การคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน

Screening of Thermotolerant Amylase-Producing Microorganisms for the Fermented Rice Noodle Wastewater Treatment

หัสลินดา บินมะแอ* อามีเน๊าะ โดยมาตู และอานีซ๊ะ สิปิดี

Hatsalinda Binma-ae*, Ameenoh Doymatu and Anasah Sipide

หลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

Department of Microbiology, *Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University,* Yala 95000, Thailand

*Corresponding author, e-mail: haslinda.b@yru.ac.th

(Recieived: Jan 31, 2021; Revised: Apr 15, 2021; Accepted: Apr 26, 2021)

บทคัดย่อ

การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อนในท้องถิ่น 18 ตัวอย่างจาก 5 แหล่ง ได้แก่ บริเวณโรงงานยางพารา บริเวณโรงงานเผาถ่าน แกลบ มูลวัว และมูลไก่ ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้การบำบัดน้ำทิ้งโรงงานผลิตขนมจีน พบเชื้อแบคทีเรียทนร้อนทั้งหมด 15 ไอโซเลท เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบเชื้อรา ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ พบว่ามี 6 ไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตอะไมเลส ได้แก่ RF1, RF2, RF4, RF7, RF11 และ CBP3 เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่แบคทีเรียทนร้อนผลิตขึ้น พบว่า แบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 93.5±0.67 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 80.54 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของโปรตีน ศึกษาการประยุกต์ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนในห้องปฏิบัติการ พบว่า แบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 มีประสิทธิภาพสามารถลดค่าบีโอดีและซีโอดีร้อยละ 41.32±0.64 และ 56.23±0.54 เมื่อนำแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ที่คัดแยกได้ มาจัดจำแนกกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพื้นฐาน พบว่าเป็นแบคทีเรียทนร้อนในสกุลของ *Bacillus* sp. ดังนั้นแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนได้

คำสำคัญ : แบคทีเรียทนร้อน อะไมเลส น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน

Abstract

Isolation and screening of thermotolerant microorganisms from 18 samples 5 habitats in local places including various areas of rubber factory, charcoal burning plant, rice husk, cow dung and chicken dung that were able to produce amylase used for treating the rice noodle wastewater. The result showed that 15 isolates were thermotolerant bacteria which can grow at 55±2°C but no fungal growth was observed. The qualitative and quantitative of amylase were examined. Six isolates can produce amylase including RF1, RF2, RF4, RF7, RF11 and CBP3. Comparison the enzymatic activity produced by thermotolerant bacteria revealed that thermotolerant bacteria isolate CBP3 could produced the highest activity of amylase ๖(93.5±0.67 U/ml) and specific activity of 80.54 U/ml of protein. Studies on the application of treatment efficiency in rice noodle process effluent in vitro showed that the thermotolerant bacterium isolate CBP3 had BOD and COD removal efficiency of 41.32±0.64 % and 56.23±0.54 %. The thermotolerant bacterium isolate CBP3 was identified on the basis of their morphological characteristics showed the CBP3 was classified as *Bacillus* sp. Therefore, thermotolerant amylase producing bacteria could be apply for wastewater treatment in the fermented rice noodle processing.

Keywords: Thermotolerant microorganisms, Amylase, Rice noodle wastewater treatment

บทนำ

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก และมีการกระจายตัวอยู่ในทุกหนทุกแห่ง ไม่ว่าจะเป็นดิน น้ำ หรืออากาศ แต่การกระจายตัวของจุลินทรีย์ในธรรมชาติไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญที่แตกต่างกัน จึงสามารถแบ่งจุลินทรีย์ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ Psychrophile (อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 15–20 องศาเซลเซียส), Mesophile (อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 20–40 องศาเซลเซียส) และยังพบจุลินทรีย์ที่สามารถอยู่รอดที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญที่อุณหภูมิห้อง หรือต่ำกว่าได้ เรียกว่า จุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง (Thermotolerant) (Mienda & Shamsir, 2013, p. 1; Ahirwar, *et al*., 2017, p. 125) สภาพแวดล้อมที่จะพบจุลินทรีย์จำพวกนี้ได้ มีตั้งแต่ในตามกองหญ้าที่เน่าเปื่อย ตามท่อน้ำร้อน หรือตามแหล่งพื้นที่ต่าง ๆ ในภูมิประเทศที่มีอุณหภูมิสูง เช่น น้ำพุร้อน หรือพื้นดินใต้ทะเลบริเวณที่มีความร้อน หรือพื้นดินที่มีผ่านความร้อนเป็นระยะเวลานาน ๆ กลไกการทนร้อนมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลภายเซลล์บางอย่าง โดยมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์ทนร้อนไปจากเอนไซม์ปกติ เพื่อให้ทนต่อสภาวะที่รุนแรง โดยการปรับตัวของเอนไซม์ที่เรียกว่า Extremozymes (Sani & Krishnaraj, 2017, p.100) จุลินทรีย์ทนร้อนมีประโยชน์ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะงานทางด้านอุตสาหกรรม เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทนร้อนสามารถทำให้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตโดยมีสิ่งมีชีวิตทั่ว ๆ ไป นอกจากนี้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ทนร้อนมีความเสถียรที่อุณหภูมิปกติ ดังนั้นจึงมีความคงทนในการผลิตทางการค้าและ การยืดระยะเวลาการเก็บเอนไซม์ได้นานขึ้น จึงสามารถลดต้นทุนในทางอุตสาหกรรม (Sani & Krishnaraj, 2017, p. 100) นอกจากมีความต้องการในทางอุตสาหกรรม จุลินทรีย์ทนร้อนยังมีการประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีอุณหภูมิสูง จากการศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งเป็นน้ำทิ้งที่มีอุณหภูมิสูง เนื่องจากในขั้นตอนของการย่อยผลปาล์มนั้นจะมีการเติมน้ำร้อนลงไป (อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส) เพื่อสกัดน้ำมันออกจากส่วนเปลือก ส่งผลทำให้น้ำทิ้งที่ออกมามีอุณหภูมิสูง โดยใช้เชื้อราทนร้อนที่มีสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส เพื่อการกำจัดน้ำมันปริมาณสารอินทรีย์ (ค่าบีโอดี, ค่าซีโอดี, น้ำมัน) ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มให้ลดลง ซึ่งสามารถลดซีโอดีได้ร้อยละ 80 (Prasertsan & Binmaeil, 2018, p. 127)

ในจังหวัดยะลามีการรับประทานขนมจีนอย่างกว้างขวาง ไม่ว่าร้านขายขนมจีนทั่วไป ในงานเลี้ยงต่าง ๆ และสามารถรับประทานได้ทุกศาสนาในทุกเพศทุกวัย จึงทำให้มีโรงงานผลิตขนมจีนทั้งแบบโฮมเมดและโรงงานอย่างน้อย 8 แหล่งในอำเภอเมืองจังหวัดยะลา กรรมวิธีการผลิตขนมจีนเริ่มต้นใช้ข้าวหักล้างและแช่ 1-2 คืน ในการผลิตขนมจีนหมัก ส่วนเส้นสดทำการล้างข้าว นำมาโม่แล้วนำแป้งที่โม่ทิ้งให้แป้งตกตะกอน หลังจากนั้นนำก้อนแป้งสะเด็ดน้ำไปนึ่ง ทำการนวด กรองแป้ง โรยเส้นและการทำขนมจีนเป็นจับ (Jijai & Siripatana, 2016, pp. 9-10) จากกระบวนการดังกล่าวมีการใช้น้ำในปริมาณที่มาก ส่งผลทำให้เกิดน้ำทิ้งในปริมาณที่มากตามมา โดยลักษณะน้ำทิ้งมีสีขาวขุ่น มีกลิ่นเหม็นจากแป้งที่เกิดการหมัก มีค่าบีโอดี 3,784.84 มิลลิกรัมต่อลิตร (Pratum, 2014, p. 93) และซีโอดีเท่ากับ 4,200-4,278 มิลลิกรัมต่อลิตร (Jijai & Siripatana, 2016, p. 26; Pratum, 2017, p. 327) และวิธีที่น่าจะเป็นไปได้ในการกำจัดสารอินรีย์ดังกล่าว คือวิธีทางชีวภาพ มีการศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน โดยใช้พืชพวกหญ้าแฝกหอมและกกกลมจันทบูร พบว่าสามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 96.46 เป็นเวลา 21 วัน (Pratum, 2017, p. 329) และมีการศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* KJP8 บ่มที่อุณหภูมิห้อง สามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 67 ที่ 120 ชั่วโมง (Pratum, 2014, p. 100) แต่เนื่องจากในขั้นตอนการผลิตขนมจีนต้องกระบวนการต้มเส้นขนมจีนที่ต้องมีอุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้เส้นขนมจีนสุก ทำให้น้ำทิ้งที่ออกมามีอุณหภูมิสูง จึงจำเป็นต้องเลือกใช้จุลินทรีย์ที่ทนร้อนได้ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถอยู่รอดที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้มีไม่มากและยังการศึกษาน้อยอยู่ ดังนั้นจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจและการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนทางชีววิทยาโดยใช้จุลินทรีย์เพื่อการกำจัดปริมาณสารอินทรีย์ให้ลดลง ตลอดจนมีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์มีความสามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนจำพวกแป้งในการเจริญโดยการผลิตเอนไซม์เอะไมเลส เพื่อนำความรู้ที่ได้ดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน และมีประโยชน์กับทุก ๆ ฝ่ายเกี่ยวข้องในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนหรือที่ต้องการใช้เป็นแนวทางในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนของจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ ซึ่งอาจจะใช้ได้จริงและไม่ก่อสารพิษในการบำบัดตลอดจนช่วยในการลดโลกร้อน ทำให้เกิดการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพชีวิตของประชาชนในท้องถิ่นที่มีผลกระทบจากกลิ่นของน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน เนื่องจากเกิดการหมักของแป้งที่ออกมากับน้ำทิ้ง ซึ่งโรงงานส่วนใหญ่อยู่ในอำเภอเมืองจังหวัดยะลา รวมทั้งพัฒนางานวิจัยให้สอดคล้องกับบริบทของสังคมท้องถิ่นชายแดนภาคใต้ได้อีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อนที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแหล่งต่าง ๆ ในท้องถิ่น นำจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดเลือกได้มาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนในระดับห้องปฏิบัติการ ตลอดจนศึกษาทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ ในท้องถิ่นสามจังหวัดชายแดนใต้ ได้แก่บริเวณโรงงานยางพาราจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ขี้เลื่อยบนพื้นดิน ขี้เลื่อยสูง 50 เซนติเมตรจากพื้นดิน ขี้เลื่อยสูง 2 เมตรจากพื้นดิน ยอดกองขี้เลื่อย น้ำในหม้อ น้ำทิ้งตามทางเดิน น้ำทิ้งหลังการอบน้ำยากันปลวก น้ำในท่อพักบำบัด ขี้เถ้าผสมดิน และขี้เถ้าไม้ยางพารา บริเวณโรงงานเผาถ่านจำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ด้านล่างของกองขี้เลื่อย ด้านข้างของกองขี้เลื่อย ด้านบนของกองขี้เลื่อย ขี้เถ้า และเศษถ่าน แกลบจำนวน 1 ตัวอย่าง มูลสัตว์จำนวน 2 ตัวอย่าง

2. ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อน

นำตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ มาทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อน โดยตัวอย่างที่เป็นของเหลวใช้ปิเปตดูดมา 1 มิลลิลิตร และตัวอย่างที่เป็นของแข็งนำมาชั่ง 1 กรัม แล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) สำหรับแบคทีเรียทนร้อน และอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB) สำหรับราทนร้อน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรียทนร้อน และเป็นเวลา 7 วัน สำหรับราทนร้อน โดยสังเกตความขุ่นและสังเกตเส้นใยทุกวัน เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นหรือเกิดเส้นใย ก็จะทำการถ่ายเชื้อที่เจริญแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลอดใหม่อีกครั้งหนึ่ง และบ่มที่อุณหภูมิ 55 ±2 องศาเซลเซียส จนอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นหรือเกิดเส้นใย แล้วนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส และสังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วทำการเก็บเชื้อโดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะที่แตกต่างกันมาอย่างละ 1 โคโลนี เก็บรักษาบนหลอดอาหารวุ้นเอียง ปิดฝาให้แน่นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการ Subculture ใหม่ทุก ๆ เดือน

3. ทดสอบกิจกรรมของอะไมเลสเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของจุลินทรีย์ทนร้อน

นำจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดแยกได้ มาทดสอบกิจกรรมของอะไมเลสเชิงคุณภาพ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดแยกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB สำหรับแบคทีเรียทนร้อน และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สำหรับราทนร้อน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทนร้อน และสำหรับราทนร้อนเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำการ Point inoculum ในอาหาร Starch agar ประกอบด้วย starch 10 กรัมต่อลิตร peptone 10 กรัมต่อลิตร yeast extract 20 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.05 กรัมต่อลิตร $MnCl_2.4H_2O$ 0.015 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.25 กรัมต่อลิตร $CaCl_2.2H_2O$ 0.05 กรัมต่อลิตร และ $FeSO_4.7H_2O$ 0.01กรัมต่อลิตร (Ashwini, *et al.*, 2011, p. 35) บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรียทนร้อน และสำหรับราทนร้อนเป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้ง โดยหยดสารสะลายไอโอดีน ลงบนโคโลนี หากเชื้อใดมีบริเวณรอบโคโลนีใสแสดงว่าจุลินทรีย์ทนร้อนมีการย่อยแป้งได้ (Sharma *et al*., 2015, p. 2) เก็บตัวอย่างเชื้อที่เจริญได้ดีและมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar slant ส่วนการทดสอบกิจกรรมของอะไมเลสเชิงปริมาณ โดยนำจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดแยกได้ มาเลี้ยงในอาหาร Starch agar เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทนร้อน และสำหรับราทนร้อนเป็นเวลา 3-4 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงต่อในอาหาร Starch broth บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทนร้อน และสำหรับราทนร้อน เป็นเวลา 3 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 ±2 องศาเซลเซียส เป็นการเตรียมหัวเชื้อ ทำการเลี้ยงในอาหารเดิมสภาวะเดิม บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทนร้อน และสำหรับราทนร้อน เป็นเวลา 4 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสโดยวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ (Miller, 1959, p. 427) และวิเคราะห์โปรตีน (Lowry *et al*., 1951, pp. 265-266)

4. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

นำจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดแยกได้ จากข้อ 3 มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยทำการเตรียมหัวเชื้อในอาหาร Starch broth เมื่อได้หัวเชื้อแล้วทำการเลี้ยงในอาหารเดิมสภาวะเดิม บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทนร้อน และสำหรับราทนร้อน เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ วัน บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสโดยวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ และวิเคราะห์โปรตีน และเลือกเก็บเฉพาะจุลินทรีย์ทนร้อนที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุด มาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งต่อไป

5. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน อำเภอเมือง จังหวัดยะลา ปริมาณ 10 ลิตร ศึกษาลักษณะของน้ำทิ้ง โดยบันทึกสีด้วยตาเปล่า วัดpH โดยเครื่องวัด pH รวมทั้งวิเคราะห์ค่า บีโอดีและซีโอดี (APHA, AWWA & WEF, 2017, pp. 5-6, 5-21) จากนั้นนำจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยแป้ง มาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดจากน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมาเลี้ยงแยกกันในอาหาร Starch broth บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทนร้อน และสำหรับราทนร้อนเป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สำหรับแบคทีเรียทนร้อนและสำหรับราทนร้อน 2.4x10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วเติมเชื้อที่ต้องการ ความเข้มข้นของแต่ละเชื้อที่ร้อยละ 10 ลงในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2) องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า pH บีโอดีและซีโอดีที่ 0 2 4 และ 6 วัน

6. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ที่มีประสิทธิภาพสูงในการบำบัด น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของจุลินทรีย์ทนร้อน ซึ่งอาศัยการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเป็นหลัก ลักษณะที่ทำการศึกษา ได้แก่ รูปร่างของจุลินทรีย์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ และทดสอบทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ Indole Methyl red Catalase Oxidase และ Starch hydrolysis (Naveena & Joy, 2014 pp. 41-56) แล้วไปเปรียบเทียบกับเอกสารทางด้านอนุกรมวิธานเพื่อจำแนกชนิด (Ashwini, *et al.,* 2011, p. 38; Annamalai, *et al.,* 2011, p. 425; Paul, *et al.,* 2009, pp. 21-128)

ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อน

จากการเก็บตัวอย่างในท้องถิ่นสามจังหวัดชายแดนใต้ (ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส) จากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ บริเวณโรงงานยางพาราจำนวน 10 ตัวอย่างจากจังหวัดยะลา บริเวณโรงงานเผาถ่านจำนวน 5 ตัวอย่างจากจังหวัดปัตตานี แกลบจำนวน 1 ตัวอย่างจากจังหวัดยะลา มูลสัตว์จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ มูลวัว และมูลไก่ จากจังหวัดนราธิวาส มาทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อน บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส และสังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น พบแบคทีเรียทนร้อนทั้งหมด 15 ไอโซเลต จากบริเวณต่าง ๆ ในโรงงานยางพารา (12 ไอโซเลต) และบริเวณต่าง ๆ ในโรงงานเผาถ่าน (3 ไอโซเลต) ได้แก่ RT1, RT2, RT3, RT4, RT5, RT6, RT7, RT8, RT9, RT10, RT11, RT12, CBP1, CBP2 และ CBP3 และไม่พบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทนร้อนในตัวอย่างแกลบและมูลสัตว์ นอกจากนี้ไม่พบเชื้อราทนร้อนในทุกตัวอย่าง ดังตารางที่ 1

2. ทดสอบกิจกรรมของอะไมเลสเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของจุลินทรีย์ทนร้อน

นำแบคทีเรียทนร้อนทั้งหมด 15 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทนร้อน จากนั้นทำการ Point inoculum ในอาหาร Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้ง โดยหยดสารละลายไอโอดีน ลงบนโคโลนี พบว่ามี 6 ไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ RF1, RF2, RF4, RF7, RF11 และ CBP3 โดยแสดงความกว้างบริเวณวงใสรอบโคโลนีมากที่สุด คือ 1.20±0.18 เซนติเมตร และ RF11 ให้ความกว้างบริเวณวงใสรอบโคโลนีน้อยที่สุด คือ 0.17±1.52 เซนติเมตร ดังตารางที่ 1 ส่วนการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเชิงปริมาณ โดยนำแบคทีเรียทนร้อนทั้งหมด 6 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ โดยทำการเลี้ยงใน Starch broth บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ

200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสโดยวิธีการวิเคราะห์ DNS พบว่าแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 93.5±0.67 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 1 และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 80.54 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของโปรตีน และเลือกแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดที่สุด มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสต่อไป

ตารางที่ 1 แบคทีเรียทนร้อนที่คัดแยกได้และกิจกรรมของอะไมเลสในแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ

No.	Sample	No. of bacterial isolated	Isolate	The average diameter of hydrolysis zone (cm)	The quantitative assay (U/mL)
1.	Rubber factory (RF)	12	RF1	0.60 ± 0.18^{B}	42.56 ± 0.45^{B}
2.			RF2	0.23 ± 0.25^{C}	12.65 ± 0.15^{C}
3.			RF3	-	-
4.			RF4	0.24 ± 0.28^{C}	14.65 ± 0.85^{C}
5.			RF5	-	-
6.			RF6	-	-
7.			RF7	0.18 ± 1.28^{C}	10.12 ± 1.84^{C}
8.			RF8	-	-
9.			RF9	-	-
10.			RF10	-	-
11.			RF11	0.17 ± 1.52^{C}	9.45 ± 1.23^{C}
12.			RF12	-	-
13.	Charcoal burning plant	3	CBP1	-	-
14.	(CBP)		CBP2	-	-
15.			CBP3	1.20 ± 0.18^{A}	93.5 ± 0.67^{A}

The data in columns was presented as mean values with standard deviations, with not significance threshold $p>0.05$

- = no activity of enzyme

3. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

นำแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ CBP3 ซึ่งมีความสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ในอาหาร Starch broth บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง ที่ 0 6 12 18 24 30 32 48 54 60 66 และ 72 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 94.5±0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลส เท่ากับ 81.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของโปรตีน ดังภาพที่ 1 และได้เลือกระยะเวลาการเลี้ยงแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ที่ 48 ชั่วโมง มาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งต่อไป

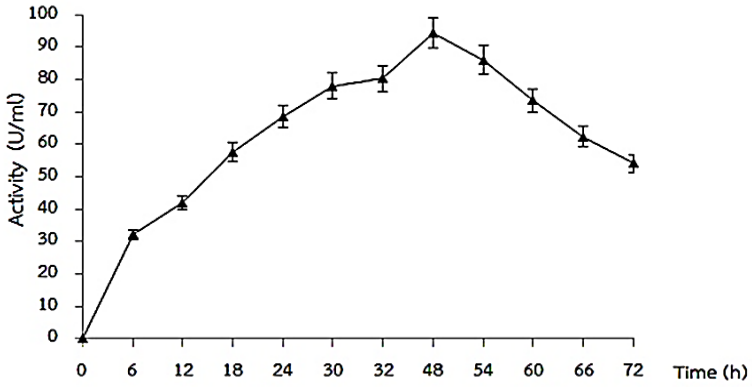
4. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน

ผลการศึกษาลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน อำเภอเมือง จังหวัดยะลา เบื้องต้นพบว่า น้ำทิ้งมีสีขาวขุ่นเมื่อสังเกตจากตาเปล่า และนำมาวัดค่า pH ได้เท่ากับ 4.3, บีโอดีมีค่าเท่ากับ 3,684 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโอดีเท่ากับ 4,325 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาการประยุกต์ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน โดยใช้แบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ CBP3 ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูง เลี้ยงในอาหาร Starch broth ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2) องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่ 0 24 36 48 และ 72 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ค่า pH

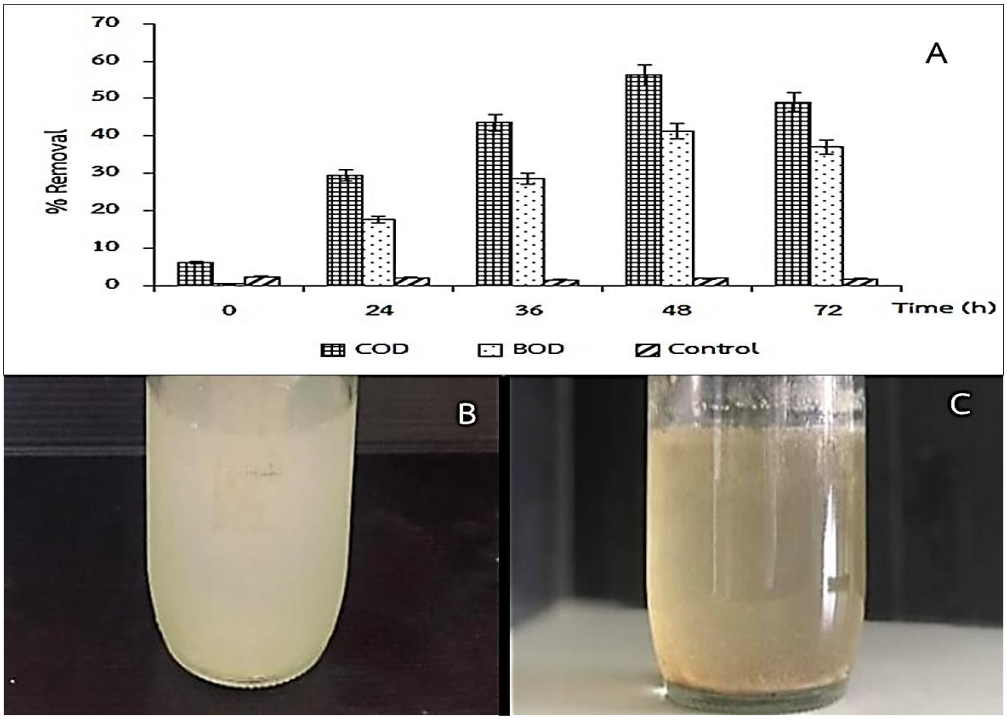
บีโอดีและซีโอดี พบว่า แบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 มีค่า pH เท่ากับ 5.88 และมีประสิทธิภาพสามารถลดค่าบีโอดีและซีโอดีเท่ากับ 1,522 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโอดีเท่ากับ 2,431 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละที่ลดลงเท่ากับ 41.32±0.64 และ 56.23±0.54 ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ดังภาพที่ 2 ดังนั้นแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนได้ต่อไป

5. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ที่มีประสิทธิภาพสูงในการบำบัด น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน

เมื่อนำแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ที่คัดเลือกได้ มาศึกษาจัดจำแนกกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพื้นฐาน ได้แก่ รูปร่างของจุลินทรีย์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ และทดสอบทางชีวเคมีบางประการ พบว่าแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ที่คัดเลือกได้ เป็นแบคทีเรียทนร้อนในสกุลของ *Bacillus* sp. ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 3



ภาพที่ 1 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ในอาหาร Starch broth บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส

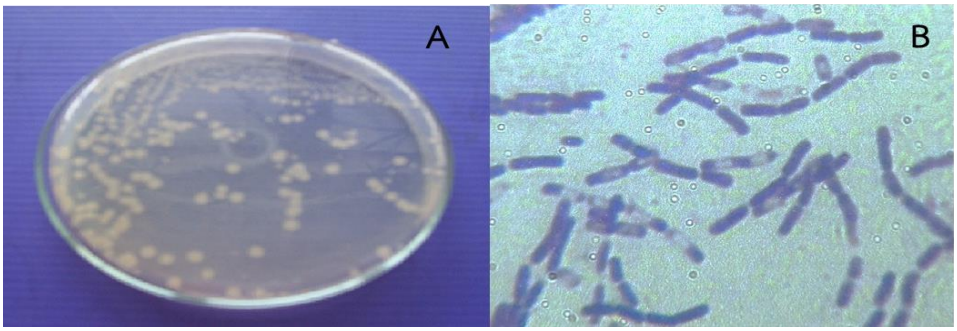


ภาพที่ 2 ร้อยละของ BOD และ COD ที่ลดลงของน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน (A) และการเปรียบเทียบลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนก่อนการบำบัด (B) และ น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนหลังการบำบัด (C) ผ่านการเลี้ยงแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 บนเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus* sp. CBP3 ที่คัดแยกได้

	Characterization of bacteria	Result
Cultural characters	Colony morphology on nutrient agar (NA)	Creamy yellow, small, round and fast growing colonies
Microscopic characters	Gram staining	+
	Shape of the cell	Rod
	Motility	Non motile
Biochemical characters	Indole	-
	Methyl red	-
	Catalase	+
	Oxidase	+
	Starch hydrolysis	+

+, positive; -, negative



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus* sp. CBP3 ที่คัดแยกได้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) (A) และรูปร่างเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (B)

อภิปรายผลการวิจัย

จากการแยกจุลินทรีย์ทนร้อนในแหล่งท้องถิ่นต่าง ๆ จำนวน 18 ตัวอย่าง 5 แหล่ง ได้แก่ บริเวณโรงงานยางพารา จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ขี้เลื่อยบนพื้นดิน ขี้เลื่อยสูง 50 เซนติเมตรจากพื้นดิน ขี้เลื่อยสูง 2 เมตรจากพื้นดิน ยอดกองขี้เลื้อย น้ำในหม้ออบ น้ำทิ้งตามทางเดิน น้ำทิ้งหลังการอบน้ำยากันปลวก น้ำในท่อพักบำบัด ขี้เถ้าผสมดิน และขี้เถ้าไม้ยางพารา บริเวณโรงงานเผาถ่านจำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ด้านล่างของกองขี้เลื่อย ด้านข้างของกองขี้เลื่อย ด้านบนของกองขี้เลื่อย ขี้เถ้า และเศษถ่าน แกลบจำนวน 1 ตัวอย่าง มูลสัตว์จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ มูลวัว และมูลไก่ จากในสามจังหวัดชายแดนใต้ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียทนร้อนทั้งหมด 15 ไอโซเลต ได้แก่ RT1, RT2, RT3, RT4, RT5, RT6, RT7, RT8, RT9, RT10, RT11, RT12, CBP1, CBP2 และ CBP3 และไม่พบเชื้อราทนร้อนในทุกตัวอย่าง จากการศึกษาสามารถพบจุลินทรีย์ทนร้อนในแหล่งต่างๆ เช่น พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. 60 องศาเซลเซียส จากกองปุ๋ยหมักจากเปลือกมันสำปะหลัง (Adedire *et al*., 2013, p. 396), บ่อน้ำพุร้อน พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Geobacillus* sp. ที่สามารถเจริญได้ถึง 90 องศาเซลเซียส (Sharma *et al*., 2015, p. 1) ตลอดจนพบเชื้อราทนร้อนที่เจริญได้ ระหว่าง 26-48 องศาเซลเซียส เช่น *Aspergillus flavus, A. fumigatus* และ *Mycocladus corymbifer* (Sreelatha *et al*., 2013, p. 355; Langarica-Fuentes *et al*., 2014, p. 132) แต่เนื่องด้วยการศึกษาครั้งนี้เลี้ยงที่ 55±2 องศาเซลเซียส จึงอาจจะทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญได้

เมื่อทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเชิงคุณภาพของแบคทีเรียทนร้อนทั้งหมด 15 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ โดยวิธี Point inoculum ในอาหาร Starch agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วราดสารสะลายไอโอดีนลงบนโคโลนี พบว่ามี 6 ไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ RF1, RF2, RF4, RF7, RF11 และ CBP3 โดยมีบริเวณวงใสรอบโคโลนีมากที่สุด คือ 1.20±0.18 เซนติเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Sharma *et al*. (2015, p. 2) เกิดวงใสรอบโคโลนีเท่ากับ 2.1-2.4 เซนติเมตร ที่เกิดจากแบคทีเรีย *Geobacillus* sp. ในอาหารที่มีแป้ง

เมื่อเลี้ยงที่ 90 องศาเซลเซียส และนำแบคทีเรียทนร้อนทั้งหมด 6 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ โดยทำการเลี้ยงใน Starch broth บนเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ แล้วนำส่วนใสหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเชิงปริมาณ โดยวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ พบว่าแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ CBP3 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 93.5±0.67 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 80.54 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของโปรตีน และเลือกแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงที่สุด เมื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Adedire *et al*. (2013, p. 396) ที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ที่ 55 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 92.4±0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมากกว่าที่รายงานของ Adedire *et al*. (2013, p. 396) ที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* HULUB1 และ *B. subtilis* SUNGB2 ที่ 55 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีค่าเท่ากับ 17.94 และ 20.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นนำแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ในอาหาร Starch broth บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 94.5±0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 81.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของโปรตีน และได้เลือกระยะเวลาการเลี้ยงแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ CBP3 ที่ 48 ชั่วโมง มาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนต่อไป

ลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน อำเภอเมือง จังหวัดยะลา เบื้องต้นพบว่า น้ำทิ้งมีสีขาวขุ่น เมื่อนำมาวัดค่า pH ได้เท่ากับ 4.3, บีโอดีมีค่าเท่ากับ 3,684 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโอดีเท่ากับ 4,325 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย pH ของน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนที่ศึกษามีค่าเท่ากับกับค่าที่รายงานผ่านมาเท่ากับ 4.3 (Jijai & Siripatana, 2016, p. 26) แต่สูงกว่ากับค่าที่รายงานผ่านมาเท่ากับ 3.58 (Pratum, 2017, p. 327) ตลอดจนต่ำกว่ากับค่าที่รายงานผ่านมาเท่ากับ 6.28-6.75 (Yeesang, *et al*., 2015, p. 13) ส่วนค่าซีโอดีมีค่าใกล้เคียงกับที่ศึกษาก่อนหน้านี้ เท่ากับ 4,200-4,278 มิลลิกรัมต่อลิตร (Jijai & Siripatana, 2016, p. 26; Pratum, 2017, p. 327) แต่ต่ำกว่ากับค่าที่รายงานผ่านมาเท่ากับ 17,000-17,600 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yeesang, *et al*., 2015, p. 13) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน จะมีความแตกต่างกัน เนื่องจากการสุ่มเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งมีความแตกต่างของโรงงานขนมจีน และเทคนิคการประยุกต์ในกระบวนการในแต่ละแหล่งแตกต่างกัน จึงทำให้ได้ลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนเกิดความแตกต่างกัน เมื่อนำแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูง มาศึกษาการประยุกต์ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน โดยเชื้อดังกล่าวเลี้ยงในอาหาร Starch broth ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ค่า pH บีโอดีและซีโอดี พบว่า แบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 มีค่า pH เท่ากับ 5.88 และมีประสิทธิภาพสามารถลดค่าบีโอดีและซีโอดีเท่ากับ 1,522 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโอดีเท่ากับ 2,431 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละที่ลดลงเท่ากับ 41.32±0.64 และ 56.23±0.54 ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับรายงานของ Pratum (2014, p. 100) ทำการเลี้ยง *B. subtilis* KJP8 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 56.23±0.00 และลดซีโอดีได้ดีที่สุดร้อยละ 67±0.02 ที่ 120 ชั่วโมง

เมื่อนำแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ที่คัดแยกได้ มาศึกษาจัดจำแนกกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพื้นฐาน ได้แก่ รูปร่างของจุลินทรีย์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ และทดสอบทางชีวเคมีบางประการ พบว่าแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ที่คัดแยกได้ เป็นแบคทีเรียทนร้อนในสกุลของ *Bacillus* sp.

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนของแบคทีเรียทนร้อนในสกุลของ *Bacillus* sp. CBP3 พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทนร้อนดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (28±2) องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพสามารถลดค่าบีโอดีและซีโอดี ร้อยละ 41.32±0.64 (1,522 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ 56.23±0.54 (2,431 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามลำดับ เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียทนร้อนมีความสามารถใช้สารอินทรีย์จำพวกแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญโดยการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ จึงทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ให้ลดลง ตลอดจนเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus สามารถผลิตสาร Compatible solutes ซึ่งเป็นสารช่วยปรับสมดุลของสารละลายภายนอกเซลล์กับภายในเซลล์ ทำให้สามารถเจริญได้ในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน แต่เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มแลคติกแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลัส ยีสต์ และรา ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน (Pratum, 2014, p. 94)

ดังนั้นจากการคัดแยกจุลินทรีย์ทนร้อนในแหล่งท้องถิ่นต่าง ๆ จำนวน 18 ตัวอย่าง 5 แหล่ง พบแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus* sp. CBP3 ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงและสามารถนำมาประยุกต์ใช้การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบได้ จึงเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำทิ้งต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆในท้องถิ่นสามจังหวัดชายแดนใต้จำนวน 18 ตัวอย่าง 5 แหล่ง ได้แก่ บริเวณโรงงานยางพาราจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ขี้เลื่อยบนพื้นดิน ขี้เลื่อยสูง 50 เซนติเมตรจากพื้นดิน ขี้เลื่อยสูง 2 เมตรจากพื้นดิน ยอดกองขี้เลื่อย น้ำในหม้ออบ น้ำทิ้งตามทางเดิน น้ำทิ้งหลังการอบน้ำยากันปลวก น้ำในท่อพักบำบัด ขี้เถ้าผสมดิน และขี้เถ้าไม้ยางพารา, บริเวณโรงงานเผาถ่านจำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ด้านล่างของกองขี้เลื่อย ด้านข้างของกองขี้เลื่อย ด้านบนของกองขี้เลื่อย ขี้เถ้า และเศษถ่าน แกลบจำนวน 1 ตัวอย่าง มูลสัตว์จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ มูลวัว และมูลไก่ ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อน ที่อุณหภูมิ 55±2 องศาเซลเซียส และสังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น พบแบคทีเรียทนร้อนทั้งหมด 15 ไอโซเลต ได้แก่ RT1, RT2, RT3, RT4, RT5, RT6, RT7, RT8, RT9, RT10, RT11, RT12, CBP1, CBP2 และ CBP3 และไม่พบเชื้อราทนร้อนในทุกตัวอย่าง ศึกษาการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ พบว่ามี 6 ไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตอะไมเลส ได้แก่ RF1, RF2, RF4, RF7, RF11 และ CBP3 โดยไอโซเลต CBP3 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเชิงปริมาณสูงสุดเท่ากับ 93.5±0.67 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นำแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าที่ 48 ชั่วโมงมีเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด มีค่าเท่ากับ 94.5±0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน พบว่า แบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ CBP3 มีประสิทธิภาพสามารถลดค่าบีโอดีและซีโอดีได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละบีโอดีและซีโอดีที่ลดลงเท่ากับ 41.32±0.64 และ 56.23±0.54 ตามลำดับ และพบว่าแบคทีเรียทนร้อนไอโซเลต CBP3 ที่คัดเลือกได้ เป็นแบคทีเรียทนร้อนในสกุลของ *Bacillus* sp. ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตเลือกอะไมเลสได้ โดย *Bacillus* sp CBP3 สามารถนำมาประยุกต์ใช้การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนได้ต่อไป

งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาขั้นต้นในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบโดยใช้แบคทีเรียทนร้อน จำเป็นต้องมีการศึกษาในรายละเอียดของแต่ละไอโซเลตที่คัดเลือกได้ต่อไปในด้านต่าง ๆ เช่น การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญแบคทีเรียทนร้อนต่อการผลิตเอนไซม์ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ตลอดจนศึกษาการจำแนกระดับ species ของ *Bacillus* ที่แยกได้ เพื่อให้แบคทีเรียทนร้อนดังกล่าวเจริญได้ดีที่สุดและผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงที่สุด ย่อยสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำทิ้งสูงสุด ส่งผลให้มีประสิทธิการบำบัดน้ำทิ้งที่ดีและนำไปใช้จริงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Adedire, O., Ogundipe, W. & Farinu, A. (2013). Studies on crude thermostable amylase produced by *Bacillus* spp. isolated from Starch Waste. *International Journal of Science and Research*. *2*(4), 396-400.

Ahirwar S., Soni, H., Prajapati, B.P. & Kango, N. (2017). Isolation and screening of thermophilic and thermotolerant fungi for production of hemicellulases from heated environments. *Mycology*. *8*(3), 125-134.

Annamalai N., Thavasi R., Vijayalakshmi S. & Balasubramanian T. (2011). Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant a-Amylase from *Bacillus cereus*. *Indian Journal of Microbiology*. *51*(4), 424–429.

APHA, AWWA & WEF. (2017). *Standard Method for the Examination of Water and Wastewater* (23rd) ed. N. Y. : American Public Health Association.

Ashwini K., Gaurav K., Karthik L., & Bhaskara Rao K.V. (2011). Optimization, production and partial purification of extracellular **α**-amylase from *Bacillus sp. marini. Archives of Applied Science Research*. *3*(1), 33-42.

Langarica-Fuentes, A., Handley, P.S., Houliden, A.G.F. & Robson, G.D. (2014). An investigation of the biodiversity of thermophilic and thermotolerant fungal species in composts using culture-based and molecular techniques. *Fungal Ecology,* 11, 132-144.

Jijai, S. *&* Siripatana, *C. (*2016*).* Biogas production by co-digestion of chicken manure with Thai rice noodle wastewater. *Present to Yala Rajabhat University.* (in Thai)

Lowry, O.H., Rossebrougggh, N.J., Farr,A.L.and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-276.

Mienda, B.S. & Shamsir, M.S. (2013). Thermotolerant microorganisms in consolidated bioprocessing for ethanol production: A review. *Research in Biotechnology*, *4*(4), 01-06.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31,426–429

Msarah, M.J., Ibrahim, I., Hamid, A.A. & Aqma, W. S. (2020). Optimization and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste biodegradation. *Heliyon*, *6*, 1-8.

Naveena, V. & Joy, P. P. (2014). *Microbiology Laboratory Manual*. Kerala : Pineapple Research Station (Kerala Agricultural University)

Paul, D.V., George, M.G,, Dorothy, J., Noel, R.K., Wolfgang, L., Fred, A.R., Karl-Heinz, S. & William, B.W. (2009).*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed). USA: Springer Science+Business Media.

Pratum, C. *(*2014). *Treatment of Traditional Thai-Fermented Rice Noodle (Khanomjeen) plant Wastewater by Effective Microorganism Together with Natural Treatment*. Ph.D thesis, Environmental Science, Kasetsart University. (in Thai)

Pratum, C. *(*2017). Influence of high organic substances concentrations in fermented rice noodle (Khanomjeen) factory wastewater on efficiency wastewater treatment of *Vetiveria Zizanioides* Nash. and *Cyperus Corymbosus* Rottb. Journal of Science and Technology Mahasarakham University, *36*(3). (in Thai)

Prasertsan, P. & Binmaeil, H. (2018). Treatment of palm oil mill effluent by thermotolerant polymer-producing fungi. *Journal of Water and Environment Technology, 16*(3), 127–137.

Sani, R.K & Krishnaraj, R.N. (2017). *Extremophilic enzymatic processing of lignocellulosic feedstocks to bioenergy: Recent advances in extremophilic* α*-amylases.* Rapid City, South Dakota, USA. Springer International Publishing AG 2017.

Sreelatha, B., Priya, A.S & Girisham, S. (2013). Incidence of thermophilic fungi in different dung samples of warangal district of AP. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, *3*(2), 355-359.

Sharma, P., Gupta, S., Sourirajan, A. & Dev, K. (2015). *Characterization of extracellular thermophilic amylase from* Geobacillus *sp. isolated from Tattapani hot spring of Himachal Pradesh, India*. *Current Biotechnology*, *4*(2),1-8.

Yeesang, J. Yemsuan S., & Kaewpuk, W. *(*2015). The utilization of wastewater from fermented rice noodle factories in Prong MaDua Community, Amphoe Mueang, Nakhon Patthom for *Spirulina* sp. *Area Based Development Research Journa*l, *7*(4). (in Thai)