การคัดเลือกและประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ

Selection and Efficiency of Lignin Degradation by Bacteria Isolated from Wastewater in the Pulp and Paper Industry

ศิรภัสสร อนุสราภรณ์, อสมา ถาวรพงศ์สถิต, กำพล นันทพงษ์ และ ภิรมย์ น้อยสำแดง*

Siraphatsorn Anusaraporn, Asama Tavornpongstid, Kampol Nanthapong and Pirom Noisumdaeng*

คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต)

Faculty of Public Health, Thammasat University (Rangsit Centre)

Received : 9 April 2018

Accepted : 30 October 2018

Published online : 2 November 2018

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษ และเยื่อกระดาษที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายลิกนิน รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในตัวอย่างน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ การทดสอบขั้นต้นในอาหารแข็ง minimal salt medium (MSM) ที่มีส่วนผสมของ 0.25 g/L methylene blue เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสจากแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 30 ไอโซเลท (VP1-VP30) ที่ได้จากการสุ่มโคโลนี พบว่า มีจำนวน 14 ไอโซเลท ให้วงใสรอบบริเวณแบคทีเรียที่มีค่าสูงสุด คือ 4.0 มิลลิเมตร และพบว่า มีแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ได้แก่ VP13 VP16 VP19 และ VP23 ให้ขนาดวงใสเพิ่มขึ้นจากวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 ของการทดสอบ โดยมีขนาดวงใสระหว่าง 3.0-4.0 มิลลิเมตร และทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท รวมถึงเชื้ออ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ *Bacillus subtilis* มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ และทำการตรวจวัดโดยวิธีทางกายภาพ พบว่าเมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท VP16 มาเลี้ยงในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ ทำให้ระดับความเข้มสีน้ำตาลลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ ในวันที่ 15 ของการทดสอบ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีแบคทีเรียในแต่ละชุดการทดสอบมาทำการวัดค่าความเข้มข้นลิกนินด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{280} พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท VP16 มีประสิทธิภาพลดความเข้มข้นลิกนินได้ร้อยละ 41.20 ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ รวมทั้ง *B. subtilis* ถึง 1.4-2.6 เท่า นอกจากนี้เมื่อวัดค่าซีโอดีโดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 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 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 bacterial isolates (VP1-VP30) obtained by randomly colonial selection were primarily tested for lignin peroxidase enzyme production on minimal salt medium (MSM) containing 0.25 g/L methylene blue. As a result, 14 isolates could generate the varying clear zone with the largest size of 4.0 millimeters. Among these isolates, VP13 VP16 VP19 and VP23 isolates showed the increasing 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 together with *Bacillus subtilis* laboratory strain were selected for further testing lignin degradation efficiency using synthetic lignin wastewater. The results found that the VP16 isolate could more efficiently decolorize lignin presented in synthetic lignin wastewater after incubating 15 days by observing the physical color appearance, and it showed efficient degradation of lignin by giving removal efficiency of 41.20%, which was 1.4-2.6 times higher than that from other isolates and *B. subtilis* by measuring concentration of lignin at OD_{280}. In addition, VP16 isolate had the highest removal efficiency of 33.33% for reducing COD in synthetic lignin wastewater tested by close reflux method; meanwhile, the removal efficiency of 15.39% was observed from *B. subtilis*.

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

บทนำ

จากสถานการณ์อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ กระดาษ และสิ่งพิมพ์ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2560 พบว่า มีทิศทางการขยายตัวทางเศรษฐกิจเพิ่มมากขึ้น โดยอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่มีกำลังการผลิตมากและถูกจัดอันดับ 1 ใน 5 ของอุตสาหกรรมที่เป็นสาเหตุของมลภาวะทางน้ำ เนื่องจากมีกระบวนการผลิตหลายขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการใช้น้ำและส่งผลก่อให้เกิดน้ำเสียปริมาณมาก (Yonsuwan, 2009) ซึ่งลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียมีสีน้ำตาลเข้ม โดยเกิดจากสีของสารลิกนินที่เป็นองค์ประกอบในเปลือกไม้มีการปนเปื้อนจากขั้นตอนการฟอกสีของอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ (Apiwatanapiwat *et al*., 2007) จึงทำให้มีค่าบีโอดี (biochemical oxygen demand, BOD) ค่าซีโอดี (chemical oxygen demand, COD) สี ความขุ่นและปริมาณสารแขวนลอยในน้ำเสียปริมาณสูง (Fuangkaeow, 2015) อย่างไรก็ตามมาตรฐานน้ำทิ้งจากกรมโรงงานอุตสาหกรรมกำหนดเกณฑ์ของสีน้ำทิ้งไว้เพียงไม่ให้เป็นที่น่ารังเกียจ และค่าซีโอดีต้องไม่เกิน 120 มิลลิกรัมต่อลิตร (Apiwatanapiwat *et al*., 2007) ลิกนินเป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกที่พบในส่วนผนังเซลล์ของพืชในธรรมชาติ ลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบสามมิติ ไม่ตกผลึก จึงทำให้ลิกนินเป็นสารที่ย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก (Pawongrat, 2015) ดังนั้นน้ำเสียที่มีส่วนประกอบของสารลิกนินในเปลือกไม้ปนเปื้อนอยู่จึงนับเป็นปัญหาที่สำคัญ เมื่อน้ำเสียถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกจะส่งผลกระทบต่อแหล่งน้ำที่รองรับน้ำเสีย โดยทำให้แหล่งน้ำดังกล่าวเกิดสภาพที่น่ารังเกียจ อีกทั้งยังมีปริมาณสารอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีค่าซีโอดีสูงขึ้น นอกจากนี้ยังกั้นขวางทางเดินของแสง ทำให้ปริมาณแสงส่องผ่านลงสู่แหล่งน้ำลดลงส่งผลรบกวนต่อการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำในการผลิตออกซิเจน ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำเป็นสาเหตุของการตายของสิ่งมีชีวิตในน้ำจำนวนมาก (Chooaksorn, 2012) เพื่อลดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมจึงจำเป็นต้องบำบัดน้ำทิ้งให้ได้มาตรฐานก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 (พ.ศ.2539) ออก

ตามความในพระราชบัญญัติโรงงาน พ.ศ.2535 เรื่อง กำหนดคุณลักษณะของน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงาน (Ministry of Industry, 2017)

อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีเทคโนโลยีการบำบัดน้ำเสียทั้งทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ซึ่งมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน แต่การเลือกใช้เทคโนโลยีทางกายภาพจะทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย อีกทั้งทางเคมีโดยการใช้สารเคมีในการกำจัดสีจะทำให้เกิดตะกอน นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มสารเคมีเข้าสู่ระบบสิ่งแวดล้อม (Siripornvisal, 2010) จึงทำให้การบำบัดด้วยเทคโนโลยีทางชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์เป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมากำจัดสีและลดค่าซีโอดีก่อนปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (Songrit & Kositanont, 2014) โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายลิกนินในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย ได้แก่ ราและแบคทีเรีย (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; Suksa-Ard, 2007) ซึ่งแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้อย่างรวดเร็วและมีกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพที่สำคัญ คือ การสร้างเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ เช่น ลิกนินเพอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสมาย่อยสลายลิกนิน (Li, *et al*., 2009; Verma & Ekka, 2015; Bandounas *et al.,* 2011; de Gonzalo *et al*., 2016; Falade *et al*., 2017) เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียนั้นยังมีข้อดีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตมาจากรา คือ มีความคงทนและสามารถนำไปใช้ได้จริงในสภาวะที่เป็นแบบ extreme environment และในสภาวะที่มี substrate ที่หลากหลาย อีกทั้งแบคทีเรียสามารถปรับตัวได้เป็นอย่างดี (immense environmental adaptability and biochemical versatility) (Lotti, 2014) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนลิกนิน โดยเฉพาะในน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ ซึ่งสันนิษฐานว่าจะมีแบคทีเรียที่มีกิจกรรมทางชีวภาพเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลิกนินอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสีย รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย การกำจัดสีและลดค่าซีโอดีในน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำหรือในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนลิกนินต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างน้ำเสีย

เก็บตัวอย่างน้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบบ่อเติมอากาศ (aerated lagoon) ของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษแห่งหนึ่งในจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 3 บริเวณ ได้แก่ บริเวณบ่อตกตะกอนขั้นต้น (pre-sedimentation) บริเวณบ่อเติมอากาศ 1 (aeration 1) และบริเวณบ่อตกตะกอนจุลินทรีย์ 1 (sedimentation 1) ตามลำดับ ซึ่งแต่ละบริเวณเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร เพื่อคัดแยกแบคทีเรียและวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำในเรื่องของค่า COD โดยวิธี Grab sampling (Sasikumar *et al*., 2014) ลงในขวดพลาสติกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และรักษาอุณหภูมิตัวอย่างน้ำเสียที่ 4 องศาเซลเซียส ระหว่างการขนส่ง

2. การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสีย

2.1 การคัดแยกและตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง

ปิเปตตัวอย่างน้ำจากบ่อเติมอากาศ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ (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^{-1}จากนั้นทำการเจือจางแบบ 10-fold serial dilution โดยปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี 0.85% normal saline ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (ได้ระดับความเจือจาง 10^{-2}) ทำการเจือจางต่อไปจนถึงระดับความ

เข้มข้น 10^{-9} จากนั้นปิเปต bacterial suspension ที่ความเข้มข้น 10^{-3} ถึง 10^{-9} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อ (spread plate) ลงบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) โดยทำ 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และคำนวณปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำเสียปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเลือกคำนวณจากความเจือจางที่เหมาะสม (มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี) ดังสมการ

$$N = n / vd \quad (1)$$

กำหนดให้ N คือ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)

n คือ ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้จากระดับความเจือจางที่นำมาคำนวณ

v คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (ml)

d คือ ระดับความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาคำนวณ

2.2 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (purification)

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแบบสุ่ม (random selection) จากโคโลนีที่มีลักษณะต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 30 โคโลนี ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีและนำมาขีดแบบตัดกัน (cross streak) ลงบนอาหารแข็ง NA เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์และเก็บแบคทีเรียที่ได้บนอาหารวุ้นเอียง (NA slant) ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียและการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ขีดเป็นเส้นตรงลงบนอาหารแข็ง minimal salt medium (MSM ซึ่งประกอบด้วย K_2HPO_4 1.8 กรัม KH_2PO_4 1.2 กรัม NH_4Cl 4 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม NaCl 0.1 กรัม $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 กรัม Agar 15 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 ลิตร) ที่มีส่วนผสมของ methylene blue 0.25 กรัมต่อลิตร (MSM + 0.25 g/L methylene blue) ซึ่ง methylene blue ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำหน้าที่เป็นอินดิเคเตอร์ในการคัดเลือกความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (Ferreira-Leitao *et al.,* 2007) (Sasikumar *et al*., 2014) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตขนาดของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบบริเวณแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นโดยวัดจากขอบโคโลนีถึงขอบของวงใส จากนั้นเลือกแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่แสดงผลบวกต่อการทดสอบมาย้อมสีด้วยเทคนิคการย้อมแกรม (Gram stain) เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์

3.1 การออกแบบชุดการทดสอบ

คัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญบน MSM + 0.25 g/L methylene blue และให้ขนาดวงใสมากที่สุดสำหรับใช้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ *B. subtilis* ร่วมกับชุดควบคุม (น้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่เติมหัวเชื้อ) ซึ่งได้ออกแบบการทดลอง ดังนี้

- เตรียมหัวเชื้อ (bacterial starter culture) : นำลูปเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการ 1 ลูปใส่ลงในหลอดทดลอง (inoculation) ที่มีอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงแบคทีเรียบนเครื่องเขย่า (shaking incubator) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- การเตรียมน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ : ได้ดัดแปลงจากกุลยา โรจน์พานิชและคณะ (Rojpanit *et al*., 2017) โดยน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มีองค์ประกอบดังนี้ KH_2PO_4 0.8870 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0567 กรัม

$CaCl_2$ 0.0308 กรัม และ alkali lignin (Sigma-Aldrich) 1.0000 กรัม ปรับค่า pH เท่ากับ 7 แบ่งใส่ฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

- การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายลิกนินของแบคทีเรีย : ชุดการทดลองนี้ประกอบด้วย น้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรีย น้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่เติมหัวเชื้อเป็นชุดควบคุม และน้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีส่วนผสมของลิกนินเป็นชุดแบลงค์ (Blank) ซึ่งน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียสามารถเตรียมได้จากการปิเปตหัวเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน มีการวัดด้วยวิธีทางกายภาพโดยการมองสีด้วยตาเปล่าทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างนำมาวัดค่าความเข้มข้นลิกนินในวันที่ 0 1 2 3 5 7 12 และ 15 ของการทดสอบ และวัดค่าซีโอดีในวันที่ 0 2 3 6 9 12 และ 15 ของการทดสอบ โดยแทนค่าของการวัดวันแรก คือ วันที่ 0 และวันสุดท้าย คือ วันที่ 15 โดยการวัดในแต่ละชุดการทดสอบจะวัด 3 ซ้ำ

3.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของลิกนินในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยวิธี spectrophotometry

สร้างกราฟมาตรฐานของลิกนิน โดยเตรียมน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 1 10 และ 100 กรัมต่อลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการหาความเข้มข้นลิกนิน (Kallavus *et al.*, 2015) ด้วย Biodrop UV/VIS spectrophotometer (SERVA Electrophoresis GmbH, Germany) โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีส่วนผสมของลิกนินเป็นค่าอ้างอิง (blank) ทำ 3 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นลิกนินจากกราฟมาตรฐานของลิกนิน ทำการวัดค่าความเข้มข้นลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์แต่ละชุดการทดสอบที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียไอโซเลท และชุดควบคุม คือ น้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่เติมหัวเชื้อที่ OD_{280} ในวันที่ 0 1 2 3 5 7 12 และ 15 ของการทดสอบ โดยการวัดในแต่ละชุดการทดสอบจะวัด 3 ซ้ำ และนำค่าความเข้มข้นลิกนินดังกล่าวมาคำนวณในการหาค่าร้อยละความเข้มข้นลิกนินที่ลดลง ดังนี้

ร้อยละความเข้มข้นลิกนินลดลง (%lignin removal efficiency)=$[(C.lignin_0 - C.lignin_{15})x100] / C.lignin_0]$ (2)

กำหนดให้ $C.lignin_0$ คือ ค่าความเข้มข้นลิกนินของน้ำเสียในวันที่ 0 (g/L) ของการทดสอบ

$C.lignin_{15}$ คือ ค่าความเข้มข้นลิกนินของน้ำเสียในวันที่ 15 (g/L) ของการทดสอบ

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

เจือจางน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ในแต่ละชุดการทดสอบ และน้ำเสียจริงจากระบบบำบัดน้ำเสีย โดยการปิเปตน้ำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงหลอดทดลองและเติมน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองบอโรซิลิเคท จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรและเติมกรดซัลฟิวริกรีเจนต์ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตรในน้ำตัวอย่างอย่างช้าๆ นำหลอดทดลองใส่ไว้ใน heating block แล้วอบที่มีอุณหภูมิ 150±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและเทน้ำตัวอย่างลงในฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หยดเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ 3 หยด จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมน้ำเงิน จากนั้นไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) ความเข้มข้น 0.05 N จนถึงจุดยุติ โดยจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดงอิฐ บันทึกผลการใช้สารละลายมาตรฐาน FAS ของน้ำตัวอย่าง และนำค่าดังกล่าวมาคำนวณในสมการการหาค่าซีโอดี ดังนี้

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

กำหนดให้ A คือ ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ FAS ที่ใช้ในการไทเทรต blank ซึ่ง blank คือ น้ำเสียสังเคราะห์
B คือ ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ FAS ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างน้ำ
M คือ ความเข้มข้นของ FAS (N)

นอกจากนี้นำค่าซีโอดีที่คำนวณได้มาคำนวณต่อไปในการหาค่าร้อยละซีโอดีที่ลดลง ดังนี้

ค่าร้อยละซีโอดีที่ลดลง = $[(COD_0 - COD_{15}) \times 100] / COD_0$ (4)

กำหนดให้ COD_0 คือ ค่า COD ของน้ำเสียในวันที่ 0 (mgO_2/L) ของการทดสอบ
COD_{15} คือ ค่า COD ของน้ำเสียในวันที่ 15 (mgO_2/L) ของการทดสอบ

ผลการวิจัย

1. การวัดค่าซีโอดีในน้ำเสียอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ

ผลการวัดค่าซีโอดีในน้ำเสียอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษจากระบบบำบัด 3 บริเวณ พบว่า น้ำเสียจากบริเวณบ่อตกตะกอนขั้นต้น บ่อเติมอากาศ 1 และบ่อตกตะกอนจุลินทรีย์ 1 มีค่าซีโอดีเท่ากับ 2,240 1,440 และ 960 mgO_2/L ตามลำดับ

2. การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียและการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส

ผลการคัดแยกแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อเติมอากาศ 1 ด้วยวิธี standard plate count โดยการทำ serial dilution และ spread plate บนอาหารแข็ง NA พบว่า สามารถนับจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวอย่างที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 6.35×10^5 CFU/ml และทำการคัดเลือกโคโลนีแบบสุ่ม (random selection) จากลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจำนวน 30 โคโลนี (5 โคโลนีต่อ 1 ลักษณะ) มาทำการ streak ลงบนอาหารแข็ง NA จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ก่อนนำไปทดสอบขั้นต่อไป ดังนั้นจากงานวิจัยสามารถแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท (VP1–VP30)

ผลการนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ข้างต้นไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสโดยการขีดเชื้อเป็นเส้นตรงลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MSM + 0.25 g/L methylene blue สังเกตการเจริญและวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นเป็นเวลา 7 วัน พบว่า มีจำนวน 14 ไอโซเลท ได้แก่ VP1 VP5 VP6 VP7 VP9 VP11 VP13 VP14 VP16 VP19 VP21 VP23 VP26 และ VP29 สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งให้ช่วงขนาดวงใสจากขอบโคโลนีถึงขอบวงใส ในวันที่ 5 มีขนาดวงใสในช่วง 1.0-3.0 มิลลิเมตร และในวันที่ 7 มีขนาดวงใสในช่วง 1.0-4.0 มิลลิเมตร และมีเพียง 4 ไอโซเลทที่มีค่าขนาดวงใสที่เพิ่มขึ้นจากวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 ได้แก่ ไอโซเลท VP13 VP16 VP19 และ VP23 โดยมีขนาดวงใสระหว่าง 3.0-4.0 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 1 และตารางที่ 1 การเกิดวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย แสดงว่า แบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสออกมาย่อยสลาย methylene blue ทำให้เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีฟ้าเป็นไม่มีสี ซึ่ง methylene blue เป็นอินดิเคเตอร์ที่บ่งบอกว่าแบคทีเรียมีความสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการย่อย

สลายลิกนิน และเมื่อนำแบคทีเรียไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม เพื่อดูลักษณะการติดสีแกรมและรูปร่าง พบว่า แบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและมีรูปร่างท่อน จากผลการทดลองจึงได้เลือกแบคทีเรียไอโซเลท VP13 VP16 VP19 และ VP23 ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินต่อไป

ก. แบคทีเรียบริสุทธิ์ บนอาหาร NA

ข. แบคทีเรียไอโซเลท VP16 บนอาหาร MSM+0.25 g/L methylene blue

ค. แบคทีเรียไอโซเลท VP4 บนอาหาร MSM+0.25 g/L methylene blue

ภาพที่ 1 ลักษณะการสร้างวงใสรอบโคโลนี ซึ่งบ่งชี้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสของแบคทีเรียขณะเจริญบนอาหารแข็ง MSM ที่มี Methylene blue เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 1 ผลการสร้างวงใส ซึ่งบ่งชี้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานกระดาษและเยื่อกระดาษ ขณะเจริญบนอาหารแข็ง MSM+methylene blue

รหัสเชื้อ	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)* บน MSM + 0.25 g/L methylene blue		รหัสเชื้อ	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)* บน MSM + 0.25 g/L methylene blue	
	อายุ 5 วัน	อายุ 7 วัน		อายุ 5 วัน	อายุ 7 วัน
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	-	-

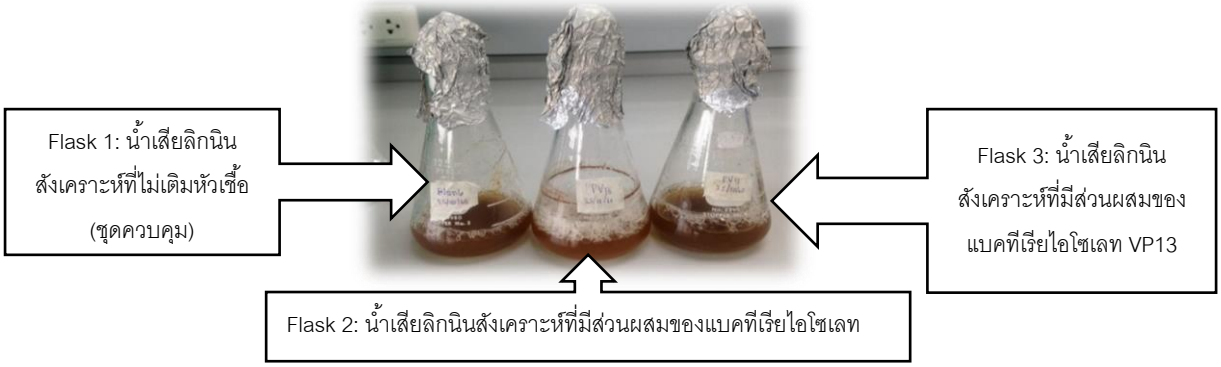
หมายเหตุ : - ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่เกิดวงใส

* ขนาดของวงใส = วัดจากขอบโคโลนีถึงขอบวงใส

3. ประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินของแบคทีเรียในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์

3.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียสังเคราะห์

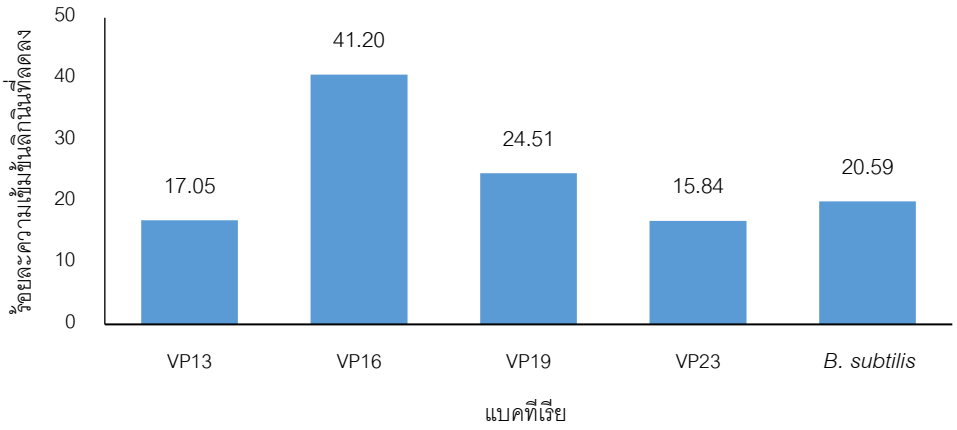
จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สีของน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ผสมกับแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท VP13 VP16 VP19 VP23 และเชื้ออ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ *B. subtilis* หลังจาก 15 วัน ด้วยตาเปล่า พบว่า การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท VP16 ในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ ทำให้ระดับความเข้มข้นสีน้ำตาลลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียไอโซเลท VP16 เปรียบเทียบกับน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียไอโซเลท VP13 และน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่เติมหัวเชื้อ ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน

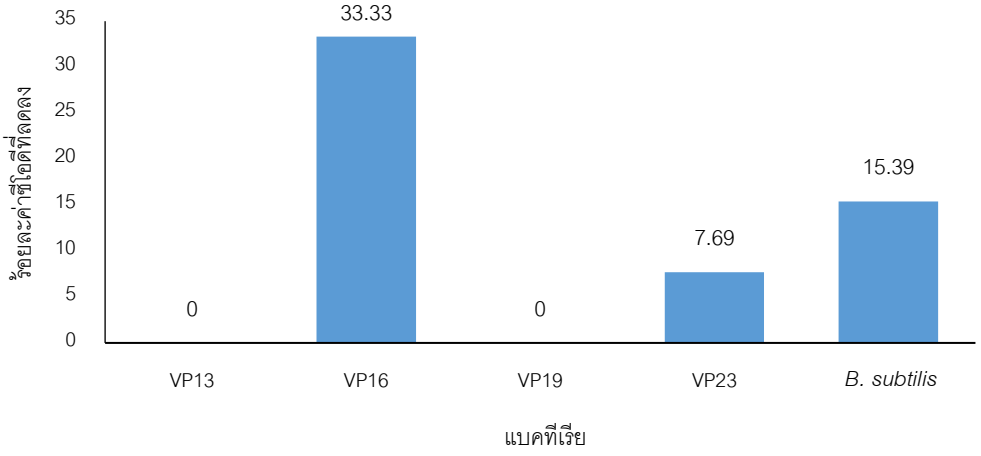
3.2 การย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรีย

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในแต่ละชุดการทดสอบ ได้แก่ ไอโซเลท VP13 VP16 VP19 VP23 และ *B. subtilis* ในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{280} ด้วยเครื่อง Biodrop UV/VIS spectrophotometer (SERVA Electrophoresis GmbH, Germany) และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณความเข้มข้นของลิกนินเทียบจากกราฟมาตรฐานของลิกนิน พบว่า ชุดการทดสอบที่มีแบคทีเรียไอโซเลท VP16 ในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนิน โดยให้ค่าร้อยละความเข้มข้นลิกนินที่ลดลง (% lignin removal efficiency) ถึง 41.20 ในระยะเวลา 15 วัน ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินต่ำกว่า โดยมีค่าความเข้มข้นของลิกนินที่ลดลงในช่วงร้อยละ 15.84-20.59 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่ไม่เติมหัวเชื้อ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษและแบคทีเรียอ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ (*B. subtilis*) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน

จากการวัดค่าซีโอดีในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทในแต่ละชุดการทดสอบ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท VP16 มีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ได้ร้อยละ 33.33 ซึ่งเป็นอัตราการลดลงที่มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ ในขณะที่ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 15.39 แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ โดยประเมินจากค่าซีโอดีที่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 วัน

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการวัดค่าซีโอดีในน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษเบื้องต้น พบว่า มีสารอินทรีย์อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียตั้งแต่บ่อตกตะกอนขั้นต้นถึงบ่อตกตะกอนจุลินทรีย์ในปริมาณสูงและมีลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ความขุ่นและสีน้ำตาลของลิกนินเข้มมาก แสดงให้เห็นถึงการมีปริมาณลิกนินอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งลิกนินเป็นองค์ประกอบของเปลือกไม้มีสีน้ำตาลเข้ม ดังนั้นในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษจึงมีกระบวนการฟอกสี เพื่อกำจัดสีส่งผลให้มีปริมาณลิกนินปนเปื้อนมากับน้ำเสียจากกระบวนการผลิตกระดาษ (Apiwatanapiwat *et al*., 2007) ซึ่งระบบการบำบัดน้ำเสียในปัจจุบันได้ให้ความสำคัญต่อวิธีการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพมากขึ้น โดยการใช้จุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียและราที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (Datta *et al*., 2017) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินจากสภาพแวดล้อมจริง คือ น้ำเสียจากอุตสาหรรมกระดาษและเยื่อกระดาษที่มีการปนเปื้อนลิกนิน ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสของความสำเร็จในการคักแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายลิกนินได้ เนื่องจากได้ผ่านการปรับสภาพให้คุ้นชิน (acclimation) และคัดเลือกตามธรรมชาติแล้ว (Chitpirom & Sangaroon, 2012) โดยผลการศึกษาการแยกเชื้อจากบ่อเติมอากาศ 1ในระบบบำบัดน้ำเสียพบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด $6.35x10^5$ CFU/ml โดยในงานวิจัยคาดหวังที่จะแยกเชื้อที่เป็น aerobic bacteria และในบ่อเติมอากาศ 1 น่าจะมีแบคทีเรียสูงที่สุด มีงานวิจัยที่ผ่านมา (Rojpanit *et al*., 2017) ได้ระบุว่าแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปพัฒนาจากจุลินทรีย์จากบ่อเกรอะ ซึ่งมีจุลินทรีย์ที่หลากหลาย เมื่อเดินระบบไปนานพอจนมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ทำให้เหลือแต่จุลินทรีย์ชนิดที่เหมาะสมและมีปริมาณของจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ (Songrit & Kositanont, 2014) จากนั้นทำการสุ่มคัดเลือกแบคทีเรียจากอาหารแข็ง NA ตามลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้งหมด 30 ไอโซเลท (VP1-VP30) เมื่อนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสในอาหารแข็ง MSM ที่มีส่วนผสมของ 0.25 g/L methylene blue โดย methylene blue เป็นสารประกอบอะโรมาติกและมีโครงสร้างที่คล้ายกับโครงสร้างของลิกนิน อีกทั้งยังเป็นอินดิเคเตอร์ในการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสในการย่อยสลายลิกนินได้ (Bholay *et al*., 2012) และยังเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรีย (Bandary *et al*., 2016; Eslami et al., 2017) ผลที่ได้จึงทำให้เกิดวงใสขึ้นรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผลการทดสอบพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่ให้วงใสจำนวนทั้งหมด 14 ไอโซเลท และมีเพียง 4 ไอโซเลท ได้แก่ VP13 VP16 VP19 และ VP23 ที่ให้ขนาดวงใสมากที่สุด รวมทั้งพบการเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 และ 7 ของการทดสอบ เมื่อทำการย้อมแกรมพบว่า ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน และจากผลการทดลองแสดงว่างานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสได้ สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่รายงานว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มที่มีคุณสมบัติย่อยสลายลิกนินได้จากตัวอย่างดิน ถ่านหิน และจากน้ำเสียอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษสา (El-Hanafy, *et al*., 2007; Huang, *et al*., 2013; Maneechai & Thongkrua, 2016; Wang, *et al*., 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) โดยแยกได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *B. subtilis KCTC2023 B.pumilus B. cereus Klebsiella sp. Pseudomonas putida Nocardia sp. Streptomyces sp.* เป็นต้น (Li *et al*., 2009; Bandounas *et al*., 2011; Harith *et al*., 2014; Min *et al.,* 2015; de Gonzalo, *et al*., 2016) เมื่อนำแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ได้แก่ VP13 VP16 VP19 และ VP23 รวมทั้งเชื้ออ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ *B. subtilis* มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์เป็นเวลา 15 วัน ซึ่งการเลือก *B. subtilis* มาทดสอบเปรียบเทียบด้วย เนื่องจากมีงานวิจัยระบุว่าแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* เกี่ยวข้องกับการลดสีและการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษด้วยการย่อยสลายลิกนินได้ (Raj *et al*., 2007; Min *et al*., 2015) ผลการทดสอบพบว่าชุดการทดสอบที่มีแบคทีเรียไอไซเลท VP16 มีความเข้มสี

น้ำตาลของลิกนินลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดสอบแบคทีเรียไอโซเลทอื่นและชุดควบคุม (ไม่เติมหัวเชื้อลงไปในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์) จากนั้นได้ทำการวัดหาร้อยละค่าความเข้มข้นลิกนินที่ลดลง (% lignin removal efficiency) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งความยาวคลื่นดังกล่าวนอกจากจะใช้วัดปริมาณโปรตีนแล้ว (Anthis & Clore, 2013) ยังสามารถนำมาใช้วัดค่าความเข้มข้นของลิกนินได้ (Kallavus *et al*., 2015) โดยแบคทีเรียไอโซเลท VP16 สามารถลดความเข้มข้นลิกนินได้ร้อยละ 41.20 ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียไอโซเลทอื่นรวมทั้ง *B. subtilis* ถึง 1.4-2.6 เท่า นอกจากนี้ยังทำการวัดหาค่าซีโอดีโดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิดในแต่ละชุดการทดสอบ ซึ่งการวัดค่าซีโอดีโดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิดเป็นวิธีการตรวจสอบน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เป็นไปตาม 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) และพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท VP16 สามารถลดค่า COD ได้ร้อยละ 33.33 ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียไอโซเลทอื่นรวมถึง *B. subtilis*

สรุปผลการวิจัย

การทดลองนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากบ่อเติมอากาศในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสจากการทดสอบบนอาหารแข็ง MSM ที่มีส่วนผสมของ 0.25 g/L methylene blue โดยมีแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลทได้แก่ VP13 VP16 VP19 และ VP23 สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและให้วงใสของการย่อยสลาย methylene blue สูงสุด 3.0-4.0 มิลลิเมตร โดยทุกไฮโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน และจากการทดสอบการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท VP16 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินได้มากกว่าไอโซเลทอื่นๆ รวมทั้ง *B. subtilis* สายพันธุ์อ้างอิงในห้องปฏิบัติการ โดยลดความเข้มสีน้ำตาลอย่างเห็นได้ชัดและลดความเข้มข้นของลิกนินในน้ำเสียลิกนินสังเคราะห์ได้ร้อยละ 41.20 รวมถึงลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 33.33 ในวันที่ 15 ของการทดสอบ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการขั้นต้น (preliminary experiment) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้เป็นแบคทีเรียจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในสภาวะจริงที่มีการปนเปื้อนลิกนิน อีกทั้งยังสามารถเพาะเลี้ยงง่าย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาและพัฒนาเชื้อเพิ่มเติมต่อไป เช่น การหาสภาวะที่เหมาะสม การจัดจำแนกและการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาและด้านพันธุกรรมของเชื้อ การศึกษากลไกและจลศาสตร์เอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในการย่อยสลายลิกนิน รวมถึงการเพิ่มขยายการทดลองเป็นระดับ pilot scale ก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้จริงในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ ซึ่งจะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

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)

Bandary, B., Hussain, Z., Kumar, R. (2016). Effect of carbon and nitrogen sources on *Escherichia coli* bacteria in removing dyes. *Materials Today: Proceedings*, *3*, 4023-4028.

Bandounas, L., Wierckx, N.J.P., de Winde, J.H., Ruijssenaars, H.J. (2011). Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnol*, *11,* 94.

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)

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). Finger printing for the lignin degrading bacteria from the soil. *Journal of Applied Sciences Research*, *3*(6), 470-475, 2007.

Eslami, H., Khavidak, S.S., Salehi, F., Khosravi, R., ali Fallahzadeh, R., Peirovi, R., Sadeghi, S. (2017). Biodegradation of methylene blue from aqueous solution by bacteria isolated from contaminated soil. *J Adv Environ Health Res*, *5*, 10-15.

Falade, A.O., Nwodo, U.U., Iweriebor, B.C., Green, E., Mabinya ,L.V., Okoh, A.I. (2017). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen*, *6,* e00394.

Ferreira-Leitao V. S., Andrade de Carvalho M. E., & Bon Elba P. S. (2007). Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: comparison to reported methods. *Dyes Pigments*, *74*, 230–236.

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)

Min, K., Gong, G., Woo, H.M., Kim, Y., Um, Y. (2015). A dye-decolorizing peroxidasefrom *Bacillus subtilis* exhibiting substrate-dependent optimum temperature for dyes and B-ether lignin dimer. *Sci Rep*., *5*, 8245.

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.

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)