รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตกระดาษโดยการตรึงเซลล์จิลุนทรีย์บนเม็ดตรึงอัลจิเนตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแพคเบดเพื่อกำจัดเซลลูโลสในน้ำเสีย

Development of paper mill wastewater treatment by using alginate immobilization with microorganism in pack bed bioreactor to degradation cellulose

ผศ. ดร. วิทวัส แจ้งเอี่ยม

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

ขอบสัน พิมพ์ว่า

การพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตกระดาษโดยการตรึงเซลล์จิลุนทรีย์บนเม็ดตรึงอัลจิเนตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแพคเบตเพื่อกำจัดเซลลูโลสในน้ำเสีย เลขที่สัญญา 47/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตกระดาษโดยการตรึงเซลล์จิลุนทรีย์บนเม็ดตรึงอัลจิเนตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแพคเบตเพื่อกำจัดเซลลูโลสในน้ำเสีย

Development of paper mill wastewater treatment by using alginate immobilization with microorganism in pack bed bioreactor to degradation cellulose

ผศ. ดร. วิทวัส แจ้งเอี่ยม

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256109A1080029

สัญญาเลขที่ 47/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตกระดาษโดยการตรึงเซลล์จิลุนทรีย์บนเม็ดตรึงอัลจิเนตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแพคเบตเพื่อกำจัดเซลลูโลสในน้ำเสีย

Development of paper mill wastewater treatment by using alginate immobilization with microorganism in pack bed bioreactor to degradation cellulose

ผศ. ดร. วิทวัส แจ้งเอี่ยม

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 47/2561

บทคัดย่อ

การพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตกระดาษ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบำบัดน้ำเสียแบบกระบวนการชีวภาพ มีความสำคัญมากกับการดำเนินการของโรงงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม กระบวนการแรก คือการคัดเลือกจุลินทรีย์จากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษที่เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียและย่อยเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบหลักของกระดาษได้ดี โดยใช้วิธี Congo red เมื่อเวลาครบ 48 ชั่วโมง พบว่ามีจุลินทรีย์ทั้งหมด 8 ชนิดที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี โดยเฉพาะจุลินทรีย์ CDB6 สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ จากนั้นนำจุลินทรีย์ทั้ง 8 ชนิดไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เป็นผลผลิตของการย่อยสลายเซลลูโลส โดยใช้วิธี DNS ซึ่งในการวิเคราะห์จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลักๆ โดยตอนที่ 1 จะใช้สารละลาย CMC เป็นตัวกระตุ้นความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลส ส่วนในตอนที่ 2 จะใช้กระดาษ Whatman No.1 เป็นตัวกระตุ้นความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดในทั้งสองการทดลองคือ จุลินทรีย์ CDB 4 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.0533 และ 0.0456 IU/ml จากนั้นวิเคราะห์ลักษณะเชิงคุณภาพของการย่อยสลายเซลลูโลส ของจุลินทรีย์ CDB 4 โดยวิธี TLC (Thin-layer chromatography) พบว่าไม่เกิดจุดของน้ำตาลกลูโคส จากนั้นนำจุลินทรีย์ CDB 4 ไปตรึงบนเม็ดตรึงอัลจิเนต โดยมีขนาดของเม็ดตรึงเท่ากับ 4 มิลลิเมตร บรรจุลงในคอลัมน์แพคเบดเพื่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษและทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่ผ่านการบำบัดทุกๆ 4 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง มาตรวจวัดค่าซีโอดีพบว่า สามารถลดค่าซีโอดีจาก 1171 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 267 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าซีโอดีลดลงอย่างต่อเนื่อง สำหรับประสิทธิภาพของเม็ดตรึงที่มีอายุการใช้งานอยู่ที่ 48 ชั่วโมงพบว่ามีความแข็งแรงที่ลดลง

Abstract

The improvement of processes of wastewater treatment in paper mill especially the use of bioprocess is the key to make the green industry. First of all, the selection of the cellulose-degraded microorganism by Congo red plate assay method was used. At 48 hours, we found 8 microorganisms which could be degraded cellulose in the assay. Cellulose degradation bacteria (CDB) number 6 has the largest clear zone. Then we use Dinitro Salicylic Acid (DNS) method to test activity of all microorganism by measuring kinetic of degradation cellulose to glucose by using Carbon methyl Cellulose (CMC) and Filter paper (Whatman No.1) to induce cellulose enzyme expression. The result showed that “CDB4” had the best performance to degrade cellulose in both inducers which the enzyme activities were 0.0533 and 0.0456 IU/ml, respectively. Thin-layer chromatography (TLC) method was the qualitative method to measure the cellulose biodegraded profile of CDB4. Moreover, we could not detect any glucose spot on TLC plate. Finally, CDB4 was immobilized in alginate and pack in Packbed Column, 4 mm. of immobilized alginate beads were formed. At 48 hours, the Chemical Oxygen Demand (COD) was decreased from 1171 ppm to 267 ppm. We found immobilized alginate beads were unstable after 48 hours of treatment wastewater.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์	5
3. ขอบเขตของการทำโครงงานวิจัย	5
4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย	7
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	20
6. วิธีการทดลอง	21
7. ผลการทดลองและอภิปรายผล	30
8. สรุปผลการทดลอง	41
9. ข้อเสนอแนะ	42
10. ผลผลิต (Output)	43
รายงานสรุปการเงิน	44
บรรณานุกรม	45
ภาคผนวก	47
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	53

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวแปรในการเลี้ยงจุลินทรีย์และการหาสภาวะของเม็ดตรึงอัลจิเนต 6

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 9

ตารางที่ 3 มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม 11

ตารางที่ 4 แสดงจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส 19

ตารางที่ 5 ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่างๆของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย 29

ตารางที่ 6 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้โดยวิธี DNS ตอนที่ 1 34

ตารางที่ 7 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้โดยวิธี DNS ตอนที่ 2 35

ตารางที่ 8 ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น 36

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 มลพิษจากขั้นตอนต่างๆของการผลิตกระดาษ 3
รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใย 7
รูปที่ 3 โครงสร้างเซลโลไบโอส (cellobiose) 8
รูปที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส 10
รูปที่ 5 Cellulose degradation pathway 15
รูปที่ 6 กลไกการทำงานของเอนไซม์ เซลลูเลส 16
รูปที่ 7 โครงสร้างของอัลจิเนต (Alginate) ชนิดต่างๆ 17
รูปที่ 8 กลไกการเกิดเจลของ calcium alginate (Egg-box model) 18
รูปที่ 9 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแพคเบด (Pack bed Bioreactor) 20
รูปที่ 10 ลักษณะของบ่อบำบัดทางชีวภาพ 23
รูปที่ 11 ตัวอย่างการคัดเลือกจุลินทรีย์โดยใช้สี Congo red 24
รูปที่ 12 ขั้นตอนการตรึงจุลินทรีย์ในเม็ดอัลจิเนต 27
รูปที่ 13 แบบจำลองระบบการบำบัดแบบแพดเบดคอลัมน์ 28
รูปที่ 14 จำลองการวัดค่า Kinetic ต่างๆ 29
รูปที่ 15 ตัวอย่างวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ 31
รูปที่ 16 กราฟแสดงความกว้างของวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ณ วันที่ 1 32
รูปที่ 17 กราฟแสดงความกว้างของวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ณ วันที่ 2 33
รูปที่ 18 กราฟเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากย่อยสลายเซลลูโลสที่มาจาก CMC และ กระดาษ Whatman No.1 37
รูปที่ 19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ CDB4 ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X 38
รูปที่ 20 การวิเคราะห์อัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธี TLC 39
รูปที่ 21 ค่าซีโอดีของการบำบัดแบบไม่มีจุลินทรีย์ CDB4 และมีจุลินทรีย์ CDB4 40
รูปที่ 22 ค่าพีเอชก่อน-หลังบำบัด 41
รูปที่ ข.1-ข.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะการเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเหลว 51
รูปที่ ข.3-ข.4 การทดสอบการเกิดน้ำตาลโดยวิธี DNS และลักษณะของเม็ดตรึงใน packbed reactor 52

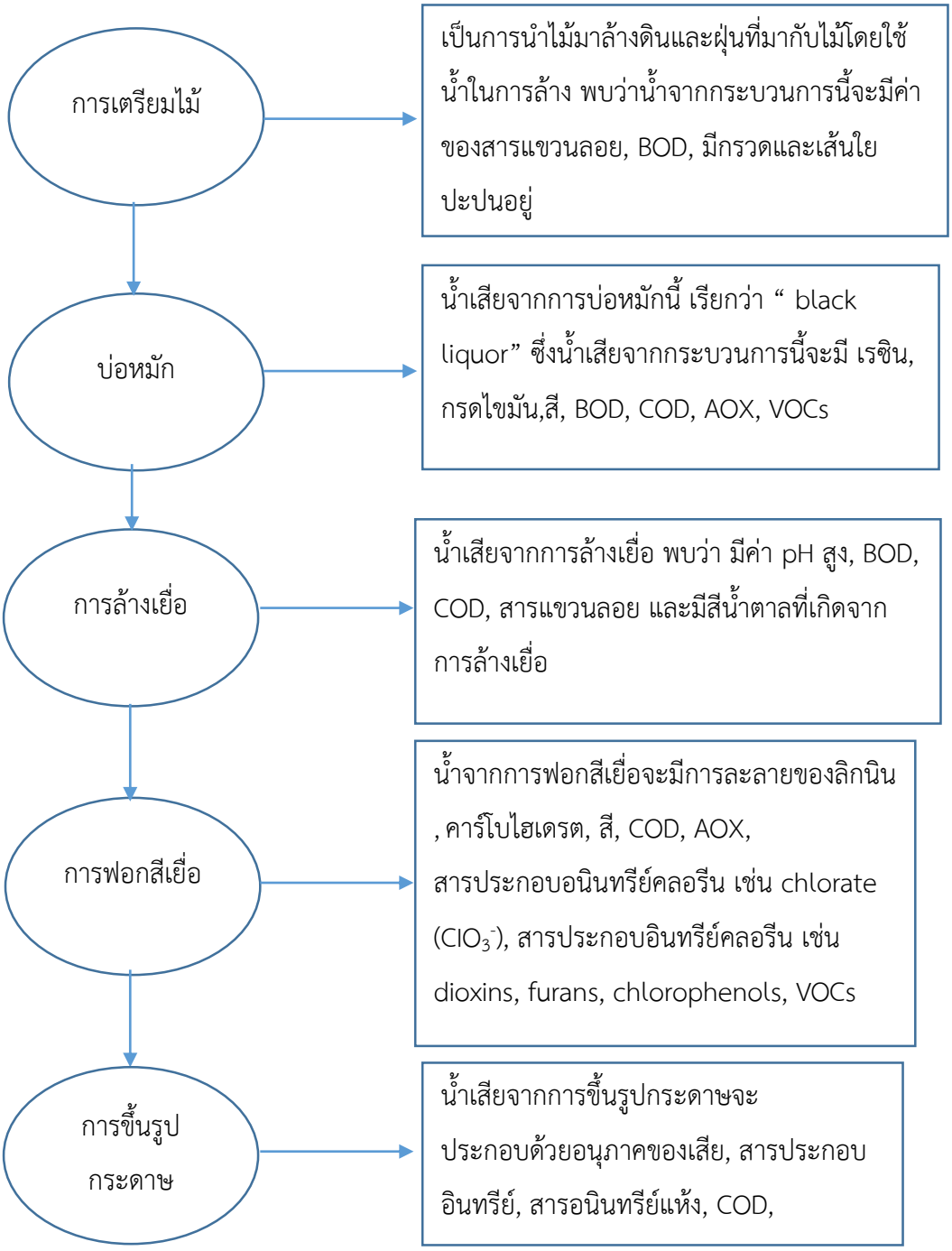
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันประเทศไทยมีอัตราการเติบโตของอุตสาหกรรมจำนวนมาก แต่ในขณะที่อุตสาหกรรมกำลังก้าวหน้าเติบโตอย่างแพร่หลายนั้น กลับเกิดปัญหาที่ตามมาจากการเติบโตของอุตสาหกรรมที่เป็นปัญหามานานหลายปี คือปัญหาสิ่งแวดล้อมทางด้านน้ำเสีย เนื่องจากในประเทศไทยมีอุตสาหกรรมที่ทำให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมด้านน้ำเสียมากมาย เช่น อุตสาหกรรมสีย้อม อุตสาหกรรมผลิตสารเคมี อุตสาหกรรมฟอกเครื่องหนัง และหนึ่งในนั้นคืออุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ อุตสาหกรรมเหล่านี้จะส่งปัญหาทางด้านน้ำเน่าเสียเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้มีการร้องเรียนปัญหาน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษในประเทศไทยโดยน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษได้ส่งกลิ่นเหม็นอย่างรุนแรงสร้างความเดือดร้อนให้ประชาชนที่อาศัยอยู่ใกล้เคียงพื้นที่ของโรงงานผลิตกระดาษ เนื่องจากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้น้ำในการเดินกระบวนการผลิตมากที่สุด โดยน้ำจากกระบวนการผลิตกระดาษ ไม่ว่าจะเป็นการเตรียมไม้ การล้างเยื่อ การฟอกสี เรื่อยจนไปถึงการขึ้นแผ่นจนเสร็จสมบูรณ์ กระบวนการเหล่านี้ล้วนแล้วใช้น้ำในเดินกระบวนการทั้งสิ้น ซึ่งเป็นที่รู้กันว่าในเนื้อไม้จะมีสารประกอบจำพวกเซลลูโลสประกอบอยู่ ซึ่งน้ำที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลสจำนวนมากจะก่อให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสีย ทำให้ค่า BOD (Biochemical Oxygen Demand) ซึ่งเป็นค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำ และค่า COD (Chemical Oxygen Demand) เป็นค่าที่บอกปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ต้องการใช้เพื่อออกซิเดชันสารอินทรีย์ในน้ำให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำมีค่าสูงมาก โดยทางกระทรวงอุตสาหกรรมอนุญาตให้ปล่อยน้ำลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้นั้นค่า BOD จะต้องไม่เกิน 20 mg/l และค่า COD จะต้องไม่เกิน 120 mg/l โดยน้ำจากกระบวนการผลิตกระดาษจะถูกส่งไปบำบัดที่บ่อบำบัดของโรงงาน โดยในน้ำเสียจะมีเยื่อกระดาษปะปนมาด้วย ซึ่งในเยื่อกระดาษนี้มีโมเลกุลของเซลลูโลสประกอบอยู่ในเยื่อนั้นๆ เนื่องจากเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์เมื่อมีอยู่ในน้ำจำนวนมากเกินกว่าที่จุลินทรีย์จะสามารถย่อยได้อาจจะทำให้น้ำเน่าเสียได้หรือเกิดการนำน้ำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิตได้น้อยลงด้วย

ในปัจจุบันประเทศไทยมีอัตราการเติบโตของอุตสาหกรรมจำนวนมาก แต่ในขณะที่อุตสาหกรรมกำลังก้าวหน้าเติบโตอย่างแพร่หลายนั้น กลับเกิดปัญหาที่ตามมาจากการเติบโตของอุตสาหกรรมที่เป็นปัญหามานานหลายปี คือปัญหาสิ่งแวดล้อมทางด้านน้ำเสีย เนื่องจากในประเทศไทยมีอุตสาหกรรมที่ทำให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมด้านน้ำเสียมากมาย เช่น อุตสาหกรรมสีย้อม อุตสาหกรรมผลิตสารเคมี อุตสาหกรรมฟอกเครื่องหนัง และหนึ่งในนั้นคืออุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ อุตสาหกรรมเหล่านี้จะส่งปัญหาทางด้านน้ำเน่าเสียเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้มีการร้องเรียนปัญหาน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษในประเทศไทยโดยน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษได้ส่งกลิ่นเหม็นอย่างรุนแรงสร้างความเดือดร้อนให้ประชาชนที่อาศัยอยู่ใกล้เคียงพื้นที่ของโรงงานผลิตกระดาษ เนื่องจากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้น้ำในการเดินกระบวนการผลิตมากที่สุด โดยน้ำจากกระบวนการผลิตกระดาษ ไม่ว่าจะเป็นการเตรียมไม้ การล้างเยื่อ การ

ฟอกสี เรื่อยจนไปถึงการขึ้นแผ่นจนเสร็จสมบูรณ์ กระบวนการเหล่านี้ล้วนแล้วใช้น้ำในเดินกระบวนการทั้งสิ้น ซึ่งเป็นที่รู้กันว่าในเนื้อไม้จะมีสารประกอบจำพวกเซลลูโลสประกอบอยู่ ซึ่งน้ำที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลสจำนวนมากจะก่อให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสีย ทำให้ค่า BOD (Biochemical Oxygen Demand) ซึ่งเป็นค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำ และค่า COD (Chemical Oxygen Demand) เป็นค่าที่บอกปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ต้องการใช้เพื่อออกซิเดชันสารอินทรีย์ในน้ำให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำมีค่าสูงมาก โดยทางกระทรวงอุตสาหกรรมอนุญาตให้ปล่อยน้ำลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้นั้นค่า BOD จะต้องไม่เกิน 20 mg/l และค่า COD จะต้องไม่เกิน 120 mg/l โดยน้ำจากกระบวนการผลิตกระดาษจะถูกส่งไปบำบัดที่บ่อบำบัดของโรงงาน โดยในน้ำเสียจะมีเยื่อกระดาษปะปนมาด้วย ซึ่งในเยื่อกระดาษนี้มีโมเลกุลของเซลลูโลสประกอบอยู่ในเยื่อนั้นๆ เนื่องจากเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์เมื่อมีอยู่ในน้ำจำนวนมากเกินกว่าที่จุลินทรีย์จะสามารถย่อยได้อาจจะทำให้น้ำเน่าเสียได้หรือเกิดการนำน้ำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิตได้น้อยลงด้วย

จากการศึกษาปัญหาของน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษพบว่าทุกขั้นตอนของการผลิตกระดาษก่อให้เกิดมลภาวะทางน้ำดังต่อไปนี้



รูปที่ 1 มลพิษจากขั้นตอนต่างๆของการผลิตกระดาษ

ที่มา :ดัดแปลงจาก Pokhrel at el., 2004

เทคโนโลยีต่างๆ ที่ใช้การบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมกระดาษมักจะมุ่งเน้นไปในทางที่จะปรับค่า pH ของน้ำเสีย ลดปริมาณสารแขวนลอย (suspended solids, SS) เช่น เส้นใย นอกจากนี้ในกรณีที่ใช้เศษ

กระดาษเก่าเป็นวัตถุดิบในการผลิตเยื่อ จะมีน้ำเสียที่เกิดจากการล้างหมึกของเศษกระดาษเดิม (de-inking process) ซึ่งน้ำเสียส่วนนี้จะมีค่าของสารแขวนลอย และความสกปรกในรูป BOD และ COD สูง โดยน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตกระดาษส่วนหนึ่งได้มีการนำกลับไปใช้ใหม่ตามลำดับความสะอาด

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับปัญหาน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษ Viraraghavan และคณะพบว่ามลภาวะส่วนใหญ่มาจากกระบวนการการผลิตต่างๆ โดยเริ่มจากขั้นตอนดังนี้ การเตรียมไม้ การผลิตเยื่อ การล้างเยื่อ การกรอง การล้างทำความสะอาด การฟอกสี และ การเข้าเครื่องผลิตกระดาษ รวมไปถึง การเคลือบแบบต่างๆ จากกระบวนการการผลิตเยื่อกระดาษเป็นกระบวนการที่สร้างน้ำเสียที่สกปรกมากที่สุด ซึ่งเป็นการผลิตเยื่อโดยใช้วิธีทางเคมี โดยการใส่สารละลายเคมี ที่อุณหภูมิและความดันสูง เพื่อให้ไม้แตกออกมาเป็นเส้นใย โดยผลผลิตที่ได้ประมาณ 40-50 % สารเคมีที่ใช้ คือ สารจำพวกแอลคาไลน์ และ กรด โดยน้ำเสียจากการผลิตเยื่อนี้จะประกอบไปด้วย เศษไม้ และสารละลายต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของไม้ ซึ่งการบำบัดจะใช้การบำบัดแบบผสมผสานระหว่างการบำบัดโดยใช้ จุลินทรีย์ที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดสีโดยการใช้เชื้อรา การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและโอโซนเนชันของสารเคมี และกำจัดสารประกอบประเภทคลอรีนให้ลดลงได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยวิธีการดูดซับโดยเทคนิคการใช้เมมเบรน (Viraraghavan el., 2004)

นอกจากนี้การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษโดยใช้วิธีการดูดซับโดยเมมเบรนแล้ว ยังพบว่าการนำสารโพลิเมอร์ประจุบวกมาสร้างตะกอนสามารถช่วยลดค่า COD ในน้ำเสียได้โดยคิดเป็นร้อยละ 87-90% (สินีนาฏ ทิพย์ดนตรี, 2543) และมีการใช้เทคโนโลยีสะอาดมาใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษเพื่อลดปัญหาน้ำเสียที่เกิดจากการกระบวนการผลิตโดยมีการนำเทคโนโลยีทางเอนไซม์และกระบวนการทางเอนไซม์มาใช้ เช่น กระบวนการเยื่อคราฟออกจากเนื้อไม้จะใช้เอนไซม์ Xylanase มาแทนการล้างด้วยน้ำเพียงครั้งเดียว พบว่าสามารถกำจัดเยื่อคราฟออกได้ง่ายและลดปริมาณการใช้น้ำและที่สำคัญลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ด้วย (ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, 2010)

จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวกับปัญหาน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษพบว่าการปรับปรุงคุณภาพของน้ำเสียมีการใช้เทคนิคที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นเทคนิคการดูดซับโดยใช้เมมเบรน การใช้เอนไซม์ในการลดสารเคมีในน้ำเสีย ซึ่งจากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาผู้วิจัยพบว่ามีงานวิจัยส่วนน้อยที่ทำการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษโดยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งทางผู้วิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญของการนำจุลินทรีย์มาตรึงในเม็ดอัจจิเนตเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพมากยิ่ง จึงได้สนใจวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยใช้การตรึงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการนำแบคทีเรียที่สามารถหาได้จากแหล่งของน้ำเสียโรงงานผลิตกระดาษเองไปตรึงในเม็ดอัลจิเนต เพื่อเพิ่มประสิทธิในการลดปริมาณของเซลลูโลสในน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษให้ลดน้อยลง

2. วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาขั้นตอนการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษโยการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

1.2.2 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการใช้แบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษ

1.2.3 เพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสโยการใช้วิธีการตรึงจุลินทรีย์ในเม็ดตรึงอัลจิเนตที่สภาวะต่างๆ

1.2.4 เพื่อศึกษาการประยุกต์การย่อยสลายในสารต่าง เพื่อนำไปต่อยอดในการบำบัดสารชนิดอื่นๆ เช่น Carbon methyl cellulose, Cellulose, Cellobiose เป็นต้น

1.2.5 เพื่อศึกษาการตรึงจุลินทรีย์เม็ดตรึงอัลจิเนตในการลดค่า พารามิเตอร์ทางน้ำเสีย

3. ขอบเขตของการทำโครงงานวิจัย

1.3.1 ใช้จุลินทรีย์ที่หาได้จากบ่อบำบัดทางชีวภาพของโรงงานผลิตกระดาษเป็นวัตถุดิบในการตรึงในเม็ดอัลจิเนต

1.3.2 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารเหลว CMC ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อนการนำมาตรึงเซลล์

1.3.3 ศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลายอัลจิเนตผสมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาสภาวะเม็ดตรึงที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยกำหนดตัวแปรต่างๆดังต่างที่ 1.1

1.3.4 วิเคราะห์ความสามารถของเม็ดตรึงอัลจิเนตในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวัดจากพารามิเตอร์ที่ลดลงที่สภาพวะต่างๆดังนี้

1.3.4.1 วัดค่า BOD โดยใช้เครื่อง DO Meter

1.3.4.2 วัดค่า COD โดยวิธีทางเคมี

1.3.4.3 วัดค่า pH ของน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว

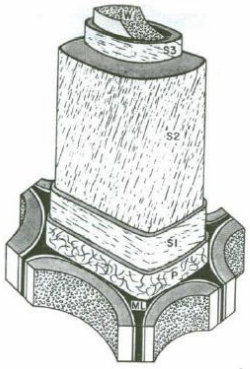
ตารางที่ 1 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม ตัวแปรควบคุมในการเลี้ยงจุลินทรีย์และการหาสภาวะของเม็ดตรึงอัลจิเนต

1.ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส	
ตัวแปรต้น	สภาวะในการเลี้ยงเชื้อได้แก่ ● เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} ● เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-3} ● เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-5} ● เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-7} ● เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-9}
ตัวแปรตาม	● การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่างๆ
ตัวแปรควบคุม	● บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เวลา 48 ชั่วโมง ● ใช้อาหารเหลว CMC ● pH 7±1
2.การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่ได้จาก ข้อ 1	
ตัวแปรต้น	● จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดจำนวน 8
ตัวแปรตาม	● ประสิทธิภาพของการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดโดยเปรียบเทียบจากค่าต่อไปนี้ - ปริมาณน้ำตาลกลูโคส - ค่า COD - ขนาดวงใสของจุลินทรีย์
ตัวแปรควบคุม	● เลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อที่ 1 ทั้งหมด 8 ชนิดในอาหาร CMC
3. การตรึงจุลินทรีย์ในเม็ดตรึงอัลจิเนต	
ตัวแปรต้น	● จุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดเลือก ● ความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนตความเข้มข้น 3 % ● ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.05 M

ตัวแปรตาม	● ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์ในเม็ดตรึงอัจจิเนต
ตัวแปรควบคุม	● เลี้ยงเชื้อโดยใช้อุณหภูมิห้อง ● ค่า pH ของน้ำที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ● ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ

4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกระดาษมาจากต้นไม้ และสิ่งที่พบในเยื่อกระดาษมากที่สุด คือ เส้นใย ซึ่งเส้นใยมีองค์ประกอบทางเคมีดังนี้



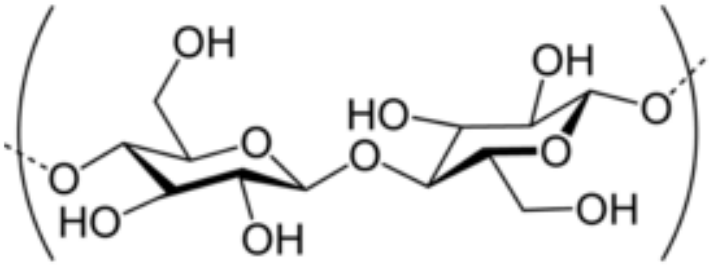
รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใย

ที่มา : Smook, 1986

เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) เชิงเส้นตรงที่ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคส (anhydroglucose unit) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-ไกลโคซิดิก ในตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 4 ของกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (β-1,4 glycosidic linkage) โดยหน่วยย่อยของเซลลูโลสที่เกิดจากการรวมกันของหน่วยกลูโคสจานวน 2 หน่วย จะเรียกว่า เซลโลไบโอส (Cellobiose unit) แสดงดังภาพที่ 3 ซึ่งส่วนปลายเซลโลไบโอสจะประกอบด้วยส่วนรีดิวซิงค์ (Reducing end group; C-1) ซึ่งเป็นส่วนที่ง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยา และส่วนของนอนรีดิวซิงค์ (Non-Reducing end group; C-4) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาโดยทั่วไประดับการเกิดพอลิเมอไรเซชั่น (degree of polymerization; DP) ของเซลลูโลสจะ

เกิดจากการรวมกันของหน่วยกลูโคสจำนวนประมาณ 1000-3000 หรือ 4000 หน่วย จึงมีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ (C6H10O5)n ซึ่งลักษณะการจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลเซลลูโลสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ 1) แบบผลึก (crystalline) 2) แบบอสัญรูป (amorphous) โดยทั่วไปโครงสร้างของเซลลูโลสจะมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ จึงทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกสูง อุณหภูมิในการหลอมตัวจึงสูงมาก มักจะเกิดการสลายตัวก่อนถึงอุณหภูมิหลอมตัว โครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลสจะทำให้การซึมผ่านของสารละลายเกิดได้ยากกว่าลักษณะโครงสร้างแบบอสัญรูป จึงทำให้ลักษณะโครงสร้างแบบอสัญรูปมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ง่ายขึ้น เซลลูโลสในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่างกัน ซึ่งการกระจายน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูโลสจะมีความสำคัญต่อสมบัติทางกายภาพ โดยเซลลูโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีสมบัติทางกายภาพที่ไม่ดี (Gardner and Blackwell, 1974)



รูปที่ 3 โครงสร้างเซลโลไบโอส (cellobiose)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Helmenstine (2013)

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเนื้อไม้ซึ่งมีปริมาณมากที่สุด คือ ประมาณร้อยละ 40 ของเนื้อไม้ทั้งในไม้ใบแคบหรือไม้ตระกูลสน (softwood) และไม้ใบกว้าง (hardwood) โดยทั่วไปจะพบเซลลูโลสอยู่ร่วมกับลิกนิน เพนโตแซน กัม แทนนิน ไขมันและสารที่ทาให้เกิดสีในต้นไม้ โดยเซลลูโลสจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเส้นใยและให้ความแข็งแรงกับต้นไม้ เซลลูโลสสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทตามขนาดของโมเลกุลหรือระดับการเกิดพอลิเมอไรเซชั่น คือ

1. แอลฟา เซลลูโลส (Alpha cellulose; DP > 90)

2. เบต้า เซลลูโลส (Beta cellulose; DP = 15-90)

3. แกมม่า เซลลูโลส (Gamma cellulose; DP < 15)

คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของเซลลูโลส คือ เซลลูโลสจะไม่ละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์สะเทิน (neutral organic solvent) เช่น เบนซีน (benzene) แอลกอฮอล์ (alcohol) และอีเธอร์ (Ether) แต่จะละลายได้ดีในกรดเกลือและกรดกำมะถันเข้มข้น ซึ่งความคงทนของเซลลูโลสต่อกรดหรือเอนไซม์จะขึ้นกับ

โครงสร้างแบบอสัญรูป เมื่อนาเซลลูโลสไปทาปฏิกิริยาทางเคมีจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้คุณสมบัติของเซลลูโลสเปลี่ยนไป จึงสามารถนำเซลลูโลสไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตพลาสติก น้ำตาล เจล ฟิล์ม เส้นใยชนิดใหม่ และสารเคลือบ เป็นต้น (Kadla and Gilbert, 2000)

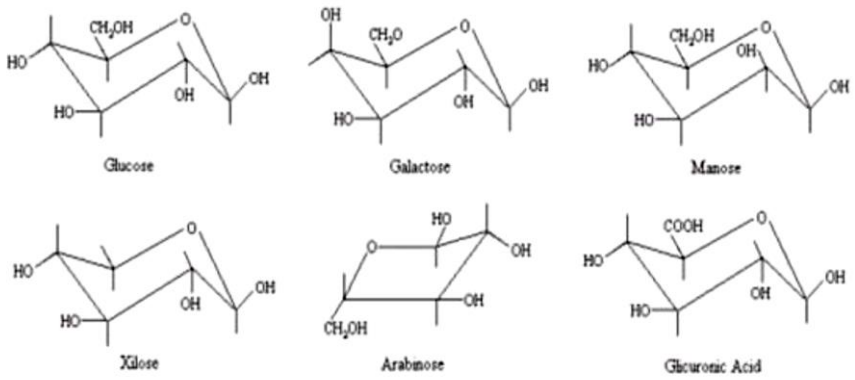
ตารางที่ 2 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	ร้อยละของเซลลูโลส	ร้อยละของเฮมิเซลลูโลส	ร้อยละของลิกนิน
ไม้เนื้อแข็ง	40-55	24-40	18-25
ไม้เนื้ออ่อน	45-50	25-35	25-35
เปลือกถั่ว	25-30	25-30	30-40
ซังข้าวโพด	45	35	15
หญ้า	25-40	35-50	10-30
ฟางข้าว	30	50	15
ใบไม้	15-20	80-85	0
ใยเมล็ดฝ้าย	80-95	5-20	0
หญ้าคอสทอล เบอมิวดา	25	35.7	6.4
หญ้าสวิช	45	31.4	12

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Reshamwala et al.,1995; Cheung and Anderson, 1997; Boopathy, 1998; Dewes and Hunsche, 1998.

เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่า มีลักษณะคล้ายเซลลูโลลแต่จะประกอบ ด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่แตกต่างกัน 5 ประเภท คือ กลูโคส (glucose) กาแลกโตส (galactose) แมนโนส (mannose) อะราบิโนส (arabinose) ไซโลส (xylose) รวมทั้งกรดกลูคูโลนิก (gluculonic acid) และกรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acid) (แสดงดังรูปที่ 4) เฮมิเซลลูโลสมีสูตรทางเคมี คือ $(C_6H_{12}O_5)_{2n}$



รูปที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา : บูรณาพากรุ๊ป จากัด (2552)

โดยปกติจะพบเฮมิเซลลูโลสอยู่รวมปะปนกับเซลลูโลส และสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน เฮมิเซลลูโลสที่พบในไม้ใบกว้าง (Hardwood) ได้แก่ ไซเลน (Xylan) และเฮมิเซลลูโลสที่พบในไม้ใบแคบ (Softwood) ได้แก่ กลูโคแมนแนน (Glucomannan) โดยเฮมิเซลลูโลสจะทาหน้าที่เป็นสารยึดเซลลูโลสไว้ด้วยกันและทำหน้าที่เสริมความแข็งแรงให้กับเส้นใย เฮมิเซลลูโลสสามารถละลายในตัวทำละลายและทำปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าเซลลูโลส ดังนั้นเฮมิเซลลูโลสจะเสื่อมสภาพได้ง่ายและสลายตัวได้ดีกว่าเซลลูโลส ทำให้ปริมาณของเฮมิเซลลูโลสในเนื้อไม้มีมากกว่าในเยื่อกระดาษที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยสารเคมีแล้ว ในระหว่างที่เนื้อไม้ถูกย่อยไปเป็นเยื่อกระดาษนั้น ปริมาณและตำแหน่งของเฮมิเซลลูโลสจะมีการเปลี่ยนแปลงไป

เฮมิเซลลูโลสจะมีบทบาทอย่างมากในการส่งเสริมให้กระดาษมีความแข็งแรงเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นสารไฮโดรฟิลิก (Hydrophillic materials) ซึ่งช่วยให้เส้นใยที่แขวนลอยในน้ำเยื่อมีการพองตัวและอุ้มน้ำได้ดี เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างเป็นอสัญรูปคือ อยู่ร่วมกันอย่างหลวมๆ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อนำเส้นใยไปผ่านกระบวนการตีบดเยื่อเพื่อทำให้ผิวของเส้นใยแตกออกเป็นไมโครไฟบริล เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทาให้ไมโค-ไฟบริลระหว่างเส้นใยเกิดการประสานกันด้วย พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ทำให้กระดาษมีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น (Sjöström, 1993)

ปัญหาน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษในประเทศไทย

ปัญหาจากการร้องเรียนกิจการการผลิตกระดาษ ได้แก่ ปัญหาน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตที่เกิดกลิ่นเหม็น และเมื่อปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ ทำให้เกิดสภาพน้ำเสียในแหล่งน้ำ มีผลกระทบต่อชุมชนที่อาศัยอยู่ใกล้เคียงและต่อระบบนิเวศของแหล่งน้ำ ดังเช่นกรณีต่อไปนี้

1. ในช่วงปี 2530 และหลังจากนั้น มีเกิดปัญหาสำคัญจากโรงงานผลิตกระดาษของ บริษัท ฟินิคซ์ พัลพ แอนด์เพเพอร์จำกัด ที่จังหวัดขอนแก่น ซึ่งปล่อยน้ำเสียที่มีกลิ่นเหม็นลงลำน้ำพอง เกิดผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก แต่หลังจากที่มีการปรับปรุงระบบการผลิตและการกำจัดน้ำเสียและมลพิษ ต่างๆ จากโรงงานแล้ว ปัญหาสามารถบรรเทาลงจนอยู่ในระดับที่ควบคุมได้

2. กลิ่นเหม็นของโรงงานผลิตกระดาษสีน้ำตาล มีสาเหตุของเรื่องร้องเรียน กลิ่นเหม็นที่เกิดขึ้นมาจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Stabilization Pond

3. การปล่อยน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษให้ไหลลงสู่คลองชลองแวง มีสีดำเข้มและกลิ่นฉุน ทำให้ผู้สูดดมถึงกับวิงเวียนศีรษะ บางรายทนกลิ่นเหม็นไม่ได้ ต้องอพยพออกจากพื้นที่

มาตรฐานการปล่อยน้ำลงสู่แหล่งธรรมชาติ

ตารางที่ 3 มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม

ดัชนีคุณภาพน้ำ	ค่ามาตรฐาน	วิธีวิเคราะห์
1. ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH value)	5.5-9.0	pH Meter
2. ค่าทีดีเอส (TDS หรือ Total Dissolved Solids)	● ไม่เกิน 3,000 มก/ล. หรืออาจแตกต่างแล้วแต่ละประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงานอุตสาหกรรม ที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 5,000 มก./ล. ● น้ำทิ้งที่จะระบายลงแหล่งน้ำกร่อยที่มีค่าความเค็ม (Salinity) เกิน 2,000 มก./ล. หรือลงสู่ทะเลค่าทีดีเอสในน้ำทิ้งจะมีค่ามากกว่าค่าทีดีเอส ที่มีอยู่ในแหล่งน้ำกร่อยหรือน้ำทะเลได้ไม่เกิน 5,000 มก.ล.	ระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 103-105oC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. สารแขวนลอย (Suspended Solids)	ไม่เกิน 50 มก./ล. หรืออาจแตกต่างแล้วแต่ประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงานอุตสาหกรรม หรือประเภทของระบบบำบัดน้ำเสียตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 150 มก./ล.	กรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว (Glass Fiber Filter Disc)
4. อุณหภูมิ (Temperature)	ไม่เกิน 40°C	เครื่องวัดอุณหภูมิ วัดขณะทำการเก็บตัวอย่างน้ำ
5. สีหรือกลิ่น	ไม่เป็นที่พึงรังเกียจ	ไม่ได้กำหนด
6. ซัลไฟด์ (Sulfide as H2S)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	Titrate
7. ไซยาไนด์ (Cyanide as HCN)	ไม่เกิน 0.2 มก./ล.	กลั่นและตามด้วยวิธี Pyridine Barbituric Acid
8. น้ำมันและไขมัน (Fat, Oil and Grease)	ไม่เกิน 5.0 มก./ล. หรืออาจแตกต่างแล้วแต่ละประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือ ประเภทของโรงงานอุตสาหกรรมตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 15 มก./ล.	สกัดด้วยตัวทำละลายแล้วแยกหาน้ำหนักของน้ำมันและไขมัน
9. ฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	Spectrophotometry
10. สารประกอบฟีนอล (Phenols)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	กลั่นและตามด้วยวิธี 4-Aminoantipyrine
11. คลอรีนอิสระ (Free Chlorine)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	lodometric Method
12. สารที่ใช้ป้องกันหรือกำจัดศัตรูพืชหรือสัตว์ (Pesticide)	ต้องตรวจไม่พบตามวิธีตรวจสอบที่กำหนด	Gas-Chromatography
13. ค่าบีโอดี (5 วันที่อุณหภูมิ 20 °C (Biochemical Oxygen Demand : BOD)	ไม่เกิน 20 มก./ล. หรือแตกต่างแล้วแต่ละประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงานอุตสาหกรรมตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควร แต่ไม่เกิน 60 มก./ล.	Azide Modification ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 5 วัน

14. ค่าทีเคเอ็น (TKN) หรือ Total Kjeldahl Nitrogen)	ไม่เกิน 100 มก./ล. หรืออาจแตกต่างแล้วแต่ละประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงานอุตสาหกรรม ตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควร แต่ไม่เกิน 200 มก./ล.	Kjeldahl
15. ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand : COD)	ไม่เกิน 120 มก./ล.หรืออาจแตกต่างแล้วแต่ละประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงานอุตสาหกรรม ตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควร แต่ไม่เกิน 400 มก./ล.	Potassium Dichromate Digestion
16. โลหะหนัก (Heavy Metal)		
1. สังกะสี (Zn)	ไม่เกิน 5.0 มก./ล.	Atomic Absorption Spectro Photometry ชนิด Direct Aspiration หรือวิธี Plasma Emission Spectroscopy ชนิด Inductively Coupled Plama : ICP
2. โครเมียมชนิดเฮ็กซาวาเล้นท์ (Hexavalent Chromium)	ไม่เกิน 0.25 มก./ล.	
3. โครเมียมชนิดไตรวาเล้นท์ (Trivalent Chromium)	ไม่เกิน 0.75 มก./ล.	
4. ทองแดง (Cu)	ไม่เกิน 2.0 มก./ล.	
5. แคดเมียม (Cd)	ไม่เกิน 0.03 มก./ล	
6. แบเรียม (Ba)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล	
7. ตะกั่ว (Pb)	ไม่เกิน 0.2 มก./ล.	
8. นิคเกิล (Ni)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	
9. แมงกานีส (Mn)	ไม่เกิน 5.0 มก./ล.	
10. อาร์เซนิค (As)	ไม่เกิน 0.25 มก./ล.	Atomic Absorption Spectrophotometry ชนิด Hydride Generation หรือวิธี Plasma Emission Spectroscopy ชนิด Inductively
11. เซเลเนียม (Se)	ไม่เกิน 0.02 มก./ล.	

		Coupled Plasma : ICP
12. ปรอท (Hg)	ไม่เกิน 0.005 มก./ล.	Atomic Absorption Cold Vapour Techique

แหล่งที่มา : ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม ลงวันที่ 3 มกราคม 2539 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 13ง ลงวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2539

แนวทางการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษแบบต่างๆ

1. การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษวิธีการดูดซับโดยเมมเบรน

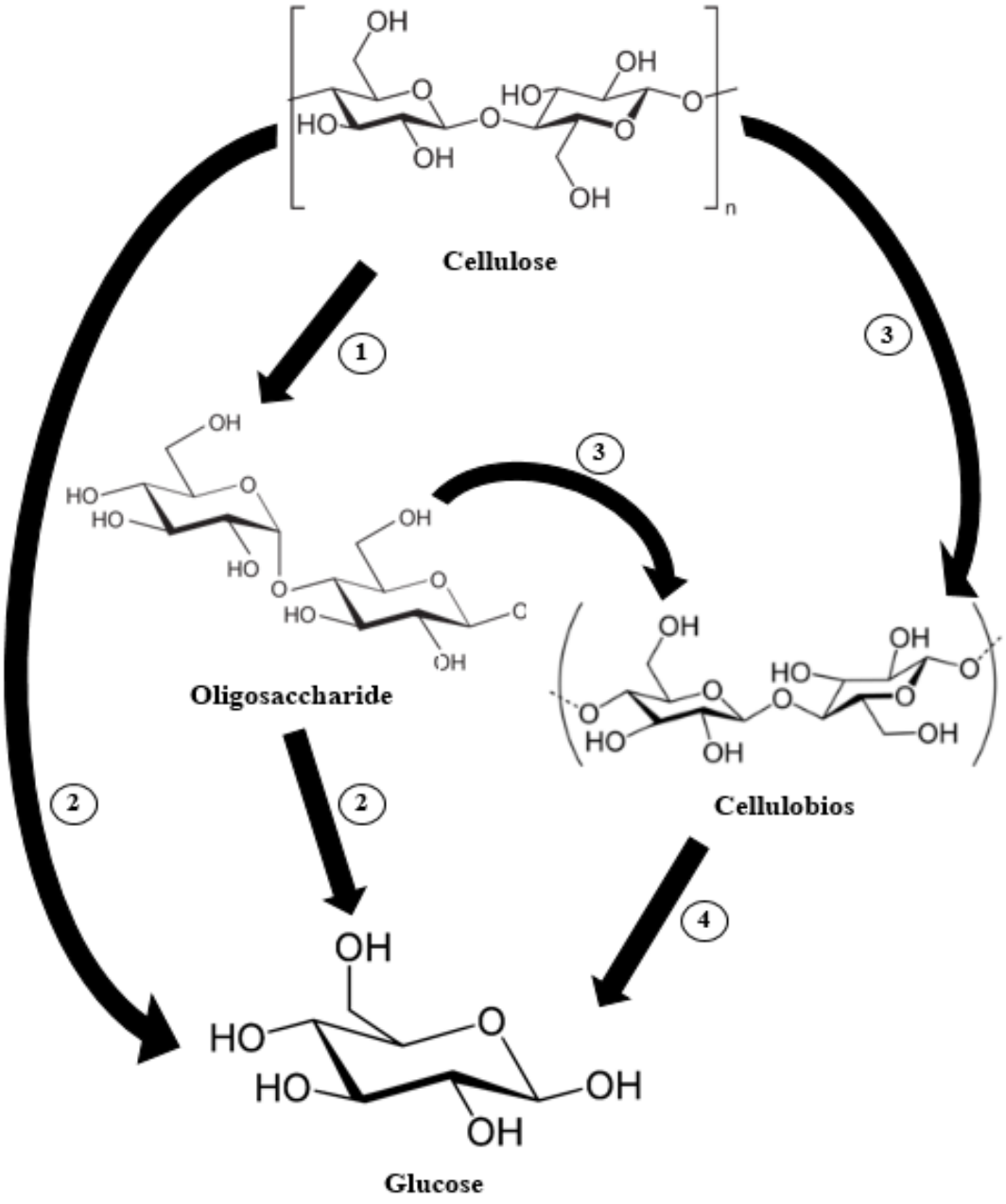
เป็นการกำจัดสีโดยการใช้เชื้อรา การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและโอโซนเนชัน ของสารเคมีและกำจัดสารประกอบประเภทคลอรีนให้ลดลงได้อย่างมีประสิทธิภาพโดย วิธีการดูดซับโดยเทคนิคการใช้เมมเบรน (Viraraghavan el., 2004)

2 .การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษโดยวิธีใช้สารโพลิเมอร์ประจุบวก

ในการบำบัดน้ำเสียโดยใช้สารโพลิเมอร์ประจุบวกในการมาช่วยสร้างตะกอน ซึ่งสามารถลดค่า COD ในน้ำเสียได้ โดยลดได้ถึงร้อยละ 87-90 (สินีนาฏ ทิพย์ดนตรี, 2543)

การบำบัดเซลลูโลสในน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษ

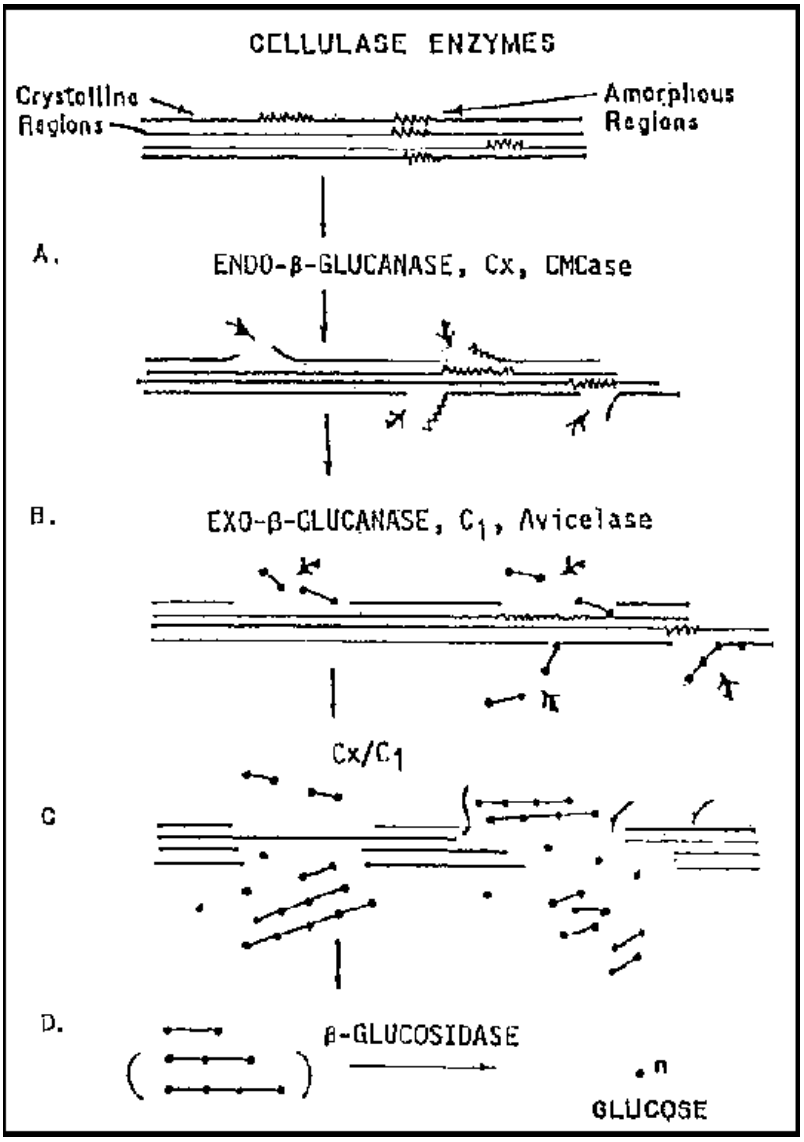
เนื่องจากเซลลูโลสจัดได้ว่าเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง เมื่อจุลินทรีย์มาย่อยสลาย จะได้แนวทางดังนี้



รูปที่ 5 Cellulose degradation pathway

(1) endoβ1,4 glucanase; (2) Exoβ1,4 glucanase (β1,4 glucanase glucohydrolase); (3) exoβ1,4 glucanase (β1,4 glucan cellobiohydrolase); (4) glucosidase (Cellobiase)

ที่มา : (ดัดแปลงจาก) T.K. Ghose and P. Ghosh, 1978



รูปที่ 6 กลไกการทำงานของเอนไซม์ เซลลูเลส

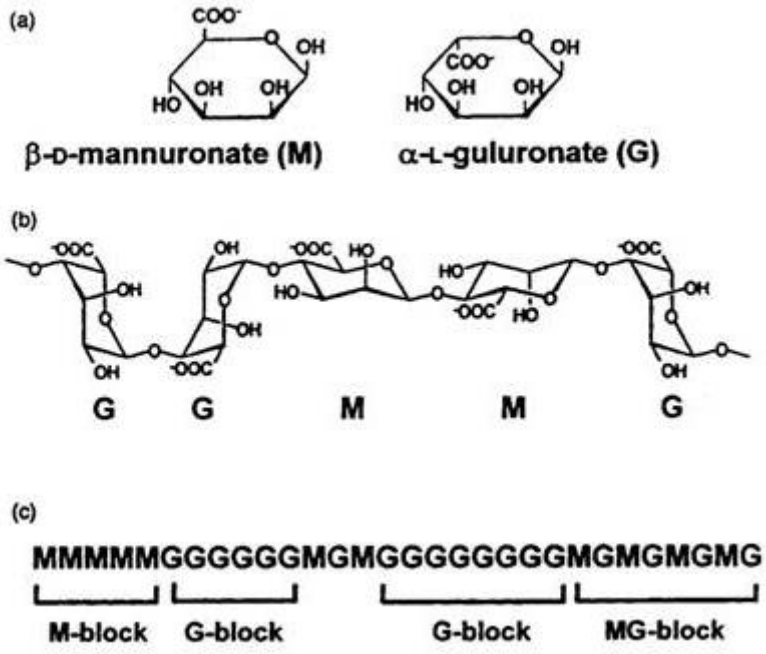
ที่มา: Reese et al.,1950

จากรูป 6 เป็นการแสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ เซลลูเลสโดยจากภาพที่จุด A เอนไซม์ endo-β-glucanase เข้ามาตัดสายพันธะที่ตำแหน่ง 1,4 ภายในสายของเซลลูโลส ที่จุด B เอนไซม์ Exo-β-glucanase เข้ามาตัดสายพันธะที่ตำแหน่ง 1,4 จากปลายสุดของสายพันธะเข้ามาเรื่อยๆ โดยทำงานร่วมกันกับเอนไซม์ endo-β-glucanase แสดงดังจุด C และเมื่อย่อยสลายพันธะจนเหลือ Cellulobiose ดังจุด D เอนไซม์ β-glucosidase (Cellobiase) จะย่อยสลายพันธะจนเหลือเพียงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือน้ำตาลกลูโคส

การบำบัดน้ำเสียโดยตรึงเซลล์แบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนต

อัลจิเนต (Alginate)

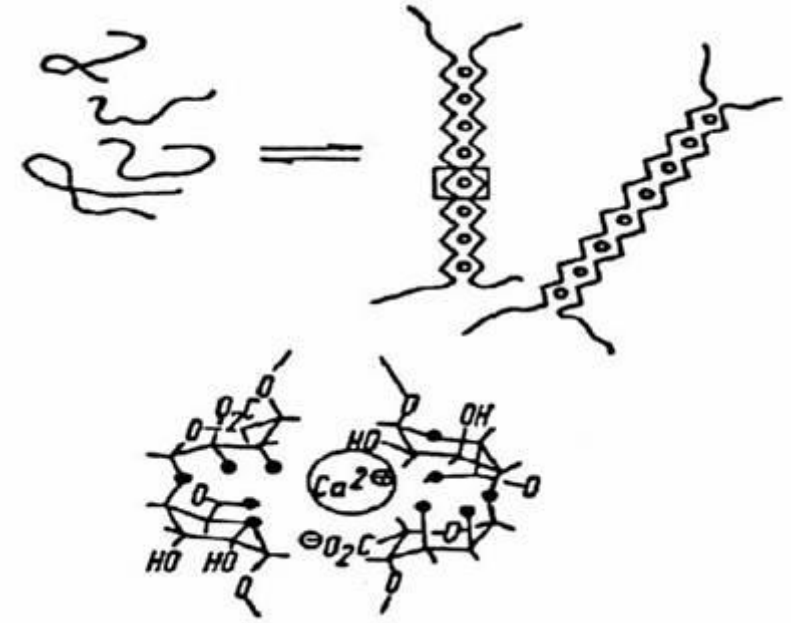
อัลจิเนตหรืออัลจินเป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyceae) ในการผลิตอัลจิเนตเป็นอุตสาหกรรมสาหร่ายทะเลที่ใช้ ได้แก่ Macrocystis pyrifera มีอัลจิเนตประมาณ 14-19 %, Laminaria cloustoni และ Laminaria digitata มีอัลจินประมาณ 15-40 % ปริมาณที่พบจะขึ้นกับชนิดของสาหร่าย ฤดูกาล และแหล่งที่สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายเหล่านี้พบได้ทั่ว ๆไปในโลก ประเทศที่ผลิตอัลจิเนตมาก คือ อเมริกา อังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน นอร์เวย์ แคนนาดา และญี่ปุ่น



รูปที่ 7 โครงสร้างของอัลจิเนต (Alginate) ชนิดต่างๆ
ที่มา : Phillips and Williams, 2000

อัลจิเนตเป็น unbranched binary copolymer ของ 1,4-b-D-manuronic acid (M) และ L-guluronic acid (G) ในโมเลกุลประกอบด้วย homopolymeric regions ของ G และ M ที่เรียกว่า G- และ M-blocks ตามลำดับและยังมีบางส่วนของโมเลกุลเป็น MG-blocks ดังรูปที่ 7 สัดส่วนของ copolymer และโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดสมบัติของอัลจิเนต เช่น ถ้าโพลีเมอร์มี G ในปริมาณที่สูงจะมี สมบัติเป็นเจลที่แข็งที่ความเข้มข้นของโลหะประจุบวกเฉพาะ (polyvalent metal cation) แต่ถ้า โพลิเมอร์มี M ปริมาณสูงจะมีแนวโน้มที่จะเกิดเจลที่อ่อนนุ่ม และมีสภาวะในการเกิดเจล ที่กว้างกว่า อัลจิเนตที่ผลิตจำหน่ายเป็นการค้ามีหลายอนุพันธ์จึงมีสมบัติการละลายในน้ำที่แตกต่างกัน เช่น อนุพันธ์ ของเกลือ Ca2+, K+, Na+, NH4+ และยังผลิตในรูปของ propylene glycol alginate ซึ่งได้จากปฏิกิริยาของ alginic acid กับ propylene oxide

ภายใต้ความดัน อนุพันธ์เหล่านี้จะละลายได้ทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ความหนืดของสารละลายอัลจิเนตที่ได้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความเข้มข้น น้ำหนักโมเลกุล และการมีโลหะประจุบวก



รูปที่ 8 กลไกการเกิดเจลของ calcium alginate (Egg-box model)

ที่มา : Isabelle Braccini and Serge Pérez,2001

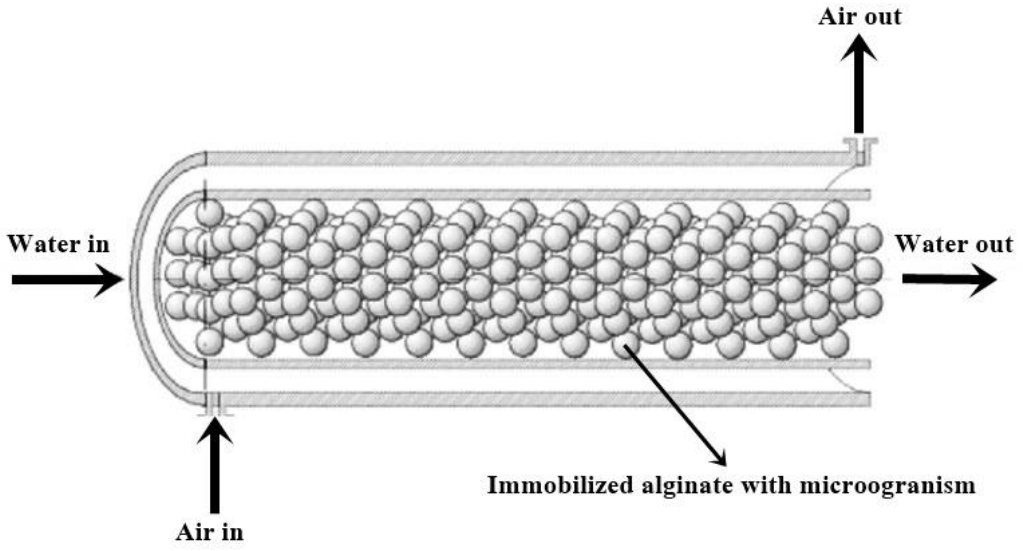
อัลจิเนตไม่ทุกชนิดมีคุณสมบัติเป็นเจลและจะเกิดเจลได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ Ca2+โครงสร้าง ของเจลมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ (egg box) โดยมี Ca2+ เกาะอยู่กับสายโพลิเมอร์ดังรูปที่ 8 คุณสมบัติที่ดีของอัลจิเนต คือ ทำให้เกิด Irreversible gel ในน้ำเย็นเมื่อมี Ca2+รวมอยู่ด้วย ซึ่งคุณสมบัติในการเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำนี้ทำให้อัลจิเนตแตกต่างจากไฮโดรคอลลอยด์ที่ได้จากสาหร่ายสีแดง

ตารางที่ 4 แสดงจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส

	Microorganism		
Fungi	*Acremonium cellulolyticus*	Bacteria	*Clostridium thermocellum*
	Aspergillus acculeatus		*Ruminococcus albus*
	Aspergillus fumigatus		*Streptomyces sp.*
	Aspergillus niger		
	Fusarium solani		
	Irpex lacteus		
	Penicillium funmiculosum		
	Phanerochaete	Actinomycetes	*Streptomyces sp.*
	chrysosporium		*Thermoactinomyces sp.*
	Schizophyllum commune		*Thermomonospora curvata*
	Sclerotium rolfsii		
	Sporotrichum cellulophilum		
	Talaromyces emersonii		
	Thielavia terrestris		
	Trichoderma koningii		
	Trichoderma reesei		
	Trichoderma viride		

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแพคเบด (Pack bed bioreactor)

การบำบัดน้ำเสียในการทดลองนั้นได้นำถังปฏิกรณ์ชีวภาพแพคเบดมาใช้ในการบำบัดโดยการนำเม็ดตรึงอัลจิเนตที่ตรึงด้วยจุลินทรีย์แล้วนั้นมาอัดให้อยู่คอลัมน์แล้วให้น้ำเสียไหลผ่านโดยมีการเติมอากาศให้กับจุลินทรีย์



รูปที่ 9 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแพคเบด (Pack bed Bioreactor)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Eduardo et al, 2011

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถพัฒนาการบำบัดน้ำเสียโดยใช้วิธีการตรึงจุลินทรีย์ในเม็ดตรึงอัลจิเนต เพื่อนำไปปรับใช้ในการบบำบัดน้ำเสียจากแหล่งอื่นๆได้

1.5.2 สามารถเพื่อประสิทธิภาพในการลดค่าพารามิเตอร์ทางน้ำเสีย จากการใช้ประโยชน์จากเม็ดตรึงอัลจิเนต

1.5.3 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดอื่นได้

6. วิธีการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง

1. ตู้อบเพาะเชื้อ
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (Auto Clave)
3. ตู้เขี่ยเชื้อ
4. เครื่องเขย่าสาร
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
6. ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
7. ปิเปตและปิเปตขนาดจุลภาค (Micro pipette)
8. หลอดเก็บสารขนาดเล็ก Micro tube
9. เทอร์โมมิเตอร์
10. ท่อยาง
11. บีกเกอร์
12. ขวดปรับปริมาตร
13. แท่งแก้วคนสาร
14. ช้อนตักสาร
15. ตะเกียงแอลกอฮอล์
16. เพลตเลี้ยงเชื้อ
17. Loop เขี่ยเชื้อ
18. แท่งแก้วสามเหลี่ยม
19. เข็มฉีดยา
20. กระดาษกรองแมนเบรน
21. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
22. เครื่อง Water bath
23. เครื่องปั่นเหวี่ยง
24. ขวดพลาสติก
25. เครื่องเขย่า
26. เตาอบอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส

27. เครื่องวัดค่า pH (pH meter)

28. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

สารเคมี

1. DI Water

2. Alcohol

3. Carbon Methyl Cellulose

4. Congo red

5. Calcium chloride

6. Cellulose

7. Sodium nitrate

8. Dipotassium phosphate

9. Potassium chloride

10. Magnesium sulphate

11. Furrous sulphate

12. Yeast extract

13. Agar

14. Gelatin

15. Dinitrosalicylic acid (DNS)

16. Sodium potassium tartrate

17. Sodium hydroxide

18. Sodium citrate buffer

19. Alginic acid

20. Sodium alginate

21. Digestion reagent

22. Sulfuric acid reagent

23. Ferrous ammonium sulfate (FAS)

24. Ferroin อินดิเคเตอร์

25. Chloroform

26. Acetic acid

ขั้นตอนการทดลอง

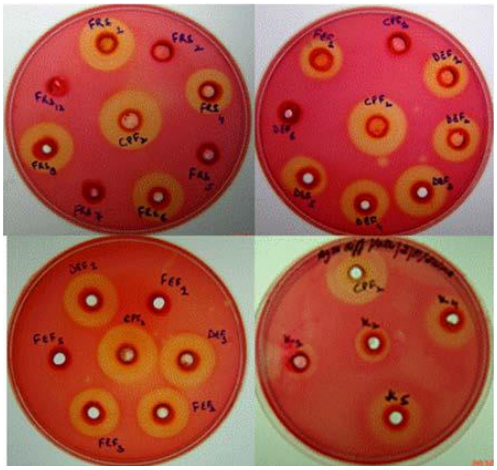
คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากบ่อบำบัดน้ำเสีย และ/หรือ แหล่งที่มีเซลลูโลสในธรรมชาติ

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง โดยเชื้อที่นำมาเพาะได้จากน้ำในบ่อบำบัดทางชีวภาพจากโรงงานผลิตกระดาษ บริษัท เบอร์ลี่ ยุคเกอร์ เซลล็อกซ์ จำกัด จังหวัดสมุทรปราการ เนื่องจากเชื้อที่นำมาเลี้ยงมีในน้ำเสียจำนวนมาก จึงทำการเจือจางตัวอย่างด้วยวิธี serial dilution ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-9} ซึ่งการเจือจางเชื้อเป็นการหาเชื้อที่แน่นอนเพียงโคโลนีเดียว เมื่อเจือจางเสร็จก็จะนำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง CMC ซึ่งอาหาร CMC เป็นอาหารที่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสจะเจริญเติบโตได้ดี และวิธีการเลี้ยงจะใช้วิธี **spread plate** เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

รูปที่ 10 ลักษณะของบ่อบำบัดทางชีวภาพ

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์โดยตรวจสอบการย่อยสลาย CMC โดยราดสารละลาย Congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนผิวหน้าอาหารที่มีโคโลนีของเชื้อเจริญอยู่ ทิ้งไว้นาน 30 นาที เทสารละลาย Congo red ที่อยู่บนผิวอาหารทิ้งแล้วล้างออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 2-3 ครั้ง จากนั้นตรวจสอบผลโดยวัดขนาดวงใส (clear zone) (สีส้มอ่อน) ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี และคำนวณค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลาย CMC

$$\text{ประสิทธิภาพในการย่อย CMC} = \frac{\text{ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)}}{\text{ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)}}$$



รูปที่ 11 ตัวอย่างการคัดเลือกจุลินทรีย์โดยใช้สี Congo red

ที่มา: Sarojini Johri, 2013

ซึ่งจากการทดสอบด้วยสี Congo red จะทำให้ทราบถึงความสามารถของการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์แต่ละตัว โดยเราจะเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามรถในการย่อยสลายเซลลูโลสที่ดีที่สุดมาประมาณ 5-6 โคโลนี เพื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวในขั้นตอนต่อไป

<u>คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลโลสในอาหารเหลว</u>

เลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสในหลอดทดลอง ขนาดเล็กประมาณ 5 x 50 mm. ภายในบรรจุอาหารเหลว NB (Nutrient Broth) เมื่อบรรจุอาหารเรียบร้อยแล้วปิดฝาให้สนิท เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ ซึ่งในการเลี้ยงจุลินทรีย์ในขั้นตอนนี้จะใช้เพื่อเป็นหัวเชื้อ โดยจะนำเข้าเครื่องเขย่าขนาดเล็ก เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธี DNS

นำจุลินทรีย์ที่คัดได้ในการทดลองขั้นต้นมาทดสอบโดยจะนำจุลินทรีย์จากข้อที่ 3.4.1.2 มาเลี้ยงในหลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร โดยใส่อาหารเหลว CMC 4 มิลลิลิตรและจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

การวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะใช้สาร Dinitrosalicylic acid (DNS) (Chaplin,1986)

ตอนที่ 1 กราฟมาตรฐาน

1. ดูดสารละลายมาตรฐานกลูโคสใส่หลอดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคสในระดับต่างๆตั้งแต่ 0-1000 ไมโครลิตร

2. เติมสาร DNS 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดกลูโคสมาตรฐานทุกหลอด และต้มในน้ำเดือด 10 นาที จะเกิดสีน้ำตาลตามระดับปริมาณกลูโคสในแต่ละหลอด จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 570 นาโมเมตร และนำค่าได้มาพลอต กราฟเป็นกราฟมาตรฐานโดยให้แกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร และ แกน X เป็นปริมาณกลูโคส

ตอนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในจุลินทรีย์

1. ใช้ DNS 3 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเหลว CMC จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และ 2% CMC ใน Sodium citrate เข้มข้น 0.05 M จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เป็น Blank

1.1 นำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว CMC มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นเอนไซม์ที่เรียกว่า “Supernatant”ด้านบนมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

1.2 นำ Supernatant ไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใส่ Supernatant ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และใส่ 2% CMC ใน Sodium citrate buffer เข้มข้น 0.05 M จำนวน 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง Water bath ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง

1.3 นำเชื้อจากข้อ 1.2 จำนวน 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย DNS จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในคิวเวทท์เพื่อนำไปวัดปริมาณกลูโคสด้วยเครื่อง Spectrophotometer

1.4 นำค่าที่ได้จากการวัดไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งจะทำให้ทราบปริมาณ ก ลู โ ค ส ที่แท้จริง

1. ใช้ DNS 3 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเหลว CMC จำนวน 0.5 และ Sodium citrate เข้มข้น 0.05 M จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เป็น Blank

1.1 นำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว CMC มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นเอนไซม์ที่เรียกว่า “Supernatant”ด้านบนมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

1.2 นำ Supernatant ไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใส่ Supernatant ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และใส่ Sodium citrate เข้มข้น 0.05 M จำนวน 0.5 มิลลิลิตร แต่ในขั้นตอนนี้จะใส่กระดาษ Whatman No.1 ขนาด 1.0×6.0 เซนติเมตร จำนวน 50 มิลลิกรัมและจากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง Water bath ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง

1.3 นำเชื้อจากข้อ 1.2 จำนวน 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย DNS จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในคิวเวทท์เพื่อนำไปวัดปริมาณกลูโคสด้วยเครื่อง Spectrophotometer

1.4 นำค่าที่ได้จากการวัดไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งจะทำให้ทราบปริมาณ กลูโคส ที่แท้จริง

<u>หมายเหตุ</u> ขั้นตอนนี้จะได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสมากที่สุด

<u>การศึกษาอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้วิธี Thin-layer chromatography (TLC)</u>

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.2 มาทำการวิเคราะห์หาอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสโดยขั้นตอนการวิเคราะห์มีดังนี้ (Karima Srih Belghitha, 2011)

1. นำจุลินทรีย์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9100 G เวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นเอนไซม์มาวิเคราะห์
2. หาความเข้มข้นของกลูโคสเพื่อใช้เป็นตัว Standard โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสเพื่อให้ได้ Standard ที่เหมาะสม
3. นำเอนไซม์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาหยดจุดละ 10 ไมโครลิตรและเป่าให้แห้ง ทำเช่นนี้ให้ครบ 24 ชั่วโมง และนำไปแช่ในสารละลายสำหรับวิเคราะห์ TLC โดยแช่จนกว่าสารละลายจะเคลื่อนที่ไปสุดแผ่นที่ใช้วิเคราะห์
4. เมื่อแช่สารละลายเสร็จให้ใช้สารเคลือบสำหรับวิเคราะห์ TLC พ่นลงบนแผ่นวิเคราะห์ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
5. ทำการเปรียบเทียบตัวอย่างกับ Standard จะทำให้ทราบอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในเม็ดอัลจิเนต

<u>การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในเม็ดอัลจิเนต</u>

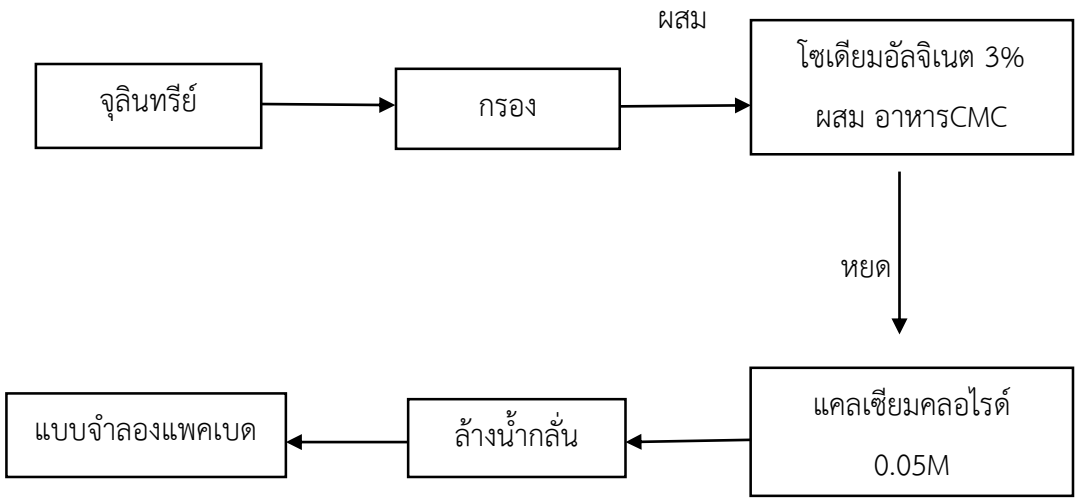
1. นำจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดเลือกโดยดูจากการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยวิธี DNS และการวิเคราะห์อัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธี TLC ที่ดีที่สุดมาทำการกรองด้วย กระดาษกรอง Whatman Sterile Membrane Filters ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร สำหรับกรองเชื้อโดยใช้วิธีการกรองด้วยปั๊มสุญญากาศ

2. เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตจำนวน 9 กรัม ผสมกับอาหารเหลว CMC จำนวน 300 มิลลิลิตร ต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่กรอง 250 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน (สารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 3%/W) (Nam Sun Wang, 1987)

3. ในการตรึงเม็ดอัลจิเนตจะต้องเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการตรึงเม็ดโดยใช้เข็มฉีดยาในการขึ้นรูปเม็ดอัลจิเนต ซึ่งขนาดของเม็ดที่ขึ้นรูปจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4มิลลิเมตร

4. จากนั้นเมื่อทำการตรึงเม็ดอัลจิเนตเสร็จแล้วก็แช่ไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดตรึงแข็งแรง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนจะนำไปใส่ในแบบจำลองแพคเบค

5. ทำการตรึงเม็ดอัลจิเนตโดยไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ผสม ทำเช่นเดียวกับการตรึงเม็ดอัลจิเนตที่มีเชื้อจุลินทรีย์ผสม เพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบค่า COD



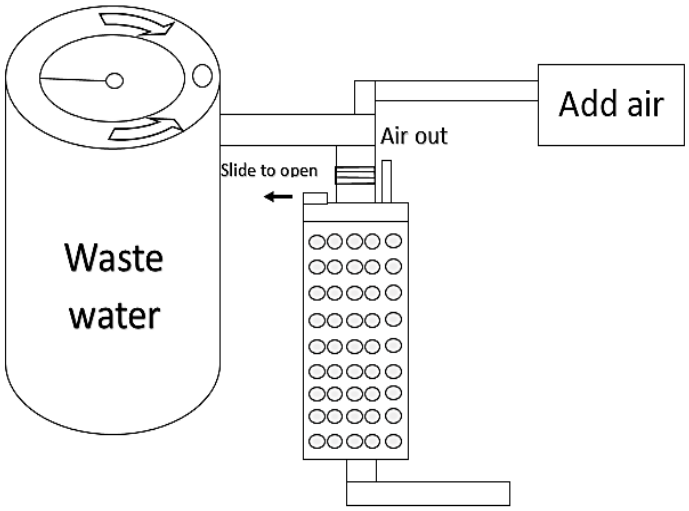
รูปที่ 12 ขั้นตอนการตรึงจุลินทรีย์ในเม็ดอัลจิเนต

ศึกษาการเลี้ยงเม็ดตรึงอัลจิเนตแบบแพคเบด

1. นำจุลินทรีย์ที่ผ่านการตรึง ไปใส่ในคอลัมน์แบบแพคเบดขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 7.0 เซนติเมตร และสูงเท่ากับ 30.0 เซนติเมตร โดยมีการไหลผ่านของน้ำเสียแบบต่อเนื่อง

2. ระหว่างการเลี้ยงเชื้อต้องมีการเติมอากาศเป็นระยะๆทางด้านบนและในขณะเดียวกันแก๊สที่เกิดขึ้นภายในคอลัมน์จะถูกระบายออกทางด้านบนเช่นกัน

3. การเลี้ยงเม็ดตรึงแบบไม่มีจุลินทรีย์ก็ทำเช่นเดียวกันกับการเลี้ยงเม็ดตรึงแบบมีจุลินทรีย์



รูปที่ 13 แบบจำลองระบบการบำบัดแบบแพดเบดคอลัมน์

การศึกษาการวัดค่า Kinetic

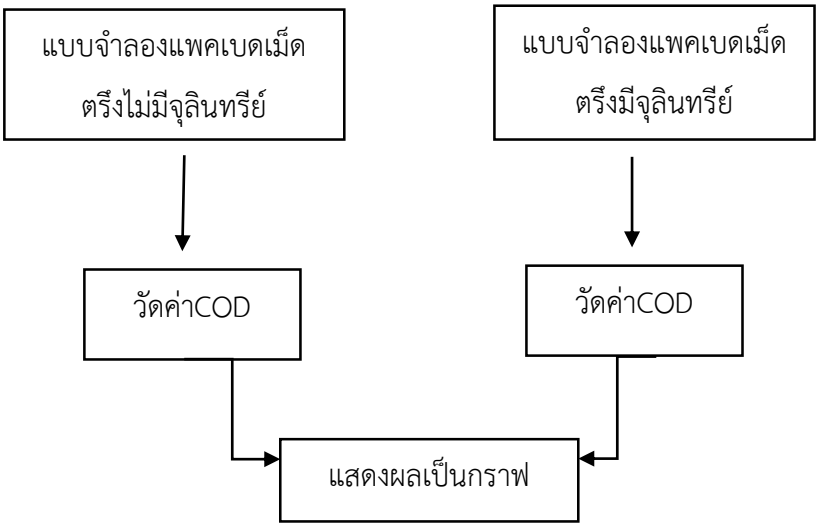
ค่า Kinetic ที่ทำการวัดคือค่า COD ซึ่งค่า COD สามารถบ่งบอกถึงการย่อยสลายของสารอินทรีย์ได้ โดยจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง ซึ่ง การวัดค่า Kinetic จะทำทั้งหมด 2 ชุดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หา ค่า COD ด้วยใช้วิธีการรีฟลักซ์แบบปิด/การไตเตรท (Closed Reflux, Titrimetric Method) ดังนี้ (ไพฑูรย์ หมายมั่นสมสุข)

1. ล้างหลอดทดลอง (Digestion Tubes) และฝาจุกด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 20 ก่อนนำไปใช้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์
2. เลือกใช้ปริมาตรของตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม ตามตารางที่ 3.1
3. นำตัวอย่างน้ำมาใส่หลอดทดลองที่เตรียมไว้ เติมสารละลาย digestion reagent
4. ค่อยๆเทกรดซัลฟิวริกรีเอเจนต์ลงไปในหลอดโดยให้กรดซัลฟิวริกรีเอเจนต์ไหลลงก้นหลอดแก้วเพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ใต้ชั้นตัวอย่างน้ำและ digestion reagent

5. ปิดจุกหลอดแก้วให้แน่นแล้วคว่ำหลอดแก้วไปมาหลาย ๆ ครั้งอย่างทั่วถึงก่อนจะนำตัวอย่างไปรีฟลักซ์ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความร้อนสะสมอยู่ที่ก้นหลอด ซึ่งอาจแตกได้ในขณะทำการรีฟลักซ์
6. ให้ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์น้ำตัวอย่าง ประมาณ 1-2 หลอด
7. นำหลอดแก้วทั้งหมดที่ใส่น้ำตัวอย่างและ Blank วางบนที่ตั้งหลอดทดลอง แล้วเข้าเตาอบที่ทำให้อุณหภูมิสูงถึง 150 ± 2 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมง ให้นำตัวอย่างออกมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเย็น
8. เทตัวอย่างจากหลอดใส่ลงในขวดรูปชมพู่แล้วไทเทรตกับสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) เข้มข้น 0.1 N จนกระทั้งถึงจุดยุติ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ อ่านปริมาตรที่ไทเทรตตอนเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลแดงทันที

ตารางที่ 5 ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่างๆของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย

Digestion Tubes	Sample (ml)	Digestion reagent (ml)	Sulfuric acid reagent (ml)	Total (ml)
16×100 mm	2.5	1.5	3.5	7.5
20×150 mm	5.0	3.0	7.0	15.0
25×150 mm	10.0	6.0	14.0	30.0
Standard 10 mL ampule	2.5	1.5	3.5	7.5



รูปที่ 14 จำลองการวัดค่า Kinetic ต่างๆ

การวัดประสิทธิภาพของเม็ดตรึงอัลจิเนตและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบบำบัด

1. วัดประสิทธิภาพของเม็ดตรึงจะใช้วิธีสุ่มตรวจขนาด และสุ่มตรวจจุลินทรีย์ในเม็ดตรึง

2. วัดค่า COD ในน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วและยังไม่ผ่านการบำบัดเพื่อเป็นการ เปรียบเทียบคุณภาพของน้ำที่ออกมาและเป็นการตรวจสอบถึงความสามารถในการย่อย สลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์

7. ผลการทดลองและอภิปรายผล

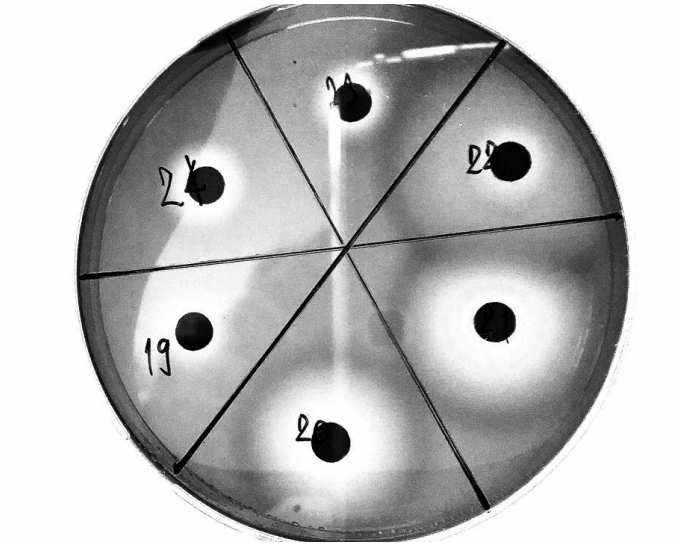
การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถที่ดีที่สุดในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้วิธี Congo red

นำจุลินทรีย์ที่อยู่ในบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษมาทำการคัดเลือกโดยใช้วิธี Spread plate บนอาหารแข็ง CMC เพื่อเป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์เบื้องต้น จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เติบโตบนอาหารแข็ง CMC มาทำการคัดเลือกโดยใช้วิธี Streak plate นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Congo red CMC เพื่อให้ง่ายต่อการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากการทดลองเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง Congo red CMC ทั้งหมด 30 ตัว พบว่ามีจุลินทรีย์ทั้งหมด 8 ตัว ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ ซึ่งได้แก่ ตัวที่ C11, C12, C20, C21, C22, CRCMC4, CRCMC5, และCRCMC7 โดยจะสังเกตขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบจุดที่หยดเชื้อซึ่งเรียกว่า “Clear zone” ซึ่ง Clear zone เกิดจากการที่จุลินทรีย์เจริญแล้วปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสไปทำปฏิกิริยากับสารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเกิดเป็นวงใสขึ้นซึ่งวงใสนั้นอาจมองเห็นได้โดยตรงในอาหารหรืออาจต้องเติมสารไปทำปฏิกิริยาบนอาหารจึงจะเห็นเป็นวงใส clear zone ทำการวัดขนาดวงใสโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์คัดเลือกโคโลนีเชื้อจุลินทีย์ที่มีขนาดวงใสกว้างกว่าโคโลนีอื่นแสดงว่ามีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยเซลลูโลส ซึ่งทำการวัดขนาดวงใสของจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว หลังจากเลี้ยงเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง พบว่ามีขนาดเท่ากับ 8.33, 15.33, 23.50, 21.83, 27.33, 27.33, 17.57, และ15.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเลี้ยงจนครบ 48 ชั่วโมงพบว่าขนาดของวงใสของจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว มีขนาดเท่ากับ 34.00, 38.33, 54.00, 51.67, 56.67, 61.33, 49.67 และ48.67 ตามลำดับ

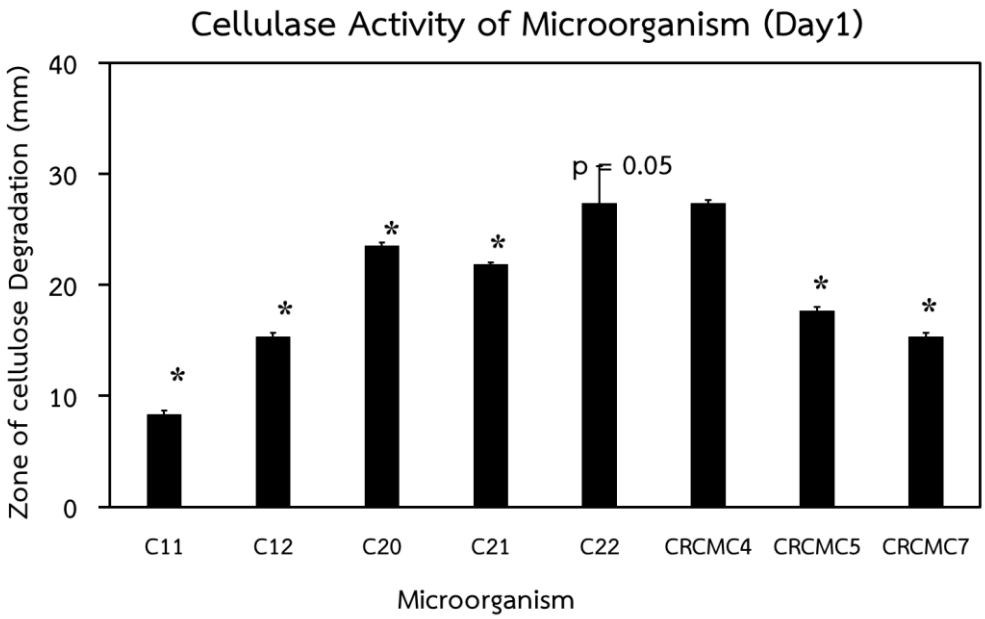
จากงานวิจัยของ Juntakorn et al (2015) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธี Congo red พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลต วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear Zone) ต่อโคโลนีของจุลินทรีย์คัดเลือกโคโลนีที่มีขนาดวงใสกว้าง 18 มิลลิเมตรขึ้นไป ซึ่งมีทั้งหมด 8 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากและก้อนเชื้อเห็ดของ Wittanalai, S.และคณะ (2015) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อราที่คัดแยกได้มา

ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยสังเกตการเกิดวงใสบนอาหาร CMC agar หลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วันแล้วเททับด้วย Congo red ผลการทดสอบพบว่าเชื้อราที่มีความสามารถสร้างวงใสได้นั้นมีทั้งหมด 9 ไอโซเลท (Figure 1) ซึ่งเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณวงใสเฉลี่ยของไอโซเลท S1-3 มีขนาดมากที่สุด (57.00 มิลลิเมตร) รองลงมา คือ ไอโซเลท M1-4 (31.17 มิลลิเมตร) และไอโซเลท S2-1 (18.33 มิลลิเมตร) ตามลำดับ

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์โดยวัดจากขนาดวงใสที่เกิดขึ้นพบว่าจากการทดลองได้ขนาดใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความแตกต่างกันเนื่องจากความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้สารอาหารโดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตจึงส่งผลให้จุลินทรีย์แต่ละตัวเกิดการย่อยสลายเซลลูโลสที่ต่างกันไปด้วย



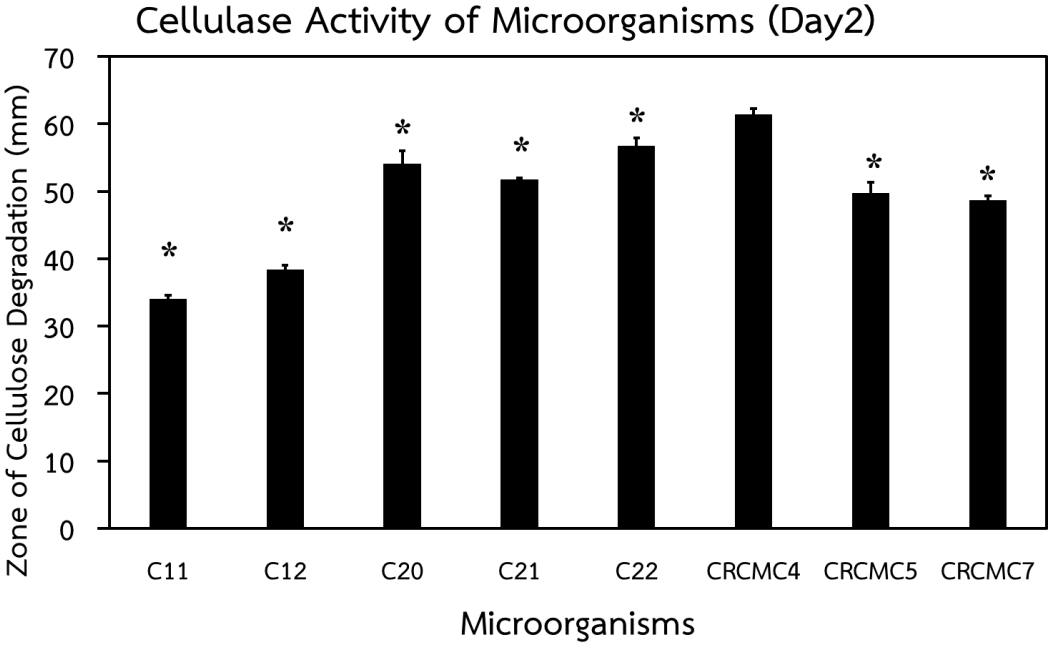
รูปที่ 15 ตัวอย่างวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์



รูปที่ 16 กราฟแสดงความกว้างของวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ณ วันที่ 1

หมายเหตุ * คือแสดงระยะห่างที่ความเชื่อมั่น p≤0.05 โดยการเทียบ t-test

จากรูปที่ 16 พบว่าจุลินทรีย์ C22 และ CRCMC4 มีขนาดวงใสกว้างที่สุด ซึ่งแสดงถึงการเกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายเซลลูโลส เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ จากกราฟจะแสดงให้เห็นความแตกต่างของขนาดวงใสของจุลินทรีย์แต่ละตัว อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ C22 และ CRCMC4 มีขนาดวงใสใกล้เคียงกันมากจึงทำการเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้การเทียบ T-test ที่ความเชื่อมั่น p≤0.05 พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองตัวมีขนาดวงใสที่เท่ากันทำให้ไม่สามารถคัดจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด



รูปที่ 17 กราฟแสดงความกว้างของวงใสที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ณ วันที่ 2

หมายเหตุ * คือแสดงระยะห่างที่ความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ โดยการเทียบ t-test

จากรูปที่ 17 พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ต่อจนครบ 48 ชั่วโมง พบว่าขนาดของวงใสของจุลินทรีย์ CRCMC4 มีขนาดวงใสที่กว้างที่สุดเท่ากับ 61.33 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ C22 และจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ จะเห็นได้ว่าขนาดของวงใสมีขนาดที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้การเปรียบเทียบด้วยวิธี T-test ที่ความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธี Congo red เป็นเพียงแนวทางในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อไปใช้ในขั้นตอนถัดไปเท่านั้น

วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธี DNS เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามรในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์

<u>การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS</u>

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยวิธี DNS เป็นการวัดหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ขั้นตอนนี้เป็นการคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดอีกวิธีหนึ่ง โดยการนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 8 ตัว โดยให้แต่ละตัวชื่อว่า CDB1, CDB2, CDB3, CDB4, CDB5, CDB6, CDB7 และCDB8 มาทำการวัดปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS ซึ่งกระบวนการวัด DNS จะแบ่งออกเป็น 2 ตอนหลักๆ โดยตอนที่ 1 เป็นการวัดปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS ซึ่ง Blank ที่ใช้จะเป็น สารละลาย

DNS 3 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเหลว CMC จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และ 2% CMC ใน Sodium citrate เข้มข้น 0.05 M จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งการวิเคราะห์ในตอนที่ 1 จะเป็นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้ง 8 ตัว ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสได้มากน้อยเพียงใด ซึ่งการทดลองในตอนที่ 1 นี้เอนไซม์จะย่อยอนุพันธุ์ของเซลลูโลสนั่นก็คือ CMC จากการทดลองพบว่า CDB1, CDB2, CBD3, CDB4, CDB5,CDB6, CDB7 และCBD8 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดังตารางที่

ตารางที่ 6 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้โดยวิธี DNS ตอนที่ 1

ชื่อจุลินทรีย์	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ (IU/ml)
CDB1	0.0615
CDB2	0.0453
CDB3	0.0494
CDB4	0.0533
CDB5	0.0607
CDB6	0.0560
CDB7	0.0538
CDB8	0.0489

จากตารางที่ 6 เป็นค่าที่ได้จากการวัดปริมาณน้ำตาลของจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว ในหน่วยของ IU/ml ซึ่ง IU หรือ International unit เป็นการบอกถึงเอนไซม์ 1 หน่วย ซึ่งเป็นปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดผลผลิต 1 ไมโครโมล/นาที ใต้ภาวะที่กำหนด ดังนั้นจากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ CDB1 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสได้ดีที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0615 IU/ml รองลงมาคือ จุลินทรีย์ CDB5 เท่ากับ 0.0607 IU/ml และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้น้อยที่สุดคือ CDB2 เท่ากับ 0.0453 IU/ml

ส่วนการวัดปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS ในตอนที่ 2 ซึ่ง Blank ที่ใช้จะเป็น สารละลาย DNS 3 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเหลว CMC จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ Sodium citrate เข้มข้น 0.05 M จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งการวิเคราะห์ในตอนที่ 2 จะต่างจากตอนที่ 1 คือจะมีการใส่กระดาษ Whatman No.1 จำนวน 50 มิลลิกรัม แทนการใส่สารละลายเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส ซึ่งการทดลองตอนที่ 2 นี้จะ

เป็นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสได้มากน้อยเพียงใด ซึ่งเอนไซม์จะทำการย่อยเซลลูโลสที่อยู่ในเนื้อกระดาษให้เป็นน้ำตาลกลูโคสนั่นเอง จากการทดลองพบว่า CDB1, CDB2, CBD3, CDB4, CDB5, CDB6, CDB7 และCBD8 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดังตารางที่

ตารางที่ 7 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้โดยวิธี DNS ตอนที่ 2

ชื่อจุลินทรีย์	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ (IU/ml)
CDB1	0.0319
CDB2	0.0366
CDB3	0.0449
CDB4	0.0456
CDB5	0.0305
CDB6	0.0356
CDB7	0.0282
CDB8	0.0179

จากตารางที่ 7 พบว่าจุลินทรีย์ CDB4 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสได้ดีที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0456 IU/ml รองลงมาคือ จุลินทรีย์ CDB3 เท่ากับ 0.0449 IU/ml และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้น้อยที่สุดคือ CDB8เท่ากับ 0.0179 IU/ml

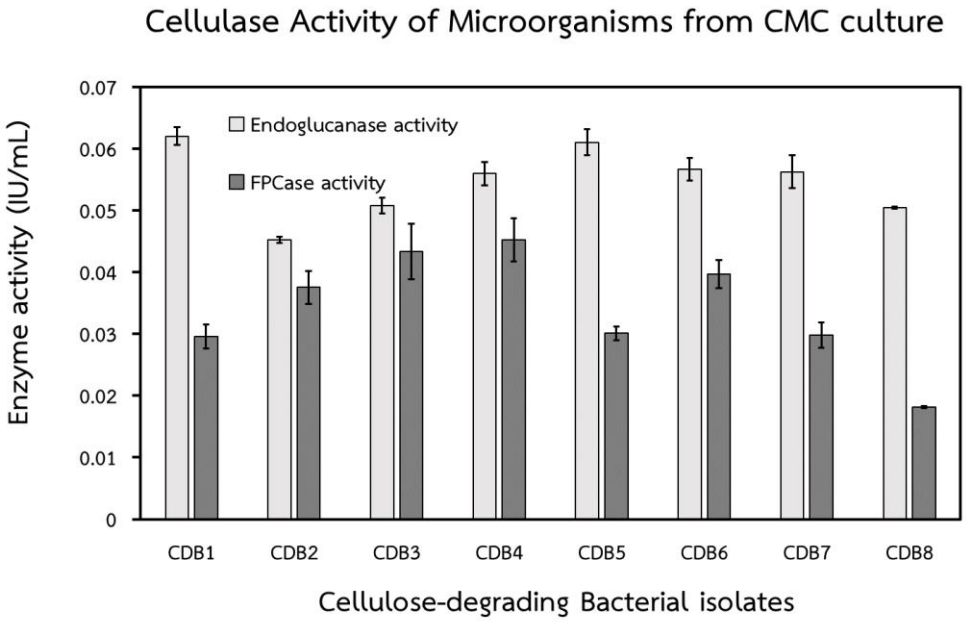
จากงานวิจัยของ Pratima Gupta และคณะ(2011) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากธรรมชาติและหาศักยภาพของเซลลูลาไลติก ซึ่งในการวิจัยได้ทำการวัดกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทั้งหมด 8 ตัว โดยการทดลองแบ่งเป็น 2 ตอน การทดลองตอนที่ 1 เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้สารละลาย CMC พบว่ามีจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสได้มากที่สุดอยู่ที่ 0.400 IU/ml และจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสน้อยที่สุดอยู่ที่ 0.1622 IU/ml ในตอนที่ 2 เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้กระดาษ Whatman No.1 พบว่ามีจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสได้มากที่สุดอยู่ที่ 0.196 IU/ml และจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสน้อยที่สุดอยู่ที่ 0.012 IU/ml ซึ่งเมื่อนำค่าจากการทดลองมาเปรียบเทียบกับงานวิจัย พบว่าค่าปริมาณการย่อยสลายเซลลูโลสหรือปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัย ทั้งนั้นเป็นเพราะ

ความแข็งแรงและความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสเนื่องจากการในการทดลองได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์มาจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษจึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่แข็งแรงเท่ากับจุลินทรีย์ที่อยู่ตามธรรมชาติ

อย่างไรก็ตามเพื่อให้ทราบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้นั้นเกิดจากความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลส ในการทดลองจึงมีการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสของเอนไซม์โดยนำเอนไซม์ของจุลินทรีย์ชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ Citrate buffer 0.5มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS พบว่าค่าที่วัดได้นั้นมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับการทดลองในตอนที่ 1 และตอนที่ 2 ดังนั้นจากการทดลองพบว่าค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในตอนที่ 1 และตอนที่ 2 เป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสจริงซึ่งตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น

ชื่อจุลินทรีย์	ใส่สารละลาย CMC (IU/ml)	ไม่ใส่สารละลาย CMC (IU/ml)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น (IU/ml)
CDB1	0.0615	0.0277	0.0338
CDB2	0.0453	0.0404	0.0046
CDB3	0.0494	0.0370	0.0124
CDB4	0.0533	0.0224	0.0309
CDB5	0.0607	0.0401	0.0206
CDB6	0.0560	0.0293	0.0267
CDB7	0.0538	0.0254	0.0284
CDB8	0.0489	0.0229	0.0260



รูปที่ 18 กราฟเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากย่อยสลายเซลลูโลสที่มาจาก CMC และ กระดาษ Whatman No.1

จากรูปที่ 18 เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการทดลองตอนที่ 1 และการทดลองตอนที่ 2 พบว่าจุลินทรีย์ CDB4 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด เท่ากับ 0.0533 IU/ml และ 0.0456 IU/ml ทั้งสองการทดลอง เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ CDB 3 มีค่าเท่ากับ 0.0494 IU/ml และ 0.0449 IU/ml และ CDB2 มีค่าเท่ากับ 0.0453 IU/ml และ 0.0366 IU/ml ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสก็ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ CDB4 แต่จากกราฟสังเกตได้ว่าจุลินทรีย์ CDB4 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธุ์ของเซลลูโลสได้ดีกว่าจุลินทรีย์ CDB3 และ CDB2 ดังนั้นจากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS พบว่าจุลินทรีย์ CDB4 เป็นตัวที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดในทั้งการทดลองตอนที่ 1 และ 2 ซึ่งในการทดลองนี้ได้นำสถิติเข้ามาช่วยในการตัดสินใจ โดยการใช้วิธีการเทียบ T-test ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นของ จุลินทรีย์แต่ละตัวนั่นเอง

<u>การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ CDB4 ด้วยกล้องจุลทรรศน์</u>

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงดังรูปที่ 19 ซึ่งเป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ CBD4 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าลักษณะภายนอกของจุลินทรีย์ CDB4 มีสีเขียวอมเหลือง โปร่งแสง ผิวเป็นร่อยย่น ไม่สามารถระบุรูปร่างได้ เมื่อทำการย้อมแกรมแล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีลักษณะ

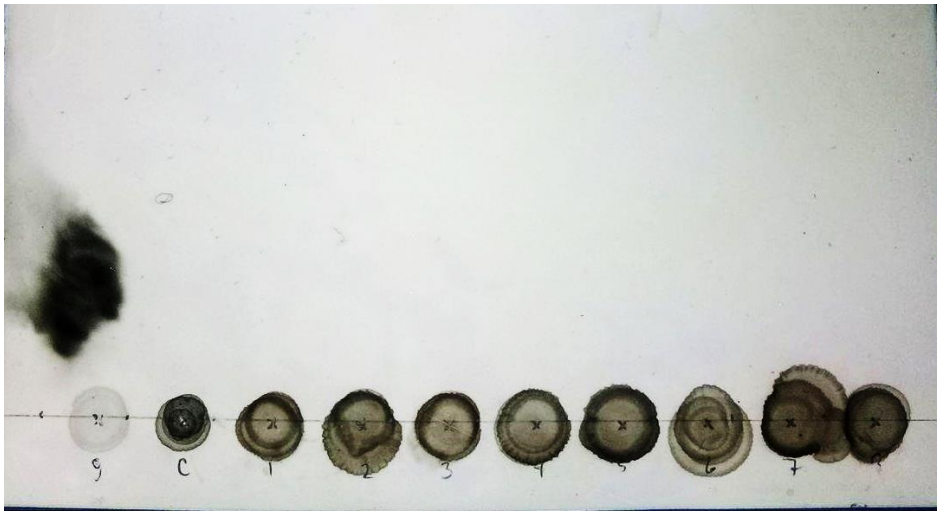
เป็นท่อนต่อๆกันเรียกว่า “Streptobacilli” มีสีแดงซึ่งแสดงให้ทราบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากงานวิจัยของ ทิพย์นภา วงษ์คูณและคณะ (2556) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวและข้าวโพดหวาน จากการทดลองพบแบคทีเรียจำนวน 26 ไอโซเลท แต่มีเพียง 4 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ได้แก่ ACSI, BDS31, BFC8 และ FFC2 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าจุลินทรีย์ BDS31 และBFC8 มีลักษณะของจุลินทรีย์ รูปร่างท่อนต่อๆกัน แต่ BDS31 ย้อมแกรมติดสีม่วงซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus licheniformis* ส่วน BFC8 ย้อมติดสีแดง มีความใกล้เคียงกับ *Cronobacter sakazakii* ดังนั้นเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ CDB 4 พบว่ามีลักษณะคล้ายกับจุลินทรีย์ BFC8

รูปที่ 19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ CDB4 ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X

การวิเคราะห์ลักษณะการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์ CDB 4 ที่ระยะเวลาต่างๆ

จากการวิเคราะห์การผลิตปริมาณน้ำตาลกลูโคสของจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัวมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ ซึ่งในขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS ไม่ทำให้ทราบว่าจุลินทรีย์มีการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่เวลาเท่าไร จึงทำการวัดอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) ซึ่งการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC จำเป็นจะต้องทำ Standard นั่นคือการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส เพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่วิเคราะห์ ซึ่งในการทดลองได้เลือกใช้ Standard ที่ความเข้มข้น 1% 2% 3% และ4% เป็นตัวเปรียบเทียบ การวิเคราะห์นี้จะทำให้ทราบ

อัตราการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 8 ตัว ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสหรือย่อยสลายได้น้อยทำให้เมื่อทดสอบด้วยวิธี TLC ไม่พบปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้น ดังนั้นการวิเคราะห์หาอัตราการย่อยสลายด้วยวิธี TLC ไม่ทำให้ทราบถึงอัตราการย่อยสลายของเซลลูโลสที่แท้จริง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นน้อย จึงทำให้การทดสอบไม่พบปริมาณน้ำตาลกลูโคส



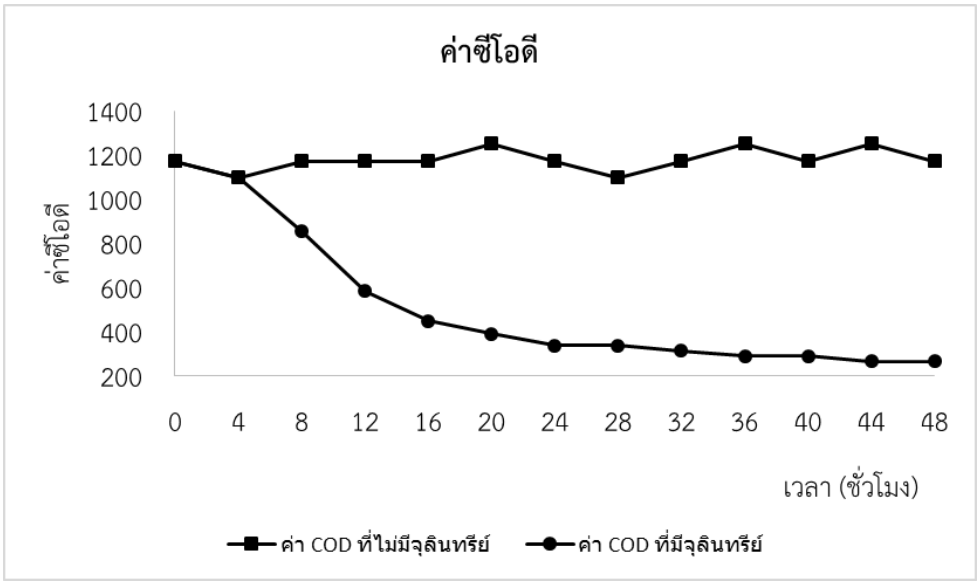
รูปที่ 20 การวิเคราะห์อัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธี TLC

จากงานวิจัยของ Kyeong Hwan Kang และคณะ(2015) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการย่อยสลายเอนไซม์ของ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ TK3-Y สำหรับบำบัดน้ำเสียที่มีส่วนผสมของสาหร่ายสีเขียว พบว่าในการทดลองได้ใช้วิธีการวิเคราะห์ TLC มาวิเคราะห์ลักษณะการย่อยสลายของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส ในการทดลองใช้เอนไซม์ของ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ TK3-Y ไปปั่นเหวี่ยงแล้วน้ำมาหยดทุกๆ 1ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 3-4 ชั่วโมง ปรากฏจุดการย่อยสลายเซลลูโลสหรือปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำไปเทียบกับผลทดลอง รูปที่ 20 พบว่าจุลินทรีย์ CDB4 เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ไม่ปรากฏจุดของน้ำตาลกลูโคสที่เวลา 1-4 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแข็งแรงของเชื้อจุลินทรีย์และชนิดของจุลินทรีย์ที่นำมาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ค่าซีโอดีของน้ำเสีย

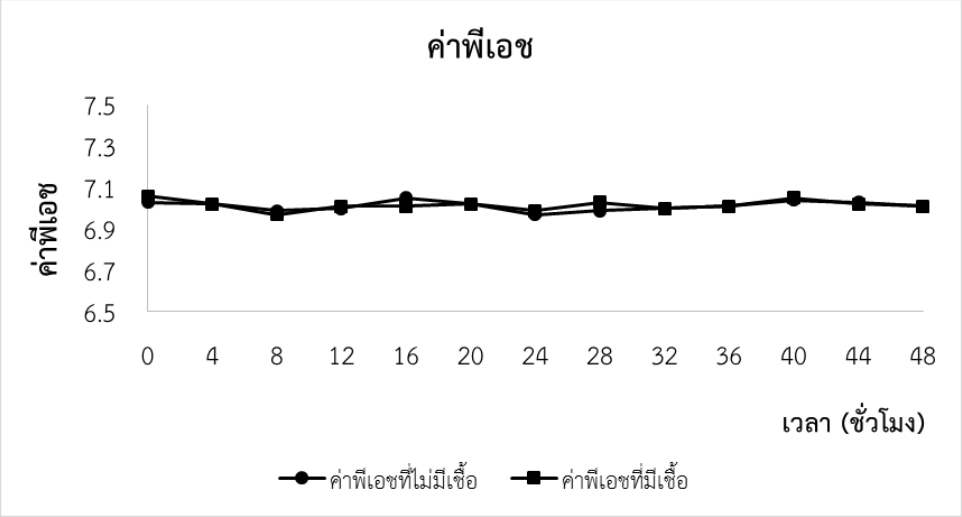
จากการวิเคราะห์ในขั้นตอนที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์ CDB4 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด จึงได้นำจุลินทรีย์ CDB4 มาทำการตรึงบนเม็ดตรึงอัลจิเนตในคอลัมน์แพคเบด ซึ่งหลักการทำงานของคอลัมน์แพคเบดจะมีการปั๊มน้ำเป็นระบบวนน้ำโดยน้ำจะถูกปั๊มจากถังน้ำเสียเข้าไปยังคอลัมน์แพคเบดซึ่งภายในคอลลัมน์แพคเบดมีเม็ดตรึงบรรจุอยู่เมื่อน้ำเสียสัมผัสกับเม็ดตรึงก็จะเกิดกิจกรรม

ของจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในเม็ดตรึงจากนั้นน้ำที่ผ่านการบำบัดก็จะไหลไปยังถังน้ำที่ผ่านการบำบัด ซึ่งน้ำที่ผ่านการบำบัดจะมีค่า COD ลดลง กระบวนการนี้เป็นการบำบัดน้ำเสียอีกกระบวนการหนึ่ง ในการทดลองได้ทำการตรึงเม็ดตรึงอัลจิเนตโดยผสมเชื้อจุลินทรีย์ CDB4ลงไปกับอัลจิเนตด้วย จากนั้นนำไปใส่ในคอลัมน์แพคเบค โดยการทดลองนี้จะเก็บตัวอย่างน้ำที่ผ่านกิจกรรมของจุลินทรีย์ในเม็ดตรึงอัลจิเนตแล้ว โดยการเก็บจะเก็บทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง จากรูปที่ 20 จะเห็นได้ว่าค่าซีโอดีที่มีเชื้อผสมอยู่จะค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยค่า COD เริ่มต้นอยู่ที่ 1171 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อผ่านการบำบัดจนครบเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดค่า COD ได้เท่ากับ 267 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในขณะเดียวกันก็จะต้องทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่ผ่านกิจกรรมของเม็ดตรึงอัลจิเนตที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ CDB4 ผสมอยู่เช่นกัน เพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าซีโอดีของแบบจำลองทั้งสอง โดยค่าซีโอดีของน้ำตัวอย่างที่ผ่านเม็ดตรึงอัลจิเนตที่ไม่มีจุลินทรีย์ CDB4 ผสมอยู่มีค่าซีโอดีขึ้นลงอย่างไม่สม่ำเสมอเฉลี่ยอยู่ที่ 1178 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเทียบกับค่าซีโอดีของการทดลองแบบเม็ดตรึงที่มีเชื้อแล้วจะแสดงให้เห็นว่าค่าซีโอดีที่ลดลงนั้นเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในเม็ดตรึงจึงส่งผลให้ค่า COD ของน้ำตัวอย่างลดลงอย่างต่อเนื่องและเมื่อทำการนำค่า COD ที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของโรงงานอุตสาหกรรมพบว่าโรงงานอุตสาหกรรมกำหนดค่า COD ของน้ำเสียที่สามารถปล่อยสู่ธรรมชาติได้อยู่ที่ไม่เกิน 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองสามารถลดค่า COD ได้อยู่ที่ 267 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่เกินค่ามาตรฐานที่โรงงานอุตสาหกรรมกำหนดไว้สามารถปล่อยสู่ธรรมชาติหรือนำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิตต่อไป



รูปที่ 21 ค่าซีโอดีของการบำบัดแบบไม่มีจุลินทรีย์ CDB4 และมีจุลินทรีย์ CDB4

ทั้งนี้ในการบำบัดน้ำจำเป็นจะต้องวัดค่าพีเอชก่อนการบำบัดและหลังจากการบำบัดเพื่อให้ทราบถึงความเหมาะสมแก่การปล่อยออกธรรมชาติ ซึ่งค่าพีเอชที่ได้จากการวัดพบว่ามีช่วงของพีเอช อยู่ที่ 6.5-7 ซึ่งค่าพีเอชที่วัดได้นั้นสอดคล้องกับมาตรฐานของโรงงานอุตสาหกรรมดังแสดงในรูป 22



รูปที่ 22 ค่าพีเอชก่อน-หลังบำบัด

8. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษโดยการตรึงจุลินทรีย์บนเม็ดตรึงอัลจิเนตในแบบจำลองแพคเบด เนื่องจากน้ำเสียที่ใช้มาจากโรงงานผลิตกระดาษ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสมาใช้ในการทดลอง ซึ่งในขั้นตอนการทดลองได้ใช้วิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ได้ใช้วิธี Congo red และวิธีวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี DNS พบว่าวิธีทั้งสองนี้สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ ทำให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดมาเป็นตัวแทนในการใช้ตรึงบนเม็ดตรึงอัลจิเนต เมื่อนำเม็ดตรึงมาทำการบำบัดน้ำเสียพบว่าประสิทธิภาพของเม็ดตรึงอัลจิเนตสามารถบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษได้ ซึ่งได้นำน้ำตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดมาทำการตรวจสอบค่า COD ทุกๆ 4 ชั่วโมง พบว่าค่า COD ลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับแบบจำลองที่ไม่มีจุลินทรีย์ จากการทดลองวัดค่า COD พบว่าน้ำเสียมีค่า COD เริ่มต้นอยู่ที่ 1171 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่หลังจากการบำบัดจนครบ 48 ชั่วโมง พบว่าน้ำเสียมีค่า COD อยู่ที่ 267 มิลลิกรัมต่อลิตรและได้ค่า DO 2.32 ซึ่งค่าที่ได้ยังคงอยู่ในมาตรฐานน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม

อย่างไรก็ตามการลดลงของค่า COD มาจากการย่อยสลายของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งถ้าในน้ำเสียมีปริมาณสารอินทรีย์มากก็จะทำให้เกิดการออกซิไดซ์ที่สูงทำให้น้ำเสียมีค่า COD สูงไปด้วย ดังนั้นเมื่อสารอินทรีย์เกิดการย่อยสลายจึงทำให้มีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำลงจึงส่งผลให้ค่า COD ที่วัดได้มีค่าต่ำลง

9. ข้อเสนอแนะ

1. จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้น้อยอาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ที่คัดจากธรรมชาติมีความแข็งแรงไม่เพียงพอหรือสภาวะที่เกิดขึ้นในห้องทดลองแตกต่างจากในธรรมชาติที่เชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่

2. ในการทดสอบการย่อยสลาย CMC เกิดกิจกรรมได้ช้าทำให้เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงได้เอนไซม์ที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบอยู่เป็นจำนวนน้อย ส่งผลให้การนำไปวัดค่าน้ำตาลน้อยลงไปด้วย

3. การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตให้มีความเข้มข้นมากขึ้น เนื่องจากในการทดลองใช้โซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 3% ส่งผลให้เมื่อนำไปใช้งานพบว่ามีอายุการใช้งานที่สั้น เนื่องจากในน้ำเสียมีของเสียประเภทไอออนสูงอยู่จำนวนมากซึ่งส่งผลต่อความแข็งแรงของโครงสร้างของเม็ดตรึงอัลจิเนต

4. ค่า BOD ที่ระยะสั้นไม่สามารถบ่งบอกได้เนื่องจากในการทดลองจริงเป็นระบบที่ไหลเวียนตลอดค่าที่ได้จึงไม่แตกต่างกัน ค่าที่วัดได้จะอยู่ในรูปของค่าที่อ๊อกซิเจนละลายอยู่ในน้ำหรือ DO และเนื่องจากเป็นระบบบำบัดที่ใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดค่า BOD จึงไม่เหมาะที่จะมาเป็นพารามิเตอร์ในการใช้ระบบบำบัดทางชีวภาพ

ผลผลิต (Output)

- รายงานฉบับสมบูรณ์
- อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ลงวารสารวิชาการระดับชาติ

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 256109A1080029 สัญญาเลขที่ 47/2561

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตกระดาษโดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนเม็ดตรึงอัลจิเนตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแบคเบดเพื่อกำจัดเซลลูโลสในน้ำเสีย

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ. ดร. วิทวัส แจ้งเอี่ยม

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 01/10/2560 ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี) 30/09/2561

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 01/10/2560

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) ..... บาท เมื่อ วันที่ เดือน ปี .....

งวดที่ 2 (40%) ..... บาท เมื่อ วันที่ เดือน ปี .....

งวดที่ 3 (10%) ..... บาท เมื่อ วันที่ เดือน ปี .....

รวม.....

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน			
2. ค่าจ้าง			
3. ค่าวัสดุ			
4. ค่าใช้สอย			
5. ค่าครุภัณฑ์			
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย)			
รวม			

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม

บูรณาพากรุ๊ป จากัด. 2552. องค์ประกอบทางเคมีของไม้ (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.buranapagroup.com/knowledge_chemical.php (15 ตุลาคม 2552)

ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, 2010 เทคโนโลยีเอนไซม์ในอุตสาหกรรมกระดาษ วารสารส่งเสริมเทคโนโลยี ฉบับที่ 213 ประจำเดือน ตุลาคม-พฤศจิกายน 2553

สินีนาฏ ทิพย์ดนตรี, การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานพิมพ์กล่องกระดาษ, วิทยานิพนธ์ (วท.ม.(การจัดการสิ่งแวดล้อม))-มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2543

Adnan A., Khan M. and Ahmad T., Optimized antimicrobial peptide (Bacitracin) production by immobilized and free cells and of Bacillus Spp GU215 using Wood chips and silicon polymer beads Pak. J. Pharm. Sci., Vol.26, No.6, November 2013, pp.1077-1082

Cheng J. and Sun Y., 2001. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology 83 (2002) 1–11

Eduardo et al., Suiting Dynamic Models of Fixed-Bed Catalytic Reactorsfor Computer-Based Applications, Engineering, 2011, 3, 778-785

Gardner, K.H.and Blackwell, J. 1974. Structure of native cellulose. Biopolymers 13: 1975-2001

Ghose, T.K., Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulosic substances, in Advances in Biochemical Engineering, 6, 25, 1977.

Helmenstine, A.M. 2013. On this day in science-January 6 (Online). Available http://chemistry.about.com/b/2013/01/05/on-this-day-in-science-january-6-anselme-payen-and-cellulose.htm. (24 February 2013)

Kadla, J.F. and Gilbert, R. 2000. Cellulose Structure: A Review. Cell Chem Technol. 34:197-216

Lewin, M. and Goldstein, I.S. 1991. Wood structure and composition. Marcel Dekker, Inc. New York. 488 p.

Phillips, G.O. and Williams, P.A., 2000, “Handbook of hydrocolloids”, New York, CRC press, pp. 87-213

Phillips, G.O. and Williams, P.A., 2000, “Handbook of hydrocolloids”, New York, CRC press,pp. 87-213

บรรณานุกรม (ต่อ)

Pokhrel, D & Viraraghavan, T. (2004). Treatment of pulp and paper mill wastewater – a review. Sci. Tot. Env., Vol. 333, pp. 37-58.

Reese et, Siu Rgh, Levinson HS. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bacteriol.* 1950 Apr;59(4):485–497.

Sjöström, E. 1993. Wood chemistry: Fundamentals and applications. Academic Press, Inc. Toronto. 293 p

Smook, G.A. 1986. Handbook for pulp and paper technologists. Joint textbook committee of the paper industry of the United States and Canada. 395 p.

Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195:19-23.

Serge Pérez and William Mackie,Structure and morphology of cellulose, CERMAV-CNRS, 2001.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการคำนวณ

การเตรียมสูตรอาหาร

สูตรการเตรียมอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ Congo red CMC

KH_2PO_4	0.5	g
$MgSO_4$	0.25	g
CMC	2	g
Agar	15	g
Congo red	0.2	g
Gelatin	2	g
Distilled water	1	l

สูตรการเตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC

KH_2PO_4	0.5	g
$MgSO_4$	0.25	g
CMC	2	g
Gelatin	2	g
Distilled water	1	l

- **การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ DNS**

DNS	10	g
$KNaC_4H_4O_6{\cdot}4H_2O$	300	g
NaOH 0.5 N	800	ml
Distilled water	1	l

- **วิธีเตรียมสารสำหรับวัดค่าซีโอดี**

1. สารละลาย digestion reagent ละลาย $K_2Cr_2O_7$ 4.913 กรัมซึ่งอบแห้งที่ 103 ^oC เป็นเวลา 2 ชม. ในน้ำ กลั่น 500 มิลลิลิตร.ค่อยๆเติม conc.H_2SO_4 167 มิลลิลิตร เติม $HgSO_4$ ลงไป 33.3 กรัม คนให้ละลายตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. กรด Sulfuric เข้มข้นที่ผสม $AgSO_4$ (Sulfuric Acid reagent) ละลาย $AgSO_4$ 22 กรัมใน Conc. H_2SO_4 ซึ่งมีน้ำหนัก 4.1 กิโลกรัม (2.5 ลิตร) แล้วตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันเพื่อให้ละลาย

3. เตรียมสารละลาย FAS

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต [Fe (NH4)2(SO4)2.6H2O] 39.2 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ทิ้งให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร สารละลายนี้ต้องเทียบมาตรฐานกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้ในการย่อยสลายทุกครั้งที่นำมาใช้

<u>วิธีการหาความเข้มข้นของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous Ammonium Sulfate)</u>

เติมสารเคมีตามตารางดังกล่าวข้างบนนี้ในภาชนะย่อยสลาย แต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง น้ำทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วไทเทรตด้วยเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous Ammonium Sulfate) ใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 0.05 - 0.1 มิลลิลิตร ทำประมาณ 1 - 2 หลอด ไทเทรต จนถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

<u>การคำนวณ</u>

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) คำนวณได้จาก

สมการ $Mf = (6VpMp)/Vf$

เมื่อ Mf = ความเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นโมลาร์

Vf = ปริมาตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ เป็นมิลลิลิตร

Vp = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้ เป็นมิลลิลิตร

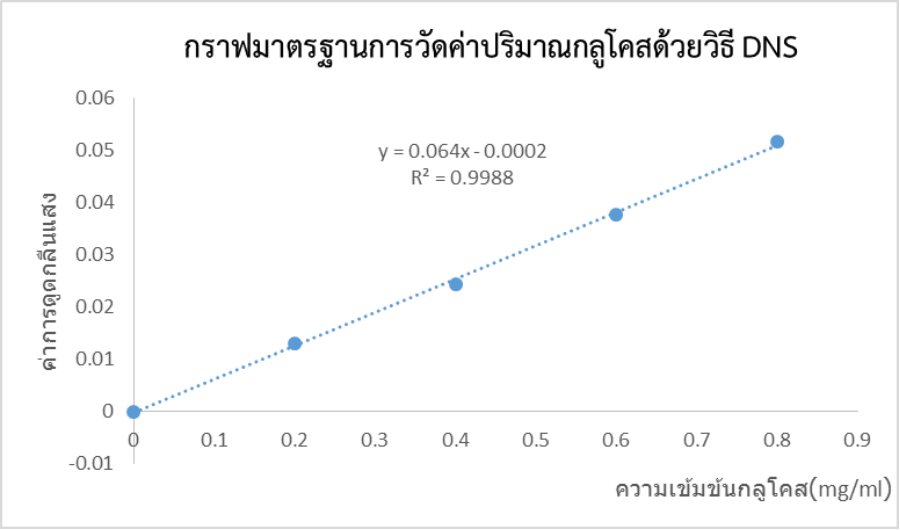
Mp = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต เป็นโมลาร์

4. สารละลาย ferroin อินดิเคเตอร์

สามารถหาซื้อได้โดยทั่วไปหรืออาจจะเตรียมขึ้นเองโดยละลาย 1,10 – Phenanthroline Monohydrate (C12H8N2.H2O) หนัก 1.48 กรัมและ Ferrous Sulfate Heptahydrate (FeSO4.7H2O) หนัก 0.7 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วทำให้เจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

ตัวอย่างการคำนวณ

วิธีคำนวณปริมาณน้ำตาล



จากกราฟแสดงสมการดังนี้ y = 0.064x-0.0002

จากสมการค่า y คือค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง

จากสมการค่า x คือค่าปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น หน่วยเป็น IU/ml

การคำนวณ

จากการทดลองครั้งที่ 1 y = 0.0387 mg/ml

แทนค่า y ลงในสมการจะได้ 0.0387 = 0.064x-0.0002

X= 0.6045 mg/ml

เปลี่ยนหน่วยให้เป็น IU/ml จะได้

$$\frac{0.6045mg}{ml}\times\frac{mole}{180g}\times\frac{1g}{1000mg}\times\frac{10^{6}\mu}{60\,\text{min}}$$ = 0.0559 µmole/ml.min

ดังนั้นค่าปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 0.0559 IU/ml

วิธีการคำนวณค่าซีโอดี

จากสูตร COD = (A-B) (8000M)/C

โดย

COD = ค่าซีโอดี หน่วยเป็นมิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร

A = ปริมาตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทBlank หน่วยเป็นมิลลิลิตร

B = ปริมาตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง หน่วยเป็นมิลลิลิตร

M = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต หน่วยเป็นโมลาร์

C = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ หน่วยเป็นมิลลิลิตร

<u>การคำนวณ</u>

ยกตัวอย่างตัวอย่างน้ำเริ่มต้น ใช้ปริมาณ FAS ในการไตเตรท 1.3 มิลลิลิตร

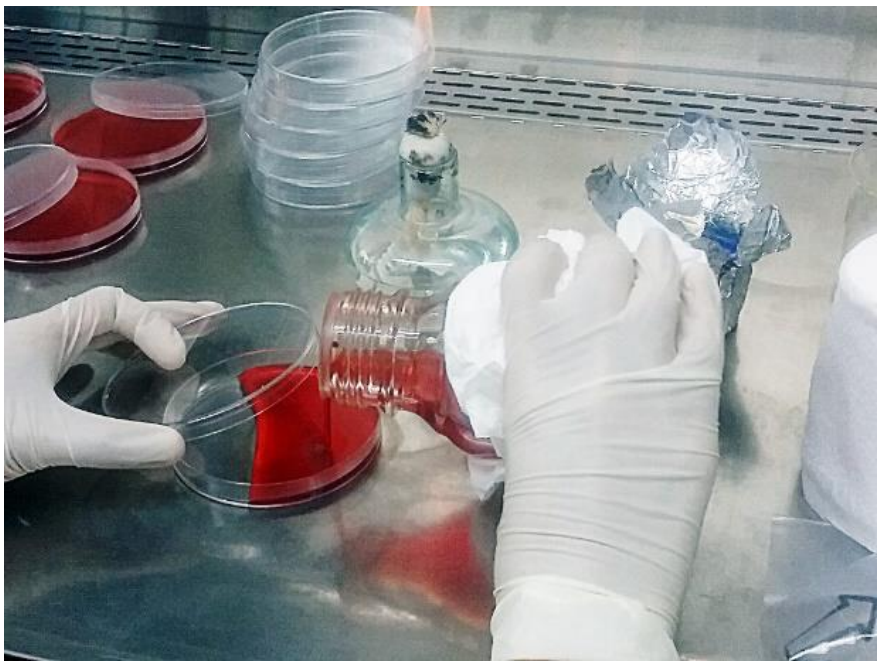
ปริมาณน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร

ปริมาตรของ FAS ที่ใช้ในการไตเตรทBlank 2.3 มิลลิลิตร

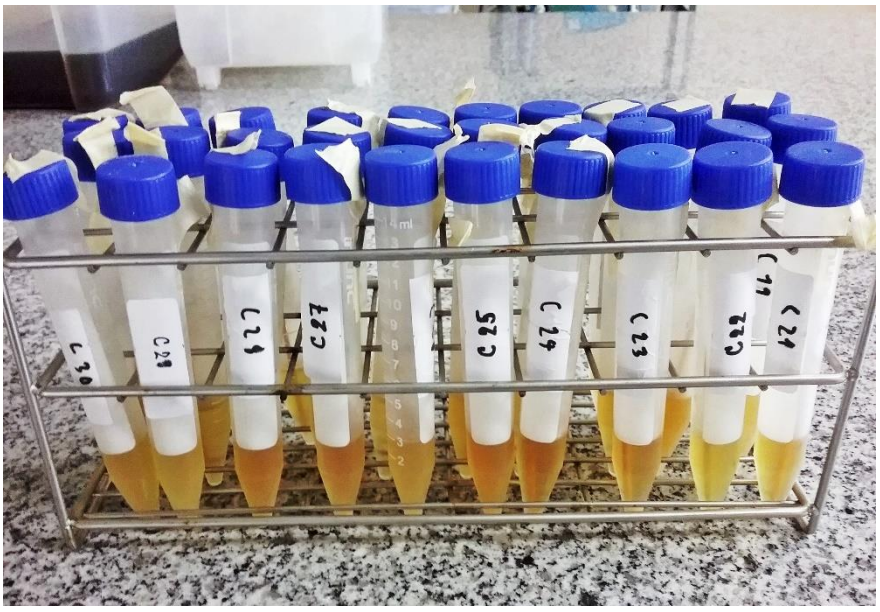
ปริมาณ Digestion reagent 3 มิลลิลิตร

$$\text{COD} = \left(2.3-1.3\right)\left(\frac{3\times 0.0167}{1.3}\times 8000\right)/5 = 1171.569 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

ภาคผนวก ข รูปภาพการทดลอง



รูปที่ ข.1 การเตรียมอาหารลี้ยงเชื้อแบบแข็ง



รูปที่ ข.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหารเหลว

รูปที่ ข.3 ทดสอบปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง Spectrophotometer

รูปที่ ข.4 ลักษณะเม็ดตรึงใน Packed bed reactor

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

1. ผู้รับผิดชอบ ประกอบด้วย

1.1 หัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) นายวิทวัส แจ้งเอี่ยม

(ภาษาอังกฤษ) Mr.Witawat Jangiam

หน่วยงานหลัก ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

โทรศัพท์ : 038-102222 (ต่อ 3350)

แฟกซ์ : 038-102222 (ต่อ 3351)

1.2 ผู้ร่วมวิจัย (ภาษาไทย) นางสาว ธิดา สุพัฒนาศิริ

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Thida Supattanasiri

หน่วยงานหลัก บริษัท เบอร์ลี่ ยุคเกอร์ เซลล็อกซ์ จำกัด

โทรศัพท์ : 02-312-6115

แฟกซ์ : 02-312-6173