อบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม C.....	123
รูปที่ 5.16 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมเมื่อใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งใช้หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์จากอำเภอพุนพินและอำเภอท่าชนะ.....	125
รูปที่ 5.17 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน <i>mcrA</i> ด้วยเทคนิค Real-time qPCR ในน้ำเสียจากระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม จังหวัดสุราษฎร์ธานี.....	128
รูปที่ 5.18 ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมที่เกิดจากน้ำเสียจากโรงงาน B จังหวัดสตูล.....	131
รูปที่ 5.19 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมที่เกิดจากน้ำเสียจากโรงงาน B จังหวัดสตูล	131
รูปที่ 5.20 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมจากน้ำเสียกระบวนการผลิตโรงงาน B จังหวัดสตูล.....	132

รูปที่ 5.21 ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมที่ผลิตจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C.....	136
รูปที่ 5.22 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมที่ผลิตจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C	136
รูปที่ 5.23 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C	137



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารประกอบฟีนอล เป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งหมู่ในโมเลกุล สามารถละลายในน้ำได้ ตัวอย่างสารประกอบฟีนอล เช่น caffeic acid, ferulic acid, lignin, 4-hydroxybenzoic acid เป็นต้น สารเหล่านี้จัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต หากมนุษย์หรือสัตว์ได้รับสารเหล่านี้เข้าไป แม้เพียงแค่การสัมผัสภายนอกหรือหายใจ จะทำให้เกิดการระคายเคืองในบริเวณที่สัมผัสทั้งผิวหนังและเยื่อเมือกต่างๆ ได้ และถ้าได้รับในปริมาณที่สูงจะเกิดการสะสมในร่างกาย ซึ่งส่งผลให้เกิดความผิดปกติที่ระบบหมุนเวียนโลหิต (Gami และคณะ, 2014) สารประกอบฟีนอลเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมเคมีหลายชนิด โดยถูกใช้เป็นส่วนผสมในเคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ เช่น สี ยาดับกลิ่น และยาฆ่าแมลง จะเห็นได้ว่าการนำเอาผลิตภัณฑ์เหล่านี้มาใช้ในชีวิตประจำวันอย่างแพร่หลาย และยังเป็นส่วนประกอบของวัตถุอันตรายจากธรรมชาติหลายชนิด เช่น ผลปาล์ม ชา องุ่น และยาสูบ จึงมีโอกาที่สารเหล่านี้จะเกิดการปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำได้ เนื่องจากสารเหล่านี้มีความเป็นขั้วสูงละลายน้ำได้ดี โดย US Environment Protection Agency (EPA) ได้เสนอให้มีการควบคุมคุณภาพของน้ำโดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลได้สูงสุดไม่เกิน 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร และกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ประเทศไทย ฉบับที่ 3 (พ.ศ.2539) ได้กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรมให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ดังนั้นจำเป็นต้องพัฒนาเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการบำบัดสารประกอบฟีนอล เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ และการย่อยสลายทางชีวภาพ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ เป็นต้น ซึ่งสารประกอบฟีนอลสามารถย่อยสลายได้ทั้งแบบอาศัยออกซิเจน และแบบไม่อาศัยออกซิเจน แต่งานวิจัยส่วนใหญ่สนใจการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในภาวะที่มีออกซิเจน เนื่องจากระบบมีประสิทธิภาพสูงในการบำบัดน้ำเสีย อีกทั้งใช้ระยะเวลาในการบำบัดสั้น โดยใช้ระยะเวลาการเก็บกักน้อยกว่า มีผลให้ถังปฏิกรณ์มีปริมาตรน้อยกว่า ซึ่งช่วยให้ประหยัดพื้นที่ในการก่อสร้างมากกว่า อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเร็วกว่า และใช้เวลาในการเริ่มเดินระบบ (start up) เร็วกว่าแบบไม่มีออกซิเจน (มันสิน ตันกุลเวศม์, 2542) จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในภาวะที่มีออกซิเจน ได้แก่ *Acinetobacter* sp. PK1, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Arthrobacter* sp., *Bacillus*

cereus, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Burkholderia cepacia* G4, *Nocardia* sp., *Methylobacterium* sp. NP3, *Nocardioides* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* PU1, *Pseudomonas pickettii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas resinovorans*, *Ralstonia eutropha*, *Rhodococcus* sp., *Candida* spp., *Fusarium* sp., *Trichosporon cutaneum* และ *Streptococcus epidermis* OCS-B เป็นต้น (Shalaby และคณะ, 2003; Gayathri และคณะ, 2010; Mohite และคณะ, 2010; Khongkhaem และคณะ, 2011; Mahiudddin และคณะ, 2012; Krastanov และคณะ, 2013) โดยทั่วไปแบคทีเรียอิสระมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลได้ในระดับที่มีความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลประมาณ 100-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลเป็นสารเคมีอันตรายที่มีผลต่อเซลล์แบคทีเรียโดยจะทำให้สูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งยับยั้งการทำหน้าที่ของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียตายเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลสูง (Heipieper และคณะ, 1992)

งานวิจัยต่อมาจึงศึกษาการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอล เช่น Pazarlioglu และคณะ (2005) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Pseudomonas putida* ที่ถูกตรึงบนหินพัมมิช พบว่า *P. putida* ที่ถูกตรึงเซลล์บนหินพัมมิชสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในเวลา 22 ชั่วโมง และสามารถใช้เซลล์ตรึงซ้ำได้ Wang และคณะ (2007) ได้นำแบคทีเรียมาตรึงเซลล์บนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol) พบว่าทำให้ทนต่อความเข้มข้นของฟีนอลได้สูงประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรภายในเวลา 9 ชั่วโมง และช่วยป้องกันแบคทีเรียเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และสามารถเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 50 วัน และ Santos และคณะ (2008) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Aureobasidium pullulans* FE13 ที่คัดแยกเชื้อจากน้ำเสียที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมพบว่า การตรึงเซลล์บนอัลจิเนตทำให้แบคทีเรียมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้สูงสุดประมาณ 18.35 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยเซลล์อิสระจะทนและย่อยฟีนอลได้น้อยกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงบนอัลจิเนต ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงแบคทีเรียบนซิลิกา เนื่องจากซิลิกาเป็นวัสดุที่มีความเสถียรสูง ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมี สามารถใช้งานได้ในช่วง pH ที่กว้าง และมีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) ไม่บวมน้ำ จึงสามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายได้ดี จากการศึกษาของ Nassif และคณะ (2002) และ Alvarez และคณะ (2007) พบว่าการตรึงเซลล์แบคทีเรียในซิลิกาสามารถเก็บเซลล์ที่ถูกตรึงในซิลิกาได้นาน ข้อดีของซิลิกาเมื่อใช้ตรึงเซลล์จะช่วยให้แบคทีเรียทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และสามารถเก็บ

แบบที่เรียกว่าตรึงบนซิลิกาไว้ได้เป็นเวลานาน รวมทั้งอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารมลพิษ นอกจากนี้เคยมีรายงานเกี่ยวกับการนำซิลิกามาใช้ตรึงแบคทีเรียสำหรับย่อยสลายฟีนอล ดังเช่นงานวิจัยของ ศึกษาการตรึงจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายฟีนอล โดยเปรียบเทียบระหว่างการตรึงเซลล์ในซิลิกาเจลชนิด prepolymerized TEOS กับการตรึงเซลล์ในพอลิยูรีเทนโฟม พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลเป็นดังนี้ เซลล์อิสระ < เซลล์ตรึงในพอลิยูรีเทนโฟม < เซลล์ตรึงในซิลิกา แสดงว่าการตรึงเซลล์ในซิลิกาเจลสามารถนำไปบำบัดฟีนอลได้ และงานวิจัยของ Khongkhaem และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้บำบัดฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์แบบระบบแบทช์ พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงประมาณ 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ดี และสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้เป็นเวลาอย่างน้อย 2 เดือน ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนและระยะเวลาในการเตรียมแบคทีเรียตรึง

จากงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถบำบัดฟีนอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาวิธีการผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา แล้วนำแบคทีเรียตรึงไปใช้ในกระบวนการกรองชีวภาพสำหรับการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียต่อไป ตัวอย่างงานวิจัยการใช้แบคทีเรียตรึงสำหรับบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลในระบบการกรองชีวภาพแบบต่างๆ มีดังต่อไปนี้ Branyik และ Kuncova (2000) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดยการตรึงเซลล์ด้วยวิธี sol-gel ในซิลิกา (SG) พอลิยูรีเทนโฟม (PU) และเซรามิกโฟม (C) พบว่าแบคทีเรียตรึงในระบบการกรองชีวภาพมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลโดยเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ packed-bed reactor with ceramic form (PBRC) > PBR (PU) > PBR (SG) > fluidized-bed reactor with PU (FBRPU) > FBR (SG) และงานวิจัยของ El-Naas และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลแบบต่อเนื่องโดยใช้ *Pseudomonas putida* ตรึงบนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ใน spouted bed bioreactor (SBBR) พบว่าอัตราการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของฟีนอลเพิ่มขึ้น และอัตราการย่อยสลายลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของของเหลว (liquid flow rate) ขณะที่ระบบการกรองชีวภาพแบบ FBR เหมาะสำหรับตัวกลางที่สามารถฟุ้งกระจายหรือตัวกลางที่สามารถลอยน้ำได้ดี และ PBR เหมาะสำหรับตัวกลางที่เป็นเซลล์หรือเอนไซม์ตรึง แต่ PBR มักเกิดปัญหาการสะสมความร้อนในเบด ซึ่งเป็นปัญหาที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพและผลผลิตของระบบ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาระบบการกรองชีวภาพขนาดเล็กแบบ airlift bioreactor (AR) ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเพื่อใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยมีการเพิ่ม Internal loop ซึ่งจะช่วยให้เกิดการหมุนวนของของเหลวและตัวกลาง (เซลล์ตรึง) ภายใน รวมทั้งช่วยกระจายแรงเฉือนให้ทั่วถึงถึงปฏิกรณ์ ทำให้เกิดการเสียหายกับตัวกลาง (เซลล์ตรึง) ภายในน้อยลง

ต่อมาผู้วิจัยได้ทดสอบประสิทธิภาพระบบการกรองชีวภาพที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา โดยใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มเป็นต้นแบบ โดยในปัจจุบันน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจัดเป็นปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากประเทศไทยจัดอยู่ในอันดับที่ 3 ของประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่สามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้เป็นอันดับแรกๆ ของโลก เนื่องจากสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศเอื้ออำนวยต่อการปลูกปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศ (Rupani และคณะ, 2010) ซึ่งน้ำเสียส่วนใหญ่ที่เกิดจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสารอินทรีย์สูง สีคล้ำ และปนเปื้อนสารอันตรายจำพวกสารประกอบฟีนอลในระดับความเข้มข้นสูง ทั้งนี้สารประกอบฟีนอลเป็นสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidases ซึ่งเป็นสาเหตุให้สารประกอบฟีนอลไม่ถูกย่อยสลายไป และปนเปื้อนออกมากับน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม (Sundram, 2003) จากรายงานที่ผ่านมาพบปริมาณของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ตั้งแต่ 30-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (พนิดา โต้ะสุ, 2555; Sayadi และคณะ, 2000; Alam และคณะ, 2009; Cordova-Rosa และคณะ, 2009; Limkhuansuwan และ Chaiprasert, 2010; Saifuddin และคณะ, 2014) ในประเทศไทยการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่ยังคงใช้การบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนและบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียร ซึ่งประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลค่อนข้างต่ำ

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจนำระบบการกรองชีวภาพที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ถูกพัฒนาขึ้นไปใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้าย และน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบบำบัดที่ใช้ทั่วไปของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และแก้ปัญหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานอุตสาหกรรมฯ นอกจากนี้ได้ติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับย่อยสลายฟีนอล และยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซมีเทนด้วยเทคนิค Real-time qPCR และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียบนซิลิกาและแบคทีเรียอื่นๆ ในระบบการกรองชีวภาพระหว่างการบำบัดด้วย CLSM โดยข้อมูลที่ได้รับจะช่วยยืนยันว่าแบคทีเรียที่เติมลงไปสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในระบบ ทำให้ทราบถึงจำนวนและความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในระบบ ซึ่งความรู้ที่ได้รับจะช่วยให้สามารถออกแบบระบบบำบัดสารประกอบฟีนอลที่สัมพันธ์กับการทำงานของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในภาวะต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งสามารถนำระบบไปขยายขนาดและเพิ่มปริมาณแบคทีเรียตรึงตามอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อให้บำบัดน้ำเสียปริมาณมากได้

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดลองนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลไปผลิตก๊าซชีวภาพ เนื่องจากในปัจจุบันโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลายแห่งนำน้ำเสียจากกระบวนการผลิตมาเป็นก๊าซชีวภาพ เพื่อนำไปผลิตเป็นกระแสไฟฟ้าใช้ภายในโรงงานและจำหน่ายให้แก่การไฟฟ้าส่วนภูมิภาค

ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าและแก้ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลสามารถยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทน (methanogens) และสารประกอบกลุ่มนี้อาจดูดซับในภาคตะกอนของระบบก๊าซชีวภาพ ทำให้การย่อยสลายทางชีวภาพลดลง ซึ่งส่งผลต่อปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพโดยรวมและปริมาณก๊าซมีเทนที่ผลิตขึ้น (Gharsallah และคณะ, 1999; Sayadi และคณะ, 2000; Dhoub และคณะ, 2005; Martinez-Garcia และคณะ, 2007; Hernandez และคณะ, 2008) จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มียานวิจัยที่ศึกษาผลกระทบของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่มีต่อแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทนและปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพโดยรวม ซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียของกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มควบคู่กับการพัฒนาเทคโนโลยีระบบการกรองชีวภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลเบื้องต้นในน้ำเสีย (pretreatment) ก่อนนำน้ำเสียเข้าสู่ระบบก๊าซชีวภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ คือการพัฒนากระบวนการกรองชีวภาพเพื่อบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียและเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตมีเทน โดยใช้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลตรึงบนซิลิกา วัตถุประสงค์ย่อยของงานวิจัยนี้ได้แก่

1.2.1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา สำหรับย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์

1.2.2 เพื่อพัฒนาระบบการกรองชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา สำหรับบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสีย

1.2.3 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้น สำหรับบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมีเทน

1.2.4 เพื่อตรวจติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนอลและประชากรแบคทีเรียในระบบการกรองชีวภาพ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบแบทช์และระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้น

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 และเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับนำไปตรึงเซลล์ จากนั้นนำหัวเชื้อแบคทีเรียมาผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

กาด้วยวิธี sol-gel ทำตามวิธีของ Khongkhaem และคณะ, 2011 เมื่อได้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาตามที่ต้องการแล้ว ขั้นตอนต่อมาคือ ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์ ที่ความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลตั้งแต่ 5 - 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหาระยะเวลาและภาวะที่เหมาะสมกับการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาจากนั้นสร้างระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ขนาดเล็ก และติดตั้งระบบการกรองชีวภาพที่สร้างขึ้นควบคู่กับหาภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ และทดสอบระบบการกรองชีวภาพที่มีแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ในระยะยาว ซึ่งข้อมูลที่ได้นำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจริงของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อไป

1.3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นในการบำบัดสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจริงจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้าย

ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของน้ำเสียจากบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 2 แห่ง คือ โรงงาน A จังหวัดสงขลาและโรงงาน B จังหวัดสตูล และทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์โดยใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor โดยใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ความเข้มข้นสารประกอบฟีนอล 6.8 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคู่กับการตรวจหาและตรวจนับจำนวนชุดของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลสในระบบการกรองชีวภาพ ติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรและการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียบนซิลิกา ระหว่างการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสีย

1.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นในการบำบัดสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ

ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 2 แห่ง คือ โรงงาน B จังหวัดสตูลและโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี และทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์โดยใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากนั้นทดสอบ

ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และทดสอบระบบการกรองชีวภาพที่มีแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในระยะยาว และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพระหว่างน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดกับน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล ซึ่งทำควบคู่กับการตรวจติดตามและตรวจนับจำนวนชุดของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลสในระบบการกรองชีวภาพและยีน *mcrA* ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพ อีกทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรและการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียบนซิลิการะหว่างการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสีย

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

- 1.4.1 ได้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสีย
- 1.4.2 ได้ระบบการกรองชีวภาพที่สามารถบำบัดสารประกอบฟีนอลเบื้องต้นในน้ำเสียก่อนนำไปผลิตมีเทน
- 1.4.3 พบว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลก่อนเข้าสู่ระบบก๊าซชีวภาพ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมีเทน
- 1.4.4 สามารถตรวจติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนอลและตรวจติดตามกลุ่มประชากรของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ใช้ในระบบการกรองชีวภาพ

บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 ปัญหาการปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลในสิ่งแวดล้อม

สารประกอบฟีนอลเป็นส่วนประกอบของวัตถุบิจากธรรมชาติหลายชนิด เช่น ผลปาล์ม ชา ไวน์ และยาสูบ จึงพบการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลยังเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมเคมีหลายชนิด และเป็นส่วนผสมในเคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ เช่น สี ยาดับกลิ่น และยาฆ่าแมลง จึงมีโอกาสที่สารประกอบฟีนอลจะปนเปื้อนในดินและแหล่งน้ำได้ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ประเทศไทย ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) ได้กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำเสียจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรม และนิคมอุตสาหกรรม ให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ดังนั้นจำเป็นต้องมีเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการกำจัดสารประกอบฟีนอล เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ และการย่อยสลายทางชีวภาพ

2.1.1 สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds หรือ phenolics) ได้แก่ สารประกอบที่มีวงแอรโรมาติกและไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ และรวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่เคมีต่างๆ ตัวอย่างสารประกอบฟีนอล ได้แก่ flavonoids, lignin, abscisic acid, cinnamic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, tyrosine, phenylalanine และ dihydroxy-phenylalanine (DOPA) สารประกอบฟีนอลเป็นตัวแทนของสารในธรรมชาติที่นับว่ามีปริมาณมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับสีและกลิ่นรส

การแบ่งชนิดของสารประกอบฟีนอล แบ่งเป็น 3 ชนิด ตามจำนวนวงของฟีนอล (phenol rings) ดังต่อไปนี้

1. Monocyclic phenols มี 1 phenol ring ที่พบทั่วไปในพืชได้แก่ phenol, catechol, hydro-quinone และ p-hydroxycinnamic acid
2. Dicyclic phenols มี 2 phenol rings ได้แก่ flavonoids และ lignans
3. Polycyclic phenols หรือ polyphenol ได้แก่ lignins, catechol melanins, flavolans (condensed tannins)

สารประกอบฟีนอลมักพบเป็นองค์ประกอบอยู่ในน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมเสมอๆ เช่น โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและน้ำมันมะกอก อุตสาหกรรมผลิตเรซิน ยา ปีโตรเคมี เซรามิก สแตนเลส สี เครื่องหนัง และถ่านหิน เป็นต้น (Alam และคณะ, 2009; Dubey และ Hussain, 2014) เนื่องจาก

สารประกอบฟีนอลมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตสูง (Gami และคณะ, 2014) จึงจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม

2.1.2 การจัดการน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอล

การกำจัดสารประกอบฟีนอลออกจากน้ำที่ปนเปื้อน สามารถใช้วิธีการดั้งเดิม เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ หรือการออกซิไดซ์ด้วยสารเคมี เป็นต้น (Godjevargova และคณะ, 2006) กระบวนการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนฟีนอลในปริมาณสูง สามารถบำบัดโดยวิธีทางกายภาพ เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย หรือวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้ตะกอนสลัดจ์ หรือหัวเชื้อผสมที่ไม่ต้องการอากาศ แต่วิธีทางกายภาพมีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายสูง และเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีอันตราย (Pazarlioglu และคณะ, 2005) นอกจากนี้แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถทนต่อสารประกอบฟีนอลความเข้มข้นสูงได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลโดยใช้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกา เพื่อให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายและทนต่อสารประกอบฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงได้ และไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นอันตราย

2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและยีนที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอล

สารประกอบฟีนอลสามารถย่อยสลายได้ทั้งแบบอาศัยออกซิเจน และแบบไม่อาศัยออกซิเจน แต่งานวิจัยส่วนใหญ่สนใจการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในภาวะที่มีออกซิเจน

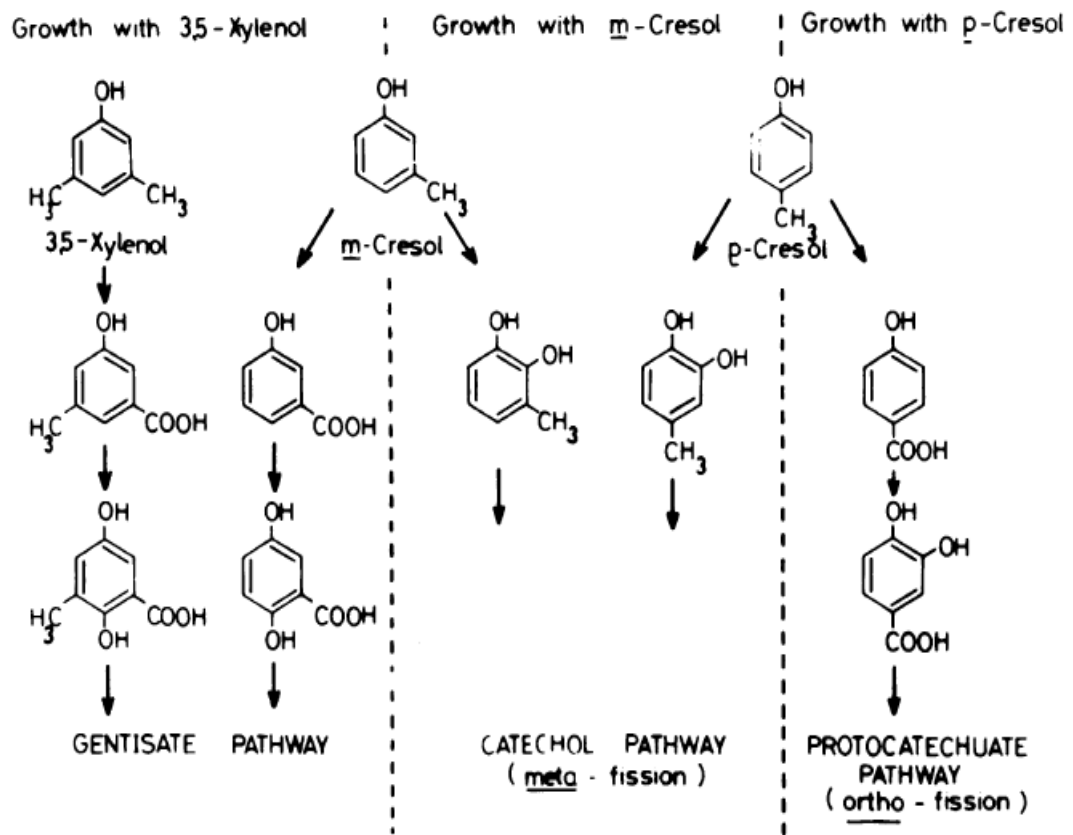
จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายฟีนอลในภาวะที่มีออกซิเจน ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Arthrobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Burkholderia cepacia* G4, *Halomonas salina*, *Nocardia* sp., *Nocardioides* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* PU1, *Pseudomonas pickettii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas resinovorans*, *Ralstonia eutropha*, *Rhodococcus* sp., *Candida* spp., *Fusarium* sp., *Trichosporon cutaneum*, และ *Streptococcus epidermis* OCS-B เป็นต้น (Shalaby และคณะ, 2003; Gayathri และ Vasudevan, 2010; Mohite และคณะ, 2010; Mahiuddin และคณะ, 2012) ส่วนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลโดยใช้ออกซิเจน ได้แก่ *Bacillus* sp., *Alcaligenes* sp., *Acinetobacter* sp., *Achromobacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum*, *Pleurotus ostreatus*, *Pseudomonas*, *Candida tropicalis*, และ *Trichosporon cutaneum* (Cho และคณะ, 2000; Aggelis และคณะ, 2003; Xiangchun และคณะ, 2003; Kargi และคณะ, 2005; Landete และคณะ, 2008; Krastanov และคณะ, 2013) จากข้อมูลข้างต้นพบว่าจุลินทรีย์ย่อยสลายฟีนอลบางชนิด สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลได้

โดยทั่วไปแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลได้ในระดับที่มีความเข้มข้น สารประกอบฟีนอลประมาณ 100-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลเป็นสารเคมีอันตรายที่มีผลต่อเซลล์แบคทีเรียโดยจะทำให้สูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งยับยั้งการทำหน้าที่ของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียตาย เมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลสูง (Heipieper และคณะ, 1992)

2.2.2 กลไกการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลโดยจุลินทรีย์

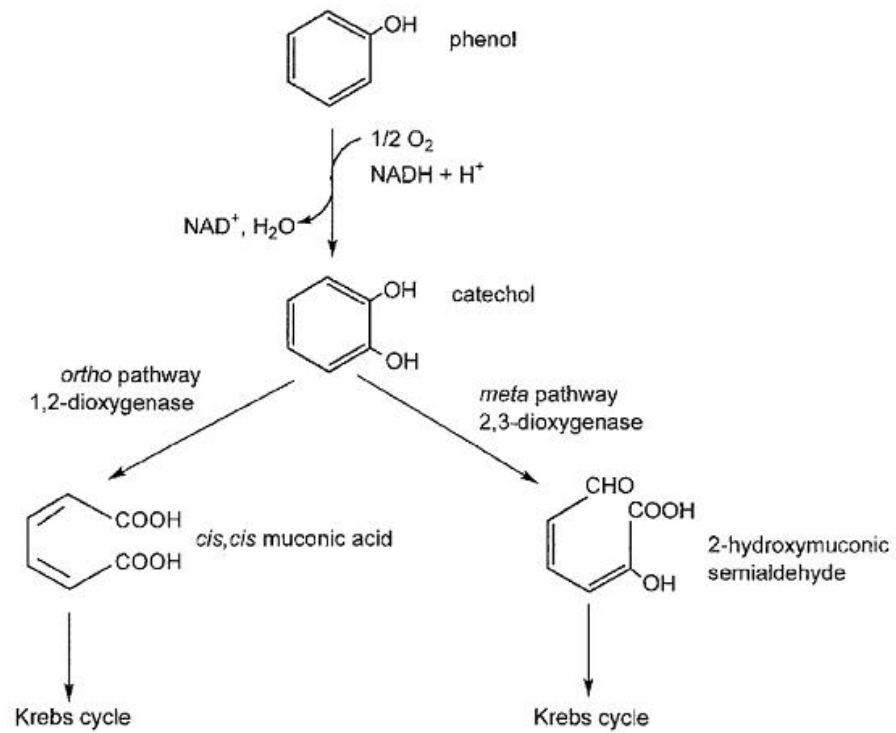
งานวิจัยส่วนใหญ่สนใจการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในภาวะที่มีออกซิเจน ดังเช่นงานวิจัยของ Varga และคณะ (1970) ซึ่งคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดิน เพื่อศึกษาวิธีการย่อยสลายฟีนอล พบว่าแบคทีเรียจีส *Pseudomonas* และ *Moraxella* สามารถย่อยสลายฟีนอลโดยผลิตเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลส ที่สามารถเปลี่ยนฟีนอลให้เป็นแคตาคอล (catechol) ซึ่งเป็นสารตัวกลางของการย่อยสลาย และเปลี่ยนแคตาคอลไปเป็น *cis,cis*-muconate โดย intradiol cleavage ด้วยเอนไซม์ catechol-1,2-dioxygenase และสามารถเปลี่ยนแคตาคอลไปเป็น α -hydroxy muconic semialdehyde โดย extradiol cleavage ด้วยเอนไซม์ catechol-2,3-dioxygenase จากนั้นจะเข้าสู่ key metabolites เพื่อเข้าสู่วัฏจักรต่อไป

สำหรับกลไกการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลแบบอาศัยออกซิเจน งานวิจัยของ Hopper และ Taylor (1974) ศึกษาวิธีการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลต่างๆ โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* พบว่าการย่อยสลาย 3,5-xyleneol, *m*-cresol และ *p*-cresol เริ่มจากการเติมออกซิเจนเข้าไปในโมเลกุลเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างเกิดเป็นแคตาคอลโดยเอนไซม์ monooxygenase ต่อมาเกิดการแตกวงของสารแคตาคอลโดยเอนไซม์ 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase และ 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase ซึ่งสามารถเกิดได้ 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งออร์โท และตำแหน่งเมทา ซึ่งการแตกวงของแคตาคอลที่ตำแหน่งต่างกันั้น ส่งผลให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่วัฏจักรต่อไป หรือเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังรูปที่ 2.1

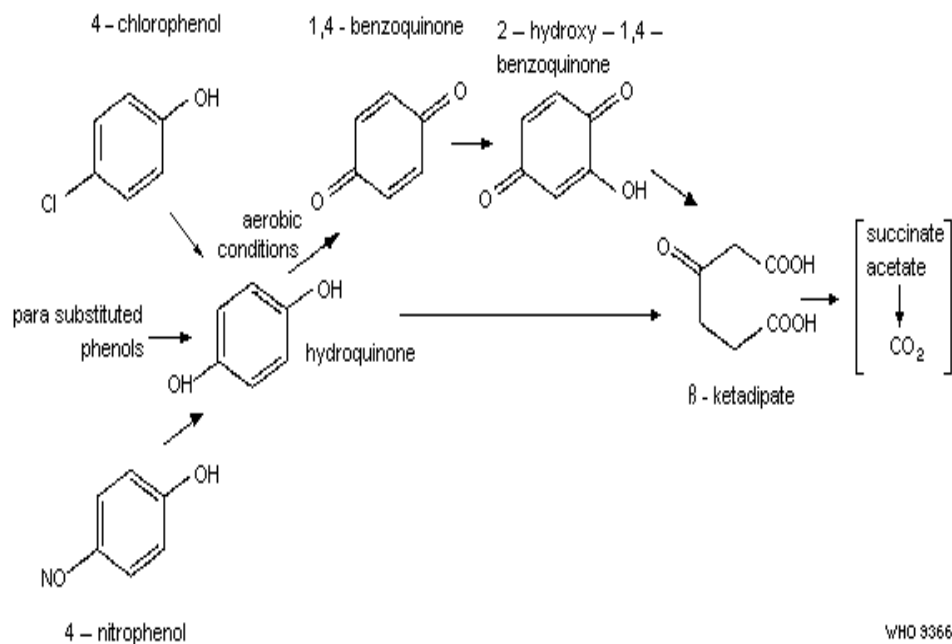


รูปที่ 2.1 วิธีการย่อยสลาย 3,5-xyleneol, m-cresol และ p-cresol โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* (ที่มา: Dong และคณะ, 1992)

ซึ่งคาดว่า *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 อาจจะมีการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลแบบใช้ออกซิเจน แสดงดังรูปที่ 2.2 และ 2.3 เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ซึ่งจากวิธีการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลคาดว่าจะไม่มีผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นพิษมากขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ



รูปที่ 2.2 การย่อยสลายฟีนอลแบบใช้ออกซิเจน
ที่มา: van Schie (2000)



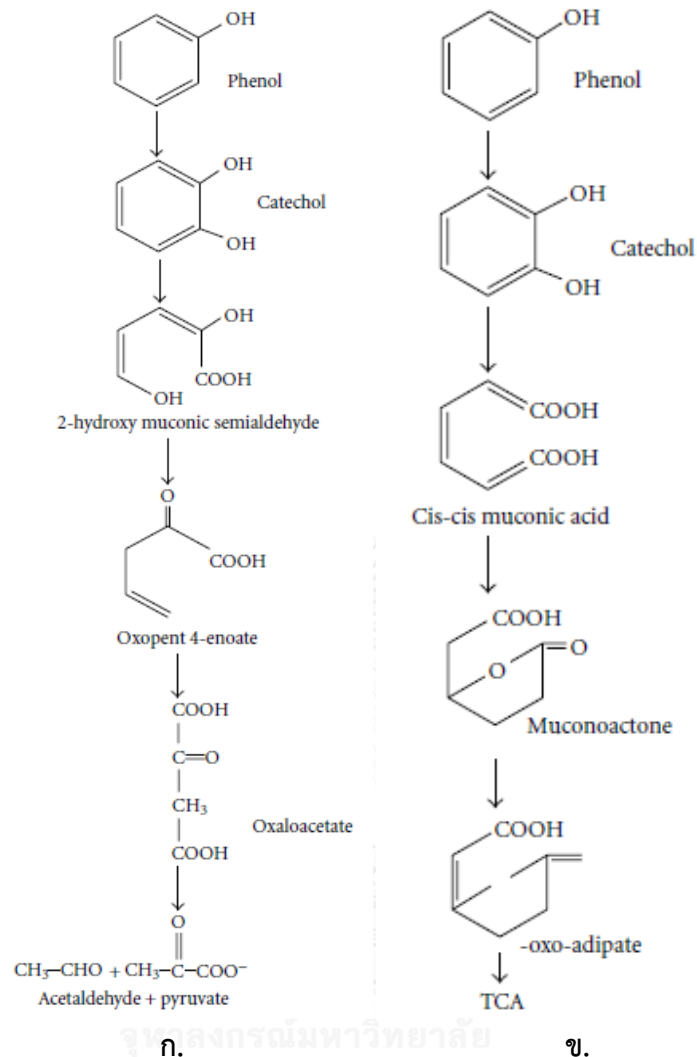
รูปที่ 2.3 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลแบบใช้ออกซิเจน
ที่มา: Devillers และคณะ (1990)

Dong และคณะ (1992) พบว่า *Bacillus stearothermophilus* FDTP-3 มียีน *pheA* สำหรับการย่อยสลายของฟีนอลแบบอาศัยออกซิเจน และมีวิธีการย่อยสลายฟีนอลที่เริ่มต้นจากการเติมออกซิเจนเข้าไปในโมเลกุล โดยใช้เอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลสเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกิดเป็นแคตคอลล ต่อมาก็เกิดการแตกวงของสารแคตคอลล ซึ่งสามารถเกิดได้ 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งออร์โทและตำแหน่งเมทา ซึ่งการแตกวงของแคตคอลลที่ตำแหน่งต่างกันั้นนั้น ส่งผลให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่วัฏจักรเครปต่อไป

Merimaa และคณะ (2006) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายฟีนอลและ *p*-cresol มียีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ Large subunit of multicomponent phenol hydroxylase (*LmPH*) ที่สามารถเปลี่ยนฟีนอลเป็นแคตคอลล และยีนประมวลรหัส C23O (catechol 2,3-dioxygenase) ที่สามารถเปลี่ยนแคตคอลลเป็น α -hydroxy muconic semialdehyde

Omokoko และคณะ (2008) ศึกษาวิธีการย่อยสลายฟีนอลโดย *Geobacillus stearothermophilus* พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟีนอลเป็นแคตคอลลโดยเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลส และเปลี่ยนแคตคอลลเป็น 2-hydroxymuconic semialdehyde ผ่าน meta-cleavage ด้วยเอนไซม์ catechol-2,3-dioxygenase โดยสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่วัฏจักรเครปต่อไป

Mahiudddin และคณะ (2012) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Pseudomonas fluorescens* PU1 ด้วยวิธีเมทา พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟีนอลเป็นแคตคอลลโดยเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลส และเปลี่ยนแคตคอลลเป็น 2-hydroxymuconic semialdehyde ผ่าน meta-cleavage สุดท้ายได้สารผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ อะซีตัลดีไฮด์และไพรูเวท แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การย่อยสลายฟีนอลแบบใช้ออกซิเจน ก.วิถีเมทา ข.วิถีออร์โท

ที่มา: Mahiudddin และคณะ (2012)

งานวิจัยนี้ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลโดยแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่ง Khongkhaem, 2011 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สามารถเจริญโดยใช้ฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวในภาวะที่มีออกซิเจน เมื่อนำแบคทีเรียนี้มาใช้ในรูปของเซลล์อิสระ พบว่าสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงถึง 2.5 กรัมต่อลิตร และเมื่อตรึงในซิลิกาสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงถึง 5.0 กรัมต่อลิตร และสามารถใช้งานได้อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามก็ยังไม่เคยมีการศึกษาถึงวิถีการย่อยสลายฟีนอลโดย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 และยังไม่เคยมีการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียนี้ในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลชนิดอื่นๆ

2.2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนอล

ยีนที่สำคัญสำหรับการย่อยสลายฟีนอล ได้แก่ ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลส ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1) ยีนกลุ่ม Single-component monooxygenase ได้แก่ *pheA* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *Pseudomonas* sp. EST1001 (Kivisaar และคณะ, 1990) และ *tbuD* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *Pseudomonas pickettii* PK01 (Kukor และ Olsewnm, 1991)

2) ยีนกลุ่ม Two-component enzyme ได้แก่ *pheA1* และ *pheA2* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *B. thermoglucosidasius* A7 (Duffner และคณะ, 2000) และ *phe* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *Geobacillus stearothermophilus* (Omokoko และคณะ, 2008)

3) ยีนกลุ่ม Multicomponent enzyme ประกอบด้วยระบบการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน ได้แก่ *dmpKLMNOP* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ CF600 (Nordlund และคณะ, 1990; Shingler และคณะ, 1989) *phhKLMNOP* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *Pseudomonas putida* P35X (Ng, 1994) *pheA1A2A3A4A5A6* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *P. putida* BH (Takeo และคณะ, 1996), *phIABCDEFG* จาก *P. putida* H (Herrmann และคณะ, 1995), *mopKLMNOP* จาก *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250 (Ehrt และคณะ, 1995) *aphKLMNOP* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *Comamonas testosteroni* TA441 (Arai และคณะ, 1998) *mphN* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2 (Zhan และคณะ, 2009) และ *LmPH* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ CF600 (Basile, 2008)

สำหรับแบคทีเรียจีนัส *Acinetobacter* ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล มีรายงานการพบยีน *mopN* และ *mphN* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับฟีนอลไฮดรอกซิเลสของ *A. calcoaceticus* NCIB8250 (Schirmer และคณะ, 1998) และ *A. calcoaceticus* PHEA-2 (Zhan และคณะ, 2009) ตามลำดับ โดยวิธีคัดกรองจากห้องสมุดด้วย southern blot hybridization อย่างไรก็ตามในขณะนี้ยังไม่พบการรายงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนอลในแบคทีเรียจีนัส *Methylobacterium*

ยีนประมวลรหัสฟีนอลไฮดรอกซิเลสสามารถใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการตรวจติดตามแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลได้ งานวิจัยนี้สนใจจะใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล เพื่อติดตามการทำงานของ

แบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ในระบบบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอล อย่างไรก็ตามเนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาถึงยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการวิถีการย่อยสลายฟีนอลโดย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 งานวิจัยนี้จึงเริ่มจากการตรวจหายีนประมวลรหัสฟีนอลไฮดรอกซิเลสในแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์จากยีนที่มีรายงานแล้ว จากนั้นใช้เป็นข้อมูลในการตรวจติดตามเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Real-time qPCR ต่อไป

2.3 การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลด้วยวิธีทางชีวภาพ

ในปัจจุบันการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากต้นทุนในการดำเนินการค่อนข้างต่ำ ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถเปลี่ยนสารประกอบฟีนอลให้เป็นสารไม่มีพิษหรือมีความเป็นพิษน้อยลงได้ โดยอาจใช้แบคทีเรียอิสระหรือแบคทีเรียตรึงบนวัสดุชนิดต่างๆ สำหรับย่อยสลายสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย และในต่างประเทศมีการใช้ระบบการกรองชีวภาพ เช่น ระบบ Fluidized bed reactor ระบบ Packed bed reactor และระบบ Airlift reactor เป็นต้น เพื่อบำบัดสารมลพิษในน้ำ ดิน และอากาศ อย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามระบบการกรองชีวภาพจะมีรูปแบบแตกต่างกันไปตามลักษณะจำเพาะของการทำงาน และความต้องการของผู้ออกแบบ โดยในการเลือกรูปแบบของระบบ ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่ความสะดวกในการจัดหาวัสดุและก่อสร้าง ความประหยัด ความง่ายในการเดินระบบ และความสะดวกในการดูแลรักษา

2.3.1 การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียอิสระในระบบการกรองชีวภาพ

ในปัจจุบันมีการใช้แบคทีเรียในรูปเซลล์อิสระย่อยสลายสารประกอบฟีนอล ทั้งนี้จะเห็นว่าแบคทีเรียอิสระทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลแตกต่างกัน ตัวอย่างงานวิจัยการใช้แบคทีเรียอิสระย่อยสลายสารประกอบฟีนอลสำหรับบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบการกรองชีวภาพแบบต่างๆ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียอิสระสำหรับย่อยสลายสารประกอบฟีนอล

จุลินทรีย์	ชนิดของระบบ บำบัด	ระยะ เวลากัก เก็บน้ำ (ชั่วโมง)	ความ เข้มข้น ของ ฟีนอล (กรัมต่อ ลิตร)	ความเข้มข้น ของ สารประกอบ ฟีนอล (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ประสิทธิภาพ การย่อย สลาย (%)	เอกสารอ้างอิง
<i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1	Airlift bioreactor	5.0- 0.83	0.20- 0.45	-	90	Viggiani และ คณะ (2006)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Batch stirred tank reactor (BSTR) และ Internal loop airlift reactor (ILALR)	-	0.4-0.6	-	100	Saravanana และคณะ (2008)
Indigenous mixed microbial culture predominantly <i>Pseudomonas</i> sp.	Internal loop airlift reactor (ILALR)	-	0.4-0.6	-	100	Saravanana และคณะ (2008)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Internal loop airlift bioreactor	8.3 และ 4.1	0.3-0.8	<i>m</i> -cresol 0.3-0.8	75-100	Saravanan และคณะ (2009)
Activated sludge	Packed-bed bioreactor	0.2-1.8	53 - 201.4 g m ³ /h	-	82.9-100	Liu และคณะ (2009)
Activated sludge	Solid-liquid partitioning bioreactor	-	0.25	2,4-dimethyl phenol และ 4-nitrophenol 0.25	100	Tomei และ คณะ (2011)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Internal loop airlift bioreactor	-	-	สารประกอบ ฟีนอล 0.1034	100	Saravanan และคณะ (2011a)

จุลินทรีย์	ชนิดของระบบ บำบัด	ระยะ เวลากัก เก็บน้ำ (ชั่วโมง)	ความ เข้มข้น ของ ฟีนอล (กรัมต่อ ลิตร)	ความเข้มข้น ของ สารประกอบ ฟีนอล (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ประสิทธิภาพ การย่อย สลาย (%)	เอกสารอ้างอิง
predominantly <i>Pseudomonas</i> sp.	Internal loop airlift bioreactor	8.3 และ 4.1	0.1-0.8	<i>m</i> -cresol 0.1-0.8	100	Saravanan และคณะ (2011b)

จากงานวิจัยข้างต้น พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของระบบบำบัดที่ใช้แบคทีเรียอิสระ ประกอบด้วย ชนิดของระบบการกรองชีวภาพ ชนิดของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล และระยะเวลากักเก็บน้ำ

2.3.2 การย่อยสลายฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

การตรึงเซลล์แบคทีเรีย (Immobilization) หมายถึง เทคนิคที่ใช้ตรึงเซลล์ ออร์กาเนล เอนไซม์ หรือ โปรตีนอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นการตรึงทางกายภาพหรือเคมีไว้บนวัสดุช่วยพยุงที่เป็นของแข็ง หรือตรึงภายในเนื้อสารที่เป็นของแข็ง หรือถูกกักไว้โดยแผ่นเยื่อ เพื่อเพิ่มความคงตัวและทำให้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่หรือใช้อย่างต่อเนื่องได้ เทคนิคในการตรึงเซลล์มี 3 วิธี คือ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมขวาง (cross-linking method) และการกักขัง (entrapment method) (Chibata, 1978; Cassidy, 1996; Khongkhaem และคณะ, 2011) เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นสมบัติของสารพาหะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีอาจแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกันคือ สมบัติเชิงกล (mechanical properties) สมบัติทางกายภาพ (physical properties) ความแข็งแรง ความชอบน้ำ (hydrophilicity) สภาพให้ซึมผ่านได้ (permeability) ความทนต่อสภาวะแวดล้อมทางกายภาพ สารเคมี การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ และแรงกระทบ เนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องทำในภาวะปลอดเชื้อ จึงต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนและความดันได้สูง สารพาหะไม่ควรเป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม และไม่ควรถูกกระทบกระเทือนต่อระบบเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ นอกจากนี้อาจพิจารณาในด้านราคา การยอมรับ และความสามารถในการนำกลับมาใช้ (Khongkhaem และคณะ, (2011); Duarte และคณะ, 2013)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาการใช้แบคทีเรียอิสระในการย่อยสลายฟีนอลจะสามารถย่อยสลายได้ที่ความเข้มข้นต่ำๆ เท่านั้น จึงทำให้มีความสนใจในการพัฒนาวิธีการตรึงเซลล์บนวัสดุต่างๆ อาทิเช่น

อัลจินเนต ไคโตซาน ถ่านกัมมันต์ และซิลิกา เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ให้สามารถย่อยสลายพินอลที่ความเข้มข้นสูงได้ อย่างไรก็ตามถ่านกัมมันต์มักจะดูดซับสารเคมีอันตราย ทำให้มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ ส่วนไคโตซานบางชนิดมีราคาแพง ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้วิธีการตรึงเซลล์แบบกักขัง (Encapsulation) บนซิลิกา ซึ่งซิลิกามีข้อดี คือ มีความเสถียรสูง ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมี สามารถใช้งานได้ในช่วง pH ที่กว้าง มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) ไม่บวมน้ำ จึงสามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายได้ดี และที่สำคัญค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์ไม่แพง เมื่อนำซิลิกามาตรึงเซลล์จุลินทรีย์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ โดยเพิ่มกิจกรรมของเมแทบอลิซึม เพิ่มปริมาณการสร้างสารเมแทบอลิท์ ช่วยเก็บรักษาและปกป้องเซลล์จากสารที่มีความเป็นพิษได้เป็นระยะเวลาานาน เพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ให้สูงขึ้น เพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง (Alvarez และคณะ, 2007; Wang และคณะ, 2007; Zhou, 2010; Duarte และคณะ, 2013)

สำหรับงานวิจัยที่ใช้ซิลิกาเพื่อตรึงจุลินทรีย์ แล้วนำไปใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายพินอล ดังเช่นงานวิจัยของ Branyik และคณะ (1998) ศึกษาการตรึงจุลินทรีย์ในซิลิกาเจล เพื่อย่อยสลายพินอลโดยการเปรียบเทียบระหว่างการตรึงเซลล์ในซิลิกาเจลกับการตรึงเซลล์ใน organic polyurethane ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยสลายพินอลเป็นดังนี้ เซลล์อิสระ < เซลล์ตรึงในพอลิยูรีเทนโฟม < เซลล์ตรึงในซิลิกา ซึ่งการตรึงเซลล์ในซิลิกาเจล สามารถนำไปบำบัดพินอลได้ และงานวิจัยของ Khongkhaem และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้บำบัดพินอลในน้ำเสียสังเคราะห์แบบระบบแบทช์ พบว่าแบคทีเรียตรึงในซิลิกามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพินอลที่ความเข้มข้นสูงประมาณ 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ดี และสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้เป็นเวลาอย่างน้อย 2 เดือน ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนและระยะเวลาในการเตรียมแบคทีเรียตรึง

จากงานวิจัยข้างต้น จะเห็นว่าประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถบำบัดพินอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้ จึงต้องการผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาโดยใช้ระบบที่ไม่ซับซ้อนและมีราคาถูกลง และการนำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาไปผลิตระบบการกรองชีวภาพสำหรับการย่อยสลายสารประกอบพินอลในน้ำเสียต่อไป

2.3.3 การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบพินอลด้วยแบคทีเรียตรึงในระบบการกรองชีวภาพ

ตัวอย่างงานวิจัยการใช้แบคทีเรียตรึงสำหรับบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบพินอลในระบบการกรองชีวภาพแบบต่างๆ มีดังต่อไปนี้

Branyik และ Kuncova (2000) ศึกษาการย่อยสลายพินอลโดยการตรึงเซลล์ด้วยวิธี sol-gel ในซิลิกา (SG) พอลิยูรีเทนโฟม (PU) และเซรามิกโฟม (C) พบว่าแบคทีเรียตรึงในระบบการกรอง

ชีวภาพมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลโดยเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ packed-bed reactor with ceramic form (PBRC) > PBR (PU) > PBR (SG) > fluidized-bed reactor with PU (FBRPU) > FBR (SG)

Quan และคณะ (2003) ศึกษาการบำบัดสารประกอบฟีนอลโดยแบคทีเรีย *Achromobacter* sp. ตรึงบน honeycomb-like ceramic พบว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor สามารถบำบัด 2,4-dichlorophenol ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 94 - 99%

Viggiani และคณะ (2006) ศึกษาการบำบัดฟีนอลโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* OX1 ตรึงบน silica sand, alumina, porous alumina, tuff และ activated carbon พบว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ airlift bioreactor สามารถบำบัดฟีนอลที่ความเข้มข้น 200 - 450 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 90% ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 5.0 - 0.83 ชั่วโมง

Bajaj และคณะ (2008) ศึกษาการบำบัดฟีนอลโดยตะกอนจุลินทรีย์ตรึงบน Liapor clay beads พบว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ fixedbed reactor สามารถบำบัดฟีนอลที่ความเข้มข้น 400 - 10,400 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 30 - 100% ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 22.8 - 144 ชั่วโมง

Zhao และคณะ (2009) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลโดยใช้แบคทีเรีย ตรึงบน organic modified montmorillonite (OMMT) ใน two-phase partitioning bioreactor ผลการศึกษาพบว่าอัตราการย่อยสลายฟีนอลลดลงตามลำดับดังนี้ จุลินทรีย์ตรึงและ OMMT-PSF capsules ใน TPPB (342.4 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) > จุลินทรีย์ตรึงปราศจาก OMMT-PSF capsules (300 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) > จุลินทรีย์อิสระและ OMMT-PSF capsules in a TPPB (208.4 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) > จุลินทรีย์อิสระปราศจาก OMMT-PSF capsules (125.8 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

Nikhitha และคณะ (2009) กำจัดฟีนอลจากน้ำเสียโดยใช้แบคทีเรียตรึงบน rubber foam ในระบบ Bed Biofilm Reactor (MBBR) ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถกำจัดฟีนอลที่ความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 75% และ 60% ตามลำดับ

El-Naas และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลแบบต่อเนื่องโดยใช้ *Pseudomonas putida* ตรึงบนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ใน spouted bed bioreactor (SBBR) ผลการศึกษาพบว่าอัตราการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของฟีนอลเพิ่มขึ้นและอัตราการย่อยสลายลดลงเมื่อเพิ่มอัตราไหลของของเหลว (liquid flow rate)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีงานวิจัยได้นำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาไปใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลในระบบการกรองชีวภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาให้มีประสิทธิภาพสูง

รวมทั้งพัฒนาระบบการกรองชีวภาพขนาดเล็กที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเพื่อใช้ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจากโรงงานสกัดปาล์มน้ำมัน

สำหรับการออกแบบระบบการกรองชีวภาพสำหรับบำบัดน้ำเสียที่ประกอบด้วยตัวกลางซึ่งทำหน้าที่ให้แบคทีเรียยึดเกาะ ต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติของตัวกลาง เช่น หากตัวกลางจมในของเหลว ก็ควรจะใช้ถังปฏิกรณ์ที่มีการกวนผสมเพื่อให้ตัวกลางฟุ้งกระจายอย่างทั่วถึง หรือหากตัวกลางที่ใช้ลอย ก็ควรเลือกใช้ถังปฏิกรณ์ชนิดที่เป็น fixed bed reactor โดยให้ของเหลวไหลผ่านตัวกลางและเกิดการบำบัดขณะที่ของเหลวไหลผ่าน (Rai University, 2004) สำหรับงานวิจัยนี้ ตัวกลางที่ใช้คือแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา ที่มีคุณสมบัติจมน้ำ ดังนั้นถังปฏิกรณ์ที่ใช้ต้องมีการกวนผสม พร้อมทั้งให้อากาศ เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ ซึ่งถังปฏิกรณ์ที่ใช้กันทั่วไปที่มีทั้งการกวนผสมและการให้อากาศมี 3 ชนิด คือ Stirred tank reactor (STR), Bubble column reactor (BCR) และ airlift bioreactor (AR) แต่ทั้งนี้มีการรายงานว่า STR ไม่เหมาะสมกับการใช้กับแบคทีเรียตรึง เนื่องจาก การเสียดสีกันระหว่างใบพัดกับแบคทีเรียตรึง ทำให้เกิดการเสียหายกับแบคทีเรียตรึง นอกจากนี้แรงเฉือนที่เกิดจากใบพัดยังกระจายไม่ทั่วถึง กล่าวคือมีแรงมากบริเวณใบพัด ซึ่งก็คือภายในถัง แต่บริเวณผิวของเหลวจะมีแรงเฉือนน้อย ในขณะที่เดียวกัน BCR และ AR มีการกระจายของแรงเฉือนอย่างทั่วถึง ทำให้แรงที่แบคทีเรียตรึงจะได้รับมีค่าน้อยกว่าแรงจาก STR แต่ BCR มีข้อเสียคือ ตัวกลางบางส่วนจะเกิดการตกตะกอนอยู่บริเวณก้นถัง และการไหลเวียนของของเหลวภายในถังไม่ทั่วถึง ส่งผลให้เกิด dead zone ขึ้น (ศิรินันท์ สุวรรณโมลี, 2547; Dubey และ Hussain, 2014) ดังนั้นจึงเลือกที่จะศึกษาเฉพาะ AR เท่านั้น โดยมีการเพิ่ม internal loop ซึ่งจะเป็นตัวช่วยให้เกิดการหมุนวนของของเหลวและตัวกลางภายใน รวมทั้งช่วยกระจายแรงเฉือนให้ทั่วถึงถังปฏิกรณ์ ทำให้เกิดการเสียหายกับตัวกลางภายในน้อยลง

2.3.4 การประยุกต์ใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนอลในระบบบำบัด

ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล เช่น ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) และ Real-time qPCR เป็นต้น มาใช้เพื่อตรวจติดตามประชากรจุลินทรีย์ในระบบบำบัด ศึกษาการกระจายตัวของยีนในกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม และตรวจติดตามยีนที่ประมวลรหัสของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารเคมีอันตราย โดยอาจใช้เทคนิคใดเทคนิคหนึ่งหรือใช้หลายเทคนิคร่วมกัน ซึ่งวิธีการตรวจติดตามดังกล่าวมีความสะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องใช้เวลานานเหมือนการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ สามารถวิเคราะห์ได้หลายยีนและหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน และเป็นวิธีที่มีความไวสูงจึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ติดตามประชากรและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนอลในระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้น

ดังเช่นงานวิจัยของ Basile และ Erijman (2008) ได้ประเมินความหลากหลายของยีน ประมวลรหัสเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลสเชิงปริมาณในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้เทคนิค Real-time qPCR ในระดับดีเอ็นเอ พบจำนวนชุดของยีน *LmPH* ประมาณ 0.05 - 0.07 จำนวนชุดของยีน *LmPH* ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด ในระหว่างการบำบัดฟีนอล

นอกจากนี้ยังสนใจศึกษาการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของซิลิกา โครงสร้างของไบโอฟิล์มบนซิลิกา และการรอดชีวิตของแบคทีเรียบนซิลิกาในระบบบำบัด ด้วยเทคนิค Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) ซึ่งเป็นวิธีการที่สำคัญสำหรับการศึกษากายวิภาคของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของวัสดุ โครงสร้างของไบโอฟิล์ม และการรอดชีวิตของแบคทีเรีย โดยการย้อมด้วยฟลูออเรสเซนต์ รวมทั้งสามารถบอกรูปร่างของไบโอฟิล์มที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ซึ่งไบโอฟิล์มที่แบคทีเรียสร้างขึ้นช่วยให้แบคทีเรียทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ จากสิ่งแวดล้อม และทำให้แบคทีเรียมีวิวัฒนาการในการปรับตัวอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงกว่าเดิมได้ ดังเช่นงานวิจัยของ Wouters และคณะ (2010) ที่ศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของ *Mycobacterium* ด้วย Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) ในระหว่างการย่อยสลายสารอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ทำให้เข้าใจพฤติกรรมของกลุ่มแบคทีเรียในระหว่างการย่อยสลายสารอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน

2.4 การบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม

2.4.1 ลักษณะน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การผลิตน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่พบในประเทศอินโดนีเซียเป็นอันดับหนึ่ง รองลงมาคือประเทศมาเลเซีย ส่วนประเทศไทยอยู่ในอันดับที่ 3 เหตุผลที่ประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้สามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้เป็นอันดับแรกๆ ของโลก เนื่องจากสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศเอื้ออำนวยต่อการปลูกน้ำมันปาล์มเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศ โดยคุณภาพของผลผลิตน้ำมันปาล์มขึ้นอยู่กับการตัดแต่งทางพันธุกรรมของสายพันธุ์น้ำมันปาล์ม และปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณน้ำมันปาล์มคือ ปัจจัยด้านภูมิอากาศ เช่น น้ำ แสงแดด และอุณหภูมิเป็นต้น (Rupani และคณะ, 2010) ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณการผลิตน้ำมันปาล์มของแต่ละประเทศ (ที่มา: Rupani และคณะ, 2010)

ประเทศ	ส่วนแบ่ง (%)	จำนวน (ตัน)
อินโดนีเซีย	44	19,000
มาเลเซีย	41	17,350
ไทย	3	1,123
ไนจีเรีย	2	850
โคลัมเบีย	2	832
อื่นๆ	8	3,556

เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม ที่ประกาศโดยกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 มาตรฐานคุณภาพน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	มาตรฐานคุณภาพน้ำเสีย*
pH	5.5-9.0
Temperature (°C)	ไม่เกิน 40 °C
BOD (mg/l)	ไม่เกิน 60 mg/L
COD (mg/l)	ไม่เกิน 400 mg/L
TKN (mg/l)	ไม่เกิน 100 mg/L
Phenol (mg/l)	ไม่เกิน 1.0 mg/L
TSS (mg/l)	ไม่เกิน 50 mg/L

แหล่งที่มา: *มาตรฐานคุณภาพน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) เรื่องกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำเสียจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรมลงวันที่ 3 มกราคม 2539 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 13 ง ลงวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2539

น้ำเสียส่วนใหญ่ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาจากขั้นตอนการอบทะลายปาล์มในรูปน้ำเสียจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ และจากเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำมันจากน้ำสลัดจ์ ปริมาณน้ำเสียคิดเป็น 2.5 ถึง 3.0 เท่าของปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ (Cheah และคณะ, 1988) ลักษณะโดยทั่วไปของน้ำเสียมีสารอินทรีย์สูง มีสีคล้ำ และมีการปนเปื้อนของสารอันตรายจำพวกสารประกอบฟีนอลในระดับความเข้มข้นสูง สี

น้ำตาลในน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์มมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์ เช่น รงควัตถุพวกแอนโทไซยานิน และแคโรทีน ซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับน้ำมันและไอน้ำ นอกจากนี้ยังพบสารประกอบพวกเมลานอยดิน (melanoidin) กัม (gum) และสารพอลิฟีนอล ในผลปาล์มนอกจากจะมีน้ำมันเป็นองค์ประกอบหลักแล้ว ยังมีสารประกอบอื่นๆ ที่ละลายได้ดีในน้ำมันหรือน้ำรวมอยู่ด้วย (Sundram และคณะ, 2003; Tan และคณะ, 2007) ทั้งนี้สารประกอบฟีนอลเป็นสารที่พบเป็นองค์ประกอบอยู่ในผลปาล์ม ปริมาณ 0.006 มิลลิกรัม ต่อลิตร ต่อกรัมผลปาล์ม หรือ มี total phenolic content เท่ากับ 83.97 กรัมต่อลิตร gallicacid equivalent (GAE) ต่อกรัมสารสกัดจากผลปาล์มซึ่งสารประกอบฟีนอลนี้จะถูกปล่อยออกมาระหว่างกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อในการสกัดน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำหรือที่เรียกว่าแบบมาตรฐาน ในขั้นตอนนี้จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polyphenoloxidases เป็นสาเหตุให้สารประกอบฟีนอลไม่ถูกย่อยสลายไป และปนเปื้อนออกมากับน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม (Sundram และคณะ, 2003)

จากรายงานของ Alam, 2009พบว่ามีการปนเปื้อนของฟีนอลในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้จากการตรวจหาปริมาณฟีนอลในน้ำเสียจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อและบ่อบำบัดน้ำเสียรวมชั้นต้นพบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 5.9 และ 7.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส, 2547) จากรายงานที่ผ่านมาพบปริมาณของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มตั้งแต่ 30 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (พนิดา ไต้ะสุ, 2555; Alam และคณะ, 2009; Cordova-Rosa และคณะ, 2009; Limkhunsuwan และ Chaiprasert, 2010; US EPA, 2013) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลยังมีส่วนทำให้เกิดสีคล้ำในน้ำเสียและถูกบำบัดได้ยากด้วยการบำบัดทางชีวภาพ (Sayadi และคณะ, 2000; Neoh และคณะ, 2014; Saifuddin และคณะ, 2014) ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ.2539) ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลความเข้มข้นสูง ก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจากข้อมูลข้างต้นกล่าวได้ว่าน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มสามารถใช้เป็นต้นแบบของการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลโดยใช้แบคทีเรียตรงบนซิลิกาได้เป็นอย่างดี

2.4.2 วิธีการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

วิธีการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในปัจจุบัน แบ่งออกเป็น 3 กระบวนการประกอบด้วย กระบวนการบำบัดทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ (US EPA, 2013)

2.4.2.1 กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางกายภาพ (Physical Treatment) เป็นกระบวนการกำจัดของแข็ง เศษวัสดุ กรวดทรายที่ปนมากับน้ำเสียและยังช่วยลดค่า BOD ของน้ำลง

ได้บางส่วน วิธีการประกอบด้วย การแยกโดยใช้ตะแกรง (Screening) การบดหรือตัด (Comminution) การกวาด (Skimming) การกำจัดกรวดทราย (Grit chamber) การดักไขมัน (Grease traps) การทำให้ลอย (Flotation) และการตกตะกอนของแข็งขนาดเล็ก (Primary sedimentation)

2.4.2.2 กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางเคมี (Chemical Treatment) เป็นการแยกสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำออกจากน้ำเช่น คลอไรด์ซัลเฟตโซเดียมโซดาไนต์ ฯลฯ เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อสัตว์ในแหล่งน้ำที่ระบายน้ำเสียลงไปทำให้น้ำมีสีกลิ่นรสที่ผิดปกติเกิดขึ้นหรือเป็นอันตรายจนไม่เหมาะกับการนำไปใช้อุปโภคบริโภคหรืออาจทำให้น้ำมีคุณสมบัติในการกัดกร่อนมีความกระด้างและตะกอนเพิ่มขึ้นการบำบัดทางเคมี ประกอบด้วย

1. การสร้างตะกอนให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อให้สามารถตกตะกอนได้ง่ายขึ้น (Coagulation and Flocculation)
2. ทำให้มวลสารที่ละลายอยู่ในน้ำตกตะกอน (Precipitation) หรือทำให้ไม่ละลายน้ำ (Insolubilization)
3. ปรับสภาพน้ำให้เหมาะสมกับความต้องการเช่นปรับค่าพีเอช
4. ฆ่าเชื้อโรค (Disinfection)
5. ปรับสภาพตะกอน (Sludge Conditioning) เพื่อใช้ในกระบวนการย่อยหรือแยกเอาน้ำออกจากตะกอน

วิธีการที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียทางเคมีได้แก่การสร้างตะกอนทางเคมี (Chemical-coagulation) การตกตะกอน (Precipitation) การให้และรับอิเล็กตรอน (Oxidation-Reduction) การทำให้เป็นกลาง (Neutralization) และการฆ่าเชื้อโรค (Disinfection) โดยขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมีของน้ำเสีย

2.4.2.3 กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological Treatment) เป็นการใช้เชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียเพื่อเป็นอาหารโดยมีภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียตามอุณหภูมิอาหารออกซิเจนและค่าความเป็นกรดต่างของน้ำเสีย (Chen และคณะ 2009; US EPA, 2013) ประกอบด้วย

1. กระบวนการบำบัดแบบใช้ออกซิเจนเป็นกระบวนการที่อาศัยการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ประเภทที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ โดยเชื้อจุลินทรีย์จะใช้อินทรีย์เป็นอาหารและเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเกิดเซลล์ใหม่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่อุณหภูมิไม่เกิน 37 องศาเซลเซียส และสารอาหารที่เหมาะสม

2. กระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นกระบวนการที่อาศัยเชื้อแบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic bacteria) ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายสารอินทรีย์ขั้นสุดท้ายได้แก่มิเทนเนียม

ใช้กับน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีความเข้มข้นของ BOD ค่อนข้างสูงเพื่อลดค่า BOD ลงระดับหนึ่งก่อนแล้วจึงต่อด้วยกระบวนการบำบัดทางชีวภาพแบบใช้อากาศ

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้กระบวนการบำบัดทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ เพื่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Perez และคณะ (2001) รายงานว่าการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นวิธีที่เหมาะสมเนื่องจากน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ปริมาณสูง

Onyia และคณะ (2001) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์มในประเทศมาเลเซีย พบว่านิยมใช้บ่อปรับเสถียร (stabilization pond) เนื่องจากข้อดีของบ่อปรับเสถียรคือ ราคาถูก ง่ายต่อการควบคุม แต่ข้อเสียคือ ต้องใช้เงินจำนวนมากในการซื้อที่ดินระยะเวลาในการเก็บกักน้ำค่อนข้างนานทำให้บำบัดน้ำเสียได้ปริมาณน้อย ส่งกลิ่นเหม็น (Ng และคณะ, 1994; Chin และคณะ, 1996)

จากการศึกษาข้างต้นพบว่ากระบวนการบำบัดที่นิยมใช้กับน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มคือ การบำบัดทางกายภาพ-เคมี และการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจน ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มควรนำการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจนมาใช้ร่วมด้วย ดังเช่นงานวิจัยของ Chen และคณะ (2009) ได้เปรียบเทียบการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบการบำบัดด้วยวิธีชีวภาพแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน

(ที่มา: Chen และคณะ, 2009)

ลักษณะ	แบบใช้ออกซิเจน	แบบไม่ใช้ออกซิเจน
Organic removal efficiency	สูง	สูง
Effluent quality	Excellent	Moderate to poor
Organic loading rate	ปานกลาง	สูง
Sludge production	สูง	ต่ำ
Nutrient requirement	สูง	ต่ำ
Alkalinity requirement	ต่ำ	สูง
Energy requirement	สูง	ต่ำถึงปานกลาง
Temperature sensitivity	ต่ำ	สูง
Start up time	2-4 สัปดาห์	2-4 เดือน
Odor	Less opportunity for odors	Potential odor problems
Bioenergy and nutrient	ไม่	ใช่

ลักษณะ	แบบใช้ออกซิเจน	แบบไม่ใช้ออกซิเจน
recovery		
Mode of treatment	Total (depending on feedstock characteristics)	Essentially pretreatment

Chan และคณะ (2012) รายงานว่าระบบบำบัดแบบ anaerobic-aerobic bioreactor (IAAB) สามารถบำบัดซีโอดี บีโอดี และของแข็งละลายน้ำทั้งหมด ในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ประมาณ 99%

อย่างไรก็ดีวิธีการเหล่านี้มักจะไม่ได้คำนึงถึงประสิทธิภาพของระบบในการกำจัดสารประกอบฟีนอล มีเพียงงานวิจัยของ Limkhuansuwan และ Chaiprasert (2010) ที่ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและความเข้มข้นของสีในน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศมาเลเซีย โดย *Lactobacillus plantarum* SF5.6 ในภาวะที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจน พบว่าระบบสามารถย่อยสลายฟีนอล สารประกอบฟีนอลและความเข้มข้นของสีได้ประมาณ 34%, 33.53% และ 15.88% ตามลำดับ (ตารางที่ 2.5) ซึ่งข้อดีของงานวิจัยนี้คือ เลือกใช้แบคทีเรียที่คัดแยกจากภาคตะกอนของโรงบำบัดน้ำเสียที่มีความสามารถในการกำจัดสีในน้ำเสีย จึงสามารถกำจัดสีได้ค่อนข้างดี แต่ข้อเสียคือ ใช้แบคทีเรียที่ไม่มีความจำเพาะในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอล ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายต่ำ

ตารางที่ 2.5 การย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและสีในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดย *Lactobacillus plantarum* SF5.6 (Limkhuansuwan และ Chaiprasert, 2010)

พารามิเตอร์	คุณภาพน้ำเสียก่อนการบำบัด	คุณภาพน้ำเสียหลังการบำบัด
pH	6	4.19
Cell mass (mg dry weight/mL)	0.1	1.18
Phenolic compounds (mg/L)	33.64	22.36
Phenol removal (%)	-	34.00
Decolorization yield (%)	-	15.88

จากการศึกษาข้างต้นพบว่า การประยุกต์ใช้ระบบการกรองชีวภาพสำหรับบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้แบคทีเรียยังมีการศึกษาน้อยมาก แต่ งานวิจัยส่วนใหญ่นิยมศึกษาการย่อยสลาย COD, BOD, TKN, ไนโตรเจนและน้ำมันมากกว่าการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบฟีนอล เนื่องจากลักษณะของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มพบ COD, BOD, TKN, ไนโตรเจนและน้ำมันในปริมาณค่อนข้างสูง ดังเช่นงานวิจัยของ Vijayaraghavan และคณะ (2007) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศมาเลเซียด้วยวิธีทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจนโดยใช้ activated sludge reactor ซึ่งเป็นการนำน้ำเสียจากบ่อบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนมาบำบัดต่อด้วยระบบกรองชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน พบว่าระบบการกรองชีวภาพสามารถย่อยสลาย COD, BOD, TKN, ไนโตรเจนและน้ำมันได้ประมาณ 98%, 93%, 94.3%, 89.9% และ 52.7% ตามลำดับ สำหรับการบำบัดด้วยวิธีการนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดโดยไม่ใช้ออกซิเจนมาบำบัดต่อแบบใช้ออกซิเจนมีข้อดีคือนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนมาบำบัดต่อด้วย activated sludge reactor แบบใช้ออกซิเจนซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารมลพิษ แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือ การเตรียมหัวเชื้อค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน และระบบเกิดอุดตันได้ง่ายเนื่องจากใช้กากตะกอนเป็นหัวเชื้อในกระบวนการบำบัด ระยะเวลาเก็บกักน้ำ (HRT) ที่ใช้ในระบบค่อนข้างสูงอาจส่งผลให้บำบัดน้ำเสียได้ปริมาณน้อยกว่าการใช้ระยะเก็บกักน้ำต่ำ และที่สำคัญใช้แบคทีเรียประจำถิ่นที่ไม่มีความจำเพาะในการย่อยสลายสารมลพิษอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการบำบัดต่ำกว่าการใช้แบคทีเรียที่คัดแยกและมีความสามารถที่จำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายสารมลพิษ

ในประเทศไทยการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่ยังคงใช้การบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนและบ่อปรับเสถียร (Chan และคณะ, 2012; Chin และคณะ, 2013) ซึ่งประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงสนใจนำระบบการกรองชีวภาพที่เติมแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาไปใช้บำบัดน้ำเสียจากบ่อบำบัดแบบบ่อปรับเสถียรและน้ำเสียจากกระบวนการผลิต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบบำบัดที่ใช้ทั่วไปของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และแก้ปัญหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานอุตสาหกรรม และสามารถเพิ่มมูลค่าโดยการนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดไปผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป

2.5 การผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม

2.5.1 ก๊าซชีวภาพ (Biogas) คือ ก๊าซที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากการย่อยสลายอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ภายใต้ภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ก๊าซชีวภาพ ประกอบด้วย ก๊าซหลายชนิดส่วนใหญ่เป็น ก๊าซมีเทน (CH_4) ประมาณ 55 - 65% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ประมาณ 35 - 45% ส่วนที่เหลือเป็นก๊าซชนิดอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจน (H_2) ประมาณ 0 - 3% ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ประมาณ 0 - 3% ไนโตรเจน (N_2) ประมาณ 0-1% และไอน้ำและประโยชน์ของก๊าซชีวภาพ ประกอบด้วย 1) ด้าน

พลังงาน ก๊าซชีวภาพมีคุณสมบัติเป็นเชื้อเพลิงที่สามารถทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงจากแหล่งอื่นๆ เช่น ฟืน ถ่าน น้ำมัน ก๊าซถัง ไฟฟ้า ฯลฯ 2) ด้านการเกษตร กากมูลสัตว์ที่ได้จากการหมักก๊าซชีวภาพสามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยได้ดีกว่าปุ๋ยพืชสด (ปุ๋ยคอก) ทั้งนี้เนื่องจากในขณะที่มีการหมักนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนในมูลสัตว์ให้กลายเป็นแอมโมเนียที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่า และยังมีคุณสมบัติที่ดีกว่าปุ๋ยเคมีในการใช้ปรับปรุงดินเพื่อการเกษตรให้มีสภาพดีขึ้นด้วย 3) ด้านปรับปรุงสภาพแวดล้อม การนำมูลสัตว์มาหมักในบ่อก๊าซชีวภาพเป็นการช่วยกำจัดมูลสัตว์บริเวณที่เลี้ยงสัตว์ ทำให้กลิ่นเหม็นและแมลงวันในบริเวณนั้นลดลง ผลที่ได้จากการหมักมูลสัตว์ในบ่อก๊าซชีวภาพที่ปราศจากออกซิเจนเป็นเวลานานทำให้โซปายาและเชื้อโรคส่วนใหญ่ในมูลสัตว์ตายด้วย จึงทำให้ผู้ที่อยู่อาศัยในบริเวณนั้นมีสุขภาพอนามัยดีขึ้น และยังเป็น การป้องกันมูลสัตว์ไม่ให้ถูกชะล้างลงไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ (US ESCAP, 2007)

2.5.2 ขั้นตอนและปฏิกิริยาการเกิดก๊าซชีวภาพ

ก๊าซชีวภาพมาจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic biological) โดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์ในกระบวนการที่มี 3 ขั้นตอนหลัก (Rozzi และคณะ, 2004; Sorathia และคณะ, 2012) สรุปได้ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 จุลินทรีย์จะใช้เอนไซม์เปลี่ยนสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารอินทรีย์โมเลกุลเล็ก เช่น ไขมัน พอลิแซคคาไรด์ และโปรตีน โดยจะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปโมเลกุลของโมโนแซคคาไรด์ (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว) กรดอะมิโน และกรดไขมัน โดยขั้นตอนนี้เรียกว่า Hydrolysis โดยการ ทำงานขั้นตอนนี้เกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มไม่ใช้ออกซิเจนแบบ strictly anaerobe เช่น *Bactericides*, *Clostridia* และกลุ่ม facultative bacteria เช่น *Streptococci*

ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนการเกิดกรด (acidogenesis) โดยเกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรด (acid-producing bacteria) และสามารถหมักได้ โดยจะเปลี่ยนสารโมเลกุลเล็กๆ จากขั้นตอนแรกไปเป็น กรดอะซิติก ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Organic Acid) เช่น กรดโพพิโอนิกและกรดบิวทริกซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกได้เช่นกัน

ขั้นตอนที่ 3 กรดอะซิติกไฮโดรเจน และ CO₂ จะเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทนและ CO₂ โดยจุลินทรีย์กลุ่ม Methanogenic bacteria. สำหรับก๊าซไฮโดรเจนและฟอร์มेटเกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม *Methanobacterium* และ *Methanococcus*

การทดสอบความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซมีเทน (Specific Methanogenic Activity; SMA) เป็นการทดสอบความสามารถในการสร้างมีเทนของตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกในระบบผลิตก๊าซชีวภาพ โดยการทดสอบนี้ทำให้ทราบข้อมูลต่างๆ ของระบบ ทั้งก่อนการดำเนินระบบและหลังจากเดินระบบไปแล้ว โดยการทำให้ SMA ในแต่ละช่วงจะนำไปวิเคราะห์ผลได้ดังนี้ การวิเคราะห์ก่อนดำเนินระบบจะทำให้ทราบว่าตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์แอนแอ

โรบิกและน้ำเสียของเราสามารถผลิตก๊าซมีเทนได้จำนวนเท่าไร? จากการย่อยของแบคทีเรียทำให้ ออกแบบระบบได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด และทำให้ทราบปริมาณก๊าซมีเทนที่สามารถนำไปใช้ได้ อีกทั้งทำให้ประเมินและออกแบบระบบที่จะนำมีเทนไปใช้ต่อไปได้อย่างถูกต้อง ส่วนการวิเคราะห์ หลังจากเดินระบบ โดยวิเคราะห์น้ำเสียเปรียบเทียบกับสารที่แบคทีเรียสามารถย่อยได้ง่ายและ เปลี่ยนไปเป็นมีเทนได้มากที่สุด เพื่อดูว่าน้ำเสียให้ค่า SMA ไกล่เคียงกับสารที่ย่อยง่ายหรือไม่ ถ้าได้ค่า ไกล่เคียงสามารถบอกได้ว่าระบบและแบคทีเรียยังคงมีคุณภาพดีทำงานได้ปกติ แต่ถ้าค่าที่ได้จากน้ำ เสียน้อยกว่าค่ามาตรฐานมาก จะทำให้ทราบว่าระบบกำลังเกิดปัญหา และต้องทำการทดสอบต่อไปว่า ปัญหานั้นๆ เกิดจากปัญหาใดหรือมีสารใดเข้ามาในระบบมากเกินไป จนทำให้ระบบเกิดปัญหาได้ (Sun และคณะ, 2012) สำหรับการทดสอบศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทน (Biochemical Methane Potential, BMP) เป็นการหาค่าศักยภาพการผลิตก๊าซมีเทนของของเสียที่นำมาบำบัดด้วยระบบแบบไม่ ใช้ออกซิเจน แสดงในรูปของปริมาณก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นทั้งหมดต่อกรัมซีโอดี หรือกรัม VSS ของเสียที่ ป้อนเข้าไป ค่า BMP ที่ได้จะแสดงถึงศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนสูงสุดของของเสีย (Moody และ คณะ, 2009) และการทำนายปริมาณก๊าซมีเทนโดยแบบจำลอง Gompertz เป็นแบบจำลองทาง คณิตศาสตร์ เพื่อทำนายอัตราการผลิตก๊าซมีเทน การใช้สารตั้งต้น และการเจริญของจุลินทรีย์ใน ระบบผลิตก๊าซชีวภาพ (Patil และคณะ, 2012)

2.5.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตก๊าซชีวภาพ

การย่อยสลายสารอินทรีย์และการผลิตก๊าซชีวภาพมีปัจจัยต่างๆ เกี่ยวข้อง (Sorathia และ คณะ, 2012) ดังต่อไปนี้

1. อุณหภูมิ (Temperature) การย่อยสลายสารอินทรีย์และการผลิตก๊าซชีวภาพในภาวะ ปราศจากออกซิเจนสามารถเกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิที่กว้างมากตั้งแต่ 4-60 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับ ชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์
2. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีความสำคัญต่อการหมักมาก ช่วง pH ที่เหมาะสมอยู่ในระดับ 6.6-7.5 ถ้า pH ต่ำเกินไปจะเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทน
3. อัลคาลินิตี (Alkalinity) ค่าอัลคาลินิตี หมายถึงความสามารถในการรักษาระดับความเป็น กรด-ด่างค่าอัลคาลินิตีที่เหมาะสมต่อการหมักมีค่าประมาณ 1,000-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของ แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)
4. สารอาหาร (Nutrients) สารอินทรีย์ที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์มี รายงานการศึกษาพบว่า มีสารอาหารในสัดส่วน C:N และ C:P ในอัตรา 25:1 และ 20:1 ตามลำดับ
5. สารยับยั้งและสารพิษ (Inhibiting and Toxic Materials) เช่น สารประกอบฟีนอล และ สารอื่นๆ เช่น ซัลไฟด์ โลหะหนัก กรดไขมันระเหยได้ ไฮโดรเจน หรือแอมโมเนีย เป็นต้น สามารถทำ ให้ขบวนการย่อยสลายในภาวะไม่มีออกซิเจนหยุดชะงักได้

6. สารอินทรีย์และลักษณะของสารอินทรีย์สำหรับขบวนการย่อยสลายซึ่งมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่เข้าเกี่ยวข้อง

2.5.4 ผลของสารประกอบฟีนอลต่อการผลิตก๊าซชีวภาพ

การนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลไปทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพเปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลจะช่วยยืนยันว่าสารประกอบฟีนอลมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างมีเทนหรือไม่ ดังเช่นงานวิจัยของ

Gharsallah และคณะ (1999) ศึกษาการกำจัดซีโอดี และสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก โดยรา *P. chrysosporium* พบว่าเราสามารถลดปริมาณซีโอดีได้ แต่สามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทำให้สารประกอบฟีนอลยังคงอยู่ในน้ำเสีย และมีผลยับยั้งการผลิตก๊าซชีวภาพ

Fountoulakis และคณะ (2002) ศึกษาการกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกด้วยรา *Pleurotus ostreatus* และนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลมาผลิตก๊าซชีวภาพ พบว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดและน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ประมาณ 1,700 และ 1,200 มิลลิลิตร ซึ่งน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ดีกว่าน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล โดยน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดและน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลสามารถผลิตก๊าซมีเทนได้ประมาณ 1,394 และ 852 มิลลิลิตรมีเทน แสดงให้เห็นว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมีเทนได้เพิ่มขึ้นประมาณ 1.64 เท่าของน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล

Martinez-Garcia และคณะ (2007) รายงานว่าการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกแบบใช้อากาศก่อนนำน้ำเสียไปผลิตก๊าซมีเทน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้นประมาณ 23%

Chen และคณะ (2008) ศึกษาการยับยั้งกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ โดยกล่าวว่า สารพิษที่พบในน้ำเสีย เช่น แอมโมเนียม ซัลไฟด์ และโลหะหนัก เป็นต้นมีผลทำให้ระบบการกรองชีวภาพล้มเหลวและยับยั้งการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ในน้ำเสีย ส่งผลให้ผลิตก๊าซชีวภาพต่ำลงหรือไม่มี การผลิตก๊าซชีวภาพ

จากงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการบำบัดสารประกอบฟีนอลเบื้องต้นในน้ำเสียก่อนนำน้ำเข้าสู่ระบบก๊าซชีวภาพ จะช่วยลดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทน (methanogens) ซึ่งส่งผลให้แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้น ถือเป็น การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพ และยังช่วยลดการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียอีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจจะนำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผลิตขึ้นมาพัฒนาเป็นตัวกรองของระบบการกรอง

ชีวภาพแบบ Internal loop airlift reactor เพื่อใช้บำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอล แล้วทดสอบประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นกับน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอีกทั้งนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดไปใช้เพื่อการผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป นอกจากนี้จะติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับย่อยสลายฟีนอลด้วยเทคนิค Real-time qPCR และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียบนซิลิกาและแบคทีเรียอื่นๆ ในระบบการกรองชีวภาพระหว่างการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียด้วย CLSM โดยข้อมูลที่ได้รับจะช่วยยืนยันว่าแบคทีเรียที่เดิมลงไปในระบบการกรองชีวภาพสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในระบบ และทำให้ทราบถึงจำนวนชุดยีนของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในระบบ ซึ่งความรู้ที่ได้รับจะช่วยให้สามารถออกแบบระบบบำบัดสารประกอบฟีนอลที่สัมพันธ์กับการทำงานของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในภาวะต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งสามารถนำระบบไปขยายขนาดและเพิ่มปริมาณแบคทีเรียตรึงตามอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อให้บำบัดน้ำเสียปริมาณมากๆ ได้ โดยระบบบำบัดที่พัฒนาขึ้นและความรู้ที่ได้รับจะสามารถนำไปปรับใช้สำหรับการบำบัดเชิงชีวภาพของสารประกอบฟีนอลหรือสารมลพิษชนิดอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ที่มีสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกัน และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพอีกด้วย

บทที่ 3

ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วย แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบแบทช์และระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้น

3.1 บทนำ

ในปัจจุบันมีการใช้สารประกอบฟีนอลอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม เช่น เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อโรค เป็นวัตถุดิบของการผลิตสี ยาง พลาสติก และสิ่งทอ เป็นตัวทำละลายสำหรับการกลั่นน้ำมันและการผลิตสารหล่อลื่น และเป็นริเอเจนต์ของกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีสารประกอบฟีนอลยังเป็นส่วนประกอบของวัตถุดิบจากธรรมชาติหลายชนิด เช่น ผลปาล์ม ชา มะกอก ยาสูบ และผลิตภัณฑ์อื่นๆ จึงพบการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลชนิดอื่นๆ ในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่น โรงงานผลิตยา 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โรงกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม 6 – 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร กระบวนการผลิตถ่านหิน 9 – 6,800 มิลลิกรัมต่อลิตร และกระบวนการผลิตปิโตรเคมี 2.8 – 1,220 มิลลิกรัมต่อลิตร (Dubey และ Hussain, 2014) นอกจากนี้ Alam และคณะ (2009) รายงานว่าพบสารประกอบฟีนอลปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสารประกอบฟีนอลมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตสูง โดยมีผลกระทบต่อการทำงานของตับ ไต ปอด และระบบหมุนเวียนโลหิต (Gami และคณะ, 2014) ทางองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้กำหนดให้มีสารประกอบฟีนอลอยู่ในน้ำดื่มได้ในปริมาณไม่เกิน 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร และกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ประเทศไทย ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) ได้กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรม และนิคมอุตสาหกรรม ให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลได้ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการบำบัดสารประกอบฟีนอล

การบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำที่ปนเปื้อน สามารถใช้วิธีการดั้งเดิม เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ หรือการออกซิไดซ์ด้วยสารเคมี เป็นต้น แต่วิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายสูง และอาจเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีอันตราย ในปัจจุบันการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้เซลล์อิสระ เซลล์ตรึง และตะกอนสลัดจ์เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากมีราคาถูกปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถเปลี่ยนสารประกอบฟีนอลให้เป็นสารเคมีที่ไม่มีพิษได้ อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไปอาจมีข้อจำกัดในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอล ซึ่งส่งผลให้ยังคงตรวจพบปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานถึงแม้จะผ่านระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแล้ว เนื่องจากสารประกอบฟีนอลเป็นสารเคมีอันตรายที่มีผลต่อเซลล์แบคทีเรีย โดยจะทำให้สูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้แบคทีเรียตายเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลสูง (Heipieper และคณะ, 1992) ดังนั้นจึง

จำเป็นต้องเติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลลงในระบบบำบัด ในงานวิจัยนี้จึงสนใจปรับปรุงวิธีการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรีย และพัฒนาวิธีใช้แบคทีเรียตรึงเป็นตัวกรองชีวภาพ (Biofilter) เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลจากโรงงานอุตสาหกรรม ทั้งนี้การตรึงแบคทีเรียบนวัสดุสังเคราะห์จะช่วยป้องกันแบคทีเรียจากสารเคมีอันตรายอื่นๆ ในระบบบำบัดน้ำเสียอีกด้วย (Pazarlioglu และ Telefoncu, 2005)

ระบบการกรองชีวภาพ (Biofiltration) เป็นระบบที่ทำให้สารมลพิษในรูปแก๊สหรือของเหลว เช่น น้ำเสียสัมผัสกับมวลจุลินทรีย์ที่เกาะติดอยู่กับตัวกลาง เพื่อให้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารมลพิษนั้นๆ ทั้งนี้ระบบจะต้องมีการปรับสภาพให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทั่วไประบบการกรองชีวภาพมีลักษณะเป็นถังปฏิกรณ์ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงไว้ภายใน การบำบัดน้ำเสียแบบระบบการกรองชีวภาพ มีข้อดีคือ 1) มีปริมาณของจุลินทรีย์ในระบบสูง เนื่องจากจุลินทรีย์มีที่ยึดเกาะสำหรับการเจริญ 2) อัตราการย่อยสลายสูงเนื่องจากมีสารอาหารสะสมที่ตัวกรองสูง 3) ทนต่อสารมลพิษที่หลากหลาย เนื่องจากสารพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ปล่อยออกมาระหว่างการสร้างไบโอฟิล์มช่วยป้องกันเซลล์ไม่ให้สัมผัสกับสารพิษโดยตรงและ 4) มีตะกอนจุลินทรีย์น้อย (Cohen, 2001) ปัจจุบันมีการใช้ระบบการกรองชีวภาพเพื่อบำบัดสารพิษในน้ำและอากาศอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ อย่างไรก็ตามระบบการกรองชีวภาพจะมีรูปแบบแตกต่างกันไปตามลักษณะจำเพาะของการใช้งาน และความต้องการของผู้ออกแบบ เช่น ระบบ Fluidized bed reactor ระบบ Packed bed reactor และระบบ Airlift reactor เป็นต้น โดยในการเลือกรูปแบบของระบบ ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่ความสะดวกในการจัดหาวัสดุและก่อสร้าง ความประหยัด และความง่ายในการเดินระบบและการดูแลรักษา สำหรับลักษณะการใช้งานตามปกติ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสำหรับเป็นตัวกรองของระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor เพื่อใช้บำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลโดยทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบแบทช์และในระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นกับน้ำเสียสังเคราะห์ ความรู้ที่ได้รับจะช่วยให้สามารถพัฒนาระบบการกรองชีวภาพต้นแบบที่ประกอบด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสำหรับบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งจัดเป็นอุตสาหกรรมทางการเกษตรที่สำคัญทางภาคใต้ของประเทศไทย และอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่พบการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียต่อไป

3.2 ขั้นตอนงานวิจัย

3.2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับตรึง

3.2.2 การผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

3.2.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผลิตขึ้นใหม่

3.2.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

3.2.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเมื่อแปรผันอุณหภูมิ

3.2.3.4 การทดสอบระยะเวลาและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

3.2.4 การพัฒนาระบบการกรองชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา สำหรับบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์

3.2.4.1 การสร้างระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ขนาดเล็ก

3.2.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับตรึง

เพาะเลี้ยง *Methylobacterium* sp. NP3 (ภาราช, 2550) และ *Acinetobacter* sp. PK1 (คงแถม, 2552) แยกจากกัน เมื่อนำมาทดลองจึงนำหัวเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้อาหารเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อลิตร บ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับตรึง โดยปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์จำนวน 2 ครั้ง แล้วแขวนลอยเซลล์ด้วยอาหารเหลว CFMM หลังจากนั้นปรับค่า OD เพื่อให้มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียตามที่ต้องการ

3.3.2 การผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

การผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาใช้วิธี sol-gel ดังสมการที่ 3.1 โดยผสม tetraethoxysilane (TEOS) และกรดไฮโดรคลอริก ลงในขวดสังเคราะห์ขนาด 15 มิลลิลิตร คนแรงๆ จนได้สารละลายใส บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับค่าพีเอช ของของผสมให้เป็นกลางด้วยโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (pH = 8) แล้วเติมหัวเชื้อแบคทีเรียโดยผสมของผสมที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2-3 นาที จนเกิดเป็นเจล (Khongkhaem และคณะ, 2011) ซึ่งผสมสารในภาชนะที่เหมาะสม เช่น จานเลี้ยงเชื้อ หรือถาดหลุม (Microtiter plate) แล้วนำเจลที่ได้มาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน แบคทีเรียจะฝังอยู่ในซิลิกา ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้แปรผันความเข้มข้นหัวเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ตรึงเซลล์ให้อยู่ระหว่าง 1.0 - 5.0 OD₅₇₈ เพื่อให้มีปริมาณแบคทีเรียต่อกรัมซิลิกา มากขึ้น นอกจากนี้ได้แปรผันขนาดของซิลิกาที่ขึ้นรูปแล้ว เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัด ฟีนอลของซิลิกาที่มีขนาดและพื้นที่ผิวแตกต่างกันดังนี้ สี่เหลี่ยมขนาด 1.0x1.0x0.5 ลูกบาศก์ เซนติเมตร และขนาด 0.5x0.5x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร และแผ่นกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร หนา 0.3 เซนติเมตร โดยซิลิกาสี่เหลี่ยมทำโดยตัดซิลิกาแผ่นหนา 0.5 เซนติเมตร ด้วยมีดคัตเตอร์ ปลอดภัยให้เป็นชิ้นเล็กตามต้องการ ส่วนซิลิกาแผ่นกลมทำโดยขึ้นรูปซิลิกาในถาดหลุม ชนิด 96 หลุม เมื่อเจลขึ้นรูปจะสามารถเคาะซิลิกาออกจากหลุมได้



3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

3.3.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผลิตขึ้นใหม่

นำแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาที่ผลิตขึ้นใหม่ 3 แบบ จากข้อ 3.3.2 มาเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมฟีนอลความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล รวมทั้งจำนวนแบคทีเรียในระบบ ทำการทดลองแต่ละชุดทั้งหมด 3 ซ้ำและมีชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของฟีนอล ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ฟีนอล และซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรียตรึง

3.3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

นำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 25 กรัม เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารประกอบฟีนอล เช่น m-cresol, o-cresol, 4-HBA, catechol, 3-methylcatechol, caffeic acid หรือ ferulic acid ที่ความเข้มข้น 10 - 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล และจำนวนแบคทีเรียในระบบ ทำการทดลองแต่ละชุดทั้งหมด 3 ซ้ำ และมีชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของสารประกอบฟีนอล ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM สารประกอบฟีนอล และซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรียตรึง ซึ่งผลการทดลองของระบบแบทช์จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาต่อในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกา เนื่องจากสารประกอบฟีนอลข้างต้นมีการปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

3.3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเมื่อแปรผันอุณหภูมิ

นำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 25 กรัม เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมฟีนอลความเข้มข้น 100 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันอุณหภูมิการบ่มดังต่อไปนี้ อุณหภูมิห้อง 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส การแปรผันอุณหภูมิเพื่อศึกษาว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 เมื่อถูกตรึงบนซิลิกาสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่อุณหภูมิเท่าใด เนื่องจากผู้วิจัยสนใจจะนำแบคทีเรียตรึงดังกล่าวไปใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มซึ่งมีอุณหภูมิสูง จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล รวมทั้งจำนวนแบคทีเรียในระบบ ทำการทดลองแต่ละชุดทั้งหมด 3 ซ้ำและมีชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของฟีนอล ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ฟีนอล และซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรียตรึง

3.3.3.4 การทดสอบระยะเวลาและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

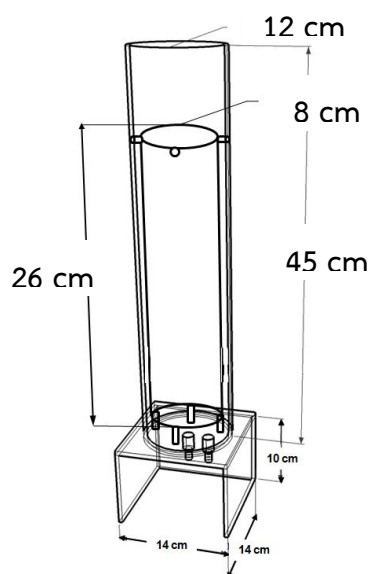
นำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาจากข้อ 3.3.2 มาทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 15 วัน จากนั้นวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียในซิลิกา และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา เมื่อเก็บ

รักษาที่ภาวะต่างๆ โดยเลือกความเข้มข้นที่แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถย่อยสลายพินอลได้สูงที่สุด ข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบว่าควรเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ภาวะใด และทราบอายุการเก็บ (shelf life) ของหัวเชื้อที่ผลิตขึ้น

3.3.4 การพัฒนาระบบการกรองชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสำหรับบำบัดสารประกอบพินอลในน้ำเสียสังเคราะห์

3.3.4.1 การสร้างระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ขนาดเล็ก

สร้างระบบ Internal loop Airlift Bioreactor ขนาดเล็ก ดังรูปที่ 3.1 โดยใช้คุณสมบัติและค่าที่เหมาะสมในการออกแบบระบบตาม Khondee และคณะ (2012) ในเบื้องต้นจะใช้ถังปฏิกรณ์ที่ทำจากอะคริลิกสูง 45 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร และ internal loop ทำจากอะคริลิกสูง 26 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร ความจุน้ำ 3 ลิตร มีฝาปิดด้านบนและฐานรองด้านล่าง โดยที่ฝาด้านบนมีการเจาะรูเพื่อใช้เป็นช่องต่อสายยางให้น้ำเข้า และเจาะรูที่ฐาน 2 รู ใช้เป็นทางน้ำออกและให้อากาศที่ 2 vvm ติดตั้งปั้มน้ำเพื่อปั้มน้ำเสียจากถังพักมายังถังปฏิกรณ์ การให้อากาศทำโดยใช้ปั้ลมต่อกับหัวทรายทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร เพื่อให้มีแรงดันเพียงพอกับการให้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถเคลื่อนที่ในระบบได้ทำการทดลองโดยแปรผันปริมาณแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาตั้งแต่ 25 - 150 กรัมต่อลิตร เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่เหมาะสม โดยดูจากการกวนผสมระหว่างแบคทีเรียตรึงบนซิลิกากับน้ำเสียอย่างทั่วถึง ทั้งนี้ควรใช้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาปริมาณน้อยๆ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการติดตั้งระบบ



รูปที่ 3.1 ลักษณะทั่วไปของระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor

3.3.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์

นำระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ขนาดเล็กที่สร้างขึ้นมาทดสอบประสิทธิภาพของระบบบำบัดโดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ น้ำกลั่นกับฟีนอล และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM กับฟีนอลและ/หรือสารประกอบฟีนอล โดยจะแปรผันระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำเสียสังเคราะห์ที่เวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล และจำนวนแบคทีเรียในระบบ หลังจากนั้นทำการทดลองแบบต่อเนื่อง เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประเมินระยะเวลาที่แบคทีเรียตรึงบนซิลิกายังคงประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอล

3.3.5 วิธีการวิเคราะห์

3.3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล ใช้วิธีของ Greenberg และคณะ (1992) โดยเติมสารดังต่อไปนี้ 0.5 N สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 2.5 มิลลิลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิลิตร 4-อะมิโนแอนติไพรีน 1 มิลลิลิตร และ โปแตสเซียมเพอริกไซยาไนด์ 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่มีฟีนอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที โดยจะเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ฟีนอล และ 4-อะมิโนแอนติไพรีน ซึ่งเป็น color reagent ในสถานะที่มีโปแตสเซียมเพอริกไซยาไนด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น antipyrine dye ที่มีสีแดง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรเพื่อหาเปอร์เซ็นต์ฟีนอลที่เหลือ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจสอบสารประกอบฟีนอลทุกตัว ยกเว้นสารที่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่งพารา

3.3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลใช้วิธีของ Bärlocher, 2005 โดยเติมสารดังต่อไปนี้ น้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ตัวอย่างที่มีสารประกอบฟีนอล 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นเติม 2% โซเดียมคาร์บอเนตใน 0.1N โซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เมื่อครบ 5 นาที เติม Folin-Ciocalteu reagent 20 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ 120 นาที ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ สารประกอบฟีนอลที่เหลือเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.3.5.3 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้วิธีของ Asses และคณะ (2009) ที่ใช้คอลัมน์ C₁₈ ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะตัวอย่าง (mobile phase) 0.1% phosphoric acid ในน้ำ (A) กับ 70% acetonitrile ในน้ำ (B) เป็นเวลา 45 นาทีซึ่งเป็นการรันแบบแกรเดียน: ตัวทำละลาย B เริ่มที่ 20% และเพิ่มเป็น 50% ใน 30 นาที

หลังจากนั้นสารถูกชะด้วยตัวทำละลาย B50% ภายใน 5 นาทีสุดท้าย ตัวทำละลาย B ลดลงเหลือ 20% จนกว่าจะสิ้นสุดการทำงาน ทั้งนี้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

3.3.5.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้น ใช้วิธีของ Aouidi และคณะ (2009) โดยนำน้ำตัวอย่างก่อนและหลังบำบัด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 390 นาโนเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่เหลืออยู่

3.3.5.5 การวัดปริมาณแบคทีเรียใช้วิธี Dilution plate count ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM เติมฟีนอล 0.1 กรัมต่อลิตร หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม ทั้งนี้แบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกา จะต้องบดวัสดุให้ละเอียด และเขย่าให้แบคทีเรียหลุดออกจากตัวกลาง โดยใช้เครื่อง sonicator ก่อนนำมาหาปริมาณแบคทีเรียด้วย ซึ่งสีโคโลนีของแบคทีเรียมีความแตกต่างกัน คือ *Methylobacterium* sp. NP3 โคโลนีสีชมพู ส่วน *Acinetobacter* sp. PK1 โคโลนีสีขาวนวล

3.3.5.6 การวิเคราะห์การเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิววัสดุตรึง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ตรึงตัวอย่างและเคลือบด้วยอนุภาคทองก่อนการวิเคราะห์

3.4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.4.1 การผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

3.4.1.1 การแปรผันความเข้มข้นหัวเชื้อแบคทีเรียระหว่างการตรึงแบคทีเรียบนซิลิกา

จากผลการทดลองเมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของหัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับการตรึงแบคทีเรียให้อยู่ระหว่าง OD₅₇₈ 1.0 - 5.0 พบว่าเซลล์ตรึงที่ผลิตขึ้นมีจำนวนแบคทีเรียดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นของหัวเชื้อและแบคทีเรียในเซลล์ตรึง

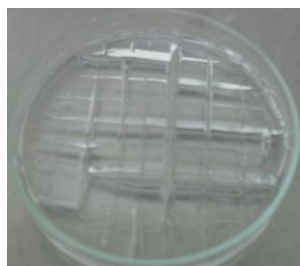
OD ₅₇₈	จำนวนแบคทีเรียที่ใช้เตรียมเซลล์ตรึง (CFU ต่อมิลลิลิตร)		จำนวนแบคทีเรียในเซลล์ตรึง (CFU ต่อกรัมซิลิกา)	
	<i>Methylobacterium</i> sp. NP3	<i>Acinetobacter</i> sp. PK1	<i>Methylobacterium</i> sp. NP3	<i>Acinetobacter</i> sp. PK1
1.0	$3.33 \pm 0.03 \times 10^8$	$4.00 \pm 0.05 \times 10^8$	$7.00 \pm 0.06 \times 10^6$	$9.00 \pm 0.05 \times 10^6$
2.0	$5.00 \pm 0.06 \times 10^9$	$6.67 \pm 0.03 \times 10^9$	$2.20 \pm 0.06 \times 10^7$	$2.47 \pm 0.01 \times 10^7$
3.0	$1.37 \pm 0.02 \times 10^{11}$	$1.40 \pm 0.03 \times 10^{11}$	$2.43 \pm 0.04 \times 10^8$	$3.10 \pm 0.10 \times 10^8$
4.0	$1.53 \pm 0.05 \times 10^{12}$	$1.93 \pm 0.10 \times 10^{12}$	$3.67 \pm 0.13 \times 10^8$	$4.33 \pm 0.13 \times 10^8$
5.0	$1.37 \pm 0.18 \times 10^{13}$	$1.53 \pm 0.09 \times 10^{13}$	$4.33 \pm 0.05 \times 10^8$	$5.33 \pm 0.12 \times 10^8$

เมื่อใช้หัวเชื้อของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ OD₅₇₈ = 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 8 - 13 Log CFU ต่อ มิลลิลิตร ในการตรึงแบคทีเรีย พบว่าจะได้เซลล์ตรึงที่มีจำนวนแบคทีเรียรวม 7.20, 7.67, 8.74, 8.90 และ 8.98 Log CFU ต่อกรัมซิลิกา ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตรึงแบคทีเรีย ด้วย sol-gel มีผลทำให้แบคทีเรียตายประมาณ 68 - 85% จากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 100% เนื่องจากกระบวนการตรึงแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยา sol-gel จะมีแอลกอฮอล์เกิดขึ้น จึงมีผลทำให้แบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซิลิกาตายไปเป็นจำนวนมาก (Alvarez และคณะ, 2007) ซึ่งการทดลองนี้ได้พยายามเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่เหลืออยู่โดยเพิ่มจำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น อย่างไรก็ตาม พื้นที่ในซิลิกาสำหรับตรึงแบคทีเรียมีจำกัด ทำให้ปริมาณแบคทีเรียสูงสุดที่พบในซิลิกา คือ $\sim 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา ซึ่งได้จากการใช้หัวเชื้อของ *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^{11} CFU ต่อ มิลลิลิตร ขึ้นไป

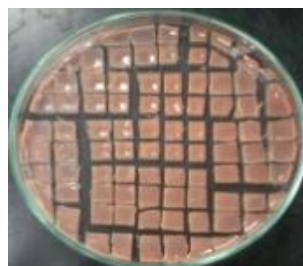
3.4.1.2 การแปรผันขนาดของซิลิกาที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการกักขัง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะซิลิกาทั้งหมด 3 แบบ คือ สี่เหลี่ยมขนาด 1.0×1.0×0.5 ลูกบาศก์ เซนติเมตร และขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร และแผ่นกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.2 และ 3.3) ซึ่งการแปรผันขนาดของซิลิกาคาดว่าจะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายพินอลดีซิน เนื่องจาก

มีพื้นที่ผิวสัมผัสของซิลิกากับพินอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมากขึ้น โดยซิลิกาขนาด 1.0×1.0×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีพื้นที่ผิวประมาณ 4 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อซิลิกา 1 ก้อน และโดยเฉลี่ยแล้วซิลิกาจำนวน 5 ก้อน เท่ากับ 1 กรัม ทำให้มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรประมาณ 8 สำหรับซิลิกาขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีพื้นที่ผิวประมาณ 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อซิลิกา 1 ก้อน และโดยเฉลี่ยแล้วซิลิกาจำนวน 9 ก้อน เท่ากับ 1 กรัม ทำให้มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรประมาณ 12 และซิลิการูปรางกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร หนา 0.3 เซนติเมตร มีพื้นที่ผิวประมาณ 3.14 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อซิลิกา 1 ก้อน และโดยเฉลี่ยแล้วซิลิกาจำนวน 12 ก้อน เท่ากับ 1 กรัม ทำให้มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรประมาณ 16 เมื่อเขย่าซิลิกาทั้งสามชนิดเป็นเวลานานพบว่ามีการแตกหักบางส่วน ซึ่งส่วนที่หักมีจำนวนโดยเฉลี่ยเท่าๆ กัน



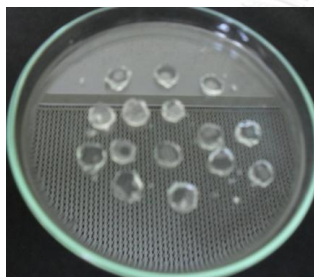
ก.



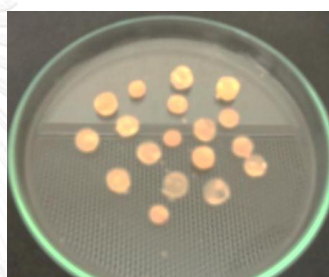
ข.

รูปที่ 3.2 ซิลิกาที่มีขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยแสดงดังนี้

ก. ซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรีย และ ข. ซิลิกาที่มีแบคทีเรีย



ก.



ข.

รูปที่ 3.3 ซิลิกาที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร โดยแสดงดังนี้

ก. ซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรีย และ ข. ซิลิกาที่มีแบคทีเรีย

3.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

3.4.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผลิตขึ้นใหม่

การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 แบบเซลล์ตรึง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เป็นน้ำเสียสังเคราะห์และเติมฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เซลล์ตรึงที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นตั้งแต่ 1.60×10^7 – 9.66×10^8 CFU ต่อกรัมซิลิกา และที่มีลักษณะแตกต่างกัน คือซิลิกา รูปลิ่มเหลี่ยมขนาดต่างๆ และซิลิการูปแผ่นกลม โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เป็นเวลา 15 วัน ผลการทดลองพบว่าซิลิกาที่ปราศจากแบคทีเรีย (ชุดควบคุม) สามารถดูดซับฟีนอลได้ประมาณ 10% ของ

ปริมาณฟินอลเริ่มต้น (ตารางที่ 3.2) ดังนั้นการลดลงของฟินอลในชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียตรงส่วนใหญ่จะเกิดโดยแอกติวิตีของแบคทีเรียที่เซลล์ตรึงในซิลิการูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีกว่าซิลิกาสี่เหลี่ยมขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร และ 1.0×1.0×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยในวันที่ 10 ซิลิการูปร่างกลมสามารถย่อยสลายฟินอลได้ประมาณ 80 - 90% แต่ซิลิกาขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร สามารถย่อยสลายฟินอลได้ประมาณ 75 - 85% และซิลิกาขนาด 1.0×1.0×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร สามารถย่อยสลายฟินอลได้ประมาณ 70 - 75% ในเวลาเดียวกัน (ตารางที่ 3.2) เนื่องจากเซลล์ตรึงในซิลิการูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร มีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับฟินอลสูงกว่าเซลล์ตรึงในซิลิกาอีก 2 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ McLoughlin และคณะ (1994) และ Mordocco และคณะ (1999) กล่าวว่าอัตราการย่อยสลายสารมลพิษจะลดลงเมื่อเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ตรึงเพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้เกิด mass และ gas transfer ต่ำ เพราะเป็นการเพิ่มระยะห่างในเมทริกซ์ของเซลล์ตรึง และทำให้พื้นที่ผิวต่อปริมาตรของเซลล์ตรึงลดลง และงานวิจัยของ Maniyam และคณะ (2012) รายงานว่าเซลล์ตรึงขนาดเล็ก(เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.8 - 2.0 มิลลิเมตร) มีประสิทธิภาพในการกำจัดไซยาไนด์ดีกว่าเซลล์ตรึงขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 - 5.2 มิลลิเมตร) เนื่องจากเซลล์ตรึงขนาดเล็กมี mass transfer และพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับสารมลพิษมากกว่าเซลล์ตรึงขนาดใหญ่ (Idris และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตามการผลิตแบคทีเรียตรงบนซิลิกาให้มีลักษณะกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ทำได้ยาก เพราะใช้เวลานานในการสังเคราะห์ซิลิกา โดยต้องค่อยๆ เติมซิลิกาตามสัดส่วนลงในภาตหลุมแต่ละหลุม นอกจากนี้ซิลิกายังแตกหักได้ง่ายเวลาเคาะซิลิกาออกจากภาตหลุม ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ซิลิกาสี่เหลี่ยมขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร สำหรับบำบัดสารประกอบฟินอลในการทดลองต่อไป เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์ค่อนข้างสะดวก รวดเร็ว และให้ประสิทธิภาพการบำบัดฟินอลใกล้เคียงกับซิลิการูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียตรึง และ จำนวนแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

ลักษณะของซิลิกา	OD ₅₇₈ *	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%)		จำนวนแบคทีเรีย เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Log CFU ต่อกรัมซิลิกา)
		ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	
สี่เหลี่ยม 1.0×1.0×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร	1.0	93.55±5.19	30.59±5.58	7.34±0.06
	2.0	95.17±0.82	26.84±2.64	7.30±0.02
	3.0	94.77±0.52	25.30±1.09	8.42±0.01
	4.0	93.77±1.21	27.56±2.35	8.35±0.03
	5.0	93.02±1.53	28.20±2.55	8.34±0.05
สี่เหลี่ยม 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร	1.0	91.64±2.21	17.85±0.51	7.10±0.10
	2.0	92.10±4.40	15.25±2.17	7.39±0.02
	3.0	90.06±1.65	13.69±1.23	8.51±0.08
	4.0	90.01±1.71	15.16±2.90	8.81±0.13
	5.0	91.54±2.35	19.41±0.96	8.84±0.06
กลม เส้นผ่าน ศูนย์กลาง0.5 ซม.	1.0	94.57±4.59	14.80±1.68	7.13±0.27
	2.0	92.24±5.23	14.99±2.40	7.66±0.49
	3.0	91.84±4.23	4.25±1.14	8.59±0.11
	4.0	94.55±8.56	8.77±2.64	8.86±0.03
	5.0	93.21±2.68	15.24±2.53	8.88±0.10

หมายเหตุ : ชุดควบคุม: ชุดที่เติมซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรีย; ชุดทดลอง: ชุดที่เติมซิลิกาที่มีแบคทีเรีย

*OD₅₇₈ ความเข้มข้นหัวเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เตรียมเซลล์ตรึง

นอกจากนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตรึงที่ผลิตจากหัวเชื้อที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น OD = 3.0 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการย่อยสลายฟีนอล ซึ่งมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นในแบคทีเรียตรึง คือ ประมาณ 10⁸ CFU ต่อกรัมซิลิกา (ตารางที่ 3.2) จากการทดลองพบว่าลักษณะของซิลิกาและจำนวนเซลล์ในซิลิกามีผลต่อการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียตรึง โดยซิลิกาที่มีแบคทีเรียมากเกินไปจะทำให้พื้นที่ที่ใช้ในการเจริญมีจำกัด จึงคาดว่าแบคทีเรียจะปรับตัวให้อยู่ในระยะพักมากกว่าระยะการเจริญ ดังนั้นประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลจึงลดลง ดังนั้นในการทดลองต่อไป

ผู้วิจัยจึงเลือกผลิตแบคทีเรียที่เรียกว่าชิลิกาให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^8 CFU ต่อกรัมชิลิกา และใช้เซลล์ตรึงที่มีลักษณะสี่เหลี่ยมขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ลูกบาศก์เซนติเมตร เท่านั้นจากการศึกษาข้างต้นพบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดยใช้เซลล์ตรึง

ชนิดของวัสดุตรึง	ความเข้มข้นฟีนอล (มก./ล.)	ประสิทธิภาพ การย่อยสลาย (%)	เอกสารอ้างอิง
Polyacrylamide (PAA) gel beads	5,000	95	Chen และคณะ (2002)
พอลิไวนิลแอลกอฮอล์	500	100	Wang และคณะ (2007)
ไคโตซาน	100	100	Hsieh และคณะ (2008)
ชิลิกา	2,500	100	Khongkhaem และคณะ (2011)
อัลจิเนต	610	92.5	Sivasubramania และ Namasivayam (2014)
ชิลิกา	5,000	95	งานวิจัยนี้



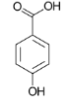

จากตารางที่ 3.3 จะเห็นว่าการตรึงแบคทีเรียบนชิลิกา ช่วยให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัสดุตรึงอื่นๆ เช่น อัลจิเนต พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และไคโตซานและความสามารถในการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนชิลิกามีค่าใกล้เคียงกับการใช้เซลล์ตรึงบน PAA gel beads ทั้งนี้ เนื่องจากเซลล์ถูกฝังอยู่ในชิลิกา ทำให้ชิลิกาช่วยปกป้องเซลล์จากการสัมผัสกับสารมลพิษโดยตรง

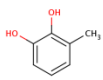
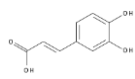
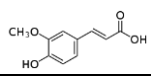
3.4.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรียตรึงบนชิลิกา

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนชิลิกาพบว่าชิลิกาที่ปราศจากแบคทีเรียสามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลทุกชนิดได้เล็กน้อย โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลเหลือในระบบประมาณ 97% (ตารางที่ 3.4) แต่แบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลบางชนิดได้ ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลในระบบเหลือน้อยกว่า ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายสารประกอบ

ฟินอลโดยแบคทีเรียอิสระและแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา โดยเลือกใช้ซิลิกาขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ลูกบาศก์ เซนติเมตรเนื่องจากมีประสิทธิภาพค่อนข้างสูงเมื่อย่อยสลายฟินอลที่ความเข้มข้นสูง และมีจำนวนแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเริ่มต้นประมาณ 8.69 ± 0.03 Log CFU ต่อกรัมซิลิกา ผลการทดลองพบว่า อัตราการย่อยสลายสารประกอบฟินอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสูงกว่าแบคทีเรียอิสระ โดย *o*-cresol ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรแบคทีเรียตรึงบนซิลิกามีอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟินอลสูงสุดประมาณ 4.17 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 3.4) เนื่องจากเป็นสารประกอบฟินอลเหล่านี้มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งออร์โทและพาราจึงใช้เวลาในการย่อยสลายเร็วกว่า caffeic acid และ ferulic acid ซึ่งเป็นสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งเมทา นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียมีจำนวนค่อนข้างคงที่เมื่อไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟินอล และมีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อมีการย่อยสลายสารประกอบฟินอล (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 อัตราการย่อยสลายสารประกอบฟินอลและจำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองต่างๆ ของวันที่ 3

สารประกอบ ฟินอล	ความ เข้มข้น (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	อัตราการย่อยสลายสารประกอบฟินอล (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)			จำนวนแบคทีเรีย		
		แบคทีเรีย อิสระ	ซิลิกา	แบคทีเรีย ตรึงบน ซิลิกา	แบคทีเรีย อิสระ ($\times 10^9$ ต่อ มิลลิลิตร)	แบคทีเรีย ตรึงในซิลิ กา ($\times 10^9$ Log CFU ต่อกรัม ซิลิกา)	แบคทีเรีย ในน้ำ ($\times 10^5$ Log CFU ต่อ มิลลิลิตร)
<i>o</i>-cresol 	100	0.83 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.34 ± 0.00	1.00 ± 0.10	1.13 ± 0.15	1.67 ± 0.15
	200	1.19 ± 0.00	0.02 ± 0.00	2.74 ± 0.00	1.20 ± 0.26	1.30 ± 0.20	1.83 ± 0.12
	500	0.50 ± 0.02	0.04 ± 0.00	4.17 ± 0.00	0.63 ± 0.58	0.70 ± 1.0	2.23 ± 0.05
<i>m</i>-cresol 	100	1.39 ± 0.00	0.02 ± 0.01	1.39 ± 0.00	1.40 ± 0.20	1.57 ± 0.15	5.00 ± 0.17
	200	0.13 ± 0.01	0.04 ± 0.02	1.62 ± 0.00	0.93 ± 0.58	0.97 ± 1.53	6.67 ± 0.25
	500	0.52 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.81 ± 0.07	0.87 ± 1.15	1.20 ± 0.27	4.67 ± 0.35
4-HBA 	100	1.39 ± 0.00	0.06 ± 0.01	1.39 ± 0.00	1.07 ± 0.21	1.50 ± 0.10	2.87 ± 0.35
Pyrocatechol 	200	1.42 ± 0.01	0.04 ± 0.01	2.78 ± 0.00	1.27 ± 0.25	1.43 ± 0.11	4.00 ± 0.17

สารประกอบ ฟีนอล	ความ เข้มข้น (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	อัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)			จำนวนแบคทีเรีย		
		แบคทีเรีย อิสระ	ซิลิกา	แบคทีเรีย ตรึงบน ซิลิกา	แบคทีเรีย อิสระ ($\times 10^9$ ต่อ มิลลิลิตร)	แบคทีเรีย ตรึงในซิลิ กา ($\times 10^9$ Log CFU ต่อกรัม ซิลิกา)	แบคทีเรีย ในน้ำ ($\times 10^5$ Log CFU ต่อ มิลลิลิตร)
3-methyl catechol 	200	1.19±0.00	0.08±0.03	0.82±0.03	1.03±0.15	1.17±0.21	5.00±0.10
Caffeic acid 	200	1.52±0.03	0.05±0.01	1.67±0.00	1.17±0.12	1.37±0.25	4.10±0.32
Ferulic acid 	200	1.19±0.00	0.06±0.02	1.57±0.01	0.93±0.12	1.10±0.20	3.50±0.33

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถย่อยสลาย *o*-cresol, *m*-cresol, 4-HBA, pyrocatechol, caffeic acid และ ferulic acid ได้ดีที่ความเข้มข้นประมาณ 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ettayebi และคณะ (2003) ศึกษาการย่อยสลายพอลิฟีนอลโดยเซลล์ตรึงในแคลเซียมอัลจินเตพบว่เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายโมโนฟีนอลและพอลิฟีนอลได้ประมาณ 69.2% และ 55.3% ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Yao และคณะ (2006) อธิบายไว้ว่าตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) มีผลต่อการย่อยสลายสารประกอบนั้นๆ โดยสารประกอบที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งออร์โทและพารา ได้แก่ *o*-cresol, pyrocatechol, 3-methylcatechol และ 4-hydroxybenzoic acid จะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าที่ตำแหน่งเมทา ได้แก่ caffeic acid ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น และงานวิจัยของ Liu และคณะ (2009) พบว่าแบคทีเรียอิสระสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. XA05 สามารถใช้ benzophenone และ 4-hydroxybenzoic acid เป็นแหล่งคาร์บอน โดยสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลจากมากไปหาน้อยดังต่อไปนี้ phenol > benzophenone > 4-hydroxybenzoic acid > cinnamic acid > resorcin ตามลำดับ

3.4.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรีย ตรึงบนซิลิกาเมื่อแปรผันอุณหภูมิ

ผู้วิจัยได้แปรผันอุณหภูมิสำหรับการย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ที่อุณหภูมิห้อง 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากต้องการทราบว่าแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ตรึงบนซิลิกา สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่อุณหภูมิเท่าใด นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสนใจบำบัดสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียตรึงบนซิลิกามีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 15.63 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 3.5) ขณะที่ความเข้มข้นฟีนอล 100 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียตรึงบนซิลิกามีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 0.97 - 18.75 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตารางที่ 3.5) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกามีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้ที่ความเข้มข้นฟีนอล 100 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่อนข้างต่ำประมาณ 0.22 - 1.94 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 3.5) ในขณะเดียวกันชุดควบคุม ประกอบด้วย ซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรียและเติมฟีนอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าฟีนอลในน้ำเสียมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย ดังตารางที่ 3.5 ซึ่งน่าจะเกิดจากกระบวนการทางกายภาพ เช่น การระเหยของฟีนอล การดูดซับโดยซิลิกาบางส่วนและเกิดจากการย่อยสลายโดยแสงในธรรมชาติ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่ปลูกตรึงในซิลิกาไม่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ เนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาตรึงบนซิลิกาเป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคืออุณหภูมิประมาณ 30 - 45 องศาเซลเซียส เท่านั้น ดังนั้นหากผู้วิจัยสนใจบำบัดสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง อาจต้องเลือกใช้แบคทีเรียที่ร้อนที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลนำมาตรึงบนซิลิกาหรือวัสดุอื่นๆ แล้วนำไปบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มต่อไป

ตารางที่ 3.5 อัตราการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่อุณหภูมิต่างๆ

ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อัตราการย่อยสลายฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	
		ชุดทดลอง	ชุดควบคุม
100	37	4.08	0.21
	40	2.08	0.42
	45	0.97	0.29
	50	0.22	0.19
250	37	10.21	0.42
	40	5.06	0.46
	45	4.79	0.40
	50	0.57	0.35
500	37	9.79	1.04
	40	9.38	0.94
	45	8.54	0.96
	50	0.00	0.81
750	37	13.75	1.46
	40	13.54	1.35
	45	7.60	1.15
	50	1.23	1.19
1,000	อุณหภูมิห้อง	15.63	1.95
	37	18.75	2.08
	40	10.10	1.98
	45	9.90	1.92
	50	1.94	1.85

สำหรับการศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่อยู่รอดในแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาและน้ำเสีย (ตารางที่ 3.6) พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นฟีนอลเป็น 100 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 อยู่ในระบบทดลอง ทดลอง เมื่ออุณหภูมิเป็น 40 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นฟีนอล 100 - 1,000 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร มีเฉพาะแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 ที่อยู่ในระบบตลอดการทดลอง ขณะที่ *Methylobacterium* sp. NP3 ไม่สามารถรอดชีวิต แต่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสที่ความเข้มข้น ฟีนอล 100-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 ไม่สามารถรอดชีวิตในระหว่างการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพการย่อยสลาย ฟีนอล

ตารางที่ 3.6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการย่อยสลายฟีนอลที่อุณหภูมิต่างๆ

ความเข้มข้นฟีนอล (มก./ล.)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ 0 ชั่วโมง		เวลาที่ 168 ชั่วโมง			
		<i>Acinetobacter</i> sp. PK1	<i>Methylobacterium</i> sp. NP3	<i>Acinetobacter</i> sp. PK1		<i>Methylobacterium</i> sp. NP3	
		CFU ต่อกรัมซิลิกา		CFU ต่อกรัมซิลิกา	CFU ต่อมิลลิลิตร	CFU ต่อกรัมซิลิกา	CFU ต่อมิลลิลิตร
100	37	4.3×10^8	3.3×10^6	7.0×10^8	6.0×10^5	4.3×10^6	5.0×10^4
	40	4.7×10^8	3.7×10^6	7.3×10^7	5.7×10^4	-	-
	45	5.0×10^8	4.0×10^6	9.0×10^6	7.7×10^4	-	-
	50	5.3×10^8	3.3×10^6	-	-	-	-
250	37	3.7×10^8	4.3×10^6	7.7×10^8	6.3×10^5	6.7×10^6	4.0×10^4
	40	3.3×10^8	3.3×10^6	4.0×10^7	3.7×10^4	-	-
	45	4.0×10^8	4.7×10^6	9.3×10^6	5.3×10^4	-	-
	50	5.0×10^8	3.7×10^6	-	-	-	-
500	37	5.7×10^8	3.3×10^6	5.0×10^9	5.3×10^5	4.7×10^6	4.7×10^4
	40	4.3×10^8	4.0×10^6	5.0×10^7	5.3×10^4	-	-
	45	4.7×10^8	4.3×10^6	5.0×10^6	5.7×10^4	-	-
	50	5.3×10^8	4.0×10^6	-	-	-	-
750	37	5.3×10^8	3.3×10^6	5.3×10^9	5.7×10^5	5.0×10^6	3.3×10^4
	40	4.0×10^8	4.3×10^6	6.3×10^7	4.3×10^4	-	-
	45	6.0×10^8	3.3×10^6	3.7×10^6	3.7×10^4	-	-
	50	6.3×10^8	4.3×10^6	-	-	-	-
1,000	อุณหภูมิห้อง	4.7×10^8	2.7×10^6	4.4×10^9	3.3×10^5	6.1×10^6	5.6×10^4
	37	4.7×10^8	3.3×10^6	4.3×10^9	4.7×10^5	5.7×10^6	5.3×10^4
	40	3.7×10^8	4.7×10^6	6.0×10^7	5.0×10^4	-	-

ความเข้มข้นฟีนอล (มก./ล.)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ 0 ชั่วโมง		เวลาที่ 168 ชั่วโมง			
		<i>Acinetobacter</i> sp. PK1	<i>Methylobacterium</i> sp. NP3	<i>Acinetobacter</i> sp. PK1		<i>Methylobacterium</i> sp. NP3	
		CFU ต่อกรัมซิลิกา		CFU ต่อกรัมซิลิกา	CFU ต่อมิลลิลิตร	CFU ต่อกรัมซิลิกา	CFU ต่อมิลลิลิตร
45		5.7×10^8	4.3×10^6	4.3×10^6	4.0×10^4	-	-
50		5.7×10^8	4.7×10^6	-	-	-	-

3.2.4 การทดสอบระยะเวลาและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

เมื่อทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 7, 14, 21, 30, 42 และ 60 พบว่าแบคทีเรียสามารถมีชีวิตรอดได้ดีเป็นเวลา 30 วัน และประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลยังคงที่เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 (ตารางที่ 3.7) แต่ในเดือนที่ 2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลลดลงอย่างชัดเจน นอกจากนี้เมื่อเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียตรึงที่เก็บไว้มีการปนเปื้อนโดยเชื้อรา และขนาดของซิลิกาเล็กลงเรื่อยๆ เนื่องจากน้ำภายในซิลิกาเกิดการระเหยออก ดังนั้นควรเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อยังไม่นำไปใช้งาน ดังเช่นงานวิจัยของ Liu และคณะ (2009) พบว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. XA05 และ *Sphingomonas* sp. FG03 ตรึงบนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์มีอัตราการย่อยสลายฟีนอลคงที่ และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 93% หลังจากเก็บแบคทีเรียตรึงเป็นเวลา 50 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสขณะที่แบคทีเรียอิสระมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลลดลง เมื่อเก็บเซลล์ไว้นาน 10 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสูญเสียแอกทิวิตีเมื่อเก็บเซลล์ไว้นาน 50 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นแบคทีเรียตรึงสามารถเก็บและยังคงมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารมลพิษได้นานกว่าแบคทีเรียอิสระ

ตารางที่ 3.7 การอยู่รอดและแอกทิวิตีของแบคทีเรียที่เรื้อรังในซาลิโกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน)	จำนวนแบคทีเรียในซาลิกาที่ผ่านการเก็บรักษา (Log CFUต่อกรัมซาลิกา)	ปริมาณฟีนอลที่เหลือ (%) ในระบบ*	
		ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	8.35±0.48	93.55±5.20	13.69±1.23
7	8.29±0.58	ND	ND
14	8.48±0.45	ND	ND
21	8.32±0.55	ND	ND
30	8.36±0.51	92.81±1.09	17.66±4.34
42	7.47±0.64	ND	ND
50	7.29±0.62	ND	ND
60	6.95±0.05	91.80±0.15	43.37±2.78

หมายเหตุ : *ทดสอบแอกทิวิตีของแบคทีเรียในซาลิกาที่ผ่านการเก็บรักษา โดยใช้ฟีนอลความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และบ่มเป็นเวลา 10 วัน

ชุดควบคุม: ชุดที่เติมซาลิกาที่ไม่มีแบคทีเรีย

ชุดทดลอง: ชุดที่เติมซาลิกาที่มีแบคทีเรีย

ND หมายถึง Not Determined

อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับการเก็บรักษาเซลล์ตรึงบนซาลิกา ดังเช่นงานวิจัยของ Desimone และคณะ (2005) พบว่า *Escherichia coli* ที่ถูกตรึงในซาลิกอนอกไซด์ สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 60 วัน งานวิจัยของ Nassif และคณะ (2002) สามารถเก็บรักษา *Escherichia coli* B (CIP-54125) ในซาลิกาแบบ wet gels ได้หลายสัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง โดยปราศจากอาหาร และ Fennouh และคณะ (2000) พบว่าการตรึง *Escherichia coli* K12 ภายในซาลิกา สามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ และเซลล์สามารถดำรงชีพอยู่ในซาลิกาได้มากกว่า 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้องทั้งนี้คาดว่า การอยู่รอดและประสิทธิภาพของแบคทีเรียในซาลิกา หลังการเก็บรักษาจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย

3.4.3 การพัฒนาระบบการกรองชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา สำหรับบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์

3.4.3.1 การสร้างระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ขนาดเล็ก

การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับบำบัดน้ำเสียที่ประกอบด้วยตัวกลางซึ่งทำหน้าที่ให้แบคทีเรียยึดเกาะ ต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติของตัวกลาง เช่น หากตัวกลางจมในของเหลว ก็ควรจะใช้ถังปฏิกรณ์ที่มีการกวนผสมเพื่อให้ตัวกลางฟุ้งกระจายอย่างทั่วถึง หรือหากตัวกลางที่ใช้ลอยตัว ก็ควรเลือกใช้ถังปฏิกรณ์ชนิดที่เป็น fixed bed reactor โดยให้ของเหลวไหลผ่านตัวกลางและเกิดการบำบัดขณะที่ของเหลวไหลผ่าน (Rai University, 2004) ในกรณีของงานวิจัยนี้ ตัวกลางที่ใช้คือแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่มีคุณสมบัติจมน้ำ ดังนั้นถังปฏิกรณ์ที่ใช้ต้องมีการกวนผสมพร้อมทั้งให้อากาศ เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศสำหรับการเจริญซึ่งถังปฏิกรณ์ที่ใช้กันทั่วไปมีทั้งการกวนผสมและการให้อากาศ 3 ชนิด คือ Stirred tank reactor (STR), Bubble column reactor (BCR) และ Airlift bioreactor (AR) แต่ทั้งนี้มีการรายงานที่ STR ไม่เหมาะสมกับการใช้กับแบคทีเรียตรึง เนื่องจากการเสียดสีกันระหว่างใบพัดกับแบคทีเรียตรึง อาจทำให้เกิดความเสียหายกับแบคทีเรียตรึง นอกจากนี้แรงเฉือนที่เกิดจากใบพัดยังกระจายไม่ทั่วถึง กล่าวคือมีแรงมากบริเวณใบพัดซึ่งก็คือภายในถัง แต่บริเวณผิวของเหลวจะมีแรงเฉือนน้อย ในขณะที่เดียวกัน BCR และ AR มีการกระจายของแรงเฉือนอย่างทั่วถึง ทำให้แรงที่แบคทีเรียตรึงจะได้รับมีค่าน้อยกว่าแรงจาก STR แต่ BCR มีข้อเสียคือ ตัวกลางบางส่วนจะเกิดการตกตะกอนอยู่บริเวณก้นถัง และการไหลเวียนของของเหลวภายในถังไม่ทั่วถึง ส่งผลให้เกิด dead zone ขึ้น (ศิริพันธ์ สุวรรณโมลี, 2547; Rai University, 2004; Dubey และ Hussain, 2014) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่จะศึกษาเฉพาะ AR เท่านั้น

ระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ขนาดเล็กที่สร้างขึ้นมีการเพิ่ม Internal loop ซึ่งจะเป็นตัวช่วยให้เกิดการหมุนวนของของเหลวและตัวกลางภายใน รวมทั้งช่วยกระจายแรงเฉือนให้ทั่วถึงถังปฏิกรณ์ทำให้เกิดการเสียหายกับตัวกลางภายในน้อยลง (รูปที่ 3.4) หลังจากนั้นบรรจุแบคทีเรียตรึงลงในถังปฏิกรณ์ โดยแปรผันปริมาณตั้งแต่ 25 - 150 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณแบคทีเรียตรึงที่เหมาะสมที่สุด คือ 25 กรัมต่อลิตร โดยแบคทีเรียตรึงสามารถหมุนวนอยู่ในถังปฏิกรณ์ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 3.8) โดยไม่มีการตกอยู่ด้านล่างของระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ดังรูปที่ 3.5 ดังนั้นจึงนำระบบที่ได้ไปทดสอบการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริงที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลต่อไป



รูปที่ 3.4 ลักษณะของระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่สร้างขึ้น

ตารางที่ 3.8 การแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงสำหรับบรรจุลงในถังปฏิกรณ์

ปริมาณแบคทีเรียตรึง (กรัมต่อลิตร)	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียตรึง
25	+++++
50	+++
100	+
150	-

หมายเหตุ: + หมายถึง แบคทีเรียตรึงสามารถหมุนวนอยู่ในถังปฏิกรณ์ได้โดยความเร็วของการเคลื่อนที่เพิ่มจาก + ถึง +++++

- หมายถึง แบคทีเรียตรึงไม่สามารถเคลื่อนที่ในถังปฏิกรณ์ได้



รูปที่ 3.5 ระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor
ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 25 กรัมต่อลิตร

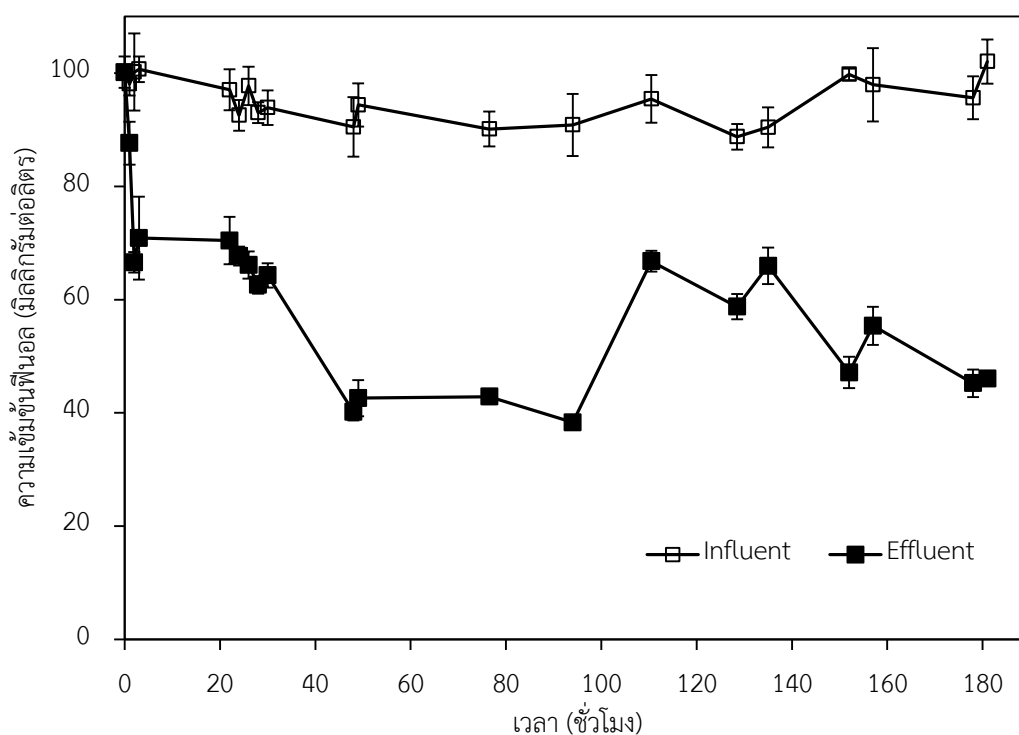
3.4.3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์

การทดลองนี้ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารประกอบฟีนอลความเข้มข้นต่างๆ เนื่องจากต้องการทราบว่าการทำงานของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาจำเป็นต้องมีสารอาหารอื่นๆ ด้วยหรือไม่ จึงศึกษาน้ำเสียสังเคราะห์ 2 ชนิด

3.4.3.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้น้ำกลั่นเติมฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 5.0 ชั่วโมง

ในการทดลองส่วนนี้ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลในน้ำกลั่น โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาใน internal loop airlift bioreactor แบบต่อเนื่อง รวมทั้งศึกษาหาระยะเวลากักเก็บน้ำ (Hydraulic Retention Time; HRT) ที่น้อยที่สุดที่ Internal loop Airlift Bioreactor สามารถบำบัดฟีนอลในน้ำกลั่นได้มากที่สุด โดยใช้ฟีนอลความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการเติมสารอาหารลงในน้ำกลั่น และเลือกใช้ปริมาณแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ 25 กรัมต่อลิตร เพราะเป็น

ปริมาณแบคทีเรียตรงที่สามารถเคลื่อนที่ในถังปฏิกรณ์ได้ดีที่สุด ส่วนระยะเวลาที่เก็บน้ำที่ศึกษา คือ 5 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเมื่อให้น้ำเสียสังเคราะห์ไหลเข้าและออกจากถังปฏิกรณ์อย่างต่อเนื่อง ระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ต้องใช้ระยะเวลาช่วงแรกในการปรับตัวก่อนที่ความเข้มข้นฟีนอลจะลดลงในเวลาต่อมา นอกจากนี้ยังพบว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor มีประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลในน้ำกลั่นได้ประมาณ 60% (รูปที่ 3.6) ซึ่งในการทดลองต่อไปมีการเปลี่ยนชนิดของน้ำเสียสังเคราะห์ (น้ำกลั่น) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor



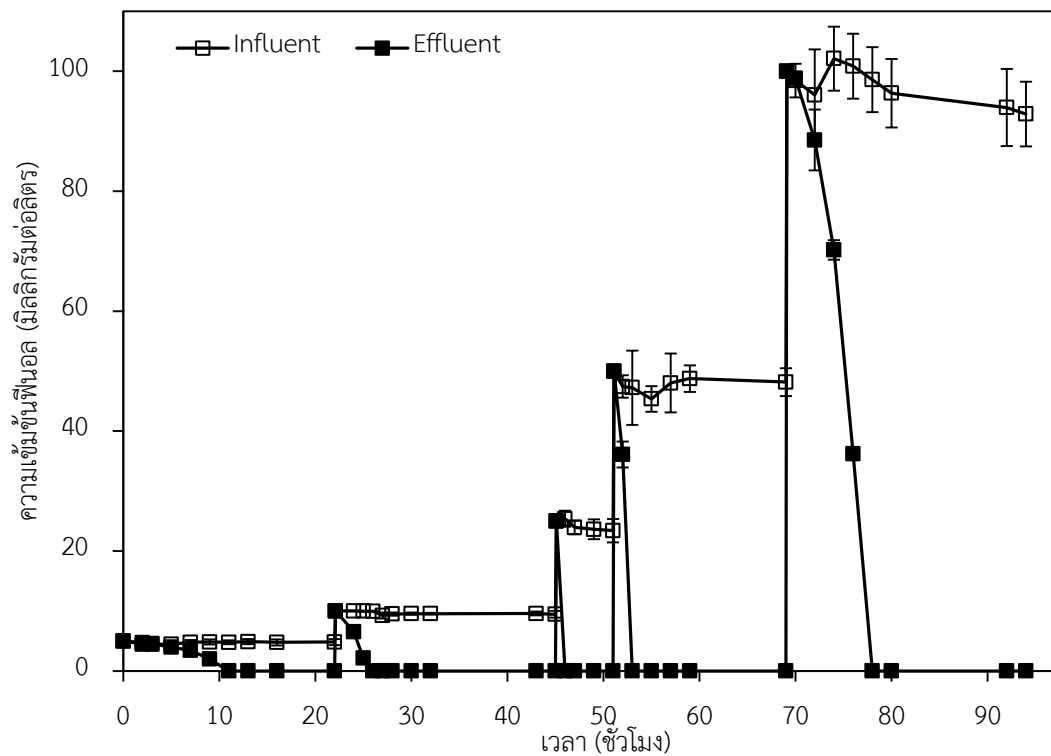
รูปที่ 3.6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้น้ำกลั่นเติม ฟีนอลที่ระยะเวลาเก็บน้ำ (HRT) 5.0 ชั่วโมง

สำหรับการศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่อยู่รอดในวัสดุตรงและน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่ามีแบคทีเรียอยู่ในระบบตลอดการทดลอง และมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทั้งระบบประมาณ $2.14 \pm 0.52 \times 10^{10}$ CFU ต่อชุดทดลอง โดยในขณะเริ่มต้นการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) มีจำนวนแบคทีเรียในซิลิกาประมาณ $4.67 \pm 1.15 \times 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา เมื่อบำบัดฟีนอลผ่านไป 181 ชั่วโมง มีจำนวนแบคทีเรียในซิลิกาเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น $8.57 \pm 0.21 \times 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา และมีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย $1.07 \pm 0.15 \times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร

3.4.3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เติมฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 5.0 ชั่วโมง

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้นิยมใช้แบคทีเรียอิสระเป็นหัวเชื้อ ดังนั้นการทดลองส่วนนี้ใช้ระบบการกรองชีวภาพที่บรรจุด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเป็นหัวเชื้อ โดยเปลี่ยนชนิดของน้ำเสียสังเคราะห์จากน้ำกลั่นมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และใช้ฟีนอลความเข้มข้น 5 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นฟีนอลที่พบในน้ำเสียจริงจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดด้วยระบบบำบัดเสถียร สำหรับการทดลองในส่วนนี้เริ่มจากนำน้ำเสียสังเคราะห์ไหลเข้า-ออกถึงปฏิกรณ์อย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งความเข้มข้นของฟีนอลที่เหลืออยู่ในน้ำเสียที่ออกจากถังปฏิกรณ์คงที่ จากนั้นจึงเปลี่ยนระยะเวลาพักเก็บน้ำไปเป็นค่าที่จะดำเนินการศึกษาต่อไป สำหรับการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ทำได้โดยวิเคราะห์หาความเข้มข้นฟีนอลในน้ำเสียที่เข้าและออกจากถังปฏิกรณ์ที่ระยะเวลาต่างๆผลการทดลองพบว่าเมื่อเริ่มปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมฟีนอลไหลเข้าและออกจากถังปฏิกรณ์อย่างต่อเนื่อง แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาไม่ต้องใช้ระยะเวลาช่วงแรกในการปรับตัว และฟีนอลมีความเข้มข้นลดลงอย่างรวดเร็วและคงที่ในเวลาต่อมา (รูปที่ 3.7) ซึ่งต่างจากการบำบัดฟีนอลในน้ำกลั่นที่ใช้ระยะเวลาช่วงแรกของการบำบัดปรับตัวนานกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor มีประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงถึง 100 % (ตารางที่ 3.9) ซึ่งมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงสุดเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่ความเข้มข้นฟีนอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับการศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่อยู่รอดในวัสดุตรึงและน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่ามีแบคทีเรียอยู่ในระบบตลอดการทดลอง และมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทั้งระบบประมาณ $6.43 \pm 0.63 \times 10^{10}$ CFU ต่อชุดทดลอง โดยในขณะเริ่มต้นการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) มีจำนวนแบคทีเรียในซิลิกาประมาณ $4.33 \pm 1.53 \times 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา เมื่อบำบัดฟีนอลผ่านไป 94 ชั่วโมง มีจำนวนแบคทีเรียในซิลิกาเพิ่มขึ้นเป็น $2.57 \pm 0.25 \times 10^9$ CFU ต่อกรัมซิลิกา และมีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย $1.30 \pm 0.27 \times 10^5$ CFU ต่อ มิลลิลิตรพบว่าระบบที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM มีจำนวนแบคทีเรียมากกว่าเมื่อใช้น้ำกลั่น เนื่องจากสารอาหารช่วยให้แบคทีเรียเจริญและทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีขึ้นดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลได้ดีกว่าแบคทีเรียอิสระ และสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลของแบคทีเรียตรึงใน Internal loop Airlift Bioreactor ได้ ดังเช่นงานวิจัยของ Pishgara และคณะ (2012) ศึกษาการบำบัดฟีนอลร่วมกับกลูโคสด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำเสียโรงงานเผาถ่านหินในประเทศอิหร่านในระบบแบบแบทช์ พบว่าระบบสามารถบำบัดฟีนอลและกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 600 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 18 และ 7 วัน ตามลำดับ ซึ่งมีอัตราการย่อย

สลายฟีนอลและกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 0.71 และ 15.63 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่เมื่อระบบบำบัดฟีนอลที่ความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกลูโคสที่ความเข้มข้น 1,800 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 0.84 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากลูโคสช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้ เนื่องจากเกิด uncompetitive cross-inhibition (Wang และคณะ, 1996) ซึ่งในการทดลองต่อไปจะมีการลดระยะเวลาพักเก็บน้ำเพื่อให้แบคทีเรียตรึงบนซิวลิกาในระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor สามารถบำบัดน้ำเสียได้ปริมาณมากขึ้น



รูปที่ 3.7 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิวลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เดิมฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 5.0 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.9 ประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 5.0 ชั่วโมง

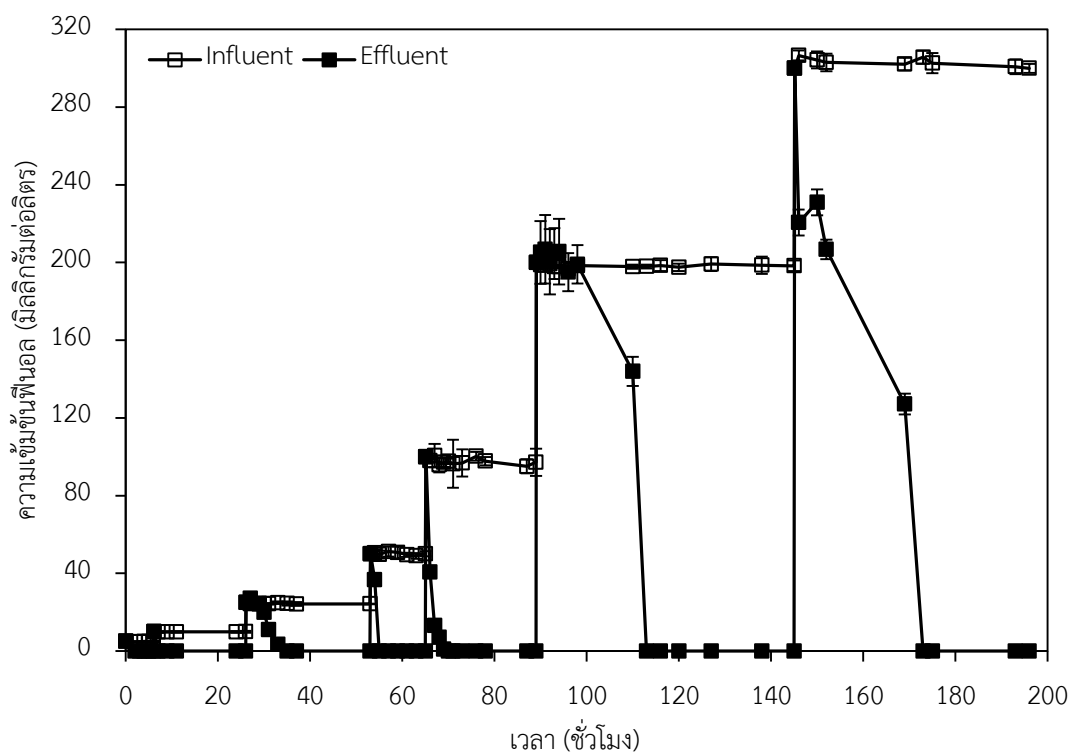
ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพในการบำบัด ฟีนอล(%)*	ความเข้มข้นฟีนอลสุดท้าย (มิลลิกรัมต่อลิตร)
5	100	0
10	100	0
25	100	0
50	100	0
100	100	0

* ประสิทธิภาพในการบำบัดเมื่อระบบเข้าสู่ Steady state

3.4.3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เต็มฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 2.5 ชั่วโมง

จากการทดลองข้างต้นพบว่าระยะเวลาพักเก็บน้ำที่เหมาะสมสำหรับการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ (อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM) โดยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor คือ 5.0 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาพักเก็บน้ำที่ใช้เวลาค่อนข้างนานในการบำบัดฟีนอล ดังนั้นในการทดลองส่วนนี้จึงเปลี่ยนระยะเวลาพักเก็บน้ำจาก 5.0 ชั่วโมง มาเป็น 2.5 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ใช้เท่ากับ 25 กรัมต่อลิตรน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เต็มฟีนอลที่ความเข้มข้น 5 - 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองในส่วนนี้เริ่มจากนำน้ำเสียสังเคราะห์ไหลเข้า-ออกถึงปฏิกรณ์อย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งความเข้มข้นของฟีนอลที่เหลืออยู่ในน้ำเสียที่ออกจากถังปฏิกรณ์คงที่ จากนั้นจึงเปลี่ยนระยะเวลาพักเก็บน้ำไปเป็นค่าที่จะดำเนินการศึกษาต่อไป สำหรับการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ทำได้โดยวิเคราะห์หาความเข้มข้นฟีนอลในน้ำเสียที่เข้าและออกจากถังปฏิกรณ์ที่ระยะเวลาต่างๆผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถบำบัดฟีนอลได้ทันที (รูปที่ 3.8) นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 2.5 ชั่วโมง ระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor มีประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลสูงถึง 100 % (ตารางที่ 3.10) โดยมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงสุดเท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้นฟีนอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ (อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM) ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 5.0 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor สามารถลดระยะเวลาพักเก็บน้ำเหลือ 2.5 ชั่วโมง ทำให้สามารถ

บำบัดน้ำเสียได้ในปริมาณมากขึ้นดังเช่นงานวิจัยของ Saravanan และคณะ (2011b) ที่ศึกษาการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ชนิด MSM ด้วยแบคทีเรียอีสเตรสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. ในระบบแบบ Internal loop Airlift Bioreactor (ILALR) แบบต่อเนื่องโดยเปรียบเทียบระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) ระหว่าง 8.3 และ 4.1 ชั่วโมง พบว่าอัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงสุดที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 8.3 ชั่วโมง เท่ากับ 36.14 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่เมื่อลดระยะเวลาพักเก็บน้ำเป็น 4.1 ชั่วโมง พบว่าอัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงสุดเพิ่มเป็น 73.17 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเมื่อลดระยะเวลาพักเก็บน้ำ ทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสารมลพิษของระบบแบบ Internal loop Airlift Bioreactor (ILALR) สูงขึ้นและสามารถบำบัดน้ำเสียได้ในปริมาณมากขึ้น



รูปที่ 3.8 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เดิมฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.10 ประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง

ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพในการบำบัด ฟีนอล (%)*	ความเข้มข้นฟีนอลสุดท้าย (มิลลิกรัมต่อลิตร)
5	100	0
10	100	0
25	100	0
50	100	0
100	100	0
200	100	0
300	100	0

* ประสิทธิภาพในการบำบัดเมื่อระบบเข้าสู่ Steady state

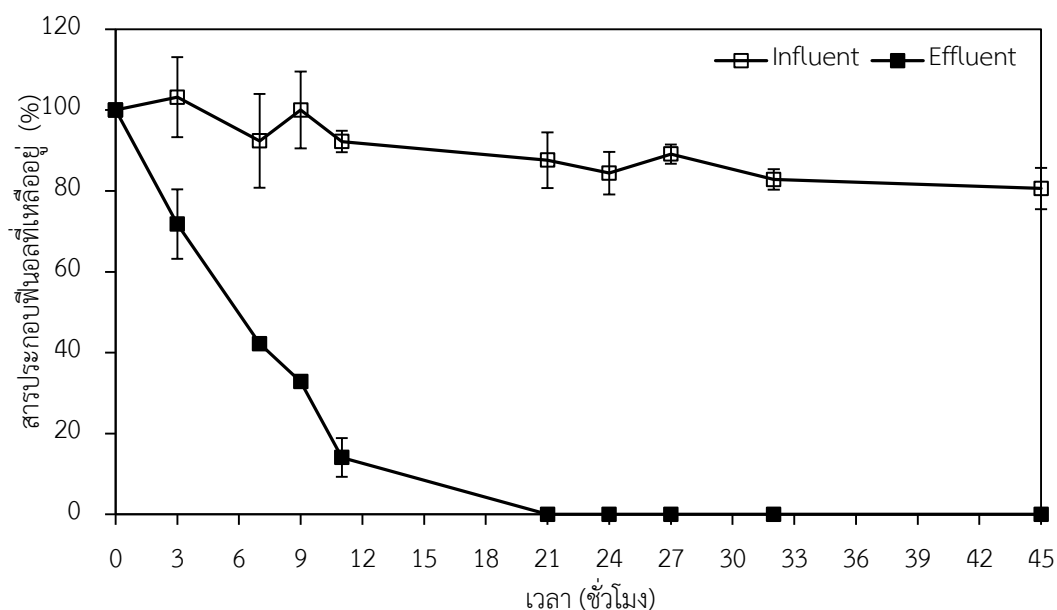
สำหรับการศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่อยู่รอดในแบคทีเรียตรงและน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่ามีแบคทีเรียอยู่ในระบบตลอดการทดลอง และมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทั้งระบบประมาณ $6.68 \pm 0.63 \times 10^{10}$ CFU ต่อชุดทดลอง ในชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียในซีกาประมาณ $4.00 \pm 0.63 \times 10^8$ CFU ต่อกรัมซีกา เมื่อบำบัดฟีนอลผ่านไป 196 ชั่วโมง มีจำนวนแบคทีเรียในซีกาเพิ่มขึ้นเป็น $2.67 \pm 0.25 \times 10^9$ CFU ต่อกรัมซีกา และมีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย $1.40 \pm 0.25 \times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร

3.4.3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรงในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เต็มสารประกอบฟีนอลชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 2.5 ชั่วโมง

จากการทดลองข้างต้นพบว่าระยะเวลาพักเก็บน้ำที่เหมาะสมสำหรับการบำบัดฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM โดยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor คือ 2.5 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียตรงบนซีกาที่ใช้เท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ต่อมาได้ทดสอบประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพ โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสารประกอบฟีนอลหลายชนิด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมฟีนอล, catechol, caffeic acid และ ferulic acid ความเข้มข้น 30, 29, 47 และ 82 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อ้างอิงจากงานวิจัยของ (Aresta และคณะ, 2010) ซึ่งจำลองมาจากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียตรงบนซีกา

สามารถบำบัดสารประกอบฟีนอลทั้งหมดได้ภายใน 21 ชั่วโมง (รูปที่ 3.9) นอกจากนี้ยังพบว่า สารประกอบฟีนอลแต่ละชนิดถูกย่อยสลายได้เกือบหมด โดยมีประสิทธิภาพการบำบัดสูงถึง 100% (ตารางที่ 3.11) ซึ่งอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลสูงสุดเท่ากับ 75.2 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง และสามารถลดความเข้มข้นของสีที่เกิดจากสารประกอบฟีนอลได้ประมาณ 50% (รูปที่ 3.10) จากตารางที่ 3.12 แสดงให้เห็นว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ ILALR ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงมีอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลสูงกว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ ILALR ที่บรรจุแบคทีเรียอิสระ

สำหรับการศึกษาจำนวนแบคทีเรียในแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาและน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่ามีแบคทีเรียอยู่ในระบบตลอดการทดลอง และมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทั้งระบบประมาณ $3.50 \pm 0.54 \times 10^{10}$ CFU ต่อชุดทดลอง ในชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียในซิลิกาประมาณ $4.67 \pm 1.15 \times 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา เมื่อบำบัดฟีนอลผ่านไป 45 ชั่วโมง มีจำนวนแบคทีเรียในซิลิกาเพิ่มขึ้นเป็น $1.40 \pm 0.20 \times 10^9$ CFU ต่อกรัมซิลิกา และมีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย $1.53 \pm 0.32 \times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.9 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เติมสารประกอบฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง

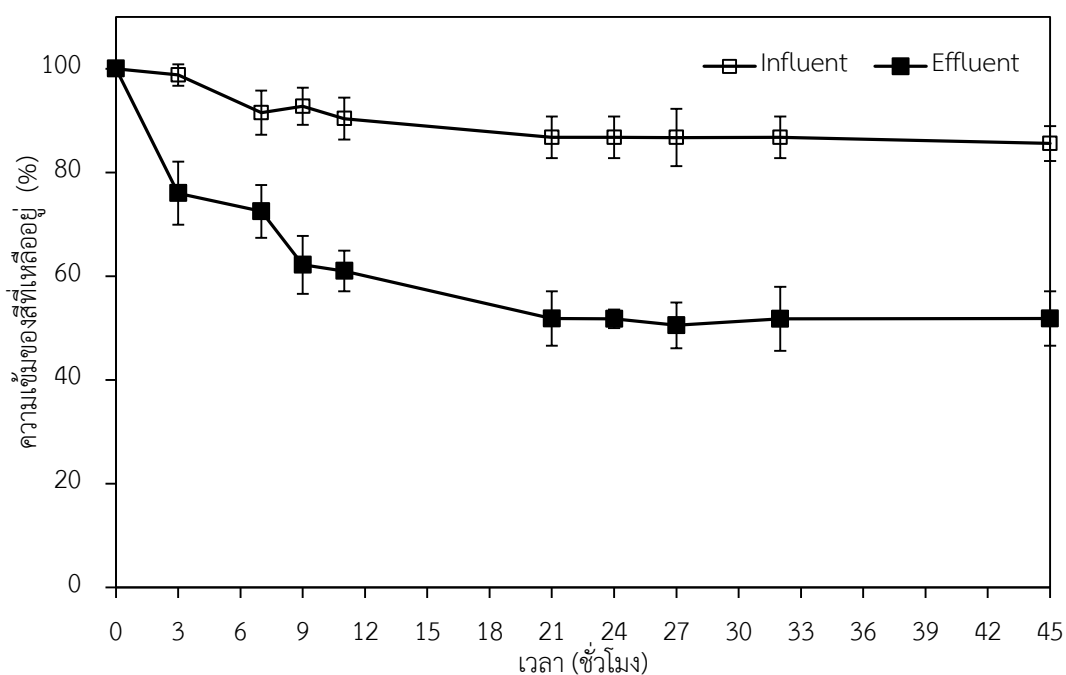
ตารางที่ 3.11 ประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง

สารประกอบฟีนอล*	ความเข้มข้นสารประกอบฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอล (%)**	ความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลสุดท้าย (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ฟีนอล	30	100	0
Catechol	29	100	0
Caffeic acid	47	100	0
Ferulic acid	82	99.99	0.003

* แหล่งที่มา: Aresta และคณะ (2010)

** ประสิทธิภาพในการบำบัดเมื่อระบบเข้าสู่ Steady state

***สารประกอบฟีนอลวิเคราะห์ด้วย 4-อะมิโนแอนติไพรีน และ HPLC

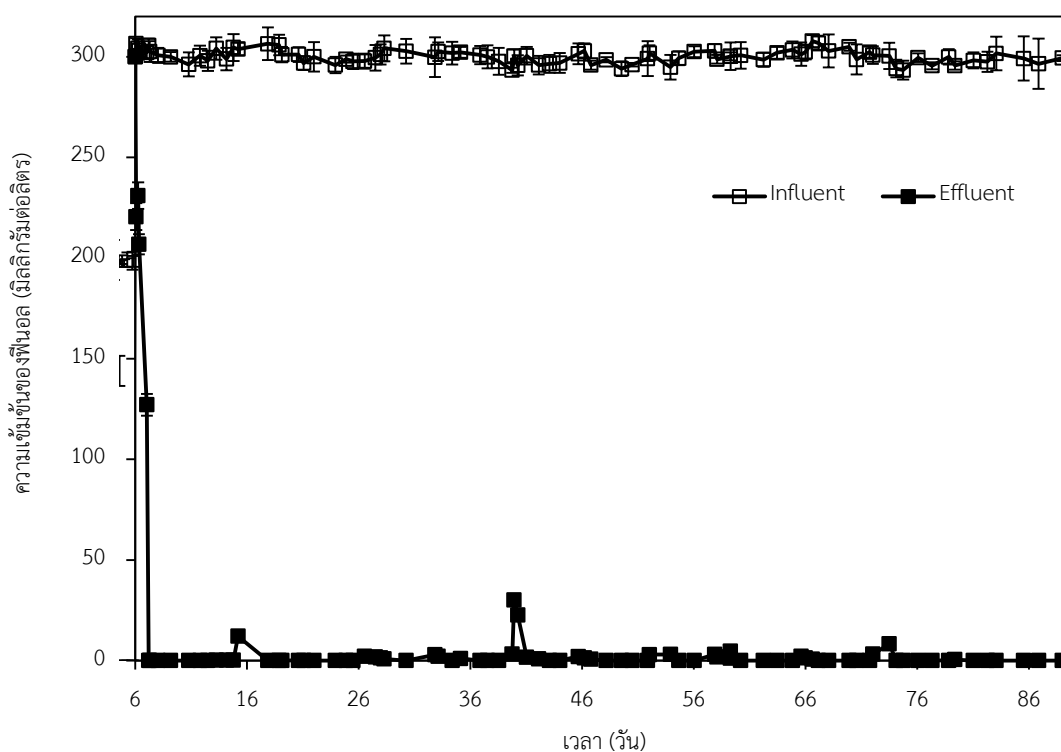


รูปที่ 3.10 ความเข้มข้นของสียที่เหลืออยู่ (%) เมื่อสารประกอบฟีนอลถูกย่อยสลายด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor

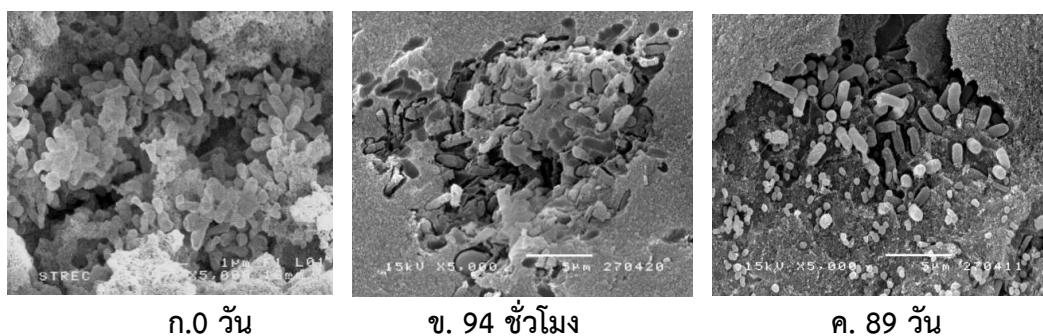
ชนิดของแบคทีเรีย	เซลล์อิสระหรือเซลล์ตรึง	ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (ชั่วโมง)	ชนิดของสารมลพิษ	ความเข้มข้นของสารมลพิษ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (%)	อัตราการย่อยสลาย (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
<i>Achromobacter</i> sp.	เซลล์ตรึง	8	2,4 dichlorophenol	100	94-99	11.75	Quan และคณะ (2003)
<i>Achromobacter</i> sp.	เซลล์ตรึง	8	ฟีนอล 2,4 dichlorophenol	200 10	100 98	25 1.25	Quan และคณะ (2004)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1	เซลล์อิสระและเซลล์ตรึง	5.0-0.83	ฟีนอล	450	90	90	Viggiani และคณะ (2006)
<i>Pseudomonas</i> spp.	เซลล์อิสระ	47	ฟีนอล	600	100	12.77	Saravanan และคณะ (2008a)
Indigenous mixed microbial culture predominantly <i>Pseudomonas</i> sp.	เซลล์อิสระ	8.3 4.1	ฟีนอล <i>m</i> -cresol	100 100	100 100	18.18 16.67	Saravanan และคณะ (2008b)
predominantly <i>Pseudomonas</i> sp.	เซลล์อิสระ	8.3 4.1	ฟีนอล <i>m</i> -cresol	300 300	100 100	36.14 24.39	Saravanan และคณะ (2011a)
<i>Pseudomonas</i> sp.	เซลล์อิสระ	-	ฟีนอล <i>m</i> -cresol	50-125	100	7.69-33.33	Saravanan และคณะ (2011b)
<i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1	เซลล์ตรึง	2.5	ฟีนอล สารประกอบฟีนอล	188-300	99-100	75.2-120	งานวิจัยนี้

ในการทดลองส่วนนี้พบว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor สามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่อง โดยเมื่อศึกษาการย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์เป็นเวลา 89 วัน ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 2.5 ชั่วโมง พบว่าระบบมีประสิทธิภาพคงที่ในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เกือบ 100% (รูปที่ 3.11) และเมื่อบำบัดฟีนอลผ่านไป 89 วัน มีจำนวนแบคทีเรียในซลิคาเพิ่มขึ้นเป็น $1.37 \pm 0.25 \times 10^9$ CFU ต่อกรัมซลิคา และมีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย $5.67 \pm 0.25 \times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร



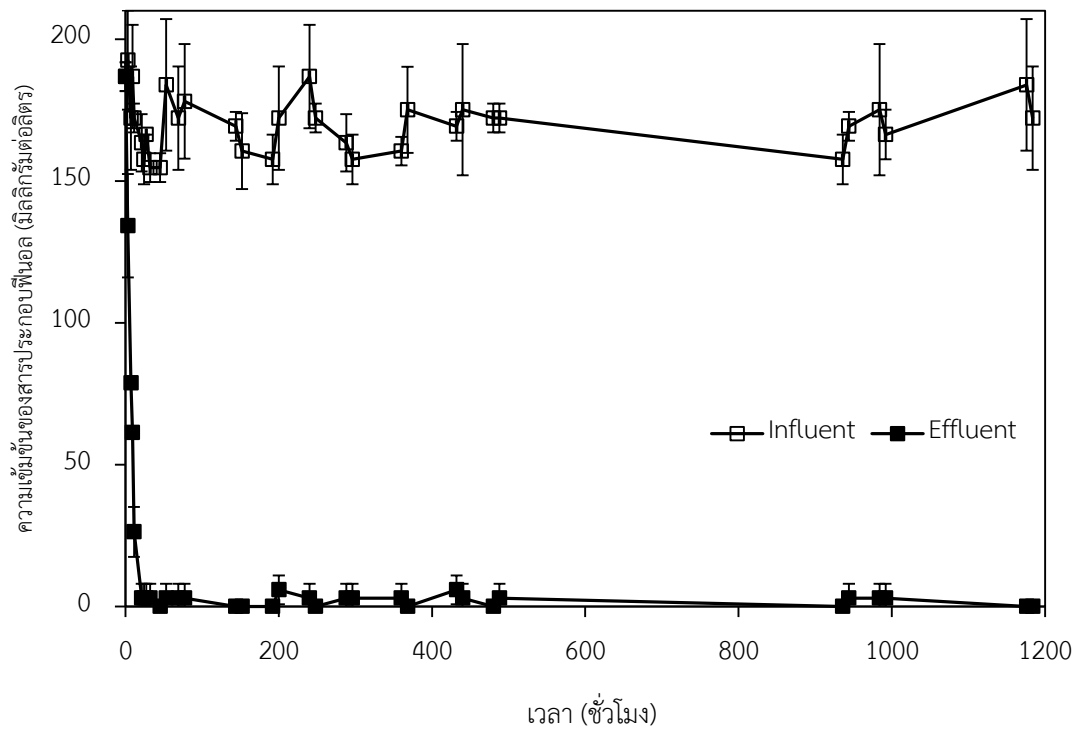
รูปที่ 3.11 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซลิคาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เติมฟีนอลที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมงแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 89 วัน

จากการนำแบคทีเรียตรึงบนซลิคาที่ผ่านการบำบัดฟีนอลไปศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) จากรูปที่ 3.12(ก) วันที่ 0 (ข) 94 ชั่วโมง และ (ค) 89 วัน สังเกตเห็นแบคทีเรียอยู่ภายในซลิคาตลอดการทดลอง

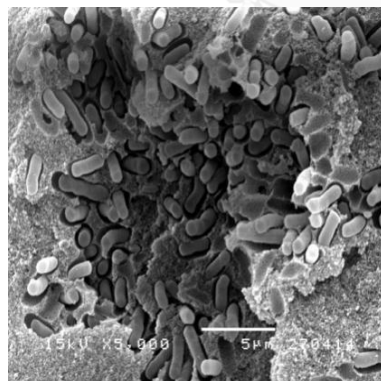


รูปที่ 3.12 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อย่อยสลายฟีนอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง

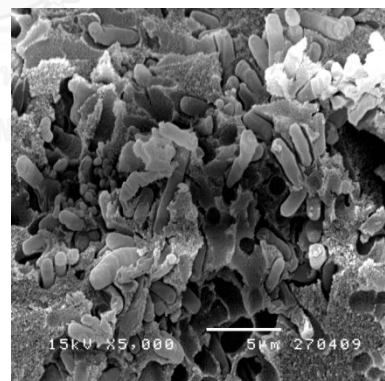
การบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 50 วัน พบว่าระบบ การกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor มีประสิทธิภาพคงที่เกือบ 100% ในการ ย่อยสลายสารประกอบฟีนอล (รูปที่ 3.13) เมื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียตรึงโดยใช้ เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) สังเกตเห็นแบคทีเรียอยู่ภายในซิลิกาตลอดการ ทดลอง (รูปที่ 3.14) นอกจากนี้พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยในชั่วโมงที่ 0 มีจำนวน แบคทีเรียในซิลิกาประมาณ $4.67 \pm 0.12 \times 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา เมื่อบำบัดฟีนอลผ่านไป 50 วัน มี จำนวนแบคทีเรียในซิลิกาเพิ่มขึ้นเป็น $1.10 \pm 0.26 \times 10^9$ CFU ต่อกรัมซิลิกา และมีจำนวนแบคทีเรียใน น้ำเสีย $2.57 \pm 0.21 \times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.13 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เต็มสารประกอบฟีนอล ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 50 วัน



ก. 45 ชั่วโมง



ข. 50 วัน

รูปที่ 3.14 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2.5 ชั่วโมง

3.4.3.2.5 การประเมินต้นทุนของระบบบำบัด

การประเมินต้นทุนของระบบบำบัดขนาดความจุ 3 ลิตร ประกอบด้วย ต้นทุนการผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 75 กรัม ซึ่งเตรียมมาจากหัวเชื้อ 1 ลิตร (ตารางที่ 3.13) ต้นทุนระบบการกรองชีวภาพ และค่าไฟฟ้าในการเดินระบบ (ตารางที่ 3.14)

ตารางที่ 3.13 ต้นทุนการผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 75 กรัม

รายการ	ปริมาณ	หน่วย	ต้นทุนต่อหน่วย (บาท)	รวมต้นทุน (บาท)
สารเคมีสำหรับเตรียมหัวเชื้อ 1 ลิตร				
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3	กรัม	1.712	5.14
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.2	กรัม	3.638	8.00
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.8	กรัม	2.568	2.05
เฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม	1.926	0.09
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม	0.62	0.03
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1	กรัม	1.926	1.93
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร	0.001	1
ฟีนอล (phenol)	0.01	กรัม	4.4	0.04
<u>รวมค่าใช้จ่ายสารเคมีสำหรับ เตรียมหัวเชื้อ</u>				<u>18.25</u>
สารเคมีสำหรับเตรียมซิลิกา 75 กรัม				
TEOS	21.87	มิลลิลิตร	2.8	61.24
HCl	17.49	มิลลิลิตร	0.18	18.36
KOH	5.01	มิลลิลิตร	0.45	2.25
<u>รวมค่าใช้จ่ายสารเคมีสำหรับ เตรียมซิลิกา</u>				<u>81.85</u>
ค่าไฟฟ้า				
Shaker (10 flasks) 1 วัน	0.054	กิโลวัตต์	2.5	3.24

รายการ	ปริมาณ	หน่วย	ต้นทุนต่อหน่วย (บาท)	รวมต้นทุน (บาท)
		ชม.		
<u>รวมค่าไฟฟ้า</u>				<u>3.24</u>
<u>รวมต้นทุนขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ</u>				<u>103.34</u>

ที่มา: พ.ศ. 2554

ตารางที่ 3.14 ต้นทุนการผลิตระบบการกรองชีวภาพและค่าไฟฟ้าในการเดินระบบ

รายการ	ปริมาณ	หน่วย	ต้นทุนต่อหน่วย (บาท)	รวมต้นทุน (บาท)
ค่าระบบการกรองชีวภาพ				
Internal loop Airlift Bioreactor	1	เครื่อง	3,000	3,000
ปั๊มลม	1	เครื่อง	280	280
ปั๊มน้ำ (ปั๊มเคมี)	1	เครื่อง	1,000	1,000
<u>รวมค่าระบบการกรองชีวภาพ</u>				<u>4,280</u>
ค่าไฟฟ้าสำหรับเดินระบบต่อวัน				
ปั๊มอากาศ	0.0036	กิโลวัตต์ ชม.	2.5	0.22
ปั๊มน้ำ	0.08	กิโลวัตต์ ชม.	2.5	4.8
<u>รวมค่าไฟฟ้าต่อวัน</u>				<u>5.02</u>
<u>รวมค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย 1 ลิตร ที่ HRT 5 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 เดือน</u>				<u>0.003</u>

ที่มา: พ.ศ. 2554

เมื่อรวมค่าใช้จ่ายทั้งหมดแล้ว พบว่าต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อและระบบบำบัดการกรองชีวภาพสำหรับบำบัดน้ำเสีย คือ 103 และ 4,280 บาท ตามลำดับ ส่วนค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย คือ 0.35 บาทต่อลิตร ทั้งนี้การขยายขนาดของระบบสามารถใช้คุณสมบัติและค่าที่เหมาะสมในการ

ออกแบบระบบตาม Khondee และคณะ (2012) และอาจจะใช้ถังพลาสติกสำหรับเก็บน้ำมาประยุกต์เป็นถังบำบัด ซึ่งสามารถเลือกขนาดของถังบำบัดตามปริมาณน้ำเสียที่ต้องการบำบัด โดยฝาของถังด้านบนมีการเจาะรูเพื่อใช้เป็นช่องต่อสายยางให้น้ำเข้า และเจาะรูที่ฐาน 2 รู ใช้เป็นทางน้ำออกและให้อากาศ แล้วติดตั้งปั้มน้ำที่มีแรงดันเพียงพอกับการให้แบคทีเรียตรึงสามารถเคลื่อนที่ในระบบได้ สำหรับการให้อากาศทำโดยใช้ปั้มลมต่อกับงานพ่นอากาศส่วน Internal loop สามารถทำจากแผ่นอะคริลิกหรือแผ่นโลหะ การสูบน้ำไปยังถังบำบัดนั้นใช้ปั้มเคมีเป็นตัวควบคุม หลังจากนั้นบรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ แล้วเดินระบบโดยให้มีระยะเวลาพักเก็บน้ำตามต้องการ



บทที่ 4

ประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นในการบำบัดสารประกอบฟีนอล ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบปรับเสถียรบ่อสุดท้าย

4.1 บทนำ

อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มดิบแบบใช้น้ำหรือแบบมาตรฐานก่อให้เกิดของเสียจากกระบวนการผลิตทั้งวัสดุเศษเหลือในรูปของแข็ง ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า เส้นใย และกะลาปาล์ม น้ำมัน นอกจากนี้ยังมีน้ำเสียซึ่งมีรายงานว่าในการผลิตน้ำมันปาล์มดิบ 1 ตัน ต้องใช้น้ำประมาณ 5 - 5.7 ตัน และน้ำที่ใช้ในการผลิตมากกว่า 50% กลายมาเป็นน้ำเสีย น้ำเสียส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการผลิตในขั้นตอนการอบทะลายปาล์มในรูปน้ำเสียจากหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ และน้ำเสียจากเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำมันจากน้ำสลัดจ์ ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูงและมีสีน้ำตาลคล้ำ อันเกิดจากสารประกอบจำพวกแอนโทไซยานิน แคโรทีน เมลานอยดิน ลิกนิน แทนนินและพอลิฟีนอล (Hartley, 1977; Hwang และคณะ, 1978; Baker และ Worgan, 1981) สีคล้ำของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีผลทำให้ออกซิเจนที่สัมผัสผิวหน้าของน้ำลดลง ขัดขวางการเจริญของสิ่งมีชีวิตในน้ำที่มีการใช้ออกซิเจน และสีของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังทำลายทัศนียภาพอีกด้วย (Park และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่พบในผลปาล์ม สารประกอบฟีนอลยังเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายลิกนินผ่านกระบวนการ wet oxidation อีกด้วย (Kongjan และคณะ, 2010) จากรายงานที่ผ่านมาพบปริมาณของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มตั้งแต่ 30-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (พนิดา โต้ะสู, 2555; Alam และคณะ, 2009; Cordova-Rosa และคณะ, 2009; Limkhunsuwan และ Chaiprasert, 2010; Bunrung และคณะ, 2014; Khongkhaem และคณะ, 2014) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลยังมีส่วนทำให้เกิดสีคล้ำในน้ำเสียและถูกบำบัดได้ยากด้วยการบำบัดทางชีวภาพ (Sayadi และคณะ, 2000; Neoh และคณะ, 2014; Saifuddin และคณะ, 2014)

น้ำเสียที่เกิดจากระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม และผ่านการบำบัดด้วยบ่อปรับเสถียรจะถูกเรียกว่า treated palm oil mill effluent (Treated POME) จากการศึกษาที่ผ่านมายังมีงานวิจัยที่ศึกษาการบำบัดสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากบ่อปรับเสถียรของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มน้อยมาก เนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นการบำบัดซีโอดี บีโอดี น้ำมันและไขมัน และสีในน้ำเสียจากบ่อปรับเสถียรของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Lam และ Lee, 2011; Neoh และคณะ, 2014) และในทางปฏิบัติโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังไม่มีเทคโนโลยีในการบำบัดสารประกอบฟีนอลเบื้องต้นก่อนปล่อยน้ำเสียออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ นอกจากนี้จุลินทรีย์ท้องถิ่นในระบบบำบัดน้ำเสียอาจไม่มี

ความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลจึงสามารถตรวจพบปริมาณสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสูงเกินกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) ซึ่งกำหนดให้น้ำเสียจากโรงงานมีสารประกอบฟีนอลได้ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลบางชนิดมีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน์ (Barron และคณะ, 2002) การปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลยังทำให้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดมีค่าซีไอดี และสีเกินกว่าค่าที่กำหนดในมาตรฐาน

การจัดการปัญหาน้ำเสียจากบ่อปรับเสถียรของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในปัจจุบันยังคงดำเนินการโดยอาศัยประสบการณ์ของผู้ควบคุมระบบบำบัด เช่น นำน้ำเสียไปรดสวนปาล์มน้ำมัน และปล่อยให้เกิดการระเหยเองตามธรรมชาติ วิธีดังกล่าวก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา การแก้ปัญหาอย่างยั่งยืนควรเน้นการแก้ไขที่แหล่งกำเนิด ตั้งแต่ปัญหาการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสีย ลดปัญหาความเข้มข้นของสี ซีไอดี และซีไอที นอกจากนี้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วจึงจะสามารถปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ หรือนำน้ำที่บำบัดแล้วกลับมาใช้ใหม่ ในปัจจุบันเทคโนโลยีที่ใช้ในการกำจัดสีและสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การกรองด้วยเมมเบรน การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ และการตกตะกอนด้วยสารเคมี แต่วิธีเหล่านี้มีความยุ่งยากในการใช้งานและการดูแลรักษา รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานค่อนข้างสูง (Hameed และคณะ, 2003; Hojjat และ Salleh, 2009) วิธีการทางชีวภาพจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีความสนใจและนิยมนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมที่มีสีจากสารประกอบฟีนอล เนื่องจากสามารถกำจัดสารที่ย่อยสลายยากได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต้นทุนดำเนินการไม่สูงมาก และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Limkhuan suwan และ Chaiprasert, 2010) การนำเทคนิคการตรึงเซลล์มาใช้เพื่อเพิ่มความทนทานให้แก่จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงบนตัวกลางต่างๆ มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้บำบัดสารมลพิษที่มีความเข้มข้นสูง อย่างไรก็ตามความสำเร็จของวิธีการบำบัดทางชีวภาพค่อนข้างเฉพาะเจาะจงขึ้นอยู่กับชนิดของสารมลพิษ ประเภทของจุลินทรีย์ และเทคนิควิธีการที่เลือกใช้ จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาและพัฒนาวิธีการที่มีความเหมาะสมกับลักษณะน้ำเสียจากบ่อปรับเสถียรในอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาบทที่ 3 พบว่าระบบการกรองชีวภาพขนาดเล็กแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 5.0 และ 2.5 ชั่วโมง สามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลความเข้มข้นตั้งแต่ 5 - 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำเสียสังเคราะห์ ได้ และสามารถใช้งานได้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือนทั้งนี้สามารถลดค่าซีไอดีและสีได้บางส่วน โดยไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารอื่นๆ เพิ่ม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาไปใช้บำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมัน

ปาล์มที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลโดยจะใช้น้ำเสียจากบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 2 แห่ง คือ จังหวัดสงขลา และจังหวัดสตูลเพื่อศึกษาและเปรียบเทียบคุณลักษณะของแหล่งน้ำเสียจากบ่อปรับเสถียรที่แตกต่างกัน ควบคู่กับการตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพในการบำบัดน้ำเสีย เพื่อยืนยันว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลเกิดจากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มียีนย่อยสลายฟีนอล ในปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้เชื้อราสำหรับการบำบัดสีที่เกิดจากสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจริงจากบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้าย (Neoh และคณะ, 2014) ยังไม่มีงานวิจัยใดศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมาใช้เพื่อการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจริงจากบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มซึ่งแบคทีเรียใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าและแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมได้ค่อนข้างยากกว่าเชื้อรา แบคทีเรียจึงมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อการบำบัดสารมลพิษในสิ่งแวดล้อม

4.2 ขั้นตอนงานวิจัย

4.2.1 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

4.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

4.2.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจริงจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา

4.2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจริงจากโรงงาน B จังหวัดสตูล

4.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

4.2.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจริงจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา

4.2.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจริงจากโรงงาน B จังหวัดสตูล

4.2.4 การตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม A จังหวัดสงขลา และโรงงาน B จังหวัดสตูล

4.2.4.1 การตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี PCR

4.2.4.2 การตรวจนับจำนวนชุดของยีนประมวลรหัส 16S rRNA และ *LmPH* ด้วยเทคนิค Real-time qPCR

4.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

4.3.1 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การทดสอบประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยจะใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 2 แห่ง คือ จังหวัดสงขลา และจังหวัดสตูล โดยศึกษาข้อมูลการผลิต ลักษณะของโรงงาน ระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำน้ำเสียดังกล่าวมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์และระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ขนาดเล็กต่อไป

4.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

นำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 25 กรัม (มีแบคทีเรียประมาณ 4.33×10^8 CFU ต่อกรัมซิลิกา) เติมลงในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมฟีนอลความเข้มข้น 25 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นฟีนอลที่เติมลงไปในระบบแบทช์เป็นความเข้มข้นของฟีนอลที่ตรวจพบในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากนั้นเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองแต่ละชุดทั้งหมด 3 ชุด และมีชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของสารประกอบฟีนอลประกอบด้วยน้ำเสียฟีนอลและซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล สี และจำนวนแบคทีเรียในระบบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลระหว่างระบบแบทช์โดยใช้น้ำเสียจริงกับน้ำเสียสังเคราะห์ หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาประเมินระยะเวลาที่เก็บน้ำสำหรับระบบการกรองชีวภาพที่จะใช้บำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อไป

4.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เลือกภาวะที่ระบบการกรองชีวภาพมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ดีที่สุดมาใช้กับน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จังหวัดสงขลาและจังหวัดสตูล โดยอาจจะเพิ่มระยะเวลา

กักเก็บน้ำ ถ้าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกามีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจริงต่ำกว่าเมื่อใช้น้ำเสียสังเคราะห์ เก็บตัวอย่างน้ำเข้า-ออก และแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่เวลาต่างๆ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล สารประกอบฟีนอล สี ค่าซีไอดี จำนวนแบคทีเรียในระบบ ตรวจสอบจำนวนชุดของยีนประมวลรหัสฟีนอลไฮดรอกซิเลสด้วยวิธี Real-time qPCR และตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรของแบคทีเรียบนซิลิกาด้วย Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) ตามวิธีข้อ 4.3.5 เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประเมินระยะเวลาที่แบคทีเรียตรึงยังคงประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอล และเป็นข้อมูลในการนำไปศึกษาต่อในระยะยาว สำหรับการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มต่อไป

4.3.4 การตรวจติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนอลและประชากรแบคทีเรียในระบบการกรองชีวภาพ

4.3.4.1 การตรวจหายีน 16S rRNA และ *LmPH* ในแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1, *Methylobacterium* sp. NP3 ตรึงบนซิลิกาและแบคทีเรียในน้ำเสีย

4.3.4.1.1 การตรวจหายีน 16S rRNA

สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 ในซิลิกาและแบคทีเรียในน้ำเสียด้วย Fast DNA spin kit (BIO 101 kit, Qbiogene, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ตรวจหายีน 16S rRNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีทดลองของ Muangchinda และคณะ, (2013) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 968 forward กับ 1401 reverse เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 433 bp โดยใช้ชุด Go-Taq[®] Green Master Mix (Promega, USA) สำหรับทำ PCR ซึ่งเติม reaction mixtures ในหลอด PCR ที่วางอยู่ในน้ำแข็ง ดังนี้

Go-Taq [®] Green Master Mix, 2X	15	μL
ไพรเมอร์ 968 F (20 พิโคโมล)	1	μL
ไพรเมอร์ 1401 R (20 พิโคโมล)	1	μL
DNA-template (25 ng)	2	μL
Nuclease-Free Water	11	μL

รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 30 μL ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 96 °ซ	เวลา 2 นาที	} 30 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 96 °ซ	เวลา 30 วินาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 55 °ซ	เวลา 30 วินาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72 °ซ	เวลา 1 นาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 °ซ	เวลา 6 นาที	

ตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ค) โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

4.3.4.1.2 การตรวจหายีนประมวลรหัสฟีนอลไฮดรอกซิเลส

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติมฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 แบคทีเรียในซลิกา และแบคทีเรียในน้ำเสียด้วย Fast DNA spin kit (BIO 101 kit, Qbiogene, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ตรวจหายีนประมวลรหัส Largest subunit of multicomponent phenolhydroxylase (*LmPH*) ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีทดลองของ Basile และ Erijman (2010) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *LmPH* forward U1+U2+U3 กับ *LmPH* U reverse โดยผู้วิจัยคาดว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 น่าจะมียีน *LmPH* ดังนั้นจึงเลือกไพรเมอร์ข้างต้นซึ่งเป็น Universal primers ที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียที่มียีนประมวลรหัสฟีนอลไฮดรอกซิเลส และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 620 bp โดยใช้ชุด Go-Taq[®] Green Master Mix (Promega, USA) สำหรับทำ PCR ซึ่งเติม reaction mixtures ในหลอด PCR ที่วางอยู่ในน้ำแข็ง ดังนี้

Go-Taq [®] Green Master Mix, 2X	15	μL
ไพรเมอร์ U1+U2+U3 F (20 พิโคโมล)	1	μL
ไพรเมอร์ UR (20 พิโคโมล)	1	μL
DNA-template (25 ng)	4	μL
Nuclease-Free Water	9	μL

รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 30 μL ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 94 °ซ เวลา 10 นาที	} 30 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 94 °ซ เวลา 1 นาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 55 °ซ เวลา 1 นาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72 °ซ เวลา 1 นาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 °ซ เวลา 10 นาที	

ตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยวิธีอิมูโนโบลอตติ้ง (Western blotting) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย (target protein) ในตัวอย่างที่ทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder และเพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นยีนประมวลรหัสพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 จึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIA quick PCR purification kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ หลังจากนั้นโคลนนิ่งผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ และทรานสฟอร์มริคอมบีแนนท์พลาสมิด (recombinant plasmid) เข้าสู่คอมพีเทนดเซลล์ *E. coli* JM109 และคัดเลือกทรานสฟอร์มแนนท์ (transformant) ที่มีริคอมบีแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) และสกัดริคอมบีแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIA prep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ หลังจากนั้นตัดริคอมบีแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Eco* RI) เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories SdnBhd, Malaysia ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกแล้ว นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) และเพื่อยืนยันได้ว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นยีนประมวลรหัสพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 ไปทดสอบในระบบการกรองชีวภาพและน้ำเสียต่อไป

4.3.4.2 การตรวจนับจำนวนชุดของยีนประมวลรหัส 16S rRNA และพันธุกรรมไฮดรอกซีเลสด้วยเทคนิค Real-time qPCR

นำแบคทีเรียที่เลี้ยงบนซีลิกาและน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดที่เวลาต่างๆ จากการเก็บตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วย Fast DNA spin kit (BIO 101 kit, Qbiogene, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากนั้นตรวจนับจำนวนชุดของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Real-time qPCR โดยใช้ SYBR Green ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Muangchinda และคณะ (2013) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 968 forward กับ 1401 reverse อุปกรณ์สำหรับ Real-time qPCR

ประกอบด้วย MJ Mini Thermal Cycler, MiniOpticon Real-Time PCR detector (Bio-Rad Laboratories Inc.) ด้วยโปรแกรม MJ Opticon Monitor Analysis Software version 3.1 (Bio-Rad Laboratories Inc.) โดยใช้ชุดทดสอบ 1× Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences, Hanover, MD, USA) และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 95 °ซ	เวลา 10 นาที	} 40 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 94 °ซ	เวลา 1 นาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 56-57 °ซ	เวลา 1 นาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72 °ซ	เวลา 1 นาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 °ซ	เวลา 6 นาที	

และวิเคราะห์ melting curve สำหรับกราฟมาตรฐานสร้างโดยใช้พลาสมิดที่มียีน 16S rRNA ที่ถูกเจือจางที่จำนวนชุดยีนระดับต่างๆ

นำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาและน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดที่เวลาต่างๆ จากการเก็บตัวอย่างมา สกัดดีเอ็นเอด้วย Fast DNA spin kit (BIO 101 kit, Qbiogene, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากนั้นตรวจนับจำนวนชุดของยีนประมวลรหัส Largest subunit of multicomponent phenolhydroxylase (*LmPH*) ด้วยเทคนิค Real-time qPCR โดยใช้ SYBR Green ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Basile และ Erijman (2010) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *LmPH* forward U1+U2+U3 กับ *LmPH* U reverse อุปกรณ์สำหรับ Real-time qPCR ประกอบด้วย MJ Mini Thermal Cycler, MiniOpticon Real-Time PCR detector (Bio-Rad Laboratories Inc.) ด้วยโปรแกรม MJ Opticon Monitor Analysis Software version 3.1 (Bio-Rad Laboratories Inc.) โดยใช้ชุดทดสอบ 1× Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences, Hanover, MD, USA) และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 95 °ซ	เวลา 10 นาที	} 40 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 94 °ซ	เวลา 1 นาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 59 °ซ	เวลา 1 นาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72 °ซ	เวลา 1 นาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 °ซ	เวลา 10 นาที	

และวิเคราะห์ melting curve สำหรับกราฟมาตรฐานสร้างโดยใช้พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสฟีนอลไฮดรอกซิเลสที่ถูกเจือจางที่จำนวนชุดยีนระดับต่างๆ

4.3.5 วิธีการวิเคราะห์

4.3.5.1 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดสงขลา และสตูล แล้วนำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียโดยใช้วิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย (APHA, AWWA, and WEF, 2005) เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ต่อไปนี้ pH, chemical oxygen demand (COD), Dissolved Oxygen (DO), total suspended solids (TSS), total phosphorus, total nitrogen และ oil&grease พร้อมทั้งวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียตามวิธีในข้อ 4.3.5.2

4.3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.3.5.1 และ 3.3.5.2

4.3.5.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นสีตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.3.5.4

4.3.5.4 การวัดปริมาณแบคทีเรียใช้วิธี Dilution plate count ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.3.5.5

4.3.5.5 การวิเคราะห์การเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิววัสดุจริงตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.3.5.6

4.3.5.6 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรของแบคทีเรียบนซิลิการะหว่างการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียด้วย Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) โดยนำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการบำบัดจากการเก็บตัวอย่างมาติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรและการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียบนซิลิกาด้วย Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) ตามวิธีของ Wouters และคณะ (2010) ด้วยเครื่องรุ่น Confocal Microscope Carl Zeiss LSM 700 เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียที่เติมลงไปในระบบยังคงมีชีวิตตลอดการทดลอง

4.4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นสำหรับบำบัดน้ำเสียจากบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

4.4.1.1 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การทดสอบประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 2 แหล่ง คือ โรงงาน A จังหวัดสงขลา และโรงงาน B จังหวัดสตูล ซึ่งโรงงาน A มีกำลังการผลิตต่อวัน สูงกว่าโรงงาน B (ตารางที่ 4.1) สำหรับลักษณะโรงงาน เป็นอาคารเปิดโล่ง ไม่มีผนัง ภายในตัวอาคารมีเครื่องจักรที่ใช้สำหรับสกัดน้ำมันปาล์ม ส่วนบริเวณรอบๆ โรงงานมีลานโล่งๆ สำหรับเตรียมทะเลลายปาล์มเข้าสู่กระบวนการผลิต และเป็นที่เก็บกากปาล์มน้ำมันที่เหลือจากกระบวนการผลิต ด้านหลังของโรงงานมีบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียร (บ่อดิน) (รูปที่ 4.1 ก และ ข) ซึ่งน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วและยังคงไม่ผ่านค่ามาตรฐาน

ทำให้ไม่สามารถปล่อยน้ำเสียออกสู่แหล่งน้ำภายนอกได้ โรงงานก็จะนำน้ำเสียบางส่วนไปใช้รดน้ำสวน ปาล์มน้ำมัน และปล่อยให้ระเหยเองตามธรรมชาติ

สำหรับวิธีการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย ใช้ถังน้ำตักน้ำเสียบริเวณผิวหน้าน้ำจากบ่อบำบัดน้ำเสีย แล้วนำน้ำเสียดังกล่าวเทใส่ถังพลาสติกขนาด 25 ลิตร เหตุผลที่เก็บน้ำเสียที่บริเวณผิวหน้าน้ำ เนื่องจากถ้าตักลงไปลึกมากจะพบแต่กากตะกอนและดินตะกอน ทำให้ได้ส่วนที่เป็นน้ำเสียน้อยมาก (รูปที่ 4.2ก) และลักษณะน้ำเสียที่เก็บมาจากบ่อบำบัดน้ำเสียมีสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งเมื่อดูด้วยตาเปล่าสีไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฯ (รูปที่ 4.2ข)

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลการผลิต และระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

รายละเอียด	โรงงาน A จังหวัดสงขลา	โรงงาน B จังหวัดสตูล
กำลังการผลิต (ตัน/ชั่วโมง)	25	15
ระบบบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียร	บ่อดิน	บ่อดิน
จำนวนบ่อบำบัดน้ำเสีย (บ่อ)	6	4
เดินระบบ (วัน/สัปดาห์)	6	5
ความลึกของบ่อ (เมตร)	3	3
ชนิดวัตถุดิบ	ปาล์มทะเลลาย	ปาล์มทะเลลาย
ผลิตภัณฑ์	น้ำมันปาล์มดิบ	น้ำมันปาล์มดิบ



ก.



ข.

รูปที่ 4.1 บ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรของโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก)
และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข)



ก.



ข.

รูปที่ 4.2 การเก็บน้ำเสีย (ก) และลักษณะน้ำเสียที่เก็บมาจากบ่อบำบัดน้ำเสีย (ข)

จากการเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำเสียบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทั้ง 2 แห่ง มาตรวจวิเคราะห์คุณภาพ พบว่าค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH), BOD, COD, TKN และปริมาณสารประกอบฟีนอลของน้ำเสียจากทั้ง 2 โรงงาน มีค่าสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม (ตารางที่ 4.2) ที่ประกาศโดยกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้น้ำเสียที่ปล่อยออกจากโรงงาน A และ B ต้องได้รับการบำบัดให้ผ่านเกณฑ์มาตรฐานก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำน้ำเสียเหล่านี้มาใช้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบขวดเขย่าขนาดเล็กแบบแบทช์และระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ขนาดเล็กต่อไป

ตารางที่ 4.2 ลักษณะน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	มาตรฐานคุณภาพน้ำเสีย*	โรงงาน A จังหวัดสงขลา**	โรงงาน B จังหวัดสตูล**
DO (mg/l)	-	0	0
pH	5.5-9.0	8.4	8.1
Temperature (°C)	ไม่เกิน 40 °C	28	38
BOD (mg/l)	ไม่เกิน 60 mg/L	160	120
COD (mg/l)	ไม่เกิน 400 mg/L	846	890
TKN (mg/l)	ไม่เกิน 100 mg/L	154	321

พารามิเตอร์	มาตรฐานคุณภาพน้ำเสีย*	โรงงาน A จังหวัดสงขลา**	โรงงาน B จังหวัดสตูล**
NH ₄ -N (mg/l)	-	105	118
Phenols (mg/l)***	ไม่เกิน 1.0 mg/L	6.8	10.7
TSS (mg/l)	ไม่เกิน 50 mg/L	562	815
TOC (mg/l)	-	240	301
TP (mg/l)	-	24.4	61.5

แหล่งที่มา: *มาตรฐานคุณภาพน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) เรื่องกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำเสียจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรมลงวันที่ 3 มกราคม 2539 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 13ง ลงวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2539

**เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงาน A และ B ในวันที่ 20 สิงหาคม 2553 และ 30 มีนาคม 2554 ตามลำดับ

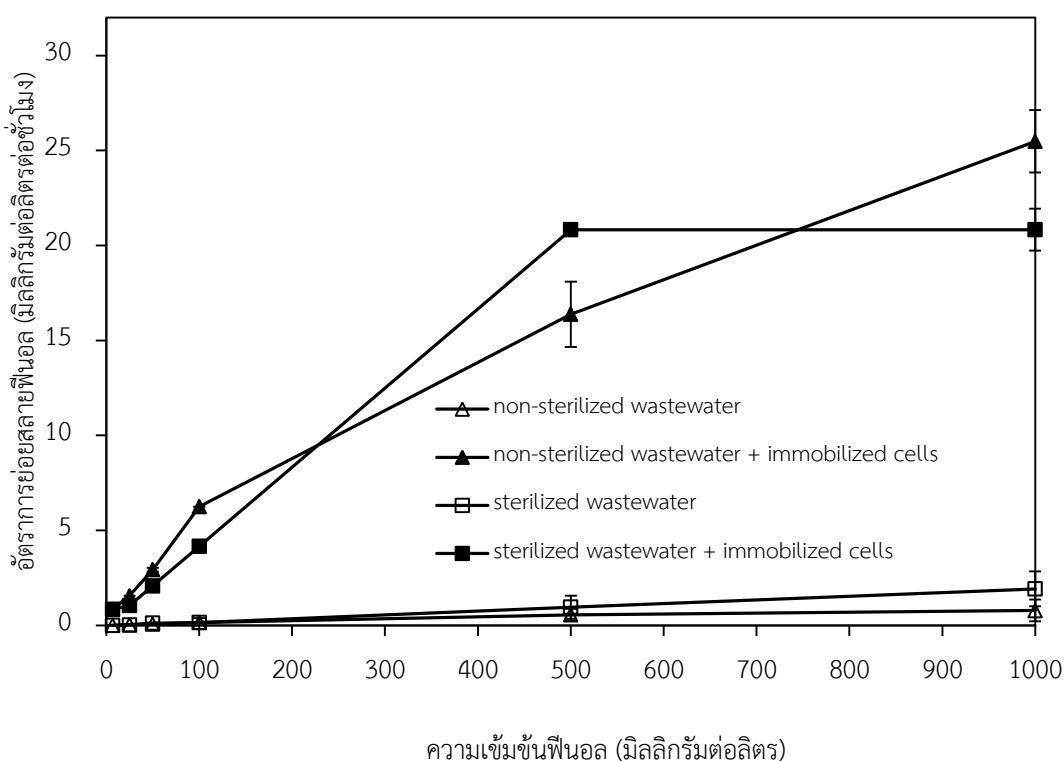
*** สารประกอบฟีนอลวิเคราะห์ด้วยวิธี 4-อะมีโนแอนติไพรีน

4.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา ในระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

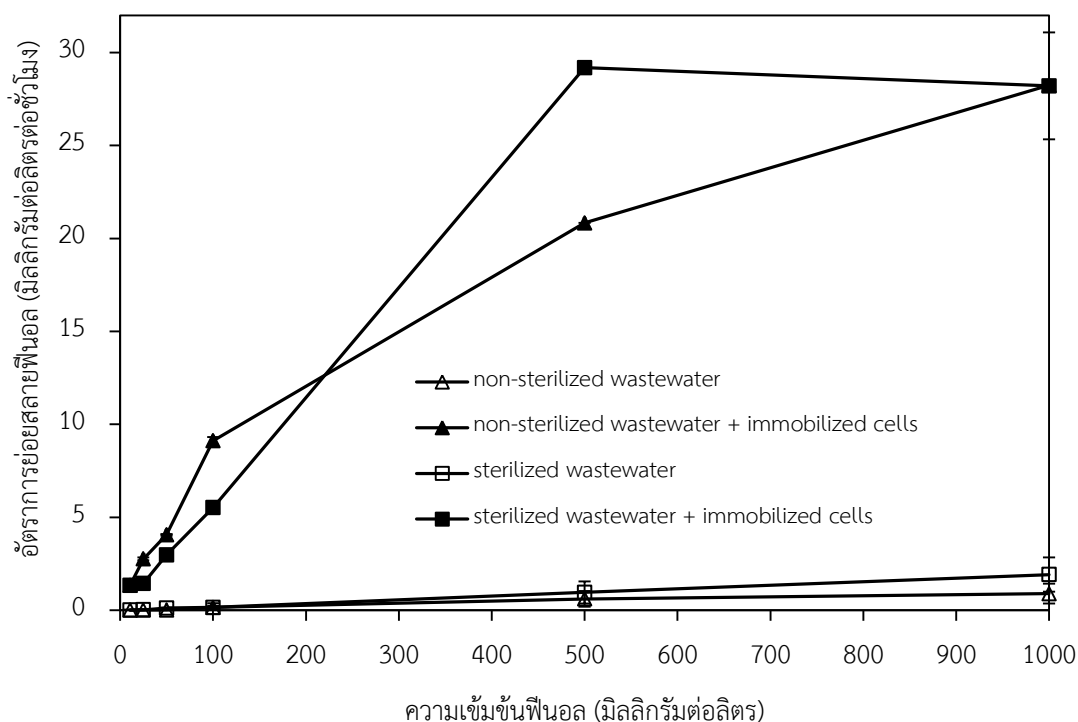
4.4.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อ

เนื่องจากฟีนอลที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากโรงงาน A มีความเข้มข้นประมาณ 6.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียปนเปื้อนฟีนอลในอุตสาหกรรมประเภทอื่นๆ เช่น Zhou และคณะ (2005) พบฟีนอลปริมาณ 131.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมถ่านหิน Ramakrishnan และ Gupta (2008) พบฟีนอลปริมาณ 490 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมถ่านหิน Alam และคณะ (2009) พบฟีนอลปริมาณ > 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม Aresta และคณะ (2010) พบฟีนอลปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอก Bunrung และคณะ (2014) พบฟีนอลปริมาณ 965 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม Neoh และคณะ (2014) พบฟีนอลปริมาณ 292 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการฆ่าเชื้อ การทดลองในส่วนนี้จึงเติมฟีนอลเพิ่มที่ความเข้มข้น 25 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อจำลองความเข้มข้นฟีนอลให้มีค่าใกล้เคียงกับน้ำเสียที่เคยมีการรายงานมาก่อน และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพสูงสุด

ของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในการบำบัดฟีนอล ผลการทดลองพบว่าอัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงสุดของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา เท่ากับ 25.5 และ 20.8 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.3ก ขณะที่อัตราการย่อยสลายฟีนอลสูงสุดของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อจากโรงงาน B จังหวัดสตูลเท่ากับ 28.2 และ 29.2 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.3ข ในขณะเดียวกันชุดควบคุมซึ่งเติมซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรีย พบว่าที่ความเข้มข้นต่างๆ ฟีนอลมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งน่าจะเกิดจากกระบวนการทางกายภาพ เช่นการดูดซับของฟีนอลบนซิลิกา การระเหยของฟีนอล และเกิดจากการย่อยสลายโดยแสงในธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่าน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลในระบบบำบัดแบบแบทช์ได้ดีกว่าในระบบบำบัดที่ใช้น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิสูงอาจส่งผลให้โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลเปลี่ยนแปลง ซึ่งทำให้แบคทีเรียอาจจะย่อยสลายได้ยากกว่าเดิม ดังเช่นงานวิจัยของ Neoh และคณะ (2014) กล่าวว่า การบำบัดสารมลพิษในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งมีจุลินทรีย์ประจำถิ่น พบว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดสารมลพิษได้ดีกว่าน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ



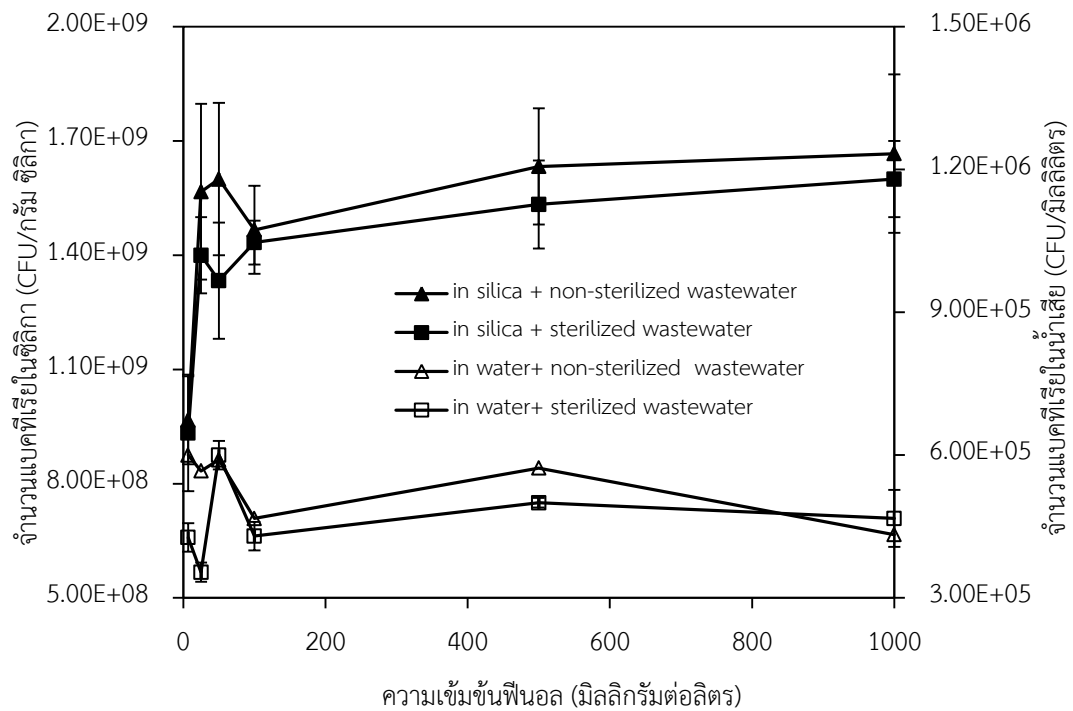
ก.



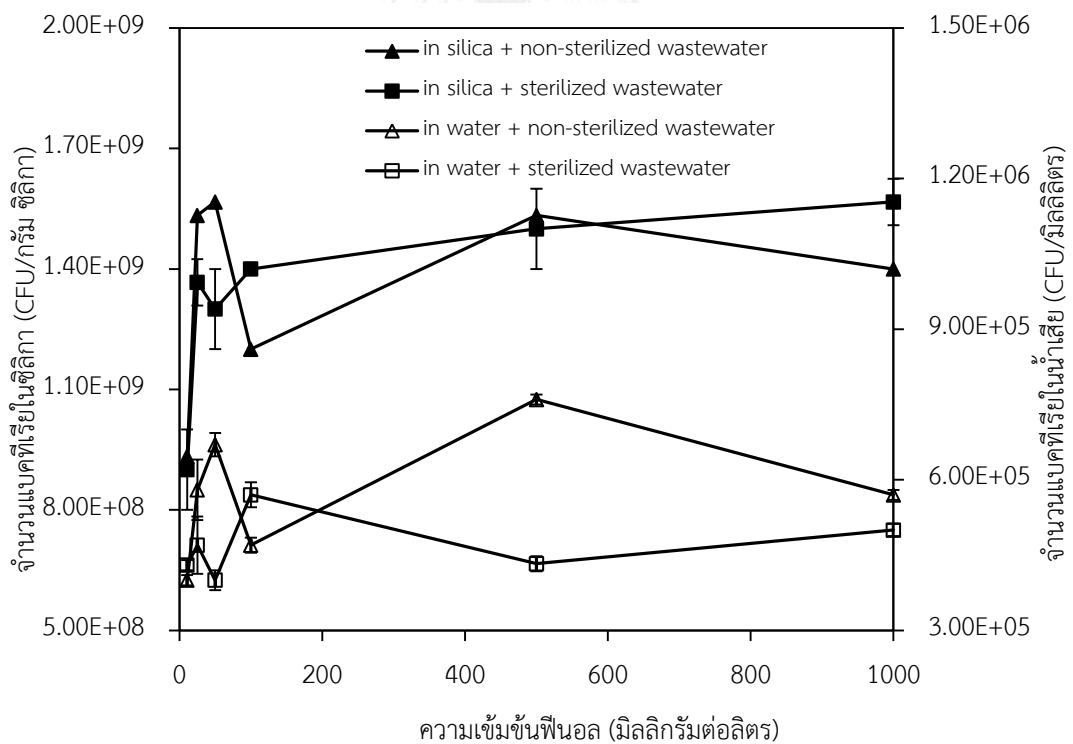
ข.

รูปที่ 4.3 อัตราการย่อยสลายฟิโนลในน้ำเสียจริงที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อจาก โรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข)

การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซิลิกา พบว่าในชั่วโมงที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้นฟิโนล 6.8 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเริ่มต้นประมาณ 6.0×10^8 - 9.67×10^8 CFU ต่อชุดทดลอง ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการบำบัด พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนเป็น 9.00×10^8 - 1.67×10^9 CFU ต่อชุดทดลอง ตามลำดับ โดยจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีจำนวนมากกว่าน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดังรูปที่ 4.4 ซึ่งการเพิ่มขึ้นของจำนวนของแบคทีเรียในระบบสอดคล้องกับปริมาณฟิโนลที่ลดลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนฟิโนล พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบที่ใช้น้ำเสียจริงมีประสิทธิภาพสูงกว่า แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถใช้ฟิโนลในน้ำเสียเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนในการเจริญ อีกทั้งน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสารอาหารอื่นๆ ที่สามารถส่งเสริมการเจริญและการทำงานของแบคทีเรียได้



ก.



ข.

รูปที่ 4.4 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระบบบำบัดแบบแบทซ์เมื่อใช้น้ำเสียจาก

โรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข)

4.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา ในระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor โดยใช้ น้ำเสียจากโรงงานสกัด น้ำมันปาล์ม A จังหวัดสงขลา และโรงงาน B จังหวัดสตูล

เมื่อนำน้ำเสียจริงจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา และโรงงาน B จังหวัดสตูลที่มีสารประกอบฟีนอลหลายชนิด มาบำบัดด้วยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 5.0 ชั่วโมง และปริมาณแบคทีเรียตรึง 25 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.5) พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน A และ B ได้ 100% เมื่อระบบเข้าสู่ steady state ดังรูปที่ 4.6 และมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน A และ B ได้ 75.7% และ 70.5% เมื่อระบบเข้าสู่ steady state ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 ก และ ข) ขณะที่ระบบสามารถบำบัดปริมาณ COD ในน้ำเสียจากโรงงาน A และ B ได้ 32.6% และ 77.5% เมื่อระบบเข้าสู่ steady state ตามลำดับ (รูปที่ 4.7) ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในการบำบัดสี พบว่าสามารถลดความเข้มของสีได้ประมาณ 10% (รูปที่ 4.8) ซึ่งอาจเกิดจากการดูดซับของซิลิกา แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมาใช้แบคทีเรียอิสระสำหรับบำบัดสีในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น *Streptomyces* sp. (Zhou และ Zimmermann, 1993), *Saccharomyces cerevisiae* (Aksu และ Donmez, 2003), *Lactobacillus plantarum* (Limkhuansuwan และ Chaiprasert, 2010), และ *Bacillus* sp. (Nakajima-Kambe และคณะ, 1999; Dawkar และคณะ, 2009) พบว่าแบคทีเรียอิสระบางสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการบำบัดสีได้ดีกว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา ทั้งนี้อาจเกิดจากแบคทีเรีนำมาตรึงบนซิลิกาไม่ได้ถูกคัดแยกมาเพื่อการบำบัดสี ส่งผลให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีค่อนข้างต่ำ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor สามารถบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลได้ และสามารถลดปริมาณ COD รวมทั้งความเข้มของสีในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้

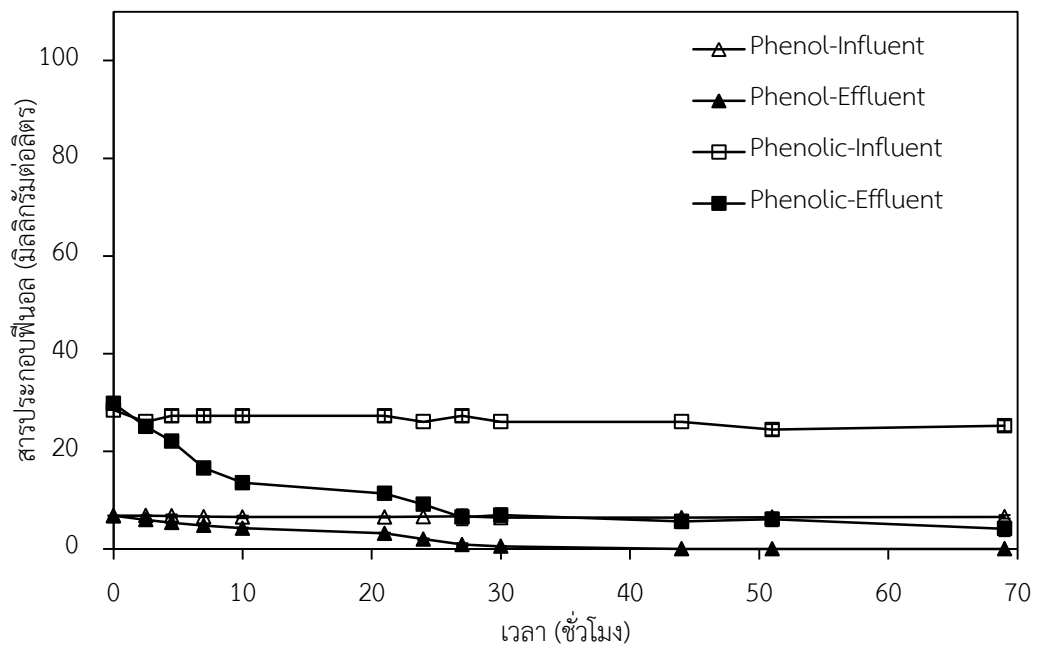


ก.

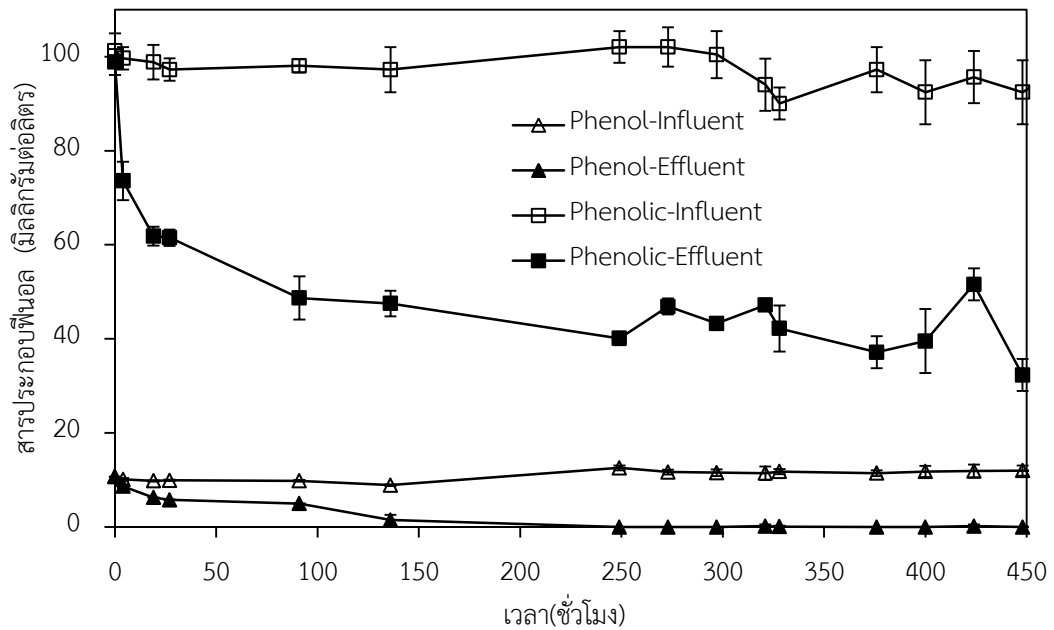


ข.

รูปที่ 4.5 ระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุแบคทีเรียตรึง 25 กรัมต่อลิตร และน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข)



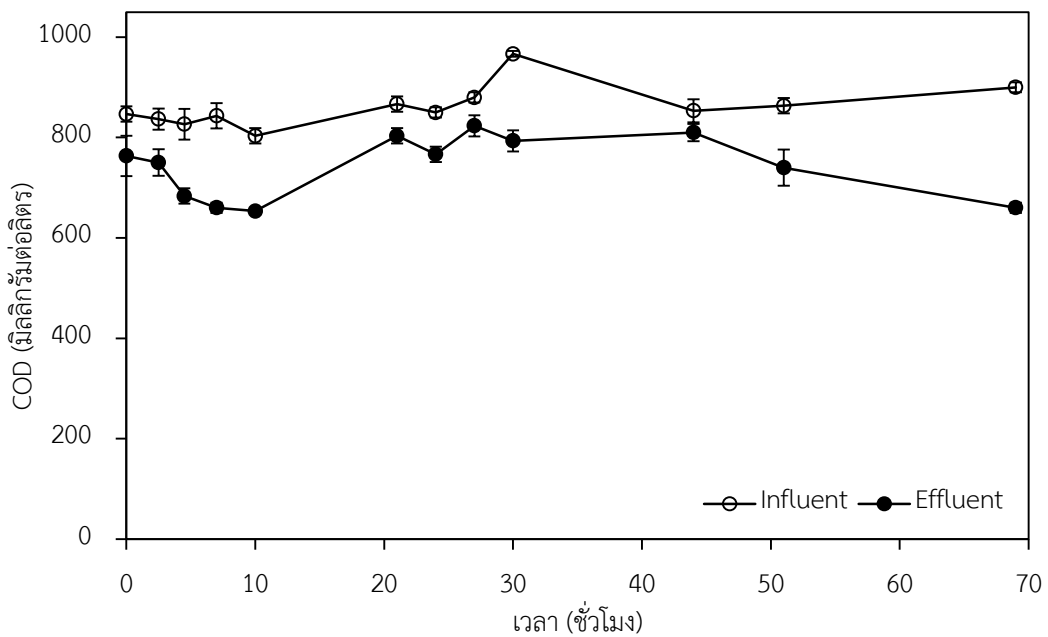
ก.



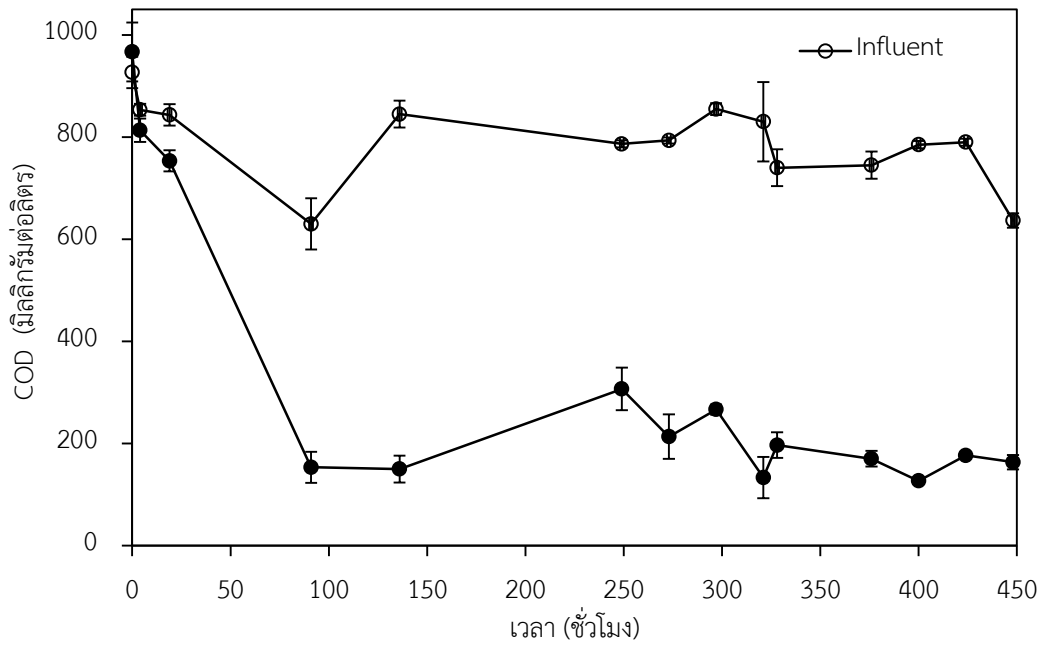
ข.

รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้บำบัดสารประกอบฟีนอล* ในน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข) ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 5.0 ชั่วโมง

หมายเหตุ: *สารประกอบฟีนอลวิเคราะห์ด้วย 4-อะมิโนแอนติไพรีน และ HPLC

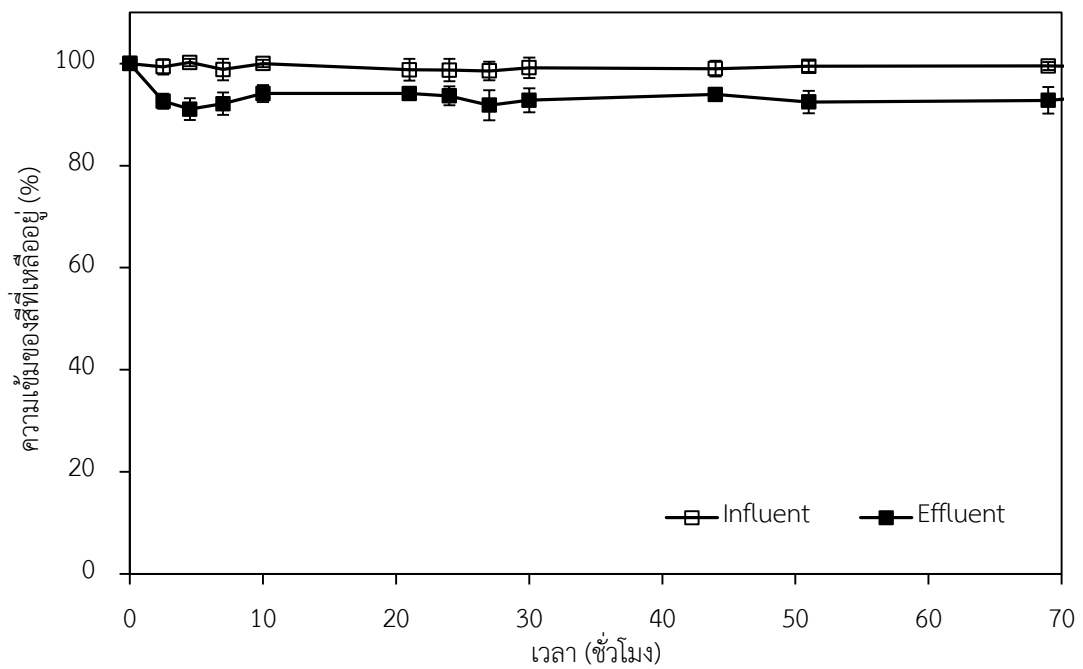


ก.

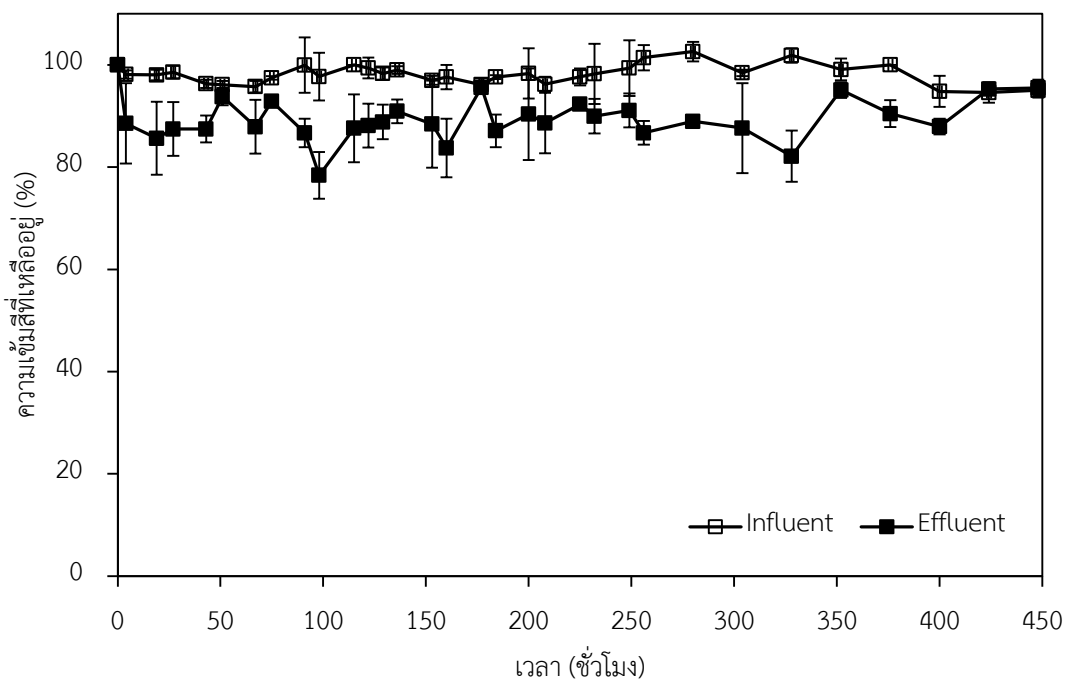


ข.

รูปที่ 4.7 COD ที่เหลืออยู่เมื่อสารประกอบฟีนอลถูกบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข) ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 5.0 ชั่วโมง



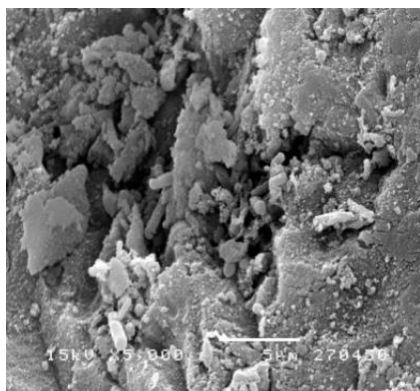
ก.



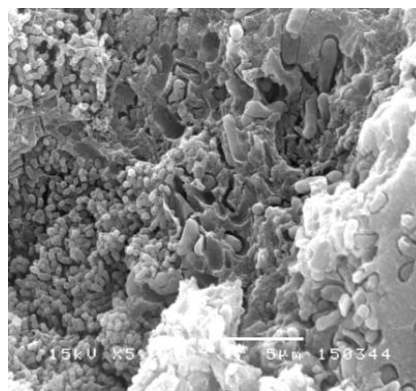
ข.

รูปที่ 4.8 ความเข้มของสีที่เหลืออยู่ (%) เมื่อสารประกอบฟีนอลถูกบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา ในระบบการกรองชีวภาพเมื่อนำน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข) ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 5.0 ชั่วโมง

สำหรับจำนวนแบคทีเรียที่อยู่รอดในแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาและน้ำเสีย พบว่ามีแบคทีเรียอยู่ในระบบตลอดการทดลอง และมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทั้งระบบประมาณ $9.75 \pm 0.54 \times 10^{10}$ - $1.60 \pm 0.25 \times 10^{11}$ CFU ต่อชุดทดลอง ในชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียในซิลิกาประมาณ $3.67 \pm 0.58 \times 10^8$ - $4.00 \pm 1.00 \times 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา เมื่อสิ้นสุดการบำบัดสารประกอบฟีนอล มีจำนวนแบคทีเรียในซิลิกาเพิ่มขึ้นเป็น $1.30 \pm 0.25 \times 10^9$ - $2.13 \pm 0.10 \times 10^9$ CFU ต่อกรัมซิลิกา และมีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย $1.23 \pm 0.12 \times 10^5$ - $1.47 \pm 0.06 \times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียไปศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) จากรูปที่ 4.9 สังเกตเห็นแบคทีเรียอยู่ภายในซิลิกาตลอดการทดลอง



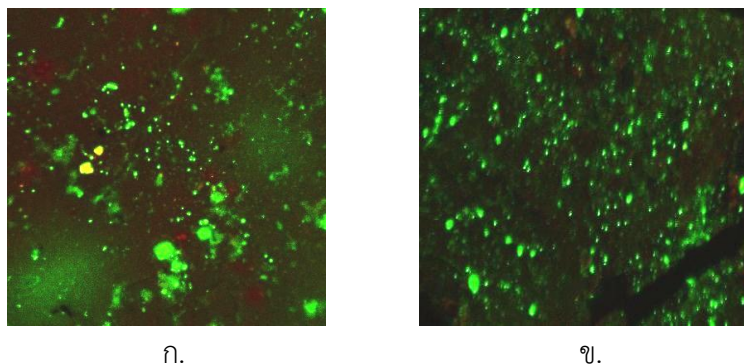
ก. 70 ชั่วโมง



ข. 450 ชั่วโมง

รูปที่ 4.9 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข) ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 5.0 ชั่วโมง

การตรวจติดตามการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของซิลิกาที่ผ่านการใช้งานในระบบการกรองชีวภาพที่เติมน้ำเสียจากโรงงาน A และโรงงาน B เป็นเวลา 70 และ 450 ชั่วโมง ตามลำดับ ทำโดยย้อมเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงโดยตรงด้วยสีย้อม FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit ซึ่งประกอบด้วย SYTO® 9 fluorescent stain และ propidium iodide fluorescent stain และส่องด้วยกล้อง CLSM ผลการทดลองแสดงให้เห็นการยึดเกาะของเซลล์และการมีชีวิตของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของวัสดุตรึง (ซิลิกา) โดยเซลล์สีเขียวที่ถูกย้อมติดสีด้วย SYTO® 9 fluorescent stain คือเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนเซลล์สีแดงที่ถูกย้อมติดสีด้วย propidium iodide fluorescent stain คือเซลล์ตาย ดังในรูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้เป็นเวลา 70 ชั่วโมง และ 450 ชั่วโมง พบแบคทีเรียที่มีชีวิตจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการบำบัดสารประกอบฟีนอลตลอดการทดลอง



ก.

ข.

รูปที่ 4.10 ภาพถ่ายการยัดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานในระบบการกรองชีวภาพเพื่อย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน A เป็นเวลา 70 ชั่วโมง (ก) และโรงงาน B เป็นเวลา 450 ชั่วโมง (ข) โดยกล้อง CLSM ที่กำลังขยาย 20 เท่า

นอกจากนี้จากการติดตามการยัดเกาะของเซลล์โดยสร้างไบโอฟิล์มและการมีชีวิตของแบคทีเรียด้วยกล้อง CLSM สามารถหาค่าการมีชีวิตของแบคทีเรียได้ โดยคำนวณหาค่าการมีชีวิตของแบคทีเรียด้วยโปรแกรม image J พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการใช้งานในระบบการกรองชีวภาพเพื่อย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน A เป็นเวลา 70 ชั่วโมง และโรงงาน B เป็นเวลา 450 ชั่วโมง มีค่าการมีชีวิตประมาณ 87.64% และ 90.65% ของจำนวนเซลล์ที่ถูกย้อมติดสีทั้งหมด ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ และสามารถนับจำนวนเซลล์ได้โดยตรงจากการส่องกล้อง CLSM ดังเช่นงานวิจัยของ Nopcharoenkul และคณะ (2013) ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ตรึงบน plastic pellets โดยใช้ CLSM พบว่าแบคทีเรียตรึงมีการรอดชีวิตประมาณ $60.09 \pm 6.57\%$ ซึ่งสัมพันธ์กับความเสถียรของไบโอฟิล์ม และเซลล์ตรึงยังคงประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำมันดีเซล และงานวิจัยของ Sivan และคณะ (2006) พบว่าหลังจาก 60 วัน ของการบำบัด *Rhodococcus ruber* ที่ถูกตรึงยังคงมีการรอดชีวิตสูงอยู่ในไบโอฟิล์ม และยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพอลิเอทิลีน

4.4.3.3 การเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ในการบำบัดน้ำเสียระหว่างโรงงาน A และ B (ตารางที่ 4.3) โดยพิจารณาจากคุณภาพของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดของโรงงาน A และโรงงาน B พบว่าระบบสามารถกำจัด COD ได้ประมาณ 32.6% และ 77.5% ตามลำดับ และสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ประมาณ 75.7% และ 70.5%

ตามลำดับ อย่างไรก็ตามทั้ง 2 ระบบ มีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลและสีได้เท่ากัน คือ 100% และ 10% ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระบบการกรองชีวภาพสามารถบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ ทั้งนี้ประสิทธิภาพของระบบอาจขึ้นอยู่กับคุณภาพของน้ำเสียที่เข้าสู่ระบบ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของระบบที่พัฒนาขึ้นสามารถบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทั้ง 2 แหล่ง ได้อย่างต่อเนื่อง และจากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบงานวิจัยใดบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุด้วยเซลล์ตรึง ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 คุณภาพของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดด้วยระบบการกรองชีวภาพที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

พารามิเตอร์	โรงงาน A จังหวัดสงขลา		โรงงาน B จังหวัดสตูล	
	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด
COD (mg/l)	846	570	890	200
TKN (mg/l)	154	ND	321	ND
Phenol (mg/l)*	6.8	0	10.7	0
Phenolic compounds (mg/l)**	26.7	6.5	112	33.1
Caffeic acid	11.5	6.5	43.2	31.6
Ferulic acid	0.9	0	24	1.5
3-HBA	0.4	0	14.9	0
4-HBA	0.3	0	4.1	0
Catechol	1.5	0	4.2	0
TP (mg/l)	24.4	ND	61.5	ND
Color (%)	100	90	100	90
Oil & grease (mg/l)	ND	ND	230	20

หมายเหตุ: ND หมายถึง Not Determined

*ฟีนอลวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

**สารประกอบฟีนอลวิเคราะห์ด้วย Folin-Ciocalteu reagent และ HPLC

ตารางที่ 4.4 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลโดยใช้ระบบการกรองชีวภาพแบบต่างๆ

ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดของน้ำเสีย	ชนิดของระบบการกรองชีวภาพ	เซลล์อิสระหรือเซลล์ตรึง	ระยะเวลากักเก็บน้ำ (ชม.)	ความเข้มข้นของสารมลพิษ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (%)	เอกสารอ้างอิง
<i>Pseudomonas putida</i>	Phenolic resins industrial wastewater	Fluidized-bed bioreactor (FBR)	เซลล์ตรึง	-	สารประกอบฟีนอล 1,000	>90	Gonzalez และคณะ (2001)
Activated sludge	Industrial oil refinery wastewater	Fixed-film bioreactor	เซลล์อิสระ	8	ฟีนอล 36 COD 900	100 85-90	Jou และ Huang (2003)
predominantly <i>Pseudomonas</i> sp.	Saline industrial wastewater	Submerged fixed-film reactor	เซลล์อิสระ	10-15	ฟีนอล 1,000 COD 30,000	100 96	Ramos และคณะ (2007)
	Industrial wastewater	Continuous stirred tank reactors (CSTR's)	เซลล์อิสระ	-	สารประกอบฟีนอล 10-500	>80	Abu-Reesh, (2010)
<i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1	Treated palm oil mill effluent (treated POME)	Internal loop airlift bioreactor	เซลล์ตรึง	5.0	สารประกอบฟีนอล 6.8-123	75-100	งานวิจัยนี้

4.4.4 การตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพในการบำบัดน้ำเสียจากบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายของโรงงาน A จังหวัดสงขลา และโรงงาน B จังหวัดสตูล

4.4.4.1 การตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี PCR

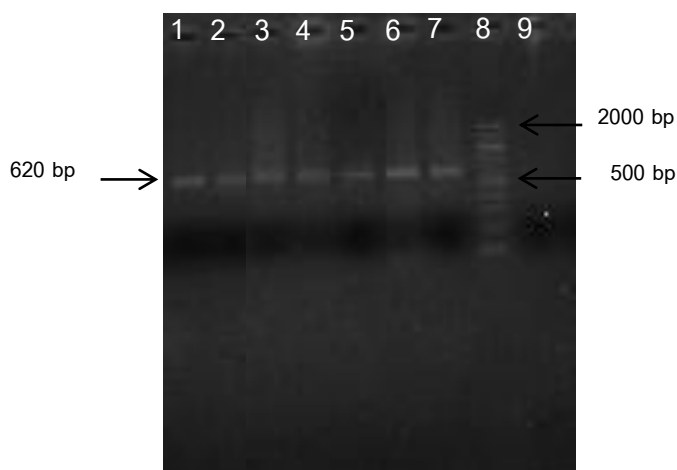
จากการตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียในซิลิกา น้ำเสียก่อนและหลังบำบัดในระบบการกรองชีวภาพ นำมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1401F และ 968R (Muangchinda และคณะ 2013) จากผลการทดลองพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 433 bp ในแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาและน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดสารประกอบฟีนอลในระบบการกรองชีวภาพ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในซิลิกาและแบคทีเรียดั้งเดิมในน้ำเสียสามารถปรับตัวในระหว่างการบำบัด ทำให้จำนวนแบคทีเรียในซิลิกาและแบคทีเรียดั้งเดิมในน้ำเสียเพิ่มขึ้นมากพอที่จะตรวจพบยีน 16S rRNA โดยวิธี PCR ดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 การมีอยู่ของยีน 16S rRNA ในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี PCR ช่องวิ่งที่ 1: marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 2: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในซิลิกาก่อนใช้งาน ช่องวิ่งที่ 3: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในซิลิกาหลังใช้งานของโรงงาน A ช่องวิ่งที่ 4: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในซิลิกาหลังใช้งานของโรงงาน B ช่องวิ่งที่ 5: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียก่อนบำบัดของโรงงาน A ช่องวิ่งที่ 6: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียก่อนบำบัดของโรงงาน B ช่องวิ่งที่ 7: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียหลังบำบัดของโรงงาน A ช่องวิ่งที่ 8: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียหลังบำบัดของโรงงาน B

ยีน *LmPH* มีหน้าที่ในการประมวลรหัสหน่วยย่อยของฟีนอลไฮดรอกซีเลสซึ่งเป็นเอนไซม์เริ่มต้นของวิถีการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียจากการตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน *LmPH* ด้วยวิธี PCR ในการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นยีนประมวลรหัสฟีนอลไฮดรอกซีเลสของเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ U1+U2+U3-F และ U-R (Basile และคณะ, 2010) จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอโคลนเข้าพลาสมิด และตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกแล้ว นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn ผลการศึกษาพบว่าชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 เป็นยีนประมวลรหัสฟีนอลไฮดรอกซีเลสจริง แสดงในภาคผนวก ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนประมวลรหัสฟีนอลไฮดรอกซีเลสในแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 ไปทดสอบกับแบคทีเรียในซลิกลาและในน้ำเสียต่อไป

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียในซลิกลาและน้ำเสียก่อนและหลังบำบัดด้วยระบบการกรองชีวภาพมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *LmPH* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซีเลสของแบคทีเรียโดยใช้คู่ไพรเมอร์ U1+U2+U3F และ UR (Basile และคณะ, 2010) พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 620 bp ในแบคทีเรียตรึงบนซลิกลาและน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพ ดังรูปที่ 4.12

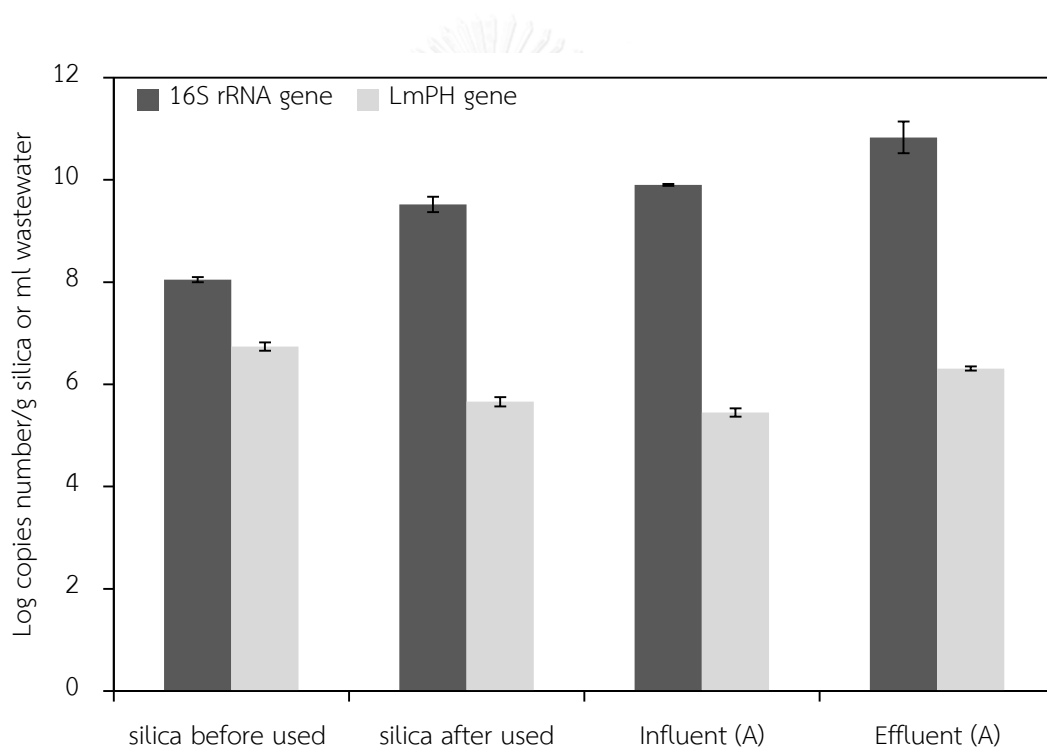


รูปที่ 4.12 การมีอยู่ของยีน *LmPH* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลสในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี PCR ช่องวิ่งที่ 1: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในชิลิกา ก่อนใช้งาน ช่องวิ่งที่ 2: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในชิลิกาหลังใช้งานของโรงงาน A ช่องวิ่งที่ 3: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในชิลิกาหลังใช้งานของโรงงาน B ช่องวิ่งที่ 4: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียก่อนบำบัดของโรงงาน A ช่องวิ่งที่ 5: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียหลังบำบัดของโรงงาน A ช่องวิ่งที่ 6: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียก่อนบำบัดของโรงงาน B ช่องวิ่งที่ 7: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียหลังบำบัดของโรงงาน B ช่องวิ่งที่ 8: marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 9: Negative

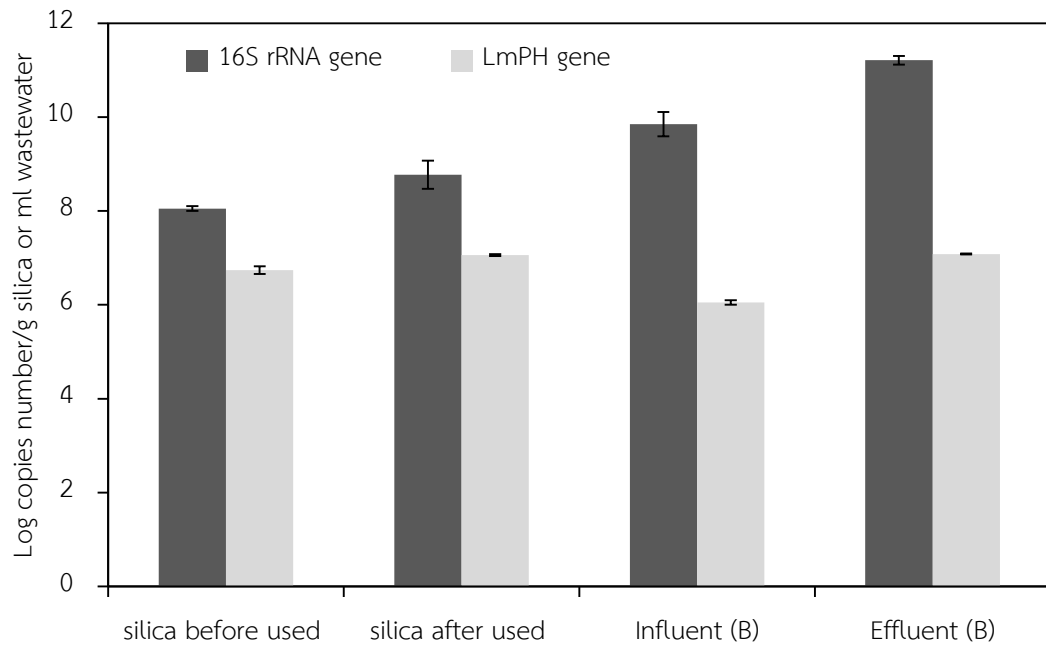
4.4.4.2 การตรวจนับจำนวนชุดของยีน 16S rRNA และยีน *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพด้วยเทคนิค Real-time qPCR เมื่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา และโรงงาน B จังหวัดสตูล

จากการตรวจนับจำนวนชุดของยีน 16S rRNA และยีน *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี Real-time qPCR โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากชิลิกาและน้ำเสียจากระบบการกรองชีวภาพก่อนและหลังการบำบัดสารประกอบฟีนอล แล้วนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1401F กับ 968R และไพรเมอร์ U1+U2+U3F กับ UR ตามลำดับ โดยนำค่า C_t ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณเป็นจำนวนแบคทีเรียจากผลการนับจำนวนชุดของยีน 16S rRNA และยีน *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพที่ใช้บำบัดน้ำเสียจากโรงงาน A และ B ด้วยวิธี Real-time qPCR พบว่าแบคทีเรียที่มียีน 16S rRNA ในแบคทีเรียตรึงบนชิลิกาและน้ำเสียจากระบบการกรองชีวภาพก่อนบำบัดมีจำนวนน้อยกว่าแบคทีเรียตรึงบนชิลิกาและน้ำเสียจากระบบการกรองชีวภาพหลังบำบัด ขณะที่จำนวนชุดของยีน *LmPH* ในแบคทีเรียตรึงบนชิลิกา ก่อนบำบัดของโรงงาน A มีจำนวนมากกว่าแบคทีเรียตรึงบนชิลิกาหลังบำบัด (รูปที่ 4.13ก) แต่โรงงาน B มีจำนวนชุดของยีน *LmPH* ในแบคทีเรียตรึงบนชิลิกาหลังบำบัดมากกว่าแบคทีเรียตรึงบนชิลิกา ก่อนบำบัด (รูปที่ 4.13ข) เมื่อพิจารณาจำนวนชุดของยีน *LmPH* ในน้ำเสียจากระบบการกรองชีวภาพก่อนบำบัดของโรงงาน A และ

B มีจำนวนน้อยกว่าน้ำเสียจากระบบการกรองชีวภาพหลังบำบัด ดังแสดงในรูปที่ 4.13ก และ ข ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียดั้งเดิมที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลที่อยู่ในซิลิกาและในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัด ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลโดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถอยู่รอดได้ในระบบการกรองชีวภาพตลอดระยะเวลาการทดลอง ทั้งนี้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกามีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียและมีการเจริญของแบคทีเรียต่ำกว่าแบคทีเรียอิสระ เนื่องจากแบคทีเรียตรึงมีพื้นที่ในการเพิ่มจำนวนค่อนข้างน้อย ทำให้มีปริมาณสลัดจ์ในระบบการกรองชีวภาพต่ำและไม่เพิ่มค่าซีไอดีของระบบ (Gonzalez และคณะ, 2001; Pazarlioglu และคณะ, 2005; Wu และคณะ, 2005; Liu และคณะ, 2009)



ก.



ข.

รูปที่ 4.13 การตรวจนับจำนวนชุดของยีน 16S rRNA และ *LmPH* ด้วยเทคนิค Real-time qPCR ในระบบการกรองชีวภาพเมื่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา (ก) และโรงงาน B จังหวัดสตูล (ข)

บทที่ 5

ประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นในการบำบัดสารประกอบฟีนอล ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ

5.1 บทนำ

น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ประกอบด้วย น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม และน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรในปัจจุบันโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีหลายแห่งนิยมนำระบบก๊าซชีวภาพมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียกันมากขึ้นจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม ก๊าซชีวภาพที่ได้สามารถเป็นแหล่งพลังงานทดแทนไปผลิตเป็นกระแสไฟฟ้าใช้ภายในโรงงานและจำหน่ายให้แก่การไฟฟ้าส่วนภูมิภาค (Ng และคณะ, 2012; Chin และคณะ, 2013) มีรายงานว่า สารประกอบฟีนอลสามารถยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทน (methanogen) และ สารประกอบกลุ่มนี้อาจดูดซับในภาคตะกอนของระบบก๊าซชีวภาพ ทำให้การย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพลดลง ซึ่งส่งผลต่อปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพโดยรวมและปริมาณก๊าซมีเทนที่ผลิตขึ้นซึ่งใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้นในการผลิต (Gharsallah และคณะ, 1999; Sayadi และคณะ, 2000; Fountoulakis และคณะ, 2002; Dhouib และคณะ, 2005; Martinez-Garcia และคณะ, 2007; Chen และคณะ, 2008; Hernandez และคณะ, 2008) ที่ผ่านมายังไม่มีงานวิจัยใด ที่ศึกษาผลกระทบของสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มต่อกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถสร้างก๊าซมีเทนและการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรด รวมทั้งปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพโดยรวม ซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม ในทางปฏิบัติโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังไม่มีเทคโนโลยีสำหรับการบำบัดสารประกอบฟีนอลเบื้องต้นก่อนนำน้ำเสียเข้าสู่ระบบก๊าซชีวภาพ ซึ่งสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการผลิตก๊าซชีวภาพหรือส่งผลให้ได้ปริมาณก๊าซชีวภาพค่อนข้างต่ำ

จากการศึกษาบทที่ 4 พบว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ตรึงบนซิลิกาที่พัฒนาขึ้นสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอล สี และซีไอดีในน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถใช้งานได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ดังนั้นในบทนี้จึงนำระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกามาใช้บำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลในปริมาณที่สูงกว่าน้ำเสียจากบ่อปรับเสถียรมาก หลังจากนั้นนำน้ำเสียที่

ผ่านการบำบัดไปผลิตก๊าซชีวภาพ เพื่อยืนยันว่าการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียก่อนนำเข้าสู่ระบบผลิตก๊าซชีวภาพสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพได้ ทั้งนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาทั้งในระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทช์ และในระบบการกรองชีวภาพโดยใช้ตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 2 แห่ง ในจังหวัดสตูล และจังหวัดสุราษฎร์ธานีแล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพระหว่างน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดกับน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล ในระหว่างการทดลองยังได้ตรวจติดตามและตรวจนับจำนวนชุดของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลสในระบบการกรองชีวภาพและยีน methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพ ซึ่งยีน *mcrA* เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซมีเทนในกลุ่มจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตก๊าซมีเทนที่พบในสิ่งแวดล้อมได้ (Hallam และคณะ, 2003) เพื่อยืนยันการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบโดยผลการศึกษาในงานวิจัยนี้สามารถเป็นอีกช่องทางหนึ่งที่จะช่วยในการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม ซึ่งช่วยเพิ่มรายได้และมูลค่าให้แก่บริษัท

5.2 ขั้นตอนงานวิจัย

5.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

5.2.1.1 น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน B จังหวัดสตูล โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบแบทช์

5.2.1.2 น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor

5.2.1.3 การตรวจติดตามยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพ

5.2.2 การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

5.2.2.1 การคัดเลือกหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกสำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพ

5.2.2.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนด้วยวิธีการทดสอบ Specific Methanogenic Activity (SMA)

5.2.2.1.2 การตรวจติดตามยีน *mcrA* ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซชีวภาพ

5.2.2.2 การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน B จังหวัดสตูลและโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี

5.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

5.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

5.3.1.1 น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน B จังหวัดสตูลโดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบแบบแบทช์

นำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 25 กรัม เติมลงในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองแต่ละชุดทั้งหมด 3 ชุด และมีชุดควบคุม เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของสารประกอบฟีนอล ประกอบด้วยน้ำเสีย สารประกอบฟีนอล และซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล และจำนวนแบคทีเรียในระบบ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอล หลังจากนั้นนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลไปศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยเปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล ตามวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 5.3.2.2

5.3.1.2 น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor

เมื่อทราบปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพแล้ว ผู้วิจัยจึงเลือกภาวะที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบฟีนอลได้สูงที่สุดจากการทดลองข้อ 4.3.3 โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3.3 เพื่อหาอายุการใช้งานของระบบการกรองชีวภาพ โดยใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลอย่างน้อย 1 แห่ง ทำการทดลองเป็นระยะเวลาประมาณ 4 เดือน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล ค่าซีโอดี และจำนวนแบคทีเรียในระบบ ตรวจสอบจำนวนชุดของยีนประมวลรหัสฟีนอลไฮดรอกซิเลสด้วยวิธี Real-time qPCR และติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรและการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียบนซิลิกาด้วย Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 5.3.5 เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประเมินระยะเวลาที่แบคทีเรียตรึงบนซิลิกายังคงมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอล หลังจากนั้นนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลไปศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยเปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล ตามวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 5.3.2.2

5.3.1.3 การตรวจติดตามยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพ

5.3.1.3.1 การตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพ

สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PK1 และ *Methylobacterium* sp. NP3 ในซิลิกาและแบคทีเรียในน้ำเสียด้วย Fast DNA spin kit (BIO 101 kit, Qbiogene, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอตรวจหายีนประมวลรหัส 16S rRNA ด้วยวิธีวิเคราะห์ข้อ 4.3.4.1.1

การตรวจหายีนประมวลรหัส Largest subunit of multicomponent phenol hydroxylase (*LmPH*) ด้วยวิธีวิเคราะห์ข้อ 4.3.4.1.2

5.3.1.3.2 การตรวจนับจำนวนชุดของยีนประมวลรหัส 16S rRNA และ *LmPH* ด้วยเทคนิค Real-time qPCR

นำแบคทีเรียตรงบนซิลิกาและน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดที่เวลาต่างๆ จากการเก็บตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วย Fast DNA spin kit (BIO 101 kit, Qbiogene, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากนั้นตรวจนับจำนวนชุดของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Real-time qPCR ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 4.3.4.2

5.3.2 การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

5.3.2.1 การคัดเลือกหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกสำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพ

5.3.2.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนด้วยวิธีการทดสอบ

Specific Methanogenic Activity (SMA)

ทดสอบความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซมีเทนเพื่อหาหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพและ/หรือก๊าซมีเทน โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตะกอนจุลินทรีย์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 2 แห่ง คือ โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในอำเภอพุนพิน และอำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ทั้งนี้ใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มจากโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานีที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลเบื้องต้นด้วยแบคทีเรียตรงบนซิลิกา และน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนเมื่อใช้ตะกอนจุลินทรีย์ต่างแหล่งกันโดยนำตัวอย่างน้ำเสียมาวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์เบื้องต้น ประกอบด้วย alkalinity, MLSS, MLVSS, VFA, sCOD, และ COD ก่อนที่จะนำไปใช้การผลิตก๊าซมีเทนตามวิธีข้อ 5.3.2.2 จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 81 วันและวิเคราะห์ปริมาณก๊าซชีวภาพ รวมทั้งนำก๊าซชีวภาพไปวิเคราะห์หาปริมาณสัดส่วนของก๊าซมีเทนในก๊าซชีวภาพทั้งหมดด้วยเครื่องวิเคราะห์ห้องค์ประกอบก๊าซ (Gas chromatography) โดยมีการคำนวณหาค่า

ความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์ (SMA) ตามวิธีของ Sun และคณะ (2012) ดังสมการดังต่อไปนี้

$$\text{SMA} = \text{Slope} / \text{biomass}$$

เมื่อ Slope = ค่าความชันสูงสุดของเส้นกราฟ

Biomass = ปริมาณตะกอนชีวภาพในระบบ (gVSS)

สำหรับชุดควบคุม: ใช้น้ำประปา ตะกอนจุลินทรีย์ และโซเดียมไบคาร์บอเนต ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 80 มิลลิลิตร

5.3.2.1.2 การตรวจติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซชีวภาพ

5.3.2.1.2.1 การตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน *mcrA* ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพ

ด้วยวิธี PCR

สกัดดีเอ็นเอด้วย Fast DNA spin kit (BIO 101 kit, Qbiogene, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ จากตะกอนแบคทีเรียและน้ำเสียในระบบผลิตก๊าซชีวภาพในวันที่ 0, 7 และ 14 ซึ่งในช่วง 14 วันแรก ระบบสามารถผลิตก๊าซมีเทนได้อย่างรวดเร็ว และจะเริ่มผลิตได้คงที่หลังจากวันที่ 14 แล้ว นำดีเอ็นเอที่สกัดไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอตรวจหายีนประมวลรหัส methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Hallam และคณะ (2003) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *mcrA* forward กับ *mcrA* reverse ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าแบคทีเรียในระบบผลิตก๊าซชีวภาพน่าจะมียีน *mcrA* โดยใช้ชุด Go-Taq® Green Master Mix (Promega, USA) สำหรับทำ PCR ซึ่งเติม reaction mixtures ในหลอด PCR ที่วางอยู่ในน้ำแข็งดังนี้

Go-Taq® Green Master Mix, 2X	15	μL
ไพรเมอร์ <i>mcrA</i> F (20 พิโคโมล)	1	μL
ไพรเมอร์ <i>mcrA</i> R (20 พิโคโมล)	1	μL
DNA-template (25 ng)	4	μL
Nuclease-Free Water	9	μL

รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 30 μL ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 95 °ซ เวลา 5 นาที	} 25 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 95 °ซ เวลา 1 นาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 55 °ซ เวลา 1 นาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72 °ซ เวลา 1 นาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 °ซ เวลา 10 นาที	

ตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

5.3.2.1.2.2 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ในระบบผลิตก๊าซ

ชีวภาพด้วยเทคนิค Real-time qPCR

นำตะกอนแบคทีเรียและน้ำเสียจากระบบผลิตก๊าซชีวภาพมาสกัดดีเอ็นเอด้วย Fast DNA spin kit (BIO 101 kit, Qbiogene, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากนั้นตรวจนับจำนวนชุดของยีนประมวลรหัส methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) ด้วยเทคนิค Real-time qPCR โดยใช้ SYBR Green ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Hallam และคณะ (2003) อุปกรณ์สำหรับ real-time PCR ประกอบด้วย MJ Mini Thermal Cycler, Mini Opticon Real-Time PCR detector (Bio-Rad Laboratories Inc.) ด้วยโปรแกรม MJ Opticon Monitor Analysis Software version 3.1 (Bio-Rad Laboratories Inc.) โดยใช้ชุดทดสอบ 1X Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences, Hanover, MD, USA) และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 94 °ซ เวลา 3 นาที	} 36 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 94 °ซ เวลา 40 วินาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 55 °ซ เวลา 1.5 นาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72 °ซ เวลา 2 นาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 °ซ เวลา 10 นาที	

และวิเคราะห์ melting curve สำหรับกราฟมาตรฐานสร้างโดยใช้พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัส methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) ที่ถูกเจือจางที่จำนวนชุดยีนระดับต่างๆ

5.3.2.2 การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

นำน้ำเสียจากระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลเบื้องต้นด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา มาวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์เบื้องต้น ประกอบด้วย alkalinity, MLSS,

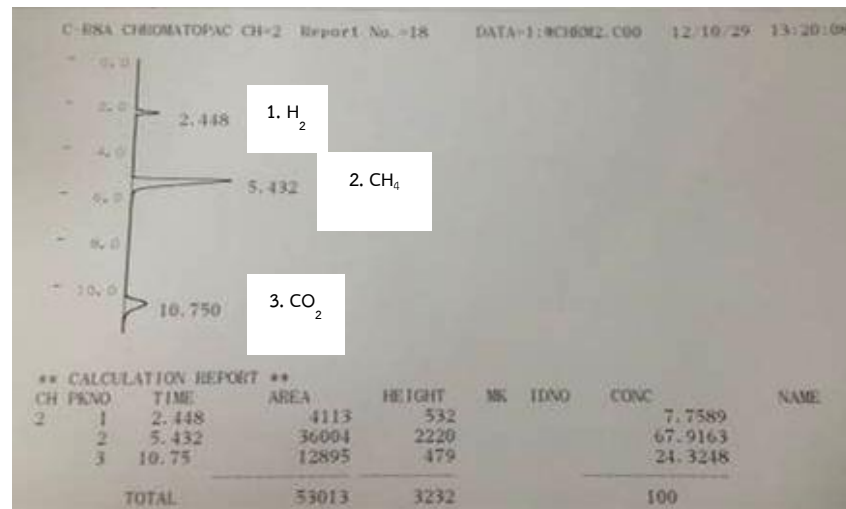
MLVSS, VFA, sCOD และ COD ในการหาค่าคุณภาพการผลิตก๊าซมีเทนเริ่มจากนำตะกอนจุลินทรีย์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซีรัม หลังจากนั้นเติมน้ำเสียจริงที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล 60 มิลลิลิตร (รูปที่ 5.1) โดยเปรียบเทียบกับน้ำเสียจริงที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลและเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.24 กรัม เพื่อควบคุมค่าพีเอชในระบบให้เป็นกลาง สุดท้ายปรับพีเอชให้มีค่าประมาณ 7.0 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl นำขวดซีรัมไปใส่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 1 นาที แล้วปิดฝาขวดซีรัมทันที นำขวดซีรัมตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าขวดซีรัมทุกวันเพื่อควบคุมระหว่างจุลินทรีย์และของเหลว จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 81 วัน และวิเคราะห์ปริมาณก๊าซชีวภาพด้วยหลักการแทนที่น้ำ (รูปที่ 5.2), pH, COD, MLSS, และ MLVSS รวมทั้งนำก๊าซชีวภาพไปวิเคราะห์หาปริมาณสัดส่วนของก๊าซมีเทนในก๊าซชีวภาพทั้งหมดด้วยเครื่องวิเคราะห์ห้องค์ประกอบก๊าซ (Gas chromatography) (รูปที่ 5.3)



รูปที่ 5.1 ลักษณะระบบผลิตก๊าซชีวภาพแบบขวดซีรัมประกอบด้วย น้ำเสีย ตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกและโซเดียมไบคาร์บอเนต ที่มีการใส่ก๊าซออกซิเจนออกจนหมดและปิดขวดจนสนิท



รูปที่ 5.2 การเก็บปริมาณก๊าซชีวภาพด้วยวิธีการแทนที่น้ำ



รูปที่ 5.3 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณสัดส่วนของก๊าซมีเทนในก๊าซชีวภาพทั้งหมด ด้วยเครื่องวิเคราะห์ห้องค์ประกอบก๊าซ (Gas chromatography)

โดยมีการคำนวณหาค่าศักยภาพการผลิตก๊าซมีเทน (Biochemical Methane Potential; BMP) ตามวิธีของ Moody และคณะ (2009) ดังสมการดังต่อไปนี้

$$\text{BMP (mLCH}_4\text{/gCOD)} = x / \text{gCOD}$$

เมื่อ BMP = ศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนของของเสีย (มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมชีโอดีทั้งหมด)

x = ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมสูงสุด (มิลลิลิตรมีเทน)

gCOD = ชีโอดีเริ่มต้นของของเสีย (กรัมชีโอดีทั้งหมด)

สำหรับชุดควบคุม: ใช้น้ำประปา ตะกอนจุลินทรีย์ และโซเดียมไบคาร์บอเนต ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 80 มิลลิลิตร

และการทำนายปริมาณก๊าซมีเทนโดยแบบจำลอง Gompertz

แบบจำลอง Gompertz เป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อทำนายอัตราการผลิตก๊าซมีเทน การใช้สารตั้งต้น และการเจริญของจุลินทรีย์ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพ ซึ่งผู้วิจัยดัดแปลงแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Gompertz model ตามวิธีของ Patil และคณะ (2012) ดังสมการดังต่อไปนี้

$$M = P \times \exp\left\{-\exp\left[\frac{Rm \times e}{P}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$$

เมื่อ	M	= ปริมาณก๊าซมีเทนสะสม (มิลลิลิตร),
	R_m	= อัตราการผลิตก๊าซมีเทนสูงสุด (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง),
	P	= ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมสูงสุด (มิลลิลิตร),
	λ	= Lag time (ชั่วโมง)
	t	= เวลาการบ่มระบบผลิตก๊าซชีวภาพ (ชั่วโมง)
	ค่าคงที่ e	= 2.71828

5.3.3 วิธีวิเคราะห์

5.3.3.1 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มในจังหวัดสงขลา และสตูล แล้วนำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียโดยใช้วิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย (APHA, AWWA and WEF, 2005) เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ต่อไปนี้ pH, alkalinity, MLSS, MLVSS, VFA, sCOD, และ COD พร้อมทั้งวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียตามวิธีในข้อ 5.3.5.2

5.3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.3.5.2

5.3.3.3 การวัดปริมาณแบคทีเรียใช้วิธี Dilution plate count ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.3.5.5

5.3.3.4 การวิเคราะห์การเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิววัสดุจริง ด้วยกล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.3.5.6

5.3.3.5 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรของแบคทีเรียบนซิลิการะหว่างการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียด้วย Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 4.3.5.6

5.4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

5.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

5.4.1.1 น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน B จังหวัดสตูล โดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบแบบแบทช์

ในการศึกษาเบื้องต้นผู้วิจัยได้วิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม โดยพิจารณาที่ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลและ COD พบว่าในน้ำเสียมีสารประกอบฟีนอลประมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณ COD ค่อนข้างสูง (ตารางที่ 5.1) ซึ่งอาจจะส่งผลต่อ

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาตั้งนั้นในการทดลองส่วนนี้จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลระหว่างน้ำเสียที่กรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกเอาตะกอนของแข็งออกกับน้ำเสียที่ไม่ผ่านการกรอง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดและลดความเป็นพิษต่อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา ในการทดลองนี้ใช้ปริมาณแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 250 กรัมต่อลิตร เพราะเป็นปริมาณแบคทีเรียตรึงที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด และปรับ pH ให้เป็นกลาง เนื่องจากเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย โดยเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล pH และ COD ผลการทดลองพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียที่กรองผ่านผ้าขาวบาง และไม่ผ่านการกรองได้ประมาณ 59.27% และ 36.90% ตามลำดับ (ดังรูปที่ 5.4 และ 5.5) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเมื่อใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายในบทที่ 4 ซึ่งสามารถบำบัดสารประกอบฟีนอลได้ 73.02% แสดงให้เห็นว่าน้ำเสียจากกระบวนการผลิตมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา ส่งผลให้ประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลลดลง ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียที่อยู่รอดในแบคทีเรียตรึงและน้ำเสียจริง พบว่ามีแบคทีเรียอยู่ในระบบตลอดการทดลอง และมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทั้งระบบประมาณ $1.61 \pm 0.11 \times 10^9$ CFU ต่อชุดทดลอง ในชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียในซิลิกาประมาณ $4.00 \pm 1.00 \times 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา และมีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย $9.00 \pm 2.00 \times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อบำบัดฟีนอลผ่านไป 7 วัน มีจำนวนแบคทีเรียในซิลิกาเพิ่มขึ้นเป็น $4.03 \pm 1.53 \times 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา และมีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย $1.30 \pm 0.20 \times 10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร ขณะที่จำนวนแบคทีเรียในระบบบำบัดแบบแบทซ์ในบทที่ 4 เมื่อใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายและมีการเติมฟีนอลเพิ่มที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระบบเป็น $9.00 \times 10^8 - 1.67 \times 10^9$ CFU ต่อชุดทดลอง และจากงานวิจัยของ Khongkhaem และคณะ (2011) พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนเป็น $9.00 \times 10^8 - 1.67 \times 10^9$ CFU ต่อชุดทดลอง เมื่อใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่เติมฟีนอลความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาด้วยระบบทดลองขนาดเล็กแบบแบทซ์จะถูกนำไปใช้สำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพในขั้นตอนต่อไป โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพกับน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล

จากการบำบัดสารประกอบฟีนอลโดยใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน B จังหวัดสตูลด้วยระบบแบทซ์ ทำให้ทราบว่า การบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบแบทซ์มีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อเปรียบเทียบกับกรใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้าย เนื่องจากน้ำเสียดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียตรึง ส่งผลให้แบคทีเรียต้องใช้เวลาในการปรับตัว จึงทำให้ระบบใช้เวลานานในการบำบัด ดังนั้นในการทดลองชั้น

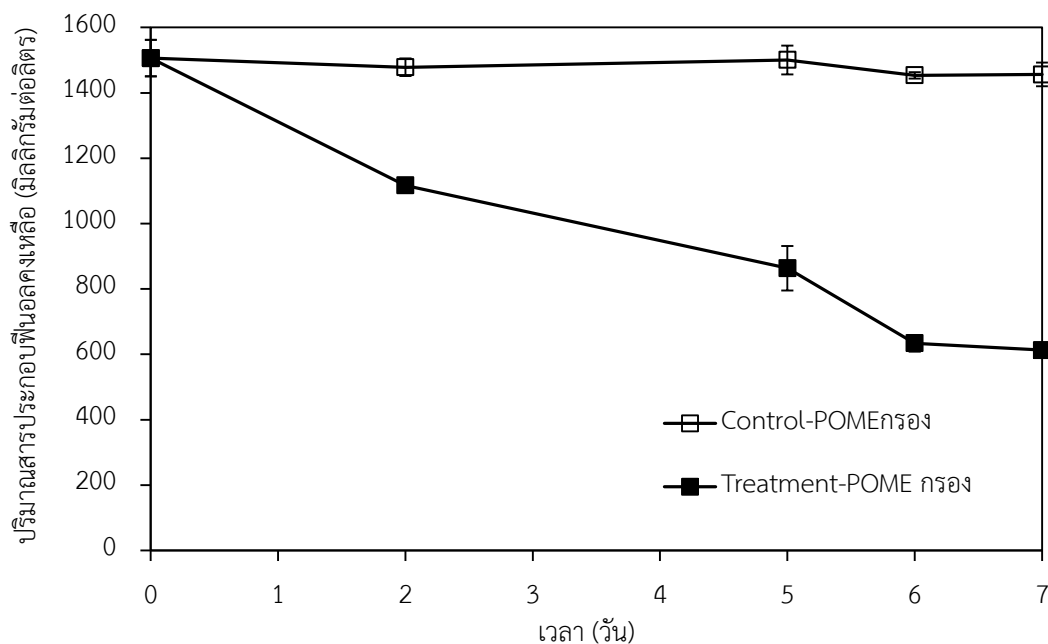
ต่อไปจะบำบัดน้ำเสียในระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor โดยจะเปลี่ยนแหล่งน้ำเสียเป็นโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งเป็นโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มขนาดใหญ่ มีกำลังการผลิตต่อวันสูง และที่สำคัญคือโรงงานนี้มีการผลิตน้ำมันปาล์มตลอดทั้งปีจึงมีน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มตลอดทั้งปี สะดวกในการขอความอนุเคราะห์น้ำเสียและการขนส่งน้ำเสียมาใช้ในการทดลอง อย่างไรก็ตาม อาจจะต้องเจือจางน้ำเสียให้มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลและค่าซีโอดีต่ำลง และอาจจะต้องกรองเอาน้ำมัน ไขมันและของแข็งบางส่วนในน้ำเสียออก เพื่อลดปัญหาการหมุนวนของแบคทีเรียตรึงและลดการเกิดภาวะ shock load ภายในระบบการกรองชีวภาพ

ตารางที่ 5.1 ลักษณะของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม B จังหวัดสตูล

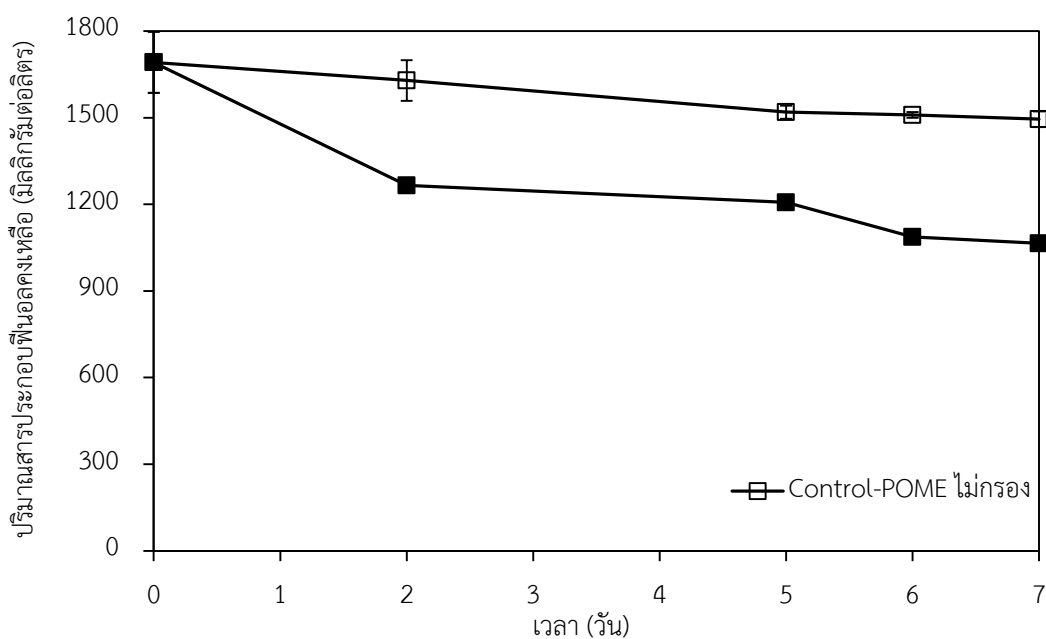
พารามิเตอร์	น้ำเสียที่ยังไม่ผ่านการบำบัด*
pH	4.02
Phenolic compounds (mg/L)*	1,500-1,700
COD (mg/L)	81,233
sCOD (mg/L)	35,067
MLSS (mg/L)	46,700
MLVSS (mg/L)	42,200
MLVSS/MLSS	0.90
VFA (mg CaCO ₃ /L)	1,269
Alkalinity (mg CaCO ₃ /L)	4,130

หมายเหตุ: *เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในวันที่ 12 มีนาคม 2555

*สารประกอบฟีนอลวิเคราะห์ด้วย Folin-Ciocalteu reagent

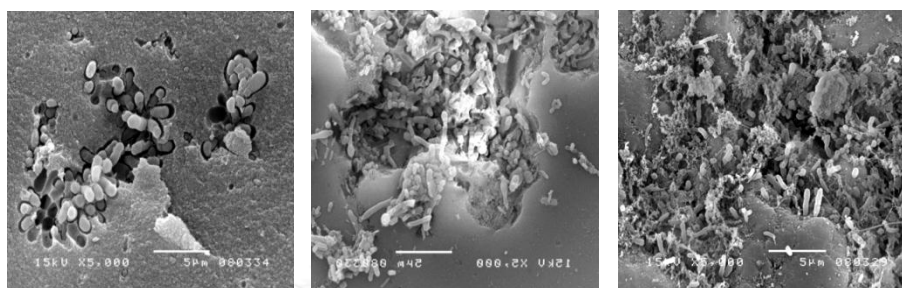


รูปที่ 5.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลที่เหลืออยู่ในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มจากโรงงาน B ที่ผ่านการกรองในชุดที่เติมซิลิกาที่มีแบคทีเรียตรึง 25 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ประกอบด้วย น้ำเสียและซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรียตรึง



รูปที่ 5.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลที่เหลืออยู่ในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มจากโรงงาน B ที่ไม่ผ่านการกรองในชุดที่เติมซิลิกาที่มีแบคทีเรียตรึง 25 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ประกอบด้วย น้ำเสียและซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรียตรึง

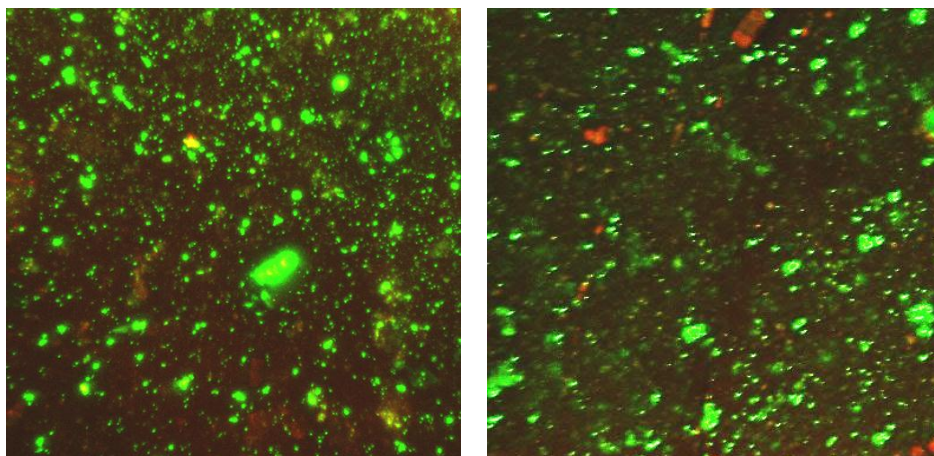
เมื่อนำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียไปศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) จากรูปที่ 5.6 (ก) ด้านในซิลิกาเมื่อใช้บำบัดเป็นเวลา 7 วัน (ข) ด้านนอกซิลิกาเมื่อใช้บำบัดน้ำเสียที่ผ่านการกรองเป็นเวลา 7 วัน และ (ค) ด้านนอกซิลิกาเมื่อใช้บำบัดน้ำเสียที่ไม่ผ่านการกรองเป็นเวลา 7 วัน สังเกตเห็นแบคทีเรียอยู่ภายในซิลิกา และมีแบคทีเรียดั้งเดิมจากน้ำเสียตลอดการทดลอง



ก. ด้านในซิลิกา
(น้ำเสียที่ผ่านการกรอง) ข. ด้านนอกซิลิกา
(น้ำเสียที่ไม่ผ่านการกรอง) ค. ด้านนอกซิลิกา

รูปที่ 5.6 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มจากโรงงาน B จังหวัดสตูล

การตรวจติดตามการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้งานในระบบการกรองชีวภาพเพื่อย่อยสลายน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของโรงงาน B เป็นเวลา 7 วันด้วยกล้อง CLSM โดยการย้อมเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงโดยตรงด้วยสีย้อม FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit ซึ่งประกอบด้วย SYTO® 9 fluorescent stain และ propidium iodide fluorescent stain และส่องด้วยกล้อง CLSM แสดงให้เห็นการยึดเกาะของเซลล์และการมีชีวิตของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของวัสดุตรึง (ซิลิกา) โดยเซลล์สีเขียวที่ถูกย้อมติดสีด้วย SYTO® 9 fluorescent stain คือเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนเซลล์สีแดงที่ถูกย้อมติดสีด้วย propidium iodide fluorescent stain คือเซลล์ตาย ดังแสดงในรูปที่ 5.7 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้บำบัดน้ำเสียที่ผ่านการกรอง (ก) และไม่ผ่านการกรอง (ข) เป็นเวลา 7 วัน ตรวจพบแบคทีเรียที่มีชีวิตจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการบำบัดสารประกอบฟีนอลตลอดการทดลอง



ก.

ข.

รูปที่ 5.7 การยัดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของเซลล์ตรึงที่ผ่านการใช้บำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการกรอง (ก) และไม่ผ่านการกรอง (ข) เป็นเวลา 7 วัน โดยกล้อง CLSM ที่กำลังขยาย 20 เท่า

นอกจากนี้จากการติดตามการยัดเกาะของเซลล์และการมีชีวิตของแบคทีเรียด้วยกล้อง CLSM สามารถหาค่าการมีชีวิตของแบคทีเรียได้ โดยคำนวณหาค่าการมีชีวิตของแบคทีเรียด้วยโปรแกรม image J พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการกรองและไม่ผ่านการกรองมีค่าการมีชีวิตประมาณ 87.79% และ 89.40% ของจำนวนเซลล์ที่ถูกย้อมติดสีทั้งหมดตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5.7 ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วแม่นยำโดยไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการและสามารถนับจำนวนเซลล์ได้โดยตรงจากการส่องกล้อง CLSM

5.4.1.2 น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor

การศึกษาเบื้องต้นได้ทดสอบหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตของโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่าในน้ำเสียมีสารประกอบฟีนอลมากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า COD ประมาณ 57,300 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5.2) และจากการทดลองข้อ 5.4.4.1 แสดงให้เห็นว่าน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มมีความเป็นพิษ ทำให้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาใช้เวลานานในการปรับตัวภายในระบบ ดังนั้นเพื่อลดความเป็นพิษของน้ำเสียต่อแบคทีเรียในระบบจึงเจือจางน้ำเสีย 4 เท่า และเพิ่มระยะเวลาพักเก็บน้ำเป็น 24 ชั่วโมงเพื่อให้ น้ำเสียอยู่ในระบบการกรองชีวภาพนานขึ้น ซึ่งจะช่วยให้ระบบบำบัดสารประกอบฟีนอลได้สูงขึ้น แต่ยังคงใช้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเท่าเดิมคือ 25 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5.8) และปรับ pH ของน้ำ

เสียให้เป็นกลางเพื่อให้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถรอดชีวิต และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลของระบบการกรองชีวภาพ ผลการทดลองพบว่าเมื่อเข้าสู่ระยะ steady state แบคทีเรียตรึงบนซิลิกามีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอล 71.1 % (รูปที่ 5.9) และสามารถลดปริมาณ COD จากความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือประมาณ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 5.10) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มกับน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายในบทที่ 4 ด้วยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor พบว่าอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มและน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายเป็น 8.00 และ 17.92 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 5.3) ซึ่งการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มทำให้ระบบการกรองชีวภาพมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลลดลงประมาณ 2.24 เท่า ของน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้าย แสดงให้เห็นว่าน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มแม้จะเจือจางแล้ว ก็ยังคงมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียตรึง จึงส่งผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอล แต่เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ดังตารางที่ 5.3 พบว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจริงได้ใกล้เคียงกับระบบการกรองชีวภาพแบบเดียวกันและชนิดอื่นๆ ซึ่งบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์จึงสรุปได้ว่าระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอล และสามารถลดปริมาณ COD ได้

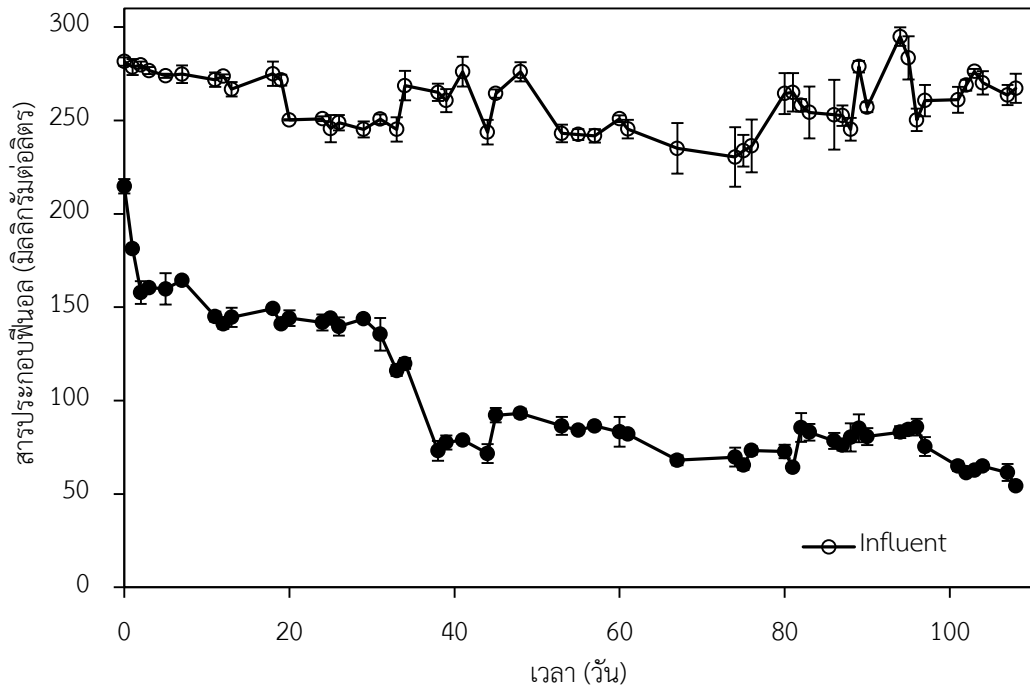
ตารางที่ 5.2 ลักษณะของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มจังหวัดสุราษฎร์ธานี

พารามิเตอร์	น้ำเสียจากกระบวนการผลิตที่ไม่เจือจาง	น้ำเสียจากกระบวนการผลิตที่เจือจาง 4 เท่า
pH	4.95	7.63
Phenolic compounds (mg/L)*	1,000	270
COD (mg/L)	57,300	15,300
sCOD (mg/L)	21,147	3,700
MLSS (mg/L)	18,800	3,400
MLVSS (mg/L)	18,000	3,000
MLVSS/MLSS	0.96	0.88
VFA (mg CaCO ₃ /L)	3,055	353
Alkalinity (mg CaCO ₃ /L)	61,950	16,220

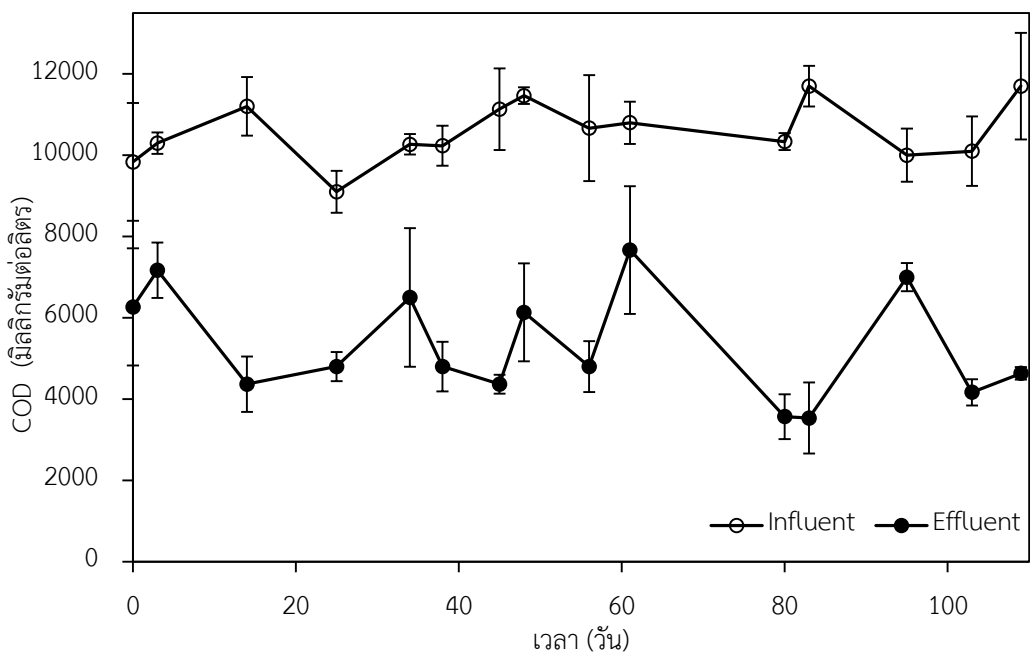
หมายเหตุ: *สารประกอบฟีนอลวิเคราะห์ด้วย Folin-Ciocalteu reagent



รูปที่ 5.8 ระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา 25 กรัมต่อลิตรและน้ำเสียเจือจาง 4 เท่า จากกระบวนการผลิตของโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี

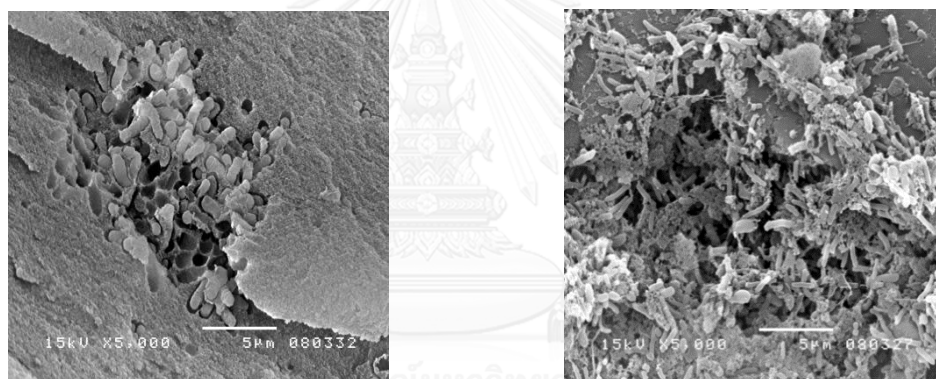


รูปที่ 5.9 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้ย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียเจือจาง 4 เท่า จากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 24 ชั่วโมง



รูปที่ 5.10 ปริมาณซีโอดีที่เหลืออยู่เมื่อสารประกอบฟีนอลถูกย่อยสลายด้วยแบคทีเรียตรึงในระบบการกรองชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียเจือจาง 4 เท่า จากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 24 ชั่วโมง

สำหรับการศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่อยู่รอดในแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาและน้ำเสียจริง พบว่ามีแบคทีเรียอยู่ในระบบตลอดการทดลอง และมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทั้งระบบประมาณ $1.04 \pm 0.27 \times 10^{11}$ CFU ต่อชุดทดลอง ในชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลในซิลิกาประมาณ $4.67 \pm 0.58 \times 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา และมีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสีย $8.67 \pm 2.08 \times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อบำบัดสารประกอบฟีนอลผ่านไป 4 เดือน มีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลในซิลิกาเพิ่มขึ้นเป็น $1.30 \pm 0.36 \times 10^9$ CFU ต่อกรัมซิลิกา และมีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียเป็น $2.00 \pm 0.26 \times 10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียไปศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope จากรูปที่ 5.11 (ก) ด้านในซิลิกาเมื่อใช้บำบัดเป็นเวลา 4 เดือนและ (ข) ด้านนอกซิลิกาเมื่อใช้บำบัดเป็นเวลา 4 เดือน สังเกตเห็นแบคทีเรียอยู่ภายในซิลิกาและมีแบคทีเรียดังเดิมจากน้ำเสียตลอดการทดลอง



ก. ด้านในซิลิกาเมื่อใช้บำบัดเป็นเวลา 4 เดือน ข. ด้านนอกซิลิกาเมื่อใช้บำบัดเป็นเวลา 4 เดือน

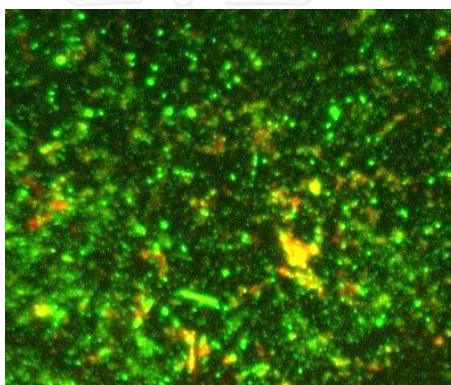
รูปที่ 5.11 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียเจือจาง 4 เท่า จากกระบวนการผลิตของโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี (ก) ด้านในซิลิกาเมื่อใช้บำบัดเป็นเวลา 4 เดือน (ข) ด้านนอกซิลิกาเมื่อใช้บำบัดเป็นเวลา 4 เดือน

ตารางที่ 5.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลของระบบขวดเขย่าแบบ
แบบพีและระบบการกรองชีวภาพ

ชนิดแบคทีเรียที่ถูก ตรึงบนซิลิกา	ชนิดของ ระบบ บำบัด	ชนิดของ น้ำเสีย	ความเข้มข้น สารประกอบ ฟีนอล (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ประสิทธิ ภาพ การย่อย สลาย สาร ประกอบ ฟีนอล (%)	อัตราการ ย่อยสลาย สารประกอบ ฟีนอล (มิลลิกรัมต่อ ลิตรต่อ ชั่วโมง)	เอกสาร อ้างอิง
ตรึงตะกอนจุลินทรีย์ ในซิลิกา (SG)	Packed- bed reactor และ Fluidized- bed reactor	น้ำเสีย สังเคราะห์	350	100	14.58	Branyik และ Kuncova (2000)
<i>Achromobacter</i> sp. ตรึงบน honeycomb-like ceramic	Internal loop Airlift Bioreactor	น้ำเสีย สังเคราะห์	2,4 dichlorophenol 100-400	94-99	2-10	Quan และคณะ (2003)
<i>Achromobacter</i> sp. ตรึงบน honeycomb-like ceramic	Internal loop Airlift Bioreactor	น้ำเสีย สังเคราะห์	ฟีนอล 200 และ 2,4 dichlorophenol 10	98-100	1.25-25	Quan และคณะ (2004)
<i>Pseudomonas</i> <i>stutzeri</i> OX1 ตรึง บน silica sand, alumina, porous alumina, tuff และ activated carbon	Airlift bioreactor	น้ำเสีย สังเคราะห์	ฟีนอล 200-450	90	36-81	Viggiani และคณะ (2006)
ตะกอนจุลินทรีย์ตรึง บน Liapor clay beads	Fixed bed reactor	น้ำเสีย สังเคราะห์	400-10,400	30-100	2.78-21.67	Bajaj และคณะ (2009)

ชนิดแบคทีเรียที่ถูก ตรึงบนซิลิกา	ชนิดของ ระบบ บำบัด	ชนิดของ น้ำเสีย	ความเข้มข้น สารประกอบ ฟีนอล (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ประสิทธิ ภาพ การย่อย สลาย สาร ประกอบ ฟีนอล (%)	อัตราการ ย่อยสลาย สารประกอบ ฟีนอล (มิลลิกรัมต่อ ลิตรต่อ ชั่วโมง)	เอกสาร อ้างอิง
แบคทีเรียตรึงบน rubber foam	Bed Biofilm Reactor (MBBR)	น้ำเสีย สังเคราะห์	200-400	60-75		Nikhitha และ Shibu (2009)
<i>Acinetobacter</i> sp. PK1 และ <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 ตรึงบนซิลิกา	ระบบขวด เขย่าแบบ แบทช์	น้ำเสียจาก กระบวนการ ผลิตน้ำมัน ปาล์ม	1,050	65.9	4.12	งานวิจัยนี้
<i>Acinetobacter</i> sp. PK1 และ <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 ตรึงบนซิลิกา	Internal loop Airlift Bioreactor	น้ำเสียเจือ จาง 4 เท่า จาก กระบวนการ การผลิต น้ำมันปาล์ม	270	71.1	8.00	งานวิจัยนี้

การตรวจติดตามการยึดเกาะของเซลล์และการมีชีวิตของแบคทีเรียในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของเซลล์ที่เรียงที่ผ่านการใช้เป็นเวลา 4 เดือน ด้วยการย้อมเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุจริงโดยตรงด้วยสีย้อม FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit ซึ่งประกอบด้วย SYTO® 9 fluorescent stain และ propidium iodide fluorescent stain และส่องด้วยกล้อง CLSM แสดงให้เห็นการยึดเกาะของเซลล์และการมีชีวิตของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของวัสดุจริง โดยเซลล์สีเขียวที่ถูกย้อมติดสีด้วย SYTO® 9 fluorescent stain คือเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนเซลล์สีแดงที่ถูกย้อมติดสีด้วย propidium iodide fluorescent stain คือเซลล์ตาย ดังรูปที่ 5.12 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่เรียงที่ผ่านการใช้เป็นเวลา 4 เดือน ตรวจพบแบคทีเรียที่มีชีวิตจำนวนมากอยู่ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของเซลล์ที่เรียง ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพของเซลล์ที่เรียงในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มตลอดการทดลอง



รูปที่ 5.12 ภาพถ่ายการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของเซลล์ที่เรียงที่ผ่านการใช้งานในระบบการกรองชีวภาพเพื่อย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเป็นเวลา 4 เดือน โดยกล้อง CLSM ที่กำลังขยาย 20 เท่า

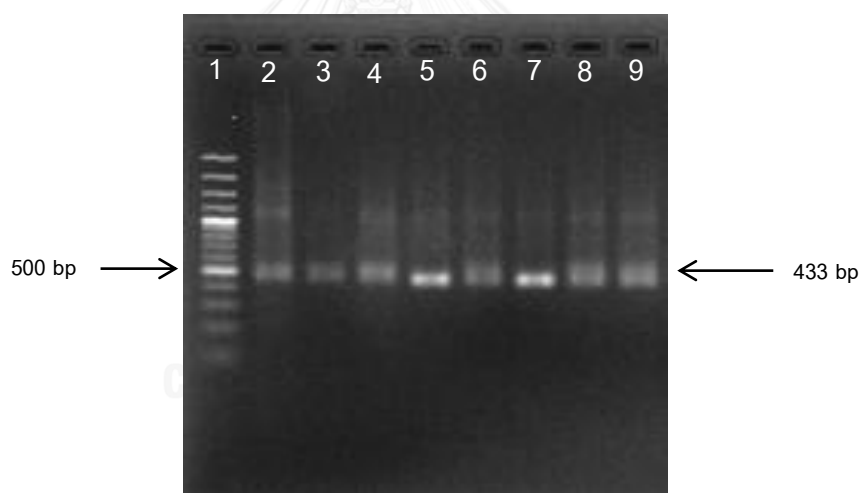
นอกจากนี้จากการติดตามการยึดเกาะของเซลล์และการมีชีวิตของแบคทีเรียด้วยกล้อง CLSM สามารถหาค่าการมีชีวิตของแบคทีเรียได้ โดยคำนวณหาค่าการมีชีวิตของแบคทีเรียด้วยโปรแกรม image J พบว่าแบคทีเรียที่เรียงบนซิลิกาที่ผ่านการใช้งานมีค่าการมีชีวิตประมาณ 86.89% ของจำนวนเซลล์ที่ถูกย้อมติดสีทั้งหมดลดลงเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 5.12 เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองในบทที่ 4 ที่ใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา และโรงงาน B จังหวัดสตูล พบว่าแบคทีเรียที่เรียงบนซิลิกาที่ผ่านการใช้งานมีค่าการมีชีวิตประมาณ 87.64% และ 90.65% ของจำนวนเซลล์ที่ถูกย้อมติดสีทั้งหมด ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า

น้ำเสียจากระบบการผลิตน้ำมันปาล์มมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียสูงกว่าน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้าย โดยทำให้แบคทีเรียตรึงมีอัตราการรอดชีวิตน้อยลง

5.4.1.3 การตรวจติดตามยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพ

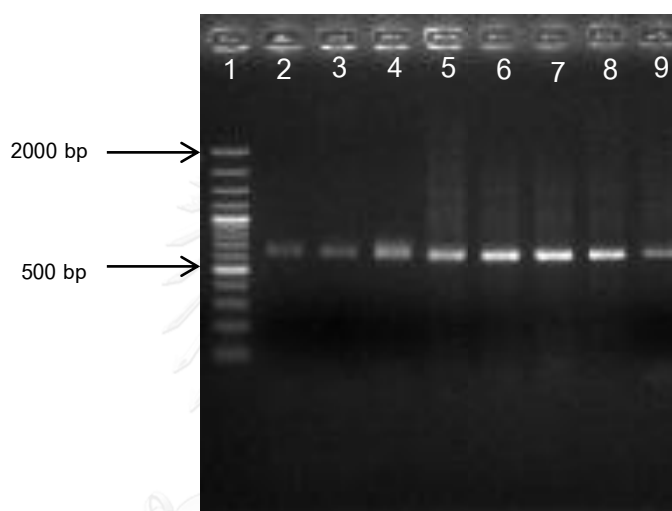
5.4.1.3.1 การตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพ

จากการตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียในซลิกันน้ำเสียโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานีก่อนและหลังบำบัดด้วยระบบการกรองชีวภาพ จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1401F และ 968R (Muangchinda และคณะ, 2013) จากผลการทดลองพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 433 bp ในแบคทีเรียตรึงบนซลิกันโดยวิธี PCR ดังรูปที่ 5.13 ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระบบการกรองชีวภาพ



รูปที่ 5.13 การมีอยู่ของยีน 16S rRNA ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ฟีนอลไฮดรอกซิเลสในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี PCR ช่องวิ่งที่ 1: marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 2: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในซลิกันก่อนใช้งาน ช่องวิ่งที่ 3: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในซลิกันหลังใช้งาน ช่องวิ่งที่ 4: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% ก่อนบำบัดวันที่ 0 ช่องวิ่งที่ 5: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% หลังบำบัดวันที่ 0 ช่องวิ่งที่ 6: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% หลังบำบัดวันที่ 2 ช่องวิ่งที่ 7: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% หลังบำบัดวันที่ 29 ช่องวิ่งที่ 8: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% หลังบำบัดวันที่ 67 ช่องวิ่งที่ 9: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% หลังบำบัดวันที่ 103

ยีน *LmPH* มีหน้าที่ในการประมวลรหัสพันธุกรรมซึ่งเป็นเอนไซม์เริ่มต้นของวิถีการย่อยสลายพินอลของแบคทีเรียจากการตรวจติดตามการมีอยู่ของยีน *LmPH* ด้วยวิธี PCR โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียในซิลิกาที่เสียบก่อนและหลังบำบัดด้วยระบบการกรองชีวภาพ จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *LmPH* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์พินอลไฮดรอกซิเลสของแบคทีเรียโดยใช้คู่ไพรเมอร์ U1+U2+U3F และ UR (Basile และคณะ, 2010) จากผลการทดลองพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 620 bp ในแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาโดยวิธี PCR ดังรูปที่ 5.14 ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารประกอบพินอลในระบบการกรองชีวภาพ

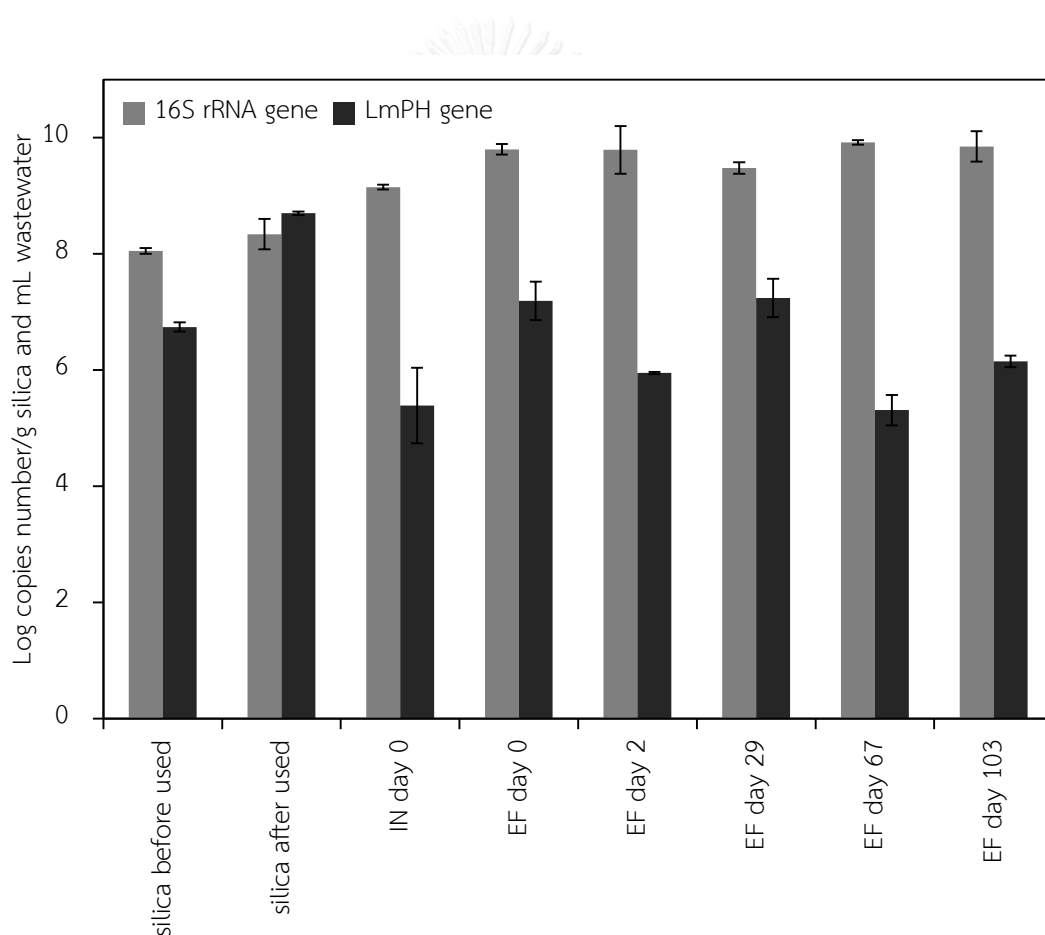


รูปที่ 5.14 การมีอยู่ของยีน *LmPH* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์พินอลไฮดรอกซิเลสในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี PCR ช่องวิ่งที่ 1: marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 2: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในซิลิกาก่อนใช้งาน ช่องวิ่งที่ 3: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในซิลิกาหลังใช้งาน ช่องวิ่งที่ 4: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% ก่อนบำบัดวันที่ 0 ช่องวิ่งที่ 5: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% หลังบำบัดวันที่ 0 ช่องวิ่งที่ 6: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% หลังบำบัดวันที่ 2 ช่องวิ่งที่ 7: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% หลังบำบัดวันที่ 29 ช่องวิ่งที่ 8: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% หลังบำบัดวันที่ 67 ช่องวิ่งที่ 9: ดีเอ็นเอจากน้ำเสียที่เจือจาง 25% หลังบำบัดวันที่ 103

5.4.1.3.2 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน 16S rRNA และยีน *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพด้วยเทคนิค Real-time qPCR

จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน 16S rRNA และยีน *LmPH* ในระบบการกรองชีวภาพด้วยวิธี Real-time qPCR โดยนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดจากซิลิกาและน้ำเสียโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี จากระบบการกรองชีวภาพก่อนและหลังการบำบัดสารประกอบพินอลนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA และยีน *LmPH* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1401F กับ 968R

และไพรเมอร์ U1+U2+U3F กับ UR ตามลำดับ โดยนำค่า C_t ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณเป็นจำนวนแบคทีเรียจากผลการทดลองพบว่าจำนวนชุดของยีน 16S rRNA และ *LmPH* ในแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาและน้ำเสียจากระบบการกรองชีวภาพก่อนบำบัดมีจำนวนน้อยกว่าหลังบำบัดที่เวลาต่างๆ (รูปที่ 5.15) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียดั้งเดิมที่สามารถย่อยสลายฟีนอลและสารประกอบฟีนอลที่อยู่ในซิลิกาและในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัด ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลและสารประกอบฟีนอลโดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถอยู่รอดได้ในระบบการกรองชีวภาพตลอดระยะเวลาการทดลองโดยจำนวนสัดส่วนของยีน *LmPH* ต่อ 16S rRNA ของซิลิกาและน้ำเสียก่อนบำบัดเท่ากับ 0.84 และ 0.59 และหลังบำบัดเพิ่มขึ้นเป็น 1.04 และ 0.56 - 0.73 ตามลำดับ



รูปที่ 5.15 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *LmPH* และ 16S rRNA ด้วยเทคนิค Real-time qPCR ในระบบการกรองชีวภาพเมื่อบำบัดน้ำเสียจากระบบการผลิตน้ำมันปาล์ม C จังหวัดสุราษฎร์ธานี

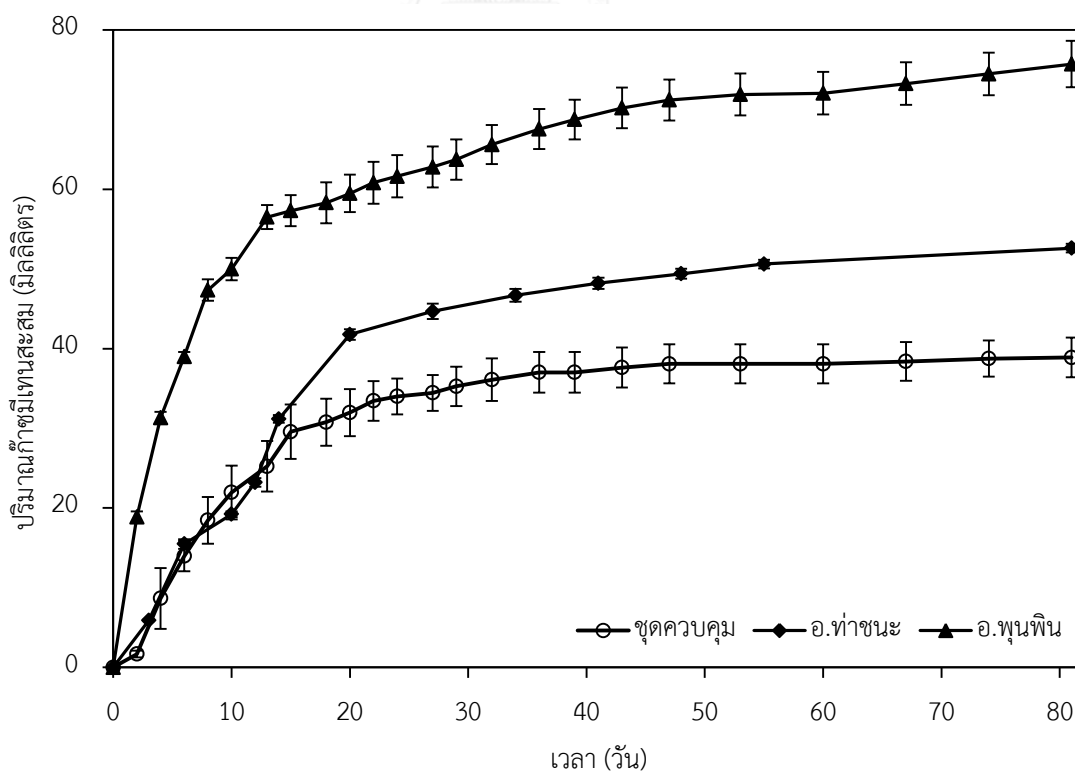
5.4.2 การคัดเลือกหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกสำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพ

5.4.2.1 การหาค่าความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซมีเทนด้วยวิธีการทดสอบ Specific Methanogenic Activity (SMA)

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพ จึงเลือกตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดสุราษฎร์ธานี 2 โรงงาน จาก 2 อำเภอ คือ อำเภอพุนพิน และอำเภอท่าชนะ (ตารางที่ 5.4) เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซชีวภาพและ/หรือก๊าซมีเทน สาเหตุที่ไม่เลือกหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากโรงงาน A จังหวัดสงขลา เนื่องจากโรงงานไม่มีระบบผลิตก๊าซชีวภาพจึงไม่มีหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิก โดยนำหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกมาผสมกับน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานีเมื่อพิจารณาลักษณะของน้ำเสีย พบว่าค่า pH ของน้ำเสียไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพและ/หรือก๊าซมีเทน ดังนั้นจึงปรับค่า pH ประมาณ 7 เนื่องจากเป็น pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทน โดยทำการทดลองในขวดซีรัมที่มีการใส่ก๊าซออกซิเจนออกให้หมดก่อนจึงปิดขวดให้สนิท จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซมีเทนดังรูปที่ 5.16 ชุดควบคุมคือ ใช้น้ำประปาเป็นสารตั้งต้น ซึ่งไม่มีสารอาหารแทนน้ำเสียจริงจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่เกิดขึ้นจริงของหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซชีวภาพ และจากรูปที่ 5.16 นำค่าความชันของกราฟมาคำนวณหาค่าความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกในการผลิตก๊าซมีเทนด้วยวิธีการทดสอบ Specific Methanogenic Activity (SMA) พบว่าตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากอำเภอท่าชนะ และอำเภอพุนพิน มีค่าความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซมีเทนประมาณ 0.11 และ 0.30 gCOD CH₄/g VSS/d ตามลำดับ เมื่อนำค่า SMA คูณกับ 433 mL/g COD (Sun และคณะ, 2012) จะได้เท่ากับ 47.63 และ 129.90 mL CH₄/g VSS/d ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากอำเภอพุนพินมีค่าความสามารถจำเพาะในการผลิตก๊าซมีเทนสูงกว่าตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากอำเภอท่าชนะ ดังนั้นจึงเลือกตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากอำเภอพุนพินเพื่อเป็นหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกสำหรับการผลิตก๊าซมีเทน

ตารางที่ 5.4 ลักษณะทั่วไปของหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิก

พารามิเตอร์	โรงงานจังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอพุนพิน	โรงงานจังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอท่าชนะ
pH	6.40	6.78
COD (mg/L)	31,967	17,426
sCOD (mg/L)	8,433	1,188
MLSS (mg/L)	33,200	16,875
MLVSS (mg/L)	26,800	12,080
MLVSS/MLSS	0.81	0.72
Phenolic compounds (mg/L)	120	80
SMA (gCOD CH ₄ /g VSS/d)	0.30	0.11
<i>mcrA</i> gene (Log copies number/mL)	6.23±0.08	5.90±0.07

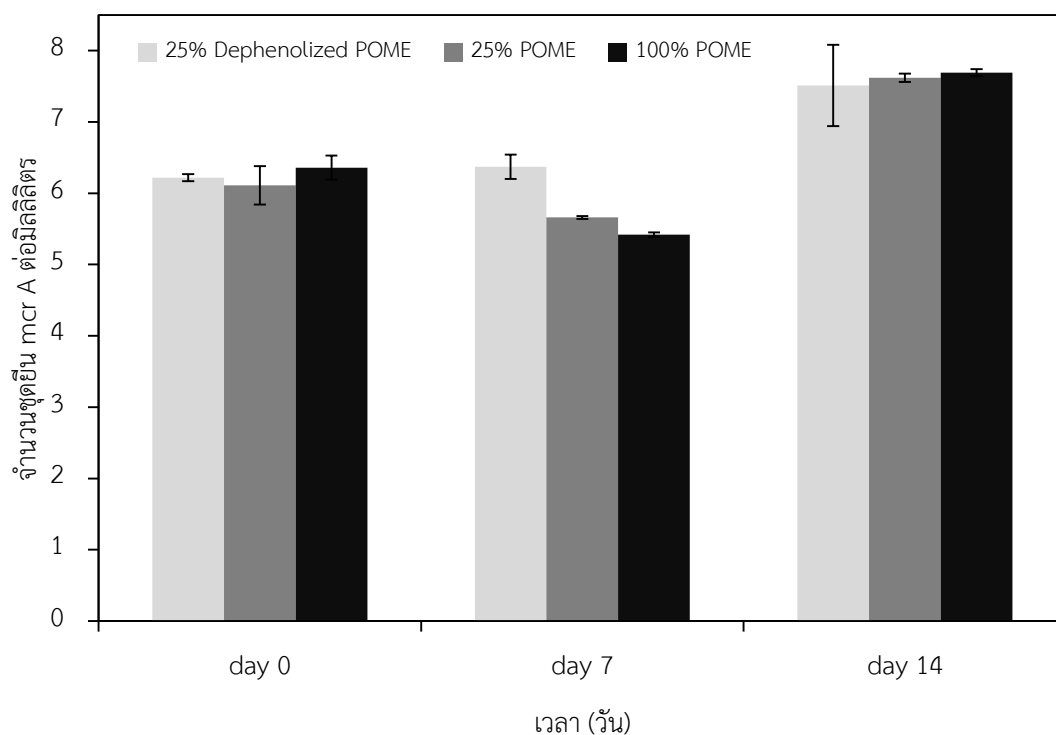


รูปที่ 5.16 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมเมื่อใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี
ซึ่งใช้หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์จากอำเภอพุนพินและอำเภอท่าชนะ

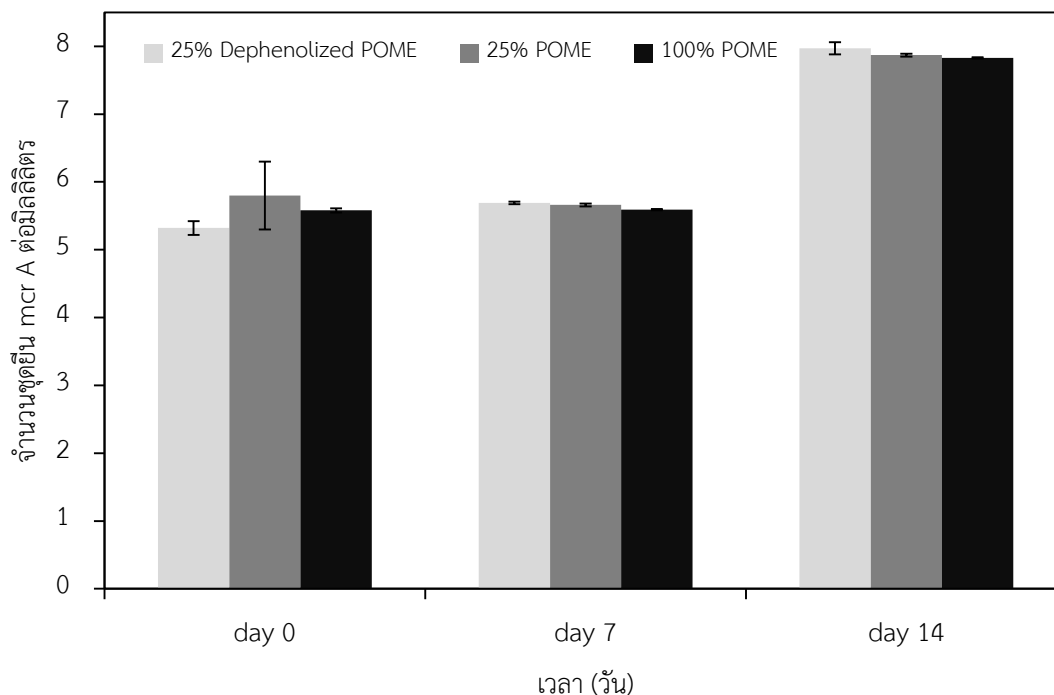
5.4.2.2 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพด้วยเทคนิค Real-time qPCR

จากการทดลองในข้อ 5.4.2.1 แสดงให้เห็นว่าระบบผลิตก๊าซชีวภาพที่ใช้หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม สามารถผลิตก๊าซมีเทนได้อย่างรวดเร็วในช่วง 14 วันแรก และจะเริ่มคงที่ในช่วงหลังจากวันที่ 14 ดังนั้นในการทดลองส่วนนี้จะตรวจติดตามจำนวนชุดยีน *mcrA* ภายใน 14 วัน เท่านั้น โดยการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพด้วยเทคนิค Real-time qPCR ซึ่งนำดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียในระบบผลิตก๊าซชีวภาพนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *mcrA* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *mcrA-F* กับ *mcrA-R* โดยนำค่า C_t ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณเป็นจำนวนแบคทีเรีย จากผลการนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ด้วยวิธี Real-time qPCR พบว่าในวันที่ 0 แบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพที่ใช้ตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากอำเภอพุนพินและอำเภอน้ำเสียวที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลมีจำนวนมากกว่าแบคทีเรียในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อผลิตก๊าซชีวภาพเป็นเวลา 7 วัน ขณะที่ในวันที่ 7 แบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพที่บรรจุน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลมีจำนวนมากกว่าแบคทีเรียในระบบผลิตก๊าซชีวภาพวันที่ 0 คือเพิ่มขึ้นจาก 6.22 เป็น 6.37 และเพิ่มขึ้นจาก 5.32 เป็น 5.69 Log copies number ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 0 พบว่ายีน *mcrA* ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพที่ใช้หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์จากอำเภอพุนพินสูงกว่าหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์จากอำเภอน้ำเสียว ซึ่งสอดคล้องกับค่า SMA จากงานวิจัยของ Steinberg และ Regan (2009) สามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ในตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกด้วยวิธี Real-time qPCR ได้ประมาณ 4.38 Log copies number ต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าจำนวนยีน *mcrA* เริ่มต้นในระบบน่าจะจะมีเพียงพอต่อการผลิตก๊าซชีวภาพและเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน พบว่าแบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพที่บรรจุน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากวันที่ 7 โดยสามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *mcrA* เมื่อใช้ตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากอำเภอพุนพินผสมกับน้ำเสียเจือจาง 4 เท่า (25% dephenolized POME) ที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล น้ำเสียเจือจาง 4 เท่า (25% POME) ที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล และน้ำเสีย (100% POME) ที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลได้เท่ากับ 7.51, 7.62 และ 7.69 Log copies number ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 5.17ก) และเมื่อใช้ตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากอำเภอน้ำเสียวผสมกับน้ำเสียเจือจาง 4 เท่า (25% dephenolized POME) ที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล น้ำเสียเจือจาง 4 เท่า (25% POME) ที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล และน้ำเสีย (100% POME) ที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลได้เท่ากับ 7.97, 7.87 และ 7.83 Log copies number ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 5.17ข) การที่จำนวนยีนในระบบการผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้ตะกอนจุลินทรีย์ของอำเภอพุนพินมีจำนวนยีน

น้อยกว่าอำเภอท่าชนะในวันที่ 14 แต่ค่า SMA กลับมีค่ามากกว่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับค่าซีไอทีในระบบผลิตก๊าซชีวภาพ และเมื่อทดสอบด้วยค่าทางสถิติ พบว่าจำนวนยีนในทั้งสองระบบในวันที่ 14 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในระยะแรกของการผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล แบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซมีเทนถูกยับยั้งแอกทิวิตีโดยสารประกอบฟีนอลแต่เมื่อเวลาผ่านไปแบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซมีเทนสามารถปรับตัวให้ทนต่อความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอลได้



ก.



ข.

รูปที่ 5.17 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *mcrA* ด้วยเทคนิค Real-time qPCR ในน้ำเสียจากระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อนำน้ำเสียจากระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอพุนพิน และตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอพุนพิน (ก) และอำเภอท่าชนะ (ข)

5.4.3 การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

ในการทดลองส่วนนี้ต้องการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อนำน้ำเสียที่มีลักษณะและองค์ประกอบแตกต่างกันว่าส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตและปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพหรือไม่ อีกทั้งต้องการพิสูจน์ว่าสารประกอบฟีนอลมีผลยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทนหรือไม่ ซึ่งจะใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลจากระบบการผลิตน้ำมันปาล์ม 2 แห่ง คือ โรงงาน B จังหวัดสตูล และโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี จากข้อ 5.4.1 และน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล โดยองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยส่วนนี้จะถูกนำไปประยุกต์ใช้กับน้ำเสียจากระบบการผลิตน้ำมันปาล์มจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่างๆ เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตก๊าซชีวภาพรวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับโรงงานอื่นๆ ที่น้ำเสียมีลักษณะคล้ายกับน้ำเสียจากระบบการผลิตน้ำมันปาล์มต่อไป

5.4.3.1 น้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน B จังหวัดสตูล

ในการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ โดยเปรียบเทียบกับปริมาณก๊าซชีวภาพระหว่างน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลจากข้อ 5.4.1.1 มาเปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ยังไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล ซึ่งลักษณะของน้ำเสียจากกระบวนการบำบัดของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังบำบัดสารประกอบฟีนอลแสดงดังตารางที่ 5.5 เมื่อพิจารณาลักษณะของน้ำเสียพบว่าค่า pH ของน้ำเสียทั้ง 3 ชนิด ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพ ดังนั้นจึงปรับค่า pH เป็น 7 เนื่องจากเป็น pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทน จากนั้นนำน้ำเสียมาผสมกับตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ทำการทดลองในขวดซีรัมที่มีการไล่ก๊าซออกซิเจนออกให้หมดก่อนจึงปิดขวดให้สนิทจากนั้นทำการวัดปริมาตรก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นโดยใช้หลักการแทนที่น้ำพบว่าปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมที่เกิดขึ้นจากน้ำเสียที่กรองเอาของแข็งออกแล้วนำมาบำบัด น้ำเสียที่ไม่ได้กรองเอาของแข็งออกแล้วนำมาบำบัด และน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดประมาณ 225.17, 471.57 และ 216.17 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ดังรูปที่ 5.18) และนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณก๊าซมีเทนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าปริมาณก๊าซมีเทนสะสมที่เกิดขึ้นจากน้ำเสียที่กรองเอาของแข็งออกแล้วนำมาบำบัด น้ำเสียที่ไม่ได้กรองเอาของแข็งออกแล้วนำมาบำบัด และน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดประมาณ 186.89, 208.50 และ 78.47 มิลลิลิตรมีเทนตามลำดับ (ดังรูปที่ 5.19 และตารางที่ 5.6) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณก๊าซมีเทนสะสมที่เกิดขึ้นจากแบบจำลองของ Gompertz (ดังรูปที่ 5.20 และตารางที่ 5.6) จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fountoulakis และคณะ (2002) ศึกษาการกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกด้วยร *Pleurotus ostreatus* และนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลมาผลิตก๊าซชีวภาพ พบว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดและน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ประมาณ 1,700 และ 1,200 มิลลิลิตร ตามลำดับ และน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดและน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลสามารถผลิตก๊าซมีเทนได้ประมาณ 1,394 และ 852 มิลลิลิตรมีเทน ตามลำดับ ซึ่งน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสามารถผลิตก๊าซชีวภาพและก๊าซมีเทนได้ดีกว่าน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล โดยน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลมีประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพและก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้นประมาณ 1.42 และ 1.64 เท่าของน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล งานวิจัยของ Martinez-Garcia และคณะ (2007) รายงานว่าการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียแบบใช้อากาศก่อนนำน้ำเสียไปผลิตก๊าซมีเทน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้นประมาณ 23% และงานวิจัยของ Chen และคณะ (2008) กล่าวว่าสารมลพิษที่พบในน้ำเสีย เช่น แอมโมเนียม ซัลไฟด์ โลหะหนัก และสารอินทรีย์ เป็นต้น มีผลทำให้ระบบการกรองชีวภาพล้มเหลวและยับยั้งการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ในน้ำเสีย ส่งผลให้ผลิตก๊าซชีวภาพต่ำลงหรือไม่มีการผลิตก๊าซชีวภาพ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนด้วยการ

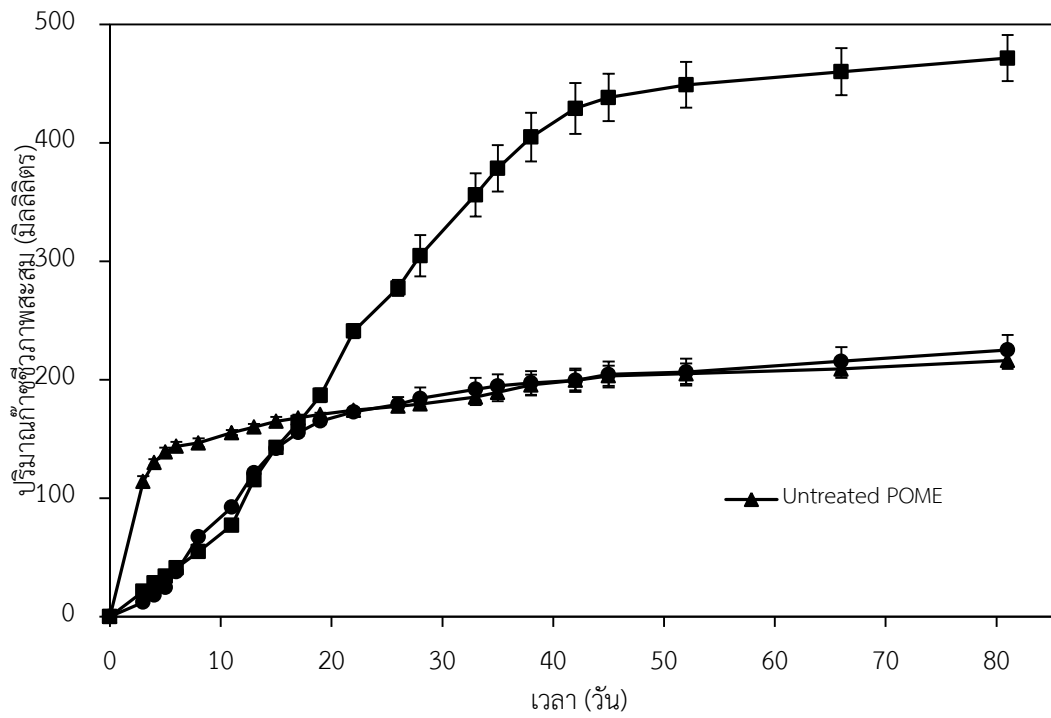
ทดสอบค่า Biochemical Methane Potential (BMP) พบว่าน้ำเสียที่กรองเอาของแข็งออกแล้วนำมาบำบัด น้ำเสียที่ไม่ได้กรองเอาของแข็งออกแล้วนำมาบำบัด และน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดมีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนประมาณ 533.97, 301.97 และ 21.44 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดีทั้งหมด ตามลำดับ ดังตารางที่ 5.6 ซึ่งค่า BMP แสดงถึงศักยภาพในการผลิตมีเทนสูงสุดของของเสียจากงานวิจัยของ Moody และคณะ (2009) ศึกษาศักยภาพการผลิตก๊าซมีเทนโดยการทดสอบค่า Biochemical Methane Potential (BMP) เพื่อทำนายและเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนของน้ำเสียจากการเกษตรในระบบทดลองแบบแบดจ์ พบว่าระบบมีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนประมาณ 290 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดีทั้งหมด และงานวิจัยของ Hafez และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตก๊าซมีเทนในระหว่างการบำบัดน้ำเสียจากระบบฝังกลบขยะ พบว่าระบบมีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนสูงสุดประมาณ 426 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดีทั้งหมด จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียก่อนเข้าสู่ระบบผลิตก๊าซชีวภาพ สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพและก๊าซมีเทนของน้ำเสียจากระบบการผลิตของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้จริง (ตารางที่ 5.8)

ตารางที่ 5.5 ลักษณะของน้ำเสียจากระบบการผลิตน้ำมันปาล์ม B จังหวัดสตูล ที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล

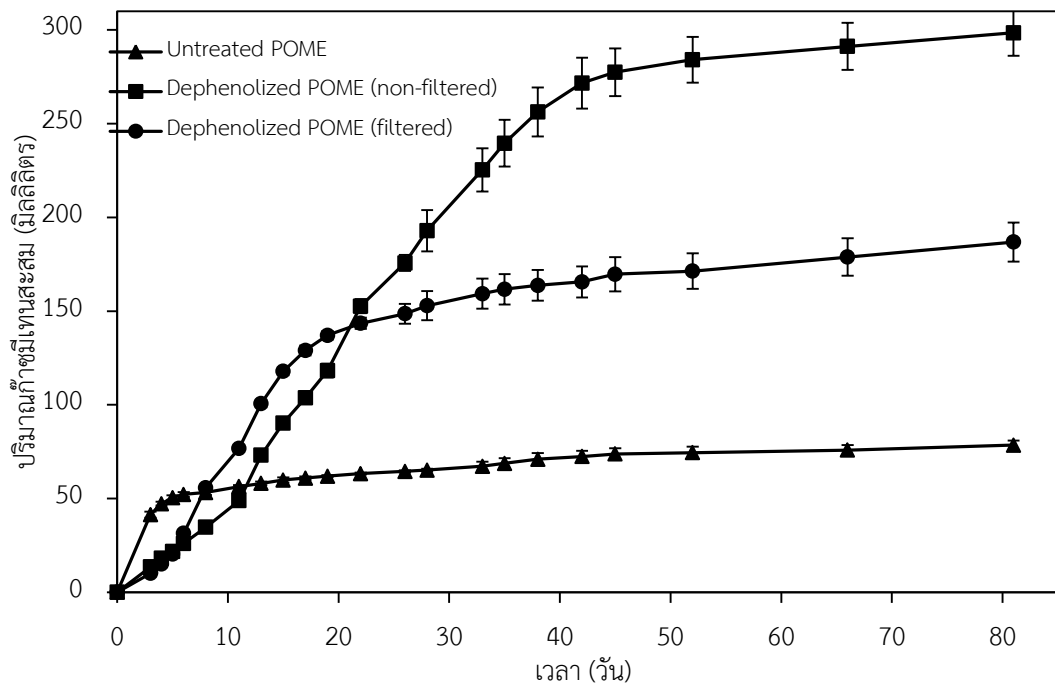
พารามิเตอร์	น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด*	น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด**
pH	8.83	7.79
COD (mg/L)	7,767	21,967
sCOD (mg/L)	1,800	5,567
MLSS (mg/L)	31,000	33,400
MLVSS (mg/L)	8,400	8,600
MLVSS/MLSS	0.27	0.26
VFA (mg CaCO ₃ /L)	70.5	79.9
Alkalinity (mg CaCO ₃ /L)	30,975	68,400

หมายเหตุ: * หมายถึง น้ำเสียที่นำมากรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อกรองเอาตะกอนออก

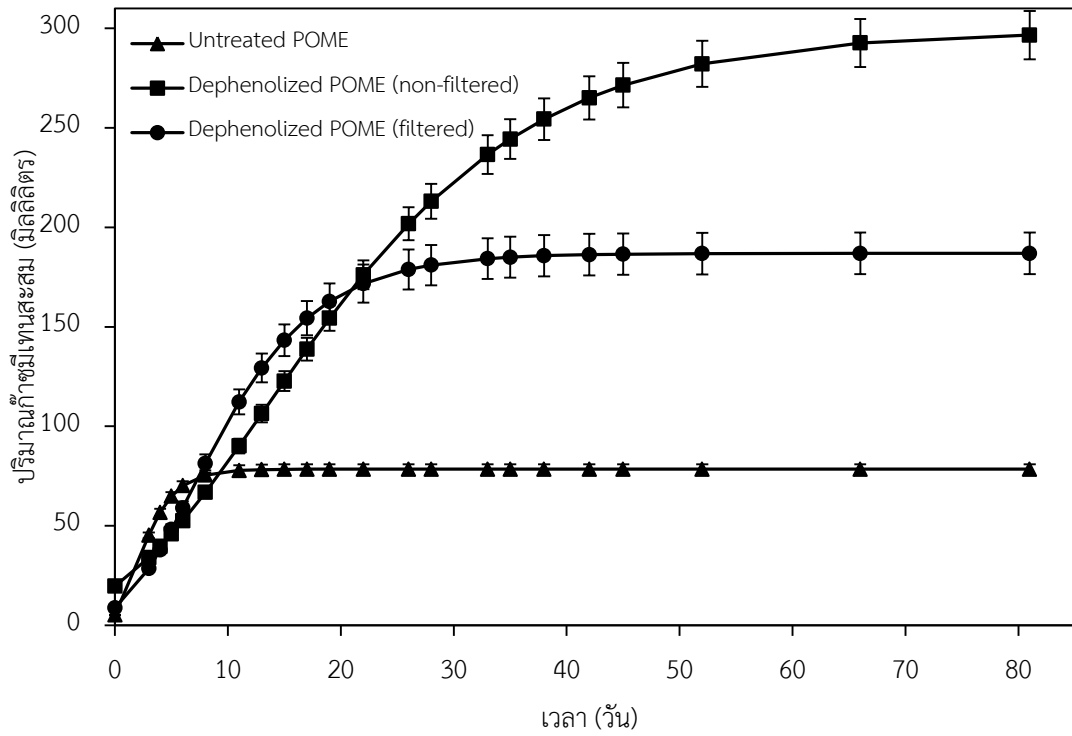
** หมายถึง น้ำเสียที่ไม่ได้ผ่านการกรองเพื่อแยกเอาตะกอนออก



รูปที่ 5.18 ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมที่เกิดจากน้ำเสียจากโรงงาน B จังหวัดสตูล
ผสมกับตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิก



รูปที่ 5.19 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมที่เกิดจากน้ำเสียจากโรงงาน B จังหวัดสตูล
ผสมกับตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิก



รูปที่ 5.20 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมจากน้ำเสียกระบวนการผลิตโรงงาน B จังหวัดสตูล
ที่เกิดจากแบบจำลองของ Gompertz

ตารางที่ 5.6 ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากการทดลองและแบบจำลองของ Gompertz

ชนิดของน้ำเสีย	หัวเชื้อ	ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสม (มิลลิลิตร)	% ก๊าซมีเทน	ปริมาณก๊าซมีเทนสะสม (มิลลิลิตร มีเทน)	Modified Gompertz parameters (model)				R ²	BMP (mLCH ₄ /gCOD)
					M (mLCH ₄)	P (mLCH ₄)	R _m (mL/h)	λ (h)		
น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด	ตะกอนสลัดจ์	216.17	36.30	78.47	78.47	78.47	0.64	4.82	0.968	21.44
น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด (กรอง)	ตะกอนสลัดจ์	225.17	83.00	186.89	186.89	186.89	0.47	17.65	0.982	533.97
น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด (ไม่กรอง)	ตะกอนสลัดจ์	471.57	63.30	298.50	296.57	298.50	0.34	2.45	0.971	301.97

5.4.3.2 น้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี

การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ โดยนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่บรรจุในระบบการกรองชีวภาพ Internal loop Airlift Bioreactor จากข้อ 5.4.1.2 มาผลิตก๊าซชีวภาพ และลักษณะน้ำเสีย แสดงในตารางที่ 5.7 จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมที่เกิดขึ้นจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด (100%) น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด (เจือจาง 4 เท่า) และน้ำเสียที่ผ่านการบำบัด (เจือจาง 4 เท่า) มีค่า 216.17, 260.37, และ 150.17-205.17 มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 5.21) เมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณก๊าซมีเทนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าปริมาณก๊าซมีเทนสะสมที่เกิดขึ้นจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด (100%) น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด (เจือจาง 4 เท่า) และน้ำเสียที่ผ่านการบำบัด (เจือจาง 4 เท่า) ประมาณ 78.47, 120.42 และ 83.06 - 149.28 มิลลิลิตรมีเทน ตามลำดับ (รูปที่ 5.22) เมื่อนำแบบจำลอง Gompertz ซึ่งเป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มาทำนายอัตราการผลิตก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซมีเทน ซึ่งผู้วิจัยดัดแปลงแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Gompertz model ตาม Patil และคณะ (2012) พบว่าปริมาณก๊าซมีเทนจากการคำนวณโดยใช้แบบจำลอง Gompertz ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับปริมาณก๊าซมีเทนที่วัดได้จากการทดลองจริง (รูปที่ 5.23 และตารางที่ 5.8) และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนด้วยการทดสอบค่า Biochemical Methane Potential (BMP) พบว่าน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด (100%) น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด (เจือจาง 4 เท่า) และน้ำเสียที่ผ่านการบำบัด (เจือจาง 4 เท่า) มีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนประมาณ 21.23, 131.12 และ

346.47-507.77 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมชีโอดีทั้งหมด ตามลำดับ (ตารางที่ 5.8) แสดงให้เห็นว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล (เจือจาง 4 เท่า) มีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้นประมาณ 3 - 4 และ 16 - 24 เท่าของน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล (เจือจาง 4 เท่า) และน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด (ไม่เจือจาง) ตามลำดับ

ผลการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซมีเทนเมื่อนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลนี้สอดคล้องกับการใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลจากโรงงาน B จังหวัดสตูล และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fountoulakis และคณะ (2002), Martinez-Garcia และคณะ (2007) และ Chen และคณะ (2008) สำหรับผลการทดสอบค่า Biochemical Methane Potential (BMP) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Moody และคณะ (2009) และ Hafez และคณะ (2010) ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 5.4.3.1 จากตารางที่ 5.9 แสดงให้เห็นว่าปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นอยู่กับแหล่งน้ำเสียที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต

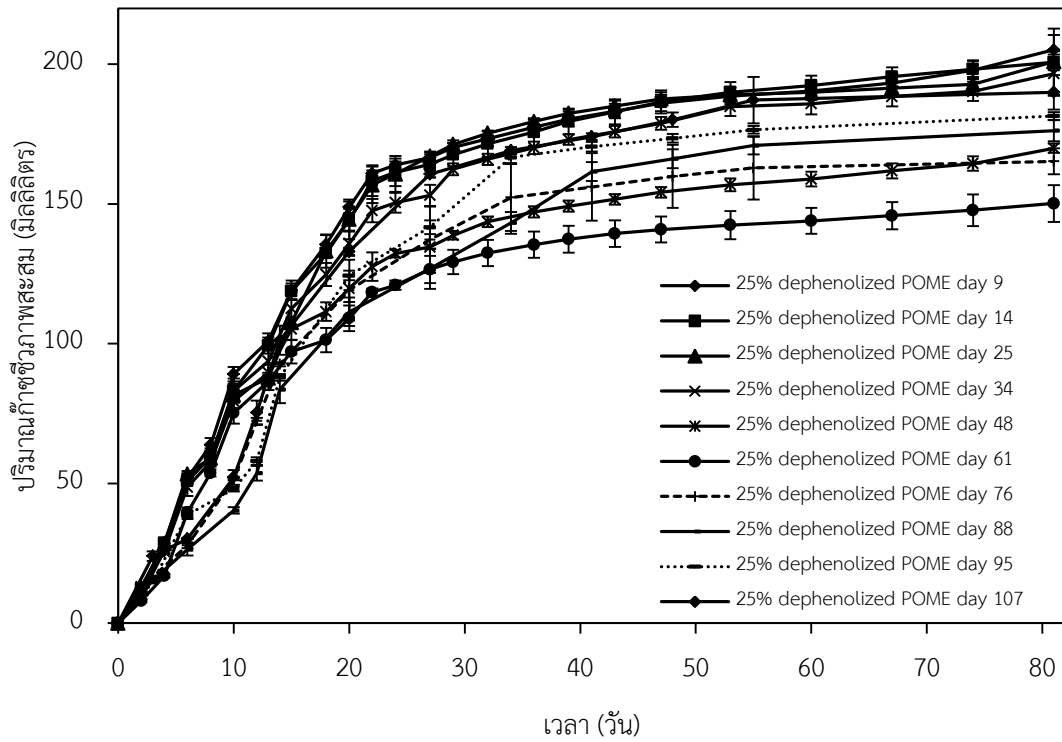
จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพและทำให้ได้ปริมาณก๊าซมีเทนสูง แต่ถ้าเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยรจากงานวิจัยข้างต้น พบว่าการใช้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาอาจจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่า เนื่องจากมีความทนทานต่อภาวะแวดล้อมที่รุนแรง และความเป็นพิษของสารมลพิษในน้ำเสียได้ดีกว่าแบคทีเรีย ดังนั้นเราสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวโดยเพิ่มระบบบำบัดเป็น 2 เฟส ประกอบด้วย เฟสที่ 1 บำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยราก่อน โดยใช้ระบบการกรองชีวภาพแบบ Packed bed bioreactor หรือระบบการกรองชีวภาพแบบอื่นๆ จากนั้นนำน้ำเสียดังกล่าวมาบำบัดต่อในเฟสที่ 2 ด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ซึ่งข้อดีของระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถขยายขนาดระบบให้ใหญ่ขึ้นได้ ทำให้สามารถรองรับปริมาณน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีปริมาณมากได้ ควบคุมระบบได้ง่าย และขั้นตอนการดำเนินการไม่ยุ่งยาก จากนั้นจึงนำน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลเข้าสู่ระบบผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป

เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นชีโอดีในระบบ พบว่าเมื่อนำน้ำเสียที่ไม่ผ่านการเจือจางซึ่งมีค่าชีโอดีประมาณ 61,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณก๊าซมีเทนเพียง 78.47 มิลลิลิตรมีเทน ขณะที่น้ำเสียที่เจือจางมีค่าชีโอดีประมาณ 15,300 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณก๊าซมีเทน 120.37 มิลลิลิตรมีเทน แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นชีโอดีมีผลต่อการผลิตก๊าซมีเทน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sun และคณะ (2012) ศึกษาความเข้มข้นของชีโอดีที่มีผลต่อการผลิตก๊าซมีเทน พบว่าปริมาณการผลิตก๊าซมีเทนลดลงจาก 150 มิลลิลิตร เป็น 61 มิลลิลิตร เมื่อความเข้มข้นชีโอดีในน้ำเสียเพิ่มจาก 4,000 เป็น

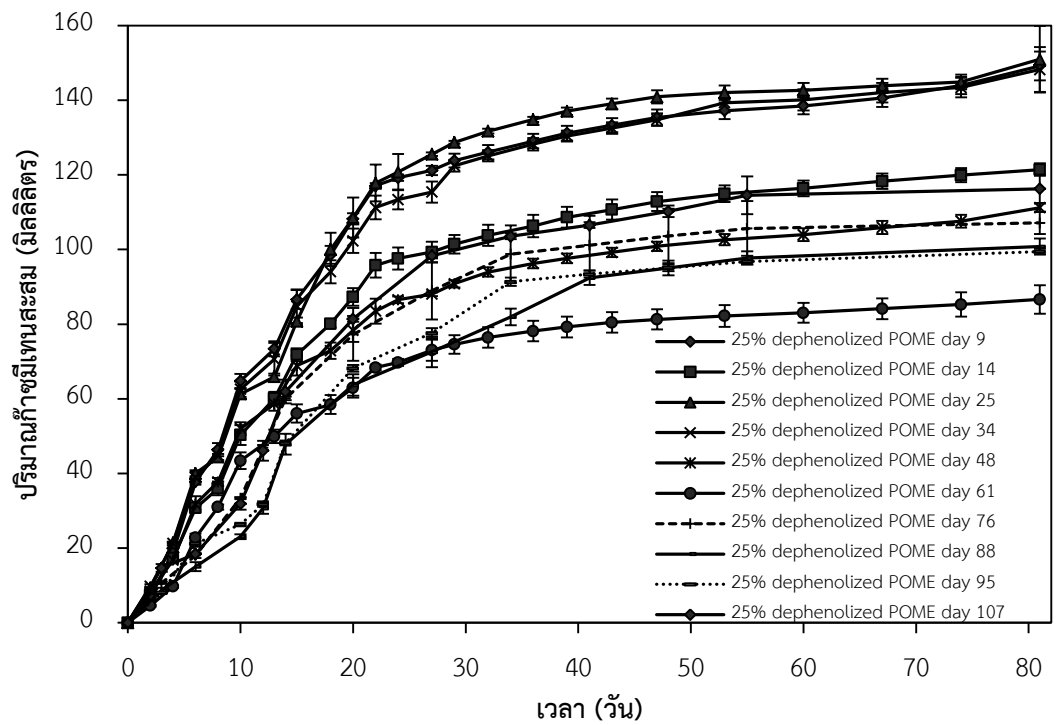
10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของซีโอดีสูงมีผลยับยั้งการทำงานของตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิก (anaerobic sludge) ส่งผลให้ระบบผลิตก๊าซมีเทนได้น้อยลงจากการศึกษาข้างต้นสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเพื่อการผลิตก๊าซมีเทนควบคู่กับการบำบัดสารประกอบฟีนอลและซีโอดี โดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนได้ดังต่อไปนี้ ใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มแบบไม่ต้องเจือจาง แต่ต้องบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียด้วยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ก่อน แล้วจึงนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดไปผลิตก๊าซมีเทน แต่วิธีนี้น้ำเสียอาจจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในระบบ และส่งผลให้ระบบล้มเหลวได้ หรือใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่เจือจาง เพื่อให้ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลและค่าซีโอดีลดลง แล้วจึงนำไปผลิตก๊าซมีเทน ซึ่งวิธีนี้ไม่สามารถบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียได้ แต่ถ้าต้องการให้ได้ปริมาณก๊าซมีเทนสูงควบคู่กับการบำบัดสารประกอบฟีนอลอย่างมีประสิทธิภาพ ควรเจือจางน้ำเสียก่อน แล้วนำไปบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor หลังจากนั้นจึงนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลไปผลิตก๊าซมีเทนต่อไป

ตารางที่ 5.7 ลักษณะของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม C จังหวัดสุราษฎร์ธานีก่อนและหลังบำบัดสารประกอบฟีนอล

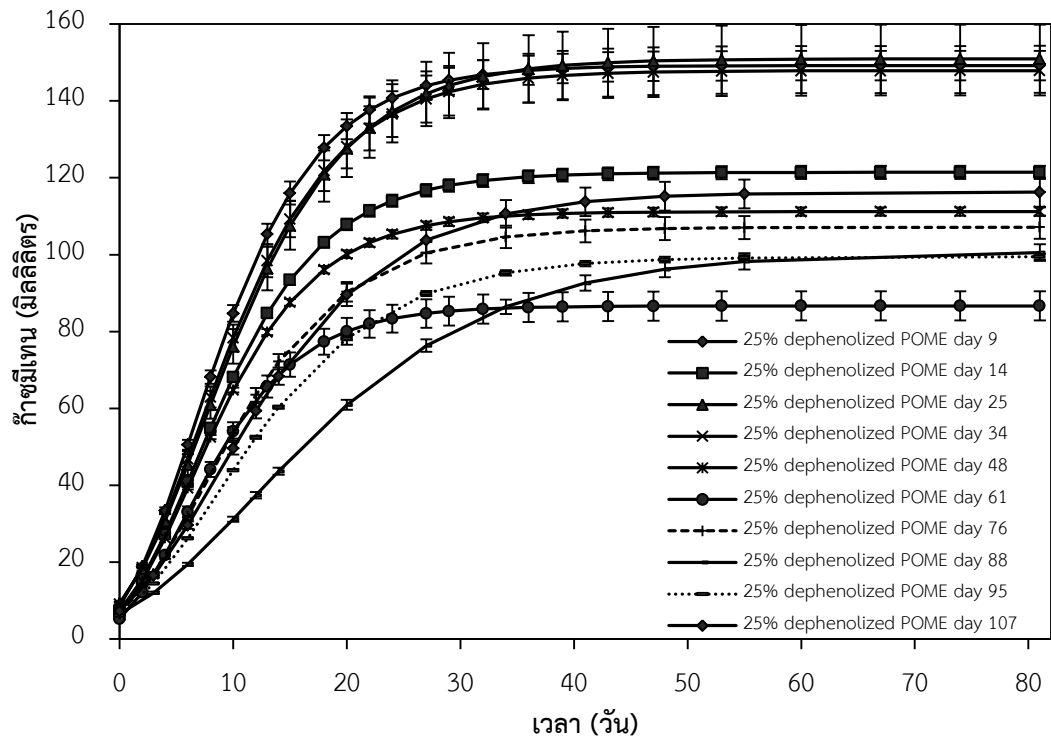
พารามิเตอร์	น้ำเสียไม่เจือจาง	น้ำเสียเจือจาง 4 เท่า	น้ำเสียเจือจาง 4 เท่าและผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล									
			วันที่ 9	วันที่ 14	วันที่ 25	วันที่ 34	วันที่ 48	วันที่ 61	วันที่ 76	วันที่ 88	วันที่ 95	วันที่ 107
pH	3.97	7.63	7.86	7.75	7.81	7.38	8.54	8.35	8.54	8.36	8.04	8.73
Phenolic compounds (mg/L)	1,000	270	166	182	134	106	98	73	156	108	54	118
COD (mg/L)	61,500	15,300	4,900	4,800	6,500	6,133	4,667	3,567	3,533	4,300	4,000	4,633
sCOD (mg/L)	34,567	3,700	1,180	1,060	440	423	610	820	420	750	247	1,833
MLSS (mg/L)	17,400	3,400	600	100	500	800	100	400	300	100	400	100
MLVSS (mg/L)	15,400	3,000	300	60	400	500	50	300	120	60	300	50
MLVSS/MLSS	0.89	0.88	0.50	0.60	0.80	0.63	0.50	0.75	0.40	0.60	0.75	0.50
VFA (mg CaCO ₃ /L)	3,055	353	359	470	705	588	130	118	940	588	350	410
Alkalinity (mg CaCO ₃ /L)	61,950	16,220	20,355	20,650	11,800	10,325	10,915	13,865	7,375	17,700	11,800	16,255



รูปที่ 5.21 ปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมที่ผลิตจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล



รูปที่ 5.22 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมที่ผลิตจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C จังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล



รูปที่ 5.23 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมจากน้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มโรงงาน C
จังหวัดสุราษฎร์ธานีที่คำนวณจากแบบจำลองของ Gompertz

ตารางที่ 5.8 ปริมาณก๊าซมีเทนสะสมที่ได้จากการคำนวณด้วยแบบจำลอง Gompertz และศักยภาพการผลิตก๊าซมีเทน (Biochemical Methane Potential; BMP)

ชนิดของน้ำเสีย	% ก๊าซมีเทน	Modified Gompertz parameters (model)					BMP (mLCH ₄ /gCOD)
		<i>M</i> (mLCH ₄)	<i>P</i> (mLCH ₄)	<i>R_m</i> (mL/h)	λ (h)	<i>R</i> ²	
25% POMEวันที่ 0	46.23	120.27	120.42	0.19	4.79	0.990	131.09
25% Dephenolized POME	72.73	149.24	149.28	0.37	7.98	0.994	507.77
25% Dephenolized POME	60.50	121.43	121.41	0.30	5.71	0.995	421.56
25% Dephenolized POME	75.13	150.98	150.77	0.33	5.11	0.933	386.58
25% Dephenolized POME	75.37	147.89	148.49	0.34	4.73	0.997	403.52
25% Dephenolized POME	65.43	111.22	111.22	0.28	3.33	0.997	397.17
25% Dephenolized POME	57.70	86.65	86.40	0.24	4.86	0.994	403.69
25% Dephenolized POME	64.83	107.14	107.01	0.23	5.71	0.990	504.80
25% Dephenolized POME	57.20	100.52	100.84	0.13	2.78	0.986	390.85
25% Dephenolized POME	54.80	99.46	99.50	0.19	4.89	0.985	414.57
25% Dephenolized POME	61.20	116.26	116.28	0.21	4.93	0.984	418.34

ตารางที่ 5.9 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ไม่ผ่านและผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล

ชนิดของน้ำเสีย	หัวเชื้อ	ปริมาณ ก๊าซ ชีวภาพ สะสม (มิลลิลิ ตร)	% ก๊าซ มี เทน	ปริมาณ ก๊าซ มีเทน สะสม (มิลลิลิ ตรมีเทน)	Modified Gompertz parameters (model)				R ²	BM P (mL CH ₄ / gCO D)	เอกสาร อ้างอิง
					M (mLC H ₄)	P (mLC H ₄)	R _m (mL/ h)	λ (h)			
น้ำเสียจากโรงงาน สกัดน้ำมันมะกอกที่ ไม่ผ่านการบำบัด (100% untreated OWM)	ตะกอน สลัดจ์	1,200	-	852	-	-	-	-	-	-	Fountoula kis และ คณะ (2002)
น้ำเสียจากโรงงาน สกัดน้ำมันมะกอกที่ ผ่านการบำบัด (100% treated OWM)	ตะกอน สลัดจ์	1,700	-	1,394	-	-	-	-	-	-	
น้ำเสียจากโรงงาน สกัดน้ำมันปาล์มที่ ไม่ผ่านการบำบัด	มูลวัว สด	150	47	70.50	-	-	-	-	-	-	Abubakar และ Ismail (2012)
น้ำเสียจากฟาร์มหมู ที่ไม่ผ่านการบำบัด	มูลสุกร	-	-	167.62-	168.39	168.0	15.98	3.00	0.94	-	Kwak และ คณะ (2013)
				312.47	-	2-	-	-	-	0.99	
น้ำเสียจากโรงงาน สกัดน้ำมันปาล์มที่ ไม่ผ่านการบำบัด (ไม่เจือจาง)	-	-	44. 17	-	-	-	-	-	-	-	Sidik และ คณะ (2013)
น้ำเสียจากโรงงาน สกัดน้ำมันปาล์มที่ ไม่ผ่านการบำบัด (60%POME)	มูลวัว 40%	-	46. 12	-	-	-	-	-	-	-	
น้ำเสียจากโรงงาน สกัดน้ำมันปาล์มที่ ไม่ผ่านการบำบัด (80%POME)	มูลวัว 20%	-	50. 56	-	-	-	-	-	-	-	
น้ำเสียจากโรงงาน สกัดน้ำมันปาล์มที่ 30%	มุลวัว	1,875	61. 13	1,146.1 9	-	-	-	-	-	-	

ชนิดของน้ำเสีย	หัวเชื้อ	ปริมาณ ก๊าซ ชีวภาพ สะสม (มิลลิลิตร)	% ก๊าซ มีเทน	ปริมาณ ก๊าซ มีเทน สะสม (มิลลิลิตรมีเทน)	Modified Gompertz parameters (model)				R ²	BMP (mL CH ₄ / gCO D)	เอกสาร อ้างอิง
					M (mLC H ₄)	P (mLC H ₄)	R _m (mL/ h)	λ (h)			
ไม่ผ่านการบำบัด (70%POME)											
น้ำเสียที่ไม่ผ่านการ บำบัด	ตะกอน สลัดจ์	216.17	36. 30	78.47	78.47	78.47	0.64	4.82	0.96 8	21.4 4	งานวิจัยนี้
น้ำเสียที่ผ่านการ บำบัด (กรอง)	ตะกอน สลัดจ์	225.17	83. 00	186.89	186.89	186.8 9	0.47	17.65	0.98 2	533. 97	งานวิจัยนี้
น้ำเสียที่ผ่านการ บำบัด (ไม่กรอง)	ตะกอน สลัดจ์	471.57	63. 30	298.50	296.57	298.5 0	0.34	2.45	0.97 1	301. 97	งานวิจัยนี้
น้ำเสียที่ไม่ผ่านการ บำบัด (เจือจาง 4 เท่า)	ตะกอน สลัดจ์	260.37	46. 23	120.42	120.27	120.4 2	0.19	4.79	0.99 0	131. 12	งานวิจัยนี้
น้ำเสียที่ผ่านการ บำบัด (เจือจาง 4 เท่า)	ตะกอน สลัดจ์	150.17- 205.17	54. 80- 75. 37	83.06- 149.28	86.65- 150.98	86.40- 150.7 7	0.24- 0.34	4.86- 7.98	0.93 3- 0.99 7	346. 47- 507. 77	งานวิจัยนี้

บทที่ 6

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 ข้อสรุป

6.1.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบแบบทซ์และระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้น

การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาให้มีประสิทธิภาพสูงชันทำได้ดังนี้คือ ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมของ *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่มีค่า OD₅₇₈ เท่ากับ 3.0 ซึ่งทำให้ได้แบคทีเรียตรึงให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $\sim 10^8$ CFU ต่อกรัมซิลิกา และใช้แบคทีเรียตรึงที่มีลักษณะสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยแบคทีเรียตรึงที่ผลิตขึ้นใหม่นี้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียต่อกรัมซิลิกาสูง ทำให้ลดระยะเวลาในการบำบัดสารประกอบฟีนอลชนิดอื่นๆ เช่น *m*-cresol, *o*-cresol, caffeic acid, ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid, catechol และ 3-methylcatechol อีกทั้งสามารถลดปริมาณแบคทีเรียตรึงในระบบได้ จึงส่งผลให้ต้นทุนของระบบโดยรวมลดลง นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่าสามารถเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ประมาณ 30 วัน จึงไม่จำเป็นต้องเตรียมแบคทีเรียตรึงใหม่บ่อยครั้ง ทำให้สะดวกต่อการนำไปใช้งานกับน้ำเสียจริง ซึ่งมีสารเคมีอันตรายปนเปื้อนหลากหลายชนิด

การนำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาไปพัฒนาเป็นระบบการกรองชีวภาพสำหรับบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลในระดับห้องปฏิบัติการสามารถทำได้ดังนี้ สร้างระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor ขนาดเล็กความจุ 3 ลิตร และเติมแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถเคลื่อนที่ในถังปฏิกรณ์ได้ดี หลังจากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพโดยใช้น้ำกลั่น และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปรับระบบให้มีระยะเวลาพักเก็บน้ำที่ 2.5 - 5.0 ชั่วโมง และให้อากาศอย่างต่อเนื่อง พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถย่อยสลายฟีนอลความเข้มข้นตั้งแต่ 5 - 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 100% และสามารถย่อยสลายฟีนอลผสมกับสารประกอบฟีนอลอื่นๆ ได้ 100% ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย โดยพบว่าจำนวนแบคทีเรียในระบบที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM มีจำนวนสูงกว่าในระบบที่ใช้น้ำกลั่น แสดงว่าสารอาหารช่วยให้แบคทีเรียเจริญและย่อยสลายสารประกอบฟีนอลได้ดีขึ้น นอกจากนี้ระบบการกรองชีวภาพนี้ยังสามารถใช้งานได้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน สำหรับต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อและระบบการกรองชีวภาพขนาดความจุ 3 ลิตร สำหรับบำบัดน้ำเสีย คือ 103 และ 4,280 บาท ตามลำดับ และค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย คือ 0.003 บาทต่อลิตร

6.1.2 ประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นในการบำบัดสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้าย

ในการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบบำบัดขวดเขย่าขนาดเล็กแบบแบทช์โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 2 แหล่ง คือ โรงงาน A จังหวัดสงขลา และโรงงาน B จังหวัดสตูล พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงเกินเกณฑ์มาตรฐานฯ กำหนด การศึกษาเบื้องต้นทดลองในระบบบำบัดขวดเขย่าขนาดเล็กแบบแบทช์โดยใช้น้ำเสียทั้งที่เติมและไม่เติมฟีนอลเพิ่ม พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทั้ง 2 แหล่ง ได้ 100% ที่ความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 6.8 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรีย พบว่าฟีนอลมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียในซิลิกามีจำนวนเพิ่มขึ้น แสดงว่าแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ตรึงบนซิลิกาสามารถเจริญโดยใช้ฟีนอลและสารอินทรีย์อื่นๆ ในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้

เมื่อนำน้ำเสียจากโรงงาน A มาบำบัดโดยระบบการกรองชีวภาพ พบว่าแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 6.8 และ 26.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 100% และ 75.7% ตามลำดับ และเมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงาน B จังหวัดสตูล พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10.7 และ 112.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 100% และ 70.5% ตามลำดับ ระบบการกรองชีวภาพยังสามารถลดค่าซีโอดี และสีได้บางส่วนโดยไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารอื่นๆ เพิ่ม โดยประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการตรึงเซลล์แบคทีเรียในซิลิกายังเป็นการปกป้องแบคทีเรียจากภาวะแวดล้อมที่รุนแรง และสารเคมีอันตรายชนิดอื่นๆ ในน้ำเสีย รวมทั้งระบบมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินระบบค่อนข้างต่ำและสะดวกในการดำเนินการ ผู้วิจัยคาดว่าจะใช้ระบบการกรองชีวภาพนี้สำหรับบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่มีสารประกอบฟีนอลปนเปื้อนได้

6.1.3 ประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นในการบำบัดสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ

ผู้วิจัยได้นำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกามาบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มซึ่งมีสารประกอบฟีนอลความเข้มข้นสูงมาก ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพของน้ำเสียนี้ ในการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในระบบบำบัดขวดเขย่าขนาดเล็กแบบแบทช์ที่

บรรจุน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของโรงงาน B จังหวัดสตูล พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียที่กรองผ่านผ้าขาวบางและไม่ผ่านการกรองได้ประมาณ 59.27% และ 36.90% ภายใน 7 วัน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลเป็นเวลานาน ส่งผลให้ค่า pH ไม่เหมาะสมต่อการนำไปผลิตก๊าซชีวภาพโดยเฉพาะก๊าซมีเทน จากนั้นได้นำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดไปผลิตก๊าซชีวภาพเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล โดยการทดสอบค่า Biochemical Methane Potential (BMP) พบว่าน้ำเสียที่กรองเอาของแข็งออกแล้วนำมาบำบัด น้ำเสียที่ไม่ได้กรองเอาของแข็งออกแล้วนำมาบำบัด และน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด มีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนประมาณ 534, 301 และ 21 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดีทั้งหมด ตามลำดับ เมื่อนำไปประยุกต์ใช้จริงในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม การกรองน้ำเสียก่อนแล้วนำมาบำบัดสารประกอบฟีนอล และนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดไปผลิตก๊าซชีวภาพอาจจะไม่เหมาะสม แต่โดยทั่วไปโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจะมีบ่อกักน้ำเสีย ซึ่งช่วยตกตะกอนของแข็งบางส่วนได้ ดังนั้นน้ำเสียที่ออกจากบ่อกักอาจถือว่าผ่านการกรองเอาของแข็งออกบางส่วนแล้ว ในการทดลองต่อไปจึงนำน้ำเสียจากบ่อกักมาบำบัดสารประกอบฟีนอลแล้วนำไปผลิตก๊าซชีวภาพ อย่างไรก็ตามการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพได้ดีกว่าน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด

เมื่อผู้วิจัยนำระบบการกรองชีวภาพที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกามาใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่เก็บจากบ่อกัก โดยทำการทดลองแบบต่อเนื่องพบว่าระบบการกรองชีวภาพมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอล โดยมีอัตราการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลเมื่อใช้น้ำเสียที่เจือจาง 4 เท่า ประมาณ 8.0 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่าการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลเป็นเวลานานส่งผลให้ค่า pH ไม่เหมาะสมต่อการนำไปผลิตก๊าซชีวภาพโดยเฉพาะก๊าซมีเทน ดังนั้นจึงปรับค่า pH ให้เหมาะสมก่อน จากนั้นนำน้ำที่ผ่านการบำบัดที่เวลาต่างๆ ไปผลิตก๊าซชีวภาพเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล โดยทดสอบความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซมีเทนด้วยวิธีการทดสอบ Specific Methanogenic Activity (SMA) พบว่าตะกอนจุลินทรีย์แอนแอโรบิกจากอำเภอฟุนพินเมื่อนำมาเป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตก๊าซมีเทน โดยใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดมีความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซมีเทนประมาณ 0.2 - 0.3 gCOD CH₄/(g VSS d) และมีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทน (Biochemical Methane Potential; BMP) ประมาณ 347 - 508 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดี ในขณะที่น้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดมีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนเพียง 131 มิลลิลิตรมีเทนต่อกรัมซีโอดี แสดงว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลมีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้นประมาณ 3 - 4 เท่าของน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล ผลจาก

การศึกษายืนยันให้เห็นว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนได้ดีกว่าน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอล

6.1.4 สรุปผลการศึกษา

ในปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยใดนำระบบการกรองชีวภาพแบบ Internal loop Airlift Bioreactor (ILALR) ที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาไปใช้บำบัดสารมลพิษในน้ำเสียจริง ซึ่งงานวิจัยนี้ได้นำระบบการกรองชีวภาพที่บรรจุแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่พัฒนาขึ้นไปใช้บำบัดสารประกอบฟีนอลที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียรบ่อสุดท้ายและน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ผลการศึกษาพบว่าระบบบำบัดมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่างๆ ได้ทั้ง 2 ประเภท ระบบที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถนำมาใช้เพื่อแก้ปัญหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานอุตสาหกรรมฯ และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนเมื่อใช้น้ำเสียที่ปนเปื้อนด้วยสารประกอบฟีนอลเป็นสารตั้งต้นได้ นอกจากนี้การตรวจติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับย่อยสลายฟีนอลด้วยเทคนิค Real-time qPCR ช่วยยืนยันว่าแบคทีเรียที่เติมลงไปในระบบสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งทำให้ทราบถึงจำนวนยีนของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารประกอบฟีนอล ความรู้ที่ได้รับจะช่วยให้ออกแบบระบบบำบัดสารประกอบฟีนอลที่สัมพันธ์กับการทำงานของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาในภาวะต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งสามารถนำระบบไปขยายขนาดและเพิ่มปริมาณแบคทีเรียตรึงตามอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อให้บำบัดน้ำเสียปริมาณมากได้

ข้อดีของระบบการกรองชีวภาพแบบ ILALR ที่พัฒนาขึ้น สรุปได้ดังนี้

- 1) ระบบมีประสิทธิภาพสูงในการบำบัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสีย
- 2) แรงเงื่อนไขเหมาะสมต่อการใช้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเป็นตัวกลาง
- 3) ระบบมี internal loop ทำให้ตัวกลางหมุนวนในระบบได้ดี และช่วยให้ออกซิเจนละลายได้ดียิ่งขึ้น
- 4) สามารถออกแบบให้ถังมีขนาดใหญ่ขึ้น จึงสามารถบำบัดน้ำเสียได้ในปริมาณมาก
- 5) ต้นทุนในการบำบัดค่อนข้างต่ำ

อย่างไรก็ดีระบบการกรองชีวภาพแบบ ILALR ที่พัฒนาขึ้นมีข้อเสียบางประการ สรุปได้ดังนี้

- 1) ระบบใช้แบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่งไม่สามารถกำจัดสีในน้ำเสียได้ และอาจจะเป็นสาเหตุให้พบสารประกอบฟีนอลตกค้าง
- 2) ระบบไม่สามารถเพิ่มปริมาณตัวกลางให้หนาแน่นมากกว่านี้ เพราะตัวกลางจะไม่สามารถหมุนวนได้ จำเป็นต้องพัฒนาตัวกลางที่มีน้ำหนักเบาขึ้น
- 3) การผสมจะมีประสิทธิภาพต่ำลงเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้สาร

อาหารและออกซิเจนภายในถังกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ จึงมีผลต่อการเกิดภาวะจำกัดของสารอาหาร และออกซิเจนได้ง่าย

ผลการศึกษายังทำให้ทราบว่าสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียมีผลต่อแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทนจริง และพบว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลสามารถช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพโดยรวมและปริมาณก๊าซมีเทนได้สูงกว่าน้ำเสียที่ไม่ผ่านการบำบัด ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้รับสามารถนำไปพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มควบคู่กับการพัฒนาเทคโนโลยีระบบการกรองชีวภาพในการบำบัดสารประกอบฟีนอลเบื้องต้นในน้ำเสียก่อนนำน้ำเสียเข้าสู่ระบบก๊าซชีวภาพต่อไป

6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 ควรปรับปรุงประสิทธิภาพของระบบให้สามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลที่ยังคงเหลืออยู่ในน้ำเสีย โดยอาจจะเพิ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่คัดแยกจากแหล่งน้ำเสีย อาทิเช่น *Saccharomyces cerevisiae* (Aksu และ Donmez, 2003), *Bacillus* sp. (Dawkar และคณะ, 2009), *Lactobacillus plantarum* (Limkhuansuwan และ Chaiprasert, 2010), *Phanerochaete chrysosporium* (Kissi และคณะ, 2001; Guimaraes และคณะ, 2005; Asamudo และคณะ, 2005; Rakamthong และ Prasertsan, 2011) เป็นต้น ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดสารประกอบฟีนอล

6.2.2 ควรศึกษาประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพในระดับนำร่อง สำหรับบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดปาล์มน้ำมัน โดยเพิ่มขนาดของถังปฏิกรณ์และเพิ่มปริมาณแบคทีเรียตรงตามอัตราส่วน

6.2.3 เนื่องจากสียังเป็นปัญหาสำคัญของน้ำเสียจากโรงงานสกัดปาล์มน้ำมัน จึงอาจนำราสายพันธุ์ต่างๆ อาทิเช่น *Phanerochaete chrysosporium* (Kissi และคณะ, 2001; Guimaraes และคณะ, 2005; Asamudo และคณะ, 2005; Rakamthong และ Prasertsan, 2011), *Curvularia clavata* (Neoh และคณะ, 2014) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสีมาตรึงเพิ่มในซิลิกาหรือวัสดุอื่นๆ เช่น โฟม (Srikanlayanukul และคณะ, 2008) อัลจิเนต (Daassi และคณะ, 2014) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีไปพร้อมกับการบำบัดสารประกอบฟีนอล

6.2.4 ควรศึกษาประสิทธิภาพของระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้น ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่มีสารประกอบฟีนอลปนเปื้อน

6.2.5 ระบบการกรองชีวภาพที่พัฒนาขึ้นยังคงมีปัญหาเกี่ยวกับค่าไฟฟ้า ซึ่งส่วนใหญ่มาจากปั๊มลมซึ่งมีหน้าที่ให้อากาศและหมุนเวียนเซลล์ตรึง วิธีหนึ่งในการแก้ไขปัญหานี้อาจทำได้โดยพัฒนาเซลล์ตรึงบนซิลิกาให้มีขนาดบางและเบากว่าเดิม โดยดัดแปลงวิธีการสังเคราะห์แบบโซล-เจล อาทิเช่น

เปลี่ยนชนิดของสารตั้งต้น pH และอุณหภูมิ เป็นต้น (Barbé และคณะ, 2005; Milea และคณะ, 2011) เพื่อให้ซิลิกาสามารถลอยตัวและหมุนเวียนในระบบได้ดี จึงไม่จำเป็นต้องใช้ปั๊มลมที่มีกำลังสูง ส่งผลให้ค่าไฟฟ้าในการเดินระบบลดลงได้ หรืออาจจะเปลี่ยนชนิดของวัสดุตั้งเป็นวัสดุที่เบาและลอยน้ำได้ดี เช่น ไคโตซาน (Khondee และคณะ, 2012) โฟม (Patil และคณะ, 2006; Chanthamalee และ Luepromchai, 2012; Martins และคณะ, 2013) เป็นต้น



รายการอ้างอิง

- ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส. (2547). การกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นันทธร เการาช. (2550). การตัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่เรี่ยทนต่อตัวทำละลายจากดิน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปิยะมาศ คงแถม. (2552). การตรึงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนซิลิกาเพื่อใช้ย่อยสลายฟีนอล. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พนิดา โต๊ะสุ. (2555). การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- มันสิน ตันกุลเวศม์. (2542). เทคโนโลยีบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- ศิรินันท์ สุวรรณโณลี. (2547). Airlift bioreactor ถึงปฏิกรณ์สำหรับเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมการไหลเวียนโดยการอัดอากาศ [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.thaiscience.com/lab_vol/p25/airlift_bioreactor.asp สืบค้น 28 กุมภาพันธ์ 2554.
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, 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, 3897–3904.
- Alam, M.Z., Ameem, E.S., Muyibi, S.A., and Kabbashi, N.A. (2009). The factors affecting the performance of activated carbon prepared from oil palm empty fruit bunches for adsorption of phenol. *Chemical Engineering Journal*, 155, 191-198.

- Alvarez, G.S., Desimone, M.F., and Diaz, L.E. (2007). Immobilization of bacteria in silica matrices using citric acid in the sol-gel process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1059–1064.
- Arai, H., Akahira, S., Ohishi, T., Maeda, M., and Kudo, T. (1998). Adaptation of *Cornamonas testosteroni* TAM1 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. *Microbiology*, 144, 2895-2903.
- Bajaj, M., Gallert, C., and Winter, J. (2008). Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. *Bioresource Technology*, 99, 8376–8381.
- Bärlocher, F. and Graca, M.A.S. (2005). Total phenolics. *Springer*, 14, 97-100.
- Basile, L.A., and Erijman, L. (2008). Quantitative assessment of phenol hydroxylase diversity in bioreactors using a functional geneanalysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 863–872.
- Branyik, T., and Kuncova, G. (2000). The use of silica gel prepare by sol-gel method and polyurethane foam as microbial carriers in the continuous degradation of phenol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 168-172.
- Cassidy, M.B., Lee, H., and Trevors, J.T. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells:a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16, 79-101.
- Chan, Y.J., Chong, M.F., Law, C.L. (2012). An integrated anaerobic-aerobic bioreactor (IAAB) for the treatment of palm oil mill effluent (POME): Start-up and steady state performance. *Process Biochemistry*, 47, 485-495.
- Cheah, S.C., Ma, N.N., Ooi, L.C., and Ong, A.S.H. (1988). Biotechnological application for the utilization of wastes from palm oil mills. *Fat Science Technology*, 33, 536-540.
- Chibata, I. (1978). Immobilized Enzymes. *Tokyo : Kadansha Ltd.*
- Cho, Y., Rhee, S., and Lee, S. (2000). Influence of phenol on biodegradation of p-nitrophenol by freely suspended and immobilized *Nocardioides* sp. NSP41. *Biodegradation*, 11, 21-28.
- Cordova-Rosa, S. M., Dams, R. I., Cordova-Rosa, E. V., Radetski, M. R., Corra, A. X. R. and Radetski, C. M. (2009). Remediation of phenol-contaminated soil by a

- bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*, 164, 61-66.
- Devillers, J., Boule, P., Vasseur, P., Prevot, P., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., Benoit-Guyod, J. L., Nendza, M., Grioni, C., Dive, D., and et al. (1990). Environmental and health risks of hydroquinone. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19, 327-354.
- Dhouib, A., Ellouz, M., Aloui, F., and Sayadi, S. (2005). Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 405-411.
- Dong, F.M., Wang, L.L., Wang, C.M., Cheng, J.P., He, Z.Q., Sheng, Z.J., and Shen, R.Q. (1992). Molecular cloning and mapping of phenol degradation genes from *Bacillus stearothermophilus* FDTP-3 and their expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2531-2535.
- Duarte, J.C., Rodrigues, J.A.R., Moran, P.J.S., Valença, G.P., and Nunhez, J.R. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3, 1-8.
- Dubey, S.K. and Hussain, A. (2014). Phenol Biodegradation: A review. *International Journal of Environmental Engineering*, 1, 151-157.
- Ehrt, S., Schirmer, F., and Hillen, W. (1995). Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol-1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *Molecular Microbiology*, 18, 13-20.
- El-Naas, M., Al-Zuhair, S., and Makhlof, S. (2010). Continuous biodegradation of phenol in a spouted bed bioreactor (SBBR). *Chemical Engineering Journal*, 160, 565-570.
- Gami, A. A., Shukor, M.Y., Khalil, K.A., Dahalan, F.A., Khalid, A., and Ahmad, S.A. (2014). Phenol and phenolic compounds toxicity. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*, 2, 11-23.

- Gayathri, K.V. and Vasudevan, N. (2010). Enrichment of phenol degrading moderately halophilic bacterial consortium from saline environment. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 1, 1-6.
- Gharsallah, N., Labat, M., Aloui, F., and Sayadi, S. (1999). The effect of *Phanerochaete chrysosporium* pretreatment of olive mill waste waters on anaerobic digestion. *Resources, Conservation and Recycling*, 27, 187-192.
- Godjevargova, T., Ivanova, D., Aleksieva, Z., and Burdelova, G. (2006). Biodegradation of phenol by immobilized *Trichosporon cutaneum* R57 on modified polymer membranes. *Process Biochemistry*, 41, 2342-2346.
- Greenberg, A.E., Classceri, L.S., and Eaton, A.D. (1992). Phenols. *Standard methods for the determination of water and wastewater*, American Public Health Association, Washington DC, pp. 5.30-35.33.
- Heipieper, H. J., Diefenbach, R., and Keweloh, H. (1992). Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1847-1852.
- Hernandez, J.E., and Edyvean, R.G.J. (2008). Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compound in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 160, 20-28.
- Herrmann, H., Müller, C., Schmidt, I., Mahnke, J., Petruschka, L., and Hahnke, K. (1995). Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas putida* strain H. *Molecular and General Genetics*, 247, 240-246.
- Idris, A. and Suzana, W. (2006). Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41, 1117-1123.
- Kargi, F., and Eker, S. (2005). Removal of 2,4 dichlorophenol and toxicity from synthetic wastewater in a rotating perforated tube film reactor. *Process Biochemistry*, 40, 205-211.

- Khongkhaem, P., Intasiri, A., and Luepromchai, E. (2011). Silica-immobilized *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 degrade high concentrations of phenol. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 448–455.
- Krastanov, A., Alexieva, Z., and Yemendzhiev, H. (2013). Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Engineering in Life Sciences*, 13, 76–87.
- Landete, J. M., Curiel, J.A., Rodriguez, H., Rivas, B., and Munoz, R. (2008). Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry*, 107, 320–326.
- Limkhuansuwan, V. a. C., P. (2010). Decolorization of molasses melanoidins and palm oil mill effluent phenolic compounds by fermentative lactic acid bacteria. *Journal of Environmental Sciences*, 22, 1209–1217.
- Liu, Y. J., Zhanga, A.N., and Wang, X.C. (2009). Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 187–192.
- Mahiudddin, M., Fakhruddin, A.N.M., and Mahin, A.Al. (2012). Degradation of phenol via Meta cleavage pathway by *Pseudomonas fluorescens* PU1. *ISRN Microbiology*, 2012, 1–6.
- Maniyam, M. N., Sjahrir, F., Ibrahim, A.L., and Cass, A.E.G. (2012). Cyanide degradation by immobilized cells of *Rhodococcus* UKMP-5M. *Biologia*, 67, 837–844.
- Martinez-Garcia, G., Johnson, A.C., Bachmann, R.T., Williams, C.J., Burgoyne, A., and Edyvean, R.G.J. (2007). Two-stage biological treatment of olive mill wastewater with whey as co-substrate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59, 273–282.
- McLoughlin, A. (1994). Controlled release of immobilised cells as a strategy to regulate ecological competence of inocula. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 51, 1–46.
- Merimaa, M., Heinaru, E., Liivak, M., Vedler, E., and Heinaru, A. (2006). Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes. *Archive Microbiology*, 186, 287–296.

- Mohite, B.V., Ejalgaonwala, R., Pawar, S., and Morankar, A. (2010). Isolation and characterization of phenol degradation bacteria from oil contaminated soil. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 7, 61-65.
- Moody, L., Burns, R., Wu-Haan, W., and Spajis, R. (2009). Use of Biochemical Methane Potential (BMP) assays for predicting and enhancing anaerobic digester performance. *Agricultural Engineering*, 44, 930-934.
- Mordocco, A., Kuek, C., and Jenkins, R. (1999). Continuous degradation of phenol at low concentration using immobilized *Pseudomonas putida*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 530-536.
- Nassif, N., Bouvet, O., Rager, M. N., Roux, C., Coradin, T., and Livage, J. (2002). Living bacteria in silica gels. *Nature Materials*, 1, 42-44.
- Ng, L. C., Shingler, V., Szea, C.C., and Poh, C.L. (1994). Cloning and sequences of the first eight genes of the chromosomally encoded (methyl)phenol degradation pathway from *Pseudomonas putida* P35X. *Gene*, 151, 29-36.
- Nikhitha, P. and Shibu, K. (2009). Removal of phenol from wastewater using Moving Bed Biofilm Reactor. 10th National Conference on Technological Trends (NCTT09).
- Nordlund, I., Powlowski, J., and Shingler, V. (1990). Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *Journal of Bacteriology*, 172, 6826-6833.
- Omokoko, B., Jantges, U.K., Zimmermann, M., Reiss, M., and Hartmeier, W. (2008). Isolation of the phe-operon from *G. stearothermophilus* comprising the phenol degradative meta-pathway genes and a novel transcriptional regulator. *BMC Microbiology*, 8, 197-207.
- Onyia, C.O., Uyub, A.M., Akunna, J.C., Norulaini, N.A., and Omar, A.K.M. (2001). Increasing the fertilizer value of palm oil mill sludge: bioaugmentation in nitrification. *Water Science and Technology*, 44, 157-162.
- Pazarlioglu, N.K. and Telefoncu, A. (2005). Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles. *Process Biochemistry*, 40, 1807-1814.

- Perez, M., Romero, L.I., and Sales, D. (2001). Organic matter degradation kinetics in an anaerobic thermophilic fluidized bed bioreactor. *Anaerobe*, 7, 25-35.
- Pishgara, R., Najafpourb, G. D., Mousavia, N., Bakhshia, Z., and Khorramib, M. (2012). Phenol biodegradation kinetics in the presence of supplementary substrate. *International Journal of Engineering*, 25, 181-191.
- Quan, X., Hanchang, S., Yongming, Z., Jianlong, W., and Yi, Q. (2003). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol in an air-lift honeycomb-like ceramic reactor. *Process Biochemistry*, 38, 1545-1551.
- Rai University. (2004). Lesson 6: Types of Bioreactor [online]. Available online at: [http://www.rocw.raifoundation.org/biotechnology/MScBioinformatics/industrial biotechnology/lecture-notes/lecture-06.pdf](http://www.rocw.raifoundation.org/biotechnology/MScBioinformatics/industrial%20biotechnology/lecture-notes/lecture-06.pdf). Accessed 25 February 2011.
- Rozzi, A.E. (2004). Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3, 93-115.
- Saifuddin, N., Saltanat, A., and Refal, H. (2014). Enhancing the removal of phenolic compounds from palm oil mill effluent by enzymatic pre-treatment and microwave-assisted extraction. *Chemical Science Transactions*, 3, doi: 10.7598/cst2014.797
- Santos, V.L., Monteiro, A.S., Braga, D.T., and Santoro, M.M. (2008). Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 1413-1420.
- Saravanan, P., Pakshirajan, K., and Saha, P. (2009). Treatment of phenolics containing synthetic wastewater in an internal loop airlift bioreactor (ILALR) using indigenous mixed strain of *Pseudomonas* sp. under continuous mode of operation. *Bioresource Technology*, 100, 4111-4116.
- Saravanan, P., Pakshirajan, K., and Saha, P. (2011a). Repeated batch operation of internal loop airlift bioreactor in degrading phenolics as single and mixed substrate by using predominantly *Pseudomonas* sp. *Sustainable Environment Research*, 21, 135-140.

- Saravanan, P., Pakshirajan, K., and Saha, P. (2011b). Studies on growth kinetics of predominantly *Pseudomonas* sp. in internal loop airlift bioreactor using phenol and m-cresol. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28, 1550-1555.
- Saravanan, P., Pakshirajan, K., and Saha, P. (2008). Biodegradation of phenol and m-cresol in a batch and fed batch operated internal loop airlift bioreactor by indigenous mixed microbial culture predominantly *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*, 99, 8553–8558.
- Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M., and Aloui, F. (2000). Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*, 35, 725-735.
- Schirmer, F. and Hillen, W. (1998). The *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250 mop operon mRNA is differentially degraded, resulting in a higher level of the 3' CatA-encoding segment than of the 5' phenol hydroxylase encoding portion. *Molecular and General Genetics*, 257, 330-337.
- Shalaby, M.S.H. (2003). Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by *Burkholderia cepacia* G4. Ph.D. thesis, Technische University Carolo-Wilhelmina, Germany.
- Shingler, V., Christopher, F., Franklin, N., Tsuda, M., Holroyd, D., and Bagdasarian, M. (1989). Molecular Analysis of a Plasmid-encoded Phenol Hydroxylase from *Pseudomonas* CF6QQ. *Journal of General Microbiology*, 135, 1083-1092.
- Sorathia, S.H., Rathod, P.P., and Sorathiya, A.S. (2012). Bio-gas generation and factors affecting the bio-gas generation-A review study. *International Journal of Advanced Engineering Technology*, 3, 72-72.
- Sun, L., Wan, S., Yu, Z., Wang, Y., and Wang, S. (2012). Anaerobic biological treatment of high strength cassava starch wastewater in a new type up-flow multistage anaerobic reactor. *Bioresource Technology*, 104, 280–288.
- Sundram, K., Sambanthamurthi, R., and Tan, Y.A. (2003). Palm fruit chemistry and nutrition Asia Pacific. *Journal of Clinical Nutrition*, 12, 355–362.
- Takeo, M., Maeda, Y., Okada, H., Miyama, K., Mori, K., Ike, M., and Fujita, M. (1996). Molecular cloning and sequencing of the phenol hydroxylase gene from

- Pseudomonas putida* BH. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 485-488.
- Tan, Y.A., Sambanthamurthi, R., Sundram, K., and Mohd, Basri, W. (2007). Valorisation of palm by-products as functional components. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 380–393.
- Tomei, M.C., Rita, S., Angelucci, D.M., and Daugulis, A.J. (2011). Solid-liquid partitioning bioreactors applied to the removal of mixtures of phenolic compounds. *Chemical Engineering Transactions* 24, 1243-1248.
- van Schie, P.M. and Young, R.J. (2000). Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation Journal*, 4, 1-18.
- Varga, J.M., and Neujahr, H. Y. (1970). Isolation from soil of phenol-utilizing organisms and metabolic studies on the pathways of phenol degradation. *Plant and Soil*, 33, 565-571.
- Viggiani, A., Olivieri, G., Siani, L., Donato, A. Di., Marzocchella, A., Salatino, P., Barbieri, P., and Galli, E. (2006). An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Journal of Biotechnology*, 123, 464–477.
- Wang, Y., Tian, Y., Han, B., Zhao, H.B., Bi, J.N., and Cai, B.L. (2007). Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 222-225.
- Wouters, K., Maes, E., Spitz, J.-A., Roeffaers, M.B.J., Wattiau, P., Hofkens, J., and Springael, D. (2010). A non-invasive fluorescent staining procedure allows Confocal Laser Scanning Microscopy based imaging of *Mycobacterium* in multispecies biofilms colonizing and degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Microbiological Methods*, 83, 317-325.
- Xiangchun, Q., and Zhang, Y.M. (2003). Biodegradation of 2,4 dichlorophenol in an airlift honeycomb like ceramic reactor. *Process Biochemistry*, 38, 1545-1551.
- Zhan, Y., Yu, H., Yan, Y, Ping, S., Lu, W., Zhang, W., Chen, M., and Lin, M. (2009). Benzoate catabolite repression of the phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2. *Current Microbiology*, 59, 368–373.

Zhao, G., Zhou, L., Li, Y., Liu, X., Ren, X., and Liu, X. (2009). Enhancement of phenol degradation using immobilized microorganisms and organic modified montmorillonite in a two-phase partitioning bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 169, 402–410.

Zhou, Z., Li, G., and Li, Y. (2010). Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 3, 21-26.

US EPA. (2013). Emerging technologies for wastewater treatment and in-plant wet weather management [online]. Available online at: <http://water.epa.gov/scitech/wastetech/publications.cfm>. Accessed 12 October 2014.





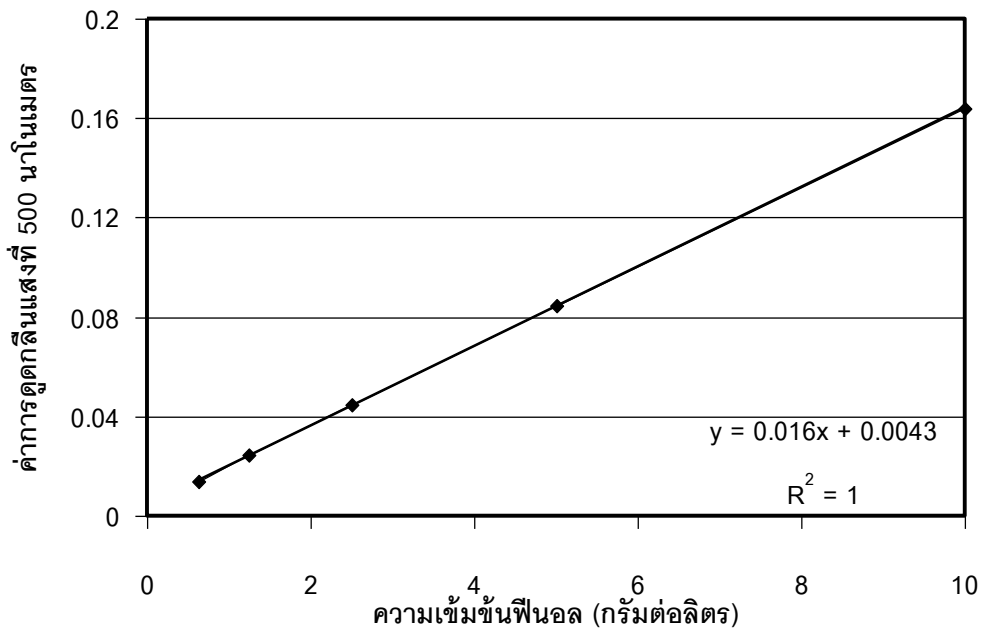
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานของฟีนอลและสารประกอบฟีนอล

ก.1 กราฟมาตรฐานของฟีนอลที่ความเจือจาง 10,000 เท่า

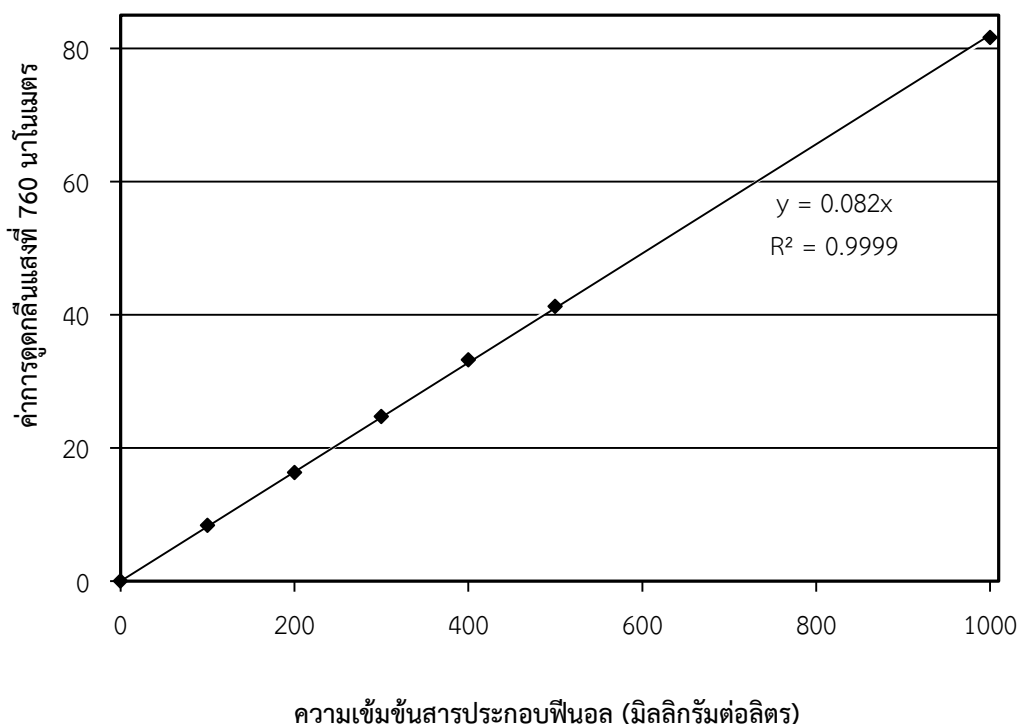


รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของฟีนอลที่ความเจือจาง 10,000 เท่า โดย UV-Visible

วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานของฟีนอลตามวิธีของ Greenberg และคณะ (1992)

ชั่งฟีนอลหนัก 10,000, 5,000, 2,500, 1,250, และ 625 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมสารดังต่อไปนี้ 0.5 N สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 2.5 มิลลิลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิลิตร 4-อะมิโนแอนติไพรีน 1 มิลลิลิตร และ โปแตสเซียมเพอริกไซยาไนด์ 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่มีฟีนอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที โดยจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟีนอล และ 4-อะมิโนแอนติไพรีน ซึ่งเป็น color reagent ในสภาวะที่มีโปแตสเซียมเพอริกไซยาไนด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น antipyrine dye ที่มีสีแดง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรเพื่อหาเปอร์เซ็นต์ ฟีนอลที่เหลือ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

ก.2 กราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลที่ความเจือจาง 52 เท่า



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลที่ความเจือจาง 52 เท่า โดย UV-Visible

วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลตามวิธีของ Barlocher และ Graca (2005)

ชั่งสารประกอบฟีนอล (tannic acid) หนัก 1,000, 500, 400, 300, 200, และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมสารดังต่อไปนี้ น้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ตัวอย่างที่มีสารประกอบฟีนอล 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นเติม 2% โซเดียมคาร์บอเนตใน 0.1N โซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เมื่อครบ 5 นาที เติม Folin-Ciocalteu reagent 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ 120 นาที ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ สารประกอบฟีนอลที่เหลือ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาคผนวก ข
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM)

สารละลาย A

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.8	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย B

เฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม ต่อมิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม ต่อมิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม ต่อมิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

ผสมสารละลาย B ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย A ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 M

EDTA (C ₁₀ H ₁₄ O ₈ Na ₂ ·2H ₂ O)	186.1	กรัม
NaOH	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากัน รอให้เย็นลง แล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 เติมน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มล. ปล่อยให้เย็นด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า

Tris-HCl	242	กรัม
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 M	100	มล.
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตร 1,000 มล. ปล่อยให้เย็นด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	20	มล.
น้ำกลั่น	980	มล.

อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9%

อะกาโรสเจล	0.9	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มล.

หลอมให้เข้ากันโดยการต้มให้ความร้อน

อะกาโรสเจลเข้มข้น 2.0%

อะกาโรสเจล	2.0	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มล.

หลอมให้เข้ากันโดยการต้มให้ความร้อน

บัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 mM	10	มล.
-------------------------------	----	-----

EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.1 mM	0.2	มล.
----------------------------	-----	-----

เติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มล. นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 µg/ml

เอธิเดียมโบรไมด์	0.1	มก.
------------------	-----	-----

น้ำกลั่น	10	มล.
----------	----	-----

ละลายให้เข้ากัน และเก็บในภาชนะปิดสนิท ในที่มืด

20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	20	กรัม
----------------------	----	------

ค่อยๆ ละลาย SDS ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้ออุณหภูมิ 60 °ซ ปริมาตร 80 มล. เมื่อสารละลายหมด เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มล. นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

20% สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K)

โปรตีนเนสเค	20	มก.
-------------	----	-----

น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	มล.
-----------------------	---	-----

สารละลาย Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 mM

Trizma base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	1.2	กรัม
---	-----	------

ละลายสารในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 1,000 มล. นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

สารละลาย CTAB/NaCl

CTAB	10	กรัม
NaCl	4.1	กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 65 °C ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติม NaCl เข้มข้น 0.7 M เมื่อสารละลายหมด เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 : 1 (v/v) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

เตรียมสารละลายฟีนอลอิมิตัวในบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยละลายฟีนอลในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68 °C และเติมผง hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้น 0.1%(w/w) จากนั้นเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 1 เท่า คนสารละลายเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น และดูดชั้นน้ำส่วนบนออก เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 1 เท่า ผสมด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก ทำขั้นนี้ซ้ำหลายๆ ครั้ง จนค่า pH ของฟีนอลมากกว่า 7.8 ขั้นสุดท้ายเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 0.1 M ที่ผสม β -mercaptoethanol (0.2 %w/v) ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายฟีนอลที่เตรียมได้ เก็บสารละลายฟีนอลในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C ผสมสารละลายฟีนอลที่เตรียมได้กับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C

สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicillin)

แอมพิซิลิน	100	มก.
น้ำปลอดประจุ	1	มล.

ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μ m

2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal)

X-gal	20	มก.
Dimethylformamide (DMF)	1	มล.

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกรอง 0.2 μ m

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 1 M

IPTG	238	มก.
น้ำปลอดประจุ	1	มล.

ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μ m

สารละลาย TfbI

โพแทสเซียมอะซิเตท (CH_3COOK)	0.295	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.148	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)	0.99	กรัม
กลีเซอรอล	15	มล.

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มล. ปรับค่า pH ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 M จนได้ค่า pH เท่ากับ 5.8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μ m

สารละลาย TfbII

2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES)	0.29	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	0.121	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.103	กรัม
กลีเซอรอล	15	มล.

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มล. เมื่อสารละลายหมด ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μ m

ภาคผนวก ง

ข้อมูลดิบ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนฟีนอลไฮดรอกซิเลส (*LmPH* gene) ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylobacterium* sp. NP3

ง.1 NP3_3

GATTGTGGCCATGTCGCCATTGAGCTTGAGCGGGGAGTTCGCCGGGATCTGGGCGTAGGCCTC
GTTTCGAGCGCTCGGTCTGCTTCATCCGGTCGAGGGTGTTCGGCGAGCGTGAGGCGCGCCACCCG
GTGCTCGGGAGCGAGGTAGAGGGCGAGCCGGAGATAGACGACCGCCGGCAGCTCATCGCCTTG
CGTCGAGCCGGCGGAGCCGAGCCCGTAGAGCACTTCGGCCGCGCCCTCCTGCGCCGACGCGAT
CAGCGGCGGCAGGGGCTTGCCGGCCTTGAGCTTGTTCGAGGGCGTCCACCACCATCGGGTGGCG
CGGCATCGCCTTCTCGAACTGGCTGTAGGCATCGATGGCGAGATCGGTGCGACAGAT

ง.2 NP3_4

GATTGTGGCCATGTCGCCATTGAGCTTGAGCGGGGAGTTCGCCGGGATCTGGGCGTAGGCCTC
GTTTCGAGCGCTCGGTCTGCTTCATCCGGTCGAGGGTGTTCGGCGAGCGTGAGGCGCGCCACCCG
GTGCTCGGGAGCGAGGTAGAGGGCGAGCCGGAGATAGACGACCGCCGGCAGCTCATCGCCTTG
CGTCGAGCCGGCGGAGCCGAGCCCGTAGAGCACTTCGGCCGCGCCCTCCTGCGCCGACGCGAT
CAGCGGCGGCAGGGGCTTGCCGGCCTTGAGCTTGTTCGAGGGCGTCCACCACCATCGGGTGGCG
CGGCATCGCCTTCTCGAACTGGCTGTAGGCATCGATGGCGAGATCGGTGCGACCGAT

ง.3 NP3_5

GCGGGAATTCGATTCCAGTCCGAAAAAGAGCGCAAGTTGAAGGCGGCGTTCGACGCCGACCAC
AACACCCTGCGCATCGTCGATGCCTATGCCCGCTTCGAGGCCGGGATCGGTGCGACCGATCTCG
CCATCGATGCCTACAGCCAGTTCGAGAAGGCGATGCCGCGCCACCCGATGGTGGTGGACGCCC
TCGACAAGCTCAAGGCCGGCAAGCCCCTGCCGCCGCTGATCGCGTCGGCGCAGGAGGGCGCGG
CCGAAGTGCTCTACGGGCTCGGCTCCGCCGGCTCGACGCAAGGCGATGAGCTGCCGGCGGTTCG
TCTATCTCCGGCTCGCCCTCTACCTCGTCCCGAGCACGCGGTGGCGCGCCTCACGCTCGCCGA
CACCCCTGACCCGGATGAAGCAGACCGAGCGCTCGAACGAGGCCTACGCCACATCCCGGCGAA
CTCCCCGCTCAAGCTCACTGGCGACATGG

ง.4 NP3_6

CGATTCAGTCTGAAAAGGAGCGCAAGTTGAAGGCGGCGTTTCGACGCCGACCACAACACCCTG
 CGCATCGCCGATGCCTATGCCCCGTTTCGAGGCCGGATCGGTTCGCACCGATCTCGCCATCGAT
 GCCTACAGCCAGTTCGAGAAGGCGATGCCGCGCCACCCGATGGTGGTGGACGCCCTCGACAAG
 CTCAAGGCCGGCAAGCCCCTGCCGCCGCTGATCGCGTCGGCGCAGGAGGGCGCGGCCGAAGTG
 CTCTACGGGCTCGGCTCCGCCGGCTCGACGCAAGGCGATGAGCTGCCGGCGGTCTGTCTATCTC
 CGGCTCGCCCTTACCTCGCTCCCAGCACGCGGTGGCGCGCCTCACGCTCGCCGACACCCTC
 GACCGGATGAAGCAGACCGAGCGCTCGAACGAGGCCTACGCCCAGAT

ง.5 NP3_7

C TTCATCCGGTCGAGGGTGTGCGCGAGCGTGAGGCGCGCCACCGCGTGCTCGGGAGCGAGGTA
 GAGGGCGAGCCGGAGATAGACGACCGCCGGCAGCTCATCGCCTTGCGTCGAGCCGGCGGAGCC
 GAGCCCGTAGAGCACTTCGGCCGCGCCCTCCTGCGCCGACGCGATCAGCGGCGGCAGGGGCTT
 GCCGGCCTTGAGCTTGTCGAGGGCGTCCACCACCATCGGGTGGCGCGGCATCGCCTTCTCGAA
 CTGGCTGTAGGCATCGATGGCGAGATCGGTGCGACCGATCCC GGCTCGAAGCGGGCA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนฟีนอลไฮดรอกซิเลส (*LmPH* gene) ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์
Acinetobacter sp. PK1

ง.6 PK1_1

TCTTCATGCTGTTTCGAGCAAGAATTTACGATTTCAAGACCAAGCGTCATGTGACGAGCTTCAT
 CTGACTGCGCACTAAAACCAAAGGTCACGGTTGCCATATCGCCGTTATAAGCTGCACCCGACAT
 AAACGGCACAAACAGCAAGTTGGTAAGTACATATTCAAAGCAAACCTAATGGCTAATAAAAAT
 TCGAAAGGGCCAGCAGAACGGGCGTCTTCAAAAAATGATTTAGGTACAGACAAATACCAAACGC
 GGTCATGCATGTGCGCCCAGTCCTGAAAACCATCAAAGAACTTGTTGTAATGGCTCATGGCATG
 AATTTGGGTCTGTACATGACGCAGCTCATCAATCGACTGCATCTGAGAAGCAATACGTGCTCCA
 ATACCACTAAATTGGCGACCTACATGGGCATAGCCTTGATAAGCCTGATATTCAAGTGGAGTCA
 CCGCTGTTAAAAGAGTTTGATCGCATTTAAGTAGCGTTCATTGCTGACATTCATCTGACCATTG
 TTTTGAGCAAACGCATCAAAAATGGCAT

ง.7 PK1_2

TATGCCATTTTTGATGCGTTTTGCTCAAACAATGGTCAGATGAATGTCAGCAATGAACGCTACTT
AAATGCGATCAAACCTCTTTTTAACAGCGGTGACTCCACTTGAATATCAGGCTTATCAAGGCTAT
GCCCATGTAGGTGCGCAATTTAGTGGTATTGGAGCACGTATTGCTTCTCAGATGCAGTCGATTG
ATGAGCTGCGTCATGTACAGACCCAAATTCATGCCATGAGCCATTACAACAAGTTCTTTGATGG
TTTTCAGGACTGGGCGCACATGCATGACCGCGTTTTGGTATTTGTCTGTACCTAAATCATTTTTTG
AAGACGCCCCGTTCTGCTGGCCCTTTTGAATTTTTATTAGCCATTAGTTTTGCTCTTGAATATGTA
CTTACCAACTTGCTGTTTGTGCCGTTTATGTCCGGTGCAGCTTATAACGGCGATATGGCAACCG
TGACCTTTGGTTTTAGTGCGCAGTCAGATGAAGCTCGTCACATGACGCTTGGTCTTGAAATCGT
GAAATTCCTTGCTCGAACAGCATG



ตารางที่ ง.1 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ย่อยสลายฟีนอล

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
NP3_3	hypothetical protein	Mpop_3305	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	-	93	YP_001925 991.1	Copeland และคณะ (2008)
NP3_4	hypothetical protein	Mpop_3305	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	-	94	YP_001925 991.1	Copeland และคณะ (2008)
NP3_5	hypothetical protein	Mpop_3305	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	-	91	YP_001925 991.1	Copeland และคณะ (2008)
NP3_6	hypothetical protein	Mpop_3305	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	-	93	YP_001925 991.1	Copeland และคณะ (2008)
NP3_7	hypothetical protein	Mpop_3305	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	-	96	YP_001925 991.1	Copeland และคณะ (2008)
PK1_1	Phenol hydroxylase	large subunit of a multicomponent phenol hydroxylase (mPH)	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	phenol	99	ACJ38077. 1	Sandhu และคณะ (2009)

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
PK1_2	Phenol hydroxylase	large subunit of a multicomponent phenol hydroxylase (mPH)	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	phenol	99	ACJ38077.1	Sandhu และคณะ (2009)



ตารางที่ ง.2 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 9

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	10.20	8.50	10.90	9.87	1.23
4	26.20	24.50	27.10	25.93	1.32
6	51.20	51.50	53.10	51.93	1.02
8	61.20	64.00	66.10	63.77	2.46
10	86.20	90.00	91.10	89.10	2.57
13	99.20	99.50	104.10	100.93	2.75
15	117.70	116.50	123.10	119.10	3.52
18	131.70	137.80	137.10	135.53	3.34
20	146.70	150.80	149.10	148.87	2.06
22	160.70	162.10	160.10	160.97	1.03
24	162.70	165.10	164.10	163.97	1.21
27	164.70	168.10	167.10	166.63	1.75
29	167.40	172.10	171.30	170.27	2.51
32	170.40	175.40	174.30	173.37	2.63
36	174.40	179.40	178.50	177.43	2.67
39	177.30	182.40	181.50	180.40	2.72
43	180.30	185.10	184.40	183.27	2.59
47	182.80	188.10	187.50	186.13	2.90
53	185.10	190.60	190.20	188.63	3.07
60	186.80	192.40	192.10	190.43	3.15
67	189.50	195.40	195.10	193.33	3.32
74	194.50	198.40	200.90	197.93	3.23
81	203.50	200.90	211.10	205.17	5.30

ตารางที่ ง.3 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 9

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซมีเทน (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	Gompertz model (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่					ตัวอย่างที่				
	1	2	3			1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.40	8.29	8.72	8.47	0.22
2	7.42	6.18	7.93	7.18	0.90	18.61	18.36	19.30	18.76	0.48
4	19.06	17.82	19.71	18.86	0.96	33.06	32.62	34.28	33.32	0.86
6	37.24	37.46	38.62	37.77	0.74	50.08	49.42	51.93	50.48	1.30
8	44.51	46.55	48.07	46.38	1.79	67.62	66.73	70.12	68.16	1.75
10	62.69	65.46	66.26	64.80	1.87	84.02	82.92	87.12	84.69	2.18
13	72.15	72.37	75.71	73.41	2.00	104.52	103.15	108.38	105.35	2.71
15	85.60	84.73	89.53	86.62	2.56	115.10	113.59	119.35	116.02	2.99
18	95.79	100.22	99.71	98.57	2.43	126.83	125.17	131.51	127.84	3.29
20	106.69	109.68	108.44	108.27	1.50	132.39	130.65	137.28	133.44	3.44
22	116.88	117.90	116.44	117.07	0.75	136.55	134.76	141.60	137.64	3.54
24	118.33	120.08	119.35	119.25	0.88	139.65	137.82	144.81	140.76	3.62
27	119.79	122.26	121.53	121.19	1.27	142.83	140.96	148.11	143.97	3.71
29	121.75	125.17	124.59	123.83	1.83	144.26	142.37	149.59	145.41	3.74
32	123.93	127.57	126.77	126.09	1.91	145.71	143.80	151.10	146.87	3.78
36	126.84	130.48	129.82	129.05	1.94	146.83	144.90	152.25	148.00	3.81
39	128.95	132.66	132.00	131.20	1.98	147.30	145.37	152.74	148.47	3.82
43	131.13	134.62	134.11	133.29	1.89	147.66	145.73	153.12	148.84	3.83
47	132.95	136.81	136.37	135.37	2.11	147.85	145.92	153.31	149.03	3.84
53	134.62	138.62	138.33	137.19	2.23	147.98	146.04	153.45	149.16	3.84
60	135.86	139.93	139.71	138.50	2.29	148.03	146.10	153.50	149.21	3.84
67	137.82	142.11	141.90	140.61	2.42	148.05	146.11	153.52	149.23	3.84
74	141.46	144.30	146.11	143.96	2.35	148.06	146.12	153.53	149.23	3.84
81	148.01	146.11	153.53	149.22	3.85	148.06	146.12	153.53	149.24	3.84

ตารางที่ ง.4 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 14

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	12.50	11.20	12.90	12.20	0.89
4	29.30	27.20	29.50	28.67	1.27
6	49.80	51.20	51.50	50.83	0.91
8	60.80	61.70	56.00	59.50	3.06
10	82.80	87.70	79.00	83.17	4.36
13	100.80	101.20	96.00	99.33	2.89
15	120.30	120.40	115.50	118.73	2.80
18	133.30	133.40	130.50	132.40	1.65
20	148.30	144.20	140.50	144.33	3.90
22	164.30	157.20	153.50	158.33	5.49
24	166.30	161.20	156.50	161.33	4.90
27	168.80	164.20	159.50	164.17	4.65
29	171.30	168.40	163.20	167.63	4.10
32	175.80	172.40	166.50	171.57	4.71
36	180.30	176.40	170.50	175.73	4.93
39	183.80	180.20	174.70	179.57	4.58
43	187.00	183.70	178.20	182.97	4.45
47	190.50	186.90	182.20	186.53	4.16
53	193.50	190.30	186.20	190.00	3.66
60	195.80	192.60	188.80	192.40	3.50
67	198.80	195.80	192.00	195.53	3.41
74	201.20	198.60	194.90	198.23	3.17
81	203.20	201.20	197.70	200.70	2.78

ตารางที่ ง.5 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 14

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซมีเทน (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	Gompertz model (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่					ตัวอย่างที่				
	1	2	3			1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.31	7.24	7.11	7.22	0.10
2	7.56	6.78	7.80	7.38	0.54	15.73	15.58	15.31	15.54	0.22
4	17.73	16.46	17.85	17.34	0.77	27.50	27.23	26.76	27.17	0.38
6	30.13	30.98	31.16	30.75	0.55	41.31	40.90	40.19	40.80	0.57
8	36.78	37.33	33.88	36.00	1.85	55.56	55.01	54.05	54.87	0.76
10	50.09	53.06	47.80	50.32	2.64	68.94	68.26	67.07	68.09	0.95
13	60.98	61.23	58.08	60.10	1.75	85.81	84.96	83.48	84.75	1.18
15	72.78	72.84	69.88	71.83	1.69	94.61	93.68	92.05	93.45	1.30
18	80.65	80.71	78.95	80.10	1.00	104.47	103.44	101.64	103.18	1.43
20	89.72	87.24	85.00	87.32	2.36	109.19	108.12	106.24	107.85	1.50
22	99.40	95.11	92.87	95.79	3.32	112.77	111.66	109.71	111.38	1.55
24	100.61	97.53	94.68	97.61	2.97	115.45	114.31	112.32	114.02	1.58
27	102.12	99.34	96.50	99.32	2.81	118.23	117.06	115.02	116.77	1.62
29	103.64	101.88	98.74	101.42	2.48	119.49	118.31	116.25	118.02	1.64
32	106.36	104.30	100.73	103.80	2.85	120.78	119.59	117.51	119.30	1.66
36	109.08	106.72	103.15	106.32	2.99	121.79	120.59	118.49	120.29	1.67
39	111.20	109.02	105.69	108.64	2.77	122.22	121.02	118.91	120.72	1.68
43	113.14	111.14	107.81	110.69	2.69	122.56	121.35	119.24	121.05	1.68
47	115.25	113.07	110.23	112.85	2.52	122.74	121.53	119.41	121.23	1.68
53	117.07	115.13	112.65	114.95	2.21	122.86	121.65	119.53	121.35	1.68
60	118.46	116.52	114.22	116.40	2.12	122.91	121.70	119.58	121.40	1.69
67	120.27	118.46	116.16	118.30	2.06	122.93	121.72	119.60	121.42	1.69
74	121.73	120.15	117.91	119.93	1.92	122.94	121.73	119.61	121.42	1.69
81	122.94	121.73	119.61	121.42	1.68	122.94	121.73	119.61	121.43	1.69

ตารางที่ ง.6 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 25

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	12.50	12.50	12.20	12.40	0.17
4	28.80	28.50	28.20	28.50	0.30
6	52.30	54.50	53.20	53.33	1.11
8	58.30	60.30	58.70	59.10	1.06
10	79.80	83.30	81.70	81.60	1.75
13	88.80	87.80	86.70	87.77	1.05
15	108.80	107.50	106.20	107.50	1.30
18	126.30	137.00	136.20	133.17	5.96
20	136.30	148.00	149.20	144.50	7.13
22	149.30	160.00	161.20	156.83	6.55
24	153.30	164.40	164.50	160.73	6.44
27	166.60	166.90	167.80	167.10	0.62
29	171.10	171.90	171.00	171.33	0.49
32	174.50	176.20	175.30	175.33	0.85
36	178.50	180.20	179.80	179.50	0.89
39	181.00	183.70	182.60	182.43	1.36
43	183.00	186.70	185.50	185.07	1.89
47	185.00	189.70	188.00	187.57	2.38
53	186.50	191.70	189.00	189.07	2.60
60	187.50	192.60	189.70	189.93	2.56
67	189.00	194.10	191.40	191.50	2.55
74	190.20	195.50	192.90	192.87	2.65
81	191.70	196.90	214.30	200.97	11.84

ตารางที่ ง.7 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 25

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซมีเทน (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	Gompertz model (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่					ตัวอย่างที่				
	1	2	3			1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.75	8.99	9.78	9.17	0.54
2	9.39	9.39	9.17	9.32	0.13	17.40	17.87	19.45	18.24	1.07
4	21.64	21.41	21.19	21.41	0.23	29.24	30.03	32.68	30.65	1.81
6	39.29	40.95	39.97	40.07	0.83	43.25	44.42	48.35	45.34	2.67
8	43.80	45.30	44.10	44.40	0.80	58.11	59.68	64.96	60.92	3.59
10	59.95	62.58	61.38	61.31	1.32	72.61	74.58	81.17	76.12	4.48
13	66.72	65.96	65.14	65.94	0.79	91.94	94.44	102.78	96.39	5.68
15	81.74	80.76	79.79	80.76	0.98	102.65	105.44	114.75	107.61	6.34
18	94.89	102.93	102.33	100.05	4.48	115.36	118.49	128.96	120.94	7.12
20	102.40	111.19	112.09	108.56	5.35	121.82	125.12	136.18	127.71	7.52
22	112.17	120.21	121.11	117.83	4.92	126.93	130.37	141.89	133.07	7.84
24	115.17	123.51	123.59	120.76	4.84	130.93	134.48	146.36	137.26	8.08
27	125.17	125.39	126.07	125.54	0.47	135.30	138.97	151.25	141.84	8.35
29	128.55	129.15	128.47	128.72	0.37	137.39	141.12	153.59	144.03	8.48
32	131.10	132.38	131.70	131.73	0.64	139.64	143.43	156.10	146.39	8.62
36	134.11	135.38	135.08	134.86	0.67	141.51	145.35	158.19	148.35	8.74
39	135.99	138.01	137.19	137.06	1.02	142.37	146.24	159.16	149.25	8.79
43	137.49	140.27	139.37	139.04	1.42	143.08	146.96	159.95	150.00	8.83
47	138.99	142.52	141.24	140.92	1.79	143.48	147.38	160.40	150.42	8.86
53	140.12	144.02	142.00	142.05	1.95	143.79	147.69	160.74	150.74	8.88
60	140.87	144.70	142.52	142.70	1.92	143.93	147.84	160.90	150.89	8.89
67	142.00	145.83	143.80	143.87	1.92	143.99	147.90	160.96	150.95	8.89
74	142.90	146.88	144.93	144.90	1.99	144.01	147.92	160.99	150.97	8.89
81	144.02	147.93	161.00	150.99	8.89	144.02	147.93	160.99	150.98	8.89

ตารางที่ ง.8 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 34

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	13.30	12.00	13.50	12.93	0.81
4	28.50	27.50	28.60	28.20	0.61
6	53.50	52.00	49.60	51.70	1.97
8	61.00	57.00	60.60	59.53	2.20
10	86.00	82.50	80.60	83.03	2.74
13	100.00	92.50	88.60	93.70	5.79
15	118.50	112.50	106.60	112.53	5.95
18	129.50	122.00	122.90	124.80	4.10
20	140.50	132.00	134.90	135.80	4.32
22	152.50	145.00	145.40	147.63	4.22
24	154.50	148.00	148.90	150.47	3.52
27	157.50	151.00	150.90	153.13	3.78
29	161.00	161.50	164.90	162.47	2.12
32	164.80	164.90	168.30	166.00	1.99
36	168.80	168.90	172.70	170.13	2.22
39	171.70	172.20	175.20	173.03	1.89
43	174.20	175.20	178.20	175.87	2.08
47	176.70	178.70	181.20	178.87	2.25
53	188.70	182.20	183.70	184.87	3.40
60	190.20	183.70	183.70	185.87	3.75
67	192.50	186.20	186.70	188.47	3.50
74	194.30	188.10	188.50	190.30	3.47
81	205.60	194.20	190.20	196.67	7.99

ตารางที่ ง.9 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 34

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซมีเทน (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	Gompertz model (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่					ตัวอย่างที่				
	1	2	3			1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.43	8.91	8.67	9.00	0.39
2	10.02	9.04	10.17	9.75	0.61	19.35	18.28	17.77	18.47	0.80
4	21.48	20.73	21.56	21.25	0.46	33.01	31.18	30.32	31.50	1.37
6	40.32	39.19	37.38	38.97	1.48	49.09	46.37	45.10	46.85	2.04
8	45.98	42.96	45.67	44.87	1.66	65.94	62.28	60.57	62.93	2.74
10	64.82	62.18	60.75	62.58	2.06	82.11	77.56	75.43	78.37	3.41
13	75.37	69.72	66.78	70.62	4.37	103.15	97.43	94.75	98.44	4.29
15	89.31	84.79	80.34	84.82	4.48	114.51	108.16	105.19	109.29	4.76
18	97.60	91.95	92.63	94.06	3.09	127.65	120.57	117.26	121.83	5.31
20	105.89	99.49	101.67	102.35	3.26	134.16	126.73	123.25	128.05	5.58
22	114.94	109.29	109.59	111.27	3.18	139.22	131.50	127.89	132.87	5.79
24	116.45	111.55	112.23	113.41	2.65	143.10	135.17	131.46	136.57	5.95
27	118.71	113.81	113.73	115.42	2.85	147.25	139.09	135.27	140.54	6.12
29	121.35	121.72	124.29	122.45	1.60	149.19	140.92	137.05	142.39	6.20
32	124.21	124.29	126.85	125.11	1.50	151.24	142.86	138.93	144.34	6.29
36	127.22	127.30	130.16	128.23	1.68	152.89	144.42	140.45	145.92	6.36
39	129.41	129.79	132.05	130.42	1.43	153.63	145.12	141.13	146.63	6.39
43	131.29	132.05	134.31	132.55	1.57	154.22	145.68	141.67	147.19	6.41
47	133.18	134.69	136.57	134.81	1.70	154.55	145.99	141.98	147.51	6.42
53	142.22	137.32	138.45	139.33	2.57	154.79	146.21	142.20	147.73	6.43
60	143.35	138.45	138.45	140.09	2.83	154.90	146.31	142.30	147.84	6.44
67	145.09	140.34	140.72	142.05	2.64	154.94	146.35	142.33	147.87	6.44
74	146.44	141.77	142.07	143.43	2.62	154.95	146.36	142.34	147.89	6.44
81	154.96	146.37	143.35	148.23	6.02	154.96	146.37	142.35	147.89	6.44

ตารางที่ ง.10 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 48

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	12.70	12.50	13.50	12.90	0.53
4	25.20	26.30	25.50	25.67	0.57
6	46.20	52.30	47.50	48.67	3.21
8	57.20	56.30	59.50	57.67	1.65
10	77.20	82.30	79.00	79.50	2.59
13	87.20	92.80	89.00	89.67	2.86
15	101.20	109.30	105.40	105.30	4.05
18	109.20	115.30	109.90	111.47	3.34
20	116.20	125.20	117.90	119.77	4.78
22	121.70	130.20	130.90	127.60	5.12
24	130.70	133.20	132.90	132.27	1.37
27	133.70	135.20	134.90	134.60	0.79
29	137.20	140.33	138.90	138.81	1.57
32	145.70	143.33	141.90	143.64	1.92
36	148.70	147.83	144.90	147.14	1.99
39	151.00	149.63	147.10	149.24	1.98
43	153.30	152.13	149.60	151.68	1.89
47	155.80	154.63	152.10	154.18	1.89
53	158.80	157.43	154.40	156.88	2.25
60	161.30	159.33	156.10	158.91	2.63
67	164.30	162.33	159.00	161.88	2.68
74	166.80	164.83	161.70	164.44	2.57
81	168.80	171.93	169.20	169.98	1.70

ตารางที่ ง.11 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 48

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซมีเทน (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	Gompertz model (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่					ตัวอย่างที่				
	1	2	3			1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.85	6.97	6.86	6.90	0.07
2	8.31	8.18	8.83	8.44	0.35	14.88	15.16	14.92	14.99	0.15
4	16.49	17.21	16.68	16.79	0.37	26.04	26.52	26.10	26.22	0.26
6	30.23	34.22	31.08	31.84	2.10	38.98	39.70	39.07	39.25	0.39
8	37.43	36.84	38.93	37.73	1.08	52.13	53.09	52.25	52.49	0.52
10	50.51	53.85	51.69	52.02	1.69	64.29	65.47	64.44	64.73	0.65
13	57.05	60.72	58.23	58.67	1.87	79.31	80.77	79.49	79.86	0.80
15	66.22	71.51	68.96	68.90	2.65	86.99	88.60	87.19	87.59	0.87
18	71.45	75.44	71.91	72.93	2.18	95.43	97.20	95.66	96.10	0.96
20	76.03	81.92	77.14	78.36	3.13	99.41	101.24	99.64	100.10	1.00
22	79.63	85.19	85.65	83.49	3.35	102.37	104.26	102.61	103.08	1.03
24	85.52	87.15	86.96	86.54	0.89	104.57	106.50	104.81	105.29	1.05
27	87.48	88.46	88.27	88.07	0.52	106.81	108.78	107.06	107.55	1.07
29	89.77	91.82	90.88	90.82	1.03	107.81	109.81	108.07	108.56	1.08
32	95.33	93.78	92.85	93.99	1.26	108.83	110.84	109.09	109.58	1.09
36	97.29	96.73	94.81	96.28	1.30	109.60	111.63	109.86	110.37	1.10
39	98.80	97.90	96.25	97.65	1.29	109.93	111.96	110.19	110.70	1.11
43	100.30	99.54	97.88	99.24	1.24	110.18	112.22	110.44	110.95	1.11
47	101.94	101.17	99.52	100.88	1.24	110.31	112.35	110.57	111.08	1.11
53	103.90	103.01	101.02	102.64	1.47	110.40	112.44	110.66	111.16	1.11
60	105.54	104.25	102.14	103.97	1.72	110.43	112.47	110.69	111.20	1.11
67	107.50	106.21	104.03	105.92	1.75	110.44	112.48	110.70	111.21	1.11
74	109.14	107.85	105.80	107.60	1.68	110.45	112.49	110.71	111.21	1.11
81	110.45	112.49	110.71	111.22	1.11	110.45	112.49	110.71	111.22	1.11

ตารางที่ ง.12 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 61

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	8.30	8.00	7.50	7.93	0.40
4	16.30	17.50	16.90	16.90	0.60
6	39.30	41.50	37.90	39.57	1.81
8	52.30	54.50	54.40	53.73	1.24
10	71.80	74.50	79.40	75.23	3.85
13	83.80	86.00	89.90	86.57	3.09
15	93.80	95.70	101.90	97.13	4.24
18	97.80	100.00	106.20	101.33	4.36
20	112.80	104.00	110.60	109.13	4.58
22	117.80	120.00	117.60	118.47	1.33
24	120.10	122.80	119.80	120.90	1.65
27	122.10	125.80	131.80	126.57	4.90
29	125.10	128.80	133.80	129.23	4.37
32	128.10	131.80	137.50	132.47	4.74
36	131.10	134.70	140.50	135.43	4.74
39	132.90	136.80	142.50	137.40	4.83
43	134.90	139.00	144.40	139.43	4.76
47	136.40	140.50	145.70	140.87	4.66
53	137.40	142.50	147.50	142.47	5.05
60	139.40	143.70	148.70	143.93	4.65
67	141.10	145.60	150.80	145.83	4.85
74	142.50	147.10	153.80	147.80	5.68
81	144.30	148.90	157.30	150.17	6.59

ตารางที่ ง.13 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 61

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซมีเทน (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	Gompertz model (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่					ตัวอย่างที่				
	1	2	3			1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.97	5.13	5.42	5.17	0.23
2	4.79	4.62	4.33	4.58	0.23	11.58	11.95	12.63	12.05	0.53
4	9.41	10.10	9.75	9.75	0.35	20.94	21.61	22.82	21.79	0.96
6	22.68	23.95	21.87	22.83	1.05	31.69	32.70	34.54	32.98	1.45
8	30.18	31.45	31.39	31.00	0.72	42.35	43.70	46.16	44.07	1.93
10	41.43	42.99	45.81	43.41	2.22	51.87	53.53	56.55	53.98	2.37
13	48.35	49.62	51.87	49.95	1.78	63.11	65.13	68.80	65.68	2.88
15	54.12	55.22	58.80	56.05	2.44	68.59	70.78	74.76	71.38	3.13
18	56.43	57.70	61.28	58.47	2.51	74.33	76.70	81.02	77.35	3.39
20	65.09	60.01	63.82	62.97	2.64	76.90	79.36	83.83	80.03	3.51
22	67.97	69.24	67.86	68.36	0.77	78.76	81.27	85.85	81.96	3.60
24	69.30	70.86	69.12	69.76	0.95	80.08	82.64	87.30	83.34	3.66
27	70.45	72.59	76.05	73.03	2.82	81.38	83.98	88.72	84.70	3.72
29	72.18	74.32	77.20	74.57	2.52	81.94	84.56	89.32	85.28	3.74
32	73.91	76.05	79.34	76.43	2.73	82.49	85.12	89.92	85.84	3.77
36	75.64	77.72	81.07	78.15	2.74	82.88	85.53	90.35	86.25	3.79
39	76.68	78.93	82.22	79.28	2.79	83.04	85.69	90.52	86.42	3.79
43	77.84	80.20	83.32	80.45	2.75	83.15	85.81	90.64	86.53	3.80
47	78.70	81.07	84.07	81.28	2.69	83.21	85.86	90.70	86.59	3.80
53	79.28	82.22	85.11	82.20	2.91	83.24	85.90	90.74	86.63	3.80
60	80.43	82.91	85.80	83.05	2.69	83.25	85.91	90.75	86.64	3.80
67	81.41	84.01	87.01	84.15	2.80	83.26	85.92	90.76	86.65	3.80
74	82.22	84.88	88.74	85.28	3.28	83.26	85.92	90.76	86.65	3.80
81	83.26	85.92	90.76	86.65	3.80	83.26	85.92	90.76	86.65	3.80

ตารางที่ ง.14 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 76

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	16.20	17.00	16.30	16.50	0.44
6	27.20	29.00	27.30	27.83	1.01
10	51.20	52.00	51.30	51.50	0.44
12	71.20	73.50	72.30	72.33	1.15
14	92.20	93.50	92.30	92.67	0.72
20	120.20	129.50	107.80	119.17	10.89
27	137.20	149.10	125.40	137.23	11.85
34	151.70	164.60	140.70	152.33	11.96
41	155.20	168.60	144.50	156.10	12.08
48	158.20	171.90	149.50	159.87	11.29
55	161.50	174.90	152.40	162.93	11.32
81	164.00	170.40	161.40	165.27	4.63

ตารางที่ ง.15 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 76

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซมีเทน (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	Gompertz model (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่					ตัวอย่างที่				
	1	2	3			1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.40	6.65	6.30	6.45	0.18
3	10.50	11.02	10.57	10.70	0.28	16.78	17.44	16.52	16.91	0.47
6	17.63	18.80	17.70	18.04	0.66	31.61	32.85	31.11	31.86	0.89
10	33.19	33.71	33.26	33.39	0.28	53.18	55.26	52.34	53.60	1.50
12	46.16	47.65	46.87	46.89	0.75	62.99	65.45	61.99	63.48	1.78
14	59.77	60.62	59.84	60.08	0.47	71.58	74.38	70.45	72.14	2.02
20	77.93	83.95	69.89	77.26	7.06	89.63	93.13	88.22	90.33	2.53
27	88.95	96.66	81.30	88.97	7.68	99.72	103.62	98.15	100.50	2.81
34	98.35	106.71	91.22	98.76	7.76	103.80	107.85	102.16	104.60	2.93
41	100.62	109.30	93.68	101.20	7.83	105.37	109.48	103.70	106.18	2.97
48	102.56	111.44	96.92	103.64	7.32	105.96	110.10	104.29	106.78	2.99
55	104.70	113.39	98.80	105.63	7.34	106.19	110.33	104.51	107.01	3.00
81	106.32	110.47	104.64	107.14	3.00	106.32	110.47	104.64	107.14	3.00

ตารางที่ ง.16 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 88

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	14.50	14.90	16.60	15.33	1.12
6	24.50	25.90	28.60	26.33	2.08
10	39.50	39.90	41.60	40.33	1.12
12	51.50	52.90	56.60	53.67	2.64
14	88.20	78.50	84.10	83.60	4.87
20	111.20	106.50	116.60	111.43	5.05
27	120.20	134.50	125.90	126.87	7.20
34	147.70	140.50	141.60	143.27	3.88
41	158.20	165.00	161.60	161.60	3.40
48	163.50	170.00	165.10	166.20	3.39
55	168.90	174.50	169.30	170.90	3.12
81	179.90	176.50	172.30	176.23	3.81

ตารางที่ ง.17 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 88

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซมีเทน (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	Gompertz model (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่					ตัวอย่างที่				
	1	2	3			1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.61	6.49	6.33	6.48	0.14
3	8.29	8.52	9.50	8.77	0.64	12.24	12.01	11.73	12.00	0.26
6	14.01	14.81	16.36	15.06	1.19	19.75	19.38	18.92	19.35	0.42
10	22.59	22.82	23.80	23.07	0.64	31.75	31.15	30.41	31.10	0.67
12	29.46	30.26	32.38	30.70	1.51	38.14	37.42	36.53	37.36	0.81
14	50.45	44.90	48.11	47.82	2.79	44.52	43.69	42.65	43.62	0.94
20	63.61	60.92	66.70	63.74	2.89	62.18	61.01	59.56	60.92	1.31
27	68.75	76.93	72.01	72.57	4.12	77.91	76.44	74.62	76.32	1.65
34	84.48	80.37	81.00	81.95	2.22	88.24	86.58	84.52	86.44	1.86
41	90.49	94.38	92.44	92.44	1.94	94.52	92.74	90.54	92.60	2.00
48	93.52	97.24	94.44	95.07	1.94	98.18	96.33	94.04	96.19	2.07
55	96.61	99.81	96.84	97.75	1.79	100.27	98.38	96.04	98.23	2.12
81	102.90	100.96	98.56	100.81	2.18	102.61	100.67	98.28	100.52	2.17

ตารางที่ ง.18 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 95

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	15.00	14.50	14.60	14.70	0.26
6	37.00	39.50	39.60	38.70	1.47
10	47.00	48.50	48.60	48.03	0.90
12	57.00	57.50	59.60	58.03	1.38
14	87.50	87.00	89.30	87.93	1.21
20	125.50	122.50	125.30	124.43	1.68
27	144.30	139.50	141.30	141.70	2.42
34	168.80	164.80	166.50	166.70	2.01
41	172.30	168.80	170.40	170.50	1.75
48	174.80	171.80	173.90	173.50	1.54
55	177.80	175.10	176.70	176.53	1.36
81	182.80	180.10	181.70	181.53	1.36

ตารางที่ ง.19 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 95

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซมีเทน (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	Gompertz model (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่					ตัวอย่างที่				
	1	2	3			1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.17	6.08	6.13	6.13	0.05
3	8.22	7.95	8.00	8.06	0.14	14.55	14.34	14.46	14.45	0.11
6	20.28	21.65	21.70	21.21	0.81	26.35	25.96	26.19	26.17	0.20
10	25.76	26.58	26.63	26.32	0.49	44.22	43.57	43.96	43.92	0.33
12	31.24	31.51	32.66	31.80	0.76	52.83	52.05	52.51	52.46	0.39
14	47.95	47.68	48.94	48.19	0.66	60.72	59.82	60.35	60.30	0.45
20	68.77	67.13	68.66	68.19	0.92	78.81	77.64	78.34	78.26	0.59
27	79.08	76.45	77.43	77.65	1.33	90.49	89.15	89.95	89.86	0.67
34	92.50	90.31	91.24	91.35	1.10	95.95	94.53	95.37	95.28	0.71
41	94.42	92.50	93.38	93.43	0.96	98.36	96.90	97.77	97.68	0.73
48	95.79	94.15	95.30	95.08	0.84	99.40	97.93	98.80	98.71	0.74
55	97.43	95.95	96.83	96.74	0.74	99.84	98.37	99.24	99.15	0.74
81	100.17	98.69	99.57	99.48	0.74	100.16	98.68	99.56	99.46	0.74

ตารางที่ ง.20 ปริมาณก๊าซชีวภาพในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัด
สารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 107

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	25.00	25.00	22.00	24.00	1.73
6	30.00	30.20	30.30	30.17	0.15
10	51.00	55.20	50.30	52.17	2.65
12	71.00	79.70	75.30	75.33	4.35
14	96.50	106.80	100.30	101.20	5.21
20	134.50	132.30	132.30	133.03	1.27
27	161.50	159.30	161.30	160.70	1.22
34	169.40	167.80	170.30	169.17	1.27
41	173.90	173.00	175.40	174.10	1.21
48	178.00	183.00	179.40	180.13	2.58
55	182.00	196.70	182.80	187.17	8.27
81	184.50	196.70	188.80	190.00	6.19

ตารางที่ ง.21 ปริมาณก๊าซมีเทนในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลด้วยระบบการกรองชีวภาพในวันที่ 107

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซมีเทน (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	Gompertz model (มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่					ตัวอย่างที่				
	1	2	3			1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.97	7.43	7.13	7.18	0.23
3	15.30	15.30	13.46	14.69	1.06	16.02	17.08	16.40	16.50	0.54
6	18.36	18.48	18.54	18.46	0.09	28.72	30.62	29.39	29.58	0.96
10	31.21	33.78	30.78	31.93	1.62	48.14	51.32	49.26	49.57	1.61
12	43.45	48.78	46.08	46.10	2.66	57.61	61.43	58.96	59.33	1.93
14	59.06	65.36	61.38	61.93	3.19	66.39	70.79	67.95	68.38	2.23
20	82.31	80.97	80.97	81.42	0.78	86.97	92.73	89.01	89.57	2.92
27	98.84	97.49	98.72	98.35	0.74	100.75	107.42	103.11	103.76	3.38
34	103.67	102.69	104.22	103.53	0.77	107.43	114.54	109.94	110.64	3.60
41	106.43	105.88	107.34	106.55	0.74	110.48	117.79	113.07	113.78	3.71
48	108.94	112.00	109.79	110.24	1.58	111.84	119.24	114.46	115.18	3.75
55	111.38	120.38	111.87	114.55	5.06	112.44	119.88	115.07	115.80	3.77
81	112.91	120.38	115.55	116.28	3.79	112.89	120.36	115.53	116.26	3.79

ตารางที่ ง.22 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยการทดสอบค่า Biochemical Methane Potential (BMP) ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลจากระบบการกรองชีวภาพในระยะยาว

เวลา (วัน)	BMP test (mLCH ₄ /gCOD)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
9	553.74	448.27	521.29	507.77	54.02
14	448.03	380.74	435.90	421.56	35.86
25	393.23	367.04	399.48	386.58	17.21
34	446.98	409.53	354.06	403.52	46.75
48	406.30	399.09	386.11	397.17	10.23
61	417.35	418.13	375.57	403.69	24.35
76	558.58	466.23	489.58	504.80	48.02
88	405.12	396.78	370.65	390.85	17.99
95	450.15	411.23	382.33	414.57	34.03
107	415.49	440.84	398.68	418.34	21.22

ตารางที่ ง.23 การทดสอบความสามารถจำเพาะของตะกอนจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซมีเทนด้วยวิธีการทดสอบ Specific Methanogenic Activity (SMA) ในระบบผลิตก๊าซชีวภาพเมื่อใช้น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดสารประกอบฟีนอลจากระบบการกรองชีวภาพในระยะยาว

เวลา (วัน)	SMA test (gCODCH ₄ /gVSS/d)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
9	0.32	0.30	0.28	0.30	0.02
14	0.26	0.28	0.27	0.27	0.01
25	0.27	0.27	0.25	0.26	0.01
34	0.31	0.30	0.30	0.30	0.01
48	0.25	0.27	0.27	0.26	0.01
61	0.31	0.30	0.29	0.30	0.01
76	0.26	0.23	0.28	0.26	0.02
88	0.30	0.26	0.25	0.27	0.03
95	0.26	0.27	0.24	0.26	0.01
107	0.28	0.30	0.28	0.29	0.01

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิยะมาศ คงแถม เกิดเมื่อวันที่ 17 ธันวาคม 2527 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในปีการศึกษา 2550 จบการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม และระดับปริญญาเอก สาขาวิชาจุลชีววิทยา จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2552 และ 2557 ตามลำดับ

การนำเสนอผลงานวิชาการ

1. Khongkhaem, P., Intasiri, A., Luepromchai, E. (2009). Immobilization of *Methylobacterium* sp. NP3 and bacteria PK1 on silica for phenol degradation. TSB 2009. 24-25 September 2009. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

2. Khongkhaem, P., Intasiri, A., Luepromchai, E. (2011). Degradation of phenolic compounds in synthetic wastewater by silica-immobilized cells. Oral Presentation. EEAT's 10th National Conference on Environment No.10. 23-25 March 2011. BP Samila Beach Hotel & Resort, Songkhla, Thailand.

3. Khongkhaem, P., Suttinun, O., Intasiri, A., and Luepromchai, E. (2011). Removal of phenolic compounds from palm oil mill effluent by silica-immobilized bacteria in an airlift reactor, 16th Biological Sciences Graduate Congress, 12-14 December 2011, National University of Singapore, Singapore.

4. Khongkhaem, P., Suttinun, O., Intasiri, A., Musikavong, C., Pinyakong, O., and Luepromchai, E. (2012). Removal of phenolic compounds in palm oil mill wastewater by bacteria immobilized on silica for enhancement of biomethanation. Oral Presentation. 17th Biological Sciences Graduate Congress. 8-10 December 2012. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

5. Khongkhaem, P., Suttinun, O., Intasiri, A., Pinyakong, O., and Luepromchai, E. (2014). Enhancing biomethanation of palm oil mill effluent after removal of phenolic compounds by using internal loop airlift bioreactor containing silica-immobilized Bacteria. The 114th General Meeting of the American Society for Microbiology. 17-20 May 2014. Boston, MA, USA.

การตีพิมพ์วารสารวิชาการ

1. Khongkhaem, P., Intasiri, A., Luepromchai, E. (2011). Silica-immobilized *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 degrade high concentrations of phenol. Letters in Applied Microbiology, 52, 448-455.

2. Khongkhaem, P., Suttinun, O., Intasiri, A., Pinyakong, O., and Luepromchai, E. (2014). Degradation of phenolic compounds in palm oil mill effluent by silica-immobilized bacteria in internal loop airlift bioreactors. Clean- soil, air, water. Doi. 10.1002/ clen. 201300853.