**การคัดเลือกและประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ**

**Selection and efficiency of lignin degradation by bacteria isolated from wastewater in the pulp and paper industry**

ศิรภัสสร อนุสราภรณ์ อสมา ถาวรพงศ์สถิตย์ กำพล นันทพงษ์ และ ภิรมย์ น้อยสำแดง\*

Siraphatsorn Anusaraporn Asama Tavornpongstid Kampol Nanthapong and Pirom Noisumdaeng\*

*คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12121*

*Faculty of Public Health, Thammasat University (Rangsit Centre), Khlong Luang, Pathum Thani 12121*

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายลิกนินรวมถึงศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในตัวอย่างน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ การทดสอบขั้นต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal salt medium (MSM) ที่มีส่วนผสมของ methylene blue เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสจากแบคทีเรียบริสุทธิ์จำนวน 30 ไอโซเลท (VP1-VP30) ที่ได้จากการสุ่มโคโลนีพบว่ามีจำนวน 14 ไอโซเลท (14/30 หรือร้อยละ 46.67) ที่ให้วงใสรอบบริเวณเชื้อและมีค่าสูงสุดคือ 4.0 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 2.1 มิลลิเมตร) และพบว่ามีแบคทีเรีย 4 ไอโซเลทได้แก่ VP13 VP16 VP19 และ VP23 ให้ขนาดวงใสเพิ่มขึ้นจากวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 ของการทดสอบโดยมีขนาดวงใสระหว่าง 3.0-4.0 มิลลิเมตรและทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทรวมถึงเชื้อมาตรฐานห้องปฏิบัติการ *B. subtilis* มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ และทำการตรวจวัดโดยวิธีทางกายภาพพบว่าความเข้มสีน้ำตาลของลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของเชื้อ VP16 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ ในวันที่ 15 ของการทดสอบ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีเชื้อแบคทีเรียในแต่ละชุดการทดสอบมาทำการวัดค่าความเข้มข้นลิกนินด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD280 พบว่าเชื้อไอโซเลท VP16 มีประสิทธิภาพลดความเข้มข้นลิกนินได้ร้อยละ 41.20 ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ รวมถึง *B. subtilis* ถึง 1.4-2.6 เท่า นอกจากนี้เมื่อวัดค่าซีโอดีโดยวิธี close reflux method พบว่าเชื้อไอโซเลท VP16 มีประสิทธิภาพลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 33.33 ซึ่งมีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ ขณะที่ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพลดค่าซีโอดีได้เพียงร้อยละ 15.39

**คำสำคัญ :** น้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ ลิกนิน แบคทีเรียย่อยสลายลิกนิน ลิกนินเพอร์ออกซิเดส

**\*Corresponding author. E-mail:** pirom.n@fph.tu.ac.th

**Abstract**

The aims of this research were to isolate the lignin-degrading bacteria from wastewater in the pulp and paper industry and to study lignin degradation efficiency of selected bacteria in the synthetic lignin wastewater. Thirty purified bacterial isolates (VP1-VP30) obtained by randomly colonial selection were primarily tested for lignin peroxidase enzyme production by using minimal salt medium (MSM) containing methylene blue. As a result, 14 of 30 isolates (46.67%) could generate the clear zone with showing the largest size of 4.0 millimeters (average 2.1 millimeters). Among those isolates, VP13 VP16 VP19 and VP23 isolates showed the increasing size of clear zone from 2.0-3.0 millimeters (day 5) to 3.0-4.0 millimeters (day 7); and all of them were gram positive bacteria with rod-shape. Thus, these 4 isolates and also *Bacillus subtilis* laboratory strain were selected for further testing lignin degradation efficiency in synthetic lignin wastewater. Interestingly, the results found that VP16 isolate could more clearly reduce brown color of lignin presented in synthetic lignin wastewater after incubating 15 days with observing by physical color measurement, and it had efficiently degraded linin by showing removal efficiency of 41.20%, which was 1.4-2.6 times higher comparing to other isolates and *B. subtilis* by measuring concentration of lignin at OD280. In addition, VP16 isolate had the highest removal efficiency of 33.33% to reduce COD measured by close reflux method in synthetic lignin wastewater.

**Keywords :** wastewater in the pulp and paper industry, lignin, lignin-degrading bacteria, lignin peroxidase

**บทนำ**

จากสถานการณ์อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ กระดาษ และสิ่งพิมพ์ในประเทศไทย ปี พ.ศ.2560 พบว่า มีทิศทาง การขยายตัวทางเศรษฐกิจเพิ่มมากขึ้น โดยอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่มีกำลังการผลิตมากและถูกจัดอันดับ 1 ใน 5 ของอุตสาหกรรมที่เป็นสาเหตุของมลภาวะทางน้ำเนื่องจากมีกระบวนการผลิตหลายขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการใช้น้ำและส่งผลก่อให้เกิดปริมาณน้ำเสียจำนวนมาก (Yonsuwan, 2009) ซึ่งลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจะมีสีน้ำตาลเข้มโดยเกิดจากสีของสารลิกนินที่เป็นองค์ประกอบในเปลือกไม้มีการปนเปื้อนจากขั้นตอนการฟอกสีของอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ (Apiwatanapiwat *et al.*, 2007) จึงทำให้มีค่าบีโอดี (biochemical oxygen demand, BOD) ซีโอดี (chemical oxygen demand, COD) สี ความขุ่นและปริมาณสารแขวนลอยในน้ำเสียปริมาณสูง (Fuangkaeow, 2015) อย่างไรก็ตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งจากกรมโรงงานอุตสาหกรรมไม่ได้กำหนดมาตรฐานตัวเลขชัดเจนแต่กำหนดเพียงสีของน้ำทิ้งจะต้องไม่ให้เป็นที่น่ารังเกียจและค่าซีโอดีต้องผ่านเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม ซึ่งกำหนดไว้ไม่เกิน 120 มิลลิกรัมต่อลิตร (Apiwatanapiwat *et al.*, 2007) ลิกนินเป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกที่พบในส่วนผนังเซลล์ของพืชในธรรมชาติ ลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบสามมิติ ไม่ตกผลึก จึงทำให้ลิกนินเป็นสารที่ย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก (Pawongrat, 2015) ดังนั้นน้ำเสียที่มีส่วนประกอบของสารลิกนินในเปลือกไม้ปนเปื้อนอยู่จึงนับเป็นปัญหาที่สำคัญ เมื่อน้ำเสียถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกจะส่งผลกระทบต่อแหล่งน้ำที่รองรับน้ำเสียโดยทำให้แหล่งน้ำดังกล่าวเกิดสภาพที่น่ารังเกียจอีกทั้งยังมีปริมาณสารอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีค่าซีโอดีสูงขึ้น นอกจากนี้ยังกั้นขวางทางเดินของแสงทำให้ปริมาณแสงส่องผ่านลงสู่แหล่งน้ำลดลงส่งผลรบกวนต่อการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำในการผลิตออกซิเจน ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำเป็นสาเหตุของการตายของสิ่งมีชีวิตในน้ำจำนวนมาก (Chooaksorn, 2012) เพื่อลดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมจึงจำเป็นต้องบำบัดน้ำทิ้งให้ได้มาตรฐานก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 (พ.ศ.2539) ออกตามความในพระราชบัญญัติโรงงาน พ.ศ.2535 เรื่อง กำหนดคุณลักษณะของน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงาน (Ministry of Industry, 2017) อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีเทคโนโลยีการบำบัดน้ำเสียทั้งทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ซึ่งมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน แต่การเลือกใช้เทคโนโลยีทางกายภาพจะทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย อีกทั้งทางเคมีโดยการใช้สารเคมีในการกำจัดสีจะทำให้เกิดตะกอน อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มสารเคมีเข้าสู่ระบบสิ่งแวดล้อม (Siripornvisal, 2010) จึงทำให้การบำบัดด้วยเทคโนโลยีทางชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์เป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมากำจัดสีและลดค่าซีโอดีก่อนปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (Songrit & Kositanont, 2014) โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายลิกนินในกระบวนการบำบัดน้ำเสียได้แก่ราและแบคทีเรีย (El-Hanafy, *et al*., 2007; Li, *et al*., 2009; Huang, *et al*., 2013; Harith *et al*., 2014; Lotfi, 2014; Wang, *et al*., 2016; Datta *et al.*, 2017) ซึ่งแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่เลี้ยงง่ายและมีกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพที่สำคัญ คือ การสร้าง extracellular enzyme เช่น ลิกนินเพอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสมาย่อยสลายลิกนิน (Li, *et al*., 2009; Verma & Ekka, 2015; de Gonzalo *et al*., 2016) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนลิกนินโดยเฉพาะในน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ ซึ่งสันนิษฐานว่าจะมีเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมทางชีวภาพเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลิกนินอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสีย รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย การกำจัดสีและลดค่าซีโอดีในน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำหรือในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนลิกนินต่อไป

**วิธีดำเนินการวิจัย**

**1. ตัวอย่างน้ำเสีย**

เก็บตัวอย่างน้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบบ่อเติมอากาศ (aerated lagoon) ของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษแห่งหนึ่งในจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 3 จุด ได้แก่ จุดที่ 1 จากบ่อตกตะกอนข้างต้น (pre-sedimentation) จุดที่ 2 จากบ่อเติมอากาศ 1 (aeration 1) และจุดที่ 3 จากบ่อตกตะกอนจุลินทรีย์ (sedimentation 1)ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยวิธี Grab sampling (Sasikumar *et al.*, 2014) ลงในขวดพลาสติกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บตัวอย่างน้ำเสียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสีย**

**2.1 การคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง**

ปิเปตน้ำเสียจากบ่อเติมอากาศ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มี 0.85% normal saline ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้ระดับความเจือจางที่ 10-1จากนั้นทำการเจือจางแบบ 10-fold serial dilution โดยปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี 0.85% normal saline ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (ได้ระดับความเจือจาง 10-2) ทำการเจือจางต่อไปจนถึงระดับความเข้มข้น 10-9 จากนั้นปิเปต bacterial suspension ที่ความเข้มข้น 10-3 ถึง 10-9 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อ (spread plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient agar (NA) โดยทำ 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารลี้ยงเชื้อ NA และคำนวณปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำเสียปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเลือกคำนวณจากความเจือจางที่เหมาะสม (มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี) ดังสมการ

N = n / vd (1)

กำหนดให้ N คือ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)

n คือ ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้จากระดับความเจือจางที่นำมาคำนวณ

v คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (ml)

d คือ ระดับความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาคำนวณ

#### **2.2 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (pure culture)**

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแบบสุ่ม (random selection) จากโคโลนีที่มีลักษณะต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 30 โคโลนี ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีและทำการลาก (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์และทำการเก็บเชื้อที่ได้บนอาหารวุ้นเอียง (NA slant) ที่ 4 องศาเซลเซียส

**2.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียและการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส**

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง minimal salt medium (MSM ซึ่งประกอบด้วย K2HPO4 1.8 กรัม KH2PO4 1.2 กรัม NH4Cl 4 กรัม MgSO4·7H2O 0.2 กรัม NaCl 0.1 กรัม FeSO4·7H2O 0.01 กรัม Agar 15 กรัม น้ำกลั่น 1,000 ลิตร) ที่มีส่วนผสมของ methlylene blue 0.25 กรัมต่อลิตร (MSM+methylene blue) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดกรองความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (Sasikumar *et al.*, 2014) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตขนาดของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบบริเวณเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นโดยวัดจากขอบโคโลนีถึงขอบของวงใส ทำการย้อมสีด้วยเทคนิคการย้อมแกรม (gram’s staining) (Maneechai & Thongkrua, 2016) เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)

### **3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์**

#### **3.1 การออกแบบชุดการทดสอบ**

เลือกเชื้อแบคทีเรียที่ให้ขนาดวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM+methylene blue มากที่สุดสำหรับใช้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐานห้องปฏิบัติการ *B. subtilis* ร่วมกับชุดควบคุม (น้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่มีแบคทีเรีย) ซึ่งในการศึกษาได้ออกแบบการทดลอง ดังนี้

- เตรียม bacterial starter culture : นำลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการใส่ลงในหลอดทดลอง (inoculation) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth (NB) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียให้ได้ saturated bacterial culture

- การเตรียมน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ : ได้ดัดแปลงจากงานวิจัยของกุลยา โรจน์พานิชและคณะ (Rojpanit *et al.*, 2017) โดยน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์มีองค์ประกอบดังนี้: KH2PO4 0.8870 กรัม MgSO4∙7H2O 0.0567 กรัม CaCl2 0.0308 กรัม และ alkali lignin (Sigma-Aldrich) 1.0000 กรัม ปรับค่า pH เท่ากับ 7 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

- การทดสอบแบคทีเรียย่อยสลายลิกนิน : ปิเปต saturated bacterial culture ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน โดยมีน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่มีแบคทีเรียเป็นชุดควบคุม สังเกตลักษณะทางกายภาพ สี ความขุ่น พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างนำมาวัดค่าความเข้มข้นของลิกนินและค่าซีโอดี

#### **3.2 การวัดค่าความเข้มข้นลิกนินด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer หรือ BioDrop**

ทำกราฟ standard curve ของลิกนิน โดยเตรียมน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.01 0.1 1 10 และ 100 กรัมต่อลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD280) ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการหาความเข้มข้นลิกนิน (Kallavus *et al.*, 2015) ด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer for micro volume หรือ BioDrop โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีส่วนผสมของลิกนินเป็นค่าอ้างอิง (blank) ทำ 3 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นลิกนินจาก standard curve ทำการวัดค่าความเข้มข้นลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์แต่ละชุดการทดสอบที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียไอโซเลท VP13 VP16 VP19 VP23 *B. subtilis* และชุดควบคุม คือน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่มีแบคทีเรียที่ OD280 ในวันที่ 0 1 2 3 5 7 12 และ 15 ของการทดสอบ โดยการวัดในแต่ละชุดการทดสอบจะวัด 3 ซ้ำ และนำค่าความเข้มข้นลิกนินดังกล่าวมาคำนวณในการหาค่าร้อยละความเข้มข้นลิกนินที่ลดลง ดังนี้

ร้อยละความเข้มข้นลิกนินที่ลดลง (% removal efficiency) = [(C.lignin0- C.lignin15) x 100] / C.lignin0] (2)

กำหนดให้ C.lignin0 คือ ค่าความเข้มข้นลิกนินของน้ำเสียในวันที่ 0 (g/L) ของการทดสอบ

C.lignin15 คือ ค่าความเข้มข้นลิกนินของน้ำเสียในวันที่ 15 (g/L) ของการทดสอบ

**3.3 การวัดค่าซีโอดีโดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด (closed reflux method)** (Baird *et al.*, 2017)

เจือจางน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ในแต่ละชุดการทดสอบ และน้ำเสียจริงจากระบบบำบัดน้ำเสีย โดยการปิเปตน้ำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงหลอดทดลองและเติมน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตน้ำตัวอย่างที่ทำการ เจือจางแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองบอโรซิลิเคท จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม ไดโครเมต (K2Cr2O7) ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรและเติมกรดซัลฟิวริกรีเจนต์ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตรในน้ำตัวอย่างอย่างช้าๆ นำหลอดทดลองใส่ไว้ใน heating block แล้วอบที่มีอุณหภูมิ 150±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและเทน้ำตัวอย่างลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หยดเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ 3 หยด จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมน้ำเงิน จากนั้นไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) ความเข้มข้น 0.05 N จนถึงจุดยุติโดยจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดงอิฐ บันทึกผลการใช้สารละลายมาตรฐาน FAS ของน้ำตัวอย่าง และนำค่าดังกล่าวมาคำนวณในสมการการหาค่าซีโอดี ดังนี้

ค่าซีโอดี (มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร) =   [(A-B) x  M  x  8,000] / ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร) (3)

กำหนดให้ A คือ ปริมาตรของ FAS ที่ใช้ในการไทเทรต blank (มิลลิลิตร) ซึ่ง blank คือน้ำกลั่น   
                    B คือ ปริมาตรของ FAS ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)  
                    M คือ ความเข้มข้นของ FAS (N)

นอกจากนี้นำค่าซีโอดีที่คำนวณได้มาคำนวณต่อไปในการหาค่าร้อยละซีโอดีที่ลดลง ดังนี้

ค่าร้อยละซีโอดีที่ลดลง = [(COD0-COD15) x 100] / COD0 (4)

กำหนดให้ COD0 คือ ค่า COD ของน้ำเสียในวันที่ 0 (mgO2/L) ของการทดสอบ

COD15 คือ ค่า COD ของน้ำเสียในวันที่ 15 (mgO2/L) ของการทดสอบ

**ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล**

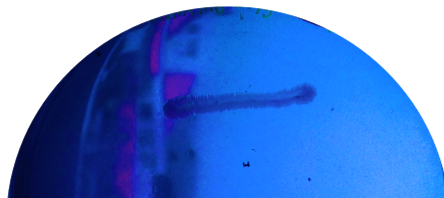
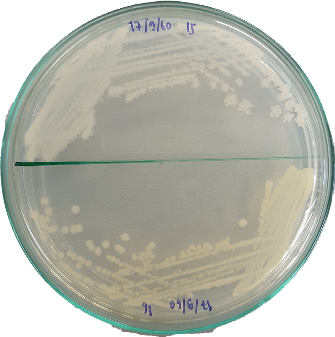
## **1. การวัดค่าซีโอดีในน้ำเสียอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ**

## ผลการวัดค่าซีโอดีในน้ำเสียอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษจากระบบบำบัด 3 จุด พบว่ามีสารอินทรีย์ในปริมาณสูงโดยน้ำเสียจากบ่อตกตะกอนขั้นต้นมีค่าซีโอดีเท่ากับ 2,240 mgO2/L น้ำเสียจากบ่อเติมอากาศ 1 มีค่าซีโอดีเท่ากับ 1,440 mgO2/L และน้ำเสียจากบ่อตกตะกอนจุลินทรีย์ 1 มีค่าซีโอดีเท่ากับ 960 mgO2/L

**2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียและการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส**

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อเติมอากาศ 1 ด้วยวิธี standard plate count โดยการทำ serial dilution และ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA พบว่า สามารถนับจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวอย่างที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 6.35×105 CFU/ml และทำการคัดเลือกโคโลนีแบบสุ่ม (random selection) จากลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจำนวน 30 โคโลนี (5 โคโลนีต่อ 1 ลักษณะ) มาทำการ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ก่อนนำไปทดสอบขั้นต่อไป ดังนั้นจากงานวิจัยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท (VP1–VP30)

ผลการนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ข้างต้นไปทดสอบคัดกรองความสามารถในการสร้างเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส โดยการขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MSM+methylene blue สังเกตการเจริญและวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีจำนวน 14 ไอโซเลท (14/30 คิดเป็น 46.67 %) ได้แก่ VP1 VP5 VP6 VP7 VP9 VP11 VP13 VP14 VP16 VP19 VP21 VP23 VP26 และ VP29 สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้ช่วงขนาดวงใสจากขอบโคโลนีถึงขอบวงใส ในวันที่ 5 มีขนาดวงใสในช่วง 1.0-3.0 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 1.9 มิลลิเมตร) และในวันที่ 7 มีขนาดวงใสในช่วง 1.0-4.0 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 2.1 มิลลิเมตร) และมีเพียง 4 ไอโซเลทที่มีค่าขนาดวงใสที่เพิ่มขึ้นจากวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 ได้แก่ไอโซเลท VP13 VP16 VP19 และ VP23 โดยมีขนาดวงใสระหว่าง 3.0-4.0 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 1และตารางที่ 1 การเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแสดงว่าแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสออกมาย่อยสลาย methylene blue ทำให้เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีฟ้าเป็นไม่มีสี และเมื่อนำแบคทีเรียไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะการติดสีย้อมและรูปร่าง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและมีรูปร่างท่อน จากผลการทดลองจึงได้เลือกแบคทีเรียไอโซเลท VP13 VP16 VP19 และ VP23 ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินต่อไป



ก. แบคทีเรียบริสุทธิ์

บนอาหาร NA

ค. แบคทีเรียไอโซเลท VP4 บนอาหาร MSM+methylene blue

ข. แบคทีเรียไอโซเลท VP16 บนอาหาร MSM+methylene blue

**ภาพที่ 1** การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จากตัวอย่างน้ำเสียอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ

**ตารางที่ 1** ผลการทดสอบคัดกรองการสร้างเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| รหัสเชื้อ | ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)\* บน MSM+methylene blue | | รหัสเชื้อ | ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)\* บน MSM+methylene blue | |
| **Day 5** | **Day 7** | **Day 5** | **Day 7** |
| VP1 | 1.0 | 1.0 | **VP16** | 3.0 | 4.0 |
| VP2 | - | - | **VP17** | - | - |
| VP3 | - | - | **VP18** | - | - |
| VP4 | - | - | **VP19** | 2.0 | 3.0 |
| VP5 | 2.0 | 2.0 | **VP20** | - | - |
| VP6 | 2.0 | 2.0 | **VP21** | 2.0 | 2.0 |
| VP7 | 2.0 | 2.0 | **VP22** | - | - |
| VP8 | - | - | **VP23** | 3.0 | 4.0 |
| VP9 | 1.0 | 1.0 | **VP24** | - | - |
| VP10 | - | - | **VP25** | - | - |
| VP11 | 2.0 | 2.0 | **VP26** | 2.0 | 2.0 |
| VP12 | - | - | **VP27** | - | - |
| VP13 | 2.0 | 3.0 | **VP28** | - | - |
| VP14 | 1.0 | 1.0 | **VP29** | 1.0 | 1.0 |
| VP15 | - | - | **VP30** | - | - |

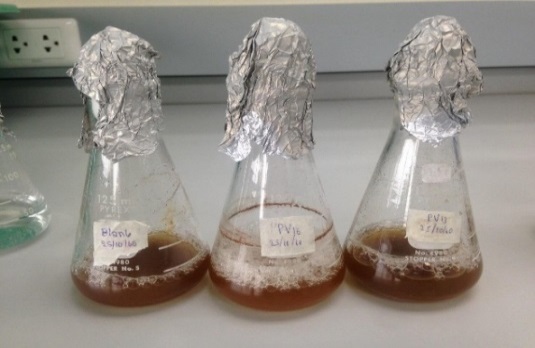
หมายเหตุ : - ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่เกิดวงใส

\* ขนาดของวงใส = วัดจากขอบโคโลนีถึงขอบวงใส

**3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินของแบคทีเรียในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์**

**3.1 ผลการสังเกตทางกายภาพ**

จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพได้แก่สีของน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ผสมกับเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท VP13 VP16 VP19 VP23 และเชื้อมาตรฐานห้องปฏิบัติการ *B. subtilis* หลังจาก 15 วัน ด้วยตาเปล่าพบว่า สีน้ำตาลของลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของเชื้อ VP16 ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังภาพที่ 2



น้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย (ชุดควบคุม)

น้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของเชื้อไอโซเลท VP16

น้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของเชื้อไอโซเลท VP13

**ภาพที่ 2** ลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของเชื้อไอโซเลท VP16 เปรียบเทียบกับน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของเชื้อไอโซเลท VP13 และน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย

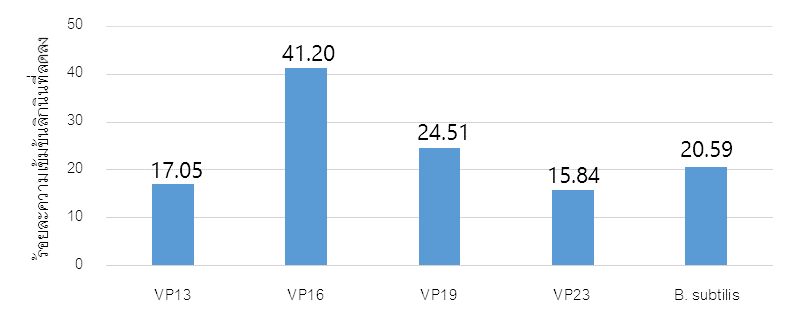
**3.2 ผลการวัดค่าความเข้มข้นลิกนินด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer**

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในแต่ละชุดการทดสอบได้แก่ ไอโซเลท VP13 VP16 VP19 VP23และ *B. subtilis* ในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD280 ด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer for micro volume หรือ BioDrop และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณความเข้มข้นของลิกนินเทียบจากกราฟ standard curve ดังภาพที่ 3 พบว่าชุดการทดสอบที่มีแบคทีเรียไอโซเลท VP16 ในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนิน โดยให้ค่าร้อยละความเข้มข้นลิกนินที่ลดลง (% removal efficiency) ถึง 41.20 ในระยะเวลา 15 วัน ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินต่ำกว่า โดยมีค่าความเข้มข้นของลิกนินที่ลดลงในช่วงร้อยละ 15.84-28.63 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ น้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่เติมแบคทีเรีย ดังภาพที่ 4

**ภาพที่ 3** กราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ OD280 และความเข้มข้นลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.01 0.1 1 10 และ 100 g/L

**3.3 ผลการวัดค่าซีโอดีแบบรีฟลักซ์แบบปิด (closed reflux method)**

จากการวัดค่าซีโอดีในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทในแต่ละชุดการทดสอบ พบว่าเชื้อไอโซเลท VP16 มีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ได้ร้อยละ 33.33 ซึ่งเป็นอัตราการลดลงที่มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ ในขณะที่ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 15.39 แสดงดังภาพที่ 5

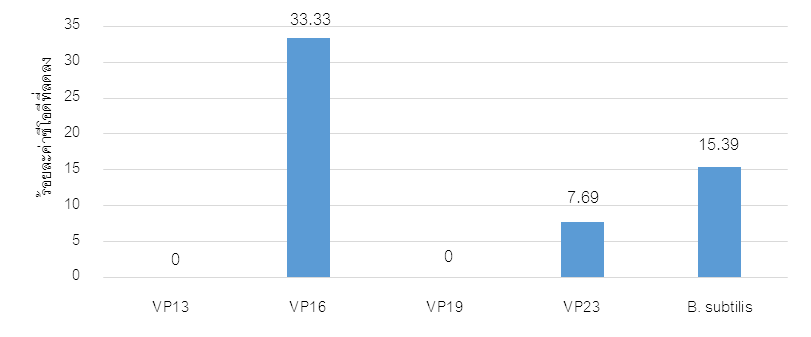


แบคทีเรียไอโซเลท

*B. subtilis*

**ภาพที่ 4** ประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้และเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานจากห้องปฏิบัติการ

แบคทีเรียไอโซเลท



*B. subtilis*

**ภาพที่ 5** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ โดยการวัดค่าซีโอดีและคำนวณประสิทธิภาพเป็นร้อยละของค่าซีโอดีที่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน

**4. วิจารณ์ผลการทดลอง**

จากการวัดค่าซีโอดีในน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษเบื้องต้นพบว่ามีสารอินทรีย์อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียตั้งแต่บ่อตกตะกอนขั้นต้นถึงบ่อตกตะกอนจุลินทรีย์ในปริมาณสูงและมีลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ความขุ่นและสีน้ำตาลของลิกนินเข้มมากแสดงให้เห็นถึงการมีปริมาณลิกนินอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งลิกนินเป็นองค์ประกอบของเปลือกไม้มีสีน้ำตาลเข้ม ดังนั้นในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษจึงมีกระบวนการฟอกสีเพื่อกำจัดสีส่งผลให้มีปริมาณลิกนินปนเปื้อนมากับน้ำเสียจากกระบวนการผลิตกระดาษ (Apiwatanapiwat *et al.*, 2007) ซึ่งระบบการบำบัดน้ำเสียในปัจจุบันได้ให้ความสำคัญต่อวิธีการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพมากขึ้นโดยการใช้จุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียและราที่สามารถผลิต ligninolytic enzymes ในการย่อยสลายลิกนิน (Datta *et al.*, 2017) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินจากสภาพแวดล้อมจริง ซึ่งน่าจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งอื่นเพราะได้ผ่านการคัดเลือกตามธรรมชาติแล้ว (Chitpirom & Sangaroon, 2012; Mookkhan, *et al*. 2017) โดยผลการศึกษาพบว่า บ่อเติมอากาศในระบบบำบัดน้ำเสียมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 6.35x105 CFU/ml ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัย (Rojpanit *et al.*, 2017) และได้ระบุว่าแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปพัฒนาจากจุลินทรีย์จากบ่อเกรอะซึ่งมีจุลินทรีย์ที่หลากหลาย เมื่อเดินระบบไปนานพอจนมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ตามธรรมชาติทำให้เหลือแต่จุลินทรีย์ชนิดที่เหมาะสมและมีปริมาณของจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ (Songrit & Kositanont, 2014) จากนั้นทำการสุ่มคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ตามลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ได้เชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมด 30 ไอโซเลท (VP1-VP30) เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีส่วนผสมของ methylene blue (0.25 กรัมต่อลิตร) โดย methylene blue เป็นสารประกอบอะโรมาติกและมีโครงสร้างที่คล้ายกับโครงสร้างของลิกนิน อีกทั้งยังเป็นอินดิเคเตอร์ในการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสในการย่อยสลายลิกนินได้ (Bholay *et al.*, 2012) ผลที่ได้จึงทำให้เกิดวงใสขึ้นรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยผลการทดสอบพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่ให้วงใสจำนวนทั้งหมด 14 ไอโซเลท และมีเพียง 4 ไอโซเลท ได้แก่ VP13 VP16 VP19 และ VP23 ที่ให้ขนาดวงใสมากที่สุดรวมทั้งพบการเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 และ 7 ของการทดสอบ เมื่อทำการย้อมแกรมพบว่า ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จากการทดลองแสดงว่างานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสได้ สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่รายงานว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มที่มีคุณสมบัติย่อยสลายลิกนินได้จากตัวอย่างดิน ถ่านหิน และจากน้ำเสียอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษสา (El-Hanafy, *et al*., 2007; Huang, *et al*., 2013; Maneechai & Thongkrua, 2016; Wang, *et a*l., 2016) และพบว่ามีแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สามารถย่อยลิกนิน (El-Hanafy, *et al*., 2007; Li, *et al*., 2009; Huang, *et al*., 2013; Harith *et al*., 2014; Lotfi, 2014; Wang, *et al*., 2016; Datta *et al.*, 2017) เมื่อนำแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ได้แก่ VP13 VP16 VP19 และ VP23 รวมทั้งเชื้อมาตรฐานห้องปฏิบัติการ *B. subtilis* มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์เป็นเวลา 15 วัน ซึ่งการเลือก *B. subtilis* มาทดสอบเปรียบเทียบด้วย เนื่องจากมีงานวิจัยระบุว่าแบคทีเรียตระกูล *Bacillus* sp. เกี่ยวข้องกับการลดสีและการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษด้วยการย่อยสลายลิกนินได้ (Raj *et al.*, 2007) ผลการทดสอบพบว่าชุดการทดสอบที่มีแบคทีเรียไซเลท VP16 มีความเข้มสีน้ำตาลของลิกนินลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดสอบแบคทีเรียไอโซเลทอื่นและชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียลงไปในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์) จากนั้นได้ทำการวัดหาร้อยละค่าความเข้มข้นลิกนินที่ลดลง (% removal efficiency) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งความยาวคลื่นดังกล่าวนอกจากจะใช้วัดปริมาณโปรตีนแล้ว (Anthis & Clore, 2013) ยังสามารถนำมาใช้วัดค่าความเข้มข้นของลิกนินได้ (Kallavus *et al.*, 2015) โดยเชื้อไอโซเลท VP16 สามารถลดความเข้มข้นลิกนินได้ร้อยละ 41.20 ซึ่งมากกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นรวมทั้ง *B. subtilis* ถึง 1.4-2.6 เท่า นอกจากนี้ยังทำการวัดหาค่าซีโอดีโดยวิธี close reflux method ในแต่ละชุดการทดสอบ ซึ่งการวัดค่าซีโอดีโดยวิธี close reflux method เป็นวิธีการตรวจสอบน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เป็นไปตาม standard methods for the examination of water and wastewater โดย American Public Health Association, American Water Work Association และ Water Environment Federation ของประเทศสหรัฐอเมริกา (Baird *et al.*, 2017) หรือตามที่กรมโรงงานอุตสาหกรรมกำหนด (Ministry of Industry, 2017) และพบว่าเชื้อไอโซเลท VP16 สามารถลดค่า COD ได้ร้อยละ 33.33 ซึ่งมากกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นรวมถึง *B. subtilis*

**สรุปผลการวิจัย**

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากบ่อเติมอากาศในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ พบว่าในตัวอย่างน้ำเสียมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ปริมาณ 6.35x105 CFU/ml สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท (VP1-VP30) เมื่อทำการทดสอบคัดกรองเพื่อดูความสามารถในการสร้างเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีส่วนผสมของ methylene blue พบว่ามีจำนวนแบคทีเรีย 14 ไอโซเลท (14/30 หรือร้อยละ 46.67) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและให้วงใสรอบโคโลนี และพบว่ามีแบคทีเรียที่ให้ขนาดวงใสของการย่อยสลายสูงสุด (ช่วงขนาด 3.0-4.0 มิลลิเมตร) จำนวน 4 ไอโซเลทได้แก่ VP13 VP16 VP19 และ VP23 โดยแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท VP13 VP16 VP19 และ VP23 รวมถึงเชื้อมาตรฐานห้องปฏิบัติการ *B. subtilis* มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ และทำการตรวจวัดโดยวิธีทางกายภาพ พบว่าความเข้มสีน้ำตาลของลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของเชื้อ VP16 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีเชื้อแบคทีเรียในแต่ละชุดการทดสอบมาทำการวัดค่าความเข้มข้นของลิกนินด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD280 พบว่าเชื้อไอโซเลท VP16 มีประสิทธิภาพลดความเข้มข้นลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ได้ร้อยละ 41.20 ส่วนเชื้อ VP13 VP19 VP23 และ *B. subtilis* สามารถลดความเข้มข้นลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ได้ร้อยละ 17.05 24.51 15.84 และ 20.59 ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อวัดค่าซีโอดีโดยวิธี close reflux method พบว่า เชื้อไอโซเลท VP16 มีประสิทธิภาพลดค่าซีโอดีได้มากสุดคือร้อยละ 33.33 อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการขั้นต้นเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้เป็นเชื้อจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในสภาวะจริงที่มีการปนเปื้อนลิกนิน อีกทั้งยังสามารถเพาะเลี้ยงง่าย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาและพัฒนาเชื้อเพิ่มเติมต่อไปก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้จริงในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ ซึ่งจะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

**กิตติกรรมประกาศ**

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณบวรพล พุทธซ้อน เจ้าหน้าที่ฝ่ายสิ่งแวดล้อมของบริษัท ที่ให้ความอนุเคราะห์อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ ขอขอบคุณบริษัทไซแอนติฟิค โปรดักชั่น จำกัด ในการจัดตั้งเครื่อง UV/Visible spectrophotometer (BioDrop)และขอขอบคุณคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนด้านห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาและสิ่งแวดล้อม ห้องปฏิบัติการเคมี รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คุณวราภรณ์ กล่อมจิต คุณณัฐพงศ์ ยมศมิตและคุณภคมน ขันธะวิมุตติ ที่อำนวยความสะดวก ช่วยเหลือและจัดหาวัสดุอุปกรณ์ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุงล่วงไปได้ด้วยดี

**เอกสารอ้างอิง**

Anthis, N.J. & Clore, G.M. (2013). Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. *The Protein Society,* 22, 851-858.

Apiwatanapiwat, W., Kreetachat, T. & Vaithanomsat, P. (2007). Decolorization of effluent from pulp and paper mill by ozone oxidation. In *Proceedings of 45th Kasetsart University Annual Conference: Architecture and Engineering and Natural Resources and Environment*. (pp. 825-834). (in Thai)

Baird, R.B., Eaton, A.D. & Rice, E.W. (2017). Chemical Oxygen Demand (COD): Closed Reflux, Titrimetric Method. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition.* (pp.240-241). Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation.

Bholay, A.D., Borkhataria, B. V., Jadhav, P.U., Palekar, K.S., Dhalkari, M. V. & Nalawade, P.M. (2012). Bacterial Lignin Peroxidase: A Tool for Biobleaching and Biodegradation of Industrial Effluents. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 2(1), 58-64

Chitpirom, K. & Sangaroon, P. (2012). Detection of Lipolytic Bacteria from Environmental Samples. *Journal of Public Health*, 42(3), 3-18. (in Thai)

Chooaksorn, W. (2012). Color Removal Technology in Industrial Wastewater. *Burapha Science Journal*, 17(1), 181-191. (in Thai)

Chungsiriporn, J., Tongsang, N., Wongmayura, W. & Intamanee, J. (2009). Removal of COD and color in wastewater from box paper factory by Fenton reaction. In *The 7th PSU-UNS International Conference on Engineering and Technology*. (pp. 1-6). (in Thai)

Datta, R., Kelkar, A., Baraniya, D., Molaei, A., Moulick, A., Meena, R.S. & Formanek, P. (2017). Enzymatic De- gradation of Lignin in Soil. *Sustainability*, 9, 1-18.

de Gonzalo, G., Colpa, D.I., Habib, M.H.M., & Fraaije, M.W. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, 236,110–119.

El-Hanafy, A.A., Abd-Elsalam, H.E., & Hafez, E.E. (2007). Fingerprinting for the lignin degrading bacteria from the soil. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(6), 470-475, 2007.

Fuangkaeow, M. (2015). *The Utilization of Fly Ash and Consructed Wetland for Tertiary Treatment of Effluent Pulp and Paper Industrial Wastewater Treatment Plant*. (Master’s thesis, Kasetsart University). (in Thai)

Harith, Z.T., Ibrahim, N.A., & Yusoff, A. (2014). Isolation and identification of locally isolated lignin degrading bacteria. *Journal of Sustainability Science and Management,* 9(2*)*, 114-118.

Huang, X., Santhanam, N., Badri, D.V., Hunter, W.J., Manter, D.K., Decker, S.R., Vivanco, J.M., & Reardon, K.F. (2013). Isolation and characterization of lignin-degrading bacteria from rainforest soils. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6), 1616-1626.

Li, J., Yuan, H. & Yang, J. (2009). Bacteria and lignin degradation. *Frontier of Biology in China*, 4(1), 29–38.

Lotfi, G. (2014). Lignin-degrading bacteria. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 20(1), 64-68.

Kallavus, U., Kärner, K., Kärner, K. & Elomaa, M. (2015). Rapid semi-quantitative determination of aspen lignin in lignocellulosic products. In *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. (pp. 105-112).

Maneechai, P. & Thongkrua, S. (2016). Isolation of Lignin Peroxidase Producing Bacteria from Mulberry Pulp and Paper Mill Wastewater and Soil of Dipterocarp Forest in University of Phayao Area. In *National Academic Conference 12th Naresuan Research: Research and Innovation with Country Development.* (pp. 127-137). (in Thai)

Ministry of Industry, (2017). *Establishment of standards for wastewater discharge from factories: 2017.* Retrieved October 10, 2017, from http://www.diw.go.th/hawk/news/ประกาศ อก.น้ำทิ้ง.PDF.

Mookkhan, P., Asa, P. & Noisumdaeng, P. (2017). Isolation and lipid decomposition efficiency of bacteria isolated from canteen wastewater. *Science and Technology RMUTT Journal*, 7(2), 241-250.

Pawongrat, R. (2015). Pretreatment processes for enhancing the efficiency of ethanol production from lingo-cellulosic agricultural wastes. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*, 2(1), 14-157. (in Thai)

Raj, A., Reddy, M.K. & Chandra, R. (2007). Decolourisation and treatment of pulp and paper mill effluent by lignin-degrading *Bacillus* sp.. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 399-406.

Rojpanit, K., Tungkananurak, N. & Tungkananurak, N. (2017). Tapioca Flour Plant Wastewater Treatment with Isolated Effective Indigenous Bacteria from Wastewater. *Thai Journal of Science and Technology*, 6(2), 140-150. (in Thai)

Sasikumar, V., Priya, V., Shankar, C.S. & Sekar, D.S. (2014). Isolation and Preliminary Screening of Lignin Degrading Microbes. *Journal of Academia and Industrial Research*, 3(6), 291-294.

Siripornvisal, S. (2010). Enzyme Technology in The Paper Industry. *Technology Promotion Association*, 37(213), 69-73. (in Thai)

Songrit, C. & Kositanont, C. (2014). Effect of Microbial Inoculum Addition for Wastewater Treatment. In *The 15th Graduate Research Conferences: 50 Years Khon Kean University of Social Devotion*. (pp. 719-724). (in Thai)

Suksa-Ard, S. (2007). *Molecular Cloning of Ligninase Gene from White-rot Fungi for Strain Improvement.* (Doctoral thesis, Kasetsart University).

Verma, M. & Ekka, A. (2015). Kraft lignin degradation through bacterial strain isolated from soils of timber areas. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 1(6), 28-32.

Wang, L., Nie, Y., Tang, Y., Song, X., Cao, K., Sun, L., Wang, Z., & Wu, X. (2016). Diverse bacteria with lignin degrading potentials isolated from two ranks of coal. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1428.

Yonsuwan, D. (2009). *Determination of importants factors for black liquor lignin separation by electrochemical and physical process*. (Master’s thesis, Chulalongkorn University). (in Thai)