การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสีย

นางสาวจันทร์ทิพย์ ทรงฤทธิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

CONSTRUCTION OF MICROBIAL CONSORTIUM FOR WASTEWATER TREATMENT

Miss Chantip Songrit

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Science
(Interdisciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสีย
โดย	นางสาวจันทร์ทิพย์ ทรงฤทธิ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชัยพร ภู่ประเสริฐ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนทรี ขุนทอง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จันทร์ทิพย์ ทรงฤทธิ์ : การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสีย. (CONSTRUCTION OF MICROBIAL CONSORTIUM FOR WASTEWATER TREATMENT) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ , 100 หน้า.

คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ทางการค้า ได้จุลินทรีย์ 10 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้ดี คือ *Pseudomonas* sp. 2 ไอโซเลท, *Bacillus* sp. 4 ไอโซเลท, *Lysinibacillus* sp. 2 ไอโซเลท, *Brevibacillus* sp. 1 ไอโซเลท และ *Escherichia coli* 1 ไอโซเลท นำมาทำเป็นหัวเชื้อใส่ลงในถังปฏิกรณ์บำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ (SBR) พบว่าสามารถลดค่าซีโอดีได้เพิ่มขึ้นจาก 78.72 เป็น 96.65 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ประสิทธิภาพการลดค่าซีโอดีของระบบบำบัดน้ำเสียเพิ่มขึ้น 17.93 เปอร์เซ็นต์และระบบเข้าสู่สภาวะเสถียรในรอบที่ 30 เร็วขึ้นจากเดิมที่เสถียรในรอบที่ 37 ดังนั้นกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงในถังปฏิกรณ์มีประสิทธิภาพช่วยในการลดค่าซีโอดีได้เร็วขึ้น กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์หลักที่ภาวะเสถียรพบว่า ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Brevibacillus choshinensis*, *Escherichia coli, Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium* sp., และ *Bacillus megaterim* พบว่ามีเชื้อชนิดที่เติมลงไป 5 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis, Bacillus cereus* และ *Brevibacillus choshinensis* แสดงว่ากลุ่มเชื้อที่เติมลงไปสามารถช่วยลดค่าซีโอดี และโตเร็วพอที่จะคงอยู่ในระบบจนถึงภาวะเสถียรได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

5387117920 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE
KEYWORDS: COD / BACTERIA / WASTEWATER TREATMENT / SBR

CHANTIP SONGRIT: CONSTRUCTION OF MICROBIAL CONSORTIUM FOR WASTEWATER TREATMENT. ADVISOR: ASST. PROF.CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., 100 pp.

Ten high efficiency in COD removal bacteria were isolated from natural and commercial product samples. They were identified as 2 isolates of *Pseudomonas* sp., 1 isolate of *Escherichia coli*, 2 isolates of *Lysinibacillus* sp., 1 isolate of *Brevibacillus* sp. and 4 isolates of *Bacillus* sp. Mixing the 10 isolates into the inoculum for wastewater treatment in SBR system resulted in increasing COD removal efficiency from 78.72 to 96.65 %, 17.93% better. The system steady state was achieved faster at the 30^{th} cycle instead of the 37^{th} cycle. At the steady state, the major bacteria were identified as *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Brevibacillus choshinensis*, *Escherichia coli, Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium* sp., and *Bacillus megaterium.* Five of them, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis, Bacillus cereus and Brevibacillus choshinensis,* were the same as in the inoculum. This evidence clues the enhancement efficiency of the bacteria and their sustainability in the SBR system.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study: Environmental Science Student's Signature .....

Academic Year: 2013 Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความช่วยเหลือของบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณทุก ๆ ท่านไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านกรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่าง ๆ ดูแลแก้ไขปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้น จนกระทั้งวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอบกราบขอบพระคุณ รองศาตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยพร ภู่ประเสริฐ และผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. สุนทรี ขุนทอง ที่ได้สละเวลาอันมีค่า เพื่อเป็นกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และให้ขอแนะนำเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ที่มอบทุนอุดหนุนในการศึกษาวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม และขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือตลอดการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่น้อง และญาติ ๆ ทุกคนที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้ จนสำเร็จการศึกษาไปได้ด้วยดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญรูป ..... ญ

สารบัญตาราง ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขตการศึกษา 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 น้ำเสีย 3

2.2 สารอินทรีย์ในน้ำเสีย 4

2.3 ความต้องการออกซิเจนในกระบวนการกำจัดมลพิษของน้ำเสีย 5

2.4 การวิเคราะห์สารอินทรีย์ในน้ำ 6

2.5 จุลินทรีย์ 6

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ 11

2.7 ระยะการเติบโตของแบคทีเรีย 13

2.8 การบำบัดน้ำเสีย (Wastewater treatment) 14

2.9 ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ 16

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย 23

อุปกรณ์ 23

เคมีภัณฑ์ 24

วิธีดำเนินงานวิจัย 24

3.1 คัดแยกจุลินทรีย์จากธรรมชาติและน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆ 24

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย 25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

3.3 ค่าการควบคุมระบบเอสบีอาร์ 26
3.4 สร้างกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย 27
3.5 จำแนกประชากรจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากถังปฏิกรณ์ที่เติมกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ 28
3.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 28
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล 29
4.1 คัดแยกจุลินทรีย์จากธรรมชาติและน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆ 29
4.2 ประสิทธิภาพการลดซีโอดีน้ำเสียสังเคราะห์ของแบคทีเรีย 43
4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลุ่มจุลินทรีย์ 47
4.4 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบ sequencing batch reactor (SBR) 48
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 54
5.1 สรุปผลการทดลอง 54
5.2 ข้อเสนอแนะ 55
รายการอ้างอิง 56
ภาคผนวก 59
ภาคผนวก ก 60
ภาคผนวก ข 62
ภาคผนวก ค 63
ภาคผนวก ง 69
ภาคผนวก จ 72
ภาคผนวก ฉ 80
ภาคผนวก ช 90
ภาคผนวก ซ 96
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 100

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ (a) activated floc และ (b) biofilm on solid surface 8
รูปที่ 2.2 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เมื่อเวลาผ่านไป (Growth curve)..... 14
รูปที่ 2.3 แผนผังการทำงานของระบบเอสบีอาร์..... 20
รูปที่ 3.1 ถังปฏิกรณ์บำบัดน้ำเสีย..... 27
รูปที่ 4.1 การเขย่าแบบตั้งหลอดทดลอง..... 43
รูปที่ 4.2 การเขย่าแบบเอียงหลอดทดลอง 44
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงค่าพารามิเตอร์ในถังปฏิกรณ์ที่เติมกากตะกอนน้ำเสียและถังปฏิกรณ์ทีเติมกาก
ตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรี+หัวเชื้อจุลินทรีย์..... 49
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่าซีโอดีน้ำออกของถังปฏิกรณ์ที่เติมกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรี..... 49
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่าซีโอดีน้ำที่ออกจากถังปฏิกรณ์ที่เติมกลุ่มหัวเชื้อกับกากตะกอนน้ำเสีย..... 50
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงค่าประสิทธิภาพการบำบัดค่าซีโอดีคงเหลือไม่เติมและหลังการเติมหัว
เชื้อจุลินทรีย์..... 51

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 กลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ในหัวเชื้อ 10
ตารางที่ 3.1 ค่าพารามิเตอร์ในการเดินระบบบำบัดน้ำเสียแบบ SBR 26
ตารางที่ 3. 2 ขั้นตอนการเดินระบบบำบัดน้ำสียแบบ SBR 26
ตารางที่ 4. 1 ลักษณะตัวอย่างกากตะกอนน้ำเสียและน้ำหมักชีวภาพชนิดต่าง ๆ และจำนวนชนิดจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 30
ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ 33
ตารางที่ 4.3 ค่าซีโอดีน้ำออกของจุลินทรีย์แต่ละตัวที่คัดแยกได้ 45
ตารางที่ 4.4 จีนัส และสปีชีส์ของจุลินทรีย์ที่จำแนกได้ 47
ตารางที่ 4.5 จีนัส และสปีชีส์ของจุลินทรีย์ที่จำแนกได้ในถังปฏิกรณ์ที่เติมกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงไปกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรี 53
ตารางที่ 4.6 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ และชนิดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ 53

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญในด้านการเกษตร การประมง และอุตสาหกรรม ปัจจุบันพบว่ามีการปล่อยน้ำเสียจากแหล่งต่าง ๆ ลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ทำให้แหล่งน้ำธรรมชาติถูกปนเปื้อนจากของเสีย เช่น เชื้อโรคสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ต่าง ๆ ทำให้แหล่งน้ำเกิดการเสื่อมโทรม (สุรอรรถ ศุภจัตุรัส, 2545)

เดิมธรรมชาติจะทำให้น้ำกลับมาสะอาดได้เอง แต่เมื่อน้ำเสียมีปริมาณมากและความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากชุมชนใหญ่ขึ้นจนถึงจุดที่ธรรมชาติไม่สามารถทำให้น้ำกลับมาสะอาดได้ทัน ดังนั้นจึงต้องมีการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีต่างๆ ก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2543) วิธีการบำบัดน้ำเสียสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 วิธี คือการบำบัดทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ซึ่งการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีการนี้เป็นการใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติใช้สารอินทรีย์หรือสิ่งสกปรกที่เจือปนในน้ำเสียเป็นอาหาร สารอินทรีย์ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ จะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน และถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และเซลล์ใหม่ ทำให้น้ำเสียมีความสกปรกลดลงจนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานตามกฎหมายที่ยอมให้ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ (Emad, 2011; สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548)

แบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปพัฒนาจากจุลินทรีย์ที่ได้จากบ่อเกรอะซึ่งมีจุลินทรีย์หลากหลาย ทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดในระยะแรกไม่ค่อยเสถียรจนกว่าจะเดินระบบไปนานๆ ให้มีการคัดแยกจุลินทรีย์ตามธรรมชาติจนชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์คงที่ ทำให้ใช้เวลาในการเริ่มต้นระบบนานเกินไป การศึกษาครั้งนี้เป็นการหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงและสามารถปรับตัวในน้ำเสียได้เร็วมาเป็นเชื้อตั้งต้น เพื่อให้ระบบบำบัดน้ำเสียเสถียรเร็วขึ้น และทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์

สร้างกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย และทำให้ระบบบำบัดน้ำเสียเสถียรเร็วขึ้น

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1. คัดเลือกจุลินทรีย์ชนิดที่ใช้อากาศหายใจ (aerobic) จากธรรมชาติ และผลิตภัณฑ์ทางการค้า

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

3. การลดค่าซีโอดีในระบบบำบัดน้ำเสียแบบ sequencing batch reactor (SBR)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เชื้อกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียและทำให้ระบบเสถียรเร็วขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำเสีย

น้ำเสีย หมายถึงน้ำที่ผ่านการใช้ประโยชน์ในกิจกรรมต่างๆ แล้ว ตัวอย่างเช่น การใช้ชีวิตประจำวันของประชากร เช่น ใช้ในการอุปโภคและบริโภค การประกอบอาหาร การชำระล้างร่างกาย ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การล้างวัตถุดิบ วัสดุอุปกรณ์ การหล่อเย็น ซึ่งทำให้น้ำดังกล่าวมีลักษณะสมบัติต่างไปจากเดิม เนื่องจากการปนเปื้อนของสิ่งสกปรก สิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจะขึ้นอยู่กับกิจกรรมที่ใช้ประโยชน์จากน้ำนั้น นอกจากนี้แล้วสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจะเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำเสียมีลักษณะสมบัติแตกต่างกันออกไป (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2552)

น้ำเสียชุมชน คือ น้ำที่ผ่านการใช้ประโยชน์ในกิจกรรมต่างๆ ของชุมชน ปกติจะระบายน้ำทิ้งผ่านท่อระบายน้ำ ไปยังแหล่งรองรับน้ำเสีย เพื่อการบำบัดให้สะอาดขึ้นก่อนทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ หากไม่มีการบำบัดจะทำให้แหล่งรับน้ำเน่าเสียในที่สุด การฟื้นฟูคุณภาพน้ำในแหล่งรับน้ำจะต้องใช้งบประมาณสูงมาก กลุ่มกิจกรรมที่ก่อให้เกิดน้ำเสียชุมชน ได้แก่

บ้านพักอาศัย น้ำเสียจากบ้านพักอาศัยเกิดจากเศษอาหารจากการล้างจานและภาชนะหรือจากการปรุงอาหาร รวมถึงสารต่างๆ ที่เกิดจากการทำความสะอาดเสื้อผ้า สิ่งของต่างๆภายในบ้านและการอาบน้ำ ซึ่งบ้านพักอาศัยส่วนใหญ่จะมีอัตราการระบายน้ำเสียประมาณ 150-216 ลิตร/คน/วัน หรือประมาณ 180 ลิตร/คน/วัน

ภัตตาคารมีน้ำเสียเกิดจากห้องครัวและห้องส้วม โดยเฉพาะค่าน้ำมันและไขมันจะมีปริมาณสูงในน้ำเสียจากห้องอาหารหรือภัตตาคาร อันเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดการอุดตันในท่อระบายน้ำเสีย

โรงแรมมีน้ำเสียจากห้องน้ำและห้องส้วมจากห้องพัก และห้องครัวหรือภัตตาคารภายในโรงแรม อาคารสำนักงาน มีน้ำเสียจากห้องน้ำห้องส้วม

กิจกรรมอื่นๆ เช่น สถานบริการอาคารพาณิชย์ โรงเรียน อาคารชุด ตลาด สถานบริการจำหน่ายน้ำมัน เป็นต้น (กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม และสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2545)

2.2 สารอินทรีย์ในน้ำเสีย

สารอินทรีย์เป็นสารประกอบ ที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นหลัก ในบางประเภทอาจมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบด้วย นอกจากนี้อาจมีกำมะถัน ฟอสฟอรัส และโลหะบางชนิดเช่นเหล็กรวมอยู่ด้วย น้ำเสียที่มีความสกปรกปานกลาง ของแข็งแขวนลอยจัดเป็นสารอินทรีย์ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของแข็งละลายน้ำเป็นสารอินทรีย์ 100 เปอร์เซ็นต์ การย่อยสลายของสารอินทรีย์นั้นต้องอาศัยออกซิเจน ดังนั้นหากมีสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่ระบายลงสู่แหล่งรองรับน้ำทิ้งตามธรรมชาติมากจะทำให้ออกซิเจนในลำน้ำถูกใช้หมดไป ทำให้สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในน้ำตาย ในสภาวะที่ลำน้ำขาดออกซิเจนสารอินทรีย์ที่เหลือยังคงถูกย่อยสลายต่อไปในแบบไม่ใช้ออกซิเจนทำให้เกิดมีเทนและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งทำให้น้ำมีสีดำและมีกลิ่นเหม็น ที่เรียกกันว่าน้ำเน่า ดังนั้นการกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียก่อนระบายลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างมาก

สารอินทรีย์ในน้ำเสียอาจแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. โปรตีน น้ำเสียมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบหลักของโปรตีน ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน ซึ่งอาจเรียกได้ว่าเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน นอกจากนี้อาจมีแร่ธาตุพวก กำมะถัน ฟอสฟอรัส และเหล็กประกอบอยู่ด้วยเล็กน้อย เมื่อโปรตีนถูกย่อยเล็กลงจะเป็นหน่วยย่อยคือกรดอะมิโน

2. คาร์โบไฮเดรตในน้ำเสียมีอยู่ประมาณ 25-50 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบหลักของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส แป้งไม่ละลายน้ำแป้งจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์หรือกรดแร่ น้ำตาลละลายน้ำจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ของแบคทีเรียและยีสต์ได้เป็นแอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์แต่เซลลูโลสในน้ำเสียจะย่อยสลายโดยแบคทีเรียได้ยาก แต่ถ้าอยู่ในดินจะถูกย่อยสลายโดยเชื้อรา

3. ไขมันเป็นสารประกอบเอสเตอร์ของแอลกอฮอล์ หรือกลีเซอรอลกับกรดไขมัน องค์ประกอบหลัก คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเล็กน้อย ในน้ำเสียมีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียส่วนใหญ่ย่อยไขมันไม่ได้ ทำให้ไขมันอุดตันของท่อระบายน้ำเป็นปัญหาต่อระบบบำบัดน้ำเสีย คราบไขมันที่ลอยบนผิวน้ำ จะเป็นตัวกั้นไม่ให้ออกซิเจนละลายน้ำเป็นผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ

นอกจากสารอินทรีย์ทั้ง 3 ประเภทดังกล่าวแล้ว ยังมีสารอินทรีย์บางประเภทที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งนับวันจะปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำมากขึ้น เช่น ผงซักฟอก สารฟีนอล ยาฆ่าแมลงที่ใช้ในการเกษตร เป็นต้น ทำให้มีความสำคัญต่อคุณภาพน้ำในธรรมชาติด้วย

2.3 ความต้องการออกซิเจนในกระบวนการกำจัดมลพิษของน้ำเสีย

น้ำเสียที่ระบายทิ้งลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติประกอบไปด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่แบคทีเรีย Heterotrophic bacteria บางชนิดสามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการใช้ออกซิเจน การใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารปนเปื้อนแบ่งเป็น 3 แบบ ดังนี้

การใช้ออกซิเจนย่อยสลายสารอินทรีย์คาร์บอน (Carbonaceous oxygen demand) คือปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการย่อยสลายคาร์บอนของสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของคาร์โบร์ไฮเดรต โปรตีน และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ จนได้เป็น CO_2และ H_2O ตัวอย่างการย่อยสลายของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน เช่น การย่อยสลายของน้ำตาลกลูโคสและไกลซีน ดังแสดงในสมการ (1) และ (2)

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O \quad (1)$$

$$2CH_2(NH)COOH + 3O_2 \longrightarrow 2NH_3 + 4CO_2 + 2H_2O \quad (2)$$

การใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจน (Nitrogenous oxygen demand) คือ ออกซิเจนที่ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งเกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน ยูเรียหรือแอมโมเนียซึ่งละลายอยู่ในน้ำเสียหรือน้ำธรรมชาติ และสารประกอบไนไตรท์ (NO_2^-) ให้เป็นไนเตรท (NO_3^-) ดังแสดงในสมการที่ (3) แบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนมีส่วนในปฏิกิริยาบางช่วง ดังแสดงในสมการที่ (4) และ (5)

$$Org\text{-}N + O_2 \xrightarrow{NH_3} Org + O_2 \longrightarrow NO_2^- - Org + O_2 \longrightarrow NO_3^- Org \quad (3)$$

$$NH_3 + 3O_2 \xrightarrow[\text{nitrite - forming bacteria}]{} 2NO_2 + 2H_2O \quad (4)$$

$$HNO_2 + O_2 \xrightarrow[\text{nitrate - forming bacteria}]{} 2HNO_3 \quad (5)$$

การใช้ออกซิเจนย่อยสลายในสารเคมีและสารรีดิวซ์บางชนิด (some chemicals and reducing agents) สารเคมีบางชนิดที่ปนเปื้อนในลำน้ำ สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในน้ำ ทำให้ออกซิเจนในน้ำลดลงได้ เช่น เหล็กเฟอรัส (Fe^{+2}), ซัลไฟท์ (SO^{-2}) และซัลไฟด์ (S^-) เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4 การวิเคราะห์สารอินทรีย์ในน้ำ

น้ำทิ้งที่ระบายลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติมีสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนหลายชนิด การที่จะวิเคราะห์สารอินทรีย์แต่ละชนิดจะไม่สะดวกจึงวิเคราะห์ในปริมาณรวม ค่าที่นิยมใช้บอกปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำที่แพร่หลายอยู่ในปัจจุบัน คือ ค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand) และซีโอดี (Chemical Oxygen Demand)

1. บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand) เป็นการวัดปริมาณออกซิเจนที่จุลชีพใช้ในกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์ในน้ำในสภาพที่มีออกซิเจน วิธีนี้ใช้เวลาบ่มนานประมาณ 5 วัน

2. ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand) คือ ปริมาณออกซิเจนในสารเคมีออกซิไดซ์ (Chemical oxidizing agent) ที่ใช้ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ ในสภาวะที่เป็นกรด วิธีนี้ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

ค่าบีโอดีและซีโอดีมีความสัมพันธ์กัน มีค่าที่เป็นสัดส่วนกันดังนี้ สัดส่วน BOD/COD ของน้ำเสียจากหมู่บ้านจัดสรรในเขตกรุงเทพมหานคร พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.42 (วัฒนา และอุทัย, 2541) และน้ำเสียจากบ้านเรือนมีค่าของ BOD/COD อยู่ในช่วงระหวาง 0.40 ถึง 0.80 โดยค่าซีโอดีจะสูงกวากว่าคาบีโอดี (ทวี สิทธิลู่ตระกูล, 2549)

ค่าออกซิเจนที่ใช้ไปไม่ว่าจะอยู่ในรูปของบีโอดีหรือซีโอดี หากมีค่าสูงแสดงว่ามีสารอินทรีย์หรือสารที่ถูกออกซิไดซ์ได้ในน้ำสูง เป็นการบ่งชี้ว่าน้ำนั้นสกปรกมาก

2.5 จุลินทรีย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุลินทรีย์มีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพไม่ว่าจะเป็นน้ำเสียชุมชนหรือน้ำเสียอุตสาหกรรม โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม Heterotrophic bacteria หลักการสำคัญคือแบคทีเรียจะย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย เพื่อใช้สารอินทรีย์ในการสร้างเซลล์และเป็นแหล่งพลังงานในการดำรงชีวิตของแบคทีเรียนั้น ทำให้เหลือสารอินทรีย์ในน้ำน้อยลง น้ำจึงสะอาดขึ้น

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ในน้ำเสียมี 2 ชนิด คือ แบบที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic) และแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic)

1.การย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจน

$$C\ H\ O\ N\ S\ (\text{สารอินทรีย์}) + H_2O + \text{แบคทีเรีย} \quad CO_2 + CH_4 \qquad (6)$$

2.การย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจนปฏิกิริยาจะแบ่งเป็นสองส่วนดังนี้

- ย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียเพื่อสร้างพลังงาน

$$C\ H\ O\ N\ S\ (\text{สารอินทรีย์}) + O_2 + \text{แบคทีเรีย} \longrightarrow CO_2 + H_2O + NH_3 + \text{Energy} \qquad (7)$$

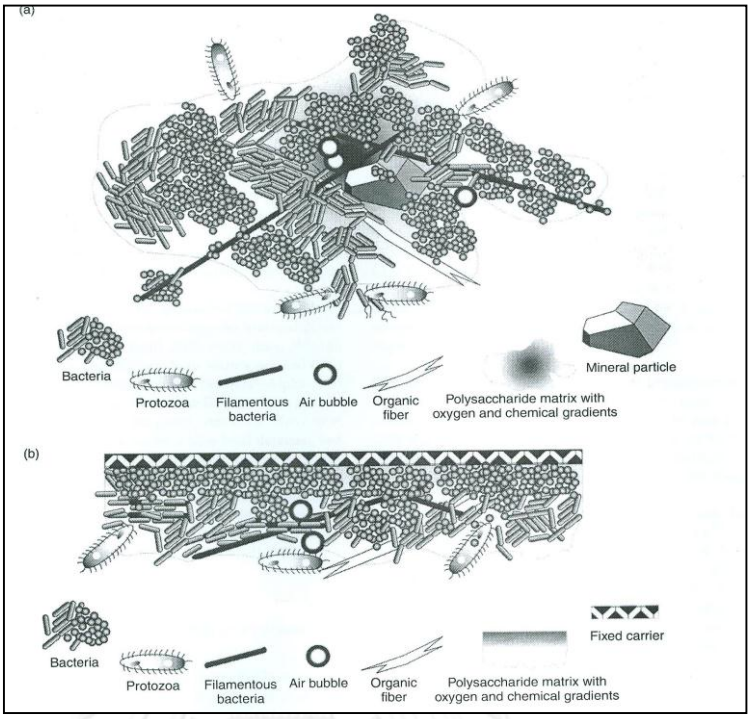
- ใช้พลังงานที่ได้ไปสร้างเซลล์ใหม่

$$C\ H\ O\ N\ S + O_2 + \text{แบคทีเรีย} + \text{Energy} \longrightarrow C_5H_7O_2N\ (\text{New bacteria}) \qquad (8)$$

ดังนั้นออกซิเจนจะต้องมีมากพอสำหรับปฏิกิริยาทั้งสองส่วน จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนจึงจะสามารถเจริญเติบโตได้ดี

กลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นตัวหลักสำคัญในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย กลุ่มจุลินทรีย์จะอยู่รวมกันเป็นฟล็อกหรือไบโอฟิล์ม ดังรูปที่ 2.1(a) และ 2.1(b) จุลินทรีย์เหล่านี้มาจากธรรมชาติคือ ดิน อากาศ และน้ำเสียที่เข้าสู่ระบบบำบัด จุลินทรีย์ที่สามารถทนและปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมในระบบบำบัดได้จะเจริญเติบโตได้ดี และใช้โมเลกุลสารอินทรีย์ที่สะสมอยู่ในระหว่างสถานะก๊าซ/ ของเหลว หรือของเหลว/ ของแข็งเป็นอาหาร ทำให้เกิดกลุ่มจุลินทรีย์เป็นฟล็อค ที่ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันไป (Pell, และ Worman, 2008) เช่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ (a) activated floc และ (b) biofilm on solid surface

แบคทีเรีย (Bacteria) คือ จุลินทรีย์ที่เป็นเซลล์เดียว มีขนาดเล็กไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีผนังหุ้มเซลล์ 2 ชั้น ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ส่วนใหญ่ไม่มีคลอโรฟิลล์ พบอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ร่างกายของคนและสัตว์ มีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น รูปแท่ง รูปทรงกลม รูปขดเป็นวง การดำรงชีพของแบคทีเรียต้องใช้พลังงานและสารประกอบต่างๆ ทั้งในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ธาตุที่สำคัญในสารประกอบคือ คาร์บอน โดยแบคทีเรียสามารถแบ่งตามแหล่งคาร์บอนที่ได้มาเป็น 2 ประเภท คือ

ออโทโทรฟิกแบคทีเรีย (Autotrophic Bacteria หรือ Autotroph) เป็นแบคทีเรียที่สร้างอาหารเองได้ โดยได้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ และได้พลังงานจากแสงอาทิตย์ หรือการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์

เฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย (Heterotrophic Bacteria หรือ Heterotroph) เป็นแบคทีเรียที่ ต้องใช้คาร์บอนจากสารอินทรีย์ และได้พลังงานจากปฏิกิริยาชีวเคมี

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งแบคทีเรียตามลักษณะความต้องการออกซิเจนได้ 3 ประเภท คือ

1. แอโรบิกแบคทีเรีย (Aerobic Bacteria) คือ แบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจนอิสระในการหายใจ เพื่อการเจริญ

2. แอนแอโรบิก (Anaerobic Bacteria) คือ แบคทีเรียที่ไม่ใช่ออกซิเจนอิสระในการหายใจ โดยทั่วไปหากได้รับออกซิเจนอิสระก็จะเป็นพิษถึงตาย

3. แฟคัลเททีฟแบคทีเรีย (Facultative Bacteria) คือ แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพมี และไม่มีออกซิเจนอิสระ

รา (Fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่มีหลายเซลล์ ไม่มีคลอโรฟิลล์ ลักษณะทั่วไปมักเป็นเส้นใยยาว ๆ และมีนิวเคลียสหลายอัน ราสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าแบคทีเรียในสภาวะที่มีพีเอชต่ำหรือมีปริมาณไนโตรเจนน้อย สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์พวกคาร์โบไฮเดรตได้ดี และยังสามารถย่อยสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ดีกว่าแบคทีเรีย ราสืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ รามีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียบางระบบ เช่น ระบบโปรยกรอง

สาหร่าย (Algae) เป็นจุลินทรีย์ที่มีเซลล์เดียว มีนิวเคลียสเห็นได้ชัด มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย มีคลอโรฟิลล์และมีรงควัตถุซึ่งอาจใช้จำแนกชนิดได้ พบอยู่ตามบริเวณที่มีความชื้นสูง น้ำทิ้ง น้ำจืด และน้ำเค็ม สาหร่ายมีบทบาทในระบบบำบัดน้ำเสียบางระบบ เช่น ระบบบ่อผึ่ง

โปรโตซัว (Protozoa) เป็นจุลินทรีย์ที่มีเซลล์เดียว มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย บางชนิดอยู่เป็นกลุ่ม (Colony) เซลล์มักมีรูปร่างคงที่ มีนิวเคลียสเห็นได้ชัดเจน บทบาทของโปรโตซัวในระบบบำบัดน้ำเสียนั้นไม่ค่อยเด่นชัด ส่วนมากจะกินแบคทีเรียทั้งที่มีชีวิตและตายแล้ว

ไวรัส (Virus) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สุด ไม่มีลักษณะเป็นเซลล์ ดำรงชีวิตแบบปรสิต สามารถทำให้เกิดโรคแก่ คน สัตว์ และพืช บทบาทของไวรัสในระบบบำบัดน้ำเสียมีน้อย ไวรัสจะสามารถทำลายเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในน้ำเสีย (ตำราระบบบำบัดมลพิษน้ำ, 2545)

ข้อดีของการที่กลุ่มจุลินทรีย์รวมกันเป็นฟล็อกหรือไบโอฟิล์มคือการที่สามารถเลือกอยู่ตามส่วนของสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมกับตัวเอง เช่น ปริมาณออกซิเจน หรือความเข้มข้นของสารอินทรีย์ที่ได้รับจากน้ำเสียทำให้แต่ละบริเวณมีจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน มีการทำงานร่วมกันส่งผลให้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงแร่ธาตุของสารอินทรีย์สูงกว่าการอยู่เพียงชนิดเดียว (Pell และ Wörman, 2008)

การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย ได้มีการศึกษาและวิจัยมาพอสมควร เช่น มีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ เรียกว่า Effective Microorganism หรือ EM ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในสถานการณ์ต่างได้อย่างหลากหลาย เช่น การบำบัดน้ำเสีย การทำปุ๋ยหมัก ควบคุมสาหร่าย (Emad, 2011)

หัวเชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 กลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ในหัวเชื้อ

กลุ่มจุลินทรีย์	ตัวอย่างจุลินทรีย์
แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	*Lactobacillus plantarum, L. casei, Streptococcus lactis*
แบคทีเรียสังเคราะห์แสง	*Rhodopseudomonas palustrus,* *Rhodobacte rspaeroides*
บาซิลลัส	*Rhodobacter spaeroides, Streptomyces griseus*
ยีสต์	*Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis*
รา	*Aspergillus oryzae, Mucor hiemalis*

มีรายงานวิจัยที่ใช้จุลินทรีย์หรือกลุ่มจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสียชุมชนได้ผลดี เช่น

1. Alam และคณะ (2003) ใช้กลุ่มเชื้อ *Penicillium corylophilum* และ *Aspergillus niger (P/A)* ลดค่าซีโอดีในน้ำเสียชุมชนที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 776 มิลลิกรัมต่อลิตรได้สูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์

2. Mishra และคณะ (2004) ใช้กลุ่มเชื้อ *Aspergillus foetidus* MTCC 508 และ *Aspergillus niger* ITCC 2012 สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมมันฝรั่งที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 8,122 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สูงสุด 90เปอร์เซ็นต์

3. Ryznar-Luty และคณะ (2008) ใช้กลุ่มเชื้อ *Bacillus circulans, Bacillus filicolonicus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus acidocaldarius* และ *Bacillus Licheniformis* สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียกากส่าที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 126,700 มิลลิกรัมต่อลิตรได้สูงสุด 85.37 เปอร์เซ็นต์

4. Malandra และคณะ (2003) ใช้เชื้อ *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata* และ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียจากโรงสุราที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 4,850-5,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 95, 46 และ 69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5. Cristiani-Urbina และคณะ (2000) ใช้กลุ่มเชื้อ *Torulopsis cremoris* และ *Candida utilis* สามารถลดค่าซีโอดี ในน้ำเสียจากโรงงานนมที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 70,700 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สูงสุด 95.8 เปอร์เซ็นต์

6. Jin และคณะ (2005) ใช้กลุ่มเชื้อ *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718), *Nitrobacteria winogradskyi* (DSMZ 10237), *Bacillus licheniformis* (CGMCC 0766), *Bacillus megaterium* (CGMCC 0767) และ *Bacillus sphaericus* (CGMCC 0764) สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียชุมชนที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 230-580 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 91.7เปอร์เซ็นต์

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์

1. ความเป็นกรด-ด่าง หรือ พีเอช (pH) แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด-ด่างแตกต่างกันออกไป บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีในที่มีสภาวะเป็นกลาง เช่น พีเอช 6-7.5 จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดี คือ *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 (Tusanee และ Suntud, 2008), *Aspergillus foetidus* MTCC 508, *Aspergillus niger* ITCC 2012 (Mishra และคณะ, 2004), *Penicillium corylophilum, Aspergillus niger* (Alam และคณะ, 2003), *Alcaligenes faecalis* No. 4, *Alcaligenes faecalis* L1 (Kiss และคณะ, 2001) บางชนิดสามารถเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด เช่น พีเอช 4 - 4.8 เชื้อที่เจริญได้ดี คือ *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae* (Malandra และคณะ, 2003), *Torulopsis cremoris* และ *Candida utilis* (Cristiani-Urbina และคณะ, 2000) และบางชนิดสามารถเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส เช่น พีเอช 8 - 8.35 จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดี คือ *Bacillus circulans, Bacillus filicolonicus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus acidocaldarius* และ *Bacillus Licheniformis* (Ryznar-Luty และคณะ, 2008), *Bacillus* sp. CAB และ *Pseudomonas* sp. CAS (Kimura และคณะ, 2001) ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียโดยทั่วไปจะมีค่าอยู่ประมาณ 5-9 และที่เหมาะสมที่สุดคือ 6.8 - 7.2 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ โดยเฉพาะระบบบำบัดน้ำเสียแบบให้อากาศทั่วไป (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2552)

2 อุณหภูมิ (Temperature) อัตราการเจริญเติบโตจะแปรผันตามอุณหภูมิและความต้องการของแบคทีเรียชนิดนั้น โดยปกติอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะสูงขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นจนถึงจุดๆ หนึ่งที่จุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งต้องการหรือเหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งก็จะลดลง และถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเกินไปจนแบคทีเรียทนไม่ได้ก็จะตาย โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่

สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิระดับปานกลาง 28 –33 องศาเซลเซียส เช่น *Aspergillus foetidus* MTCC 508, *Aspergillus niger* ITCC 2012 (Mishra และคณะ, 2004), *Torulopsis cremoris, Candida utilis* (Cristiani-Urbina และคณะ, 2000), *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae* (Malandra และคณะ, 2003), *Penicillium corylophilum* และ *Aspergillus niger (Alam et al., 2003)* และที่อุณหภูมิสูง 58 องศาเซลเซียส เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดี คือ *Bacillus filicolonicus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus acidocaldarius Bacillus circulans,* และ *Bacillus Licheniformis* (Ryznar-Luty และคณะ, 2008)

3 ออกซิเจน (Oxygen) ความสำคัญของออกซิเจนนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียแบ่งออกตามความต้องการออกซิเจนนั้นมีอยู่ 2 กลุ่มใหญ่ๆ โดยแบคทีเรียชนิดที่ใช้ออกซิเจนอิสระในการดำรงชีวิตถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Aerobic bacteria และแบคทีเรียชนิดที่ใช้ออกซิเจนในรูปสารประกอบไม่ว่าจะเป็นสารประกอยอินทรีย์ (Organic oxygen compound) หรือสารอนินทรีย์ (Inorganic oxygen compound) เช่น NO_3^- หรือ SO_4^{-2} เป็นต้น ดังนั้นหากควบคุมสภาวะแวดล้อมในน้ำหรือน้ำเสียให้ไม่มีออกซิเจนแบคทีเรียในกลุ่ม Aerobic bacteria ก็จะตายหมด ส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม Anaerobic bacteria จะเจริญเติบโตได้ดี แต่อย่างไรก็ตามปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ในถังปฏิกิริยาหรือถังเติมอากาศโดยทั่วไปนั้นปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต้องไม่น้อยกว่า 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อป้องกันสภาวะขาดออกซิเจนละลายน้ำ (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2552) จากงานวิจัย พบว่า ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับ 2 - 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (Jin และคณะ, 2005; Tsang และคณะ, 2007) เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดี เช่น *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718), *Nitrobacteria winogradskyi* (DSMZ 10237), *Bacillus licheniformis* (CGMCC 0766), *Bacillus megaterium* (CGMCC 0767) และ *Bacillus sphaericus* (CGMCC 0764) และสามารถลดค่าซีโอดีได้ 91.7 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำเสียชุมชนที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 230 - 580 มิลลิกรัมต่อลิตร (Jin และคณะ, 2005) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับ 3.8 - 6.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Micrococcusluteus, Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Comamonas* sp., *Acinetobactor* sp. และ *Rhodoccus* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดี และสามารถลดค่าค่าซีโอดีได้ 96 - 99 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำเสียไนโตรเบนซีนที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 1,140 มิลลิกรัมต่อลิตร (Zhao และคณะ, 2011)

4 อาหาร (Food) อาหารของแบคทีเรียแบ่งออกได้ 2 ชนิดใหญ่ๆ คือสารอาหารเพื่อใช้เป็นพลังงานและใช้เพื่อสร้างเซลล์ใหม่ อาหารส่วนใหญ่ได้แก่สารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอนเป็นส่วนใหญ่ อาหารอีกชนิดหนึ่งคืออาหารเสริม (Nutrients) ซึ่งมีความจำเป็นในการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ได้แก่ สารประกอบไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ที่มีความจำเป็นอย่างมากต่อจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำเสีย หากขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส การใช้กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพใน

การบำบัดสิ่งสกปรกคือสารอินทรีย์จะเป็นไปได้ยาก จะต้องมีการเติมสารทั้ง 2 อย่าง ลงไปในน้ำเสีย เพื่อให้การบำบัดมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีสารประกอบแร่ธาตุต่างๆ ที่มีความจำเป็นสำหรับแบคทีเรียในการเจริญเติบโต เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม เป็นต้น

2.7 ระยะการเติบโตของแบคทีเรีย

ถ้าสภาพแวดล้อมต่างๆ ทั้งทางกายภาพ ทางเคมี ไม่ขัดต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแล้วอัตราเร่งในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารเท่านั้น (Metcalf and Eddy, 1991) ทั้งนี้อาหารเสริมสร้างจะต้องเพียงพอด้วย การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแปรผันตรงกับปริมาณอาหาร การวัดอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอาจวัดโดยการหาปริมาณจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น หรือน้ำหนักของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะสัมพันธ์กับระยะเวลา สามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดังรูปที่ 2.2 นี้คือ

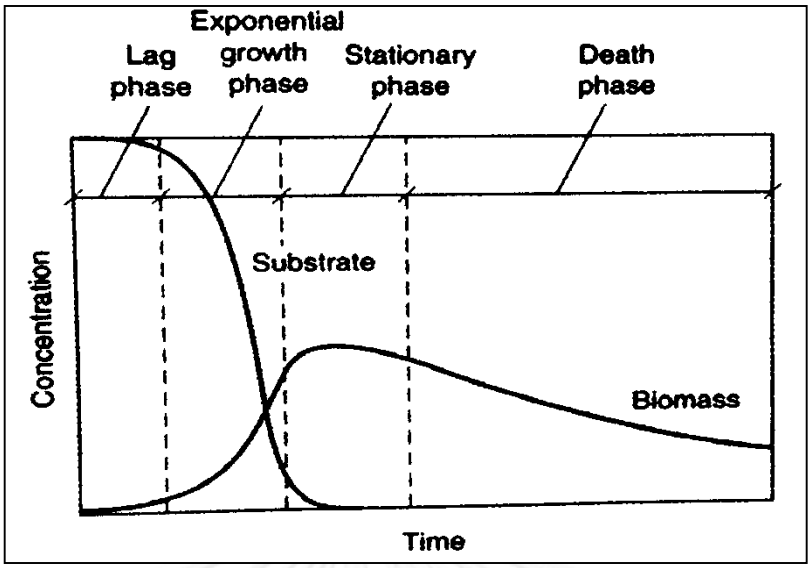
1. ในระยะแรกแบคทีเรียจะมีการปรับตัว และเป็นระยะที่แบคทีเรียได้รับสารอาหารเพื่อนำมาสร้างเป็นส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ ดังนั้นจึงยังไม่มีการแบ่งตัว อัตราการเจริญเติบโตจะต่ำ ระยะนี้จะเรียกว่า Lag phase

2. เมื่อแบคทีเรียสามารถปรับตัวได้ดีและมีการสะสมอาหาร จะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและค่อนข้างสม่ำเสมอ อาจจะเรียกระยะนี้ว่า Steady state อัตราการเจริญเติบโตในระยะนี้จะสูงที่สุด เรียกระยะนี้ว่า Log phase

3. หลังจากนั้นอาหารต่างๆ ในน้ำเสียหรืออาหารเลี้ยงเชื้อจะเริ่มน้อยลง ของเสียจากแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะถูกจำกัด แบคทีเรียบางส่วนจะเจริญเติบโตไปได้และบางส่วนจะตายลง ทำให้ปริมาณแบคทีเรียโดยรวมค่อนข้างคงที่ อัตราการเจริญเติบโตเกือบเป็นศูนย์ ระยะนี้เรียกว่า Stationary phase

4. หลังจากระยะ Stationary phase พบว่าอาหารยิ่งน้อยลงไปอีก อัตราการตายจะสูงกว่าอัตราการเจริญเติบโต ปริมาณแบคทีเรียจึงลดลง ระยะนี้เรียกว่า Declined growth phase

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 2.2 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เมื่อเวลาผ่านไป (Growth curve)

2.8 การบำบัดน้ำเสีย (Wastewater treatment)

น้ำเสียมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำ ส่วนที่เหลือเป็นของแข็งแขวนลอยและสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ น้ำตาล กรดอะมิโน กรดไขมัน แอลกอฮอล์ และสารอนินทรีย์อื่นๆ ดังนั้นเมื่อปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำจึงเป็นการเพิ่มสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ให้แก่แหล่งน้ำ ทำให้แบคทีเรียนำไปใช้เป็นอาหารและเจริญเติบโตพร้อมกับย่อยสลายสารอินทรีย์ไปด้วยซึ่งจะมีการใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายเรื่อยๆ จนบางครั้งใช้ไปเกือบหมดจึงเกิดสภาพไร้อออกซิเจนในแหล่งน้ำ ทำให้สิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำทนอยู่ไม่ได้และตายในที่สุด ทำให้แบคทีเรียพวกแอนแอโรบิคเจริญขึ้นมาแทนที่มากมายและย่อยสลายต่อไป การย่อยสลายในสภาพที่ไม่ใช้ออกซิเจนจะได้สารประกอบที่มีกลิ่นเหม็น เช่น ก๊าซไข่เน่า หรือก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เป็นต้น ทำให้แหล่งน้ำกลายเป็นน้ำเน่าเสีย (นงลักษณ์ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

ลักษณะของระบบบำบัดน้ำเสียที่เหมาะสมในแต่ละพื้นที่คือเป็นที่สามารถทำงานได้ง่ายและควบคุมได้สะดวก ซึ่งต้องมีค่าใช้จ่ายไม่สูงมากเกินไปทำให้ผู้ที่จะสร้างระบบสามารถยอมรับได้ นอกจากนี้แต่ละระบบต้องการพื้นที่ในการปลูกสร้างไม่เท่ากันดังนั้นพื้นที่ในการปลูกสร้างต้องเหมาะสม ระบบบำบัดน้ำเสียที่ถูกนำมาใช้ในประเทศไทยเป็นอันดับแรกคือ การบำบัดแบบบ่อเกรอะบ่อซึม ซึ่งเป็นแบบที่นิยมใช้ในบ้านเรือนทั่วไป นอกจากนั้นยังเป็นการป้องกันน้ำเน่าเสียที่เกิดจากแหล่งโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศไทยจึงได้มีการประกาศใช้พระราชบัญญัติโรงงานซึ่งบังคับให้โรงงานอุตสาหกรรมต้องจัดให้มีระบบการบำบัดน้ำเสียชนิดต่างๆ ขึ้นมาก่อนที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ รวมทั้งยังมีกฎหมายของน้ำทิ้งหลายประเภทที่ถูกกำหนดออกมาเพื่อช่วยรักษาสภาพ

สิ่งแวดล้อมและลดภาวะมลพิษทางน้ำและด้านอื่นๆ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548) โดยประเภทของระบบบำบัดน้ำเสียสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. ระบบบำบัดน้ำเสียทางกายภาพ (Physical treatment) คือวิธีการบำบัดโดยใช้กระบวนการทางกายภาพ เช่น การดักด้วยตะแกรง การตกตะกอน (Sedimentation) และการกรอง (Filtration) สารปนเปื้อนจากน้ำเสียหรืออาจจะเรียกว่าเป็นการบำบัดน้ำเสียเบื้องต้น(Pretreatment step) ซึ่งกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางกายภาพโดยส่วนใหญ่จะใช้เป็นกระบวนการบำบัดในขั้นแรกในการบำบัดน้ำเสีย เพื่อเป็นการเตรียมน้ำเสียให้เหมาะสมที่จะถูกบำบัดในขั้นต่อไป ซึ่งอาจจะเป็นกระบวนการบำบัดทางเคมีหรือชีวภาพวิธีนี้นิยมใช้ในการบำบัดสารปนเปื้อนบางชนิดหรือบำบัดน้ำเสียที่มีความสกปรกไม่มากนักวิธีการบำบัดน้ำเสียทางกายภาพจะเสียค่าใช้จ่ายสูงพอๆกับวิธีการบำบัดน้ำเสียทางเคมี

2. ระบบบำบัดน้ำเสียทางเคมี (Chemical treatment) คือวิธีการบำบัดโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี เช่น การทำให้เป็นกลาง (Neutralization) การทำให้เกิดตะกอน (Precipitation) และการช่วยการตกตะกอนของสารปนเปื้อนทำให้น้ำเสียแยกออกจากน้ำส่วนใส (Chemical-coagulation) การบำบัดน้ำเสียทางเคมีส่วนใหญ่จะใช้สำหรับน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของสิ่งสกปรกที่ละลายในน้ำเสีย หรือแขวนลอยอยู่ในน้ำเสียและไม่สามารถตกตะกอนหรือแยกชั้นออกจากน้ำเสียโดยง่าย เพื่อช่วยเร่งให้สิ่งปนเปื้อนในน้ำเสียสามารถแยกออกจากน้ำเสียได้เร็วขึ้นกว่าปกติ เพื่อลดระยะเวลาและเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดทางกายภาพให้สูงขึ้น และเป็นวิธีการที่ใช้ในการปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างของน้ำเสียให้สมดุลหรือเหมาะสมที่จะปล่อยทิ้งลงสู่สาธารณะ หรือเป็นการเตรียมน้ำเสียให้มีสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปบำบัดในขั้นที่สูงขึ้น วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการบำบัดแต่มีข้อเสียตรงที่มีค่าใช้จ่ายสูงและทำให้เกิดกากตะกอนในปริมาณที่สูง

3. ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological treatment) คือระบบบำบัดที่ใช้สิ่งมีชีวิตในธรรมชาติในการบำบัดสารปนเปื้อนในน้ำเสีย จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ เชื้อรา สาหร่าย และโพรโตซัว ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพประกอบด้วย 2 ประเภทใหญ่ คือ ระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน และระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548)

ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีทางเคมีหรือวิธีทางกายภาพจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดกับน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนสารอินทรีย์

2.9 ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotrophic จะไปทำลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่อยู่ในรูปละลายน้ำ (Soluble) หรือแขวนลอยอยู่ในน้ำ (Colloid or suspended solids) ด้วยปฏิกิริยาชีวเคมีแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเป็นการกำจัดหรือทำให้เกิดตะกอนของสิ่งปนเปื้อน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ละลายน้ำหรือแขวนลอยอยู่ในน้ำเสีย รวมทั้งเป็นการทำให้สิ่งปนเปื้อนเหล่านั้นเสถียร (Stable) ขึ้นโดยอาศัยจุลินทรีย์ในกลุ่ม Heterotrophic bacteria เป็นหลัก ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศและแบบใช้อากาศ

กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (Aerobic wastewater treatment)

เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบให้หรือเติมอากาศ โดยอาศัยจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนหรืออากาศในการดำรงชีวิต (aerobic microorganism) โดยส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Aerobic heterotrophic bacteria เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องอาศัยออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) หรือ ออกซิเจนอิสระ ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้อากาศ (aerobic bacteria) สามารถจำแนกได้เป็น 2 ขั้นตอน ตามลำดับดังนี้ คือ

ขั้นตอนที่ 1: เป็นกระบวนการนำสารอินทรีย์หรือสารอาหารเข้าไปในเซลล์ โดยจุลินทรีย์จะส่งเอนไซม์ (enzyme) ออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มาเกาะติดที่ผนังเซลล์เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารโมเลกุลเล็กที่จะสามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้

ขั้นตอนที่ 2: เป็นกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อที่จะผลิตพลังงานไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ และการสร้างเซลล์ใหม่ โดยเขียนอยู่ในรูปของสมการโดยรวมได้

เมื่อสารอินทรีย์ในน้ำเสียถูกเปลี่ยนรูปมาเป็นจุลินทรีย์เซลล์ใหม่ จะรวมตัวกันเป็นฟล็อก (floc) ก็จะมีน้ำหนักมากขึ้น และแยกออกจากน้ำเสียได้ง่ายด้วยการตกตะกอน

กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ จำแนกได้เป็น 2 ประเภทหลัก คือ

1. ระบบบำบัดที่จุลินทรีย์เกาะติดผิวตัวกลาง หรือ ระบบฟิล์มตรึง (fixed film system) เช่น ระบบโปรยกรอง (Trickling Filter) และระบบแผ่นหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactor) เป็นต้น (กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม และสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2545; มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2543)

2. ระบบบำบัดที่จุลินทรีย์แขวนลอยอยู่ในระบบ (suspended system) เช่น บ่อแอโรบิก (Aerobic Pond) บ่อเติมอากาศ (Aerated Lagoon) ระบบแอคติเวทเต็ดสลัดจ์ (Activated Sludge) เป็นต้น

ระบบแอคติเวทเต็ดสลัดจ์ (Activated Sludge) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง สามารถควบคุมปริมาณสิ่งสกปรกหรือสารอินทรีย์ของน้ำเสียที่เข้าสู่ระบบบำบัดทำให้มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียได้ดี

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งจะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อสภาพแวดล้อมของระบบบำบัดน้ำเสียโดยเฉพาะในถังปฏิกิริยาหรือถังเติมอากาศเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย โดยสภาวะแวดล้อมที่สำคัญมีดังนี้

1. ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen: DO) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในถังปฏิกิริยาหรือถังเติมอากาศในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำเสีย ชนิดของสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนที่ต้องการบำบัด เช่น น้ำเสียชุมชน หรือน้ำเสียจากอาคารบ้านเรือน ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่ต้องควบคุมจะอยู่ที่ 0.5 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้การควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับต่ำๆ อาจจะเป็นผลดีกับระบบบำบัดน้ำเสียโดยรวมก็ได้ เพราะการควบคุมระดับหรือปริมาณออกซิเจนละลายให้ต่ำๆ เช่นที่ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจจะส่งผลให้ตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดสามารถจมตัวลงสู่ก้นถังได้ดีในช่วงของการตกตะกอน เพราะจะเป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียที่ตกตะกอนได้ดีเจริญเติบโตดีและลดปริมาณตะกอนที่ตกตะกอนยากซึ่งเป็นพวกเชื้อราลง

2. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระบบบำบัดน้ำเสียควรจะควบคุมสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วงที่เป็นกลางโดยเฉพาะระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งมักจะควบคุมความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 6.8 - 7.2 เป็นต้น จะทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีและตะกอนแบคทีเรียของระบบบำบัดน้ำเสียสามารถจมตัวได้ดี หากสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำกว่า 6.5 เชื้อราอาจจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าแบคทีเรีย จนกระทั่งความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดลงต่ำกว่า 4.5 เชื้อราจะมี

ปริมาณมากกว่าแบคทีเรีย ซึ่งส่งผลให้ตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย (Bio-sludge) จมตัวได้ยากในถังตกตะกอน นอกจากนี้แล้วถ้าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าสูงกว่า 9 แบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียจะเจริญเติบโตได้ช้าลง ทำให้ประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียต่ำลงด้วย เพราะฟอสฟอรัสจะตกผลึกทำให้จุลินทรีย์ไม่มีฟอสฟอรัสใช้

3. อุณหภูมิ (Temperature) โดยปกติแล้วอุณหภูมิของระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งไม่ควรเกิน 40 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าการย่อยสลายหรือบำบัดสารอินทรีย์บีโอดีจะแปรผันโดยตรงกับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นก็ตาม แต่หากอุณหภูมิของระบบเกินกว่า 40 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียก็จะลดลง เนื่องจากตะกอนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียทนไม่ได้และจะตายในที่สุด ซึ่งอุณหภูมิจะส่งผลโดยตรงต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตของตะกอนจุลินทรีย์ของระบบบำบัดน้ำเสีย ดังนั้นการเลือกกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียจึงมีความสำคัญอย่างมาก เช่น หากต้องการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียที่อุณหภูมิใดอุณหภูมิหนึ่ง ก็ต้องพยายามคัดเลือกกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี ณ อุณหภูมินั้นๆ สาเหตุที่จำเป็นต้องมีการควบคุมระดับอุณหภูมิของระบบบำบัดน้ำเสียอาจจะเนื่องมาจากสภาพภูมิอากาศและสภาพของน้ำเสียที่ต้องการบำบัด เป็นต้น

โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ (sequencing batch reactor หรือ SBR) เป็นระบบบำบัดประเภทหนึ่งในระบบแอคติเวทเต็ดสลัดจ์ซึ่งมีวิธีการทำงานคล้ายๆกับระบบตะกอนเร่งทั่ว ๆ ไป

การบำบัดน้ำเสียด้วยระบบเอสบีอาร์(sequencing batch reactor หรือ SBR)

ระบบเอสบีอาร์ (sequencing batch reactor หรือ SBR) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบตะกอนเร่ง (activated sludge) ที่มีการทำงานแบบกะ (batch) เริ่มมีการใช้งานในช่วง ค.ศ.1960 (Metcalf และ Eddy, 2003) และเป็นระบบน้ำเสียที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่และยังสามารถใช้กับน้ำเสียจากบ้านเรือน ซึ่งโดยทั่วไประบบแบบนี้จะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและพื้นที่ในการก่อสร้าง สามารถเปลี่ยนการทำงานให้เหมาะสมกับลักษณะของน้ำเสียได้ และมีประสิทธิภาพสูงในการบำบัดน้ำเสียที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารประกอบอินทรีย์ มีอัตราการไหลเป็นช่วงๆ นอกจากนี้ระบบเอสบีอาร์สามารถบำบัดฟอสฟอรัสหรือไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง ระบบเอสบีอาร์มีลักษณะเด่น คือไม่ต้องมีระบบหมุนเวียนตะกอน และมีการปรับสภาพโดยทำหน้าที่เป็นถังปรับสภาพด้วยตัวเอง ซึ่งทำให้ระบบมีความสามารถในการรองรับต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงฉับพลันของอัตราการป้อนน้ำเสียได้เป็นอย่างดี ซึ่งหลักของระบบเอสบีอาร์ใช้ถังเพียง 1 ถัง แทนการทำงานของ 3 ถัง ดังรูปที่ 2.3 โดยมีการเติมอากาศและการตกตะกอนภายในถังเดียวกัน ทำให้ประหยัดพื้นที่และค่าใช้จ่าย ทั้งยังเป็นการลดโครงสร้างของระบบบำบัดที่ซับซ้อนด้วยระบบเอสบีอาร์มีประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ สารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในน้ำเสีย ระบบเอส

บีอาร์ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อให้สามารถควบคุมได้ง่ายและเหมาะสำหรับใช้บำบัดทั้งน้ำเสียจากชุมชนและน้ำเสียจากอุตสาหกรรมขนาดเล็กที่มีน้ำเสียไม่มาก ระบบเอสบีอาร์มีขั้นตอนการบำบัดทั้งหมด 5 ขั้นตอนดังนี้คือ

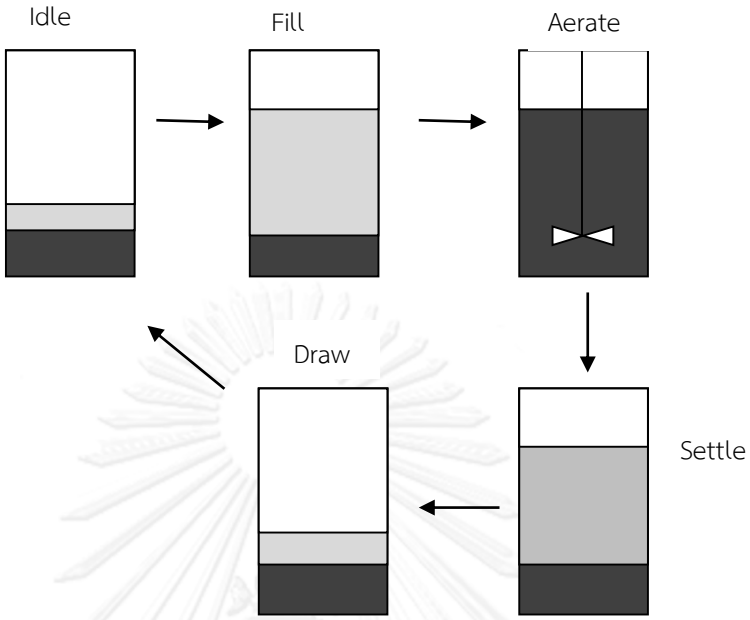
1. การเติมน้ำเสีย (Fill) รับน้ำเสียจากขบวนการที่เกิดน้ำเสียเข้ามาในถังปฏิกรณ์ซึ่งมีจุลินทรีย์อยู่ในถัง โดยปริมาตรน้ำเสียเริ่มต้นในถังอาจต่ำประมาณร้อยละ 25 ของปริมาตรถังซึ่งเป็นปริมาณน้ำเสียที่เหลืออยู่ในช่วงสุดท้ายของช่วงพัก (Idle) ให้เติมน้ำเสียจนถึงระดับที่กำหนดไว้ (100 เปอร์เซ็นต์) ในช่วงเติมน้ำเสียอาจมีการเติมอากาศหรือไม่ก็ได้ ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ว่าจะใช้บำบัดอะไร

2. การบำบัด (React) เป็นช่วงการเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ในชุดทดลอง ในช่วงนี้จะมีการเติมอากาศให้แก่ระบบเพื่อทำการกำจัดน้ำเสีย

3. การตกตะกอน (Settle) กระบวนการนี้จะหยุดนิ่งเพื่อให้ตะกอนเกิดการตกตะกอนเพื่อเป็นการแยกตะกอนจุลินทรีย์ออกจากน้ำเสียที่บำบัดแล้ว (Treated Effluent) กากตะกอนในระบบเอสบีอาร์จะมีประสิทธิภาพมากกว่าในระบบตะกอนเร่งแบบต่อเนื่อง (Continuous Activated Sludge System) เพราะของเหลวอยู่ในสภาพนิ่งอย่างสมบูรณ์ จะไม่ถูกรบกวนจากการไหลของน้ำหรือสภาวะอื่นๆ และระยะเวลาของการตกตะกอนไม่ควรยาวนานเกินไปเพราะจะทำให้ตะกอนลอยตัว

4. การถ่ายน้ำทิ้ง (Draw) เวลาที่มีการระบายน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วออกจากถังปฏิกรณ์ เพื่อให้ได้ส่วนน้ำใสจึงควรใช้ระบบถ่ายเทน้ำแบบทุ่นลอยดูดน้ำหรือฝายปรับระดับ

5. การพัก(Idle) ช่วงเวลาหลังจากที่ระบายน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วออกจากถังปฏิกรณ์และก่อนที่จะเติมน้ำเสียเข้าถังใหม่อีกครั้ง เป็นช่วงที่ระบบอยู่นิ่งๆ จุดประสงค์ของ Idle ในระบบหลายถังคือ เพื่อเตรียมเวลาสำหรับถังปฏิกิริยาแรก ให้มีช่วงการเติมน้ำเสีย(Fill) ที่สมบูรณ์ก่อนที่น้ำเสียจะเข้าสู่ถังอื่น เนื่องจากช่วงพัก(Idle) ไม่ใช่ช่วงจำเป็น บางครั้งจึงถูกยกเว้น (Mace และMata-Alvarex, 2002; สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2552)



รูปที่ 2.3 แผนผังการทำงานของระบบเอสบีอาร์

ระบบตะกอนเร่งแบบ sequencing batch reactor (SBR) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งชนิดที่มีการพัฒนาขึ้นเพื่อความเหมาะสมและแก้ปัญหาบางอย่างที่เกิดขึ้นในการควบคุมระบบบำบัดแบบเลี้ยงตะกอนทั่วไป เช่น ปัญหาโรงงานมีการปล่อยน้ำเสียออกจากขบวนการผลิตเป็นช่วงๆ ปัญหาคุณภาพของตะกอนในถังเติมอากาศหรือถังปฏิกิริยาของระบบบำบัดแบบเลี้ยงตะกอนเร่งทั่วไป ตัวอย่างเช่น การจับตัวของตะกอน หรือปัญหาการเกิดขบวนการ Nitrification และ Denitrification ในระบบบำบัดน้ำเสีย การเกิดตะกอนลอยในถังตกตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเลี้ยงตะกอนเร่งทั่วไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้อดีและข้อเสียของระบบเลี้ยงตะกอนเร่งแบบเอสบีอาร์

ข้อดีของระบบเลี้ยงตะกอนเร่งแบบเอสบีอาร์

1. ถังปฏิกิริยาในระบบเลี้ยงตะกอนเร่งแบบเอสบีอาร์มีลักษณะเหมือนกับถังพักน้ำ (Equalization basin) ในระหว่างช่วงเติมน้ำเสียจึงสามารถรับภาระฉับพลัน (Shock load) ของบีโอดีได้ดีและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดโดยระบบบำบัดน้ำเสียดังกล่าวจะมีคุณภาพดี

2. ระบบเลี้ยงตะกอนเร่งแบบเอสบีอาร์เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบเลี้ยงตะกอนเร่งที่ใช้เวลาเป็นตัวกำหนดขั้นตอนการทำงาน ดังนั้นน้ำที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียแล้วหากยังไม่ได้คุณภาพดี

ตามที่ต้องการก็สามารถเก็บกักไว้เพื่อบำบัดน้ำเสียต่อไปจนกว่าจะได้คุณภาพดีตามต้องการจึงค่อยระบายน้ำเสียเหล่านั้นออกจากระบบบำบัดน้ำเสีย

3. น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วจะถูกทิ้งไว้ให้ตกตะกอนให้สภาพค่อนข้างนิ่ง ทำให้ตะกอนไม่เกิดการหลุดออกจากระบบบำบัดน้ำเสีย (Wash out) โดยตะกอนจะต้องอยู่ภายในถังปฏิกิริยา ไม่ต้องมีการหมุนเวียนตะกอนจุลินทรีย์ เนื่องจากตะกอนจุลินทรีย์จะยังคงอยู่ในถังปฏิกิริยาเสมอ

4. เนื่องจากความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย (Dissolved oxygen) มีค่าเป็นศูนย์หรือใกล้เคียงศูนย์ในช่วงรับน้ำเสีย (Fill) ซึ่งเป็นช่วงที่ไม่มีการเติมออกซิเจน ดังนั้นในช่วงทำปฏิกิริยา (Reaction) ออกซิเจนจึงสามารถละลายลงไปได้มาก ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายเทออกซิเจนจากเครื่องเติมอากาศมีสูง

5. ประหยัดเนื้อที่ในการติดตั้ง เนื่องจากใช้ถังปฏิกิริยาเพียงใบเดียวทำหน้าที่เป็นทั้งถังเติมอากาศและถังตกตะกอน

6. เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่มีความยืดหยุ่นสูง สามารถปรับเปลี่ยนเวลาของขั้นตอนการทำงานในระบบบำบัดน้ำเสียเพื่อให้เหมาะสมกับน้ำเสียแต่ละประเภทได้

7. ระบบบำบัดน้ำเสียมีราคาต่ำกว่าระบบอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบเลี้ยงตะกอนเร่งชนิดอื่นๆ เนื่องจากไม่มีการหมุนเวียนตะกอน โดยตะกอนจะถูกรักษาอยู่ในถังปฏิกิริยาเสมอ จึงไม่จำเป็นต้องมีถังตะกอนและปั๊มสูบตะกอนทั้งยังเป็นการประหยัดพลังงานของระบบอีกด้วย แต่จะต้องมีการระบายตะกอนส่วนเกินออกจากถังปฏิกิริยาเป็นครั้งคราว

8. ไม่ต้องการการบำรุงรักษามากนัก ทั้งนี้เนื่องจากอุปกรณ์ที่มีอยู่ในระบบบำบัดค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบเลี้ยงตะกอนเร่งชนิดอื่นๆ ดังเดิมที่จะประกอบด้วยทั้งถังเติมอากาศและถังตกตะกอน

ข้อเสียของระบบเลี้ยงตะกอนเร่งแบบเอสบีอาร์

1. ต้องมีการควบคุมระดับตะกอนในถังปฏิกิริยา เนื่องจากระบบการสูบตะกอนส่วนเกินทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำเสียหรือถังปฏิกิริยาทำได้ค่อนข้างยาก รวมทั้งการควบคุมระดับตะกอนในบ่อปฏิกิริยาและการกำหนดจำนวนตะกอนจุลินทรีย์ที่ต้องการสูบทิ้งก็ทำได้ยาก อาจจะต้องใช้ระบบประมาณการ

2. ถังเติมอากาศจะต้องใหญ่พอและให้มีความลึกของชั้นน้ำใสพอเหมาะกับการถ่ายน้ำ เนื่องจากช่วงเวลาการถ่ายน้ำจะสั้น ทำให้อัตราไหลออกของน้ำสูงกว่าถังตกตะกอนทั่วไป อาจรบกวนตะกอนจุลินทรีย์ให้ลอยขึ้นมาได้ (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2552)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา (Binocular compound microscope) รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus optical co.Ltd., Taiwan
2. ขวดสีชาขนาด 1,000 มิลลิลิตร
3. ขวดสีชาขนาด 500 มิลลิลิตร
4. ขวดสีชาขนาด 250 มิลลิลิตร
5. เครื่องนึ่งความดันฆ่าเชื้อ(Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomyประเทศ Germany
6. เครื่องชั่งหยาบ 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ100C บริษัท Presicaประเทศ Switzerland
7. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AB204-5 บริษัท Mettlerประเทศ Switzerland
8. เครื่องปั๊มรีดสาย(Peristaltic pump) รุ่น 505U บริษัท Watson Marlow ประเทศ Englan
9. เครื่องเขย่า (Shaker)รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Co. Inc., USA
10. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)รุ่น Seven Easy บริษัท Mettler-Toledo, Switzerland
11. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave)รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan
12. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Hach DR/2400 บริษัทHach, USA
13. ไมโครปิเปต (Micropipette)รุ่น 100P ยี่ห้อ Eppendorf
14. ไมโครปิเปต (Micropipette)รุ่น 1000P ยี่ห้อLio Lab
15. ปั๊มอากาศ (Air pump)รุ่น DOA-P104-BN บริษัท MFG.CORP., USA
16. ตู้อบความร้อน (Hot air oven)รุ่น Conthermserie five บริษัทContherm Scientific Ltd., New Zealand
17. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น BVT-124 บริษัท International Scientific Supply, USA
18. เครื่องแก้ว บริษัท Pyrex, USA
19. เครื่องแก้ว บริษัท Schott Duran, Germany
20. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer)รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA

เคมีภัณฑ์

1. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Merck, Germany
2. กลูโคส (glucose)บริษัท Merck, Germany
3. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)บริษัท J.T baker, USA
4. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany
5. กรดซัลฟูริก (H2SO4) บริษัท J.T baker, USA
6. กรดซัลฟูริก (H2SO4) บริษัท J.T baker, USA
7. แบคโตเปบโทน (Bacto peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
8. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)บริษัท ScharlauChemie S.A., Spain
9. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)บริษัท Ajax Finechem, Australia
10. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท HBD Laboratories Chemicals Ltd., England
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)บริษัท Merck, Germany
12. แบคโตเปบโทน (Bacto peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
13. ผงสกัดจากมอลต์(Malt extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
14. ผงวุ้น
15. ยูเรีย (Urea)บริษัท Unilab, Australia
16. เมอคิวริกซัลเฟต ($HgSO_4$)บริษัท Fisher scientific, UK
17. เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$)บริษัท Fisher scientific, UK
18. ซิลเวอร์ซัลเฟต ($AgSO_4$)บริษัท Poch, Poland
19. โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)บริษัท Unilab, Australia
20. โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)บริษัท Unilab, Australia
21. โปตัสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$)บริษัท Fisher scientific, UK
22. โปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต ($HOOC_6H_4COOK$)บริษัท Fisher scientific, UK

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 คัดแยกจุลินทรีย์จากธรรมชาติและน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆ

นำตัวอย่างที่เป็นของเหลวชนิดละ 2 มิลลิลิตรหรือ 2 กรัม ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (จุฑากานต์ บุญมี, 2553) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเชื้อแต่ละชนิดที่ขึ้นไปขีดลงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเอาโคโลนีเดี่ยวไปขีดซ้ำจนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อไปศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ลักษณะของโคโลนี แล้วย้อมสีแกรมเพื่อตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการศึกษาต่อไป

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย

3.2.1 การทำหัวเชื้อ

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในข้อ 1 มาขีดลงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ประมาณ 4 ลูป จากนั้นนำไปเขย่าให้เป็นสารละลายและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปรับค่าดูดกลืนแสงให้ได้ 0.5 โดยวิธีการทำเจือจาง (Dilution) ใ ช้สารละลายที่ได้เป็นหัวเชื้อต่อไป

3.2.2 ทดสอบการบำบัดน้ำเสีย

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำเสียสังเคราะห์ 4.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าที่เครื่องเขย่าแบบ reciprocal โดยวางหลอดทดลองแบบเอียง ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างน้ำเสียไปวิเคราะห์หาค่าซีโอดีก่อนและหลังการใส่เชื้อ

3.2.3 คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพและศึกษาลักษณะของโคโลนีและเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากข้อ 3.2.2 ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์10 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้สูงที่สุดนำจุลินทรีย์ทั้ง 10 ไอโซเลท มาขีดลงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นใช้ลูป (loop) แตะเชื้อจากเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ลงบนสไลด์ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 1 หยด จากนั้นเกลี่ยเชื้อ (Smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆไม่ให้หนาแน่นมากจนเกินไปและปล่อยให้แห้ง แล้วทำการตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์จะทำให้เชื้อไม่หลุดออกขณะย้อมสี การตรึงเชื้อทำได้โดยการนำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อทิ้งไว้จนแห้งแล้วไปผ่านเปลวไฟบนตะเกียงแอลกอฮอล์ไปมาอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง แล้วนำไปหยดสี คริสตอลไวโอเลต (Crystal violet) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเททิ้งหยดสารละลายไอโอดีน (iodine) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างสีออกด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 95 % (Ethyl alcohol) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น และหยดสีซาฟรานิน (Safranin) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

3.3 ค่าการควบคุมระบบเอสบีอาร์

การควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ดังนี้ คือ ค่าซีโอดีเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าดีโอ ≥ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร pH ในช่วง 6.9-8.6 ที่อุณหภูมิ 29.3-31.0 องศาเซลเซียล และควบคุมปริมาณกากตะกอนน้ำเสีย (MLSS) ให้คงที่ที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3) และค่า F/M เท่ากับ 0.44/รอบ ทำการเดินระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ โดยควบคุมเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้ เติมน้ำเสีย 5 นาที, ให้อากาศ 60 นาที, ตกตะกอน 40 นาที, ระบายน้ำออก 5 นาที (ดัดแปลงจาก Volodymyr และคณะ, 2006)

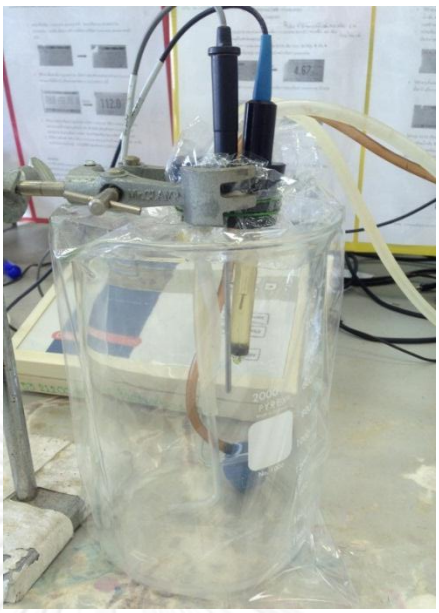
ตารางที่ 3.1 ค่าพารามิเตอร์ในการเดินระบบบำบัดน้ำเสียแบบ SBR

พารามิเตอร์	หน่วย	ความเข้มข้น
COD	มิลลิกรัมต่อลิตร	1,000
MLSS	มิลลิกรัมต่อลิตร	1,500
Temperature	องศาเซลเซียส	29.3-31.0
DO	มิลลิกรัมต่อลิตร	≥ 2
pH		6.9-8.6

ตารางที่ 3. 2 ขั้นตอนการเดินระบบบำบัดน้ำสียแบบ SBR

ขั้นตอน	หน่วย	ระยะเวลา
เติมน้ำ	นาที	5
ให้อากาศ	นาที	60
ตกตะกอน	นาที	40
ถ่ายน้ำออก	นาที	5

นำมาผสมกันในถังปฏิกรณ์แบบsequencing batch reactor (SBR) ทำการติดตามค่า COD ในน้ำที่ออกจากระบบบำบัด จนได้ค่า COD ที่คงที่ นำค่าที่ได้มาคำนวณประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย



รูปที่ 3.1 ถังปฏิกรณ์บำบัดน้ำเสีย

3.4 สร้างกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย

3.4.1 การทำกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์

จากข้อ 3.2.3 นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มาขีดลงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นใช้ลูป (loop) เขี่ยเชื้อลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรเชื้อแบคทีเรียให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ทำเช่นนี้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท จากนั้นดูดสารละลายจุลินทรีย์ชนิดละ 15 มิลลิลิตร มาผสมกันเพื่อใช้เป็นกลุ่มหัวเชื้อต่อไป ก่อนการเติมหัวเชื้อเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ จะต้องปรับปริมาณของ MLSS ให้เท่ากันก่อนหัวเชื้อโดย ปริมาณหัวเชื้อที่เติมลงไป 150 มิลลิกรัมนั้น คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 219 มิลลิกรัม ดังนั้นเมื่อเติมหัวเชื้อ 150 มิลลิลิตร จะต้องดูดปริมาณตะกอนออก 150 มิลลิลิตรเช่นกัน เพราะเมื่อคิดน้ำหนักเซลล์แห้งของกากตะกอนน้ำเสียกับหัวเชื้อที่เติมลงไปแล้วมีค่าใกล้เคียงกัน

3.4.2 ทดสอบประสิทธิการบำบัดน้ำเสียของกลุ่มจุลินทรีย์

ในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของกลุ่มจุลินทรีย์นี้เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบ SBR เป็นระบบปิด โดยแบ่งออกเป็น 2 ถังปฏิกรณ์ คือ ถังปฏิกรณ์แรกนำกากตะกอนน้ำเสียจาก

โรงบำบัดน้ำเสียช่องนนทรีมาใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพียงอย่างเดียว (ตัวควบคุม) เติมกากตะกอนน้ำเสียลงในถังปฏิกรณ์ โดยและถังปฏิกรณ์ที่ 2 ใช้กากตะกอนน้ำเสียจากโรงบำบัดน้ำเสียช่องนนทรีผสมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.1 มาผสมลงในถังปฏิกรณ์(ตัวทดลอง) ขนาด 2,000 มิลลิลิตร โดยแต่ละถังปฏิกรณ์มีปริมาณ MLSS เท่ากับ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และปรับดังรูปที่ 3.1 โดยทำการเดินระบบตามค่าที่กำหนดในตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2 ทำการทดลองวันละ 5 รอบ ทั้งหมด 8 วันและตรวจวัดค่า MLSS ให้คงที่ ประมาณ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในแต่ละวันก่อนเริ่มการทดลองจะทำการดูดตัวอย่างน้ำเสียมา 30 มิลลิลิตร ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อวัดปริมาณ MLSS และแต่ละรอบที่เดินระบบจะต้องค่อยสังเกตุดูปริมาณตะกอน อย่าให้มีกากตะกอนน้ำเสียเกินขีดระดับที่ขีดไว้ในช่วงตกตะกอน เปรียบเสมือนการวัดปริมาณกากตะกอนน้ำเสียโดยใช้กรวมอิมฮอฟฟ์ หากปริมาณกากตะกอนน้ำเสียเกินต้องทำการดูดกากตะกอนน้ำเสียออก เพื่อปรับปริมาณกากตะกอนน้ำเสียให้คงเดิม จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำเสียไปวิเคราะห์ค่าซีโอดี หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย

3.5 จำแนกประชากรจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากถังปฏิกรณ์ที่เติมกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์

โดยทำการคัดแยกจุลินทรีย์ตามการทดลองที่ 3.1

3.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำจุลินทรีย์ทั้ง 10 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.3 และจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.4 ไปศึกษาลักษณะของโคโลนี แล้วย้อมสีแกรมเพื่อตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นการศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้น จากนั้นนำจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป (ภาคผนวก จ) ตามวิธี Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (John, และคณะ, 1994)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

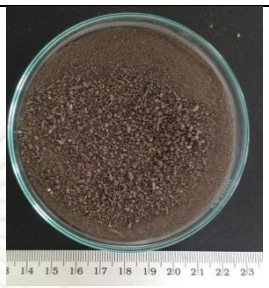
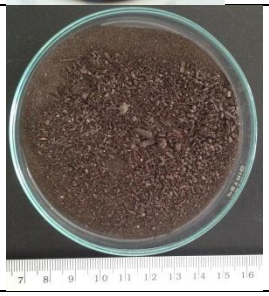
4.1 คัดแยกจุลินทรีย์จากธรรมชาติและน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆ

จากตัวอย่างกากตะกอนน้ำเสียและน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆ ที่ขายในท้องตลาดจำนวน 11 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.1) พบว่าเมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาคัดแยกจุลินทรีย์โดยกระตุ้นในอาหาร nutrient both (NB) โดยเขย่าแบบ reciprocal ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่ละตัวอย่างไปคัดแยกจุลินทรีย์ในอาหารตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1 พบว่าไม่มีจุลินทรีย์ขึ้นบนอาหารทั้ง 2 ชนิด อาจมีสาเหตุมาจากตัวอย่างที่วางขายแต่ละชนิดวางตลาดนานทำให้มีจุลินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะพักตัว ทำให้ต้องการเวลานานในการปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ ดังนั้นจึงเพิ่มระยะเวลาการกระตุ้นในอาหารเหลว nutrient both (NB) พบว่ามีจุลินทรีย์ขึ้นในอาหาร nutrient agar (NA) แต่ไม่ขึ้นในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) แสดงว่ากลุ่มจุลินทรีย์ในตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรีย เนื่องจากอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารที่เหมาะใช้คัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์และรา

จากข้างต้นพบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถขึ้นได้ในอาหาร nutrient agar (NA) ทั้งหมด 49 ไอโซเลท จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ดังตารางที่ 4.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4. 1 ลักษณะตัวอย่างกากตะกอนน้ำเสียและน้ำหมักชีวภาพชนิดต่าง ๆ และจำนวนชนิดจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ลำดับที่	แหล่งที่คัดแยก	ลักษณะตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	จำนวนชนิด (ไอโซเลท)
1	ตัวอย่างผงจุลินทรีย์จากเขตบางเขน กทม.	เป็นผงสีดำ ไม่มีกลิ่น		3
2	ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จากเขตบางเขน กทม.	เป็นน้ำ มีสีน้ำตาลมีกลิ่นเหม็นฉุน พีเอช = 6.3		4
3	ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากเขตบางเขน กทม.	เป็นน้ำ มีสีน้ำตาลมีกลิ่นเหม็นฉุน พีเอช = 5.9		3
4	ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจาก อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี	เป็นน้ำ มีสีน้ำตาลมีกลิ่นฉุน พีเอช = 5.6		0
5	ตัวอย่างผงจุลินทรีย์จากเขตบางเขน	เป็นเกล็ดผงสีเทาดำ ไม่มีกลิ่น		7

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะตัวอย่างกากตะกอนน้ำเสียและน้ำหมักชีวภาพชนิดต่าง ๆ และจำนวนชนิดจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

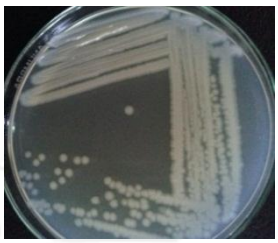
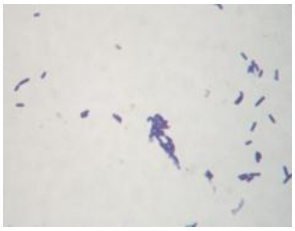
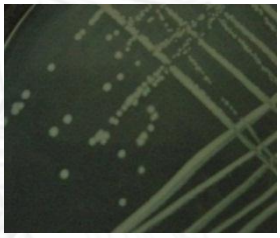
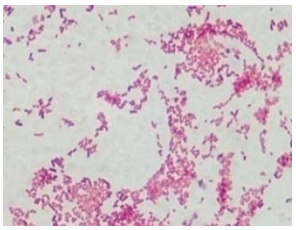
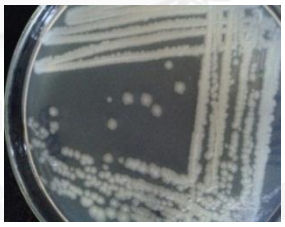
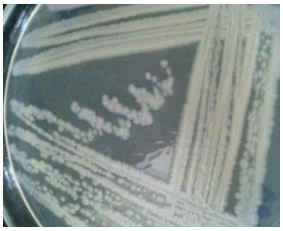
ลำดับที่	แหล่งที่คัดแยก	ลักษณะตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	จำนวนชนิด (ไอโซเลท)
6	ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากท่าน้ำเทเวศน์ กทม.	เป็นน้ำ มีสีน้ำตาล มีกลิ่นฉุน พีเอช = 6.1		4
7	ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากบริเวณท่าน้ำเทเวศน์ กทม.	เป็นน้ำ มีสีน้ำตาล มีกลิ่นเหม็นฉุนเล็กน้อย พีเอช = 4.9		9
8	ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากห้างสรรพสินค้าพัทยา จ.ชลบุรี	เป็นน้ำ มีสีน้ำตาล มีกลิ่นฉุน พีเอช = 5.2		4
9	ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากตลาดนัดพัทยา จ.ชลบุรี	เป็นน้ำ มีสีน้ำตาลดำ มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยวเล็กน้อย พีเอช = 5.7		2

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะตัวอย่างกากตะกอนน้ำเสียและน้ำหมักชีวภาพชนิดต่าง ๆ และจำนวนชนิดจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

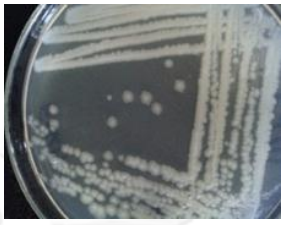
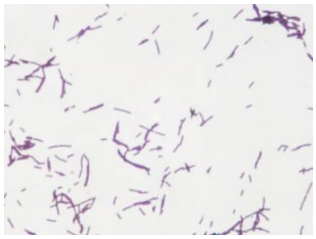
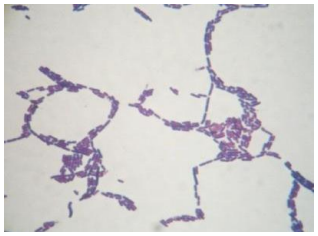
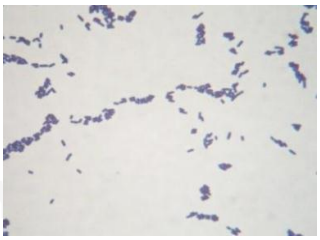
ลำดับที่	แหล่งที่คัดแยก	ลักษณะตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	จำนวนชนิด (ไอโซเลท)
9	ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จากตลาดนัดจตุจักร กทม.	เป็นน้ำ มีสีน้ำตาล มีกลิ่นเหม็นฉุน พีเอช = 5.2		6
11	กากตะกอนน้ำเสีย จ.นครปฐม	เป็นตะกอนเหลว มีสีดำ มีกลิ่นเหม็น		7
รวม				49

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

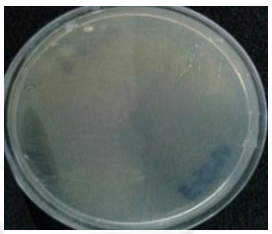
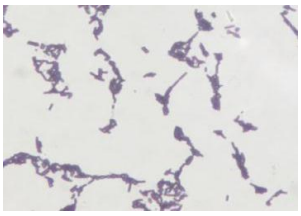
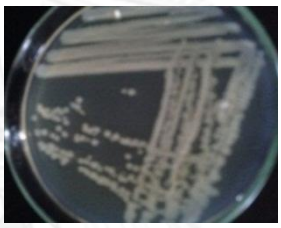
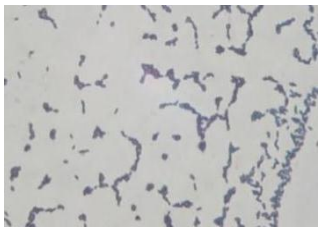
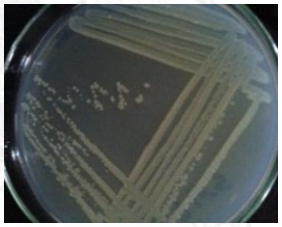
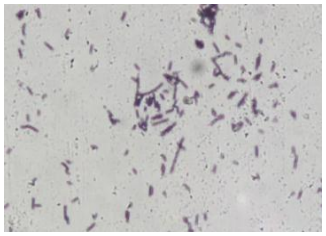
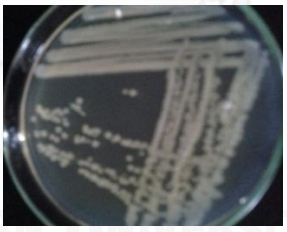
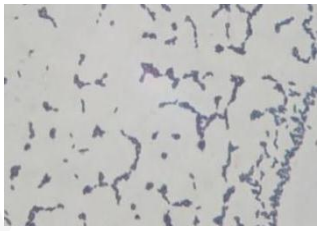
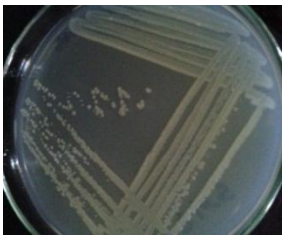
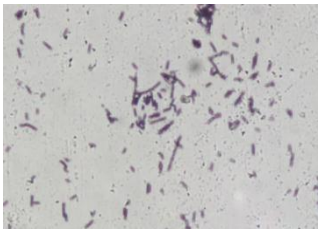
ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลำดับที่	ตัวอย่างจุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
1	P 1	โคโลนีสีขาวผิวมัน ผิวหน้าโคโลนีเรียบ ขอบโคโลนีเรียบ		
2	P 2	โคโลนีสีขาวครีมผิวด้าน ผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
3	P 3	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีด้าน ขอบโคโลนีหยัก เป็นคลื่น โคโลนีนูนสูง		
4	BK 1	โคโลนีสีขาวครีมผิวด้าน ผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีหยักเป็นคลื่น		
5	BK 2	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีด้าน โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		

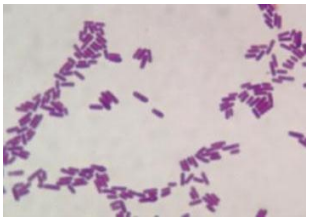
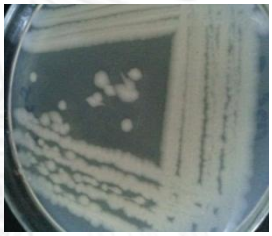
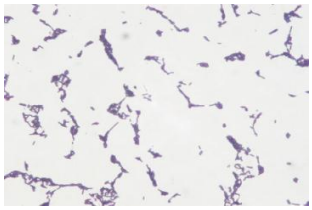
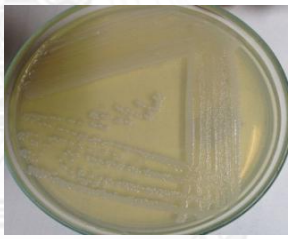
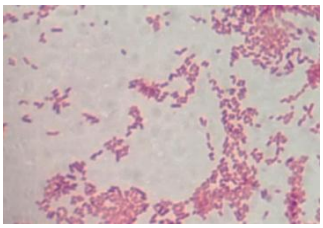
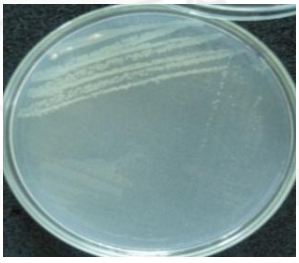
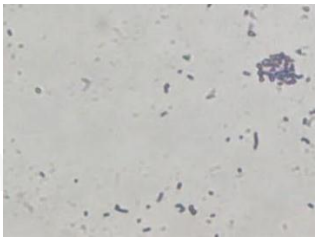
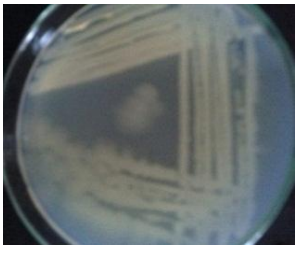
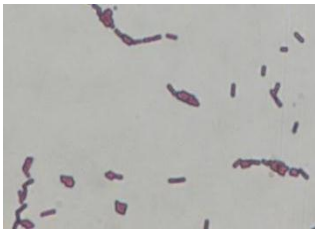
ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลำดับที่	ตัวอย่างจุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
6	BK 3	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีมันวาว โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีหยัก		
7	BK 4	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวโคโลนีมันวาว โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
8	PW 1	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีด้าน โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีหยัก		
9	PW 2	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวโคโลนีด้าน ขอบโคโลนีเรียบ		
10	PW 3	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีด้าน โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ แบนราบ		

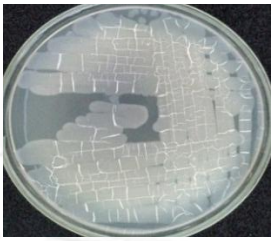
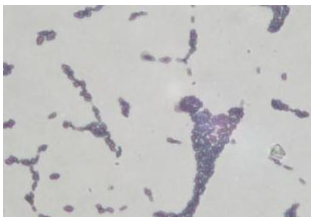
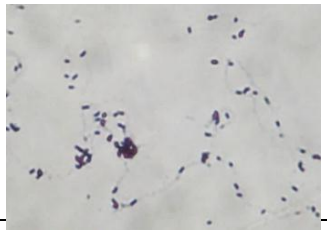
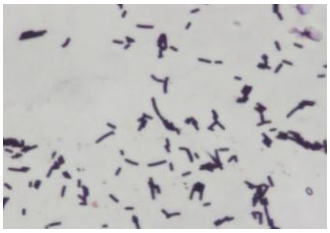
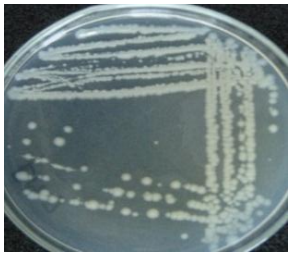
ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลำดับที่	ตัวอย่างจุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
11	PK 1	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวโคโลนีมันวาว โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
12	PK 2	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีมันวาว โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
13	PK 3	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีแผ่ขยาย ผิวโคโลนีมันวาว โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ แบนราบ		
14	PK 4	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีด้าน เป็นคลื่น โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
15	PK 5	โคโลนีสีขาวเหลือง ผิวโคโลนีมันวาว เป็นคลื่น ขอบโคโลนีเรียบ แบนราบ		

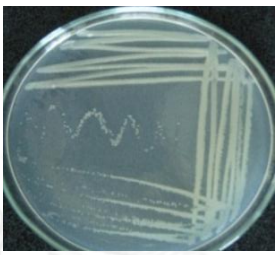
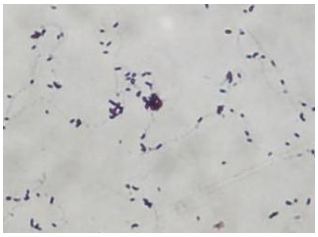
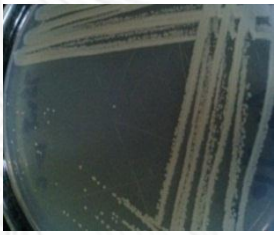
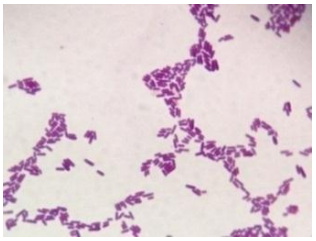
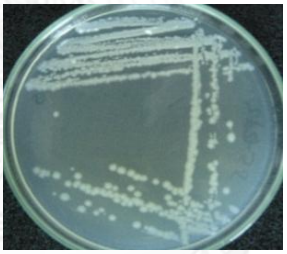
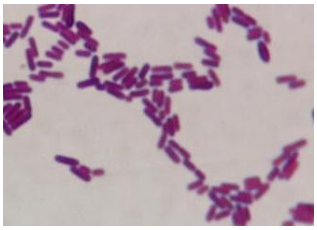
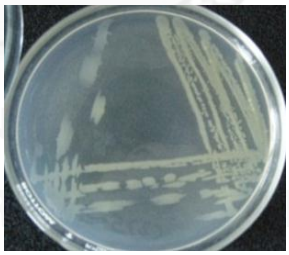
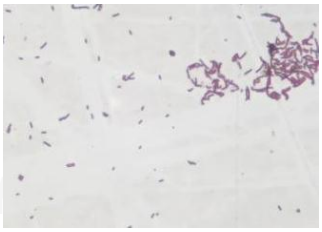
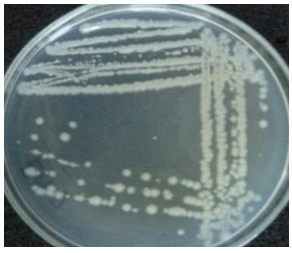
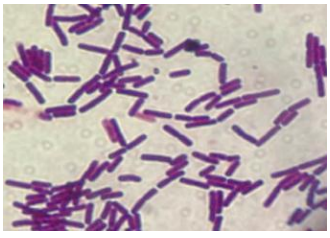
ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลำดับที่	ตัวอย่างจุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
16	PK 6	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีมันวาว เป็นคลื่น โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
17	PK 7	โคโลนีสีขาวเหลือง ผิวโคโลนีมันวาว เป็นคลื่น โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
18	KS 1	โคโลนีสีขาวเหลือง ผิวโคโลนีมัน โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
19	KS 2	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวโคโลนีมันวาว โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
20	KS 3	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีแผ่ขยาย ผิวโคโลนีมัน ขอบโคโลนีหยัก มีกลิ่นเหม็นเล็กน้อย		

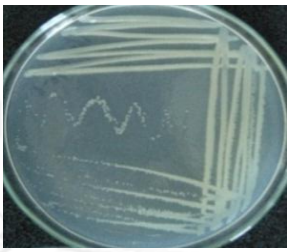
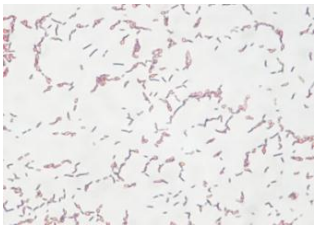
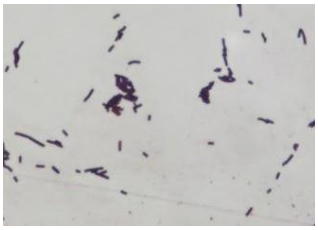
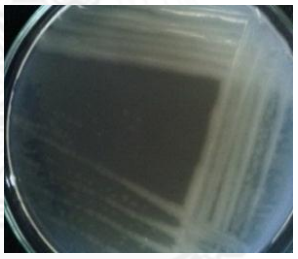
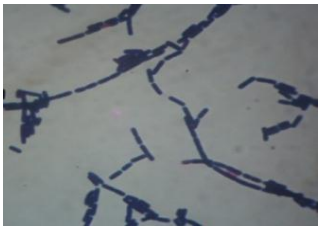
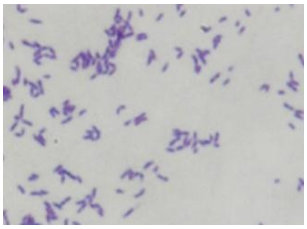
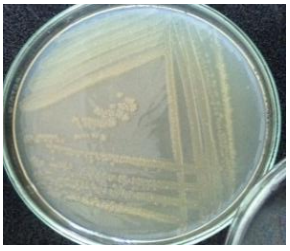
ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลำดับที่	ตัวอย่างจุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
21	KS 4	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีเป็นแผ่นๆ ผิวโคโลนีด้าน ขอบโคโลนีเรียบ		
22	R 1	โคโลนีสีขาวเหลือง โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวโคโลนีมันวาว โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
23	R 2	โคโลนีสีขาวครีม ผิวหน้าโคโลนีเป็นคลื่น โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีหยัก		
24	R 3	โคโลนีสีขาวเหลือง ผิวหน้าโคโลนีด้าน เป็นคลื่น โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีหยัก		
25	R 4	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีด้าน โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		

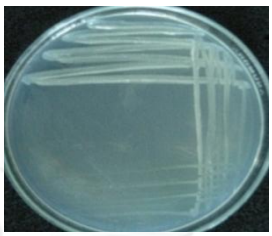
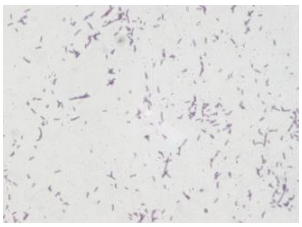
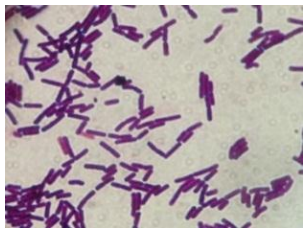
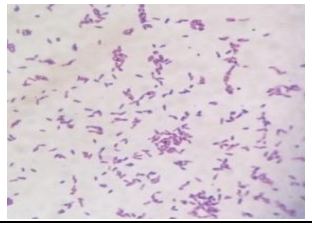
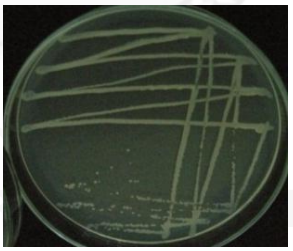
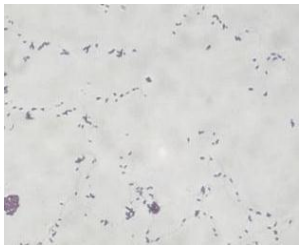
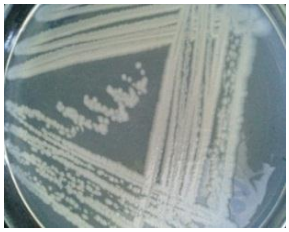
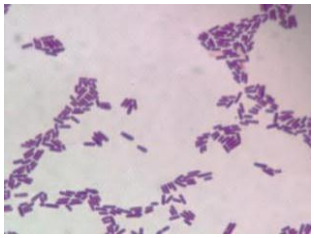
ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลำดับที่	ตัวอย่างจุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
26	R 5	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวโคโลนีด้านโคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
27	R 6	โคโลนีสีขาวเหลือง โคโลนีขนาดเล็ก ผิวด้านผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
28	R 7	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีมันวาว ขอบโคโลนีหยัก โคโลนีนูนสูง		
29	R 8	โคโลนีสีขาวเหลือง โคโลนีแผ่ขยาย ขอบโคโลนีหยัก โคโลนีนูนสูง		
30	R 9	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีมัน ขอบโคโลนีหยัก โคโลนีนูนสูง		

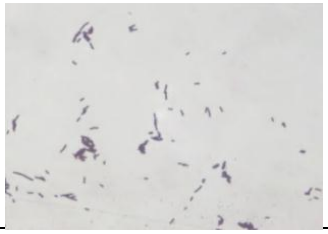
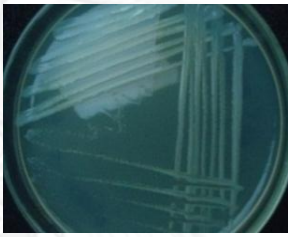
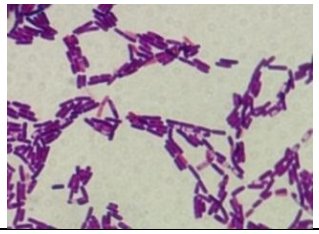
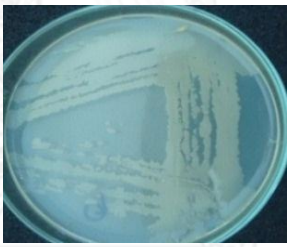
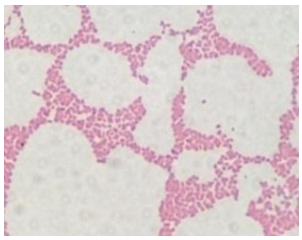
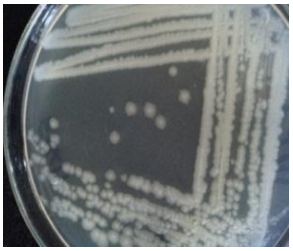
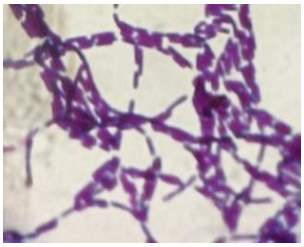
ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลำดับที่	ตัวอย่างจุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
31	PL 1	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีขนาดเล็ก ขอบโคโลนีหยัก โคโลนีนูนสูง		
32	PL 2	โคโลนีสีเหลืองขุ่น ผิวโคโลนีมันวาว เป็นคลื่น ขอบโคโลนีหยัก โคโลนีนูนสูง		
33	PL 3	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวโคโลนีมันวาว โคโลนีแบนราบ ขอบโคโลนีเรียบ		
34	PL 4	โคโลนีสีขาวเหลือง ผิวโคโลนีด้าน เป็นคลื่น ขอบโคโลนีหยัก โคโลนีนูนสูง		
35	QM 1	โคโลนีสีเหลืองขุ่น ผิวโคโลนีมัน เนียนเรียบ ขอบโคโลรเรียบ โคโลนีนูนสูง		

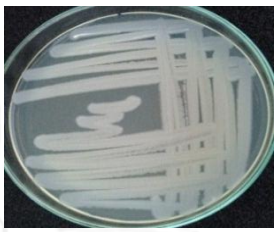
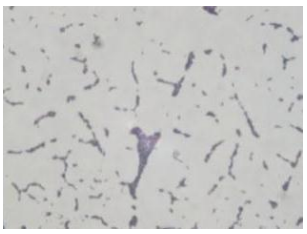
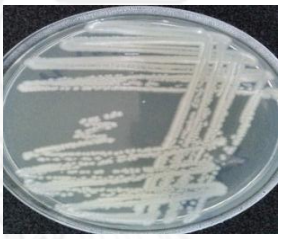
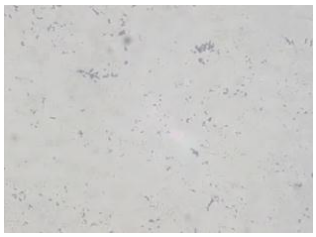
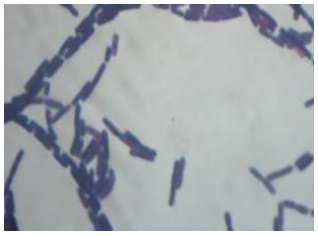
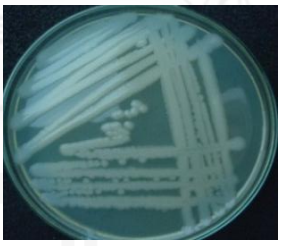
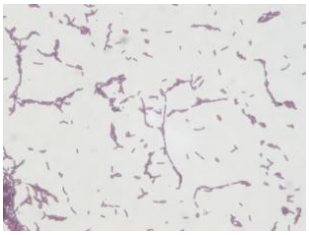
ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลำดับที่	ตัวอย่างจุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
36	QM 2	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวโคโลนีเรียบมันวาว ขอบโคโลนีเรียบ		
37	S 1	โคโลนีสีขาวครีมผิวด้านผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
38	S 2	โคโลนีสีขาวขุ่น โคโลนีขนาดเล็ก ผิวเรียบมันวาว ขอบโคโลนีเรียบ		
39	S 3	โคโลนีสีขาวขุ่น โคโลนีนูนสูง ผิวเรียบด้าน ขอบโคโลนีเรียบ		
40	S 4	โคโลนีมีสีขาว โคโลนีผิวด้าน ผิวหน้าเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีหยัก		

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลำดับที่	ตัวอย่างจุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
41	S 5	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีขนาดเล็ก ผิวมัน ผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
42	S 6	โคโลนีสีขาวครีมผิวมัน โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
43	S 7	โคโลนีสีครีม โคโลนีขนาดเล็ก ผิวมันวาว เรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีหยัก มีกลิ่นเหม็นเล็กน้อย		
44	J 1	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีขนาดเล็กผิวด้านผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
45	J 2	โคโลนีสีขาวครีม ขอบโคโลนีหยัก ผิวหน้าโคโลนีมันด้านโคโลนีนูนสูง		

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลำดับที่	ตัวอย่างจุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
46	J 3	โคโลนีสีขาวครีมผิวด้าน ผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
47	J 4	โคโลนีสีขาวครีมผิวด้าน ผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		
48	J 5	โคโลนีสีขาวครีมผิวด้าน ผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีหยัก		
49	J 6	โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีผิวมัน โคโลนีขอบนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ		

หมายเหตุ P คือ ตัวอย่างผงจุลินทรีย์ จากเขตบางเขน

BK คือ ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จากเขตบางเขน

PW คือ ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จากเขตบางเขน

KS คือ ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จาก อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี

PK คือ ตัวอย่างผงจุลินทรีย์ จากเขตบางเขน

R คือ ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จากท่าน้ำเทเวศน์ กทม.

PL คือ ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จากท่าน้ำเทเวศน์ กทม.

QM คือ ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จากห้างสรรพสินค้า พัทยา ชลบุรี

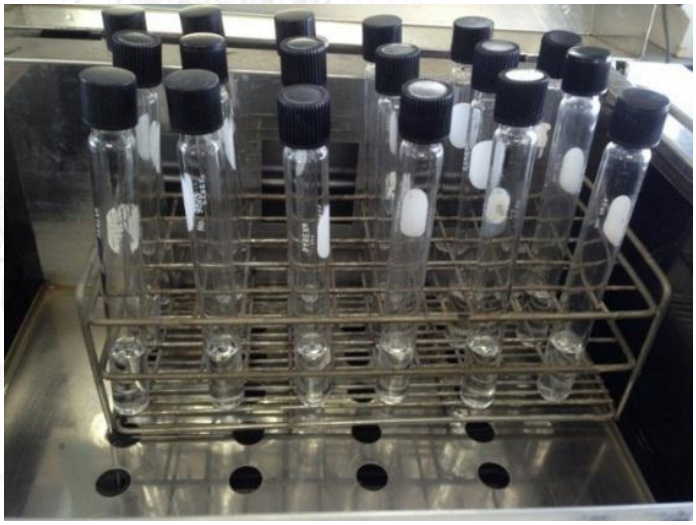
S คือ กากตะกอนน้ำเสีย จ.นครปฐม

J คือ ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จาก ตลาดนัดจตุจักร กทม

คัดแยกจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจนได้ 49 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งใช้เป็นตัวคัดเลือกเอาจุลินทรีย์ที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน ศึกษาลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังตารางที่ 4.2 พบว่ามีแบคทีเรียแกรมลบ 7 ไอโซเลท และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 42 ไอโซเลท ลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะเป็นลักษณะเบื้องต้นเพื่อจะใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียต่อไป

4.2 ประสิทธิภาพการลดซีโอดีน้ำเสียสังเคราะห์ของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 4.1 มาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย โดยเริ่มจากนำแบคทีเรียแต่ละตัวมาทำหัวเชื้อตามวิธีการทดลองที่ 3.2 จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้ไปทดสอบกับน้ำเสียชุมชนสังเคราะห์ (ภาคผนวก ก) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตามการทดลองที่ 3.2.2 (รูปที่ 4.1) พบว่าหัวเชื้อของแบคทีเรียแต่ละตัวที่เติมลงในน้ำเสียสังเคราะห์ของแต่ละหลอดนั้นไม่สามารถลดค่าซีโอดีลงได้เลย อาจมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ในน้ำเสียมีโอกาสสัมผัสกับออกซิเจนภายในหลอดทดลองได้น้อยจึงไม่เพียงพอต่อการลดค่าซีโอดีจึงเปลี่ยนวิธีการวางหลอดทดลองเขย่าแบบใหม่เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวหน้าในหลอดทดลองให้มีปริมาณออกซิเจนมากขึ้น โดยเอียงหลอดทดลองและเขย่าแบบ reciprocal 200 รอบต่อนาที ดังรูปที่ 4.2 สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้ดังตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.1 การเขย่าแบบตั้งหลอดทดลอง

รูปที่ 4.2 การเขย่าแบบเอียงหลอดทดลอง

ดังนั้นการวางหลอดทดลองให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสออกซิเจนมากจะทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียได้เพิ่มขึ้นเพราะในภาวะที่มีการให้อากาศจุลินทรีย์จะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจและสร้างพลังงานได้มากกว่าภาวะไร้ออกซิเจนจุลินทรีย์จึงสามารถย่อยสารอินทรีย์ได้เร็ว (นงลักษณ์และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

จากตารางที่ 4.3 คัดแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท ที่สามารถลดค่าซีโอดีได้สูงสุด ในเวลา 48 ชั่วโมง ได้แก่ P2, R6, PL3, S1, S2, S6, S7, J1, J2 และ J5 ไว้เป็นหัวเชื้อ แบคทีเรียที่คัดไว้ 10 ไอโซเลท สามารถลดค่าซีโอดีจากค่าซีโอดีเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงเหลือ 299.73, 321.07, 331.73, 344.40, 347.73, 353.07, 369.07, 369.07, 374.40, และ 379.73 ตามลำดับซึ่งมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย คือ 70.03, 67.89, 66.83, 65.56, 65.23, 64.69, 63.09, 63.09, 62.56, และ 62.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การที่ทั้ง 10 ไอโซเลท สามารถลดค่าซีโอดีได้มากกว่าไอโซเลทอื่น ๆ นั้น แสดงว่าเป็นแบคทีเรียที่เหมาะสมกับน้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้จึงสามรถเจริญเติบโตได้เร็วกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีของน้ำเสียชุมชนสังเคราะห์ (ตารางที่ 4.3) พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากกากตะกอนน้ำเสียจังหวัดนครปฐมนั้นมีจุลินทรีย์ที่สามารถลดค่าซีโอดีมากที่สุด คือ 4 ไอโซเลท, ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จากตลาดนัดจตุจักร 3 ไอโซเลท, ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จากท่าน้ำเทเวศน์ กทม., ตัวอย่างผงจุลินทรีย์ จากเขตบางเขน และตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จากท่าน้ำเทเวศน์ กทม. อย่างละ 1 ไอโซเลท จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่มาจากธรรมชาติไม่ผ่านการแปรรูปจะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่า

ตารางที่ 4.3 ค่าซีโอดีน้ำออกของจุลินทรีย์แต่ละตัวที่คัดแยกได้

ลำดับที่	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์	ค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	% การบำบัดน้ำเสีย
1	P 1	433.07	56.69
2	P 2*	344.40	65.56
3	P 3	962.13	3.79
4	BK 1	747.73	25.23
5	BK 2	705.07	29.49
6	BK 3	822.40	17.76
7	BK 4	753.73	24.63
8	PW 1	801.07	19.89
9	PW 2	962.13	3.79
10	PW 3	840.26	15.97
11	PK 1	566.40	43.36
12	PK 2	731.73	26.83
13	PK 3	833.07	16.69
14	PK 4	790.40	20.96
15	PK 5	875.73	12.43
16	PK 6	833.07	16.69
17	PK 7	699.73	30.03
18	KS 1	801.07	19.89
19	KS 2	571.73	42.83
20	KS 3	678.40	32.16
21	KS 4	651.73	34.83
22	R 1	662.40	33.76
23	R 2	790.40	20.96
24	R 3	683.73	31.63

ตางรางที่ 4.3 (ต่อ) ค่าซีโอดีน้ำออกของจุลินทรีย์แต่ละตัวที่คัดแยกได้

ลำดับที่	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์	ค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	% การบำบัดน้ำเสีย
25	R 4	673.07	32.69
26	R 5	401.07	59.89
27	R 6*	369.07	63.09
28	R 7	539.73	46.03
29	R 8	944.45	5.56
30	R 9	886.40	11.36
31	PL 1	737.07	26.29
32	PL 2	523.73	47.63
33	PL 3*	321.07	67.89
34	PL 4	881.07	11.89
35	QM 1	726.40	27.36
36	QM 2	603.73	39.63
37	S 1*	331.73	66.83
38	S 2*	374.40	62.56
39	S 3	689.07	31.09
40	S 4	619.73	38.03
41	S 5	582.40	42.83
42	S 6*	353.07	64.69
43	S 7*	379.73	62.03
44	J 1*	369.07	63.09
45	J 2*	299.73	70.03
46	J 3	737.07	26.29
47	J 4	459.73	54.03
48	J 5*	347.73	65.23
49	J 6	689.07	31.09

หมายเหตุ * คือ จุลินทรีย์ที่สามารถลดค่าซีโอดีได้สูงสุด 10 อันดับแรก

4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลุ่มจุลินทรีย์

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง **10** ไอโซเลท ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ตามวิธีการทดลองที่ 3.5 พบว่าได้แบคทีเรียดังนี้ (ตารางที่ 4.4)

- *Bacillus* sp. เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง เซลล์ติดแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ มี 1 ต่อ 1 ส่วนใหญ่มีการเคลื่อนที่โดยใช้ lateral flagella ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph เมแทบอลิซึมเป็นแบบ respiration 4 ไอโซเท

-*Pseudomonas* sp**.** เป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างเป็นแท่งตรงหรือโค้งเล็กน้อย เซลล์ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella แบบ monotrichous หรือ multitrichous ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph metabolism เป็นแบบ respiration หรือ facultative chemolithotroph ขึ้นอยู่กับชนิด 2 ไอโซเลท

- *Escherichieae* sp. เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งตรง อยู่เดี่ยวๆหรืออยู่เป็นคู่ เคลื่อนที่โดยใช้ peritrichous flagella หรือไม่เคลื่อนที่ก็ได้ ขึ้นได้บนอาหารง่าย ๆ สามารถใช้แอซีเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สามารถใช้ซิเตรท กลูโคส และคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ จะถูกหมักเกิดกรดแลกติก แอซีติก และฟอร์มิก บางส่วนของฟอร์มิกจะถูกย่อยโดย hydrogenlyase ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และ ไฮโดรเจน 1 ไอโซเลท

- *Lysinibacillus* sp. เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง เซลล์ติดสีแกรมบวก มีลักษณะคล้ายๆกับจุลินทรีย์กลุ่ม *bacillus* sp. 2 ไอโซเลท

- *Brevibacillus* sp. เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง เซลล์มีทั้งแกรมบวก และแกรมลบ เป็นส่วนหนึ่งของแฟมิลี่ *Paenibacillaceae* 1 ไอโซเลท (Paul และคณะ, 2009)

ตารางที่ 4.4 จีนัส และสปีชีส์ของจุลินทรีย์ที่จำแนกได้

ลำดับที่	รหัส	ชนิดจุลินทรีย์
1	J1	*Pseudomonas aeruginosa*
2	J2	*Bacillus subtilis*
3	J5	*Bacillus cereus*
4	S1	*Bacillus thuringiensis*
5	S2	*Lysinibacillus fusiformis*
6	S6	*Lysinibacillus sphaericus*
7	S7	*Bacillus mycoides.*
8	P2	*E. coli*
9	R6	*pseudomonas putida*
10	PL3	*Brevibacillus choshinensis*

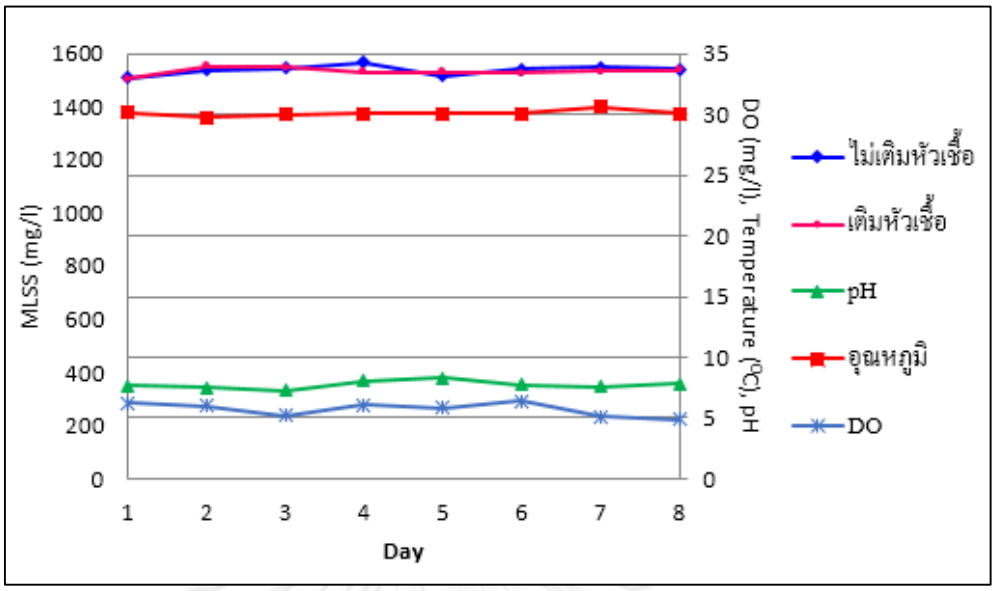
จากตารางที่ 4.4 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท นั้นเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดินและน้ำ ไม่ใช่เชื้อก่อโรคมีการดำรงชีวิตได้ดีในสภาวะใช้ออกซิเจน สามารถเจริญเติบโตและใช้พลังงานจากสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ ไม่ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ สามารถเพิ่มจำนวนและมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 20-42 องศาเซลเซียส (Paul และคณะ, 2011)

จากการศึกษาของ Volodymyr และคณะ (2006) ได้คัดแยกแบคทีเรีย *Klebsiella pneumonia* strain B และ *Pseudomonas veronii* strain F จากเม็ดจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน แสดงว่าชนิดทางจุลินทรีย์ในระบบบำบัดอาจแตกต่างกันได้

4.4 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบ sequencing batch reactor (SBR)

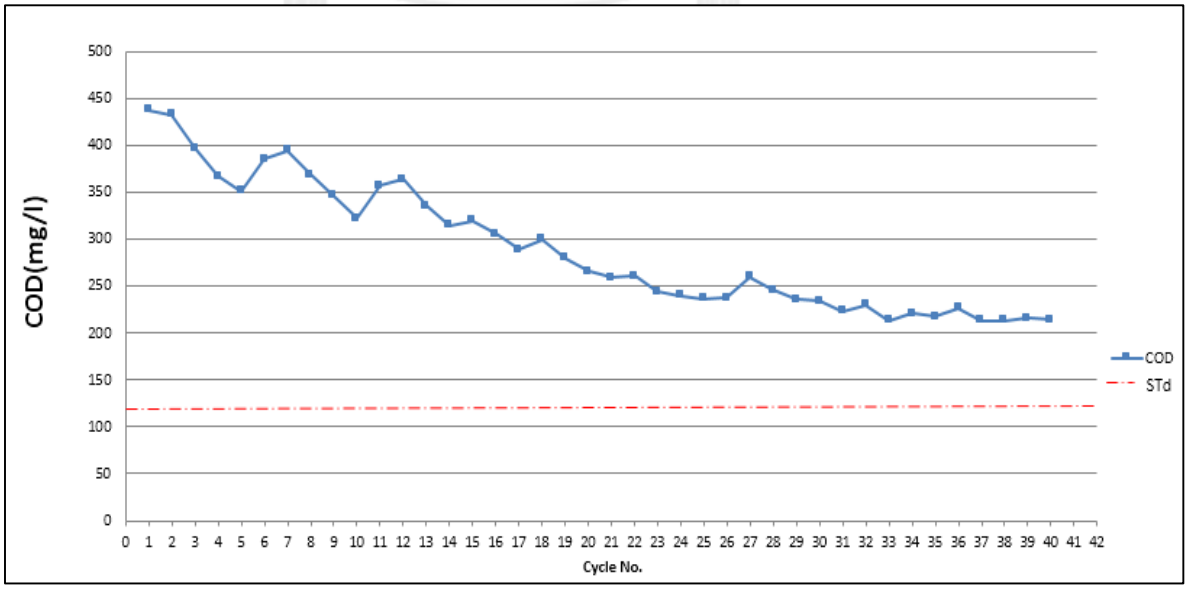
ทำการเดินระบบบำบัดน้ำเสียระบบเอสบีอาร์โดยเติมเฉพาะกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรี เป็นถังควบคุม และเติมกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรีรวมกับกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ในถังทดลองตามวิธีการทดลองที่ 3.3.2 โดยมีการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ดังนี้ คือ ค่าซีโอดีเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าดีโอ ≥ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร pH ในช่วง 6.9-8.6 ที่อุณหภูมิ 29.3-31.0 องศาเซลเซียล และควบคุมปริมาณกากตะกอนน้ำเสีย (MLSS) ให้คงที่ที่ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3) และค่า F/M เท่ากับ 0.44/รอบ ทำการเดินระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ โดยควบคุมเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้ เติมน้ำเสีย 5 นาที, ให้อากาศ 60 นาที, ตกตะกอน 40 นาที, ระบายน้ำออก 5 นาที (ดัดแปลงจาก Volodymyr และคณะ, 2006)

จากการคำนวณ F/M จะเห็นได้ว่า แต่ละรอบของการเดินระบบบำบัดนั้นมีค่า F/M เท่ากับ0.44/cycle ซึ่งมีค่าสูงอยู่ในช่วง high rate แสดงว่าน้ำเสียชุมชนสังเคราะห์ที่เติมลงไปนั้นมีค่าซีโอดีสูงหรือมีปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำสูง ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้หมด หรืออาจเป็นเพราะในน้ำเสียมีสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายยากจึงทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายได้



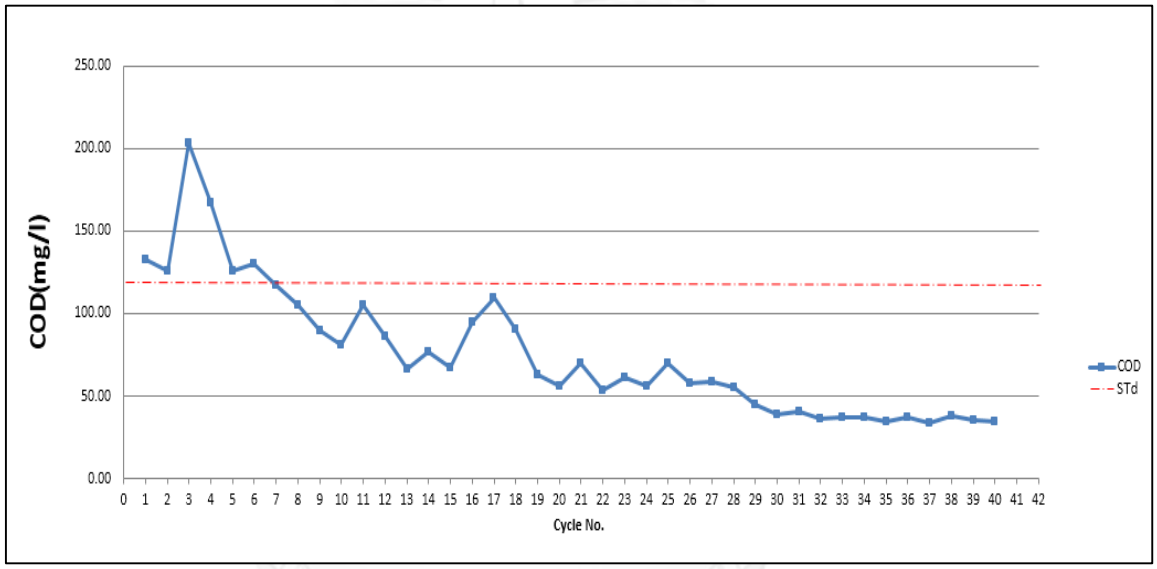
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงค่าพารามิเตอร์ในถังปฏิกรณ์ที่เติมกากตะกอนน้ำเสียและถังปฏิกรณ์ทีเติมกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรี+หัวเชื้อจุลินทรีย์

จากการเดินระบบบำบัดน้ำเสียของถังควบคุม พบว่าการเดินระบบรอบที่ 1 - 15 ค่าซีโอดีลดลงมาอยู่ในช่วง 319.47 - 437.47 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่รอบที่ 16 - 40 มีค่าซีโอดีลดลงเหลืออยู่ในช่วง 305.47 - 212.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ระบบบำบัดน้ำเสียเข้าสู่สภาวะเสถียรตั้งแต่รอบที่ 37 มีค่าซีโอดีที่สภาวะเสถียรคือ 212.80 ± 1.15 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4) โดยมีค่า DO 5.36 มิลลิกรัมต่อลิตร, ค่า pH 7.8, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่คุณภาพน้ำออกของถังปฏิกรณ์นี้ยังไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้ง ซึ่งค่าซีโอดีที่ตรวจวัดได้จะต้องมีค่าไม่เกิน 120 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ., 2539)



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่าซีโอดีน้ำออกของถังปฏิกรณ์ที่เติมกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรี

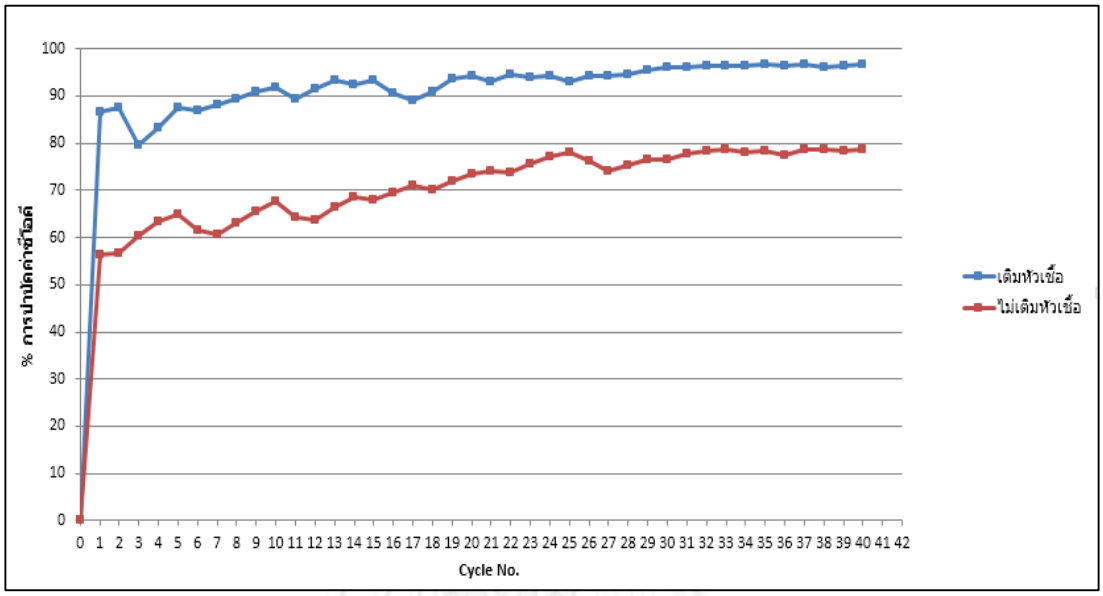
จากนั้นจึงนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ตามตารางที่ 4.4 ทั้ง 10 ไอโซเลท มาสร้างเป็นกลุ่มหัวเชื้อดังการทดลองที่ 3.3 จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้ไปเติมในถังปฏิกรณ์แบบ SBR โดยถังทดลองเดินระบบแบบเดียวกับถังควบคุม ก่อนเติมกลุ่มหัวเชื้อลงไปมีการดูดน้ำเสียจากช่องนนทรีออกมา 150 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมกลุ่มหัวเชื้อ 150 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อเป็นการปรับปริมาณของถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถัง ให้เท่ากันเมื่อเดินระบบ พบว่า รอบที่ 1 - 10 มีค่าซีโอดีลดลงเหลืออยู่ในช่วง 202.80 - 104.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่รอบที่ 11 - 40 มีค่าซีโอดีลดลงเหลืออยู่ในช่วง 95.59 - 33.47 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยระบบบำบัดน้ำเสียเข้าสู่สภาวะเสถียรตั้งแต่รอบที่ 30 ที่ภาวะเสถียรซีโอดีลดลงเหลือ 33.47 ± 1.15 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.5) ค่า DO 5.29 มิลลิกรัมต่อลิตร, ค่า pH 7.7, อุณหภูมิ 29.9 ซึ่งมีคุณภาพน้ำออกเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้ง (กรมควบคุมมลพิษ, 2539)



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่าซีโอดีน้ำที่ออกจากถังปฏิกรณ์ที่เติมกลุ่มหัวเชื้อกับกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรี

จากการทดลองทั้ง 2 ถัง พบว่าหลังการเดินระบบรอบแรกค่าซีโอดีของน้ำที่ออกจากถังควบคุมลดลงเหลือ 437.47 มิลลิกรัมต่อลิตร การลดลงเป็นส่วนหนึ่งของการเจือจางความเข้มข้นของกากตะกอน ส่วนที่ภาวะเสถียรของน้ำที่ออกจากถังทดลองคือ 202.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งค่าซีโอดีลดลงมากกว่า 1 เท่า ค่าซีโอดีคงเหลือของถังควบคุมและถังทดลองคือ 212.80 และ 33.47 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย คือ 78.72 เปอร์เซ็นต์ และ 96.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.6 และมีค่า MLSS, DO, pH, อุณหภูมิ ในช่วงภาวะเสถียรใกล้เคียงกันดังรูปที่ 4.3 ถังทดลองพบว่ามีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียเพิ่มขึ้น 17.93 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงไปนั้นสามารถเจริญเติบโตรวมตัวกับกากตะกอนเป็นฟล็อคในตะกอนน้ำเสียส่งผลให้การบำบัดน้ำเสียนั้นมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น เมื่อคิดประสิทธิภาพการบำบัดค่าซีโอดีของกากตะกอนที่ภาวะเสถียรจะพบว่าถังควบคุม กากตะกอนบำบัดค่าซีโอดีได้

0.52 มิลลิกรัมซีโอดีต่อมิลลิกรัมกากตะกอน-ลิตร-รอบ ในขณะที่ถังทดลองกากตะกอนบำบัดค่าซีโอดีได้ 0.64 มิลลิกรัมซีโอดีต่อมิลลิกรัมกากตะกอน-ลิตร-รอบ



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงค่าประสิทธิภาพการบำบัดค่าซีโอดีคงเหลือไม่เติมและหลังการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์

ผลการทดลองสอดคล้อง (Val del Rio และคณะ (2006) ที่ใช้คือ *Klebsiella pneumonia* strain B และ *Pseudomonas veronii* strain F ที่คัดแยกจากเม็ดจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน ผสมกับกากตะกอนน้ำเสียในระบบบำบัดแบบเอสบีอาร์ พบว่าช่วยทำให้ระบบบำบัดน้ำเสียมีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีได้ดีขึ้นเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ และเข้าสู่สภาวะเสถียรหลังจากผ่านไป 8 วัน การใช้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ในสภาวะใช้ออกซิเจนยังช่วยให้เม็ดตะกอนจุลินทรีย์ในระบบตกตะกอนได้เร็วขึ้นอีกด้วย (Morgenroth, 1997)

Alam และคณะ (2003) ได้ศึกษาการใช้กลุ่มเชื้อ *Penicillium corylophilum* และ *Aspergillus niger (P/A)* บำบัดน้ำเสียชุมชนพบว่าสามารถลดค่าซีโอดีได้สูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์

Jin และคณะ (2005) ได้ศึกษาการใช้กลุ่มเชื้อ *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718), *Nitrobacteria winogradskyi* (DSMZ 10237), *Bacillus licheniformis* (CGMCC 0766), *Bacillus megaterium* (CGMCC 0767) และ *Bacillus sphaericus* (CGMCC 0764) บำบัดน้ำเสียชุมชนพบว่าสามารถลดค่าซีโอดีได้ 91.7 เปอร์เซ็นต์ จากกลุ่มเชื้อข้างต้นจะเห็นได้ว่าเป็นกลุ่มเชื้อที่มาจากหน่วยเก็บคลังเชื้อซึ่งไม่ได้คัดแยกมาเอง เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ทางการค้า ในการบำบัดน้ำเสียจะเห็นได้ว่ากลุ่มเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ทางการค้านั้นมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียได้ดีกว่าคือ

96.65 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการทำงานของระบบบัดน้ำเสียต้องการจุลินทรีย์เป็นกลุ่มเพราะจุลินทรีย์เหล่านั้นจะทำงานเสริมกันทำให้ระบบบำบัดน้ำเสียมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียได้ดีขึ้น

4.5 ศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์บำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์

เมื่อนำกากตะกอนน้ำเสียจากถังปฏิกรณ์ที่เติมกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงไปกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรีมาทำการคัดแยกเชื้อ (การทดลอง 3.4) และไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (การทดลอง 3.5) พบว่ามีกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ในถังปฏิกรณ์ทั้งหมด 8 ไอโซเลท ดังตารางที่ 4.5

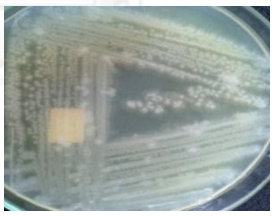
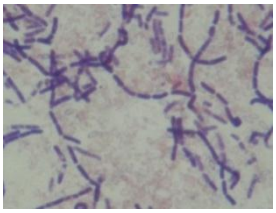
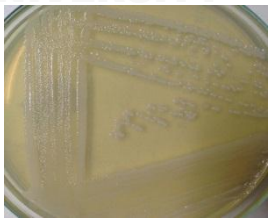
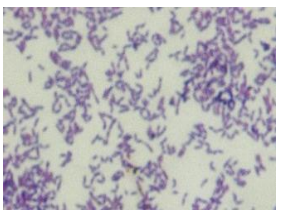
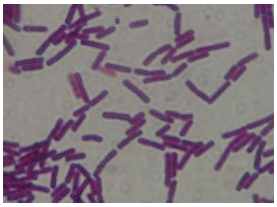
หัวเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 10 ไอโซเลท ที่เติมลงไปในถังปฏิกรณ์นั้นเหลือเพียง 5 ไอโซเลท คือ *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Brevibacillus choshinensis* และ *Escherichia coli* เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับแบคทีเรียตารางที่ 4.4 เพื่อใช้เป็นตัวติดตามกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในถังบำบัดน้ำเสีย พบว่าแบทีเรียที่เหลืออยู่ 5 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียที่สามารถปรับตัวอยู่ในสภาะแวดล้อมใหม่ได้ และมีบทบาทในการบำบัดน้ำเสียได้อบ่างมีประสิทธิภาพ ส่วนแบคทีเรียที่หายไป 5 ไอโซเลท อาจเป็นเพราะว่าไม่สามารถปรับตัวในสภาวะแวดล้อมใหม่ได้ จึงถูกชะออกมากับน้ำทิ้งที่ออกจากถังปฏิกรณ์ และแบคทีเรียที่คัดแยกเพิ่มได้ 3 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ และชนิดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (ตารางที่ 4.6) คือ *Bacillus megaterium, Bacillus licheniformis* และ *Corynebacterium* sp (ตารางที่ 4.5) แสดงว่าในกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรีมีจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพคือ 3 ไอโซเลทนี้ ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เหลือเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์หลักที่สามารถอยู่รวมกันได้ในสภาพกลุ่มจุลินทรีย์ผสมและมีประสิทธิภาพในทำงานร่วมกันได้เป็นอย่างดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.5 จีนัส และสปีชีส์ของจุลินทรีย์ที่จำแนกได้ในถังปฏิกรณ์ที่เติมกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงไปกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรี

ลำดับที่	สายพันธุ์จุลินทรีย์
1	*Pseudomonas aeruginosa* J1
2	*Bacillus subtilis* J2
3	*Bacillus cereus* J5
4	*Brevibacillus choshinensis* PL3
5	*Escherichia coli* P2
6	*Bacillus licheniformis*
7	*Corynebacterium* sp.
8	*Bacillus megaterium*

ตารางที่ 4.6 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ และชนิดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

ลำดับที่	สายพันธุ์จุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x)
1	*Bacillus licheniformis*	โคโลนีสีขาวครีม ผิวมัน ผิวหน้าเป็นคลื่น ขอบโคโลนีหยัก โคโลนีนูนสูง		
2	*Corynebacterium* sp.	โคโลนีสีขาวครีม ผิวโคโลนีมมันวาว ขอบโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง		
3	*Bacillus megaterium*	โคโลนีสีขาว ผิวโคโลนีด้าน ขอบโคโลนีเป็นหยัก โคโลนีนูนสูง		

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสีย โดยคัดแยกจุลินทรีย์ชนิดที่ใช้อากาศหายใจจากธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ทางการค้า ทั้งแบบผงและแบบน้ำ เพื่อสร้างกลุ่มจุลินทรีย์สำหรับบำบัดน้ำเสียชุมชน

จากการนำตัวอย่างจากธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ทางการค้าทั้ง 11 ตัวอย่าง มาทำการคัดแยกในอาหาร NA ลักษณะโคโลนีเพื่อเป็นการจำแนกจุลินทรีย์เบื้องต้น และนำไปศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตเร็วได้ทั้งหมด 49 ไอโซเลท จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกถึง 42 ไอโซเลท และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 7 ไอโซเลท และแบคทีเรียส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นท่อน

จาก 49 ไอโซเลท คัดจุลินทรีย์ 10 ไอโซเลทที่สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้ดีที่สุด นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีผลทดสอบแสดงว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus aeruginosa, Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Brevibacillus choshinensis*, *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Lysinibacillus sphaericus*, และ *Lysinibacillus fusiformis* ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท เป็นกลุ่มที่ไม่ก่อโรค สามารถใช้บำบัดน้ำเสียได้

เมื่อนำแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท มาทำเป็นกลุ่มหัวเชื้อเติมลงไปในถังปฏิกรณ์บำบัดน้ำเสียชุมชนสังเคราะห์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียขึ้นจาก 78.72 เปอร์เซ็นต์ เป็น 96.65 เปอร์เซ็นต์ และเข้าสู่สภาวะเสถียรได้เร็วขึ้นในรอบที่ 30 จากเดิมเสถียรในรอบที่ 37 และจาก F/M มีค่าเท่ากับ 0.44/รอบ แสดงว่าการบำบัดน้ำเสียของระบบอยู่ในภาวะ high rate treatment อย่างไรก็ตามยังคงมีค่าซีโอดีในน้ำออกจากระบบของถังปฏิกรณ์กากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรีและถังปฏิกรณ์เติมกลุ่มหัวเชื้อลงในกากตะกอนน้ำเสียจากช่องนนทรีมีค่าเท่ากับ 212.80±1.15 และ 33.47±1.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อทำการจำแนกประชากรจุลินทรีย์จากกากตะกอนถังปฏิกรณ์ที่เติมกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ชุมชนจนเข้าสู่ภาวะเสถียรแล้ว พบว่าจุลินทรีย์ที่เป็นประชากรหลักทั้งหมด 10 ไอโซเลท ที่เติมลงไปนั้นเหลือแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท คือ *Bacillus* subtilis, *Escherichia coli*, *Brevibacillus choshinensis, Pseudomonas aeruginosa,* และ *Bacillus*

cereus, และพบแบคทีเรียอื่นอีก 3 ไอโซเลท คือ *Bacillus megaterium, Bacillus licheniformis* และ *Corynebacterium* sp ซึ่งอาจเป็นประชากรหลักในกากตะกอนน้ำเสียช่องนนทรี แสดงว่ากลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หลักที่เป็นประชากรสามารถอยู่รวมกันได้ในสภาพกลุ่มแบคทีเรียผสม

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการใช้กลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์หลักที่เหลือ 5 ไอโซเลท คือ *Bacillus* subtilis, *Escherichia coli*., *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus,* และ *Brevibacillus choshinensis* อีกครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันว่าถ้าเติมกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์แค่ 5 ไอโซเลท กลุ่มหัวเชื้อจะยังสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพหมือนเดิมหรือไม่

2. ควรมีการศึกษาการใช้น้ำเสียจริงเพื่อให้ใกล้เคียงกับสภาพความเป็นจริงของการเดินระบบบำบัดน้ำเสียต่อไป

3. ควรมีการศึกษาการบำบัดน้ำเสียแบบระบบเปิดเพื่อให้เหมือนจริงกับระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้บำบัดน้ำเสียโดยทั่วไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Alam, Z. M., L-Razi, F. A., ABD-Aziz, S., & H.A., M. (2003). Optimization of compatible mixed cultures for liquid state bioconversion of municipal wastewater sludge. *Water, Air and Soil Pollution, 149*, 113-126.

Cristiani-Urbina, E., Netzahuatl-Munoz, R.A., Manriquez-Rojas, J.F., Juarez-Ramirez, C., Ruiz-Ordaz, N., Galindez-Mayer, J. (2000). Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. *Process Biochemistry, 35*, 649-657.

Emad, A. S. (2011). Prospects of effective microorganisms technology in wastes treatment in Egypt. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 243-248.

Jin, M., Wang, X.-W., Gong, T.-S., Gu, C.-Q., Zhang, B., Shen, Z.-Q., Li, J.-W. . (2005). A novel membrane bioreactor enhanced by effective microorganisms for the treatment of domestic wastewater. *Apply Microbial Biotechnol, 69*, 229-235.

John, G. H., Noel, R. K., Peter, H. A. S., James, T. S., Stanley, T. W. . (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Kimura, T., Ito, Y. . (2001). Two Bacteria Mixed Culture System Suitable for Degrading Terephthalate in Wastewater. *Journal of Bioengineering, 91*, 416-418.

Kiss, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P., Sannia, G. . (2001). Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Apply Microbiol Biotechnol., 57*, 221-226.

Mace, S., Mata-Alvarez, J. . (2002). Utilization of SBR Technology for Wastewater Treatment: An Overview. *Industrial Engineering Chemical Reserch, 41*, 5539-5553.

Malandra, L., Wolfaardt, G., Zietsman, A., Viljoen-Bloom M. (2003). Microbiological of a biological contactor for winery wastewater treatment. *Water Research, 37*, 4125-4413.

Metcalf, E. (1991). *Wastewater Engineering Treatment Disposal and Reuse*.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Mishra, B. K., Arora, A., Lata. (2004). Optimization of a biological for treating potato chips industry wastewater using a mixed culture of Aspergillus foetidus and Aspergillus niger *Bioresource Technology, 94*, 9-12.

Morgenroth, E., Sherden, T. I, Van-Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J,. Wilderre, P. A. . (1997). Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Reserch, 31*, 3191-3194.

Paul, V., George, G., Dorothy, O., Noel, R., K., Wolfgang, L., Fred, A., R., Karl-Heinz, S., William, B., W. (2009). *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Second Edition*.

Pell, M., WÖrman, A. . (2008). Biological Wastewater Treatment Systems. *Ecosystem/ Biological Wastewater Treatment Systems*, 426-441.

Ryznar-Luty, A., Krzywonos, M., Cibis, E., Miskiewicz, T. . (2008). Aerbic Biodegradation of Vinasse by a Mixed Culture of Bacteria of the Genus Bacillus: Optimization of Temperatyre, pH and Oxygenation State. *Polish Journal of Environ Stud, 17*, 101-112.

Tsang, Y. F., Hua, F.L., Chua, H., Sin, S.N., Wang, Y.J. . (2007). Optimization of biological treatment of paper mill effluent in a sequencing batch reactor. *Biochemical Engineering Journal, 34*, 193-199.

Tusanee T., S. S. (2008). Decolorization of molasses wastewater by Lactobacillus plantarum No. PV71-1861. *Bioresource Technology, 99*, 6258–6265

Val del Rio, A., Figueroa, M., Arrojo, B., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., G. García-Torriello, G., Méndez, R. . (2012). Aerobic granular SBR systems applied to the treatment of industrial effluents. *Journal of Environmental Management, 95*, S88-S92.

Volodymyr, I., Xiao-Hui, W., Tiong-Lee, S., T., Joo-Hwa, T. (2005). Bioaugmentation and enhanced formation of microbial granules used in aerobic wastewater treatment. *Apply Microbial Biotechnol, 70*, 374-381.

Zhao, D., Liu C., Zhang, Y., Liu, Q. 2011. Biodegradation of nitrobenzene by aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor (SBR). Desalination. *281*, 17-22.

กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม และสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. (2545). ตำราระบบบำบัดมลพิษน้ำ. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ.

กรมควบคุมมลพิษ. (2539). กำหนดการมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม.

จุฑากานต์ บุญมี. (2553). การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทวี สิทธิลู่ตระกูล. (2549). การหาความสัมพันธ์ของ *BOD, COD,* และ *TOC* ในน้ำเสียและน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียชนิดตะกอนเร่ง. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2547). จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. (2543). คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. (2552). ระบบบำบัดน้ำเสีย การเลือกใช้ การออกแบบ การควบคุม และการแก้ปัญหา. สำนักพิมพ์ท้อป จำกัด.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2548). จุลชีววิทยาของน้ำเสีย. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรอรรถ ศุภจัตุรัส. (2545). การศึกษาการใช้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้บำบัดไขมันในระบบบำบัดน้ำเสีย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient Agar (NA)

สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
แบคโตเปปโตน	3	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°Cเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวNutrient Broth (NB)

สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
แบคโตเปปโตน	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar

มันฝรั่ง	200	กรัม
เดกซ์โทรส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อาหารน้ำเสียสังเคราะห์ (ดัดแปลงจาก Suntud, 2000)

กลูโคส	3.168	กรัมต่อลิตร
ยูเรีย	0.076	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.313	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa)	0.1	กรัมต่อลิตร
โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	0.5	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

นำโปตัสเซียมไดโครเมตไปอบแห้งที่ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วชั่งมา 4.913 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 167 มิลลิลิตร และเติมเมอคิวรักซัลเฟต 33.3 กรัม ทิ้งให้ละลายแล้วปล่อยให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายกรดซัลฟูริก

เติมซิลเวอร์ซัลเฟต5.5 กรัม ลงในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 540 มิลลิลิตร หรือ 1 กิโลกรัม ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน ให้ซิลเวอร์ซัลเฟตละลาย เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์

ละลาย 1,10-ฟีแนนโทลีนโมโนไฮเดรต1.485 กรัม และเฟอริกซัลเฟต695 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นและเจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่มีหลอดหยดที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต

นำโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลตมาบดแล้วอบแห้งที่ 120 องศาเซลเซียส แล้วชั่งมา 425 มิลลิลิตร และละลายด้วยน้ำกลั่นและเจือจางจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ซึ่งโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต 1 กรัม มีซีโอดีเท่ากับ 1.176 กรัม ออกซิเจนและสารละลายนี้จะมีซีโอดีเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

ภาคผนวก ค

COD (Chemical Oxygen Demand)

1. ความหมายของ COD

ปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ต้องการเพื่อใช้ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ในน้ำให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำโดยตัวออกซิเจนอย่างแรง (Strong oxidizing agent) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด

2. หลักการทั่วไป

การวัดกำลังความสกปรกของน้ำทิ้งจากอาคารบ้านเรือนและน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบโดยใช้ค่าซีโอดีนั้น อาศัยหลักการที่ว่าสารอินทรีย์เกือบทั้งหมด(ยกเว้นเป็นส่วนน้อย) สามารถถูกออกซิไดซ์โดยตัวเติมออกซิเจนอย่างแรงภายใต้สภาวะที่เป็นกรดสารอินทรีย์คาร์บอนในน้ำทิ้งประมาณ 95 – 100 เปอร์เซ็นต์ถูกเปลี่ยนเป็นไนเตรต และพวกอะมิโน ไนโตรเจน ก็ถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียไนโตรเจน ปฏิกิริยาพื้นฐานของการเติมออกซิเจนอาจเขียนได้ดังแสดงในสมการดังนี้

$$C_nH_aO_bN_c + (n + a/4 - b/2 - \tfrac{3}{4}\, c)\, O_2 \text{---------}> n\, CO_2 + (a/2 - 3/2C)\, H2O + cNH_3$$

การหาค่าซีโอดีออกซิเจนที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ดังสมการ ข้างล่างได้มาจากตัวเติมออกซิเจนอย่างแรง แสดงดังในสมการนี้

Organic Carbon + Chemical Oxidizing agent

$\triangle$ | H+

CO_2+ H_2O+ Reduced Oxidizing agent

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาปริมาณตัวเติมออกซิเจนที่ถูกใช้ไปจะถูกนำไปคำนวณหาค่าปริมาณออกซิเจนที่ต้องการใช้สำหรับย่อยสลายสารอินทรีย์ ถ้าปริมาณออกซิเจนถูกใช้ไปมากจะแสดงว่าสารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลายมีจำนวนมาก

สารเติมออกซิเจนที่ใช้ในการหาค่าซีโอดีของน้ำมีหลายตัว เช่น โปโตเซียมเปอร์แมงกาเนต(KMnO4) เซริคซัลเฟต ($Ce_2(SO_4)_3$) โปตัสเซียมไอโอเดต (KIO_3) และกรดไอโอดิค (HIO_3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โปตัสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_3$) และโปตัสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) แต่ละตัวมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน แต่ที่นิยมใช้มากในปัจจุบันและเป็นวิธีที่เป็นมาตรฐานของสหรัฐอเมริกาตามข้อกำหนดของ APHA คือ โปตัสเซียมไดโครเมต เพราะมีความสามารถในการออกซิเดชั่นสูงและเหมาะสมกับตัวอย่างน้ำหลายชนิดโดยเฉพาะน้ำทิ้งจากอาคารบ้านเรือน สามารถออกซิไดซ์สารประกอบอินทรีย์ได้มากชนิดจนเกือบสมบูรณ์ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ นอกจากนี้การวัดปริมาณของไดโครเมตอิออน ($Cr_2O_7^{-2}$) ยังทำได้ง่าย ได้ผลแน่นอนและยังเป็นสารที่มีราคาถูก นอกจากนี้ยังมีข้อดีของโปตัสเซียมไดโครเมตอีกอย่างหนึ่งคือถ้าใช้ $K_2Cr_2O_7$ชนิด Analyticalgrade เอามาอบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียสก่อนใช้เตรียมน้ำอยากจะได้สารละลายที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (Primary Standard)

หลักการหาค่าซีโอดีโดยใช้ $K_2Cr_2O_7$ คือ สารอินทรีย์คาร์บอนในน้ำตัวอย่างไม่ต่ำกว่า 95 -98 % จะถูกออกซิไดซ์ด้วย $K_2Cr_2O_7$ ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดอย่างแรง และอุณหภูมิสูงได้เป็น CO_2 และ H_2O ส่วนแอมโมเนียรวมทั้งสารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น พวก Amino- และ Nitrite-nitrogenจะถูกเปลี่ยนเป็น Ammonium Sulfate $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งจะไม่ถูกออกซิไดซ์อีก จะเกิดความผิดพลาดประมาณ 2 – 3 % เนื่องจากสารระเหยได้บางตัวที่ไม่ถูกออกซิไดซ์ เช่น มีเทน (CH_4) ดังนั้นปฏิกิริยาจึงอาศัยกระบวนการกลั่นย้อนกลับ (Reflux) หรือกระทำในระบบปิดเพื่อป้องกันการสูญหายไปของสารระเหยที่มีอยู่เดิมในตัวของน้ำ หรือที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาย่อยสลายนอกจากนั้นยังมีสารอินทรีย์บางตัวที่ย่อยสลายด้วย $K_2Cr_2O_7$ ได้ยาก เช่น Fatty acid straight - chain,Aliphatic straight – chin, Alcohol และ Straight - chain acid จึงจำเป็นต้องเติมซิลเวอร์ซัลเฟต ($AgSO_4$)เป็น Catalyst และใช้ $HgSO_4$ เป็นตัวกำจัดขัดขวางของพวกคลอไรค์อิออน(Cl^-) ซึ่งมักพบเสมอในน้ำเสียจากอาคารบ้านเรือนและน้ำเสียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ปฏิกิริยาการย่อยสลายเป็นแสดงดังในสมการนี้

$$C_n H_a O_b + cCr_2O_7^{-2} + 8c\ H + \text{---------} > nCO_2 + a + 8c\ H_2O + 2c\ Cr^{+3}$$

เมื่อ c = 2/3 n + a/6 – b/3 หรืออาจเขียนสมการง่าย ๆ ดังในสมการนี้

$$3\ \text{Organic C} + 2\ Cr_2O_7^{-2} + 16\ H^+ \text{----}\triangle\text{----} > 3\ CO_2 + 4\ Cr^{+3} + 8\ H_2O$$

ในการวิเคราะห์จะเติมสารละลาย $K_2Cr_2O_7$ ที่ทราบความเข้มข้นและปริมาตรจำนวนมากเกินพอลงไป หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาการย่อยสลายแล้ว $K_2Cr_2O_7$ ที่คงเหลือจะถูกไตเตรทด้วยสารละลายFerrous Ammonium Sulfate (FAS) โดยใช้เฟอโรอิน ($Fe(C_{12}H_8N_2)_3^{+2}$) เป็นอินดิเคเตอร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในช่วงนี้ แสดงดังในสมการที่นี้

Ferroin

$Cr_2O_7^{-2} + 6Fe^{+2} + 14H^{+} \text{----------} > 6\,Fe^{+3} + 2Cr^{+3} + 7H_2O$

โครเมียมอิออนในสารละลาย $K_2Cr_2O_7$ ที่เหลืออยู่ใน Cr^{+6} มีสีเหลืองจะถูกรีดิวซ์ด้วย Fe^{+2}ในสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตให้เป็น Cr^{+3} ซึ่งมีสีเขียวแทนแต่เนื่องจากสีเหลืองของ Cr^{+6} และสีเขียวของ Cr^{+3} ต่างกันไม่ชัดเจน จึงใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ทำให้จุดยุติ (End point) เป็นสีน้ำตาล (Reddish brown) ซึ่งชัดเจนว่าสีเขียวของเกลือโครมิค จากนั้นคำนวณหาปริมาณออกซิเจนซึ่งสมดุลย์กับปริมาณสารอินทรีย์ได้

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ค่าซีโอดี

ในการวิเคราะห์ค่าซีโอดีนั้นมีปัจจัยหลายสิ่งที่ส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ ซึ่งจะทำให้ค่า ซีโอดีที่วิเคราะห์ได้มีความถูกต้องแม่นยำหรือคลาดเคลื่อนได้ เช่น อุณหภูมิความเข้มข้นของกรด จุดยุติของปฏิกิริยา เวลาที่ใช้ในการย่อยสลายและความเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตStone(1974) ได้นำเสนอผลการวิจัยของเขาซึ่งเปรียบเทียบการหาค่าซีโอดีโดยวิธีไดโครเมตโดยใช้เวลารีฟลักซ์นาน 1, 2 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ กับตัวอย่างน้ำทิ้งบ้านพักอาศัย และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม พบว่าระยะเวลาเพียง 1 ชั่วโมงก็เพียงพอในการย่อยสลาย แต่ที่ระยะเวลาการรีฟลักซ์2 ชั่วโมงให้ค่าสูงที่สุดเขาจึงแนะนำให้ใช้เวลารีฟลักซ์2 ชั่วโมง ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 2.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ค.1 ผลของระยะเวลา Reflux ต่อการหาค่า COD วิธี Dichromate โดยใช้ $AgSO_4$ เป็น Catalyst

การทดลองที่	ค่า COD (มิลลิกรัม/ลิตร)					
	น้ำทิ้งชุมชน			น้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม		
	รีฟลักซ์ นาน 1 ชั่วโมง	รีฟลักซ์ นาน 2 ชั่วโมง	รีฟลักซ์ นาน 4 ชั่วโมง	รีฟลักซ์ นาน 1 ชั่วโมง	รีฟลักซ์ นาน 2 ชั่วโมง	รีฟลักซ์ นาน 4 ชั่วโมง
1	652	656	648	1004	1004	100
2	832	840	844	1064	1072	1076
3	740	736	724	972	972	964
4	720	736	708	940	948	948
5	820	824	820	832	840	832
6	680	684	680	916	920	916
รวม	741	746	737	955	976	956

ที่มา: Stone (1974)

ตัวขัดขวาง (Interfrence)

วัตถุประสงค์ของการหาค่าซีโอดีของน้ำตัวอย่างก็เพื่อหาปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการย่อยสลายของสารอินทรีย์คาร์บอนโดยอาศัยสารออกซิไดซ์อย่างแรง เป็นตัวให้ออกซิเจนในปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox) ดังนั้นอาจจะมีสารอินทรีย์บางตัวสามารถออกซิไดซ์หรือสามารถออกซิไดซ์ตัวออกซิไดซ์ที่ใช้ในปฏิกิริยาหาค่าซีโอดีซึ่งในที่นี้คือ $K_2Cr_2O_7$ มีผลทำให้ค่าซีโอดีที่หาได้มากขึ้นหรือน้อยลงกว่าความเป็นจริงตามลำดับตัวขัดขวางหรือตัวรบกวน เช่น NO_2^- , SO_2 และอนุมูลลบของธาตุกลุ่มเฮไลด์ เช่น Cl^-, Br^-และ I^-โดยเฉพาะ Cl^-ซึ่งมักพบในน้ำทิ้งจากอาคารบ้านพักอาศัยจะไปทำปฏิกิริยากับ $K_2Cr_2O_7$ ได้ มีผลทำให้ซีโอดีที่หาได้สูงกว่าความเป็นจริง นอกจากนี้ Cl^-ยังสามารถทำปฏิกิริยาทำให้ $AgSO_4$ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการหาซีโอดีตกตะกอนทำให้สารอินทรีย์บางตัวไปถูกย่อยสลาย

การเติม $HgSO_4$ ในตัวอย่างที่จะรีฟลักซ์ เพื่อให้ $HgSO_4$ ทำปฏิกิริยากับ Cl^-ได้เป็น $HgCl_2$ ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำมาก(Ksp = Solubility Products ที่ 25 ° C = 2.6x 10^{-15}) ปฏิกิริยาการจับ Cl- ของ Hg + ใน $HgSO_4$ ดังแสดงในสมการนี้ (Dobbs and Williams, 1963)

$$Hg^{+3} + 2Cl^- \text{----------} > HgCl_2$$

การใช้ $HgCl_4$ เป็นตัวลดอิทธิพลของ Cl^-ในการวิเคราะห์ค่าซีโอดีมีข้อจำกัด คือสามารถใช้การได้ดีในตัวอย่างน้ำที่ปริมาณคลอไรด์ไม่เกิน 2,000 mg/l และปริมาณของ $HgSO_4$ ที่ได้ต้องอยู่ในอัตราส่วน $HgSO_4 : Cl^- = 10 : 1$ โดยน้ำหนัก ดังนั้นน้ำตัวอย่างที่มีปริมาณคลอไรค์สูง ๆ เช่น น้ำทะเล จึงไม่สามารถใช้วิธี Dichromate Reflux แบบธรรมดาได้

สารที่ย่อยสลายด้วยวิธี COD – dichromate ได้ยาก

ตารางที่ 2.4 แสดงสารอินทรีย์โดยทั่วไปจะสามารถถูกออกซิไดซ์ด้วย $K_2Cr_2O_7$ ได้ถึง 95 – 98 % ได้เป็น CO_2 และ H_2O แต่ก็ยังมีสารอินทรีย์บางชนิดที่ย่อยสลายได้น้อยจนเกือบไม่ย่อยสลายเลย ถ้าไม่เติม $AgSO_4$ ได้แก่ Volatile straight chain, Aliphatic compounds เพราะพวกนี้ถูกเปลี่ยนเป็นไอลอยขึ้นเหนือสารละลายไม่กลับคืนลงมาในสารละลายที่กำลังถูก Refluxedการเติม $AgSO_4$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้ย่อยสลายได้มากขึ้นโดยเฉพาะพวก Short – chaincarbon acid และ Alcohol เช่น Acetic และ Amino acid และทำการย่อยสลายในระบบปิด(Closed reflux) ก็จะช่วยให้ Volatile Organic Compounds ย่อยสลายได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สารบางตัวไม่สามารถย่อยสลายได้โดยวิธี COD Dichromate แม้ว่าจะใช้ $AgSO_4$ เป็นตัวเร่งแล้วก็ตาม สารเหล่านั้น ได้แก่ Aromatic hydrocarbon เช่น Benzene Toluene และ Pyridines สารประกอบ N-containingococyclic compounds บางตัว เช่น Pyrrole, Pyrrolidine, Proline และ Nicotinic acid รวมทั้งพวก Hydrocarbon บางตัวที่ละลายน้ำได้น้อย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ค.2 สารที่สามารถถูกออกซิไดซ์ด้วย $K_2Cr_2O_7$ ได้ถึง 95 – 98 เปอร์เซ็นต์

Methanol	Ethanol	Butanol
Formaldehyde	Acetaldehype	Acetone
Formic acid	Acetic acid	Butyric acid
Isobutyric acid	Soap	Oxalic acid
Adipic acid	Saccininc acid	Maleic acid
Lactic acid	Tartaric acid	Citric acid
Pyromucic acid	Glucose	Saccharose
Lactose	Sorbose	Glycocol
Aminocaproic acid	Valine	Glutamic acid
Cystine	Histidine	Formamide
Acetamide	Peptone	Casein
KCN	$K_2FE(CN)_6$	KCNS
Phenol	O-cresol	2-Naphthol
Pyrocatechol	8-oxyquinoline	Nitrobenzene
Bezoic acid	Salicylic acid	Phthalic acid
p-aminobenzoic acid	Sulfanilic acid	Phenylacetic acid
Cinnamic acid	Aniline	Benzidine
Toluenesulfonic acid	Aminonaphthol	Piperidine
Dodecylbenzene	Dioxane	Disulfonic acid
Sulfonic acid	3-methylindole	Tetrahydrofuran
Indole	β – Nathylamine	Protein hydrolysates

ที่มา: Leithe et al. (1975)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ง

วิธีการวิเคราะห์และคำนวณ

วิธีวิเคราะห์ค่าซีโอดี

ปิเปตตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อยสลาย ดังตารางที่ 3.2 แล้วเติมสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆเติมสารละลายกรดซัลฟูริก (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 14 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นแล้วเขย่าหลอดวนไปมาเพื่อให้สารละลายผสมกันดี นำหลอดย่อยสลายใส่ลงในขาตั้งหลอด จากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ เทสารละลายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นหยดเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข) 2-3 หยด แล้วนำไปไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (FAS) (ภาคผนวก ข) เมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลแดง จดบันทึกปริมาณของสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต (FAS) เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณ (B) ต้องทำแบลงค์ (Blank) ด้วยทุกครั้ง เพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต (FAS) โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำเสียและทำการวิเคราะห์เหมือนตัวอย่างน้ำเสีย จดบันทึกปริมาณของสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต (FAS) เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณ (A)

การคำนวณ

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times N \times 8{,}000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำเสีย (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ A คือ ปริมาณของ FAS ที่ใช้ไตเตรต Blank

B คือ ปริมาณของ FAS ที่ใช้ไตเตรต ตัวอย่างน้ำเสีย

N คือ Normality ของ FAS ที่ใช้

ตารางที่ ง.1 แสดงปริมาณของตัวอย่างน้ำและรีเอเจนต์ต่างๆ ในหลอดทดลอง

ขนาดหลอดย่อยสลาย	ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)	สารละลาย K_2Cr_2O7 (มิลลิลิตร)	สารละลายกรด H_2SO_4 (มิลลิลิตร)	ปริมาตรรวม (มิลลิลิตร)
Culture Tube :				
16 × 100 มม	2.5	1.5	3.5	7.5
20 × 150 มม	5.0	3.0	7.0	15.0
25 ×150 มม	10.0	6	14.0	30.0

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต

วิเคราะห์โดยใช้สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมตแทนสารละลาย แล้วไตเตรทน้ำกลั่นด้วยสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต

การคำนวณ

นอร์มัลลิตีของสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต (FAS)

$$= \frac{\text{ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต (มิลลิลิตร)} \times 0.1}{\text{ปริมาตรมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลตที่ใช้ไตเตรต (มิลลิลิตร)}}$$

วิธีวิเคราะห์ MLSS

อบกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสิกเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก (B) เก็บกระดาษกรองไว้ในเดสิกเคเตอร์จนกว่าจะใช้ทดลอง วางกระดาษกรองลงในกรวยบุคเนอร์ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องดูดสุญญากาศ ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียกแล้วเปิดเครื่องดูดอากาศ เพื่อให้กระดาษกรองแนบติดกับกรวยบุคเนอร์ ตวงปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ผสมเข้ากันดีแล้ว 50 – 100 มล. แล้วเทน้ำตัวอย่างลงในกรวยบุคเนอร์และเปิดเครื่องดูดสุญญากาศจนน้ำแห้ง แล้วล้างเครื่องกรองด้วยน้ำกลั่น 10 มล. เปิดเครื่องทิ้งไว้ 3 นาที เมื่อแห้งแล้วนำกระดาษกรองออกวางในภาชนะเดิม (อาจใช้ถ้วยระเหยหรือกระดาษอลูมิเนียมก็ได้) แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ (A)

การคำนวณ

$$\text{ของแข็งแขวนลอย (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(\mathbf{A-B}) \times \mathbf{10^6}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำเสีย (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักของกระดาษกรองและของแข็งแขวนลอย (กรัม)
B คือ น้ำหนักของกระดาษกรอง (กรัม)

การคำนวณ F/M

$$F/M = \frac{\mathbf{COD \times Q}}{\mathbf{MLSS \times V}} = \frac{\mathbf{1{,}000\ mg/l \times 1\ l/Cycle}}{\mathbf{1{,}500 mg/l \times 1.5\ l}} = 0.444 \text{ / cycle}$$

เมื่อ COD = ค่าความเข้มข้นซีโอดีที่ใช้
MLSS = ค่า MLSS ในถังปฏิกรณ์
Q = ปริมาณน้ำเสียที่เติมต่อรอบ
V = ปริมาตรการทำงานของถังปฏิกรณ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก จ

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

การทดสอบแคตาเลส (Catalase Test)

Tube Test

ปลูกเชื้อลงในอาหารวุ้นที่เอียง (ปกติใช้ NA) บ่นที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วเติม 1 มิลลิลิตร ของ 3 เปอร์เซ็นต์ H_2O_2 เอียงให้ไหลไปมาบนผิวอาหาร ผลบวก เกิดฟองแก๊ส ผลลบ ไม่เกิดฟองแก๊ส

Plate Test (Slide method)

หยด H_2O_2 ที่มีความเข้มข้น 3 หรือ 30 เปอร์เซ็นต์ 1 หยด ลงบนสไลด์ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อลงไปทำการผสมให้เข้ากัน ผลบวก เกิดฟองแก๊ส ผลลบ ไม่มีฟอง

การทดสอบออกซิเดส (Oxidase Test)

Kovac's method

วางกระดาษกรองที่อิ่มด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ teramethyl-p-phenylenediamine HCl ลงผลบวกเกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 นาที ใช้ลวด nichrome เขี่ยโคโลนีออกมาทดสอบ โดยลากโคโลนีไปมาบนกระดาษผลบวกเกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 นาที หรืออาจจะทดสอบโดยการหยดน้ำยาทดสอบลงบนจานเพาะเชื้อ ที่มีโคโลนี ถ้ามี Oxidase จะมีสีชมพูแล้วก็เป็นสีม่วง และสามารถเอาเชื้อไปย้อมสีแกรมได้เพาะน้ำยาทดสอบไม่ขัดขวางการย้อมสีแกรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Indophenol method

เลี้ยงเชื้อลงบน NA Slant บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เวลา 18-24 ชั่วโมง ห้ามนานกว่านี้ ทำ positive control ของ Aeromonas sp.หยดสารละลาย A และ B อย่างละ 2-3 หยด ลงไปแล้วเขย่าและเอียงไปมาภายในหลอดตามแนวที่ปลูกเชื้อ ผลบวก เกิดสีน้ำเงินภายใน 2 นาที ถ้าเวลานานกว่านี้จะเป็น weak oxidase สารละลาย A ละลาย 1 กรัม ของ α-napthol ลงในสารละลาย 95 เปอร์เซ็นต์ alcohol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ สารละลาย B ละลาย 1 กรัม ของ p-aminodimethylaniline HCl หรือ Oxalate ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นไม่ควรเกิน 1 เดือน

การทดสอบโคแอกกูเลส (Coagulase test)

วิธีการทดสอบ ทำได้ 2 วิธี คือ

ทำบนแผ่นแก้ว (Slide) เพื่อทดสอบ bound coagulase

หยด plasma บนแผ่นแก้ว 1 หยด แล้วเขี่ยเชื้อที่เลี้ยงไว้ใน Staphylococcus medium No. 110 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 18-24 ชั่วโมง มา 1 ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ผสมกับ plasma ทำ suspension

ผลบวก จะเกิดการรวมกลุ่มของเซลล์แล้วตกตะกอน (clumping) ภายในเวลารวดเร็ว ถือว่าเชื้อที่ทดสอบสร้าง coagulase

ผลลบ ไม่เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ ควรนำไปทดสอบโดยวิธีใช้หลอดทดลองขนาดเล็กต่อไป

ในหลอดทดลอง

ดูดเอา suspension ของเชื้อที่เลี้ยงไว้ใน brain heart infusion broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 12-18 ชั่วโมง มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็กที่อบฆ่าเชื่อแล้ว และได้ใส่ plasma 0.5 มิลลิลิตร ไว้ก่อนผสมให้เข้ากัน นำมาบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วตรวจผล

ผลบวก plasma จะจับตัวแข็งเป็นก้อน แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบสร้าง coagulase

ผลลบ plasma จะเหลวเหมือนเดิม การแข็งตัวของ plasma มีหลายระดับอาจแข็งเป็นบางส่วน หรือแข็งทั้งหลอดก็ได้

การทดสอบ MR (Methyl Red Test)

ปลูกเชื้อลงในอาหาร MR-VP บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน หยด methyl red 5-6 หยดลงไปต่ออาหารที่มีเชื้อ 5 มิลลิลิตร ผลบวก สีแดงสด ผลลบ เหลืองหรือส้ม

การบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องหรือ 35 องศาเซลเซียส ก็เพียงพอสำหรับสมาชิกส่วนใหญ่ของแบคทีเรียพวก enterobacteriaceae แต่สำหรับเชื้อบางชนิดอาจใช้เวลาที่นานกว่านี้ก็ได้

สารทดสอบ methyl red ละลาย 0.1 กรัมของ methyl red ลงใน 300 มิลลิลิตร ของเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้เป็น 500 มิลลิลลิตร

การทดสอบ VP (Voges – Proskauer Test)

O'Meara Modification

แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดทดสอบที่สะอาด เติม creatine ลงไปปริมาณเท่ากับปลายมีดแหลมๆเติมด่าง NaOH 40 เปอร์เซ็นต์ ลงไปปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ผลบวก เกิดสีชมพูภายใน 2 นาที หรือช้ากว่านี้ก็ได้ ผลลบ สีเหลือง

Barritt's Method

ปลูกเชื้อลงใน MR-VP medium บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่สะอาด เติม 0.6 มิลลิลิตร ของ 5 เปอร์เซ็นต์ α-narphthol solution เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ 40 เปอร์เซ็นต์ KOH เขย่าให้เข้ากัน ผลบวก สีแดงภายใน 5 นาที ผลลบ สีเหลือง

การทดสอบอินโดล (Indole Test)

Kovac's method

ปลูกเชื้อลงในอาหารเหลว tryptone หรืออาหารอื่นๆ ที่เหมาะสม เช่น MIO หรือ SIM บ่มไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Kovac's reagent 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ผลบวก สีแดงที่ผิวชั้นบน ผลลบ ไม่เกิดสี ถ้าเป็นสีส้มจัดเป็น variable เนื่องจาก trptopham ถูกออกซิไดซ์ไปเป็น Skatole (methyl indole)

การทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate Utilization Test)

ปลูกเชื้อลงบนผิวอาหารวุ้นที่เอียง (Simmon's Citrate agar) โดยใช้เข็มเขี่ยทำให้เชื้อเป็นจุดบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็น 24-48 ชั่วโมง ผลบวก มีการเจริญอาหารเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นน้ำเงิน ผลลบ ไม่มีการเจริญ สีของอาหารไม่เปลี่ยน

ทดสอบการใช้แอซีเตต (Acetate Utilization Test)

ทำ suspension ของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้น้ำเกลือ ปลูกเชื้อลงในอหารบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็น 24-48 ชั่วโมง ผลบวก มีการเจริญ เกิดสีน้ำเงิน ผลลบ ไม่มีการเจริญเป็นสีเขียวเหมือนเดิม

การทดสอบการใช้มาโลเนด (Malonate Utilization Test)

อาหารที่ใช้คือ modified malonate broth ปลูกเชื้อลงในอาหร ใช้เชื้ออายุ 18-24 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็น 24-48 ชั่วโมง ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ผลลบ ไม่เปลี่ยนสี เป็นสีเขียวเหมือนเดิม

การทดสอบการย่อยอาร์จินิน (Arginine dihydrolase Test)

Moeller's Method

อาหาร Moeller's Decarboxylase broth base แล้วเติม 1 เปอร์เซ็นต์

L- arginine monohydrochloride ขณะเดียวกันก็เตรียม Moeller's Decarboxylase broth base โดยไม่เติม L- arginine ไว้เป็นอาหารเปรียบเทียบ

ปลูกเชื้อลงในอาหารที่เติม arginine และไม่เติม จากนั้นเท mineral oil ทับให้หนาประมาณ 4-5 มิลลิเมตร ลงในแต่ละหลอด บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ตรวจผลภายใน 4 วัน ผลบวก สีม่วงหรือสีแดง(หลอกเปรียบเทียบสีเหลือง) ผลลบ เหลืองทั้ง 2 หลอด

Falkow's Method

อาหาร Decarboxylase Medim base ที่เติม 0.5 เปอร์เซ็นต์

L- arginine monohydrochloride ขณะเดียวกันก็เตรียม carboxylase base ที่ไม่ใส่ L- arginine

ปลูกเชื้อลงในอาหารทดสอบและอาหารเปรียบเทียบ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ตรวจผลภายใน 4 วัน ผลบวก สีม่วง (หลอดเปรียบเทียบสีเหลือง) ผลลบ เหลืองทั้ง 2 หลอด

การทดสอบการย่อยเยลาติน (Gelatin liquefaction Test)

วิธีที่ 1 stab method เตรียมอาหารที่มี gelatin 12 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-15 นาที ปลูกเชื้อในลักษณะ Stab บ่มที่ 20-22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ตรวจสอบการเหลว โดยเอาหลอดเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ตู้เย็น เป็นเวลา 30 นาที แล้วเอาออกมาดูการเหลว ถ้ายังไม่เหลวบ่มต่อทั้งกระทั่งเหลว หรือจนกระทั่ง 30 วัน

Strong positive ทำให้อาหารเหลวที่อุณหภูมิต่ำภายใน 3 วัน

Weak positive ทำให้อาหารเหลวที่อุณหภูมิต่ำภายหลัง 3 วัน

วิธีที่ 2 อาหาร NB + 12 เปอร์เซ็นต์ gelatin 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อ ปลูกเชื้อให้เป็นขุดเดียว(point inculate) ลงในจานเพาะเชื้อ (1 จุด :1 จาน) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เทลาดด้วยสารละลาย mercuric chloride ($HgCl_2$ 12 กรัม

ละลายใน น้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร HCI conc. 16 มิลลิลิตร) ผลบวก เกิดวงใสรอบๆบริเวณเชื้อเจริญ ผลลบ ไม่เกิด

การทดสอบการย่อยแป้ง (Strarch hydrolysis Test)

อาหารที่ใช้ทดสอบต้องมี 0.2 เปอร์เซ็นต์ Soluble Starch ปลูกเชื้อลงในอาหารบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม จะมีการเจริญ หยดสารละลายไอโอดีน 2-3 หยด ลงในอาหารเหลว อ่านผบทันที ผลบวก ไม่มีการเปลี่ยนสี ผลลบ สีน้ำเงิน

ถ้าเป็น plate หรือ slant เทน้ำยาไอโอดีนลาด ผลบวก อาหารเป็นสีน้ำเงิน แต่บริเวณรอบๆ โคโลนีไม่มีสี ผลลบ เป็นสีน้ำเงิน

การทดสอบการย่อยเอ็ซคูลิน (Esculin hydrolysis Test)

เตรียม bile – esculin agar (Difco) แต่ไม่ใส่เซรุ่มม้า เตรียมใส่หลอดทำให้เอียง (Slant) สำหรับเชื้อ Streptococci ปลูกเชื้อโดยการขีดไปมา (Streak) บ่มเข้าข้ามคืนที่ 35 องศาเซลเซียส ถ้าใช้เชื้อมากอาจเกิดผลบวกภายใน 2-3 ชั่วโมง ผลบวกอาหารเป็นสีดำ ผลลบไม่เปลี่ยนสี

การทดสอบการย่อยฮิพพูเรต (Hyppurate hydrolysis)

เตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลาย Sodium hippurate ปิดจุกปละเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ละลายหลอดที่บรรจุ Sodium hippurate เขี่ยเชื้อ beta hemolytic Streptococci ถ้าโคโลนี่ใหญ่ ใช้เพียงโคโลนีเดียว ถ้าเล็กให้ใช้หลายโคโลนี suspension ควรจะขุ่น เทเชื้อทั้งที่ผลเป็นบวกและลบลงในหลอดทดสอบข้อ 1 (คนละหลอด) คือใช้เชื้อ streptococci group B และ A ตามลำดับ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม ninhydrin reagent 0.2 มิลลิลิตร (5 หยด) อย่าเขย่าหลอด บ่มต่อเป็นเวลา 10 นาที ไม่เกินครึ่งชั่วโมง เอาหลอดทดสอบออจากที่บ่มอ่านผลทันที ผลบวก สีม่วงดำ ผลลบ ไม่เปลี่ยนสี หรือสีม่วงอ่อน

การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate reduction Test)

เขี่ยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร nitrate broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หยด Sulfanilic acid และ **α**-napthylamine ถ้าเกิดสีแดงปนตะกอน แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงเติมผงสังกะสีลงไป ผลบวกไม่เกิดสีเนื่องจาก NO^-_3 ถูกรีดิวซ์เป็น NO^-_2 และ N_2 ผลลบ มีสีแดง

การทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide Production Test)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) แตะเชื้อลงใน triple sugar iron agar slant โดยขีดไปมา (Streak) ที่ผิวของพื้นเอียง (slant) แล้วเทลง (Stab) ลงไปที่ส่วนก้นหลอดเรียกว่าทำ butt บ่มที่อุณหภูมิห้องตรวจผลทุกวันจนครบ 5 วัน สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารและดูการเกิดแก๊ส

การทดสอบยูรีเอส (Urease Test)

ปลูกเชื้อลงให้เป็นจุด ลงบนอาหารตรวจสอบวุ้นเอียงโดยใช้เชื้อที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ด้วยปริมาณเล็กน้อย การใช้เชื้ออายุน้อยเพื่อป้องกันมิให้มีการปะปนนของเซลล์ที่ตายแล้วหรือสิ่งที่เจอปนอื่นๆ เกิดจากการเจริญของเซลล์ ซึ่งจะไปรบกวนการอ่านผล

บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ตรวจผลการทดสอบทุกๆ วันเป็นเวลา 7 วัน และบันทึกระยะเวลาที่สังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของอาหารด้วย เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น แสดงว่าผลการทดลองเป็นบวก ระยะที่เกิดอาจช่วยในการพิจารณาจำแนกชนิดจุลินทรีย์

การทดสอบฟอสฟาเตส (Phosphatase)

วิธีการที่ 1 ใช้อาหาร NA นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความกดดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็น 50-55 องศาเซลเซียส เติม 2 มิลลิลิตร ของ 0.5 เปอร์เซ็นต์ Sodium phenolphthalein diphosphate ต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อลงในจารเพาะเชื้อ บ่มข้ามคืนที่ 35 องศาเซลเซียส วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในที่มีไอของ NH_3 จากขวดที่เปิดทำในตู้ควัน ผลบวก เกิดสีชมพู ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

วิธีการที่ 2 ปลูกเชื้อปราณมากลงในสารลาย p-nitrophenylphosphate ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร บ่ม 6 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส เติม 0.04 M glycine-NaOH buffer (pH 10.5) ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ผลบวก เกิดสีเหลือง

การทดสอบการออกซิไดส์กลูโคเนต (Gluconate oxidation Test)

เติม gluconate substrate tablet ลงในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ปลูกเชื้อปริมาณมากลงไป บ่มข้ามคืนที่ 35-37 องศาเซลเซียส เติม Clinitest tablet ผลบวก เกิดตะกอนสี green-yellow-orange ผลลบ สีน้ำเงิน

การทดสอบลีซิทิเนส(Lecithinase Test)

เตรียมอาหาร egg yolk agar ได้แก่ peptone 20 กรัม, Na_2HPO_4 2.5 กรัม, NaCl 1.0 กรัม, $MgSO_4$ 0.05 กรัม, Dextrose 1.0 กรัม, Agar 12.5 กรัม และ น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.4 นึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทำให้เย็นอุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เติม antibiotic free egg yolk ผสมให้เข้ากันเทลงในจานเพาะเชื้อ ก่อนที่จะแยกไข่โดยวิธีปราศจากเชื้อ ขีดเชื้อไปมา หรือทำเป็นจุดบนอาหาร บ่ม 48 ชั่วโมง ที่ 35 องศาเซลเซียส บรรยากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ผลบวกขุ่นรอบๆบริเวณที่เชื้อเจริญ

การทดสอบดีเอมิเนส (Deaminase Test)

เลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นเอียง phenylalanine อายุประมาณ 18 ถึง 24 ชั่วโมง และทำหลอดเปรียบเทียบ คือ ไม่มีเชื้อ เติม 10 เปอร์เซ็นต์ ของ ferric chloride ลงไปหลอดละ 5 หยด เขย่าหลอดเบาๆ เพื่อให้เชื้อหลุดจากอาหาร สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสีของอาหาร และสารตรวจสอบที่หยดลงไปภายใน 5 นาที เพราะสีที่เกิดขึ้นไม่เสถียร

ผลบวก จะพบสีเขียวอาจอ่อนหรือเข้มในอาหารแบะสารตรวจสอบ และดูเปรียบเทียบกับหลอดเปรียบเทียบจะทำให้อ่านผลง่ายขึ้น

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี คือ ยังคงเป็นสีเหลืองของ ferric chloride

การทดสอบดีคาร์บอซิเลส (Decarboxilase Test)

ปลูกเชื้อลงในอาหารที่มีกรดอะมิโนแต่ละชนิดอย่างละ 1 หลอด ทำหลอดเปรียบเทียบ โดยใช้อาหาร decarboxylase base ปลูกเชื้อลงไป ถ้าเป็นอาหารเหลว เทพาราฟินทับทุกหลอด แล้วปิดจุกฝาเกลียวให้แน่น บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูผลการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร ผลบวกหลอดที่มีกรดอะมิโนเป็นสีม่วง และหลอดเปรียบเทียบเป็นสีเหลือง ผลลบเหลืองทั้งสองหลอด

การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation Test)

ปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปในอาหาร fermentation Carbohydrate medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง หรือ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 18-24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหาร และดูการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส

ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่า เชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้เฉพาะกรด อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และมีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่า เชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้กรดและแก๊ส

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี คือ เป็นสีเขียวเหมือนเดิม แสดงว่าเชื้อไม่หมักคาร์โบไฮเดรต

การทดสอบการออกซิไดซ์และการหมัก (Oxidation – Fermentation Test)

ปลูกเชื้อลงในอาหาร Hugh and Leifson's O-F medium ชนิดละ 2 หลอด โดยการแทงตรงลงไป หลอดหนึ่งทำให้อยู่ในสภาพขาดอากาศโดยเทพาราฟินเหยวผิดผิวหน้าประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง ดูการเปรียบเทียบสีของอาหารและเกิดแก๊ส

ผล อาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นเหลือง เฉพาะหลอดที่ไม่ไม่ได้เทพาราฟิน แสดงว่าเป็น Oxidation แต่ถ้าเกิดเปลี่ยนสีทั้งสองหลอด แสดงว่าเป็น fermentation

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ฉ

ตารางแสดงค่า OD.600 nm การเจริญเติบโตและน้ำหนักแห้งของจุลินทรีย์คัดเลือกทั้ง 10 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ ฉ.1 ค่า OD.600 nm ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า

รหัสจุลินทรีย์	เวลา (h)	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 1	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 2	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 3	OD_{600} nm. เฉลี่ย	SD
P. aeruginosa J1	0	0.043	0.039	0.041	0.041	0.002
	3	0.127	0.138	0.132	0.132	0.006
	6	0.763	0.755	0.76	0.759	0.004
	9	1.084	1.094	1.087	1.088	0.005
	12	1.264	1.33	1.307	1.300	0.034
	15	1.24	1.21	1.207	1.219	0.018
	18	1.235	1.23	1.236	1.234	0.003
	21	1.241	1.248	1.246	1.245	0.004
	24	1.206	1.198	1.209	1.204	0.006
B. mycoides S7	0	0.039	0.039	0.038	0.039	0.001
	3	0.063	0.069	0.069	0.067	0.003
	6	0.472	0.467	0.469	0.469	0.003
	9	0.521	0.527	0.517	0.522	0.005
	12	0.566	0.546	0.597	0.570	0.026
	15	0.642	0.648	0.647	0.646	0.003
	18	0.704	0.709	0.701	0.705	0.004
	21	0.728	0.725	0.719	0.724	0.005
	24	0.81	0.809	0.813	0.811	0.002

ตารางที่ ฉ.2 ค่า OD.600 nm ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า(ต่อ)

รหัสจุลินทรีย์	เวลา (h)	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 1	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 2	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 3	OD_{600} nm. เฉลี่ย	SD
B. subtilis J2	0	0.043	0.039	0.041	0.041	0.002
	3	0.268	0.265	0.272	0.268	0.004
	6	0.899	0.897	0.92	0.905	0.013
	9	1.044	1.045	1.049	1.046	0.003
	12	1.168	1.172	1.18	1.173	0.006
	15	1.316	1.319	1.32	1.318	0.002
	18	1.389	1.392	1.402	1.394	0.007
	21	1.394	1.396	1.398	1.396	0.002
	24	1.451	1.445	1.448	1.448	0.003
L. fusiformis S2	0	0.496	0.501	0.509	0.502	0.007
	3	0.483	0.489	0.48	0.484	0.005
	6	1.033	1.029	1.026	1.029	0.004
	9	1.502	1.498	1.498	1.499	0.002
	12	1.659	1.664	1.656	1.660	0.004
	15	1.978	1.969	1.972	1.973	0.005
	18	1.877	1.871	1.875	1.874	0.003
	21	1.821	1.818	1.815	1.818	0.003
	24	1.782	1.791	1.787	1.787	0.005

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ฉ.3 ค่า OD.600 nm ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า(ต่อ)

รหัสจุลินทรีย์	เวลา (h)	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 1	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 2	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 3	OD_{600} nm. เฉลี่ย	SD
Br. choshinensis PL3	0	0.414	0.409	0.408	0.410	0.003
	3	0.651	0.656	0.646	0.651	0.005
	6	1.145	1.131	1.139	1.138	0.007
	9	1.47	1.475	1.481	1.475	0.006
	12	1.526	1.519	1.512	1.519	0.007
	15	1.639	1.642	1.648	1.643	0.005
	18	1.662	1.654	1.659	1.658	0.004
	21	1.592	1.584	1.588	1.588	0.004
	24	1.456	1.452	1.448	1.452	0.004
B. cereus J5	0	0.542	0.545	0.551	0.546	0.005
	3	0.564	0.572	0.578	0.571	0.007
	6	0.672	0.666	0.658	0.665	0.007
	9	1.338	1.342	1.338	1.339	0.002
	12	1.559	1.566	1.564	1.563	0.004
	15	1.756	1.749	1.752	1.752	0.004
	18	1.731	1.728	1.723	1.727	0.004
	21	1.673	1.679	1.682	1.678	0.005
	24	1.667	1.659	1.661	1.662	0.004

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ฉ.4 ค่า OD.600 nm ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า(ต่อ)

รหัส จุลินทรีย์	เวลา (h)	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 1	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 2	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 3	OD_{600} nm. เฉลี่ย	SD
E. coli P2	0	0.082	0.079	0.077	0.079	0.003
	3	0.127	0.118	0.123	0.123	0.005
	6	0.688	0.695	0.692	0.692	0.004
	9	0.996	1.001	0.993	0.997	0.004
	12	1.132	0.134	1.135	0.800	0.577
	15	1.181	1.179	1.778	1.379	0.345
	18	1.263	1.263	1.1267	1.218	0.079
	21	1.34	1.345	1.338	1.341	0.004
	24	1.278	1.275	1.282	1.278	0.004
P. putida R6	0	0.082	0.084	0.081	0.082	0.002
	3	0.1	0.095	0.098	0.098	0.003
	6	0.284	0.274	0.279	0.279	0.005
	9	0.678	0.672	0.675	0.675	0.003
	12	0.811	0.804	0.807	0.807	0.004
	15	0.961	0.957	0.959	0.959	0.002
	18	0.943	0.946	0.941	0.943	0.003
	21	0.976	0.972	0.975	0.974	0.002
	24	0.966	0.965	0.959	0.963	0.004

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ฉ.5 ค่า OD.600 nm ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า(ต่อ)

รหัส จุลินทรีย์	เวลา (h)	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 1	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 2	OD_{600} nm. ซ้ำที่ 3	OD_{600} nm. เฉลี่ย	SD
B. thuringiensis S1	0	0.082	0.079	0.078	0.080	0.002
	3	0.53	0.57	0.55	0.550	0.020
	6	0.86	0.863	0.865	0.863	0.003
	9	0.875	0.877	0.875	0.876	0.001
	12	0.897	0.899	0.891	0.896	0.004
	15	0.935	0.939	0.941	0.938	0.003
	18	0.969	0.971	0.974	0.971	0.003
	21	1.085	1.089	1.091	1.088	0.003
	24	1.194	1.189	1.187	1.190	0.004
L. sphaericus S6	0	0.463	0.459	0.462	0.461	0.002
	3	0.503	0.502	0.507	0.504	0.003
	6	0.936	0.936	0.929	0.934	0.004
	9	1.417	1.421	1.419	1.419	0.002
	12	1.61	1.597	1.599	1.602	0.007
	15	1.733	1.733	1.737	1.734	0.002
	18	1.96	1.969	1.965	1.965	0.005
	21	1.973	1.971	1.969	1.971	0.002
	24	1.872	1.869	1.873	1.871	0.002

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ฉ.6 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า

รหัสจุลินทรีย์	เวลา (h)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 1	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 2	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 3	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/ml)	SD
P. aeruginosa J1	0	62.8	62.5	62.2	62.50	12.50	0.30
	3	86.8	86.5	87.1	86.80	17.36	0.30
	6	87.1	87.5	87.7	87.43	17.49	0.31
	9	88.9	89.3	89.2	89.13	17.83	0.21
	12	89.9	89.6	89.2	89.57	17.91	0.35
	15	91	91.3	90.8	91.03	18.21	0.25
	18	92	91.5	91.8	91.77	18.35	0.25
	21	92.5	92.8	92.7	92.67	18.53	0.15
	24	93	92.7	93.1	92.93	18.59	0.21
B. mycoides S7	0	60.5	61.2	60.8	60.83	12.17	0.35
	3	65.3	65.5	64.9	65.23	13.05	0.31
	6	70.1	70.8	71	70.63	14.13	0.47
	9	73.4	72.9	73.2	73.17	14.63	0.25
	12	77.9	78.5	78.7	78.37	15.67	0.42
	15	83.5	84.3	77.5	81.77	16.35	3.72
	18	84.6	84.3	85	84.63	16.93	0.35
	21	87.5	85.4	88.5	87.13	17.43	1.58
	24	89.3	89.9	90.9	90.03	18.01	0.81

ตารางที่ ฉ.7 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า(ต่อ)

รหัสจุลินทรีย์	เวลา (h)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 1	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 2	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 3	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/ml)	SD
B. subtilis J2	0	60.3	60.9	61.1	60.77	12.15	0.42
	3	65.4	64.8	65.7	65.30	13.06	0.46
	6	68.9	69.5	69.7	69.37	13.87	0.42
	9	71.3	72.5	72	71.93	14.39	0.60
	12	74.4	74	74.8	74.40	14.88	0.40
	15	79.8	79.5	78.9	79.40	15.88	0.46
	18	85.2	85.5	84.5	85.07	17.01	0.51
	21	87.5	87.8	87.5	87.60	17.52	0.17
	24	89.5	89.1	89.9	89.50	17.90	0.40
L. fusiformis S2	0	67.5	68	68.4	67.97	13.59	0.45
	3	69.9	68.9	10.7	49.83	9.97	33.89
	6	73.5	74.2	74.7	74.13	14.83	0.60
	9	78.9	78.3	79.4	78.87	15.77	0.55
	12	85.8	86.4	86.6	86.27	17.25	0.42
	15	89.8	89.3	89.7	89.60	17.92	0.26
	18	91.1	91.5	91.8	91.47	18.29	0.35
	21	95.7	96.8	97.6	96.70	19.34	0.95
	24	96	95.4	97.6	96.33	19.27	1.14

ตารางที่ ฉ.8 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า(ต่อ)

รหัสจุลินทรีย์	เวลา (h)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 1	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 2	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 3	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/ml)	SD
Br. choshinensis PL3	0	73.5	77.4	73.3	74.73	14.95	2.31
	3	76.7	78.3	78.4	77.80	15.56	0.95
	6	79.5	80	80.1	79.87	15.97	0.32
	9	86.6	86.9	89.6	87.70	17.54	1.65
	12	88.4	88.6	88.7	88.57	17.71	0.15
	15	88.9	88.5	89.3	88.90	17.78	0.40
	18	93.6	90.3	92.4	92.10	18.42	1.67
	21	95.1	96.4	96.9	96.13	19.23	0.93
	24	99.1	98.5	99.6	99.07	19.81	0.55
B. cereus J5	0	79.2	78.7	79.3	79.07	15.81	0.32
	3	83	83.7	82.4	83.03	16.61	0.65
	6	83.9	84	84.7	84.20	16.84	0.44
	9	88.9	89.3	88.7	88.97	17.79	0.31
	12	91.8	90.3	90.7	90.93	18.19	0.78
	15	94.8	95.5	95.3	95.20	19.04	0.36
	18	95.6	94.9	95.5	95.33	19.07	0.38
	21	96.9	97.2	96.4	96.83	19.37	0.40
	24	98.4	97.9	97.7	98.00	19.60	0.36

ตารางที่ ฉ.9 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า(ต่อ)

รหัสจุลินทรีย์	เวลา (h)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 1	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 2	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 3	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/ml)	SD
E. coli P2	0	81.3	80.8	81.1	81.07	16.21	0.25
	3	85.6	85.3	84.9	85.27	17.05	0.35
	6	90.1	89.7	88.9	89.57	17.91	0.61
	9	94.7	93.9	95.2	94.60	18.92	0.66
	12	95.8	96.8	96.2	96.27	19.25	0.50
	15	98.7	98.9	97.5	98.37	19.67	0.76
	18	99	99.6	99.3	99.30	19.86	0.30
	21	100.8	101.4	101.9	101.37	20.27	0.55
	24	102.3	103.5	102.7	102.83	20.57	0.61
P. putida R6	0	79.8	78.6	79.2	79.20	15.84	0.60
	3	82.3	81.6	82	81.97	16.39	0.35
	6	85.4	85.9	86.3	85.87	17.17	0.45
	9	88.9	88.2	87.8	88.30	17.66	0.56
	12	89.8	88.6	89.3	89.23	17.85	0.60
	15	92.4	93.6	93.1	93.03	18.61	0.60
	18	95.3	95.8	96.4	95.83	19.17	0.55
	21	98.7	98.8	99.3	98.93	19.79	0.32
	24	99.9	100.8	101.5	100.73	20.15	0.80

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ฉ.10 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า(ต่อ)

รหัสจุลินทรีย์	เวลา (h)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 1	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 2	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/5ml) ซ้ำที่ 3	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/ml)	SD
B. thuringiensis S1	0	72.6	73.1	72.3	72.67	14.53	0.40
	3	78.9	78.6	79.2	78.90	15.78	0.30
	6	83.5	84.2	83.8	83.83	16.77	0.35
	9	89.6	89.9	88.7	89.40	17.88	0.62
	12	93.4	94.3	93.8	93.83	18.77	0.45
	15	95.4	96.4	95.8	95.87	19.17	0.50
	18	98.7	97.2	98.1	98.00	19.60	0.75
	21	99.5	99.1	99.1	99.23	19.85	0.23
	24	101.5	100.7	101.2	101.13	20.23	0.40
L. sphaericus S6	0	61.5	62.1	61.9	61.83	12.37	0.31
	3	65.4	64.8	65.7	65.30	13.06	0.46
	6	69.8	69.2	68.7	69.23	13.85	0.55
	9	73.5	73	72.8	73.10	14.62	0.36
	12	77.5	76.9	78.2	77.53	15.51	0.65
	15	79.8	79.9	80.4	80.03	16.01	0.32
	18	81.5	81.8	81.1	81.47	16.29	0.35
	21	83.5	83.7	82.9	83.37	16.67	0.42
	24	84.5	85.5	84.9	84.97	16.99	0.50

ภาคผนวก ช

ผลการทดสอบชีวเคมี

ตารางที่ ช.1 ผลการทดสอบสมบัติชีวเคมีของ *Pseudomonas sp.*

Test	*Pseudomonas aeruginosa*	*Pseudomonas putida*
No. of flagella	1	>1
Fluorescent pigments	d[b]	+[b]
Pyocyanine	d	-
Carotenoids	-	-
Growth at 41 ^{0}C		
Levan formation from sucrose	+	-
Arginine dihydrolase	-	-
Oxidase reaction	+	+
Denitrification	+	+
Hydrolysis of :	+	-
Gelatin		
Starch	+	-
Poly - β –	-	-
Hydroxybutyrate	-	-
Carbon source for growth :	+	+
Glucose	-	-
Trehalose	+	+
2 – Ketogluconate	-	-
Meso – Inositol	+	-
Geraniol	+	+
L- Valine	+	+
β – Alanine	+	+

[a]Lateral flagella of short wave length may also be product under certain conditions.

[b]+ = positive for 90% or more of strains ; - = negative for 90% or more of strain ; d = positive for more than 10% but less than 90% of all strains studied.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช.2 ผลการทดสอบสมบัติชีวเคมีของ *Bacillus sp.*

Test	*Bacillus subtilis*	*Bacillus cereus*	*Bacillus thuringiensis*	*Bacillus mycoides*	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus megaterium*
Rods						
Width, μm	0.7-0.8	1.0-1.2	1.0-1.2	1.0-1.2	0.6-0.8	1.2-1.5
Length, μm	2-3	3-5	3-5	3-5	1.5-3	2-5
Gram reaction	+	+	+	+	+	+
Unstained globules in the protoplasm	-	+	+	+	-	+
Spores						
ellipsoidal	+	+	+	+	+	+
round	+	-	-	-	+	v
central or paracentral	-	+	+	+	-	+
swelling the sporangium	-	-	-	-	-	-
Crystaline Parasporal bodies		-	a	-		-
Motility	+	a	a	-	+	a
Catalase	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	-	+	+	+	+	-
V-P reaction	+	+	+	+	+	-
pH in V-P broth	5.4-8.0	4.3-5.6	4.3-5.6	4.5-5.6	5.0-5.6	4.5-6.8
Temperature for growth, °C						
Maximum	45-55	35-45	40-45	35-40	50-55	35-45
Minimum	5-20	10-20	10-15	10-15	15	3-20
Egg yolk reaction	-	+	+	+	-	-
Growth in						
0.001% lysozyme	B	+	+	+	-	-
Media at pH 5.7	+	+	+	+	+	+
0.02% azide[a]	-				+	
7% NaCl	+		+	a	-	+
Ammonia glucose medium		-		-		+
Acid from						
Glucose	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	-	A	-	+	a
Xylose	+	-	A	-	+	a
Mannitol	+	-	+	-	+	+
Hydrolysis of Starch	+	+	+	+	+	+
Hippurate, 4 week	-				-	
Use of citrate	+	+	+	+	+	+
propionate	-				+	
Reduction NO_3^- to NO_2^-	+	+	b	+	+	b

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช.2 (ต่อ) ผลการทดสอบสมบัติชีวเคมีของ *Bacillus sp.*

Test	*Bacillus subtilis*	*Bacillus cereus*	*Bacillus thuringiensis*	*Bacillus mycoides*	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus megaterium*
Decomposition of Casein Tyrosine phenylalanine, 1 week	 + - 	 + + -	 + + -	 + + -	 + + 	 + a
Liquefaction of nutrient Gelatin, 20 °c 2 week	1.0 cm or more				<1.0 cm	

+ = 85 to 100% of strains positive ; a = 50 to 84% of the strains positive ; b = 15 to 49% of the strains positive ; - = 0 to 14% of the strain positive ; v = character inconstant

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช.3 ผลการทดสอบสมบัติชีวเคมีของ *E. coli*

Test	*Escherichia coli*	Test	*Escherichia coli*
Gram stain (24h)	-	Raffinose	-
Oxidase (24h)	-	L-Rhamnose	-
Indole production	+	Salicin	-
Methyl red	+	D-Sorbitol	+
Voges- Proskauer	-	Sucose	D
Citrate (Simmons)	-	Trehalose	+
Hydrogen sulfide production	-	D-Xylose	+
Urea hydrolysis	-	Mucate	+
Phenylalanine deaminase	-	Tartrate, Jordans	+
(24h)	+	Esculin hydrolysis	d
Lysine decarboxylase	[-]	Acetate utilization	+
Arginine dihydrolase	d	Nitrate reduction	+
Ornithine decarboxylase	+	Deoxyribonuclease, 25 ^{o}c	-
Motility	-	Lipase	-
Gelatin hydrolysis, 22 ^{0}c	-	ONPG[c]	+
KCN, growth	-	Pigment[d]	-
Malonate utilization	+	Flagella arrangement[e]	P
D-Glucose, acid production	+	Catalase production (24h)	+
D-Glucose, gas production		Oxidation-fermentation	F
Acid production:	-		
D-Adonitol	+		
L- Arabinose	-		
Cellobiose	-		
Dulcitol	D		
Glycerol	-		
Myo-Inositol	-		
Lactose	-		
Maltose	+		
D-Mannitol	+		
D-Mannose	-		
Melibiose	+		
α-Methyl-D-glucoside			

-, 0-10% positive; [-], 11-25% positive; [+], 76-89% positive; +, 90-100% positive.

[a] Data not available. [b] No growth. [c] ONPG, *O*-nitrophenyl-**β**-D-galactopyranoside.

[d] B, brown; O, orange; R, red or pink; Y, yellow.

[e] P, peritrichous; L, lateral. [f] F, fermentative.

D different reactions in different taxa (species of a genus or genera of a family)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช.4 ผลการทดสอบสมบัติชีวเคมีของ *lysinibacillus* sp.

ทดสอบ	*Lysinibacillus sphaericus*	*Lysinibacillus fusiformis*
Rods Width, µm Length, µm	ND	0.6-1.0 1.5-5.0
Gram reaction Unstained globules in the protoplasm	+	+
Growth: Temperature °C pH rang 7% NaCl	 10-40 6.0-9.5 -	 17-40 6.0-9.5 +
Boron tolerance	75+	60+
Voges-Proskauer test	-	-
Reduction NO_3^- to NO_2^-	-	-
Oxidase L-Arginine dihydrolase L-Lysine and L-ornithine Tryptophan deaminase	+ ND ND -[a]	+ ND ND ND
Hydrolysis: Urea Gelatin Aesculin	 + + -	 + + -
Acid from Sucrose D-Xylose N-Acetyl-D-glucosamine	 V - ND	 V - ND
Resistance to (µg ml^{-1}): Chloramphenicol Erythromycin Rifampicin Streptomycin Tetracycline	 + + - +W -	 + + - +W -
Oxidation of: Pyruvate α- Hydroxybutyrate β- Hydroxybutyrate	 +[b] -[b] -[b]	 +[b] -[b] -[b]

All type strains produced positive results for motility, growth without NaCl and catalase activity and negative result for H2S product and indole production. ND, data available; V, variable result; +, positive; W, weakly positive; -, negative.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช.5 ผลการทดสอบสมบัติชีวเคมีของ *Brevibacillus* sp.

ทดสอบ	*Brevibacillus choshinensis*	ทดสอบ	*Brevibacillus choshinensis*
Gram reaction	+	d-Galacturonate	-
Anaerobic growth	-	d-Gluconate	d
Growth at:		d-Glucuronate	-
20°C d	+	l-Glutamate	-
50°C	-	dl-Lactate	-
55°C	-	d-Malate	d
NaCl tolerance:		l-Malate	+
2%	-	Malonate	d
3%	-	Mucate	-
4%	-	2-Oxoglutarate	+
5%	-	Propionate	+
Hydrolysis of:		Quinate	-
Casein	-	Succinate	-
Gelatin	-	l-Tartrate	-
ONPG	-		
Starch	-		
Urea	-		
Nitrate reduction	-		
*Acid from:*f	-		
N-Acetylglucosamine	-		
d-Fructose	-		
d-Glucose	-		
Glycerol	-		
Maltose	-		
d-Mannitol	-		
d-Mannose	-		
Ribose	+		
d-Tagatose	-		
d-Trehalose	-		
d-Turanose	-		
*Alkali from:*f	-		
cis-Aconitate	-		
trans-Aconitate	-		
Aspartate	-		
Caprylate	-		
Citrate	d		
Fumarate	-		

[a]Symbols: +, >85% positive; d, results differ between strains (16–84% positive); –, 0–15% positive; +/v, positive or variable reaction within a strain; +/v/–, positive, variable or negative reaction within a strain; v, reaction varies within a strain; w, weak reaction; +/w, positive or weak positive reaction; d/w, results differ between strains, but positive reactions are weak; no entry indicates that no data are available.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ซ

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ค่าซีโอดี

ตารางที่ ซ.1 ค่าซีโอดีของของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด

รหัสจุลินทรีย์	ค่าซีโอดี (mg/l) ซ้ำที่ 1	ค่าซีโอดี (mg/l) ซ้ำที่ 2	ค่าซีโอดี (mg/l) ซ้ำที่ 3	ค่าซีโอดี (mg/l) เฉลี่ย	SD	% การบำบัด
P 1	422.40	438.40	438.40	433.07	9.24	56.69
P 2	328.40	344.40	360.40	344.40	16.00	65.56
P 3	1000.00	886.40	1000.00	962.13	65.59	3.79
BK 1	742.40	742.40	758.40	747.73	9.24	25.23
BK 2	703.38	694.40	710.40	692.06	12.65	30.79
BK 3	822.40	806.40	838.40	822.40	16.00	17.76
BK 4	744.40	758.40	758.40	753.73	8.08	24.63
PW 1	790.40	806.40	806.40	801.07	9.24	19.89
Pw 2	1000.00	1000.00	886.40	962.13	65.59	3.79
PW 3	800.00	900.00	820.77	840.26	52.77	15.97
PK 1	566.40	582.40	550.40	566.40	16.00	43.36
PK 2	710.40	742.40	742.40	731.73	18.48	26.83
PK 3	838.40	838.40	822.40	833.07	9.24	16.69
PK 4	790.40	790.40	790.40	790.40	0.00	20.96
PK 5	886.40	870.40	870.40	875.73	9.24	12.43
PK 6	838.40	850.32	872.40	855.71	17.01	14.43
PK 7	694.40	678.40	710.40	694.40	16.00	30.56
KS 1	801.35	817.56	806.40	815.10	7.77	18.49
KS 2	579.42	582.40	566.40	576.07	8.51	42.39

ตารางที่ ซ.2 ค่าซีโอดีของของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด(ต่อ)

รหัสจุลินทรีย์	ค่าซีโอดี (mg/l) ซ้ำที่ 1	ค่าซีโอดี (mg/l) ซ้ำที่ 2	ค่าซีโอดี (mg/l) ซ้ำที่ 3	ค่าซีโอดี (mg/l) เฉลี่ย	SD	% การบำบัด
KS 3	678.40	678.40	678.40	678.40	0.00	32.16
KS 4	662.40	646.40	646.40	651.73	9.24	34.83
R 1	678.40	646.40	662.40	662.40	16.00	33.76
R 2	806.40	790.40	812.42	803.67	11.38	19.69
R 3	662.40	694.40	694.40	683.73	18.48	31.63
R 4	662.40	678.40	678.40	673.07	9.24	32.69
R 5	390.40	416.25	406.40	404.35	13.05	59.57
R 6	358.40	374.40	374.40	369.07	9.24	63.09
R 7	534.40	550.40	548.32	544.37	8.70	45.56
R 8	966.67	966.67	900.00	944.45	38.49	5.56
R 9	886.40	886.40	886.40	886.40	0.00	11.36
PL 1	742.40	726.40	742.40	737.07	9.24	26.29
PL 2	534.40	518.40	545.32	532.71	13.54	46.73
PL 3	326.40	310.40	326.40	321.07	9.24	67.89
PL 4	886.40	870.40	892.35	883.05	11.35	11.70
QM 1	726.40	726.40	726.40	726.40	0.00	27.36
QM 2	598.40	624.35	614.40	612.38	13.09	38.76
S 1	342.40	326.40	326.40	331.73	9.24	66.83
S 2	374.40	390.40	358.40	374.40	16.00	62.56
S 3	694.40	701.35	678.40	691.38	11.77	30.86

ตารางที่ ซ.3 ค่าซีโอดีของของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด(ต่อ)

รหัสจุลินทรีย์	ค่าซีโอดี (mg/l) ซ้ำที่ 1	ค่าซีโอดี (mg/l) ซ้ำที่ 2	ค่าซีโอดี (mg/l) ซ้ำที่ 3	ค่าซีโอดี (mg/l) เฉลี่ย	SD	% การบำบัด
S 4	614.40	630.40	636.35	627.65	11.35	37.30
S 5	582.40	578.35	566.40	575.72	8.32	42.43
S 6	358.40	358.40	342.40	353.07	9.24	64.69
S 7	374.40	374.40	390.40	379.73	9.24	62.03
E 1	374.40	366.35	358.40	366.38	8.00	63.35
E 2	294.40	294.40	310.40	299.73	9.24	70.03
E 3	742.40	758.35	726.40	742.38	15.98	25.76
E 4	310.40	294.40	278.40	294.40	16.00	70.56
E 5	342.40	358.40	342.40	347.73	9.24	65.23
E 6	694.40	710.35	678.40	694.38	15.98	30.56

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ซ.4 ค่า MLSS ของถังปฏิกรณ์บำบัดน้ำเสียกากตะกอนช่องนนทรีและกากตะกอนช่องนนทรีเติมกลุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์

ถังปฏิกรณ์	day	1	2	3	เฉลี่ย	SD
กากตะกอนน้ำเสียช่องนนทรี	1	1506	1510	1509	1508.33	2.08
	2	1535	1540	1543	1539.33	4.04
	3	1543	1545	1550	1546.00	3.61
	4	1570	1568	1565	1567.67	2.52
	5	1519	1515	1520	1518.00	2.65
	6	1535	1542	1545	1540.67	5.13
	7	1550	1549	1553	1550.67	2.08
	8	1540	1542	1540	1540.67	1.15
กากตะกอนน้ำเสียช่องนนทรี+หัวเชื้อจุลินทรีย์	1	1510	1505	1504	1506.33	3.21
	2	1558	1554	1550	1554.00	4.00
	3	1554	1550	1548	1550.67	3.06
	4	1525	1530	1538	1531.00	6.56
	5	1532	1530	1535	1532.33	2.52
	6	1530	1525	1526	1527.00	2.65
	7	1535	1538	1535	1536.00	1.73
	8	1540	1538	1536	1538.00	2.00

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจันทร์ทิพย์ ทรงฤทธิ์ เกิดวันที่ 09 เดือนสิงหาคม พ.ศ.2530 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม จากคณะทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่ 10 ถนนเทศบาล 23 ต.สระแก้ว อ.เมือง จ.สระแก้ว 27000

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University