การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันถั่วเหลืองโดยการเติมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

นางสาวพิชญ์นาฏ สุทธิสมณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4793-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TREATMENT OF WASTEWATER CONTAINING SOYBEAN OIL BY ADDING LIPASE-PRODUCING BACTERIA IN ACTIVATED SLUDGE SYSTEM

Miss Pitchanart Suthisom

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Environmental Science (Inter-department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-4793-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันถั่วเหลืองโดยการเติมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์
โดย	นางสาวพิชญ์นาฏ สุทธิสมณ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธา ขาวเธียร)

....กรรมการ

(ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิชญ์นาฏ สุทธิสมณ์: การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันถั่วเหลืองโดยการเติมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์. (TREATMENT OF WASTEWATER CONTAINING SOYBEAN OIL BY ADDING LIPASE-PRODUCING BACTERIA IN ACTIVATED SLUDGE SYSTEM) อ. ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์; 77 หน้า. ISBN 974-17-4793-4.

จากตัวอย่างดินและน้ำเสียจากร้านอาหาร ตลาด และบ้านเรือน สามารถแยกแบคทีเรียผลิตไลเปสด้วยอาหารที่ประกอบด้วยน้ำมันมะกอกได้ 37 ไอโซเลท นำมาคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสได้กว้างในอาหาร tributyrin agar ได้ 10 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ได้แบคทีเรียผสมกลุ่มสุดท้ายประกอบด้วย 3 ไอโซเลท คือ L1, L2 และ L3 จึงนำมาศึกษาการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ต่อไป

ผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันถั่วเหลือง ซีโอดี และบีโอดี ในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์พบว่า ชุดควบคุมสามารถลดค่าน้ำมันถั่วเหลือง ซีโอดี และบีโอดี ได้ร้อยละ 90.9, 84.1 และ 85.2 ตามลำดับ ชุดที่มีการเติมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ L1, L2 และ L3 สามารถลดค่าน้ำมันถั่วเหลือง ซีโอดี และบีโอดี ได้ร้อยละ 97.5, 86.3 และ 87.8 ตามลำดับ ชุดที่มีการเติมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ L1, L2, L3, *Acinetobacter* และ *Yarrowia* สามารถลดค่าน้ำมันถั่วเหลือง ซีโอดี และบีโอดี ได้ร้อยละ 97.5, 86.5 และ 87.6 ตามลำดับ ผลจากการติดตามความสามารถในการคงอยู่ในระบบของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ L1, L2 และ L3 รวมทั้ง *Acinetobacter* และ *Yarrowia* โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Chloramphenical พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถเจริญอยู่ในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ได้ตลอดการทดลอง แสดงว่าจุลินทรีย์ที่เติมลงไปน่าจะใช้ในระบบบำบัดจริงได้ ทั้งนี้จะต้องทดลองในระดับขยายขนาดต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สหสาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต..
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....................................
ปีการศึกษา 2546

4389085520: MAJOR INTER-DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SCIENCE
KEY WORD: LIPASE/ ACTIVATED SLUDGE/ OIL REMOVAL/ WASTEWATER TREATMENT

PITCHANART SUTHISOM: TREATMENT OF WASTEWATER CONTAINING SOYBEAN OIL BY ADDING LIPASE-PRODUCING BACTERIA IN ACTIVATED SLUDGE SYSTEM. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANON, Ph.D., 77 pp. ISBN 974-17-4793-4.

From soil samples and wastewater samples collected from canteen, side-street market and domestic house, 37 isolates with lipase activity were obtained in a medium containing olive oil which then further screened in tributyrin agar. Ten isolates with the highest clear zone from tributyrin agar were test for sustainability in synthetic wastewater with soybean oil. Isolates L1, L2 and L3 were the 3 most abundant bacteria sustained in the wastewater. Therefore, L1, L2 and L3 were used for further study in soybean oil degradation using activated sludge system.

The removal efficiency of soybean oil, COD, BOD in activated sludge system of the control unit was 90.9%, 84.1% and 85.2%, respectively. The removal efficiency of soybean oil, COD, BOD of the unit with addition of L1, L2 and L3 were 97.5%, 86.3% and 87.8%, respectively. The removal efficiency of soybean oil, COD, BOD of the unit adding L1, L2 , L3, *Acinetobacter* and *Yarrowia* were 97.5%, 86.5% and 87.6%, respectively. The follow up for sustainability of selected bacteria L1, L2 , L3, *Acinetobacter* and the yeast *Yarrowia* by using chloramphenical was found that these microorganisms could be sustained in activated sludge system throughout the experiment. The microorganisms showed their potential for using in activated sludge system. However, the further tests in scaling up are need.

Inter-department Environmental Science . Student's signature.............................
Field of study Environmental Science . Advisor's signature...........................…
Academic year 2003 .

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขรายละเอียดในวิทยานิพนธ์ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุธา ขาวเธียร และ ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่ายิ่งเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการเขียนวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการวิจัย ตลอดจนวัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ มูลนิธิชิน โสภณพนิช ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการวิจัยครั้งนี้

และที่สำคัญที่สุด ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่อบรมเลี้ยงดูมา ให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แนวคิดและทฤษฎี	3
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	19
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	19
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย	20
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	21
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	61
5.1 สรุปผลการวิจัย	61
5.2 ข้อเสนอแนะ	62
รายการอ้างอิง	63
ภาคผนวก	68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์...... 25
ตารางที่ 3.2 แผนการเก็บตัวอย่างน้ำของการทดลองแต่ละชุด.. 30
ตารางที่ 3.3 วิธีที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ... 31
ตารางที่ 4.1 ลักษณะและสถานที่เก็บของตัวอย่างที่นำมาทำการทดลอง...... 34
ตารางที่ 4.2 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้จากแต่ละตัวอย่าง... 34
ตารางที่ 4.3 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสกับ
เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 37 ไอโซเลท... 35
ตารางที่ 4.4 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสกับเส้นผ่านศูนย์กลาง
โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท ที่ผลิตเอนไซม์
ไลเปสได้ดีในอาหาร tributyrin agar...... 37
ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกได้
จากหัวเชื้อสลัดจ์ตั้งต้นและแบคทีเรียที่ผลิต
เอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 ชนิด...... 55
ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Acinetobacter* และ *Yarrowia*... 57
ตารางที่ ค.1 ผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าออกซิเจนละลาย (DO)
และค่าความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์(MLSS) ในถังเติมอากาศ
ของการทดลองชุดที่ 1... 73
ตารางที่ ค.2 ผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าออกซิเจนละลาย (DO)
และค่าความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์(MLSS) ในถังเติมอากาศ
ของการทดลองชุดที่ 2...... 73
ตารางที่ ค.3 ผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าออกซิเจนละลาย (DO)
และค่าความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์(MLSS) ในถังเติมอากาศ
ของการทดลองชุดที่ 3... 74
ตารางที่ ง.1 ผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดี (COD) บีโอดี (BOD)
และน้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil) ของการทดลองชุดที่ 1... 75
ตารางที่ ง.2 ผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดี (COD) บีโอดี (BOD)
และน้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil) ของการทดลองชุดที่ 2 ... 75

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ ง.3 ผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดี (COD) บีโอดี (BOD) และน้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil) ของการทดลองชุดที่ 3………………………...... 76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

รูปที่ 2.1 ปฏิกริยาและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการบำบัด
ทางชีววิทยาแบบไม่ต่อเนื่อง …………………………………………………………….…… 6
รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์………………………….. 7
รูปที่ 2.3 อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในช่วงต่างๆ
ในระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์………………...…………………………………….. 10
รูปที่ 2.4 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของไลเปส……………………………………………………. 13
รูปที่ 3.1 FLOW DIAGRAM ของการทดลอง………………...……………………………….. 27
รูปที่ 3.2 ระบบบำบัดแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ที่ใช้ในการทดลอง...………………………………….. 28
รูปที่ 4.1 ลักษณะของ L1 เมื่อย้อมสีแกรม ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์
ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย x100..........……………..………………......…........……........ 38
รูปที่ 4.2 ลักษณะของ L2 เมื่อย้อมสีแกรม ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์
ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย x100……………..………………….……………………...… 39
รูปที่ 4.3 ลักษณะของ L3 เมื่อย้อมสีแกรม ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์
ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย x100……………………...……………........................... 39
รูปที่ 4.4 ระดับพีเอชของน้ำเสียในถังเติมอากาศ ในช่วงเก็บผลการทดลอง
ทั้ง 7 วัน ของการทดลองทั้ง 3 ชุด…..………….......…......................……...…................ 41
รูปที่ 4.5 ระดับออกซิเจนละลายของน้ำเสียในถังเติมอากาศ ในช่วงเก็บผลการทดลอง
ทั้ง 7 วัน ของการทดลองทั้ง 3 ชุด ณ อุณหภูมิห้อง……………….…………………..…..... 43
รูปที่ 4.6 ระดับของแข็งแขวนลอยในถังเติมอากาศ ในช่วงเก็บผลการทดลอง
ทั้ง 7 วัน ของการทดลองทั้ง 3 ชุด.........…...………………..........….………............ 45
รูปที่ 4.7 ปริมาณของน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัดที่มีความเข้มข้น
ของน้ำมันเริ่มต้น 963 มิลลิกรัมต่อลิตร ของการทดลอง ทั้ง 3 ชุด………...………….…... 47
รูปที่ 4.8 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำเสียสังเคราะห์
ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันเริ่มต้น 963 มิลลิกรัมต่อลิตร
ของการทดลองทั้ง 3 ชุด……………………………….………………………………... 47
รูปที่ 4.9 ค่าซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัด ของการทดลองทั้ง 3 ชุด……………… 49
รูปที่ 4.10 ประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์ของการทดลองทั้ง 3 ชุด…………… 49

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

รูปที่ 4.11 ค่าบีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัด
ของการทดลองทั้ง 3 ชุด………………………………………………………………... 51
รูปที่ 4.12 ประสิทธิภาพการกำจัดบีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์
ของการทดลองทั้ง 3 ชุด……………..……………………………………………….…… 51
รูปที่ 4.13 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Chloramphenical ของ S1………….…………. 53
รูปที่ 4.14 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Chloramphenical ของ L1……………………. 54
รูปที่ 4.15 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Chloramphenical ของ L2……………………. 54
รูปที่ 4.16 เชื้อที่ขึ้นได้ในบริเวณที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ Chloramphenical……..……..…………… 58
รูปที่ 4.17 โคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ขึ้นได้ในบริเวณที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ…………………………….. 59
รูปที่ 4.18 ลักษณะของ *Yarrowia* ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยเลนส์วัตถุ
กำลังขยาย x40…………………………………………………………………...……. 59
รูปที่ 4.19 ลักษณะของ *Acinetobacter* ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยเลนส์วัตถุ
กำลังขยาย x100……………………………………………………….………… 60
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาซีโอดี……………………………..……………………… 72

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การที่น้ำทิ้งจากบ้านเรือนหรือโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภทมีไขมันปะปนอยู่ มักก่อให้เกิดปัญหาต่อระบบบำบัดน้ำทิ้งทางชีววิทยาอย่างมาก เนื่องจากการลอยตัวของไขมันเป็นสาเหตุให้มีการดึงสารแขวนลอยอื่นๆ ขึ้นสู่ผิวทำให้ตกตะกอนยาก (พัฒนา ขวัญสกุล, 2520) และไขมันก่อให้เกิดปัญหาการอุดตันทำให้ระบบบำบัดไม่สามารถทำงานได้ (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2530) นอกจากนี้ยังทำให้กระบวนการการย่อยสลายน้ำทิ้งช้ามากเพราะจุลินทรีย์ย่อยไขมันได้ช้า ด้วยเหตุดังกล่าวเมื่อมีการบำบัดน้ำทิ้งทางชีววิทยาจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงไขมันที่อาจจะปะปนอยู่ในน้ำทิ้งบางประเภท

การกำจัดไขมันในน้ำทิ้งนั้นสามารถกำจัดได้ทั้งวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การตักหรือกวาด (skimming) การทำให้ลอย (flotation) และวิธีทางเคมี ได้แก่ การใช้สารเคมีช่วยในการตกตะกอน (chemical precipitation) เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปกระบวนการบำบัดน้ำทิ้งทางชีววิทยานั้นจะมีการกำจัดไขมันตามวิธีข้างต้นก่อน เพราะไขมันที่มีอยู่ในน้ำทิ้งจะทำให้การบำบัดน้ำทิ้งทางชีววิทยาไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ทำให้ต้องใช้พื้นที่และต้นทุนในการสร้างถังดักไขมันและต้องเสียค่าแรงในการช้อนตักไขมันจากบ่อทิ้งเพื่อไปกำจัดด้วยวิธีอื่น ได้มีการศึกษาปริมาณไขมันจากโรงอาหารสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (ขนาด 13 ร้านค้า) พบว่าน้ำทิ้งที่ออกมายังมีปริมาณไขมันสูงถึง 163 มิลลิกรัมต่อลิตร จากเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แม้จะใช้เวลากักพักในถังดักไขมันสูงถึง 6 ชั่วโมง แล้วก็ตาม (อุดร จารุรัตน์ และจารุรัตน์ วรนิสรากุล, 2536) ดังนั้นหากมีการนำจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียมาทำงานพร้อมกับกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยาได้ น่าจะเป็นวิธีการที่ช่วยลดขั้นตอนการบำบัดลงแต่ยังบำบัดน้ำเสียได้ดี ในการศึกษานี้จะคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปสเพื่อที่จะนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิต extracellular lipase เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมัน

1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ที่เติมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมัน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 จุลินทรีย์ผสม (mixed culture) คือ แบคทีเรียผลิตไลเปสที่คัดเลือกได้ ผสมกับ *Acinetobacter* และ *Yarrowia* ในการศึกษากับแบบจำลองของระบบบำบัด
1.3.2 น้ำเสียที่ใช้ คือ น้ำเสียสังเคราะห์ที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง (0.1%)
1.3.3 แบบจำลองที่ใช้ของระบบบำบัดน้ำเสียเป็นแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ ในระดับห้องปฏิบัติการ
1.3.4 ทำการตรวจวิเคราะห์ค่า pH, COD, BOD, MLSS, DO และ น้ำมัน เพื่อประเมินประสิทธิภาพของระบบที่เติมและไม่เติมจุลินทรีย์ผสม

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เริ่มดำเนินการทดลองโดยทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส และทำการคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง จากนั้นจึงนำไปศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันในน้ำเสีย ในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถนำแบคทีเรียผลิตไลเปสที่คัดเลือกได้ ไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียได้
1.5.2 เป็นการช่วยลดปัญหามลพิษสิ่งแวดล้อมทางน้ำที่เกิดจากน้ำมัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 น้ำมันและไขมันในน้ำทิ้ง

น้ำมันและไขมันที่ปะปนมากับน้ำทิ้งบ้านเรือน โรงงานอุตสาหกรรม ภัตตาคาร โรงแรม อาคารสูง นับเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดสภาพมลภาวะการเน่าเสียของลำน้ำสาธารณะโดยทั่วไป สภาพน้ำมันและไขมันที่ปะปนออกมานั้นจะเคลือบที่ผิวหน้าของน้ำทิ้งทำให้เกิดความไม่น่าดูและ ยังทำให้ดึงสารแขวนลอยอื่นๆ ขึ้นสู่ผิว ทำให้ตกตะกอนยาก อีกทั้งยังปิดกั้นผิวหน้าไม่ให้อากาศผ่านเข้าไปผสมกับน้ำได้ นอกจากนี้น้ำมันและไขมันอาจห่อหุ้มจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถกินอาหารหรือหายใจได้ การย่อยสลายไขมันในน้ำทิ้งเกิดช้ามากเพราะจุลินทรีย์ย่อยน้ำมันและไขมันได้ช้า ด้วยเหตุดังกล่าวเมื่อจะมีการบำบัดน้ำทิ้งทางชีววิทยาจำเป็นต้องคำนึงถึงน้ำมันและไขมันที่อาจปะปนอยู่ในน้ำทิ้งบางประเภท

2.1.1.1 สภาพทางกายภาพของน้ำมันและไขมันในน้ำทิ้ง

น้ำมันและไขมันปะปนอยู่ในน้ำทิ้งในรูปต่างๆ คือ

(1) สารแขวนลอย (as suspended fat or oil) มีเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 10^{-3} ซม. บางทีเรียก catchable fat

(2) อีมัลชั่น (as emulsified fat or oil) หมายถึง ไขมันที่อยู่ใน heterogenous system คือ อนุภาคที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 10^{-5} ซม. กระจายอยู่ในน้ำ

(3) สารละลาย (as dissolved fat or oil) เป็นพวกกรดไขมัน (fatty acid) ซึ่งประกอบด้วย oleophilic hydrocarbon chain และ hydrophilic head group ทำให้ละลายอยู่ในน้ำได้

2.1.1.2 วิธีการกำจัดน้ำมันและไขมัน

การกำจัดน้ำมันและไขมันทำได้โดยการแยกน้ำมันและไขมันออกจากน้ำเสียนั้นสามารถทำได้โดยหลายวิธี ได้แก่ วิธีการทางด้านกายภาพ วิธีการด้านเคมี และวิธีการทางด้านชีววิทยา

การจะเลือกวิธีใดนั้นขึ้นกับองค์ประกอบหลายประการ เช่น ปริมาณ สภาพ ชนิด ของน้ำมันและไขมัน

(1) วิธีการทางด้านกายภาพ (physical method) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมใช้กันมากและแพร่หลาย เนื่องจากทำได้รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำ กระบวนการไม่ซับซ้อน ทั้งนี้ยังขึ้นกับคุณสมบัติของน้ำมันและไขมันทางด้านกายภาพ ซึ่งแตกต่างกันไปตามแหล่งกำเนิด และขนาดโมเลกุล ชนิดที่โมเลกุลใหญ่มีระยะเวลาเก็บกักน้อยสามารถแยกชั้นได้รวดเร็วอาจใช้ถังดักน้ำมันและไขมัน (oil & grease trap) แต่ถ้ามีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ในรูปของคอลลอยด์ หรืออีมัลชั่น (colloid & emulsion) ซึ่งโมเลกุลมีขนาดใกล้เคียงกับโมเลกุลของน้ำหรือเล็กกว่า ทำให้แยกออกมาได้ยาก ต้องใช้กรรมวิธีอื่น เช่น วิธีใช้อากาศเป่าลงไปในน้ำทิ้ง (air floatation) เป็นวิธีทางกายภาพอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ได้กับน้ำมันและไขมันเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะที่มีโมเลกุลขนาดเล็กความหนาแน่นน้อย การเป่าอากาศลงไปในน้ำทิ้งจะเป็นการแยกน้ำมันและไขมันออกจากน้ำ โดยการอัดอากาศให้เป็นฟองขนาดเล็กๆ ฟองเหล่านี้จะเป็นตัวช่วย ยก พา แยก โมเลกุลของน้ำมันและไขมันออกจากน้ำทิ้ง (วิทยา อยู่สุข, 2537)

(2) วิธีการทางเคมี (chemical method) สามารถทำได้ด้วยการเติมสารเคมี เช่น คลอรีน แต่วิธีการนี้มักไม่ค่อยได้รับความนิยมเพราะจะก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในระบบ และยังไม่เหมาะกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบเลี้ยงตะกอนเพราะสารเคมีจะไปทำลายจุลินทรีย์ในระบบ

(3) วิธีการทางด้านชีววิทยา (biological method) วิธีการนี้สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

(3.1) การสลายโดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (biodegradation) เป็นกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ เช่น ยีสต์ รา แอคทิโนมัยซิส และแบคทีเรีย ช่วยในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน และนำเอาไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของตัวมันเอง ซึ่งกระบวนการนี้จะเป็นไปอย่างช้าๆ และใช้เวลานานกว่าจะกำจัดได้หมด แต่จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย หรือแทบไม่เกิดเลย (สมรัตน์ ยินดีพิธ, 2533)

(3.2) การเร่งธรรมชาติ (bioremediation) ทำได้ 2 วิธี ดังนี้

(3.2.1) การเติมธาตุอาหาร (nutrient enrichment or fertilization) เช่น การเติมไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ลงในน้ำที่มีน้ำมันและไขมันเพื่อกระตุ้นหรือเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยน้ำมันและไขมันที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ ให้มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

(3.2.2) การเติมเชื้อจุลินทรีย์ (seeding) เป็นการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันให้มากขึ้น เชื้อที่เติมยังแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เชื้อที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติแล้วแยกออกมา กับเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยทางพันธุวิศวกรรม (จิราภรณ์ สุขุมาวาลี และคณะ, 2536)

2.1.2 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ (activated sludge)

ระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ (activated sludge) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา ซึ่งอาศัยสิ่งมีชีวิต อันได้แก่ พวกจุลินทรีย์ทั้งหลายในการกิน ทำลาย ย่อยสลาย ดูดซับ หรือเปลี่ยนรูปของมลสารต่างๆ ที่อยู่ในน้ำเสียให้มีค่าความสกปรกน้อยลง ในการควบคุมการทำงานจึงเป็นเรื่องที่ค่อนข้างซับซ้อนและละเอียดอ่อน ต้องเข้าใจความต้องการของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมทั้งสภาวะแวดล้อมและลักษณะทางกายภาพต่างๆ ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตเพื่อให้ระบบสามารถทำงานได้ดีที่สุด

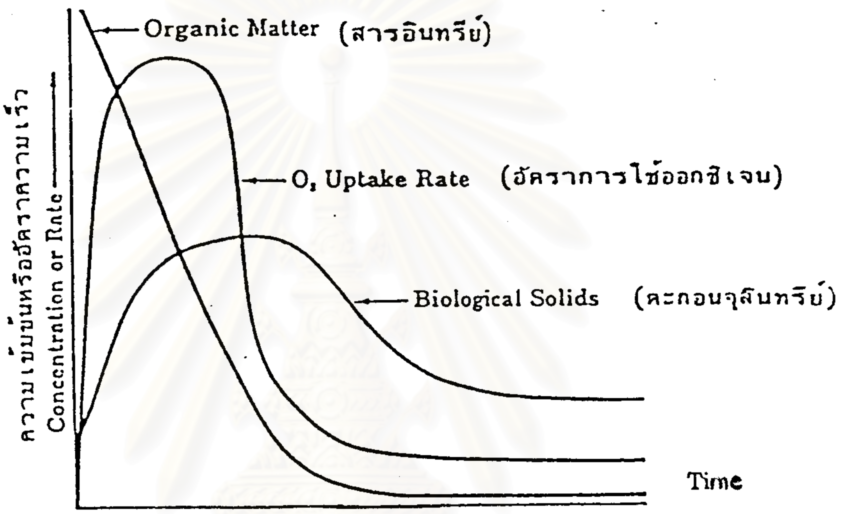
2.1.2.1 กลไกในการทำงานของระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

กระบวนการแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมากมายหลายชนิดที่ถูกควบคุมให้เจริญเติบโตอยู่ในน้ำ ซึ่งมีออกซิเจนอิสระละลายอยู่ และจะต้องมีสารอินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นอาหารและแหล่งพลังงานในการดำรงชีพได้อีกด้วย ปฏิกริยาทางชีวเคมีของกระบวนการสามารถเขียนได้ดังนี้

$$\text{มลสารอินทรีย์} + \text{จุลินทรีย์} \xrightarrow{\text{ออกซิเจน}} \text{จุลินทรีย์ตัวใหม่} + \text{คาร์บอนไดออกไซด์} + \text{น้ำ} + \text{พลังงาน}$$

มลสาร (pollutant) ที่อยู่ในน้ำเสียจะถูกจุลินทรีย์ใช้เป็นอาหารและเจริญเติบโตขยายพันธุ์ต่อไป ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะลอยขึ้นไปในอากาศ ส่วนน้ำจะผสมออกไปกับน้ำที่บำบัดแล้ว พลังงานก็จะถูกจุลินทรีย์ใช้ในการดำเนินชีวิต สรุปแล้วมลสารซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ สารอินทรีย์ต่างๆ ในน้ำเสียจะถูกเปลี่ยนมาเป็นจุลินทรีย์ที่หนักกว่าน้ำ สามารถแยกออกได้ง่ายด้วยการตกตะกอนในถังตกตะกอน น้ำเสียที่ถูกจุลินทรีย์นำสารอินทรีย์ต่างๆ มาใช้จนหมดแล้วก็จะเป็นน้ำสะอาดพอที่จะปล่อยทิ้งโดยไม่เกิดการเน่าเหม็น

ในการใช้สารอาหารหรือในการย่อยสลาย (break down) สารอินทรีย์อาจมีการทำงานร่วมกันหลายชนิดก็ได้ โดยจุลินทรีย์บางชนิดเริ่มทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ซับซ้อน (complex organics) ก่อน จากนั้นก็จะมีชนิดอื่นๆ ย่อยสลายส่วนที่เหลือ หรือมิฉะนั้นก็อาจจะเป็นการนำเอาผลหรือของเสียที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มาทำการย่อยสลายต่อจนเป็นสารที่ไม่สามารถย่อยสลายต่อไปได้อีก (end product) ลักษณะของการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในการทำงานของกระบวนการแบบทำงานเป็นครั้งคราว (batch process) สามารถแสดงได้ตามรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ปฏิกริยาและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการบำบัดทางชีววิทยาแบบไม่ต่อเนื่อง (สุรพล สายพานิช, 2538: 151-153)

เมื่อเริ่มการทำงานค่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำเสียจะมีค่าสูง ส่วนจุลินทรีย์จะมีค่าความเข้มข้นต่ำและมีอัตราการใช้ออกซิเจนต่ำ ต่อจากนั้นเมื่อจุลินทรีย์เริ่มทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ก็จะเริ่มใช้ออกซิเจนมากขึ้นและเจริญเติบโตเป็นผลให้มีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ครั้นเมื่ออาหารเริ่มขาดแคลนจนไม่เพียงพอในการดำรงชีพของจุลินทรีย์ ปริมาณจุลินทรีย์และอัตราความต้องการออกซิเจนก็จะลดลงตามลำดับ แต่สำหรับในระบบบำบัดน้ำเสียจริงซึ่งมีน้ำเสียไหลเข้าระบบอย่างต่อเนื่อง จุลินทรีย์ก็จะย่อยสลายสารอินทรีย์และเพิ่มปริมาณอยู่ตลอดเวลาและมีอัตราการใช้ออกซิเจนสูงตลอดเวลาเช่นเดียวกัน

จุลินทรีย์ต้องนำออกซิเจนมาใช้ด้วยเหตุผล 3 ประการ คือ

(1) ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงาน ตามสมการ

สารอินทรีย์ + ออกซิเจน —(จุลินทรีย์ / เอนไซม์)→ คาร์บอนไดออกไซด์ + น้ำ + พลังงาน

(2) ใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่

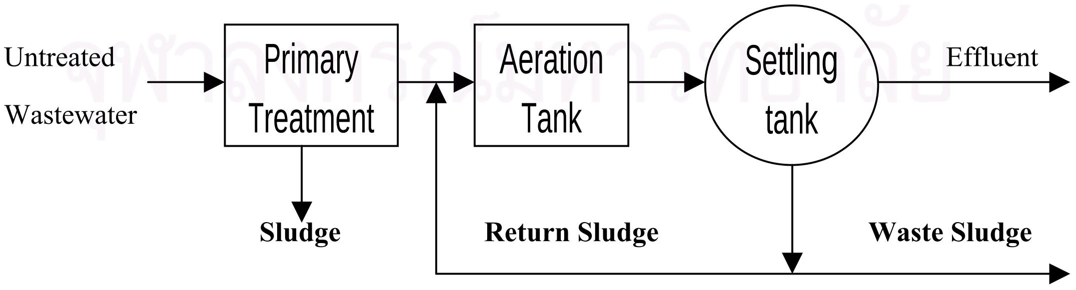
สารอินทรีย์ + ฟอสฟอรัส + ไนโตรเจน + ออกซิเจน —(จุลินทรีย์ / พลังงาน)→ เซลล์ใหม่ + น้ำ + คาร์บอนไดออกไซด์

(3) ใช้ในการย่อยสลายจุลินทรีย์ตัวอื่นที่ตายแล้วเพื่อเป็นอาหาร

จุลินทรีย์ที่ตายแล้ว + ออกซิเจน —(จุลินทรีย์ / เอนไซม์)→ คาร์บอนไดออกไซด์ + น้ำ + พลังงาน + (แอมโมเนียหรือไนเตรต)

2.1.2.2 ส่วนประกอบและการทำงานของระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

ส่วนประกอบของระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ประกอบด้วยกระบวนการย่อยที่สำคัญหลายกระบวนการมารวมกัน แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ (วรรษา โชติชัยสถิตย์, 2541)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น้ำเสียเมื่อผ่านระบบบำบัดเบื้องต้น (primary treatment) ซึ่งเป็นการบำบัดทางกายภาพเพื่อขจัดของแข็งขนาดใหญ่ เช่น เศษผ้า กระดาษ กรวด ทราย เป็นต้น แล้วก็จะไหลเข้าถังเติมอากาศ (aeration tank) ซึ่งถังเติมอากาศถือว่าเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดของระบบนี้ โดยในถังเติมอากาศจะมีเครื่องเติมอากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่น้ำเสีย และผสมน้ำเสียกับจุลินทรีย์ให้ทำปฏิกิริยาด้านชีวเคมีในการกำจัดสิ่งสกปรกในน้ำเสีย ทำให้ระบบสามารถกำจัดสิ่งสกปรกที่อยู่ในน้ำเสียได้ประมาณ 90% ซึ่งส่วนที่ถูกกำจัดไปส่วนใหญ่ ได้แก่ พวกสารอินทรีย์

น้ำเสียที่ถูกบำบัดแล้วจะไหลต่อไปยังถังตกตะกอนเพื่อแยกตะกอนจุลินทรีย์ออกจากน้ำใส หน้าที่สำคัญของถังตกตะกอน คือ การขจัดของแข็งตกตะกอนได้หรือแยกจุลินทรีย์ออกจากน้ำเสีย ทั้งนี้เพื่อให้น้ำที่ผ่านถังตกตะกอนออกไปแล้วมีคุณภาพที่ดี เช่น มีความเข้มข้นของตะกอนแขวนลอยต่ำ มีค่าบีโอดีต่ำ เป็นต้น และหลังแยกตะกอนจุลินทรีย์โดยการตกตะกอนออกจากน้ำทิ้งแล้วตะกอนที่แยกตัวอยู่ที่ก้นถังตกตะกอนส่วนหนึ่งจะถูกสูบกลับ (return sludge) ไปเข้ายังถังเติมอากาศเพื่อลดมลสารที่เข้ามาใหม่ และเพื่อรักษาปริมาณจุลินทรีย์ในระบบให้มีค่าคงที่ตลอดเวลา ซึ่งจะมีผลทำให้การทำงานของระบบขึ้นอยู่กับการหมุนเวียนจุลินทรีย์กลับสู่ระบบอย่างเพียงพอ ตะกอนจุลินทรีย์อีกส่วนหนึ่งจะเป็นตะกอนจุลินทรีย์ส่วนเกินที่เป็นผลจากการเจริญเติบโตซึ่งจะต้องนำไปบำบัด สำหรับน้ำใสส่วนบนจะเป็นน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วทิ้งออกจากระบบได้

ส่วนการนำตะกอนจุลินทรีย์ส่วนเกิน (excess sludge) ที่เกิดจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ออกจากระบบเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องกระทำอย่างสม่ำเสมอเพื่อรักษาปริมาณตะกอนจุลินทรีย์ในระบบให้มีค่าพอเหมาะ ซึ่งเป็นหลักสำคัญในการควบคุมการทำงานของกระบวนการตะกอนเร่ง ให้มีอัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์ (F/M) ที่สมดุล อันจะยังผลให้อาหารหรือมลสารที่มีอยู่ในน้ำเสียสามารถถูกกำจัดให้หมดไปหรือมีค่าเหลืออยู่น้อย เพื่อให้อาหารเป็นตัวจำกัดในการเจริญเติบโต (food limiting factor)

2.1.2.3 จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อยู่ในระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

ในการออกแบบและควบคุมระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์นั้นต้องมีความเข้าใจถึงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อยู่ในระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ ซึ่งจุลินทรีย์ในระบบนี้แบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ

(1) จุลินทรีย์ผู้สร้างฟลอค (floc former) ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่สามารถจับตัวกันเป็นกลุ่มฟลอค และตกตะกอนได้ดี

(2) จุลินทรีย์ผู้สลาย (saprophyte) ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ บางชนิดสร้างฟลอคได้ด้วย

(3) จุลินทรีย์ผู้กิน (predator) คือ พวกที่กินจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กกว่าเป็นอาหาร กลุ่มนี้ประกอบด้วยโปรโตซัว (protozoa) อมีบา (ameoba) และ โรติเฟอร์ (rotifer) เป็นต้น

(4) จุลินทรีย์ผู้ก่อกวน (nuisance microorganism) เป็นพวกที่ก่อกวนการทำงานของระบบ เช่น แบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (filamentous bacteria) ซึ่งทำให้เกิดอาการตะกอนไม่จมตัว เป็นต้น

ระบบบำบัดน้ำเสียจะทำงานได้ดีเมื่อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ประเภท อาศัยอยู่รวมกันในปริมาณที่เหมาะสม

2.1.2.4 การเกิดตะกอนแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

ตะกอนแบคทีเรียแอคติเวตเต็ดสลัดจ์เกิดขึ้นต่อเนื่องกัน 3 ขั้นตอน ในถังเติมอากาศ คือ

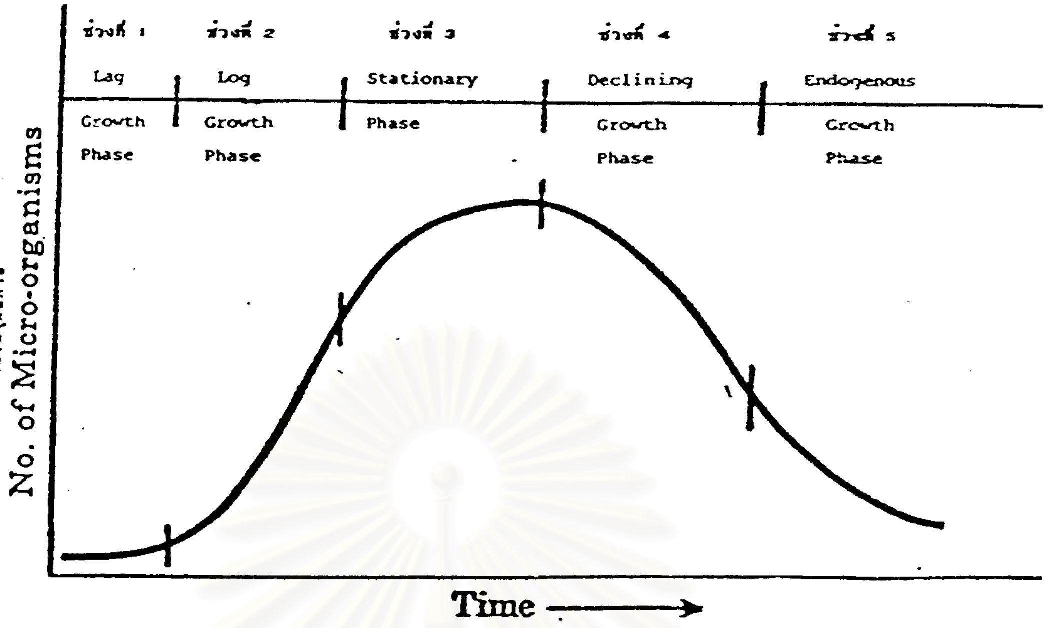
(1) ขั้นส่งถ่าย (transfer step) สารอินทรีย์ในน้ำเสียจะถูกแบคทีเรียดูดมาติดที่ผนังเซลล์ และส่งน้ำย่อยออกมาย่อยสลายจนสารอินทรีย์เปลี่ยนไปอยู่ในรูปโมเลกุลที่เล็กพอที่ซึมผ่านเข้าในเซลล์เพื่อใช้เป็นอาหารได้ ในขั้นตอนนี้จะใช้เวลาประมาณ 15 ถึง 30 นาที จุลินทรีย์จะผลิตน้ำย่อยขึ้นมาไว้ภายในเซลล์และในน้ำที่อยู่รอบตัวของมัน

(2) ขั้นเปลี่ยนรูป (conversion step) เมื่อสารอินทรีย์ในน้ำเสียถูกย่อยให้มีโมเลกุลเล็กและสามารถละลายน้ำผ่านเข้าไปในเซลล์ได้แล้ว ก็จะถูกจุลินทรีย์ทำการเปลี่ยนรูปโดยกระบวนการสลาย (catalysis) กระบวนการสังเคราะห์ (synthesis) และกระบวนการออกซิเดชั่น (oxidation) เพื่อสร้างพลังงาน

(3) ขั้นรวมตะกอน (floculation step) เป็นการรวมตัวของตะกอนแบคทีเรียโดยจุลินทรีย์จะถูกกวนผสมกันอยู่ในถังเติมอากาศ จับตัวเป็นตะกอนใหญ่ ที่เรียกว่า ฟลอค (floc)

2.1.2.5 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

จุลินทรีย์ที่อยู่ในถังปฏิกริยาสามารถแบ่งการเจริญเติบโตออกได้เป็น 5 ช่วง ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในช่วงต่างๆ ในระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ (เพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ, 2537)

จากรูปข้างต้นสามารถอธิบายได้ดังนี้

ช่วงที่ 1 Lag Phase เป็นระยะเริ่มใส่จุลินทรีย์ลงไปในอาหารหรือสารอินทรีย์ จะเป็นระยะปรับตัวมีอัตราการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ต่ำ เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องใช้เวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม และเริ่มสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย

ช่วงที่ 2 Log Phase เป็นระยะที่จุลินทรีย์ปรับตัวเองได้แล้ว เมื่อมีอาหารสมบูรณ์จึงเติบโตได้รวดเร็ว เนื่องจากมีอาหารเหลือเฟือ ลักษณะของจุลินทรีย์จะเติบโตกระจายเป็นเซลล์อิสระไม่รวมกันเป็นฟลอคที่ดี ถ้าระบบบำบัดน้ำเสียทำงานอยู่ในช่วงนี้ตะกอนเร่งจะตกตะกอนไม่ดี เป็นผลให้น้ำทิ้งขุ่น เนื่องจากมีตะกอนจุลินทรีย์หลุดออกมามาก อีกทั้งยังมีมลสารอินทรีย์เหลืออยู่เป็นจำนวนมากทำให้น้ำออกมีค่าบีโอดีสูง

ช่วงที่ 3 Stationary Phase เป็นระยะที่อัตราการแบ่งตัวของจุลินทรีย์เท่ากับอัตราการตายของจุลินทรีย์เนื่องจากปริมาณสารอาหารลดลง ทำให้การเจริญเติบโตถูกจำกัด

ช่วงที่ 4 Declining Phase เป็นระยะที่อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะลดลงเนื่องจากมีปริมาณอาหารเหลืออยู่จำกัด จุลินทรีย์จะรวมกลุ่มกันเป็นฟลอคที่ดีตกตะกอนได้ง่าย

ช่วงที่ 5 Endogenous Phase เป็นระยะที่พวกจุลินทรีย์ใช้อาหารที่เก็บสะสมเอาไว้ภายในตัวของมันเองจนหมดแล้วก็จะตายและเซลล์แตก (lysis) กลายเป็นอาหารของจุลินทรีย์ตัวอื่นที่ยังมีชีวิตอยู่ เนื่องจากปริมาณอาหารที่มีในสิ่งแวดล้อมลดน้อยลงหรือเริ่มขาดแคลน หากไม่มีอาหารเพิ่มขึ้นจำนวนจุลินทรีย์ก็จะลดลงและตายจนหมด

ในถังเติมอากาศมักควบคุมให้จุลินทรีย์ทำงานในช่วงที่ 4 และ 5 เนื่องจากการเกิดตะกอนจุลินทรีย์นั้นจะเริ่มเกิดในระยะ Declining Phase และจะได้ดีที่สุดที่ระยะ Endogenous Phase

2.1.2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์

การเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานของระบบเพื่อให้ระบบทำงานอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ปัจจัยดังกล่าว ได้แก่

(1) ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย

สารอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นอาหารของจุลินทรีย์ในระบบตะกอนเร่ง ดังนั้นหากความเข้มข้นของสารอินทรีย์เปลี่ยนแปลงมากจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบ การควบคุมการทำงานที่ดีจึงต้องควบคุมอัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์ในระบบให้มีค่าพอเหมาะ

(2) อาหารเสริม

จุลินทรีย์ต้องการอาหารเสริม (Nutrients) ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และเหล็ก นอกเหนือจากสารอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งนำมาใช้เป็นพลังงาน ปกติแร่ธาตุเหล่านี้มีอยู่ครบในน้ำเสียชุมชน (Domestic Wastewater) แต่อาจจะมีไม่พอในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม จึงควรมีการเติมให้เหมาะสม

(3) ออกซิเจนละลายน้ำ

ในถังเติมอากาศควรมีค่าออกซิเจนละลายน้ำระหว่าง 1 ถึง 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะเหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสีย

(4) ระยะเวลาในการบำบัด

ระยะเวลาที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียในถังเติมอากาศ จะต้องมีมากพอที่จุลินทรีย์จะใช้ในการย่อยสลายมลสารต่างๆ เพื่อให้ระบบสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

(5) ค่าพีเอช

ค่าพีเอชมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์มากในระบบบำบัดน้ำเสีย ดังนั้นควรควบคุมให้ระบบมีค่าพีเอชใกล้ 7 มากที่สุด และไม่ควรมีค่าเกินช่วง 6.5-8.5

(6) สารพิษ

สารเป็นพิษที่มีผลต่อจุลินทรีย์และการทำงานของระบบ แบ่งออกเป็น 2 จำพวก คือ แบบพิษเฉียบพลัน ซึ่งจุลินทรีย์จะตายหมดภายในระยะเวลาอันสั้น และแบบพิษออกฤทธิ์ช้า ซึ่งใช้เวลานานและค่อยๆ ตาย

(7) อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการทำงานและเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกระบวนการเลี้ยงตะกอน เนื่องจากโดยทั่วไปการเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 10 องศาเซลเซียส จะทำให้จุลินทรีย์เติบโตเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว

(8) การกวน

การกวนภายในถังเติมอากาศต้องทั่วถึง เพื่อทำให้ระบบมีประสิทธิภาพในการกำจัดมลสารสูงเพราะจุลินทรีย์ได้สัมผัสกับน้ำเสียที่ส่งเข้ามาบำบัดได้ทั่วถึง

(9) อัตราการไหลของน้ำเสีย

การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของน้ำเสียที่ส่งเข้ามาในระบบบำบัด มีผลโดยตรงต่อการทำงานของกระบวนการทางชีววิทยา ดังนั้นควรมีการควบคุมให้มีการส่งน้ำเสียเข้ามาบำบัดอย่างสม่ำเสมอในอัตราที่ใกล้เคียงกับที่ได้ออกแบบเอาไว้

2.1.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

2.1.3.1 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสมีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) (E.C. 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอลกับกรดไขมันดังรูปที่ 2.4 พบว่าไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์อาจเป็นสารตัวกลางในปฏิกริยาได้ โดยธรรมชาติสับสเตรทของไลเปสเป็นไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นกรดไขมันโมเลกุลยาวที่ไม่ละลายน้ำ ไลเปสจะเร่งปฏิกริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ที่อยู่ระหว่างส่วนที่ไม่ละลายน้ำและส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งจะเกิดปฏิกริยาดังกล่าวได้เมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพ oil-water interface (Macrae, 1983)

Triglyceride

↓↑

Diglyceride + free fatty acid

↓↑

Monoglyceride + free fatty acid

↓↑

Glycerol + free fatty acid

รูปที่ 2.4 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของไลเปส (Macrae, 1983)

2.1.3.2 แหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะให้เอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติในการทำงานแตกต่างกันไป เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์นั้นมี 2 รูปแบบด้วยกัน คือ extracellular lipase และ intracellular lipase จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะในบริเวณที่มีน้ำมันและไขมันปนเปื้อน เช่น Sztajar และ Maliszewska (1988) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากดินที่มีน้ำมันปนเปื้อน หรือสามารถพบจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในดินนา ดินจากสวนผัก และดินในสวนป่า (Kojima และคณะ, 1994) และยังพบได้ในระบบบำบัดน้ำเสีย (Chappe และคณะ, 1995) นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในอาหาร โดย Talon และคณะ (1995) พบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากไส้กรอก (French dry sausages)

2.1.3.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้นั้นมีหลายจำพวก เช่น

(1) เชื้อรา มีเชื้อราหลายจีนัสที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Rhizopus* sp. ที่แยกได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันพืช พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 84 unitต่อลิตร เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท (Sztajar และ Maliszewska, 1988) Gluyamova และ Davranov (1994) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Mucor miehei* พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งแบบ extracellular lipase และ intracellular lipase

(2) ยีสต์ Miller และคณะ (1991) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสซึ่งได้จาก *Candida rugosa* เป็นยีสต์ที่สามารถนำมาผลิตเอนไซม์ไลเปสในระดับการค้าได้

(3) แบคทีเรีย Sugihara และคณะ (1992) คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงจากดินได้ คือ *Pseudomonas cepacia* และ Schuepp และคณะ (1995) ได้ศึกษาการผลิต การทำให้บริสุทธิ์ และลักษณะการทำงานเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas fragi*

2.1.3.4 กลไกการย่อยสลายไขมันของจุลินทรีย์

ไขมันส่วนใหญ่เป็นไตรกลีเซอไรด์เมื่อถูกย่อยสลายด้วยไลเปส ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ คือ กลีเซอรอล และกรดไขมัน ซึ่งในส่วนของกรดไขมันที่ได้จะเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายภายในเซลล์ต่อไป โดยผ่านกระบวนการ beta หรือ omega oxidation จนได้เป็น acetyl-CoA และเข้าสู่วิถีของ tricarboxylic acid ต่อไป จนได้พลังงานออกมา ในส่วนของกลีเซอรอลที่เหลือจะถูกย่อยสลายต่อจนเข้าวิถีของ EMP ได้เป็น phophenolpyruvate และเข้าสู่วิถีของ tricarboxylic acid (Rehm และ Reed, 1981)

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 การศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

Peppler และ Perlman (1976) พบว่าการแยกจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ย่อยสลายไขมันนั้นสามารถแยกได้จากแหล่งดินทั่วไป โรงงานเนื้อสัตว์ แหล่งบำบัดน้ำเสีย (sewage treatment plants) จากโรงอาหาร และระบบบำบัดน้ำเสียตามบ้าน (septic tank) การคัดแยกจากดิน เช่นSztajar และ Maliszewska (1988) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากดินที่มีน้ำมันปนเปื้อน พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิด คือ *Pseudomonas fluorescens, Bacillus circulans, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* และ *Bacillus* sp. Takeshi และคณะ (2001) ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสจากดินที่ Siberian tunda เจริญที่ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะในการนำไปใช้บำบัดของเสียที่เป็นพวกไขมันในสภาวะที่หนาวเย็น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 20 องศาเซลเซียส แบคทีเรียนี้มีลักษณะ cocciod rod และเป็นแกรมลบ

นอกจากจะสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากดินที่มีอยู่ในธรรมชาติหรือดินที่มีน้ำมันปนเปื้อนแล้ว ยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากอาหารได้เช่นกัน Norris และ Ribbons (1971) คัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างไลเปสจากคุณสมบัติการสร้าง pearly layer เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีนม หรือไข่แดงเป็นส่วนประกอบ คือ *Clostridia* และ *Staphylococci* ซึ่งย่อยสารประกอบเชิงซ้อนของไขมันที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาเป็นกรดไขมันอิสระ และสามารถทดสอบความจำเพาะในการย่อยสลายกลีเซอรอลไตรบิวทีเรทโดยนำมาเลี้ยงในอาหาร tributyrin agar แล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการผลิตไลเปสโดยจะเกิดส่วนใสรอบๆ โคโลนี Talon และคณะ (1995) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากไส้กรอก (French dry sausages) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ได้คือ *Staphylococcus warneri* โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้นี้เป็นเอนไซม์ไลเปสประเภท extracellular lipase นอกจากนี้ Haba และคณะ (2000) คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสโดยใช้น้ำมันที่ผ่านการทอดแล้วเป็นสับสเตรท ได้เชื้อแบคทีเรีย คือ *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. และ *Staphylococcus* sp. โดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสได้สูงคือ *Pseudomonas* sp. 3AT (2,748 หน่วยต่อลิตร) และ *Pseudomonas* aeruginosa ATCC 11 (1,703.8 หน่วยต่อลิตร)

ภายหลังการคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส จะนำไปศึกษาตามวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันไป ดังเช่น Mitsuda และคณะ (1988) คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์ pyrethroids พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้คือ *Alcaligenes faecalis* FO-1211, *Bacillus badius* ATCC-14574, *Bacillus megaterium* IFO-12108, *Chromobacterium chocolatum*IFO-3758 *และ Flavabacterium arborescen* IFO-3750 และ Gerhardt และคณะ (1994) คัดเลือกเชื้อ *Pseudomonas auruginosa* เพื่อศึกษาความสามารถย่อยสลายไขมันที่มีโมเลกุลยาว เช่น tweens ผสมลงในอาหารความเข้มข้น 1% และใส่ $CaCl_2$ 0.01% หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหารแล้วบ่มไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการผลิตไลเปสโดยจะเกิดผลึกของ calcium soap รอบๆ โคโลนี ซึ่งเกิดจากการที่กรดไขมันรวมตัวกับแคลเซียม

2.2.2 การศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมัน

การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันนั้นได้มีการบำบัดหลายวิธีด้วยกัน เช่น บำบัดด้วยบ่อกรองไร้อากาศ โดย ธงชัย พรรณสวัสดิ์ (2532) ได้ทำการศึกษาที่หาดกระรน จังหวัดภูเก็ต พบว่าคุณภาพของน้ำที่ออกจากระบบไม่ได้มาตรฐานพอที่จะระบายออกสู่แหล่งน้ำ โดยเฉพาะค่า บีโอดีและซีโอดี มีค่าสูงถึง 440 และ 818 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงมากกว่าน้ำเสียออกจากบ้าน

เรือนในชุมชน นอกจากนี้ค่าน้ำมันและไขมันสูงถึง 103 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่ามาตรฐานน้ำทิ้งของสำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติกำหนด และยังก่อให้เกิดปัญหาการอุดตันของเศษอาหารและขยะต่างๆ ที่มาจากภัตตาคารอีกด้วย ส่วน Hanaki (1990) ซึ่งบำบัดด้วยวิธีเดียวกันสามารถลดค่าซีโอดีลงได้ถึงร้อยละ 80 จากน้ำเสียโรงอาหารซึ่งประกอบด้วยไขมันประมาณร้อยละ 30 ของซีโอดี โดยได้เปรียบเทียบระหว่างระบบซิงเกิลเฟส (single-phase) และ ทูเฟส (two-phase) พบว่าการใช้ระบบซิงเกิลเฟสสามารถลดปริมาณซีโอดีได้ดีกว่าทูเฟส เพราะมีการดักจับไขมัน (entrapment) พวกของแข็งที่เป็นสารอินทรีย์ได้ดีกว่า ส่วนการกำจัดไขมันในระบบทูเฟสจะดีกว่า

นอกจากนี้ยังมีการบำบัดโดยใช้เชื้อ *Candida tropicalis* S001 ที่คัดเลือกได้จาก sludge เพื่อกำจัดไขมันออกจากน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม โดย Rydin และคณะ (1990) ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถใช้ไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ และยังสามารถสร้างก๊าซมีเทนได้ถึง 0.3 m^3 ต่อ 1 กิโลกรัมของ COD ด้วย และการบำบัดโดยใช้ถังดักไขมัน โดย อุดร จารุรัตน์ (2536) ได้ทำการศึกษาปริมาณไขมันจากโรงอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (ขนาด 13 ร้านค้า) ค่าน้ำมันและไขมันเริ่มต้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แม้จะใช้เวลาในถังดักไขมันสูงถึง 6 ชั่วโมง แล้วก็ตาม น้ำทิ้งที่ออกมาก็ยังมีปริมาณไขมันสูงถึง 163 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงเกินกว่าค่ามาตรฐานที่พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 ได้กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากอาคารบางประเภทและบางขนาดไว้ สำหรับภัตตาคารและร้านอาหารที่มีพื้นที่ให้บริการตั้งแต่ 100 ตารางเมตรขึ้นไป ปริมาณน้ำมันและไขมันต้องไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.3 การศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันโดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันโดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์นั้นมีผู้ได้ศึกษาไว้มากมาย และมักจะมีการเติมจุลินทรีย์จากแหล่งอื่น หรือแยกมาจากแหล่งบำบัดเดิมเติมลงไป เช่น *Acinetobacter calcoaceticus, Pseudomonas putida* และ *Aeromonas* (Chappe และ Mourey, 1994) ซึ่งพบว่าเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ดี ทำให้ระบบสามารถบำบัดน้ำเสียได้ดีขึ้น การศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันสามารถศึกษาได้จากน้ำเสียสังเคราะห์ เช่น Hsu และคณะ (1983) ได้ทดลองนำสลัดจ์มาใช้สำหรับศึกษาการย่อยสลายไขมันในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ พบว่าสลัดจ์ที่ใช้สามารถย่อยสลายไขมันได้ ซึ่งประกอบไปด้วย 3 กระบวนการด้วยกัน คือ hydrolysis oxidation และ adsorption ซึ่งย่อยสลาย

ไขมันได้ดีเมื่อมีความเข้มข้นของไขมันต่ำกว่า 800 มิลลิกรัมต่อลิตร Wakelin และ Forster (1997) เปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำมันมะกอกด้วย activated sludge กับ acclimatized activated sludge พบว่า acclimatized activated sludge สามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกได้รวดเร็วกว่า มีประสิทธิภาพการย่อยสลายมากกว่า 90% ในขณะที่การใช้ activated sludge มีประสิทธิภาพการย่อยสลายเพียง 90% ซึ่งเกิดเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์ใน acclimatized activated sludge ไม่มีระยะ lag phase จุลินทรีย์สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ทันที แต่การใช้ activated sludge จุลินทรีย์มีระยะ lag phase นานถึง 24 ชั่วโมง และศึกษาจากน้ำเสียจริง เช่น Becker และคณะ (1999) ศึกษาพบว่า การย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันมะกอก และการบำบัดน้ำเสียจากการล้างขนสัตว์ที่มีไขมันสูง ภายใต้สภาวะ aerobic thermophilic (65°C) โดยใช้ *Bacillus thermolevorans* IHI-91 ในถังปฏิกริยาแบบกวนอย่างต่อเนื่องนั้น น้ำมันมะกอกถูกย่อยสลายไปมากกว่า 90% ที่ residence time 2 ชั่วโมง และอัตราการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 900 mg/l/h ค่ามวลชีวภาพสูงสุดที่ได้ คือ 1.05 g ของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำมันมะกอกที่ถูกใช้ไป และสัมประสิทธิ์การคงตัว 0.04 g ของน้ำมันมะกอก g DCW/h ส่วนการกำจัดไขมันในน้ำเสียของการล้างขนสัตว์ (COD เท่ากับ 77000 mg/l) เป็น 20-30% ที่ residence time 10-20 ชั่วโมง ในขณะที่การกำจัด COD อยู่ที่ 15-20% Borja และ Alba (1995) ได้ทำการศึกษาน้ำที่ปล่อยออกจากการล้างในกระบวนการผลิต virgin olive oil ซึ่งถูกบำบัดโดยการใช้ mixed activated sludge ผลการทดลองแสดงว่า COD ของน้ำที่ปล่อยออกสัมพันธ์กับ feed strength ที่ใส่เข้าไป Wakelin และ Forster (1996) ได้ศึกษาโดยใช้ pure cultures และ mixed cultures ทดสอบกับน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ และ grease จาก grease-trap ของร้านอาหาร fast-food โดย pure cultures ที่ใช้ คือ *Acinetobacter* sp., *Rhodococcus rubra*, *Nocardia amarae* และ *Microthix parvicella* นำมาเปรียบเทียบกับ mixed cultures ซึ่งแยกได้จาก grease-trap, MC1 และ activated sludge จากการศึกษาพบว่า *Acinetobacter* เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพที่สุด สามารถกำจัดไขมันได้ 60-65% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 8 g/l ส่วน mixed culture, MC1 แปรผันในช่วง 29-73% และ activated sludge มีประสิทธิภาพการกำจัดดีกว่า 90% และ Chigusa และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาโดยแยก yeast ได้ 9 สายพันธุ์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยน้ำมันได้ เพื่อที่จะใช้บำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันโดยไม่มีการบำบัดเบื้องต้นก่อน ซึ่งความสามารถในการย่อยน้ำมันได้นี้ จะประเมินในด้าน lipase activity และ β-oxidation activity จากการศึกษาพบว่า mixed strains ที่ได้มาจากโรงงานน้ำมันถั่วเหลืองมีอัตราการกำจัดน้ำมันดีกว่า single strain และพบว่า 10,000 mg/l ของน้ำมันในน้ำเสียดิบลดลงโดยการบำบัดด้วย yeast ทำให้ความเข้มข้นเหลือเป็น 100 mg/l และถูกบำบัดต่อไปโดย activated sludge ให้เหลือ 2 mg/l

นอกจากนี้ Mkhize และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาพบว่า หลังการวิเคราะห์ parameter ของน้ำเสียดิบ ความสามารถในการบำบัดโดยใช้ aerobic/aerobic sequencing batch reactor (SBR) มีค่า COD ลดลง 75% และน้ำมันและสารแขวนลอยถูกกำจัดไปมากกว่า 90% และ Dueholm และคณะ (2001) ได้ทำการทดลองพบว่า อัตราการใช้ไปของออกซิเจนและไนโตรเจน (OUR และ NUR) ของ long-chain fatty acid ในการเปลี่ยนรูปของไขมันภายใต้สภาวะ aerobic และ anoxic มีค่าสูงสุดอยู่ในระดับเดียวกับ acetate แสดงว่า long-chain fatty acid ถูกใช้ได้โดยง่าย แต่ adsorption ของ long-chain fatty acid ต่อพื้นผิวของ activated sludge วัดค่าได้ยาก กระบวนการ hydrolysis ของ triacylglyceride ไม่สามารถบอกได้เพราะช้ามาก

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) บริษัท New Brunswick Scientific, USA.
2. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (cooled incubator) บริษัท Scientific Promotion Co., Ltd., Thailand.
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Avanti™ J-30I บริษัท Beckman Coulter, USA.
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybernetics, Singapore.
5. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) บริษัท EDT direct ION Ltd.
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 บริษัท Spectronic Instrument, USA.
7. เครื่องชั่งไฟฟ้า (balance)

   ชนิดอ่านละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Sartorius, Germany.

   ชนิดอ่านละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PB 3002 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co., Ltd., Japan.
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS-3020 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd., Japan.
10. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Larminar flow รุ่น J2-21 บริษัท ISSCO, USA.
11. ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd., Japan.
12. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, USA.
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TW 20 บริษัท Julabo Labortechnik GMBH, Germamy.
14. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น VSM-3 บริษัท Snelton Scientific Inc., USA.
15. กล้องถ่ายภาพดิจิตอล (digital camera) รุ่น Marvica บริษัท Sony, Japan.
16. เครื่องสูบชนิดรีดสาย (peristaltic pump) รุ่น 505U บริษัท Watson-Marlow Limited, England.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17. เครื่องสูบชนิดรีดสาย (peristaltic pump) รุ่น SJ-1211H บริษัท ATTO Corporation.
18. เครื่องเติมอากาศ (air pump) รุ่น ACO-9901 บริษัท Hailea Group, Co., Ltd., Thailand.
19. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) รุ่น CH 30 บริษัท Olympus Optical Co., Ltd., Japan.
20. ตู้อบ (oven) บริษัท Memmert, Germany.
21. เครื่องวิเคราะห์ค่าออกซิเจนละลาย (DO meter) รุ่น YSI 55 บริษัท Incorporated, USA.
22. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น 3016 บริษัท GFL, Germany.
23. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน รุ่น 2055 Soxtec บริษัท Foss Tecator, Sweden.
24. เครื่องดูดอากาศ (vacuum pump) รุ่น A-35 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan.

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท J.T. Baker, USA.
2. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.
3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.
4. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท Ajax Chemicals, Australia.
5. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.
6. แคลเซียมคลอไรด์ (anhydrous $CaCl_2$) บริษัท Ajax Chemicals, Australia.
7. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) บริษัท BDH Laboratories Chemicals Ltd., England.
8. แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) E. Merck Darmstadt, Germany.
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Famitalia Carlo Erba, Italy.
10. โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.
11. โซเดียมไอโอไดด์ (NaI) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.
12. โซเดียมเอไซด์ (NaN_3) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.
13. โปแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) บริษัท J.T. Baker, USA.
14. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) บริษัท J.T. Baker, USA.
15. กรดซาลิไซลิค (Salicylic Acid) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.
16. โซเดียมไธโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) บริษัท Fatimalia Carlo Erba, Italy.
17. เมอร์คิวริกซัลเฟต ($HgSO_2$) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.
18. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.
19. โปแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

20. โปแตสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต (KHP) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

21. กรดเกลือเข้มข้น (conc. HCl) บริษัท Fatimalia Carlo Erba, Italy.

22. เฮกเซน (C_6H_{14}) บริษัท J.T. Baker, USA.

23. น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) บริษัท มรกตอินดัสตรีส์ จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย.

24. เมธิลเทิร์ตบิวทิลอีเธอร์ ($C_5H_{12}O$) บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand.

25. ไตรบูไทริน (tributyrin) บริษัท Fluka, Switzerland.

26. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท BDH Laboratories Chemicals Ltd., England.

27. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Fatimalia Carlo Erba, Italy.

28. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA.

29. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) บริษัท Difco Laboratories, USA.

30. น้ำมันมะกอก (olive oil) บริษัท Bertolli, Italy.

31. วุ้น (agar) บริษัท Difco Laboratories, USA.

32. แบคโตเปปโตน (bacto-peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA.

33. แบคโตทริปโตน (bacto-tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA.

34. แบคโตซอยโตน (bacto-soytone) บริษัท Difco Laboratories, USA.

35. แลคโทส (lactose) บริษัท Difco Laboratories, USA.

36. มอลโทส (maltose) บริษัท Difco Laboratories, USA.

37. เกลือน้ำดี (bile salt) บริษัท Difco Laboratories, USA.

38. บรอมคลีซอลเพอเพิล (bromcresol purple) บริษัท Fluka, Switzerland.

39. มูลเลอร์ฮินตัน (mueller hinton agar) บริษัท Difco Laboratories, USA.

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง

3.3.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี double layer technique ตามวิธีของ กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย (2532)

1. เก็บตัวอย่างดินและน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ เช่น ดินบริเวณที่ประกอบอาหารจากโรงอาหาร น้ำเสียจากบ่อพักน้ำเสียจากร้านอาหาร จากนั้นนำตัวอย่างกลับมายังห้องปฏิบัติการ

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. นำตัวอย่างดินหรือน้ำเสีย 2 ลูป ใส่ลงในน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดน้ำตัวอย่างข้างต้น 1 - 2 หยด ถ่ายลงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (ตามภาคผนวก ก หมายเลข 1) ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร ปริมาณหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (incubator shaker) ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน เมื่อพบการเจริญของแบคทีเรียให้ดูดเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 หยด ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม ทำเช่นเดียวกับตอนแรก เมื่อพบการเจริญให้ทำซ้ำอีกครั้ง

3. เจือจางเชื้อจากข้อ 2 ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ดูดเซลล์จากหลอดที่มีความเจือจางที่ต้องการใส่ลงในหลอดทดสอบที่บรรจุอาหารที่มีน้ำมันมะกอกและวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ตามภาคผนวก ก หมายเลข 2) ที่หลอมละลายแล้ว (อาหารบรรจุในหลอดปริมาณเท่ากับ 6 มิลลิลิตร) และอยู่ใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องผสมให้เชื้อกระจาย จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร basal medium บรรจุอยู่ก่อนแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 - 7 วัน แบคทีเรียที่สามารถสร้างไลเปสได้ จะให้บริเวณใสรอบโคโลนี

4. แยกแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่มีรูปร่างแตกต่างกันที่เจริญได้รวดเร็ว และสร้างบริเวณใสได้กว้างจากจานเพาะเลี้ยงข้อ 3 มาทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 2 - 3 ภายหลังได้โคโลนีเดี่ยวจะนำไปเลี้ยงในอาหาร nutrient agar slant (ตามภาคผนวก ก หมายเลข 3)

3.3.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง โดยการดูบริเวณใส (clear zone) ตามวิธีของ Chappe และคณะ (1994)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.3.1.1 มาตรวจสอบโดยวิธีการวัดปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นบนอาหาร emulsion tributyrin agar (ตามภาคผนวก ก หมายเลข 5) โดยวิธี point inoculum และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างบริเวณใสรอบๆ โคโลนี ที่มีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงมาเพียง 10 โคโลนี เพื่อทำการศึกษาต่อ

3.3.1.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถอยู่รอดได้ในภาวะเชื้อผสม ตามวิธีของ Venkateswaran และคณะ (1995)

การทดลองในขั้นนี้เป็นการนำแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้ 10 สายพันธุ์ จากตัวอย่างน้ำเสียตามการคัดเลือกในข้อ 3.3.1.1 และ 3.3.1.2 มาทำการคัดเลือกอีกครั้ง โดยอาศัยหลักการคัดเลือกด้วยวิธีธรรมชาติ (natural selection) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อหากลุ่มเชื้อผสม (mixed culture) ที่ดีที่สุด คือจุลินทรีย์ตัวใดเจริญได้เร็วกว่าก็จะสามารถใช้น้ำมันพืชซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้เร็วกว่า ทำให้จุลินทรีย์ที่เจริญช้าไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ และถูกกำจัดออกไปในที่สุด (Venkateswaran และคณะ, 1995)

วิธีการคัดเลือกเริ่มต้นจากการนำเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างที่ 1 เชื้อละ 1 โคโลนี มาเลี้ยงรวมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันพืช 1 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที วัดค่าความขุ่นโดยใช้ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนพบว่าเชื้อเริ่มเจริญเข้าสู่ระยะ early stationary จึงนำเชื้อผสมที่ได้จากตัวอย่างที่ 1 ไปผสมกับเชื้อที่ได้จากตัวอย่างแหล่งที่ 2 ซึ่งเตรียมด้วยวิธีเดียวกัน ผสมด้วยปริมาตรเท่าๆ กัน แล้วนำ 1 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อที่ผสมแล้วถ่ายลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันพืช 1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อที่ภาวะเดิม จนเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ early stationary จึงนำไปผสมกับเชื้อผสมจากตัวอย่างแหล่งอื่นๆ ต่อ จนกระทั่งได้เชื้อผสมกลุ่มสุดท้าย นำมาเกลี่ยบน nutrient agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ที่เหลือจากการคัดเลือกตามธรรมชาติ โดยได้จากโคโลนีเดี่ยวๆ ที่เจริญบน nutrient agar เก็บรักษาเชื้อไว้เพื่อทำการทดลองต่อไป

3.3.1.4 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหาร nutrient agar slant

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาเขี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปใช้ในระบบบำบัด

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด โดยแต่ละชนิดนำมาชนิดละ 1 โคโลนี ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว nutrient broth อยู่ 5 มิลลิลิตร (ตามภาคผนวก ก หมายเลข 4) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อจากแต่ละหลอดมาหลอดละ 3

มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว nutrient broth อยู่ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำเชื้อที่ได้ในข้อ 1 มา 3 เปอร์เซ็นต์ แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่แต่ละขวดที่มีอาหารเหลว nutrient broth 100 มิลลิลิตร อีกครั้ง แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้มาปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนโดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำเชื้อที่ตกตะกอนมาชนิดละ 200 mg/l ใส่ลงในถังเติมอากาศเพื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสีย โดยเติมอากาศและน้ำเสียสังเคราะห์เพื่อปรับให้เชื้อมีความคุ้นเคยกับน้ำเสีย

3.3.3 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ *Yarrowia* และ *Acinetobacter* ไปใช้ในระบบบำบัด

ปฏิบัติเช่นเดียวกับแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในข้อ 3.3.2

3.3.4 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง ซีโอดี และ บีโอดี ในน้ำเสียของระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

การทดลองทั้งหมดกระทำที่ห้องปฏิบัติการของสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งเตรียมขึ้นดังนี้

<u>การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์</u> (synthetic waste preparation)

น้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดลองนี้มี COD ประมาณ 500 mg/l เตรียมขึ้นโดยมีส่วนประกอบต่างๆ ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.1 โดยจะเตรียมส่วนประกอบเหล่านี้ให้อยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้น 100 เท่า แล้วทำการแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งในตู้แช่ที่มีอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำมาใช้จึงนำออกมาแล้วผสมกับน้ำตามอัตราส่วน

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์

Components (mg/L)	COD, mg/L		
	1,000	2,000	3,000
Bacto-peptone	220.34	440.68	660.9
Sugar	658.6	1,317.2	1,975.4
$MgSO_4$	56.25	112.5	168.7
$FeCl_3$	13.12	26.24	39.4
KH_2PO_4	293	586	878.4
K_2HPO_4	372.7	745.4	1,117.8
$NaHCO_3$	400	400	400

การศึกษาจะแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด คือ

1. ชุดทดลองควบคุม (control) มีเฉพาะหัวเชื้อจากระบบบำบัดน้ำเสียเดิม
2. เหมือนชุดที่ 1 และมีการเติมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
3. เหมือนชุดที่ 2 และมีการเติม *Acinetobacter* และ *Yarrowia*

3.3.4.1 ขั้นเตรียมการทดลอง

<u>การทดลองชุดที่ 1</u>

การทดลองชุดที่ 1 เริ่มต้นโดยนำหัวเชื้อตะกอนจากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา เติมลงในส่วนที่เป็นถังเติมอากาศประมาณ 0.1 ลิตร แล้วเติมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี COD ประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไป 0.2 ลิตร และน้ำประปาจนเต็มปริมาตร 0.8 ลิตร แล้วเติมอากาศทิ้งไว้ค้างคืน วันรุ่งขึ้นจึงหยุดเติมอากาศเพื่อดึงน้ำใสส่วนบนทิ้งออกประมาณ 0.3 ลิตร แล้วเติมน้ำเสียลงไปอีกจนเต็มปริมาตรจึงเติมอากาศต่อ ทำเช่นนี้เรื่อยไปเพื่อให้หัวเชื้อตะกอนที่นำมาใช้ได้ค่อยๆ ปรับตัวให้มีความคุ้นเคยกับน้ำเสียชนิดใหม่ที่ใช้ในการวิจัย จนกระทั่งปริมาณน้ำใสส่วนบนที่ดึงออกและปริมาณน้ำเสียที่เติมเป็น 0.6 ลิตร จึงเริ่มป้อนน้ำเสียอย่างต่อเนื่อง หลังจากนั้นประมาณ

1 สัปดาห์ เมื่อสังเกตได้ว่ามีปริมาณตะกอนเพิ่มขึ้นมากพอประมาณ จึงทำการควบคุมค่าอายุตะกอน โดยระบายน้ำตะกอนทิ้งจากถังเติมอากาศ และเริ่มทดลองโดยติดตามวัดค่าความเข้มข้นของน้ำตะกอนในถังเติมอากาศเพียงอย่างเดียวก่อน เพื่อใช้ตรวจสอบว่าระบบเริ่มจะมีการเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state) แล้วหรือยัง เมื่อสังเกตได้ว่าค่าความเข้มข้นของน้ำตะกอนเริ่มมีค่าคงที่ โดยไม่แปรปรวนมากแล้ว (อยู่ในช่วง 1,425-1,575 mg/l) จึงเริ่มต้นเก็บผลข้อมูลอย่างต่อเนื่อง จากการวิเคราะห์น้ำตัวอย่างที่จุดต่างๆ ตามแผนการวิจัย ซึ่งเวลาที่ใช้ตั้งแต่ตอนเริ่มต้นเลี้ยงจุลินทรีย์จนถึงเวลาเริ่มเก็บผลข้อมูลของช่วงสภาวะคงที่นั้น นานพอที่หัวเชื้อตะกอนซึ่งได้มาจากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยาที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้สามารถปรับตัวให้มีความคุ้นเคยกับน้ำเสียชนิดใหม่ได้แล้ว และมีเสถียรภาพเพียงพอที่จะสามารถปรับตัวเข้าสู่สภาวะคงที่

ในการทดลองชุดที่ 1 นี้ ได้ทำการทดลองเพื่อเก็บผลข้อมูลของระบบที่มีค่าอายุตะกอน 15 วัน โดยการควบคุมค่าอายุตะกอนให้มีค่าอยู่ในช่วงตามที่ต้องการ ทำได้โดยปรับและควบคุมอัตราการระบายน้ำตะกอนทิ้งจากถังเติมอากาศ ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บข้อมูลผลการทดลองในช่วงสภาวะคงที่ในการวิจัยครั้งนี้กำหนดไว้ว่าต้องใช้เวลานาน 7 วัน ต่อเนื่องกัน

การทดลองชุดที่ 2

การทดลองชุดที่ 2 ได้เริ่มต้นเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์หลังจากที่ได้เก็บผลข้อมูลของการทดลองชุดที่ 1 เสร็จสิ้นแล้ว โดยนำน้ำตะกอนซึ่งได้เลี้ยงเตรียมไว้มาใส่ในถังเติมอากาศ พร้อมทั้งทำการเติมแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ชนิดๆ ละ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไป แล้วเริ่มป้อนน้ำเสียอย่างต่อเนื่อง

หลังจากที่ได้ป้อนน้ำเสียอย่างต่อเนื่อง และทำการควบคุมค่าอายุตะกอนในระบบโดยระบายน้ำตะกอนทิ้งจากถังเติมอากาศ และทำการวิเคราะห์น้ำตัวอย่างเพื่อติดตามวัดค่าความเข้มข้นของน้ำตะกอนให้มีค่าคงที่นานประมาณ 1 สัปดาห์ เมื่อสังเกตได้ว่าค่าดังกล่าวมีค่าไม่แปรปรวนมากแล้ว (อยู่ในช่วง 1,425-1,575 mg/l) จึงเริ่มต้นเก็บข้อมูลอย่างต่อเนื่อง จากการวิเคราะห์น้ำที่จุดต่างๆ ตามแผนการวิจัย ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บข้อมูลผลการทดลองในช่วงสภาวะคงที่ในการทดลองชุดที่ 2 นี้ ใช้เวลานาน 7 วัน ต่อเนื่องกัน เช่นเดียวกับการทดลองชุดที่ 1

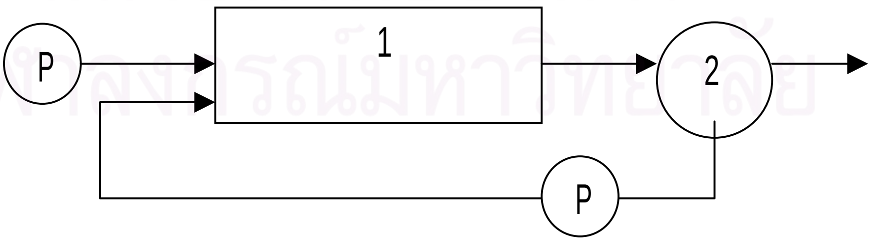
<u>การทดลองชุดที่ 3</u>

การทดลองชุดที่ 3 ได้เริ่มต้นเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์หลังจากที่ได้เก็บผลข้อมูลของการทดลองชุดที่ 2 เสร็จสิ้นแล้ว โดยนำน้ำตะกอนซึ่งได้เลี้ยงเตรียมไว้มาใส่ในถังเติมอากาศ พร้อมทั้งทำการเติมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ชนิดๆ ละ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไป เช่นเดียวกับการทดลองชุดที่ 2 แต่ในการทดลองชุดที่ 3 นี้ จะมีการเติม *Acinetobacter* และ *Yarrowia* เพิ่มลงไปด้วยในปริมาณเดียวกัน

หลังจากที่ได้ป้อนน้ำเสียอย่างต่อเนื่อง และทำการควบคุมค่าอายุตะกอนในระบบโดยระบายน้ำตะกอนทิ้งจากถังเติมอากาศ และทำการวิเคราะห์น้ำตัวอย่างเพื่อติดตามวัดค่าความเข้มข้นของน้ำตะกอนให้มีค่าคงที่นานประมาณ 1 สัปดาห์ เมื่อสังเกตได้ว่าค่าดังกล่าวมีค่าไม่แปรปรวนมากแล้ว (อยู่ในช่วง 1,425-1,575 mg/l) จึงเริ่มต้นเก็บข้อมูลอย่างต่อเนื่อง จากการวิเคราะห์น้ำที่จุดต่างๆ ตามแผนการวิจัย ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บข้อมูลผลการทดลองในช่วงสภาวะคงที่ในการทดลองชุดที่ 3 นี้ ใช้เวลานาน 7 วัน ต่อเนื่องกัน เช่นเดียวกับการทดลองชุดที่ 1 และ 2 ที่ผ่านมา

3.3.4.2 ขั้นดำเนินการทดลอง

ใช้แบบทดลองตามแบบของ พิษณุ บุณยภักดิ์ (2539) ที่มีถังเติมอากาศใบเดียว (แสดงในรูปที่ 3.1) ขนาด 0.8 ลิตร ป้อนน้ำเสียอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราคงที่ 0.08 ลิตรต่อชั่วโมง (เวลากักน้ำ 10 ชั่วโมง) ค่าอายุตะกอน 15 วัน อัตราน้ำทิ้งตะกอน 0.05 ลิตรต่อวัน เก็บตัวอย่างน้ำที่จุดต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ โดยควบคุม pH ในถังเติมอากาศให้มีค่า 6.5 – 8.5 ค่า DO ไม่ต่ำกว่า 2 mg/l และอัตราการสูบตะกอนกลับให้มีค่าคงที่ประมาณ 0.08 ลิตรต่อชั่วโมง



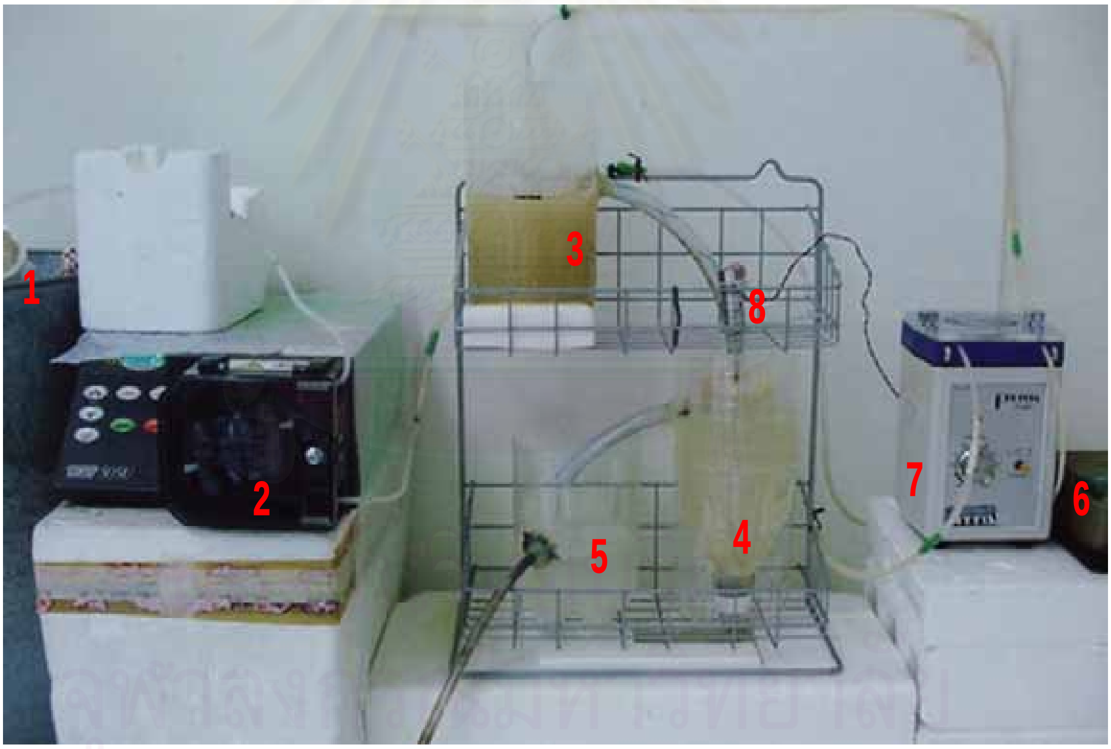
1 : Aeration Tank 2 : Clarifier

รูปที่ 3.1 FLOW DIAGRAM ของการทดลอง

เมื่อทำการทดลองเดินระบบแล้วจะเก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ปริมาณของของแข็งแขวนลอยในถังเติมอากาศ เพื่อตรวจสอบค่าอายุตะกอนว่าได้ตามที่ต้องการหรือไม่ ถ้าหากมีค่าที่ผิดไปจากค่าที่ต้องการ (1,425-1,575 mg/l) ก็จะปรับอัตราการทิ้งน้ำตะกอนใหม่ จนกระทั่งได้ค่าอายุตะกอนใกล้เคียงกับค่าที่ต้องการ เมื่อสังเกตได้ว่าระบบเข้าสู่สภาวะคงที่แล้ว จึงเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

3.3.4.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในระบบบำบัด

เมื่อติดตั้งระบบของการทดลองตาม FLOW DIAGRAM ที่แสดงในรูปที่ 3.1 แล้ว จะมีลักษณะของระบบดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองมีดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.2 ระบบบำบัดแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. <u>ถังพักน้ำเสีย</u>

เป็นถุงพลาสติกทนร้อนที่มีความจุประมาณ 10 ลิตร มัดปิดปากถุงป้องกันการปนเปื้อนจากภายนอก และมีท่อต่อออกมาเพื่อใช้สูบน้ำเสียเข้าระบบ มีภาชนะรองรับอยู่ภายนอกซึ่งสามารถนำเข้าเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ได้ เนื่องจากต้องผ่านการฆ่าเชื้อก่อน เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีจุลินทรีย์อื่นอยู่ในระบบที่จะสามารถใช้น้ำเสียสังเคราะห์เป็นแหล่งอาหารได้ เพราะจะทำให้ผลการทดลองผิดพลาดได้

2. <u>เครื่องสูบน้ำเสียเข้าระบบ</u>

เป็นเครื่องสูบชนิดรีดสาย (peristatic pump) ใช้สูบน้ำจากถังพักน้ำเสียเข้าสู่ถังเติมอากาศ โดยควบคุมอัตราการสูบน้ำให้มีค่าคงที่ประมาณ 0.08 ลิตรต่อชั่วโมง และสามารถทำงานได้ตลอด 24 ชั่วโมง

3. <u>ถังเติมอากาศ</u>

ใช้ถังพลาสติกซึ่งดัดแปลงมาจากขวดน้ำอัดลม มีปริมาตรความจุ 0.8 ลิตร

4. <u>ถังตกตะกอน</u>

ใช้ถังพลาสติกซึ่งดัดแปลงมาจากขวดน้ำอัดลม มีปริมาตรความจุ 0.4 ลิตร ตรงบริเวณก้นถังเป็นรูปกรวยเพื่อให้สลัดจ์ตกตะกอนได้ดี

5. <u>ถังรับน้ำใสจากถังตกตะกอน</u>

ใช้ถังพลาสติกซึ่งดัดแปลงมาจากขวดน้ำอัดลม มีปริมาตรความจุประมาณ 1 ลิตร และมีท่อน้ำล้นระบายน้ำออก

6. <u>เครื่องเติมอากาศ</u>

ใช้เครื่องเติมอากาศ (air pump) รุ่น ACO-9901 บริษัท Hailea Group Co., Ltd.

7. <u>เครื่องสูบเวียนตะกอน</u>

เป็นเครื่องสูบชนิดรีดสาย (peristatic pump) ใช้สูบตะกอนจากก้นถังตกตะกอนแล้วป้อนกลับเข้าสู่ถังเติมอากาศ โดยควบคุมอัตราการสูบน้ำให้มีค่าคงที่ประมาณ 0.08 ลิตรต่อชั่วโมง และต้องสามารถทำงานได้ตลอด 24 ชั่วโมง

8. <u>เครื่องกวาดตะกอน</u>

ทำจากมอเตอร์ขนาดเล็ก ต่อกับโครงลวดซึ่งดัดให้แนบไปกับก้นถังตกตะกอน เพื่อป้องกันมิให้จุลินทรีย์ไปเกาะติดจนอาจเกิดการอุดตันของระบบบำบัดได้ เนื่องจากอัตราการสูบตะกอนกลับมีค่าต่ำมาก

3.3.4.4 การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อทำการวิเคราะห์

การเก็บข้อมูลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำในแต่ละชุดการทดลองใช้เวลา 1 สัปดาห์ ซึ่งจะใช้ข้อมูลในช่วงเวลาที่ระบบเข้าสู่สภาวะคงที่แล้วเท่านั้น โดยการเก็บตัวอย่างแล้วทำการวิเคราะห์ของการทดลองแต่ละชุดเมื่อระบบเข้าสู่สภาวะคงที่สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แผนการเก็บตัวอย่างน้ำของการทดลองแต่ละชุด

การวิเคราะห์	ถังพักน้ำเสีย	ถังเติมอากาศ	ถังรับน้ำใส
pH	A	A	-
DO	A	A	-
MLSS	-	A	-
COD	A	-	A
BOD	A	-	A
น้ำมัน	A	-	A

หมายเหตุ: A หมายถึง ทำการเก็บตัวอย่าง-วิเคราะห์ทุกวัน

3.3.4.5 วิธีที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

วิธีที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำสรุปได้ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 วิธีที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

พารามิเตอร์	วิธีที่ใช้วิเคราะห์
พีเอช (pH)	เครื่องวัดพีเอช รุ่น Cyberscan 2000
ออกซิเจนละลายน้ำ (DO)	เครื่องวัดดีโอ รุ่น YSI 55
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (MLSS)	อบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส ตามวิธี Standard Method
ซีโอดี (COD)	รีฟลักซ์ปิดแบบเทียบสี ตามวิธี Standard Method
บีโอดี (BOD)	เอไซด์โมดิฟิเคชั่น ตามวิธี Standard Method
น้ำมัน	เครื่องวิเคราะห์ไขมัน Soxtec Avanti 2055

ปัจจัยอื่นๆ ที่ต้องควบคุมให้คงที่ตลอดการทดลอง

(1) พีเอชในถังเติมอากาศ รักษาระดับให้มีค่าอยู่ในช่วง 6.5-8.5 ตลอดที่ทำการทดลองทั้ง 3 ชุด

(2) ค่าออกซิเจนละลาย (DO) ในถังเติมอากาศ ต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เสมอ

3.3.5 การตรวจสอบความสามารถในการคงอยู่ในระบบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยใช้คุณสมบัติความไวต่อยาปฏิชีวนะ

3.3.5.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากหัวเชื้อสลัดจ์ตั้งต้น

นำตะกอนสลัดจ์ของหัวเชื้อระบบบำบัดในถังเติมอากาศ มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้มีความเข้มข้นลดลงตามลำดับครั้งละ 10 เท่า (10 – fold serial dilution) ใช้ปิเปตดูดเชื้อในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร มาใส่จานเพาะเชื้อซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Herellea Agar ตามสูตรในภาคผนวก ก หมายเลข 6 จากนั้นกระจายเชื้อ (spread) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีของเชื้อที่เจริญได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยเขี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมและบ่มที่ภาวะเดิม เลี้ยงโคโลนีเดี่ยวที่ได้บนอาหารแข็งเอียงชนิด NA (ตามภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส

3.3.5.2 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกได้จากหัวเชื้อสลัดจ์ตั้งต้นและแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 ชนิด

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.3.5.1 รวมทั้ง แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ชนิด ในตอนต้น มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวชนิด NB (ตามภาคผนวก ก หมายเลข 4) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในอาหารเหลว NB ที่มีเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดเจริญอยู่ นำมากระจายเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยทำ 3 ระนาบ จากนั้นนำแผ่นยาทดสอบต่างๆ มาวางด้วยวิธีปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาอ่านผลการไวและการต้านต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ

3.3.5.3 การทดสอบความสามารถในการคงอยู่ในระบบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ชนิด (การทดลองชุดที่ 2) โดยใช้คุณสมบัติความไวต่อยาปฏิชีวนะ

นำตัวอย่างน้ำจากถังเติมอากาศในการทดลองชุดที่ 2 มา 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเหลว NB (ตามภาคผนวก ก หมายเลข 4) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในอาหารเหลว NB ที่มีเชื้อเจริญอยู่ นำมากระจายเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็ง Herellea Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยทำ 3 ระนาบ จากนั้นนำแผ่นยาทดสอบ Chloramphenical มาวางด้วยวิธีปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำมาอ่านผลการทดลองโดยใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาคีบไม้พันสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน ป้ายเชื้อที่ขึ้นได้ในบริเวณที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ แล้วนำไม้พันสำลีใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว NB อยู่ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อที่ขึ้นให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วนำเชื้อแต่ละชนิดที่แยกได้มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.3.5.2 เพื่อดูว่าเชื้อที่ขึ้นได้ในบริเวณที่ไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นเชื้อชนิดใด โดยดูผลเปรียบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เทียบกับผลที่ได้ในข้อ 3.3.5.2 ปฏิบัติเช่นนี้ทุกวันเพื่อดูว่าเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปในระบบบำบัด สามารถอยู่ในระบบได้หรือไม่

3.3.6 การทดสอบความสามารถในการคงอยู่ในระบบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ชนิด *Acinetobacter* และ *Yarrowia* (การทดลองชุดที่ 3) โดยใช้คุณสมบัติความไวต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความสามารถในการคงอยู่ในระบบของแบคทีเรียที่เติมลงไปในระบบทั้งหมด ในการทดลองชุดที่ 3 นั้น ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.3.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตไลเปส

เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดินและน้ำจำนวน 6 ตัวอย่าง (รายละเอียดดังตารางที่ 4.1) พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่เจริญได้ในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนโดยวิธี double layer technique ได้จำนวนเชื้อทั้งสิ้น 37 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะและสถานที่เก็บของตัวอย่างที่นำมาทำการทดลอง

ตัวอย่างที่	ลักษณะตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	pH
1	ดิน	ร้านอาหาร	30	7.42
2	น้ำ	โรงอาหาร	29	6.90
3	น้ำ	บ้าน	28	6.76
4	น้ำ	ร้านอาหาร	31	7.05
5	ดิน	ร้านอาหาร	30	7.20
6	น้ำ	ตลาด	32	6.81

ตารางที่ 4.2 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้จากแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	สถานที่เก็บ	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้	รหัสที่ใช้กับแต่ละไอโซเลท
1	ร้านอาหาร	6	A1-A6
2	โรงอาหาร	8	B1-B8
3	บ้าน	5	C1-C5
4	ร้านอาหาร	4	D1-D4
5	ร้านอาหาร	5	E1-E5
6	ตลาด	9	F1-F9
รวม		37	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในขั้นแรกนี้ เลือกใช้น้ำมันมะกอกซึ่งเป็น complex triglyceride เป็นแหล่งคาร์บอนในการแยกเชื้อโดยวิธี double layer technique เพราะ Sztajar และ Maliszewska (1988) ได้ศึกษาผลของน้ำมันชนิดต่างๆ ต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสพบว่า เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ปริมาณเซลล์ที่สูงกว่าการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน จึงคาดว่าแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสจะเจริญได้ดีทำให้แยกได้ง่ายขึ้น

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง

นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 37 ไอโซเลท ที่แยกได้นำมาเลี้ยงบนอาหาร tributyrin agar เพื่อคัดไอโซเลทที่ผลิตไลเปสได้สูง โดยดูการเกิดส่วนใสรอบๆ โคโลนี ตามวิธีของ Chappe และคณะ (1994) การคัดเลือกวิธีนี้เป็นการใช้สับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ tributyrin แบคทีเรียผลิตไลเปสจะย่อยสลาย tributyrin จึงทำให้เห็นพื้นที่ใสรอบๆ โคโลนี ผลการทดลองพบเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ 22 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 37 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ส่วนใส (mm)	โคโลนี (mm)	อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี
A1	13.58	6.92	1.96
A2	17.06	7.12	2.40
A3	13.96	8.30	1.68
A4	-	-	-
A5	12.58	5.36	2.35
A6	-	-	-
B1	-	-	-
B2	-	-	-
B3	16.20	5.62	2.88
B4	12.08	7.00	1.73
B5	-	-	-

ตารางที่ 4.3 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 37 ไอโซเลท (ต่อ)

ไอโซเลท	ส่วนใส (mm)	โคโลนี (mm)	อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี
B6	5.64	4.88	1.16
B7	4.96	2.00	2.48
B8	13.38	6.82	1.96
C1	10.24	4.58	2.24
C2	3.26	1.10	2.96
C3	7.88	4.40	1.79
C4	14.50	5.60	2.59
C5	7.86	4.90	1.60
D1	-	-	-
D2	-	-	-
D3	-	-	-
D4	-	-	-
E1	10.48	3.68	2.85
E2	6.40	4.52	1.42
E3	33.78	11.12	3.04
E4	-	-	-
E5	-	-	-
F1	16.02	7.28	2.20
F2	-	-	-
F3	9.92	3.90	2.54
F4	13.06	6.80	1.92
F5	-	-	-
F6	-	-	-
F7	7.28	3.06	2.38
F8	-	-	-
F9	7.92	4.40	1.80

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเปลี่ยนมาใช้ tributyrin ในการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในภายหลัง เนื่องจากน้ำมันมะกอกให้ผลการทดลองที่ตัดสินใจยาก เพราะมีบริเวณใสหลายชนิด บริเวณใสบางชนิดใสมากแต่แคบ บางชนิดขุ่นแต่กว้าง และบางชนิดมีทั้งขุ่นและใสอยู่ด้วยกัน คือ ส่วนที่ใสจะอยู่แคบๆภายใน และส่วนที่ขุ่นอยู่ภายนอก (กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, 2532) ขณะที่ tributyrin จะให้บริเวณใสเพียงชนิดเดียวที่สามารถเห็นได้ชัดเจนสะดวกแก่การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง จากการที่แบคทีเรีย 37 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้ในขั้นแรก สามารถย่อย tributyrin ได้เพียง 22 ไอโซเลท ทำให้ยืนยันได้ว่า การใช้ complex triglyceride ทำให้การอ่านผลคลาดเคลื่อนไปได้ การทดลองนี้สอดคล้องกับ Lawrance และคณะ (1967) ที่พบว่า triglyceride ที่มีความซับซ้อน เช่น butter fat จะไม่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น triglyceride ที่ใช้คัดเลือกและทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส เพราะ triglyceride พวกนี้จะให้บริเวณใสที่ขุ่นทำให้ตัดสินใจยาก และเพื่อคัดแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองตามวิธีของ Venkateswaran และ Harayama (1995) สำหรับใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย จากแบคทีเรีย 22 ไอโซเลท จะคัดเลือกไอโซเลทที่มีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่สูงที่สุดเพียง 10 ไอโซเลท มาทำการศึกษาการอยู่รอดในระบบต่อเนื่อง แบคทีเรีย 10 ไอโซเลท ที่ผ่านการคัดเลือกได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.4

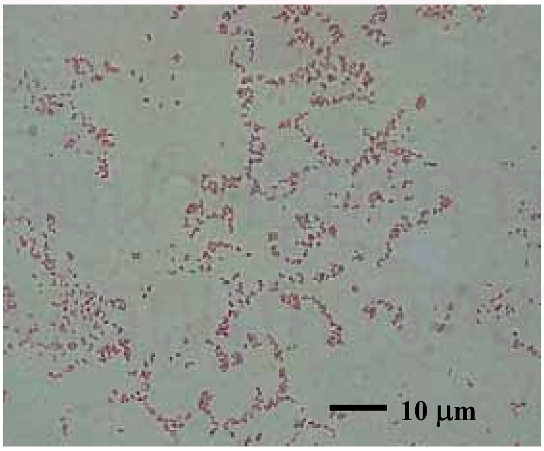
ตารางที่ 4.4 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหาร tributyrin agar

ไอโซเลท	อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี
A2	2.40
A5	2.35
B3	2.88
B7	2.48
C2	2.96
C4	2.59
E1	2.85
E3	3.04
F3	2.54
F7	2.38

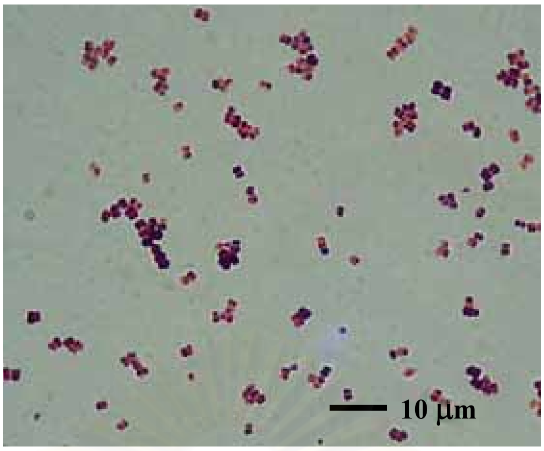
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถอยู่รอดได้ในภาวะเชื้อผสม

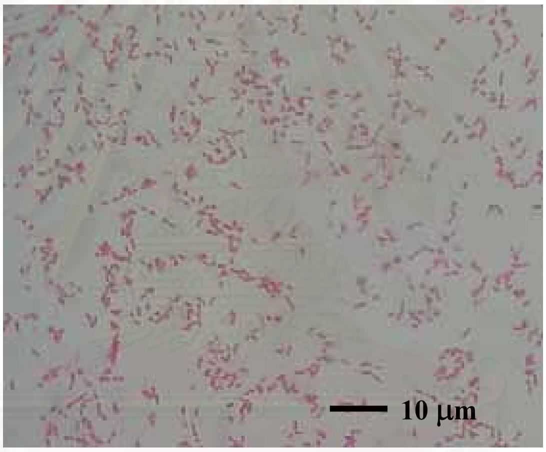
นำแบคทีเรียทั้งหมด 10 ไอโซเลท ที่ได้ในข้อ 4.2 มาทำการคัดเลือกด้วยวิธีการตามธรรมชาติ (natural selection) ในอาหารเหลว เพื่อหากลุ่มเชื้อ (mixed culture) ที่มีความสามารถในการอยู่รอดในภาวะเชื้อผสมและสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่สุด โดยเพาะเลี้ยงตามวิธีข้อ 3.3.1.3 ซึ่งอาศัยหลักการคัดเลือกตามธรรมชาติคือ แบคทีเรียชนิดใดสามารถใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญได้รวดเร็วกว่า จะกลายเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ของประชากร ส่วนแบคทีเรียที่เจริญช้าโตไม่ทัน จะถูกกำจัดออกไปในที่สุด (Venkateswaran และ Harayama, 1995) และเมื่อได้เชื้อผสมกลุ่มสุดท้ายแล้วจึงนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่เหลือจากการคัดเลือกตามวิธีดังกล่าว พบว่ามีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทคงอยู่ในระบบได้นานกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ แสดงว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญและใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนได้เร็วที่สุดในภาวะที่ใช้คัดเลือก (Ijah, 1998) ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท คือ L1, L2 และ L3 ซึ่งติดสีย้อมแกรมได้เป็นแกรมลบ แกรมบวก และแกรมลบ ตามลำดับ (รูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3) มาศึกษาการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ต่อไป การคัดเลือกการอยู่รอดนี้คล้ายกับการทดลองของ ปัญจพล ชิโนดม (2543) ที่คัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายน้ำมันดิบ



รูปที่ 4.1 ลักษณะของ L1 เมื่อย้อมสีแกรม ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย x100



รูปที่ 4.2 ลักษณะของ L2 เมื่อย้อมสีแกรม ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย x100



รูปที่ 4.3 ลักษณะของ L3 เมื่อย้อมสีแกรม ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย x100

4.4 ผลการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองของระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์

ทำการเดินระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ตามวิธีที่อธิบายในหัวข้อ 3.3.4.1 และ 3.3.4.2 จนระบบคงที่โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ (MLSS) คงที่ แล้วเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาวิเคราะห์ การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุด ได้แก่

ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุม ใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา

ชุดที่ 2 ใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา และเติมเชื้อที่คัดได้จากข้อ 4.3 จำนวน 3 ไอโซเลท คือ L1, L2 และ L3

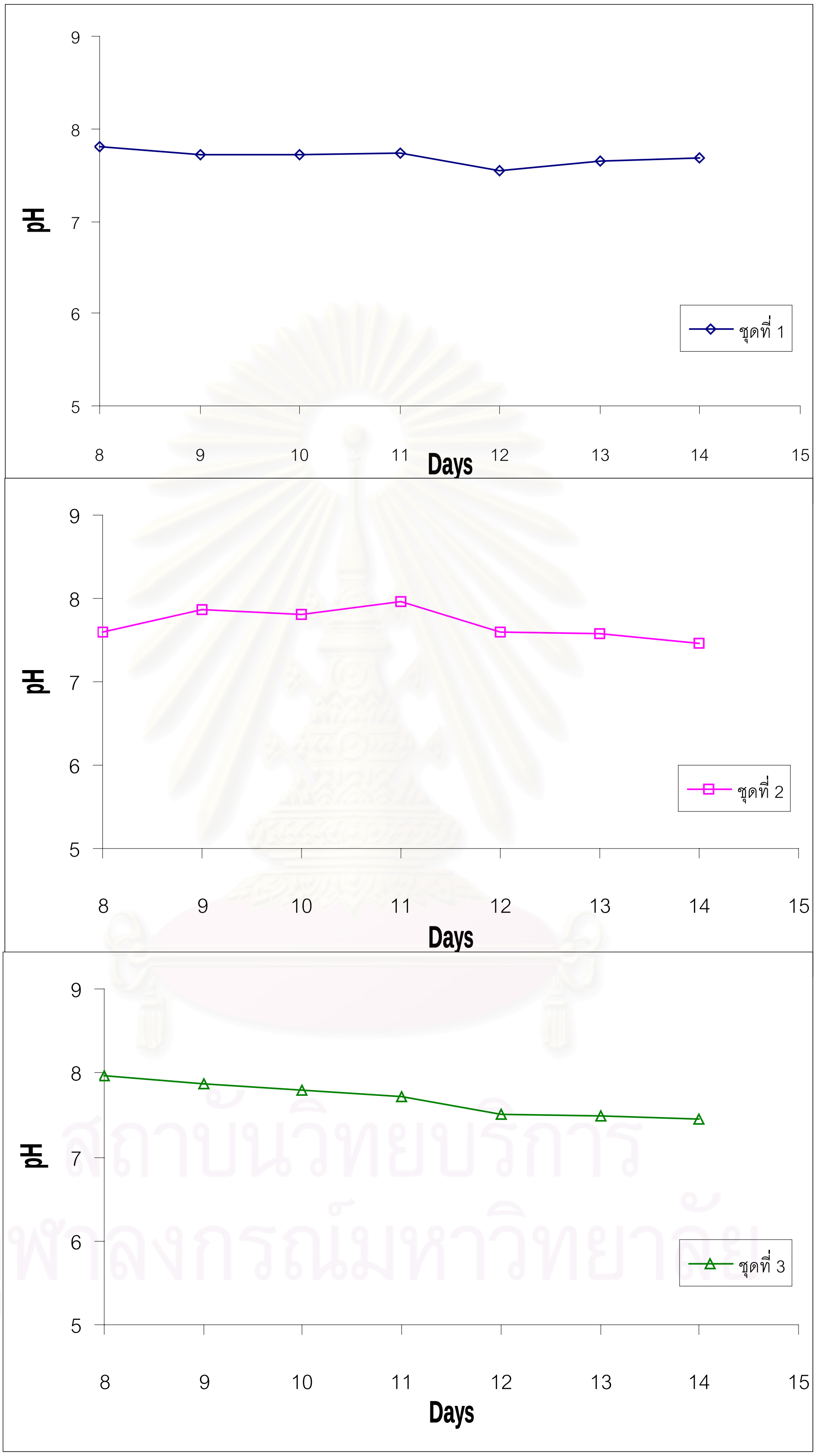
ชุดที่ 3 ใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา เชื้อที่คัดได้จากข้อ 4.3 จำนวน 3 ไอโซเลท คือ L1, L2 และ L3 และมีการเติม *Acinetobacter* และ *Yarrowia*

ผลการทดลองที่ได้ทั้ง 3 ชุด มีดังนี้

4.4.1 พีเอช

การวัดค่าพีเอชของน้ำตัวอย่างกระทำเป็นอันดับแรกโดยทันทีที่เก็บตัวอย่างน้ำจากถังเติมอากาศ เพื่อมาทำการวิเคราะห์ในแต่ละวัน โดยในการทดลองทุกชุดพบว่า ค่าพีเอชของน้ำเสียที่เข้าสู่ระบบมีค่า 8.40 ซึ่งมีค่าคงที่ เนื่องจากเป็นน้ำเสียสังเคราะห์ที่เตรียมขึ้นด้วยความเข้มข้นที่เท่ากัน และมิได้มีการปรับค่าให้เป็นกลาง เนื่องจากค่าพีเอชดังกล่าวยังอยู่ในช่วง (6.5-8.5) ที่ระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ยังสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (สุรพล สายพานิช, 2531) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่เติมลงไปสามารถอยู่ได้ในภาวะที่เป็นเบส ส่วนค่าพีเอชในถังเติมอากาศของการทดลองทั้ง 3 ชุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.69 (อยู่ในช่วง 7.55-7.81), 7.70 (อยู่ในช่วง 7.47-7.97) และ 7.68 (อยู่ในช่วง 7.45-7.96) ตามลำดับ เป็นที่สังเกตว่าทั้ง 3 การทดลองพีเอชมีแนวโน้มลดลงตามเวลา แม้ว่าจะยังอยู่ในช่วงพีเอชเป็นกลางก็ตาม ผลการวัดระดับค่าพีเอชของน้ำเสียในถังเติมอากาศในช่วงเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน ของการทดลองทั้ง 3 ชุด นี้ สามารถแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 4.4 (ข้อมูลแสดงผลการวิเคราะห์ค่าพีเอชในถังเติมอากาศในช่วงเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน แสดงในตารางที่ ค.1 ค.2 และ ค.3 ในภาคผนวก ค)

ระดับค่าพีเอชในถังเติมอากาศของการทดลองแต่ละชุดนั้น ระบบสามารถรักษาระดับให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบได้ และจัดว่าเป็นระดับที่ไม่ส่งผลกระทบใดๆ ต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีในระบบเช่นกัน โดยที่ระดับพีเอชดังกล่าวเกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องทำการปรับค่าด้วยการเติมสารเคมี ระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์จะสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ก็ต่อเมื่อมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.5-8.5 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 6.5 รา (fungi) จะเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียทำให้ประสิทธิภาพของระบบต่ำลง และสลัดจ์ตกตะกอนได้ไม่ดี ส่วนค่าพีเอชที่สูงจะทำให้ฟอสฟอรัสแยกตัวออกมาจากน้ำ (precipitate) และจุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ทำให้ระบบทำงานได้ไม่ดีเช่นกัน หากพีเอชมีค่าสูงหรือต่ำมาก จุลินทรีย์ก็จะตายหมด ไม่สามารถดำรงชีพต่อไปได้ (สุรพล สายพาณิช, 2531)



รูปที่ 4.4 ระดับพีเอชของน้ำเสียในถังเติมอากาศ ในช่วงเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน ของการทดลองทั้ง 3 ชุด

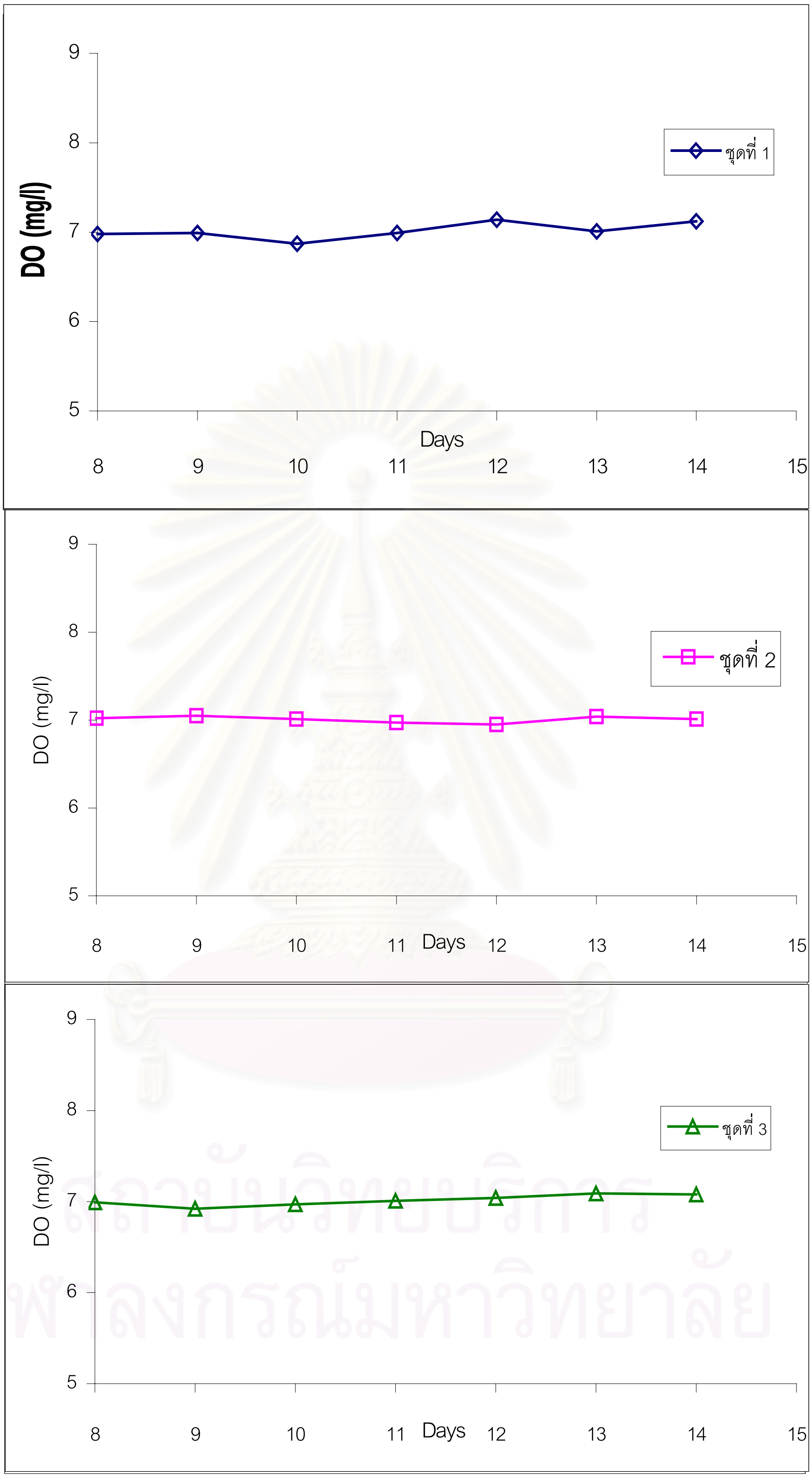
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.2 ปริมาณออกซิเจนละลาย (DO)

การเติมอากาศในถังเติมอากาศของการทดลองทั้ง 3 ชุด ต้องทำการเติมอากาศในปริมาณที่มากเกินพอ เพื่อให้ภายในถังเติมอากาศของทุกๆ การทดลองมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำอย่างมากเพียงพอตลอดเวลา (รักษาสภาพแวดล้อมภายในถังให้เป็นแบบแอโรบิก) โดยทั่วไปแล้วในถังเติมอากาศจะต้องมีค่าออกซิเจนละลายน้ำระหว่าง 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร (สุรพล สายพาณิช, 2531) และเพื่อให้เกิดการกวนผสม (mixing) อย่างทั่วถึงสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกันตลอดทั้งถัง ซึ่งได้ผลดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 4.5 (ข้อมูลแสดงผลการวิเคราะห์ค่าออกซิเจนละลายในถังเติมอากาศในช่วงเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน แสดงในตารางที่ ค.1 ค.2 และ ค.3ในภาคผนวก ค)

จากรูปจะเห็นได้ว่า สามารถรักษาค่าดีโอหรือปริมาณออกซิเจนละลายภายในถังเติมอากาศให้อยู่ในระดับที่สูงได้ตลอดเวลาที่ทำการวิจัย นั่นคือสามารถควบคุมระบบโดยไม่ให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเป็นตัวจำกัดอัตราการเกิดปฏิกิริยา และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบได้ตามขอบเขตการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



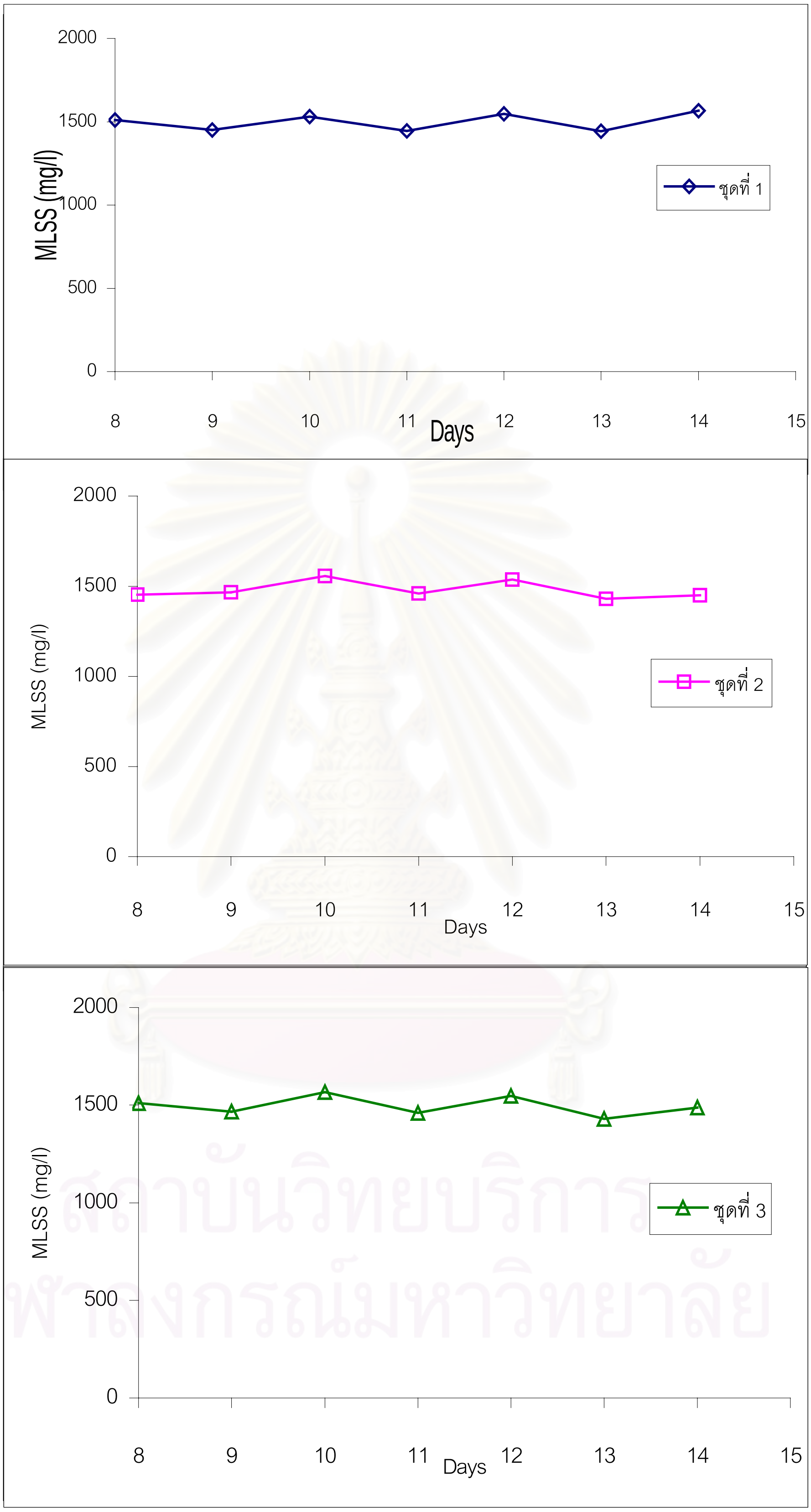
รูปที่ 4.5 ระดับออกซิเจนละลายของน้ำเสียในถังเติมอากาศ ในช่วงเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน ของการทดลองทั้ง 3 ชุด ณ อุณหภูมิห้อง

4.4.3 ของแข็งแขวนลอยในถังเติมอากาศ

ระดับปริมาณของแข็งแขวนลอยในถังเติมอากาศ หรือค่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ในถังเติมอากาศในช่วงเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน ของการทดลองทั้ง 3 ชุด แสดงได้ดังรูปที่ 4.6 (ข้อมูลแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดในถังเติมอากาศในช่วงเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน แสดงในตารางที่ ค.1 ค.2 และ ค.3 ในภาคผนวก ค) สามารถวิเคราะห์ได้ดังนี้

ปริมาณของแข็งแขวนลอยในถังเติมอากาศของการทดลองชุดที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,499 มิลลิกรัมต่อลิตร (อยู่ในช่วง 1,443-1,567 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนการทดลองชุดที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,479 มิลลิกรัมต่อลิตร (อยู่ในช่วง 1,430-1,557 มิลลิกรัมต่อลิตร) และในการทดลองชุดที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,495 มิลลิกรัมต่อลิตร (อยู่ในช่วง 1,430-1,567 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะเห็นได้ว่าปริมาณของแข็งแขวนลอยในถังเติมอากาศ หรือค่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ในถังเติมอากาศในช่วงเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน ของการทดลองทั้ง 3 ชุด นั้น สามารถควบคุมให้มีค่าอยู่ในช่วงที่แผนการวิจัยกำหนดไว้ได้ซึ่งถือว่าระบบคงที่ และมีปริมาณจุลินทรีย์มากพอที่จะจับรวมตัวกันเพื่อการตกตะกอน แต่จากการสังเกตพบว่าน้ำส่วนบนจะมีลักษณะขุ่นทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำมันถั่วเหลืองที่เติมลงไปในระบบบำบัดซึ่งมีคุณสมบัติความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ ทำให้เกิดการลอยตัวที่ผิวหน้าน้ำ จุลินทรีย์ในระบบบำบัดไม่สามารถย่อยสลายได้หมดทำให้มีผลต่อการตกตะกอน โดยการลอยตัวของน้ำมันเป็นสาเหตุให้มีการดึงสารแขวนลอยอื่นๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ขึ้นสู่ผิวทำให้ตกตะกอนยากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



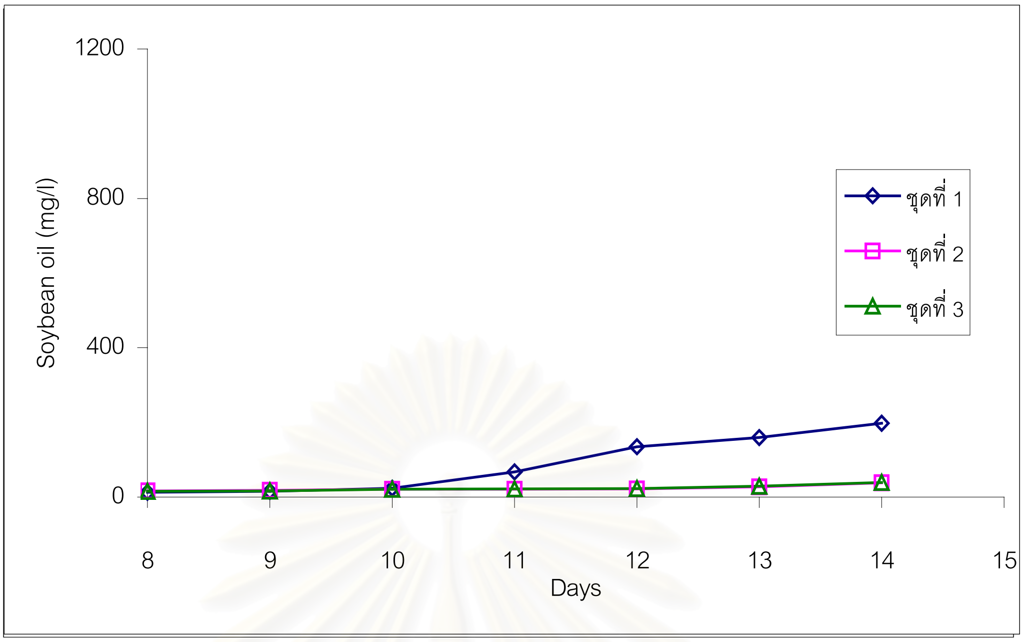
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.6 ระดับของแข็งแขวนลอยในถังเติมอากาศ ในช่วงเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน ของการทดลองทั้ง 3 ชุด

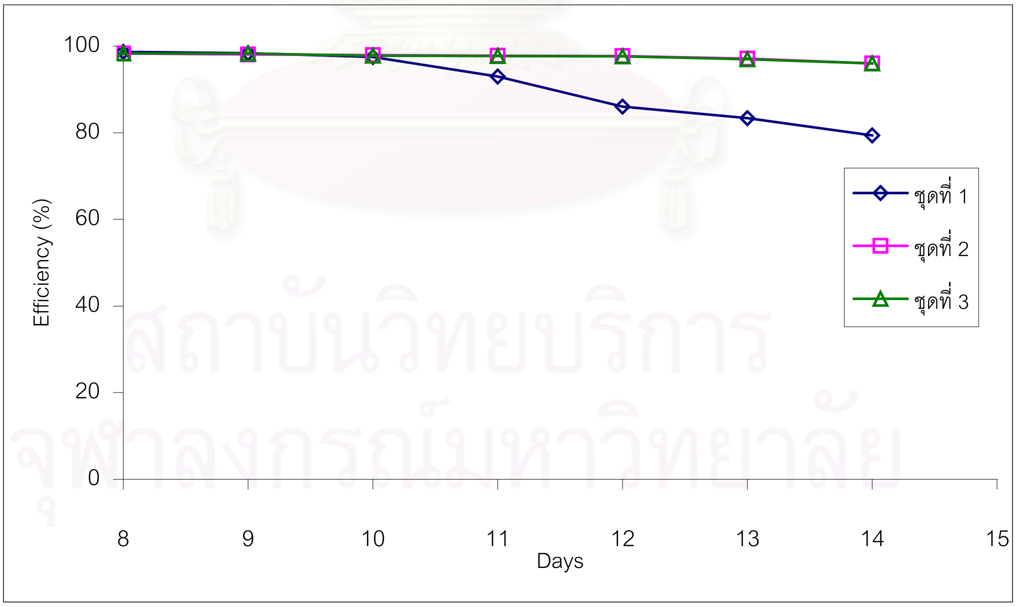
4.4.4 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil)

จากการศึกษาพบว่าน้ำเสียจากโรงอาหารและห้างสรรพสินค้าซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของน้ำเสียชุมชน มีค่าน้ำมันและไขมันไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุดร จารุรัตน์ (2536) และ วรรษา โชติชัยสถิตย์ (2541) พบว่าน้ำเสียจากโรงอาหารมีค่าน้ำมันและไขมันเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเลือกใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 0.1% เมื่อเติมในระบบบำบัดจะทำให้ระบบบำบัดมีความเข้มข้นของน้ำมันเริ่มต้น 963 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาข้างต้น เพราะสลัดจ์ที่ใช้ในการทดลองเป็นสลัดจ์ที่นำมาจากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน โดยผลการทดลองที่ได้ทั้ง 3 ชุด พบว่ามีค่าเฉลี่ยของน้ำมันที่เหลือออกมาหลังผ่านการบำบัดเท่ากับ 87.4, 23.4 และ 23.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันคิดเป็นร้อยละ 90.9 $\pm$ 7.3, 97.5 $\pm$ 0.7 และ 97.5 $\pm$ 0.7 ตามลำดับ แสดงได้ดังรูปที่ 4.7 และ 4.8 (ข้อมูลแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองของน้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัดแล้ว แสดงในตารางที่ ง.1, ง.2 และ ง.3 ในภาคผนวก ง)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 3 ชุด จะเห็นได้ว่า ชุดที่ 2 และ 3 คือชุดที่มีการเติมแบคทีเรียจากแหล่งอื่นเพิ่มลงไปมีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันใกล้เคียงกัน และสามารถกำจัดน้ำมันได้ดีกว่าชุดที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียจากแหล่งอื่น ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4.7 และ 4.8 ซึ่งเปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 3 ชุด ของน้ำมันหลังผ่านการบำบัด และร้อยละของประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมัน ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียที่เติมลงไปสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสมาช่วยย่อยสลายน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ ทำให้สามารถกำจัดน้ำมันได้มากขึ้น และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันได้ดียิ่งขึ้นจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในระบบ เช่นเดียวกับผลการทดลองของ วรรษา โชติชัยสถิตย์ (2541) โดยประสิทธิภาพของการเติมแบคทีเรียสำเร็จรูป SLB 100 เพื่อกำจัดน้ำมันเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมจากร้อยละ 75.5 เป็นร้อยละ 86 และ อัจฉรา คอประเสริฐศักดิ์ (2542) ซึ่งพบว่า เชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท สามารถย่อยสลายไขมันได้สูงกว่าการทดลองชุดควบคุม โดยย่อยสลายไปคิดเป็นร้อยละ 70-88 ขณะที่ชุดควบคุมย่อยสลายไขมันได้เพียงร้อยละ 63 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการทดลองของ อุดร จารุรัตน์ (2536) ที่ได้ทำการกำจัดน้ำมันและไขมันจากโรงอาหารโดยวิธีทางกายภาพคือใช้ถังดักไขมัน น้ำทิ้งที่ออกมาก็ยังมีปริมาณน้ำมันและไขมันสูงถึง 163 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นการกำจัดเฉพาะไขมันออกจากน้ำเสีย ต้องทำการบำบัดน้ำเสียเพื่อลดค่าซีโอดีโดยวิธีอื่นอีก ในขณะที่ผลจากการทดลองในครั้งนี้สามารถกำจัดน้ำมันและลดค่าซีโอดีได้ในขั้นตอนเดียวเป็นการลดขั้นตอนการบำบัดลงแต่ยังสามารถบำบัดน้ำเสียได้ดี แต่การย่อยสลายไขมันในน้ำเสียไม่ได้เกิดจากการทำงานของแบคทีเรียที่เติมเข้าไปเพียงอย่างเดียว ยังเป็นการทำงาน



รูปที่ 4.7 ปริมาณของน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัด ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันเริ่มต้น 963 มิลลิกรัมต่อลิตร ของการทดลองทั้ง 3 ชุด



รูปที่ 4.8 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันเริ่มต้น 963 มิลลิกรัมต่อลิตร ของการทดลองทั้ง 3 ชุด

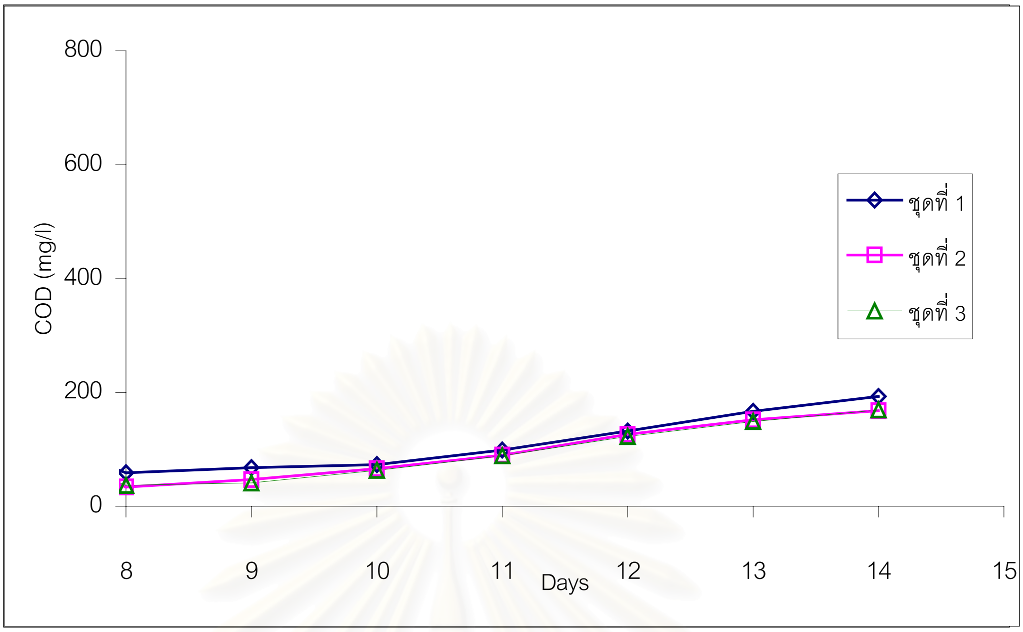
ร่วมกันของจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในน้ำเสียด้วย ซึ่งมีทั้งยีสต์ แบคทีเรีย และโปรโตซัว (Bailey และ Ollis, 1986; Metcalf และ Eddy, 1991) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงความสัมพันธ์ในการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในการบำบัดน้ำเสียด้วย

สำหรับการทดลองชุดที่ 3 นั้น เมื่อคิดเป็นร้อยละของประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันไม่แตกต่างจากผลการทดลองชุดที่ 2 แม้ว่าจะมีรายงานว่า *Acinetobacter* เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ดี (Chappe และ Mourey, 1994) และ *Yarrowia* เป็นยีสต์ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้สูง (ปัญจพล ชิโนดม, 2543) แต่ทั้ง *Acinetobacter* และ *Yarrowia* ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ อาจเป็นแบคทีเรียคนละสายพันธุ์และแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองเปลี่ยนไปจากเดิม ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันที่ได้ในการทดลองชุดที่ 3 ไม่แตกต่างจากการทดลองชุดที่ 2

4.4.5 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดี (COD)

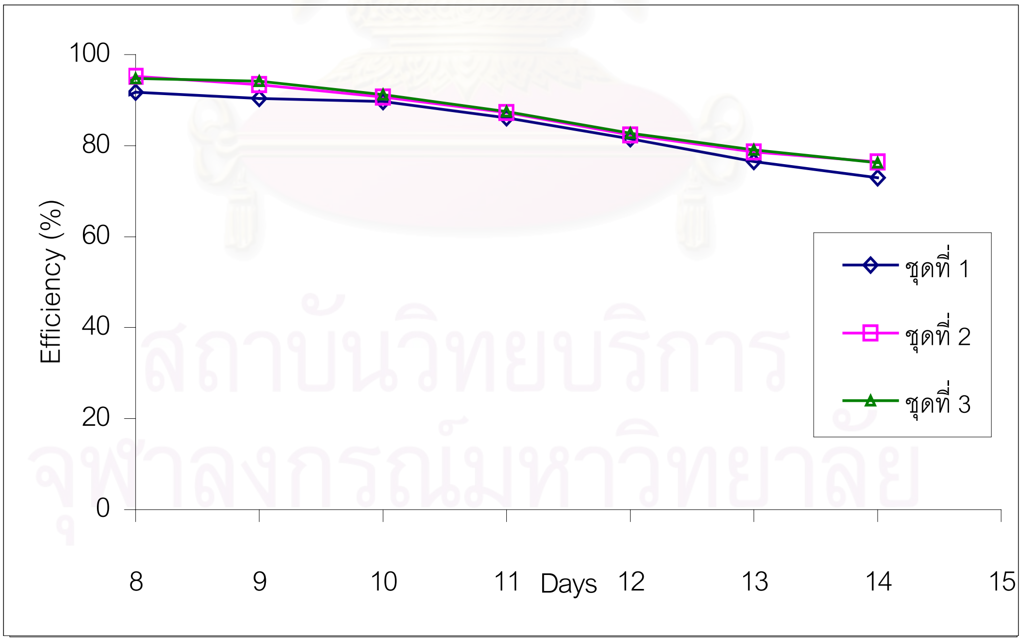
ผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีซึ่งมีค่าเริ่มต้น 712 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบผลการทดลองกัน 3 ชุด พบว่ามีค่าเฉลี่ยของซีโอดีหลังผ่านการบำบัดเท่ากับ 113, 97 และ 95.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีคิดเป็นร้อยละ 84.1 $\pm$ 6.8, 86.3 $\pm$ 6.8 และ 86.5 $\pm$ 6.8 ตามลำดับ แสดงได้ดังรูปที่ 4.9 และ 4.10 (ข้อมูลแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณซีโอดีของน้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัดแล้ว แสดงในตารางที่ ง.1, ง.2 และ ง.3 ในภาคผนวก ง)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 3 ชุด จะเห็นได้ว่า การทดลองชุดที่ 2 และ 3 ที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งอื่นเพิ่มลงไป ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันมากนัก ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4.9 และ 4.10 ซึ่งเปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 3 ชุด ของซีโอดีหลังผ่านการบำบัด และร้อยละของประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดี ตามลำดับ ผลการทดลองเป็นเช่นเดียวกับ วรรษา โชติชัยสถิตย์ (2541) โดยเมื่อเติมแบคทีเรียสำเร็จรูป SLB 100 สามารถกำจัดซีโอดีเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมได้เพียงเล็กน้อย โดยเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 93 เป็นร้อยละ 94



รูปที่ 4.9 ค่าซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัด ของการทดลองทั้ง 3 ชุด

0



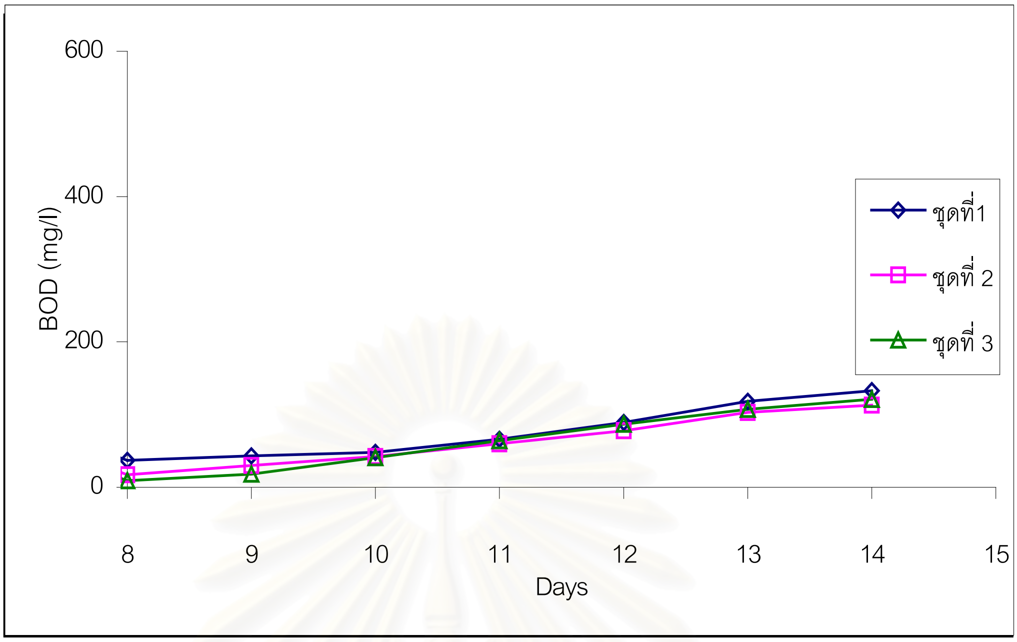
รูปที่ 4.10 ประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์ ของการทดลองทั้ง 3 ชุด

4.4.6 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดบีโอดี (BOD)

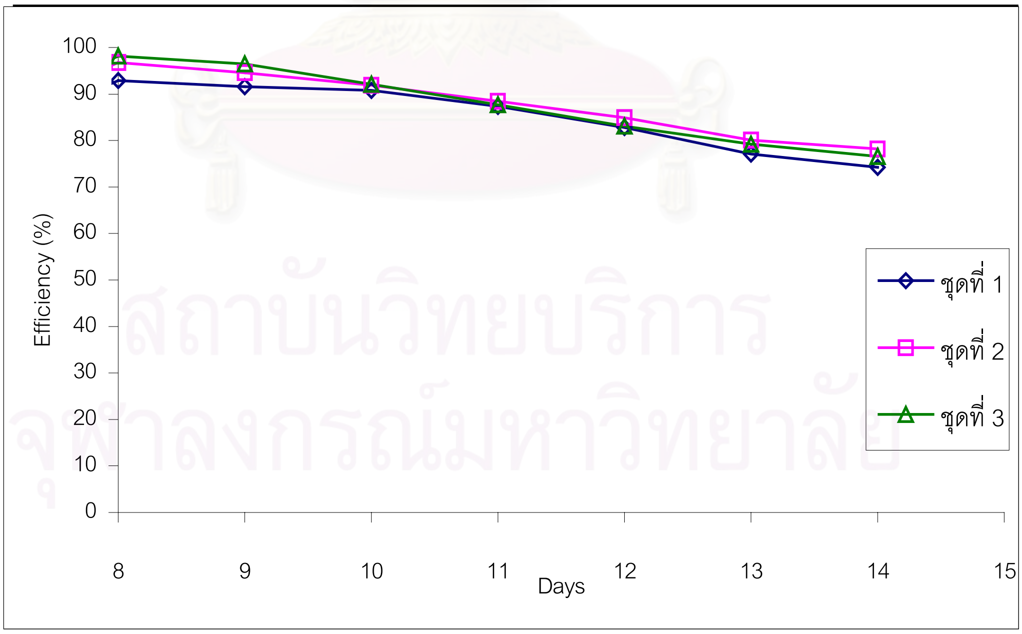
ผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดบีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันถั่วเหลือง โดยเปรียบเทียบผลการทดลองกัน 3 ชุด พบว่ามีค่าเฉลี่ยของบีโอดีหลังผ่านการบำบัดเท่ากับ 76, 63 และ 63.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการกำจัดบีโอดีคิดเป็นร้อยละ 85.2 ± 6.9, 87.8 ± 6.6 และ 87.6 ± 7.8 ตามลำดับ แสดงได้ดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 (ข้อมูลแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีของน้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัดแล้ว แสดงในตารางที่ ง.1, ง.2 และ ง.3 ในภาคผนวก ง)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 3 ชุด จะเห็นได้ว่า การทดลองชุดที่ 2 และ 3 ที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งอื่นเพิ่มลงไป ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดบีโอดีมากกว่าการทดลองชุดที่ 1 ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4.11 และ 4.12 ซึ่งเปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 3 ชุด ของบีโอดีหลังผ่านการบำบัด และร้อยละของประสิทธิภาพการกำจัดบีโอดี ตามลำดับ

จากผลการทดลองทั้ง 3 ชุด จะเห็นได้ว่า เมื่อเติมจุลินทรีย์จากแหล่งอื่นลงไปในระบบ ประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมัน ซีโอดี และบีโอดี ไม่แตกต่างกันมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสลัดจ์ที่นำมาจากระบบน้ำเสียเดิมได้มีการปรับให้มีความคุ้นเคยกับน้ำเสียสังเคราะห์เป็นเวลานาน ทำให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียเดิมมีการปรับตัว สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการเจริญ จึงใช้สับสเตรทในน้ำเสียชนิดใหม่ได้เร็ว (Brock และคณะ, 1994) แม้ว่าผลการทดลองในครั้งนี้จะให้ประสิทธิภาพการกำจัดไม่เพิ่มขึ้นมากนัก แต่หากนำไปใช้กับน้ำเสียจริงอาจให้ผลที่แตกต่างออกไป เนื่องจากมีรายงานของ อัจฉรา คอประเสริฐศักดิ์ (2542) ศึกษาการย่อยสลายไขมันในน้ำเสีย โดยใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 4 ไอโซเลท พบว่าสามารถย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจากโรงงานขนมอบได้สูงกว่าน้ำมันพืชในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยน้ำมันพืชถูกย่อยสลายไปเพียง 27-30 เปอร์เซ็นต์ แต่ไขมันในน้ำเสียโรงงานขนมอบย่อยสลายไป 50-70 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันพืช อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อเป็นอาหารจำพวก minimal ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแหล่งไนโตรเจน ฟอสเฟต และแร่ธาตุอาหารได้จากสารประกอบอนินทรีย์ ซึ่งเป็นอาหารที่พอเพียงสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ ในขณะที่น้ำเสียประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ซึ่งเป็น complex media (Tchobanoglous และ Burton, 1991) สารประกอบเหล่านี้มีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ประเภท chemoheterotrophs ที่ต้องการพลังงานและคาร์บอนสำหรับการเจริญของเซลล์ จุลินทรีย์สามารถได้พลังงานเหล่านี้จากแป้ง น้ำตาล และไขมันที่อยู่ในน้ำเสีย ส่วนแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ



รูปที่ 4.11 ค่าบีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัด ของการทดลองทั้ง 3 ชุด



รูปที่ 4.12 ประสิทธิภาพการกำจัดบีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์ของการทดลองทั้ง 3 ชุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซัลเฟต ได้จากการย่อยสลายโปรตีน (Bailey และ Ollis,1986) สารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำเสียช่วยส่งเสริมให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีกว่าในอาหารสังเคราะห์ จึงทำให้การย่อยสลายไขมันมีปริมาณเพิ่มขึ้น

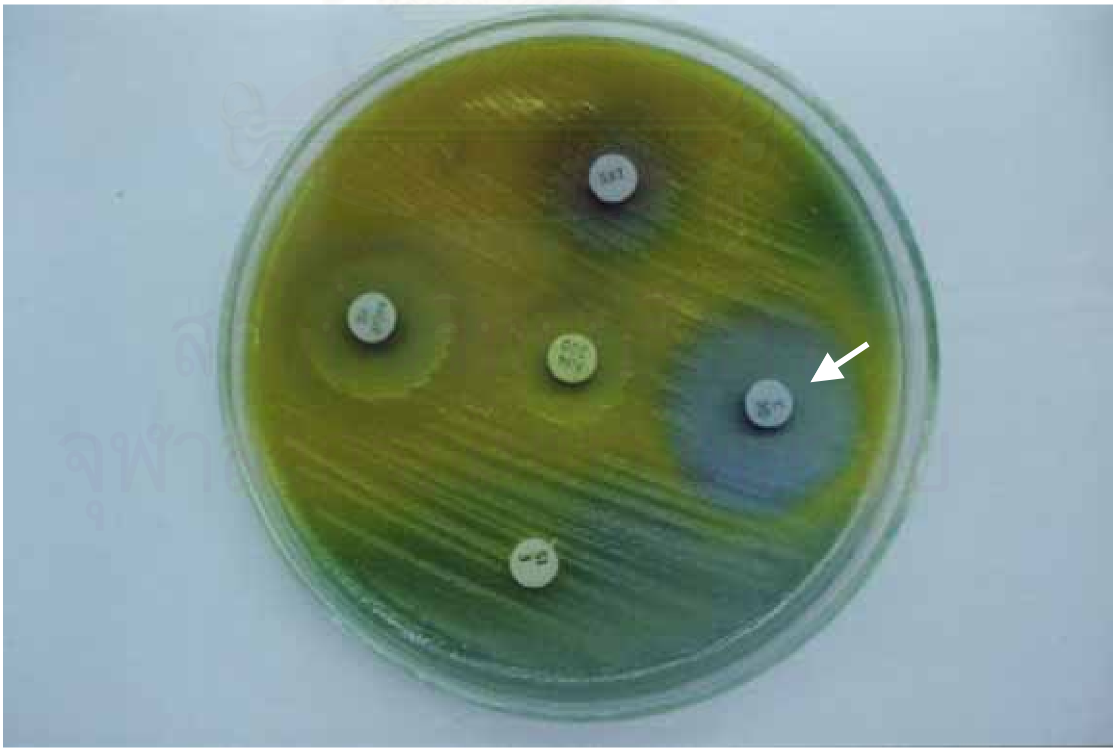
ผลการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมัน ซีโอดี และบีโอดี ของการทดลองทั้ง 3 ชุด จะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดที่ลดลง ทั้งที่น่าจะมีค่าค่อนข้างคงที่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระบบยังไม่อยู่ในสภาวะคงที่ที่แท้จริง เนื่องจากตามแผนการทดลองกำหนดไว้ว่าเมื่อควบคุมค่าความเข้มข้นของน้ำตะกอนได้คงที่จะถือว่าระบบคงที่ หรืออาจเกิดเนื่องจากปริมาณน้ำมันที่ป้อนเข้าสู่ระบบนั้นมีค่ามากเกินไประบบไม่สามารถกำจัดได้หมด ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดมีแนวโน้มที่ลดลง ซึ่งในการศึกษาต่อไปนั้นควรมีการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมัน ซีโอดี และบีโอดี ที่มีค่าความเข้มข้นของน้ำมันเริ่มต้นค่าต่างๆ และผลการทดลองครั้งนี้สังเกตพบว่าน้ำเสียส่วนบนในถังตกตะกอนมีลักษณะขุ่น ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากกระบวนการดูดซับไขมันโดยเซลล์ของจุลินทรีย์ จากการทดลองของ Hsu และคณะ (1983) พบว่าอัตราการดูดซับไขมันโดยสลัดจ์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไขมันเพิ่มขึ้น จนกระทั่งถึง 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นสูงกว่านี้อัตราการดูดซับไขมันจะคงที่ ประกอบกับน้ำมันที่มีอยู่ดึงตะกอนจุลินทรีย์ขึ้นสู่ผิวน้ำเสียหลังการบำบัดจึงมีลักษณะขุ่น เมื่อนำไปวิเคราะห์ทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณสูงขึ้น (Hemer และคณะ, 1985) หรือความขุ่นอาจเกิดจากการเกิด emulsion เนื่องจากจุลินทรีย์สร้าง surfactant ก็ได้ นอกจากประเด็นที่กล่าวมาแล้วความสัมพันธ์ในการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงด้วย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เติมลงไปอาจมีการสร้างสารยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์เดิมหรือเป็นไปในทางกลับกัน จึงต้องศึกษาความสามารถในการคงอยู่ในระบบของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

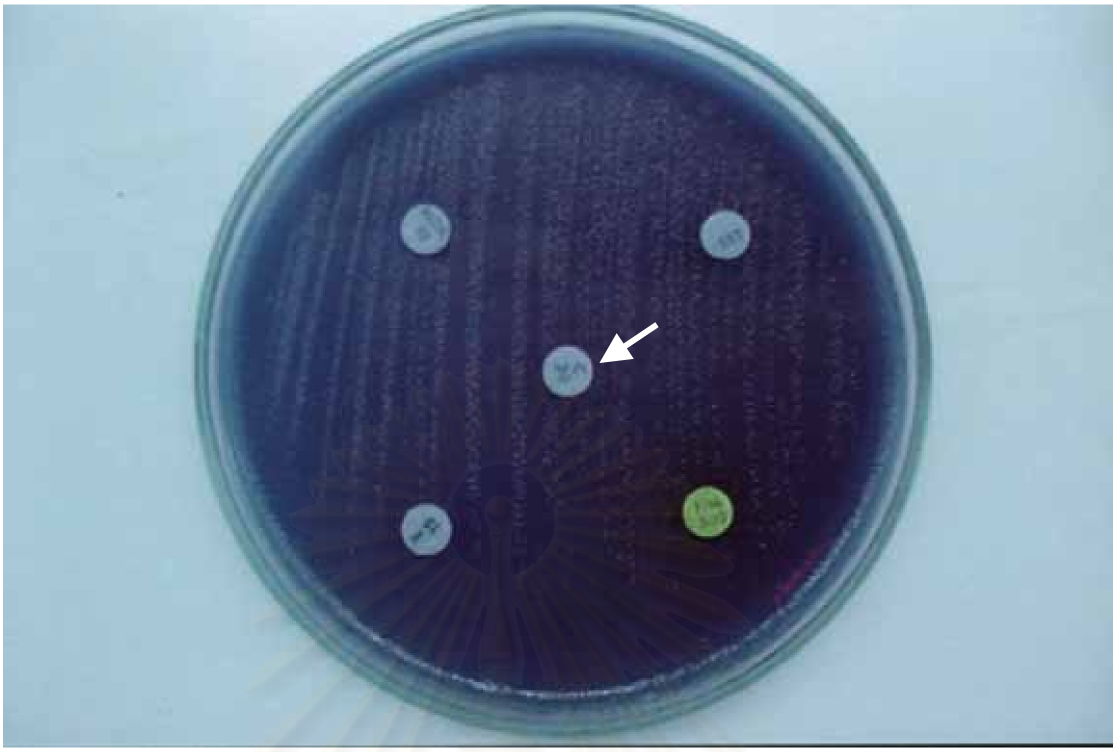
4.5 ความสามารถในการคงอยู่ในระบบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการทดลองชุดที่ 2 โดยใช้คุณสมบัติความไวต่อยาปฏิชีวนะ

4.5.1 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกได้จากหัวเชื้อสลัดจ์ตั้งต้นและแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 ชนิด

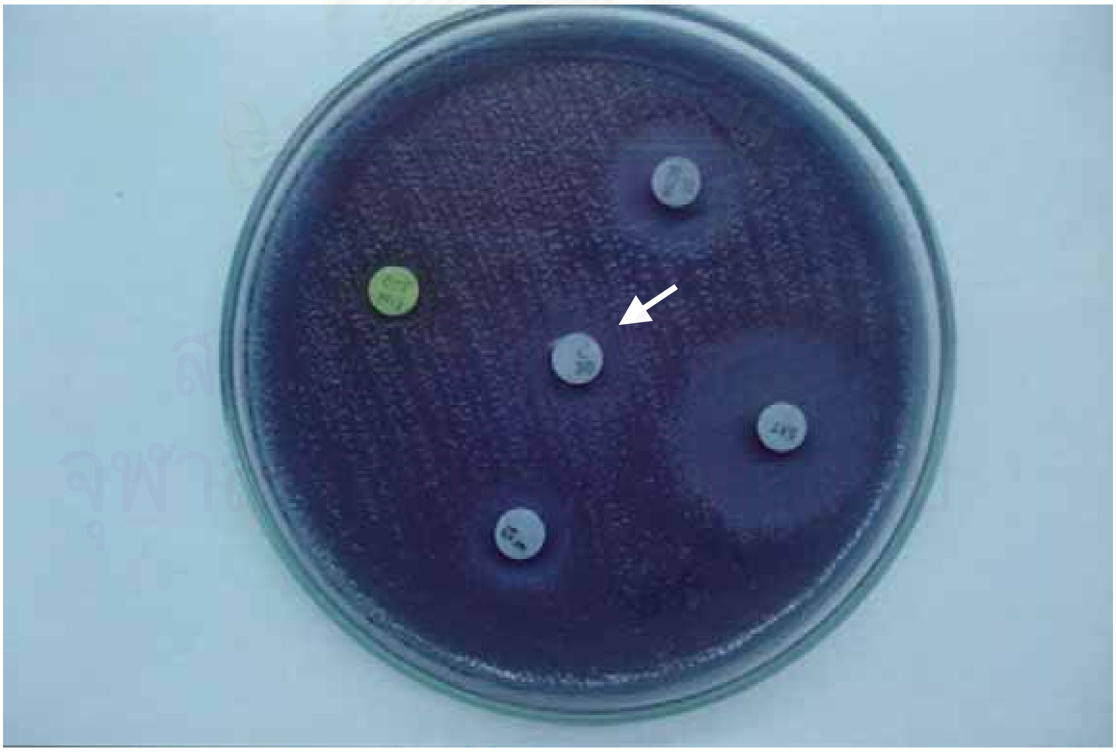
เนื่องจากระบบบำบัดน้ำเสียมีจุลินทรีย์อยู่อย่างหนาแน่น การติดตามดูว่ายังคงมีจุลินทรีย์ที่เติมลงไปอยู่หรือไม่จึงค่อนข้างลำบาก วิโรจน์ ประเทืองสวัสดิ์ (2541) จึงใช้คุณสมบัติความไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นตัวบ่งชี้ซึ่งทำให้ง่ายต่อการติดตาม ผลการแยกเชื้อจากหัวเชื้อสลัดจ์ตั้งต้นพบลักษณะจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิด จึงนำมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะกับยา 23 ชนิด พบว่ามียาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียวที่เชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดไวต่อการทดสอบ ในขณะที่แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ชนิด สามารถต้านยานั้นได้ ซึ่งก็คือ Chloramphenical ตัวอย่างลักษณะการต้านยาแสดงในรูปที่ 4.13 , 4.14 และ 4.15 ดังนั้นจึงใช้ยาชนิดนี้เป็นตัวทดสอบในการติดตามความสามารถในการคงอยู่ในระบบของเชื้อที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกได้จากหัวเชื้อสลัดจ์ตั้งต้น (S1-S5) และแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 ชนิด (L1-L3) แสดงในตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.13 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Chloramphenical ของ S1



รูปที่ 4.14 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Chloramphenical ของ L1



รูปที่ 4.15 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Chloramphenical ของ L2

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกได้จากหัวเชื้อสลัดจ์ตั้งต้น และแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 ชนิด

ชื่อยา	S1	S2	S3	S4	S5	L1	L2	L3
Norfloxain	S	S	S	S	S	S	R	R
Chloramphenical	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**
Nitrofurantoin	S	S	S	R	S	R	R	R
SXT	S	S	S	S	S	S	R	R
Erythromycin	R	S	R	R	R	S	R	R
Cefamandole	S	S	S	R	S	R	R	R
Augmentin	R	S	R	S	R	S	R	R
Cefoperazone	S	S	S	S	S	S	R	R
Ciprofloxacin	S	S	S	S	S	S	R	R
Ceftazidime	S	S	S	S	S	S	R	R
Gentamycin	S	S	S	R	S	S	R	R
Tetracycline	S	S	S	S	S	S	R	R
Imipenem	S	S	S	R	S	S	R	R
Netilmicin	S	S	S	R	S	S	R	R
Kanamycin	S	S	S	R	S	S	R	R
Penicillin	R	R	R	R	R	R	R	R
Amikacin	S	S	S	R	S	S	R	R
Clindamycin	R	R	R	R	R	R	R	R
Oxacillin	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicillin	R	R	R	R	S	R	R	R
Ceftriaxone	S	S	S	R	S	S	R	R
Cefotaxime	S	S	S	R	S	S	R	R
Vancomycin	R	R	R	S	R	R	R	R

หมายเหตุ: S = ไม่สามารถทนยาปฏิชีวนะ S1-S5 = เชื้อจากหัวเชื้อสลัดจ์ตั้งต้น

R = ทนต่อยาปฏิชีวนะ L1-L3 = เชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

4.5.2 การทดสอบความสามารถในการคงอยู่ในระบบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ชนิด โดยใช้คุณสมบัติความไวต่อยาปฏิชีวนะ

เมื่อนำตัวอย่างน้ำจากถังเติมอากาศในการทดลองชุดที่ 2 มาทดสอบความไวต่อยา Chloramphenical ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำ พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้านต่อยาได้แต่ไม่ทราบว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดใด จึงป้ายเชื้อที่ขึ้นได้ในบริเวณที่ไวต่อยาปฏิชีวนะมาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วนำเชื้อแต่ละชนิดที่แยกได้มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อนำผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะไปเปรียบเทียบกับตารางที่ 4.5 และเปรียบเทียบลักษณะเซลล์จากการย้อมสีแกรม พบว่าเชื้อที่ขึ้นได้ในบริเวณที่ไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นเชื้อ L1, L2 และ L3 แสดงว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้นั้นสามารถคงอยู่ในระบบได้ เป็นเช่นนี้ตลอดการเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน

4.6 การทดสอบความสามารถในการคงอยู่ในระบบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ชนิด *Acinetobacter* และ *Yarrowia* ในการทดลองชุดที่ 3 โดยใช้คุณสมบัติความไวต่อยาปฏิชีวนะ

4.6.1 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Acinetobacter* และ *Yarrowia*

เมื่อนำ *Acinetobacter* และ *Yarrowia* มาตรวจสอบคุณสมบัติความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 23 ชนิด พบว่ามียาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียวที่เชื้อแบคทีเรียซึ่งแยกจากหัวเชื้อสลัดจ์ตั้งต้นทั้ง 5 ชนิด ไวต่อการทดสอบ และ *Acinetobacter* และ *Yarrowia* สามารถต้านต่อยานั้นได้ ซึ่งก็คือ Chloramphenical เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสที่แยกได้ ดังนั้นจึงใช้ยาชนิดนี้เป็นตัวทดสอบในการติดตามความสามารถในการคงอยู่ในระบบของเชื้อที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด *Acinetobacter* และ *Yarrowia* ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Acinetobacter* และ *Yarrowia* แสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Acinetobacter* และ *Yarrowia*

ชื่อยา	*Acinetobacter*	*Yarrowia*
Norfloxacin	S	R
Chloramphenical	R	R
Nitrofurantoin	R	R
SXT	R	R
Erythromycin	S	R
Cefamandole	R	R
Augmentin	S	R
Cefoperazone	S	R
Ciprofloxacin	S	R
Ceftazidime	S	R
Gentamycin	S	R
Tetracycline	S	R
Imipenem	S	R
Netilmicin	S	R
Kanamycin	S	R
Penicillin	R	R
Amikacin	S	R
Clindamycin	R	R
Oxacillin	R	R
Ampicillin	R	R
Ceftriaxone	S	R
Cefotaxime	S	R
Vancomycin	R	R

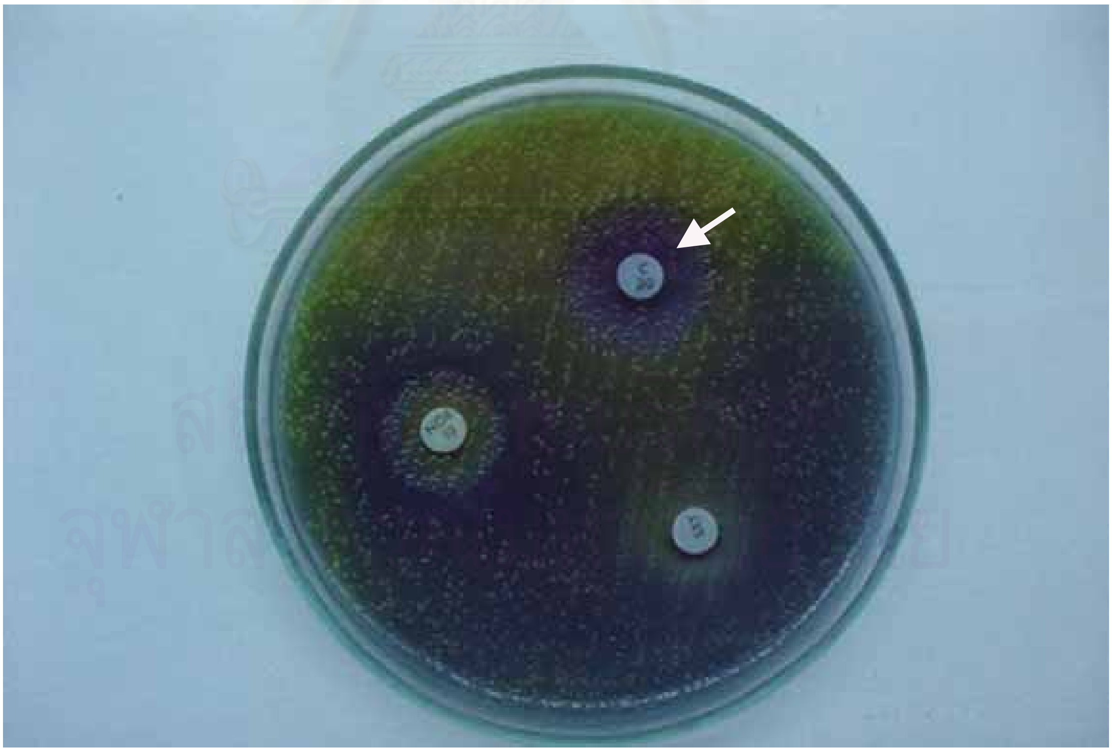
หมายเหตุ: S = ไม่สามารถทนยาปฏิชีวนะ

R = ทนต่อยาปฏิชีวนะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

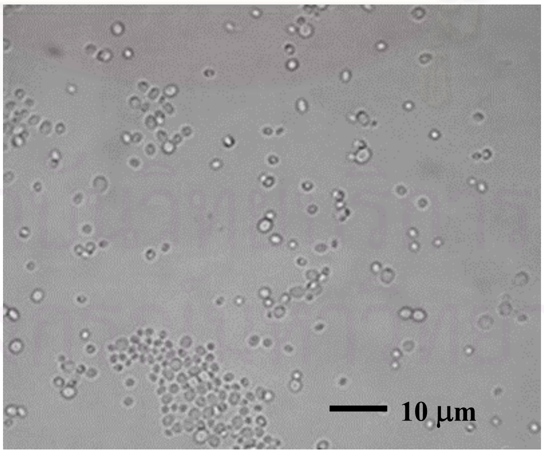
4.6.2 การทดสอบความสามารถในการคงอยู่ในระบบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ชนิด ของ *Acinetobacter* และ *Yarrowia* โดยใช้คุณสมบัติความไวต่อยาปฏิชีวนะ

เมื่อนำตัวอย่างน้ำจากถังเติมอากาศในการทดลองชุดที่ 3 มาทดสอบความไวต่อยา Chloramphenical ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำ พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้านต่อยาได้แต่ไม่ทราบว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดใด (รูปที่ 4.16) จึงป้ายเชื้อที่ขึ้นได้ในบริเวณที่ไวต่อยาปฏิชีวนะมาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว ดังรูปที่ 4.17 แล้วนำเชื้อแต่ละชนิดที่แยกได้มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อนำผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะไปเปรียบเทียบกับตารางที่ 4.5 พบว่าเชื้อที่ขึ้นได้ในบริเวณที่ไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นเชื้อ L1, L2, L3 (ลักษณะเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แสดงในข้อ 4.3), *Acinetobacter* และ *Yarrowia* (ลักษณะเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แสดงดังรูปที่ 4.18 และ 4.19) เนื่องจากผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ตรงตามที่ทดสอบข้างต้น และเมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีลักษณะตรงตามที่เคยตรวจสอบ แสดงว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้นั้นสามารถคงอยู่ในระบบได้ เป็นเช่นนี้ตลอดการเก็บผลการทดลองทั้ง 7 วัน

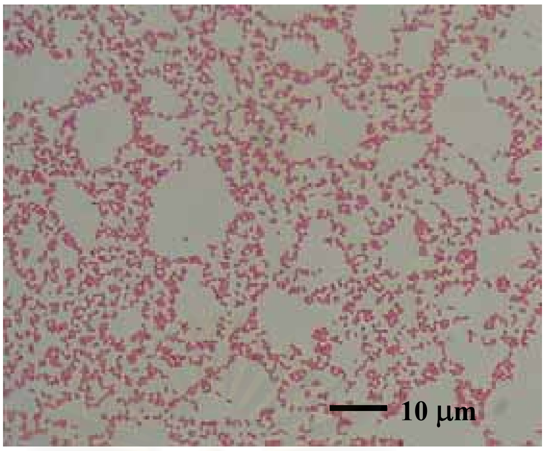


รูปที่ 4.16 เชื้อที่ขึ้นได้ในบริเวณที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ Chloramphenical

รูปที่ 4.17 โคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ขึ้นได้ในบริเวณที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ



รูปที่ 4.18 ลักษณะของ *Yarrowia* ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย x40



รูปที่ 4.19 ลักษณะของ *Acinetobacter* ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย x100

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ คือ แบคทีเรียที่แยกได้ คือ L1, L2 และ L3 รวมทั้ง *Acinetobacter* และ *Yarrowia* สามารถมีชีวิตอยู่ได้ตลอดการทดลองทั้ง 7 วัน แต่จำนวนประชากรของกลุ่มจุลินทรีย์ที่เติมลงไปนั้นไม่สามารถทราบได้แน่ชัด และหากเดินระบบต่อไปมากกว่าระยะเวลาที่ทำการศึกษา กลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวจะสามารถอยู่ได้หรือไม่ เนื่องจากมีแนวโน้มประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมัน ซีโอดี และบีโอดี ที่ลดลง เพราะค่าประสิทธิภาพการกำจัดที่ลดลงนั้น อาจเกิดเนื่องจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่เติมลงไป หรือสลัดจ์ที่นำมาจากระบบบำบัดน้ำเสียเดิมมีประชากรที่ลดลง เพราะผลผลิตจากการย่อยสับสเตรตของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งอาจไปยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง เช่น กลูโคส ยับยั้งการผลิตโปรติเอส และเซลลูเลส ได้ เป็นการยับยั้งแบบ catabolite represssion (อรพิน ภูมิภมร, 2526) ความสัมพันธ์ในการอยู่ร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไป

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากตัวอย่างดินและน้ำเสียจากร้านอาหาร ตลาด และบ้านเรือน สามารถแยกแบคทีเรียด้วยอาหารที่ประกอบด้วยน้ำมันมะกอกได้ 37 ไอโซเลท นำมาคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสได้กว้างในอาหาร tributyrin agar ได้ 10 ไอโซเลท เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ได้แบคทีเรียผสมกลุ่มสุดท้ายประกอบด้วย 3 ไอโซเลท คือ L1, L2 และ L3 จึงนำมาศึกษาการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ต่อไป

ผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันถั่วเหลือง ซีโอดี และบีโอดี ในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์สามารถสรุปได้ดังนี้

ชุดที่ 1 ชุดทดลองควบคุม (control) มีเฉพาะหัวเชื้อจากระบบบำบัดน้ำเสียเดิม ผลการศึกษาพบว่า สามารถลดค่าน้ำมันถั่วเหลือง ซีโอดี และบีโอดี ได้ร้อยละ 90.9 ± 7.3, 84.1 ± 6.8 และ 85.2 ± 6.9 ตามลำดับ

ชุดที่ 2 เหมือนชุดที่ 1 และมีการเติมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ L1, L2 และ L3 ผลการศึกษาพบว่า สามารถลดค่าน้ำมันถั่วเหลือง ซีโอดี และบีโอดี ได้ร้อยละ 97.5 ± 0.7, 86.3 ± 6.8 และ 87.8 ± 6.6 ตามลำดับ

ชุดที่ 3 เหมือนชุดที่ 2 และมีการเติม *Acinetobacter* และ *Yarrowia* ผลการศึกษาพบว่า สามารถลดค่าน้ำมันถั่วเหลือง ซีโอดี และบีโอดี ได้ร้อยละ 97.5 ± 0.7, 86.5 ± 6.8 และ 87.6 ± 7.8 ตามลำดับ

ผลจากการติดตามความสามารถในการคงอยู่ในระบบของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ L1, L2 และ L3 รวมทั้ง *Acinetobacter* และ *Yarrowia* โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Chloramphenical พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถเจริญอยู่ในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ได้ตลอดการทดลอง

แสดงว่าจุลินทรีย์ที่เติมลงไปน่าจะใช้ในระบบบำบัดจริงได้ ทั้งนี้จะต้องทดลองในระดับขยายขนาดต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาวิจัยเพื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงจากแหล่งอื่นในประเทศไทย เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ต่อไป

2. ควรมีการศึกษาวิจัยเมื่อเดินระบบบำบัดโดยใช้ระยะเวลาที่นานมากขึ้น เนื่องจากระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ที่ควบคุมค่าอายุตะกอนนั้น ควรใช้ระยะเวลาในการเก็บผลการทดลองนาน 2-3 เท่า ของค่าอายุตะกอน

3. ควรจะมีการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันถั่วเหลือง ซีโอดี และบีโอดี ในระบบบำบัดที่ใช้น้ำเสียจริง

4. ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมัน ซีโอดี และบีโอดี ที่มีค่าความเข้มข้นของน้ำมันเริ่มต้นค่าต่างๆ

5. ควรมีการศึกษาด้านความสัมพันธ์ในการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในระบบบำบัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. 2532. การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตเอนไซม์ Lipase และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิราภรณ์ สุขุมาวาลี และคณะ. 2536. การกำจัดคราบน้ำมันโดยจุลินทรีย์. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ ประจำปี 2536 ของสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. เทคโนโลยีการควบคุมมลพิษ. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิตติ์ 18-19 มิถุนายน 2536: 350-356.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2530. น้ำเสียชุมชนและปัญหามลภาวะทางน้ำในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2532. รายงานสมบูรณ์ การจัดการคุณภาพน้ำของลุ่มน้ำกะรนจังหวัดภูเก็ต. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปัญจพล ชิโนดม. 2543. การสร้างกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เพื่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัฒนา ขวัญสกุล. 2520. การกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปโดยระบบแอคทิเวตเต็ดสลัดจ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต แผนกวิชาวิศวกรรมสุขาภิบาล บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิษณุ บุณยภักดิ์. 2539. การศึกษาพารามิเตอร์จลน์ตะกอนเร่งแบบหลายขั้นตอน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ. ประสิทธิภาพของ Biocord ในการเลี้ยงตะกอนจุลชีพ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรรษา โชติชัยสถิตย์. 2541. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียสำเร็จรูปในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิทยา อยู่สุข. การแยกไขมันน้ำมันในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม. วารสารความปลอดภัยและสิ่งแวดล้อม. 4(ตุลาคม-ธันวาคม): 51-53.

วิโรจน์ ประเทืองสวัสดิ์. 2541. ประชากรและประสิทธิภาพของ *Acinetobacter* sp. ในการกำจัดฟอสเฟตในระบบบำบัดน้ำเสียชนิดทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมรัตน์ ยินดีพิธ. 2533. การกำจัดคราบน้ำมันด้วยวิธีชีวภาพ. วารสารความรู้คือประทีป. 4(กรกฎาคม-กันยายน): 13-20.

สุรพล สายพานิช. 2531. การออกแบบและควบคุมการทำงานของกระบวนการตะกอนเร่ง. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการเรื่องน้ำเสีย จัดโดยวิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทยร่วมกับกรมโรงงานอุตสาหกรรม.

สุรพล สายพานิช. 2538. การควบคุมดูแลระบบบำบัดน้ำเสีย. คณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พิมพ์ครั้งที่ 2: 151-153.

อรพิน ภูมิอมร. 2526. ระบบชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ เล่มที่ 3. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร: 345 น.

อัจฉรา คอประเสริฐศักดิ์. 2542. การศึกษาแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันและน้ำเสียประเภทไขมันสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุดร จารุรัตน์ และจารุรัตน์ วรนิสรากุล. 2536. แนวทางการออกแบบถังดักไขมันที่เหมาะสม. กรุงเทพมหานคร: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Bailey,J.E. and Ollis, D.E. 1986. Biochemical Engineering Foundamentals, McGraw-Hill Book Co. Singapore. 984 p.

Becker, P., Koster, D., Popov, M.N., Markossian, S., Antranikian, G. and Markl, H. 1999. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. Water Research. 33(3): 653-660.

Borja, R. and Alba, J. 1995. Activated sludge treatment of wash waters derived from the purification of virgin olive oil in a new manufacturing process. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 64(1): 25-30.

Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 1994. Biology of Microorganisms. Prentice Hall., Englewood. 909 p.

Chappe, P., Mourey, A., and Kibertus, G. 1994. Variation of lipolitic activity in the genus *Acinetobacter radioresistens*. J. Gen. Appl. Microbiol. 4: 103-114.

Chigusa, K., Hasegava, T., Yamamoto, N. and Watanabe, Y. 1996. Treatment of wastewater from oil manufacturing plant by yeasts. Water Science and Technology. 34(11): 51-58.

Dueholm, T.E., Andreasen, K.H. and Nielsen, P.H. 2001. Transformation of lipids in activated sludge. Water Science and Technology. 43(1): 165-172.

Gerhaedt, P., Murray,R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R. 1994. Method of General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington. D.C. 791 p.

Gluyamova, K.A. and Davranov, K.D. 1994. Effect of cellure condition on production of extra and intracellular lipase by the fungus *Mucor michei*. Appl. Biochem. Microbiol. 30(2): 524-526.

Haba, E., Breso, O., Ferrer, C., Marques, A. Busquets, M. and Manresa, A. 2000. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. Enzyme Microb. Technol. 26: 40-44.

Hanaki, K.S. and Katsuo, K. 1990. Treatment of oily cafeteria wastewater by single- phase and two-phase anaerobic filter. J. Water Science Technology. 22: 299-306.

Hemer, G.T., Egli, T. and Mechsner, K. 1985. Biological treatment of industrial wastewater a microbiological basis for process performance. J. App. Bacteriol. Symposium Supplement. 31: 127S-140S.

Hsu, T., Hanaki, K. and Mutsumoto, J. 1983. Kinetic of hydrolysis oxidation and during olive oil degradation by activated sludge. Biotechnol.Bioeng. 25: 1829-1839.

Ijah, U.J.J. 1998. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolated from tropical soil in degrading crude oil. Waste Management. 18: 293-299.

Kojima, Y., Yokoe, M. and Mase, T. 1994. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Psuedomonas Fluorescens* AK102. Biosci. Biotech. Biochem. 58(9): 1564-1568.

Lawrance, K.C., Fryer, T.F. and Reiter, B. 1967. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipase. Nature. 25: 1264-1265.

Macre, A.R. 1983. Lipase catalyzed interesterification of oil and fat. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 60(2): 243A-246A.

Miller, D.A., Prausintz, J.M. and Blanch, H.W. 1991. Kinetic of lipase catalyzed interesterification of triglyceride in cyclohexane. Enzyme Microb. Technol. 13: 98-103.

Mitsuda, S., Umenura, T. and Hirohasa, H. 1988. Preparation of an optically pure secondary alcohol of synthetic pyrethroids using microbial lipases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 310-315.

Mkhize, S.P., Atkinson, B.W. and Bux, F. 2000. Evaluation of a laboratory-scale biological process for the treatment of edible oil effluent. Water Sa. 26(4): 555-558.

Norris, J.R. and Ribbons, D.W. 1971. Methods in microbiology Vol. 6. Elsevier Publishing Co., Amsterdam. 593 p.

Peppler, H.J. and Perlman, D. 1979. Microbial Technology vol. 2: Fermentation Technology 2nd ed. Academic Press Inc., New York.

Rehm, H.J. and Reed, G. 1981. Biotechnology Vol.1. Verlag Chemic, Weinheim. 520 p.

Rydin, S., Molin, G. and Nilssos, I. 1990. Conversion of fat into grease biomass in protein containing wastewater. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 473-476.

Schuepp, C., Kermasha, S., Michalski, M.C. and Morin, A. 1994. Production, partial purification and characterization of lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA037. Process. Biochem. 32(3): 225-232.

Sugihara, A.,Ueshima.,M.,Shimada,Y., Tsunasawa, S. and Tominago, Y. 1992. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. J. Biochem. 112: 598-603.

Sztajar, H. and Maliszewska, I. 1988. Production of exogenous bacterial, fungi and actinomycetes. Enzyme Microb. Technol. 10: 492-496.

Takeshi, S., Toru, N., Tatsuo, N., and Nobuyoshi, E. 2001. Cold-active lipolytic activity of psychrophic *Acinetobacter* sp. Strain No. 6. J. Biosci. Bioeng. 92: 144-148.

Talon, R., Dublet, N., Montet, M.C. and Cantonnet, M. 1995. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. Current. Microbiol. 30: 11-16.

Venkateswaran, K. and Harayama, S. 1995. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. Can. J. Microbiol. 41: 767-775.

Wakelin, N.G. and Forster, C.F. 1997. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. Bioresource Technology. 59(1): 37-43.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหารเหลวสำหรับคัดเลือกเชื้อ

$(NH_4)_2SO_4$	5.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3	กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง	20.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดยกเว้นน้ำมันถั่วเหลืองให้เข้ากัน นำไปปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 ก่อนที่จะนำไปอุ่นให้ร้อน จากนั้นจึงถ่ายใส่หลอดทดลองในปริมาณหลอดละ 4.9 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำมันถั่วเหลือง 0.1 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซ็นต์น้ำมันถั่วเหลือง) ลงไป

2. สูตรอาหารแข็งสำหรับคัดเลือกเชื้อ

2.1 Basal medium

สูตรอาหารเหมือนข้อ 1 แต่เติม agar 2 เปอร์เซ็นต์ และไม่ใส่น้ำมันถั่วเหลือง

2.2 สูตรอาหารแข็งสำหรับเททับหน้า

สูตรเหมือนข้อ 1 แต่มีการเพิ่ม agar 15 กรัม (1.5 เปอร์เซ็นต์) เข้ามาด้วย และลดน้ำมันถั่วเหลืองเหลือ 5 มิลลิลิตร (0.5 เปอร์เซ็นต์)

การเตรียมอาหารข้อ 2.2 จะทำโดยผสมส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นน้ำมันถั่วเหลืองและ agar ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงนำไปปรับพีเอช แล้วเติม agar ก่อนที่จะนำไปหลอมละลายด้วยความร้อน เมื่อ agar หลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายแล้ว จึงนำสารละลายร้อนนี้มาเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจะถ่ายสารละลายดังกล่าวสู่หลอดทดลองหลอดละ 6 มิลลิลิตร ก่อนที่จะนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สูตรอาหารแข็ง Nutrient Agar สำหรับเก็บเชื้อ

Beef Extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลาย beef extract และ peptone ในน้ำกลั่น นำไปทำให้ร้อนบนแผ่นความร้อนจนได้อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส ใส่ agar ทีละน้อย คนสารละลายจน agar ละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แบ่งใส่หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เอียงหลอดรอจนแข็งตัวจะได้ slant สำหรับเก็บเชื้อจุลินทรีย์

4. สูตรอาหารเหลว Nutrient Broth สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ

เช่นเดียวกับสูตรอาหารแข็ง nutrient agar แต่ไม่ต้องเติม agar ละลาย beef extract และ peptone ในน้ำกลั่น นำไปแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ตามปริมาณที่ต้องการ แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. สูตรอาหาร Emulsion Tributyrin Agar

Yeast Extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	12	กรัม
Tributyrin	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

หากไม่ได้ใช้อาหารสำเร็จ ให้นำส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นน้ำมัน tributyrin มาผสมให้ความร้อนจน agar ละลาย จากนั้นจึงนำ tributyrin มาผสมโดยเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ก่อนเทลงจานเพาะเชื้อควรเขย่าให้เม็ดน้ำมันกระจายตัวให้ทั่วก่อน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สูตรอาหารแข็ง Herrellea Agar

Tryptone	15.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Maltose	10.0	กรัม
Bile salt	1.25	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	16.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมสารประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

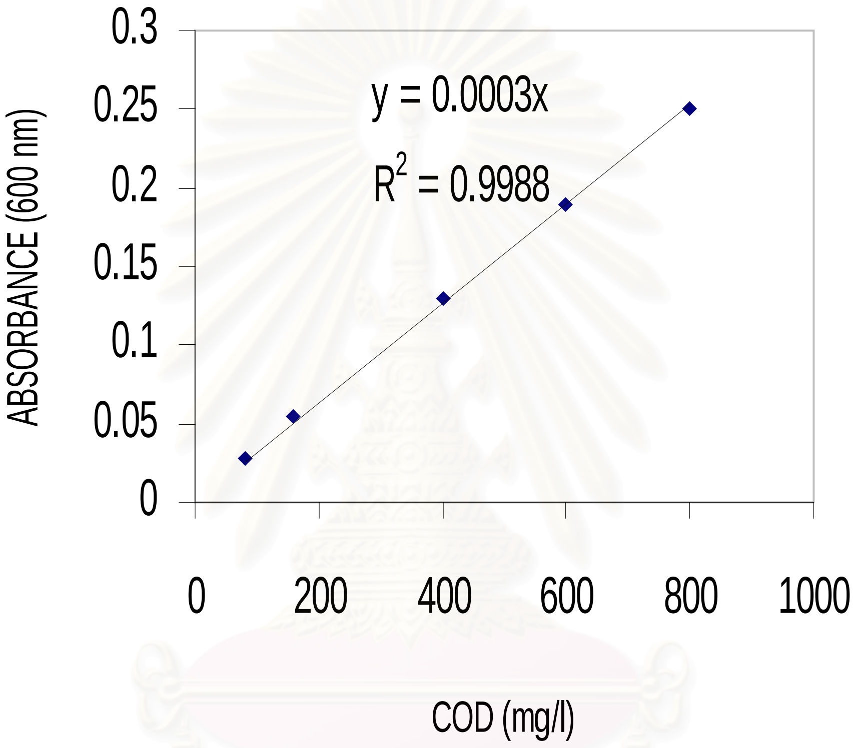
7. สูตรอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar

Beef extract	5.0	กรัม
Casein	17.5	กรัม
Strach	1.5	กรัม
Agar	12.5	กรัม

ผสมสารประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาซีโอดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค.1 ผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าออกซิเจนละลาย (DO) และค่าความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์(MLSS) ในถังเติมอากาศ ของการทดลองชุดที่ 1

วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	ผลการทดลองชุดที่ 1		
		pH	DO (mg/l)	MLSS (mg/l)
22/06/46	1	7.81	6.98	1,510
23/06/46	2	7.71	6.99	1,450
24/06/46	3	7.71	6.87	1,530
25/06/46	4	7.74	6.99	1,445
26/06/46	5	7.55	7.14	1,547
27/06/46	6	7.65	7.01	1,443
28/06/46	7	7.68	7.12	1,567

ตารางที่ ค.2 ผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าออกซิเจนละลาย (DO) และค่าความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์(MLSS) ในถังเติมอากาศ ของการทดลองชุดที่ 2

วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	ผลการทดลองชุดที่ 2		
		pH	DO (mg/l)	MLSS (mg/l)
18/07/46	1	7.60	7.02	1,453
19/07/46	2	7.87	7.05	1,467
20/07/46	3	7.80	7.01	1,557
21/07/46	4	7.97	6097	1,460
22/07/46	5	7.60	6.95	1,537
23/07/46	6	7.58	7.04	1,430
24/07/46	7	7.47	7.01	1,450

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.3 ผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าออกซิเจนละลาย (DO) และค่าความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์(MLSS) ในถังเติมอากาศ ของการทดลองชุดที่ 3

วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	ผลการทดลองชุดที่ 3		
		pH	DO (mg/l)	MLSS (mg/l)
02/08/46	1	7.96	6.99	1,510
03/08/46	2	7.87	6.92	1,467
04/08/46	3	7.80	6.97	1,567
05/08/46	4	7.71	7.01	1,460
06/08/46	5	7.51	7.04	1,547
07/08/46	6	7.49	7.09	1,430
08/08/46	7	7.45	7.08	1,487

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง.1 ผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดี (COD) บีโอดี (BOD) และน้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil) ของการทดลองชุดที่ 1

วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	ผลการทดลองชุดที่ 1					
		COD (mg/l)	% removal	BOD (mg/l)	% removal	Soybean Oil (mg/l)	% removal
22/06/46	1	59	91.7	37	92.9	12.5	98.7
23/06/46	2	68	90.4	43	91.6	15.4	98.4
24/06/46	3	73	89.7	48	90.8	24.0	97.5
25/06/46	4	99	86.1	66	87.3	67.1	93.0
26/06/46	5	132	81.5	89	82.8	135	86.0
27/06/46	6	167	76.5	118	77.1	160	83.4
28/06/46	7	193	72.9	133	74.2	198	79.4

ตารางที่ ง.2 ผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดี (COD) บีโอดี (BOD) และน้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil) ของการทดลองชุดที่ 2

วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	ผลการทดลองชุดที่ 2					
		COD (mg/l)	% removal	BOD (mg/l)	% removal	Soybean Oil (mg/l)	% removal
18/07/46	1	34	95.2	17	96.8	16.0	98.3
19/07/46	2	47	93.4	30	94.6	18.4	98.1
20/07/46	3	66	90.7	42	91.9	20.6	97.9
21/07/46	4	90	87.3	60	88.4	20.9	97.8
22/07/46	5	126	82.3	78	84.9	22.1	97.7
23/07/46	6	152	78.6	103	80.1	27.5	97.1
24/07/46	7	168	76.4	113	78.2	38.3	96.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.3 ผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดี (COD) บีโอดี (BOD) และน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) ของการทดลองชุดที่ 3

วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	ผลการทดลองชุดที่ 3					
		COD (mg/l)	% removal	BOD (mg/l)	% removal	Soybean Oil (mg/l)	% removal
02/08/46	1	37	94.8	9	98.2	15.9	98.3
03/08/46	2	41	94.2	18	96.5	16.1	98.3
04/08/46	3	63	91.2	41	92.1	20.9	97.8
05/08/46	4	89	87.5	64	87.7	21.9	97.7
06/08/46	5	123	82.7	87	83.1	23.1	97.6
07/08/46	6	149	79.1	107	79.2	28.8	97.0
08/08/46	7	169	76.3	121	76.6	38.8	96.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว พิชญ์นาฏ สุทธิสมณ์ เกิดเมื่อวันที่ 13 มีนาคม 2520 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2543 จนกระทั่งสำเร็จการศึกษาในภาคเรียนที่ 2 ปีการศึกษา 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย