ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การศึกษาแบคทีเรียหลักในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบตะกอนเร่งจากโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Study of Dominant Bacteria in Activated Sludge from Frozen Seafood Industry using Culture-Based Technique

นามผู้วิจัย นางสาววิจิตรา แก้วหลวง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

(.....อาจารย์พีรกานติ์ บรรเจิดกิจ, D.Tech.Sc.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(.....ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัญญา สิริวิทยาปกรณ์, Ph.D.....)

หัวหน้าภาควิชา .....

(.....รองศาสตราจารย์ชาติ เจียมไชยศรี, D.Eng.....)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(.....รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.....)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....**เดือน**..... **พ.ศ.**.....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาแบคทีเรียหลักในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบตะกอนเร่ง จากโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Study of Dominant Bacteria in Activated Sludge from Frozen Seafood Industry using Culture-Based Technique

โดย

นางสาววิจิตรา แก้วหลวง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจิตรา แก้วหลวง 2555: การศึกษาแบคทีเรียหลักในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบตะกอนเร่งจากโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม) สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ พีรกานติ์ บรรเจิดกิจ, D.Tech.Sc. 114 หน้า

แบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพมีหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสีย ดังนั้นการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่มีบทบาทในการบำบัดน้ำเสียจึงเป็นประโยชน์ในการควบคุมการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพและเสถียรภาพมากยิ่งขึ้น การศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาแบคทีเรียหลักในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็งจำนวน 3 โรงงาน ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะควบคู่กับการวิเคราะห์ทางชีวเคมี เพื่อเป็นการคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลการวิเคราะห์พารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำเสีย ดังนี้ pH BOD COD TKN TP TSS และ Oil and Grease

กลุ่มแบคทีเรียหลักที่ศึกษาคือ *Zoogloea* spp. *Pseudomonas* spp. *Bacillus* spp. *Acinetobacter* spp. และ *Nitrosomonas* spp. เมื่อทำการทดลองเพื่อหาจำนวนของแบคทีเรีย พบว่าในบ่อเติมอากาศของโรงงานที่ 1 และ 2 จำนวนแบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *Zoogloea* sp. เท่ากับ 1.4×10^9 CFU/ml และ 4.2×10^7 CFU/ml ตามลำดับ ขณะที่โรงงานที่ 3 พบ *Pseudomonas* sp. ในบ่อแอน็อกซิกมากที่สุดเท่ากับ 1.0×10^7 CFU/ml ส่วนบ่อแอโรบิกพบ *Nitrosomonas* sp. มากที่สุดเท่ากับ 1.3×10^9 CFU/ml และเมื่อวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำออกจากระบบแล้วมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่พบ

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ (ค่าซีโอดี) โดยการทดลองด้วยถังปฏิกรณ์ในระดับปฏิบัติการแบบเป็นกะ (batch reactor) พบว่า *Zoogloea* sp. เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในบ่อเติมอากาศและมีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีมากที่สุดคือร้อยละ 77.78 ที่ระยะกักเก็บ 2 ชั่วโมง ส่วน *Bacillus* sp., *Nitrosomonas* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. สามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 74.35, 52.14, 25.57 และ 16.75 ตามลำดับ

_____ _____ ___ / ___ / ____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vichittra Kaewluang 2012: Study of Dominant Bacteria in Activated Sludge from Frozen Seafood Industry using Culture-Based Technique. Master of Engineering (Environmental Engineering), Major Field: Environmental Engineering, Department of Environmental Engineering. Thesis Advisor: Miss Peerakarn Banjerdkij, D.Tech.Sc. 114 pages.

The role of bacteria in biological wastewater treatment system is to degradate the organic matter. Therefore, the understanding the type of bacteria is important for the use of control the operation of system to increase efficiency and stable. This study determined the dominant bacteria in activated sludge wastewater treatment from three frozen seafood industries by culturing in selective medium and biochemical analysis, in order to isolate and identify bacteria. In addition, the data of chemical analysis will be used to compare with amount to bacteria as follows pH, BOD, COD, TKN, TP, TSS and Oil and Grease.

The dominant bacterium in this study is *Zoogloea* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp. and *Nitrosomonas* spp. for found amount of bacteria. In the first and second factories of aerobic tank, the most bacteria is *Zoogloea* spp. of 1.4×10^9 CFU/ml and 4.2×10^7 CFU/ml respectively. In the third factory of anoxic tank, the most of bacteria is *Pseudomonas* spp. of 1.0×10^7 CFU/ml and for aerobic tank, the most is *Nitrosomonas* spp. of 1.3×10^9 CFU/ml. In addition, the chemical parameter of effluent was reduced when compare with amount of bacteria.

Study efficiency of dominant bacteria for wastewater treatment (COD) in batch reactor of lab-scale, *Zoogloea* spp. is the most bacteria found in aeration tank and has the highest efficiency to reduce COD at 77.78% at 2 hours within hydraulic retention time. In addition, *Bacillus* sp., *Nitrosomonas* sp., *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. remove COD at 74.35%, 52.14% 25.57% and 16.75% respectively.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ. ภัชราภรณ์ สุวรรณวิทยา ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. เบญจภรณ์ ประภักดี ผู้ทรงคุณวุฒิจากมหาวิทยาลัยมหิดล อ.ดร. พีรกานต์ บรรเจิดกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผศ.ดร. สัญญา สิริวิทยาปกรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาตลอดจนกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554-2555 จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้การสนับสนุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ภายใต้โครงการชื่อการควบคุมและตรวจสอบระบบบำบัดน้ำเสียด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล และภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พร้อมทั้งขอกราบขอบพระคุณสถาบันพัฒนาข้าราชการกรุงเทพมหานคร สำนักปลัดกรุงเทพมหานคร ได้อนุมัติการลาเรียนและให้ทุนประเภท 1(ก) เพื่อสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษาตลอดหลักสูตร งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2553-2555

ทั้งนี้ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง และขอขอบคุณ คุณกาญจนา ทุยเวียง เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ที่ได้ให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อคุณแม่ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจมาโดยตลอดจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

วิจิตรา แก้วหลวง

เมษายน 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	38
อุปกรณ์	38
วิธีการ	41
ผลและวิจารณ์	47
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
สรุป	67
ข้อเสนอแนะ	68
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	69
ภาคผนวก	73
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางเคมีและการเตรียมสารเคมี	74
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี	87
ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมสารและอาหารเลี้ยงเชื้อในทางจุลชีววิทยา	90
ภาคผนวก ง รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียในน้ำเสีย	97
ภาคผนวก จ ข้อมูลค่าซีโอดีในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย	101
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	114

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณการใช้น้ำในกระบวนการผลิตปลาทะเลแช่แข็ง	5
2	ข้อมูลการใช้น้ำ-น้ำแข็ง และภาระบีโอดี-ซีโอดีของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง	6
3	สัดส่วนของไนตริไฟเออร์ต่อวีเอสเอสในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีบีโอดีต่อทีเคเอ็นต่างกัน	13
4	ปริมาณโลหะที่ยับยั้งการเกิดไนตริฟิเคชัน	13
5	สารอนินทรีย์บางชนิดที่ยับยั้งไนตริฟิเคชัน	14
6	ข้อมูลการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งชนิดต่างๆ	20
7	แบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในน้ำเสีย	26
8	แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง	26
9	พารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์น้ำเสีย	42
10	อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะสำหรับคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย	43
11	แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย	46
12	คุณลักษณะน้ำเข้า - น้ำออกโดยเฉลี่ยจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานที่ทำการศึกษา	47
13	ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียโรงงานที่ 1	48
14	ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียโรงงานที่ 2	49
15	ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียโรงงานที่ 3	49
16	จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะแต่ละชนิดครั้งที่ 1	51
17	จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะแต่ละชนิดครั้งที่ 2	51
18	ลักษณะโคโลนีที่มีจำนวนมากที่สุดในบ่อเติมอากาศของโรงงานที่ 1	52
19	ลักษณะโคโลนีที่มีจำนวนมากที่สุดในบ่อเติมอากาศของโรงงานที่ 2	53
20	ลักษณะโคโลนีที่มีจำนวนมากที่สุดในบ่อแอน็อกซิกของโรงงานที่ 3	54

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
21	ลักษณะโคโลนีที่มีจำนวนมากที่สุดในบ่อแอโรบิกของโรงงานที่ 3	55
22	ผลการติดสีแกรม รูปร่าง การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส และออกซิเดสของแบคทีเรียในน้ำเสีย	57
23	การจัดจำแนกแบคทีเรียของ Bergey's manual of determinative bacteriology	58
24	ผลการทดสอบ motility test ของแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร Medium of AOB	59
25	แบคทีเรียที่มีจำนวนมากที่สุดในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ	60
26	ค่า OD_{600} ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงของแบคทีเรียแต่ละชนิด	62

ตารางผนวกที่

ข1	ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีของโรงงานที่ 1	88
ข2	ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีของโรงงานที่ 2	88
ข3	ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีของโรงงานที่ 3	89
จ1	ค่าซีโอดีในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง	102
จ2	ค่าซีโอดีในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	106
จ3	ค่าซีโอดีในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียที่ระยะเวลา 5 ชั่วโมง	110

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง	8
2	แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจนแบบถังตกตะกอน 1 ถัง	15
3	แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจนที่มีถังตกตะกอนมากกว่า 1 ถัง	16
4	แผนผังบาเดนโฟ	17
5	แผนผังระบบเมนสตรีมในการบำบัดสารฟอสฟอรัส	18
6	แผนผังระบบบาเดนโฟในการบำบัดสารฟอสฟอรัส	19
7	แผนผังระบบยูซีทีในการบำบัดสารฟอสฟอรัส	20
8	ขั้นตอนการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์	22
9	กราฟการเจริญของแบคทีเรีย (Growth Curve)	28
10	การแยกเชื้อด้วยวิธีการ pour plate	30
11	วิธีการ cross streak plate	31
12	การนำเชื้อออกมาเพาะเลี้ยง	37
13	แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำเสียโรงงานที่ 1 และ 2	41
14	แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำเสียโรงงานที่ 3	41
15	แสดงผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสและออกซิเดส	59
16	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการลดค่าซีโอดีกับเวลา	63

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
ก1	กราฟมาตรฐานฟอสเฟตในงานวิจัย	83
ง1	รูปร่างและการติดสีแกรมของ *Pseudomonas* sp. จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	98
ง2	รูปร่างและการติดสีแกรมของ *Zoogloea* sp. จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	98
ง3	รูปร่างและการติดสีแกรมของ *Bacillus* sp. จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	99
ง4	รูปร่างและการติดสีแกรมของ *Acinetobacter* sp. จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	99
ง5	รูปร่างและการติดสีแกรมของ *Nitrosomonas* sp. จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	100

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

กก.	=	กิโลกรัม
ม.^{3}	=	ลูกบาศก์เมตร
มก./ล.	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
มล.	=	มิลลิลิตร
AOB	=	Ammonia Oxidizing Bacteria คือแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดส์แอมโมเนียได้
BOD	=	Biochemical Oxygen Demand คือปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายอินทรีย์สารทางชีวภาพ
CFU/ml	=	Colony Forming Unit per milliliter คือ หน่วยนับจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร
COD	=	Chemical Oxygen Demand คือปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ใช้ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ทั้งในรูปที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำด้วยวิธีทางเคมี
HRT	=	Hydraulic Retention Time คือระยะกักเก็บน้ำ
mg/L	=	milligram per liter คือมิลลิกรัมต่อลิตร
OD_{600}	=	ptical density คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร
pH	=	Power of Hydrogen ion คือค่าแสดงความเป็นกรด-ด่าง
TKN	=	Total Kjeldahl Nitrogen คือปริมาณไนโตรเจนที่เป็นผลรวมแอมโมเนียไนโตรเจน และไนโตรเจนอินทรีย์
TP	=	Total Phosphorus คือปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด
TSS	=	Total Suspended Solid คือปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาแบคทีเรียหลักในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบตะกอนเร่งจากโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Study of Dominant Bacteria in Activated Sludge from Frozen Seafood Industry using Culture-Based Technique

คำนำ

อุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งเป็นอุตสาหกรรมอาหารที่มีความสำคัญที่สุดประเภทหนึ่งของประเทศไทย สามารถส่งออกและสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก และยังเป็นอุตสาหกรรมที่ก่อให้เกิดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตในปริมาณมากเช่นกัน น้ำเสียส่วนใหญ่ของอุตสาหกรรมประเภทนี้เป็นน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์สูง ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของเศษเนื้อ เลือด และไขมันของสัตว์ทะเลที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต มีผลทำให้ค่าบีโอดี ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และค่าน้ำมันและไขมันสูง ดังนั้นอุตสาหกรรมดังกล่าวจึงจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ เพื่อให้ได้คุณภาพน้ำทิ้งตามมาตรฐานที่กฎหมายกำหนดไว้ กระบวนการบำบัดน้ำเสียส่วนใหญ่ของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งจึงเป็นกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ โดยการใช้จุลินทรีย์เป็นตัวย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียให้มีปริมาณน้อยลงหรือตามที่กฎหมายกำหนดไว้ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพ ซึ่งหากทำการศึกษาและทำความเข้าใจถึงชนิดและสมบัติของแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสีย ทำให้สามารถควบคุมประสิทธิภาพการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียให้ดียิ่งขึ้นได้

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบคทีเรียหลักในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบตะกอนเร่งจากโรงงานอาหารทะเลแช่แข็งในเขตจังหวัดสมุทรสาคร โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ และการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียหลักแบบเฉพาะเจาะจงด้วยถังปฏิกรณ์ในระดับปฏิบัติการแบบเป็นกะ (Batch Reactor) ซึ่งเป็นการศึกษาและการทำความเข้าใจถึงชนิดและประสิทธิภาพของแบคทีเรียหลักในการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมประสิทธิภาพและเสถียรภาพของระบบบำบัดน้ำเสียให้ดียิ่งขึ้น ตั้งแต่การเริ่มเดินระบบ (Start up) ไปจนถึงการดำเนินระบบ (Operation) อีกทั้งยังสามารถนำความรู้เกี่ยวกับชนิดของแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการบำบัดน้ำเสียมาเพาะขยายและประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียอื่นๆได้จริง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาจำนวนและชนิดของแบคทีเรียหลักในระดับสกุล (Genus) จากน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตอาหารทะเลแช่แข็งในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็งด้วยแบคทีเรียหลักแบบเฉพาะเจาะจง

ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาแบคทีเรียหลักในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบตะกอนเร่งของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็งในเขตจังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 3 โรงงาน ซึ่งประกอบด้วยน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งทั่วไป จำนวน 2 โรงงาน และน้ำเสียจากระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารไนโตรเจน จำนวน 1 โรงงาน ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ โดยกลุ่มแบคทีเรียหลักที่ศึกษาคือ *Pseudomonas* spp., *Zoogloea* spp., *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp. และ *Nitrosomonas* spp. ซึ่งใช้อาหารจำเพาะ *Pseudomonas* CFC Agar, *Zoogloea* Medium, *Bacillus* Medium, Trypticase Soy Agar และ Medium for Ammonia Oxidizing Bacteria ในการคัดแยกและหาจำนวนของแบคทีเรียตามลำดับ จากนั้นทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับสกุล (Genus) ด้วยวิธีทางชีวเคมีเบื้องต้นคือ การย้อมสีแกรม การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส และการทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ของ *Nitrosomonas* spp. เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมนอกเหนือจากการย้อมสีแกรม

2. ศึกษาคุณภาพน้ำเข้าและน้ำออกจากระบบบำบัดน้ำเสียด้วยการวิเคราะห์พารามิเตอร์ทางเคมีดังนี้ คือ พีเอช (Power of Hydrogen ion: pH) บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand: BOD) ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand: COD) ทีเคเอ็น (Total Kjeldahl Nitrogen: TKN) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total Phosphorus: TP) ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solid: TSS) และค่าน้ำมันและไขมัน (Oil and Grease) เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาบทบาทและชนิดของแบคทีเรียที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเข้าและน้ำออกจากระบบบำบัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียของแบคทีเรียหลักแบบเฉพาะเจาะจง โดยการทดลองด้วยถังปฏิกรณ์ในระดับปฏิบัติการแบบเป็นกะ (Batch Reactor) ซึ่งใช้น้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็งโรงงานที่ 1 เป็นตัวแทนของน้ำเสียในการทดลอง และใช้ค่าซีโอดีเป็นพารามิเตอร์ในการบอกถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียหลักแต่ละชนิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ปริมาณและลักษณะน้ำเสียจากการผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง

ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่แข็งใช้อาหารจำพวกอาหารทะเลสด เช่น ปู กุ้ง ปลา และปลาหมึก เป็นวัตถุดิบ น้ำสะอาดหรือน้ำประปาเป็นวัตถุดิบอีกประเภทหนึ่งที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแช่แข็งในปริมาณมากเช่นกัน โดยมีวัตถุประสงค์ในการใช้ล้างทำความสะอาดวัตถุดิบ การล้างภาชนะและเครื่องจักรอุปกรณ์ การล้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการผลิต การทำความสะอาดบริเวณพื้นที่ทำงาน และช่วยในการชำระล้างเศษซากต่างๆ นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำแข็งและน้ำเย็น เพื่อคงความสดและควบคุมการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิต ทั้งนี้หากพิจารณาถึงการใช้น้ำรวมทั้งน้ำแข็งในแต่ละขั้นตอนการผลิต พบว่าการผลิตอาหารทะเลแช่แข็งนั้นมีการใช้น้ำในทุกขั้นตอน และยังมีปริมาณน้ำใช้ที่แตกต่างกันด้วย ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณการใช้น้ำในกระบวนการผลิตปลาทะเลแช่แข็ง

ขั้นตอนการผลิต	ปริมาณน้ำใช้ (ลูกบาศก์เมตรต่อตันวัตถุดิบ)
การละลายน้ำแข็ง	5
การทำความสะอาดวัตถุดิบ	1
การขอดเกล็ด	10-15
การตัดหัวปลา	1
การตัดแต่งขั้นต้น	1-3
การลอกหนังปลา	0.2-0.6
การตัดแต่งขั้นสุดท้าย	0.1
การแช่เยือกแข็งและจัดเก็บ	0.2

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2548)

นอกจากนี้ยังมีข้อมูลในการใช้น้ำและน้ำแข็งในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง พร้อมทั้งข้อมูลภาระบีโอดีและซีโอดีของสถานประกอบการในกลุ่มอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งจำนวน 20 แห่ง (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551) ดังตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ข้อมูลการใช้น้ำ-น้ำแข็ง และภาระบีโอดี-ซีโอดีของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง

สถานประกอบการ	ผลิตภัณฑ์หลัก	กำลังผลิต (ตันต่อวัน)	การใช้น้ำ (ม.^{3}ต่อตัน)	การใช้น้ำแข็ง (ม.^{3}ต่อตัน)	ภาระบีโอดี (กก.ต่อตัน)	ภาระซีโอดี (กก.ต่อตัน)
1	กุ้ง	28.85	49.01	2.17	48.49	56.89
2	กุ้ง	17.43	51.06	2.35	51.34	94.03
3	กุ้ง	9.79	48.62	0.86	60.92	114.88
4	กุ้ง	6.14	28.51	3.34	47.46	63.34
5	กุ้ง	6.36	45.11	3.56	172.23	246.04
6	กุ้ง	5.31	25.58	3.89	3.9	10.04
7	ปลา	14.14	25.78	0.64	47.51	82.55
8	ปลาทูน่า	3.61	16.49	1.92	2.69	11.04
9	ปลาทูน่า	4.26	28.28	0.00	4.71	21.50
10	ปลา	6.56	29.27	3.33	105.73	134.92
11	ปลา	34.79	22.18	0.55	19.13	26.96
12	ปลาหมึก	11.62	31.27	1.34	23.46	39.10
13	ปลาหมึก	1.67	30.75	3.04	58.01	82.88
14	ปลาหมึก	26.79	40.09	2.45	78.25	97.81
15	ปลาหมึก	59.69	25.45	0.95	70.67	86.70
16	ปลาหมึก	1.43	27.68	2.16	92.11	129.95
17	ซูริมิ	42.93	26.18	2.00	107.23	172.13
18	ซูริมิ	22.14	35.01	1.28	115.19	175.31
19	ซูริมิ	4.59	35.50	2.07	69.05	144.97
20	ซูริมิ	13.39	49.59	3.33	216.97	280.56

ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม (2551)

น้ำเสียจากกระบวนการผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง เกิดจากการล้างวัตถุดิบเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งน้ำเสียดังกล่าวมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์สูง เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเศษเนื้อ เลือด และไขมันของสัตว์ทะเลที่ใช้เป็นวัตถุดิบ มีผลทำให้ค่าบีโอดี ค่าของแข็งแขวนลอย และค่าไขมันและ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำมันสูง โดยน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตจะถูกส่งไปบำบัดยังระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งส่วนใหญ่ใช้ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเนื่องจากน้ำเสียดังกล่าวมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์สูง ทั้งนี้ทางโรงงานอาจเลือกใช้ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic) หรือระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic) ในการบำบัดน้ำเสีย หรือใช้ทั้ง 2 ระบบร่วมกัน

ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน

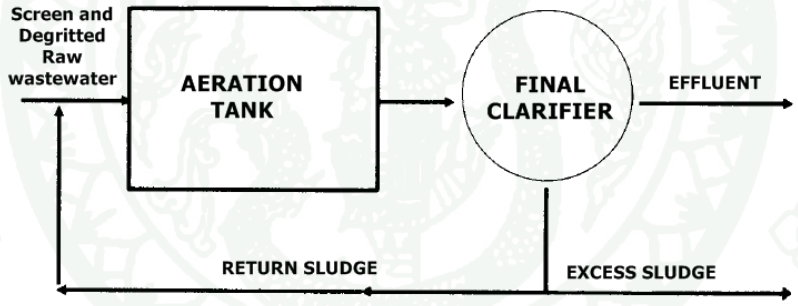
การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological Wastewater Treatment) เป็นการบำบัดน้ำเสียโดยการกำจัดสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของสารละลายและสารแขวนลอยที่ไม่สามารถตกตะกอนได้ด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก โดยอาศัยจุลินทรีย์ในการกำจัดและย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสีย ทำให้ค่าความสกปรกหรือค่าบีโอดีลดลง จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกว่าร้อยละ 95 รองลงมาคือ รา สาหร่าย และโพรโทซัว (ทวี, 2538; สุบัณฑิต, 2548) โดยระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพสามารถแยกออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน และระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจน ในที่นี้จะกล่าวถึงระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน

ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน มีอยู่หลายรูปแบบด้วยกัน เช่น ระบบบำบัดแบบตะกอนเร่ง (Activated sludge, AS) ระบบบำบัดแบบแผ่นจานหมุนชีวภาพ (Rotating biological contactor, RBC) ระบบบำบัดแบบคลองวนเวียน (Oxidation ditch, OD) และระบบบำบัดแบบถังปฏิกรณ์สลับเป็นกะ (Sequencing batch reactor, SBR) (สุเทพ, 2552) โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งถือเป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่มีความนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ในประเทศที่พัฒนาแล้วได้มีการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งให้มีความสามารถในการบำบัดธาตุอาหารได้มากขึ้นนอกเหนือจากการบำบัดสารอินทรีย์คาร์บอนเพียงอย่างเดียว ซึ่งระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งสามารถนำมาประยุกต์เพื่อกำจัดไนโตรเจน และฟอสฟอรัสได้ ในที่นี้จะกล่าวถึงระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งทั่วไป ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารไนโตรเจน และระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารฟอสฟอรัส ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง เป็นระบบที่สามารถบำบัดได้ทั้งน้ำเสียชุมชนและน้ำเสียอุตสาหกรรมโดยอาศัยการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic bacteria) เป็นหลัก ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งประกอบด้วยถังเติมอากาศ (Aeration Tank) และถังตกตะกอน (Sedimentation Tank) (ภาพที่ 1) ขั้นตอนแรกคือการเติมน้ำเสียเข้าถังเติมอากาศที่มีตะกอนจุลินทรีย์หรือเรียกว่า “สลัดจ์” (Sludge) อยู่เป็นจำนวนมาก จุลินทรีย์เหล่านี้จะทำการย่อยสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสียให้อยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ แอมโมเนีย (NH_4) และเกิดเซลล์ใหม่ของจุลินทรีย์ (Bitton, 2005) หลังจากผ่านถังเติมอากาศแล้วน้ำเสียจะไหลเข้าสู่ถังตกตะกอนเพื่อเป็นการแยกสลัดจ์ออกจากน้ำเสียโดยการตกตะกอนของสลัดจ์สู่ก้นถัง ตะกอนบางส่วนจะถูกสูบกลับเข้าไปในถังเติมอากาศเพื่อรักษาความเข้มข้นของสลัดจ์ให้ได้ตามที่กำหนด และอีกส่วนจะเป็นสลัดจ์ส่วนเกิน (Excess sludge) ที่ต้องนำไปกำจัดต่อไป ค่าการออกแบบระบบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการกำจัดบีโอดีได้ถึงร้อยละ 85-95 (Tchobanoglous *et al.*, 2004)



ภาพที่ 1 แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

ที่มา: Bitton (2005)

วัตถุประสงค์ของการบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งคือ เพื่อให้สามารถลดสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสียให้มากที่สุดในระยะเวลาอันสั้นโดยวิธีทางชีววิทยา ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมระบบให้มีประสิทธิภาพคือ (สุรพล, 2538)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ก. ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย

เนื่องจากสารอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นอาหารของจุลินทรีย์ในระบบตะกอนเร่ง ดังนั้น หากมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอินทรีย์มากจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และมีผลทำให้อัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์สูงคือ มีอาหารมากทำให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและกระจายอยู่ทั่วไปแทนที่จะรวมตัวกันเป็นก้อน (Floc) ทำให้เกิดการตกตะกอนได้ไม่ดี ในขณะเดียวกันถ้าอัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์ต่ำ คือมีอาหารน้อยจำนวนจุลินทรีย์น้อยลง เกิดตะกอนจุลินทรีย์และตกตะกอนได้เร็ว แต่ก็ไม่สามารถจับตะกอนเล็กๆตกลงมาได้หมดทำให้น้ำที่ออกจากถังตกตะกอนขุ่น

ข. อาหารเสริม

จุลินทรีย์ในระบบต้องการอาหารเสริม (Nutrient) ซึ่งได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และเหล็ก นอกเหนือจากสารอินทรีย์ต่างๆ ปกติแร่ธาตุเหล่านี้มีอยู่ครบในน้ำเสียชุมชนแต่อาจมีไม่พอในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งการขาดอาหารเสริมเหล่านี้จะทำให้จุลินทรีย์ที่สร้างกลุ่มตะกอนเติบโตได้ไม่ดี จุลินทรีย์ชนิดเส้นใยเจริญได้มากกว่า ตะกอนเกิดการตกตะกอนได้ยาก และทำให้เกิดตะกอนอืด ปกติจะควบคุม ค่า BOD: N: P: Fe เท่ากับ 100: 5: 1: 0.5

ค. ออกซิเจนละลายน้ำ

ในถังเติมอากาศจะต้องมีออกซิเจนละลายน้ำไม่น้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเป็นการรักษาความเข้มข้นของออกซิเจนในน้ำ ซึ่งค่าออกซิเจนละลายน้ำขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ กล่าวคือ ถ้าอุณหภูมิสูงออกซิเจนจะมีค่าการละลายน้ำอิ่มตัวต่ำทำให้ต้องมีการเติมออกซิเจนมาก และทำให้เกิดการสิ้นเปลือง ในขณะเดียวกันถ้าอุณหภูมิต่ำออกซิเจนจะมีค่าการละลายน้ำอิ่มตัวสูง จึงทำให้การเติมออกซิเจนน้อยกว่าอุณหภูมิสูง

ง. ระยะเวลาในการบำบัด

ระยะเวลาในการบำบัดในบ่อเติมอากาศต้องมีมากเพียงพอที่จุลินทรีย์จะใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ หากใช้ระยะเวลาสั้นเกินไปสารที่ถูกย่อยสลายได้ยากจะไม่ถูกย่อยจนถึงขั้นสุดท้าย ทำให้ค่าบีโอดีเหลืออยู่ในน้ำเสียมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จ. ค่าพีเอช

แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีที่ค่าพีเอช 6.5-8.5 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 6.5 ราจะเติบโตได้ดีกว่าแบคทีเรีย ทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดต่ำลงและตะกอนเกิดการตกตะกอนได้ไม่ดี ส่วนค่าพีเอชสูงทำให้ฟอสฟอรัสแยกตัวออกจากน้ำ (Precipitate) จุลินทรีย์ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ในขณะเดียวกันถ้าพีเอชสูงหรือต่ำเกินไปจุลินทรีย์ไม่สามารถดำรงชีวิตได้

ฉ. สารเป็นพิษ

สารเป็นพิษแบ่งออกเป็น 2 จำพวกคือ แบบพิษเฉียบพลัน (Acute Toxicity) ซึ่งจุลินทรีย์จะตายหมดภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วโมงสารจำพวกนี้ได้แก่ ไซยาไนด์ อาร์เซนิค เป็นต้น และแบบพิษออกฤทธิ์ช้า (Chronic Toxicity) ซึ่งใช้เวลานานและค่อยๆตายสารจำพวกนี้ได้แก่ ทองแดง และโลหะหนักต่างๆ เป็นต้น

ช. อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทุกๆ 10 องศาเซลเซียส จะทำให้จุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเท่าตัวจนถึงอุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นอุณหภูมิจะสูงเกินไปทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตน้อยลงอย่างรวดเร็ว แต่การควบคุมอุณหภูมิทำได้ยาก ดังนั้นจึงทำการควบคุมความเข้มข้นของตะกอนเร่งในบ่อเติมอากาศหรือ MLSS ให้มีค่าน้อยลงเมื่ออุณหภูมิสูงและเพิ่มให้มากขึ้นเมื่ออุณหภูมิต่ำ

ซ. การกวน

ภายในบ่อเติมอากาศต้องมีการกวนผสมอย่างทั่วถึงเพื่อป้องกันไม่ให้ตะกอนจุลินทรีย์ตกตะกอน และให้จุลินทรีย์สัมผัสกับน้ำเสียเพื่อจะได้ใช้อาหารและลดสารอินทรีย์ในน้ำเสียรวมทั้งจะได้จับตัวเป็นกลุ่มตะกอน (Floc) ที่ดี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฌ. อัตราการไหลของน้ำ

การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของน้ำมีผลโดยตรงต่อการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพและในบ่อตกตะกอน กล่าวคือหากอัตราการไหลของน้ำเสียสูง ระยะเวลาในการบำบัดก็จะน้อยลง ค่าสารอินทรีย์เพิ่มขึ้น และระยะเวลาตกตะกอนก็ลดลงด้วย ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดลง ดังนั้นจึงควรมีอัตราการไหลของน้ำอย่างสม่ำเสมอให้ใกล้เคียงกับที่ออกแบบเอาไว้ เป็นต้น

2. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจน

น้ำเสียบางประเภทมีปริมาณของไนโตรเจนสูง เช่น น้ำเสียจากแหล่งเกษตรกรรม โดยไนโตรเจนที่พบในน้ำเสียมี 4 รูปแบบคือ ก๊าซแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์ และสารอินทรีย์ไนโตรเจน ดังนั้นในการกำจัดไนโตรเจนในรูปแบบต่างๆ จำเป็นต้องใช้ปฏิกิริยาหลายชนิดร่วมกันเพื่อให้ได้ปริมาณไนโตรเจนตามมาตรฐานน้ำทิ้งที่ได้กำหนดไว้ และเพื่อป้องกันกระบวนการยูโทรฟิเคชันในแหล่งน้ำด้วย ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดสารไนโตรเจนให้มีประสิทธิภาพต้องอาศัย 2 กระบวนการประกอบกันคือ ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน (สุบัณฑิต, 2548)

ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (Nitrification) คือ กระบวนการย่อยสลายแอมโมเนียมไอออนหรือก๊าซแอมโมเนีย ภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจนกลายเป็นไนเตรท ดังสมการ (1) และ (2) (Gerardi, 2006)

ขั้นตอนที่ 1 *Nitrosomonas* ออกซิไดส์แอมโมเนียมไอออนไปเป็นไนไตรท์

$$NH_4^+ + 1.5\ O_2 \xrightarrow{\textit{Nitrosomonas \& Nitrosospira}} NO_2^- + 2H^+ + \text{energy} \ldots\ldots\ldots (1)$$

ขั้นตอนที่ 2 *Nitrobacter* ออกซิไดส์ไนไตรท์ไปเป็นไนเตรท

$$NO_2^- + 0.5\ O_2 \xrightarrow{\textit{Nitrobacter \& Nitrospira}} NO_3^- + \text{energy} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันคือ พีเอช อุณหภูมิ ความเข้มเข้นของแอมโมเนียและไนไตรท์ ความเข้มข้นของออกซิเจน อัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็น (BOD_5/TKN ratio) ความเค็ม และสารพิษ (ธงชัย, 2545; Bitton, 2005)

ก. พีเอช แบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิง มีความไวต่อค่าพีเอชมากและทำงานได้ดีในพีเอชค่อนไปทางด่างหรือประมาณ 7.5-9.0 (ธงชัย, 2545)

ข. อุณหภูมิมีผลต่อ *Nitrobacter* มากกว่า *Nitrosomonas* อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันคือช่วง 25-30 องศาเซลเซียส (ธงชัย, 2545; Bitton, 2005)

ค. ความเข้มข้นของแอมโมเนียและไนไตรท์ในถังเติมอากาศนั้น มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Nitrosomonas* และ *Nitrobacter* ซึ่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มนี้เป็นไปตามสมการของโมนอด คือ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแอมโมเนีย และไนไตรท์ ตามลำดับ

ง. ความเข้มข้นของออกซิเจนหรือค่าออกซิเจนละลายน้ำมีผลต่อแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิง ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความไวต่อออกซิเจนความเข้มข้นต่ำ ทั้งนี้ถ้าค่าออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับหรือมากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธงชัย, 2545; Tchobanoglous *et al.*, 2004) ไม่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน แต่ควรให้มีค่าออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. อัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็นมีผลต่อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย กล่าวคือเมื่อ อัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็นเพิ่มขึ้นไนตริไฟอิงแบคทีเรียจะลดลง ดังนั้นอัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็นที่เหมาะต่อกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันคือ ไม่เกิน 3 (Tchobanoglous *et al.*, 2004; Bitton, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถแสดงอัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็นที่มีผลต่อสัดส่วนของไนตริไฟเออร์ต่อวีเอสเอสในระบบบำบัดน้ำเสีย แสดงดังตารางที่ 3

ฉ. ความเค็ม มีผลทางลบต่อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย แต่ก็ยังสามารถปรับตัวเข้ากับความเค็มได้ดีพอควร ได้มีการทดลองกับระบบแอน็อกซิก-แอโรบิก พบว่าไนตริไฟอิงแบคทีเรียปรับตัวเข้ากับความเค็มได้ดีกว่าเฮเทอโรโทปแบคทีเรียที่กำจัดบีโอดี

ช. สารพิษ มีสารหลากหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งได้ แสดงดังตารางที่ 4 และ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 สัดส่วนไนตริไฟเออร์ต่อวีเอสเอสในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีบีโอดีต่อทีเคเอ็นต่างกัน

บีโอดีต่อทีเคเอ็น	ไนตริไฟเออร์ต่อวีเอสเอส	บีโอดีต่อทีเคเอ็น	ไนตริไฟเออร์ต่อวีเอสเอส
0.5	0.35	5	0.054
1	0.21	6	0.043
2	0.12	7	0.037
3	0.083	8	0.033
4	0.064	9	0.029

ที่มา: ธงชัย (2545)

ตารางที่ 4 ปริมาณโลหะที่ยับยั้งการเกิดไนตริฟิเคชัน

โลหะ	ความเข้มข้น (มก./ล.)	ผลกระทบ
โคบอลต์	0.08-0.5	ยับยั้ง *Nitrosomonas* (เชื้อบริสุทธิ์)
โคเมียม$^{+3}$	> 0.25	ยับยั้งการโตของ *Nitrosomonas* (เชื้อบริสุทธิ์)
	118	ยับยั้งร้อยละ 75 ของสลัดจ์ไวงาน
ทองแดง	0.05-0.56	ยับยั้งกิจกรรมของ *Nitrosomonas* (เชื้อบริสุทธิ์)
นิกเกิล	> 0.25	ยับยั้งกิจกรรมของ *Nitrosomonas* (เชื้อบริสุทธิ์)
สังกะสี	0.08-0.5	ยับยั้ง *Nitrosomonas* (เชื้อบริสุทธิ์)

ที่มา: ธงชัย (2545)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 สารอนินทรีย์บางชนิดที่ยับยั้งไนตริฟิเคชัน

สารอนินทรีย์	ความเข้มข้น (มก./ล.)	สารอนินทรีย์	ความเข้มข้น (มก./ล.)
แคดเมียม	14.3	ตะกั่ว	0.5
โครเมียม III	10	ทองแดง	230
ซัลไฟต์	5.0	นิกเกิล	5.0
โซเดียมคลอไรด์	35,000	โพแทสเซียมไดโครเมต	6.0
โซเดียมไซยาเนต	100	โพแทสเซียมไธโอไซยาเนต	300
โซเดียมไซยาไนด์	1	สังกะสี	11.0
โซเดียมอาร์ซีไนต์	2,000	แอมโมเนียม	1,000
ไซยาไนด์	16.5	ไฮโดรเจนซัลไฟด์	50

ที่มา: ธงชัย (2545)

ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) คือ ปฏิกิริยาที่เปลี่ยนไนเตรทให้เป็นก๊าซไนโตรเจน โดยปฏิกิริยาดังกล่าวประกอบด้วย 5 โมเลกุลไนโตรเจน และ 4 ขั้นตอนทางชีวเคมี ซึ่งโมเลกุลทั้ง 5 โมเลกุลประกอบด้วย ไนเตรท (NO^-_3) ไนไตรท์ (NO^-_2) ไนตริกออกไซด์ (NO) ไนตรัสออกไซด์ (N_2O) และก๊าซไนโตรเจน (N_2) ดังสมการ (3)

$$NO^-_3 \longrightarrow NO^-_2 \longrightarrow NO \longrightarrow N_2O \longrightarrow N_2 \quad \text{.....(3)}$$

ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันมี 2 ขั้นตอนที่ต้องการพลังงานมาช่วยในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งพลังงานที่ต้องการนั้นคือ สารอินทรีย์หรือสับสเตรท (substrate) นั้นเอง ปฏิกิริยาที่ว่าคือการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และการเปลี่ยนไนไตรท์เป็นก๊าซไนโตรเจน โดยมีไนตริกอ ออกไซด์ และไนตรัสออกไซด์ เป็นสารประกอบตัวกลาง (Intermediate compound) ดังสมการ (4) (5) และ (6)

$$6\,NO^-_3 + 2CH_3OH \xrightarrow{\text{denitrifying bacteria}} 6\,NO^-_2 + 2CO_2 + 4H_2O \text{.....(4)}$$

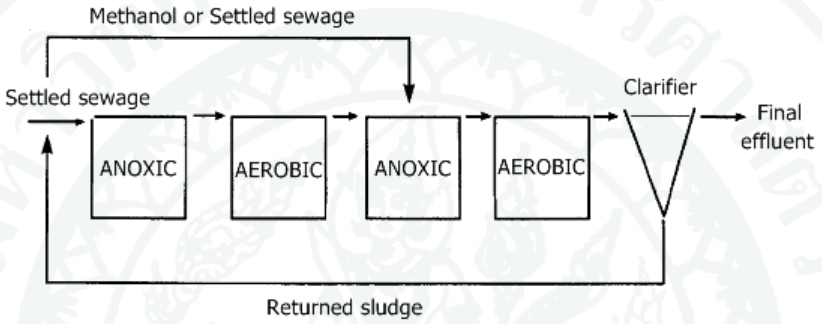
$$6\,NO^-_2 + 3CH_3OH \xrightarrow{\text{denitrifying bacteria}} 3N_2 + 3CO_2 + 6OH^- \text{..... (5)}$$

$$6\,NO^-_3 + 5CH_3OH \xrightarrow{\text{denitrifying bacteria}} 3N_2 + 5CO_2 + 7H_2O + 6OH^- \text{ ...(6)}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่สามารถกำจัดไนโตรเจนได้อย่างสมบูรณ์ โดยปฏิกิริยาจะเกิดได้นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวให้อิเล็กตรอน (สับสเตรท) และจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแอนอ็อกซิก ระบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจน ประกอบด้วย 3 ระบบ คือ

2.1 ระบบบำบัดแบบที่มีถังตกตะกอน 1 ถัง (Single Sludge System) คือ ระบบที่มีถังตกตะกอน 1 ถัง ซึ่งประกอบด้วยถังย่อยสลายแบบที่ไม่ใช้ออกซิเจนสลับกับถังที่ใช้ออกซิเจนหรือถังเติมอากาศ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจนแบบถังตกตะกอน 1 ถัง

ที่มา: Bitton (2005)

ถังย่อยสลายแบบดีไนตริฟิเคชัน (Anoxic tank) คือ ถังย่อยสลายที่ไม่ใช้ออกซิเจนเป็นถังที่มีการย่อยสลายสารปนเปื้อนในน้ำเสีย ดังสมการ (7)

$$BOD + NO^-_3 \longrightarrow N_2 + CO_2 + H_2O + NH^+_4 \quad \text{.....(7)}$$

จากสมการในถังย่อยสลายเกิดการบำบัดสารปนเปื้อนในรูปบีโอดีและสารไนโตรเจนในรูปของไนเตรท ในขณะเดียวกันเกิดการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ให้เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมไอออนซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปในถังเติมอากาศ (Aerobic tank) โดยถังเติมอากาศเป็นถังที่มีการย่อยสลายสารปนเปื้อนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ดังสมการ (8) และ (9)

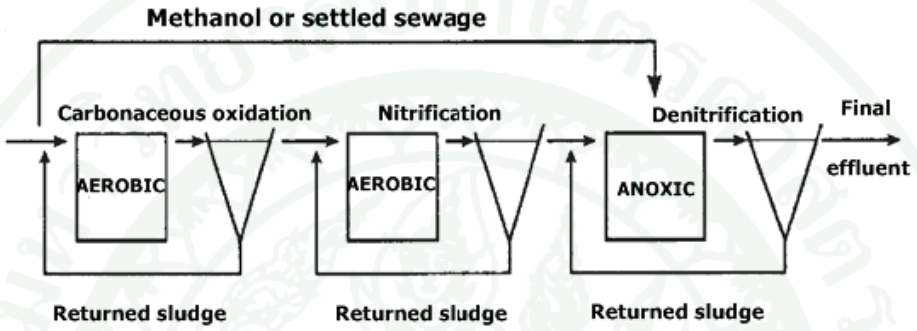
$$BOD + O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O \quad \text{.....(8)}$$

$$NH^+_4 + O_2 \longrightarrow NO^-_3 + H_2O \quad \text{.....(9)}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้นถังเติมอากาศจึงเป็นถังที่ย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ในรูปบีโอดีที่เหลือจากถังย่อยสลายแบบดีไนตริฟิเคชันให้หมดไปและทำการย่อยสลายแอมโมเนียมไอออนด้วยปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันให้เปลี่ยนเป็นไนเตรท

2.2 ระบบที่มีถังตกตะกอนมากกว่า 1 ถัง (Multi-sludge System) คือ ระบบที่ประกอบด้วยชุดถังย่อยสลายและถังตกตะกอนจำนวน 3 ชุดต่อเนื่องกัน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจนแบบที่มีถังตกตะกอนมากกว่า 1 ถัง

ที่มา: Bitton (2005)

ถังย่อยสลายชุดที่ 1 คือ ถังเติมอากาศ (Aerobic tank) เป็นถังที่มีการย่อยสลายสารประกอบคาร์บอนในรูปบีโอดีจึงเรียกชุดนี้ว่า Carbonaceous oxidation ดังสมการ (10)

$$BOD + O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O \text{.....(10)}$$

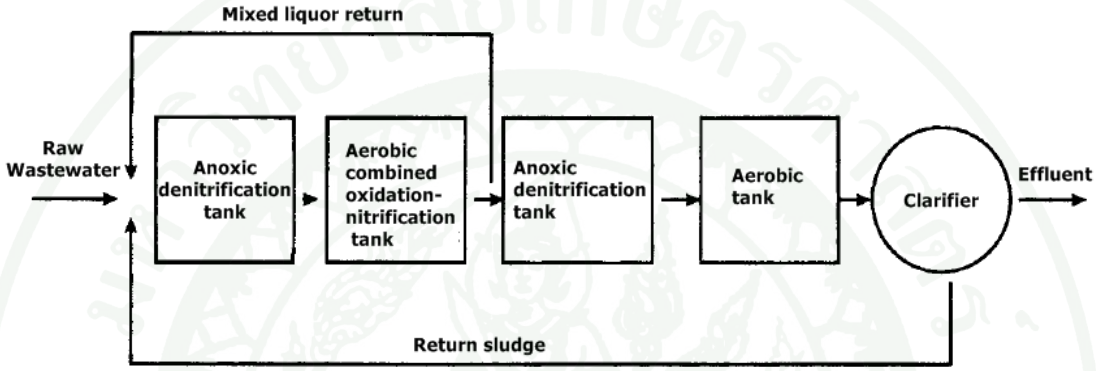
ถังย่อยสลายชุดที่ 2 คือ ถังเติมอากาศที่มีการขยายเวลาในการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไอออนจึงเรียกชุดนี้ว่า Nitrogeneous oxidation ดังสมการ (11)

$$NH_4^+ + O_2 \longrightarrow NO_3^- + H_2O \text{.....(11)}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ถังย่อยสลายชุดที่ 3 คือ ถังย่อยสลายแบบดีไนตริฟิเคชันเป็นถังที่มีการย่อยสลายสารไนโตรเจนด้วยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน โดยมีการเติมสารตั้งต้นเพิ่มเติม (เมทานอลหรือน้ำเสีย) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันอย่างสมบูรณ์

2.3 ระบบบาเดนโฟ (Bardenpho system) คือ ระบบบำบัดที่มีถังย่อยสลายจำนวน 4 ถังและถังตกตะกอน 1 ถัง (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แผนผังบาเดนโฟ

ที่มา: Bitton (2005)

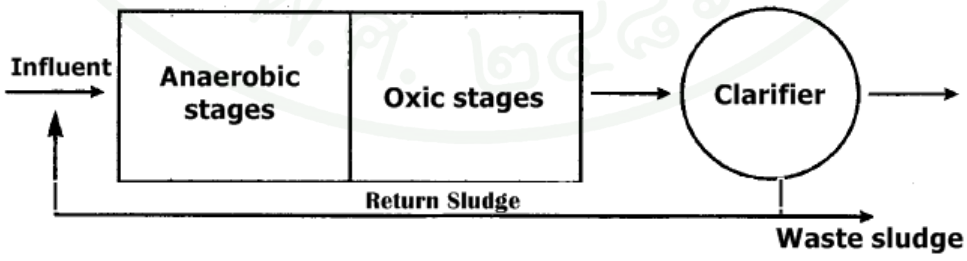
ถังย่อยสลายชุดที่ 1 คือ ถังย่อยสลายแบบดีไนตริฟิเคชัน (Anoxic tank) เป็นถังที่มีการบำบัดสารสกปรกในรูปบีโอดีและสารไนโตรเจนในรูปไนเตรท ในขณะเดียวกันเกิดการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ให้เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมไอออน ดังสมการ (7) ซึ่งจะถูกย่อยในถังย่อยสลายชุดที่ 2 โดยถังย่อยสลายชุดที่ 2 คือถังเติมอากาศที่มีการเติมอากาศนานกว่าถังเติมอากาศของระบบตะกอนเร่งทั่วไป เกิดการย่อยสลายสารปนเปื้อนทั้งสารประกอบคาร์บอนในรูปบีโอดีที่เหลือจากถังย่อยสลายชุดที่ 1 และสารประกอบไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไอออนด้วยปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันให้เปลี่ยนเป็นไนเตรท ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ดังสมการ (10) และ (11) ซึ่งถังย่อยสลายชุดที่ 3 มีกลไกการทำงานเหมือนกับถังย่อยสลายชุดที่ 1 และถังย่อยสลายชุดที่ 4 มีกลไกเหมือนกับถังย่อยสลายชุดที่ 2 ดังนั้นระบบบาเดนโฟจึงสามารถบำบัดสารประกอบคาร์บอนและไนโตรเจนออกจากน้ำเสียได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารฟอสฟอรัส

น้ำเสียบางประเภทมีสารฟอสฟอรัสปนเปื้อนอยู่ เช่น น้ำเสียจากอาคารบ้านเรือน โดยฟอสฟอรัสจะอยู่ในรูปของฟอสเฟตหลายรูปแบบ เช่น ออร์โทฟอสเฟต คอนเดนส์ฟอสเฟต และออร์แกนิกฟอสเฟต (ฟอสโฟไลปิด น้ำตาลฟอสเฟตและนิวคลีโอไทด์) เป็นต้น โดยกลุ่มโพลีฟอสเฟต และออร์แกนิกฟอสเฟตจะปนเปื้อนในน้ำเสียสูงถึงร้อยละ 70 ที่มาของสารฟอสเฟตเหล่านี้คือ อุจจาระ ของเสียและสารชำระล้างโดยเฉพาะอย่างยิ่งผงซักฟอก ฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยที่สำคัญของการเกิดยูโทรฟิเคชันในน้ำ ดังนั้นจึงต้องมีการบำบัดสารฟอสฟอรัสในน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ ซึ่งการบำบัดฟอสฟอรัสด้วยวิธีทางชีวภาพต้องอาศัยกระบวนการ 2 ขั้นตอน (สุบัณฑิต, 2538) คือ ระบบที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic system) สลับกับระบบที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic system) ซึ่งระบบการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic system) คือ กลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนทำการดูดซึมสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตเข้าไปในเซลล์และย่อยให้เปลี่ยนเป็นสารอินทรีย์ฟอสเฟตก่อนที่จะปล่อยสารอินทรีย์ฟอสเฟตออกนอกเซลล์ และระบบการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic system) คือ กลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนและสะสมฟอสเฟต เรียก polyphosphate accumulate organisms (POAs) (Sidat *et al.,* 1999; Bitton, 2005) เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่จะทำการดูดซึมสารอินทรีย์ฟอสเฟตเข้าไปภายในเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารฟอสฟอรัสที่มีการใช้ในปัจจุบันมีดังนี้คือ

3.1 ระบบบำบัดสารฟอสฟอรัสโดยวิธีทางชีวภาพแบบเมนสตรีม (Mainstream processes) คือ ระบบที่ประกอบด้วยถังย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนและถังเติมอากาศ ร่วมกับถังตกตะกอน 1 ถัง (ภาพที่ 5)



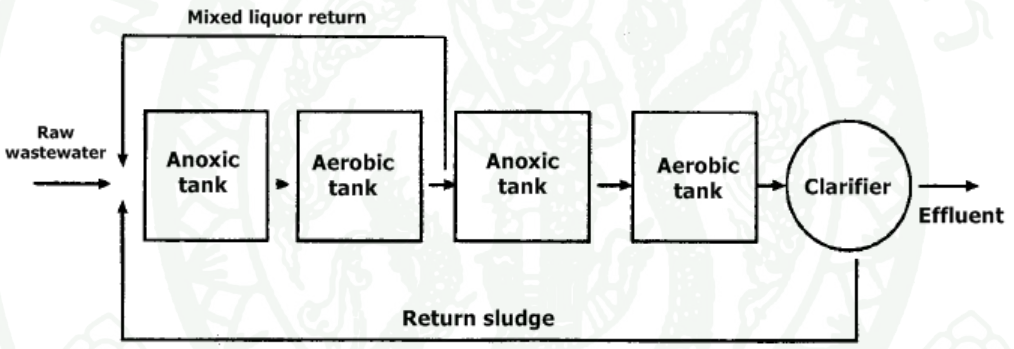
ภาพที่ 5 แผนผังระบบเมนสตรีมในการบำบัดสารฟอสฟอรัส

ที่มา: Bitton (2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ถังย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic tank) คือ ถังที่มีการย่อยสลายสารปนเปื้อนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังสมการ (7) แบคทีเรียที่ย่อยสลายสารปนเปื้อนในรูปบีโอดีและมีฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบได้ถูกเพิ่มจำนวน การนำเอาสารปนเปื้อนในรูปบีโอดีมาเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนสารประกอบฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปฟอสเฟตซึ่งละลายอยู่ในน้ำเสียก่อนเข้าสู่ถังย่อยสลายแบบเติมอากาศ ในถังนี้จุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้ออกซิเจนและสะสมฟอสเฟตเรียกว่า polyphosphate accumulation organisms (PAOs) จะดูดซึมสารอินทรีย์ฟอสเฟตในน้ำเสียจากถังย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนมาสะสมในเซลล์ซึ่งเป็นการกำจัดฟอสฟอรัสออกจากน้ำเสีย นอกจากนี้ยังย่อยสลายสารปนเปื้อนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ดังสมการ (10) และ (11)

3.2 ระบบบาเดนโฟ (Bardenpho processes) คือ ระบบบำบัดที่มีถังย่อยสลายสารปนเปื้อนจำนวน 4 ถัง และถังตกตะกอน 1 ถัง (ภาพที่ 6)



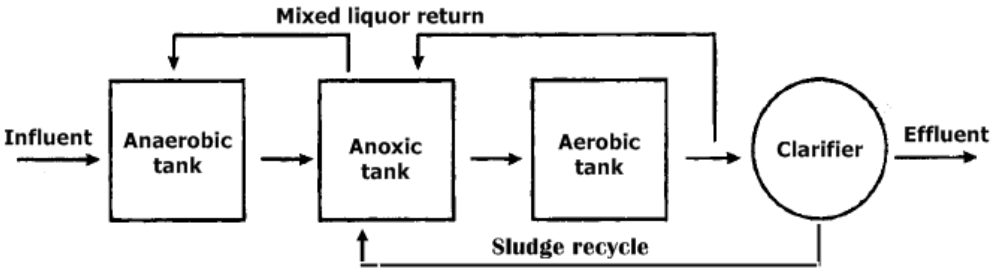
ภาพที่ 6 แผนผังระบบบาเดนโฟในการบำบัดสารฟอสฟอรัส

ที่มา: Bitton (2005)

ระบบบาเดนโฟเป็นระบบที่มีถังย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนสลับกับถังย่อยสลายแบบเติมอากาศซึ่งมีกลไกการบำบัดสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนและฟอสฟอรัสเหมือนระบบเมนสตรีมเพียงแต่มีถังย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนและถังย่อยสลายแบบเติมอากาศอย่างละ 2 ชุด ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ถังย่อยสลายที่เพิ่มมาทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์และฟอสฟอรัสที่เหลือจากชุดที่ 1 ออกจากน้ำเสียอีกครั้ง

3.3 ระบบยูทีซี (UTC processes) คือ ระบบที่ประกอบด้วยถังย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน ถังย่อยสลายแบบดีไนตริฟิเคชัน ถังเติมอากาศ และถังตกตะกอน (ภาพที่ 7)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 แผนผังระบบยูทีซีในการบำบัดสารฟอสฟอรัส

ที่มา: Bitton (2005)

ระบบยูทีซีเป็นระบบที่มีถังย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic tank) ย่อยสลายสารประกอบคาร์บอนและเปลี่ยนสารประกอบฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปสารอินทรีย์ฟอสเฟตแล้วเข้าสู่ถังย่อยสลายแบบดีไนตริฟิเคชัน ซึ่งเป็นถังที่ย่อยสลายสารประกอบคาร์บอนและไนเตรทเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และก๊าซไนโตรเจน จากนั้นเข้าสู่ถังเติมอากาศโดยถังนี้จะมีการย่อยสลายสารประกอบคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสก่อนที่จะปล่อยเข้าสู่ถังตกตะกอน ซึ่งบ่อตกตะกอนทำหน้าที่แยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดจากถังย่อยสลายทั้ง 3 ถัง ก่อนปล่อยสู่ขั้นตอนต่อไป

ข้อมูลการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งชนิดต่างๆ เช่น อัตราส่วนของอาหารต่อตะกอนของจุลินทรีย์ (F/M) อายุสลัดจ์ ระยะกักเก็บน้ำ และประสิทธิภาพการกำจัดบีโอดี แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ข้อมูลการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งชนิดต่างๆ

ระบบ	F/M (kg BOD/kg MLVSS-d)	อายุสลัดจ์ (วัน)	ระยะกักเก็บน้ำ (ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการกำจัดบีโอดี (ร้อยละ)
ระบบทั่วไปแบบไหลตามกัน	0.2-0.4	3-15	4-8	85-95
ระบบทั่วไปแบบกวนสมบูรณ์	0.2-0.6	3-15	3-5	85-95
ระบบปรับเสถียรสัมผัส	0.05-0.1	5-10	3-5	80-90
ระบบคลองวนเวียน	0.05-0.3	15-30	15-30	85-90

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ระบบ	F/M (kg BOD/kg MLVSS-d)	อายุสลัดจ์ (วัน)	ระยะกักเก็บน้ำ (ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการกำจัดบีโอดี (ร้อยละ)
ระบบเอสบีอาร์	0.2-0.6	10-30	N/A	85-95
ระบบแบบเติมอากาศยืดเวลา	0.05-0.1	20-30	18-36	75-95

F/M = Food per Microorganism คือ อัตราส่วนของอาหารต่อตะกอนของจุลินทรีย์
N/A = not applicable คือ ไม่สามารถกำหนดค่าที่เหมาะสมได้

ที่มา: Tchobanoglous *et al.* (2004)

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ คือ ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่ใช้ถังเติมอากาศและถังตกตะกอนเป็นถังเดียวกัน โดยทั่วไปการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ใน 1 วงจรจะประกอบไปด้วย 5 ขั้นตอนดังนี้ (Tchobanoglous *et al.*, 2004)

1. การเติมน้ำเสีย (Fill) คือ การเติมน้ำเสียเข้าถังปฏิกิริยาที่มีตะกอนจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจะเริ่มเติมน้ำจากร้อยละ 25 ของความจุสูงสุดของถังจนเต็มคือร้อยละ 100 หากควบคุมระยะเวลาที่ใช้ในช่วงนี้ใช้เวลาประมาณร้อยละ 25 ของเวลาทั้งหมดใน 1 วงจร

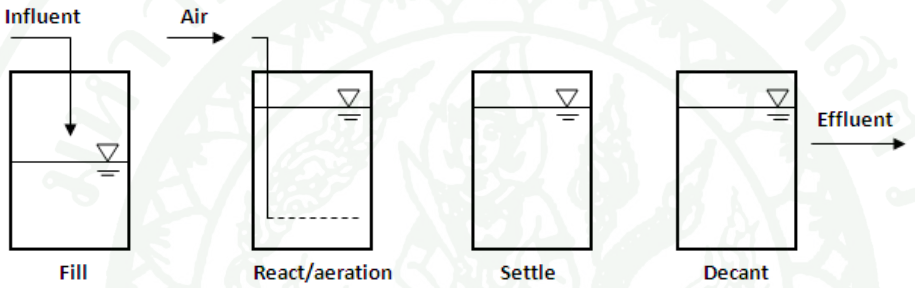
2. การเกิดปฏิกิริยา (React) คือ ช่วงที่มีการเติมอากาศอย่างต่อเนื่อง เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่ขั้นตอนการเติมน้ำเสีย ระยะเวลาที่ใช้ในช่วงนี้ประมาณร้อยละ 35 ของเวลาทั้งหมดใน 1 วงจร

3. การปล่อยให้ตะกอนจมตัว (Settle) คือ ช่วงที่มีการตกตะกอนในถังปฏิกิริยา ซึ่งเป็นช่วงที่ใช้แยกตะกอนจุลินทรีย์ออกจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว โดยทั่วไปจะใช้ระยะเวลาในช่วงนี้ประมาณร้อยละ 20 ของเวลาทั้งหมดใน 1 วงจร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การรินน้ำใสออก (Draw) คือ ช่วงที่มีการระบายน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วหรือน้ำใสออกจากถังปฏิกิริยา วิธีที่นิยมใช้ในการรินน้ำใสออกคือ การใช้ระบบฝายลอย (Floating) หรือฝายที่ปรับระดับได้ (Adjustable Weir) โดยมากในช่วงนี้ใช้เวลาร้อยละ 5-30 ของเวลาทั้งหมดใน 1 วงจร (15 นาที-2 ชั่วโมง) ซึ่งเวลาที่ใช้ทั่วไปคือ 45 นาที

5. การพัก (Idle) คือ ช่วงหลังจากการระบายน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วออกจากถังปฏิกิริยาและก่อนที่จะเติมน้ำเสียเข้าถังใหม่อีกครั้ง เนื่องจากช่วงนี้ไม่มีความสำคัญมากนัก จะมีหรือไม่มีก็ได้ ซึ่งขั้นตอนทั้ง 5 ขั้นตอนแสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์

ที่มา: Tchobanoglous *et al.* (2004)

โดยทั่วไประบบเอสบีอาร์ 1 วงจร ประกอบด้วยการเติมน้ำเสีย 3 ชั่วโมง การเติมอากาศหรือการเกิดปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง และมีขั้นตอนการตกตะกอนและรินน้ำใสออกอย่างละ 30 นาที และช่วงพักซึ่งขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้ควบคุมระบบ (Tchobanoglous *et al.*, 2004)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำเสีย

ทวี (2538) และสุบัณฑิต (2548) อธิบายถึงการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางชีววิทยา (Biological treatment) ซึ่งเป็นการบำบัดน้ำเสียที่อาศัยจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกว่าร้อยละ 95 ช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ดังนั้นการศึกษาและการทำความเข้าใจถึงชนิดและคุณสมบัติของแบคทีเรียทำให้สามารถควบคุมการบำบัดน้ำเสียได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. จุลินทรีย์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งเป็นระบบบำบัดที่มีการนำน้ำเสียมาผสมกับตะกอนของจุลินทรีย์ (Activated Sludge) และมีการเติมอากาศอย่างต่อเนื่องให้กับระบบ โดยน้ำเสียจะผ่านการย่อยสลายสิ่งปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ในระบบ และถูกส่งเข้าสู่ถังตกตะกอน เมื่อมีการตกตะกอนน้ำใสจะไหลออกจากถังในขณะที่ตะกอน (Floc) ที่อยู่ส่วนก้นถังจะถูกปั๊มเข้าถังเติมอากาศ และตะกอนส่วนเกินจะถูกกำจัดออก กลุ่มแบคทีเรียที่สำคัญซึ่งทำให้เกิดกลุ่มตะกอน (Floc) ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Achromobacter, Aerobacter, Citromonas, Flavobacterium, Pseudomonas* และ *Zoogloea* (Bitton, 2005; Gerardi, 2006) เป็นแบคทีเรียที่พบในบ่อเติมอากาศ และแบคทีเรียกลุ่มนี้จะออกซิไดซ์สารอินทรีย์ในน้ำเสียให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ และมีรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Zoogloea* มักพบบ่อยในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง ซึ่งเป็นดัชนีบอกว่ามีสารอินทรีย์อยู่ในน้ำเสียค่อนข้างสูง (สาวิตรี, 2552)

นอกจากนี้ Liang *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษา *Zoogloea* spp. โดยนำ *Zoogloea* spp. มาช่วยในการบำบัดน้ำมันหล่อลื่น (Lubricating oil) ที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย พบว่า *Zoogloea* spp. สามารถบำบัดน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำเสียได้ และผลที่ได้คือ ที่ระยะเวลากักเก็บ (HRT) 12 ชั่วโมง อัตราการไหล 16.5 ลิตรต่อชั่วโมง สามารถลดน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในน้ำเสียได้ร้อยละ 99.3 ภายใน 15 วัน และที่ระยะเวลากักเก็บ 6 ชั่วโมง อัตราการไหล 33 ลิตรต่อชั่วโมง สามารถลดได้ร้อยละ 98.6 ภายใน 12 วัน อีกทั้ง You and Ouyang (2007) ยังได้ทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งพบว่า *Pseudomonas spinosa, Zoogloea ramigera* และ *Streptococcus penumoniae* เป็นแบคทีเรียเด่นในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง โดยระบบมีประสิทธิภาพในการลดค่าบีโอดีและซีโอดีได้ถึงร้อยละ 75.6 และ 75.4 ตามลำดับ และพบเป็นแบคทีเรียเด่นในระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ หรืออาร์บีซี (Rotating Biological Contactor) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดค่าบีโอดีและซีโอดีได้ถึงร้อยละ 79.0 และ 67.0 ตามลำดับ

2. จุลินทรีย์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจน

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจนเป็นระบบที่ใช้แบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิง (Nitrifying bacteria) และแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟอิง (Denitrifying bacteria) ในการกำจัดไนโตรเจน ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิงแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามปฏิกิริยาคือ แบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนเพื่อออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Ammonia Oxidizing

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bacteria (AOB) โดยแบคทีเรียกลุ่ม AOB ที่พบในน้ำเสียเป็นแบคทีเรียสกุล *Nitrosomonas* (Gerardi, 2006) เป็นส่วนมาก ส่วนอีกกลุ่มคือแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB) เช่นแบคทีเรียสกุล *Nitrobacter* และ *Nitrospira* ส่วนแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟอิงเป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobic bacteria กล่าวคือในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแต่มีไนเตรทแบคทีเรียกลุ่มนี้ก็สามารถใช้ไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน แบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Alcaligenes* (Arquiaga *et al.*, 1993; Mara and Horan, 2003; Gerardi, 2006)

นอกจากนี้ Arquiaga *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียอีกกลุ่มในน้ำเสียที่มีค่าโซเดียมไนไตรท์สูง พบว่าแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงสกุล *Alcaligenes* และ *Pseudomonas* จะพบบ่อยในถังแอน็อกซิก (anoxic reactor) ร่วมกับแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงและกลุ่มที่ไม่ใช่แบคทีเรียดีไนตริไฟอิงอื่นๆ เช่น *Acinetobacter* และ *Flavobacterium* แต่อย่างไรก็ตามมีเพียงแบคทีเรียสกุล *Alcaligenes* เท่านั้นที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้สมบรูณ์ที่สุด สิรินันท์ และคณะ (2552) ได้ศึกษาแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงที่มีประสิทธิภาพบำบัดไนเตรทในน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งพบว่า *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงที่สามารถบำบัดไนเตรทได้และมีประสิทธิภาพในการลดค่าไนเตรทได้ถึงร้อยละ 53

3. จุลินทรีย์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารฟอสฟอรัส

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารฟอสฟอรัสเป็นระบบที่อาศัยกระบวนการ 2 ขั้นตอน (สุบัณฑิต, 2538) คือ ระบบที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic system) สลับกับระบบที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic system) โดยระบบการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic system) จะอาศัยแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนทำการดูดซึมสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตเข้าไปในเซลล์และย่อยให้เปลี่ยนเป็นสารอินทรีย์ฟอสเฟตก่อนที่จะปล่อยสารอินทรีย์ฟอสเฟตออกนอกเซลล์เข้าสู่ระบบการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic system) โดยอาศัยแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนและสะสมฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ เรียกว่า polyphosphate accumulate organisms (POAs) (Sidat *et al*., 1999) ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus* (Bitton, 2005) *Acinobacter, Aerobacter, Enterobacter, Klebsiella* และ *Proteobacter* (Gerardi, 2006) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่จะทำการดูดซึมสารอินทรีย์ฟอสเฟตเข้าไปภายในเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทั้งนี้ Sidat *et al*. (1999) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถลดโพลีฟอสเฟตในน้ำเสีย พบว่า *Acinetobacter calcoaceticus(lowffi), Aeromonas hydrophila,* และ *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียเด่นที่สามารถลดปริมาณโพลีฟอสเฟตในน้ำเสียได้โดยการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ (intracellular) ในสภาวะที่มีอากาศ ต่อมา Sarioglu (2005) ได้ทดลองใช้ *Acinetobacter lowffi* และ *Pseudomonas aeruginosa* บำบัดฟอสฟอรัสในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ (Sequencing Batch Reactor) โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าซีโอดี ค่าออร์โทฟอสเฟต และค่าแอมโมเนีย เท่ากับ 1,000, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยใช้ถังปฏิกรณ์ 3 ถัง ถังที่ 1 เติม *Acinetobacter lowffi* ถังที่ 2 เติม *Acinetobacter lowffi* และ *Pseudomonas aeruginosa* ถังที่ 3 เติม *Pseudomonas aeruginosa* พบว่า ถังที่ 1 สามารถบำบัดหรือลดฟอสฟอรัสได้ทั้งหมด ส่วนถังที่ 2 และ 3 สามารถบำบัดฟอสฟอรัสได้เพียงร้อยละ 25 และ 20 ตามลำดับ และในทั้ง 3 ถังปฏิกรณ์สามารถลดค่าซีโอดีได้เท่ากันคือ ร้อยละ 90

อีกทั้ง Mongkolthanaruk and Dharmsthiti (2002) ได้ทำการศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่มีค่าบีโอดีต่ำแต่มีไขมันสูงด้วยกลุ่มแบคทีเรียรวมซึ่งประกอบด้วย *Pseudomonas aeruginosa* 6.1×10^8 CFU/ml *Bacillus* sp. 4.8×10^8 CFU/ml และ *Acinetobacter calcoaceticus* 8.9×10^7CFU/ml ใน 20 มิลลิลิตร พบว่า *Bacillus* sp. มีการสร้างเอนไซม์ protease และ amylase ส่วน *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter calcoaceticus* มีการสร้างเอนไซม์ lipase และสามารถบำบัดน้ำเสียที่มีค่าบีโอดีประมาณ 3,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าไขมัน 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ลดลงน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ในเวลา 12 วันภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

Gerardi (2006) อธิบายว่าบทบาทของแบคทีเรียในน้ำเสียนั้นแตกต่างกันไป กล่าวคือ แบคทีเรียบางกลุ่มมีบทบาทในด้านบวกต่อการบำบัดน้ำเสีย ในขณะที่บางกลุ่มมีบทบาทในด้านลบต่อการบำบัดน้ำเสีย แต่ก็มีแบคทีเรียอีกกลุ่มที่มีบทบาททั้งลบและบวกต่อการบำบัดน้ำเสียด้วย แบคทีเรียที่มีหน้าที่ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน แสดงดังตารางที่ 7

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 แบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในน้ำเสีย

ชนิดของแบคทีเรีย	หน้าที่
Pseudomonas	ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต สารปนเปื้อนในน้ำเสีย และผลิตเมือกที่ช่วยในการสร้างฟล๊อค (Floc)
Zoogloea	ผลิตเมือกที่ช่วยในการสร้างฟล๊อค (Floc)
Bacillus	ย่อยสลายโปรตีน
Arthrobacter	ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต
Microthrix	ย่อยสลายไขมัน
Acinetobacter	ย่อยสลายฟอสฟอรัส
Nitrosomonas	ทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ขั้นที่ 1 หรือแอมโมเนียออกซิเดชัน
Nitrobacter	ทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ขั้นที่ 2 หรือไนไตรท์ออกซิเดชัน
Achromobacter	ทำให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน

ที่มา: สุบัณฑิต (2548)

Bitton (2005) ทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งด้วยวิธีการ culture-based technique พบกลุ่มแบคทีเรียเด่นคือ *Zoogloea, Pseudomonas, Flavobacterium, Alcaligenese, Achromobacter, Corynebacterium, Comomonas, Brevibacterium, Acinetobacter* และ *Bacillus* ในบ่อเติมอากาศ และทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งด้วยวิธีการศึกษา 16S rRNA และ 23S rRNA พบแบคทีเรียกลุ่ม *Comamonas-Pseudomonas* species มากที่สุด ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

กลุ่มแบคทีเรีย	การคัดแยกทั้งหมด (ร้อยละ)
Comamonas-Pseudomonas	50.0
Alcaligenes	5.8
Pseudomonas (Fluorescent group)	1.9
Paracoccus	11.5
Unidentified (gram-negative rods)	1.9

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 (ต่อ)

กลุ่มแบคทีเรีย	การคัดแยกทั้งหมด (ร้อยละ)
Aeromonas	1.9
Flavobacterium-Cytophaga	13.5
Bacillus	1.9
Micrococcus	1.9
Coryneform	5.8
Arthrobacter	1.9
Aureobacterium-Microbacterium	1.9

ที่มา: Bitton (2005)

การเจริญของจุลินทรีย์

หากนำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารอาหารเพียงพอ โดยไม่มีการเติมหรือเปลี่ยนอาหารซึ่งเรียกว่าการเลี้ยงแบบเป็นกะ (Batch) แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น หรือน้ำหนักของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น สามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้เป็น 4 ระยะ คือ (สันทัด, 2549; ราตรี, 2552; Bitton, 2005)

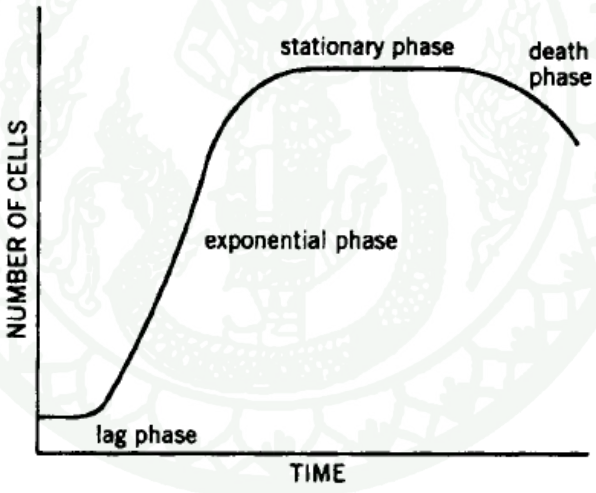
1. Lag phase เป็นระยะแรกในการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียจะต้องมีการปรับตัวและเป็นระยะที่แบคทีเรียได้รับสารอาหารเพื่อนำมาเป็นส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ โดยระยะนี้จะไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่มีการเพิ่มขนาดของเซลล์ มีการสะสมเอนไซม์และพลังงานที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ ความยาวของช่วงนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้และอายุของแบคทีเรีย

2. Logarithmic phase หรือ Exponential phase เป็นระยะที่เซลล์มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้แล้วและมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วแบบทวีคูณ (binary fission) คือ การเพิ่มจาก 1 เป็น 2 จาก 2 เป็น 4 ไปเรื่อยๆ ทำให้ประชากรเพิ่มจำนวนแบบ Exponential ในช่วงนี้เซลล์จะมีกิจกรรมทางเมแทบอลิซึมสูงสุด โดยความยาวของช่วงนี้ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. Stationary phase เมื่อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนไปถึงระยะหนึ่ง อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มน้อยลง และมีการสะสมของเสีย การเจริญเติบโตจะถูกจำกัดและลดลงจนเป็นศูนย์ แต่กระบวนการทางชีวภาพส่วนใหญ่ยังดำเนินอยู่เพื่อคงความมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งเซลล์ยังต้องการอาหารและอาจดึงมาจากแหล่งสะสมในเซลล์ เป็นช่วงที่ประชากรเข้าสู่ช่วงสภาวะหยุดนิ่ง โดยอาจอยู่ได้เป็นระยะเวลานานพอโดยไม่ตาย และหากมีการเติมอาหารจะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อีก

4. Death phase หรือ Logarithmic decline phase เป็นระยะหลังจากเกิด Stationary phase แล้ว เซลล์อยู่ในสภาพที่ไม่แข็งแรง มีกิจกรรมต่ำและอาจมีเซลล์ที่มีความผิดปกติทางโครงสร้าง ระยะนี้อัตราการตายของเซลล์มีมากกว่าอัตราการเกิดของเซลล์ใหม่ ดังนั้นจำนวนเซลล์จึงลดลงอย่างรวดเร็ว ถ้าไม่ได้รับสารอาหารใหม่ เซลล์บางชนิดอาจตายเกือบหมดภายใน 2-3 วัน แต่บางชนิดจะคงเหลืออยู่รอดไปได้เรื่อยๆ เช่นกัน ซึ่งระยะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 4 ระยะดังกล่าว แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 กราฟการเจริญของแบคทีเรีย (Growth Curve)

ที่มา: Bitton (2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์ในน้ำเสีย

1. การแยกเชื้อ (isolation)

เนื่องจากในน้ำเสียมีจุลินทรีย์อยู่มากมายหลายชนิด รวมทั้งปริมาณของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันตามคุณสมบัติของน้ำเสีย ดังนั้นก่อนจะศึกษาเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องทำการแยกเชื้อให้เป็น “เชื้อบริสุทธิ์” (Pure Culture) ซึ่งการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์คือ การทำให้เซลล์จุลินทรีย์กระจายออกเป็นเซลล์เดี่ยว แล้วจึงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ชนิดนั้นอีกครั้ง ขั้นแรกต้องทำการเจือจางให้เซลล์มีจำนวนลดลงจนแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวได้ ซึ่งมีวิธีการแยกเชื้อด้วยกัน 3 วิธีคือ การแยกเชื้อด้วยวิธีการ Pour plate, Spread plate และ Streak plate (จุรีรัตน์, 2552; Harley and Prescott, 2002) ทั้ง 3 วิธีดังกล่าวมีวัตถุประสงค์คล้ายกันคือต้องการให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เป็นโคโลนีเดี่ยว นอกจากนี้วิธีการ Pour plate และ Spread plate ยังเป็นวิธีที่ใช้นับจำนวนเชื้อเริ่มต้นด้วย ซึ่งเทคนิคในการแยกเชื้อบริสุทธิ์มีรายละเอียดดังนี้

1.1 Spread plate technique

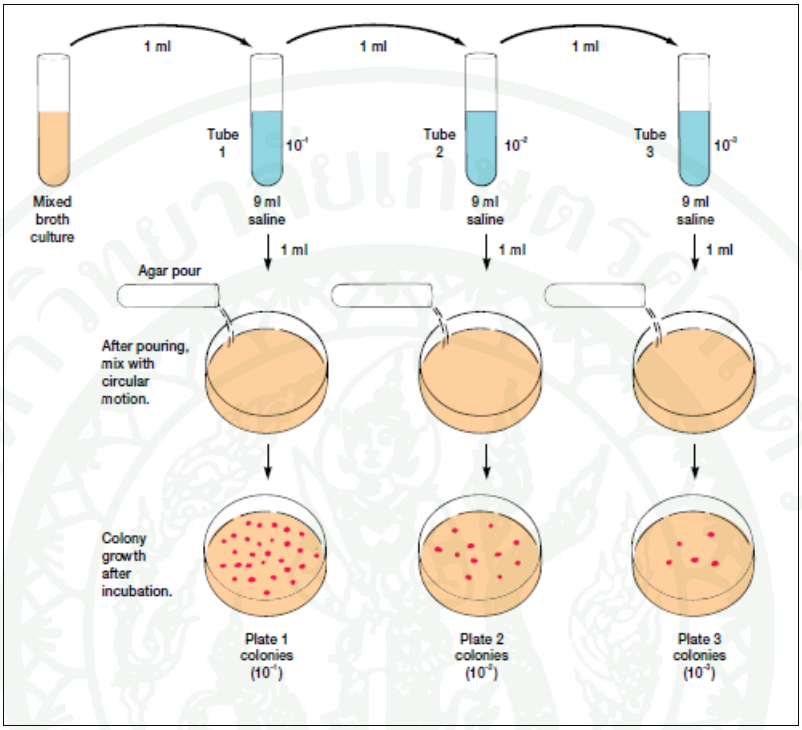
เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อการคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยการเจือจางแบคทีเรียให้อยู่ในช่วง 30-300 เซลล์แล้วปิเปตไปวางไว้ที่ตรงกลางของจานเพาะเชื้อ (Petri plate) ทำการเกลี่ยให้เชื้อกระจายด้วยแท่งแก้ว (Spreader) หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมจะปรากฏโคโลนี (Colony) ของแบคทีเรียขึ้น ซึ่งในหนึ่งโคโลนีจะมีแบคทีเรียอยู่จำนวนมากแต่ถือว่ามาจากแบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียว จึงเป็นการทำให้เกิดการแยกจุลินทรีย์ออกมาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ เมื่อมองด้วยตาเปล่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โคโลนีจะมีลักษณะแตกต่างกัน

1.2 Pour plate technique

เป็นเทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มต้นจากการเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นหลายๆความเข้มข้นด้วยเทคนิค Serial dilution เพื่อทำให้เชื้อเจือจางมากพอที่จะทำให้เกิดโคโลนีเดี่ยว แล้วปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อ จากนั้นเทอาหารวุ้น (Agar Medium) ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองลงไปในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างเชื้อ หลังจากนั้นผสมอาหารและเชื้อให้เข้ากันและให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ โดยอาหารวุ้นที่ใช้ควรมีอุณหภูมิที่ 45-50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่เหมาะสมไม่ทำให้เชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตาย หลังจากนั้นปล่อยให้วุ้นแข็งตัว โดยเซลล์จุลินทรีย์จะถูกตรึงให้อยู่ภายในอาหารวุ้น บ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมจะเกิดโคโลนีเดี่ยวๆของเชื้อขึ้น (สาวิตรี, 2552) โดยมีขั้นตอนการ pour plate ดังภาพที่ 10



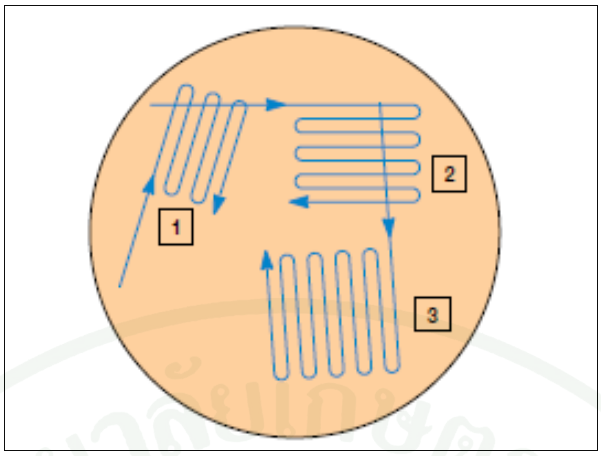
ภาพที่ 10 การแยกเชื้อด้วยวิธีการ pour plate

ที่มา: Harley and Prescott (2002)

1.3 Streak-Plate Technique

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกวิธีหนึ่งคือ การแยกเชื้อด้วยวิธี Streak plate ซึ่งวิธีที่นิยมมากที่สุดคือ cross streak plate ซึ่งทำได้โดยการใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) แตะตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจแล้วลากหรือขีด (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งอยู่ให้ได้ตามแนวระนาบติดต่อกัน 3-4 เส้น ดังภาพที่ 11

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 วิธีการ cross streak plate

ที่มา: Harley and Prescott (2002)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันไปโดยปัจจัยต่างๆที่แตกต่างกันนั้นได้แก่ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ สารอาหารต่างๆซึ่งเป็นแหล่งพลังงาน ดังนั้นหากต้องการศึกษาจุลินทรีย์ใดควรศึกษาความต้องการของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ เพื่อจะได้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้ตรงตามความต้องการของเชื้อนั้นให้ถูกต้อง อาหารเลี้ยงเชื้อในทางจุลชีววิทยาแบ่งตามลักษณะการใช้งานได้เป็น 5 ชนิด (จุรีรัตน์, 2552; สาวิตรี, 2552) ดังนี้

2.1 Enrichment medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มักมีลักษณะเป็นของเหลว ใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยเติมสารอาหารพิเศษเฉพาะที่ช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

2.2 Selective medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกเฉพาะจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการให้เจริญและเพิ่มจำนวน ส่วนจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะมีการเติมสารบางอย่างที่ช่วยทำให้เชื้อที่สนใจเจริญได้มาก และเร็วกว่าเชื้อชนิดอื่น หรือเติมสารบางอย่างเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ไม่สนใจ ส่วนใหญ่ใช้เป็นอาหารแข็ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 Differential medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารบางอย่างเพื่อใช้บอกความแตกต่างของจุลินทรีย์ 2-3 กลุ่มโดยเชื้อที่เจริญบนอาหารมีสีแตกต่างกัน หรือทำให้อาหารเปลี่ยนสีได้แตกต่างกัน

2.4 Synthetic medium หรือ chemically defined medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณที่แน่นอน

2.5 Complex medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารอาหารต่างๆที่เพียงพอต่อความต้องการในการเจริญของจุลินทรีย์ มักเตรียมจากสารประกอบธรรมชาติซึ่งไม่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน

3. การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

การจัดจำแนกเชื้อเพื่อเทียบเคียงเชื้อที่ไม่ทราบกับเชื้อที่ทราบเพื่อความถูกต้องจะต้องดูลักษณะหลายอย่างรวมกัน (ดวงพร, 2537) ดังนี้

3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ก่อนอื่นต้องทำให้เชื้อที่ไม่ทราบให้บริสุทธิ์ (Pure culture) แล้วทำการศึกษารูปร่างเซลล์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ ความสามารถในการเคลื่อนที่ การสร้าง capsule การดู flagella จะทราบได้โดยการย้อมสีแบบเฉพาะต่างๆ แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2 ลักษณะของความต้องการอาหาร (Nutritional characteristics) แบคทีเรียมีความต้องการอาหารแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับประเภทของแหล่งพลังงานและคาร์บอน ตลอดจนสารอาหารอื่นๆจะสะท้อนให้เห็น metabolic diversity

3.3 ลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological characteristics) จะเกี่ยวกับความต้องการออกซิเจนปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และความเข้มข้นของไอออน

3.4 ลักษณะทางชีวเคมี (Biochemical characteristics) เกี่ยวกับเอนไซม์ที่มีผลต่อการใช้สารอาหาร แล้วทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิดใดรวมถึงวิธีทดสอบแต่ละชนิด ซึ่งลักษณะนี้จะใช้มากในการจำแนกแบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.5 ลักษณะทางอิมมูโนวิทยา (Immunological characteristics) ดูลักษณะแอนติเจน

3.6 ลักษณะการทำให้เกิดโรค (Pathogenic characteristics) ศึกษาอาการที่ก่อให้เกิดและลักษณะของแผล ตลอดจนสาเหตุที่ทำให้เกิด ยกตัวอย่างเช่น การสร้างสารพิษของเชื้อ

คุณลักษณะของแบคทีเรียหลักที่ทำการศึกษา

แบคทีเรียหลักที่ทำการศึกษาคือ *Zoogloea* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp. และ *Nitrosomonas* spp. มีคุณลักษณะดังต่อไปนี้

1. สกุล *Zoogloea* สามารถจัดหมวดหมู่ได้ดังนี้

Domain: Bacteria
Phylum: Proteobacteria
Class: Betaproteobateria
Order: Rhodocycales
Family: Pseudomonadaceae
Genus: Zoogloea

ลักษณะทั่วไปของสกุล *Zoogloea* มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) กว้าง 0.5 -1.0 ไมครอน ยาว 1-3 ไมครอน ไม่สร้างสปอร์ เซลล์ติดแกรมลบ (Gram negative) เมื่อเซลล์อายุน้อยจะเคลื่อนที่ได้ดี โดยใช้ polar mono-flagella ตามแหล่งธรรมชาติ เมื่อเจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเซลล์จะรวมตัวเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มใหญ่ ลอยไปมาได้หรือเกาะติดกับพื้นที่ผิว กลุ่มก้อนที่เกาะติดกันมีลักษณะคล้ายนิ้วมือ (ดวงพร, 2537; Buchanan and Gibbons, 1957) เพราะมีการสร้าง fibrils มาเชื่อมกันระหว่างเซลล์ การดำรงชีวิตเป็นแบบ Chemoorganotroph การทดสอบแคตาเลส (Catalase test) และทดสอบออกซิเดส (Oxidase test) ให้ผลบวก เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีอากาศเท่านั้น (Obligate aerobic bacteria) อุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะคือ 7-7.5 และไม่เจริญเมื่อพีเอช 4.5 หรือ 9.6 เจริญได้ใน 3 % NaCl แต่ถ้า 6.5% NaCl ไม่สามารถเจริญได้ ชนิดที่พบในน้ำเสียคือ *Zoogloea ramigera* (สาวิตรี, 2552)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. สกุล *Pseudomonas* สามารถจัดหมวดหมู่ได้ดังนี้

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Pseudomonadales

Family: Pseudomonadceae

Genus: Pseudomonas

ลักษณะทั่วไปของสกุล *Pseudomonas* เป็นเซลล์เดี่ยวท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อยแต่ไม่เป็นเกลียว ส่วนมากเซลล์มีขนาด 0.5-1 ไมครอน ยาว 1.5-4 ไมครอน ติดสีแกรมลบ (Gram negative) เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella แบบ monotrichous หรือ multitrichous ไม่สร้างปลอกหรือก้าน ไม่มีระยะพักตัว ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph มี metabolism เป็นแบบ respiration ไม่มีการหมัก เป็นพวก obligate aerobe ยกเว้นบางชนิดเป็นพวกที่เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe chemolithotroph) สามารถใช้ H_2 หรือ CO เป็นแหล่งพลังงานและใช้ O_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ส่วนในกลุ่ม denitrifying สามารถใช้ไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้เพราะมี anaerobic respiration catalase เป็นบวก ค่า G+C content ของ DNA 58-70 โมลเปอร์เซ็นต์ (ดวงพร, 2537; Buchanan and Gibbons, 1957) แบคทีเรียกลุ่มนี้พบได้ทั่วไปในดิน น้ำจืด น้ำทะเล ส่วนใหญ่ทดสอบออกซิเดสให้ผลบวก มีบางชนิดเท่านั้นที่ให้ผลบวกอ่อนๆ หรือให้ผลเป็นลบ สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 4-43 องศาเซลเซียส แต่ส่วนมากจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทุกชนิดเจริญเติบโตได้ดีที่พีเอช 7.0-8.5

3. สกุล *Bacillus* สารถจัดหมวดหมู่ได้ดังนี้

Domain: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Bacillales

Family: Bacillaceae

Genus: Bacillus

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทั่วไปของสกุล *Bacillus* มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อนตรงหรือเกือบตรง ติดสีแกรมบวก (Gram positive) ส่วนใหญ่มีการเคลื่อนที่โดยใช้ lateral flagella สร้างเอนโดสปอร์ 1 อันต่อเซลล์ เป็นพวก aerobe หรือ facultative anaerobe โดย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่มีความหลากหลายอย่างมาก แบคทีเรียในสกุลนี้สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เพคติน แป้ง โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต บางสปีชีส์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ และบางสปีชีส์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ การที่ *Bacillus* สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์และสร้างเอนโดสปอร์ได้นั้น เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญ แบคทีเรียสกุลนี้สามารถอยู่รอดและทนต่อสิ่งแวดล้อมได้ (สิรินันท์, 2550) แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph มี metabolism เป็นแบบ respiration หรือ fermentation หรือเป็นได้ทั้งสองอย่าง สามารถใช้อาหารได้แตกต่างกัน ส่วนใหญ่ทดสอบแคตาเลสให้ผลบวก ค่า G+C content ของ DNA 32-62 โมลเปอร์เซ็นต์ ยกตัวอย่างเช่น *Bacillus subtilis* (ดวงพร, 2537) ส่วนใหญ่ อุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ในช่วง 25-75 องศาเซลเซียส สามารถทน 2-25% NaCl พีเอชที่เหมาะสมคือ 7.5-8

4. สกุล *Acinetobacter* สามารถจัดหมวดหมู่ได้ดังนี้

Domain: Bacteria
Phylum: Proteobacteria
Class: Gammaproteobacteria
Order: Pseudomonadales
Family: Morexellaceae
Genus: Acinetobacter

ลักษณะทั่วไปของสกุล *Acinetobacter* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นและอวบ อยู่เป็นคู่เป็นสายสั้นๆส่วนมากเซลล์มีขนาด 1.0-1.5 ไมครอน ยาว 1.5-2.5 ไมครอน ติดสีแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างของแบคทีเรียอาจเป็นได้ทั้งรูปร่างแบบกลมหรือแบบท่อน ขึ้นอยู่กับช่วงของการเจริญเติบโตและประเภทอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่มักจะพบแบบกลมในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ไม่สร้างสปอร์ ไม่มี flagella บางชนิดมีการเคลื่อนที่แบบกระตุก (twitching) บนพื้นผิวที่แข็ง ส่วนใหญ่มี capsule และ fimbriae ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph การทดสอบแคตาเลสให้ผลบวก ส่วนการทดสอบออกซิเดสให้ผลลบ อุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ในช่วง 30-32 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตเท่ากับ 7 เป็นพวก obligate aerobe ต้านทานต่อยาเพนนิซิลิน (ดวงพร, 2537; Buchanan and Gibbons, 1957)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. สกุล *Nitrosomonas* สามารถจัดหมวดหมู่ได้ดังนี้

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Betaproteobacteria

Order: Nitrosomonadales

Family: Nitrosomonadaceae

Genus: Nitrosomonas

ลักษณะทั่วไปของสกุล *Nitrosomonas* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน ขนาด 0.8-0.9 ไมครอน ยาว 1.0-2.0 ไมครอน เคลื่อนที่ด้วย subpolar flagella อยู่เดี่ยวๆ บางครั้งพบเป็นโซ่สั้นๆ ติดสีแกรมลบ (Gram negative) ดำรงชีวิตแบบ obligate chemolithotroph โดยออกซิไดส์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ เจริญได้ในน้ำจืดและน้ำทะเลที่มีแอมโมเนียและเกลือของสารอนินทรีย์ การเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้ไม่ขึ้นกับสารอินทรีย์ อุณหภูมิที่เจริญเติบโตได้อยู่ในช่วง 5-30 องศาเซลเซียส พีเอชที่เจริญได้คือ 5.8-8.5 พบทั่วไปในดิน น้ำจืด และน้ำทะเล (ดวงพร, 2537; Buchanan and Gibbons, 1957)

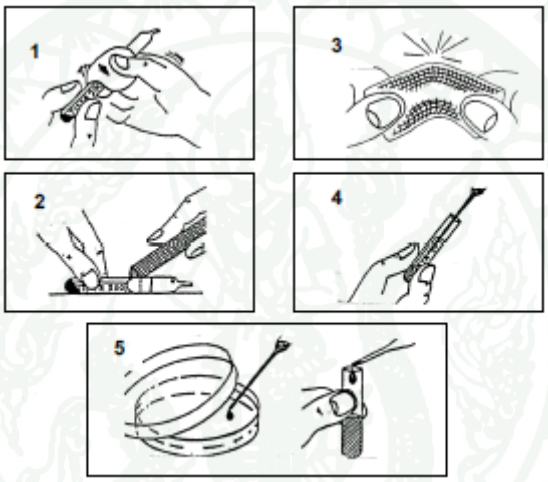
การนำเชื้อออกมาเพาะเลี้ยง (Subculture)

สมบูรณ์ (2553) อธิบายว่าการนำเชื้อที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งออกมาเพาะเลี้ยงในทางปฏิบัติการจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตจะแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการละลายเชื้อด้วยอาหารเหลว (rehydration process) และการเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้อุณหภูมิ อัตราการให้ความร้อน ปริมาตรและองค์ประกอบของอาหารเหลว (rehydration medium) มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อได้ เมื่อได้รับหลอดเชื้อจากศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อควรตรวจดูหมายเลขเชื้อ ชื่อเชื้อและความต้องการจำเพาะต่อการเจริญ สีซิลิกาเจลหรือตรวจสุญญากาศด้วย high frequency tester และทำตามคำแนะนำของศูนย์ได้กำหนดไว้

การเปิดควรทำด้วยความระมัดระวังเพราะเชื้อในลักษณะแห้งนั้นเบามากอาจกระเด็นออกมาได้ ควรทำให้หลอดแตกอย่างเบาๆ และปล่อยให้อากาศเข้าไปอย่างช้าๆ โดยใช้ตะไบทำให้หลอดเป็นรอยบริเวณตรงกลางของจุกสำลีที่อยู่ข้างในหลอด และใช้แท่งแก้วลนไฟให้ร้อนแดงจี้ให้แตกซึ่งจุกสำลีจะยังอยู่ข้างในทำให้อากาศเข้าไปทีละน้อย หลังจากนั้นประมาณ 1 นาทีความดันของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อากาศภายในและภายนอกจะเท่ากัน นำส่วนบนของหลอดออกไป โดยจุกสำลียังติดอยู่กับหลอดอีกส่วนหนึ่ง นำจุกสำลีออกและสวมจุกสำลีใหม่ที่ปราศจากเชื้อแทน (ส่วนที่ถูกตัดออกและสำลีเก่ายังมีเชื้อปะปนอยู่ จึงควรนำไปฆ่าเชื้อก่อน) ต่อมาใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดอาหารเหลวใส่ลงไปในเชื้อที่ทำแห้งภายในหลอด และผสมเบาๆ ซึ่งจะเห็นว่าเชื้อละลายเกือบทันที ระหว่างที่ผสมไม่ควรทำให้กระเด็นและเกิดฟองอากาศ ขั้นตอนการนำเชื้อออกมาเพาะเลี้ยงดังภาพที่ 12 โดยทั่วไปคิดว่าเชื้อที่นำออกมาต้องเจริญแน่นอน จึงมักย้ายสารละลายเชื้อเพียง 2-3 หยดไปหยดลงบนอาหารที่เหมาะสม การตรวจสอบเชื้อปะปนง่ายๆ ควรทำบนอาหารวุ้นและนำแผ่นกระดาษที่มีหมายเลขเชื้อออกมาวางบนอาหารด้วย เพื่อป้องกันการเขียนรหัสผิดพลาด



ภาพที่ 12 การนำเชื้อออกมาเพาะเลี้ยง

ที่มา: สมบูรณ์ (2553)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง
   1.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
   1.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet)
   1.3 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
   1.4 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
   1.5 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ 20 ± 1 องศาเซลเซียส
   1.6 เครื่องจ่ายลม (Air pump)
   1.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
   1.8 เครื่องอังน้ำ (Water bath)
   1.9 เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)
   1.10 ตู้อบ (Hot air oven)
   1.11 เครื่องดูดสุญญากาศ (Vacuum pump)
   1.12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น HANNA HI 3222
   1.13 เครื่องมือสำหรับการย่อยสลาย (Digestion apparatus)
   1.14 เครื่องมือสำหรับการกลั่นแอมโมเนีย (Distillation apparatus)
   1.15 เตาให้ความร้อน (Hot plate)
   1.16 ตู้ดูดความชื้น (Desiccators)
   1.17 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
   1.18 Automatic pipette aid

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง
   2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี
      2.1.1 กระบอกตวง (Cylinder)
      2.1.2 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
      2.1.3 หลอดทดลอง (Test tube)
      2.1.4 บีกเกอร์ (Beaker)
      2.1.5 บิวเรต (Burette)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.6 ปิเปต (Pipette)

2.1.7 ขวดปริมาตร (Volumetric flask)

2.1.8 แท่งแก้วคนสาร (Stirrer rod)

2.1.9 ช้อนตักสารเคมี (Spatula)

2.1.10 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)

2.1.11 ลูกยางดูดปิเปต (Bulb)

2.1.12 ปากคีบ (Forceps)

2.1.13 ถ้วยอะลูมิเนียม (Aluminum weighing dishes)

2.1.14 กระดาษกรอง GF/C ขนาด 4.7 เซนติเมตร

2.1.15 ชุดกรวยบุชเนอร์ (Buchner funnel)

2.1.16 คิวเวตต์ (Cuvette)

2.1.17 ขวดเจลดาลห์ (Kjeldahl flask)

2.1.18 กระดาษกรอง ขนาด 11 เซนติเมตร เบอร์ 40

2.1.19 ถ้วยระเหย (Evaporating disc)

2.1.20 กรวยแยก (Separatory Funnel)

2.1.21 กรวยกรอง (Funnel)

2.1.22 ขาตั้งพร้อมตัวหนีบยึด

2.1.23 ขวดบีโอดี (BOD bottle)

2.1.24 โหลแก้วสำหรับเตรียมน้ำเจือจาง

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

2.2.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

2.2.2 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)

2.2.3 ห่วงถ่ายเชื้อ และเข็มเขี่ยเชื้อ(Loop and Needle)

2.2.4 ปิเปตปลอดเชื้อ (Sterile pipette)

2.2.5 กระบอกใส่ปิเปต (Pipette canister)

2.2.6 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (Duran bottle)

2.2.7 หลอดทดลอง (Test tube) ที่ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)

2.2.8 สไลด์ย้อมสีแกรม (Microscope slide)

2.2.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

2.2.10 ถุงพลาสติกและยาง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.11 กระดาษทิชชูและสำลี

2.2.12 อะลูมิเนียมฟอยด์

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองประสิทธิภาพของแบคทีเรียหลักแบบเฉพาะเจาะจง

2.3.1 เครื่องจ่ายลม ยี่ห้อ Sonic double type10000

2.3.2 ลูกฟู่ ข้อแยกพร้อมวาล์วปรับลม

2.3.3 สายยาง

2.3.4 ถังพลาสติก ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่ใช้ในการทดลอง (สูตรอาหารดู ภาคผนวก ค)

3.1 *Pseudomonas* CFC Agar (Atlas, 2005)

3.2 *Zoogloea* Medium (Atlas, 2005)

3.3 *Bacillus* Medium (Atlas, 2005)

3.4 Trypticase Soy Agar (สมบรูณ์, 2553)

3.5 Medium for Ammonia-Oxidizing Bacteria (Atlas, 2005)

4. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีแกรม การทดสอบแคตาเลส และการทดสอบออกซิเดส (ดวงพร, 2537; ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2547) การเตรียมสารเคมีดู ภาคผนวก ค

4.1 เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

4.2 Crystal violet

4.3 Safranin

4.4 สารละลายไอโอดีน

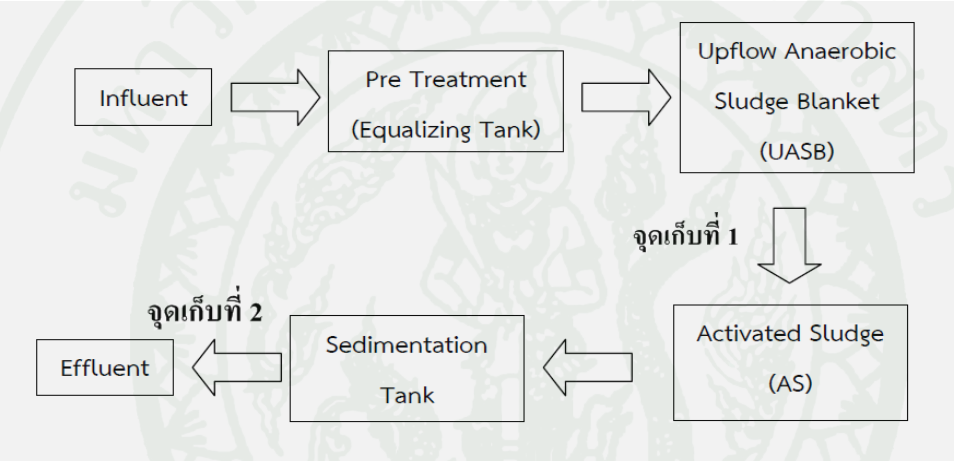
4.5 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

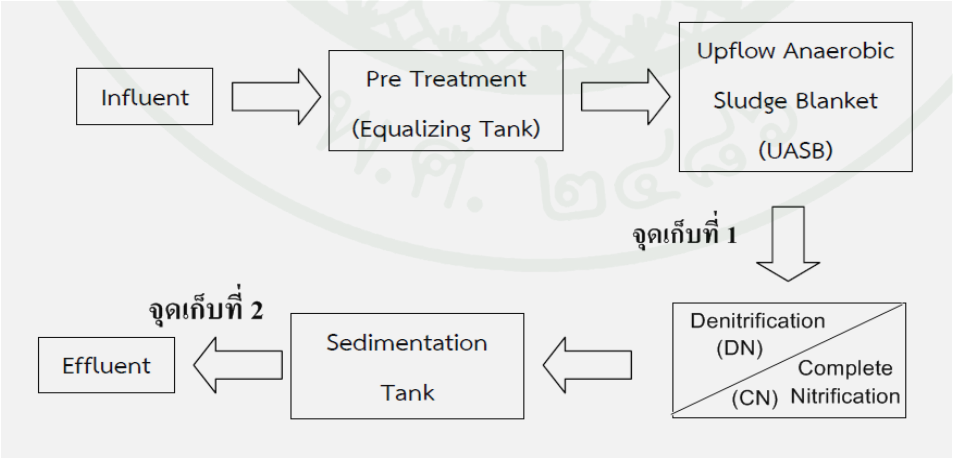
วิธีการ

1. ตัวอย่างน้ำเสียและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียทางเคมี

เก็บตัวอย่างน้ำเสียเข้าและออกจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง จำนวน 3 โรงงาน ที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียดังนี้ การบำบัดขั้นต้น (Primary treatment) ด้วยตะแกรงดักขยะ/บ่อดักไขมัน และผ่านระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบ UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) ก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง ดังภาพที่ 13 และ 14



ภาพที่ 13 แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำเสียโรงงานที่ 1 และ 2



ภาพที่ 14 แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำเสียโรงงานที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำตัวอย่างน้ำเสียจากจุดเก็บที่ 1 และจุดเก็บที่ 2 ของโรงงานที่ 1, 2 และ 3 (ภาพที่ 12 และ 13) มาวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางเคมี คือ pH, BOD, COD, TKN, TP, TSS และ Oil and Grease โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตาม Standard Methods for Examination of water and wastewater, 20th Edition ดังตารางที่ 9 ทั้งนี้วิธีการวิเคราะห์และการเตรียมสารเคมีดูที่ภาคผนวก ก

ตารางที่ 9 พารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์น้ำเสีย

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์
pH	pH Meter ยี่ห้อ Hanna
BOD	Azide Modification Method
COD	Closed Reflux Method
TKN	Macro-Kjeldahl Method
TP	Ascorbic Acid Method
TSS	Gravimetric Method
Grease and Oil	Partition Gravimetric

2. การคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง

ทำการคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสียจากบ่อเติมอากาศ ของโรงงานที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง และน้ำเสียจากบ่อแอน็อกซิกและบ่อแอโรบิกของโรงงานที่ 3 ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารไนโตรเจน ด้วยวิธีการ spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ทั้งนี้กลุ่มแบคทีเรียที่ศึกษาคือ *Zoogloea* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Nitrosomonas* spp. และ *Acinetobacter* spp. และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียที่ศึกษา แสดงดังตารางที่ 10

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะสำหรับคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสีย

แบคทีเรีย	อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ
Zoogloea spp.	*Zoogloea* Medium (Atlas, 2005)
Pseudomonas spp.	*Pseudomonas* CFC Agar (Atlas, 2005)
Bacillus spp.	*Bacillus* Medium (Atlas, 2005)
Nitrosomonas spp.	Medium for Ammonia-Oxidizing Bacteria(Atlas, 2005)
Acinetobacter spp.	Trypticase Soy Agar (สมบูรณ์, 2553)

2.1 การคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate มีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะตามสูตรอาหารในภาคผนวก ค นำอาหารที่เตรียมเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.1.2 นำอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นรอให้วุ้นอาหารแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการตรวจเช็คการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงเชื้อขณะทำการเทอาหาร

2.1.3 นำตัวอย่างน้ำเสียมาเจือจางให้สามารถ spread plate อยู่ในช่วงจำนวนโคโลนีเท่ากับ 30-300 โคโลนี จากนั้นปิเปตน้ำเสียในหลอดเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะตามตารางที่ 10 ใช้ spreader ที่จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และผ่านเปลวไฟระยะหนึ่งเกลี่ยให้ทั่วจานเพาะเชื้อจนรู้สึกหนืด ทำ 2 ค่าความเจือจางและค่าความเจือจางละ 2 ซ้ำ บันทึกข้อมูลบนจานเพาะเชื้อ คว่ำจานเพาะเชื้อและบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดพร้อมทั้งสังเกตลักษณะของโคโลนี จากนั้นอีก 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีพร้อมทั้งสังเกตลักษณะของโคโลนีอีกครั้ง บันทึกข้อมูล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การทำเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ streak plate

คัดเลือกโคโลนีที่มีจำนวนมากที่สุดในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะจากข้อ 2.1 ที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จาก ววว. มา streak plate โดยใช้เทคนิค cross streak ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ เพื่อเป็นการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ผ่านการเผาไฟจนแดงระยะหนึ่งแตะโคโลนีที่คัดเลือกแล้วขีด (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะจนได้ 4 แนว ทำอย่างละ 2 ซ้ำ บันทึกข้อมูลลงบนจานเพาะเชื้อ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีว่ามีลักษณะเดียวกับโคโลนีที่เลือก และเกิดเป็นโคโลนีเดี่ยวซึ่งหมายถึงเชื้อมีความบริสุทธิ์ (สาวิตรี, 2552) จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้เก็บในอาหารวุ้นเอียง (slant agar) และนำไปจำแนกเชื้อในขั้นตอนต่อไป

3. การจำแนกสกุลของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง

นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากการ streak plate ในข้อ 2.2 ของแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะมาจำแนกชนิดตามหลักการของ Bergey's manual of determinative bacteriology, 2nd Edition ดังนี้

3.1 การย้อมสีแกรม

3.1.1 นำโคโลนีเดี่ยวในข้อ 2.2 ของแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่มีอายุในช่วง 24-48 ชั่วโมงมาย้อมสีแกรม โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ผ่านการเผาไฟจนแดงระยะหนึ่งเขี่ยโคโลนีแล้วนำมาเกลี่ย (smear) เป็นวงกลมลงบนสไลด์ที่มีหยดน้ำเล็กน้อยจนแห้ง จากนั้นนำสไลด์ผ่านเปลวไฟเพื่อเป็นการตรึงเชื้อให้ติดสไลด์

3.1.2 นำสไลด์ที่ตรึงเชื้อมาหยดด้วยสี crystal violet ให้ท่วมรอยเกลี่ยเป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำเปล่า

3.1.3 หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยเกลี่ยเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้งล้างด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมาแต่อย่าให้เกิน 20 วินาทีแล้วล้างด้วยน้ำเปล่าทันที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.4 หยดสี safranin ให้ท่วมรอยเกลี่ยเป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้งล้างด้วยน้ำเปล่าซับด้วยกระดาษซับทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อดูการติดสีแกรมและรูปร่าง

3.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสและออกซิเดส

3.2.1 นำโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 2.2 ในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่มีอายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง มาทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่ผ่านการเผาไฟจนแดงระยะหนึ่งเขี่ยโคโลนี จากนั้นนำมาแตะกับ 3% H_2O_2 ที่หยดไว้บนสไลด์ ผลบวกคือเกิดฟองแก๊ส ผลลบคือไม่เกิดฟอง

3.2.2 นำโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 2.2 ในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่มีอายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่ผ่านการเผาไฟจนแดงระยะหนึ่งเขี่ยโคโลนี จากนั้นขีดห่วงเขี่ยเชื้อที่มีโคโลนีของแบคทีเรียลงบนกระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วย 0.5% tetramethyl-para phenylenediamine HCl ผลบวกคือเกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที ผลลบคือไม่เกิดสีม่วงภายใน 10 วินาที

3.3 การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่

เป็นการจำแนกและศึกษาการเคลื่อนที่ของ *Nitrosomonas* spp. โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารกึ่งเหลวกึ่งแข็ง (semi-solid medium) ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test) โดยการนำโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ Medium for Ammonia-Oxidizing Bacteria อายุ 24 ชั่วโมงมา stab ลงในอาหารกึ่งเหลวกึ่งแข็ง บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อกระจายไปจากแนวที่ stab แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการเคลื่อนที่

4. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียหลักแบบเฉพาะเจาะจงด้วยถังปฏิกรณ์ในระดับปฏิบัติการแบบเป็นกะ (Batch Reactor)

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียหลักแบบเฉพาะเจาะจงด้วยถังปฏิกรณ์ในระดับปฏิบัติการแบบเป็นกะ (Batch Reactor) มีขั้นตอนดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1 นำแบคทีเรียจากตารางที่ 11 มาเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ streak plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะจนได้โคโลนีเดี่ยว นำโคโลนีเดี่ยวที่มีอายุ 24 ชั่วโมงมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (TSB: Tryptic Soy Broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียมาวัดความขุ่นของเชื้อด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร (optical density: OD_{600}) กำหนดให้ค่า OD_{600} อยู่ในช่วง 0.5-1.2 หากค่า OD_{600} ของแบคทีเรียมากกว่า 0.5 ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จนได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 ก่อนนำไปทดสอบด้วยถังปฏิกรณ์ในระดับปฏิบัติการแบบเป็นกะ

4.2 เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 ลงในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนของสารละลายเชื้อแบคทีเรียต่อน้ำเสียเท่ากับ 5: 95 (สารละลายเชื้อ 15 มิลลิลิตร: น้ำเสีย 285 มิลลิลิตร) ทำอย่างละ 3 ซ้ำ พร้อมทั้งขวดควบคุมที่มีน้ำเสียปริมาตร 300 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด จากนั้นเติมอากาศด้วยปั๊มจ่ายลมที่มีอัตราการเติมออกซิเจนเท่ากับ 5.5 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

4.3 เก็บตัวอย่างน้ำเสียที่เวลา 2, 4 และ 5 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าซีโอดี ซึ่งเป็นเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำเสียตามค่าการออกแบบของระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่กำหนดให้มีค่าระยะกักเก็บน้ำ 3-5 ชั่วโมง (Tchobanoglous et al., 2004)

ตารางที่ 11 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย

แบคทีเรียบริสุทธิ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)	แบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยกในน้ำเสียของโรงงานที่ 1
Acinetobacter calcoaceticus TISTR 1264	*Acinetobacter* sp.
Bacillus sp. TISTR 028	*Bacillus* sp.
Pseudomonas sp. TISTR 902	*Pseudomonas* sp.
Zoogloea ramigera TISTR 1326	*Zoogloea* sp.
	Nitrosomonas sp.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียทางเคมี

จากผลการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำเข้าและน้ำออกจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง จำนวน 3 โรงงาน ที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียดังนี้ การบำบัดขั้นต้น (Primary treatment) ด้วยตะแกรงดักขยะ/บ่อดักไขมัน และผ่านระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบ UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) ก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง ทั้งนี้คุณลักษณะน้ำเข้าและน้ำออกโดยเฉลี่ยจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของทั้ง 3 โรงงาน แสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 คุณลักษณะน้ำเข้า - น้ำออกโดยเฉลี่ยจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานที่ทำการศึกษา

พารามิเตอร์	โรงงานที่ 1		โรงงานที่ 2		โรงงานที่ 3	
	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก
pH	6.58	6.85	7.01	7.28	6.64	7.01
BOD (mg/l)	774	40	806	52	949	127
COD (mg/l)	1,487	390	3,447	487	3,990	426
TP (mg/l)	395.9	41.1	316.7	38.1	517.2	14.1
TKN (mg/l)	103	7	322	54	429	111
TSS (mg/l)	261	40	2,753	30	3,163	43
Grease and oil (mg/l)	115	34.4	30.3	24.1	196.3	69.4

น้ำเข้าและน้ำออกโดยเฉลี่ยของทั้ง 3 โรงงานซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.58-7.28 ซึ่งมีค่าเหมาะกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มักควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.5-8.5 (สุรพล, 2538) ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีและตะกอนแบคทีเรียของระบบบำบัดน้ำเสียสามารถจมตัวได้ดี (สันทัด, 2549) ส่วนค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำเข้าทั้ง 3 โรงงาน ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่บ่งบอกถึงปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสีย หรือบ่งบอกถึงปริมาณสารอาหารของแบคทีเรียมีค่าโดยเฉลี่ยไม่แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามโรงงานที่ 3 มีค่าสูงที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้น้ำเข้าของโรงงานที่ 3 พบ ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด ค่าทีเคเอ็น ค่าของแข็งแขวนลอย และค่าน้ำมันและไขมันมีค่าสูงกว่าโรงงานที่ 1 และ 2 เช่นกัน แต่ไม่แตกต่างกันมาก อีกทั้งค่าพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำออกทั้ง 3 โรงงาน มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับน้ำเข้าในทุกพารามิเตอร์

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของโรงงานที่ 1 ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.61-7.14 มีประสิทธิภาพในการลดค่าบีโอดีโดยเฉลี่ยร้อยละ 96 ลดค่าซีโอดีได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 70 มีเพียงเดือนที่ 4 สามารถลดค่าซีโอดีได้เพียงร้อยละ 59.3 นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการลดค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด ค่าทีเคเอ็น และค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมดได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 80 และค่าไขมันและน้ำมันของเดือนที่ 1 สามารถลดได้ร้อยละ 85 ในขณะที่ค่าไขมันและน้ำมันของเดือนที่ 2, 3 และ 4 ลดได้เพียงร้อยละ 61.3, 62.3 และ 36.6 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียโรงงานที่ 1

เดือนที่	พีเอช	ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย (ร้อยละ)					
		บีโอดี	ซีโอดี	ฟอสฟอรัสทั้งหมด	ทีเคเอ็น	ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด	ไขมันและน้ำมัน
1	7.14	96.4	93.8	88.8	99.3	82.3	85.0
2	6.90	96.1	78.1	86.3	94.1	87.9	61.3
3	6.75	84.2	73.9	91.2	93.5	92.0	62.8
4	6.61	96.6	59.3	90.8	85.7	79.3	36.6

โรงงานที่ 2 ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.11-7.38 มีประสิทธิภาพในการลดค่าบีโอดีโดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 90 ส่วนค่าซีโอดีของเดือนที่ 1 และ 2 สามารถลดได้เพียงร้อยละ 43.7 และ 65.0 ตามลำดับ ขณะที่เดือนที่ 3 และ 4 สามารถลดค่าซีโอดีได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 80 นอกจากนี้โรงงานที่ 2 ยังมีประสิทธิภาพในการลดค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด ค่าทีเคเอ็น และค่าไขมันและน้ำมันได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 50 แสดงดังตารางที่ 14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียโรงงานที่ 2

เดือนที่	พีเอช	ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย (ร้อยละ)					
		บีโอดี	ซีโอดี	ฟอสฟอรัสทั้งหมด	ทีเคเอ็น	ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด	ไขมันและน้ำมัน
1	7.38	90.0	43.7	72.7	62.7	85.2	38.5
2	7.25	93.6	65.0	74.0	75.7	97.3	61.3
3	7.36	96.2	91.7	91.4	91.4	99.4	75.4
4	7.11	92.3	88.7	93.4	98.9	99.2	55.6

ส่วนโรงงานที่ 3 ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.72-7.34 และมีประสิทธิภาพในการลดค่าบีโอดีโดยเฉลี่ยได้มากกว่าร้อยละ 90 ส่วนค่าซีโอดี ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด และค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด สามารถลดได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 80 ค่าทีเคเอ็นสามารถลดได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 60 ยกเว้นในเดือนที่ 1 ไม่สามารลดค่าทีเคเอ็นได้ ขณะที่ค่าไขมันและน้ำมันมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันในแต่ละเดือน แสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียโรงงานที่ 3

เดือนที่	พีเอช	ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย (ร้อยละ)					
		บีโอดี	ซีโอดี	ฟอสฟอรัสทั้งหมด	ทีเคเอ็น	ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด	ไขมันและน้ำมัน
1	7.00	68.8	80.2	95.9	-126.2	99.3	43.8
2	7.34	92.5	94.6	97.5	79.8	99.0	74.2
3	6.99	94.1	92.3	96.9	63.1	98.3	61.0
4	6.72	92.8	87.5	98.7	98.1	98.5	91.0

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของทั้ง 3 โรงงาน พบว่าโรงงานที่ 1, 2 และ 3 มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.61-7.38 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีคืออยู่ในช่วง 6.5-8.5 (สุรพล, 2538) นอกจากนี้ทั้ง 3 โรงงาน สามารถลดค่าบีโอดีโดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 90 ทั้งนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพดังกล่าวเป็นไปตามค่าการออกแบบของระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่ออกแบบไว้ให้สามารถลดค่าบีโอดีได้ร้อยละ 85-95 (Tchobanoglous *et al.*, 2004) ในขณะที่โรงงานที่ 3 สามารถลดค่าซีโอดีได้โดยเฉลี่ยมากที่สุดคือ มากกว่าร้อยละ 90 เป็นส่วนใหญ่

สำหรับค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด ค่าทีเคเอ็น และค่าน้ำมันและไขมัน ทั้ง 3 โรงงาน สามารถลดได้โดยเฉลี่ยในแต่ละเดือนมากกว่าร้อยละ 50 ยกเว้นโรงงานที่ 3 ที่ข้อมูลในเดือนที่ 1 ไม่สามารถลดค่าทีเคเอ็นได้ อีกทั้งน้ำออกจากระบบมีค่าทีเคเอ็นเพิ่มขึ้นในขณะที่เดือนอื่นสามารถลดค่าทีเคเอ็นได้มากกว่าร้อยละ 63.1-98.1 ดังตารางที่ 13 เกิดจากน้ำเสียในเดือนที่ 1 มีค่าบีโอดีสูงและค่าทีเคเอ็นต่ำ (ดูภาคผนวก ข) มีผลทำให้อัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็น (BOD_5/ TKN ratio) สูงเกินไป ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน กล่าวคือหากอัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็นมีค่ามากกว่า 3 ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารไนโตรเจนจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันลดลง (Tchobanoglous *et al.*, 2004; Bitton, 2005)

ส่วนค่าฟอสฟอรัสทั้งหมดเมื่อพิจารณาแล้วพบว่าโรงงานที่ 3 สามารถลดค่าฟอสฟอรัสทั้งหมดได้มากที่สุดถึงร้อยละ 95.9-98.7 เนื่องจากโรงงานที่ 3 ใช้ระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งที่มีการกำจัดไนโตรเจนซึ่งมีกระบวนการเดินระบบที่คล้ายคลึงกับระบบที่มีการกำจัดสารฟอสฟอรัส คือเป็นระบบที่ไม่ใช้ออกซิเจนต่อเนื่องกับระบบที่ใช้ออกซิเจน (สุบัณฑิต, 2548) จึงทำให้เกิดการกำจัดไนโตรเจนควบคู่กับการกำจัดฟอสฟอรัส ด้วยเหตุนี้โรงงานที่ 3 จึงสามารถลดค่าฟอสฟอรัสทั้งหมดได้มากกว่าโรงงานที่ 1 และ 2 ซึ่งมีคุณลักษณะของน้ำเข้าใกล้เคียงกัน

2. การคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง

2.1 การคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate

การคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate เป็นวิธีที่เหมาะต่อการหาจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม aerobic bacteria ทั้งนี้งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบคทีเรียหลักในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน แบคทีเรียที่ศึกษาจึงเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) ดังนั้นจึงใช้วิธีการคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ *Pseudomonas* CFC Agar, *Zoogloea* Medium, *Bacillus* Medium, Trypticase Soy Agar และ Medium for Ammonia-Oxidizing

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bacteria (AOB) ในน้ำเสียจากบ่อเติมอากาศของโรงงานที่ 1 และ 2 และน้ำเสียจากบ่อแอน็อกซิกและบ่อแอโรบิกของโรงงานที่ 3 เมื่อทำการคัดแยกและหาจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสียของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็งในช่วง 2 เดือนสุดท้าย (เดือนที่ 3 และเดือนที่ 4) พบว่าการคัดแยกแบคทีเรียในบ่อเติมอากาศของโรงงานที่ 1 และ 2 มีจำนวนโคโลนีแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Zoogloea* Medium มากที่สุด ขณะที่ในบ่อแอน็อกซิกของโรงงานที่ 3 มีจำนวนโคโลนีแบคทีเรียเจริญได้มากที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* CFC Agar ส่วนในบ่อแอโรบิกของโรงงานที่ 3 พบจำนวนโคโลนีแบคทีเรียเจริญได้มากที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium for AOB แสดงดังตารางที่ 16 และ 17

ตารางที่ 16 จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะแต่ละชนิดครั้งที่ 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ	CFU/ml			
	บ่อเติมอากาศ โรงงานที่ 1	บ่อเติมอากาศ โรงงานที่ 2	บ่อแอน็อกซิก โรงงานที่ 3	บ่อแอโรบิก โรงงานที่ 3
Zoogloea Medium	2.6×10^9	7.5×10^7	2.1×10^6	5.5×10^6
Pseudomonas CFC Agar	1.4×10^8	3.8×10^6	4.3×10^7	8.9×10^6
Bacillus Medium	2.3×10^7	3.9×10^6	2.2×10^6	1.7×10^6
Trypticase Soy Agar	1.3×10^7	6.7×10^6	5.8×10^6	1.3×10^6
Medium for AOB	1.2×10^6	5.4×10^6	9.3×10^6	1.2×10^9

ตารางที่ 17 จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะแต่ละชนิดครั้งที่ 2

อาหารเลี้ยงเชื้อ	CFU/ml			
	บ่อเติมอากาศ โรงงานที่ 1	บ่อเติมอากาศ โรงงานที่ 2	บ่อแอน็อกซิก โรงงานที่ 3	บ่อแอโรบิก โรงงานที่ 3
Zoogloea Medium	1.6×10^9	5.1×10^7	1.7×10^6	1.2×10^6
Pseudomonas CFC Agar	2.6×10^8	1.3×10^6	1.2×10^7	1.3×10^6
Bacillus Medium	9.6×10^7	1.5×10^6	8.3×10^6	1.4×10^6
Trypticase Soy Agar	7.6×10^7	7.9×10^6	7.7×10^6	1.8×10^6
Medium for AOB	1.6×10^6	1.1×10^6	8.7×10^6	1.5×10^9

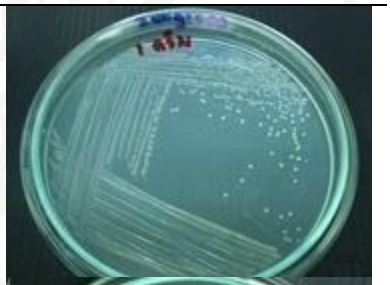
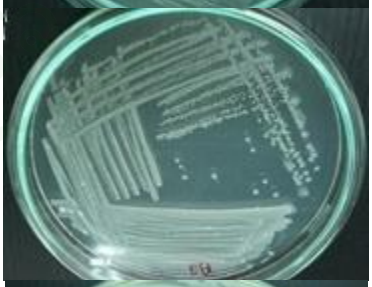
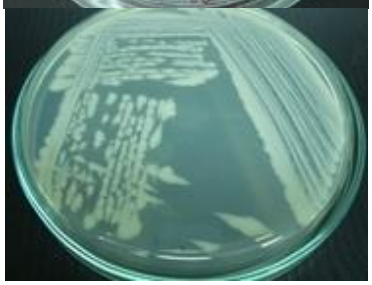
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อพิจารณาจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงโดยรวมกับประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียของทั้ง 3 โรงงาน พบว่าจำนวนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความสอดคล้องกับประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียกล่าวคือ จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในการคัดแยกครั้งที่ 1 มีจำนวนมากกว่าครั้งที่ 2 และประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียในเดือนที่ 3 มีประสิทธิภาพมากกว่าในเดือนที่ 4 (ตารางที่ 13, 14 และ 15) ดังนั้นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียมีแนวโน้มทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียเพิ่มขึ้น เช่น การลดค่าบีโอดี ค่าซีโอดี เป็นต้น

2.1 การทำเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ streak plate

นำโคโลนีที่มีจำนวนมากที่สุดในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะของครั้งที่ 2 ที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จาก วว. มา spread plate โดยใช้เทคนิค cross streak ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะอีกครั้ง เพื่อเป็นการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ซึ่งลักษณะที่ได้จากการ cross streak แสดงดังตารางที่ 18-21

ตารางที่ 18 ลักษณะโคโลนีที่มีจำนวนมากที่สุดในบ่อเติมอากาศของโรงงานที่ 1

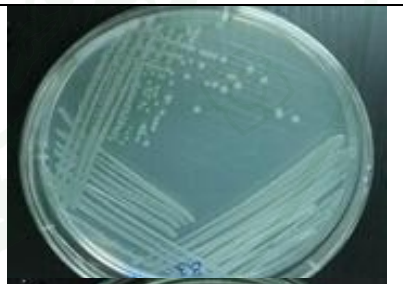
อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Zoogloea Medium	สีขาว กลมทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 2 มม.	
Pseudomonas CFC Agar	สีขาว กลมทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 2 มม.	
Bacillus Medium	สีขาว กลม ขอบเรียบ ผิวแห้ง	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 18 (ต่อ)

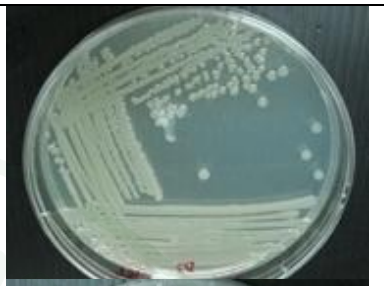
อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Trypticase Soy Agar	สีครีม กลมนูน วาวทึบแสง ขอบเรียบ	
Medium for AOB	สีขาว กลม โปร่งแสง ขนาด 1 มม.	

ตารางที่ 19 ลักษณะโคโลนีที่มีจำนวนมากที่สุดในบ่อเติมอากาศของโรงงานที่ 2

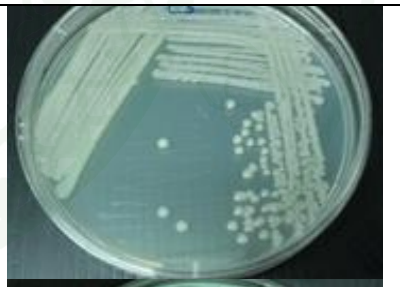
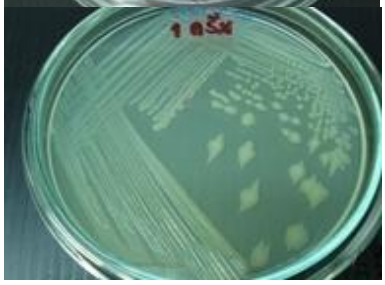
อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Zoogloea Medium	สีขาว กลมทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 2 มม.	
Pseudomonas CFC Agar	สีขาว มีเมือก กลมนูน วาวทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 3 มม.	
Bacillus Medium	สีครีม กลม ขอบเรียบ ผิวแห้ง	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 19 (ต่อ)

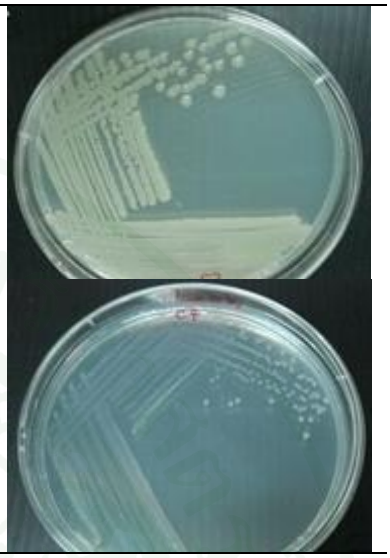
อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Trypticase Soy Agar	สีครีม กลมนูน วาวทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 3-4 มม.	
Medium for AOB	สีขาว กลม โปร่งแสง ขนาด 1 มม.	

ตารางที่ 20 ลักษณะโคโลนีที่มีจำนวนมากที่สุดในบ่อแอน็อกซิกของโรงงานที่ 3

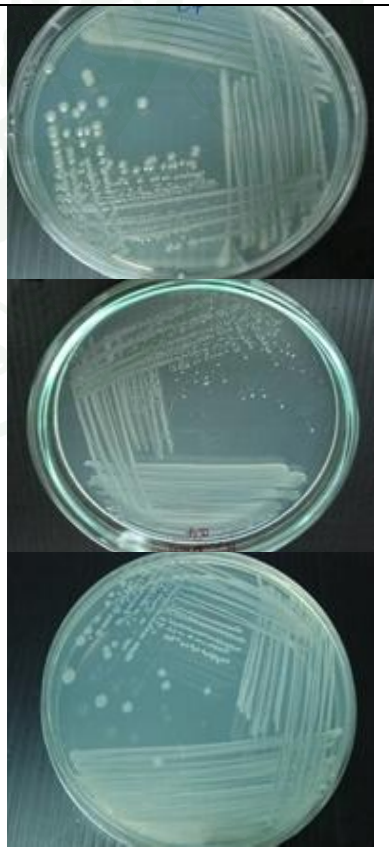
อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Zoogloea Medium	สีครีม กลมวาว ทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 3 มม.	
Pseudomonas CFC Agar	สีขาว กลมทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 2 มม.	
Bacillus Medium	สีครีม กลม ขอบเรียบ ผิวแห้ง	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 20 (ต่อ)

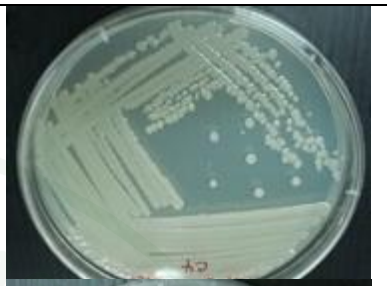
อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Trypticase Soy Agar	สีครีม กลมนูน วาวทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 4 มม.	
Medium for AOB	สีขาว กลมมีเมือก โปร่งแสง ขนาด 1 มม.	

ตารางที่ 21 ลักษณะโคโลนีที่มีจำนวนมากที่สุดในบ่อแอโรบิกของโรงงานที่ 3

อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Zoogloea Medium	สีครีม กลมนูน วาวทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 3-4 มม.	
Pseudomonas CFC Agar	สีขาว กลมทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 2 มม.	
Bacillus Medium	สีครีม กลม ขอบเรียบ ผิวแห้ง	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 21 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ	ลักษณะโคโลนี	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี
Trypticase Soy Agar	สีครีม กลมนูน วาวทึบแสง ขอบเรียบ ขนาด 4 มม.	
Medium for AOB	สีขาว กลมมีเมือก โปร่งแสง ขนาด 1 มม.	

ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น มีลักษณะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (incubate) กล่าวคือหากเพาะเลี้ยงในอาหาร Differential medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่บอกความแตกต่างของจุลินทรีย์ 2-3 กลุ่มโดยเชื้อที่เจริญบนอาหารจะมีสีที่แตกต่าง หรือทำให้อาหารเปลี่ยนสีจึงสามารถทำให้จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สนใจได้ (จุรีรัตน์, 2552) ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อในการศึกษานี้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียชนิดที่ต้องการให้เจริญและเพิ่มจำนวน ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่สนใจจะเจริญได้น้อยหรือยับยั้งการเจริญ (สาวิตรี, 2552) จากการศึกษาในครั้งนี้ลักษณะโคโลนีมีความคล้ายคลึงกันไม่สามารถแยกชนิดของแบคทีเรียได้ ต้องจำแนกชนิดของแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธีการย้อมสีแกรม การทดสอบแคตาเลสและออกซิเดสต่อไป

3. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียในน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง

เมื่อนำโคโลนีที่ได้จากการ cross streak ซึ่งเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะมาย้อมสีแกรม ทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสและออกซิเดส ผลจากการจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่ได้เทียบกับการจำแนกแบคทีเรียของ Bergey's manual of determinative bacteriology, 2nd Edition แสดงดังตารางที่ 22 และ 23

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 22 ผลติดสีแกรม รูปร่าง การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสและออกซิเดส ของแบคทีเรียในน้ำเสีย

สถานที่	โคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ผลแคตาเลส	ผลออกซิเดส
บ่อเติมอากาศ โรงงานที่ 1	*Zoogloea* Medium	-	ท่อน	+	+
	Bacillus Medium	+	ท่อน	+	n
	Pseudomonas CFC Agar	-	ท่อน	+	+
	Trypticase Soy Agar	-	ท่อน	+	-
	Medium for AOB	-	ท่อน	n	n
บ่อเติมอากาศ โรงงานที่ 2	*Zoogloea* Medium	-	ท่อน	+	+
	Bacillus Medium	+	ท่อน	+	n
	Pseudomonas CFC Agar	-	ท่อน	+	+
	Trypticase Soy Agar	-	ท่อน	+	-
	Medium for AOB	-	ท่อน	n	n
บ่อแอน็อกซิก โรงงานที่ 3	*Zoogloea* Medium	-	ท่อน	+	+
	Bacillus Medium	+	ท่อน	+	n
	Pseudomonas CFC Agar	-	ท่อน	+	+
	Trypticase Soy Agar	-	ท่อน	+	-
	Medium for AOB	-	ท่อน	n	n
บ่อแอโรบิก โรงงานที่ 3	*Zoogloea* Medium	-	ท่อน	+	+
	Bacillus Medium	+	ท่อน	+	n
	Pseudomonas CFC Agar	-	ท่อน	+	+
	Trypticase Soy Agar	-	ท่อน	+	-
	Medium for AOB	-	ท่อน	n	n

n = ไม่ได้ทำการทดสอบ (no test) เนื่องจากไม่มีการจัดจำแนกด้วยวิธีดังกล่าว

+ = ให้ผลบวก (positive); catalase test คือเกิดฟองแก๊ส oxidase test คือเกิดสีม่วงใน10 วินาที

- = ให้ผลลบ (negative); catalase test คือไม่เกิดฟอง oxidase test คือ ไม่เกิดสีม่วงใน 10 วินาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

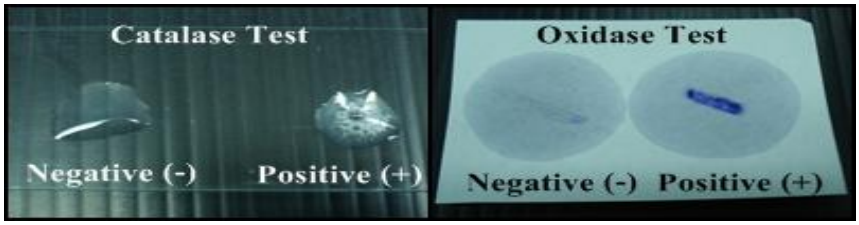
ตารางที่ 23 การจัดจำแนกแบคทีเรียของ Bergey's manual of determinative bacteriology

แบคทีเรีย	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ผลแคตาเลส	ผลออกซิเดส
Zoogloea spp.	-	ท่อน	+	+
Bacillus spp.	+	ท่อน	+	ND
Pseudomonas spp.	-	ท่อน	+	+
Acinetobacter spp.	-	ท่อน	+	-
Nitrosomonas spp.	-	ท่อน	ND	ND

ND = ไม่มีข้อมูล (no data) คือ ไม่มีการจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธีดังกล่าว

ผลจากตารางที่ 22 พบว่ามีผลสอดคล้องกับลักษณะของแบคทีเรียกลุ่มที่ได้จัดจำแนกไว้ในตารางที่ 23 โดย Bergey's manual of determinative bacteriology, 2nd Edition (Buchanan and Gibbons, 1957) ที่ได้อธิบายไว้ว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Zoogloea* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. และ *Nitrosomonas* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีลักษณะเซลล์เป็นท่อน เมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส *Zoogloea* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Acinetobacter* spp. ให้ผลบวก (ภาพที่ 15) ทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส *Zoogloea* spp. และ *Pseudomonas* spp. ให้ผลบวก ในขณะที่ *Acinetobacter* spp. ให้ผลลบ ส่วน *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) ลักษณะเซลล์เป็นท่อน มีการสร้างเอนโดสปอร์ และเมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสให้ผลบวก จากตารางที่ 22 จะเห็นว่าโคโลนีที่เจริญเติบโตในอาหาร Medium for AOB ซึ่งเป็นอาหารเพาะเลี้ยง *Nitrosomonas* spp. ไม่ได้ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสและออกซิเดส เนื่องจาก *Nitrosomonas* spp. ไม่มีการกล่าวถึงวิธีการจัดจำแนกด้วยวิธีการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสและออกซิเดส นอกจากนี้โคโลนีที่เจริญเติบโตในอาหาร *Bacillus* Medium ซึ่งเป็นอาหารเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp. ไม่ได้ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส เนื่องจากไม่มีการกล่าวถึงวิธีการจัดจำแนก *Bacillu* spp. ด้วยวิธีการทดสอบออกซิเดสเช่นกัน ทั้งนี้ ภาพแสดงการติดสีแกรมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสีย เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ดูภาคผนวก ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 แสดงผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสและออกซิเดส

ทำการศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test) ของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium for AOB เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมจากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีการย้อมสีแกรม ผลจากการศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ของ *Nitrosomonas* spp. คือ เชื้อเกิดการกระจายไปจากแนวที่ stab ซึ่งหมายถึงแบคทีเรียมีการเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นผลที่มีความสอดคล้องกับการจำแนกชนิดแบคทีเรียของ Buchanan and Gibbons (1957) ที่อธิบายว่า *Nitrosomonas* spp. ส่วนใหญ่จะเคลื่อนที่ด้วย subpolar flagella ทั้งนี้ผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของ *Nitrosomonas* spp. แสดงดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ผลการทดสอบ motility test ของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium for AOB

สถานที่	ผลการทดสอบ motility test
บ่อเติมอากาศโรงงานที่ 1	+
บ่อเติมอากาศโรงงานที่ 2	+
บ่อแอน็อกซิกโรงงานที่ 3	+
บ่อแอโรบิกโรงงานที่ 3	+

+ = ให้ผลบวก (positive); เชื้อกระจายไปจากแนวที่ stab

- = ให้ผลลบ (negative); เชื้อไม่กระจายไปจากแนวที่ stab

จากผลข้างต้นเป็นการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีจำนวนมากที่สุดในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ พบว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหาร *Zoogloea* Medium, *Bacillus* Medium, *Pseudomonas* CFC Agar, Trypticase Soy Agar และ Medium for AOB มีคุณลักษณะเหมือนแบคทีเรียกลุ่ม *Zoogloea* , *Bacillus* , *Pseudomonas*, *Acinetobacter* และ *Nitrosomonas* ตามลำดับ และเมื่อนับจำนวนโคโลนีที่ผ่านการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (ตารางที่ 25) พบว่าในบ่อเติมอากาศ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของโรงงานที่ 1 มีปริมาณของ *Zoogloea* sp. มากที่สุดคือ $1.4x10^9$ CFU/ml รองลงมาพบ *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Nitrosomonas* sp. เท่ากับ $2.5x10^8$, $8.3x10^7$, $6.5x10^7$ และ $1.5x10^6$ CFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ในบ่อเติมอากาศของโรงงานที่ 2 มีปริมาณ *Zoogloea* sp. มากที่สุดเช่นกันคือ $4.2x10^7$ CFU/ml รองลงมาคือ *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Nitrosomonas* sp. เท่ากับ $6.1x10^6$, $1.2x10^6$, $1.1x10^6$ และ $1.0x10^6$ CFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่ในบ่อแอน็อกซิกของโรงงานที่ 3 พบ *Pseudomonas* sp. มากที่สุดคือ $1.0x10^7$ CFU/ml และพบ *Nitrosomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Zoogloea* sp. เท่ากับ $6.9x10^6$, $6.7x10^6$, $6.0x10^6$ และ $1.5x10^6$ CFU/ml ตามลำดับ ส่วนในบ่อแอโรบิกโรงงานที่ 3 พบ *Nitrosomonas* sp. มากที่สุดคือ $1.3x10^9$ CFU/ml และยังพบ *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. และ *Zoogloea* sp. มีปริมาณเท่ากับ $1.7x10^6$, $1.2x10^6$, $1.2x10^6$ และ $1.1x10^6$ CFU/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 25 แบคทีเรียที่มีจำนวนมากที่สุดในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

แบคทีเรีย	CFU/ml			
	บ่อเติมอากาศ โรงงานที่ 1	บ่อเติมอากาศ โรงงานที่ 2	บ่อแอน็อกซิก โรงงานที่ 3	บ่อแอโรบิก โรงงานที่ 3
Zoogloea sp.	$1.4x10^9$	$4.2x10^7$	$1.5x10^6$	$1.1x10^6$
Pseudomonas sp.	$2.5x10^8$	$1.1x10^6$	$1.0x10^7$	$1.2x10^6$
Bacillus sp.	$8.3x10^7$	$1.2x10^6$	$6.7x10^6$	$1.2x10^6$
Acinetobacter sp.	$6.5x10^7$	$6.1x10^6$	$6.0x10^6$	$1.7x10^6$
Nitrosomonas sp.	$1.5x10^6$	$1.0x10^6$	$6.9x10^6$	$1.3x10^9$

จากตารางที่ 25 ในบ่อเติมอากาศของโรงงานที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งมีจำนวนของ *Zoogloea* sp. มากที่สุดนั้นมีความสอดคล้องกับรายงานของสาวิตรี (2552) ที่อธิบายว่ามักพบ *Zoogloea* sp. ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง ซึ่งเป็นดัชนีบ่งบอกว่ามีสารอินทรีย์อยู่ในน้ำเสียค่อนข้างสูง และเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกลุ่มตะกอนหรือฟล๊อก (floc) (Bitton, 2005; Gerardi, 2006) ขณะที่โรงงานที่ 3 ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารไนโตรเจน พบว่าในบ่อแอน็อกซิกมีปริมาณ *Pseudomonas* sp. มากที่สุด เนื่องจากในบ่อดังกล่าวเป็นบ่อที่มีการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน ทั้งนี้เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟอิง และ *Pseudomonas* จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มดีไนตริไฟอิง (Gerardi, 2006) นอกจากนี้ Arquiaga *et al.* (1993) รายงานว่าสามารถพบ *Pseudomonas* ได้ในถังแอน็อกซิกร่วมกับกลุ่มที่ไม่ใช่แบคทีเรียดีไนตริไฟอิง เช่น *Acinetobacter* ซึ่งเมื่อพิจารณาจากตารางที่ 25 พบ *Acinetobacter* ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับ *Pseudomonas* เช่นกัน ทั้งนี้ สิรินันท์ และคณะ (2552) ยังได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ *Pseudomonas* พบว่า *Pseudomonas* มีประสิทธิภาพในการลดค่าไนเตรทในน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งได้ถึงร้อยละ 53 ด้วย ดังนั้นจึงสามารถพบ *Pseudomonas* sp. ได้มากในบ่อแอน็อกซิก

บ่อแอโรบิกของโรงงานที่ 3 พบ *Nitrosomonas* sp. จำนวนมากที่สุด เนื่องจากบ่อแอโรบิกมีปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันเกิดขึ้น และ *Nitrosomonas* เป็นแบคทีเรียไนตริฟิเคชันที่สามารถออกซิไดส์แอมโมเนียมไอออนไปเป็นไนเตรทได้ (Gerardi, 2006) ในสภาวะดังกล่าวจึงทำให้สามารถพบ *Nitrosomonas* ได้มากในบ่อแอโรบิกนี้ นอกจากนี้ยังสามารถพบแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. และ *Acinetobacter* sp. ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียข้างต้นที่ได้กล่าวไว้ ซึ่งจากการศึกษาของ Sidat *et al.* (1999) และ Sarioglu (2005) ได้รายงานว่า *Acinetobacter* เป็นแบคทีเรียที่สามารถบำบัดฟอสฟอรัสได้โดยการสะสมไว้ในเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ และเมื่อพิจารณาค่าฟอสฟอรัสทั้งหมดของน้ำออกจากระบบมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับน้ำเข้าระบบ ดังนั้นจึงทำให้สามารถพบ *Acinetobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถบำบัดฟอสฟอรัสได้ทั้ง 3 โรงงาน ส่วน *Bacillus* สุบัณฑิต (2548) อธิบายว่าเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีน ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง นอกจากนี้ Mongkolthanaruk and Dharmsthiti (2002) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* พบว่า *Bacillus* มีการสร้างเอนไซม์ protease และ amylase ซึ่งสามารถย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตได้ ทั้งนี้น้ำเสียจากโรงงานอาหารทะเลแช่แข็งมีองค์ประกอบของโปรตีนซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนเศษเลือด และเศษเนื้อของสัตว์ทะเลที่ใช้เป็นวัตถุดิบ และเมื่อพิจารณาค่าบีโอดีและค่าซีโอดีซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่แสดงถึงปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียพบว่าน้ำออกจากระบบของทั้ง 3 โรงงานมีค่าลดลงโดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 80 และ 70 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำเข้าของระบบ แสดงดังตารางที่ 13, 14 และ 15

4. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียหลักแบบเฉพาะเจาะจง ด้วยถังปฏิกรณ์ในระดับปฏิบัติการแบบเป็นกะ (batch reactor)

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยกและจำแนกในน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง ด้วยถัง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปฏิกรณ์ระดับปฏิบัติการแบบเป็นกะ (batch reactor) โดยทำการบ่มเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB (Tryptic Soy Broth) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่า OD_{600} แสดงดังตารางที่ 26

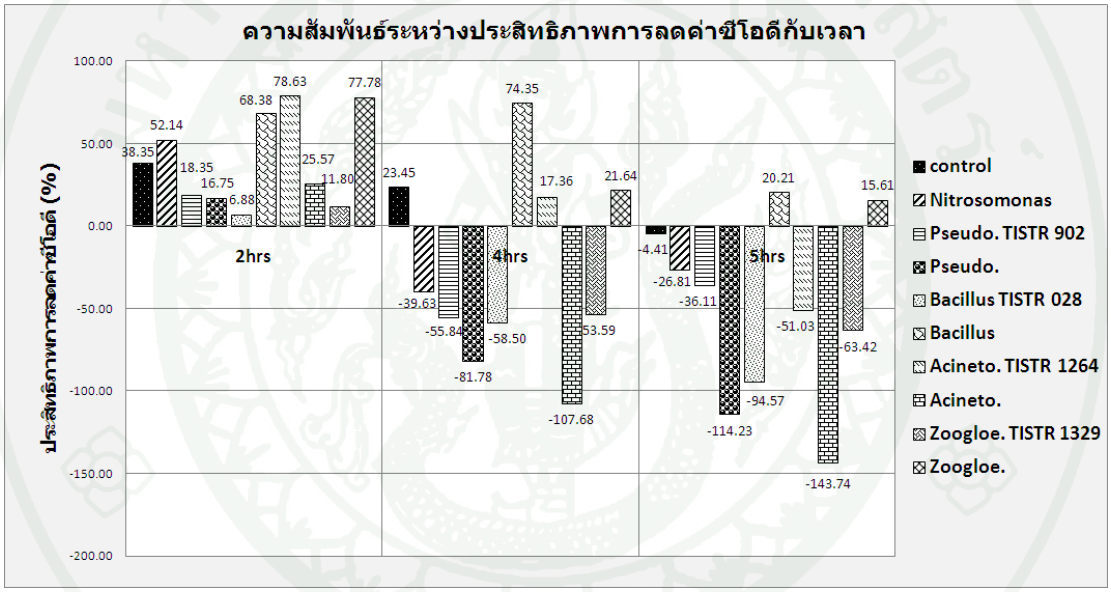
ตารางที่ 26 ค่า OD_{600} ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงของแบคทีเรียแต่ละชนิด

แบคทีเรีย	ค่า OD_{600} ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง
Acinetobacter calcoaceticus TISTR 1264	1.2
Acinetobacter sp.	1.0
Zoogloea ramigera TISTR 1329	0.5
Zoogloea sp.	1.0
Pseudomonas sp. TISTR 902	0.7
Pseudomonas sp.	1.0
Bacillus sp. TISTR 028	0.5
Bacillus sp.	1.0
Nitrosomonas sp.	0.9

ทำการเจือจางสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า OD_{600} มากกว่า 0.5 ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบเป็นกะ (batch reactor) โดยใช้อัตราส่วนของสารละลายเชื้อแบคทีเรียต่อน้ำเสียเท่ากับ 5:95 (สารละลายเชื้อแบคทีเรีย 15 มิลลิลิตร: น้ำเสีย 285 มิลลิลิตร) โดยมีถังควบคุมที่ใส่น้ำเสียปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอากาศด้วยปั๊มจ่ายลมที่อัตราการเติมออกซิเจนเท่ากับ 5.5 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำเสียที่เวลา 2, 4 และ 5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นไปตามค่าการออกแบบของระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่กำหนดให้มีระยะกักเก็บน้ำ 3-5 ชั่วโมง (Tchobanoglous et al., 2004) แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าซีโอดีเพื่อเป็นพารามิเตอร์ในการบ่งบอกประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการนำน้ำเสียจากโรงงานที่ 1 มาเป็นตัวแทนในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ซึ่งมีอัตราส่วนของบีโอดีต่อซีโอดีเท่ากับ 0.6 เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ค่าซีโอดีเป็นพารามิเตอร์บ่งบอกประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ซึ่งสามารถคำนวณกลับเป็นค่าบีโอดีในอัตราส่วนคงที่ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการลดค่าซีโอดีหรือการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียของแบคทีเรียแบบเฉพาะเจาะจง พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำเสีย คือ *Zoogloea* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Nitrosomonas* sp. มีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 77.78, 16.75, 68.38, 25.57 และ 52.14 ตามลำดับ ที่ระยะเวลากักเก็บ 2 ชั่วโมง ส่วนที่ระยะกักเก็บ 4 ชั่งโมง *Bacillus* sp. มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นคือสามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 74.35 ส่วนแบคทีเรียบริสุทธิ์จาก วว. คือ *Zoogloea ramigera* TISTR 1329, *Pseudomonas* sp. TISTR 902, *Bacillus* sp. TISTR 028 และ *Acinetobacter calcoaceticus* TISTR 1264 มีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 11.08, 18.35, 6.88 และ 78.63 ตามลำดับ ที่ระยะเวลากักเก็บ 2 ชั่วโมง และถังควบคุมสามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 38.35 ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการลดค่าซีโอดีกับเวลา

จากตารางที่ 26 พบว่าค่า OD $_{600}$ ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงอัตราการเจริญเติบโต และระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแต่ละชนิด ทั้งนี้เมื่อนำน้ำกลั่นมาเจือจางเพื่อเป็นการควบคุมให้มีจำนวนของแบคทีเรียที่เท่ากัน แต่แบคทีเรียดังกล่าวมีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน จึงทำให้ความสามารถในการทำงานหรือมีความไวของกิจกรรม (active) ที่แตกต่างกัน จากผลการทดสอบข้างต้น ถังควบคุมสามารถบำบัดน้ำเสียได้โดยไม่ต้องเติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียเพิ่ม เนื่องจากในน้ำเสียไม่ได้มีการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจึงทำให้มีแบคทีเรียที่สามารถบำบัดน้ำเสียอยู่ก่อนแล้ว และแบคทีเรียหลักที่ทำการคัดแยกในการศึกษาครั้งนี้มาจากน้ำเสียดังกล่าวด้วย จึงทำให้เมื่อเติมอากาศให้กับถังควบคุมเพียงอย่างเดียวสามารถลด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่าซีโอดีได้ถึงร้อยละ 38.35 และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดค่าซีโอดีของแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำเสียกับแบคทีเรียบริสุทธิ์จาก วว. พบว่า *Zoogloea* sp. จากน้ำเสียมีประสิทธิภาพมากกว่า *Zoogloea ramigera* TISTR 1329 จาก วว. เนื่องจาก *Zoogloea* sp. จากน้ำเสียมีค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 ในขณะที่ *Zoogloea ramigera* TISTR 1329 จาก วว. มีค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จึงเป็นการบ่งบอกว่า *Zoogloea* sp. จากน้ำเสียอยู่ในช่วงการเจริญเติบโตเร็วกว่า *Zoogloea ramigera* TISTR 1329 จาก วว. และเมื่อนำมาเจือจางให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 เท่ากัน ซึ่งเป็นการทำให้มีจำนวนแบคทีเรียที่เท่ากัน แต่แบคทีเรียจากน้ำเสียมีค่า OD_{600} เริ่มต้นมากกว่าและมีความไว (active) มากกว่าจึงทำให้สามารถลดค่าซีโอดีได้มากกว่าแม้ว่าจะมีปริมาณแบคทีเรียที่เท่ากัน เช่นเดียวกับ *Acinetobacter* และ *Bacillus* ซึ่งมีค่า OD_{600} เริ่มต้นต่างกันจึงทำให้เชื้อที่มีค่า OD_{600} มากกว่าและมีความไวมากกว่าสามารถลดค่าซีโอดีได้มากกว่าเช่นกัน (สันทัด, 2549; ราตรี, 2552; Bitton, 2005)

ขณะที่ *Pseudomonas* มีค่า OD_{600} เริ่มต้นที่แตกต่างกันแต่ประสิทธิภาพการลดค่าซีโอดีไม่แตกต่างกันมากและสามารถลดค่าซีโอดีได้เพียงร้อยละ 16.75 และ 18.35 ซึ่งน้อยกว่าถังควบคุม เนื่องจาก *Pseudomonas* เมื่ออยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นสามารถทำให้บทบาทของแบคทีเรียอีกชนิดลดลงได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sarioglu (2005) เมื่อทดลองใช้ *Acinetobacter calcoaceticus* ร่วมกับ *Pseudomonas aeruginosa* บำบัดฟอสฟอรัสในระบบบำบัดน้ำเสียแบบ SBR โดยใช้ถังปฏิกรณ์ 3 ถัง ถังที่ 1 เติม *Acinetobacter calcoaceticus* เพียงชนิดเดียว ถังที่ 2 เติม *Acinetobacter calcoaceticus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ถังที่ 3 เติม *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าถังที่ 1 บำบัดฟอสฟอรัสได้ถึงร้อยละ 100 ส่วนถังที่ 2 และ 3 บำบัดฟอสฟอรัสได้เพียงร้อยละ 25 และ 20 ตามลำดับ จากผลการศึกษาข้างต้นประสิทธิภาพการบำบัดฟอสฟอรัสในถังที่ 2 มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับถังที่ 1 แต่มากกว่าถังที่ 3 เล็กน้อย ดังนั้นจากผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่าการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดฟอสฟอรัสไม่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนชนิดของแบคทีเรียอีกทั้งเมื่อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter calcoaceticus* อยู่ร่วมกัน *Pseudomonas aeruginosa* ทำให้ *Acinetobacter calcoaceticus* มีประสิทธิภาพในการบำบัดฟอสฟอรัสลดลง

เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ ถังควบคุมสามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 38.35 แต่เมื่อเติม *Pseudomonas* ทำให้มีประสิทธิภาพการบำบัดลดลง เนื่องจาก *Pseudomonas* ไปลดบทบาทการทำงานของ *Acinetobacter* ที่มีอยู่ในน้ำเสีย จึงทำให้การบำบัดฟอสฟอรัสลดลง (Sarioglu, 2005) อีกทั้งยังมีผลทำให้ประสิทธิภาพการลดค่าซีโอดีลดลงด้วย เพราะน้ำเสียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปนเปื้อนของฟอสฟอรัสในรูปออร์แกนิกฟอสเฟตเป็นส่วนมาก ซึ่งเกิดจากเศษเนื้อ เลือดและของเสียจากสัตว์ทะเลที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ดังนั้นเมื่อประสิทธิภาพการบำบัดฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปของออร์แกนิกฟอสเฟตซึ่งเป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งลดลง จึงมีผลทำให้ประสิทธิภาพการลดค่าซีโอดีลดลงเช่นกันเมื่อเทียบกับถังควบคุม นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า OD_{600} เริ่มต้นของแบคทีเรียจากน้ำเสียมีค่ามากกว่าแบคทีเรียจาก วว. จึงทำให้แบคทีเรียจากน้ำเสียมีความไวมากกว่า มีผลทำให้สามารถลดบทบาทของ *Acinetobacter* ได้ดีกว่าแบคทีเรียจาก วว. ทำให้ในถังที่เติมแบคทีเรียจากน้ำเสียมีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีน้อยกว่าในถังที่เติมแบคทีเรียจาก วว.

ส่วน *Nitrosomonas* สามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 52.14 ที่ระยะกักเก็บ 2 ชั่วโมงเนื่องจาก *Nitrosomonas* เป็นแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟิเคชันที่สามารถออกซิไดส์แอมโมเนียมไอออนไปเป็นไนไตรท์ (Gerardi, 2006) และแบคทีเรียกลุ่ม Obligate chemolithotroph ซึ่งมีบทบาทในการลดสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย แต่เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์กลับมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับถังควบคุม ซึ่งอาจเกิดจากการที่ *Nitrosomonas* ออกซิไดส์แอมโมเนียที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตไปเป็นไนไตรท์ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่า จึงทำให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำเสีย และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ได้

ที่ระยะกักเก็บ 4 และ 5 ชั่วโมงพบว่าประสิทธิภาพการบำบัดสารอินทรีย์เริ่มลดลงและในแบคทีเรียบางชนิดมีค่าติดลบ คือค่าซีโอดีของน้ำเสียในการทดสอบมากกว่าค่าซีโอดีของน้ำเสียก่อนการทดสอบ เนื่องจากระยะเวลาดังกล่าวเป็นระยะเวลาที่ปริมาณสารอาหารในน้ำเสียเริ่มลดลงและมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของแบคทีเรีย จึงทำให้แบคทีเรียขาดอาหารและตายในที่สุด ซึ่งการตายของแบคทีเรียเป็นการเพิ่มสารอินทรีย์ให้กับน้ำเสีย อีกทั้งการเก็บตัวอย่างน้ำเสียมาวิเคราะห์ค่าซีโอดีเป็นการเก็บตัวอย่างน้ำเสียในขณะที่กำลังเติมอากาศซึ่งมีลักษณะและปริมาณการเติมอากาศของถังปฏิกรณ์ที่มีรูปแบบการให้อากาศที่ไม่ทั่วถัง ลักษณะน้ำในถังปฏิกรณ์ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันจึงทำให้เก็บตะกอนอินทรีย์มาด้วย ดังนั้นค่าซีโอดีของน้ำเสียจึงเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ที่ระยะกักเก็บ 4 ชั่วโมง ถังที่เติม *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียจากน้ำเสียยังคงมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเนื่องจาก *Bacillus* สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้หลากหลาย เช่น เซลลูโลส แป้ง คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน (สิรินันท์, 2550) อีกทั้ง *Bacillus* สามารถสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งทำให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (Buchanan and Gibbons, 1957) ที่ระยะกักเก็บ 4 ชั่วโมง จึงมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียที่ได้จากน้ำเสีย พบว่า *Zoogloea* sp. มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือร้อยละ 77.78 ที่ระยะกักเก็บ 2 ชั่วโมง เนื่องจาก *Zoogloea* เป็นแบคทีเรียหลักในบ่อเติมอากาศของระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง และสามารถออกซิไดส์สารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ (สาวิตรี, 2552; Bitton, 2005; You and Ouyang, 2007) นอกจากนี้ *Zoogloea* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นแบคทีเรียที่ได้จากน้ำเสียที่นำมาทดลองจึงทำให้แบคทีเรียชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียนี้ได้ดี ส่วนแบคทีเรียบริสุทธิ์จาก วว. พบว่า *Acinetobacter calcoaceticus* TISTR 1264 มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือร้อยละ 78.63 ที่ระยะกักเก็บ 2 ชั่วโมง เนื่องจาก *Acinetobacter calcoaceticus* TISTR 1264 ชนิดนี้มีความหลากหลายในการบำบัดสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในน้ำเสีย (sidat *et al.*, 1999; Sarioglu, 2005) จึงทำให้สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้มากถึงร้อยละ 78.63

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษากลุ่มแบคทีเรียหลักในระบบบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากการผลิตอาหารทะเลแช่แข็งด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ พบว่าโรงงานที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นโรงงานที่มีการบำบัดน้ำเสียด้วยระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง พบ *Zoogloea* spp. มากที่สุดซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ช่วยในการสร้างฟล็อก และพบ *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp. และ *Nitrosomonas* spp. ในปริมาณใกล้เคียงกัน ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ฟอสฟอรัส และแอมโมเนีย ตามลำดับ จึงสามารถทำให้ระบบบำบัดน้ำเสียสามารถลดค่าบีโอดีได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 90 ลดค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด และค่าไขมันและน้ำมัน มากกว่าร้อยละ 50 นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าทีเคเอ็น และค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมดได้มากกว่าร้อยละ 80 ส่วนโรงงานที่ 3 เป็นโรงงานที่ใช้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการกำจัดไนโตรเจนพบ *Pseudomonas* spp. ในบ่อแอน็อกซิกมากที่สุดแต่ก็มีค่าใกล้เคียงกับแบคทีเรียกลุ่มอื่น ส่วนในบ่อแอโรบิกพบ *Nitrosomonas* spp. มากที่สุด ซึ่งเป็นผลที่มีความสัมพันธ์กับการออกแบบของระบบที่ต้องการกำจัดไนโตรเจน คือ พบ *Nitrosomonas* spp. ในบ่อแอโรบิกมากที่สุด ซึ่งเป็นบ่อที่เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน และ *Nitrosomonas* spp. ก็เป็นแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิงที่สามารถกำจัดไนโตรเจนได้ จึงทำให้ระบบสามารถลดค่าทีเคเอ็นได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 80 ลดค่าซีโอดี ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด และค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมดมากกว่าร้อยละ 90 อีกทั้งยังสามารถลดค่าบีโอดีได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 80

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียที่ได้จากน้ำเสียพบว่า *Zoogloea* sp. สามารถลดค่าซีโอดีได้มากที่สุดคือร้อยละ 77.78 ที่ระยะกักเก็บ 2 ชั่วโมง รองลงมาคือ *Bacillus* sp., *Nitrosomonas* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. สามารถลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 74.35, 52.14, 25.57 และ 16.75 ตามลำดับ และพบว่า *Zoogloea* sp. เป็นแบคทีเรียหลักที่มีปริมาณมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้พร้อมทั้งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้มากที่สุดอีกด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. สามารถนำข้อมูลกลุ่มแบคทีเรียหลักมาใช้ในการออกแบบ และควบคุมประสิทธิภาพระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งจากการผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง พร้อมทั้งนำแบคทีเรียหลักดังกล่าวมาเพาะขยายและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆที่มีลักษณะใกล้เคียงกันได้

2. เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ซึ่งอาจมีแบคทีเรียหลายชนิดที่มีอยู่ในน้ำเสียไม่สามารถเจริญเติบโตและเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้ (uncultured) ดังนั้นจึงควรมีการนำเอาวิธี Molecular Technique มาช่วยในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแบบเฉพาะเจาะจงต่อไป

3. ควรมีการนำวิธี Bioaugmentation มาช่วยในการศึกษาประสิทธิภาพการลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสีย เนื่องจากการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักคือศึกษาชนิดของแบคทีเรียหลักที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง จึงไม่ได้มุ่งเน้นในเรื่อง Bioaugmentation

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2548. **แนวทางปฏิบัติที่ดีด้านการป้องกันและลดมลพิษอุตสาหกรรมทะเลเยือกแข็งประเภทปลา**. (คู่มือ). กรมควบคุมมลพิษ กระทรงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2551. **หลักปฏิบัติเทคโนโลยีการผลิตที่สะอาดอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง.** สุเทพการพิมพ์, เชียงใหม่.

จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์. 2552. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ.** ครั้งที่ 1. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

ทวี จิตไมตรี. 2538. จุลชีววิทยาของระบบบำบัดน้ำเสีย, น. 114-138. *ใน* เพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ, บรรณาธิการ. **การควบคุมดูแลระบบบำบัดน้ำเสีย.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2545. **การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2547. **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ.** พิมพ์ครั้งที่ 5. บริษัท เจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2553. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2549. **ระบบบำบัดน้ำเสีย การเลือกใช้ การออกแบบ การควบคุม และแก้ไขปัญหา**. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท สำนักพิมพ์ท้อป จำกัด, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาวิตรี วทัญญูไพศาล. 2552. **จุลชีววิทยาเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท มิสเตอร์ก๊อปปี้ (ประเทศไทย) จำกัด, กรุงเทพฯ.

สิรินันท์ ชมภูแสง. 2550. **การจัดจำแนกและศึกษาคุณสมบัติของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิรินันท์ ศรีดำ, นพดล ศุกระกาญจน์ และ นุกูล อินทระสังขา. 2552. การคัดเลือกแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงที่มีประสิทธิภาพเพื่อการบำบัดไนเตรทในน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, *ใน* **การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 19.** มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2548. **จุลชีววิทยาของน้ำเสีย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุรพล สายพานิช. 2538. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Activated Sludge, น. 150-232. *ใน* เพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ, บรรณาธิการ. **การควบคุมดูแลระบบบำบัดน้ำเสีย.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุเทพ สิริวิทยาปกรณ์. 2552. **เทคโนโลยีน้ำเสีย**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Atlas, R. M. 2005. **Media for Environmental Microbiology.** 2nd ed. Taylor & Francis Group, USA.

Arquiaga, M. C., L. W. Canter and D. A. Sabatini. 1993. Microbiology of high sodium nitrite wastewater treatment. **Environmental Pollution** 81: 1-6

Clesceri, L. S., A. E. Greenberg and A. D. Eaton. 1998. **Standard Methods for Examination of water and wastewater.** 20th ed. American Public Health Association, USA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bitton, G. 2005. **Wastewater Microbiology.** 3th ed. Jonh Wiley & Sons, Inc., Publication. Canada.

Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1957. **Bergey's Manual of Determination Bacteriology.** 8th ed. The Williams and Wilkins Co., USA.

Gerardi, M. H. 2006. **Wastewater Bacteria**. 1th ed. John Wiley & Sons, Inc., Publication. Canada.

Harley, J. and L. M. Prescott. 2002. **Laboratory Exercises in Microbiology.** 5th ed. The McGraw-Hill Companies, USA.

Liang, J., W. X. Juan, G. Z. Lian, Z. D. Zhi and X. S. Qin. 2006. Biodegradation of Lubricating Oil in Wastewater with Zoogloea sp.. **Soil Science Society of China** 16 (4): 540-544.

Mara, D and N. Horan. 2003. **Water and Wastewater Microbiology.** Academic Press, UK.

Mongkolthanaruk, W. and S. Dharmsthiti. 2002. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradatio** 50: 101-105.

Sarioglu, M. 2005. Biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor by using pure Culture. **Process Biochemistry** 40: 1599-1603.

Sidat, M., F. Bux and H. C. Kasan. 1999. Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from Activated sludge. **Water SA** 25(2): 175-179.

Tchobanoglous, G., F. L. Burton and H. D. Stensel. 2004. **Wastewater Engineering.** 4th ed. The McGraw-Hill companies, Inc., USA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

You, S. J. and C. F. Ouyang. 2007. Identification the microbial diversity in a municipal Wastewater treatment plant using non-cultured based methods. **Journal of the Chinese Institute of Engineers** 30(3): 431-440.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีและการเตรียมสารเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ค่าบีโอดีแบบเจือจางที่ไม่เติมเชื้อ

1.1 การเตรียมสารเคมี

1) น้ำกลั่นต้องมีคุณภาพสูง ควรมีทองแดงน้อยกว่า 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร ปราศจากคลอรีน คลอรามีน สารอินทรีย์ กรดและด่าง (พีเอชต้องเป็นกลาง)

2) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เตรียมโดยการละลาย KH_2PO_4 8.5 กรัม, $Na_2HPO_4.7H_2O$ 33.4 กรัม, K_2HPO_4 21.75 กรัม และNH_4Cl 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้เป็น 1 ลิตร

3) สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต เตรียมโดยการละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 22.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางเป็น 1 ลิตร

4) สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เตรียมโดยการละลาย anhydrous$CaCl_2$ 27.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางเป็น 1 ลิตร

5) สารละลายเฟริคคลอไรด์ เตรียมโดยการละลาย $FeCl_3.6H_2O$ 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางเป็น 1 ลิตร

6) สารละลายแมงกานีสซัลเฟต เตรียมโดยการละลาย $MnSO_4.H_2O$ 364 กรัม หรือ $MnSO_4.4H_2O$ 480 กรัม หรือ $MnSO_4.2H_2O$ 400 กรัม ในน้ำกลั่น กรองแล้วเจือจางเป็น 1 ลิตร

7) สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ (*Alkali-Iodide-Azide Reagent*) เตรียมโดยการละลาย NaOH 500 กรัม (หรือ KOH 700 กรัม) และ NaI 135 กรัม (หรือKI 150 กรัม) ในน้ำกลั่นเจือจางเป็น 1 ลิตร และละลาย NaN_3 10 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในสารละลายข้างต้น

8) กรดซัลฟุริเข้มข้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9) น้ำแป้ง เตรียมโดยการละลายแป้ง 5 กรัม ในน้ำต้ม 800 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ได้ 1 ลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที ตั้งค้างคืนใช้แต่น้ำใส เติม Salicylic Acid 1.25 กรัม ต่อน้ำแป้ง 1 ลิตร

10) สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยการละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 24.82 กรัมในน้ำต้มที่เย็นแล้ว เติมจนได้ปริมาณ 1 ลิตร เก็บรักษาโดยการเติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร หรือ NaOH 1 กรัมต่อสารละลาย 1 ลิตร

11) สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.0250 นอร์มัล เตรียมโดยการเจือจางสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 นอร์มัล จำนวน 25มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บรักษาโดยเติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร หรือ NaOH 0.4 กรัมต่อสารละลาย 1 ลิตร นำสารละลายนี้มาหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardization) ด้วยสารละลายมาตรฐานไดโครเมต

12) สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต 0.0250 นอร์มัล เตรียมโดยการละลายโปแตสเซียมไดโครเมตที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 103° องศาเซลเซียส นาน2 ชั่วโมง จำนวน 1.226 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

13) น้ำเจือจาง เตรียมโดยการตวงน้ำกลั่นใส่ขวดแอสไพเรเตอร์ที่สะอาด เป่าอากาศที่สะอาดเพื่อเพิ่มออกซิเจนในน้ำกลั่น อย่างน้อย 1 ชั่วโมง เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอ-ไรด์ และเฟริคคลอไรด์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำเจือจาง 1 ลิตร

การหาความเข้มข้นของ $Na_2S_2O_3$ 0.025 นอร์มัล โดยละลาย KI 2 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ เติมกรดซัลฟุริค (1+9) 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต 0.025 นอร์มัล จำนวน 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 5 นาที เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วไตไตรทด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตโดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสีที่จุดยุติ

$$\text{Normality } Na_2S_2O_3 = \frac{0.025 \times A}{20}$$

A = ปริมาตรสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรท (มิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 วิธีวิเคราะห์ค่าบีโอดีแบบเจือจางที่ไม่เติมเชื้อ

ปรับตัวอย่างน้ำให้มีอุณหภูมิประมาณ 20° ซ. พีเอชอยู่ในช่วง 6.5-7.5

↓

เลือกปริมาณตัวอย่างน้ำที่จะใช้ 2 ค่า ปิเปตใส่ขวดบีโอดีอย่างละ 3 ขวด

↓

เติมน้ำเจือจางให้เต็มขวดระวังอย่างให้เกิดฟองอากาศ หาดีโอวันแรก (DO_0) ของแต่ละความเข้มข้นอย่างละ 1 ขวด อีก 2 ขวดนำไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 20 °ซ.ในที่มืด นาน 5 วันให้เติมน้ำกลั่นหล่อที่ปากขวดไม่ให้แห้ง

↓

ครบ 5 วัน นำตัวอย่างมาหาค่าดีโอที่เหลือ (DO_5)

1.3 การคำนวณค่าบีโอดี

$$\text{ค่าบีโอดี (มก./ล.)} = \frac{(DO_0 - DO_5) \times 300}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้}}$$

2. การวิเคราะห์ค่าซีโอดีโดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด

2.1 การเตรียมสารเคมี

1) สารละลาย digestion reagent เตรียมโดยการสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมต สำหรับย่อยสลาย 0.1 นอร์มัล ชั่ง $K_2Cr_2O_7$ ซึ่งอบแห้งที่ 130 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มา 4.913 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริคเข้มข้น 167 มิลลิลิตร และเติม $HgSO_4$ 33.3 กรัมทิ้งให้ละลายและปล่อยให้เย็นจึงเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

2) สารละลายกรดซัลฟุริค เตรียมโดยการเติม Ag_2SO_4 8.8 กรัม ลงในกรดซัลฟุริคเข้มข้น 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3) สารละลายเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยการละลาย Phenanthroline Monohydrate 1.485 กรัม กับ $FeSO_4.7H_2O$ 695 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

4) สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.10 นอร์มัล (FAS) เตรียมโดยการละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ 39.2 กรัมในน้ำกลั่นเติมกรดซัลฟุริคเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นำสารละลายนี้มาหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลายมาตรฐานไดโครเมต (Standardization)

การหาความเข้มข้น $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0.10 นอร์มัล โดยปิเปต $K_2Cr_2O_7$ 0.2 นอร์มัล 25 มิลลิลิตร เติม conc.H_2SO_4-$AgSO_4$ 20 มิลลิลิตรเจือจางในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ หยดสารละลายเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์จำนวน 2-3 หยดนำไปไตเตรทกับ สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.10 นอร์มัล สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ

$$\text{Normality } Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 = \frac{\text{มล. } K_2Cr_2O_7 \times 0.10}{\text{มล. } Fe(NH_4)_2(SO_4)_2}$$

2.2 วิธีวิเคราะห์ค่าซีโอดีโดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด

ตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิลิตร+ $K_2Cr_2O_7$ 6 มิลลิลิตร+ conc.H_2SO_4-$AgSO_4$ 7 มิลลิลิตร

↓ เขย่าให้เข้ากัน

ย่อยที่ตู้อบที่ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

↓ ทิ้งไว้ให้เย็น

เทใส่ขวดรูปชมพู่ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง

↓ หยดเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์

ไตเตรทด้วย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ จากสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การคำนวณค่าซีโอดี

$$\text{ค่าซีโอดี (มก./ล.)} = \frac{(A-B) \times C \times 8{,}000 \times D}{\text{มล. ตัวอย่างน้ำ}}$$

A = มิลลิลิตรของ FAS ที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

B = มิลลิลิตรของ FAS ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างน้ำ

C = นอร์มัลลิตี้ของ FAS

D = อัตราการเจือจางของตัวอย่างน้ำ (dilution of sample)

3. การวิเคราะห์ค่าทีเคเอ็นไนโตรเจน

3.1 การเตรียมสารเคมี

1) สารละลาย digestion reagent เตรียมโดยการละลาย K_2SO_4 134 กรัมและ $CuSO_4$ 7.3 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม conc.H_2SO_4 134 มิลลิลิตร ทำให้เย็นเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการตกผลึก

2) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์-โซเดียมไธโอซัลเฟต เตรียมโดยการละลาย NaOH 500 กรัม และ $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 25 กรัม ในน้ำและเจือจางเป็น 1 ลิตร

3) สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ เตรียมโดยการเติม NaOH 0.1 นอร์มัล 88 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย $Na_2B_4O_7$ 0.25 โมลาร์ (เตรียมได้โดยละลาย $Na_2B_4O_7.10H_2O$ 9.5 กรัมในน้ำ 1 ลิตร) 500 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

4) สารละลายอินดิเคเตอร์ผสม เตรียมโดยการละลายเมทธิลเรด 200 มิลลิกรัม ในเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% หรือในไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทธิลีนบลู 100 มิลลิกรัม ในเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% หรือในไอโซโพรพิล-แอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน เตรียมใช้แต่ละเดือน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5) สารละลายกรดบอริคที่มีอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยการละลาย H_3BO_3 20 กรัมในน้ำกลั่นเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ผสม 10 มิลลิลิตร เจือจางให้เป็น 1 ลิตร เตรียมใช้แต่ละเดือน

6) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์มัล เตรียมโดยการละลาย NaOH 240 กรัมในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนครบ 1 ลิตร

7) สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยการละลายฟีนอล์ฟทาลีน 5 กรัมในเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% จำนวน 500 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นอีก 500 มิลลิลิตร

8) สารละลายมาตรฐานกำมะถัน 0.02 นอร์มัล เตรียมโดยการเจือจางกรดซัลฟุริค 1.0 นอร์มัล จำนวน 20 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำสารละลายนี้มาหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardization) ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.05 นอร์มัล จำนวน 20 มิลลิลิตร

$$\text{Normality } H_2SO_4 = \frac{0.05 \times 20}{\text{มล. } H_2SO_4 \text{ ที่ใช้ไตเตรท}}$$

3.2 วิธีวิเคราะห์ค่าทีเคเอ็นไนโตรเจน

ตัวอย่างน้ำ 25 มิลลิลิตรในขวดเจลดาลห์ เติมน้ำกลั่นจนได้ 200 มิลลิลิตร
ปรับพีเอชให้เป็นกลาง

↓ ใส่ลูกแก้ว 3-4 เม็ด

เติมสารละลาย digestion reagent 50 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องย่อยสลาย
จนได้สารละลายใส

↓ ทิ้งไว้ให้เย็น

เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร และฟีนอล์ฟทาลีน 0.5 มิลลิลิตร
เขย่าแล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ไธโอซัลเฟต 50 มิลลิลิตรจนกลายเป็นสีชมพู

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

↓

นำขวดเจลดาห์ต่อเข้าเครื่องกลั่นโดยให้ปลายท่อกลั่นอยู่ใต้สารละลายกรดบอริค
ที่มีอินดิเคเตอร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่
กลั่นจนได้สารละลาย 200 มิลลิลิตร

↓

นำมาไตเตรทกับ 0.02 นอร์มัล จนถึงจุดยุติซึ่งสารละลายจะเป็นสีม่วง

3.3 การคำนวณค่าทีเคเอ็นไนโตรเจน

$$\text{ทีเคเอ็นไนโตรเจน (มก./ล.)} = \frac{(A-B) \times 280}{\text{มล. ตัวอย่างน้ำ}}$$

A = มล. H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างน้ำ
B = มล. H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

4. การวิเคราะห์ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด

4.1 การเตรียมสารเคมี

1) กรดซัลฟุริค 5 นอร์มัล เตรียมโดยการเจือจาง conc.H_2SO_4 70 มิลลิลิตรในน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

2) สารละลายแอนติโมนิลโปแตสเซียมตาเตรต เตรียมโดยการละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6.0.5H_2O$ 1.3715 กรัมในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตรแล้วเจือจางเป็น 500 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรเก็บในขวดแก้ว

3) สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต เตรียมโดยการละลาย $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 20 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4) กรดแอสคอร์บิค เตรียมโดยการละลายกรดแอสคอร์บิค 1.76 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะคงตัวประมาณ 1 สัปดาห์ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5) สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยการละลายฟีนอล์ฟทาลีน 5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ (C_2H_5OH) 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 500 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

6) น้ำยารวมในสัดส่วนสำหรับ 100 มิลลิลิตรดังนี้ (น้ำยารวมอยู่ตัวได้ 4 ชั่วโมง)

กรดซัลฟุริค 5 นอร์มัล	50	มิลลิลิตร
สารละลายแอนติโมนิลโปแตสเซียมตาเตรต	5	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต	15	มิลลิลิตร
สารละลายกรดแอสคอร์บิค	30	มิลลิลิตร

7) สารละลายสต๊อกฟอสเฟต (1 มิลลิลิตร = 50 ไมโครกรัมหรือ 0.05 มิลลิกรัม) เตรียมโดยการละลาย anhydrous KH_2PO_5 219.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางให้ได้ 1 ลิตร

4.2 วิธีวิเคราะห์ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด

ตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรที่เหมาะสมแล้วเจือจางให้ได้ 100 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง หยดฟีนอล์ฟทาลีน 1 หยดถ้าเป็นสีแดงให้หยดกรดซัลฟุริค 5 นอร์มัล ทีละหยดจนสีแดงหาย เติม conc.H_2SO_4 1 มิลลิลิตร

↓

นำไปต้มด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ 98-13 kPa 30 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นหยดฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยดปรับตัวอย่างให้เป็นกลางด้วย NaOH จนได้สีชมพูอ่อนเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

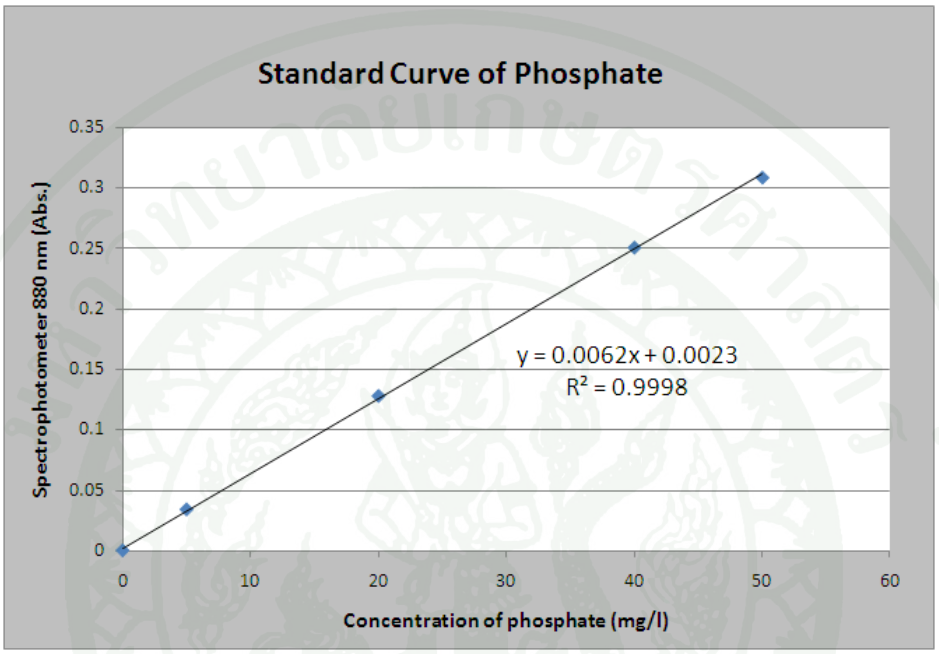
↓ เติมน้ำยารวม 8 มิลลิลิตร

นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 การคำนวณค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด

$$\text{ฟอสเฟต (มก. P/ล.)} = \frac{\text{มิลลิกรัมฟอสเฟตที่อ่านได้จากกราฟ}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มล.)}}$$



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานฟอสเฟตในงานวิจัย

5. การวิเคราะห์ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด

5.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) โถทำแห้ง พร้อมสารดูดความชื้น
2) ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ
3) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4) กระดาษกรอง GF/C ขนาด 4.7 ซม.
5) ชุดกรองประกอบด้วย กรวยบุคเนอร์
6) เครื่องดูดสุญญากาศ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 วิธีวิเคราะห์ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด

อบถ้วยอลูมิเนียมพร้อมกระดาษกรอง
ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

↓ ปล่อยทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง

ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมกระดาษกรอง บันทึกค่าที่ได้ (A) จากนั้น
เทตัวอย่างน้ำที่เขย่าเข้ากันดี 50 ml ลงบนกระดาษกรอง GF/C
แล้วล้างกรวยกรองและกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น

↓

อบถ้วยอลูมิเนียมพร้อมกระดาษกรองในตู้อบที่อุณหภูมิ
105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

↓ ปล่อยทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง

นำมาชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าที่ได้ (B)

5.3 การคำนวณค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด

$$\text{ของแข็งแขวนลอย (มก./ล.)} = \frac{(B-A) \times 10^6}{C}$$

A = น้ำหนักกระดาษกรองอย่างเดียว, กรัม
B = น้ำหนักกระดาษกรองและของแข็ง, กรัม
C = ปริมาตรตัวอย่างน้ำ, มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การวิเคราะห์ค่าไขมันและน้ำมัน

6.1 เครื่องมือ

1) กรวยแยก ขนาด 500 มิลลิลิตรซึ่งล้างด้วยเฮกเซน
2) ถ้วยระเหย
3) เครื่องอังน้ำ
4) กระดาษกรอง ขนาด 11 เซนติเมตร เบอร์ 40
5) กรวยกรอง
6) บีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร และ 100 มิลลิลิตร ซึ่งล้างด้วยเฮกเซน
7) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

6.2 สารเคมี

1) กรดซัลฟุริคเข้มข้น
2) เฮกเซนหรือฟรีออน
3) โซเดียมซัลเฟตปารศจากน้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3 วิธีวิเคราะห์ค่าไขมันและน้ำมัน

ตัวอย่างน้ำ 200 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ปรับพีเอชให้น้อยกว่า 2
ด้วยกรดซัลฟุริคเข้มข้น

↓

เทตัวอย่างน้ำใส่กรวยกรอง เติมเฮกเซน 10-15 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง
ประมาณ 2 นาที ตั้งทิ้งไว้จนสารแยกชั้น

↓

ถ่ายชั้นตัวอย่างน้ำใส่บีกเกอร์เดิม และถ่ายชั้นเฮกเซนที่มีไขมันและน้ำมันละลายอยู่
ผ่านกรวยกรองที่มีโซเดียมซัลเฟตบนกระดาษกรองลงใน
ถ้วยระเหย (ทำให้แห้งและทราบน้ำหนักแล้ว, A)

↓

สกัดซ้ำๆหลายครั้ง จนไขมันและน้ำมันถูกสกัดออกจากตัวอย่างน้ำจนหมด

↓

นำถ้วยระเหยที่ได้ไประเหยเอาเฮกเซนออก ที่เครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ
70 องศาเซลเซียส จนแห้งปราศจากความชื้นแล้วปล่อยให้เย็นในโถทำแห้ง
นำมาชั่งน้ำหนัก (B)

6.4 การคำนวณค่าไขมันและน้ำมัน

$$\text{ไขมันและน้ำมัน (มก./ล.)} = \frac{(B-A) \times 10^6}{C}$$

A = น้ำหนักถ้วยระเหย, กรัม

B = น้ำหนักถ้วยระเหยรวมกับไขมันและน้ำมัน, กรัม

C = ปริมาตรตัวอย่างน้ำ, มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีของโรงงานที่ 1

พารามิเตอร์	เดือนที่ 1		เดือนที่ 2		เดือนที่ 3		เดือนที่ 4	
	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก
pH	6.60	7.14	6.75	6.90	6.58	6.75	6.37	6.61
BOD (mg/l)	855	31	765	30	380	60	1,095	37
COD (mg/l)	1,280	80	1,280	280	1,227	320	2,160	880
TP (mg/l)	456.6	51	251.2	34.4	390.6	34.5	485.2	44.4
TKN (mg/l)	133	0.9	136	8	46	3	98	14
TSS (mg/l)	260	46	213	26	237	19	334	69
Grease and Oil (mg/l)	250	37.5	55	21.3	75	27.9	80	50.7

ตารางผนวกที่ ข2 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีของโรงงานที่ 2

พารามิเตอร์	เดือนที่ 1		เดือนที่ 2		เดือนที่ 3		เดือนที่ 4	
	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก
pH	6.99	7.38	7.25	7.25	6.97	7.36	6.81	7.11
BOD (mg/l)	660	66	660	42	1,230	47	675	52
COD (mg/l)	853	480	800	280	6,133	507	6,000	680
TP (mg/l)	150.2	41	150.1	39	435	37.4	531.6	35.1
TKN (mg/l)	324	121	346	84	35	3	583.8	6.2
TSS (mg/l)	280	41.5	207.8	5.7	5,223	32	5,302	42
Grease and Oil (mg/l)	65	40	55	21.3	81.3	20	33.8	15

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข3 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีของโรงงานที่ 3

พารามิเตอร์	เดือนที่ 1		เดือนที่ 2		เดือนที่ 3		เดือนที่ 4	
	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก
pH	6.70	7.00	6.89	7.34	6.63	6.99	6.32	6.72
BOD (mg/l)	1,020	318	1,125	84	983	58	668	48
COD (mg/l)	2,080	412	3,680	200	3,800	293	6,400	800
TP (mg/l)	555.8	22.4	577.8	14.7	413.6	12.5	521.4	6.6
TKN (mg/l)	42	95	902	182	431	159	339	6.5
TSS (mg/l)	1,560	11	2,785	28.1	4,110	71	4,195	61
Grease and Oil (mg/l)	240	135	150	38.8	227.5	88.8	167.5	15

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมสารและอาหารเลี้ยงเชื้อในทางจุลชีววิทยา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. *Pseudomonas* CFC Agar

Gelatin	16.0	กรัม
Agar	11.0	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
K_2SO_4	10.0	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	1.4	กรัม
Glycerol	10.0	มิลลิลิตร
CFC selective supplement	10.0	มิลลิลิตร (Oxiod)

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น (ยกเว้น CFC selective supplement และผงวุ้น) ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 7.1 เติมผงวุ้นและให้ความร้อนจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วเติม CFC selective supplement ผสมให้เข้ากัน ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อนี้สำหรับเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* species

2. *Zoogloea* Medium

Agar	15.0	กรัม
Tryptone	5.0	กรัม
Glycerol	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Sodium lactate	0.5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ให้ความร้อนจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อนี้สำหรับเพาะเลี้ยง *Zoogloea ramigera* และ *Zoogloea* species

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. *Bacillus* Medium

Agar	25.0	กรัม
Peptone	6.0	กรัม
Tryptone	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Beef extract	1.5	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	1.0	ไมโครกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ให้ความร้อนจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อนี้สำหรับเพาะเลี้ยง *Bacillus* species

4. Trypticase Soy Agar

Tryptone	17.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Soya	3.0	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ให้ความร้อนจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อนี้สำหรับเพาะเลี้ยง *Acinetobacter* species

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. Medium for Ammonia-Oxidizing Bacteria

Agar	10.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	235.0	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	200.0	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	40.0	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	40.0	มิลลิกรัม
Iron-EDTA-Phenol red solution	1.0	มิลลิลิตร
Na_2CO_3 solution	ใส่ตามตัวแปร	

Iron-EDTA-Phenol red solution ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

$FeSO_4.7H_2O$	50.0	มิลลิกรัม
Sodium EDTA	50.0	มิลลิกรัม
Phenol Red	50.0	มิลลิกรัม

Na_2CO_3 solution ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Na_2CO_3	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ยกเว้น Na_2CO_3 solution ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรให้ความร้อนจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติม Na_2CO_3 solution ที่ปราศจากเชื้อจนสารละลายเป็นสีชมพูอ่อน ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อนี้สำหรับเพาะเลี้ยง *Nitrosomonas europaea*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. Trypticase Soy Broth

Tryptone	17.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Soya	3.0	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ให้ความร้อนจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อนี้สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่ม fastidious และ nonfastidious

7. การเตรียมน้ำเจือจาง

Phosphate Buffered Dilution Water

1) Stock phosphate

ละลาย KH_2PO_4 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 เติมน้ำกลั่นจนได้ 1,000 มิลลิลิตร

2) Stock solution magnesium chloride

ละลาย $MgCl_2$ 38 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย Stock phosphate buffer solution 1.25 มิลลิลิตร และสารละลาย Stock solution magnesium chloride 5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 800มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนได้ 1,000 มิลลิลิตร ปิเปตใส่หลอดทดลองจำนวน 9 มิลลิลิตร ปิดฝานำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การเตรียมสีย้อมแกรม (Gram's stain)

8.1 Crystal violet

สารละลาย A

Crystal violet (85% dye)	2.0	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้ และถ้าสีเข้มข้นเกินไปอาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

8.2 Safranin O counterstain (stock solution)

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100.0	มิลลิลิตร

ละลายสีในแอลกอฮอล์จนละลายหมด ถ้าจะใช้สีในการย้อมให้เจือจางเป็น 1:10 และถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้

8.3 Gram's iodine solution (mordant)

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

ละลาย iodine และ KI ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 300 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

8.4 Ethyl alcohol 95%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. สารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ Catalase

3% Hydrogen peroxide solution

H_2O_2	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

10. สารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ Oxidase

1% tetramethyl paraphenylene diamine hydrochloride solution

tetramethyl paraphenylene diamine hydrochloride	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

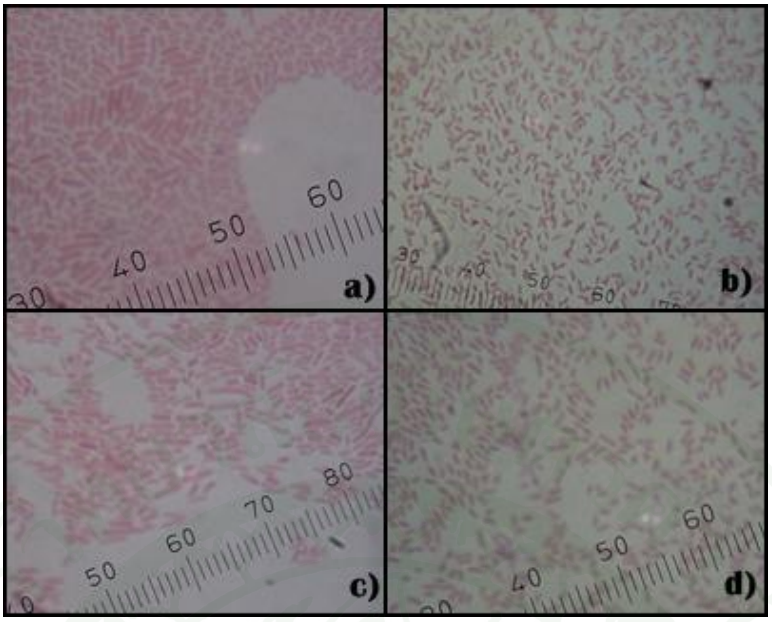
ละลาย tetramethyl paraphenylene diamine hydrochloride ในน้ำกลั่น นำสารละลายใส่ขวดสีชาเก็บในตู้เย็น ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินใช้ในการทดสอบไม่ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

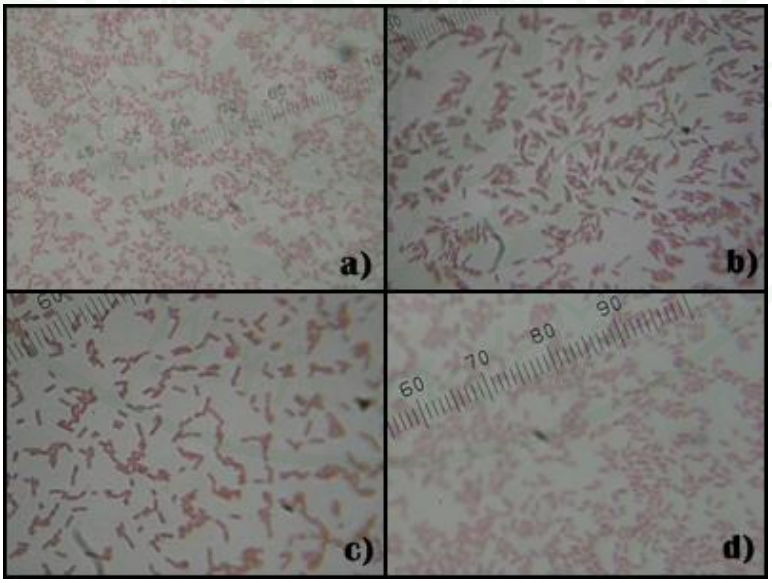
ภาคผนวก ง

รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียในน้ำเสีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

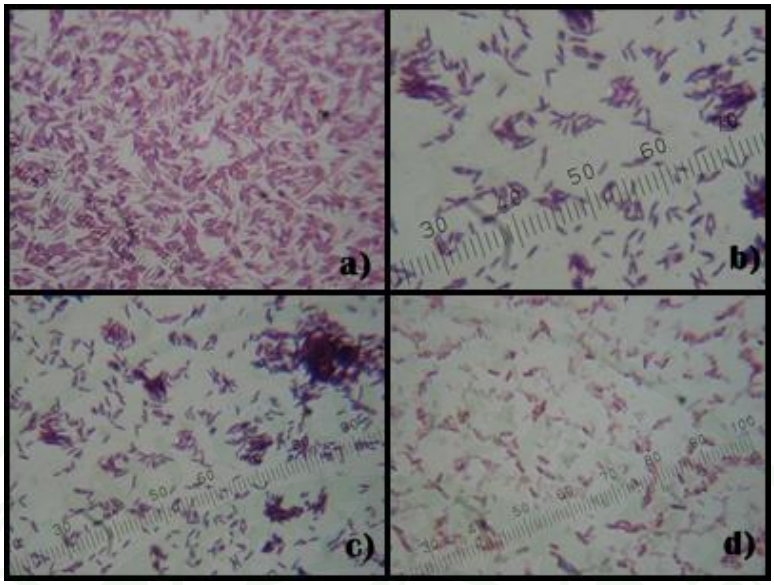


ภาพผนวกที่ ง1 รูปร่างและการติดสีแกรมของ *Pseudomonas* sp. จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า
a) ในบ่อเติมอากาศโรงงานที่ 1 b) ในบ่อเติมอากาศโรงงานที่ 2
c) ในบ่อแอน็อกซิกโรงงานที่ 3 d) ในบ่อแอโรบิกโรงงานที่ 3

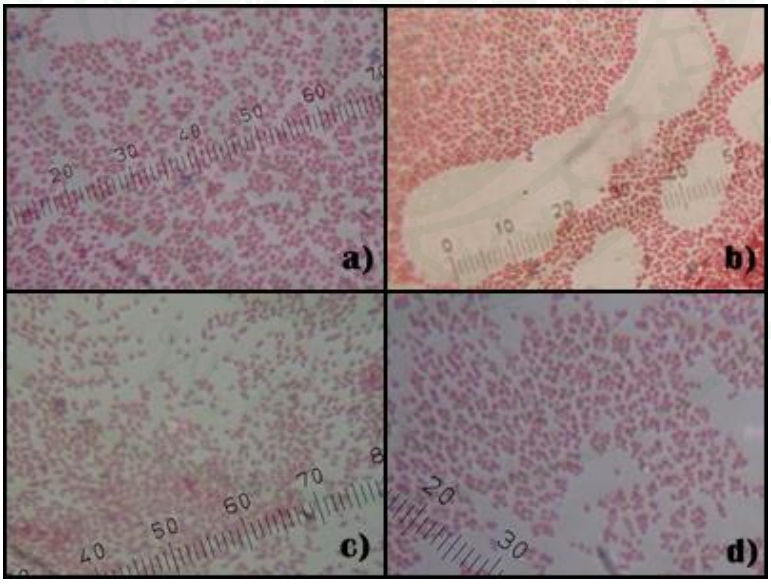


ภาพผนวกที่ ง2 รูปร่างและการติดสีแกรมของ *Zoogloea* sp. จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เ ท่า
a) ในบ่อเติมอากาศโรงงานที่ 1 b) ในบ่อเติมอากาศโรงงานที่ 2
c) ในบ่อแอน็อกซิกโรงงานที่ 3 d) ในบ่อแอโรบิกโรงงานที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

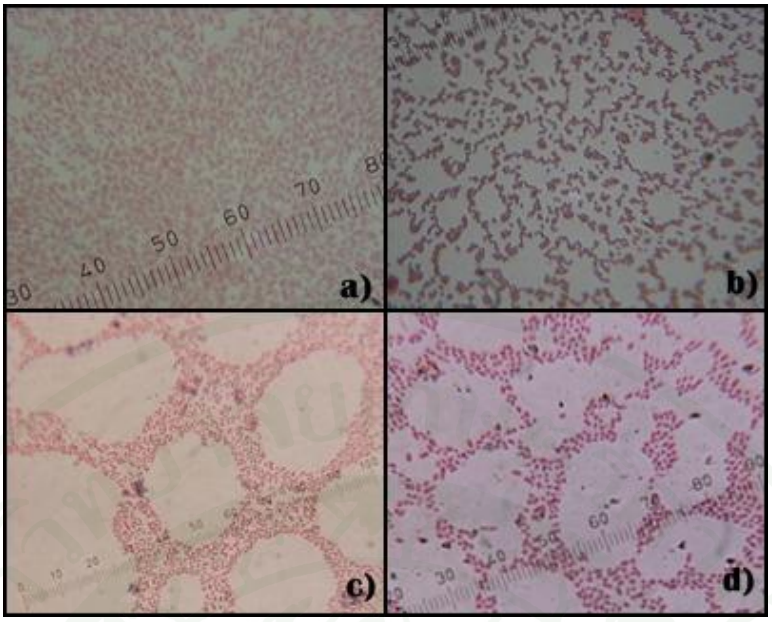


ภาพผนวกที่ ง3 รูปร่างและการติดสีแกรมของ *Bacillus* sp.จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า
a) ในบ่อเติมอากาศโรงงานที่ 1 b) ในบ่อเติมอากาศโรงงานที่ 2
c) ในบ่อแอน็อกซิกโรงงานที่ 3 d) ในบ่อแอโรบิกโรงงานที่ 3



ภาพผนวกที่ ง4 รูปร่างและการติดสีแกรมของ *Acinetobacter* sp.จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า
a) ในบ่อเติมอากาศโรงงานที่ 1 b) ในบ่อเติมอากาศโรงงานที่ 2
c) ในบ่อแอน็อกซิกโรงงานที่ 3 d) ในบ่อแอโรบิกโรงงานที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ง5 รูปร่างและการติดสีแกรมของ *Nitrosomonas* sp.จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า
a) ในบ่อเติมอากาศโรงงานที่ 1 b) ในบ่อเติมอากาศโรงงานที่ 2
c) ในบ่อแอน็อกซิกโรงงานที่ 3 d) ในบ่อแอโรบิกโรงงานที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก จ

ข้อมูลค่าซีโอดีในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 ค่าซีโอดีในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังควบคุม	1[b]	1	2.8	2.3	915.8
(ไม่เติมแบคทีเรียเพิ่ม)		2	2.8	1.9	1,607.0
		3	2.8	2.2	1,088.6
ถังควบคุม	2[b]	1	2.8	2.1	1,261.4
(ไม่เติมแบคทีเรียเพิ่ม)		2	2.8	1.9	1,607.0
		3	2.8	2.4	743.0
ถังควบคุม	3[b]	1	2.8	2.0	1,434.2
(ไม่เติมแบคทีเรียเพิ่ม)		2	2.8	1.9	1,607.0
		3	2.8	2.5	570.2
ถังเติม *Zoogloea* sp.	1[c]	1	3.3	3.1	249.6
		2	3.3	3.0	374.4
		3	3.3	2.9	499.2
ถังเติม *Zoogloea* sp.	2[c]	1	3.3	3.1	249.6
		2	3.3	3.1	249.6
		3	3.3	3.1	249.6
ถังเติม *Zoogloea* sp.	3[c]	1	3.3	2.8	624.0
		2	3.3	2.9	499.2
		3	3.3	3.1	249.6
ถังเติม *Zoogloea ramigera*	1[b]	1	2.8	1.8	1,779.8
TISTR1329		2	2.8	1.9	1,607.0
		3	2.8	1.9	1,607.0
ถังเติม *Zoogloea ramigera*	2[b]	1	2.8	1.8	1,779.8
TISTR1329		2	2.8	1.8	1,779.8
		3	2.8	1.9	1,607.0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังเติม *Zoogloea ramigera*	3[b]	1	2.8	1.7	1,952.6
TISTR 1329		2	2.8	1.9	1,607.0
		3	2.8	1.8	1,779.8
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	1[b]	1	2.8	1.7	1,952.6
		2	2.8	1.6	2,125.4
		3	2.8	1.7	1,952.6
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	2[b]	1	2.8	1.8	1,779.8
		2	2.8	1.7	1,952.6
		3	2.8	1.6	2,125.4
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	3[b]	1	2.8	1.7	1,952.6
		2	2.8	1.7	1,952.6
		3	2.8	1.6	2,125.4
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	1[d]	1	3.8	2.8	1,056.0
TISTR 902		2	3.8	2.7	1,161.1
		3	3.8	2.8	1,056.0
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	2[d]	1	3.8	2.8	1,056.0
TISTR 902		2	3.8	2.6	1,267.2
		3	3.8	2.6	1,267.2
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	3[d]	1	3.8	2.9	950.4
TISTR 902		2	3.8	2.7	1,161.6
		3	3.8	2.5	1,372.8
ถังเติม *Acinetobacter* sp.	1[b]	1	2.8	2.1	1,261.4
		2	2.8	2.0	1,434.2
		3	2.8	1.9	1,607.0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังเติม *Acinetobacter* sp.	2[b]	1	2.8	2.0	1,434.2
		2	2.8	2.1	1,261.4
		3	2.8	2.0	1,434.2
ถังเติม *Acinetobacter* sp.	3[b]	1	2.8	1.9	1,607.0
		2	2.8	1.9	1,607.0
		3	2.8	2.0	1,434.2
ถังเติม *Acinetobacter*	1[c]	1	3.3	3.2	124.8
calcoaceticus TISTR 1264		2	3.3	3.0	374.4
		3	3.3	2.8	624.0
ถังเติม *Acinetobacter*	2[c]	1	3.3	3.0	374.4
calcoaceticus TISTR 1264		2	3.3	3.0	374.4
		3	3.3	3.0	374.4
ถังเติม *Acinetobacter*	3[c]	1	3.3	3.1	249.6
calcoaceticus TISTR 1264		2	3.3	3.2	124.8
		3	3.3	2.9	499.2
ถังเติม *Bacillus* sp.	1[c]	1	3.3	2.9	499.2
		2	3.3	3.0	374.4
		3	3.3	3.0	374.4
ถังเติม *Bacillus* sp.	2[c]	1	3.3	3.0	374.4
		2	3.3	2.9	499.2
		3	3.3	2.5	998.4
ถังเติม *Bacillus* sp.	3[c]	1	3.3	2.9	499.2
		2	3.3	2.8	624.0
		3	3.3	3.0	374.4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังเติม *Bacillus* sp.	1[b]	1	2.8	1.7	1,952.6
TISTR 028		2	2.8	1.8	1,779.8
		3	2.8	1.9	1,607.0
ถังเติม *Bacillus* sp.	2[b]	1	2.8	1.8	1,779.8
TISTR 028		2	2.8	1.7	1,952.6
		3	2.8	1.8	1,779.8
ถังเติม *Bacillus* sp.	3[b]	1	2.8	1.9	1,607.0
TISTR 028		2	2.8	1.8	1,779.8
		3	2.8	1.6	2,125.4
ถังเติม *Nitrosomonas* sp.	1[c]	1	3.3	2.8	624.0
		2	3.3	3.0	374.4
		3	3.3	2.9	499.2
ถังเติม *Nitrosomonas* sp.	2[c]	1	3.3	3.0	374.4
		2	3.3	2.5	998.4
		3	3.3	2.9	499.2
ถังเติม *Nitrosomonas* sp.	3[c]	1	3.3	2.5	998.4
		2	3.3	2.6	873.6
		3	3.3	1.9	1,747.2

a = อัตราเจือจาง 10 เท่า และปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

b = ไตเตรทด้วย 0.108 นอร์มัล FAS

c = ไตเตรทด้วย 0.078 นอร์มัล FAS

d = ไตเตรทด้วย 0.066 นอร์มัล FAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ2 ค่าซีโอดีในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังควบคุม	1[b]	1	2.8	2.4	1,238.6
(ไม่เติมแบคทีเรียเพิ่ม)		2	2.8	2.3	1,526.7
		3	2.8	2.3	1,526.7
ถังควบคุม	2[b]	1	2.8	2.3	1,526.7
(ไม่เติมแบคทีเรียเพิ่ม)		2	2.8	2.1	2,102.8
		3	2.8	2.3	1,526.7
ถังควบคุม	3[b]	1	2.8	2.3	1,526.7
(ไม่เติมแบคทีเรียเพิ่ม)		2	2.8	2.3	1,526.7
		3	2.8	2.5	950.6
ถังเติม *Zoogloea* sp.	1[d]	1	3.8	3.0	1,408.3
		2	3.8	3.0	1,408.3
		3	3.8	3.0	1,408.3
ถังเติม *Zoogloea* sp.	2[d]	1	3.8	3.1	1,232.2
		2	3.8	2.9	1,584.3
		3	3.8	3.1	1,232.2
ถังเติม *Zoogloea* sp.	3[d]	1	3.8	3.1	1,232.2
		2	3.8	3.3	880.2
		3	3.8	3.2	1,056.2
ถังเติม *Zoogloea ramigera*	1[b]	1	2.8	2.0	2,390.9
TISTR1329		2	2.8	1.9	2,678.9
		3	2.8	1.7	3,255.1
ถังเติม *Zoogloea ramigera*	2[b]	1	2.8	1.7	3,255.1
TISTR1329		2	2.8	1.9	2,678.9
		3	2.8	1.8	2,966.9

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ2 (ต่อ)

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังเติม *Zoogloea ramigera*	3[b]	1	2.8	1.8	2,966.9
TISTR 1329		2	2.8	1.8	2,966.9
		3	2.8	1.7	3,255.1
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	1[b]	1	2.8	1.7	3,255.1
		2	2.8	1.6	3,543.1
		3	2.8	1.6	3,543.1
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	2[b]	1	2.8	1.5	3,831.2
		2	2.8	1.6	3,543.1
		3	2.8	1.6	3,543.1
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	3[b]	1	2.8	1.7	3,255.1
		2	2.8	1.5	3,831.2
		3	2.8	1.6	3,543.1
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	1[d]	1	3.8	2.9	1,587.2
TISTR 902		2	3.8	3.0	1,410.8
		3	3.8	2.4	2,468.9
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	2[d]	1	3.8	2.5	2,292.6
TISTR 902		2	3.8	2.2	2,821.6
		3	3.8	2.6	2,116.2
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	3[d]	1	3.8	2.4	2,468.9
TISTR 902		2	3.8	2.6	2,116.2
		3	3.8	2.4	2,468.9
ถังเติม *Acinetobacter* sp.	1[b]	1	2.8	1.5	3,831.2
		2	2.8	1.4	4,119.2
		3	2.8	1.5	3,831.2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ2 (ต่อ)

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังเติม *Acinetobacter* sp.	2[b]	1	2.8	1.3	4,407.3
		2	2.8	1.5	3,831.3
		3	2.8	1.4	4,119.2
ถังเติม *Acinetobacter* sp.	3[b]	1	2.8	1.5	3,831.2
		2	2.8	1.3	4,407.3
		3	2.8	1.4	4,119.2
ถังเติม *Acinetobacter*	1[c]	1	3.3	2.8	1,040.2
calcoaceticus TISTR 1264		2	3.3	2.7	1,248.3
		3	3.3	2.7	1,248.3
ถังเติม *Acinetobacter*	2[c]	1	3.3	2.7	1,248.3
calcoaceticus TISTR 1264		2	3.3	2.6	1,456.3
		3	3.3	2.7	1,248.3
ถังเติม *Acinetobacter*	3[c]	1	3.3	2.4	1,872.4
calcoaceticus TISTR 1264		2	3.3	2.7	1,248.3
		3	3.3	2.6	1,456.3
ถังเติม *Bacillus* sp.	1[c]	1	3.3	3.1	416.1
		2	3.3	3.2	208.0
		3	3.3	3.1	416.1
ถังเติม *Bacillus* sp.	2[c]	1	3.3	3.2	208.0
		2	3.3	3.1	416.1
		3	3.3	3.1	416.1
ถังเติม *Bacillus* sp.	3[c]	1	3.3	3.0	624.1
		2	3.3	3.1	416.1
		3	3.3	3.0	624.1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ2 (ต่อ)

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังเติม *Bacillus* sp.	1[b]	1	2.8	2.0	2,390.9
TISTR 028		2	2.8	1.9	2,678.9
		3	2.8	1.8	2,966.9
ถังเติม *Bacillus* sp.	2[b]	1	2.8	1.8	2,966.9
TISTR 028		2	2.8	1.7	3,255.1
		3	2.8	1.7	3,255.1
ถังเติม *Bacillus* sp.	3[b]	1	2.8	1.7	3,255.1
TISTR 028		2	2.8	1.5	3,831.2
		3	2.8	1.7	3,255.1
ถังเติม *Nitrosomonas* sp.	1[c]	1	3.3	2.3	2,080.4
		2	3.3	2.3	2,080.4
		3	3.3	2.1	2,496.5
ถังเติม *Nitrosomonas* sp.	2[c]	1	3.3	2.1	2,496.5
		2	3.3	2.2	2,288.5
		3	3.3	2.2	2,288.5
ถังเติม *Nitrosomonas* sp.	3[c]	1	3.3	2.4	1,872.4
		2	3.3	2.3	2,080.4
		3	3.3	2.0	2,704.5

a = อัตราเจือจาง 16.67 เท่า และปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

b = ไตเตรทด้วย 0.108 นอร์มัล FAS

c = ไตเตรทด้วย 0.078 นอร์มัล FAS

d = ไตเตรทด้วย 0.066 นอร์มัล FAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ3 ค่าซีโอดีในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียที่ระยะเวลา 5 ชั่วโมง

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังควบคุม	1[b]	1	2.8	2.1	2,102.8
(ไม่เติมแบคทีเรียเพิ่ม)		2	2.8	2.1	2,102.8
		3	2.8	2.2	1,814.8
ถังควบคุม	2[b]	1	2.8	2.2	1,814.8
(ไม่เติมแบคทีเรียเพิ่ม)		2	2.8	2.1	2,102.8
		3	2.8	2.0	2,390.9
ถังควบคุม	3[b]	1	2.8	2.3	1,526.7
(ไม่เติมแบคทีเรียเพิ่ม)		2	2.8	2.1	2,102.8
		3	2.8	2.0	2,390.9
ถังเติม *Zoogloea* sp.	1[d]	1	3.8	2.9	1,584.3
		2	3.8	3.0	1,408.3
		3	3.8	3.0	1,408.3
ถังเติม *Zoogloea* sp.	2[d]	1	3.8	3.1	1,232.2
		2	3.8	3.1	1,232.2
		3	3.8	3.0	1,408.3
ถังเติม *Zoogloea* sp.	3[d]	1	3.8	3.1	1,232.2
		2	3.8	3.0	1,408.3
		3	3.8	3.0	1,408.3
ถังเติม *Zoogloea ramigera*	1[b]	1	2.8	1.8	2,966.9
TISTR1329		2	2.8	1.8	2,966.9
		3	2.8	1.6	3,543.1
ถังเติม *Zoogloea ramigera*	2[b]	1	2.8	1.5	3,831.2
TISTR1329		2	2.8	1.8	2,966.9
		3	2.8	1.7	3,255.1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ2 (ต่อ)

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังเติม *Zoogloea ramigera*	3[b]	1	2.8	1.6	3,543.1
TISTR 1329		2	2.8	1.8	2,966.9
		3	2.8	1.7	3,255.1
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	1[b]	1	2.8	1.3	4,407.3
		2	2.8	1.3	4,407.3
		3	2.8	1.4	4,119.2
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	2[b]	1	2.8	1.5	3,831.2
		2	2.8	1.3	4,407.3
		3	2.8	1.4	4,119.2
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	3[b]	1	2.8	1.4	4,119.2
		2	2.8	1.3	4,407.3
		3	2.8	1.5	3,831.2
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	1[d]	1	3.8	2.8	1,760.4
TISTR 902		2	3.8	2.6	2,112.4
		3	3.8	2.9	1,584.3
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	2[d]	1	3.8	2.7	1,936.4
TISTR 902		2	3.8	2.8	1,760.4
		3	3.8	2.8	1,760.4
ถังเติม *Pseudomonas* sp.	3[d]	1	3.8	2.7	1,936.4
TISTR 902		2	3.8	2.4	2,464.5
		3	3.8	2.7	1,936.4
ถังเติม *Acinetobacter* sp.	1[b]	1	2.8	1.2	4,695.3
		2	2.8	1.1	4,983.4
		3	2.8	1.2	4,695.3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ3 (ต่อ)

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังเติม *Acinetobacter* sp.	2[b]	1	2.8	1.3	4,407.3
		2	2.8	1.2	4,695.3
		3	2.8	1.1	4,983.4
ถังเติม *Acinetobacter* sp.	3[b]	1	2.8	1.2	4,695.3
		2	2.8	1.1	4,983.4
		3	2.8	1.2	4,695.3
ถังเติม *Acinetobacter*	1[c]	1	2.3	1.2	2,288.5
calcoaceticus TISTR 1264		2	2.3	1.1	2,496.5
		3	2.3	1.2	2,288.5
ถังเติม *Acinetobacter*	2[c]	1	2.3	1.3	2,080.4
calcoaceticus TISTR 1264		2	2.3	1.2	2,288.5
		3	2.3	1.1	2,496.5
ถังเติม *Acinetobacter*	3[c]	1	2.3	1.2	2,288.5
calcoaceticus TISTR 1264		2	2.3	1.1	2,496.5
		3	2.3	1.2	2,288.5
ถังเติม *Bacillus* sp.	1[c]	1	3.3	2.8	1,040.2
		2	3.3	2.7	1,248.3
		3	3.3	2.6	1,456.3
ถังเติม *Bacillus* sp.	2[c]	1	3.3	2.7	1,248.3
		2	3.3	2.6	1,456.3
		3	3.3	2.8	1,040.2
ถังเติม *Bacillus* sp.	3[c]	1	3.3	2.6	1,456.3
		2	3.3	2.7	1,248.3
		3	3.3	2.6	1,456.3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ3 (ต่อ)

แบคทีเรียที่เติม	ถังปฏิกรณ์ที่	ครั้งที่	FAS ของแบลงค์ (ml)	FAS ของตัวอย่าง (ml)	ซีโอดี [a] (mg/l)
ถังเติม *Bacillus* sp.	1[b]	1	2.8	1.9	2,678.9
TISTR 028		2	2.8	1.8	2,966.9
		3	2.8	1.7	3,255.1
ถังเติม *Bacillus* sp.	2[b]	1	2.8	1.6	3,543.1
TISTR 028		2	2.8	1.4	4,119.2
		3	2.8	1.4	4,119.3
ถังเติม *Bacillus* sp.	3[b]	1	2.8	1.1	4,983.4
TISTR 028		2	2.8	1.3	4,407.3
		3	2.8	1.4	4,119.2
ถังเติม *Nitrosomonas* sp.	1[c]	1	3.3	2.2	2,288.5
		2	3.3	2.9	832.2
		3	3.3	2.5	1,664.3
ถังเติม *Nitrosomonas* sp.	2[c]	1	3.3	2.3	2,080.4
		2	3.3	2.1	2,496.5
		3	3.3	2.2	2,288.5
ถังเติม *Nitrosomonas* sp.	3[c]	1	3.3	2.2	2,288.5
		2	3.3	2.3	2,080.4
		3	3.3	2.1	2,496.5

a = อัตราเจือจาง 16.67 เท่า และปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

b = ไตเตรทด้วย 0.108 นอร์มัล FAS

c = ไตเตรทด้วย 0.078 นอร์มัล FAS

d = ไตเตรทด้วย 0.066 นอร์มัล FAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววิจิตรา แก้วหลวง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	24 กุมภาพันธ์ 2526
สถานที่เกิด	อำเภอนิคมคำสร้อย จังหวัดมุกดาหาร
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(สาธารณสุขศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับ 2 มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิชาการสุขาภิบาลปฏิบัติการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักงานจัดการคุณภาพน้ำ สำนักการระบายน้ำ
นำเสนอผลงานที่	งานการประชุมวิชาการวิศวกรรมโยธาแห่งชาติ ครั้งที่ 17 (17th National Convention on Civil Engineering) วันที่ 9-11 พฤษภาคม พ.ศ. 2555 โรงแรมเซ็นทารา แกรนด์แอนคอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ อุดรธานี
ผลงานการนำเสนอบทความ	ได้รับรางวัลบทความดีเด่นจากการนำเสนอบทความ ในงานการประชุมวิชาการวิศวกรรมโยธาแห่งชาติ ครั้งที่ 17

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์