ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ	เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) จากอุตสาหกรรมสิ่งทอ

Isolation and Screening of Terephthalic Acid (TA)-Degrading Microorganisms from Textile Industry

นามผู้วิจัย นางสาวเศารยา สุขเกษม

ได้รับพิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ปราโมทย์ ศิริโรจน์, D.Agri. Sci.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน ..... พ.ศ. .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย สาร Terephthalic Acid (TA) จากอุตสาหกรรมสิ่งทอ

Isolation and Screening of Terephthalic Acid (TA)-Degrading Microorganisms from Textile Industry

โดย

นางสาวเศารยา สุขเกษม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เศารยา สุขเกษม 2557: การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) จากอุตสาหกรรมสิ่งทอ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, D.Agr. 138 หน้า

เส้นใยโพลีเอสเทอร์เป็นเส้นใยสังเคราะห์ที่มีความคงทนและได้รับความนิยมเป็นอย่างสูงในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งในกระบวนการปรับปรุงลักษณะสัมผัสของเส้นใยชนิดนี้ ส่งผลให้เกิดการสะสมของน้ำเสียมากขึ้น จากการปรับปรุงสมบัติของน้ำเสียให้อยู่ในช่วงที่กฎหมายกำหนด ทำให้มีการตกค้างของสาร Terephthalic Acid (TA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เส้นใยชนิดนี้ ผลเสียจากการกำจัดสาร TA นี้ซึ่งทำโดยการฝังกลบ (Landfill) หรือการเผาภายใต้อุณหภูมิสูง (Incineration) คือค่าใช้จ่ายสูงและก่อให้เกิดมลพิษ ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้การบำบัดทางชีวภาพ (Biodegradation) โดยอาศัยความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงศึกษาการแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร TA จากตัวอย่างดินและแหล่งตะกอนดินในบ่อบำบัดน้ำเสียของประเทศไทย ภายหลังการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว nondefined medium ที่มีสาร TA 0.1 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทที่มีการย่อยสลายสาร TA เมื่อเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 12 ได้รวดเร็วที่สุด คือไอโซเลท G5, (แยกได้จากตัวอย่างดินของแหล่งฝังกลบขยะ), ไอโซเลท P5 และ S2 (แยกได้จากดินตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสียของชุมชน และของอุตสาหกรรมสิ่งทอตามลำดับ) เมื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสาร TA พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์(โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 - 45 องศาเซลเซียส และช่วงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 6.0 – 9.0 และมีการย่อยสลายสาร TA ได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีการเติมสาร yeast extract ที่ 0.04 เปอร์เซนต์(โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และพบว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถย่อยสลายสาร TA ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์(โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ดีถึงร้อยละ 97.62 เมื่อเพาะเลี้ยงในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm (ปริมาตรของอากาศ / ปริมาตรน้ำหมัก / นาที) ภายในระยะเวลา 60 ชั่วโมง ผลการจำแนกจุลินทรีย์ซึ่งคัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเปรียบเทียบลำดับเบส 16sRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท G5 และ S2 จัดเป็น *Rhodococcus pyridinivorans* โดยมีระดับความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.8 และ 99.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และไอโซเลท P5 จัดเป็น *Rhodococcus rhodochrous* ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.6 เปอร์เซ็นต์

_____ _____ __/_____/__

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Saoraya Sookkasem 2014: Isolation and Screening of Terephthalic Acid (TA)-Degrading Microorganisms from Textile Industry. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Werasit Sanpamongkolchai, D.Agr. 138 pages.

Polyester is an durable synthetic fiber and most widely use in textile industry. Caustic treatment was used to improve the appearance and texture of polyester filament. During wastewater treatment process, Terephthalic Acid (TA) was precipitated and affected to environmental pollution . Basically TA treatment was carried out by incineration or landfill which caused air pollution and been costly. At present base on the ability of microorganisms, biodegradation could be applied for pollutant degradation. The isolation and screening of TA-degradation microorganism from soil and sludge waste water treatment, were carried out by using nondefined medium containing 0.1% TA as carbon source. The result showed that three isolates of TA degrading microorganisms , G5, P5 and S2 were isolated from landfill, sludge and textile industry's soil sample respectively. TA degrading activity and cell growth were investigated. The result showed that 3 isolates could use TA 1.0 (%w/v) as substrate for cell growth in the range of pH 6.0 to 9.0 and 30 °C to 45 °C. TA degradation activity was highest in the medium containing yeast extract 0.04 (%w/v). The activity was stimulated more by mixing 3 isolates together in 2 l minijar fermenter at 37 °C, 200 rpm agitation and aeration at 1.0 vvm. The result showed that mixed cultures could grow and degrade TA at concentration of 1.0% (w/v) during 60 hr at a level of 97.62% . Based on morphological study and 16sRNA sequence data, isolate G5 and S2 were classified as *Rhodococcus pyridinivorans* (99.8 and 99.2 % similarity, respectively) and isolate P5 as *Rhodococcus rhodochrous* (99.6 % similarity).

_____ _____ __/_____/__

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทมาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์ และ อาจารย์ ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติม และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณโรงงานสามพรานการทอ ที่เอื้อเฟื้อสำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ กราบขอบพระคุณพ่อแม่ ครอบครัว ญาติ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับการช่วยเหลือในทุกๆด้าน

เศารยา สุขเกษม

กุมภาพันธ์ 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	37
สรุปและข้อเสนอแนะ	83
สรุป	83
ข้อเสนอแนะ	85
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	86
ภาคผนวก	97
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	98
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์	101
ภาคผนวก ค ผลการทดลอง	106
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	138

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจำแนกประเภทของเส้นใย	7
2	การเปรียบเทียบระหว่างเส้นใยธรรมชาติและเส้นใยประดิษฐ์	8
3	สมบัติทางกายภาพของเส้นใยโพลีเอสเทอร์	11
4	สมบัติทางเคมีของเส้นใยโพลีเอสเทอร์	12
5	ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของเส้นใยโพลีเอสเทอร์	13
6	ข้อมูลความปลอดภัยเคมีภัณฑ์ (MSDS) บางประการของสาร Terephthalic Acid (TA)	17
7	ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของกระบวนการ Bioremediation	21
8	ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) จากตัวอย่างดินของแหล่งต่างๆของประเทศไทยเมื่อเลี้ยงในอาหาร nondefined medium ที่มี TA 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	39
9	ความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ของเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลทต่างๆ ที่ระยะเวลาชั่วโมงที่12เมื่อเลี้ยงในอาหาร nondefined medium ที่มี TA 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	42
10	ลักษณะทางชีววิทยาบางประการของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้	79

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค1 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 107

ค2 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 108

ค3 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 109

ค4 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 110

ค5 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 111

ค6 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ปริมาณสาร TA ระดับต่างๆ ที่37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที 112

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค7 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 รอบต่อนาที 113

ค8 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 114

ค9 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA)เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆที่ 37 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 รอบต่อนาที 115

ค10 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 116

ค11 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่ 37 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 รอบต่อนาที 117

ค12 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 118

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค13 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ 119

ค14 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ 120

ค15 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ 121

ค16 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ 122

ค17 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ 123

ค18 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาทีภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ 124

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค19 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และyeast extract ระดับต่างๆบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 125

ค20 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และyeast extract ระดับต่างๆบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 126

ค21 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และyeast extract ระดับต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 127

ค22 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และyeast extract ระดับต่างๆบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 128

ค23 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และyeast extract ระดับต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 129

ค24 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined mediumที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และyeast extract ระดับต่างๆบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 130

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค25 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5P5, G5S2, P5S2 และG5P5S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 131

ค26 การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5P5, G5S2, P5S2 และ G5P5S2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 132

ค27 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5, P5 และ S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) 1.0 และ yeast extract 0.02 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร (fermenter) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm 133

ค28 การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5, P5 และ S2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) 1.0 และ yeast extract 0.02 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร (fermenter) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm 134

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วงจรทั้งระบบของอุตสาหกรรมสิ่งทอแสดงความต่อเนื่องตั้งแต่ต้นน้ำกลางน้ำและปลายน้ำ	5
2	กระบวนการผลิตเส้นใยโพลีเอสเทอร์	6
3	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์โพลีเอสเทอร์	10
4	การเกิดโพลีเมอร์แบบควบแน่น	10
5	การเกิดสาร Terephthalic Acid (TA) ภายหลังการเกิดปฏิกิริยา Acidification	15
6	โครงสร้างของสาร phthalate isomers ทั้ง 3 รูปแบบ	15
7	กลไกของการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ	27
8	กลไกของการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะมีอากาศ	28
9	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	45
10	การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	46
11	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	47
12	การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	49
14	การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	50
15	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)ที่ค่าพีเอชระดับต่างๆอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	52
16	การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอชระดับต่างๆ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200รอบต่อนาที	53
17	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าพีเอชระดับต่างๆ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	54
18	การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอชระดับต่างๆ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	55

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)ที่ค่าพีเอชระดับต่างๆอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	56
20	การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA)ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอชระดับต่างๆ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	57
21	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิระดับต่างๆ	60
22	การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิระดับต่างๆ	61
23	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิระดับต่างๆ	62
24	การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่า ควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิระดับต่างๆ	63

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

25 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาทีอุณหภูมิระดับต่างๆ 64

26 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิระดับต่างๆ 65

27 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract ระดับต่างๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 67

28 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของ yeast extract ระดับต่างๆ 68

29 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract ระดับต่างๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 69

30 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของ yeast extract ระดับต่างๆ 70

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
31	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract ระดับต่างๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	71
32	การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของ yeast extract ระดับต่างๆ	72
33	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่างไอโซเลท G5, P5 และ S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 รอบต่อนาที	74
34	การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่างไอโซเลท G5, P5 และ S2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)บนเครื่องเขย่าอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที	75
35	ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5, P5 และ S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในระดับถังหมักขนาด 2.0 ลิตร (fermenter) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm	77

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

36	การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5, P5 และ S2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ระดับถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm	78
37	ลักษณะ Vegetative cell ของไอโซเลท G5 ซึ่งย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	80
38	ลักษณะ Vegetative cell ของไอโซเลท P5 ซึ่งย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	81
39	ลักษณะ Vegetative cell ของไอโซเลท S2 ซึ่งย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	82

ภาพผนวกที่

ค1	ลำดับเบส 16sRNA ของไอโซเลท G5	135
ค2	ลำดับเบส 16sRNA ของไอโซเลท P5	136
ค3	ลำดับเบส 16sRNA ของไอโซเลท S2	137

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) จากอุตสาหกรรมสิ่งทอ

Isolation and Screening of Terephthalic Acid (TA)-Degrading Microorganisms from Textile Industry

คำนำ

ปัจจุบันการพัฒนาเส้นใยสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมสิ่งทอได้รับการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเส้นใยโพลีเอสเทอร์ (Polyester) ซึ่งมีกำลังการผลิตในปี พ.ศ.2543 คิดเป็น 79.2 เปอร์เซ็นต์ของกำลังการผลิตเส้นใยสังเคราะห์ทั้งหมด (สถาบันพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ, 2552)

กระบวนการพัฒนาลักษณะบางประการของเส้นใยโพลีเอสเทอร์ที่ได้ให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ด้านเครื่องนุ่งห่มมากขึ้น ซึ่ง 70 เปอร์เซ็นต์ของของเส้นใยชนิดนี้ต้องผ่านเข้าสู่กระบวนการลดน้ำหนักผ้า (Weight Reduction) (Latta, 1984; Kimura and Ito, 2001; Jo *et al*., 2006) ภายหลังสิ้นสุดการผลิตในกระบวนการนี้ ทำให้เกิดน้ำเสียที่มีค่าพีเอชสูงเกินค่ามาตราฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (5.5 - 9.0) (ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์และสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539))

ภายหลังการปรับสภาพน้ำเสียให้มีค่าในช่วงที่กฎหมายกำหนด ส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของสารTerephthalic Acid (TA) ที่ไม่ละลายน้ำ โดยทั่วไปสาร TA ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม แต่หากจัดการกับสารนี้ไม่เหมาะสม อาจก่อให้เกิดเอสเทอร์ของสารนี้ เช่น Dimethyl Terephthalate (DMT) หรือ Diethyl Terephthalate (DETP) โดยอันตรายของสารดังกล่าวมีทั้งความเป็นพิษต่อตับ, การพัฒนาตัวอ่อนผิดปกติ รวมถึงการเป็นสารก่อมะเร็ง (Jackson *et al*., 1996; Li *et al*., 2005; Wang and Gu, 2006)

ปัจจุบันมีการประยุกต์ความรู้ทางชีวภาพเพื่อย่อยสลายสารปนเปื้อนในธรรมชาติ (Biodegradation) แทนการฝังกลบ (Landfilling) (Ejlertsson *et al*., 1996) หรือการเผาภายใต้อุณหภูมิสูง (Incineration) (Lau, 1978) ซึ่งก่อให้เกิดมลพิษในอากาศ และค่าใช้จ่ายสูง (Sugimori *et al*., 2000)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารนี้ เช่น *Bacillus* sp. (Karegoudar and Pujar, 1985; Kimura and Ito, 2001), *Comamonas* sp. (Wang *et al*., 1995), *Pseudomonas* sp. (Kimura and Ito, 2001; Vamsee-Krishna *et al*., 2006), *Rhodococcus* sp. (Naumova *et al*., 1986; Choi *et al*., 2005) *Viarovorax* sp. (Wang and Gu, 2006)

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินตามแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร TA จากอุตสาหกรรมสิ่งทอ เพื่อนำไปบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของสารนี้ในอนาคตต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. แยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินในประเทศไทย ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA)

2. ศึกษาคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทย ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA)

3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

4. ศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อผสม และประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ใน minijar fermenter

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. กระบวนการผลิตผ้าโพลีเอสเทอร์

อุตสาหกรรมสิ่งทอนับได้ว่าเป็นอุตสาหกรรมที่มีศักยภาพของความต่อเนื่องอย่างเป็นระบบ โดยอาจแยกได้เป็นส่วนๆ ผลผลิตของส่วนหนึ่งถูกส่งต่อไปเป็นวัตถุดิบของอีกส่วนหนึ่ง คล้ายระบบลูกโซ่ติดต่อกันไป ดังแสดงในภาพที่ 1 แสดงอุตสาหกรรมต้นน้ำ เริ่มจากอุตสาหกรรมการผลิตเส้นใยทั้งเส้นใยประดิษฐ์และเส้นใยธรรมชาติ ซึ่งเป็นผลผลิตทางเกษตรกรรมจะเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมการปั่นด้าย เส้นด้ายถูกนำไปใช้ในการทอผ้า หรือถักผ้า จากนั้นเส้นด้ายและผ้าผืนถูกส่งผ่านเข้าสู่กระบวนการของการฟอก ย้อม พิมพ์ และตกแต่งสำเร็จ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สิ่งทอสำเร็จรูป พร้อมนำไปเป็นวัตถุดิบให้กับอุตสาหกรรมปลายน้ำ คือ อุตสาหกรรมเสื้อผ้าสำเร็จรูป เครื่องนุ่งห่ม และผลิตภัณฑ์สิ่งทออื่นๆ

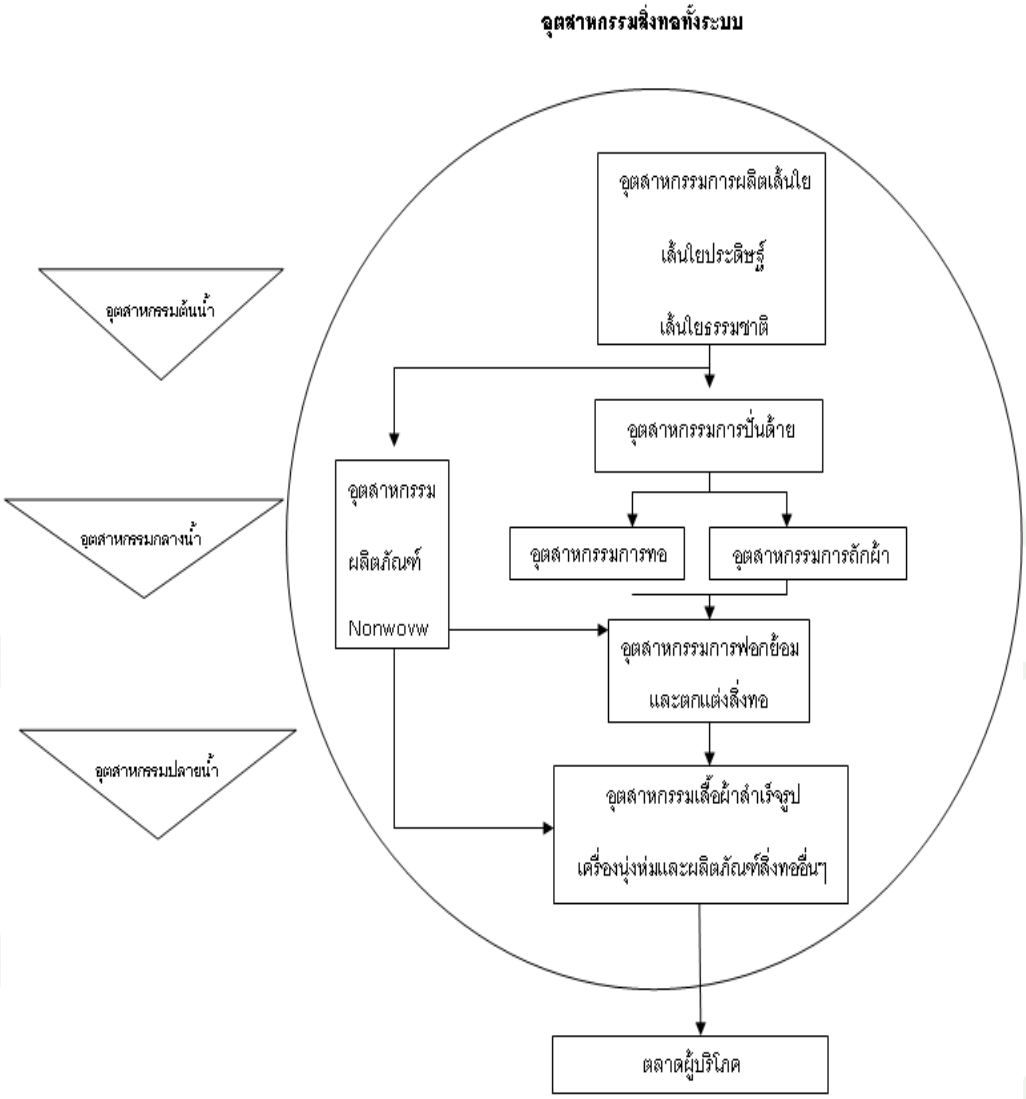
การผลิตโพลีเอสเทอร์มี 3 ขั้นตอนหลักดังแสดงในภาพที่ 2

(1) การผลิตโพลีเมอร์ (Polymerization)

(2) การอัดเป็นเส้นใย (Fiber Spinning)

(3) การดึงยืด (Drawing)

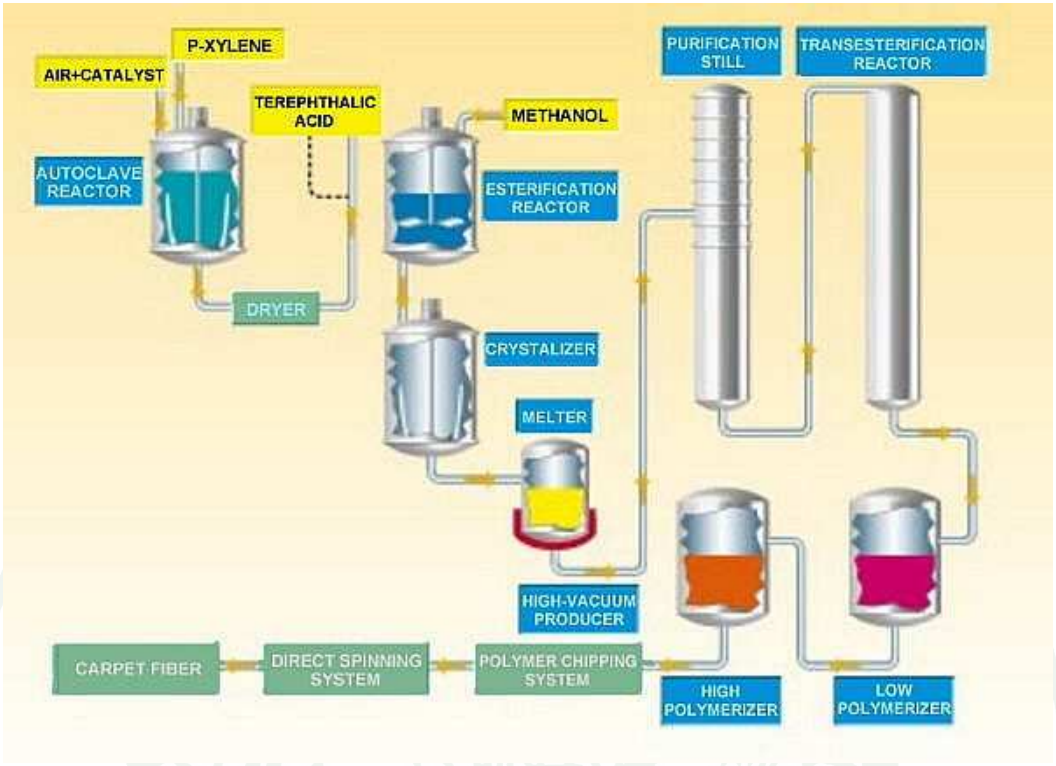
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 วงจรทั้งระบบของอุตสาหกรรมสิ่งทอ แสดงความต่อเนื่องตั้งแต่ ต้นน้ำ กลางน้ำ และปลายน้ำ

ที่มา: วีระศักดิ์ (2542)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 กระบวนการผลิตเส้นใยโพลีเอสเทอร์

ที่มา: Swicofil AG Textile Services (2010)

เส้นใยอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ เส้นใยธรรมชาติ (Natural fiber) และเส้นใยประดิษฐ์ (Man-made fiber) ดังแสดงในตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 การจำแนกประเภทของเส้นใย

ประเภทเส้นใย	แหล่งที่มา	ตัวอย่าง
เส้นใยธรรมชาติ	เซลลูโลส (เส้นใยพืช)	ฝ้าย (Cotton), ลินิน (Linen), ปอ (Jute), รามี (Ramie), ป่าน (Hemp), นุ่น (Kapok)
	โปรตีน (เส้นใยสัตว์)	ขนสัตว์ (Wool), ไหม (Silk), ผม (Hair)
	แร่	แร่ใยหิน (Asbestos)
	ยาง	ยาง (Rubber)
เส้นใยประดิษฐ์	เซลลูโลส	เรยอน (Rayon), ไลโอเซลล์ (Lyocell), แอซีเทต (Acetate), ไตรแอซีเทต (Triacetate)
	โพลีเมอร์ที่ไม่ใช่เซลลูโลส	อะครีลิค (Acrylic), มอดอะครีลิค (Modacrylic), อะรามิด (Aramid), ไนลอน (Nylon), โนโวลอยด์ (Novoloid) , โอเลฟิน (Olefin), โพลีเอสเทอร์ (Polyester), ซาราน (Saran), สแปนเดกซ์ (Spandex), ไวเนียน (Vinyon)
	แร่และเหล็ก	โลหะ (Metallic), แก้ว (Glass), เซรามิค (Ceramic), กราไฟต์ (Graphite)

ที่มา: ดัดแปลงจากวีระศักดิ์ (2542)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบระหว่างเส้นใยธรรมชาติและเส้นใยประดิษฐ์

เส้นใยธรรมชาติ	เส้นใยประดิษฐ์
การผลิตขึ้นอยู่กับฤดูกาล และต้องเก็บรักษาเพื่อรอการใช้งาน	การผลิตทำได้อย่างต่อเนื่องตลอดปี
คุณภาพไม่สม่ำเสมอ ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ อาหาร น้ำ แมลง และโรคต่างๆ	คุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากตั้งใจประดิษฐ์ให้เกิดความไม่สม่ำเสมอขึ้น
สมบัติกายภาพ ขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของพืช หรือสัตว์นั้นๆ	สมบัติกายภาพ ขึ้นกับเจตนาของการควบคุมกระบวนการผลิต และการดัดแปรภายหลังกระบวนการผลิต
ส่วนประกอบทางเคมี และโครงสร้างโมเลกุลขึ้นกับการเจริญเติบโตทางธรรมชาติ	ส่วนประกอบทางเคมี และโครงสร้างโมเลกุลขึ้นกับสารตั้งต้นที่ใช้สังเคราะห์
สมบัติเป็นไปตามธรรมชาติ	สมบัติเป็นไปตามการประดิษฐ์
สมบัติที่ปรากฏบนผ้าผืนสามารถเปลี่ยนแปลงโดยการตกแต่งสำเร็จเส้นด้ายและผ้าผืน	สมบัติของเส้นใยเปลี่ยนแปลงได้จากการดัดแปรวัตถุดิบ และภาวะการผลิตสมบัติที่ปรากฏบนผ้า สามารถเปลี่ยนแปลงได้ด้วยการตกแต่งสำเร็จที่ผ้าผืน
เฉพาะไหมเท่านั้นที่เป็นเส้นยาว	สามารถกำหนดความยาวของเส้นใยได้
การใช้งานขาดความคล่องตัวต่อการเปลี่ยนแปลง	มีความหลากหลาย สามารถปรับตัวให้เหมาะสมแก่การใช้งานได้รวดเร็ว
ดูดซึมความชื้นได้ดี	ส่วนใหญ่ดูดซึมความชื้นไม่ดี ยกเว้นเรยอนและอะซีเทต
ไม่อ่อนไหวต่อความร้อน	ส่วนใหญ่อ่อนไหวต่อความร้อน ยกเว้นเรยอน
ต้องทำการตกแต่งสำเร็จก่อน จึงทำให้อยู่ตัวด้วยความร้อนได้	เส้นใยส่วนใหญ่ (ยกเว้นเรยอน และอะซีเทต) สามารถทำให้อยู่ตัวด้วยความร้อนได้
การวิจัยพัฒนาและการส่งเสริม อาศัยองค์กรร่วมทั้งเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม	การวิจัยพัฒนา และการส่งเสริม ทำได้ทั้งโดยบริษัทเช่นเดียวกับโดยอาศัยองค์กรร่วม

ที่มา: ดัดแปลงจากวีระศักดิ์ (2542)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

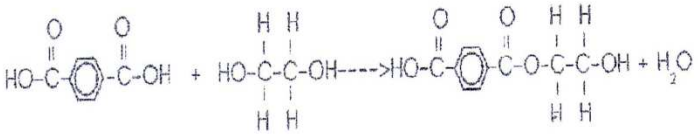
2. เส้นใยโพลีเอสเทอร์ (Polyester)

2.1 การสังเคราะห์เส้นใยโพลีเอสเทอร์

เส้นใยโพลีเอสเทอร์ (Polyester) เป็นเส้นใยประดิษฐ์ที่มีผู้ใช้มากที่สุดในกลุ่มเส้นใยประดิษฐ์ (Man-made fiber) ทั้งหลาย ทั้งนี้เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ ผู้ที่สังเคราะห์โพลีเอสเทอร์ได้คนแรกคือ W. H. Carothers แต่ไม่ได้ผลิตออกสู่ตลาด เพราะคุณสมบัติของเส้นใยที่สังเคราะห์ได้ในครั้งแรกไม่ดีพอ ในอดีตนั้นการผลิตเส้นใยโพลีเอสเทอร์นิยมใช้สาร Dimethyl Terephthalic Acid ทำปฏิกิริยาร่วมกันกับสาร Ethylene Glycol ในการสังเคราะห์เส้นใยโพลีเอสเทอร์ ซึ่งมีข้อดีในด้านราคาค่อนข้างถูก แต่เมทานอลที่เกิดจากปฏิกิริยาจะเป็นสารไวไฟ และมีความเป็นพิษ การแก้ปัญหาดังกล่าว ทำได้โดยการใช้สาร Terephthalic Acid ในการสังเคราะห์เส้นใยโพลีเอสเทอร์แทน ส่งผลทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นบ้าง

เส้นใยโพลีเอสเทอร์ เป็นโพลิเมอร์ที่เกิดจากการเกิดโพลีเมอร์แบบควบแน่น (Condensation Polymerization) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเกิดโพลิเมอร์ระหว่างโมเลกุลเล็ก 2 ชนิด ที่แต่ละโมเลกุลมีหมู่ที่ทำหน้าที่ (Functional Group) 2 หมู่ เมื่อทำปฏิกิริยากันจะได้เป็นสารโมเลกุลใหญ่และน้ำเกิดขึ้น สารโมเลกุลใหญ่ที่เกิดจากโมเลกุลเล็ก 2 โมเลกุล จะทำหน้าที่เป็นหน่วยซ้ำ (Repeat Unit) ทำปฏิกิริยากับหน่วยซ้ำอื่นๆต่อไปได้อีก ในขณะที่สภาวะทางเคมีของปฏิกิริยานั้นเหมาะสม เช่น ปฏิกิริยาของสารไดคาร์บอกซิลิกแอซิด กับสารไดไฮดริกแอลกอฮอล์ ยกตัวอย่างการสังเคราะห์โพลีเอสเทอร์ โดยมี Terephthalic Acid กับ Ethylene Glycol เป็นสารตั้งต้นในการผลิต ดังแสดงในภาพที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



Terephthalic acid Ethylene glycol Hydroxyethyl terephthalate

ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์โพลีเอสเทอร์

ที่มา: มณฑา (2541)

จากปฏิกิริยาถ้าให้ A แทนหมู่ธาตุที่แสดงความเป็นกรด B แทนหมู่ธาตุที่แสดงว่าเป็นแอลกอฮอล์ของ Hydroxyethyl terephthalate แล้ว สามารถเขียนสัญลักษณ์แทนปฏิกิริยาการเกิดโพลีเอสเทอร์ได้ดังแสดงในภาพที่ 4

$A(\,)B + A(\,)B \longrightarrow A-(\,)-(\,)\text{-}B$

$A(\,)-(\,)B + A(\,)-(\,)B \longrightarrow A-(\,)-(\,)-(\,)-(\,)\text{-}B$

$A(\,)_4B + A(\,)_4B \longrightarrow A(\,)_8B$

$A(\,)_8B + A(\,)_8B \longrightarrow A(\,)_{16}B$

$A(\,)_nB + A(\,)_nB \longrightarrow A(\,)_{2n}B$

2n คือ จำนวนหน่วยซ้ำของ Hydroxyethyl terephthalate

ภาพที่ 4 การเกิดโพลีเมอร์แบบควบแน่น

ที่มา: มณฑา (2541)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 สมบัติของเส้นใยโพลีเอสเทอร์

รูปร่างและโครงสร้างทางเคมี เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยโพลีเอสเทอร์มีลักษณะยาวเป็นเส้นตรง ไม่บิดตัว ผิวเรียบ อาจเห็นจุดเล็กๆของพิกเมนท์กระจายอยู่ทั่วไป ถ้าดูด้านตัดขวางจะมีลักษณะหลายแบบ เช่น กลม สามเหลี่ยมมุมมน ห้าเหลี่ยมมุมมน หรือมีรูปร่างอื่นๆ ต่างกันไปแล้วแต่จุดประสงค์ของผู้ผลิต ส่งผลให้เส้นในที่ผลิตได้มีสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับรวมถึงข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของเส้นใยชนิดนี้ ดังแสดงในตารางที่ 5 จากสมบัติในด้านต่างๆของเส้นใยโพลีเอสเทอร์ พบว่ามีการนำเส้นใยสังเคราะห์ชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น เครื่องนุ่งห่มโดยเฉพาะเสื้อผ้าที่ต้องการให้ไม่ยับง่าย, เชือก ใบเรือ ท่อน้ำผ้าใบที่ใช้ในการดับเพลิง สายพานในโรงงานอุตสาหกรรมการผลิต ผ้าขึงกรองช้อนเยื่อกระดาษในโรงงานกระดาษ ผ้าใบเคลือบสารพีวีซี

ตารางที่ 3 สมบัติทางกายภาพของเส้นใยโพลีเอสเทอร์

สมบัติทางกายภาพด้าน	ลักษณะของเส้นใยโพลีเอสเทอร์
ความยาว	สามารถทำให้เป็นเส้นใยยาว หรือเส้นใยสั้นได้ตามความต้องการ
สี	ขาว
การสะท้อนแสง	มีทั้งชนิดใส และขุ่น
ความเหนียว	4.5-5.0 กรัม/เดนเยอร์ ชนิดที่มีความเหนียวมาก 8.0 กรัม/เดนเยอร์ ขณะที่เปียกความเหนียวไม่ต่างจากขณะแห้ง
การยืดตัวและหดกลับ	ยืดตัวได้สูงสุด 20-30% ถ้ายืดตัวออกไป 2% จะหดกลับได้ 97-100% ถ้ายืดตัว 4% จะหดกลับได้ 90%
ความคืนตัว	ดีมากไม่ยับย่นง่าย
ความคงทนต่อการขัดถู	ดี
ความคงขนาด	ค่อนข้างดี ถ้าผ่านการทำให้อยู่ตัวด้วยความร้อน จะทำให้มีความคงทนขนาดดีมาก ผ้าจะไม่ยืดหรือหด
การดูดความชื้น	0.4% ที่สภาวะมาตรฐาน
ความถ่วงจำเพาะ	1.38

ที่มา: ดัดแปลงจากวีระศักดิ์ (2542)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 สมบัติทางเคมีของเส้นใยโพลีเอสเทอร์

สมบัติทางเคมีด้าน	ลักษณะของเส้นใยโพลีเอสเทอร์
สารฟอกขาว	มีความคงทนต่อสารฟอกขาวทุกชนิด
กรด-ด่าง	ทนต่อกรดอ่อนได้ดี แต่ละลายในกรดกำมะถันเข้มข้น และร้อน ไม่ทนต่อด่างแก่
สารทำละลายอินทรีย์	ทนต่อสารอินทรีย์บางชนิด เช่น แอลกอฮอล์ คีโตน และสารทำละลายซักแห้ง แต่ละลายได้ในเมตาครีซอลที่ร้อน, กรดไตรฟลูออโรอะซีติก, ฟีนอล ออโธคลอโรฟีนอล
แสงแดดและความร้อน	ถูกแสงแดดเป็นระยะเวลานานๆความเหนียวจะลดลงแต่ถ้ามีกระจกกั้น ก็จะลดอันตรายจากแสงไปได้มาก รังสีแกมมาจากโคบอลท์ 60 ก็มีผลลดความเหนียวของเส้นใยได้ โพลีเอสเทอร์จะหลอมตัวที่อุณหภูมิประมาณ 250 ° C ถ้าต้มในน้ำเดือดจะหดตัว สำหรับโพลีเอสเทอร์ที่ผ่านการทำให้อยู่ตัวโดยความร้อน (Heat setting) จะไม่หดตัว ไม่ยับหรือซักรีดที่อุณหภูมิสูง
รอยเปื้อน	เมื่อเปื้อนคราบหรือสิ่งสกปรกที่ละลายน้ำได้ จะล้างทำความสะอาดออกได้โดยง่าย แต่ถ้าเป็นคราบที่มีไขมันปนอยู่จะล้างออกได้ยาก
การย้อมสี	ย้อมได้ด้วยสีดิสเพอร์ส และสีอะโซอิก

ที่มา: ดัดแปลงจากวีระศักดิ์ (2542)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของเส้นใยโพลีเอสเทอร์

ข้อได้เปรียบ	ข้อเสียเปรียบ
1. มีความคงทนต่อการยืดหด	1. การเป็นตัวนำความร้อนที่ไม่ดี การดูดความชื้นต่ำ ทำให้สวมใส่ไม่สบายในอากาศร้อน และความชื้นสูง เนื่องจากเกิดการสะสมประจุไฟฟ้าสถิตในขณะอากาศแห้งและเย็น
2. ไม่ยับย่นง่าย เมื่ออัดจีบ (Pleated) จะได้รอยจีบที่คงทน	2. ผ้าโพลีเอสเทอร์ มีผิวสัมผัสที่ค่อนข้างกระด้างไม่อ่อนนุ่ม เช่นผ้าที่ทำจากเส้นใยธรรมชาติ ส่งผลให้ผ้ามีการทิ้งตัวไม่ดี นับเป็นข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์ของผ้าโพลีเอสเทอร์
3. ทนทานต่อการขัดสี	
4. มีน้ำหนักน้อย	
5. ทนทานต่อสารเคมี ซึ่งมีผลต่อการดูแลรักษา	
6. ทำความสะอาดได้ง่าย ทั้งวิธีการซักน้ำและซักแห้ง	

ที่มา: ดัดแปลงจากวีระศักดิ์ (2542)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การลดน้ำหนักผ้าโพลีเอสเทอร์

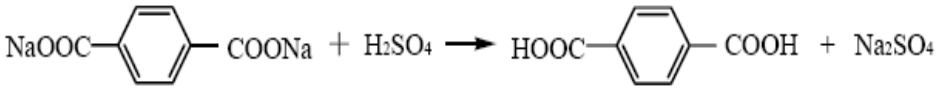
กระบวนการลดน้ำหนักผ้า มีชื่อเรียกที่แตกต่างกัน เช่น Caustic treatment หรือ Alkali weight reduction นั้นเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อการประยุกต์ใช้เส้นใยโพลีเอสเทอร์ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เนื่องมาจากปฏิกิริยาเคมีของสารเคมีประเภทด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ต่อผ้าโพลีเอสเทอร์ที่ผลิตได้ในตอนต้น หลังจากสิ้นสุดกระบวนการนี้พบว่าลักษณะสัมผัสและความทิ้งตัวของสิ่งทอประเภทเส้นใยสังเคราะห์มีค่าเพิ่มขึ้น(Latta, 1984; Jo *et al*., 2006; Fan *et al*., 2007)

ผ้าโพลีเอสเทอร์เมื่อนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ในเวลาและอุณหภูมิพอเหมาะ พบว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถกัดกร่อน และทำลายเส้นใยโพลีเอสเทอร์ได้

การลดน้ำหนักผ้าโพลีเอสเทอร์ โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ นับว่าเป็นวิธีการเพิ่มความนุ่มให้กับผ้าโพลีเอสเทอร์ที่ดีวิธีการหนึ่ง แต่มีปัจจัยหลายอย่างที่ต้องควบคุม มิฉะนั้นแล้วคุณภาพของผ้าที่ได้จะไม่สม่ำเสมอ

ปกติน้ำเสียที่ได้จากกระบวนการลดน้ำหนักผ้า ประกอบด้วย โมโนเมอร์ของโพลีเอสเทอร์ หรือ TA ในรูปของเกลือโซเดียม และเอทธิลีนไกลคอล ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยสารเคมีภายใต้สภาวะที่มีความเป็นด่างสูง (12-14) และค่า COD ประมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรจึงทำให้เกิดน้ำเสียจากกระบวนการลดน้ำหนักผ้ามีค่าพีเอชที่สูงซึ่งไม่เหมาะสมต่อการปล่อยสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ ดังนั้นต้องมีการปรับสมบัติบางประการให้มีค่าในช่วงที่เหมาะสมซึ่งกำหนดไว้ในมาตราฐานน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ เช่นการปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรด (Acidation) ผลที่ตามมาคือการเกิดสาร Terephthalic Acid เนื่องจากค่าพีเอชของน้ำเสียที่ลดลง ดังแสดงในภาพที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



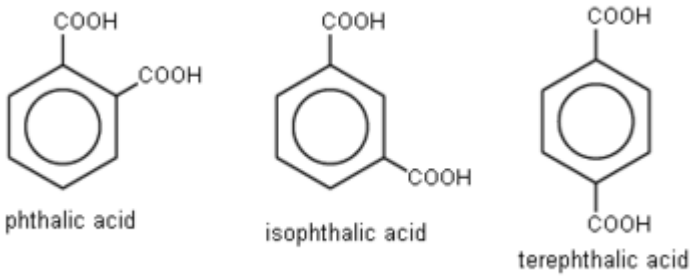
ภาพที่ 5 การเกิดสาร Terephthalic Acid (TA) ภายหลังการเกิดปฏิกิริยา Acidation

ที่มา: Fan *et al*. (2007)

4. สาร Terephthalic Acid (TA)

สาร Terephthalic Acid จัดอยู่ในกลุ่มของสารอินทรีย์ มีชื่อเรียกทางการค้าหลายชื่อ เช่น p-phthalic acid และ 1,4-benzenedicarboxylic acid เป็นสารที่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ การผลิตพลาสติกประเภทโพลีเอทธีลิน เป็นต้น ลักษณะทางกายภาพของสาร Terephthalic Acid (TA) มีดังแสดงในตารางที่ 6

ซึ่งสาร Terephthalic Acid (TA) จัดอยู่ในประเภทของสารเคมีกลุ่ม phthalic acid isomers โดยโครงสร้างของสารนี้สามารถเกิดเป็นเป็นไอโซเมอร์ได้ 3 แบบ ได้แก่ ortho, meta และ para benzene dicarboxylic acid โดยมีลักษณะโครงสร้างของสารดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 โครงสร้างของสาร phthalate isomers ทั้ง 3 รูปแบบ

ที่มา: Citizendia organization (2009)

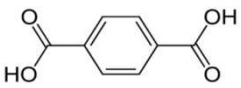
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ถึงแม้ว่า TA สามารถปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ เช่นมีการปนเปื้อนของสารนี้ในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ แต่รายงานผลการศึกษาถึงความเป็นพิษของสาร TA พบว่าสารนี้ไม่มีผลต่อสุขภาพของมนุษย์ ในการเป็นสารก่อมะเร็งหรือทำให้เกิดความผิดปกติอื่นๆ (กรมควบคุมมลพิษ, 2544)

TA ไม่จัดเป็นสาร bioaccumulate กล่าวคือสารชนิดนี้สามารถย่อยสลายได้เมื่อมีการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น การเกิด hydroxyl radical oxidation ในชั้นบรรยากาศ และมีการย่อยสลายทางชีวภาพซึ่งพบได้ เมื่อมีการปนเปื้อนของสารนี้ในดินหรือบริเวณน้ำผิวดิน ภายใต้สภาวะมีอากาศ ผลของการตรวจพบสาร Terephthalic Acid ในชั้นบรรยากาศรวมถึงตัวอย่างของแหล่งน้ำนั้นมีค่าน้อยมาก (U.S. Environmental Protection Agency, 1994)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ข้อมูลความปลอดภัยเคมีภัณฑ์ (MSDS) บางประการของสาร Terephthalic Acid(TA)

ด้าน	ข้อมูลสาร Terephthalic Acid (TA)
ชื่อเคมี IUPAC	1,4-Benzenedicarboxylic acid
ชื่อเคมีทั่วไป	Terephthalic Acid
ชื่อพ้องอื่นๆ	Benzene para Dicarboxylic Acid; P-Phthalic acid; 1,4-Benzenedicarboxylic acid; P-benzenedicarboxylic acid; TPA
สูตรโมเลกุล	$C_8H_6O_4$
สูตรโครงสร้าง	
รหัส CAS NO.	100-21-0
สถานะ	เป็นผง หรือผลึก
สี	ขาว
กลิ่น	คล้ายกรด
น้ำหนักโมเลกุล	166.13
จุดเดือด(°ซ.)	300
จุดหลอมเหลว/จุดเยือกแข็ง(° ซ.)	>300
ความถ่วงจำเพาะ(น้ำ=1)	1.51
ความสามารถในการละลายน้ำที่(กรัม/100 มล.)	ไม่ละลายน้ำ ที่ 20° ซ.

ที่มา: ดัดแปลงจากกรมควบคุมมลพิษ (2544)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การปนเปื้อนของ Terephthalic Acid (TA) ในสิ่งแวดล้อม

5.1 การปนเปื้อนของสาร TA ในอากาศ

U.S. Environmental Protection Agency (1994) รายงานการศึกษาพบว่าสาร TA สามารถปนเปื้อนในชั้นบรรยากาศได้ แต่มีปริมาณความเข้มข้นของสารนี้ไม่มาก ทั้งนี้มีสาเหตุเนื่องมาจากสารนี้มีค่าความดันไอ และค่า Henry's law constant ต่ำ รวมทั้งค่าสัดส่วนระหว่าง octanol/water สูง

การย่อยสลายของสาร TA เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาระหว่างไอของสาร TA กับ อนุมูลของกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl radicals) ในชั้นบรรยากาศ ทั้งนี้ Syracuse ResearchCorporation (1988) แสดงผลการศึกษาถึงครึ่งชีวิตในการย่อยสลายสารในลักษณะดังกล่าวว่าใช้เวลาประมาณ 8.6 วัน โดยกระบวนการ photodegradation

5.2 การปนเปื้อนของสาร TA ในน้ำ

ก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาว่า สาร TA ที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมนั้น ส่วนมากจะถูกดูดซับติดกับดินหรือตะกอน มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ละลายในชั้นของน้ำ แต่การละลายของ TA ในน้ำอาจมีค่าเพิ่มขึ้นในสารประเภทตัวทำละลายบางชนิด ซึ่งส่งผลให้เกิดการเพิ่มปริมาณของสาร TA ในน้ำใต้ดินสูงขึ้นได้

Bemis *et al.* (1982) แสดงผลการศึกษาว่า โอกาสในการพบการปนเปื้อนของสาร Terephthalic Acid (TA) ในธรรมชาตินั้น เกิดได้ในส่วนของแหล่งน้ำและดิน ทั้งนี้เนื่องมาจากความสามารถในการละลายน้ำของสาร TA มีค่าที่ต่ำ แต่ในท้ายที่สุดสารนี้จะเกิดการย่อยสลายได้เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม

5.3 การปนเปื้อนของสาร TA ในดิน

การกระจายตัวของแหล่งอุตสาหกรรมและบริเวณฝังกลบขยะที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การปนเปื้อนของสาร TA ในดินมากขึ้นด้วย ทั้งนี้พบว่าอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของสาร TA นั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาจเกิดขึ้นในดินได้ แต่มีค่าต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยสลายทางชีวภาพของสารนี้ในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสาร TA สาเหตุเนื่องมาจากสาร TA สามารถถูกดูดซับได้บนพื้นผิวของ soil organic matter ทำให้ความสามารถในการถูกย่อยสลายทางชีวภาพ (bioavaiability) ของสารชนิดนี้มีค่าลดลง

ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงความสามารถในการย่อยสลายของสาร TA โดยเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมีการประยุกต์ใช้จริงในการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ ทั้งนี้เนื่องมาจากอัตราการย่อยสลายของสารชนิดนี้ด้วยวิธีการ hydrolysis และ photolysis มีค่าต่ำ(U.S. Environmental Protection Agency, 1994)

6. แนวทางการกำจัดสาร Terephthalic Acid (TA)

เนื่องจากสารประกอบอะโรมาติค(aromatic compounds)มีการย่อยสลายได้ช้าภายใต้ภาวะ anaerobic condition ส่งผลให้มีการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมภายใต้สภาวะมีอากาศ (Lau, 1978) ก่อนหน้านี้มีการรายงานผลการศึกษาถึงการย่อยสลายของสารในกลุ่มนี้ เช่น phthalate isomers ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ยกตัวอย่างเช่น upflow anaerobic sludge blanket processes (Macarie *et al*., 1992; Cheng *et al*., 1997; Kleerebezem *et al*., 1997)แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการย่อยสลายสาร TA ภายใต้สภาวะมีอากาศ (Aerobic condition) มีค่าสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยสลายสารชนิดนี้ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ (Anaerobic condition) (Kleerebezem *et al*., 1999; Chang *et al*., 2005)

การย่อยสลายของสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเช่นสารในกลุ่มไฮโดรคาร์บอน, สารกลุ่ม polychlorinated biphenyls (PCBs), polyaromatic hydrocarbon, สารประกอบ heterocyclic (เช่น pyridine/quinoline) โดยเชื้อจุลินทรีย์ ได้รับความสนใจในการศึกษาตั้งแต่อดีต (Harada and Koiwa, 1977; Engelhardt *et al*., 1978; Aftring *et al*., 1981; Elmorsi and Hopper, 1981; Karegoudar and Pujar, 1984; Shelton *et al*., 1984; Karegoudar and Pujar, 1985; Wang *et al*., 1995; Kleerebezem *et al*., 1999)

กระบวนการย่อยสลายของสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนโดยเชื้อจุลินทรีย์นั้นส่วนใหญ่เริ่มต้นจากการเปลี่ยนโครงสร้างของสารตั้งต้น (Mineralization) ทั้งนี้สารในกลุ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

phthalate มักเริ่มต้นด้วยการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เพื่อทำลายพันธะเอสเทอร์ของสาร (Hydrolysis) (Engelhardt and Wallnofer, 1978; Benckiser and Ottow, 1982; Taylor and Ribbons, 1983; Ribbons *et al*., 1984) ผลการศึกษาพบว่า การย่อยสลายสารประเภทนี้ภายใต้สภาวะมีอากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และน้ำ (Ribbons *et al*., 1984) ขณะที่การย่อยสลายสารภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ Acetate และก๊าซมีเทน (CH_4) (Kleerebezem *et al*., 1999; Krishna *et al*., 2008)

ในปัจจุบันผลการศึกษาในเรื่องของการย่อยสลายสาร TA นั้นแพร่หลาย เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถนำสารดังกล่าว มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเจริญเติบโต ส่งผลทำให้มีการนำความรู้ในส่วนนี้มาประยุกต์ใช้กับการย่อยสลายสารทางชีวภาพ (Biodegradation)

นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาเพิ่มเติมในด้านการเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายทางชีวภาพมากขึ้น เช่น การประยุกต์ใช้วิธีการ Advanced oxidation processes (AOPs) ในการ pretreatment น้ำเสียจากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมสิ่งทอ (Yeber *et al*., 1999; Kang *et al*., 2000; Ledakowicz *et al*., 2001; Rodriguez *et al*., 2002; Pokhrel *et al*., 2004)

7. กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation)

7.1 กระบวนการ Bioremediation

การแก้ปัญหาด้วยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งใช้สิ่งมีชีวิต เช่น พืช แบคทีเรีย และ รา เป็นต้น ในการสลายสารอินทรีย์อันตรายที่ปนเปื้อน หรือลดความเป็นพิษของสารอินทรีย์ลง เพื่อรักษาสภาพของดิน, แร่ธาตุ, ดินตะกอน (sludges) และสิ่งต่างๆที่ละลายอยู่ในน้ำ ซึ่งวิธีการนี้มีการคิดค้นและพัฒนา เพื่อกำจัดสารที่ย่อยสลายได้ยากและสารมีพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ Bioremediation สามารถแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการ ดังนี้

7.1.1 Biostimulation เป็นกระบวนการปรับสภาพของสิ่งแวดล้อม โดยการเติมแร่ธาตุอาหาร เพื่อกระตุ้นเชื้อจุลินทรีย์ให้มีความสามารถในการกำจัดของเสียและสารที่ก่อมลพิษ

7.1.2 Bioaugmentation เป็นกระบวนการเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสิ่งปนเปื้อนลงไปบริเวณที่ต้องการบำบัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.1.3 Intrinsic Bioremediation (Natural Attenuation) เป็นกระบวนการย่อยสลายสารปนเปื้อนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ

กระบวนการ Bioremediation ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายจากนักบำบัดทางสิ่งแวดล้อมทั่วโลก เพราะเป็นวิธีการที่มีต้นทุนในการดำเนินงานต่ำกว่าการใช้วิธีทางเคมี หรือทางกายภาพในการบำบัด และสามารถเลือกวิธีในการบำบัดที่เหมาะสม ภายหลังการพิจารณาปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องร่วมด้วยซึ่งตารางที่ 7 แสดงข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบจากกระบวนการนี้

ตารางที่ 7 ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของกระบวนการ Bioremediation

ข้อได้เปรียบ	ข้อเสียเปรียบ
1. มีความเฉพาะเจาะจงสูง	1. ใช้ระยะเวลาในการบำบัดสารปนเปื้อนค่อนข้างนาน
2. ค่าใช้จ่ายน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการบำบัดแบบ Excavation หรือ Incineration Process	2. ต้องการสภาวะที่มีความเหมาะสม และทดสอบการบำบัดกับบริเวณที่มีการปนเปื้อนจริง
3. ไม่ส่งผ่านการปนเปื้อนจากบริเวณหนึ่งไปสู่บริเวณอื่น	3. อาจพบความเสี่ยงในระหว่างการบำบัด จากตัวยับยั้งได้
4. ใช้กระบวนการตามธรรมชาติ	4. สารประกอบบางชนิด ไม่อาจถูกย่อยสลายตามธรรมชาติได้
5. ได้รับการยอมรับจากสาธารณะ	

8. ความสามารถของการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์

คือ กระบวนการย่อยสลายสารมลพิษอินทรีย์ซึ่งย่อยสลายได้ช้าในธรรมชาติ (Xenobiotic) เช่น สารประกอบในกลุ่มไฮโดรคาร์บอน(Hydrocarbon), ปิโตรเลียม (Petroleum), BTEX, Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs), Polychlorinated biphenyls (PCBs), Chlorinated phenols, Pesticide compounds สารพิษตกค้างอื่นๆในดินและแหล่งน้ำ รวมทั้งสารพิษและสารอินทรีย์ที่เหลือทิ้งจากภาคอุตสาหกรรมด้วยสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น แบคทีเรีย, เชื้อรา, สาหร่าย หรือสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง มาช่วยย่อยสลายสารมลพิษอินทรีย์ดังกล่าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจัยที่ส่งผลในการย่อยสลายสาร Xenobiotic ได้แก่

8.1 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนที่ต้องการกำจัด

8.2 สารตั้งต้น เช่น ชนิดของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการย่อยสลาย และตำแหน่งของสารตั้งต้นที่เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา

8.3 สารอาหาร แหล่งอาหารที่จำเป็นในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจน

8.4 สภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ, ความเป็นกรดด่าง (pH) ซึ่งมีผลต่อระยะเวลาในการปรับตัวและเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

8.5 คุณสมบัติของสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งเป็นสารที่เราต้องการย่อยสลาย

Alexander (1994) และ Vidali (2001) รายงานถึงปัจจัยบางประการที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการใช้วิธีการนี้ เช่น กลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ต้องมีระบบเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนที่เราสนใจ นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายรวมทั้งตัวกลางต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาของการย่อยสลายสาร TA นั้นต้องมีความเป็นพิษที่ลดลง นอกจากนี้สภาพแวดล้อมของบริเวณที่มีการปนเปื้อนต้องเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งสารปนเปื้อนที่ต้องการบำบัดนั้นต้องสามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ (bioavailable)

ภาพที่ 7 แสดงกลไกของการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Anaerobic degradation) ดังนี้ ในเบื้องต้นนั้นเกิดการเปลี่ยนรูปของสาร TA กลายเป็นเอสเทอร์ของ CoA (ester of CoA) โดยเอนไซม์ acyl CoA synthetase (Nozawa and Maruyama, 1988)ตามด้วยการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation ด้วยการทำงานของเอนไซม์ decarboxylase เกิดเป็น benzoyl Co A ท้ายที่สุดเกิดการแตกตัวของโครงสร้างวงแหวน (ring cleavage) เพื่อเข้าสู่ β – oxidation pathway ต่อไป (Vamsee and Phale, 2008)

ผลการศึกษาในเรื่องของการย่อยสลายสาร TA ภายใต้สภาวะมีอากาศ (Aerobic condition) พบว่ามีค่าสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ (Anaerobic condition) (Kleerebezem *et al*., 1999; Chang *et al*., 2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 8 Vamsee and Phale (2008) แสดงกลไกของการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะมีอากาศ (Aerobic degradation) ดังนี้ขั้นตอนการเมแทบอไลต์ของสารนี้เริ่มต้นจากการเกิดปฏิกิริยา double hydroxylation ที่ตำแหน่ง 1 และ2 โดยการทำงานของเอนไซม์ terephthalate 1,2-dioxygenase เกิดเป็น 2-hydro-1,2-dihydroxy Terephthalic Acid ท้ายที่สุดเกิดสารตัวกลางที่เรียกว่า protocatechuate (3,4-dihydroxybenzoate) ทั้งนี้สาร protocatechuate ซึ่งเป็นสารตัวกลางของการย่อยสลายสาร TA ภายใต้สภาวะมีอากาศ (Aerobic condition)

Eaton and Ribbons (1982) รายงานผลการศึกษาว่า protocatechuate สามารถถูกเปลี่ยนรูปต่อ ซึ่งส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของสาร TA ได้แตกต่างกัน 2 แบบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เช่น เอนไซม์ protocatechuate 4,5-dioxygenase (*meta*-cleavage pathway) หรือ เอนไซม์ protocatechuate 3,4-dioxygenase (*ortho*-cleavage pathway) ดังแสดงในภาพที่ 8

Vamsee and Phale (2008) รายงานการเกิด 3,4-dihydroxybenzoate หรือ protocatechuate เป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในทุกวิถีการย่อยสลายของสารในกลุ่ม phthalate isomer ทั้ง 3 รูปแบบ ในสภาวะมีอากาศ ซึ่งลักษณะการแตกวงโครงสร้างของสาร protocatechuate นั้นสามารถแบ่งได้ 2 ลักษณะกล่าวคือ แบบแรกเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ protocatechuate 4,5-dioxygenase (เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า extradiol, *meta* pathway) ซึ่งแตกต่างจากการทำงานของเอนไซม์ protocatechuate 3,4-dioxygenase (intradiol, *ortho* pathway) ดังแสดงในภาพที่ 8

การทำงานของเอนไซม์ protocatechuate 4,5-dioxygenase เริ่มจากการเปลี่ยนสาร 3,4-dihydroxybenzoate กลายเป็น 4-carboxy-2-hydroxy-muconic semialdehyde ท้ายสุดจะเกิดเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยา 4-oxalocitramalte คือ pyruvate และoxaloacetate (Eaton and Ribbons, 1982; Gibson and Subramanian, 1984; Eaton, 2001)

ในขณะที่การทำงานของเอนไซม์ protocatechuate 3,4-dioxygenase มีผลในการทำลายโครงสร้างของสาร 3,4-dihydroxybenzoate เกิดเป็นสาร ß-carboxy-*cis,cis*-muconic acid (Gibson and Subramanian, 1984; Vamsee *et al*., 2006) ตามด้วยการเกิดสารตัวกลางเช่น succinyl-CoA และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

acetyl-CoA เพื่อเข้าสู่วัฏจักร ß-ketoadipate ต่อไป (Gibson and Subramanian, 1984; Zylstra *et al*., 1989)

ผลการศึกษาส่วนใหญ่พบว่า เชื้อจุลินทรีย์มีชีวิต ซึ่งมีแหล่งอาศัยอยู่บริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารที่เป็นมลพิษนั้น มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบที่เป็นมลพิษได้

ก่อนหน้านี้มีการศึกษาเรื่องการย่อยสลายของไอโซเมอร์ของสาร benzene dicarboxylate, phthalate (1,2 substitution), isophthalate (1,3) และ terephthalate (TER) (Keyser *et al*., 1976; Ribbons *et al*., 1984)

Liang *et al*. (2008) รายงานการศึกษาถึงชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในกลุ่ม phthalate นั้นส่วนใหญ่เป็นเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม aerobes หรือ facultative anaerobes นอกจากนั้นยังแบ่งย่อยได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้ *Proteobacteria, Actinobacteria*, *Firmicutes* และ *Bacteroids/ Chlorobi* ตัวอย่างเช่น *Sphingomonas*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*และ *Rhodococcus*

ทั้งนี้ความสามารถในการย่อยสลายสาร phthalate isomer ทั้ง 3 รูปแบบนั้นอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสาร phthalate ที่ต้องการศึกษา เนื่องจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการนั้นมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้มีการศึกษาการประยุกต์ใช้เชื้อผสม (mixed culture) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน

Kimura and Ito (2001) รายงานผลการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Pseudomonas* และ *Bacillus*ในการบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นของสาร Terephthalate เท่ากับ 8 กรัมต่อลิตรได้สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับการบำบัดโดยเชื้อหนึ่งกลุ่มทั้งนี้เนื่องจากการใช้สารนี้เป็นสารตั้งต้นในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ หรือกล่าวได้ว่า TA ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน

Harada and Koiwa (1977) รายงานผลการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *Alcaligenes*, *Arthrobacter* และ *Corynebacterium* ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสาร phthalate isomers ทั้ง 3 รูปแบบในการเป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vamsee and Phale (2008) รายงานผลการศึกษากลุ่มของเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องต่อการย่อยสลายสารกลุ่ม phthalate กล่าวคือ การย่อยสลายที่สมบูรณ์นั้น เกิดจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ Permeases, เอนไซม์ Terephthalate-dioxygenase และเอนไซม์ Protocatechuate dioxygenase

รายงานการศึกษาเรื่องเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Comamonas testosterone* YZW-D (Wang *et al*., 1995), *Pseudomonas cepacia* DB01 (Chang and Zylstra, 1998), *Viarovorax paradoxus* T4 (Wang and Gu, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* PP4, *Pseudomonas* sp. PPD (Vamsee *et al*., 2006), *Rhodococcus rubropertinctus* (Naumova *et al*., 1986), *Rhodococcus* sp. DK17 (Choi *et al*., 2005) นอกจากนี้ Qiu *et al*. (2006) รายงานผลการย่อยสลายสาร TA ภายใต้สภาวะไร้อากาศของเชื้อ *Pelotomaculum isophthalicum*(JI^T) และการเลี้ยงแบบ cocultured ร่วมกันระหว่างเชื้อ *Methanospirillum hungatei* และเชื้อ *Pelotomaculum terephthalicum* (JT^T) ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายสาร TA ในสภาวะไร้อากาศได้เช่นเดียวกัน

Ikeda *et al*. (1998) และ Hudlicky *et al*. (1999) ได้อธิบายผลการศึกษาว่าการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ ในกระบวนการย่อยสลายสารที่มีลักษณะโครงสร้างวงแหวนนั้น มีความสำคัญในการศึกษา เพื่อใช้ในการเตรียมสารตัวกลางสังเคราะห์ที่มีประโยชน์ชนิดอื่นได้

Sugimori *et al*. (2000) รายงานผลการศึกษาว่าการย่อยสลายของสาร TA ภายใต้สภาวะที่มีอากาศโดยเชื้อ *Dietzia* sp. สายพันธุ์ GS-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นด่าง (alkaliphilic bacterium) เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Kimura and Ito (2001) ซึ่งแสดงการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์แตกต่างกัน (mixed culture) มา ประยุกต์เพื่อใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรม ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างสูงแม้ว่าก่อนหน้านี้ ได้มีรายงานการศึกษาถึงความสามารถของการประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียในการย่อยสลายสาร TA ภายใต้สภาวะของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงเป็นกลาง

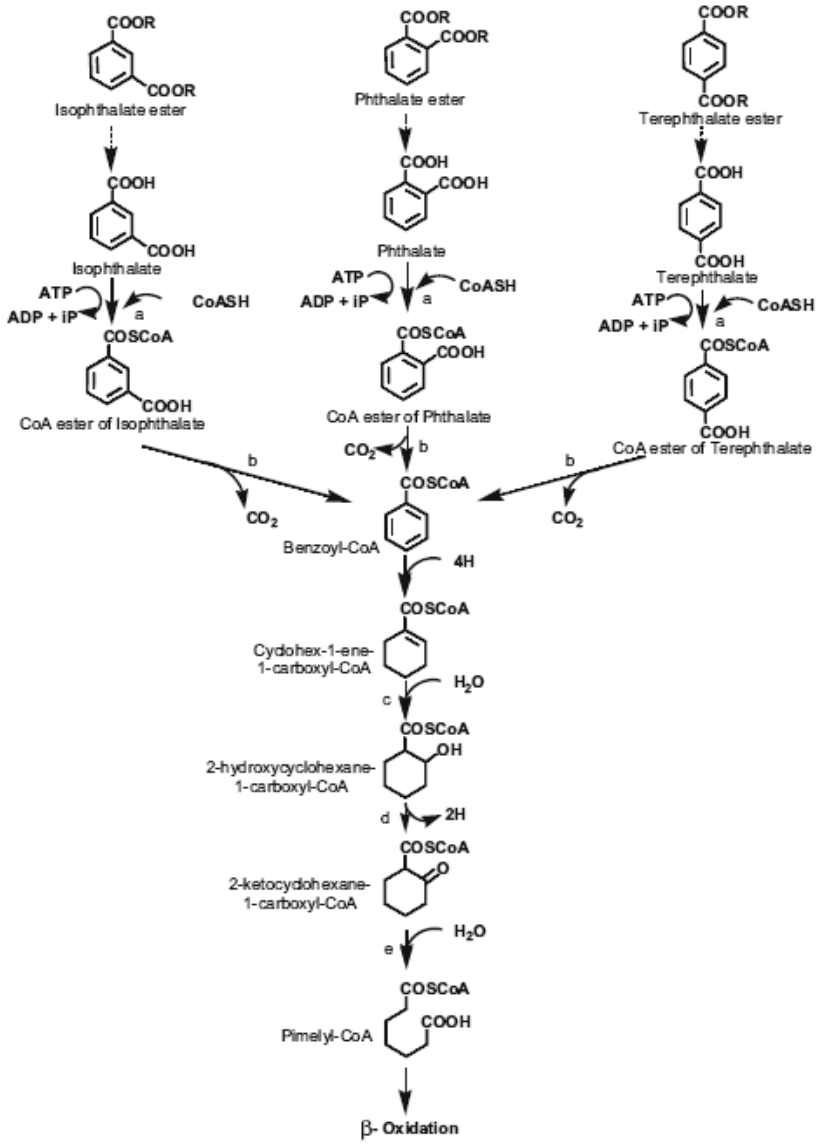
Shigematsu (2003) รายงานว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกมาจาก activated sludge ที่เก็บมาจากบริเวณบำบัดน้ำเสียของโรงงานในประเทศญี่ปุ่น โดยเทคนิค enrichment ซึ่งมีสาร TA เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะสัณฐานวิทยาของไอโซเลต T7^{T}มีดังนี้ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเซลล์เป็นแท่งสั้น จากการวิเคราะห์ทางด้าน phylogenetic พบว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Delftia*

นอกจากนี้มีตัวอย่างการศึกษาถึงการย่อยสลายทางชีวภาพของสารนี้ในสภาวะมีอากาศ พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น กลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Nocardia* sp. strain DSM 43251 (Engelhardt *et al*., 1979), *Bacillus* sp. (Karegoudar and Pujar, 1985) และ *Dietzia* sp. strain GS-1 (Sugimori *et al*., 2000) นอกจากนี้พบว่า *Proteobacteria*, *Bordetella* sp. strain K1, *Pseudomonas* sp. strain C4S (Kimura and Ito, 2001) และ *Comamonas testosterone* strains, T-2 (Schlafli *et al*., 1994) และสายพันธุ์ YZW-D (Wang *et al*., 1995) มีความสามารถในการย่อยสลายสารนี้เช่นเดียวกัน

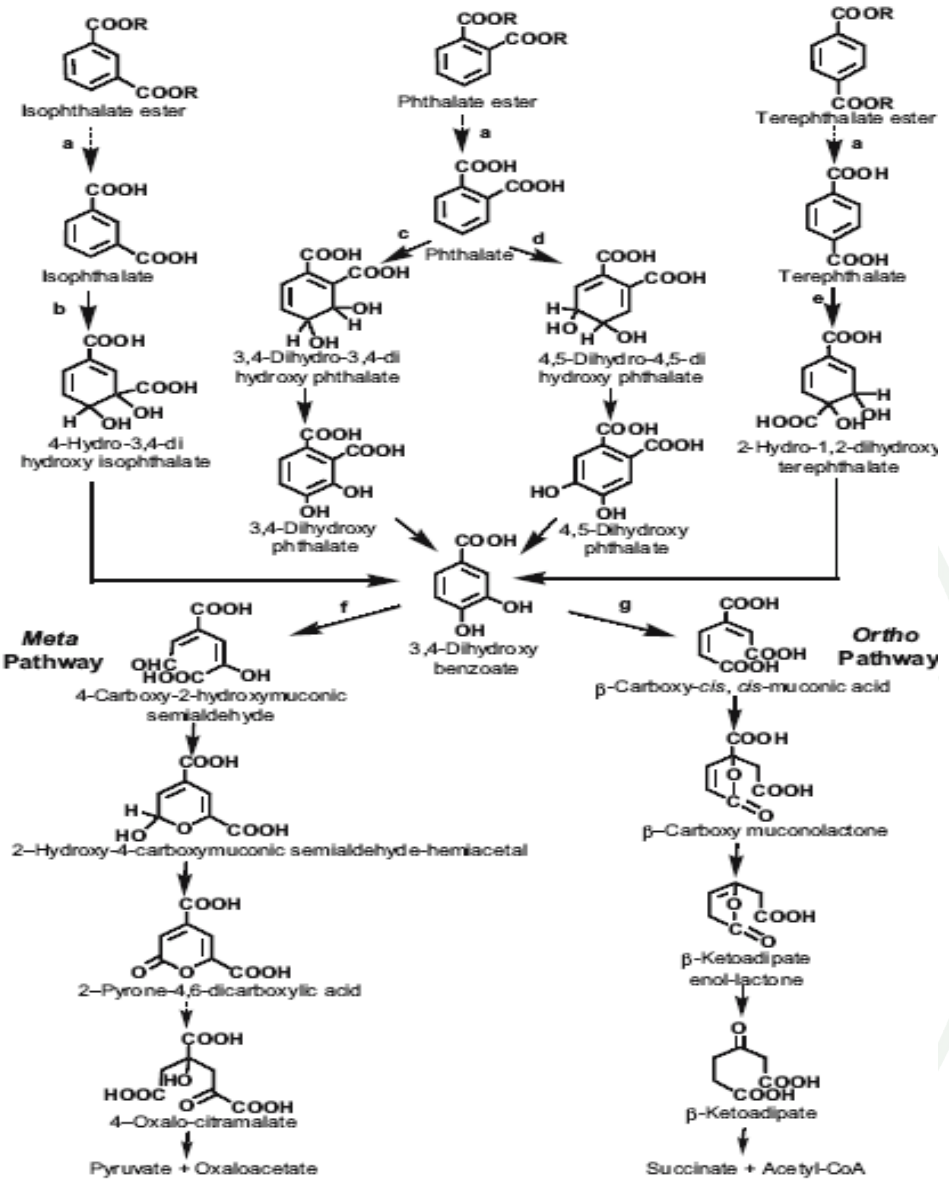
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 กลไกของการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Anaerobic degradation) โดย a: CoA ligase; b: decarboxylase; c: cyclo-1-ene-1-carboxyl-CoA hydratase; d: 2-hydroxycyclohexane-1-carboxy-CoA dehydrogenase; e: 2-ketocyclohexane-1-carboxyl-CoA hydrolase

ที่มา: Vamsee *et al*. (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 กลไกของการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะมีอากาศ (Aerobic degradation) โดย a: esterase; b: isophthalate 3,4-dioxygenase; c: phthalate 3,4-dioxygenase; d: phthalate 4,5-dioxygenase; e: terephthalate 1,2-dioxygenase; f: protocatechuate 4,5-dioxygenase; g: protocatechuate 3,4-dioxygenase

ที่มา: Vamsee *et al*. (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างดินที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีแหล่งที่มาแตกต่างกัน เช่น

1.1 ตัวอย่างดินตะกอนจากโรงงานสามพรานการทอ จ. นครปฐม
1.2 ตัวอย่างดินจากบริเวณทุ่งนา จ. อยุธยา
1.3 ตัวอย่างดินจากบริเวณอาคารอุตสาหกรรมเกษตร 3 ม.เกษตรศาสตร์ จ. กรุงเทพมหานคร
1.4 ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะ จ. กาฬสินธุ์
1.5 ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะ จ. กาญจนบุรี
1.6 ตัวอย่างดินตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสียจ. กรุงเทพมหานคร
1.7 ตัวอย่างดินตะกอนจากโรงงานแปรรูปอาหารแช่แข็ง จ. สมุทรสาคร
1.8 ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะ จ. สงขลา
1.9 ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะทางการเกษตร จ. ปราจีนบุรี
1.10 ตัวอย่างดินบริเวณข้างบึงพลาญชัย จ. ร้อยเอ็ด
1.11 ตัวอย่างดินบริเวณริมแม่น้ำชี จ. ร้อยเอ็ด
1.12 ตัวอย่างดินบริเวณดอยปุย จ. เชียงใหม่
1.13 ตัวอย่างดินจากบริเวณแหล่งฝังกลบขยะทางการเกษตร เชียงคาน จ. เลย
1.14 ตัวอย่างดินภูกระดึง จ. เลย
1.15 ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะบริเวณอุตสาหกรรมอาหาร จ. สระบุรี
1.16 ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะบริเวณอุตสาหกรรรม จ. สระบุรี
1.17 ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะจ. ชุมพร
1.18 ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะจ.สุราษฎร์ธานี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เครื่องเขย่าเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

2.2 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)

2.3 เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge)

2.4 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง

2.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

2.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

2.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

2.8 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator)

2.9 เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็น (ดังระบุในแต่ละการทดลอง)

2.10 ถังหมักขนาด 2 ลิตร (EYELA Mini Jar Fermenter รุ่น M-100)

2.11 สารเคมีต่างๆที่จำเป็น (ดังระบุในแต่ละการทดลอง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA)

ตัวอย่างดินและดินตะกอนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานสามพรานการทอ จังหวัดนครปฐม และแหล่งดินธรรมชาติจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ สาร Terephthalic Acid (TA) (Merck, Darmstadt, Germany) ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูง โดยเตรียมสารละลาย TA ตามวิธีการของ Kleerebezem *et. al.* (1999a) นำไปผสมกับสารเคมีชนิดอื่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ดัดแปลงจากวิธีการของ Kimura และ Ito (2001) เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป การเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA ทำได้โดยเติมตัวอย่างดิน 10 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีส่วนประกอบของสาร TA ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน ทำต่อเนื่อง 3 ครั้ง จนกระทั่งสังเกตุความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA)

ภายหลังการถ่ายเชื้อแขวนลอยตามวิธีการในข้อ 1. ครั้งที่ 3 นำเชื้อแขวนลอยมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นถ่ายสารละลายเจือจางดังกล่าวลงในจานเพาะเชื้ออาหารแข็งชนิดเดียวกันที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จานละ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยเชื้อให้ทั่วแล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเลือกเก็บโคโลนีที่มีสี รูปร่าง และลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak บนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA)

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ โดยถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลวชนิดเดียวกัน 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวชนิดเดียวกันที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการบ่มในเครื่องเขย่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Sugimori *et al*., 2000) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พร้อมกับการพิจารณาสัดส่วนของปริมาณสาร Terephthalic Acid (TA)ที่ลดลง ณ เวลา 12 ชั่วโมง (ภาคผนวก ข ข้อ 1.1) ทั้งนี้เลือกเก็บเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สาร Terephthalic Acid (TA) ในการเจริญได้เร็วที่สุด โดยเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียงชนิดเดียวกัน เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4. การศึกษาความเข้มข้นของTerephthalic Acid (TA) ที่มีต่อความสามารถของการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะอาหารเหลว

การทดสอบความเข้มข้นของสาร Terephthalic Acid (TA) ที่มีต่อกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารนี้ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว nondefined medium ที่ประกอบด้วยสาร TA 0.25, 0. 5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Sugimori *et al*., 2000) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ร่วมกับการพิจารณาสัดส่วนปริมาณสาร TA ที่ลดลงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA)

การทดสอบค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) นั้นโดยเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ6, 7, 8 และ 9 บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Sugimori *et al*., 2000) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และพิจารณาปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในตัวอย่างน้ำหมักที่ได้ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารชนิดนี้ (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2)

6. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA)

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) นั้นทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ3 ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว nondefined medium ทำการบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ช่วงอุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Sugimori *et al*., 2000) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในตัวอย่างน้ำหมักที่ได้ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารชนิดนี้ (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การศึกษาผลของการเติม yeast extract ลงในอาหารที่มีผลต่อการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะอาหารเหลว

การทดสอบผลของสาร yeast extract ที่มีต่อกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารนี้ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ3ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว nondefined medium ที่ความเข้มข้นสาร Terephthalic Acid (TA) 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และเพิ่มปริมาณสาร yeast extract ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 0, 0.02, 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งทำให้ปริมาณสาร yeast extract ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 0.02, 0.04, 0.12 และ 0.52 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Sugimori *et al*., 2000) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ร่วมกับการพิจารณาปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในตัวอย่างน้ำหมักที่ได้ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารชนิดนี้ (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2)

8. การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA ได้รวดเร็วที่สุดจากการศึกษาในข้อ 3 จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท G5, P5 และ S2 ที่แยกมาจากตัวอย่างดินและดินตะกอน โดยเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแยกกันในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว nondefined medium ที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พิจารณาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ซึ่งมีค่าโดยประมาณเท่ากับ 0.7 (ดัดแปลงจาก Wang *et al*., 2008) จากนั้นนำเซลล์แต่ละชนิดมาผสมในสัดส่วนที่เท่ากัน สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการจัดกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 ไอโซเลทเป็น 4 กลุ่มดังนี้ G5P5, G5S2, P5S2 และ G5P5S2 เพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ที่ความเข้มข้นของสาร Terephthalic Acid (TA) เท่ากับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก ๆ 12 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำมาวิเคราะห์การ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Sugimori *et al*., 2000) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และพิจารณาปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในน้ำหมักตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2)

9. ศึกษาการเจริญและความสามารถของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในระดับถังหมักขนาด 2.0 ลิตร (EYELA Mini Jar Fermenter รุ่น M-100)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid ทั้ง 3 ไอโซเลท ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว nondefined medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เพื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งมีค่าประมาณเท่ากับ 0.7 (ดัดแปลงจาก Wang *et al*., 2008)นำเซลล์แต่ละชนิดมาผสมในสัดส่วนที่เท่ากัน จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอย 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันปริมาตร 1.5 ลิตร ที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง พิจารณาการเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) และปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในน้ำหมัก (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2)

10. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) โดยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) บางประการของเชื้อจุลินทรีย์และการจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับเบส

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีบางประการของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในข้อ 2 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง Nondefined medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อย้อมสีแบบแกรมการเคลื่อนที่และทดสอบ Catalase ตามลำดับ (ภาคผนวก ข ข้อ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ) และการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA ด้วยวิธีการ 16sRNA เพื่อให้สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ถูกต้องมากขึ้น (Wheeler *et al*., 2003)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

11. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

12. ระยะเวลาในการทดลอง

ระยะเวลาเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2551 ถึง ตุลาคม 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA)

การคัดเลือกเบื้องต้น (primary screening) เป็นการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) จากแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินในแหล่งต่างๆของประเทศไทย โดยจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA ได้จะมีการเจริญเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง nondefined medium ที่มีความเข้มข้นของสาร Terephthalic Acid (TA) 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) การเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกมาได้แต่ละสายพันธุ์ จะใช้สัดส่วนของสาร Terephthalic Acid (TA) ที่ลดลงภายใน 12 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์) เป็นตัวบ่งชี้ (ภาคผนวก ข ข้อ 1.1)

ผลการทดลองมีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในแหล่งต่างๆ ทั้งหมด 121 ไอโซเลท

คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งดินและดินตะกอนทั้งสิ้น 18 แหล่งในประเทศไทย ซึ่งพิจารณาจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสาร TA และแหล่งฝังกลบขยะ รวมถึงบ่อบำบัดน้ำเสีย โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nondefined medium ที่ประกอบด้วยสาร TA ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายหลังจากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA ได้ทั้งหมดจำนวน 121 ไอโซเลท (ตารางที่ 8) และจุลินทรีย์จำนวน 31 ไอโซเลท มีความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ในชั่วโมงที่ 12 มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ โดยจุลินทรีย์กลุ่มที่แยกได้จากดินตะกอนของบำบัดน้ำเสียของโรงงานสิ่งทอ (S)และบ่อบำบัดน้ำเสียของแหล่งชุมชน (P) มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่สามารถย่อยสลายสาร TA มากที่สุด สันนิษฐานเบื้องต้นว่าตัวอย่างดินตะกอนบริเวณดังกล่าว เป็นบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารนี้ หรือสารปนเปื้อนซึ่งมีลักษณะโครงสร้างใกล้เคียงกับสารชนิดนี้ (Maszenan *et al*., 2011) ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวจะนำไปใช้เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 31 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากการคัดเลือกเบื้องต้น ในอาหารเหลว nondefined medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาวัดทุก 12 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และปริมาณสาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Terephthalic Acid (TA) ที่ลดลง ณ เวลา 12 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 และ 240 นาโนเมตรตามลำดับ จากตารางที่ 9 เมื่อพิจารณาผลความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ณ เวลา 12 ชั่วโมง ไอโซเลต S2, P5 และ G5 สามารถใช้สาร TA ในการเจริญได้เร็วที่สุด จุลินทรีย์ดังกล่าวนำไปใช้เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) จากตัวอย่างดินของแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย เมื่อเลี้ยงในอาหาร nondefined medium ที่มี TA 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

Source	Number of TA-degrading microorganims (isolate)	TA-degrading ability				
		+	++	+++	++++	+++++
S	15	-	5	-	8	2
B	8	2	6	-	-	-
C	5	-	-	2	1	2
E	8	6	-	-	1	1
G	15	10	-	-	2	3
P	8	-	-	-	-	8
sm	6	1	-	-	-	5
sk	5	-	3	-	2	-
1	5	-	-	1	1	3
2	3	-	3	-	-	-
4	3	-	-	3	-	-
dp	5	3	-	-	-	2
chk	7	4	2	1	-	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Source	Number of TA-degrading microorganims (isolate)	TA-degrading ability				
		+	++	+++	++++	+++++
5	6	-	4	2	-	-
6	5	2	1	-	-	2
7	9	-	-	3	5	1
8	4	3	-	-	-	1
9	4	2	1	-	-	1

หมายเหตุ สัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลอง

S ตัวอย่างดินตะกอนจากโรงงานสามพรานการทอ จ. นครปฐม

B ตัวอย่างดินจากบริเวณทุ่งนา จ. อยุธยา

C ตัวอย่างดินจากบริเวณอาคารอุตสาหกรรมเกษตร 3 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ. กรุงเทพมหานคร

E ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะ จ. กาฬสินธุ์

G ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะ จ. กาญจนบุรี

P ตัวอย่างดินตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสีย จ. กรุงเทพมหานคร

sm ตัวอย่างดินตะกอนจากโรงงานแปรรูปอาหารแช่แข็ง จ. สมุทรสาคร

sk ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะ จ. สงขลา

1 ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะทางการเกษตร จ. ปราจีนบุรี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 (ต่อ)

หมายเหตุ สัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2	ตัวอย่างดินบริเวณข้างบึงพลาญชัยจ. ร้อยเอ็ด
4	ตัวอย่างดินบริเวณริมแม่น้ำชี จ. ร้อยเอ็ด
dp	ตัวอย่างดินบริเวณดอยปุย จ. เชียงใหม่
chk	ตัวอย่างดินจากบริเวณแหล่งฝังกลบขยะทางการเกษตร เชียงคาน จ. เลย
5	ตัวอย่างดินภูกระดึง จ. เลย
6	ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะบริเวณอุตสาหกรรมอาหาร จ. สระบุรี
7	ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะบริเวณอุตสาหกรรรม จ. สระบุรี
8	ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะจ. ชุมพร
9	ตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะจ.สุราษฎร์ธานี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ของเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลทต่างๆ ที่ระยะเวลาชั่วโมงที่ 12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร nondefined medium ที่มี TA 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

Isolate no.	TA-degrading ability (%)	Isolate no.	TA-degrading ability (%)
S3	51.74	sm1	46.11
S2	98.30	sm2	45.06
C2	52.90	sm3	40.61
C4	44.34	sm4	53.12
E4	59.26	sm5	52.03
G1	69.71	11	51.34
G4	51.64	13	55.35
G5	89.75	14	53.07
P1	67.42	dp1	55.13
P3	50.30	dp4	55.66
P4	50.25	61	53.82
P5	97.67	63	52.41
P6	62.21	78	53.36
P7	57.13	81	57.47
P8	48.05	91	53.99
P9	50.62		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะอาหารเหลว

ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทที่แยกและคัดเลือกได้จากตัวอย่างดินและดินตะกอนในแหล่งต่างๆของประเทศไทย โดยเพาะเลี้ยงไอโซเลต G5, P5 และ S2 ในอาหารเหลว nondefined medium ที่ประกอบด้วยสาร TA 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในน้ำหมัก

เมื่อพิจารณาผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าในช่วงระยะเวลาเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีระยะพักตัว (Lag phase) ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาที่เชื้อจุลินทรีย์มีการปรับตัวรวมถึงการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดต่างๆ สำหรับการย่อยสลายสารปนเปื้อน ในที่นี้คือสาร TA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อการเจริญและเพิ่มปริมาณเซลล์ (อลิสา, 2553)

ทั้งนี้ช่วงระยะพักตัวของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนมีค่าแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปริมาณสารตั้งต้น ดังแสดงในภาพที่ 9, 11 และ 13 ซึ่งพบว่าช่วงการปรับตัวของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีต่อการย่อยสลายสาร TA ที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) มีระยะเวลายาวนานกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยสลายสารนี้ที่ปริมาณ 0.25, 0.50 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sugimori *et al.* (2000) ซึ่งรายงานผลการศึกษาว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Dietzia* sp. Strain GS-1 ที่สามารถย่อยสลายสาร disodium terephthalate มีระยะพักตัวเท่ากับ 50 ชั่วโมง

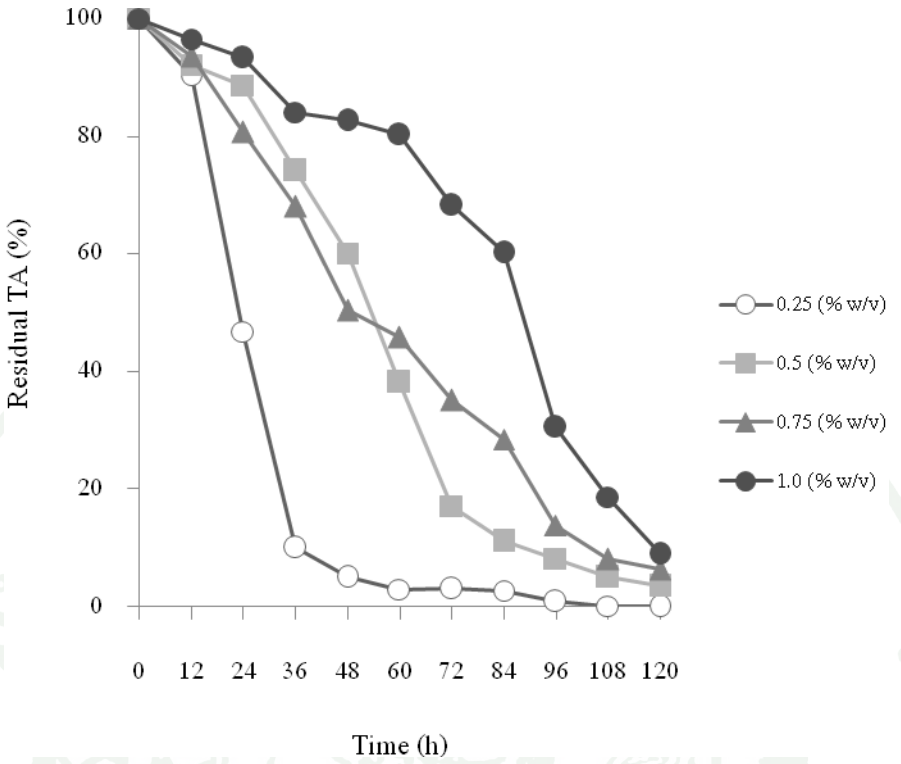
นอกจากนี้พบว่าปริมาณสาร TA ในน้ำหมักลดลงตลอดช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เนื่องจากสารนี้ถูกใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Schläfli *et al*., 1994) โดยเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 10, 12 และ 14 ทั้งนี้ลักษณะการย่อยสลายสาร TA ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทนั้น มีความคล้ายคลึงกัน โดยจุลินทรีย์ย่อยสลายสารนี้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ได้รวดเร็วที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการย่อยสลายสารนี้อย่างสมบูรณ์ ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า (วีรานุช, 2554) ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทที่แยกได้นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสารนี้ที่ปริมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณสาร TA สูงสุดสำหรับการศึกษาครั้งนี้ โดยพบสัดส่วนของปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในน้ำหมักเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ไอโซเลท G5, P5 และ S2 ในชั่วโมงที่ 120 ของระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 9.00, 6.20 และ 4.66 เปอร์เซ็นต์ของสารตั้งต้นตามลำดับ

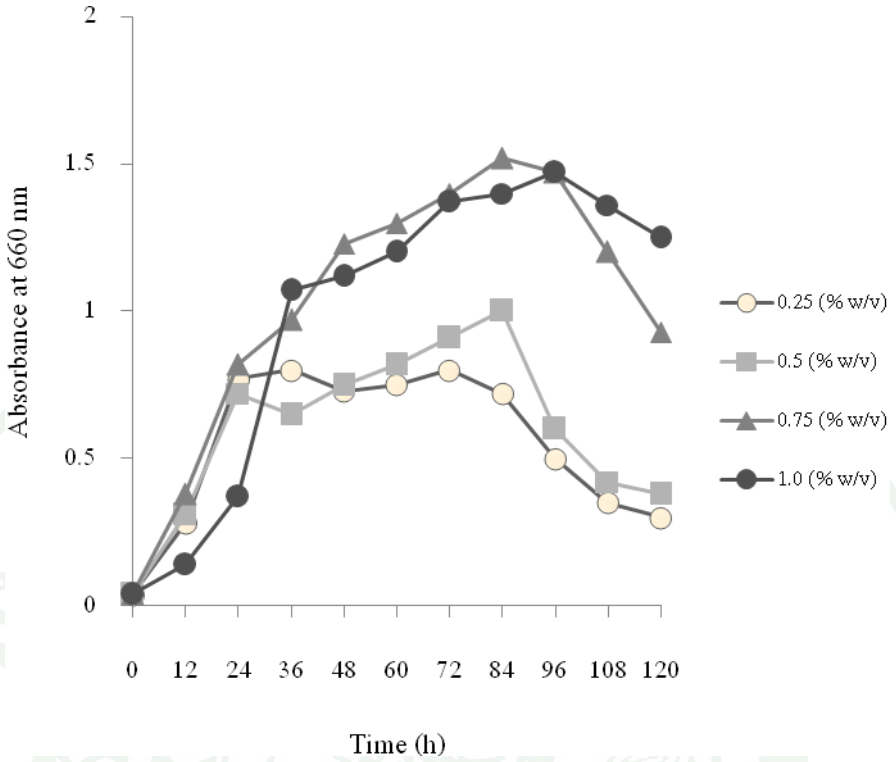
Zhang *et al*. (2013) รายงานถึงระดับปริมาณของสาร TA ที่มากกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) อาจส่งผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากความเป็นพิษของสารชนิดนี้ ดังนั้นปริมาณสาร TA ที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จึงเป็นปริมาณสาร TA ที่นำไปใช้ศึกษาในลำดับต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



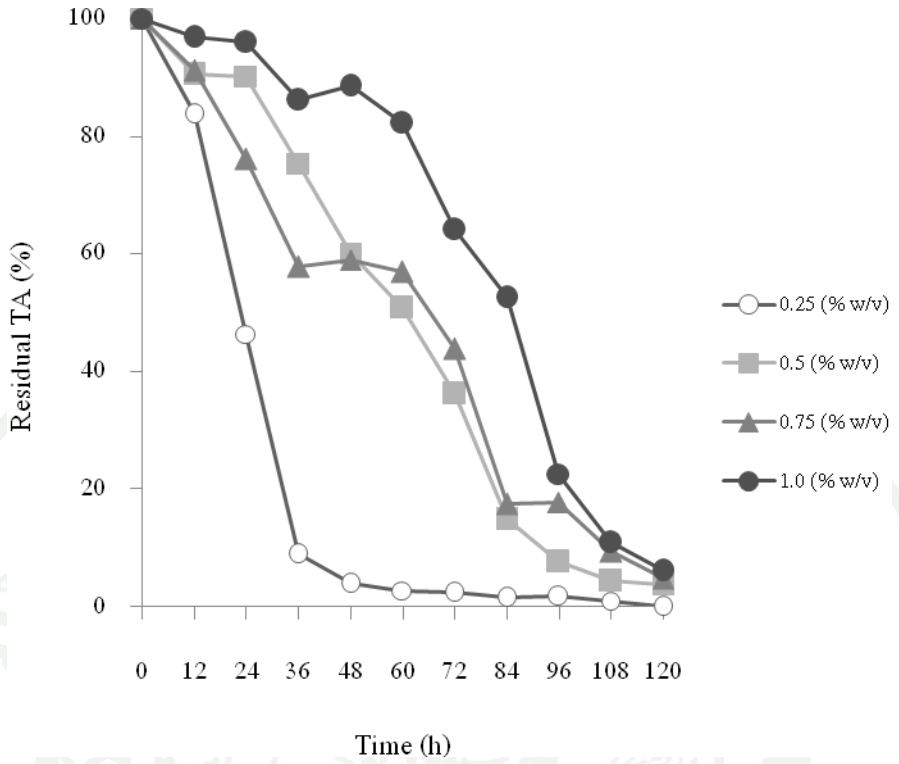
ภาพที่ 9 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



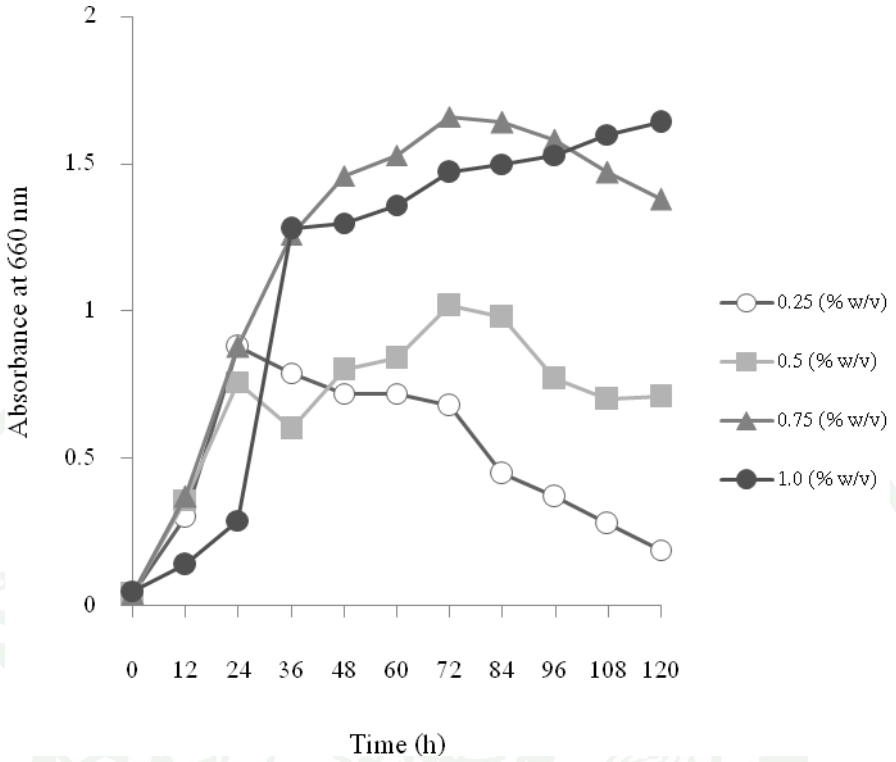
ภาพที่ 10 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



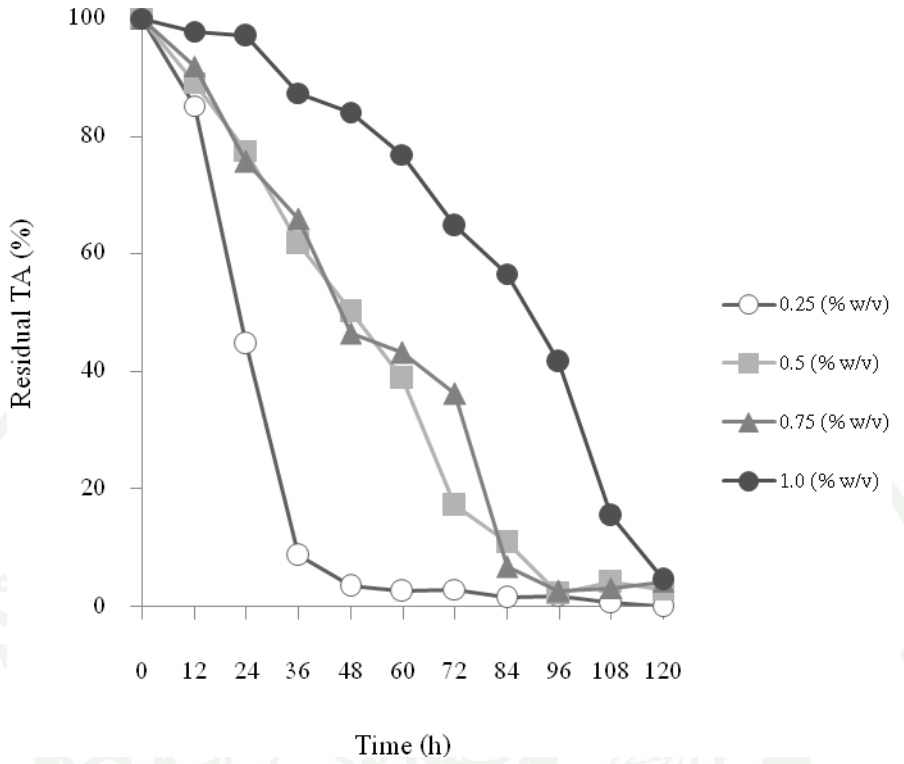
ภาพที่ 11 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



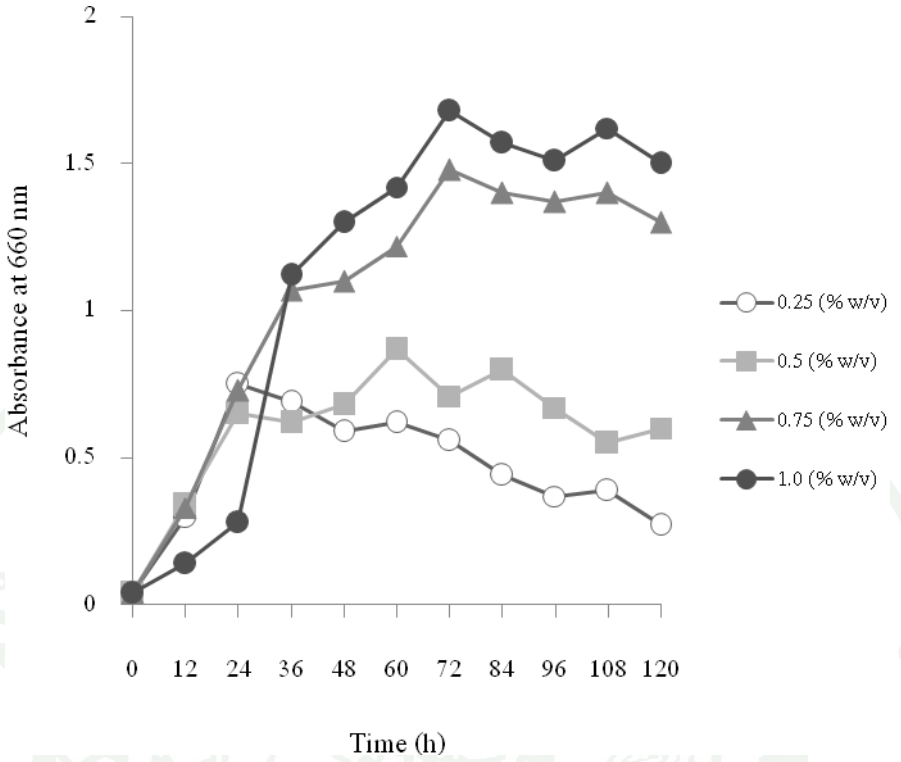
ภาพที่ 12 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

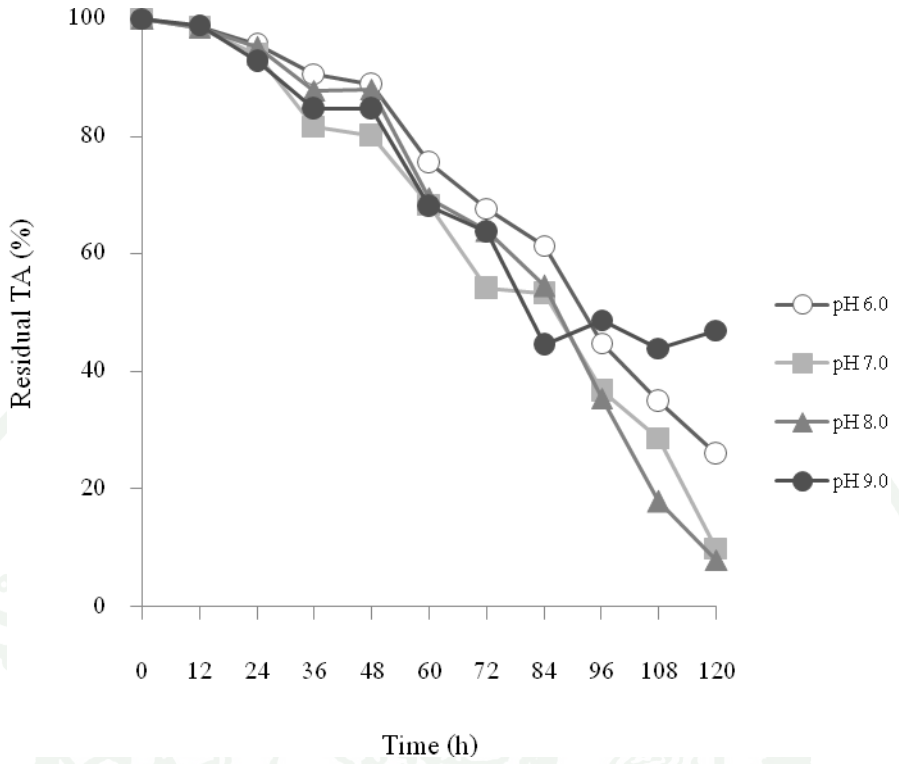
3. การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในสภาวะอาหารเหลว

จากผลการศึกษา พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลตที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ทั้ง 3 ไอโซเลตในอาหารเหลว nondefined medium ที่ประกอบด้วยสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสความเร็ว200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ12 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์สัดส่วนของปริมาณสาร TA ที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการย่อยสลายสารชนิดนี้ ดังแสดงในภาพที่ 15, 17 และ 19นอกจากนี้สังเกตพบระยะการพักตัว (Lag phase) ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท ใน 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 16, 18 และ 20

ทั้งนี้พบว่าการละลายของสาร TA มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ กล่าวคือเมื่อค่าพีเอชมีค่าต่ำกว่า 5.5 สารชนิดนี้จะเกิดการตกตะกอนเป็นสาเหตุทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถนำสารปนเปื้อนชนิดนี้ไปใช้ในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ หรือกล่าวได้ว่าสารนี้มีค่า bioavailability ต่ำเมื่อมีค่าพีเอชลดลง สอดคล้องกับรายงานผลการศึกษาของ Zhang *et al*. (2013) ที่แสดงถึงการลดลงของประสิทธิภาพในการบำบัดสารปนเปื้อนทางชีวภาพ เนื่องจากกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องต่อวิถีการย่อยสลายทางชีวภาพ ซึ่งถูกสังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์นั้นสามารถถูกยับยั้งได้ที่สภาวะความเป็นกรด (acidic) หรือเป็นด่าง (alkaline) นอกจากนี้พบว่าค่าพีเอชยังส่งผลโดยตรงต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายสารปนเปื้อน รวมไปถึงระบบการดูดซึมสารอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ (อลิสา, 2553; Murty *et al*., 2012)

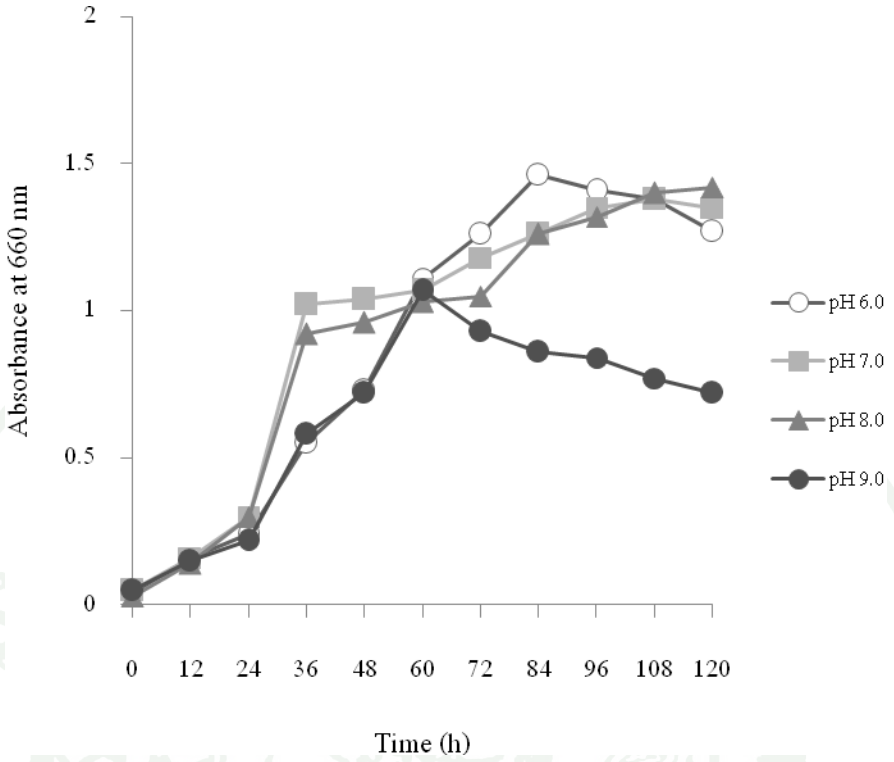
Gaudy *et al*. (1982) และ McLelland (1996) รายงานช่วงค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 และ 7.0 มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพทั้งนี้พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้นั้น ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารนี้ใกล้เคียงกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท G5, P5 และ S2 แสดงผลการย่อยสลายสาร TA ได้ดีที่สุด ดังแสดงสัดส่วนของสารนี้ที่คงเหลือในน้ำหมัก เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 120 ชั่วโมง เท่ากับ 9.97, 9.85 และ 9.39 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ถูกนำไปใช้เป็นค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการศึกษาในระดับถังหมักต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



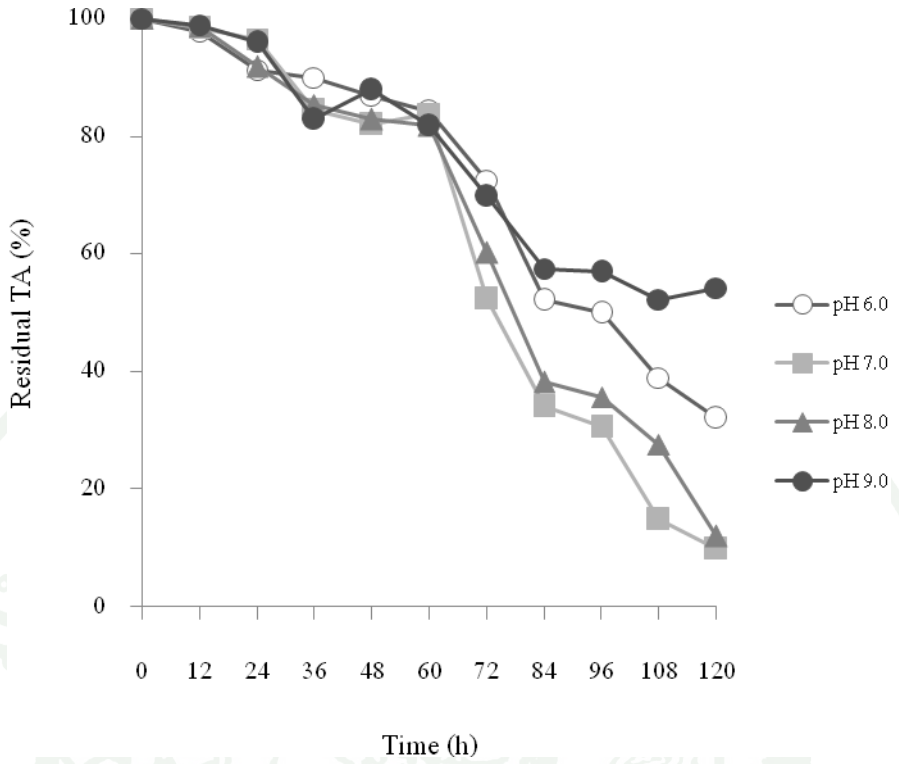
ภาพที่ 15 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ค่าพีเอชระดับต่างๆอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



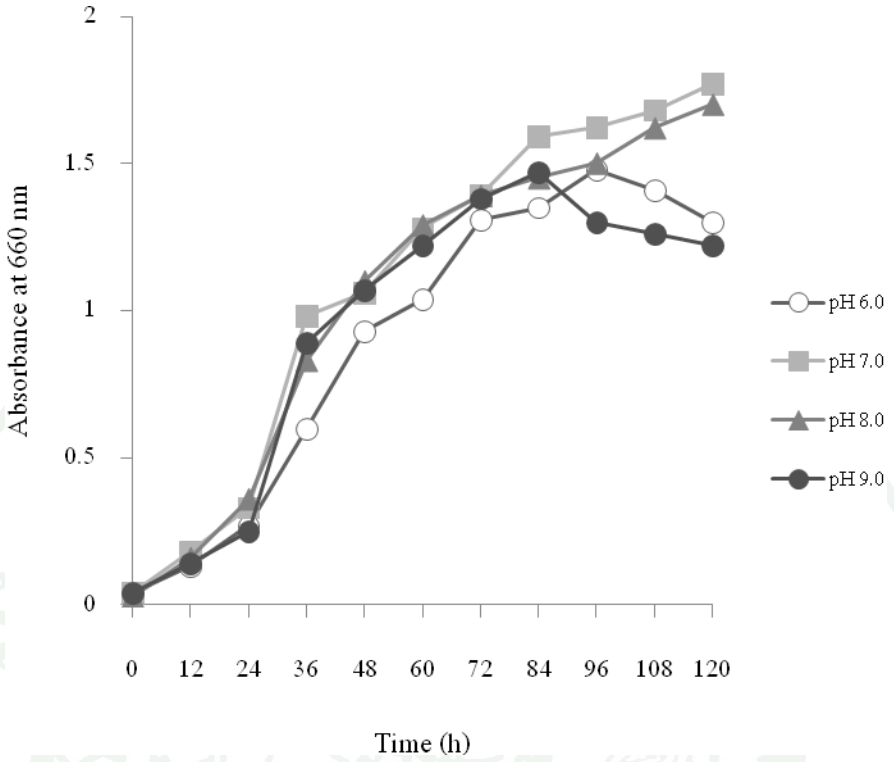
ภาพที่ 16 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอชระดับต่างๆ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



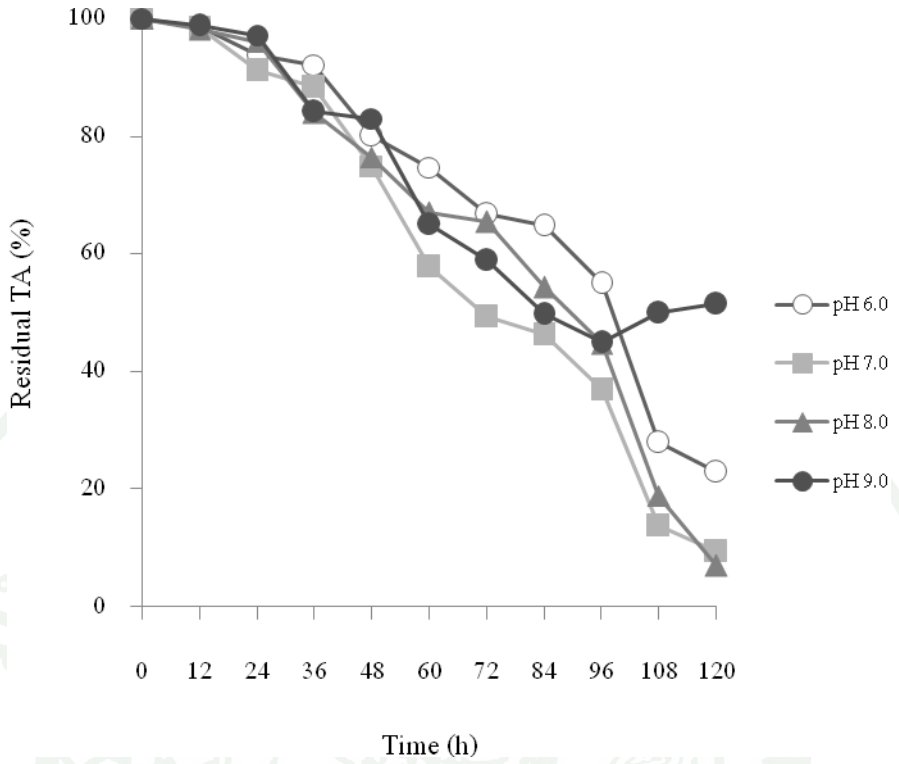
ภาพที่ 17 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าพีเอชระดับต่างๆ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



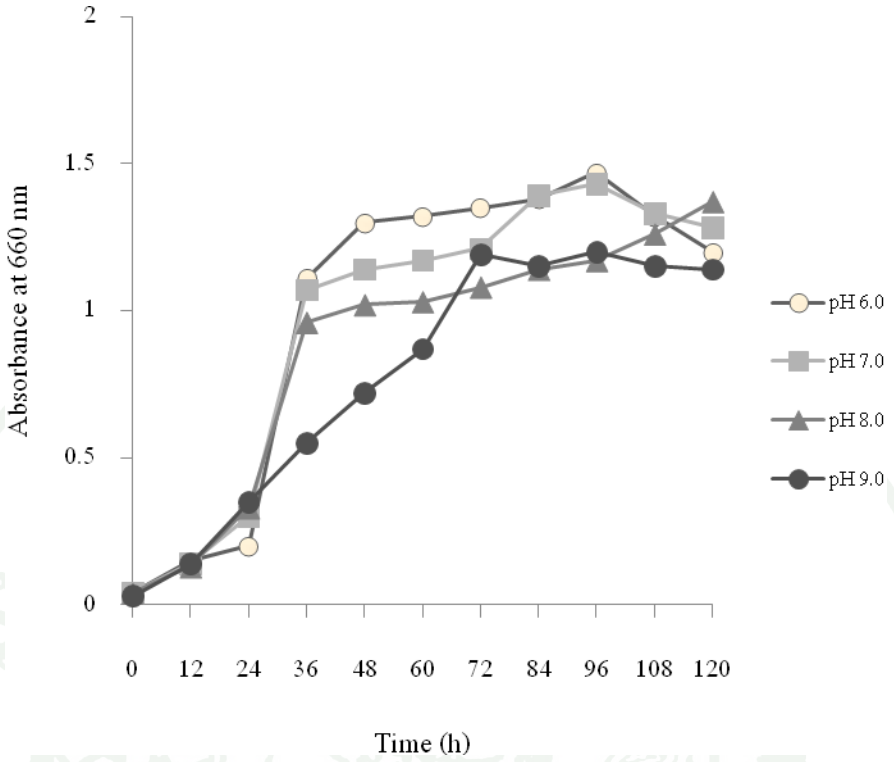
ภาพที่ 18 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอชระดับต่างๆ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 19 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ค่าพีเอชระดับต่างๆอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 20 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอชระดับต่างๆ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในสภาวะอาหารเหลว

ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA โดยเพาะเลี้ยงไอโซเลต G5, P5 และ S2 ในอาหารเหลว nondefined medium ที่ประกอบด้วยสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ12 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์สัดส่วนของปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในน้ำหมัก พบว่าทุกไอโซเลตสามารถใช้สาร TA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในการเจริญเติบโต สอดคล้องกับการเจริญของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 22, 24 และ 26

เนื่องจากประสิทธิภาพในการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้น การที่เชื้อจุลินทรีย์มีการเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็ว เป็นเหตุทำให้ระยะเวลาการย่อยสลายสารปนเปื้อนเกิดได้เร็วมากขึ้นด้วย (Prieto *et al*., 2002) เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการย่อยสลายถูกสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานผลการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงการอธิบายความสัมพันธ์ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา (Reaction rate) กับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นไปตามกฎของ Arrhenius (Cantarella *et al*., 1998; Padmakumar and Oriel, 1999; Cantarella *et al*., 2004; Zhou *et al*., 2004)

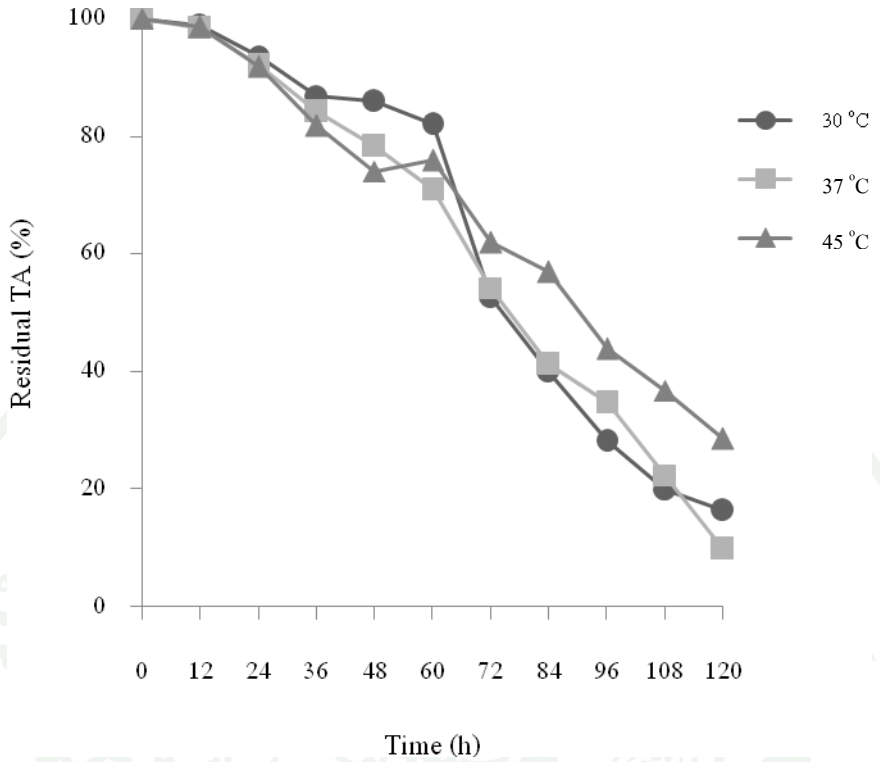
ผลการศึกษาพบว่าในช่วงระยะเวลา 48 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สัดส่วนของปริมาณสาร TA ในน้ำหมักมีค่าลดลงมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามเชื้อจุลินทรีย์มีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว ในช่วงต้นของการเพาะเลี้ยงเท่านั้น และมีการเจริญที่ลดลงในช่วงท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5, P5 และ S2 ดังแสดงในภาพที่ 21, 23 และ 25 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายสาร TA พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท ยังคงมีกิจกรรมการย่อยสลายสารนี้ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถูกใช้เป็นสภาวะสำหรับการเพาะเลี้ยงในขั้นตอนแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

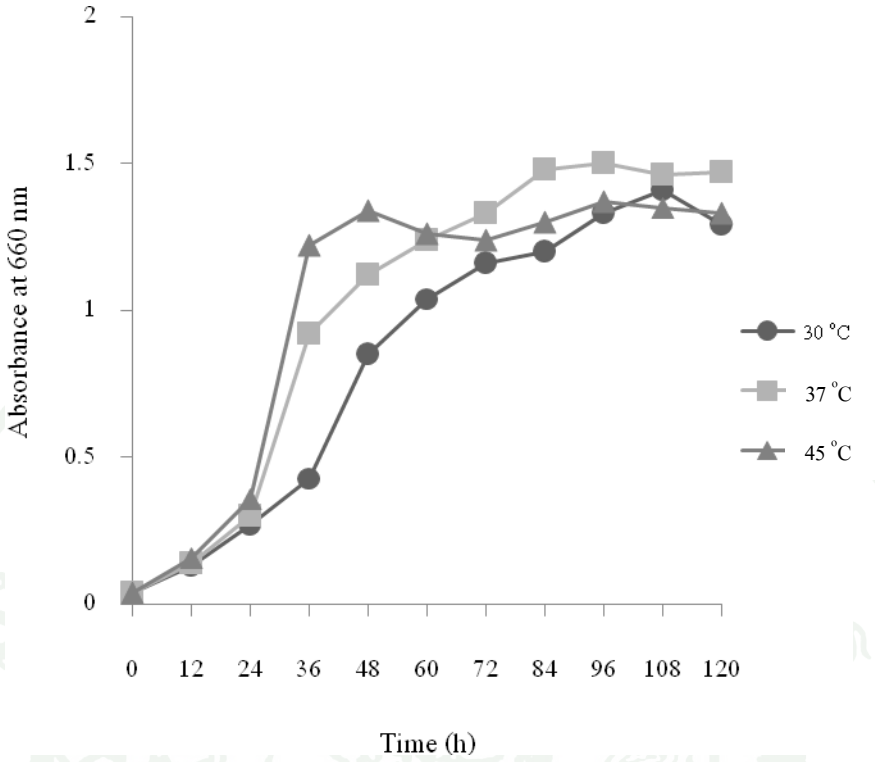
(Thermotolerant) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชนิดของแหล่งตัวอย่างดินและดินตะกอนที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ อยู่ในพื้นที่เขตร้อน ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ และย่อยสลายสารปนเปื้อน หรือมีการปรับตัวให้ทนทานต่อสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงได้ (Kuntiya *et al*., 2013) แต่อย่างไรก็ตามพบการบำบัดทางชีวภาพ เกิดจากความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Mesophile เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ 37 องศาเซลเซียส จึงถูกนำไปศึกษาเพื่อใช้เป็นสภาวะการเพาะเลี้ยงในขั้นตอนต่อไป (Rittman and McCarty, 2001; Murty *et al*., 2012)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



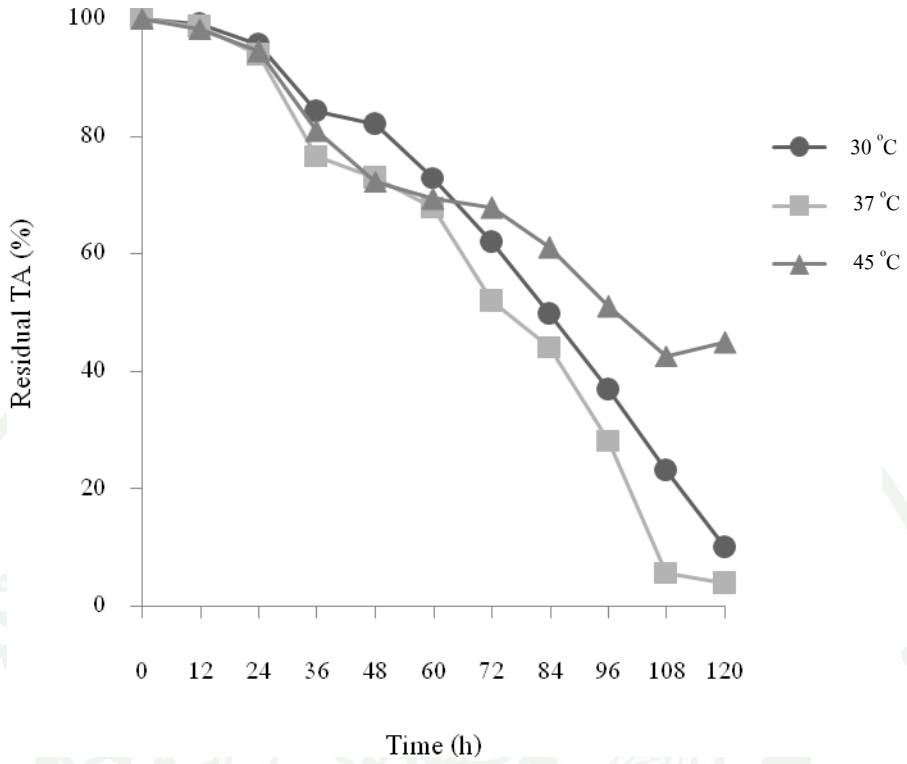
ภาพที่ 21 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิระดับต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



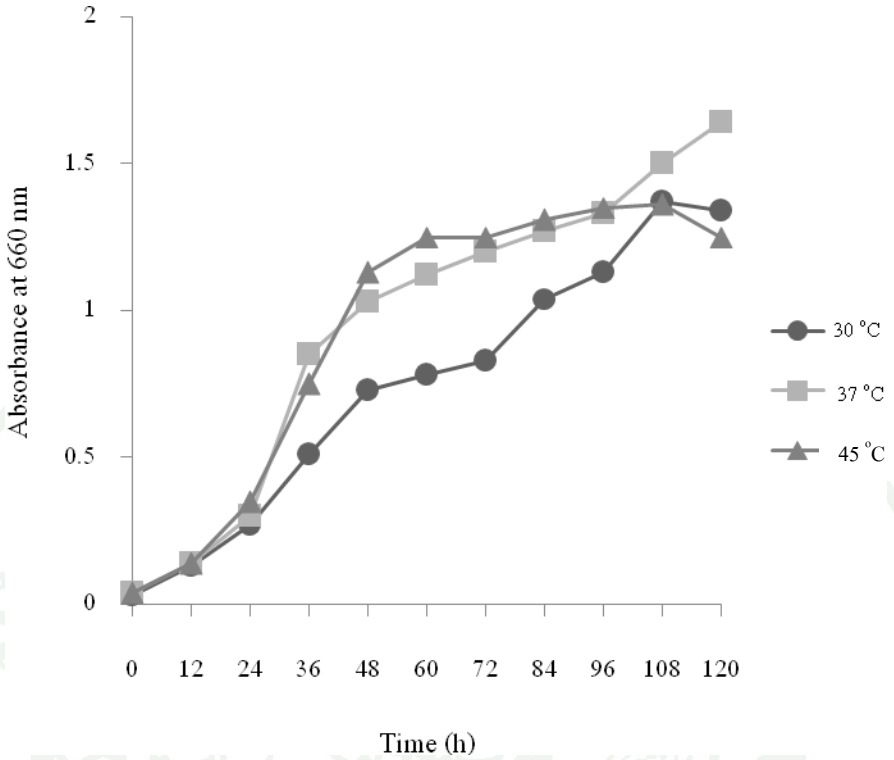
ภาพที่ 22 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิระดับต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



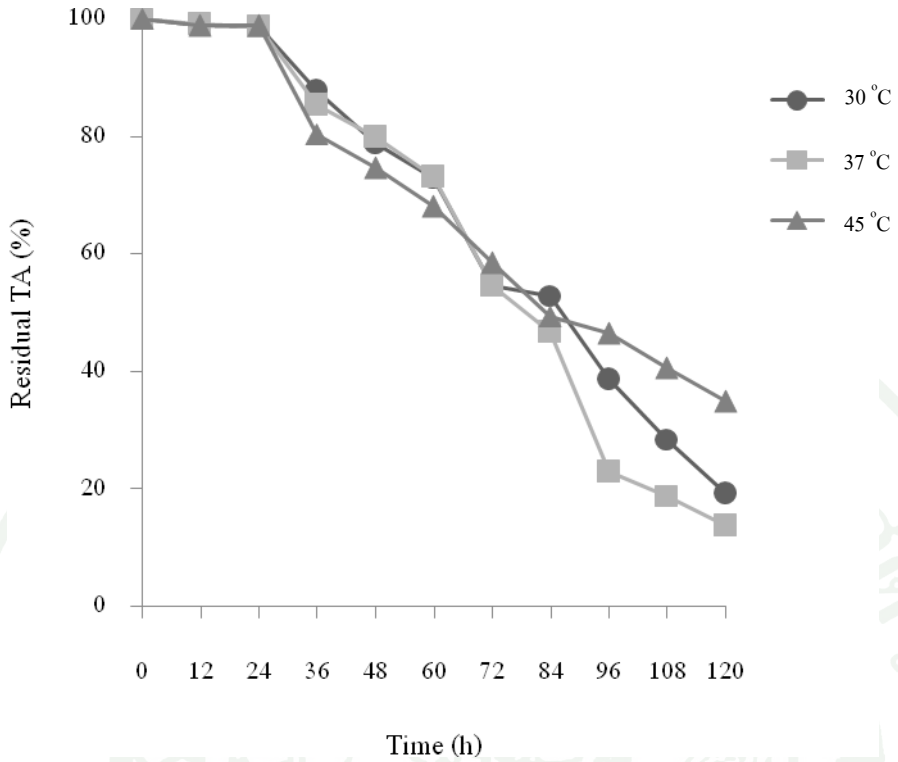
ภาพที่ 23 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิระดับต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



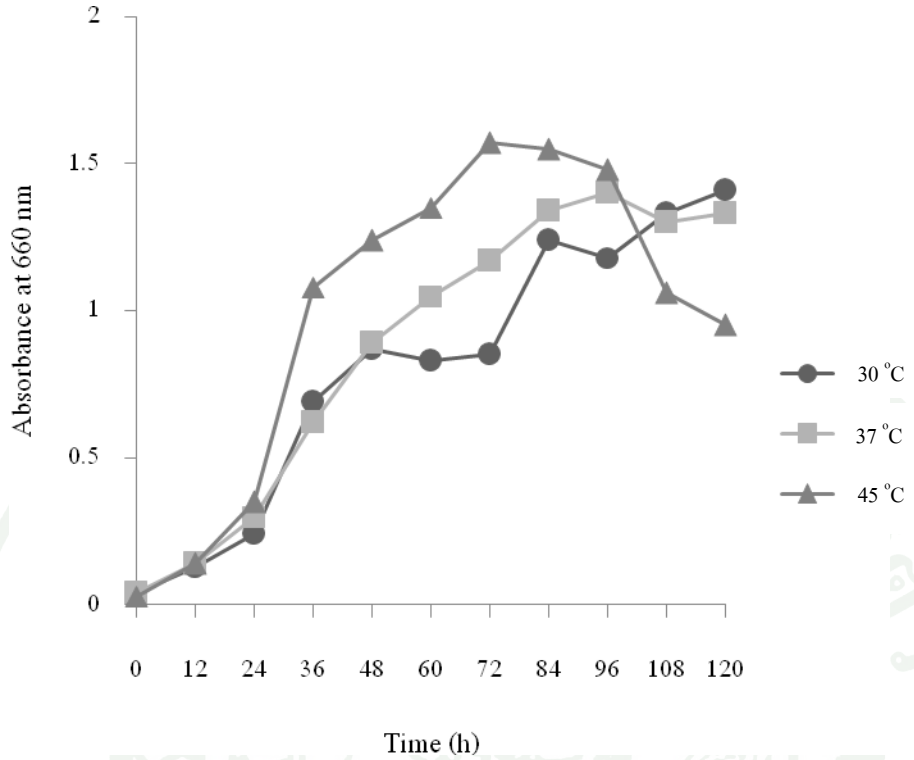
ภาพที่ 24 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่า ควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิระดับต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 25 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิระดับต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 26 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิระดับต่างๆ

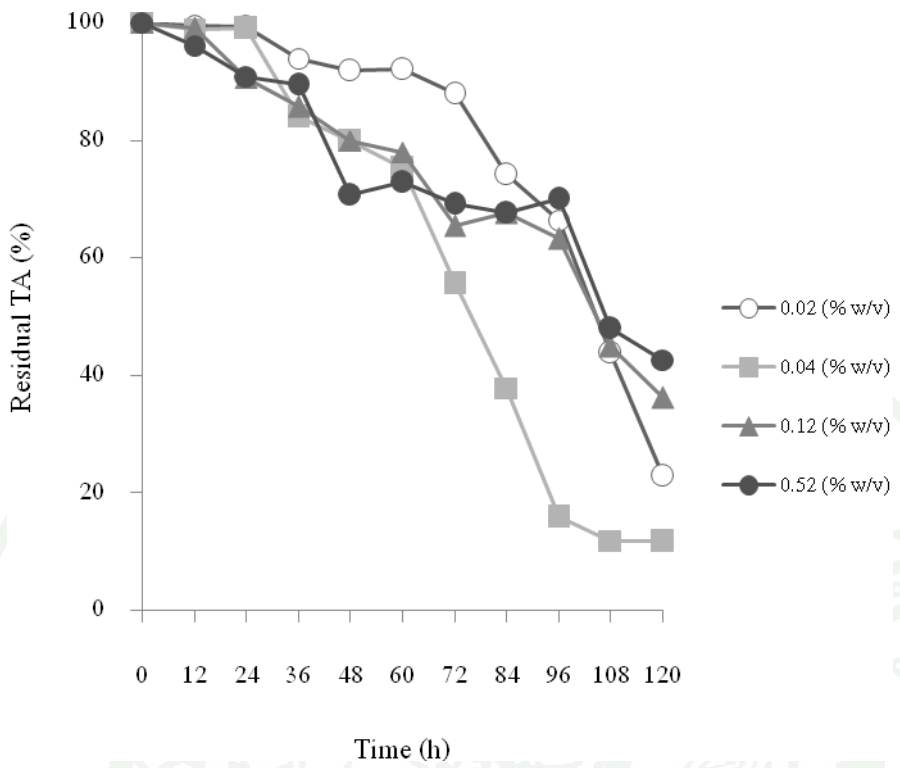
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การศึกษาผลของ yeast extract ที่มีต่อการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) โดยเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะอาหารเหลว

ทดสอบผลของสาร yeast extract ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA โดยเพาะเลี้ยงไอโซเลต G5, P5 และ S2 ในอาหารเหลว nondefined medium ที่ประกอบด้วยสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุม ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่ประกอบด้วย yeast extract 0.02, 0.04, 0.12 และ 0.52 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์สัดส่วนของปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในน้ำหมักจุลินทรีย์ทุกไอโซเลตสามารถใช้สาร TA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ตลอดช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 28, 30 และ 32 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท G5, P5 และ S2 นาน 120 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างน้ำหมักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี yeast extract 0.04 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)แสดงสัดส่วนของปริมาณสารชนิดนี้คงเหลือในน้ำหมักมีค่าน้อยที่สุด เท่ากับ 11.75 , 9.85 และ 11.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 27, 29 และ 31 (Sanchez *et al*., 2000; Margesin and Schinner 2001; Duncan *et al*., 2003; Maki *et al*., 2003; Sarkar *et al*., 2005; Veenagayathri and Vasudevan, 2010)

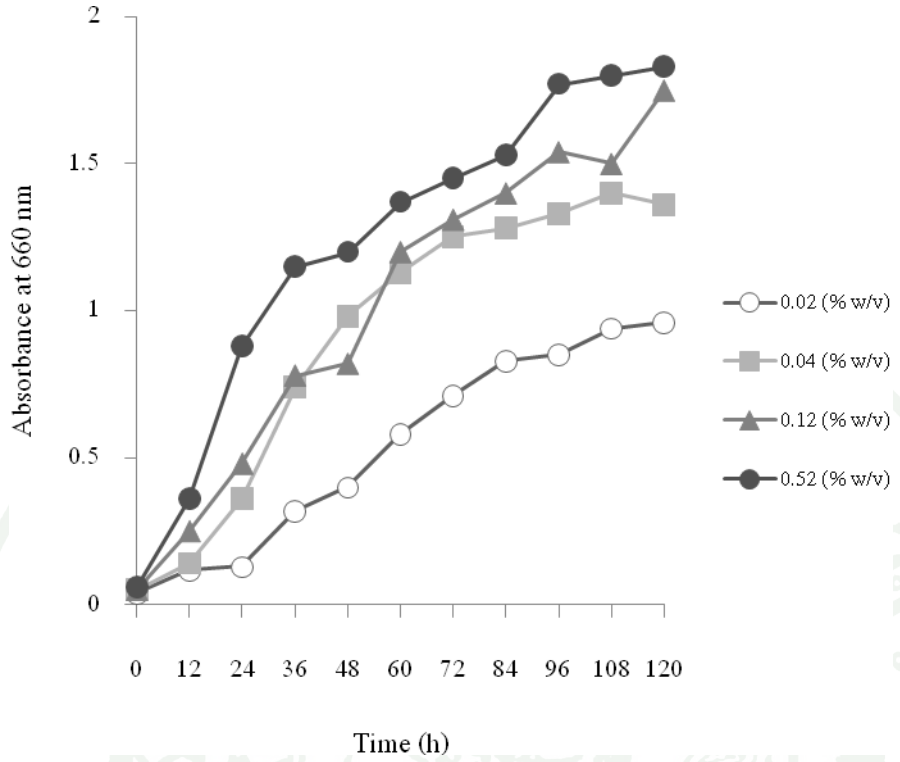
ถึงแม้ว่ามีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงการเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดทางชีวภาพด้วยการทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มขึ้น โดยการเติมแหล่งสารอาหารไนโตรเจน (Alexeander, 1994; Vidali, 2001) แต่พบว่าเมื่อเพิ่มระดับของปริมาณสาร yeast extract ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.12 และ 0.52 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) กลับส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารชนิดนี้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้มีค่าลดลง ทั้งนี้สาเหตุเนื่องจาก yeast extract เป็นแหล่งของสารอาหารไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ที่สามารถถูกใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน นอกเหนือจากการถูกใช้เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ (Cheng *et al*., 1997; Fajardo *et al*., 1997; Wang *et al*., 2007; Wang *et al*., 2011) ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ง่ายกว่าสาร TA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



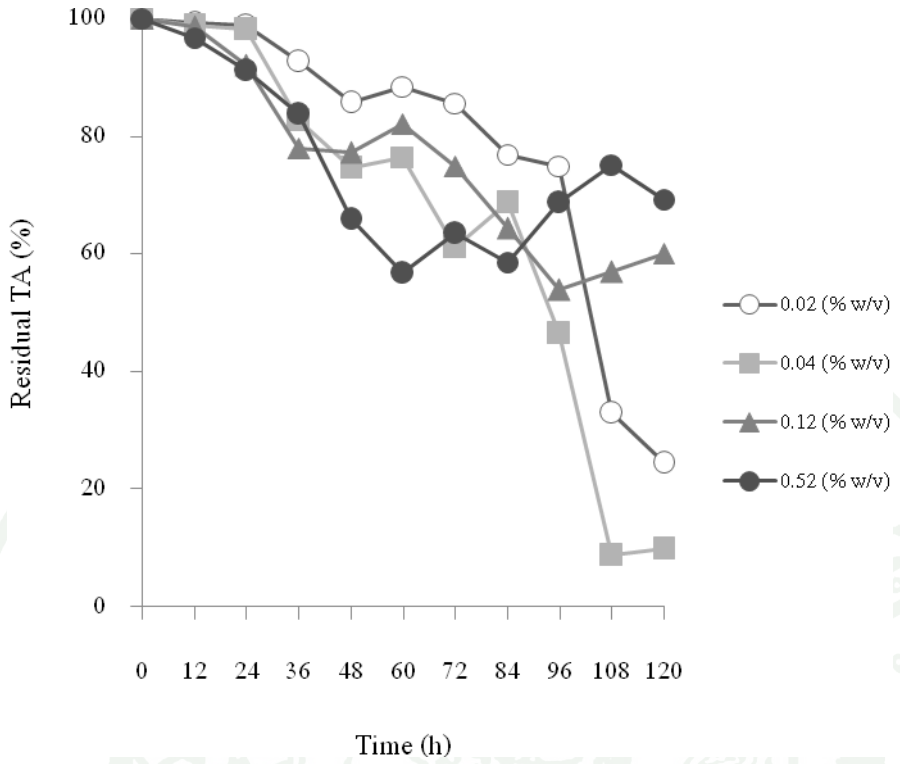
ภาพที่ 27 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract ระดับต่างๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



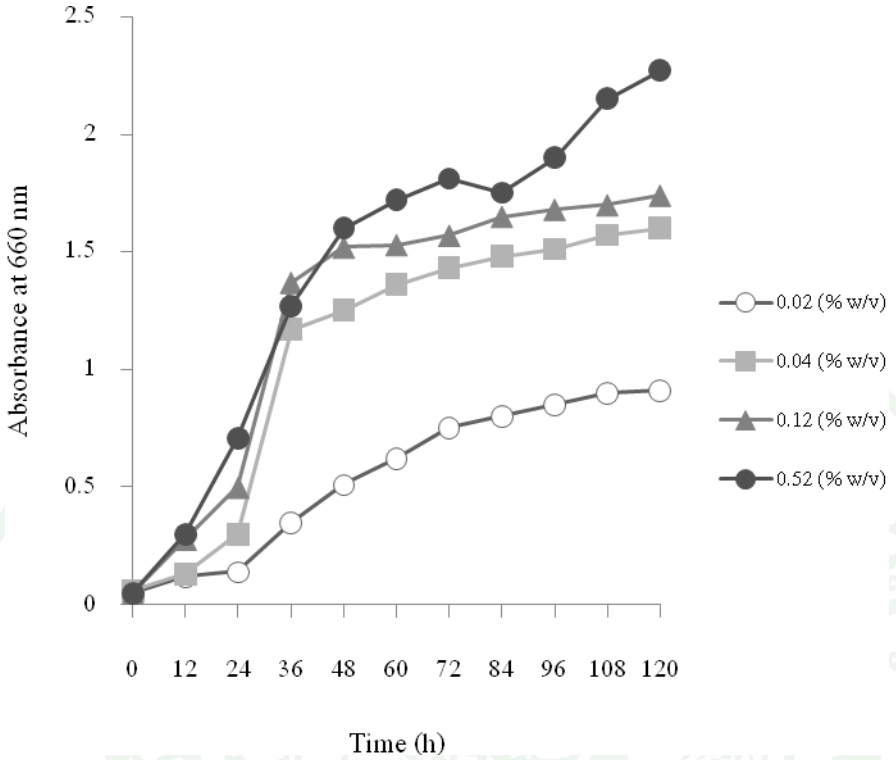
ภาพที่ 28 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของ yeast extract ระดับต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



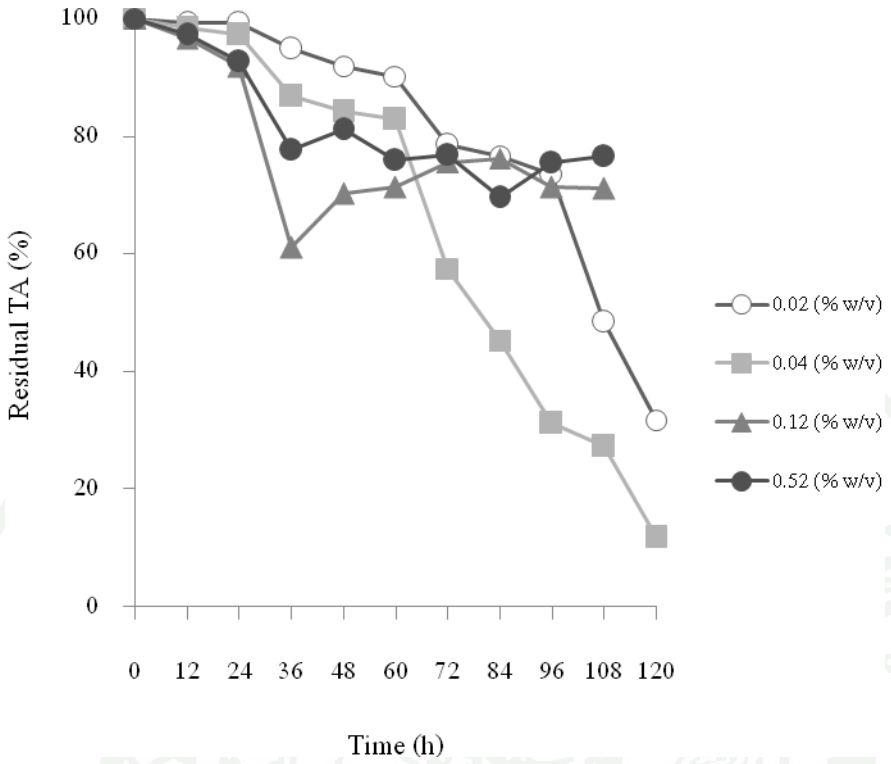
ภาพที่ 29 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract ระดับต่างๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



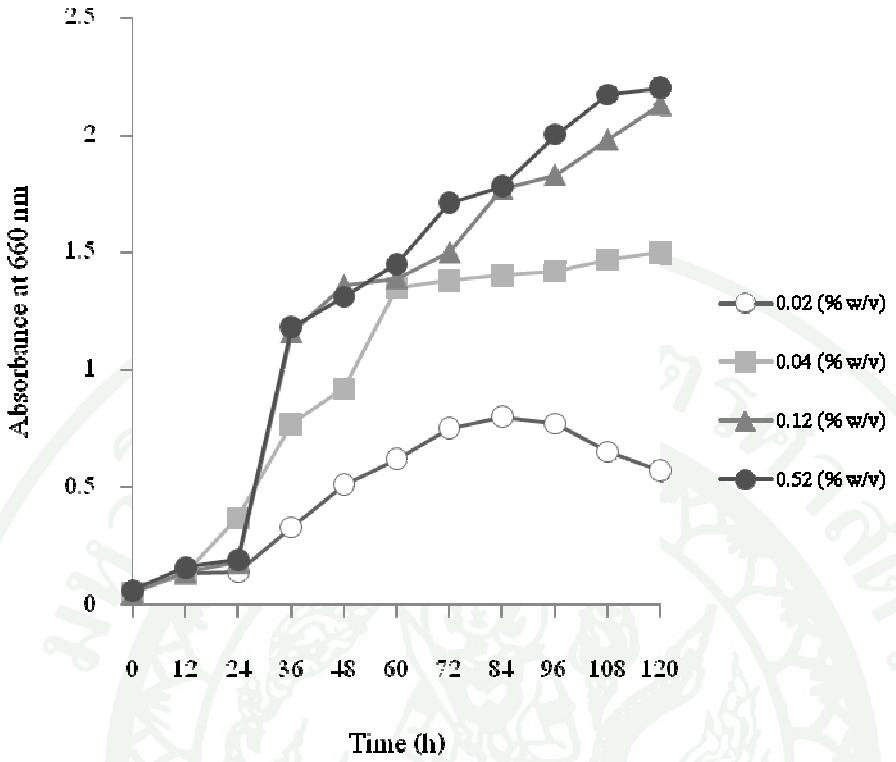
ภาพที่ 30 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของ yeast extract ระดับต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 31 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract ระดับต่างๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 32 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของ yeast extract ระดับต่างๆ

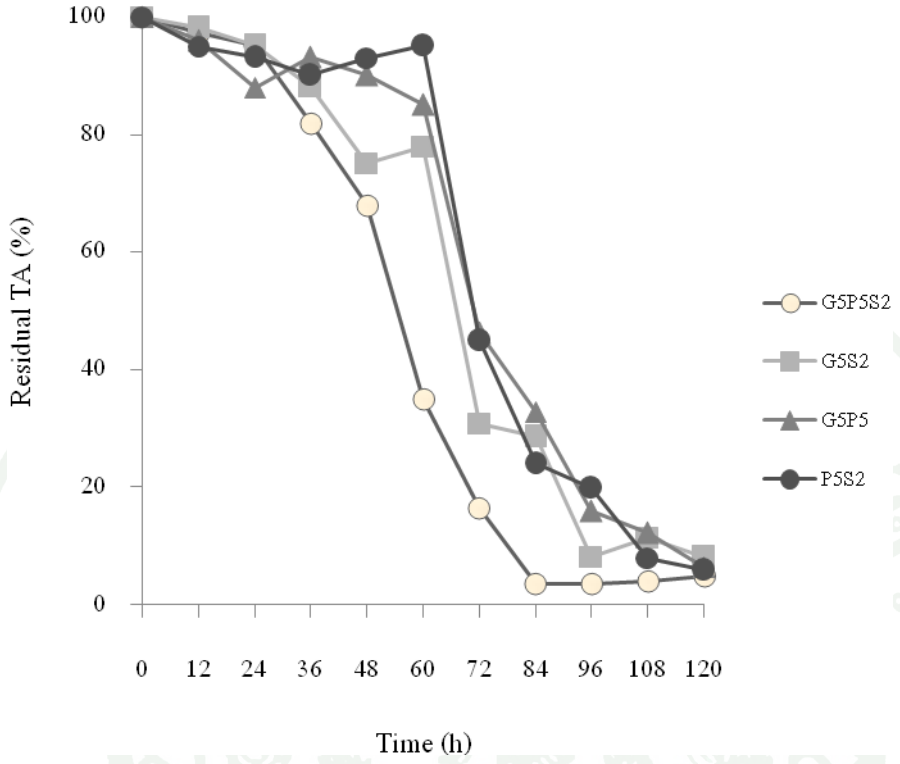
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสม ระหว่างไอโซเลท G5 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินแหล่งฝังกลบขยะ กับไอโซเลท P5 และ S2 ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนของบ่อบำบัดน้ำเสีย และอุตสาหกรรมสิ่งทอ ตามลำดับแบ่งกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมได้ดังนี้ G5S2, G5P5, S2P5 และ G5P5S2 โดยเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหารเหลว nondefined medium ที่มีสาร TA ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 33 ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ สอดคล้องกับปริมาณของสาร TA ที่คงเหลือในน้ำหมักมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังแสดงในภาพที่ 34

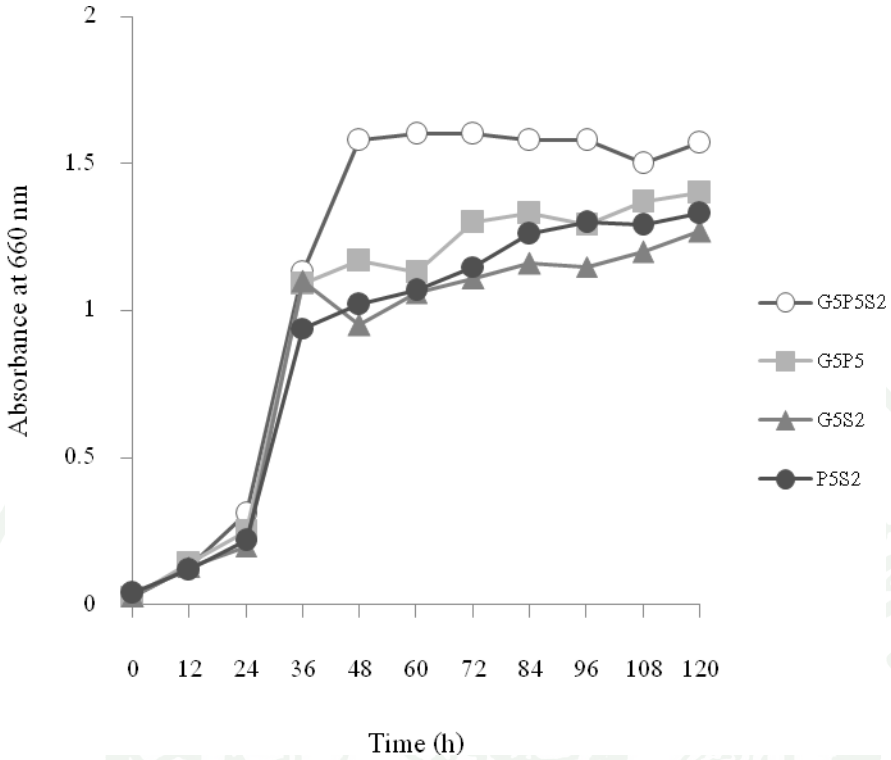
จากการศึกษาพบว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสม G5P5S2 แสดงการลดลงของสาร Terephthalic Acid (TA) มากกว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมกลุ่มอื่นๆ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลาชั่วโมงที่ 60 ของการเพาะเลี้ยง อลิสา (2553) รายงานถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารปนเปื้อนอาจขึ้นอยู่กับความถี่ในการได้รับสารปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวคือเชื้อจุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้ทนทานต่อชนิดของสารมลพิษนั้น โดยการสังเคราะห์ระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องต่อการย่อยสลายสารนั้น เพื่อใช้เป็นแหล่งของสารอาหารในการเจริญ ทำให้ระยะเวลาที่เชื้อจุลินทรีย์ใช้ในการปรับตัวลดลง เปรียบเสมือนเป็นการเพิ่มปริมาณเซลล์ (Enrichment technique) สอดคล้องกับผลการทดลอง พบว่าในกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ผสมนั้น มีไอโซเลท S2 ที่แยกจากตัวอย่างดินตะกอนของบ่อบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมสิ่งทอซึ่งเชื้อจุลินทรีย์อาจปรับตัวให้ทนทานเมื่อได้รับสารปนเปื้อนเดิม ในกรณีนี้คือสาร TA เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 และ P5 ที่แยกจากดินแหล่งฝังกลบขยะ และ ดินตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสียชุมชน ที่มีการปนเปื้อนของสารมลพิษหลากหลายชนิด รวมถึงสารปนเปื้อนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารชนิดนี้ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกและคัดเลือกได้ในข้างต้นสามารถปรับตัวให้ทนทานต่อสาร TA ถึงแม้ว่าเชื้อจุลินทรีย์จะไม่ได้อาศัยในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารชนิดนี้โดยตรงก็ตาม Dawson and Chang (1992) แสดงประสิทธิภาพของการบำบัดทางชีวภาพโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ดีกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์ เช่นเดียวกันกับรายงานผลการศึกษาก่อนหน้านี้ ถึงการย่อยสลายสารชนิดนี้ด้วยการประยุกต์ใช้กลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ผสม ระหว่างเชื้อ *Bacillus* sp. กับ *Pseudomonas* sp. (Kimura and Ito, 2001) และเชื้อ *Comamonas* sp. กับ *Rhodococcus* sp. (Ordaz-Corte *et al*., 2013)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 33 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่างไอโซเลท G5, P5 และ S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 34 การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่างไอโซเลท G5, P5 และ S2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

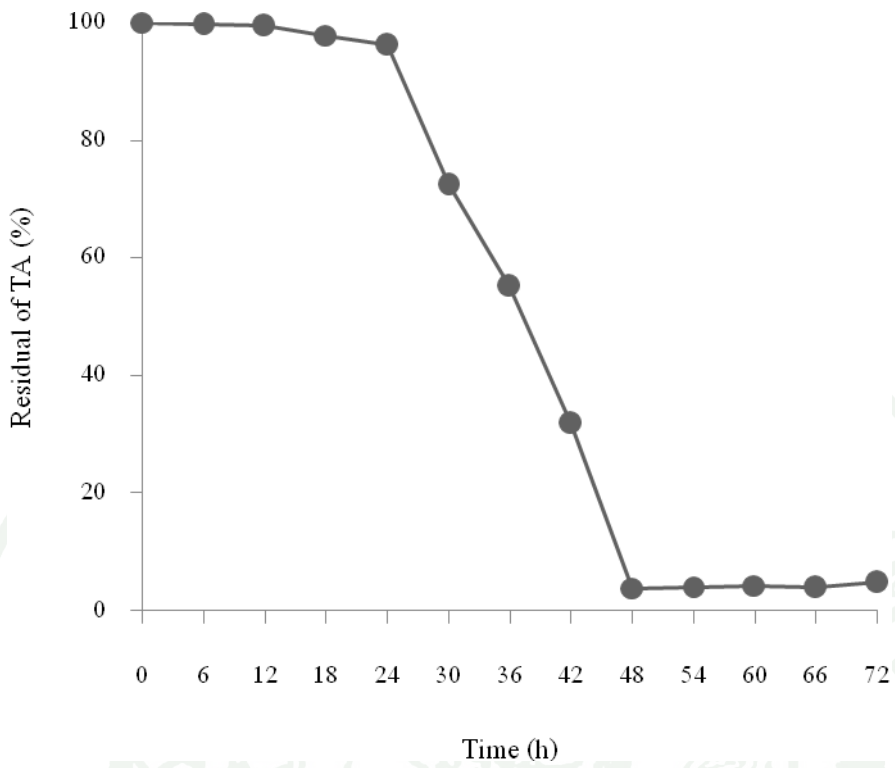
7. ศึกษาการเจริญและความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในระดับถังหมักขนาด 2.0 ลิตร (EYELA Mini Jar Fermenter รุ่นM-100)

การศึกษาการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่สามารถย่อยสลายสาร TA ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินในแหล่งต่างๆของประเทศไทยทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท G5, S2 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินตะกอนของโรงงานสิ่งทอ และและไอโซเลท P5 ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนของบ่อบำบัดน้ำเสีย โดยเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท ในอาหารเหลว nondefined medium ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ศึกษาการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหารเหลว nondefined medium ที่มีสาร TAเท่ากับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 35 โดยช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร TA ที่ลดลง เนื่องจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในระยะพักตัว (Lag phase) หลังจากชั่วโมงที่ 24 พบการลดลงของสารชนิดนี้อย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น และปริมาณเซลล์มีค่ามากสุดเท่ากับ 3.80×10^8 CFU/ml ในชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญลดลง เนื่องจากสาร TA ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องตลอด จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 72 ดังแสดงในภาพที่ 36

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่สามารถย่อยสลายสาร TA ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท G5, P5 และ S2 ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ส่งผลทำให้การย่อยสลายสาร TA ใช้ระยะเวลาน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระดับเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังหมักสามารถควบคุมได้ง่าย และดีกว่าในระดับเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (อลิสา, 2553)

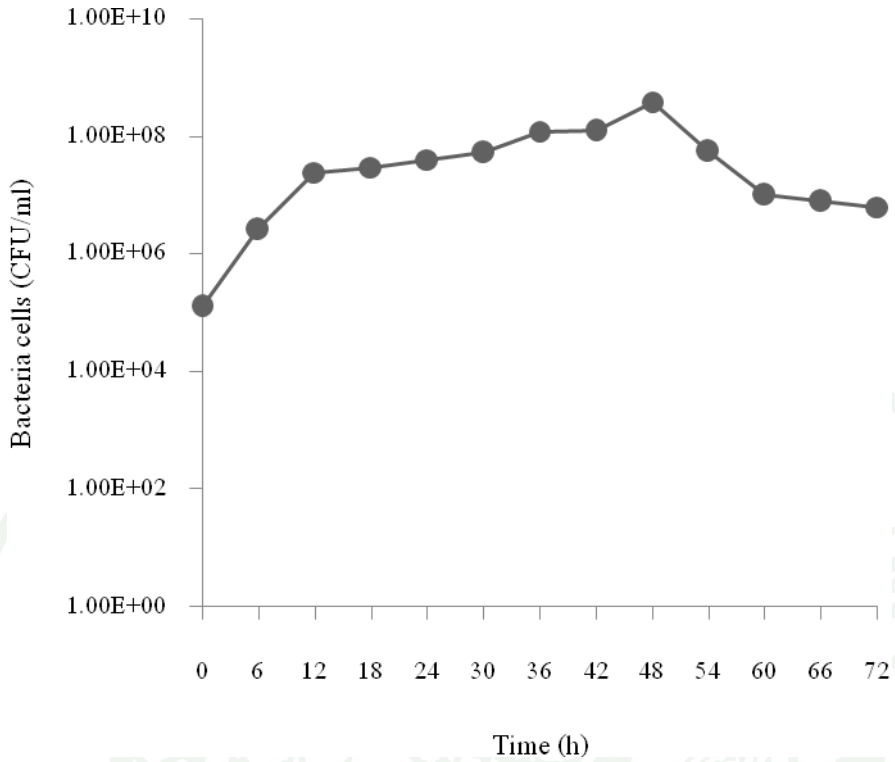
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 35 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5, P5 และ S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มี

สาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในระดับถังหมักขนาด 2.0 ลิตร (fermenter) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 36 การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5, P5 และ S2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ระดับถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) โดยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) บางประการของเชื้อจุลินทรีย์และการจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับเบส

เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5, P5 และ S2 บนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก) พบว่า โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีเหลืองส้ม และมีลักษณะทางชีววิทยาอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ลักษณะทางชีววิทยาบางประการของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

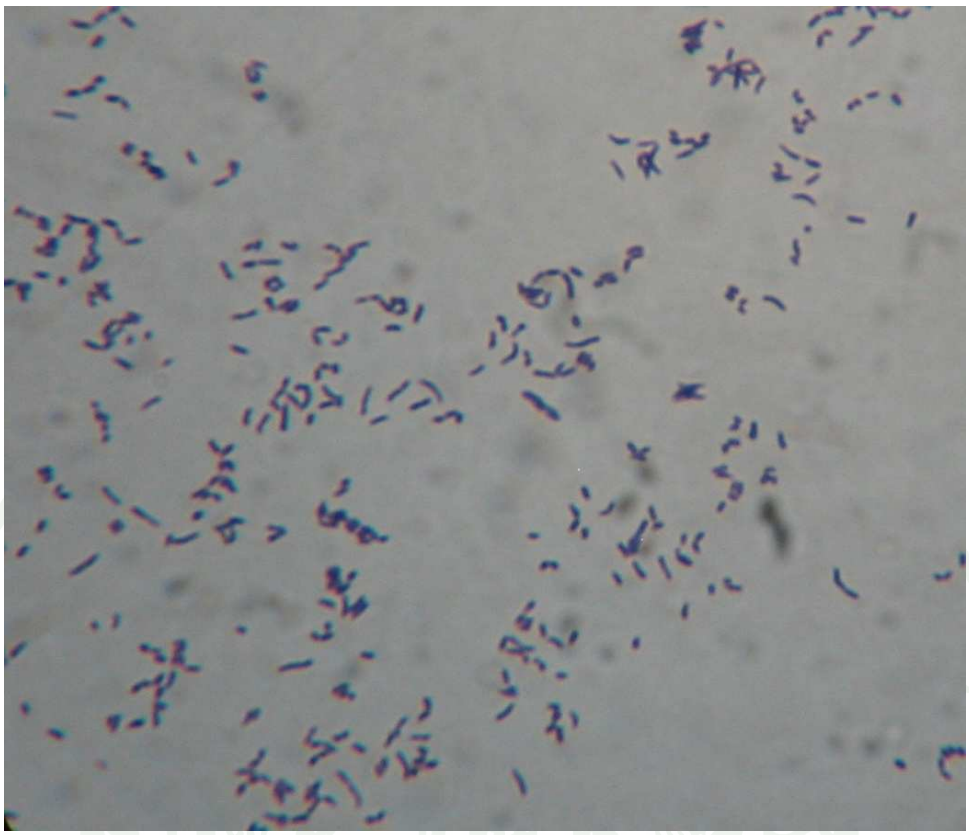
ไอโซเลท	G5	P5	S2
ลักษณะโคโลนี	กลม	กลม	กลม
การติดสีแกรม	+	+	+
รูปร่างเซลล์	curve rod	curve rod	curve rod
การเคลื่อนที่	-	-	-
Catalase test	+	+	+

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (+) = ให้ผลบวก, (-) = ให้ผลลบ

จากผลการทดลอง เมื่อนำผลการศึกษาเบื้องต้นเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ในหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ปี 1989 ในกลุ่ม Gram positive, rod shape พบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียในสกุล *Rhodococcus*

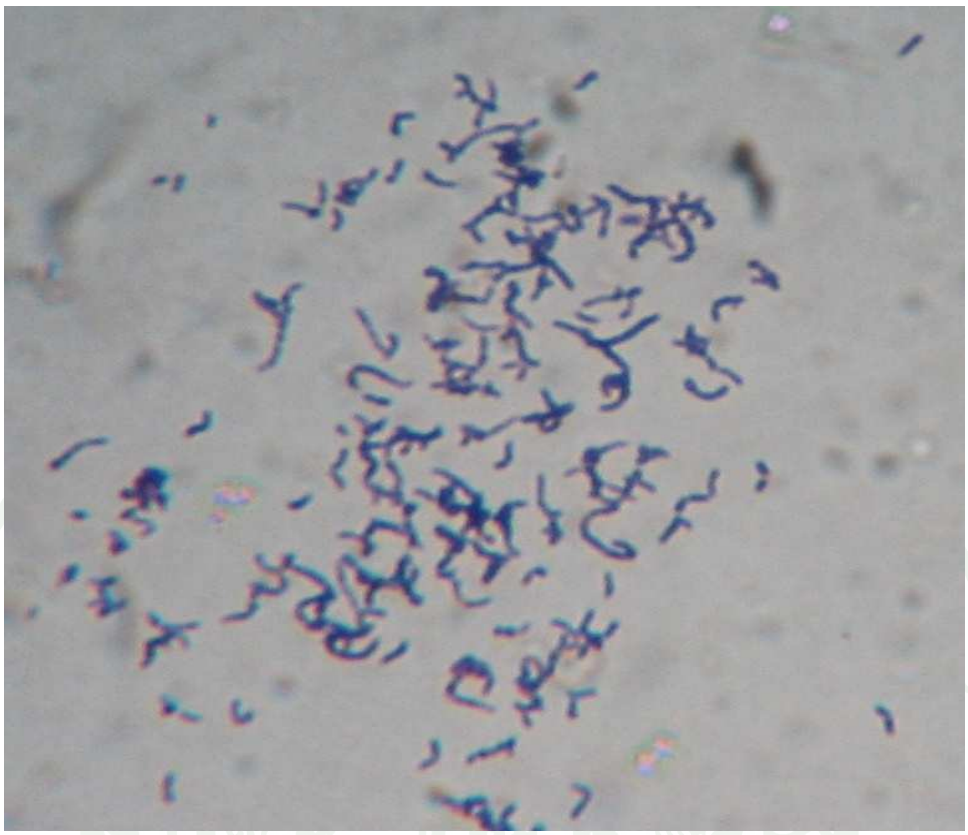
เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้มีความคล้ายคลึงกัน จึงใช้วิธีการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี 16sRNA โดยคัดลอกลำดับเบสของยีนในส่วน 16sRNA จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษา และนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank (Wheeler *et al*., 2003) ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท G5 และ S2 มีความคล้ายกับแบคทีเรีย *Rhodococcus pyridinivorans* ที่ระดับความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.8 และ 99.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ไอโซเลท P5 คล้ายกับแบคทีเรีย *Rhodococcus rhodochrous* ที่ระดับความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลำดับเบสส่วน 16sRNA ของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5, P5 และ S2 ดังแสดงในภาคผนวก ค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 37 ลักษณะ Vegetative cell ของไอโซเลท G5 ซึ่งย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 38 ลักษณะ Vegetative cell ของไอโซเลท P5 ซึ่งย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 39 ลักษณะ Vegetative cell ของไอโซเลท S2 ซึ่งย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษานี้เป็นการแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เพื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งมีการปนเปื้อนของสารนี้ภายหลังจากการปรับสภาพน้ำเสียของกระบวนการผลิต โดยทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและดินตะกอนในแหล่งต่างๆของประเทศไทยซึ่งสามารถคัดแยกได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) 31 ไอโซเลท ภายหลังการคัดเลือกพบว่ามี 3 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ได้ดี คือ จุลินทรีย์ ไอโซเลท G5, S2 และ P5 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินแหล่งฝังกลบขยะ, ตัวอย่างดินตะกอนของบริเวณบ่อบำบัดน้ำเสีย โรงงานสิ่งทอและ ตัวอย่างดินตะกอนของบริเวณบ่อบำบัดน้ำเสียแหล่งชุมชนตามลำดับ

เมื่อศึกษาถึงรูปแบบการย่อยสลายสาร TA ในอาหารเหลว nondefined medium ในระดับฟลาสก์ พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถย่อยสลายสาร TA เพื่อใช้ในกิจกรรมและการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ โดยพบสัดส่วนของปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในน้ำหมักมีค่าลดลงตลอดช่วงการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทมีรูปแบบการย่อยสลายคล้ายกัน ซึ่งระยะเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการย่อยสลายสารนี้ที่ปริมาณ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) รวดเร็วที่สุด และนานมากขึ้น เมื่อเพิ่มระดับปริมาณสารนี้เท่ากับ 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของ yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ที่มีต่อความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ผลการศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ yeast extract 0.04 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทมีการย่อยสลายสารชนิดนี้เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนจากภายนอก หรือการย่อยสลายสาร TA ที่ระดับความเข้มข้นของ yeast extract เท่ากับ 0.12 และ 0.52 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญและอยู่รอดตลอดระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงดังนั้นการที่สาร TA ไม่ถูกย่อยสลายเป็นผลจากปริมาณของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่สูงมากเกิน ซึ่งทำให้จุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถนำไปใช้ในกิจกรรม และการเจริญเติบโตของเซลล์ได้รวดเร็วกว่าการใช้สาร TA อย่างเดียว เป็นต้น

การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสาร TA เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะอุณหภูมิ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ระดับต่างๆ พบการลดลงของสารชนิดนี้ในตัวอย่างน้ำหมัก แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สามารถปรับตัว และมีการเจริญตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ทั้งช่วงอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายสารชนิดนี้เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารชนิดนี้สามารถทำงานได้ทุกสภาวะของการเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

นอกจากนี้เมื่อศึกษาการประยุกต์ใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท S2, G5 และ P5ในระดับถังหมัก พบการลดลงของสาร TA ที่รวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในระดับเครื่องเขย่า เนื่องจากการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงให้มีความเหมาะสม ส่งผลให้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และปรับตัวเพื่อย่อยสลายสารนี้โดยอาศัยกระบวนการทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) บางประการ และการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสส่วน 16sRNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท G5 และ S2 จัดเป็นแบคทีเรีย *Rhodococcus pyridinivorans* ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.8 และ 99.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และไอโซเลท P5 จัดเป็น *Rhodococcus rhodochrous* ที่ระดับความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.6 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. เพิ่มการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ มากขึ้น เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์มีความหลากหลายเพิ่มมากขึ้น

2. ปรับปรุงสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารปนเปื้อนที่สนใจศึกษาได้มากขึ้น

3. ศึกษาการทดลองการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยเชื้อจุลินทรีย์ ในสภาวะสิ่งแวดล้อมจริง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. 2539. กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม. **ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมฉบับที่ 3**.

กรมควบคุมมลพิษ. 2544. **เอกสารข้อมูลความปลอดภัยเคมีภัณฑ์ (MSDS)**. แหล่งที่มา http://msds. pcd. go.th. 5 พฤษภาคม 2549.

มณฑา จันทร์เกตุเลี้ยด. 2541. **วิทยาศาสตร์สิ่งทอเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สมาคมคหเศรษฐศาสตร์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชินูปถัมภ์, กรุงเทพฯ.

สถาบันพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ. 2552**. รายงานความก้าวหน้า ครั้งที่ 1 โครงการจัดทำข้อมูลอุตสาหกรรมเชิงเปรียบเทียบเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขัน (สาขาสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม)**. แหล่งที่มา: http://www.thaitextile.org/benchmark/report2.doc. 9 ธันวาคม 2552.

วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา. 2542. **วิทยาศาสตร์เส้นใย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

วีรานุช หลาง. 2544. **จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อลิสา วังใน. 2553. **การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

Aftring, R. P., B. E. Chalker and B. F. Taylor. 1981. Degradation of phthalic acids by denitrifying, mixed cultures of bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 41: 1177-1183.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Alexander, M. 1994. **Biodegradation and bioremediation**. AcademicPress. Sandiego. Calif.

Bemis, A. G., B. J. Dindorf, A. Horwood and A. Samans. 1982. **Phthalic acids and their benzene polycarboxylic acids**. In: Mark. H. F.

Benckiser, G. and J. C. G. Ottow. 1982. Metabolism of the plasticizer di-n- butylphthalate by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* under anaerobic conditions with nitrate as the only electron acceptor. **Appl. Environ.Microbiol.** 44(3): 576-578.

Citizendia organization. 2009. **Arene substitution patterns**. Source: http://en.wikipedia.org, 30 June 2010.

Chang, H. K. and G. J. Zylstra. 1998. Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1. **J. Bacteriol**. 180: 6529-6537.

Chang, B. V., G. S. Liao and S. Y. Yuan. 2005. Anaerobic degradation of diethyl phthalate, di-n-butyl phthalate and di-(2-ethylhexyl) phthalate from river sediment in Taiwan. **Chemosphere**. 58: 1601-1607.

Cheng, S. S., C. T. Ho and J. H. Wu . 1997. Pilot study of UASB process treating PTA manufacturing wastewater. **Water Sci. Technol**. 36: 73-82.

Cantarella, M., A. Spera and F. Alfani. 1998. Characterization in UF membrane reactors of nitrile hydratase from *Brevibacterium imperialis* CBS 489-74 resting cells. **Ann. NY. Acad. Sci**. 864: 224-227.

———, L. Cantarella, A. Gallifuoco, R. Frezzini, A. Spera and F. Alfani. 2004. A study in UF-membrane reactor on activity and stability of nitrile from microbacterium imperial CBS 498-74 resting cells for propionamide production**. J. Mol. Catal. B-Enzym**. 29: 105-113.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Choi, K. Y., D. Kim, W. J. Sul, J. C. Chae, G. J. Zylstra, Y. M. Kim and E. Kim. 2005. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. **FEMS**. **Microbiol. Lett**. 252: 207-213.

Dawson, T. D. and F. Chang. 1992. Screening test of the biodegradative capability of a new strain of *Pseudomonas gladioli* (BSU 45124) on some xenobiotic organics. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**. 49(10).

Duncan, K., E. Jennings, P. Buck, H. Wells, R. Kolhatkar, K. Sublette, W. T. Potter and T. Todd. 2003. Multi-species ecotoxicity assessment of petroleum-contaminated soil. **Soil and Sediment Contamination**. 12: 181-206.

Eaton, R. W. and D. W. Ribbons. 1982. Metabolism of dimethyl phthalate by *Micrococcus* sp. strain 12B. **J. Bacteriol**. 151: 465-467.

_____. 2001. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. **J.Bacteriol**. 183: 3689-3703.

Ejlertsson, J., U. Meyerson and B. H. Svensson. 1996. Anaerobic degradation of phthalic acid esters during digestion of municipal solid waste under landfilling conditions. **Biodegradation**. 7: 345-352.

Elmorsi, E. A. and D. J. Hopper. 1981. Bacterial catabolisms of isoterephthalate and terephthalate. **Biochem.Soc. Trans.** 9: 431.

Engelhardt, G. and P. R. Wallnofer. 1978. Metabolism of di- and mono-n-butyl phthalate by soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 35(2): 243-246.

_____, H. G. Rast and P. R. Wallnofer. 1979. Degradation of aromatic carboxylic acids by *Nocardia* spec. DSM 43251. **FEMS. Microbiol. Lett.** 5: 245-251.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Fajardo, C., J. P. Guyot., H. Macarie, O. Monroy. 1997. Inhibition of anaerobic digestion by terephthalic acid and its aromatic by products. **Water Sci. Technol**. 36: 83-90.

Fan, L., L. Zhang., J. Shen., S. Wang and H. Chen. 2007. Study on recovery and refining of TA from alkali reduction wastewater. **Desalination**. 206: 353-357.

Gaudy, J. A. F. and A. F. Rozich. 1982. Design and operational model for activated sludge treating inhibitory carbon sources. **Civ. Eng. Pract. Design. Eng**. 2: 55-70.

Gibson, D. T. and V. Subramanian. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: **Microbial degradation of organic compounds**, (Gibson DT ed), Marcel Dekker, New York, pp 181-252.

Goodfellow, M. 1989. **Genus *Rhodococcus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4 ed**. Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J.G. pp.2333-2339. Baltimore: Williams and Wilkins.

Harada, T. and S. Koiwa. 1977. Utilization of phthalic acid and iso- and tere- phthalic acid by soil bacteria. **J.Ferment. Technol.** 55: 97-102.

Hudlicky, T., D. Gonzales and D. T. Gibson. 1999. Enzymatic dihydroxylation of aromatics in enantioselective synthesis: expanding asymmetric methodology. **Aldrichim. Acta.** 32: 35-52.

Ikeda, H., T. Sugai., H. Hosomi., S. Ohba and H. Ohta. 1998. Syntheses of highly oxygen-functionalized derivatives of dihydrodihydroxyphthalic acid in enantiomerically enriched forms. **Biosci. Biotechnol.Biochem.** 62: 396-400.

Jackson, M. A., D. P. Labeda and L. A. Becker. 1996. Isolation for bacteria and fungi for the hydrolysis of phthalate and terephthalate esters. **J. Ind. Microbiol**. 16: 301-304.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Jo J. H., S. M. Lee, H. J. Kim, J. G. Kim, J. S. Choi, Y. K. Park and J. Jung. 2006. Improvement of biodegradability of industrial wastewaters by radiation treatment. **J. Radioanal. Nucl. Chem**. 268. (1): 145-150.

Kang, Y. W. and K. Y. Hwang. 2000. Effects of reaction conditions on the oxidation efficiency in the Fenton process. **Water Res**. 34: 2786-2790.

Karegoudar, T. B. and B. G. Pujar. 1984. Biodegradation of phthalate and phthalate esters. **Proc. Indian.Acad. Sci.** 93: 1155-1158.

_____ and _____ . 1985. Degradation of terephthalate acid by a *Bacillus* species. **FEMS. Microbiol. Lett.** 30: 217-220.

Keyser. P., B. G. Pujar, R. W. Eaton and D. W. Ribbons. 1976. Biodegradation of phthalates and their esters by bacteria. **Environ. Health. Perspect**. 18: 159-166.

Kimura, T. and Y. Ito. 2001. Two bacterial mixed culture systems suitable for degrading terephthalate in wastewater. **J. Biosci. Bioen.** 91(4): 416-418.

Kleerebezem R, J. Mortier, L. W. Pol and G Lettinga. 1997. Anaerobic pretreatment of petrochemical effluents: terephthalic acid wastewater. **Water Sci. Technol**. 36: 237-248.

_____, L. W. Pol and G. Lettinga.1999a. Anaerobic biodegradability of phthalic acid isomers and related compounds. **Biodegradation**. 10: 63-73.

_____ ,_____ and _____. 1999b. Anaerobic degradation of phthalic isomers by methanogenic consortia. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1152-1160.

_____ ,_____ , _____. 1999c. The role of benzoate in anaerobic degradation of terephthalate. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1161-1167.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Krishna. GVT. and P. Kumar. 2008. Treatment of low strength complex wastewater using an aerobic baffled reactor (ABR). **Bioresour. Technol**. 99: 8193-8200.

Kuntiya, A., S. Takenaka and P. Seesuriyachan. 2013. High potential of thermotolerant *Candida tropicalis* no. 10 for high concentration of phenol biodegradation. **Food Appl. Biosci. J**. 1(2): 59-68.

Latta, B. M. 1984. Improved tactile and sorption properties of polyester fabrics through caustic treatment. **Text. Res. J.** 54: 766-775.

Lau, C. M. 1978. Staging aeration for high efficiency treatment of aromatic acids plant wastewater. **32nd Ind. Waste. Conf. Purdue. University**. 63-74.

Ledakowicz, S., R. Maciejewska, J. Perkowski and A. Bin. 2001. Ozonation of reactive blue 81 in the bubble column. **Water Sci. Technol**. 44(5): 47-52.

Li, J. X., J. D. Gu and J. H. Yao. 2005. Degradation of dimethyl terephthalate by *Pasteurella multocida* Sa and *Sphingomonas paucimobilis* Sy isolated from mangrove sediment. **Int. Biodeter. Biodegr**. 56: 158-165.

Liang, D. W., T. Zhang, H. H. P. Fang and J. He. 2008. Phthalates biodegradation in the environment. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 80: 183-198.

Macarie H., A. Noyola and J. P. Guyot. 1992. Anaerobic treatment of a petrochemical wastewater from a terephthalic acid plant. **Water Sci. Technol**. 25: 223-235.

Maki, H., N. Hirayama, T. Hiwatari, K. Kohata, H. Uchiyama, M. Watanabe, F. Yamasaki and M. Furuki. 2003. Crude oil bioremediation field experiment in the sea of Japan. **Marine Pollution Bulletin**. 47: 74-77.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Margesin, R. and F. Schinner. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel oil contaminated soil in an alpine glacier skiing area. **Appl. Environ. Microbiol**. 67: 3127-3133.

Maszenan, A. M., Y. Liu and W. J. Ng. 2011. Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules. **Biotechnology Advances**. 29: 111-123.

McLelland, S. P. 1996. Supporting a ground water and soil natural remediation proposal. **Site Remed. News**. 8(1): 1-11.

Murty, S. D., D. S. Patel, R. Soni and N. Bhatt. 2012. Isolation and identification of bacterial culture for azo dye degrading capability. **Int. J. Res. Chem. and Env**.2(4): 69-79.

Naumova, R. P., S. K. Zaripova and L. P. Usmanova. 1986. Regulation of terephthalate catabolism in *Rhodococcus rubropertinctus*. **Microbiol**. 55: 729-734.

Nozawa, T. and Y. Maruyama. 1988. Anaerobic metabolism of phthalate and other aromatic compounds by a denitrifying bacterium. **J. Bacteriol**. 170: 5778-5784.

Oomori, T., M. Matsubara, S. Masuda and T. Kodama. 1991. Production of 4,5-dihydro-4,5-dihydroxyphthalate from phthalate by a mutant strain of *Pseudomonas testosteroni* M4-1. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 35: 431-435.

Ordaz-Cortez, A., F. Thalasso, E. Salgado-Manjarrez and C. Garibay-Orijel. 2013. Treatment of wastewater containing high concentrations of terephthalic acid by *Comamonas* sp. and *Rhodococcus* sp.: kinetic and stoichiometric characterization. **Water Environ. J**.

Padmakumar, R. and P. Oriel. 1999. Bioconversion of acrylonitrile to acrylamide using a thermostable nitrile hydralase. **Appl. Biochem. Biotechnol**. 77: 671-679.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pokhrel, D. and T. Viraraghavan. 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater: a review. **Sci. Total. Environ**. 333: (1-3). 37-58.

Prieto, M. B., A. Hidalgo, C. Rodriguez-Femandez, J. L. Serra and M. J. Llama. 2002. Biodegradation of phenol in systhetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 58: 853-859.

Qiu, Y. L., Y. Sekiguchi, S. Hanada, H. Imachi, I. C. Tseng, S. S. Cheng, A. Ohashi, H. Harada and Y. Kamagata. 2006. *Pelotomaculum terephthalicum* sp. Nov. and *Pelotomaculum isophthalicum* sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens. **Arch. Microbiol**. 185: 172-182.

Ribbons, D. W., P. Keyser, D. A. Kunz, B. F. Taylor, R. W. Eaton and B. N. Anderson. 1984. Microbial degradation of phthalates. In: Gibson DT (ED) **Microbial degradation of organics compounds**, pp 371-397.

Rittman, B. E. and P. L. McCarty. 2001. Principles and application. **In Environmental Biotechnology**. McGraw Hill: New York.

Rodriguez, M., V. Sarria, S. Esplugas and C. Pulgarin. 2002. Photo-Fenton treatment of a biorecalcitrant wastewater generated in textile activities: biodegradability of the phototreated solution. **J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry**. 151: 129-135.

Sanchez, M. A., L. M. Campbell, F. A. Brinker and D. Owens. 2000. Attenuation the natural way, a former wood-preserving site offers a case study for evaluating the potential of monitored natural attenuation. **Environ. Poll**. 136: 187-195.

Savotianoff, D. 1990. TPA-DMT, confidence is coming back. **Infect. Chem**. 317: 193-201.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Schlafli, H. R., M. A. Weiss, T. Leisinger and A. M. Cook. 1994. Terephthalate 1,2- dioxygenase system from *Comamonas testosterone* T-2: Purification and some properties of the oxygenase component. **J.Bacteriol.** 176: 6644-6652.

Shelton, D. R., S. A. Boyd and J. M. Tiedje. 1984. Anaerobic biodegradation of phthalic acid esters in sludge. **Environ. Sci. Technol.** 18(2): 93-97.

Shigematsu, T., K. Yumihara, Y. Ueda, S. Morimura and K. Kida. 2003. Purification and gene cloning of the oxygenase component of the terephthalate 1,2-dioxygenase system from *Delftia tsuruhatensis* strain T7. **FEMS. Microbiol. Lett**. 220: 255-260.

Sugimori, D., T. Dake and S. Nakamura. 2000. Microbial degradation of disodium terephthalate by alkaliphilic *Dietzia* sp. strain GS-1. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. 64: 2709-2711.

Swicofil AG Textile Services. 2010. **Polyester**. Available Source:http://www.swicofil.com/images/polyester.jpg, 30 June 2010.

Syracuse Research Corporation. 1988. **Calculated Values SRC Report**.

Taylor, B. F. and D. W. Ribbons. 1983. Bacterial decarboxylation of o-phthalic acids. **Appl. Environ. Microbiol.** 46: 1276-1281.

U. S. Environmental Protection Agency. 1994. **Preliminary Exposure Profile: Terephthalic Acid: Draft report**.

Vamsee-Krishna, C., Y. Mohan and P. S. Phale. 2006. Biodegradation of phthalate isomers by *Pseudomonas aeruginosa* PP4, *Pseudomonas* sp. PPD and *Acinetobacter lwoffii* ISP4. **Appl. Microbiol.Biotechnol**. 72: 1263-1269.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____ and P. S. Phale. 2008. Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters. **Indian. J. Microbiol**. 48: 19-34.

Veenagayathri, K. and N. Vasudevan. 2010. Effect of pH, nitrogen sources and salts on the degradation of phenol by the bacterium consortium under saline conditions. **Int. J**. **Biotechnol. Biochem**. 6: 783-791.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. **Pure. Appl. Chem**. 73(7): 1163-1172.

Wang, Y. Z., Y. M. Zhou and G. J. Zystra. 1995. Molecular analysis of isophthalate and terephthalate degradation by *Comamonas testosteroni* YZW-D. **Environ. Health. Perspect**. 103: 9-12.

_____ , Y. P. and J. D. Gu. 2006. Degradability of dimethyl terephthalate by *Variovorax paradoxus* T4 and *Sphingomonas yanoikuyae* DOS01 isolated from deep-ocean sediments. **Ecotoxicol**. 15: 549-557.

_____, L., S. Barrington and J. W. Kim. 2007. Biodegradation of pentyl amine and aniline from petrochemical wastewater**. J. Environ. Manage**. 83: 191-197.

_____ , Z. Y., D. M. Gao, F. M. Li, J. Zhao, Y. Z. Xin, S. Simkins and B. S. Xing. 2008. Petroleum hydrocarbon degradation potential of soil bacteria native to the yellow river delta. **Pedosphere**. 18(6): 707-716.

_____ , Z. J., L. H. Teng, J. Zhuang, X. L. Huang and J. F. Zhang. 2011. Study on optimal biodegradation of terephthalic acid by an isolated *Pseudomonas* sp.. **African Journal Biotechnology**. 10(16): 3143-3148.

Washington State University. 2001. **Polymers**. Available Source: http://www.Chemistry2.csudh.edu/rpendarvis/Polymer/html, 30 June 2010.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wheeler, D. L., D. M. Church, S. Federhen, A. E. Lash, T. L. Madden, J. U. Pentius, G. D. Schuler, L. M. Schriml, E. Sequeira, T. A. Tatusova and L. Wagner. 2003. Database resources of the national center for biotechnology. **Nucleic Acids Res**. 31(1): 28-33.

Yeber, M. C., J. Rodriguez, J. Freer, J. Baeza and N. Duran. 1999. Advanced oxidation of a pulp mill bleaching wastewater. **Chemosphere**. 39: 1679-1688.

Zhang, Y. M., Y. Q. Sun, Z. J. Wang and J. Zhang. 2013. Degradation of terephthalic acid by a newly isolated strain of *Arthobacter* sp. 0574. **S. Afr. J. Sci**. 109.

Zhou, H. Y., X. H. Xu and D. H. Wang. 2004. Catalytic dechlorination and kinetics of 6-dichlorobenzene by Pd/Fe. **Chin. J. Chem. Eng**. 12(4): 505-509.

Zylstra, G. J., R. H. Olsen and D. P. Ballou. 1989. Cloning, expression and regulation of the *Pseudomonas cepacia* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. **J. Bacteriol**. 171: 5907-5914.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. อาหาร Nondefined medium (Kimura and Ito, 2001)

Terephthalic Acid (TA)	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	3.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4 7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4 7H_2O$	0.02	กรัม
yeast extract	0.2	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการละลายสาร Terephthalic Acid (Kleerebezem *et al*., 1999)

ทำการละลายสาร Terephthalic Acid (TA) ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ในปริมาณเพียงเล็กน้อย ภายใต้ช่วงอุณหภูมิซึ่งมีค่าระหว่าง 80-90 องศาเซลเซียส หลังจากอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าลดลง ให้ทำการปรับค่าพีเอชให้มีค่าที่เหมาะสมด้วย 1M HCl

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับค่าพีเอชเท่ากับ 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร Nutrient Agar (NA)(Goodfellow, 1989)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอชเป็น 6.8-7.0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ละลายส่วนผสมต่างๆ ในน้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Normal saline (Goodfellow, 1989)

NaCl	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหาร Motility test medium (Goodfellow, 1989)

Tryptose	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอชเป็น 7.2 ± 0.2

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับค่าพีเอชเท่ากับ 7.2 ± 0.2 แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณสาร Terephthalic Acid (TA)

นำตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที หลังจากนั้นดูดเก็บส่วนใสที่ได้ (supernatant) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร

1.1 หลักการพิจารณาความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ณ เวลา 12 ชั่วโมง (%) คำนวณได้ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Kimura and Ito, 2001)

$$\text{ความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ที่เวลา 12 ชั่วโมง (\%)} = \frac{\text{ค่า OD 240nm ชม.ที่ 0} - \text{ค่า OD 240nm ชม.ที่ 12}}{\text{ค่า OD 240nm ชม.ที่ 0}} \times 100$$

กำหนดความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในแหล่งต่างๆ โดยใช้สัดส่วนของสาร TA ที่ลดลงในชั่วโมงที่ 12 (%) ดังนี้

สัดส่วนสาร TA ลดลงในช่วงต่ำกว่า 10 % ของสารตั้งต้น ใช้สัญลักษณ์เป็น +
สัดส่วนสาร TA ลดลงในช่วง 10 – 20 % ของสารตั้งต้น ใช้สัญลักษณ์เป็น ++
สัดส่วนสาร TA ลดลงในช่วง 20 – 30 % ของสารตั้งต้น ใช้สัญลักษณ์เป็น +++
สัดส่วนสาร TA ลดลงในช่วง 30 – 40 % ของสารตั้งต้น ใช้สัญลักษณ์เป็น ++++
สัดส่วนสาร TA ลดลงในช่วงมากกว่า 40 % ของสารตั้งต้น ใช้สัญลักษณ์เป็น +++++

1.2 หลักการพิจารณาปริมาณสาร TA ที่คงเหลือในน้ำหมัก ณ เวลาที่ศึกษา (%) คำนวณได้ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Kimura and Ito, 2001)

$$\text{ความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ณ เวลาที่ศึกษา (\%)} = \frac{\text{ค่า OD 240nm ชม.ที่ศึกษา}}{\text{ค่า OD 240nm ชม.เริ่มต้น}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) (Goodfellow, 1989)

2.1 การเตรียมสารเคมี

2.1.1 Crystal violet

สารละลาย A		
Crystal violet (85% dye)	2.0	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร
ละลายสีในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด		
สารละลาย B		
Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ถ้ามีตะกอน ควรกรองก่อนนำไปใช้ และถ้าสีเข้มข้นเกินไปอาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

2.1.2 Safranin O counterstain(stock solution)

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100.0	มิลลิลิตร

ถ้าจะใช้สีในการย้อมเซลล์ให้ทำการเจือจางเป็น 1:10 (stock safranin O 10 มิลลิลิตร โดยทำการผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร) ถ้ามีตะกอนควรกรองก่อนใช้ทุกครั้ง

2.1.3 Gram's iodine solution (mordant)

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodide (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ละลาย Potassium iodine ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆ ก่อน จึงเติม Iodine (crystal) แล้วเติมน้ำให้ครบ จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชา

2.1.4 Alcohol-acetone (decolorizer)

Ethyl alcohol 95%	250.0	มิลลิลิตร
Acetone	250.0	มิลลิลิตร

2.2วิธีการปฏิบัติ

2.2.1 ทำความสะอาดสไลด์ และเช็ดให้แห้ง

2.2.2 เตรียมรอยสเมียร์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน

2.2.3 หยดสี Crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

2.2.4 เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

2.2.5 เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% หรือ แอลกอฮอล์อาซิโตน จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบาๆ

2.2.6 ซับด้วยกระดาษซับ และย้อมทับด้วยการหยดสี Safranin O ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

2.2.7 เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง

2.2.8 นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test) (Goodfellow, 1989)

บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (inoculate) ที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ motility test medium โดยการแทง (stab) เพียงครั้งเดียว ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ปลายแหลม (loop) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของส่วนสูงอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 18 – 24 ชั่วโมง

- ผลบวก (+) สังเกตเห็นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ออกมานอกรอย stab หรือไม่เห็นรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอย stab แต่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นเพิ่มขึ้น
- ผลลบ (+) ไม่สังเกตเห็นการเจริญของเชื้อเด่นชัด นอกจากรอยบริเวณ stab เท่านั้น โดยเห็นขอบเขตการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชัดเจน

4. การทดสอบแคตาเลส (Catalase test) (Goodfellow, 1989)

วิธีการทดสอบ Plate test (Slide method)

หยดสารละลาย H_2O_2 ที่มีความเข้มข้น 3 หรือ 30 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 หยดลงบนสไลด์ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ ทำการเขี่ยเชื้อลงไปทำการผสมให้เข้ากัน

- ผลบวก (+) เกิดฟองแก๊ส
- ผลลบ (+) ไม่เกิดฟองแก๊ส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	TA (% w/v)			
Incubation time (h)	0.25	0.5	0.75	1.0
0	100.00	100.00	100.00	100.00
12	90.28	92.13	93.50	96.52
24	46.82	88.65	80.75	93.28
36	10.03	74.18	68.00	84.07
48	5.07	60.10	50.45	82.65
60	3.02	38.20	45.80	80.22
72	3.11	17.15	35.10	68.33
84	2.79	11.15	28.50	60.25
96	0.94	8.23	13.92	30.50
108	0.15	5.07	8.17	18.69
120	0.00	3.59	6.35	9.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค2 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	TA (% w/v)			
Incubation time (h)	0.25	0.5	0.75	1.0
0	0.04	0.04	0.04	0.0 4
12	0.28	0.31	0.38	0.14
24	0.77	0.72	0.82	0.37
36	0.80	0.65	0.97	1.07
48	0.73	0.75	1.23	1.12
60	0.75	0.82	1.30	1.20
72	0.80	0.91	1.40	1.37
84	0.72	1.00	1.52	1.40
96	0.50	0.60	1.47	1.47
108	0.35	0.42	1.20	1.36
120	0.30	0.38	0.93	1.25

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค3 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	TA (% w/v)			
Incubation time (h)	0.25	0.5	0.75	1.0
0	100.00	100.00	100.00	100.00
12	83.74	90.58	91.22	96.89
24	46.40	90.18	76.06	95.99
36	9.00	75.35	57.88	86.20
48	4.00	60.12	59.04	88.61
60	2.80	50.90	56.91	82.26
72	2.40	36.27	43.88	64.15
84	1.60	14.83	17.55	52.63
96	1.80	7.62	17.82	22.60
108	1.00	4.44	9.40	11.00
120	0.00	3.81	4.79	6.20

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค4 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	TA (% w/v)			
Incubation time (h)	0.25	0.5	0.75	1.0
0	0.04	0.04	0.04	0.05
12	0.30	0.36	0.37	0.14
24	0.88	0.76	0.88	0.29
36	0.79	0.60	1.26	1.28
48	0.72	0.80	1.46	1.30
60	0.72	0.84	1.53	1.36
72	0.68	1.02	1.66	1.47
84	0.45	0.98	1.64	1.50
96	0.37	0.77	1.58	1.53
108	0.28	0.70	1.47	1.60
120	0.19	0.71	1.38	1.64

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค5 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ความเข้มข้นของสาร TA ระดับต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	TA (% w/v)			
Incubation time (h)	0.25	0.5	0.75	1.0
0	100.00	100.00	100.00	100.00
12	85.20	89.07	91.89	97.81
24	44.80	77.53	75.68	97.01
36	8.80	61.74	65.94	87.34
48	3.60	50.20	46.49	84.06
60	2.60	38.84	43.24	76.90
72	3.00	17.20	36.22	64.76
84	1.60	10.93	6.76	56.59
96	1.85	2.28	2.70	41.70
108	0.80	4.15	3.24	15.50
120	0.00	2.83	4.32	4.66

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค6 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่ปริมาณสาร TA ระดับต่างๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	TA (% w/v)			
Incubation time (h)	0.25	0.5	0.75	1.0
0	0.04	0.04	0.04	0.04
12	0.30	0.34	0.33	0.14
24	0.75	0.65	0.73	0.28
36	0.69	0.62	1.07	1.12
48	0.59	0.68	1.10	1.30
60	0.62	0.87	1.22	1.42
72	0.56	0.71	1.48	1.68
84	0.44	0.80	1.40	1.57
96	0.37	0.67	1.37	1.51
108	0.39	0.55	1.40	1.62
120	0.27	0.60	1.30	1.50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค7 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

Incubation time (h)	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
0	100.00	100.00	100.00	100.00
12	98.57	98.35	98.50	98.90
24	95.52	93.74	95.06	92.62
36	90.61	81.71	87.75	84.68
48	88.72	80.00	87.97	84.69
60	75.51	68.38	69.42	67.99
72	67.76	54.08	63.87	63.67
84	61.43	53.26	54.53	44.49
96	44.88	36.65	35.47	48.78
108	34.97	28.70	17.95	44.00
120	25.93	9.97	8.00	47.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค8 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

Incubation time (h)	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
0	0.04	0.05	0.03	0.05
12	0.16	0.16	0.14	0.15
24	0.24	0.30	0.30	0.22
36	0.55	1.02	0.92	0.58
48	0.73	1.04	0.96	0.72
60	1.11	1.07	1.03	1.07
72	1.26	1.18	1.05	0.93
84	1.46	1.26	1.26	0.86
96	1.41	1.35	1.32	0.84
108	1.38	1.38	1.40	0.77
120	1.27	1.35	1.42	0.72

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค9 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่ 37 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 รอบต่อนาที

Incubation time (h)	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
0	100.00	100.00	100.00	100.00
12	97.80	98.35	98.66	98.88
24	91.25	96.50	91.80	95.95
36	89.98	84.41	85.40	82.91
48	86.80	82.04	82.95	87.90
60	84.20	83.88	81.82	81.85
72	72.50	52.30	60.23	69.74
84	52.10	34.00	38.16	57.50
96	50.00	30.55	35.70	56.90
108	38.95	14.87	27.66	52.24
120	32.15	9.85	12.00	54.20

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค10 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

Incubation time (h)	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
0	0.04	0.04	0.03	0.04
12	0.13	0.18	0.16	0.14
24	0.27	0.33	0.36	0.25
36	0.60	0.98	0.83	0.89
48	0.93	1.06	1.10	1.07
60	1.04	1.28	1.29	1.22
72	1.31	1.39	1.39	1.38
84	1.35	1.59	1.45	1.47
96	1.48	1.62	1.50	1.30
108	1.41	1.68	1.62	1.26
120	1.30	1.77	1.70	1.22

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค11 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

Incubation time (h)	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
0	100.00	100.00	100.00	100.00
12	98.65	98.30	98.15	98.80
24	93.90	91.15	96.06	97.14
36	92.16	88.30	83.91	84.25
48	80.04	74.90	76.42	83.00
60	74.67	57.80	67.00	65.00
72	66.82	49.38	65.48	58.90
84	64.80	46.23	54.27	49.70
96	55.00	36.90	44.80	45.00
108	28.00	13.80	18.93	49.97
120	22.90	9.39	6.98	51.45

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค12 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และค่าพีเอช (pH) ระดับต่างๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

Incubation time (h)	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
0	0.04	0.04	0.04	0.03
12	0.15	0.14	0.13	0.14
24	0.20	0.30	0.33	0.35
36	1.11	1.07	0.96	0.55
48	1.30	1.14	1.02	0.72
60	1.32	1.17	1.03	0.87
72	1.35	1.21	1.08	1.19
84	1.38	1.39	1.14	1.15
96	1.47	1.43	1.17	1.20
108	1.32	1.33	1.26	1.15
120	1.20	1.28	1.37	1.14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค13 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ

	Temperature		
Incubation time (h)	30 °C	37 °C	45 °C
0	100.00	100.00	100.00
12	98.73	98.42	98.57
24	93.65	92.08	91.84
36	86.93	84.23	81.80
48	85.98	78.35	74.03
60	82.00	70.90	75.95
72	52.64	54.21	62.00
84	40.00	41.20	56.89
96	28.16	34.64	43.86
108	20.00	22.37	36.81
120	16.42	9.81	28.63

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค14 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ

	Temperature		
Incubation time (h)	30 °C	37 °C	45 °C
0	0.04	0.04	0.04
12	0.13	0.14	0.16
24	0.27	0.30	0.36
36	0.43	0.92	1.22
48	0.85	1.12	1.34
60	1.04	1.24	1.26
72	1.16	1.33	1.24
84	1.20	1.48	1.30
96	1.33	1.50	1.37
108	1.41	1.46	1.35
120	1.29	1.47	1.33

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค15 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ

	Temperature		
Incubation time (h)	30 °C	37 °C	45 °C
0	100.00	100.00	100.00
12	98.97	98.60	98.21
24	95.49	93.80	94.42
36	84.22	76.64	80.86
48	82.00	72.89	72.30
60	72.95	67.96	69.35
72	62.00	51.85	67.89
84	49.79	44.20	61.10
96	36.88	28.25	51.00
108	23.15	5.81	42.66
120	10.08	3.92	45.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค16 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่ย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ

	Temperature		
Incubation time (h)	30 °C	37 °C	45 °C
0	0.03	0.04	0.04
12	0.13	0.14	0.14
24	0.27	0.30	0.35
36	0.51	0.85	0.75
48	0.73	1.03	1.13
60	0.78	1.12	1.25
72	0.83	1.20	1.25
84	1.04	1.27	1.31
96	1.13	1.33	1.35
108	1.37	1.50	1.36
120	1.34	1.64	1.25

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค17 ความสามารถในการย่อยสลายสาร TerephthalicAcid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ

	Temperature		
Incubation time (h)	30 °C	37 °C	45 °C
0	100.00	100.00	100.00
12	98.88	98.96	98.80
24	98.65	98.55	98.73
36	87.74	85.20	80.35
48	78.86	79.83	74.60
60	72.96	73.06	68.00
72	54.50	54.58	58.40
84	52.87	46.70	49.40
96	38.63	22.84	46.52
108	28.45	18.88	40.57
120	19.17	13.81	34.93

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค18 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิระดับต่างๆ

	Temperature		
Incubation time (h)	30 °C	37 °C	45 °C
0	0.04	0.04	0.03
12	0.13	0.14	0.14
24	0.24	0.30	0.35
36	0.69	0.62	1.08
48	0.87	0.89	1.24
60	0.83	1.05	1.35
72	0.85	1.17	1.57
84	1.24	1.34	1.55
96	1.18	1.40	1.48
108	1.33	1.30	1.06
120	1.41	1.33	0.95

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค19 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terepththalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และyeast extract ระดับต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	yeast extract (% w/v)			
Incubation time (h)	0.02	0.04	0.12	0.52
0	100.00	100.00	100.00	100.00
12	99.55	98.93	98.94	96.05
24	99.20	98.97	90.62	90.85
36	93.85	83.96	85.71	89.40
48	91.88	79.86	79.92	70.70
60	92.05	75.23	78.00	72.84
72	87.92	55.65	65.46	69.18
84	74.15	37.82	67.59	67.57
96	66.40	15.88	63.23	70.06
108	43.82	11.91	44.90	48.03
120	22.94	11.75	36.25	42.64

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค20 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท G5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract ระดับต่างๆบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	yeast extract (% w/v)			
Incubation time (h)	0.02	0.04	0.12	0.52
0	0.04	0.05	0.05	0.06
12	0.12	0.14	0.25	0.36
24	0.13	0.36	0.48	0.88
36	0.32	0.74	0.78	1.15
48	0.40	0.98	0.82	1.20
60	0.58	1.13	1.20	1.37
72	0.71	1.25	1.31	1.45
84	0.83	1.28	1.40	1.53
96	0.85	1.33	1.54	1.77
108	0.94	1.40	1.50	1.80
120	0.96	1.36	1.75	1.83

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค21 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terepththalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract ระดับต่างๆบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	yeast extract (% w/v)			
Incubation time (h)	0.02	0.04	0.12	0.52
0	100.00	100.00	100.00	100.00
12	99.27	98.74	98.51	96.71
24	98.83	98.14	91.97	91.19
36	92.71	82.70	77.95	83.81
48	85.69	74.54	77.14	65.82
60	88.44	76.42	82.14	56.78
72	85.63	61.04	74.94	63.48
84	76.91	68.70	64.34	58.59
96	74.96	46.50	53.86	68.74
108	33.01	8.70	56.98	75.16
120	24.52	9.85	60.09	69.23

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค22 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท P5 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract ระดับต่างๆบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	yeast extract (% w/v)			
Incubation time (h)	0.02	0.04	0.12	0.52
0	0.05	0.06	0.05	0.05
12	0.12	0.13	0.28	0.30
24	0.14	0.30	0.50	0.71
36	0.35	1.17	1.37	1.27
48	0.51	1.25	1.52	1.60
60	0.62	1.36	1.53	1.72
72	0.75	1.43	1.57	1.81
84	0.80	1.48	1.65	1.75
96	0.85	1.51	1.68	1.90
108	0.90	1.57	1.70	2.15
120	0.91	1.60	1.74	2.27

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค23 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terepththalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และyeast extract ระดับต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	yeast extract (% w/v)			
Incubation time (h)	0.02	0.04	0.12	0.52
0	100.00	100.00	100.00	100.00
12	99.28	98.31	95.64	97.26
24	99.17	97.22	91.77	92.66
36	94.92	88.84	61.06	77.63
48	91.94	84.24	70.25	81.16
60	90.18	82.94	71.31	75.93
72	78.54	57.47	75.58	76.72
84	76.88	45.30	76.22	69.63
96	73.64	31.16	71.33	75.44
108	48.45	27.36	71.17	76.60
120	31.78	11.85	74.85	83.82

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค24 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลท S2 ที่สามารถย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร TA 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract ระดับต่างๆบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	yeast extract (% w/v)			
Incubation time (h)	0.02	0.04	0.12	0.52
0	0.05	0.05	0.05	0.06
12	0.13	0.13	0.14	0.16
24	0.14	0.37	0.18	0.19
36	0.33	0.77	1.16	1.18
48	0.51	0.92	1.36	1.31
60	0.62	1.35	1.39	1.45
72	0.75	1.38	1.50	1.71
84	0.80	1.40	1.77	1.78
96	0.77	1.42	1.83	2.00
108	0.65	1.47	1.98	2.17
120	0.57	1.50	2.13	2.20

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค25 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5P5, G5S2, P5S2 และ G5P5S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	Mixed culture			
Incubation time (h)	G5P5S2	G5S2	G5P5	P5S2
0	100.00	100.00	100.00	100.00
12	97.22	98.15	96.00	95.00
24	95.17	95.14	88.00	93.07
36	82.00	88.10	93.17	90.00
48	68.08	75.13	90.08	93.00
60	35.00	78.00	85.00	95.04
72	16.46	30.92	46.24	44.94
84	3.63	28.63	32.89	23.96
96	3.67	8.22	15.96	19.86
108	4.06	11.49	12.24	8.00
120	4.99	8.13	6.50	5.92

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค26 การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5P5, G5S2, P5S2 และ G5P5S2เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

	Mixed culture			
Incubation time (h)	G5P5S2	G5S2	G5P5	P5S2
0	0.03	0.03	0.03	0.04
12	0.13	0.13	0.14	0.12
24	0.31	0.20	0.25	0.22
36	1.13	1.10	1.09	0.94
48	1.58	0.95	1.17	1.02
60	1.60	1.06	1.13	1.07
72	1.60	1.11	1.30	1.15
84	1.58	1.16	1.33	1.26
96	1.58	1.15	1.29	1.30
108	1.50	1.20	1.37	1.29
120	1.57	1.27	1.40	1.33

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค27 ความสามารถในการย่อยสลายสาร Terephthalic Acid (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5, P5 และ S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสาร Terephthalic Acid (TA) 1.0 และ yeast extract 0.02 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร (fermenter) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

Incubation time (h)	Residual TA (%)
0	100
6	99.63
12	99.41
18	97.82
24	96.17
30	72.35
36	55.26
42	31.89
48	3.86
54	4.07
60	2.38
66	4.00
72	4.82

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค28 การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมไอโซเลท G5, P5 และ S2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ที่มีสารTerephthalic Acid (TA) 1.0 และ yeast extract 0.02 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร (fermenter) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

Incubation time (h)	Bacteria cells (CFU/ml)
0	1.28×10^5
6	2.60×10^6
12	2.42×10^7
18	2.95×10^7
24	4.00×10^7
30	5.20×10^7
36	1.20×10^8
42	1.22×10^8
48	3.80×10^8
54	5.60×10^7
60	1.01×10^7
66	7.70×10^6
72	6.20×10^6

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG
TCTAATACCGGATATGACCTCTTGATGCATGTTCTGGGGTGGAAAGTTTTTCGGTGCAGGATGAGC
CCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGA
GAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCACCCATGACGAAGCGCAAGTGACGGTAGTGGGAGAAGAAGCACCGGCCAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAG
CTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCGTCTGTGAAATCCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTGCAGGCGATAC
GGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC
AGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGT
TTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCCAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGA
TGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGTACCGGACGACTGCAGAGATGTGGTTTCCCTT
GTGGCCGGTAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGGACTCGCAGGAGACTGCC
GGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCA
CACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCC
GGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA
TCAGCAACGCTGCGGTGAATA

ภาพผนวกที่ ค1 ลำดับเบส 16sRNA ของไอโซเลท G5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

TGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCTTGCCCTCTGGGATAAGCCTGG
GAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCTTGcTGCATGGTGAGGGGTGGAAAGTTTTTCGGTGC
AGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAG
CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGG
CCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCA
CCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGG
GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCGTCTGTGAAATCCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTG
CAGGCGATACGGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG
CGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCT
AGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCCAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGG
ATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGTACCGGACGACTGCAGAGATG
TGGTTTCCCTTGTGGCCGGTAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGGACTCGC
AGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGT
CCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAAT
CCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTA
GTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACG
TCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGC

ภาพผนวกที่ ค2 ลำดับเบส 16sRNA ของไอโซเลท P5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTCCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGG
GTCTAATACCGGATATGACCTCGGGATGCATGTCCTGGGGTGGAAAGTTTTTCGGTGCAGGATGA
GCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCT
GAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG
AGCTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCGTCTGTGAAATCCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTGCAGGCGAT
ACGGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA
TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGG
GTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCCAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTC
GATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGTACCGGACGACTGCAGAGATGTGGTTTCC
CTTGTGGCCGGTAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGGACTCGCAGGAGACT
GCCGGGGTCAACTCGAAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCT
TCACACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAA
GCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGC
AGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAA
GTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTCGTGGGAGGGAGCCGTCGAA

ภาพผนวกที่ ค3 ลำดับเบส 16sRNA ของไอโซเลท S2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว เศารยา สุขเกษม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	3 มีนาคม 2527
สถานที่เกิด	เขต สัมพันธวงศ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์