



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและการประยุกต์ใช้เชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์และ
วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการบำบัดน้ำทิ้ง
โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

**Screening and Application by Thermotolerant Fungi from
Dungs and Agriculture waste in Treatment of
Palm Oil Mill Effluent**

โดย

หัตถินดา บินมะแอ

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและการประยุกต์ใช้เชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์และ
วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการบำบัดน้ำทิ้ง
โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Screening and Application by Thermotolerant Fungi from
Dungs and Agriculture waste in Treatment of
Palm Oil Mill Effluent

โดย

หัสตินดา บินมะแอ

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

บทคัดย่อ

ชื่อชุดโครงการวิจัย	การคัดแยกและการประยุกต์ใช้เชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
ผู้วิจัย	นางสาวหัตถินดา บินมะแอ
สาขาวิชา	ชีววิทยา
ปีงบประมาณ	2555

แยกเชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 15 ไอโซเลต ได้แก่ AO1, AO2, AO3, BO1, BO2, BO3, CO1, DO1, DO2, AS1, AS2, BS1, BS2, CS1 และ CS2 หลังจากการทดสอบความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคลาเนสได้ดีที่สุด 8 ไอโซเลต ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราทนร้อนที่แยกได้ พบว่าไอโซเลต AO1, BO2, CO1, DO1, AS1 และ BS1 เป็นเชื้อราทนร้อนสกุล *Aspergillus* sp. ไอโซเลต AO3, BO3 และ CS1 เป็นเชื้อราทนร้อนสกุล *Scytalidium* sp. ส่วน BS2 เป็นเชื้อราทนร้อนสกุล *Oedocephalum* sp. และไอโซเลต CS2 เป็นเชื้อราทนร้อนสกุล *Chrysosporium* sp. ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อราทนร้อนที่แยกได้ในช่วงอุณหภูมิต่างๆ พบว่า CO1, AS1, BS1, CS1, AO1, BO1, BS2 และ DO1 มีคุณสมบัติทนร้อนและเชื้อเจริญได้ดีที่สุดทุกสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่าเชื้อรา DO1 ได้ดีที่สุด คือ สามารถลดค่าบีโอดีและซีโอดีร้อยละ 30.98 และ 48.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Title	Screening and Application by Thermotolerant Fungi from Dungs and Agriculture waste in Treatment of Palm Oil Mill Effluent
Author	Miss Haslinda Binma-eil
สาขาวิชา	ชีววิทยา
ปีงบประมาณ	2555

Abstract

Fifteen Thermotolerant Fungi were isolated from Dungs and agriculture waste including AO1, AO2, AO3, BO1, BO2, BO3, CO1, DO1, DO2, AS1, AS2, BS1, BS2, CS1 and CS2. All of these isolated were examined for Cellulose and Xylanase production. The result showed that eight isolates gave the highest of Cellulose and Xylanase activities. The isolate AO1, BO2, CO1, DO1, AS1 and BS1 were classified as *Aspergillus* sp., AO3, BO3 and CS1 were classified as *Scytalidium* sp., BS2 was classified as *Oedocephalum* sp. and CS2 was classified as *Chrysosporium* sp. Studies on thermotolerant properties of CO1, AS1, BS1, CS1, AO1, BO1, BS2 และ DO1 were found to be thermotolerant with the optimum temperatures of 45°C. Effect of treatment efficiency in Palm oil Mill Effluent. Results DO1; it had acidic pH with 5.31 giving the BOD and COD removal of 30.98 % and 48.75 % respectively.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัย ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก สถาบันวิจัยและพัฒนาชายแดนภาคใต้ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ที่ได้ให้โอกาสรับทุนวิจัยในโครงการวิจัย ระดับมหาวิทยาลัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555

ขอขอบคุณอาจารย์ประจำหลักสูตรดุริยางคศิลป์ สาขาวิชา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำ ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์การทดลอง

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคน ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิด ต่างๆ ตลอดจนกำลังใจที่ได้มอบให้กับข้าพเจ้าตลอดมา จนโครงการวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ด้วยดี

หัสตินดา บินมะแอ

สารบัญ

	หน้าที่
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
- ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
- วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
- ขอบเขตของงานวิจัย	3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
- นิยามของจุลินทรีย์ทนร้อน	5
- แหล่งที่พบจุลินทรีย์ทนความร้อน	5
- กลไกการทนร้อนของจุลินทรีย์ทนความร้อน	6
- แหล่งที่มาและคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม	7
- ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการใช้น้ำมันของเชื้อรา	9
- เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบ ในน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์ม	13
- การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบ	17
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	21
บทที่ 4 ผลการวิจัย	27
บทที่ 5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ	58
บรรณานุกรม	62

สารบัญ (ต่อ)

ภาคผนวก	65
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	66
ภาคผนวก ข สีและน้ำยาทดสอบ	68
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเสีย	70
ภาคผนวก ง ภาพประกอบการศึกษา	78
ประวัติผู้เขียน	80

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Significant ของไอโซเลต AO1	34
4.2 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Moderate ของไอโซเลต DO2	34
4.3 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Negligible ของไอโซเลต AO2	34
4.4 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Significant ของไอโซเลต AO1	39
4.5 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Moderate ของไอโซเลต DO2	39
4.6 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Negligible ของไอโซเลต AO2	39
4.7 ลักษณะ โคลนีสและสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Aspergillus</i> sp.	41
4.8 ลักษณะ โคลนีสและสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Scytalidium</i> sp.	43
4.9 ลักษณะ โคลนีสและสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Oedocephalum</i> sp.	45
4.10 ลักษณะ โคลนีสและสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Chrysosporium</i> sp.	47
4.11 ค่าพีเอชในน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยเลี้ยงเชื้อราแบบเขย่า ที่ความเร็ว รอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน	56
4.12 เพอร์เซ็นต์บีโอดีที่ลดลงหลังจากทดสอบการบำบัดน้ำทิ้งจาก โรงงานน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราที่คัดเลือกไว้เป็นเวลา 6 วัน	56
4.13 เพอร์เซ็นต์ซีโอดีที่ลดลงหลังจากทดสอบการบำบัดน้ำทิ้งจาก โรงงานน้ำมันปาล์ม ด้วยเชื้อราที่คัดเลือกไว้เป็นเวลา 6 วัน	57
ภาพผนวกที่	
1. การเปรียบเทียบน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยชุดควบคุม และตัวอย่างผ่านการบำบัดแล้วโดยเชื้อราที่คัดเลือกไว้	79

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 จำนวนเชื้อราทนร้อนทั้งหมดที่คัดแยกได้จากมูลสัตว์ และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	27
4.2 จำนวนไอโซเลตของเชื้อราทนร้อนที่คัดแยกได้จากมูลสัตว์ และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	28
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลตที่คัดแยกได้	29
4.4 ระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราทนร้อนที่คัดแยกได้	31
4.5 ขนาดความกว้างของวงใสของเชื้อราทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดแยกได้	33
4.6 ระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคซานเนสของเชื้อราทนร้อนที่คัดแยกได้	36
4.7 ขนาดความกว้างของวงใสของเชื้อราทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์ไคซานเนสที่คัดแยกได้	38
4.8 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน	49
4.9 ลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม จ. นราธิวาส เปรียบเทียบกับโรงงานน้ำมันปาล์มแหล่งอื่นๆ	51
4.10 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช ระหว่างการทดสอบการบำบัดน้ำทิ้ง จากโรงงานน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกไว้ เป็นเวลา 6 วัน	54
4.11 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ระหว่างทดสอบการบำบัดน้ำทิ้งจาก โรงงานน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกไว้ เป็นเวลา 6 วัน	54
4.12 การเปลี่ยนแปลงของค่าบีโอดีหลังจากทดสอบการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงาน น้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกไว้ เป็นเวลา 6 วัน	55
4.13 การเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดีหลังจากทดสอบการบำบัดน้ำทิ้งจาก โรงงานน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกไว้ เป็นเวลา 6 วัน	55
ตารางผนวกที่	
1 ขนาดตัวอย่างและอัตราเจือจางที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาซีโอดี	76
2 ขนาดของหลอดแก้วปริมาตรตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม	76

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) กลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งทางภาคใต้ของประเทศไทย เนื่องจากการนำน้ำมันปาล์มไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวางและรวดเร็ว เพราะสามารถนำไปใช้ในการทดแทนน้ำมันพืชอื่น ๆ และแทนไขสัตว์ได้เป็นอย่างดี และราคาต่ำกว่าน้ำมันพืชอื่นๆ ทำให้มีการปลูกอย่างแพร่หลายและการผลิตน้ำมันปาล์มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในภาคใต้ของประเทศไทย เช่น กระบี่ ตรัง สุราษฎร์ธานี ชุมพร และสงขลา (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสามจังหวัดชายแดนภาคใต้แล้ว รัฐบาลมีนโยบายที่จะให้พื้นที่เหล่านั้นเป็นแหล่งเพาะปลูก ผลิตน้ำมันปาล์ม และผลิตไบโอดีเซล ในลำดับต้นๆ ของประเทศไทย จึงทำให้มีหน่วยงานที่เกี่ยวข้องต่างๆ ส่งเสริมการปลูกต้นปาล์มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และประชาชน ก็ให้การตอบรับอย่างดี จึงทำให้ในเขตสามจังหวัดชายแดนภาคใต้ มีปริมาณต้นปาล์มที่กำลังรอผลผลิต และมีผลิตแล้วนั้นมากขึ้นตามไปด้วย และให้จังหวัดนราธิวาสเป็นแหล่งแปรรูปปาล์มดังกล่าว ซึ่งรัฐบาลได้จัดสรรงบประมาณและสร้างโรงงานขนาดใหญ่ สามารถรองรับผลผลิตในกระบวนการแปรรูปวันละหลายๆ ตัน ซึ่งตั้งอยู่ในบริเวณนิคมอุตสาหกรรมบาเจาะ จังหวัดนราธิวาส แต่ในการผลิตน้ำมันปาล์มผลที่ตามมาจะมีวัสดุเศษเหลือที่เป็นของเหลว คือ น้ำทิ้ง และส่วนของแข็ง ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า กาก เนื่อปาล์ม สลัดจ์ (อารี กังแฮ, 2536) โดยเฉพาะน้ำทิ้งซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือที่ได้จากกระบวนการผลิต ส่วนใหญ่มากจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน (แบบใช้น้ำ) จากสองขั้นตอน คือ น้ำนึ่งปาล์มหรือน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (Sterilizer condensate) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter) หรือเครื่อง separator น้ำทิ้งดังกล่าวจะมีน้ำมันปนอยู่ประมาณ 10-20 กรัมต่อลิตร น้ำมันในน้ำทิ้งอยู่ในลักษณะอิมัลชัน ซึ่งแยกออกได้ยากและไม่สามารถแยกออกได้ด้วยวิธีการทางกายภาพ (อรุณ หันพงศ์จิตติกุล และคณะ, 2537) และวิธีที่น่าจะเป็นไปได้ในการกำจัดน้ำมันออกจากน้ำทิ้งคือวิธีทางชีวภาพ มีการศึกษาเพื่อการจัดน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโดยใช้วิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ เป็นการแยกหรือกำจัดน้ำมันในน้ำทิ้ง ซึ่งเป็นการบำบัดขั้นต้นก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดขั้นที่สองด้วยกระบวนการชีวภาพ วิธีการแยกหรือกำจัดน้ำมันที่มีอยู่ในน้ำเสียมี 2 วิธี คือวิธีทางกายภาพและเคมีทำได้โดยการทำให้ไขมันและน้ำมันเกิดการลอยตัวโดยอาศัยการกระจายของฟองอากาศจากเครื่อง

อัครอากาศ (Forster, 1992 อ้างโดยโสภา จันทภาโส, 2542) และวิธีการบำบัดทางชีวภาพสามารถใช้จุลินทรีย์ทั้งที่ต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจน ย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ในน้ำเสีย

เนื่องจากมีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถใช้ไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้แก่ *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma harzianum*, *Myceliophthora thermophila*, *Trichoderma virid* เป็นต้น ซึ่งนอกจากช่วยกำจัดไขมันแล้ว ยังทำให้ค่าซีไอลดลงมากกว่าร้อยละ 70 และได้ มวลชีวภาพสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสายพันธุ์ของเชื้อราที่สามารถผลิต ไบโอฟิลิเมอร์ได้ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งให้มวลชีวภาพสูงเกือบ 50 กรัมต่อลิตร และมีการวิจัยศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์เซลล์และไซลันเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ทางการค้ามาบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าเอนไซม์ทั้งสองแหล่งสามารถแยกสารแขวนลอยในน้ำทิ้ง และน้ำมันออกจากน้ำมันของโรงงานน้ำมันปาล์มได้ ทำให้องค์ส่วนที่เหลือมีปริมาณน้ำมันเท่ากับร้อยละ 99 และค่าซีไอดีเท่ากับร้อยละ 71 (Prasertsan *et al.*, 1997) โสภา จันทภาโส (2542) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์และการลดความเข้มข้นของสี พบว่า น้ำทิ้งต้องมีปริมาณน้ำมันไม่ต่ำกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะทำให้เกิดตะกอนเบาจากปฏิกิริยาของเอนไซม์และความเข้มข้นต่ำสุดของเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ไซลันเนสทางการค้า (Meicellase) คือ 200 และ 600 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ดังนั้นวิธีทางชีววิทยาโดยใช้จุลินทรีย์ จึงน่าจะเป็นวิธีการที่มีความเป็นไปได้ในการกำจัดไขมันออกจากน้ำทิ้ง ทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ (ค่าบีโอดี, ค่าซีโอดี) ลดลง และสามารถผลิตไบโอฟิลิเมอร์ได้ที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะใช้เชื้อราทนร้อนในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เนื่องจากในขั้นตอนของการย่อยผลปาล์มนั้น จะมีการเติมน้ำร้อนลงไป (อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส) เพื่อสกัดน้ำมันออกจากส่วนเปลือก (พุนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533) ทำให้น้ำทิ้งที่ออกมามีอุณหภูมิสูง จึงจำเป็นต้องเลือกใช้จุลินทรีย์ที่ทนร้อนได้และเพื่อการบำบัดน้ำทิ้งมีประสิทธิภาพมากขึ้นและทำให้ช่วยลดปัญหาด้านการบำบัดน้ำเสียและด้านมลภาวะสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการมีน้ำมันปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกเชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร
2. เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้

ขอบเขตการศึกษา

1. ทำการคัดแยกเชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์ชนิดต่างๆ และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากแหล่งต่างๆ
2. ทำศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ จากมูลสัตว์ชนิดต่างๆ และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากแหล่งต่างๆ
3. ทำศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ / และหน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ
 - 1.1 ได้เชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์ชนิดต่างๆ และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากแหล่งต่างๆ
 - 1.2 ได้ทราบสมบัติบางประการของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ จากมูลสัตว์ชนิดต่างๆ และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากแหล่งต่างๆ
 - 1.3 ได้ทราบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้
 - 1.4 นำความรู้ที่ได้เป็นแนวทางในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ ซึ่งอาจจะใช้ได้จริงและไม่ก่อสารพิษในการบำบัด ตลอดจนช่วยลดโลกร้อน
2. หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - 2.1 นำความรู้ที่ได้ดังกล่าวไปเผยแพร่ แก่ชุมชน และอาจสามารถเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ ซึ่งอาจจะใช้ได้จริงและไม่ก่อสารพิษในการบำบัด ตลอดจนช่วยลดโลกร้อน
 - 2.2 หน่วยงานของรัฐบาล เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและประโยชน์กับทางทุกฝ่ายเกี่ยวข้องหรือ ที่ต้องการเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ ซึ่งอาจจะใช้ได้จริงและช่วยลดโลกร้อน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จุลินทรีย์ที่กระจายอยู่ทั่วไปในอากาศ ดิน น้ำ ลม ทะเลทราย น้ำพุ และแหล่งอื่นๆ สามารถแบ่งจุลินทรีย์ดังกล่าว ตามช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตได้ 3 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophiles) เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของน้ำ และจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophiles) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในช่วง 40 - 50 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า (จูลิรัตน์ แซ่เต๋, 2541) ในส่วนของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่มักพบในสกุลที่สร้างสปอร์ เช่น *Bacillus* และ *Clostridium* (จูลิรัตน์ แซ่เต๋, 2541) โดยทั่วไปจุลินทรีย์พวกโปรคาริโอต สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิที่สูงกว่าจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต พบว่ามีรา และสาหร่ายจำนวนไม่กี่ชนิดที่เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงถึง 55 - 60 องศาเซลเซียส (จูลิรัตน์ แซ่เต๋, 2541) ส่วนแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงบางชนิดสามารถเจริญได้ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิปานกลางถึงอุณหภูมิก่อนข้างสูง โดยมีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิสูงกว่า 50-60 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 - 60 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 50 - 60 องศาเซลเซียส เรียกว่า obligate หรือ extreme thermophile หรือ caldophilic ส่วนแบคทีเรียที่สามารถอยู่รอดที่อุณหภูมิ 50 - 60 องศาเซลเซียส แต่อัตราการเจริญสูงสุดอยู่ภายใต้อุณหภูมิ 50 - 60 องศาเซลเซียส เรียกว่า แบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant หรือ thermotolerant bacteria) แบคทีเรียเหล่านี้จะทนต่อขบวนการพาสเจอร์ไรซ์ได้ เช่น *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp. (จูลิรัตน์ แซ่เต๋, 2541) จุลินทรีย์ดังกล่าว มีการศึกษามากมาย ปีแต่ไม่ได้รับความสนใจมากนัก จนกระทั่งพบแบคทีเรียที่สามารถอาศัยอยู่ที่อุณหภูมิจุดเดือดของน้ำ หรือสูงกว่าจุดเดือดของน้ำ จึงทำให้ได้รับความสนใจและมีการศึกษาทั้งทางด้านพื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ โดยการประยุกต์ใช้ได้รับการสนใจด้านการเน้นแหล่งเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะ เช่น ใช้เป็น active agents ในกระบวนการหมักที่ต้องการอุณหภูมิสูง ใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย และใช้ในการชะล้างสินแร่ เป็นต้น (วิภาวรรณ ไตรรัตนกุล, 2540)

นิยามของจุลินทรีย์ทนร้อน (Thermotolerant)

Aragno (1992 อ้างโดย ศิริพร หมาดคำ , 2544) กล่าวว่า จุลินทรีย์ทนร้อน หรือ จุลินทรีย์ทนร้อนอุณหภูมิสูง หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส และยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ส่วน Crisan (1973 อ้างโดย มานะ กาญจนเสถียร, 2537) ได้ให้ความหมายของเชื้อราทนร้อน หมายถึง เชื้อราในกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในแหล่งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 จนถึง 50 หรือ 55 องศาเซลเซียส

แหล่งที่พบจุลินทรีย์ทนความร้อน

Thermophile และ thermotolerant กระจายอยู่ทั่วไปตามสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติของโลก ส่วนใหญ่เป็นสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการกระทำของภูเขาไฟ การเคลื่อนตัวของแผ่นเปลือกโลก หรือ การเกิดแผ่นดินไหว ลักษณะดังกล่าวทำให้เกิดน้ำร้อนที่มีแร่ธาตุละลายอยู่ ทำให้เกิดเป็นน้ำพุร้อนและส่วนใหญ่จะมีกรด – ด่างเป็นกลาง (วิภาวรรณ ไตรรัตนานุกุล, 2540) สิ่งแวดล้อมอีกชนิดหนึ่งที่มีแร่ธาตุอยู่สูงและพบพวก Thermophile และ thermotolerant อาศัยอยู่ คือพื้นดินของทะเล นอกจากจะทนความร้อนได้แล้ว จุลินทรีย์ดังกล่าวยังสามารถทนเค็มได้อีกด้วย แต่จุลินทรีย์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมข้างต้นการเปลี่ยนแปลงสูง และเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ยาก และในบางครั้งอาจจะพบจุลินทรีย์พวก Thermophile และ thermotolerant จากแหล่งที่อยู่ที่ไม่ถึง เช่น จากดินในสวน หรือจากน้ำแข็งได้อีกด้วย (วิภาวรรณ ไตรรัตนานุกุล , 2540) วสันต์ เพชรรัตน์ และ มานะ กาญจนเสถียร (2533) รายงานว่า พบเชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูงและเชื้อราทนความร้อนจากปุ๋ยหมักสำหรับเพาะเห็ด คีฟาง พบเชื้อรา 10 ชนิด พบราพวก *Aspergillus fumigatus* มากที่สุด และมีความถี่ในการพบระหว่าง 83 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เชื้อราพวก *Thermomyces lanuginosus* โดยมีความถี่การพบเท่ากับ 10 - 33.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อราชนิดอื่นๆ จัดว่าพบน้อยมาก Hudson และคณะ (1990) ได้ศึกษาแยกแบคทีเรียทนร้อนจากบ่อน้ำพุร้อน ในประเทศนิวซีแลนด์ ซึ่งพบแบคทีเรียทนร้อนที่เจริญ แบบไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เป็นแกรมลบ และพบว่ายังสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ และสามารถหมักแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิสูงได้ มานะ กาญจนเสถียร (2537) ศึกษาแยกเชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูงจากวัสดุบางชนิด ได้แก่ จีเลื่อย ไร่ข้าว กากปาล์มน้ำมัน และถ่านแกลบ โดยวิธี Modified Soil Plate Technique พบเชื้อราจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Rhizomucor pusillus*, *Chaetomium thermophile* และ *Thermomyces lanuginosns* Friedrich

Gowland และคณะ (1987 อ้างโดย จูริรัตน์ แซ่เต๋ , 2541) คัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิที่ผลิตไลเปสจากกองหญ้าหมัก กองถ่านหินในทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศอังกฤษและจากน้ำพุบริเวณตอนล่างฝั่งตะวันตกของสหรัฐอเมริกา สามารถคัดเชื้อได้ 94 ไอโซเลทจากกองถ่าน และ 46 ไอโซเลทจากตัวอย่างน้ำพุ

Sigurgisladdottir และคณะ (1993 อ้างโดย จูริรัตน์ แซ่เต๋ , 2541) คัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสจากแบคทีเรียที่เก็บในแหล่งรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียของ Technological Institute of Iceland (Ice Tec) ซึ่งเก็บแบคทีเรียทน อุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้จากน้ำพุร้อนทั่วประเทศไอซ์แลนด์มากกว่า 700 สายพันธุ์

Handelsman และ Shoham (1994 อ้างโดย จูริรัตน์ แซ่เต๋ , 2541) คัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงจากตัวอย่างที่มีน้ำมันปนเปื้อนในประเทศอิสราเอลได้แบคทีเรีย 44 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

Rath และ Subramanyam (1996 อ้างโดย จูริรัตน์ แซ่เต๋ , 2541) คัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงจากน้ำพุ 3 แห่งในเมือง Orissa ประเทศอินเดีย ได้แบคทีเรีย 19 สายพันธุ์ จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Bacillus* sp. ทั้งสิ้น เชื้อเจริญได้ถึงอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

Sidhu และคณะ (1998 อ้างโดย จูริรัตน์ แซ่เต๋ , 2541) แยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิ *Bacillus* sp. RS-12 ได้จากดิน เชื้อที่แยกได้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 50 องศาเซลเซียส

กลไกการทนร้อนของจุลินทรีย์ทนความร้อน

กลไกการทนร้อนของ Thermophile และ thermotolerant ยังไม่เข้าใจมากนักจากผลการศึกษาพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลภายในเซลล์บางอย่างได้แก่ มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์ทนร้อนไปจากเอนไซม์ปกติน้อย มีการเพิ่มสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวที่ผนังเซลล์ หรือมีการสังเคราะห์โปรตีนกลุ่ม Heat shock proteins ขึ้น เป็นต้น การเปลี่ยนแปลง หรือ ปรับตัวของจุลินทรีย์ให้มีชีวิตภายใต้อุณหภูมิสูงนี้เป็นกลไกที่ต้องใช้ระยะเวลายาวนาน ดังนั้น แหล่งที่อยู่จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการพิจารณา เมื่อนักวิทยาศาสตร์ต้องการแยกจุลินทรีย์ที่มีสมบัติพิเศษต่างๆ เหล่านี้ (รัตนารัตน์โรจน์ , 2534) ได้พบว่า เหตุผลที่แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสามารถมีชีวิตรอดและและเจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงนั้น เนื่องจากโครงสร้างไลปิดของผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไขมันประเภทอิ่มตัวกรดไขมันที่มีกิ่งสาขา และกรดไขมันสายยาวในสัดส่วนที่สูง จึงทำให้ผนังเซลล์ ทำหน้าที่ในการส่งสาร จึงต้องการไขมันที่อยู่ในสภาวะกึ่งของเหลว ซึ่งสภาวะนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติทางเคมีของไลปิด และอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม ผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวสายยาว และกรดไขมันที่มีกิ่ง

สาขาในสัดส่วนที่สูง เมื่อพิจารณาความแตกต่างทางธรรมชาติของโปรตีน และเอนไซม์ พบว่า คุณสมบัติหลายข้อของโปรตีนและเอนไซม์ของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง เช่น น้ำหนักโมเลกุล องค์ประกอบหน่วยย่อย คล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง แต่กลับมีความเสถียรภาพ ที่อุณหภูมิสูง จึงควรเป็นผลมาจากการดะมิโนในสายเปปไทด์ ซึ่งมีผลต่อโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary) และจตุรภูมิ (quarternary) ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีความแข็ง และยืดหยุ่นต่ำภายใต้ ระดับปานกลาง แต่สามารถทำงานและเสถียรภาพภายใต้อุณหภูมิสูง (Vandermark and Bafzing, 1987)

จุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย หรือราที่มีการสร้างสปอร์ จะมีกลไกการทนทานของความร้อน สปอร์โดยสปอร์มีองค์ประกอบพิเศษที่ทนทานความร้อนได้ดี เช่น เอนไซม์ที่ทนความร้อน, ไม่มีน้ำอิสระ มีแร่ธาตุมาก โดยเฉพาะแคลเซียม มีกรดไดฟอสฟอริก พบว่าทนความร้อนของสปอร์ เนื่องจาก ความสัมพันธ์ระหว่าง Ca^{2+} กับการสร้างกรดฟอสฟอริก เช่น ถ้าเลี้ยงแบคทีเรียที่กำลังสร้างสปอร์ใน อาหารที่ขาด Ca^{2+} ระดับการทนความร้อนจะลดลง หรือถ้าเลี้ยงในอาหารที่ขาดกรดฟอสฟอริก ก็ให้ผล เช่นเดียวกัน จึงแสดงว่าธาตุแคลเซียมและกรดฟอสฟอริกมีความสัมพันธ์กับการทนความร้อนของ สปอร์แบคทีเรียดังกล่าวได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541)

แหล่งที่มาและคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

ในการสกัดน้ำมันปาล์มนั้นได้มีการพัฒนากันมาช้านานแล้ว นับตั้งแต่การสกัดน้ำมันแบบ พื้นเมืองอัฟริกาซึ่งใช้แรงงานคนและสัตว์ ต่อมาความต้องการน้ำมันปาล์มมีมากขึ้น จึงมีการค้นคว้า กรรมวิธีการผลิตให้ได้ปริมาณที่มากขึ้น โดยมีการใช้เครื่องมือกันมากขึ้นเพื่อให้ผลผลิตเพิ่มพูนขึ้น จากการที่ได้สำรวจโรงงานน้ำมันปาล์มในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จังหวัดสตูล และจังหวัด สุราษฎร์ธานี พบว่า กระบวนการผลิตแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การสกัดแบบไม่ใช้น้ำ (dry process) และแบบใช้น้ำ (wet process) หรือที่เรียกว่าแบบมาตรฐาน และพบว่ากระบวนการ ผลิตจะมีผลต่อคุณภาพ และปริมาณน้ำเสียของโรงงาน

จากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานจะมีน้ำทิ้งออกมาในปริมาณมาก ส่วน ใหญ่มาจากสองขั้นตอน คือ น้ำนึ่งปาล์ม หรือน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (Sterilizer condensate) และน้ำ ทิ้งจากเครื่อง decanter หรือเครื่อง separator ก่อนที่จะไหลไปรวมเป็นน้ำทิ้งรวมในบ่อบำบัดน้ำเสีย ของโรงงาน ส่วนน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (Sterilizer condensate) มีประมาณ 200 ลิตรต่อ 10 ตันของ ทะลายปาล์ม (พูนสุข ประเสริฐสรณ์ และคณะ , 2533) ปริมาณน้ำทิ้งคิดเป็น 2.5-3.0 เท่าของ ปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ (Cheah *et al.*, 1988) ส่วน Hwang และคณะ (1978) ได้รายงานว่าปริมาณ

น้ำทิ้งทั้งหมดคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณทะลายปาล์ม และมีน้ำมันร้อยละ 2 ปนอยู่ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ

คุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำทิ้ง ได้แก่ น้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสีย น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter หรือเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ลักษณะโดยรวมของน้ำทิ้งจากแหล่งต่าง ๆ เหล่านี้ พบว่าน้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสียมีค่า ซีโอดี บีโอดี ของแข็งแขวนลอย และของแข็งทั้งหมดสูงกว่าน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter หรือเครื่องเหวี่ยง (พูนสุข ประเสริฐสุรพร และคณะ, 2533)

อรัญ หันพงษ์กิตติกุล และคณะ (2537) ศึกษาการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 4 โรงงานซึ่งมีการแยกน้ำมัน 3 แบบ คือ การแยกน้ำมันโดยใช้เครื่อง decanter การแยกน้ำมันจากน้ำสลัดจ์โดยใช้เครื่อง separator และการแยกน้ำมันโดยใช้เครื่อง separator ร่วมกับ decanter และขั้นตอนสุดท้ายคือการดักน้ำมันจากน้ำทิ้งก่อนปล่อยลงสู่บ่อบำบัด โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้ decanter ในการแยกน้ำมันโดยตรงจะมีปริมาณน้ำทิ้งน้อยที่สุดคือ 0.44 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด ในขณะที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้ separator หรือ separator ร่วมกับ decanter มีปริมาณน้ำทิ้ง 0.90-1.81 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด ทั้งนี้เนื่องจากการแยกน้ำมันโดยใช้เครื่อง decanter มีการผสมน้ำปริมาณน้อยมาก ประมาณ 1 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด ในขณะที่การแยกน้ำมันจากน้ำและสลัดจ์โดยใช้เครื่อง separator หรือ separator ร่วมกับ decanter นี้ต้องมีถังลอยซึ่งเติมน้ำเพื่อให้ไขมันแยกตัวจากสารแขวนลอยได้ดี และน้ำสลัดจ์ที่ตกจมยังคงมีน้ำมันอยู่ในปริมาณมาก จะถูกนำไปเติมน้ำก่อนที่จะแยกโดยใช้ separator ร่วมกับ decanter มีปริมาณน้ำทิ้ง 0.87 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด มีค่าซีโอดี บีโอดี สารแขวนลอย และน้ำมันเท่ากับ 52.45, 26.58, 12.84 และ 8.72 กิโลกรัมต่อตันทะลายปาล์มสดตามลำดับ

ลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้เครื่อง ดีแคนเตอร์ในการแยกน้ำมัน มีพีเอช 4.65 และมีค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เฉลี่ยดังนี้คือ ซีโอดี บีโอดี สารแขวนลอย และน้ำมัน เท่ากับ 113.96, 59.39, 26.3 และ 14.7 กรัมต่อลิตร ในขณะที่โรงงานที่ใช้ separator หรือ separator ร่วมกับ decanter มีพีเอช 4.53-4.67 และมีค่าพารามิเตอร์เหล่านี้ใกล้เคียงกัน และอยู่ในช่วง 42.64-68.34, 21.45-30.70, 5.2-20.8 และ 7.6-14.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับ นอกจากนี้ น้ำทิ้งยังประกอบด้วย อินทรีย์สารและแร่ธาตุต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่ ไนโตรเจน (1.37-2.08 เปอร์เซ็นต์) โปแตสเซียม (0.09-4.15 เปอร์เซ็นต์) ฟอสฟอรัส (0.28-0.42 เปอร์เซ็นต์) เป็นต้น และ (Okiy, 1987; Hwang *et al.*, 1987 อ้างโดย อารี อังแสง, 2536) พารามิเตอร์เหล่านี้ล้วนบ่งชี้ให้เห็นแนวโน้มที่น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจะก่อให้เกิดปัญหาด้านมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้

เนื่องจากในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีน้ำมันเจือปนอยู่มาก การแยกหรือกำจัดน้ำมัน (หรือไขมัน) ในน้ำทิ้ง เป็นก การบำบัดขั้นต้นก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดขั้นที่สองด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียที่สามารถใช้น้ำมันและไขมันเป็นสารอาหาร มีปริมาณน้อยชนิด นอกจากนี้การกำจัดน้ำมันออกจากกระบวนการบำบัดจะยุ่งยาก ดังนั้นในการบำบัดขั้นต้นจึงมีการกำจัดน้ำมัน และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ออกจากระบบเพื่อจะทำให้การบำบัดขั้นต่อไปมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ซึ่งการบำบัดน้ำทิ้งที่มีน้ำมันและไขมันเป็นองค์ประกอบ จำเป็นต้องทำการบำบัดขั้นต้นแบบกายภาพ-เคมีก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดโดยใช้จุลินทรีย์ การกำจัดน้ำมันและไขมันสามารถทำได้โดยการ ทำให้น้ำมันและไขมันเกิดการลอยตัว โดยอาศัยการกระจายตัวของฟองอากาศจากเครื่องอัดอากาศ (Forster, 1992 อ้างโดยโสภา จันทภาโส, 2542)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการใช้น้ำมันของเชื้อรา

อิทธิพลของสารอาหาร อุณหภูมิ พีเอช การให้อากาศ มีผลต่อการเจริญและการใช้น้ำมันของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ

1. สารอาหาร

จุลินทรีย์สามารถทำลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียโดยใช้เป็นอาหารในการดำรงชีวิต เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ แต่เนื่องจากน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมหลายชนิดจะมีปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอ จึงจำเป็นต้องเติมลงไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารอาหารประเภทธาตุอาหารหลัก (macronutrients) ซึ่งทราบได้จากการวิเคราะห์ค่าของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสของน้ำเสีย และเปรียบเทียบกับอัตราค่าสุดของ BOD_5 : N:P เท่ากับ 100:5:1 หากน้ำเสียมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่ำกว่านี้ แสดงว่าน้ำเสียขาดสารอาหาร จำเป็นต้องเติมลงไป การเติมปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้เพียงพอจะมีผลให้การเจริญของจุลินทรีย์ไม่ถูกจำกัด ปฏิริยาการบำบัดขั้นต้นได้อย่างเต็มที่และประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม พบว่าในระบบ activated sludge ที่มีการเติมสารอาหารจะมีความต้องการออกซิเจนมากกว่าระบบที่ไม่เติมสารอาหาร (Wuhrman, 1956 อ้างโดยปรีชา มุณิศรี, 2539)

รูปแบบของสารอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ NH_3 , N, NO_2 , N, NO_3 , N และ Org-N จะมีผลต่อการที่แบคทีเรียจะนำไปใช้ในการเจริญ แต่สารอินทรีย์ไนโตรเจนจะไม่มีประโยชน์จนกว่าได้ถูกย่อยสลายอยู่ในรูป alkanolamine และกรดอะมิโน ดังนั้นไม่ควรเติมในรูปของสารอินทรีย์ไนโตรเจนเพื่อเพิ่มไนโตรเจนให้กับน้ำเสีย ถ้าหากไม่พอ ควรเติม $(NH_4)_2SO_4$ แต่ถ้าไม่ต้องการ

ให้เซลล์เฟดมาเกี่ยวข้อง ด้วยให้ใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 และ KH_2PO_4 แทน (Symons *et al.*, 1960 อ้างโดยปรีชา มุณีศรี, 2539)

Barker และคณะ (1981) ศึกษาการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* ในน้ำทิ้งจากการละลายปาล์มและสลัดจ์ เพื่อให้ได้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 20 : 1 ในการศึกษาจะเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ โดยอัตราส่วนที่เติมประมาณ 14 : 1 เลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าจะได้เซลล์ที่มีโปรตีน 39.6 เปอร์เซ็นต์และลด ซีโอดีได้ 75 เปอร์เซ็นต์

Pokomy และคณะ (1994 อ้างโดยปรีชา มุณีศรี, 2539) ศึกษาผลของแหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อการผลิตไลเปสของเชื้อ *A. niger* ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้ร้อยละ 0.1 NH_4NO_3 ร่วมกับร้อยละ 0.1 NH_2PO_4 เชื้อจะผลิตไลเปสได้มากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแหล่งอื่น ส่วนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.2 ของ NH_4NO_3 และร้อยละ 0.2 ของ KH_2PO_4 ที่เวลาการเลี้ยง 2 วัน เชื้อจะผลิตไลเปสได้สูงสุด

2. อุณหภูมิ

จุลินทรีย์ทั่วไปตามธรรมชาติ สามารถจัดแบ่งออกตาม ช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญ 3 กลุ่ม คือ Psychophile เจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 15 - 20 องศาเซลเซียส Mesophile เจริญได้ดีในอุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิที่เหมาะสม 20 - 40 องศาเซลเซียส และ Thermophile พวกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง การเพิ่มอุณหภูมิขึ้น ทุกๆ 10 องศาเซลเซียส จะทำให้จุลินทรีย์ เจริญขึ้นเท่าตัวจนถึงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การบำบัดทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่ำจะตกได้ ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง ถ้าอุณหภูมิในถังตกตะกอนมีการเปลี่ยนแปลงต่างกันเกิน 2 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการไหลวนของน้ำเนื่องจากมีความหนาแน่นแตกต่างกันซึ่งเรียกว่า density current (สุรพล สายพานิช, 2537)

อัตราการลดลงซีโอดีจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ แต่จะลดลงหากอุณหภูมิสูงเกินไป (ไม่ควรเกิน 40 องศาเซลเซียส) ปฏิกริยาชีวเคมีแบบไม่ใช้อากาศจะเกิดขึ้นได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิสูงระหว่าง 48-57 องศาเซลเซียส (ปรีชา มุณีศรี, 2539)

Cooney และ Emerson (1964 อ้างโดย มานะ กาญจนะเสถียร, 2537) กล่าวว่าเชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูง (Thermophilic) หมายถึง เชื้อราในกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในแหล่งที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 จนถึง 50 หรือ 55 องศาเซลเซียส เช่น *Humicola grisea thermoidea* และ *Rhizomucor pusillus* ส่วนเชื้อราในอีกพวกหนึ่งคือ เชื้อราทนร้อนหมายถึง เชื้อราในกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในแหล่งที่

อุณหภูมิต่ำกว่า 20 จนถึง 50 หรือ 55 องศาเซลเซียส (Crisan, 1973 อ้างโดยมานะ กาญจน์เสถียร , 2537) เช่น *A. fumigatus*, *Geotrichichum* sp. (มานะ กาญจน์เสถียร, 2537)

Yeoh (1986 อ้างโดยปรีชา มณีศรี , 2539) ทดลองใช้จุลินทรีย์ รักษ์กลุ่ม thermophilic anaerobic (45 – 55 องศาเซลเซียส) ที่ไม่ต้องการอากาศมาบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าพบว่าเชื้อเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าบีโอดี ที่ 3 วันลดลงมากที่สุด (ร้อยละ 95) และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจะได้ก๊าซมีเทนมากที่สุด (ร้อยละ 69) เมื่อเทียบกับอุณหภูมิอื่นๆ (45-55 องศาเซลเซียส)

Borja และ Banks (1993 อ้างโดยปรีชา มณีศรี, 2539) ทดลองบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแบบกึ่งต่อเนื่องไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถลดค่าซีโอดีกว่า ร้อยละ 96 หลังการหมักเป็นเวลา 7 วัน ได้ก๊าซมีเทน 10-15 กิโลกรัมของซีโอดีต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน

ปรีชา มณีศรี (2539) ได้เปรียบเทียบการกำจัดน้ำมันในน้ำทิ้งโดยยีสต์ *Candida tropicalis* F- 129 และ *C. palmeoliophila* Y – 128) ไร (*A. niger* ATCC 6275 และ *A. oryzae*) และเชื้อราทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกไว้ (ST4 และ ST 29) พบว่าเชื้อ ST 29 ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดน้ำมันได้สูงสุด (ร้อยละ 99.65) ได้ปริมาณมวลชีวภาพ 44.56 กรัมต่อลิตร ซึ่ง Lee และคณะ (1993) เลี้ยงเชื้อ *C. tropicalis* F129 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมัน อยู่ ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิช่วง 30-43 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม

3. พีเอช

จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์เจริญได้ดีที่พีเอชต่างกัน โดยที่เชื้อราจะเจริญได้ดีที่พีเอชต่ำกว่า 6.5 ส่วนแบคทีเรียเจริญได้ดีที่พีเอชระหว่าง 6.5-8.5 ที่พีเอชมีค่าต่ำกว่า 6.5 ทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพต่ำลง และตะกอนเร่งตกตะกอนได้ไม่ดี ส่วนพีเอชที่มีค่าสูงทำให้ฟอสฟอรัสมีการแยกตัวออกมาจากน้ำ (precipitate) และจุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทำให้ระบบทำงานได้ไม่ดี (สุรพล สายพานิช, 2537)

ในระบบบำบัดน้ำเสีย พีเอชต้องอยู่ในช่วง 6.5–9 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 6.5 ราจะเจริญแข่งขันกับแบคทีเรีย และเมื่อพีเอชลดลงถึง 4.5 จะมีมากกว่าแบคทีเรียที่พีเอชสูงกว่า 9 แบคทีเรียย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ช้าลง พีเอชที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศอยู่ในช่วง 6.6 – 6.7 ถ้าพีเอชสูงหรือต่ำกว่านี้จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการบำบัดลดลง ที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 6.2 ประสิทธิภาพลดลงอย่างรวดเร็ว เพราะสภาวะที่เป็นกรดนั้นจะเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียที่สร้าง ก๊าซมีเทน (เสริมพล รัตสุข และ ไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์ 2524)

Ibrahim และ Noor (1991) ศึกษาผลิตไลเปส โดยเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ในอาหารสังเคราะห์ ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 สภาพการเลี้ยงมีการกวนให้อากาศ ที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 4.5–5.5 พบว่าหลังจากเลี้ยง 24 ชั่วโมง ได้ เอนไซม์ไลเปส 40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ไลเปส คือ พีเอช 4.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4. การให้อากาศ

ในระบบการบำบัดน้ำเสียนิยมใช้ทั้งแบบให้อากาศและไร้อากาศ หรือทั้งสองแบบ ซึ่งขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการหมักและชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในถังเดิมอากาศจะต้องมีค่าออกซิเจนละลายน้ำระหว่าง 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำนี้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ หากอุณหภูมิสูงจุลินทรีย์สามารถทำงานได้มากก็ต้องการออกซิเจนมาก นอกจากนี้ที่อุณหภูมิสูงออกซิเจนจะมีค่าการละลายน้ำอิ่มตัว (saturation value) ต่ำ จึงทำให้ต้องใช้ออกซิเจนมาก ในทำนองกลับกันหากอุณหภูมิต่ำ ความต้องการเติมอากาศน้อยกว่าที่อุณหภูมิสูงในการที่จะรักษาระดับความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำที่มีค่าเท่ากัน (สุรพล สายพานิช, 2537)

5. การกวน

การกวนทำให้จุลินทรีย์ อากาศ และสารอาหารในน้ำเสียผสมกันอย่างทั่วถึงและช่วยให้ฟองอากาศมีขนาดเล็ก ระบบการกวนที่มีประสิทธิภาพจะต้องทำให้การละลายของออกซิเจนในน้ำที่มีปริมาณเท่าๆกันทุกจุดในถังหมัก การกวนนิยมใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบให้อากาศ ภายในถังเดิมอากาศจะต้องมีการ กวนอย่างทั่วถึงเพื่อป้องกันมิให้เกิดตะกอนจุลินทรีย์ และเพื่อให้จุลินทรีย์ได้สัมผัสกับน้ำที่ส่งเข้ามาบำบัดโดยใช้เป็นอาหารและลดมลสารต่าง ๆ รวมทั้งจะได้จับตัวกันเป็นกลุ่มกัน และทำให้ระบบมีประสิทธิภาพในการกำจัดมลสารสูง การกวนที่สมบูรณ์ในถังเดิมอากาศจะต้อง มีความเข้มข้นของตะกอนเร่ง และค่าความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำสม่ำเสมอหมดตลอด (สุรพล สายพานิช, 2537)

Ibrahim และ Noor (1991) ศึกษาผลการกวน (200, 250, 300 และ 400 รอบต่อนาที) ต่อกิจกรรมของไลเปส การเจริญของเชื้อ และการใช้น้ำมันของเชื้อ *A. niger* ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที เชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่เวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง และการลดลงของน้ำมันก็จะดีที่สุดที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที รองลงมาคือ 250, 200 และ 400 รอบต่อนาที และยังพบว่าอัตราการกวนสูง (มากกว่า 400 รอบต่อนาที) จะทำให้เซลล์ถูกทำลายได้

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์ม

เนื่องจากน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มมีปริมาณสารอินทรีย์สูงและประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิดที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ จึงมีการศึกษาที่จะใช้น้ำทิ้งเป็นสารอาหารของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์และสามารถนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้สำหรับการบำบัดน้ำทิ้งได้ด้วยส่วนหนึ่ง

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์ม

1. เซลลูเลส (cellulase)

วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเป็นสารลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (จารูวรรณ มณีศรี , 2536) การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเซลลูเลสได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เช่น กลูโคส เซลโลไบโอส ซึ่งละลายน้ำได้

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกลไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีนเท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ดี เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์เชิงซ้อนประกอบด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ endo-beta-1,4 glucan glucanohydrolase (E.C.3.2.1.4) หรือ endo-beta-1,4 glucanase, exo-beta-1,4glucan cellobilhydrolase(E.C.3.2.1.19) , beta- glucosidase (E.C.3.2.2.1) และ exo-beta-1,4 glucan glucohydrolase(E.C.3.2.1.7.4) หรือ exo-beta-1,4 glucosidase (Fan and Lee, 1983 อ้างโดย จารูวรรณ มณีศรี,2536)

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยเซลลูโลสโดยเซลลูเลสซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส แต่อาจต่ำกว่าหรือสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำมาผลิต จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา แบคทีเรียได้แก่ พวกที่ต้องการอากาศเช่น *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Pseudomonas* พวกเจริญได้ทั้งสภาพมีอากาศและไม่มีอากาศ (Facultative) เช่น *Cellulomonas* พวกที่ไม่ต้องการอากาศเช่น *Clostridium*, *Thermophilum*, *Rumincoccus albus*, *Bacterroier*, *Acetivibrio* (Mandels, 1975 อ้างโดยเบญจวรรณ ชิตมณี, 2534)

จุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสได้ส่วนใหญ่จะเป็นพวกเชื้อราได้แก่ *Trichoderma reesel* (ชื่อเดิม *Trichoderma viride*), *T. koningii*, *Penicillium funiculosum*, *P. iriensis*, *P. verruculosum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus*, *Phanerochaete chrysosporiu* (*Sporotrichum*, *Phanerochaete*), *Polyporus adustus*, *Myorthecium verruculosum*, *Penicillium filamentosa* และ

Eupenicillium javanicum ส่วน *Trichoderma fungi* ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้มี *Chaetomium thermophile vardissitu*, *Sporotrichum thermopilicum* และ *Trichoderma auarntiacus* เชื้อราพวกนี้ย่อยเซลลูโลสได้รวดเร็วแต่กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสใน Culture filtrate ต่ำ (Mandels, 1975 อ้างโดยเบญจวรรณ ชิตมณี, 2534)

เบญจวรรณ ชิตมณี (2534) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มโดยเชื้อราที่แยกได้ พบว่าเชื้อรา F11 มีคุณสมบัติในการย่อยกระดาษกรอง และให้อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวให้ค่าแอกติวิตี CMCase เท่ากับ 0.101 หนึ่งต่อมิลลิลิตร และปริมาณโปรตีนของเซลล์ร้อยละ 20.6

Prasertsan และคณะ (1997) ศึกษาการประยุกต์เอนไซม์เซลลูเลส และไซลานเนส ที่ผลิตจาก *A. niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ทางค้า คือ Meicellase และ Sumzyme มาบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่า เอนไซม์ทั้งสองแหล่งสามารถแยกปริมาณน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ 99.0 เปอร์เซ็นต์, 99.7 เปอร์เซ็นต์ และ 96.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และค่าซีไอดี 76 เปอร์เซ็นต์, 69 เปอร์เซ็นต์และ 76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. ไซลานเนส (xylanase)

ส่วนเฮมิเซลลูโลส เป็น พอลิแซ็กคาไรด์เช่นเดียวกับเซลลูโลส แต่โมเลกุลมีขนาดเล็กกว่า และมี side chain ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดเช่น ไซโลส กลูโคส แมนโนส กาแลคโตส อะราบินโนส (Tsao และ Chiang, 1993 อ้างโดยเบญจวรรณ ชิตมณี, 2534) องค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส คือ ไซแลน ซึ่งเป็น xylopyranose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β (1 $\rightarrow$ 4) ไซแลนจากการแหล่งต่างๆ มีโครงสร้างเหมือนกัน จะต่างกันในส่วน side chain โดยทั่วไปไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อนมีประมาณ 15–30 เปอร์เซ็นต์ และ 7–12 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Whitler and Richard, 1970 อ้างโดยจารวรรณ มณีศรี, 2538) เอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส แบ่งออกเป็น 2 ชนิด (Dekker and Richard, 1976 อ้างโดยจารวรรณ มณีศรี, 2538) คือ endo-beta-1,4 xylan xylanohydrolase (E.C.3.2.1.8) และ exo beta-1,4 xylohydrolase (E.C.3.2.1.37)

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสพบทั้งในแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ ในแบคทีเรียพบเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Aeromonas caviae* W-61 (Viet et al., 1991 อ้างโดยัญญา ศรีโพธิ์, 2538), *Bacillus polymyxa* (morale et al., 1993 อ้างโดยัญญา ศรีโพธิ์, 2538) เป็นต้น ในเชื้อราพบ Aspergillus fumigatus และ A. oryzae (Bailey and Viikari, 1993 อ้างโดยัญญา ศรีโพธิ์, 2538), Trichoderma koningii G-39 (Huang, et al., 1991 อ้างโดยัญญา ศรีโพธิ์, 2538)

เอนไซม์ไลลาเนสพบในยีสต์พวก *Cryptococcus* เช่น *C. flavus* (Nakanishi *et al.*, 1984 อ้างโดย รัชญา ศรีโพธิ์, 2538)

โศภา จันทภาโส (2542) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์และการลดความเข้มข้นของสี พบว่า น้ำทิ้งต้องมีปริมาณน้ำมันไม่ต่ำกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะทำให้เกิดตะกอนเบาจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ และความเข้มข้นต่ำสุดของเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ไลลาเนสทางการค้า (Meicellase) คือ 200 และ 600 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และพบว่า การแยกสารแขวนลอยออกมาทดลองลดความเข้มข้นของสีด้วยวิธีการต่าง ๆ วิธีทางเคมีโดยใช้สารช่วยตะกอนมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของสีได้สูงกว่าวิธีการทางชีวภาพ

3. ไลเปส (lipase)

ไลเปส (Lipase หรือ Triacylglycerol acylhydrolase ; E.C.3.1.13) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ (ester bond) ของ tri-, bi หรือ monoglycerides ให้เป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมัน กลไกการทำงานของเอนไซม์นี้แตกต่างจากเอนไซม์ที่ละลายน้ำทั่วไปคือ จะเร่งปฏิกิริยาที่บริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและน้ำมัน (oil water interface) ทั้งนี้เนื่องจากสัณฐานของเอนไซม์นี้เป็น hydrophobic lipid ซึ่งอยู่ใน hydrophilic aqueous medium และโดยเหตุนี้ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไลเปส จึงมีสมบัติทางจลนศาสตร์ไม่เป็นไปตาม Michaelis-Menten model (Jaeger *et al.*, 1994 อ้างโดย รัตนา เรืองไรรัตนาโรจน์ และจันทรา ปุรินทรภิบาล, 2534) แหล่งของไลเปสพบทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในจุลินทรีย์ ปัจจุบันได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากสามารถผลิตไลเปสได้ในปริมาณสูงและมีความคงตัวดี จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *A. niger* (Sugihara *et al.*, 1988 อ้างโดย วุฒิชัย พิชัยยุทธ, 2538), *Pseudomonas fluorescens*, *Candida rugosa* (Veeragavan and Gibbs, 1989 อ้างโดย วุฒิชัย พิชัยยุทธ, 2538)

Pokomy และคณะ (1994 อ้างโดย ปรีชา มุณีศรี, 2539) พบว่าเชื้อ *A. niger* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิตได้มากขึ้นเมื่อเติมร้อยละ 0.1 NH_4NO_3 ร่วมกับร้อยละ 0.1 NH_2PO_4

รัตนา เรืองไรรัตนาโรจน์ และจันทิมา ปุรินทรภิบาล (2537) คัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งและกากทะลายปาล์ม จำนวน 7 ตัวอย่าง พบจุลินทรีย์จำนวน 33 ไอโซเลทและได้นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า มี 10 ไอโซเลท มีแอกติวิตีไลเปส โดยให้ผลเป็นบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบแบบแข็ง Tween-80 agar ที่ 60 องศาเซลเซียส

4. เพคตินเนส (pectinase)

โดยทั่วไปของพืชไม้ผลโดยเฉพาะผลจะมีสารประเภทเพคตินอยู่จำนวนมาก ซึ่งพบทั่วไปในผนังเซลล์ของพืชชั้นสูง และชั้นระหว่างเซลล์ของพืช ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มลักษณะคงตัวของเนื้อสัมผัส (texture) ของผักและพืชไม้ผล Barker และคณะ (1981) ศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากหม้อฆ่าเชื้อ พบว่ามีปริมาณเพคติน 5.7 กรัมต่อลิตร ส่วนประกอบประเภทเพคติน และอนุพันธ์ของพอลิเมอร์ของ α -1, 4-D-galacturonopyranose units เป็นสับสเทรตของเพคตินเนส ซึ่ง polygalacturonase เป็นชนิดหนึ่งของเพคตินเนส สับสเทรตของเพคตินเนส มีหลายประเภท ดังรายละเอียดต่อไปนี้ คือ

4.1. สารประเภทเพคติน (Pectin substances) เป็นคอลลอยด์ของคาร์โบไฮเดรตในพืช ประกอบด้วย anhydrogalacturonic acid units และอนุพันธ์

4.2. โปรโตเพคติน (Protopectin) เป็นสารเพคตินต้นตอที่ไม่ละลายน้ำของพืช

4.3. เพคติน (Pectin) ทั่วไปสำหรับเรียกสารประเภทเพคตินที่มีหมู่คาร์บอกซิล ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ถูกทำให้เป็นเอสเทอร์ด้วยเมทานอล เพคตินเป็นสารพวคคอลลอยด์ ที่ทำให้เกิดเจล ระหว่างน้ำตาลและกรดดี นำไปใช้ในการทำเยลและเยลลี่ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)

เพคติน (pectin) ตามคำจำกัดความของ American Chemical Society ในปี 1926 หมายถึง สาร methylated ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของโปรโตเพคติน (protopectin) ถ้าขจัด methyl groups ออกจนหมด จะได้กรดเพคติน (pectin acid) ประโยชน์ของเพคติน คือ ใช้ทำเยลและเยลลี่ ต่อมามีการแก้ไขความหมายใหม่ให้รัดกุมยิ่งขึ้น โดยให้คำจำกัดความว่า เพคตินนั้น หมายถึง ชื่อที่ใช้แทนกลุ่มสาร water-soluble pectinic acids ซึ่งมีจำนวน methyl ester groups แตกต่างกันไป และภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เพคตินสามารถเกิดเจล (gel) กับน้ำตาลและกรดได้ สำหรับเพคตินที่มี methyl estersอยู่น้อย ถ้ารวมกับโลหะหนักจะเกิดเจลได้ (Kertesz, 1951 อ้างโดย นัยทัศน์ ภูธรันย์, 2529)

เพคติน เป็นกลุ่มสารพวค complex colloidal carbohydrates ในโมเลกุลประกอบด้วย กรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acid) ที่ต่อกันด้วย α - 1, 4 glucosidic linkage โดยที่ carboxyl groups บางตัวของกรดกาแลกทูโรนิกถูก esterified ด้วย methyl groups เพคตินมีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 40,000-50,000 เพคตินเป็นสารพอลิเมอร์ของกรดกาแลกทูโรนิก โดย carboxyl groups ของกรดดังกล่าวจับกับ methyl groups หรือจับกับ araban, galactan หรือ polysaccharides ตัวอื่นๆ ก็ได้ นอกจากนี้ hydroxyl groups บนอะตอมของคาร์บอนตัวที่ 2 และที่ 3 ของกรดดังกล่าว ยังอาจจับกับ acetyl groups หรือเกิด ether - like linkages กับสารคาร์โบไฮเดรตตัวอื่นๆ หรืออยู่เป็นอิสระก็ได้ ส่วน side chains ของเพคตินอาจเกิด ester linkages ระหว่าง carboxyl groups กับ hydroxyl groups ของสารคาร์โบไฮเดรต หรือเกิด hemiacetyl linkage ระหว่าง reducing groups ที่

อยู่ปลาย polysaccharides กับ hydroxyl groups ของ polygalacturonides หรือเกิด ether linkages ระหว่าง hydroxyl groups กับ polysaccharides หรือ polygalacturonides (นัยทัศน์ ภู่อรรถ, 2529)

4.4. กรดเพคติน (Pectin acid) เป็นพอลิเมอร์ของ anhydrogalacturonic acid units มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระ

4.5. กรดเพคตินิก (Pectinic acid) เป็นสารที่รวมหมายถึงเพคติน ซึ่งมีหมู่เมทิลเอสเทอร์เล็กน้อย

แหล่งพบเพคติน

พบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่นเดียวกับที่พบสารประเภทเพคติน แต่อยู่คนละชั้นของเซลล์ แต่เมื่อเซลล์พืชถูกขาดหรือได้รับการกระทบกระเทือน เอนไซม์และเพคตินจะเคลื่อนเข้าใกล้กัน ทำให้เกิดการย่อยสลาย ลักษณะความคงตัวของเนื้อสัมผัสของผักผลไม้เสียไป ผักผลไม้จะนิ่มลง ปัจจุบันได้มีการผลิตเพคตินสำหรับการค้าจากการสกัดจุลินทรีย์ ไม่พบเพคตินในสัตว์ ยกเว้น หอยทาก (snail)

การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบ

การแยกหรือกำจัดน้ำมัน (หรือไขมัน) ในน้ำทิ้ง เป็นการบำบัดขั้นต้นก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดขั้นที่สองด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียที่สามารถใช้น้ำมันและไขมันเป็นสารอาหารมีปริมาณน้อยชนิด นอกจากนี้การกำจัดน้ำมันออกจากระบบการบำบัดจะยุ่งยาก ดังนั้นในการบำบัดขั้นต้นจึงมีการกำจัดน้ำมัน และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ออกจากระบบเพื่อจะ ทำให้การบำบัดขั้นต่อไปมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันเป็นองค์ประกอบ จำเป็นต้องทำการบำบัดขั้นต้นแบบกายภาพ-เคมีก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดโดยใช้จุลินทรีย์ การกำจัดน้ำมันและไขมันสามารถทำได้โดยการให้น้ำมันและไขมันเกิดการลอยตัว โดยอาศัยการกระจายตัวของฟองอากาศจากเครื่องอัดอากาศ (Forster, 1992, อ้างโดยโสภณ จันทภาโส, 2542)

อรรณู หันพงศ์กิตติกุล และคณะ (2537) ได้ศึกษาทดลองแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการต่างๆ พบว่าน้ำมันที่มีอยู่ในน้ำทิ้งจากหม้อต้มมาเชื้อสามารถแยกได้ง่าย โดยต้มทิ้งไว้ก็เกิดการแยกชั้น สำหรับน้ำทิ้งจากเครื่องแยกหรือน้ำทิ้งจากบ่อพักน้ำทิ้งรวมไม่สามารถแยกออกโดยวิธีการตกจม (normal setting) การใช้ความร้อนพร้อมกับการแกว่งโดยทำอย่างช้า ๆ (15 รอบต่อนาที) การใช้สารช่วยตกตะกอน เช่น FeCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ การใช้วิธีการกระจายอากาศ (dissolved air floatation) ก็ไม่สามารถแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ เมื่อน้ำทิ้งจากเครื่องแยก Separator เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง จะทำให้น้ำทิ้งแยกออกเป็น 3 ชั้นมีปริมาณชั้นบน 2-14

เปอร์เซ็นต์ ชั้นกลาง 57-77 เปอร์เซ็นต์ และชั้นล่าง 16-28 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละชั้นมีปริมาณน้ำมัน 4.00-5.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับน้ำทิ้งจากบ่อน้ำทิ้งรวม เมื่อทำการหมუნเหวี่ยงมีปริมาณชั้นบน 3-13 เปอร์เซ็นต์ ชั้นกลาง 60-79 เปอร์เซ็นต์ และชั้นล่าง 10-28 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละชั้นมีปริมาณน้ำมัน 1.67-2.64 เปอร์เซ็นต์, 0.08-0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 3.14-4.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การหมუნเหวี่ยงของน้ำทิ้งจากเครื่องแยกน้ำมันจากบ่อน้ำทิ้งรวมสามารถแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ 5-30 เปอร์เซ็นต์ และทำให้น้ำทิ้งสุดท้ายมีค่าซีโอไซด์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณน้ำมันลดลง 85 เปอร์เซ็นต์ และวิธีที่น่าจะเป็นไปได้ในการกำจัดน้ำมันออกจากน้ำทิ้ง คือ วิธีบำบัดทางชีวภาพ โดยใช้จุลินทรีย์ที่ต้องการ และไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ และการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำเสีย เนื่องจากมีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ สามารถใช้น้ำมัน เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ ได้แก่ *Aspergillus* sp. (Prasertsan *et al.*, 1997), *Rhizopus* sp. (Rasak *et al.*, 1997), *Trichoderma harzianum* และ *Myceliophthora thermophila* (Vikineswary *et al.*, 1997), *Trichoderma viride* (Karim and Kamill, 1989) และที่สำคัญพบพวกจุลินทรีย์ทนร้อน Vikineswary และ Shim (1996) แยกเชื้อ *Myceliophthora thermophila* โดยการคัดเลือกเชื้อจาก น้ำทิ้งสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถย่อยเซลลูโลสและอะไมโลส มีแอกติวิตีของเซลลูเลส 1330 ยูนิตต่อมิลลิตร และแอกติวิตีการย่อยแป้ง 1800 ยูนิตต่อมิลลิตร

นอกจากนี้สามารถใช้เอนไซม์ในการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม จารูวรรณ มณีสรี (2538) ได้ใช้เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ไฮโดรไลติกการค้ำ คือ Meicellase และ Symzyme พบว่าทั้ง 3 ชนิดสามารถแยกปริมาณน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ร้อยละ 99.04, 99.70 และ 96.0 ตามลำดับที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืน รวมทั้งสามารถแยกสารแขวนลอยจากน้ำทิ้งได้ร้อยละ 71.4, 70. และ 69.8 ทำให้ออกไซด์ลดลงร้อยละ 76.0, 69.4, และ 76.5 ตามลำดับ

การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้เชื้อราจะเป็นการบำบัดแบบให้อากาศมีหลายระบบทั้งแบบง่าย ๆ โดยอาศัยอากาศจากธรรมชาติ และแบบอาศัยอากาศจากเครื่องให้อากาศ เช่น activated sludge หรืออาจจะใช้การกวน แต่มีหลักการที่เหมือนกัน คือ ใช้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ และกำจัดสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำเสีย

Karim และ Kamil (1989) ศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อ *T. viride* โดยศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์ม และน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มที่ผ่านการต้มให้เดือด นาน 10 นาที แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง โดยเติมสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา *T. viride* ซึ่งน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมเชื้อและไม่เติมเชื้อมีค่า ซีโอไซด์เริ่มต้นประมาณ 700-850 และ 1,000-1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าเวลาผ่านไป 10 และ 14 วัน

สามารถลดค่าซีไอดีจากการใช้เส้นใย และสปอร์ลงเหลือ 56 และ 44 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ หรือมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับค่าซีไอดี ของชุดควบคุมซึ่งไม่ต้ม และไม่มีการเติม เชื้อราลงไป ลดลงประมาณ 43-52 เปอร์เซ็นต์ ได้มวลชีวภาพของชุดที่เติมเชื้อจากการใช้ไมซีเลียม ของน้ำทิ้งที่ผ่านการต้มและไม่ผ่านการต้มประมาณ 1.42 และ 1.32 กรัมต่อลิตรของน้ำหนัก ไมซีเลียมแห้ง หลัง 10 วันตามลำดับ ส่วนมวลชีวภาพของชุดที่เติมเชื้อจากการใช้สปอร์ของน้ำทิ้งที่ ผ่านการต้มและไม่ผ่านต้มประมาณ 1.29 และ 1.21 กรัมต่อลิตรของน้ำหนักไมซีเลียมแห้ง หลัง 14 วันตามลำดับ และ โปรตีน 37.6-40.7 เปอร์เซ็นต์ของการใช้ไมซีเลียมและสปอร์ของน้ำทิ้งที่ผ่านการ ต้มและไม่ผ่านต้ม

ปรีชา มุณิสรี (2539) ศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้จุลินทรีย์ พบว่าการบำบัดน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ในขั้นแรกด้วยเชื้อราทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ ST 29 ในสภาพปลอดเชื้อสามารถกำจัดน้ำมันและกริสได้ 99.01 เปอร์เซ็นต์ ค่าซีไอดีลดลง 69 เปอร์เซ็นต์ และได้ปริมาณมวลชีวภาพ 48.19 กรัมต่อลิตร ส่วนภายใต้สภาวะไม่ปลอดเชื้อ น้ำมัน และกริสลดลง 90.30 เปอร์เซ็นต์ ค่าซีไอดีลดลง 73 เปอร์เซ็นต์ และได้ปริมาณมวลชีวภาพ 44.87 กรัมต่อลิตรได้ดีกว่าเชื้อราทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ ST 4 และจากการสังเกต ลักษณะการ เจริญของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า เมื่อเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เส้นใยของเชื้อ รวมกันเป็นก้อนและมีสีดำ โดยภายในก้อนเส้นใยจะมีเศษตะกอนและน้ำมันรวมอยู่ด้วย เมื่อ วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและกริสที่มีอยู่ในเส้นใยของสายพันธุ์ ST 29 พบว่ามีปริมาณน้ำมันและกริส 0.04 กรัมต่อกรัมมวลชีวภาพ หรือ 7.80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำมันเริ่มต้น ซึ่งแสดงว่าเชื้อรา ST 29 สามารถใช้น้ำมันได้จริง 91.85 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการบำบัดขั้นที่สองด้วย *Rhodocyclus gelationosus* R7 ในสภาพปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อพบว่า เชื้อสูงสุดที่เวลา 8 วัน ให้ปริมาณ มวลชีวภาพ 2.87 และ 2.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Vikineswary และคณะ (1997) เลี้ยง *Trichoderma harzianum* และ *Myceliophthora thermophila* ในน้ำทิ้งของน้ำมันปาล์ม และได้ทำการศึกษาการเจริญโดยการเลี้ยงแบบ batch พบว่า หลังจากการเลี้ยง 24 ชั่วโมง *M. thermophila* ให้มวลชีวภาพ 28.6 กรัมต่อลิตร บีไอดีและซีไอดี ลดลง 72 เปอร์เซ็นต์ และ 74 ตามลำดับ ส่วน *T. harzianum* ให้มวลชีวภาพ 20 กรัมต่อลิตร บีไอ ดีและซีไอดีลดลง 67 เปอร์เซ็นต์ และ 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Sayadi และ Ellouz (1992) รายงานว่า *Phanerochaete chrysosporium* สามารถที่จะลดค่า สีของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอกได้ 35 เปอร์เซ็นต์ และสามารถย่อยสลายสารที่มีน้ำหนัก โมเลกุลสูงและต่ำได้ เป็นผลให้ค่าซี ไอดีลดลงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรานี้สามารถผลิต

เอนไซม์ที่สำคัญ คือ ลิกันเนส ซึ่งสามารถย่อยสลายสารพวก xenobiotic และ organopollutant ได้หลายชนิด

น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นมลภาวะต่อสภาพแวดล้อมอย่างมาก และเป็นปัญหาในการกำจัดโดยกระบวนการทางชีวภาพ การใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยลดปริมาณสารต่างๆ ได้โดยใช้สารต่างๆ ที่มีอยู่น้ำทิ้งเป็นสับสเตรต โดยนำน้ำทิ้งมาทำงานร่วมกันกับเอนไซม์ในระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อที่จะให้น้ำทิ้งมีความเป็นพิษน้อยลง มีการพัฒนานำเอนไซม์ที่ถูกตรึงมาใช้ในการบำบัดน้ำ ทิ้ง ตัวอย่างการใช้เอนไซม์แลก แคสที่ถูกตรึงจาก *Lentinula edodes* และใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอก โดยศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์แลก แคส และใช้บำบัดน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอก แล้วยังสามารถลดสีของน้ำทิ้งได้ด้วย (Annibale *et al.*, 1999) และมีรายงานพบว่าเชื้อรา *Lentinula edodes* สามารถผลิตเอนไซม์ polygalacturonase โดยใช้กากสตอร์เบอร์รี่ มีกิจกรรมสูงในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส (Zheng และ Shetty, 2000) ซึ่ง polygalacturonase เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ไกลโคซิลในสารประกอบเพคติน

ดังนั้นการศึกษาคัดแยกและการประยุกต์ใช้เชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร ศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ เช่น ด้านสัณฐานวิทยา ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ตลอดจนศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ เพื่อให้ได้เชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์ชนิดต่างๆ และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากแหล่งต่างๆ ที่ทราบสมบัติบางประการของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ดังกล่าว และทราบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ แล้วนำความรู้ที่ได้ดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม และมีประโยชน์กับทางทุกๆ ฝ่ายเกี่ยวข้องในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม หรือ ที่ต้องการเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำ เสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ ซึ่งอาจจะใช้ได้จริง และไม่ก่อสารพิษในการบำบัด ตลอดจนช่วยลดโลกร้อน ทำให้เกิดการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพชีวิตของประชาชนในท้องถิ่น รวมทั้งพัฒนางานวิจัยให้สอดคล้องกับบริบทของสังคมท้องถิ่นชายแดนภาคใต้ได้อีกทางหนึ่ง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

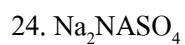
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

อาหารเลี้ยงเชื้อรา

1. Potato Dextrose Agar (PDA)
2. Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC)

สารเคมี

1. congo red
2. NaCl
3. Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt
4. Agar
5. KH_2PO_4
6. NH_4NO_3
7. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
8. Yeast extract
9. Alcohol 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
10. Lactophenol cotton blue
11. KCl
12. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
13. ZnSO_4
14. MnSO_4
15. Tartaric Acid
16. Birchwood xylan
17. Sodium potassium tartrate
18. Na_2CO_3
19. NaHCO_3
20. Na_2SO_4
21. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
22. Na_2SO_4



อุปกรณ์

1. Plate
2. Hot plate
3. Hot air oven
4. Autoclave
5. Needle
6. Slide และ Cover slip
7. Rack
8. Spreader
9. Dopper
10. Flask ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร
11. หลอดทดลอง
12. ปิเปต ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
13. บีกเกอร์
14. กล้องจุลทรรศน์
15. เครื่องชั่งสาร
16. กระบอกตวง
17. แท่งแก้วคน
18. ตะเกียงแอลกอฮอล์
19. สำลี
20. กระจกฟลอยด์
21. ปากกาเคมี
22. ถุงพลาสติก

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่าง

1.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อราทนร้อน จากมูลสัตว์และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร จำนวน 100 กรัม จากแหล่งต่างๆในท้องถิ่นจังหวัดยะลา และพื้นที่ใกล้เคียง ดังนี้

- ตัวอย่างจากเตาเผาถ่าน ได้แก่ ด้านล่างของกองจี้เลื้อย ด้านข้างของกองจี้เลื้อย ด้านบนของกองจี้เลื้อย จี้เถาถ่าน และ เศษถ่าน

- ตัวอย่างจากโรงงานยางพารา ได้แก่ จี้เลื้อยบนพื้นดิน กองจี้เลื้อยความสูง 50 เซนติเมตร จากพื้นดิน จี้เลื้อยความสูง 2 เมตร จากพื้นดิน ยอดกองจี้เลื้อย น้ำในหม้ออบไม้ น้ำที่ตามทางเดิน น้ำที่หลังการอบน้ำยากันปลวก น้ำในท่อพักบำบัด จี้เถาปนดิน บริเวณหม้ออบไม้ และ จี้เถาบริเวณหม้ออบไม้

- แกลบ

- เก็บตัวอย่างมูลสัตว์ ได้แก่ มูลวัว มูลม้า มูลแพะ และมูลไก่

1.2 การเก็บตัวอย่างตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ในนิคมอุตสาหกรรมบาเจาะ จังหวัดนราธิวาส เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากท่อน้ำทิ้งของเครื่องดีแคนเตอร์โดยตรง ใส่ภาชนะบรรจุขนาด 100 ลิตร แบ่งน้ำทิ้งใส่ขวดขนาด 1.5 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิต่ำ จนกว่าจะใช้

2. การคัดเลือกเชื้อราทนร้อน

นำตัวอย่างที่เป็นของเหลวใช้ปิเปตดูดมา 1 มิลลิลิตร และตัวอย่างที่เป็นของแข็ง นำมาชั่ง 1 กรัม แล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสังเกตเส้นใยทุกวัน

เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเกิดเส้นใย ก็จะทำการถ่ายเชื้อที่เจริญแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลอดใหม่อีกครั้งหนึ่ง และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดเส้นใย แล้วนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซึ่งมีส่วนประกอบเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทุกประการ ยกเว้นมีการเติม Agar 20 กรัม ต่อลิตร ลงไปด้วย โดยใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายไปทั่ว ๆ ผิวหน้าของอาหารบ่มจนเพาะเชื้อที่ 55 องศาเซลเซียส และสังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วทำการเก็บเชื้อโดยเลือกโคโลนีของราที่มีลักษณะแตกต่างกันมาอย่างละ 1 โคโลนี เก็บรักษานบนหลอดอาหารวุ้นแข็ง Potato Dextrose agar ปิดฝาให้แน่นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการ subculture ใหม่ทุก ๆ เดือน

3. การแยกเชื้อราบนรื้อน

นำเชื้อราที่ทำการคัดเลือกได้จากข้อ 2 มาศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อราโดยใช้เทคนิค slide culture โดยการเตรียมอาหารและจานเพาะเชื้อ คือ เตรียมอาหาร Potato Dextrose Agar เทบนจานเลี้ยงเชื้อ และเตรียมจานเพาะเชื้อ โดยวางแท่งแก้วอ แผ่นสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ลงบนจานเพาะเชื้อนำไปบ่มฆ่าเชื้อและเพาะเชื้อ โดยการใช้มีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วกรีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar ที่เตรียมไว้ เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดพอเหมาะ ใช้ปลายมีดยกแผ่นวุ้นที่ตัดแล้ววางบนแผ่นสไลด์ในจานเพาะเชื้อ แล้วใช้เข็มเย็บที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยสปอร์ของรามาดะลงบนแผ่นวุ้นให้ทั่ว ใช้ปากกิบจุ่มแอลกอฮอล์เผาฆ่าเชื้อ กีบกระจกปิดสไลด์ที่วางอยู่ในจานเพาะเชื้อมาปิดบนชิ้นวุ้นที่ปลูกเชื้อแล้ว เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อ ให้ระดับของน้ำต่ำกว่าแผ่นสไลด์ แล้วทำการปิดฝาจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนกว่าจะเห็นการเจริญของเส้นใยราได้อย่างชัดเจน

การตรวจผล ทำได้โดยยกกระจกปิดสไลด์ขึ้นแล้วหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงไปที่เส้นใยของเชื้อราที่เจริญอยู่บนกระจกปิดสไลด์ เพื่อให้แอลกอฮอล์กระจายเข้าสู่เส้นใยรา ก่อนที่แอลกอฮอล์จะแห้งนำกระจกปิดสไลด์วางบนน้ำยา Lactophenol ซึ่งหยดอยู่ตรงกลางสไลด์แผ่นใหม่ เขี่ยชิ้นวุ้นที่อยู่บนแผ่นสไลด์ออกทิ้งไป และหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ บนสไลด์ที่มีเส้นใยของรา หยดน้ำยา Lactophenol บนเส้นใยรา ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แผ่นใหม่ นำสไลด์ที่ได้ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อราต่อไป

4. ศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อราบนรื้อนที่คัดเลือกได้จากมูลสัตว์ชนิดต่างๆ และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากแหล่งต่างๆ

4.1 ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไชนาเนส เชิงคุณภาพ

4.1.1. ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเชิงคุณภาพ

ดัดแปลงจากวิธีของ Teacher และ wood (1989)

นำเชื้อราบนรื้อนที่บริสุทธิ์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำหัวของ Dopper ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อเจาะตรงปลายเส้นใย นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC Agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 วัน โดยให้โคโลนิมีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 40 มิลลิเมตร จึงนำมาทดสอบด้วย congo red test โดยการเทร้อยละ 0.1 congo red ให้ทั่วอาหารทิ้งไว้ 10-15 นาที จึงเทสารละลาย congo red ออกจากนั้นราดทับด้วย 1 M NaCl นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนเกินทิ้ง จะเห็นวงใสที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ตรวจผล

ความสามารถในการผลิตของเอนไซม์เซลลูเลส และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสแล้วบันทึกข้อมูล

สำหรับเกณฑ์การแบ่งระดับความสามารถในการผลิตของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสามารถแบ่งได้ดังนี้

Significant : ขนาดของวงใส (Clear zone) มากกว่าหรือเท่ากับโคโลนี

Moderate : ขนาดของวงใส (Clear zone) น้อยกว่าหรือขนาดของวงจาง (Pale zone) มากกว่าโคโลนี

Negligible : ขนาดของวงจาง (Pale zone) น้อยกว่าหรือเท่ากับโคโลนี

4.1.2 ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซนาเนสเชิงคุณภาพ ตามวิธีของ Mackenzie และ Willaim (1984)

นำเชื้อราที่บริสุทธิ์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำหัวของ Dopper ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ เจาะตรงปลายเส้นใย นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซนาเนส และบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นตัวควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-5 วัน หลังจากนั้น นำเชื้อราที่ผ่านการเพาะเลี้ยง มา Flash plate ด้วย congo red 0.1 % เป็นเวลา 30 นาที และล้าง plate ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลาประมาณ 1 วินาที ทำการ Flash plate อีก 2 ครั้ง ด้วย 1 M NaCl เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบวงใส (clear zone) ที่เกิดรอบๆ โคโลนีของ จุลินทรีย์บนพื้น background สีแดงหรือสีม่วงอ่อนบนตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อและวัดขนาดของวงใส (clear zone) และวงจาง (pale zone) เทียบกับขนาดโคโลนีจุลินทรีย์

สำหรับเกณฑ์การแบ่งระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซนาเนสของเชื้อราสามารถแบ่งได้ ดังนี้

Significant : ขนาดวงใส (clear zone) มากกว่าหรือเท่ากับโคโลนี

Moderate : ขนาดวงใส (clear zone) น้อยกว่าหรือขนาดของวงจาง (pale zone) มากกว่าโคโลนี

Negligible : ขนาดวงจาง (pale zone) น้อยกว่าหรือเท่ากับโคโลนี

4.2 สัณฐานวิทยา

นำรายละเอียดทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาจากข้อ 3 โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาศัยการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นหลัก ลักษณะที่ทำการศึกษา ได้แก่ รูปร่างของเชื้อราจุลินทรีย์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ แล้วไปเปรียบเทียบกับเอกสารทางด้านอนุกรมวิธานเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราที่ร้อน

4.3 การทดสอบคุณสมบัติทนร้อนของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ

ใช้เชื้อที่กำลังเจริญบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน โดยตัดบริเวณขอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ในจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส, ชุคควบคุม) และที่อุณหภูมิ 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อ โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และคัดเลือกรูปร่างที่ทนร้อนที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว เพื่อศึกษาต่อไป

5. ศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราที่คัดเลือกได้

5.1 คุณลักษณะของน้ำทิ้งน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

นำน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาบันทึกค่า pH วิเคราะห์ค่าบีโอดี และซีโอดี

5.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราที่คัดเลือกได้

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานปาล์ม มาทดสอบการบำบัดน้ำด้วยเชื้อราที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 3 และ 4) โดยนำสปอร์ตัวอย่างเชื้อราเริ่มต้นเจือจางด้วยสารละลาย Tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหยดตัวอย่างบนสีกาไมโดมิเตอร์ แล้วนับจำนวนสปอร์จากกล้องกำลังขยาย 10 เท่า ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 2.4×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณร้อยละ 10 ลงในพลาสติกที่บรรจุ น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (หลังการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร วางพลาสติก บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากข้อ 4.3) เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาบันทึกค่า pH วิเคราะห์ค่าบีโอดี และซีโอดี

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. แยกเชื้อราทนร้อนและการทำให้บริสุทธิ์

1.1 จำนวนเชื้อราทนร้อนทั้งหมดในตัวอย่างจากมูลสัตว์และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จากการเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ แกลบ จี้เถ้าถ่าน จี้เลื่อย และไม้ผุ ในบริเวณหมู่ที่ 8 ตำบลบุดี อำเภอเมือง จังหวัดยะลา ส่วน มูลวัว มูลม้า มูลแพะ และ มูลไก่ เก็บตัวอย่างในเขตบริเวณ หมู่ที่ 3 ตำบลลิค อำเภอเมือง จังหวัดยะลา โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) พบเชื้อราทนร้อนทั้งหมดจากไม้ผุ และแกลบมากที่สุด เท่ากับ 2.7×10^3 CFU/ml รองลงมา คือ มูลวัว และจี้เถ้าถ่าน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.7×10^3 CFU/ml และ 7.7×10^2 CFU/ml ตามลำดับ ส่วนมูลไก่ไม่พบเชื้อราทนร้อน ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนเชื้อราทนร้อนทั้งหมดที่คัดแยกได้จากมูลสัตว์และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ตัวอย่าง	จำนวนเชื้อราทนร้อน (CFU/ml)
แกลบ (AO)	2.7×10^3
จี้เถ้าถ่าน (BO)	7.7×10^2
จี้เลื่อย (CO)	1.3×10^2
ไม้ผุ (DO)	2.7×10^3
มูลวัว (AS)	1.7×10^3
มูลม้า (BS)	3×10^2
มูลแพะ (CS)	8×10^2
มูลไก่ (DS)	Not found

1.2 แยกเชื้อราบนรื้อนและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนรื้อนที่คัดแยกได้จากมูลสัตว์และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

จากจำนวนเชื้อราบนรื้อนทั้งหมดที่คัดแยกได้จากมูลสัตว์และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อราบนรื้อนได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลต โดยแยกจากแกลบและจี้เถ้าถ่านได้มากที่สุด ตัวอย่างละ 3 ไอโซเลต ได้แก่ AO1, AO2, AO3, BO1, BO2 และ BO3 รองลงมาจากไม้ผุ 2 ไอโซเลต ได้แก่ DO1 และ DO2 ส่วนมูลวัว มูลม้า และมูลแพะ ตัวอย่างละ 2 ไอโซเลต ได้แก่ AS1, AS2, BS1, BS2, CS1 และ CS2 ตามลำดับ และจากจี้เถ้อยเพียง 1 ไอโซเลต ได้แก่ CO1 ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยราแต่ละไอโซเลตมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 จำนวนไอโซเลตของเชื้อราบนรื้อนที่คัดแยกได้จากมูลสัตว์และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่คัดแยกได้	รหัสไอโซเลต
แกลบ	3	AO1
		AO2
		AO3
จี้เถ้าถ่าน	3	BO1
		BO2
		BO3
จี้เถ้อย	1	CO1
ไม้ผุ	2	DO1
		DO2
มูลวัว	2	AS1
		AS2
มูลม้า	2	BS1
		BS2
มูลแพะ	2	CS1
		CS2
มูลไก่	Not found	-

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลตที่คัดแยกได้

รหัสไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
AO1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว
AO2	โคโลนีสีขาว สปอร์สีดำกระจายกลางโคโลนี โคโลนีนูนฟูแบบแผ่กระจายคล้ายขนสัตว์ ขอบโคโลนีและเส้นใยมีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีขาว
AO3	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้าโคโลนีมีรอยแยก ขอบหยัก
BO1	โคโลนีสีเหลือง ราบเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเป็นผงคล้ายเม็ดทราย หรือผงแป้ง ขอบโคโลนีสีขาว
BO2	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลาง โคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว
BO3	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้าโคโลนีมีรอยแยก ขอบหยัก
CO1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว
DO1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว
DO2	โคโลนีและเส้นใยสีขาว นูนฟูคล้ายสำลี ตรงกลางมีสปอร์สีดำ เป็นเม็ด ๆ ข้างใต้โคโลนีสีเขียวย่อน
AS1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ด้านหลังสีเขียวปนเหลือง
AS2	โคโลนีสีเหลือง ราบเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเป็นผงคล้ายเม็ดทราย หรือผงแป้ง ขอบโคโลนีสีขาว
BS1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ด้านหลังสีเขียวปนเหลือง

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลตที่คัดแยกได้(ต่อ)

รหัสไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
BS2	โคโลนีสีขาววาวนุ่มคล้ายกำมะหยี่ โคโลนีฟู ข้างใต้โคโลนีสีเหลืองอ่อน
CS1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ด้านหลังสีเขียวปนเหลือง
CS2	โคโลนีสีครีม ฟูคล้ายสำลี ขอบโคโลนีและเส้นใยมีสีขาว

2. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราทนร้อน

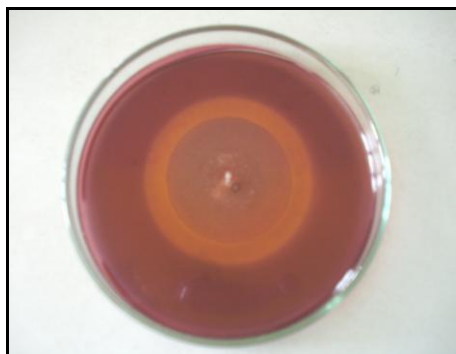
จากการนำเชื้อราทนร้อนทั้งหมดที่คัดแยกได้จำนวนทั้งหมด 15 ไอโซเลต คือ AO1, AO2, AO3, BO1, BO2, BO3, CO1, DO1, DO2, AS1, AS2, BS1, BS2, CS1 และ CS2 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC agar) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน พบว่าเชื้อราทนร้อนสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar ได้ ยกเว้นไอโซเลต BO1 และ AS2 เมื่อนำเชื้อราทนร้อนดังกล่าวมาทดสอบเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี Congo red test พบว่า ไอโซเลตต่าง ๆ สามารถสร้างวงใสอยู่ในเกณฑ์ทั้ง 3 ระดับ คือ ระดับ Significant จำนวนทั้งหมด 11 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AO1 (ภาพที่ 4.1), AO3, BO2, BO3, CO1, DO1, AS1, BS1, BS2, CS1 และ CS2 ระดับ Moderate จำนวนทั้งหมด 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต DO2 (ภาพที่ 4.2) ส่วนระดับ Negligible จำนวนทั้งหมด 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AO2 (ภาพที่ 4.3) และดังแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งเมื่อวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส พบว่า AO1, BO2, CO1, DO1, AS1, BS1, BS2 และ CS1 สามารถสร้างวงใสได้ดีที่สุดเท่ากับ 15 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต AO3 และ BO3 สามารถสร้างวงใสเท่ากับ 8 มิลลิเมตร และน้อยที่สุด คือ ไอโซเลต CS2 สามารถสร้างวงใสเท่ากับ 1 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลต DO2 มีวงใสน้อยกว่าขนาดของโคโลนี ส่วนไอโซเลต AO2 ไม่สามารถสร้างวงใสแต่จะสร้างวงจางน้อยกว่าขนาดของโคโลนี ดังแสดงใน ตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราบนร่อนที่คัดแยกได้

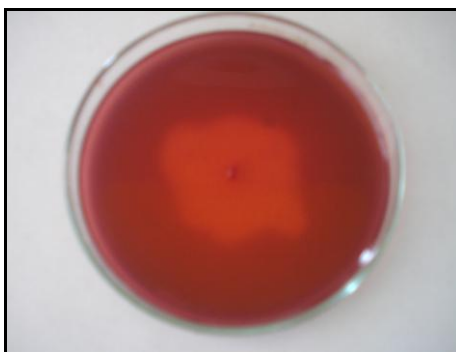
รหัสไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
AO1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้น คล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant
AO2	โคโลนีสีขาว สปอร์สีดำกระจายกลางโคโลนี โคโลนีฟูแบบแผ่กระจายคล้ายขนสัตว์ ขอบโคโลนีและเส้นใยมีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีขาว	Negligible
AO3	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้าโคโลนีมีรอยแยก ขอบหยัก	Significant
BO1	โคโลนีสีเหลือง ราบเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเป็นผง คล้ายเม็ดทรายหรือผงแป้ง ขอบโคโลนีสีขาว	No Growth
BO2	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้น คล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant
BO3	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้าโคโลนีมีรอยแยก ขอบหยัก	Significant
CO1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้น คล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant
DO1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้น คล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant

ตารางที่ 4.4 ระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราบนร้อนที่คัดแยกได้ (ต่อ)

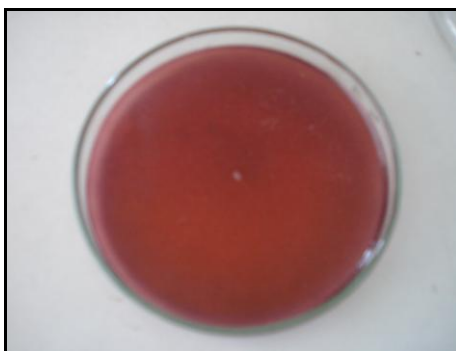
รหัสไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
DO2	โคโลนีและเส้นใยสีขาว นูนฟูคล้ายสำลี ตรงกลางมีสปอร์สีดำ เป็นเม็ด ๆ ข้างใต้โคโลนีสีเขียวย่อ	Moderate
AS1	โคโลนีสีเขียวยาวเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียวย่อ	Significant
AS2	โคโลนีสีเหลือง ยาวเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเป็นผงคล้ายเม็ดทรายหรือผงแป้ง ขอบโคโลนีสีขาว	No Growth
BS1	โคโลนีสีเขียวยาวเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียวย่อ	Significant
BS2	โคโลนีสีขาวนวลนุ่มคล้ายกำมะหยี่ โคโลนีนูนฟู ข้างใต้โคโลนีสีเหลืองอ่อน	Significant
CS1	โคโลนีสีเขียวยาวเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียวย่อ	Significant
CS2	โคโลนีสีครีม นูนฟูคล้ายสำลี ขอบโคโลนีและเส้นใยสีขาว	Significant



ภาพที่ 4.1 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Significant ของไอโซเลต AO1



ภาพที่ 4.2 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Moderate ของไอโซเลต DO2



ภาพที่ 4.3 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Negligible ของไอโซเลต AO2

3. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคซานเนสของเชื้อราทนร้อน

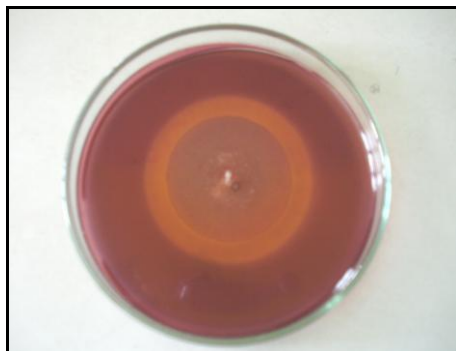
จากการนำเชื้อราทนร้อนทั้งหมดที่คัดแยกได้จำนวนทั้งหมด 15 ไอโซเลต คือ AO1, AO2, AO3, BO1, BO2, BO3, CO1, DO1, DO2, AS1, AS2, BS1, BS2, CS1 และ CS2 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคซานเนส ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน พบว่าเชื้อราทนร้อนสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคซานเนสได้ ยกเว้นไอโซเลต BO1 และ AS2 เมื่อนำเชื้อราทนร้อนดังกล่าวมาทดสอบเอนไซม์ดังกล่าว พบว่า ไอโซเลตต่างๆ สามารถสร้างวงใสอยู่ในเกณฑ์ทั้ง 3 ระดับ คือ ระดับ Significant จำนวนทั้งหมด 11 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AO1 (ภาพที่ 4.4), AO3, BO2, BO3, CO1, DO1, AS1, BS1, BS2, CS1 และ CS2 ระดับ Moderate จำนวนทั้งหมด 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต DO2 (ภาพที่ 4.5) ส่วนระดับ Negligible จำนวนทั้งหมด 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AO2 (ภาพที่ 4.6) และดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งเมื่อวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส พบว่า AO1, BO2, CO1, DO1, AS1, BS1, BS2 และ CS1 สามารถสร้างวงใสได้ดีที่สุดเท่ากับ 30 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต AO3 และ BO3 สามารถสร้างวงใสเท่ากับ 16 มิลลิเมตร และน้อยที่สุด คือ ไอโซเลต CS2 สามารถสร้างวงใสเท่ากับ 3 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลต DO2 มีวงใส น้อยกว่าขนาดของโคโลนี ส่วนไอโซเลต AO2 ไม่สามารถสร้างวงใสแต่จะสร้างวงจางน้อยกว่าขนาดของโคโลนีดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราบนรื้อนที่คัดแยกได้

รหัสไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส
AO1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้น คล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant
AO2	โคโลนีสีขาว สปอร์สีดำกระจายกลางโคโลนี โคโลนีฟูแบบแผ่กระจายคล้ายขนสัตว์ ขอบโคโลนีและเส้นใยมีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีขาว	Negligible
AO3	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้าโคโลนีมีรอยแยก ขอบหยัก	Significant
BO1	โคโลนีสีเหลือง ราบเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเป็นผง คล้ายเม็ดทรายหรือผงแป้ง ขอบโคโลนีสีขาว	No Growth
BO2	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้น คล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant
BO3	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้าโคโลนีมีรอยแยก ขอบหยัก	Significant
CO1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้น คล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant
DO1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้น คล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant
DO2	โคโลนีและเส้นใยสีขาว ฟูคล้ายสำลี ตรงกลางมีสปอร์สีดำ เป็นเม็ด ๆ ข้างใต้โคโลนีสีเขียวอ่อน	Moderate

ตารางที่ 4.6 ระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราทนร้อนที่คัดแยกได้ (ต่อ)

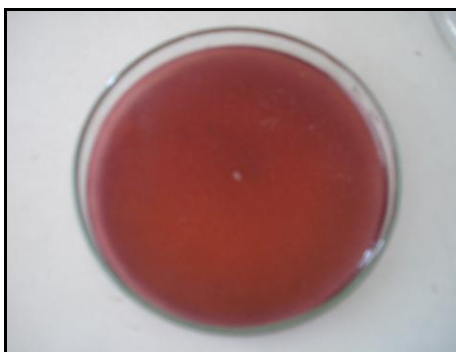
รหัสไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส
AS1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant
AS2	โคโลนีสีเหลือง ราบเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเป็นผงคล้ายเม็ดทรายหรือผงแป้ง ขอบโคโลนีสีขาว	No Growth
BS1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant
BS2	โคโลนีสีขาวนวลนุ่มคล้ายกำมะหยี่ โคโลนีฟู ข้างใต้โคโลนีสีเหลืองอ่อน	Significant
CS1	โคโลนีสีเขียว ราบเรียบ ตรงกลางโคโลนีสูงขึ้นคล้ายกระดุม (เป็นตุ่ม) ขอบโคโลนีสีขาว ข้างใต้โคโลนีสีเขียว	Significant
CS2	โคโลนีสีครีม ฟูคล้ายสำลี ขอบโคโลนีและเส้นใยมีสีขาว	Significant



ภาพที่ 4.4 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Significant ของไอโซเลต AO1



ภาพที่ 4.5 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Moderate ของไอโซเลต DO2



ภาพที่ 4.6 การสร้างวงใสในเกณฑ์ Negligible ของไอโซเลต AO2

4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

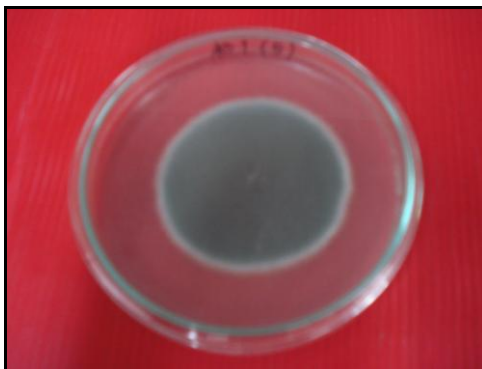
ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ ซึ่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส อยู่ในระดับ Significant และมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่าง ได้แก่ AO1, AO3, BS2 และ CS2 โดยศึกษาการเจริญเติบโต ลักษณะโคโลนี และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

4.1. ไอโซเลต AO1, BO2, CO1, DO1, AS1 และ BS1

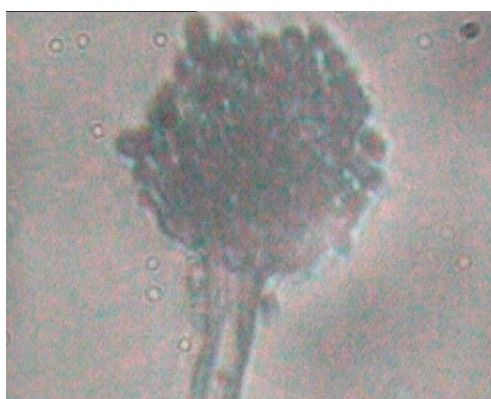
ลักษณะโคโลนี โคโลนีบนอาหาร PDA เจริญได้ดี รูปร่างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 มิลลิเมตร ภายในเวลา 3 วัน ระยะแรกมีสีขาว หลังจากนั้นจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียวและเปลี่ยนเป็นสีเขียวปนเทาเมื่ออายุมากขึ้น โคโลนีมีลักษณะคล้ายกระดุม ขอบโคโลนีมีสีขาวและเรียบสม่ำเสมอ ด้านใต้โคโลนีมีสีเขียวปนเหลือง

ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เส้นใยมีผนังกัน conidiophore ไม่มีแขนง ตรงปลายของ conidiophore โป่งออก เรียกว่า vesicle ซึ่งมีลักษณะครึ่ง วงกลม บนผิวของ vesicle มี sterigma 1 ชั้น ลักษณะคล้ายขวดฟลasks (flask shape) ส่วนปลายของ sterigma มี conidia ติดกันเป็นสาย เมื่อแก่เต็มที่ conidia จะค่อย ๆ หลุดออก แต่ละเซลล์ของ conidia มีรูปร่างกลม ผิวเรียบ

จากลักษณะที่กล่าวมาข้างต้น จึงจำแนกเชื้อราเป็น *Aspergillus* sp. (ภาพที่ 4.7)



ก



ข

ภาพที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Aspergillus* sp.

ก. ลักษณะโคโลนีของ *Aspergillus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) อายุ 5 วัน

ข. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Aspergillus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X) อายุ 3 วัน

4.2. ไอโซเลต AO3, BO3 และ CS1

ลักษณะโคโลนี โคโลนีบนอาหาร PDA เจริญค่อนข้างช้า รูปร่างค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25 มิลลิเมตร ภายในเวลา 3 วัน ระยะแรกมี สีขาวอมเหลือง ผิวโคโลนี ขรุขระเล็กน้อย หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม ผิวโคโลนีขรุขระมากขึ้น มีรอยแตกเป็นแฉก ๆ ขอบโคโลนีหยัก

ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เส้นใยมีผนังกัน มีกิ่งก้านสาขามาก conidia เจริญกลาง เส้นใยแบบเดี่ยว ๆ หรือต่อเป็นสายเมื่ออายุมากขึ้น conidia รูปร่างกลมรี มีสีดำทึบ

จากลักษณะที่กล่าวมาข้างต้น จึงจำแนกเชื้อรานี้ เป็น *Scytalidium* sp. (ภาพที่ 4.8)



ก



ข

ภาพที่ 4.8 ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Scytalidium* sp.

ก. ลักษณะโคโลนีของ *Scytalidium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) อายุ 5 วัน

ข. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Scytalidium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X) อายุ 3 วัน

4.3. ไอโซเลต BS2

ลักษณะโคโลนี โคโลนีบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เจริญได้ค่อนข้างช้า รูปร่างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 19 มิลลิเมตร ภายในเวลา 3 วัน โคโลนีมีสีขาวนวล นูนฟู แน่นคล้ายกำมะหยี่ ขอบโคโลนีเรียบสม่ำเสมอ ด้านใต้โคโลนีสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 4.9 ก.)

ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เส้นใยมีผนังกัน conidiophore ไม่มีแขนง ตรงปลาย ของ conidiophore โป่งออก เรียกว่า vesicle ซึ่งมีลักษณะวงกลม บนผิวของ vesicle เป็นที่เจริญของ conidia 1 ชั้น มีรูปร่างกลม สีใสไม่ดำทึบ เมื่อแก่เต็มที่ conidia จะค่อย ๆ หลุดออก (ภาพที่ 4.9 ข.)

จากลักษณะที่กล่าวมาข้างต้น จึงจำแนกเชื้อรานี้ เป็น *Oedocephalum* sp.



ก



ข

ภาพที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Oedocephalum* sp.

ก. ลักษณะโคโลนีของ *Oedocephalum* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) อายุ 5 วัน

ข. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Oedocephalum* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40 X) อายุ 3 วัน

4.4. ไอโซเลต CS2

ลักษณะโคโลนี ลักษณะโคโลนี โคโลนีบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เจริญได้เร็วมาก รูปร่างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 60 มิลลิเมตร ภายในเวลา 2 วัน ระยะแรกมีสีขาว หลังจากนั้นจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีครีมและเปลี่ยนเป็นสีครีมปนเทาเมื่ออายุมากขึ้น โคโลนีมีลักษณะนูนฟูคล้ายสำลี ขอบโคโลนีสีขาวและเรียบสม่ำเสมอ (ภาพที่ 4.10 ก.)

ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เส้นใยมีผนังกัน conidia เกิดบน conidiogenous cell สั้นๆ คล้ายการบวมออกของผนังเซลล์ ซึ่งเกิดตามความยาวของเส้นใย conidia มีขนาดใหญ่ รูปร่างคล้ายใบพาย ใสไม่ทึบ (ภาพที่ 4.10 ข.)

จากลักษณะที่กล่าวมาข้างต้น จึงจำแนกเชื้อรานี้ เป็น *Chrysosporium* sp.



ก



ข

ภาพที่ 4.10 ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Chrysosporium* sp.

ก. ลักษณะโคโลนีของ *Chrysosporium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) อายุ 5 วัน

ข. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Chrysosporium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40 X) อายุ 3 วัน

5. การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อราที่แยกได้ในช่วงอุณหภูมิต่างๆ

จากการเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ ได้แก่ AO1, BO2, CO1, DO1, AS1, BS1, BS2 และ CS1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส , ชดควบคุม) 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกวัน พบว่า เชื้อ AO1 สามารถเจริญได้ รวดเร็วและดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 5.12 เซนติเมตร เชื้อ CO1 สามารถเจริญได้ รวดเร็วและดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 4.90 เซนติเมตร เชื้อ BO2 สามารถเจริญได้ รวดเร็วและดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 4.89 เซนติเมตร เชื้อ DO1 สามารถเจริญได้ รวดเร็วและดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 4.81 เซนติเมตร , เชื้อ CS1 สามารถเจริญได้ รวดเร็วและดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 4.76 เซนติเมตร, เชื้อ BS1 สามารถเจริญได้ รวดเร็วและดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 4.55 เซนติเมตร ส่วนเชื้อ AS1 สามารถเจริญได้ รวดเร็วและดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 4.1 เซนติเมตร และเชื้อ BS2 สามารถเจริญได้ รวดเร็วและดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 4 เซนติเมตร ส่วนที่อุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีเชื้อใดเจริญ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

Strains	Temperature (°C) / Days																				
	Room Temperature (30 ± 2)							45							50						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
CO1	-	+	++	++	++	++	++	-	+	++	++	++	+++	+++	-	-	+	+	++	++	++
AS1	-	+	+	++	++	++	++	-	+	++	++	++	+++	+++	-	-	+	+	++	++	++
BS1	-	-	++	++	++	++	++	-	+	++	++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	+	+
CS1	-	+	++	++	++	++	++	-	+	++	++	++	+++	+++	-	-	+	+	++	++	++
AO1	-	-	+	++	++	++	++	-	+	++	++	+++	+++	+++	-	-	+	+	++	++	++
BO1	-	-	+	+	++	++	++	-	+	++	++	++	+++	+++	-	-	-	-	+	+	+
BS2	-	-	+	+	++	++	++	-	+	++	++	++	+++	+++	-	-	-	-	+	+	+
DO1	-	+	++	++	++	++	++	-	+	++	++	+++	+++	+++	-	-	+	+	+	++	++

ตารางที่ 4.8 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

Strains	Temperature (°C) / Days													
	55							60						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
CO1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AO1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BO1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DO1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Remarks +++ = very good growth (colony diameter >4 cm)
 ++ = medium growth (colony diameter 2.1-4 cm)
 + = little growth (colony diameter 0.5- 2 cm)
 - = no growth

6. ศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้

6.1 ศึกษาคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

จากการสังเกตคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่า มีคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม มีสีเทาดำ มีความขุ่นหนืด กลิ่นเหม็นจัด และมีไขมันบางๆลอยอยู่ บริเวณผิวหน้าของน้ำทิ้ง เมื่อนำมาวัดค่าพีเอช ได้เท่ากับ 4.52 วัดอุณหภูมิมีค่าเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ค่าบีโอดีมีค่าเท่ากับ 14,350 มิลลิกรัมต่อลิตร และวิเคราะห์ค่าซีโอดีมีค่าเท่ากับ 42,336 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม จังหวัดนราธิวาส เปรียบเทียบกับโรงงานน้ำมันปาล์มแหล่งอื่นๆ

คุณลักษณะของน้ำทิ้ง	การศึกษาครั้งนี้	ปรีชา มุณีศรี (2539)	โสภา จันทภาโส (2541)	หัสตินดา บินมะแอ (2548)
สี	เทาดำ	เทา	-	เทา
พีเอช	4.52	4.50	4.50	4.50
บีโอดี (มล./ล)	14,350	17,750	56,400	71,950
ซีโอดี (มล./ล)	42,336	35,500	112,800	50,840

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มโดยคัดเลือกเชื้อราทนร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลลานเอสได้สูง คือ DO1 และ BS1 มาเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิเหมาะสม (จากข้อ 5) สุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน พบว่าวันที่ 0 เชื้อ DO1 และ BS1 มีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชจากเชื้อเท่ากับ 4.92 และ 5.01 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าพีเอชวันที่ 0 เท่ากับ 4.92 ส่วนวันที่ 2 เชื้อ DO1 และ BS1 มีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชจากเชื้อเท่ากับ 5.02 และ 5.11 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่างกับน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าพีเอช เท่ากับ 4.92 ส่วนในวันที่ 4 เชื้อ DO1 และ BS1 มีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชจากเชื้อเท่ากับ 5.12 และ 5.28 ตามลำดับ มีค่าต่างกับน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าพีเอช เท่ากับ 4.95 และวันที่ 6

เชื้อ DO1 และ BS1 มีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชจากเชื้อเท่ากับ 5.22 และ 5.31 ตามลำดับ มีค่าต่างกับน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าพีเอช เท่ากับ 4.97 ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และในภาพที่ 4.11 ทำการศึกษาอุณหภูมิ โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 0, 2, 4 และ 6 วัน ในวันที่ 0 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีอุณหภูมิเท่ากับ 28.5 และ 29 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำ ที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีอุณหภูมิเท่ากับ 29 ส่วนวันที่ 2 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเท่ากับ 29 และ 29 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีอุณหภูมิเท่ากับ 29 ส่วนในวันที่ 4 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีอุณหภูมิเท่ากับ 29 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิวันที่ 4 เท่ากับ 29 และวันที่ 6 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเท่ากับ 30 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่างกับน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีอุณหภูมิเท่ากับ 29 ดังแสดงในตารางที่ 4.11

เมื่อนำมาหาค่าบีโอดีของเชื้อที่คัดเลือกได้ โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 0, 2, 4 และ 6 วัน ในวันที่ 0 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีค่าบีโอดีดังนี้ 14,299 และ 14,346 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าบีโอดี วันที่ 0 เท่ากับ 14,346 ส่วนวันที่ 2 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีค่าบีโอดีดังนี้ 10,458 และ 12,246 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่างกับน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าบีโอดี วันที่ 2 เท่ากับ 14,341 ส่วนในวันที่ 4 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีค่าบีโอดีดังนี้ 9,945 และ 10,437 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่างกับน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าบีโอดี วันที่ 4 เท่ากับ 14,339 และวันที่ 6 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีค่า บีโอดีดังนี้ 9,904 และ 10,121 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่างกับน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าบีโอดี วันที่ 6 เท่ากับ 14,292 เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการลดค่าบีโอดีพบว่าเชื้อ DO1 สามารถลดค่าบีโอดีได้มากที่สุด เท่ากับ 9,904 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 30.98 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่ 6 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.12 และ ภาพที่ 4.12 จากนั้นนำมาวัดค่าชีโอดีของเชื้อที่คัดเลือกได้ วันที่ 0 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีค่าชีโอดีดังนี้ 39,776 และ 42,336 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่างกับน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าชีโอดี วันที่ 0 เท่ากับ 42,295 ส่วนวันที่ 2 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีค่าชีโอดีดังนี้ 29,856 และ 34,816 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่างกับน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าชีโอดี วันที่ 2 เท่ากับ 42,252 ส่วนในวันที่ 4 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีค่าชีโอดีดังนี้ 23,904 และ 26,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่างกับน้ำที่จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ

(ชุดควบคุม) มีค่าซีไอดี วันที่ 4 เท่ากับ 42,239 และวันที่ 6 พบว่าเชื้อ DO1 และ BS1 มีค่าซีไอดีดังนี้ 21,696 และ 23,616 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่างกับน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ไม่เติมเชื้อ (ชุดควบคุม) มีค่าซีไอดี วันที่ 6 เท่ากับ 42,198 เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการลดค่าซีไอดีพบว่าเชื้อ DO1 สามารถลดค่าซีไอดีได้มากที่สุดเท่ากับ 21,696 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 48.75 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่ 6 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.13 และ ภาพที่ 4.13

**ตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช ระหว่างการทดสอบการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมัน
ปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกไว้ เป็นเวลา 6 วัน**

ไอโซเลต	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
DO1	4.92	5.02	5.15	5.22
BS1	5.01	5.11	5.28	5.31
หาควบคุม	4.92	4.92	4.95	4.97

**ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ระหว่างทดสอบการบำบัดน้ำที่ ังจากโรงงานน้ำมัน
ปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกไว้ เป็นเวลา 6 วัน**

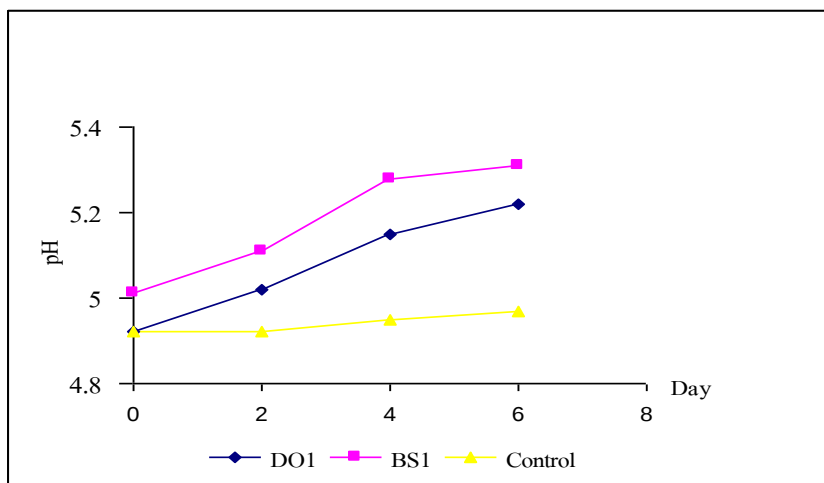
ไอโซเลต	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
DO1	29	29	30	31
BS1	28.5	29	29	30
หาควบคุม	29	29	29	29

ตารางที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงของค่าบีโอดีหลังจากทดสอบการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงาน
น้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกไว้ เป็นเวลา 6 วัน

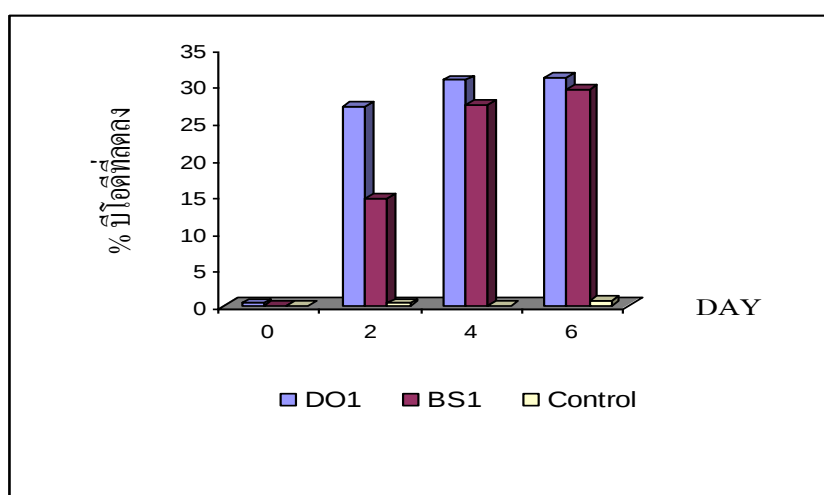
ไอโซเลต	การเปลี่ยนแปลงค่าบีโอดี							
	ค่าบีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)				เปอร์เซ็นต์ที่ลดลง			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
DO1	14,299	10,458	9,945	9,904	0.35	27.17	30.69	30.98
BS1	14,346	12,246	10,437	10,121	0.02	14.66	27.26	29.46
ชุดควบคุม	14,346	14,341	14,339	14,292	0.02	0.4	0.04	0.8

ตารางที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดีหลังจากทดสอบการบำบัด น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมัน
ปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกไว้ เป็นเวลา 6 วัน

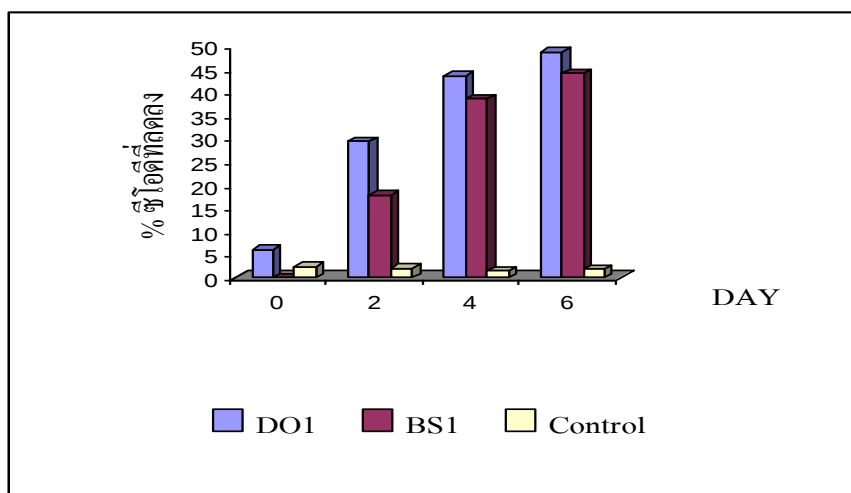
ไอโซเลต	การเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดี							
	ค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)				เปอร์เซ็นต์ที่ลดลง			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
DO1	39,776	29,856	23,904	21,696	6.04	29.47	43.52	48.75
BS1	42,336	34,816	26,000	23,616	0	17.76	38.58	44.21
ชุดควบคุม	42,292	42,252	42,239	42,198	2.3	2	1.5	1.9



ภาพที่ 4.11 ค่าพีเอชในน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยเลี้ยงเชื้อราแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 วัน



ภาพที่ 4.12 เปอร์เซนต์ไขมันที่ลดลงหลังจากทดสอบการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ด้วยเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกไว้เป็นเวลา 6 วัน



ภาพที่ 4.13 เปอร์เซนต์เชื้อแบคทีเรียที่ลดลงหลังจากทดสอบการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ด้วย
เชื้อราที่คัดเลือกไว้เป็นเวลา 6 วัน

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

1. แยกเชื้อราทนร้อนและการทำให้บริสุทธิ์

จากการเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อราทนร้อนจากมูลสัตว์และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ แกลบ จี๋เถ้าน จี๋เลื่อย ไม้ฝุ่ มูลวัว มูลม้า มูลแพะ และ มูลไก่ พบเชื้อราทนร้อนทั้งหมดจาก ไม้ฝุ่ และแกลบมากที่สุด เท่ากับ 2.7×10^3 CFU/ml รองลงมา คือ มูลวัว และจี๋เถ้าน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.7×10^3 CFU/ml และ 7.7×10^2 CFU/ml ตามลำดับ ส่วนมูลไก่ไม่พบเชื้อราทนร้อน แล้วทำการแยกเชื้อราทนร้อนดังกล่าว พบเชื้อราทนร้อนได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลต โดยแยกจากแกลบและจี๋เถ้านได้มากที่สุด ตัวอย่างละ 3 ไอโซเลต ได้แก่ AO1, AO2, AO3, BO1, BO2 และ BO3 รองลงมาจาก ไม้ฝุ่ 2 ไอโซเลต ได้แก่ DO1 และ DO2 ส่วนมูลวัว มูลม้า และมูลแพะ ตัวอย่างละ 2 ไอโซเลต ได้แก่ AS1, AS2, BS1, BS2, CS1 และ CS2 ตามลำดับ และจากจี๋เลื่อยเพียง 1 ไอโซเลต ได้แก่ CO1

2. แยกเชื้อราทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการนำเชื้อราทนร้อนทั้งหมดที่คัดแยกได้จำนวนทั้งหมด 15 ไอโซเลต คือ AO1, AO2, AO3, BO1, BO2, BO3, CO1, DO1, DO2, AS1, AS2, BS1, BS2, CS1 และ CS2 พบเชื้อราทนร้อนสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar ได้ ยกเว้นไอโซเลต BO1 และ AS2 เมื่อนำเชื้อราทนร้อนดังกล่าวมาทดสอบเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี Congo red test พบว่า ไอโซเลตต่าง ๆ สามารถสร้างวงใสอยู่ในเกณฑ์ทั้ง 3 ระดับ คือ ระดับ Significant 11 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AO1, AO3, BO2, BO3, CO1, DO1, AS1, BS1, BS2, CS1 และ CS2 ระดับ Moderate 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต DO2 ส่วนระดับ Negligible 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AO2 ซึ่งเมื่อวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส พบว่า AO1, BO2, CO1, DO1, AS1, BS1, BS2 และ CS1 สามารถสร้างวงใสได้ดีที่สุดเท่ากับ 15 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต AO3 และ BO3 สามารถสร้างวงใสเท่ากับ 8 มิลลิเมตร และน้อยที่สุด คือ ไอโซเลต CS2 สามารถสร้างวงใสเท่ากับ 1 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลต DO2 มีวงใสน้อยกว่าขนาดของโคโลนี ส่วนไอโซเลต AO2 ไม่สามารถสร้างวงใสแต่จะสร้างวงจางน้อยกว่าขนาดของโคโลนี

3. แยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลเนส

จากการนำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดที่คัดแยกได้จำนวนทั้งหมด 15 ไอโซเลต คือ AO1, AO2, AO3, BO1, BO2, BO3, CO1, DO1, DO2, AS1, AS2, BS1, BS2, CS1 และ CS2 พบเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลเนสสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลเนสได้ ยกเว้น ไอโซเลต BO1 และ AS2 เมื่อนำเชื้อราที่แยกได้มาทดสอบเอนไซม์ไซลเนสพบว่า ไอโซเลตต่าง ๆ สามารถสร้างวงใสอยู่ในเกณฑ์ทั้ง 3 ระดับ คือ ระดับ Significant 11 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AO1, AO3, BO2, BO3, CO1, DO1, AS1, BS1, BS2, CS1 และ CS2 ระดับ Moderate 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต DO2 ส่วนระดับ Negligible 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AO2 ซึ่งเมื่อวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส พบว่า AO1, BO2, CO1, DO1, AS1, BS1, BS2 และ CS1 สามารถสร้างวงใสได้ดีที่สุดเท่ากับ 30 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต AO3 และ BO3 สามารถสร้างวงใสเท่ากับ 16 มิลลิเมตร และน้อยที่สุด คือ ไอโซเลต CS2 สามารถสร้างวงใสเท่ากับ 3 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลต DO2 มีวงใสน้อยกว่าขนาดของโคโลนี ส่วนไอโซเลต AO2 ไม่สามารถสร้างวงใสแต่จะสร้างวงจางน้อยกว่าขนาดของโคโลนี

4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลเนส

ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ ซึ่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและ ไซลเนส อยู่ในระดับ Significant และมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่าง ได้แก่ AO1, AO3, BS2 และ CS2 โดยศึกษาการเจริญ ลักษณะโคโลนี และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ ไอโซเลต AO1 เป็นเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ *Aspergillus* sp., ไอโซเลต AO3 เป็นเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ *Scytalidium* sp., BS2 เป็นเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ *Oedocephalum* sp. และ ไอโซเลต CS2 เป็นเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ *Chrysosporium* sp.

5. การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อราที่แยกได้ในช่วงอุณหภูมิต่างๆ

จากการเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ ได้แก่ AO1, BO2, CO1, DO1, AS1, BS1, BS2 และ CS1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส, ชุดควบคุม) 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกวัน มีคุณสมบัติที่ร้อนและเชื้อเจริญได้ดีที่สุดทุกสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีเชื้อใดเจริญ

6. ศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกได้

6.1 ศึกษาคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

จากการสังเกตคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม อ.เมือง จ.นราธิวาส พบว่าคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่นำมาวิเคราะห์มีสีเทาดำ มีความขุ่นหนืด กลิ่นเหม็นจัด และมีไขมันบางๆ ลอยอยู่บริเวณผิวหน้าของน้ำทิ้ง เมื่อนำมาวัดค่า พีเอช ได้เท่ากับ 4.52 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าพีเอช 4.50 ของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานตรังน้ำมันปาล์ม จำกัด ศึกษาโดย หัสตินดา บินมะแอ (2548) วิเคราะห์ค่าบีโอดีมีค่าเท่ากับ 14,350 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างกับค่าบีโอดี 71,950 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ศึกษาโดย หัสตินดา บินมะแอ (2548) และวิเคราะห์ค่าซีโอดีมีค่าเท่ากับ 42,336 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะมีค่าแตกต่างกับค่าซีโอดี 50,850 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ศึกษาโดย หัสตินดา บินมะแอ (2548) ของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานตรังน้ำมันปาล์ม จำกัด ที่ศึกษาโดย หัสตินดา บินมะแอ (2548) ส่วนค่าบีโอดีและซีโอดีที่มีค่าแตกต่างกันในแต่ละโรงงาน เนื่องจากปริมาณสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มย่อมแตกต่างกันในเรื่องคุณภาพของวัตถุดิบกระบวนการผลิตช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง ฉะนั้นเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์โดยวัดค่า ซีโอดีและบีโอดีจึงมีค่าแตกต่างกัน

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราทนร้อนที่คัดเลือกไว้ ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่าเชื้อรา DO1 และเชื้อรา BS1 วัดพีเอชระหว่างการทดสอบการบำบัดน้ำทิ้ง จะอยู่ในช่วง 4.92- 5.31 จะเห็นได้ว่าพีเอชของน้ำทิ้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเจริญของเส้นใย เนื่องจากเชื้อมีการใช้สารอินทรีย์กรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะมิโน กรดไขมัน กรดระเหยได้ จำพวกกรดอะซิดิก กรดโปรโอนิก กรดบิวทริก และ isopropyl alcohol เป็นต้น ซึ่งเป็นสารประกอบที่อยู่ในน้ำทิ้ง และทำให้น้ำทิ้งมีความเป็นกรด (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533) วัดอุณหภูมิจากการทดสอบการบำบัดน้ำทิ้งเชื้อรา DO1 และเชื้อ BS1 มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 28.5 – 31 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าบีโอดี เชื้อรา DO1 มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสูงกว่าเชื้อ BS1 มีค่าเท่ากับ 9,904 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อ BS1 สามารถลดค่าบีโอดีมีค่าเท่ากับ 10,121 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 30.98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าซีโอดีจากเชื้อ DO1 และ BS1 พบว่าเชื้อ DO1 มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสูงกว่าเชื้อ BS1 มีค่าเท่ากับ 21,696 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อ BS1 สามารถลดค่าซีโอดีมีค่าเท่ากับ 23,616 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 48.75 เปอร์เซ็นต์ การที่สารอาหารหรือสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่างกันจะมีผลทำให้ความสามารถในการลดสารอินทรีย์ต่างกัน และการเจริญของ

จุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของน้ำทิ้ง ดังนั้นการที่เชื้อมีความสามารถในการบำบัดค่าซีโอดี และบีโอดีได้สูงหรือต่ำ อาจจะเนื่องจากปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอหรือมากเกินไป และชนิดของสารอาหารไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ในเชิงปริมาณ
2. ควรมีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ต่างๆ เพิ่มขึ้น เช่น เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไลเปส เป็นต้น
3. ควรมีการศึกษาการประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ นอกเหนือจากการบำบัดน้ำเสีย เช่น การย่อยขยะ การผลิตสารต่างๆ
4. ควรมีการศึกษาการใช้ประโยชน์ของเชื้อราทนร้อนในด้านอื่นๆ

บรรณานุกรม

- จารุวรรณ มณีศรี. 2538. การผลิตและประยุกต์ใช้ไซลานเนส เซลลูเลสจากกากน้ำมันปาล์ม โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต . สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จूरรัตน์ แซ่เต๋. 2541. การคัดเลือก และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย *Xobohumus* ที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธัญญา ศรีโพธิ์. 2538. การทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Cryptococcus lasrentii*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุว รณพินิจ. 2541. ลักษณะและโครงสร้างละเอียดของแบคทีเรีย ใน จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 42-73. จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- นัยทัศน์ ภู่อริณ. 2529. ศึกษาสารสกัดเพคตินจากส่วนเหลือใช้ของจำปาตะ . ปัญหาพิเศษ . คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เบญจวรรณ ชิตมณี. (2534). การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยเชื้อราที่แยกได้.วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปรีชา มณีศรี. 2539. การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้จุลินทรีย์ . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ .
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรจิจกุล และอริณ หันพงษ์กิตติกุล. 2533. กระบวนการใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้งและคุณสมบัติของน้ำเสียของโรงงานน้ำมันปาล์ม. ว. สงขลานครินทร์. 12 (2) : 169 – 176.
- มานะ กาญจนมณีเสถียร. 2531. ราที่เจริญในอุณหภูมิสูงและราทนร้อนจากดิน มูลสัตว์ และเศษเหลือจากการจากการเกษตร : การจำแนก และประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์. สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มานะ กาญจนมณีเสถียร. 2537. เชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูงจากวัสดุบางชนิด และ key อย่างง่ายที่ใช้ในการจำแนก. ว.สงขลานครินทร์. 16 (1):83 -92.

- รัตนา เรืองไรรัตน์โรจน์ และ จันทิมา ปุรินทรภิบาล . 2534 . การคัดเลือกจุลินทรีย์ทนความร้อน ซึ่งสามารถสลายไขมันที่อุณหภูมิสูง จากวัสดุเศษเหลือน้ำทิ้งโรงงานปาล์ม . ปัญหาพิเศษ . สาขาชีวเคมี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วสันต์ เพชรรัตน์ และมานะ กาญจนมณีเสถียร . 2533. ราที่เจริญในอุณหภูมิสูงและราทนร้อน จากปุ๋ยหมักสำหรับเพาะเห็ดฟาง. ว. สงขลานครินทร์. 12(3) :223-228.
- วิภาวรรณ ไตรรัตนากุล. 2540. การตรวจหาเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มี อุณหภูมิสูง. โครงการงานทางเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ศิริพร หมาดล้า . 2544. การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์การจำแนกชนิดและ คุณสมบัติของพอลิเมอร์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุรพล สายพานิช . 2537. ระบบการบำบัดน้ำเสียแบบ Activated : การควบคุมและดูแลระบบ บำบัดน้ำเสีย. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .
- เสริมพล รัตสุข และ ไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. 2524. การกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม และ แหล่งชุมชน. สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.
- โสภา จันทภาโส. 2542. ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงาน น้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์และการลดความเข้มข้นของสี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- หัตถินดา บินมะแอ. (2547). การบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่ผลิต พอลิเมอร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อารี กังแฮ. 2536. การผลิตเซลล์และไลซานส์ จากวัสดุเศษเหลือโรงงานน้ำมันปาล์มโดย เชื้อ *Aspergillus* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อรัญ หันพงศ์กิตติกุล , พูนสุข ประเสริฐสรรพ , กัลยา ศรีสุวรรณ , เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และ วีระศักดิ์ ทองลิ้มปี. 2537. การศึกษาวิธีการแยกน้ำมันในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมัน ปาล์ม : เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา การลดการสูญเสียน้ำมันในอุตสาหกรรมน้ำมัน ปาล์ม. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 7 เมษายน 2537 ณ โรงแรมสยามธานีสุราษฎร์ธานี.
- Annibal, A.D., Stazi, S.R., Vincignerra, V., Mattia, E.D., Sermanni, G.G. 1999. Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. Process Biochem. 34 : 697-706.

- APHA, AWWA and WPCF.1998. Standard Methods for the Examination off Water and Wastewater. 18th ed. N.Y: American Public Health Association.
- Cheah, S. C., Ma, A. N., Ooi, L. C. L. ana Ong, A. S. H. 1988. Biotechnology applications for the utilization of wastes from palm oil mills. *Fat. Sci. Technol.* 535-540.
- Hudson, J.A., Morgan, H.W., D. 1990. Cellulotic properties of extremely thermophilic anaerobe. *Appl. Microbiol. Biot.* 33(6):687-691.
- Hwang, T.K., Ong, S.M., Scow, C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm oil mill effluent. *Planter.* 54 : 749-756.
- Karim, M.I.A., and Kamil, A.Q.A. 1989. Biological treatment of palm oil mill effluent using *Trichoderma viride*. *Biol. Wastes.* 27(2) : 143-152.
- Prasertsan, P., Kittikul, A.H, Kungnae, A., Maneesri J. and Oi, S. 1997. Optimization for xylanase and cellulase producion from *Aspergillus niger* ATCC 6275 in palm oil mill waste and its application. *World J. Microbiol. Biotcchnol.* 13 :555-559.
- Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Musani, R., Samad, M.N. and Basri, M. 1997. Some characteristics of lipase from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 3:153-159.
- Vikineswary, S., Kthubutheen, A.J. and Ravoof, A.A. 1997. Growth of *Trichoderma harzianum* and *Myceliophthora thermophila* in palm oil sludge. *World J. Microbiol. Biot.* 13 : 189-194.
- Vikineswary, S. and Shim, Y.L. 1996. Growth and starch degrading activity of *Myceliophthora thermophila* in solid-substrate fermentation of sago hampas. *J. Mol. Biol.* 4 : 85-89.
- Zheng, Z. and Shetty, K., 2000. Solid state prodution of polygalacyuronase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochem.* 35 : 825-830.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช ระหว่าง 5.0-5.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2. Carboxymethyl Cellulose agar

carboxymethyl Cellulose sodium salt	1.0	กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม
NH_4NO_3	2.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
Yeast extract	0.2	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 7.0 ด้วย 1N HCl จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบเอนไซม์เซลลูลาเนส

ตามวิธีของ Mackenzie และ Willaim (1984) มีส่วนประกอบดังนี้

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NH_4NO_3	5.0	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
ZnSO_4	0.01	กรัม
MnSO_4	0.01	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
Birchwood xylan	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สี่และห้าทดสอบ

1. การเตรียม ร้อยละ 0.1 Congo red

Congo red	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Congo red ในน้ำกลั่นให้เข้ากัน หากมีตะกอนให้กรองก่อนใช้

2. การเตรียม 1 M NaCl

NaCl	55.44	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่นให้เข้ากัน

ภาคผนวก ค
วิธีวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเสีย

1. การวิเคราะห์ บีโอดี (Dilution method) (APHA, AWWA and WEF, 1998)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- ตัวอย่างน้ำที่ต้องการวิเคราะห์
- ขวด BOD ขนาด 300 มิลลิลิตร พร้อมจุกแก้วที่เป็น ground joint
- ขวดเอเดนเมเยอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร
- บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
- ปิเปต
- ตู้บ่มเชื้อควบคุม อุณหภูมิที่ 21 องศาเซลเซียส
- Reagents ที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารเคมี

1. สารละลาย Phosphate buffer : ละลาย KH_2PO_4 8.5 กรัม, K_2HPO_4 21.75 กรัม, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 33.4 กรัม และ NH_4Cl 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้เป็น 1 ลิตร สารละลายนี้จะมี pH ประมาณ 7.2
2. สารละลาย MgSO_4 : ละลาย $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางให้เป็น 1 ลิตร
3. สารละลาย CaCl_2 : ละลาย anhydrous CaCl_2 27.5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางให้เป็น 1 ลิตร
4. สารละลาย FeCl_3 : ละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางให้เป็น 1 ลิตร
5. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต : ละลาย $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 480 กรัม หรือ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 400 กรัม หรือ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 364 กรัม ในน้ำกลั่น กรองแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
6. สารละลาย Alkali - iodide : ละลาย NaOH 500 กรัม (หรือ KOH 700 กรัม) และ NaCl 135 กรัม (หรือ KI 150 กรัม) ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร
7. สารละลาย Alkali – iodide azide : ละลาย NaN_3 10 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในสารละลาย Alkali – iodide
8. Cone. H_2SO_4

9. น้ำแป้ง : ละลาย soluble starch หรือ แป้งมันสำปะหลัง 5 กรัมในน้ำต้ม แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ถ้าต้องการเก็บ ไว้เป็นเวลานานเติม salicylic acid 1.25 กรัม หรือ toluene 2-3 หยดต่อ น้ำแป้ง 1 ลิตร

10. สารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.025 N ละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.205 กรัมใน น้ำกลั่นต้มเดือด ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

11. สารละลายมาตรฐาน $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.025 N: ละลาย $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1.226 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียม dilution water โดยใช้

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์	}	อย่างละ 1 มิลลิลิตร/ น้ำกลั่น 1 ลิตร
--	---	--------------------------------------

2. เดิมออกซิเจนในน้ำกลั่นประมาณ 10-15 นาที

3. ทำการเจือจางน้ำตัวอย่าง 2 ขวดตามสัดส่วนที่ต้องการโดยใช้ dilution water

4. นำขวดหนึ่งมาหาค่า Dissolved Oxygen (DO_0) โดยวิธีการดังนี้

ใส่ตัวอย่างน้ำในขวดบีโอดี 300 มิลลิลิตร



เติม 1 มิลลิลิตร Manganese sulfate solution

(ละลาย $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)



เติม 1 มิลลิลิตร Alkaline – iodide azide reagent

(ละลาย NaOH 500 + NaI 135 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร + NaN_3 10 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร)



ปิดจุก เขย่าขวดกลับไปมาประมาณ 15 ครั้ง



ปล่อยให้ตะกอนนอนก้น มองเห็นน้ำใสข้างบนประมาณ 100 มิลลิลิตร

เติม 1 มิลลิลิตร $\text{Conc. H}_2\text{SO}_4$ เขย่าจนตะกอนหายไป



เทสารละลายในขวดทิ้งไป 99 มิลลิลิตร



สารละลายที่เหลือไทเทรตด้วย 0.025 โมลาร์ โซเดียมไทโอซัลเฟต โดยใช้ น้ำแบ่งเป็นอินดิเคเตอร์

5. นำขวดหนึ่งไป incubator ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

6. เมื่อครบ 5 วันแล้ว นำตัวอย่างมาหาค่า Dissolved Oxygen ที่เหลืออยู่ (DO_5) โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับ (DO_0)

7. คำนวณค่าบีโอดี จากสมการ $BOD = DO_0 - DO_5$

2. การวิเคราะห์ซีโอดี (Close Reflux Method) (APHA, AWWA and WEF, 1998)

เครื่องมืออุปกรณ์

1. หลอดย่อย (Digestion Vessels) เป็นหลอดแก้วบอโรซิลิเกต (Borosilicate) ซึ่งใช้เลี้ยงเชื้อขนาด 16×100 หรือ 20 ×150 หรือ 25× 150 มิลลิเมตร มีฝาพลาสติกเกลียวซึ่งทำด้วย TEE
2. บล็อก (Block) หรือที่ใส่หลอดแก้วแบบดัน ทำด้วยอลูมิเนียม ความลึกของช่องใส่หลอดประมาณ 45-50 มิลลิเมตร การให้ความร้อนเพื่อต้มย่อยสลายกระทำโดยวางบล็อกบนเตาแผ่น
3. ตู้อบ (Oven) สามารถควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 150 ± 2 องศาเซลเซียส
4. บิวเรต
5. ขวดรูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต เข้มข้น 0.1 นอร์มัล
ละลายโปแตสเซียมไดโครเมต ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหนัก 4.193 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 167 มิลลิลิตร และปรอทซัลเฟต 33.3 กรัม คนให้ละลาย ปล่อยให้แห้งไว้ให้เย็น แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
2. กรดซัลฟูริกและซิลเวอร์ซัลเฟต
ซังซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 8.8 กรัม ใส่ลงในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน เพื่อให้ซิลเวอร์ซัลเฟตละลายได้ทั้งหมดก่อนนำไปใช้ต่อไป
3. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) 19.6 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายเฟอโรอินดิแคเตอร์

ละลาย 1,10-ฟีแนนโทรีน โมโนไฮเดรต (1,10-Phenanthroline Monohydrate, $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) 1.485 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous Sulfate, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 695 มิลลิกรัม ใน น้ำกลั่นแล้วเจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลาย FAS

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต 0.1 นอร์มัล 5.0 มิลลิลิตร ใส่ ขวดรูปกรวย เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วจึงค่อยๆเติมกรดซัลฟริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น เติม เฟอโรอิน 2.3 หยดไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน FAS จนได้สีน้ำตาลเป็นจุดยุติ

$$\text{ความเข้มข้นของ FAS . นอร์มัล (N)} = (5.0 \times 0.1) / \text{มล. FAS ที่ใช้}$$

5. กรดซัลฟามิก (Sulfamic Acid)

ใช้สำหรับป้องกันการรบกวนของไนไตรต์ (NO_2) ปริมาณที่ใช้คือ 10 มิลลิกรัม ต่อ ทุกๆ 1 มิลลิกรัม ของไนไตรต์

6. สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟทา เลต (Potassium Hydrogen Phthalate หรือ KHP)

บด KHP เพื่อลดขนาดลงและนำไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งและมีน้ำหนักคงที่ แล้วละลาย KHP ที่บดและอบแห้งแล้ว 425 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นเจือจางให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายมีซีไอดีเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเก็บรักษาในตู้เย็นได้นานไม่เกิน 3 เดือน

7. สารละลายกลูโคส

ละลายกลูโคส 486 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะมีค่าซีไอดีเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (กลูโคส 1 กรัม จะให้ซีไอดี 1.067 กรัม) สารละลายกลูโคสจะไม่ค่อยคงตัวเพราะสามารถย่อยสลายมวลชีวภาพได้อย่างรวดเร็ว

วิธีวิเคราะห์

ต้องล้างหลอดแก้วและฝาปิดด้วยสารละลายกัมมะถัน 20% เสมอก่อนทุกครั้งก่อน ใช้งาน

1. เลือกขนาดของหลอดแก้วสำหรับคัมซีไอดีให้เหมาะสม

ถ้าตัวอย่างน้ำมีซีไอดีต่ำให้เลือกหลอดแก้วที่มีขนาด 25×150 มิลลิเมตร (ปริมาตรตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิลิตร) ถ้าซีไอดีค่อนข้างสูงให้ใช้หลอดแก้วขนาด 20×150 มิลลิเมตร

(ปริมาตรตัวอย่างน้ำ 5 มิลลิลิตร) และถ้าซีไอสูงสามารถเลือกหลอดแก้วขนาด 16×100 มิลลิเมตร (ปริมาตรตัวอย่างน้ำ 2.5 มิลลิลิตร) ในที่นี้ขอแนะนำว่าไม่จำเป็นต้องใช้หลอดหลายขนาด ใช้เพียง 2 ขนาดคือ 25×150 มิลลิเมตร สำหรับหาค่าซีไอที่มีค่าต่ำและขนาด 25 × 150 มิลลิเมตร สำหรับค่าซีไอที่มีค่าสูง ถ้าตัวอย่างมีค่าสูงมากก็ให้เจือจางตัวอย่างน้ำก่อน

2. การเลือกปริมาตรตัวอย่างน้ำ

ถ้าเป็นน้ำสะอาด ธรรมชาติหรือน้ำที่มีค่า ซีไอต่ำๆ (<40 มิลลิกรัมต่อลิตร) ควรใช้ตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดแก้วขนาด 25×150 มิลลิเมตร แต่ถ้าซีไอมีค่าสูงกว่านั้นให้เลือกใช้หลอดแก้วขนาด 20×150 มิลลิเมตร โดยเลือกใช้ตัวอย่างน้ำมากที่สุด 5 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่า แล้วเติมน้ำกลั่นให้เป็น 5 มิลลิลิตร และถ้าตัวอย่างน้ำมีค่าซีไอมากต้องเจือจางก่อนนำมาใช้ ควรประมาณค่าซีไอของตัวอย่างน้ำคร่าวๆ ก่อนเพื่อที่จะเลือกใช้ปริมาณตัวอย่างได้อย่างเหมาะสม การประมาณค่าซีไอทำได้โดยพิจารณาจากลักษณะน้ำ แหล่งที่มาของน้ำ และจากค่า Rapid COD การเลือกขนาดตัวอย่างที่ วิเคราะห์ให้เหมาะสมอาจดูได้จากตาราง ในทางปฏิบัติ ควรเลือกใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำให้ผลต่าง FAS ที่ใช้ในการ ไตเตรตแบลงค์และตัวอย่างน้ำอยู่ระหว่าง 1-5 มิลลิลิตร

3. ใส่ตัวอย่างน้ำลงในหลอดแก้วขนาดเหมาะสม เติมน้ำยาย่อยสลาย หรือโปแตสเซียมไดโครเมต ตามด้วยกัมมะถันอย่างช้าๆ ในปริมาณที่แสดงอยู่ในตาราง (ถ้าใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำน้อยกว่าที่แสดงในตารางให้เติมน้ำกลั่นให้ครบตามจำนวน) ปิดฝาให้แน่นและเขย่าผสมกันให้ดี สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่นทำเหมือนตัวอย่างทุกอย่าง

4. วางหลอดแก้วในบล้อกแล้วใส่ตุ้มน้ำ ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 150 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5. เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้ว นำออกจากตุ้มน้ำปล่อยให้เย็น

6. เทสารละลายออกจากหลอดแก้วลงในขวดรูปกรวย ใช้น้ำกลั่นล้างสารละลายในหลอดแก้ว แล้วเทรวมลงในขวดรูปกรวย เติมน้ำฟอสฟอโรอินอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด แล้วไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน FAS สีของสารละลายจะค่อยๆ เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียวอมเหลือง ฝาน้ำตาลแดง ซึ่งถึงจุดยุติ จดปริมาณ FAS ที่ใช้ในการไตเตรต

ตารางผนวกที่ 1 ขนาดตัวอย่างและอัตราเจือจางที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาซีโอดี

ช่วงซีโอดี	ขนาดตัวอย่าง	อัตราเจือจาง
<200	5	1:1
200-400	4	1:1
400-800	2	1:1
800-1,600	1	1:1
1,600-3,200	5	1:10
2,700-5,300	3	1:10
4,000-8,000	4	1:20
8,000-16,000	2	1:20
13,000-26,000	3	1:50
20,000-40,000	2	1:50
40,000-80,000	2	1:100
80,000-160,000	1	1:100

* เมื่อใช้ FAS ความเข้มข้น 0.05 นอร์มัล และ $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ตารางผนวกที่ 2 ขนาดของหลอดแก้วปริมาตรตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม

ขนาดหลอดแก้ว (มล.)	ปริมาตรตัวอย่าง น้ำ (มล.)	สารละลาย ไดโครเมต (มล.)	สารละลาย กรดซัลฟูริก (มล.)	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)
16<100	2.5	1.5	3.5	7.5
20<150	5.0	3.0	3.0	15.0
25<150	10.0	6.0	6.0	30.0

การคำนวณ

$$\text{ซีไอดี, มิลลิกรัม/ลิตร} = \frac{(A-B) \times N \times 8000}{\text{มล. ของตัวอย่างน้ำ}}$$

เมื่อ A = มิลลิลิตรของ FAS ที่ใช้ในการไตเตรตแบลงค์
 B = มิลลิลิตรของ FAS ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง
 N = ความเข้มข้นของ FAS นอร์มัล

ภาคผนวก ง
ภาพประกอบการศึกษา



ชุดควบคุม



ชุดตัวอย่าง

ภาพผนวกที่ 1 การเปรียบเทียบน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยชุดควบคุม และตัวอย่างผ่าน
การบำบัดแล้วโดยเชื้อราทนร้อน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวหัตถินดา บินมะแอ

วัน เดือน ปีเกิด 2 กันยายน 2522

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยาประยุกต์)	สถาบันราชภัฏยะลา	2544
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

ผลงานวิชาการ

Binmaeil, H. Prasertsan, P. and H-Kittikun, A. 2003. Biomass production and oil removal from palm oil mill effluent by thermotolerant fungi. Paster presentation at Bio Thailand 2003. Technology for Life. 17-20 July, 2003. Pattaya Exhibition and Convention Hall (PEACH) Pattaya, Chonburi, Thailand.

หัตถินดา บินมะแอ. 2549. การบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 10(1): 105-117

หัตถินดา บินมะแอ. 2550. มารูจักโยเกิร์ต...กันดีกว่า. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 11(1) : 105-117

หัตถินดา บินมะแอ. 2551. นมแพะ...อีกทางเลือกของคนรักสุขภาพ. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 12(1) : 29-35

หัตถินดา บินมะแอ. 2552. เชื้อพันธุ์วุ้นสวรรค์ (Bacterial cellulose). ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 13(1) : 50-54

หัตถินดา บินมะแอ. 2552. การคัดเลือกและแยกจุลินทรีย์ทนร้อนจากแหล่งต่างๆ ในท้องถิ่น. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 13(1) : 1-10

หัตถินดา บินมะแอ. 2553. จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร: ภัยใกล้ตัวที่ต้องระวัง. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 14(1) : 53-62