

## คำนำ

ปัญหาน้ำเสียเกิดขึ้นจากความเจริญเติบโตของประเทศ ทั้งทางด้านเศรษฐกิจ จำนวนประชากรทั้งนี้ น้ำเสียเกิดขึ้นจากการใช้น้ำของมนุษย์เพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ นับแต่ปี พ.ศ. 2500 เป็นต้นมาในช่วงหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 ทุกประเทศได้เร่งฟื้นฟูเศรษฐกิจ จุดกำเนิดการเกิดน้ำเสียสำหรับประเทศไทยเกิดขึ้นในช่วงปี พ.ศ. 2512 ถึง พ.ศ. 2515 อุตสาหกรรมได้มีการปล่อยน้ำเสียลงสู่แม่น้ำแม่กลอง ความเน่าเสียในแม่น้ำเกิดขึ้นเป็นระยะ ๆ ในช่วงฤดูร้อนของปี พ.ศ. 2515-2516 ได้เกิดภาวะเน่าเสียในแม่น้ำแม่กลองอย่างรุนแรงส่งผลกระทบต่อชุมชนใกล้เคียงเป็นวงกว้าง กระทรวงอุตสาหกรรมจึงเริ่มบังคับให้อุตสาหกรรมอุตสาหกรรมมีการก่อสร้างระบบบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ จึงถือเป็นจุดกำเนิดของงานบำบัดน้ำเสียในประเทศไทย ในปีพ.ศ. 2518 ได้มีการตราพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2518 พร้อมทั้งจัดตั้งสำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติขึ้น ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2530 – 2539 เศรษฐกิจของประเทศไทยได้ขยายตัวอย่างมาก ซึ่งมีผลให้เกิดมลภาวะเนื่องจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมอุตสาหกรรมและชุมชน จากนั้นในปี พ.ศ. 2535 ได้มีการประกาศใช้พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 แทนพระราชบัญญัติ ๗ ปี พ.ศ. 2518 ซึ่งนอกจากจะทำให้มีการปรับปรุงส่วนราชการใหม่โดยมีการจัดตั้งกรมควบคุมมลพิษ สำนักนโยบายแผนและสิ่งแวดล้อม และกรมส่งเสริมสุขภาพสิ่งแวดล้อมขึ้นแทนสำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ

จะเห็นได้ว่าการสร้างระบบบำบัดน้ำเสียของประเทศไทยมีมายาวนานเกือบ 40 ปี แต่ปัญหาคุณภาพของน้ำเน่าเสียยังคงปรากฏตามชุมชนใกล้เคียงพื้นที่แม้มีระบบบำบัดน้ำเสีย ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการควบคุม ติดตามและตรวจสอบระบบบำบัดน้ำเสียในพื้นที่ส่วนใหญ่ใช้เทคนิคทางเคมีหรือชีวเคมีที่เป็นวิธีการบอกสถานะของระบบบำบัดน้ำเสียโดยรวม และระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศไทยมากกว่าร้อยละ 80 เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีววิทยาซึ่งอาศัยกลไกการทำงานของจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ในขณะที่วิธีการตรวจวิเคราะห์ความสามารถของระบบบำบัดน้ำเสียอาศัยเทคนิคทางเคมีหรือชีวเคมี ได้แก่ ค่าซีโอดี (COD: Chemical Oxygen Demand) หรือ ค่าบีโอดี (BOD : Biochemical Oxygen Demand) โดยนำมาคำนวณเป็นประสิทธิภาพการบำบัด อันเป็นการแสดงถึงความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบนั้น ๆ ทำให้การควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียไม่สามารถกระทำได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ เนื่องจากปัจจัยที่ใช้ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสีย ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณอาหาร (ค่า COD หรือ BOD) สารอาหาร (ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส) และสภาวะแวดล้อมอื่น ๆ ต่างเป็นปัจจัยทางเคมีวิเคราะห์ที่ถูกกำหนดในช่วงที่

กว้าง ทำให้ไม่เฉพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์บางกลุ่มที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแต่ละประเภท ดังนั้นเพื่อในงานทางด้านระบบบำบัดน้ำเสียเกิดความรู้ความเข้าใจอย่างละเอียดขึ้นในกระบวนการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์โดยเทียบกับค่า COD หรือ BOD ที่ใช้บ่งบอกถึงความสามารถของระบบบำบัดน้ำเสีย อย่างไรก็ตามการบ่งชี้ประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียด้วยเชื้อจุลินทรีย์จากกระบวนการเพาะเลี้ยงมีข้อจำกัดในการตรวจสอบใช้เวลานาน และเกิดความผิดพลาดในการตรวจสอบ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) คือ การทำ 16S rDNA clone library ร่วมกับ เทคนิค Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) มาใช้ในแก้ไขปัญหาที่เกิดจากข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงดังกล่าว โดยเทคนิคทั้ง 2 วิธีนี้ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยง อีกทั้งยังใช้เวลารวดเร็วในการตรวจสอบ เทียบกับข้อมูลวิเคราะห์ทางเคมีที่นิยมใช้ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสีย คือ ค่า COD - BOD โดยสามารถนำข้อมูลเปรียบเทียบนี้ไปใช้ในการวางแผนและควบคุมระบบ ตั้งแต่การเริ่มต้นระบบ และการดำเนินระบบ เพื่อให้ระบบทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง และมีเสถียรภาพที่ดีในระยะยาว

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเรื่องการควบคุมและตรวจสอบระบบบำบัดน้ำเสียด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล มีความสอดคล้องกับนโยบายและยุทธศาสตร์การพัฒนาชาติ (พ.ศ. 2551-2554) สอดคล้องกับ **ยุทธศาสตร์ที่ 4** การเสริมสร้างและพัฒนาทุนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม **กลยุทธ์การวิจัยที่ 1** การบริหารจัดการและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน **แผนงานวิจัยที่ 9** การวิจัยเกี่ยวกับมลพิษ การจัดการมลพิษและผลกระทบสิ่งแวดล้อมจากมลพิษ เนื่องจากเป็นการวิจัยโดยพัฒนาใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อการควบคุมและตรวจสอบระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งมีจุดด้อยในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียที่มีมายาวนานกว่า 40 ปี ซึ่งเป็นการส่งผลกระทบระยะยาวในการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า รวมทั้งส่งเสริมให้เกิดอนุรักษ์ทรัพยากรน้ำอันเป็นปัจจัยพื้นฐานของการดำรงชีวิตของมวลมนุษยชาติและสิ่งแวดล้อมในสถานการณ์โลกร้อน และสอดคล้องกับยุทธศาสตร์มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ในกลุ่มเรื่องเร่งด่วนที่ 6 เทคโนโลยีใหม่และเทคโนโลยีที่สำคัญสำหรับอุตสาหกรรม แผนงานวิจัย การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ

#### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีอิทธิพลต่อการควบคุมและตรวจสอบระบบบำบัดน้ำเสีย
2. ได้ข้อมูลพื้นฐานที่แม่นยำทางด้านกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อการควบคุมและตรวจสอบระบบบำบัดน้ำเสีย



## การตรวจเอกสาร

ระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศไทยมากกว่าร้อยละ 80 เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีววิทยาซึ่งอาศัยกลไกการทำงานของจุลินทรีย์หลายกลุ่ม โดยเฉพาะระบบบำบัดน้ำเสียของภาคอุตสาหกรรม ในขณะที่วิธีการตรวจวิเคราะห์ความสามารถของระบบบำบัดน้ำเสียอาศัยเทคนิคทางเคมีหรือชีวเคมี ได้แก่ ค่าซีโอดี (COD: Chemical Oxygen Demand) หรือ ค่าบีโอดี (BOD : Biochemical Oxygen Demand) โดยนำมาคำนวณเป็นประสิทธิภาพการบำบัด อันเป็นการแสดงถึงความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบนั้น ๆ ทำให้การควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียไม่สามารถกระทำได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ เนื่องจากปัจจัยที่ใช้ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสีย ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณอาหาร (ค่า COD หรือ BOD) สารอาหาร (ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส) และสภาวะแวดล้อมอื่น ๆ ต่างเป็นปัจจัยทางเคมีวิเคราะห์ที่ถูกกำหนดในช่วงที่กว้างทำให้ไม่เฉพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์บางกลุ่มที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแต่ละประเภท ดังนั้นเพื่อให้งานทางด้านระบบบำบัดน้ำเสียเกิดความรู้ความเข้าใจอย่างละเอียดขึ้นในกระบวนการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์โดยเทียบกับค่า COD หรือ BOD ที่ใช้บ่งบอกถึงความสามารถของระบบบำบัดน้ำเสียอย่างไรก็ตามการบ่งชี้ประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียด้วยเชื้อจุลินทรีย์จากกระบวนการเพาะเลี้ยงมีข้อจำกัดในการตรวจสอบใช้เวลานาน และเกิดความผิดพลาดในการตรวจสอบ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) คือ การทำ 16S rDNA clone library ร่วมกับ เทคนิค Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) มาใช้ในแก้ไขปัญหาที่เกิดจากข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงดังกล่าว โดยเทคนิคทั้ง 2 วิธีนี้ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยง อีกทั้งยังใช้เวลารวดเร็วในการตรวจสอบ เทียบกับข้อมูลวิเคราะห์ทางเคมีที่นิยมใช้ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสีย คือ ค่า COD – BOD โดยสามารถนำข้อมูลเปรียบเทียบนี้ไปใช้ในการวางแผนและควบคุมระบบ ตั้งแต่การเริ่มต้นระบบ และการดำเนินระบบ เพื่อให้ระบบทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง และมีเสถียรภาพที่ดีในระยะยาว

### 1. ระบบบำบัดน้ำเสีย (Wastewater treatment plant)

กระบวนการบำบัดน้ำเสียที่ใช้กันอยู่ทั่วไปในปัจจุบัน สามารถแบ่งออกได้เป็นประเภทใหญ่ๆ 3 ประเภท ได้แก่ (คณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม, 2538; สุเทพ, 2549)

- 1) กระบวนการทางกายภาพ (Physical Processes)
- 2) กระบวนการทางเคมี (Chemical Processes)
- 3) กระบวนการทางชีวภาพ (Biological Processes)

กระบวนการทางกายภาพ หมายถึง กระบวนการที่ใช้หลักการทางกลศาสตร์ในการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งรวมทั้งการแยกสารแขวนลอยโดยใช้ตะแกรง การแยกกรวดทราย การปรับสมดุลของปริมาณน้ำเสีย การตกตะกอน การทำให้ลอยตัว การแยกไขมัน การถ่ายเทก๊าซและการเติมอากาศ การกรอง กระบวนการรีเวิร์สออสโมซิส

กระบวนการทางเคมีเป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่มีการใช้สารเคมีหรือมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเกิดขึ้นในน้ำเสีย ซึ่งได้แก่ การปรับค่าความเป็นกรดด่าง การตกตะกอนทางเคมี การดูดซับผิว การฆ่าเชื้อโรคโดยสารเคมี

กระบวนการทางชีวภาพเป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่อาศัยจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ปนมากับน้ำเสีย สามารถแยกออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ขึ้นอยู่กับประเภทของจุลินทรีย์ที่ทำการย่อยสลาย ได้แก่

- 1) กระบวนการที่ใช้ ออกซิเจน (aerobic processes)
- 2) กระบวนการที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic processes)

ในแต่ละประเภทยังสามารถแบ่งออกได้เป็นแบบที่ให้จุลินทรีย์ลอยอยู่ในน้ำเสีย (suspended growth) และแบบที่ให้จุลินทรีย์เกาะติดกับวัสดุตัวกลาง (attached growth) กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพที่นิยมใช้ในการบำบัดน้ำเสียส่วนใหญ่ (มันสิน, 2543, Tchobanoglous *et al.*, 2004 และ สุเทพ, 2549) ได้แก่

### 1.1 ประเภทใช้ออกซิเจน

ระบบตะกอนจุลินทรีย์เร่ง (Activated Sludge) มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ ถังเติมอากาศ (aerobic tank) และถังตกตะกอน (secondary sedimentation tank) และการสูบตะกอนออกจากถังตกตะกอนป้อนกลับไปยังถังเติมอากาศ เพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในถังเติมอากาศให้มากพอที่จะย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ปนมากับน้ำเสียได้อย่างรวดเร็ว เป็นระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพที่นิยมใช้มากที่สุดระบบหนึ่ง

ระบบบ่อเติมอากาศ (Aerated Lagoon) มีลักษณะคล้ายระบบตะกอนจุลินทรีย์เร่ง เพียงแต่บ่อเติมอากาศและบ่อตกตะกอนโดยทั่วไปจะมีระยะเวลาเก็บกัก (detention time) นานกว่าในระบบตะกอนจุลินทรีย์เร่ง และอาจไม่มีการสูบตะกอนจากบ่อตกตะกอนกลับไปยังบ่อเติมอากาศ

ระบบบ่อผึ่ง (Stabilization Pond) เป็นบ่อย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อาศัยจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนโดยออกซิเจนจะซึมจากอากาศเหนือผิวน้ำลงน้ำหรือเกิดจากการสังเคราะห์แสงของพืช น้ำที่เกิดขึ้นในบ่อไม่ต้องอาศัยเครื่องจักรกลในการเติมอากาศให้กับน้ำอัตราการย่อยสลาย

สารอินทรีย์ช้ากว่าการเติมอากาศ จึงต้องการพื้นที่มากกว่าแต่ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานและการบำรุงรักษาต่ำ

การหมักแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic Digestion) เป็นกระบวนการที่ใช้บำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นสูง หรือใช้บำบัดตะกอนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการบำบัดน้ำเสียกระบวนการอื่น โดยทำการเก็บกักน้ำเสียไว้ในถังหมักซึ่งอาจปรับอุณหภูมิให้สูงกว่าปกติเพื่อเร่งอัตราการย่อยสลาย น้ำเสียมีการเติมอากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้น้ำเสียเพื่อให้กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์เกิดขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน

## 1.2 ประเภทไม่ใช้ออกซิเจน

การหมักแบบไร้อากาศ (Anaerobic Digestion) เป็นการบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นสูง หรือตะกอนที่เกิดจากการบำบัดน้ำเสียกระบวนการอื่น โดยกักเก็บน้ำเสียไว้ในถังซึ่งปิดมิดชิดเป็นเวลานานและปล่อยให้จุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ในกระบวนการนี้จะมีก๊าซมีเทน (methane) และคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) เกิดขึ้น

ระบบบ่อไร้อากาศ (Anaerobic Pond) เป็นการบำบัดน้ำเสียโดยกักเก็บไว้ในบ่อ และปล่อยให้จุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียในลักษณะคล้ายกับกระบวนการหมักแบบไร้อากาศที่กล่าวข้างต้น เพียงแต่ระบบบ่อไร้อากาศจะใช้บ่อที่ขุดขึ้น และมีลักษณะเป็นการบำบัดแบบธรรมชาติมากกว่า

ระบบบ่อกรองไร้อากาศ (Anaerobic Filter) เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่อาศัยจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่เกาะติดอยู่ที่ผิวของวัสดุกรองที่บรรจุอยู่ในถังและผ่านน้ำเสียเข้าไปโดยที่วัสดุกรองทั้งหมดจะจมอยู่ใต้น้ำ โดยทั่วไปการผ่านน้ำเสียจะผ่านจากด้านล่างของถังและให้น้ำเสียที่ผ่านชั้นวัสดุกรองไหลล้นลงรางที่ติดตั้งอยู่เหนือระดับชั้นวัสดุกรองหรือมีให้ตะกอนที่ปนมากับน้ำเสียเข้าไปอุดตันในช่องว่างของวัสดุกรอง

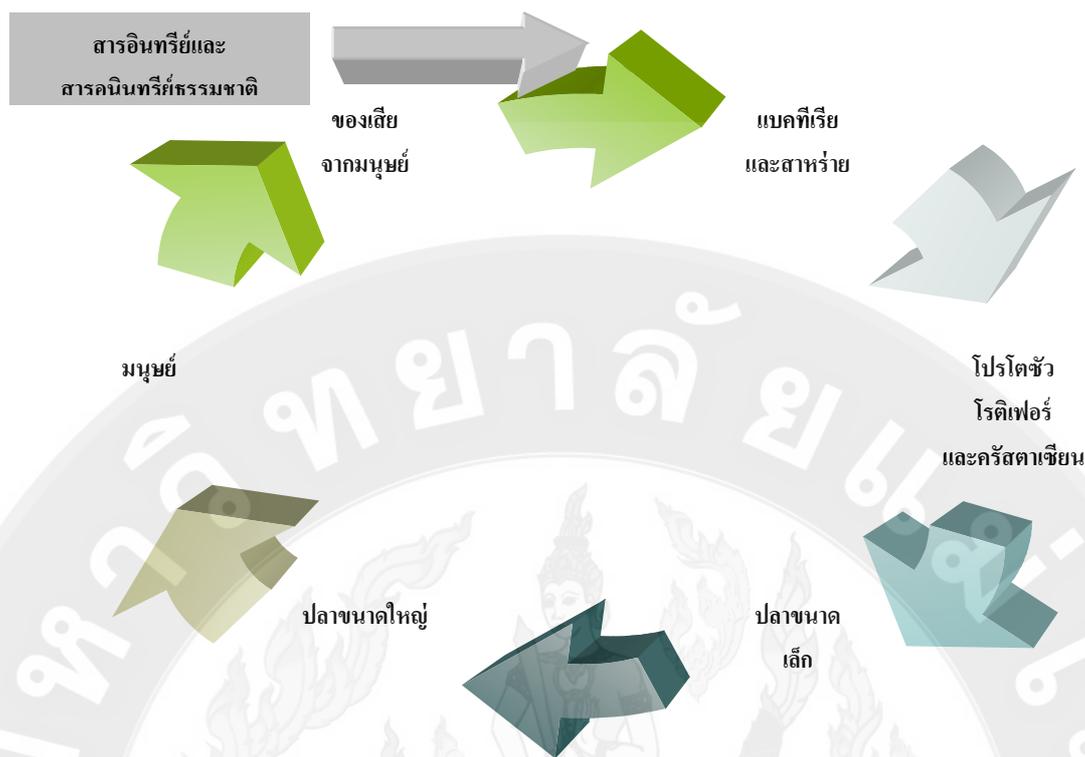
จากกระบวนการบำบัดข้างต้น กระบวนการทางชีวภาพนับเป็นกระบวนการที่สำคัญในการบำบัดมลภาวะทางน้ำ โดยอาศัยกลไกการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียเป็นสำคัญ ประสิทธิภาพของการบำบัดจึงขึ้นอยู่กับความสามารถของจุลินทรีย์ในการทำงานภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ปัจจุบันการศึกษาการทำงานของจุลินทรีย์สามารถวัดได้จากผลการวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำเสียเป็นสำคัญ

## 2. ระบบนิเวศวิทยาของแบคทีเรียในน้ำเสีย

การศึกษาและดูแลระบบบำบัดน้ำเสีย โดยเฉพาะระบบบำบัดน้ำเสียที่อาศัยกระบวนการบำบัดทางชีววิทยา (biological treatment) เป็นหลักจำเป็นต้องเข้าใจถึงบทบาทและความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสีย โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา พบว่าเป็นแบคทีเรียกว่า 95% รองลงมาได้แก่ รา สาหร่าย และ โปรโตซัว ตามลำดับ (คณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม, 2538; สุเทพ, 2551)

นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำ ส่วนมากแบคทีเรียและสาหร่ายเป็นกลุ่มจุลินทรีย์สำคัญที่เริ่มต้นในวงจรชีวภาพของแหล่งน้ำ ดังภาพที่ 1

จากวงจรชีวภาพของแหล่งน้ำจะพบว่า แบคทีเรียสามารถใช้สารอินทรีย์ในรูปที่ละลายน้ำเปลี่ยนเป็นสารประกอบของเซลล์ใหม่และสารอนินทรีย์ และสาหร่ายในแหล่งน้ำจะนำสารอนินทรีย์ไปใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่ โดยเซลล์ใหม่ของแบคทีเรียและสาหร่ายจะกลายเป็นอาหารของโปรโตซัว โรติเฟอร์และครัสตาเซียน ตามลำดับ ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะกลายเป็นอาหารของปลาเล็กและปลาใหญ่ สุดท้ายปลาจะกลายเป็นอาหารของมนุษย์ตามลำดับ และมนุษย์ทิ้งของเสียที่เหลือจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ลงแหล่งน้ำ โดยของเสียเหล่านี้เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ซึ่งเป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์ของแหล่งน้ำต่อไป การเกิดสมดุลของวงจรชีวภาพในแหล่งน้ำมีปัจจัยที่สำคัญคือ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen; DO) โดยแหล่งน้ำได้รับออกซิเจนตามธรรมชาติจากหลายแหล่ง ได้แก่ การคายออกซิเจนจากปฏิกิริยาสังเคราะห์แสงของพืชน้ำ การแลกเปลี่ยนออกซิเจนระหว่างบรรยากาศและผิวน้ำ และการถ่ายเทออกซิเจนในแหล่งน้ำที่มีการไหลเร็ว (Turbulent flow) ดังนั้นหากแหล่งน้ำได้รับปริมาณสารอินทรีย์เพิ่มขึ้น กระตุ้นให้จุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนเพื่อสร้างเซลล์ใหม่มากขึ้น ปริมาณออกซิเจนในแหล่งน้ำลดลงทำให้สัตว์น้ำที่อยู่ในระดับสูงกว่า เช่น ปลาขนาดใหญ่ซึ่งมีความอ่อนไหวมากที่สุดต่อปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงตายลงตามด้วยปลาขนาดเล็ก จากนั้นเป็นครัสตาเซียน โรติเฟอร์และโปรโตซัวตามลำดับ ทำให้แหล่งน้ำนั้นเกิดภาวะขาดออกซิเจนรุนแรงขึ้นจนกลายเป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทำให้เกิดจุลินทรีย์กลุ่มใหม่คือ จุลินทรีย์แบบไม่ใช้อากาศ ซึ่งผลที่ได้จากการย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในภาวะแบบไม่ใช้อากาศนี้ คือ กลิ่นเหม็น และสีค้ำจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสารโลหะซัลไฟด์ต่างๆ



ภาพ 1 วงจรชีวภาพของแหล่งน้ำ

ที่มา : ดัดแปลงจาก วันเพ็ญ วิโรจนกูฏ, 2531. ชีววิทยาสำหรับวิศวกรสิ่งแวดล้อม

กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสำคัญในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยาที่มีศักยภาพในการบำบัดน้ำเสียประเภทไม่ใช้อากาศ คือ *Pseudomonas* และ *Clostridium* เนื่องจาก *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟเออร์ (denitrifier) ซึ่งใช้ในตรรกเป็นตัวรับอิเล็กตรอนให้กลายเป็นก๊าซไนโตรเจน ในขณะที่ไนโตรเจนอาจเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียได้อีกทางหนึ่งขึ้นอยู่กับกลุ่มของแบคทีเรีย (สุบัณชาติ, 2548 , สุเทพ, 2549 และ Tchobanoglous *et al.* ,2004) สำหรับ *Clostridium* เป็นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาการหมักโดยใช้ไนโตรเจนจากนั้นเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย (สุบัณชาติ, 2548 และ Tchobanoglous *et al.* ,2004) สำหรับแบคทีเรียที่มักพบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศจะมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับประเภทหรือแหล่งที่มาของน้ำเสีย เช่น น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารคอง จะพบกลุ่มแบคทีเรียทนเค็ม ในขณะที่อุตสาหกรรมแปรรูปนม จะเป็นกลุ่มแบคทีเรียในดีไฟอิงแบคทีเรียเป็นกลุ่มแบคทีเรียเด่น (สุบัณชาติ, 2548)

### 3. การศึกษาแบคทีเรียในน้ำเสีย

การตรวจสอบแบคทีเรียที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไป มักจะเป็น culture based methods อาทิเช่น direct plate count หรือ Most Probable Number (MPN) ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัด เนื่องจากจุลินทรีย์บางกลุ่มไม่สามารถ

ทำการเพาะเลี้ยงได้ หากเพาะเลี้ยงได้ก็ใช้เวลาาน ทำให้จุลินทรีย์บางส่วนไม่เคยมีการตรวจพบ และไม่มีการศึกษา และอาจเกิดความผิดพลาดในการตรวจสอบได้ง่าย เนื่องจากเชื้อบางชนิดมีคุณลักษณะใกล้เคียงกัน (Amann *et al.*, 1995) โดยในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจจำแนกที่เรียในสิ่งแวดล้อม โดยเทคนิคไม่ทำการเพาะเลี้ยง (unculturable technique) ซึ่งจะทำให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ในปัจจุบันได้มีการนำเอา ribosomal RNA ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมาใช้ในการตรวจหาและจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความจำเพาะสูง ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็วกว่าวิธีการดั้งเดิม อีกทั้งไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ทำให้สามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่มาจากสิ่งแวดล้อมซึ่งยากต่อการเพาะเลี้ยงได้ นอกจากนี้ยังได้มีการนำเอา 16S Ribosomal RNA มาทำ Fluorescent *In Situ* Hybridization มาใช้ในการศึกษา microbial organization และหน้าที่ของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศต่างๆ

เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาแบคทีเรียในน้ำเสีย ส่วนใหญ่เป็นการศึกษายีนในส่วนของ 16S ribosomal RNA ร่วมด้วยการออกแบบ DNA probe เพื่อใช้ในการตรวจจำแนกจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำและใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น เนื่องจากไม่ต้องมีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Amann *et al.*, 1995) โดยนักวิจัยจากต่างประเทศได้มีการศึกษาแบคทีเรียในน้ำเสียโดยใช้วิธีดังกล่าวมาบ้างแล้ว (Xin *et al.*, 2008; Feder *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2003) แต่ในประเทศไทยเองมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากต่างประเทศ กลุ่มของแบคทีเรียที่พบในน้ำเสียแบบต่าง ๆ ทั้งชนิดและปริมาณอาจมีความแตกต่างจากงานวิจัยของต่างประเทศ

#### 4. คุณลักษณะน้ำเสียอุตสาหกรรม

แม้ว่าน้ำเสียที่เกิดในประเทศไทยที่มีปริมาณมากในแต่ละปี คือ น้ำเสียจากชุมชน แต่เนื่องจากการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชนนั้น โดยส่วนใหญ่อยู่ภายใต้การดูแลของภาครัฐและและมีความสกรปรกติเมื่อเทียบกับน้ำเสียจากภาคอุตสาหกรรม อุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งเป็นอุตสาหกรรมอาหารที่มีความสำคัญที่สุดประเภทหนึ่งของประเทศไทย สามารถส่งออกและสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก และยังเป็นอุตสาหกรรมที่ก่อให้เกิดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตในปริมาณมากเช่นกัน น้ำเสียส่วนใหญ่ของอุตสาหกรรมประเภทนี้เป็นน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์สูง ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของเศษเนื้อ เลือด และไขมันของสัตว์ทะเลที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต มีผลทำให้ค่าบีโอดี ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และค่าน้ำมันและไขมันสูง ดังนั้นอุตสาหกรรมดังกล่าวจึงจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่

แหล่งน้ำสาธารณะ เพื่อให้ได้คุณภาพน้ำทั้งตามมาตรฐานที่กฎหมายกำหนดไว้ กระบวนการบำบัดน้ำเสียส่วนใหญ่ของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งจึงเป็นกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ โดยการใช้จุลินทรีย์เป็นตัวย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียให้มีปริมาณน้อยลงหรือตามที่กฎหมายกำหนดไว้ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพ ซึ่งหากทำการศึกษาและทำความเข้าใจถึงชนิดและสมบัติของแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสีย ทำให้สามารถควบคุมประสิทธิภาพการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียให้ดียิ่งขึ้นได้

ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่แข็งใช้อาหารจำพวกอาหารทะเลสด เช่น ปู กุ้ง ปลา และปลาหมึกเป็นวัตถุดิบ น้ำสะอาดหรือน้ำประปาเป็นวัตถุดิบอีกประเภทหนึ่งก็นำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแช่แข็งในปริมาณมากเช่นกัน โดยมีวัตถุประสงค์ในการใช้ล้างทำความสะอาดวัตถุดิบ การล้างภาชนะและเครื่องจักรอุปกรณ์ การล้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการผลิต การทำความสะอาดบริเวณพื้นที่ทำงาน และช่วยในการชำระล้างเศษซากต่างๆ นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำแข็งและน้ำเย็น เพื่อคงความสดและควบคุมการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิต ทั้งนี้หากพิจารณาถึงการใช้น้ำรวมทั้งน้ำแข็งในแต่ละขั้นตอนการผลิต พบว่าการผลิตอาหารทะเลแช่แข็งนั้นมีการใช้น้ำในทุกขั้นตอน และยังมีปริมาณน้ำใช้ที่แตกต่างกันด้วย ดังตารางที่ 1

ตาราง 1 ปริมาณการใช้น้ำในกระบวนการผลิตปลาทะเลแช่แข็ง

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

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2548)

นอกจากนี้ยังมีข้อมูลในการใช้น้ำและน้ำแข็งในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง พร้อมทั้งข้อมูลภาระบีโอดีและซีโอดีของสถานประกอบการในกลุ่มอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งจำนวน 20 แห่ง (กรมอุตสาหกรรมอุตสาหกรรม, 2551) ดังตารางที่ 2

ตาราง 2 ข้อมูลการใช้น้ำ-น้ำแข็ง และภาระบีโอดี-ซีโอดีของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง

สถานประกอบการ	ผลิตภัณฑ์หลัก	กำลังผลิต (ตันต่อวัน)	การใช้น้ำ (ม. <sup>3</sup> ต่อตัน)	การใช้น้ำแข็ง (ม. <sup>3</sup> 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: กรมอุตสาหกรรมอุตสาหกรรม (2551)

น้ำเสียจากกระบวนการผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง เกิดจากการล้างวัตถุดิบเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งน้ำเสียดังกล่าวมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์สูง เนื่องจากการปนเปื้อนของเศษเนื้อ เลือด และไขมันของสัตว์ทะเลที่ใช้เป็นวัตถุดิบ มีผลทำให้ค่าบีโอดี ค่าของแข็งแขวนลอย และค่าไขมันและน้ำมันสูง โดยน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตจะถูกส่งไปบำบัดยังระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรม ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งส่วนใหญ่ใช้ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเนื่องจากน้ำเสียดังกล่าวมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์สูง ทั้งนี้ทางอุตสาหกรรมอาจเลือกใช้ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) หรือระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน (aerobic) ในการบำบัดน้ำเสีย หรือใช้ทั้ง 2 ระบบร่วมกัน สำหรับระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) ของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง ดังตารางที่ 3

ตาราง 3 ปริมาณน้ำเสีย และ COD Loading ต่อวันของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งแต่ละกลุ่มสถานประกอบการที่ใช้ระบบ UASB

ประเภทอุตสาหกรรม	ปริมาณน้ำ และ COD Loading	
	m <sup>3</sup> /day	Kg COD/day
กุ้งแช่แข็ง (1)	1,000	2,100
กุ้งแช่แข็ง (2)	1,000	1,500
ทำปลา	250	600
แช่แข็งและซูริมิ	2,400	3,000

ที่มา: สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย (2548)

โดยทั่วไปอุตสาหกรรมอาหาร จะมีปริมาณสารอินทรีย์ปะปนมากับน้ำเสียปริมาณสูงทำให้ระบบบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนเข้ามามีบทบาทในการบำบัด เพราะสามารถลดค่า BOD loading ได้มาก ดังนั้นระบบ UASB; Up-flow Anaerobic Sludge Blanket จึงเป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่อุตสาหกรรมอุตสาหกรรมนิยมใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

ตาราง 4 ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมปลา

พารามิเตอร์ทางเคมี	หน่วย	ความเข้มข้น	
		การล้างและการแช่	น้ำเสียรวม
COD	mg/l	5,250	873
SS	mg/l	371	119
TDS	g NaCl/l	46	17
Cl <sup>-</sup>	g/l	27	10
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/l	1,240	164
TKN	mg N/l	747	128
T-P	mg P/l	5	5

ที่มา: Dan (2000)

จากตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าระบบบำบัดน้ำเสียมีปริมาณคลอรีนอยู่ค่อนข้างสูง ซึ่งคลอรีนจะมีผลต่อระบบบำบัดแบบชีวภาพ ไม่ว่าจะผลต่อค่าพารามิเตอร์ทางเคมี หรือปริมาณกลุ่มประชากรของ methanogen (Joseph and Frederick, 1992)

โดยระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพที่ใช้แบคทีเรียในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ปัจจุบันมีทั้งหมด 4 ประเภท (สุบัตินิต, 2548; สุเทพ, 2552) ดังต่อไปนี้ ระบบ UASB; Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor ระบบ Conventional Anaerobic Digester แต่ระบบดังกล่าวไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างมาก จึงต้องการอุณหภูมิที่สูงและคงที่เพื่อทำการย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ระบบ Anaerobic Filter (Packed-bed Reactors) แต่เนื่องจากพื้นที่ผิวสำหรับจุลินทรีย์ยึดเกาะน้อยเกินไป ส่งผลต่อประสิทธิภาพของระบบ และระบบ Anaerobic Fluidized Bed Reactor ซึ่งข้อเสียของระบบคือต้องการการดูแล และควบคุมอย่างใกล้ชิด ดังนั้นจึงต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการควบคุม นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการก่อสร้างระบบสูง

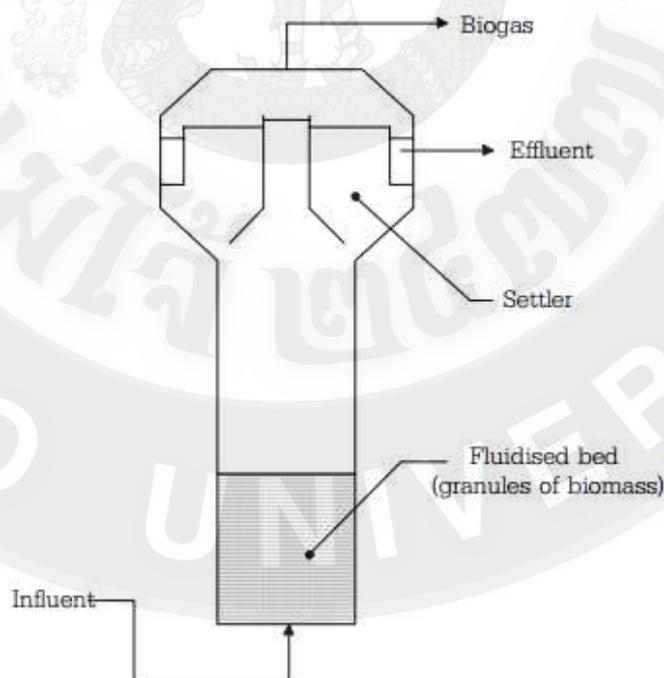
## 5. ระบบบำบัดน้ำเสียและเกณฑ์การออกแบบสำหรับอุตสาหกรรมอาหารทะเล

ระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแห่งหนึ่งส่วนใหญ่ใช้ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเนื่องจากน้ำเสียดังกล่าวมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์สูง ทั้งนี้ทางอุตสาหกรรมอาจเลือกใช้ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) หรือระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน (aerobic) ในการบำบัดน้ำเสีย หรือใช้ทั้ง 2 ระบบร่วมกัน

### 5.1 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน Upflow Anaerobic Sludge Blanket; UASB

#### UASB

ระบบ UASB เป็นระบบที่ได้รับความนิยมในการบำบัดน้ำเสียที่มีค่า COD สูง เมื่อเทียบกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนอื่นๆ เนื่องจากมีการพัฒนาความหนาแน่นของตะกอน โดยกลไกในการบำบัดคือ น้ำเข้าจะไหลผ่านบริเวณกลุ่มตะกอนที่อยู่ด้านล่างของถัง ซึ่งกลุ่มตะกอนดังกล่าวจะมีจุลินทรีย์ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ก่อนที่จะไหลขึ้นด้านบนของระบบบำบัด และออกจากระบบบำบัด นอกจากนี้การย่อยสลายของแบคทีเรียยังทำให้ระบบบำบัด UASB เกิดก๊าซมีเทนขึ้นด้วยกลไกการย่อยสลายของแบคทีเรีย โดยที่ก๊าซจะถูกกักไว้ด้านบนของระบบบำบัด เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพ 2 ส่วนประกอบต่างๆ ของระบบ UASB

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2545)

โดยการออกแบบระบบ UASB พิจารณาจากข้อมูลของลักษณะน้ำเสีย, ปริมาณสารอินทรีย์, อัตราการไหลของน้ำ, ปริมาตรของถังปฏิกรณ์, ลักษณะทางกายภาพ และระบบเก็บกักก๊าซ (Tchobanoglous *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีค่าพารามิเตอร์ ดังตารางที่ 5 ที่ใช้ในการออกแบบเบื้องต้นของระบบ UASB

ตาราง 5 ค่าการออกแบบถังปฏิกรณ์ UASB เมื่อเริ่มต้นระบบ

พารามิเตอร์	หน่วย	ค่าที่ใช้ในการออกแบบ
pH	-	6.3-7.8
Hydraulic retention time; HRT	ชั่วโมง; hr	4-20
Organic loading rate; OLR	Kg COD/m <sup>3</sup> .d	0.4-3.6
อุณหภูมิ	°C	20-55
COD:N:P	-	600:5:1

ที่มา: คัดแปลงจาก Tchobanoglous *et al.* (2004); Habeeb *et al.* (2010)

### ลักษณะของน้ำเสีย

ลักษณะของน้ำเสียที่ใช้ในการบำบัดจะพิจารณาองค์ประกอบของน้ำเสียและค่าของแข็ง การเกิดเม็ดตะกอนจะแตกต่างกันตามการไหลของน้ำเสีย หรือภายใต้การควบคุมระบบบำบัดที่ต่างกัน ซึ่งลักษณะสำคัญของระบบ UASB คือ การเก็บกักตะกอนไว้ในถังปฏิกรณ์ได้จำนวนมาก โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เป็นเม็ดตะกอน จนกระทั่งมีขนาดใหญ่ และน้ำหนักมาก มีความเร็วในการจมตัวสูง สามารถตกตะกอนได้ดี การรวมตัวเป็นเม็ดตะกอนขึ้นอยู่กับลักษณะน้ำเสีย เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ตอนเริ่มเดินระบบ และอุปกรณ์แยก 3 สถานะต้องทำงานได้ดี โดยตะกอนจุลินทรีย์ที่ตกตะกอนแยกตัวลงมา ต้องสามารถกลับกลับเข้าถังปฏิกรณ์ได้ง่ายไม่มีการสะสมตัวอยู่ในส่วนตกตะกอน และมีการหลุดออกของตะกอนไปกับน้ำทิ้งน้อยที่สุด (กรมควบคุมมลพิษ, 2545) นอกจากนี้สภาพแวดล้อมก็ยังส่งผลต่อความแตกต่างของลักษณะของจุลินทรีย์ น้ำเสียที่มีปริมาณของโปรตีน และไขมันสูงมีแนวโน้มทำให้เกิดปัญหาต่อเม็ดตะกอน และการเกิดปัญหาสตัคค์เล็ก ซึ่งน้ำเสียของอุตสาหกรรมปลาจะมีโปรตีน และไขมันเป็นส่วนประกอบหลักของน้ำเสีย (Chowdhury *et al.*, 2010) ประสิทธิภาพในการบำบัดของระบบ UASB เป็นการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งควรมีค่า BOD:N:P เท่ากับ 100:1.1:0.2 และระบบบำบัดควรมีค่า COD:N:P เท่ากับ 600:5:1 (Tchobanoglous *et al.*, 2004)

### ปริมาณสารอินทรีย์

โดยปกติน้ำเสียที่มีค่า COD loading ที่ผ่านการบำบัดด้วยระบบ UASB แล้ว ระบบดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพในการลดค่า COD loading 90 – 95% เมื่อ COD loading อยู่ในช่วง 12 – 20 kg COD/m<sup>3</sup>d ที่อุณหภูมิ 30 – 35 °C แต่หากประสิทธิภาพในการบำบัดน้อยกว่า 90% และมีปริมาณตะกอนออกมาพร้อมกับน้ำออกมาก ต้องมีการเพิ่มอัตราการไหลให้มากขึ้นเพื่อเป็นการลดความหนาแน่นของเม็ดตะกอน จึงเป็นผลให้ค่า COD loading สูงขึ้น โดยหากต้องการให้มีประสิทธิภาพในการบำบัด 85-95% สำหรับระบบ UASB ที่อุณหภูมิ 30°C ค่า COD loading และปัจจัยต่างๆ ควรเป็นไปตามดังตารางที่ 6

ตาราง 6 ค่า COD loading ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัด 85-95% สำหรับระบบ UASB ที่อุณหภูมิ 30°C

Wastewater COD (mg/L)	Fraction as particulate COD	Volumetric loading, kg COD/m <sup>3</sup> d		
		Flocculent sludge	Granular sludge with high TSS removal	Granular sludge with little TSS removal
1000-2000	0.10-0.30	2-4	2-4	8-12
	0.30-0.60	2-4	2-4	8-14
	0.60-1.00	na	na	na
2000-6000	0.10-0.30	3-5	3-5	12-18
	0.30-0.60	4-8	2-6	12-24
	0.60-1.00	4-8	2-6	na
6000-9000	0.10-0.30	4-6	4-6	15-20
	0.30-0.60	5-7	3-7	15-24
	0.60-1.00	6-8	3-8	na
9000-18,000	0.10-0.30	5-8	4-6	15-24
	0.30-0.60	na	3-7	na
	0.60-1.00	na	3-7	na

ที่มา: Tchobanoglous *et al.* (2004)

### ความเร็วในการไหลของน้ำ

ความเร็วในการไหลของน้ำจะขึ้นอยู่กับการไหล และพื้นที่ของปฏิกรณ์ ซึ่งเป็นไปตามหลักการการออกแบบ ซึ่งความเร็วน้ำไหลขึ้นที่เหมาะสม ควรจะน้อยกว่า 1 m/hr โดยการออกแบบเป็นไปตามตารางที่ 7 ดังนี้

ตาราง 7 ความเร็วในการไหลของน้ำ และความสูงของถังปฏิกรณ์

ชนิดของน้ำเสีย	อัตราการไหลขึ้น (m/h)		ความสูงของถังปฏิกรณ์ (m)	
	ช่วง	เฉลี่ย	ช่วง	เฉลี่ย
COD nearly 100% soluble	1.0-3.0	1.5	6-10	8
COD partially soluble	1.0-1.25	1.0	3-7	6
Domestic wastewater	0.8-1.0	0.7	3-5	5

ที่มา: Tchobanoglous *et al.* (2004)

### ปริมาตรของถังปฏิกรณ์

การออกแบบถังปฏิกรณ์จะพิจารณาจาก ปริมาณสารอินทรีย์ อัตราการไหลของน้ำ และประสิทธิภาพของระบบที่ต้องการ โดยที่ประสิทธิภาพของการบำบัดน้ำเสียสามารถดูได้จาก จำนวนของตะกอน และชีวมวลที่ยังมีประสิทธิภาพในการทำงานอยู่ โดยความสูงของถังควรอยู่ระหว่าง 4.0-4.8 m และส่วนตกตะกอนควรสูง 1.5-1.6 m (กรมควบคุมมลพิษ, 2545)

### ปัจจัยที่ควบคุมกระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน

แม้ว่าการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจนจะเป็นกระบวนการที่ง่ายต่อการควบคุมระบบ แต่ก็ต้องมีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมตามที่ระบบต้องการ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการบำบัดน้ำเสีย โดยสุบัตินิต (2548) กล่าวว่า

### อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิมีอิทธิพลอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยแบคทีเรียแต่ละกลุ่มในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนจะมีความต้องการอุณหภูมิในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียได้ดังนี้

- |                        |                |         |
|------------------------|----------------|---------|
| 1) Psychrophilic range | มีช่วงอุณหภูมิ | 5-15°C  |
| 2) Mesophilic range    | มีช่วงอุณหภูมิ | 35-37°C |
| 3) Thermophilic range  | มีช่วงอุณหภูมิ | 50-55°C |

เนื่องจากแบคทีเรียที่สร้างมีเทนมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายครั้งนี้ซึ่งแบคทีเรียชนิดดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมากซึ่งถึงย่อยสลายแบบที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงต้องใช้อุณหภูมิประมาณ 50-65°C ซึ่งอุณหภูมิ 52°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมมากที่สุดในการย่อยสลาย และถึงย่อยสลายแบบอุณหภูมิปานกลางซึ่งต้องมีอุณหภูมิประมาณ 30-35°C ส่วนในประเทศไทยระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนมักถูกควบคุมแบบ mesophilic ได้เองโดยสภาพภูมิอากาศในประเทศไทยเอง โดยไม่ต้องเพิ่มอุณหภูมิให้กับน้ำเสียก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดหรือถึงปฏิกรณ์ (สันทัด, 2549)

#### พีเอช (pH)

ความเป็นกรด-ด่างเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการย่อยสลายของแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในถึงย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่มีแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างมีเทน ถ้าค่า pH มีค่าที่ไม่เป็นกลาง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างมีเทนจะถูกยับยั้ง ซึ่งสันทัด (2549) กล่าวว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียโดยทั่วไปมีค่าอยู่ระหว่าง 5-9 และค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ 6.8-7.2 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา

#### อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ถ้าสภาพแวดล้อมต่างๆ ทั้งทางกายภาพและทางเคมีไม่ขัดต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อัตราเร่งในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารเท่านั้น (Tchobanoglous *et al.*, 2004) โดย สันทัด (2549) กล่าวว่า การเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณอาหาร การวัดอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียวัดได้โดยการหาปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะสัมพันธ์กับระยะเวลา นั่นคือหากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือน้ำเสีย จะสามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดังนี้

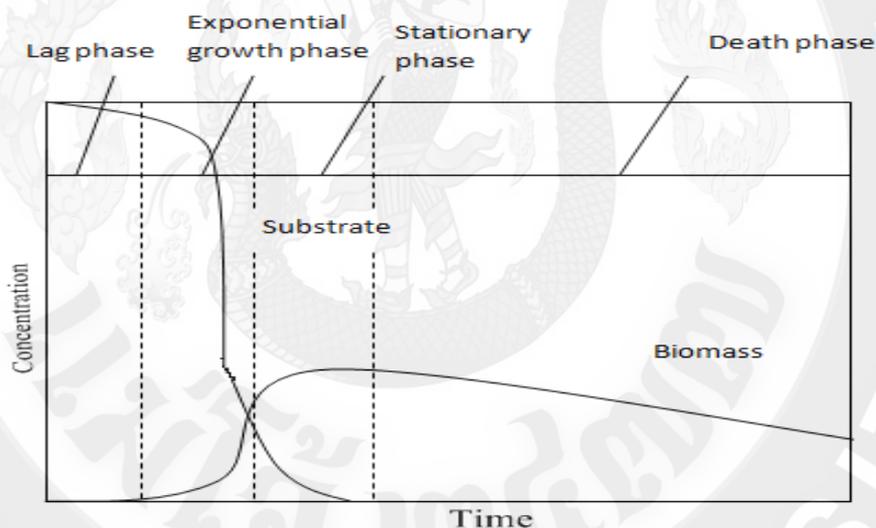
1. ในระยะแรกแบคทีเรียจะมีการปรับตัว และเป็นระยะที่แบคทีเรียได้รับสารอาหารเพื่อนำมาสร้างส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ ดังนั้นจึงยังไม่มีแบ่งตัว อัตราการเจริญเติบโตต่ำ ระยะนี้เรียกว่า lag phase

2. เมื่อแบคทีเรียปรับตัวได้จะมีการสะสมอาหาร และแบ่งตัวอย่างรวดเร็วอย่างสม่ำเสมอ บางครั้งเรียกว่า steady state อัตราการเจริญเติบโตในระยะนี้สูงสุด เรียกว่า log phase

3. หลังจากนั้นอาหารต่างๆในน้ำเสีย หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มน้อยลง ของเสียจากแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะถูกจำกัด โดยแบคทีเรียบางส่วนสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ และบางส่วนจะตายลง ทำให้แบคทีเรียโดยรวมค่อนข้างคงที่นั่นคือ อัตราการเจริญเติบโตสุทธิเกือบเป็นศูนย์ ระยะนี้เรียกว่า stationary phase

4. หลังจากระยะ stationary phase อาหารจะยิ่งน้อยลง และอัตราการตายจะสูงกว่าอัตราการเจริญเติบโต ปริมาณแบคทีเรียจึงลดลง เรียกว่า declined growth

5. Endogenous growth phase เป็นระยะที่อาหารเหลือน้อยลงจนเกือบหมด จะมีการตายมากขึ้น พวกที่ดำรงชีวิตอยู่ได้จำเป็นต้องใช้อาหารที่สะสมภายในเซลล์เพื่อดำรงชีวิตเรียกว่า Auto oxidation ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพ 3 การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระหว่างสารตั้งต้นกับมวลของจุลินทรีย์  
ที่มา: ดัดแปลงจากสันทัด (2549)

#### เวลาที่น้ำเสียอยู่ในถังย่อยสลาย (Retention Time)

เวลาที่อยู่ที่อยู่ในถังต้องเป็นเวลาที่เหมาะสม และเพียงพอที่จะทำให้เกิดการย่อยสลายสารปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เวลาที่เก็บน้ำเสียน้อยๆ 4 ชั่วโมง แต่ควรมีมากกว่า 6 ชั่วโมง (กรมควบคุมมลพิษ, 2545) ส่วน กรมควบคุมมลพิษ (2545) ได้แนะนำว่า ความเร็วน้ำไหลของน้ำไม่ควรเกิน 4 m/hr

### สารพิษ (Toxicants)

เนื่องจากสารบางชนิดมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของแบคทีเรีย อาทิเช่น ซัลไฟด์ มีผลต่อการทำงานของกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทน โดยเกิดจากหากระบบมีกรดแอสिटิกเกิดขึ้น ปริมาณน้อยจะทำให้ขั้นตอนสุดท้ายในถังย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนเกิดปฏิกิริยาซัลเฟตรีดักชัน (sulfate reduction) ได้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และทำให้ระบบล้นเหลวได้

### ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์จะเกิดจากขั้นตอนที่ 2 หรือ acidogenesis และเป็นสารตั้งต้นของ ปฏิกิริยาการสร้างก๊าซมีเทน ถ้าปริมาณของกรดอินทรีย์มีอยู่ปริมาณสูงกว่าปกติจะทำให้บ่งชี้ได้ว่า ขั้นตอนของปฏิกิริยาการสร้างมีเทนถูกยับยั้ง หรือเป็นสัญญาณที่บ่งบอกถึงความไม่สมดุลของ กระบวนการย่อยสลายในระบบทำให้ระบบล้นเหลวได้

### ไอออน และความเค็ม

Joseph and Frederick (1992) กล่าวว่า ซัลเฟตเป็นตัวควบคุมที่สำคัญในขั้นตอน methanogenesis เพราะมีการทำงานแข่งกันระหว่าง sulfate-reducing bacteria และ methanogen ความเค็มมีผลต่อค่าฟลักซ์ของก๊าซมีเทนเมื่อมีการทดลองกับน้ำทะเล โดยหาก NaCl มีความเข้มข้นมากกว่า 0.2 M จะมีผลกระทบต่อกลุ่มประชากร methanogen นอกจากนี้ไอออนยังส่งผลกระทบต่อ การเกิดปฏิกิริยาทางเคมี และอาจมีผลกระทบต่อกรยับยั้งด้านอื่นทางเคมี

## 5.2 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน

ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน มีอยู่หลายรูปแบบด้วยกัน เช่น ระบบบำบัดแบบตะกอนเร่ง (Activated sludge, AS) ระบบบำบัดแบบแผ่นจานหมุนชีวภาพ (Rotating biological contactor, RBC) ระบบบำบัดแบบคลองวนเวียน (Oxidation ditch, OD) และ ระบบบำบัดแบบถังปฏิกรณ์สลับเป็นกะ (Sequencing batch reactor, SBR) (สุเทพ, 2552) โดยระบบ บำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งถือเป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่มีความนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ใน ประเทศที่พัฒนาแล้วได้มีการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งให้มีความสามารถในการ บำบัดธาตุอาหารได้มากขึ้นนอกเหนือจากการบำบัดสารอินทรีย์คาร์บอนเพียงอย่างเดียว ซึ่งระบบ บำบัดแบบตะกอนเร่งสามารถนำมาประยุกต์เพื่อกำจัดไนโตรเจน และฟอสฟอรัสได้ ในที่นี้จะ กล่าวถึงระบบบำบัดน้ำเสียแบบ ตะกอนเร่งทั่วไป ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัด สารไนโตรเจน และระบบบำบัด น้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารฟอสฟอรัส ดังนี้

### 5.3 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง เป็นระบบที่สามารถบำบัดได้ทั้งน้ำเสียชุมชน และน้ำเสียอุตสาหกรรม โดยอาศัยการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) เป็นหลัก ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งประกอบด้วยถังเติมอากาศ (aeration Tank) และถังตกตะกอน (sedimentation tank) ขั้นตอนแรกคือการเติมน้ำเสียเข้าถังเติมอากาศที่มีตะกอนจุลินทรีย์หรือเรียกว่า “สลัดจ์” (sludge) อยู่เป็นจำนวนมาก จุลินทรีย์เหล่านี้จะทำการย่อยสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสียให้อยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) น้ำ แอมโมเนีย (NH<sub>4</sub>) และเกิดเซลล์ใหม่ของจุลินทรีย์ (Bitton, 2005) หลังจากผ่านถังเติมอากาศแล้วน้ำเสียจะไหลเข้าสู่ถังตกตะกอนเพื่อเป็นการแยกสลัดจ์ออกจากน้ำเสียโดยการตกตะกอนของสลัดจ์สู่ก้นถัง ตะกอนบางส่วนจะถูกสูบกลับเข้าไปในถังเติมอากาศเพื่อรักษาความเข้มข้นของสลัดจ์ให้ได้ตามที่กำหนด และอีกส่วนจะเป็นสลัดจ์ส่วนเกิน (excess sludge) ที่ต้องนำไปกำจัดต่อไป ค่าการออกแบบระบบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการกำจัดบีโอดีได้ถึงร้อยละ 85-95 (Tchobanoglous *et al.*, 2004) วัตถุประสงค์ของการบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งคือ เพื่อให้สามารถลดสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสียให้มากที่สุดในช่วงเวลาอันสั้น โดยวิธีทางชีววิทยา ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมระบบให้มีประสิทธิภาพคือ (สุรพล, 2538)

#### ก. ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย

เนื่องจากสารอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นอาหารของจุลินทรีย์ในระบบตะกอนเร่ง ดังนั้นหากมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอินทรีย์มากจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และมีผลทำให้อัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์สูงคือ มีอาหารมากทำให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและกระจายอยู่ทั่วไปแทนที่จะรวมตัวกันเป็นก้อน (floc) ทำให้เกิดการตกตะกอนได้ไม่ดี ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำของอาหารต่อจุลินทรีย์ต่ำ คือมีอาหารน้อยจำนวนจุลินทรีย์น้อยลงเกิดตะกอนจุลินทรีย์และตกตะกอนได้เร็ว แต่ก็ไม่สามารถจับตะกอนเล็กๆตกลงมาได้หมดทำให้น้ำที่ออกจากถังตกตะกอนขุ่น

#### ข. อาหารเสริม

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

### ค. ออกซิเจนละลายน้ำ

ในถังเติมอากาศจะต้องมีออกซิเจนละลายน้ำไม่น้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเป็นการรักษาความเข้มข้นของออกซิเจนในน้ำ ซึ่งค่าออกซิเจนละลายน้ำขึ้นอยู่กับอุณหภูมิกล่าวคือ ถ้าอุณหภูมิสูงออกซิเจนจะมีค่าการละลายน้ำอึดตัวต่ำทำให้ต้องมีการเติมออกซิเจนมาก และทำให้เกิดการสิ้นเปลือง ในขณะที่เดียวกันถ้าอุณหภูมิต่ำออกซิเจนจะมีค่าการละลายน้ำอึดตัวสูงจึงทำให้การเติมออกซิเจนน้อยกว่าอุณหภูมิสูง

### ง. ระยะเวลาในการบำบัด

ระยะเวลาในการบำบัดในบ่อเติมอากาศต้องมีมากเพียงพอที่จุลินทรีย์จะใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ หากใช้ระยะเวลาสั้นเกินไปสารที่ถูกย่อยสลายได้ยากจะไม่ถูกย่อยจนถึงขั้นสุดท้าย ทำให้ค่าบีโอดีเหลืออยู่ในน้ำเสียมาก

### จ. ค่าพีเอช

แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีที่ค่าพีเอช 6.5-8.5 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 6.5 ว่าจะเติบโตได้ดีกว่าแบคทีเรีย ทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดต่ำลงและตะกอนเกิดการตกตะกอนได้ไม่ดี ส่วนค่าพีเอชสูงทำให้ฟอสฟอรัสแยกตัวออกจากน้ำ (precipitate) จุลินทรีย์ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในขณะเดียวกันถ้าพีเอชสูงหรือต่ำเกินไปจุลินทรีย์ไม่สามารถดำรงชีวิตได้

### ฉ. สารเป็นพิษ

สารเป็นพิษแบ่งออกเป็น 2 จำพวกคือ แบบพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ซึ่งจุลินทรีย์จะตายหมดภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วโมงสารจำพวกนี้ได้แก่ ไซยาไนด์ อาร์เซนิก 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

### ฉ. อัตราการไหลของน้ำ

การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของน้ำมีผลโดยตรงต่อการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพและในบ่อกักตะกอน กล่าวคือหากอัตราการไหลของน้ำเสียสูง ระยะเวลาในการบำบัดจะน้อยลง ค่าสารอินทรีย์เพิ่มขึ้น และระยะเวลาตกตะกอนลดลงด้วย ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดลง ดังนั้นจึงควรมีอัตราการไหลของน้ำอย่างสม่ำเสมอให้ใกล้เคียงกับที่ออกแบบเอาไว้ เป็นต้น

#### 5.3.1. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจน

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

ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (nitrification) คือ กระบวนการย่อยสลายแอมโมเนียมไอออนหรือก๊าซแอมโมเนีย ภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจนกลายเป็นไนเตรท (Gerardi, 2006)

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

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

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

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

ง. ความเข้มข้นของออกซิเจนหรือค่าออกซิเจนละลายน้ำมีผลต่อแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิง ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความไวต่อออกซิเจนความเข้มข้นต่ำ ทั้งนี้ถ้าค่าออกซิเจนละลายน้ำ

เท่ากับหรือมากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธงชัย, 2545; Tchobanoglous *et al.*, 2004) ไม่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน แต่ควรให้มีค่าออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. อัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็นมีผลต่อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย กล่าวคือเมื่ออัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็นเพิ่มขึ้นไนตริไฟอิงแบคทีเรียจะลดลง ดังนั้นอัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็นที่เหมาะสมต่อกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันคือ ไม่เกิน 3 (Tchobanoglous *et al.*, 2004; Bitton, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถแสดงอัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็นที่มีผลต่อสัดส่วนของไนตริไฟเออร์ต่อไวรัสเอสในระบบบำบัดน้ำเสีย

ฉ. ความเค็ม มีผลทางลบต่อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย แต่ก็ยังสามารถปรับตัวเข้ากับ ความเค็มได้ดีพอควร ได้มีการทดลองกับระบบแอนีออกซิก-แอโรบิก พบว่าไนตริไฟอิงแบคทีเรียปรับตัวเข้ากับความเค็มได้ดีกว่าเฮเทอโรโทปแบคทีเรียที่กำจัดบีโอดี

ช. สารพิษ มีสารหลากหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งได้

ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) คือ ปฏิกิริยาที่เปลี่ยนไนเตรทให้เป็นก๊าซไนโตรเจน โดยปฏิกิริยาดังกล่าวประกอบด้วย 5 โมเลกุลไนโตรเจน และ 4 ขั้นตอนทางชีวเคมี ซึ่งโมเลกุลทั้ง 5 โมเลกุลประกอบด้วย ไนเตรท ( $\text{NO}_3^-$ ) ไนไตรท์ ( $\text{NO}_2^-$ ) ไนตริกออกไซด์ ( $\text{NO}$ ) ไนตรัส-ออกไซด์ ( $\text{N}_2\text{O}$ ) และก๊าซไนโตรเจน ( $\text{N}_2$ )

ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันมี 2 ขั้นตอนที่ต้องการพลังงานมาช่วยในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งพลังงานที่ต้องการนั้นคือ สารอินทรีย์หรือสับสเตรท (substrate) นั่นเอง ปฏิกิริยาที่ว่าเป็นการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และการเปลี่ยนไนไตรท์เป็นก๊าซไนโตรเจน โดยมีไนตริกออกไซด์และไนตรัส-ออกไซด์ เป็นสารประกอบตัวกลาง (intermediate compound)

ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่สามารถกำจัดไนโตรเจนได้อย่างสมบูรณ์ โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวให้อิเล็กตรอน (สับสเตรท) และจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแอนีออกซิก

### 5.3.2 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารฟอสฟอรัส

น้ำเสียบางประเภทมีสารฟอสฟอรัสปนเปื้อนอยู่ เช่น น้ำเสียจากอาคารบ้านเรือน โดยฟอสฟอรัสจะอยู่ในรูปของฟอสเฟตหลายรูปแบบ เช่น ออร์โทฟอสเฟต คอนเดนส์ฟอสเฟต และออร์แกนิกฟอสเฟต (ฟอสโฟไลปิด น้ำตาลฟอสเฟตและนิวคลีโอไทด์) เป็นต้น โดยกลุ่มโพลีฟอสเฟต และออร์แกนิกฟอสเฟตจะปนเปื้อนในน้ำเสียสูงถึงร้อยละ 70 ที่มาของสารฟอสเฟตเหล่านี้คือ อุจจาระ ของเสียและสารชำระล้างโดยเฉพาะอย่างยิ่งผงซักฟอก ฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยที่

สำคัญของการเกิด ยูโทรฟิเคชันในน้ำ ดังนั้นจึงต้องมีการบำบัดสารฟอสฟอรัสในน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ ซึ่งการบำบัดฟอสฟอรัสด้วยวิธีทางชีวภาพต้องอาศัยกระบวนการ 2 ขั้นตอน (สุบัตฑิต, 2538) คือ ระบบที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic system) สลับกับระบบที่ใช้ ออกซิเจน (aerobic system) ซึ่งระบบการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic system) คือ กลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนทำการดูดซึมสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟตเข้าไปในเซลล์และย่อย ให้เปลี่ยนเป็นสารอินทรีย์ฟอสเฟตก่อนที่จะปล่อยสารอินทรีย์ฟอสเฟตออกนอกเซลล์ และระบบ การย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (aerobic system) คือ กลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนและสะสม ฟอสเฟต เรียก polyphosphate accumulate organisms (POAs) (Sidat *et al.*, 1999; Bitton, 2005) เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่จะทำการดูดซึมสารอินทรีย์ฟอสเฟตเข้าไปภายในเซลล์ภายใต้สภาวะที่มี ออกซิเจน

ข้อมูลการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งชนิดต่างๆ เช่น อัตราส่วนของอาหารต่อตะกอนของจุลินทรีย์ (F/M) อายุสลัดจ์ ระยะกักเก็บน้ำ และประสิทธิภาพการกำจัดบีโอดี แสดงดังตารางที่ 8

ตาราง 8 ข้อมูลการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งชนิดต่างๆ

ระบบ	F/M (kg BOD/kg MLVSS-d)	อายุสลัดจ์ (วัน)	ระยะ กักเก็บน้ำ (ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพ การกำจัดบีโอดี (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
ระบบเอสปีอาร์	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

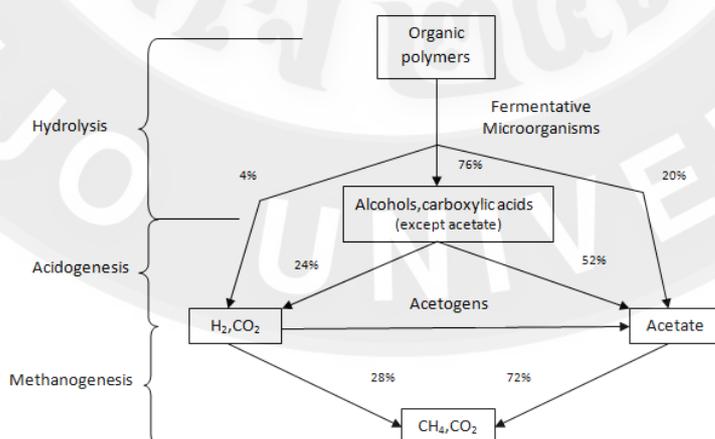
ที่มา: Tchobanoglous *et al.* (2004)

## 6. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำเสีย

ทวี (2538) และสุพัฒน์ (2548) อธิบายถึงการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางชีววิทยา (biological treatment) ซึ่งเป็นการบำบัดน้ำเสียที่อาศัยจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกว่าร้อยละ 95 ช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ดังนั้นการศึกษาและการทำความเข้าใจถึงชนิดและคุณสมบัติของแบคทีเรียทำให้สามารถควบคุมการบำบัดน้ำเสียได้

### 6.1 จุลินทรีย์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน

กระบวนการย่อยสลายในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนจะประกอบด้วยกลุ่มฟังไจ และ โปรโตซัวจำนวนน้อย ดังนั้นการย่อยสลายส่วนใหญ่เป็นหน้าที่ของแบคทีเรีย (Gerardi, 2006) ชนิดของแบคทีเรียที่พบในระบบบำบัดประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 กลุ่ม คือ ไฮโดรไลติกแบคทีเรีย (hydrolytic bacteria) เฟอร์เมนเตทีฟแบคทีเรีย (fermentative bacteria) และ เมทาโนจีนิกแบคทีเรีย (methanogenic bacteria) จากการชนิดของแบคทีเรียพบว่าส่วนใหญ่คือ *Clostridium* spp. และ *Bacteroides* spp. รวมทั้ง *Pseudomonas* spp. และ *Bacillus* spp. แต่แบคทีเรียกลุ่มเด่นในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนคือกลุ่มแบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจน ส่วน *Clostridium* spp., *Megasphaera* spp., streptococci และ bacilli เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นในกลุ่มของ fermentative bacteria ทั้งนี้แบคทีเรียทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์จนกระทั่งกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซมีเทน โดยหลักจากการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนจะประกอบไปด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กระบวนการอะซิโดเจนีซิส (acidogenesis) และกระบวนการเมทาโนเจนีซิส (methanogenesis) (สุเทพ, 2552) ดังภาพที่ 4



ภาพ 4 การย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน

ที่มา: คัดแปลงมาจาก Zehnder et al. (1982); สุเทพ (2552)

กรมควบคุมมลพิษ (2546) กล่าวว่า ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กระบวนการแรกที่เป็นบทบาทของกลุ่ม hydrolytic bacteria ที่ผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ให้เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเพื่อที่เซลล์สามารถดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ และนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

การย่อยสลายโปรตีนในกระบวนการ hydrolysis จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ proteases ซึ่งทำให้เกิดเป็นกรดอะมิโน ไคเปปไทด์ หรือ โอลิโกเปปไทด์ ส่วนปฏิกิริยา hydrolysis ของคาร์โบไฮเดรตจะเกิดปฏิกิริยาที่ค่า pH น้อยๆ (Gallert and Winter, 2005) แต่หากเป็นปฏิกิริยา hydrolysis ของโปรตีนจะมีค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากับค่า pH ตามธรรมชาติ หรือมีค่า alkaline pH น้อยๆ ปฏิกิริยา acidogenesis ของน้ำเสียที่มีโปรตีนจะมีค่า pH เท่ากับ 7 หรือมากกว่า (Gallert and Winter, 2005)

Gallert and Winter (2005) กล่าวว่า ไขมันเป็นชีวพอลิเมอร์ที่มีผลต่อค่า COD ในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร การย่อยสลายไขมันด้วยเอนไซม์ lipases หรือ phospholipases ไขมัน และน้ำมันต้องถูกลดแรงตึงผิว การย่อยสลายไขมันในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน โมเลกุลของน้ำตาล และกลีเซอรอลสามารถถูกย่อยสลายให้กลายเป็นก๊าซมีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์จากปฏิกิริยาของ fermentative bacteria และ methanogenic bacteria หลังจากปฏิกิริยา hydrolysis fermentation และ acetogenesis สารประกอบไขมันที่อยู่ในช่วง methanogenesis จะเปลี่ยนเป็น acetate คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน ซึ่งเป็นแก๊สชีวภาพ ปฏิกิริยาทั้งหมดจะเกิดภายในเซลล์ที่มีอิทธิพลมาจาก syntrophic interaction ที่มีการถ่ายโอนไฮโดรเจน ยกเว้นปฏิกิริยา lipases ที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์

*Clostridium butyricum* และ *Enterobacter aerogenes* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน อย่างมีประสิทธิภาพ (Nath and Das, 2004) ซึ่งจะอยู่ในกระบวนการ Acidogenesis (Jo *et al.*, 2008) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเป็นกระบวนการที่สองที่แบคทีเรียมีการผลิตกรดอินทรีย์ (Organic acids) และแอลกอฮอล์ (alcohols) จึงทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้มีชื่อเรียกว่า อะซิโดเจน (acidogens) ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Clostridium* spp., *Peptococcus anaerobes* *Bifidobacterium* spp., *Desulphovibrio* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Acetomyces*, *Staphylococcus* spp. และ *Escherichia coli* แต่กลุ่มของจุลินทรีย์ระยะนี้เป็นกลุ่มที่ยังไม่สามารถผลิตมีเทนได้จึงเรียกอนเมทาโนจีนิกแบคทีเรีย (non-methanogenic bacteria) ซึ่งมีหลากหลายสายพันธุ์เป็นทั้งแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative) และแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น

(obligate anaerobic bacteria) โดยแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่มีบทบาทในการสร้างกรดไขมันระเหยก็คือกลุ่ม *Clostridium* spp. ดังแสดงในตารางที่ 9 จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในถัง UASB พบว่าประชากรส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม methanogen รองลงมาคือ non-methanogen แต่เมื่อเดินระบบและมีการรับสารอินทรีย์พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นตามอัตราการป้อนสารอินทรีย์ที่เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้พบว่า suspended bed สัดส่วนของ non-methanogen ต่อประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มมากขึ้น และเป็นกลุ่มประชากรหลัก ในขณะที่ packed bed สัดส่วนของ non-methanogen คงที่ (สมเกียรติ, 2548)

อย่างไรก็ตามพบว่า hydrolytic bacteria ในกลุ่มแรกบางพวกก็มีความสามารถทำหน้าที่ย่อยสลายแบคทีเรียที่สร้างกรด (acid formers) ในกลุ่มที่สองบางพวก โดยสร้างกรดและแอลกอฮอล์ได้จากการหมัก (fermentation) กรดไขมัน (fatty acids monosaccharides) และกรดอะมิโน (amino acids) ไปเป็นพรอปิเนต (propionate) บิวไทเรต (butyrate) ซัคซิเนต (succinate) แลคเตต (lactate) อะซิเตต (acetate) แอลกอฮอล์ (alcohols) คาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) และไฮโดรเจน ( $\text{H}_2$ ) ตามลำดับ บทบาทสำคัญหลักของระยะที่สองคือการเตรียมสารตั้งต้น (substrates) ต่างๆ โดยกลุ่ม อะซิโตจีนิกแบคทีเรีย (acetogenic bacteria) เพื่อสร้างมีเทน ได้แก่ ไฮโดรเจน ( $\text{H}_2$ ) คาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) ฟอร์มेट (formate) เมทานอล (methanol) เมทิลลามีน (methylamines) และอะซิเตต (acetate) ตามลำดับ

Hydrolytic bacteria เจริญเติบโตได้ไม่ดีเมื่ออยู่ตามลำพัง เนื่องจากหากมีการสะสมก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นมาจะทำให้ความดันพาร์เซียลสูง (สุบัต, 2548) ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติก แบคทีเรียสร้างกรดอะซิติกจะสร้างอาหารให้แก่แบคทีเรียสร้างมีเทน ส่วนแบคทีเรียที่สร้างมีเทนก็ช่วยทำลายก๊าซไฮโดรเจนให้กับแบคทีเรียที่สร้างกรด

ตาราง 9 ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียบางกลุ่มในจีส Clostridium

ลักษณะสำคัญ	ผลผลิต และลักษณะอื่น	ชนิด
1. ย่อยคาร์โบไฮเดรต	อะซิเตท, แลคเตท,	<i>C. cellubioaparum</i>
- ย่อยเซลลูโลส	ซัสติเนท, ไฮโดรเจน, เอทานอล, คาร์บอนไดออกไซด์	<i>C. thermocellum</i>
- ย่อยน้ำตาล แป้งและเพคติน	อะเซโทน, บิวทานอล, เอทานอล,	<i>C. butyricum</i>
บางชนิดตรึงไนโตรเจน	ไอโซพรีนอล, บิวทาเรต, อะซิเตท, พรีออเนท, ซัสติเนท, ไฮโดรเจน, คาร์บอนไดออกไซด์	<i>C. acetobutylicum</i> <i>C. pasteurianum</i> <i>C. perfringens</i>
- ย่อยน้ำตาลให้เป็น กรดอะซิติก	ผลิตอะซิเตทจากคาร์บอนไดออกไซด์	<i>C. thermosulfurogens</i> <i>C. aceticum</i> <i>C. Thermoaceticum</i> <i>C. formicoaceticum</i>
- ย่อยเฉพาะ pentoses หรือ methylpentoses	อะซิเตท, พรีออเนท, n-บิวทานอล, ไฮโดรเจน, คาร์บอนไดออกไซด์	<i>C. methylpentosum</i>
2. ย่อยโปรตีน และ กรดอะมิโน	อะซิเตท, กรดไขมันระเหยอื่น, แอมโมเนีย, คาร์บอนไดออกไซด์, อาจ ให้ไฮโดรเจน	<i>C. sporogen</i> <i>C. tetani</i> <i>C. botulinum</i>
- อาจย่อยน้ำตาล	บิวไทเรต และอะซิเตท	<i>C. tetanomorphum</i>
- ย่อยสารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม	อาจผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ พรีออเนท, อะซิเตท และ คาร์บอนไดออกไซด์	<i>C. propionicum</i>
3. ย่อยคาร์โบไฮเดรต หรือ กรดอะมิโน	อะซิเตท, ฟอร์มเมท, มีไอโซบิวไทเรต และไอโซวาเลอเรตเล็กน้อย	<i>C. bifementans</i>
4. ย่อยพิวรีน	อะซิเตท, purines, forming acetate, คาร์บอนไดออกไซด์, แอมโมเนีย	<i>C. acidurici</i>
5. ย่อยเอทานอลให้เป็นกรด ไขมัน	ให้อะซิเตทเป็นสารรับอิเล็กตรอน	<i>C. kluyveri</i>

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2546)

เมทาโนจีนีซิส (Methanogenesis; methane formation) เป็นกระบวนการในช่วงที่มีเทนแบคทีเรียจะเปลี่ยนกรดเป็นก๊าซมีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ (Steiner, 2000) ซึ่งแบคทีเรียที่สร้างมีเทน หรือ เมทาโนเจน (methanogen) เป็นแบคทีเรียที่ไม่อาจทนต่อออกซิเจน และเจริญเติบโตซ้ำ อีกทั้งยังจำเพาะต่อชนิดของอาหารมาก ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาที่เก็บ และภาวะบรรทุกระบบสารอินทรีย์คาร์บอน และไนเตรตในโตรเจนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในระบบ โดยจุลินทรีย์เด่นที่พบในถังปฏิกรณ์คือ *Bacteroidetes*, *Firmicutes* และ *Thermomicrobia* ส่วนจุลินทรีย์กลุ่มย่อยที่พบคือ *Nitrospira*, *Acidobacteria*, *Acinobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Chlorobi* และ *Betaproteobacteria* ซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจนทั้งสิ้น (วลัยภรณ์, 2551) ทั้งนี้ Keyser et al. (2007) ศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ในตะกอนจากระบบ UASB ของอุตสาหกรรมเครื่องดื่มกระป๋องด้วยวิธี fingerprint พบว่า unculturable แบคทีเรีย 35 % ส่วนอีก 65 % เป็นแบคทีเรียแบบ culturable ที่ประกอบไปด้วยสกุลต่างๆต่อไปนี้ *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Shewanella*, *Microbacterium*, *Leuconostoc*, *Sulfurospirillum*, *Acidaminococcus*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Nitrospira*, *Synergistes*, *Rhodococcus*, *Rhodocyclus* และ *Syntrophobacter*) โดย ศึกษากลุ่มแบคทีเรียของน้ำเสียจากการเลี้ยงสุกรในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนพบว่า มีกลุ่ม *Firmicutes* 33%, *Acidobacteria* 23%, *Proteobacteria* 19%, *Bacteroidetes* 11%, *Nitrospira* 8%, *Chloroflexi* 4% และแบคทีเรียชนิดอื่นอีก 2% ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวแตกต่างจากการศึกษาของ Tang et al. (2005) ที่ศึกษากลุ่มแบคทีเรียจากถังเก็บน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนของน้ำเสียจากการเลี้ยงสุกรและพบ *Clostridium* 15%, *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* subdivision 20%, *Microplasma* 10%, *Flexibacter* *Cytophaga-Bacteroides* 20% และแบคทีเรียชนิดอื่นอีก 35% นอกจากนี้ยังแตกต่างกับการศึกษาของ ที่ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงสุกรของระบบบำบัดน้ำเสียแบบกรองทางชีวภาพที่พบว่า มีกลุ่ม *Firmicutes* มากกว่า 34%,  $\gamma$ -*Proteobacteria* 23%,  $\alpha$ -*Proteobacteria* 17,  $\beta$ -*Proteobacteria* 18%, *Actinobacteria* 10% และแบคทีเรียชนิดอื่นอีก 8%

Pantamas et al. (2003) ศึกษาการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซมีเทน ซึ่งการย่อยสลายกลูโคสไปเป็นก๊าซมีเทนเป็นการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่มีการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายกลุ่มคือ hydrolytic fermentative bacteria, acetogenic bacteria, และ methanogenic bacteria และศึกษาการทำงานระหว่าง *Bacillus* spp. กับ enriched methane producing bacteria (Enriched MPB) โดยพบว่า enriched MPB มีความสามารถในการย่อยสลายกลูโคสไปเป็นก๊าซมีเทนได้

ตาราง 10 ชนิดและหน้าที่ของแบคทีเรียอื่นๆ ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์

แบคทีเรีย	หน้าที่ในการทำงาน
<i>Bacillus</i> spp.	สามารถออกซิไดซ์ คาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ และสารประกอบอื่นๆ เช่น ไขมัน น้ำมัน โปรตีน และแป้ง โดยสามารถทำงานได้ดีในการย่อยสลายตะกอน เนื่องจากสามารถหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ ให้กลายเป็นโมเลกุลเล็ก อีกทั้งสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่กั้นบ่อได้ขณะที่เจริญเติบโต
<i>Pseudomonas</i> spp.	ออกซิไดซ์สารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้
<i>Enterobacter</i> spp.	เจริญเติบโตได้ทั้งในสภาพไม่มีออกซิเจน และสภาพที่มีออกซิเจน โดยภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนจะออกซิไดซ์สารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบง่าย ๆ ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ กลายเป็นแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์ของพืชน้ำ แต่ในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำๆ จะเกิดการหมักของสารประกอบคาร์บอนทำให้เกิดกรดอินทรีย์
<i>Nitrosomonas</i> spp.	ออกซิไดซ์แอมโมเนีย-ไนโตรเจนให้เป็นไนไตรต์-ไนโตรเจนซึ่งต้องการออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอ การเจริญเติบโตต้องอาศัยสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนที่ละลายน้ำ แต่กระบวนการทำงานจะถูกจำกัดเมื่อมีสารประกอบอินทรีย์มากกว่า 20 ppm

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก อ่ำพล (2546)

## 6.2. 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 ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ว่ามีสารอินทรีย์อยู่ในน้ำเสียนั่นเอง (สาวิตรี, 2552)

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

### 6.3 จุลินทรีย์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจน

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่บำบัดสารไนโตรเจนเป็นระบบที่ใช้แบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิง (nitrifying bacteria) และแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟอิง (denitrifying bacteria) ในการกำจัดไนโตรเจน ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิงแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามปฏิกิริยา คือ แบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนเพื่อออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรที่เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า ammonia oxidizing bacteria (AOB) โดยแบคทีเรียกลุ่ม AOB ที่พบในน้ำเสียเป็นแบคทีเรียสกุล *Nitrosomonas* (Gerardi, 2006) เป็นส่วนมาก ส่วนอีกกลุ่มคือแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไนโตรที่ไปเป็นไนเตรทเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB) เช่นแบคทีเรียสกุล *Nitrobacter* และ *Nitrospira* ส่วนแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟอิงเป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobic bacteria กล่าวคือในสถานะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนแต่มีไนเตรทแบคทีเรียกลุ่มนี้ก็สามารถใช้ในเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน แบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Alcaligenes* (Arquiaga *et al.*, 1993; Mara and Horan, 2003; Gerardi, 2006)

นอกจากนี้ Arquiaga *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียอีกกลุ่มในน้ำเสียที่มีค่าโซเดียมไนเตรทสูง พบว่าแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงสกุล *Alcaligenes* และ *Pseudomonas* จะพบบ่อยในถังแอน็อกซิก (anoxic reactor) ร่วมกับแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงและกลุ่มที่ไม่ใช่แบคทีเรียดีไนตริไฟอิงอื่นๆ เช่น *Acinetobacter* และ *Flavobacterium* แต่อย่างไรก็ตามมีเพียงแบคทีเรียสกุล *Alcaligenes* เท่านั้นที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริไฟเคชันได้สมบูรณ์ที่สุด สิรินันท์ และคณะ (2552) ได้ศึกษาแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงที่มีประสิทธิภาพบำบัดไนเตรทในน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ชายฝั่งพบว่า *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงที่สามารถบำบัดไนเตรทได้และมีประสิทธิภาพในการลดค่าไนเตรทได้ถึงร้อยละ 53

#### 6.4 จุลินทรีย์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารฟอสฟอรัส

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารฟอสฟอรัสเป็นระบบที่อาศัยกระบวนการ 2 ขั้นตอน (สุบัญญัติ, 2538) คือ ระบบที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic system) สลับกับระบบที่ใช้ออกซิเจน (aerobic system) โดยระบบการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic system) จะอาศัยแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนทำการดูดซึมสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟตเข้าไปในเซลล์และย่อยให้เปลี่ยนเป็นสารอินทรีย์ฟอสเฟตก่อนที่จะปล่อยสารอินทรีย์ฟอสเฟตออกนอกเซลล์เข้าสู่ระบบการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (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

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

อีกทั้ง Mongkoltharuk and Dharmstithi (2002) ได้ทำการศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่มีค่าบีโอดีต่ำแต่มีไขมันสูงด้วยกลุ่มแบคทีเรียรวมซึ่งประกอบด้วย *Pseudomonas aeruginosa*  $6.1 \times 10^8$  CFU/ml *Bacillus* sp.  $4.8 \times 10^8$  CFU/ml และ *Acinetobacter calcoaceticus*  $8.9 \times 10^7$  CFU/ml ใน 20 มิลลิลิตร พบว่า *Bacillus* sp. มีการสร้างเอนไซม์ protease และ amylase ส่วน *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter calcoaceticus* มีการสร้างเอนไซม์ lipase และสามารถบำบัดน้ำเสีย

ที่มีค่าบีโอดีประมาณ 3,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าไขมัน 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ลดลงน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ในเวลา 12 วันภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

Gerardi (2006) อธิบายว่าบทบาทของแบคทีเรียในน้ำเสียนั้นแตกต่างกันไป กล่าวคือแบคทีเรียบางกลุ่มมีบทบาทในด้านบวกต่อการบำบัดน้ำเสีย ในขณะที่บางกลุ่มมีบทบาทในด้านลบต่อการบำบัดน้ำเสีย แต่ก็มีแบคทีเรียอีกกลุ่มที่มีบทบาททั้งลบและบวกต่อการบำบัดน้ำเสียด้วย แบคทีเรียที่มีหน้าที่ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน แสดงดังตารางที่

11

**ตาราง 11** แบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในน้ำเสีย

ชนิดของแบคทีเรีย	หน้าที่
<i>Pseudomonas</i>	ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต สารปนเปื้อนในน้ำเสีย และผลิตเมือกที่ช่วยในการสร้างฟล็อก (floc)
<i>Zoogloea</i>	ผลิตเมือกที่ช่วยในการสร้างฟล็อก (floc)
<i>Bacillus</i>	ย่อยสลายโปรตีน
<i>Arthrobacter</i>	ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต
<i>Microthrix</i>	ย่อยสลายไขมัน
<i>Acinetobacter</i>	ย่อยสลายฟอสฟอรัส
<i>Nitrosomonas</i>	ทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ขั้นที่ 1 หรือแอมโมเนียออกซิเดชัน
<i>Nitrobacter</i>	ทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ขั้นที่ 2 หรือไนไตรท์ออกซิเดชัน
<i>Achromobacter</i>	ทำให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน

ที่มา: สุบัญญัติ (2548)

Bitton (2005) ทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งด้วยวิธีการ culture-based technique พบกลุ่มแบคทีเรียเด่นคือ *Zoogloea*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Comomonas*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter* และ *Bacillus* ในบ่อเติมอากาศ และทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งด้วยวิธีการศึกษา 16S rRNA และ 23S rRNA พบแบคทีเรียกลุ่ม *Comamonas-Pseudomonas* species มากที่สุด ดังตารางที่ 12

ตาราง 12 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

กลุ่มแบคทีเรีย	การคัดแยกทั้งหมด (ร้อยละ)
<i>Comamonas-Pseudomonas</i>	50.0
<i>Alcaligenes</i>	5.8
<i>Pseudomonas</i> (Fluorescent group)	1.9
<i>Paracoccus</i>	11.5
Unidentified (Gram-negative rods)	1.9
<i>Aeromonas</i>	1.9
<i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	13.5
<i>Bacillus</i>	1.9
<i>Micrococcus</i>	1.9
<i>Coryneform</i>	5.8
<i>Arthrobacter</i>	1.9
<i>Aureobacterium-Microbacterium</i>	1.9

ที่มา: Bitton (2005)

## 7. การศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

### 7.1 Ribosomal RNA

อาร์เอ็นเอไรโบโซมเป็นองค์ประกอบสำคัญของไรโบโซม ซึ่งเป็นอนุภาคที่ให้ อาร์เอ็นเอนำรหัสอาร์เอ็นเอถ่ายโอนและองค์ประกอบอื่นๆ ที่จำเป็น มาเกาะเพื่อร่วมกันสังเคราะห์ โปรตีน ไรโบโซมของ *E. coli* มีมวลประมาณ  $2.7 \times 10^6$  ดาลตัน และมีสัมประสิทธิ์การนอนก้น (sedimentation coefficient) 70S ซึ่งสามารถแยกออกจากกันเป็น 2 หน่วยย่อยได้แก่ หน่วยย่อย 30S ซึ่งประกอบด้วยอาร์เอ็นเอนขนาด 16S กับพอลิเพปไทด์ 21 ชนิด และหน่วยย่อย 50S ซึ่งประกอบด้วยอาร์เอ็นเอนขนาด 5S และ 23S กับพอลิเพปไทด์ 34 ชนิด อาร์เอ็นเอไรโบโซม 16S ช่วยให้หน่วยย่อยไรโบโซม 30S ไปเกาะบนสายอาร์เอ็นเอนำรหัส ณ จุดเริ่มต้นได้อย่างจำเพาะ การที่ อาร์เอ็นเอไรโบโซม 16S ทำเช่นนี้ได้เพราะลำดับเบสที่ปลาย 3' สามารถคู่สมกับลำดับเบสจำเพาะ บนอาร์เอ็นเอนำรหัส เรียกว่า ลำดับเบส Shine-Dalgarno หรือตำแหน่งยึดเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site) หลังจากนั้น อาร์เอ็นเอถ่ายโอนพร้อมกรดอะมิโน โปรตีนองค์ประกอบที่

เกี่ยวข้อง และหน่วยย่อยไรโบโซม 50S จะเข้ามาประกอบกันเป็นไรโบโซม 70S ที่สมบูรณ์ พร้อมทั้งจะสร้างโปรตีนต่อไปโดยแปลรหัสไปตามสายอาร์เอ็นเอ นำรหัสเบสที่เรีย *E.coli* มียีนสำหรับสร้างสายรหัสอาร์เอ็นเอไรโบโซมขึ้นต้นอยู่ทั้งหมด 7 ชุด ที่อยู่บนโครโมโซม ณ ตำแหน่งต่างๆ กัน ยีนทั้ง 7 ชุด มีส่วนของอาร์เอ็นเอไรโบโซมเหมือนกันแต่มีความแตกต่างกันที่ตำแหน่ง ชนิด และจำนวนของอาร์เอ็นเอถ่ายโอนที่แทรกอยู่ (สุกัญญา และ วิเชียร, 2547)

Ribosomal RNA (rRNA) โดยทั่วไปโมเลกุลของ rRNA ประกอบรวมอยู่กับโปรตีนแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ที่เรียกว่า ไรโบโซม (ribosome) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการแปลรหัส (ภาพ 5)

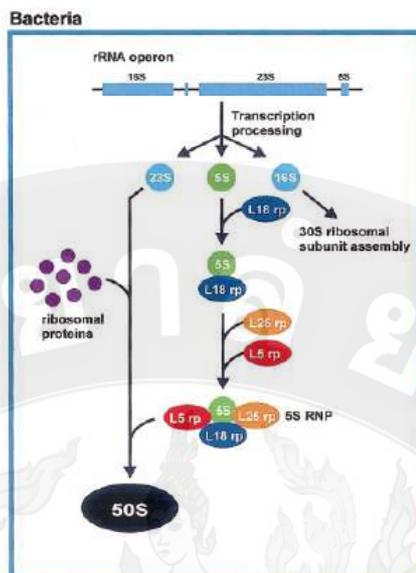
โปรคาริโอต สามารถแบ่งโมเลกุลของ rRNA ได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. 23S rRNA มีขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ หน่วยใหญ่ของไรโบโซม ขนาด 50S
2. 16S rRNA มีขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์ เป็นองค์ประกอบของ หน่วยใหญ่ของไรโบโซม ขนาด 30S
3. 5S rRNA มีขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโบโซม ขนาด 50S

ไรโบโซมของโปรคาริโอตมีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ 50S และ 30S โดย

1. Large subunit (50S) ประกอบด้วย 23S rRNA + 5S rRNA + protein 34 ชนิด
2. Small subunit (30S) ประกอบด้วย 16S rRNA + protein 21 ชนิด

(S = Sevedberg unit คือ A value used to express the velocity with a molecule or structure sediments when centrifuged in a dense solution)



ภาพ 5 องค์ประกอบของไรโบโซมในโปรคาริโอต (แบคทีเรีย)

ที่มา: Szymanski et al. (2003)

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าในโปรคาริโอตทุกชนิดจะต้องมีขึ้นในการสังเคราะห์ไรโบโซม และมีหน้าที่ที่แน่นอนคือการสังเคราะห์โปรตีน โดยจะผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอด และพบว่าการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ ซึ่งมีบริเวณอนุรักษ์ในระดับที่เหมาะสม และยังมีบริเวณที่มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดแต่ละกลุ่มของจุลินทรีย์จึงสามารถที่จะนำลำดับเบสของยีน ribosomal RNA มาใช้ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตได้

โดยส่วนใหญ่จะนิยมใช้ยีนส่วน 16S rRNA ในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ เพื่อแสดงถึงความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากความเหมาะสมของโมเลกุลของยีน 16S rRNA มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส ซึ่งยีนส่วน 5S rRNA มีลำดับเบสเพียงประมาณ 120 คู่เบส ซึ่งมีข้อมูลลำดับเบสที่น้อย ส่วนยีน 23S rRNA มีลำดับเบสประมาณ 2,900 คู่เบส ซึ่งมีข้อมูลลำดับเบสที่มากและเป็นส่วนที่ดี แต่ในทางปฏิบัติ และการวิเคราะห์ทำได้ยากกว่า และนอกจากนี้ ยีนส่วน 16S rRNA ยังมีความแม่นยำ นิยมนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย เพราะยีน 16S rRNA มีลำดับเบสอนุรักษ์ปานกลางและมีความแตกต่างมากพอที่จะนำมาใช้ในการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ได้ ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับความคล้ายกัน (similarity) ของลำดับเบสของยีน 16S rRNA และยังมี primer ที่เป็น universal ของยีน 16S rRNA ที่สามารถนำมาใช้ในการเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นดีเพื่อเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอของ

แบคทีเรียทุกชนิดได้ (Weisburg et al., 1991; Petti et al., 2005) และสามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ 16S rRNA ยีนซึ่งเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในการนำมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอย่างง่ายสะดวกและรวดเร็วด้วยการใช้ phylogenetic analysis รวมถึงใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียและการจัดกลุ่มของแบคทีเรียได้ (Lane et al., 1985) นอกจากนี้ยังมีการเก็บรวบรวมของมูลของ 16S rRNA ยีนเป็นจำนวนมากซึ่งเราสามารถค้นหาได้ในระบบออนไลน์ของเว็บไซต์ฐานข้อมูลที่จัดเก็บ ซึ่งง่ายและสะดวกต่อการค้นหาและการใช้งานในการศึกษา (Robin et al., 1994)

### การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย

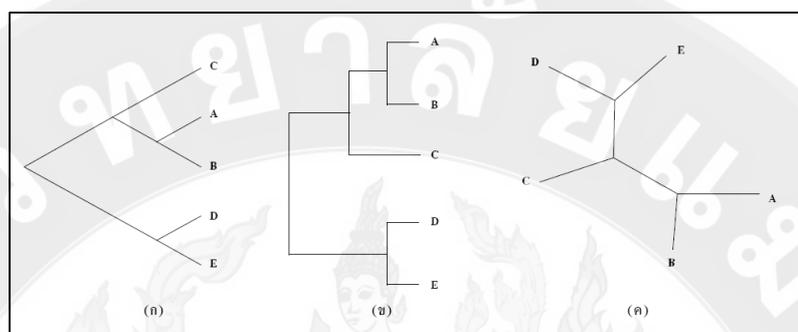
การศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันนิยมใช้การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ เนื่องจากมีความสำคัญในการจัดกลุ่ม และศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยพิจารณาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต และการมีบรรพบุรุษร่วมกัน และการทำแผนภูมิต้นไม้ได้มีการนำความรู้แผนใหม่ทางชีววิทยาและวิทยาศาสตร์สาขาอื่นๆ เข้ามาประกอบด้วย ซึ่งเป็นระบบที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ซึ่งในปัจจุบันนี้ระบบวิทยาเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีเปรียบเทียบด้วยการอ่านลำดับดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการได้ตรงที่สุด คือ เป็นวิธีที่ตรงที่สุดในการวัดการสืบทอดทางพันธุกรรมร่วมกัน จากบรรพบุรุษร่วมของสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนั้น ข้อสำคัญในการศึกษาโดยใช้ลักษณะระดับอนุ เช่นนี้คือ เราจะต้องเลือกยีนที่จะใช้ให้มีอัตราการวิวัฒนาการเหมาะสมกับกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่เราสนใจจะศึกษา กล่าวคือ ใช้ยีนที่วิวัฒนาการช้ากับกลุ่มที่วิวัฒนาการแยกจากกัน ตั้งแต่ครั้งโบราณกาล (ancient groups) ตัวอย่างเช่น ribosomal subunit DNA ซึ่งมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและวิวัฒนาการช้ามาก ได้ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตทั้ง 3 โดเมนหลัก (domains) คือ bacteria, archaea และ eukaryota ขณะที่เลือกใช้ยีนที่วิวัฒนาการเร็วกับกลุ่มที่วิวัฒนาการแยกจากกันเมื่อไม่นานมาแล้ว (recent groups) ตัวอย่างเช่น mitochondrial genes ซึ่งมีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสดีเอ็นเอ (base substitution rate) เร็วกว่าใน nuclear genes ถึง 10 เท่า และถูกใช้อย่างแพร่หลายในระบบวิทยาของสัตว์ (เจษฎา, 2545)

### ไฟโลจีนetikทรี (Phylogenetic tree)

ไฟโลจีนetikทรีสามารถสร้างโดยอาศัยข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา ซากดึกดำบรรพ์หรือข้อมูลระดับโมเลกุล โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับโปรตีนของยีนต่างๆ ที่เป็นออร์โธลอก (orthologue)

ไฟโลจีนติกทรี มีองค์ประกอบคล้ายต้นไม้ คือ ประกอบด้วยกิ่งก้านหรือแขนง (branch) ก้านอาจแตกเป็นกิ่งย่อยแบบสองทาง (bifurcation) หรือหลายทาง (multifurcation) ซึ่งแบบหลังนี้พบน้อยมาก ตำแหน่งที่ก้านแตกเป็นกิ่งย่อยเป็นจุดต่อ เรียกว่า โหนด (node) ที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับเบส หรือโปรตีนสายพันธุ์หรือสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิต เรียกว่า ใบ (leaf) หรือ แทกซอน (taxon) หรือหน่วยอนุกรมวิธานเชิงปฏิบัติการ (OTU; operational taxonomic unit) อาจพิจารณาทรีเป็นกราฟชนิดหนึ่งซึ่งมีส่วนยอด (vertex) เป็น โหนด และแขนงที่ต่อโหนดเป็นเส้นขอบ (edge) แต่ทรีอาจมีจุดกำเนิดร่วมหรือราก (rooted tree) ซึ่งเป็นส่วนยอดทรีเป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วมของแทกซา (taxa) ทั้งหมดหรือไม่มีราก (unrooted tree) ก็ได้ ทรีที่มีรากจะทำให้ทราบทิศทาง เวลา และบรรพบุรุษในการวิวัฒนาการความยาวของก้านที่แตกต่างกัน แสดงระยะห่างของวิวัฒนาการ ซึ่งแต่ละก้านอาจมีอัตราเร็วของวิวัฒนาการแตกต่างกัน ระยะห่างอาจแสดงเป็นตัวเลขบนแต่ละก้านหรืออาจเขียนเป็นสเกลความยาวบอกขนาดในภาพหรืออาจเขียนในลักษณะเส้นตรงที่แยกออกจากกัน (ภาพ 8 ก) หรืออาจเขียนด้วยเส้นแนวตั้งและแนวนอน (ภาพ 8 ข) เพื่อให้เปรียบเทียบความยาวของก้านได้ง่าย ในกรณีเส้นในแนวตั้งเป็นเส้นเชื่อมต่อไม่มีความหมายอื่นใด หรืออาจเขียนในลักษณะที่ส่วนของใบเสมอกัน และโดยความยาวของก้านไม่มีความหมาย ทรีในลักษณะนี้ เรียกว่า คลอดโดแกรม (cladogram) ถ้าพิจารณาทรีโดยสนใจเพียงโครงสร้างการแตกกิ่งก้าน ไม่สนใจความยาวของขอบสามารถจะกล่าวว่า ทรีนั้นมีโทโพโลยี (topology) เดียวกันหรือเรียก topological trees เมื่อสามารถบิดหรือยืดขอบต่างๆ แล้วทำให้ทรี ที่มีลักษณะ โครงสร้างของกิ่งก้านแบบเดียวกัน หรืออาจเรียกว่าเป็น additive tree ถ้าระยะห่างของวิวัฒนาการของสองแทกซาที่แยกมาจากโหนดเดียวกันเท่ากับผลบวกของระยะห่างทั้งสองจากโหนดนั้น ถ้าตั้งสมมุติฐานให้ทรีมีอัตราการกลายพันธุ์ (mutation rate) คงที่สำหรับทุกสายทาง (lineages) สำหรับการวิวัฒนาการของลำดับเบสหรือโปรตีน จะเรียกสมมุติฐานนี้ว่า สมมุติฐานนาฬิกาของโมเลกุล (molecular clock assumption) เนื่องจากอัตราการกลายพันธุ์คงที่ ดังนั้น ปริมาณการกลายพันธุ์ของแต่ละเส้นขอบจะเป็นสัดส่วนกับเวลาที่ผ่านไป ดังนั้น ไม่ว่าจะใช้ความยาวของเส้นแทนปริมาณการกลายพันธุ์หรือเวลาที่ผ่านไปจะได้ตัวเลขเดียวกันแต่ถ้าไม่ใช่สมมุติฐานนาฬิกาของโมเลกุลที่ขอบที่มีระยะเวลาเท่ากัน แต่มีอัตราเร็วของการกลายพันธุ์แตกต่างกัน ขอบที่มีอัตราเร็วการกลายพันธุ์มากกว่าจะมีปริมาณการกลายพันธุ์มากกว่าในช่วงเวลาที่ผ่านไปเท่ากันนั้น กลุ่มของแทกซาที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมกันเรียกว่า คลอด (clad) หรืออาจมีเพียงคลอดเดียว เรียกว่า monophyletic tree หรือ มีหลายคลอดเรียกว่า polyphyletic tree และแต่ละคู่ของสปีชีส์ หรือแทกซาที่แยกจากกันและกันหนึ่งช่วงโหนดที่อยู่ภายในทรี (internal node) หรือ กล่าวอีกอย่างก็คือ แทกซาใดๆที่เส้นขอบวิ่งไปบรรจบกัน เรียกว่า เป็นเพื่อนบ้านกัน (neighbors) สำหรับสปีชีส์หรือแทกซาที่แยกออกจากสปีชีส์

อื่นที่กำลังศึกษาในระยะแรกๆ ของการวิวัฒนาการ เรียกว่า พวกนอกกลุ่ม (outgroup) ซึ่งสปีชีส์เหล่านี้สามารถนำมาใช้เพื่อสร้างทรีแบบมีรากได้ องค์ประกอบที่สำคัญของไฟโลจีนเนติกทรี (สมชาย, 2008) ดังแสดงในภาพ 6



ภาพ 6 องค์ประกอบที่สำคัญของไฟโลจีนเนติกทรี ทรีในรูป ก และ ข เป็นแบบชนิดมีราก โดยรูป ข ทรีอยู่ในลักษณะเส้นนอน และเส้นตั้ง ส่วนรูป ค เป็นแบบไม่มีราก ทั้งสามทรีนี้มีโทโพโลยีเหมือนกัน A-E คือ แทกซา โดย A, B แยกมาจากโนดหนึ่ง และ D, E จากอีกโนดหนึ่ง และแทกซา A, B, C อยู่ในคลด หนึ่งส่วนแทกซา D, E อยู่อีกคลดหนึ่งต่างคลดกัน

ที่มา: สมชาย (2008)

จำนวนของทรีทั้งชนิดมีรากและไม่มีราก สามารถคำนวณหาได้เมื่อทราบจำนวนของแทกซา ซึ่งจะมีจำนวนมากมาย ดังนั้น โปรแกรมสำหรับสร้างไฟโลจีนเนติกทรีจึงมุ่งไปสู่การสร้างหรือค้นหาทรีที่เหมาะสมหรือดีที่สุด ซึ่งบางวิธีจะใช้เวลาและกำลังคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์หามาก การสร้างไฟโลจีนเนติกทรีมี 5 ขั้นตอน คือ การรวบรวมชุดข้อมูล การจัดเรียงลำดับ การพิจารณาเลือกวิธีวิเคราะห์ เลือกโมเดลวิวัฒนาการ และ โปรแกรมการทดสอบและการนำเสนอ

จากที่กล่าวมาเราสามารถนำความรู้ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทาง ดังเช่น สามารถเปลี่ยนรูปวงศ์วานวิวัฒนาการให้เป็นแผนผังการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตตามลำดับชั้น (hierarchical classification) และเป็นกุญแจตรวจสอบรายชื่อสิ่งมีชีวิต (identification key) ได้ สามารถใช้วงศ์วานวิวัฒนาการในการบอกลำดับของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตนั้น ไปตามแนวทางของแผนภูมิต้นไม้ สามารถใช้วงศ์วานวิวัฒนาการในการทำนายว่า สิ่งมีชีวิตชนิดที่เราสนใจ น่าจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับชนิดที่เป็นพี่น้องกับชนิดนั้น (sister taxon) เราอาจจะนำวงศ์วานวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่พึงพาอาศัยกัน มาศึกษาเปรียบเทียบกัน เพื่อดูรูปแบบการเกิดวิวัฒนาการ

ร่วม (co-evolution) ของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นได้ นำวงศัณฐานวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ทางนิเวศน์วิทยาเดียวกัน มาศึกษาเปรียบเทียบกัน เพื่อประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์ เช่น กำหนดว่าพื้นที่ใดมีความเป็นสิ่งมีชีวิตเฉพาะถิ่นมากกว่า (high endemism) หรือ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่า (high genetic diversity) (เจษฎา, 2545) ซึ่งปัจจุบันก็มีนักวิจัยจำนวนมากได้นำ phylogenetic tree หรือการศึกษาวงศัณฐานวิวัฒนาการมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย การจัดกลุ่มของแบคทีเรีย โดยการใ้ชิ้นส่วน 16S rRNA ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย และจัดกลุ่มของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่สนใจ



## 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  $20 \pm 1$  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. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี

- 2.1 กระจกตวง (Cylinder)
- 2.2 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 2.3 หลอดทดลอง (Test tube)
- 2.4 บีกเกอร์ (Beaker)
- 2.5 บิวเรต (Burette)
- 2.6 ปิเปต (Pipette)

- 2.7 ขวดปริมาตร (Volumetric flask)
- 2.8 แท่งแก้วคนสาร (Stirrer rod)
- 2.9 ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
- 2.10 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
- 2.11 ลูกยางดูดบีบ (Bulb)
- 2.12 ปากคีบ (Forceps)
- 2.13 ถ้วยอะลูมิเนียม (Aluminum weighing dishes)
- 2.14 กระดาษกรอง GF/C ขนาด 4.7 เซนติเมตร
- 2.15 ชุดกรวยบุชเนอร์ (Buchner funnel)
- 2.16 คิวเวตต์ (Cuvette)
- 2.17 ขวดเจลดาลห์ (Kjeldahl flask)
- 2.18 กระดาษกรอง ขนาด 11 เซนติเมตร เบอร์ 40
- 2.19 ถ้วยระเหย (Evaporating disc)
- 2.20 กรวยแยก (Separatory Funnel)
- 2.21 กรวยกรอง (Funnel)
- 2.22 ขาดังพร้อมตัวหนีบยึด
- 2.23 ขวดบีโอดี (BOD bottle)
- 2.24 โหลแก้วสำหรับเตรียมน้ำเจือจาง

### 3. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1 สารละลาย/สารเคมี ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (Geneaid, Taiwan)
  - สารละลายเอนไซม์ lysozyme (Biobasic, Canada)/TEN ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase 2 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (Fermentas, USA)
  - สารละลาย W1 buffer
  - สารละลาย Wash buffer
  - สารละลาย Elution buffer
  - เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์
- 3.2 สารละลาย/สารเคมี ที่ใช้ในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR
  - PCR Master Mix (Fermentas, USA)
  - สารละลาย 16S rDNA primer ตาราง 3 (1<sup>st</sup> BASE CUSTOM OLIGOS,

Malaysia)

- DNA Template
- deionized water (RNase free water) (Fermentas, USA)

### 3.3 สารละลาย/ สารเคมีที่ใช้ในการทำ electrophoresis

- สารละลาย PCR product
- Loading dye (Fermentas, USA)
- GeneRuler™100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, USA)
- GeneRuler™100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)
- GeneRuler™10 kb DNA Ladder (Fermentas, USA)
- สารละลาย Gel star (Lonza, Switzerland)
- UltraClean™ Agarose gel 3.0 เปอร์เซ็นต์
- สารละลาย TAE buffer

### 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani medium)

- |                  |      |
|------------------|------|
| - Yeast extract  | 10 g |
| - NaCl           | 5 g  |
| - Peptone casine | 10 g |
| - Agar           | 15 g |

ปรับปริมาตร 1000 ml ปรับค่า pH ด้วยการเติม NaOH ~ 0.2 ml

### 3.5 สารละลายอื่นๆ

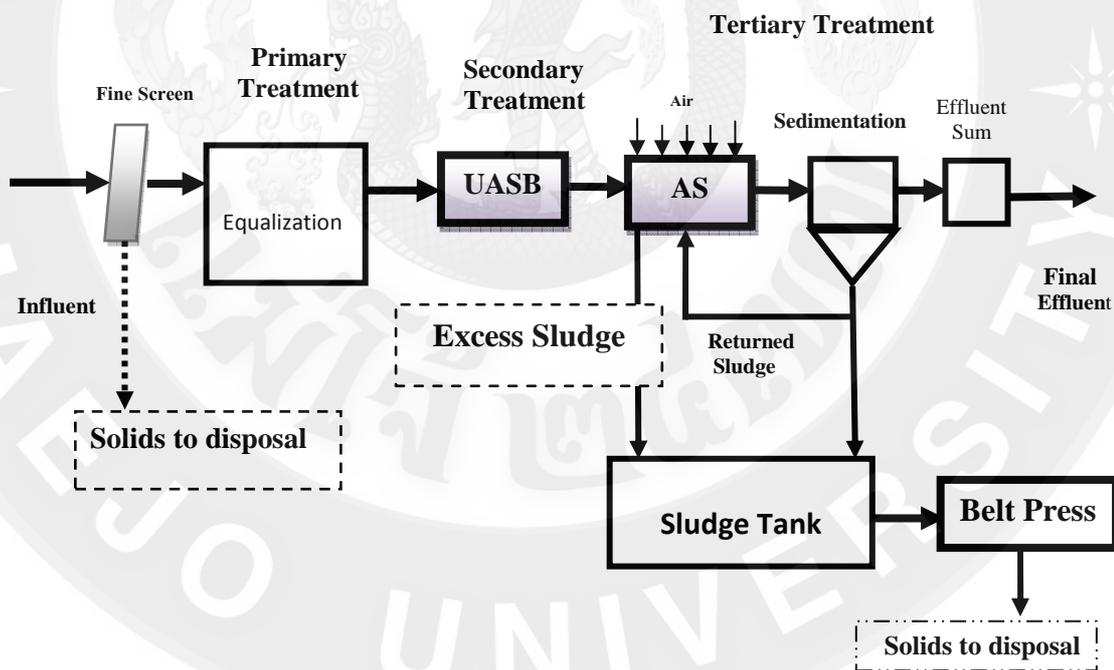
- Alkaline lysis solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCL pH 8, 10 mM EDTA)
- Alkaline lysis solution II (0.2 N NaOH, 1% w/v SDS)
- Alkaline lysis solution III (3 M potassium acetate adjust pH to 4.8 with glacial acetic acid)
- Lysis buffer (5 mM EDTA, 10% (w/v) sucrose, 0.25% (w/v) SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05% (w/v) bromophenol blue)
- IPTG (20 mg/ml)
- X-gal (20 mg/ml)

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 1. ตัวอย่างน้ำเสียและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียทางเคมี

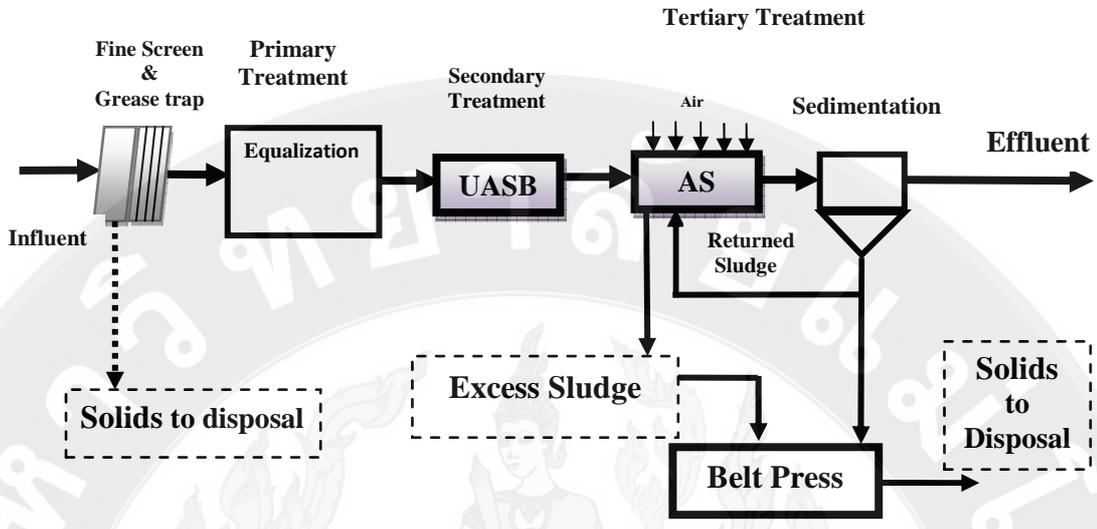
เก็บตัวอย่างน้ำเสียเข้าและออกจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง จำนวน 3 แห่ง ที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียดังนี้ การบำบัดขั้นต้น (Primary treatment) ด้วยตะแกรงคัดขยะ/บ่อดักไขมัน และผ่านระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบ UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) ก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง ดังภาพที่ 7 8 และ 9

อุตสาหกรรมที่ 1



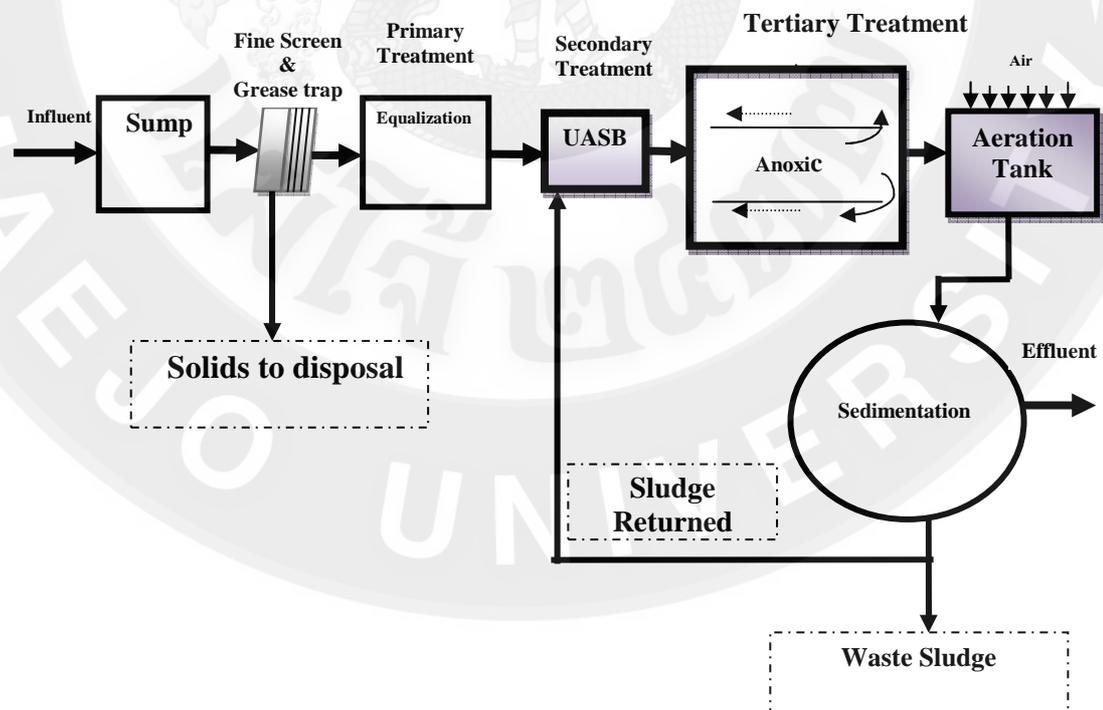
ภาพ 7 แสดงขั้นตอนของระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ 1

อุตสาหกรรมที่ 2



ภาพ 8 แสดงขั้นตอนของระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ 2

อุตสาหกรรมที่ 3



ภาพ 9 แสดงขั้นตอนของระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ 3

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียทั้งแบบตะกอนเร่ง (Activated Sludge) และระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดของแต่ละส่วนในกระบวนการบำบัดด้วยพารามิเตอร์ที่ใช้ในปัจจุบัน คือ ค่า COD-BOD เปรียบเทียบกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่ศึกษาในแต่ละส่วนของกระบวนการ ค่าพารามิเตอร์ทางเคมี คือ pH, BOD, COD, TKN, TP, TSS และ Oil and Grease โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตาม Standard Methods for Examination of water and wastewater, 20<sup>th</sup> Edition ดังตารางที่ 13

ตาราง 13 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. การสกัดดีเอ็นเอ การโคลนนิ่ง และการหาลำดับเบสส่วน 16S rRNA

### 2.1. การเก็บตัวอย่างและการเตรียมดีเอ็นเอ

#### 2.1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

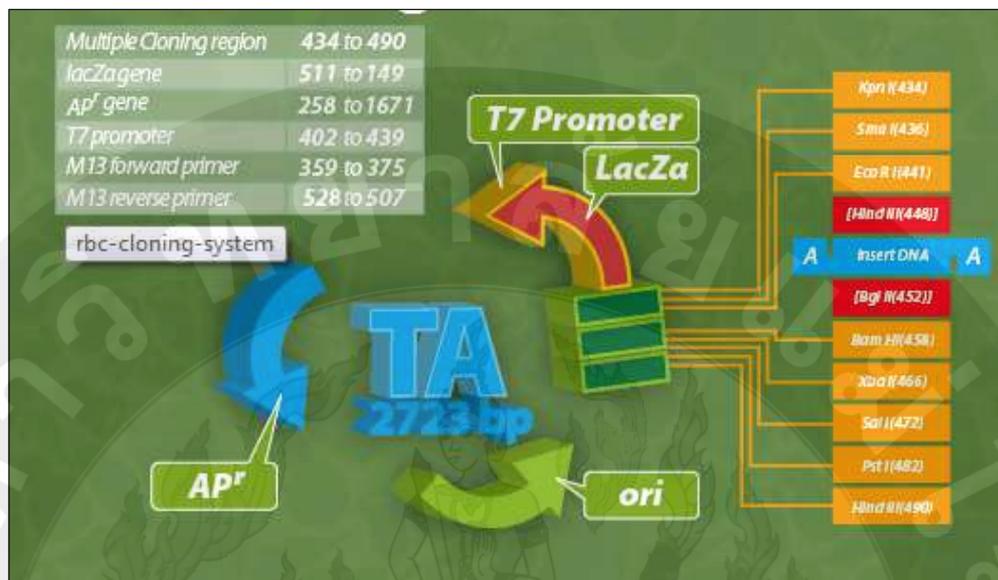
ตัวอย่างแบคทีเรียจะเก็บจากน้ำเสียในระบบบำบัดน้ำเสียแบ่งออกเป็นสองระบบ คือ ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (UASB) และระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจนซึ่งของอุตสาหกรรมที่ 1 และ 2 เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง และน้ำเสียจากบ่อ แอเนอโรบิกและบ่อแอโรบิกของอุตสาหกรรมที่ 3 ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารไนโตรเจน อย่างละ 3 ชั่วโมงรวมกัน ซึ่งส่วนมากจะเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ เก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงแล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA mini kit (Geneaid Biotech Ltd.) ตามวิธีการของชุดสกัด จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

### 2.1.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction

ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1.1 เป็นแม่พิมพ์ในการทำ polymerase chain reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3') ที่ออกแบบจากยีนส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรีย โดยใช้ อุณหภูมิ 95 °C นาน 5 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 25 รอบของ 95 °C นาน 1 นาที 55°C นาน 1 นาทีและ 72°C นาน 1 นาที และขั้นตอนสุดท้าย 72°C นาน 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

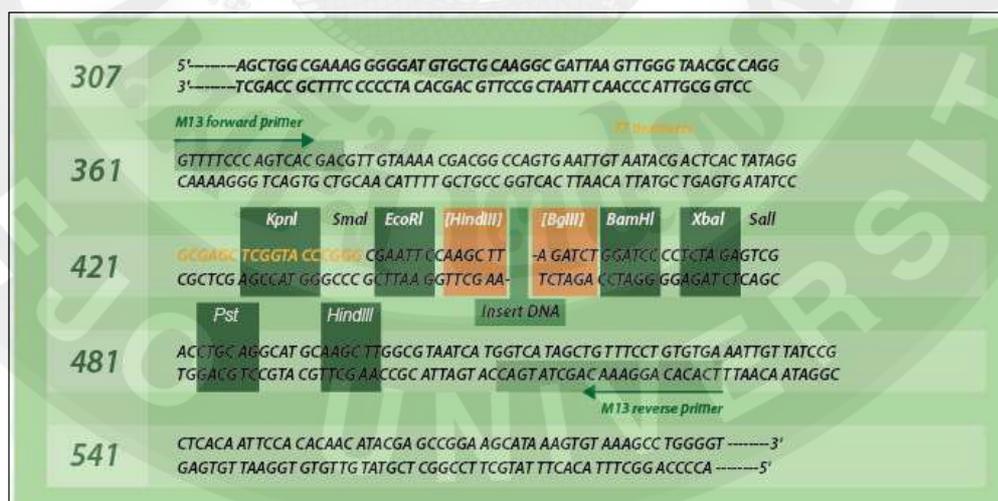
### 2.2 การโคลนยีนดีเอ็นเอ 16S rRNA

นำผลผลิตจากการทำ PCR มาแยกบริสุทธิ์จากเจลด้วยชุดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) ด้วยวิธีการตามชุดสำเร็จรูป โดยให้ลำดับโคลนของแบคทีเรียในระบบ บำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (UASB) เป็น 3D และลำดับโคลนของแบคทีเรียในระบบบำบัด น้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน เป็น 4E จากนั้นวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ได้ด้วย 1% Agarose gel electrophoresis แล้วโคลนเข้าดีเอ็นเอพลาสมิดด้วยชุด RBC TA Cloning Vector Kit (RBC Bioscience) (ดังภาพที่ 10 และ 11) ด้วยวิธีการตามชุดสำเร็จรูป แล้วถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้า แบคทีเรีย *E. coli* ด้วย Non heat Shock Transformation RBC HIT Competent Cell (RBCBioscience) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยสีของโคโลนี (blue-white screening) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และ IPTG และ X-gal (5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีสีขาวหรือมี Insert gene เลี้ยงในอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง เก็บเซลล์ 2 มิลลิลิตร ใน Glycerol 20% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่วนหนึ่งนำไปคัดเลือกรายละเอียดโดยวิธี Rapid size screening



ภาพ 10 Map and Sequence reference points of the RBC TA cloning vector

ที่มา : ดัดแปลงจาก <http://www.rcbioscience.com/products/rbc-cloning-system/ta-cloning-vector/rbc-ta-cloning-vector-kit> (24 กุมภาพันธ์ 2556)



ภาพ 11 แสดง Multiple cloning site sequence of the RBC TA Cloning Vector

ที่มา: ดัดแปลงจาก <http://www.rcbioscience.com/products/rbc-cloning-system/ta-cloning-vector/rbc-ta-cloning-vector-kit> (24 กุมภาพันธ์ 2556)

### 2.2.1 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)

เลี้ยงเซลล์ใน LB broth ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ข้ามคืนจากนั้น ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Lysis buffer (5 mM EDTA, 10%w/v sucrose, 0.25%w/v SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05% w/v bromophenol blue) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที และบ่มทันทีในน้ำแข็ง 4 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยง 12000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที คูด่วนใสด้านบน 30 ไมโครลิตร มาเป็นสารตัวอย่างในการทำ 1% Agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที คัดเลือกโคลน ที่มีขนาดดีเอ็นเอสายผสมประมาณ 4200 bp

### 2.2.2 การสกัด ดีเอ็นเอสายผสม ด้วยวิธี Alkaline lysis

นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าข้ามคืน คูดเก็บ Cell culture 3-5 มิลลิลิตร โดยคูดครั้งละ 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ใช้ pipette คูดส่วนใส (Supernatant) ออกให้หมด เก็บเฉพาะเซลล์ (Cell pellet) ไว้ จากนั้นละลาย Cell pellet ที่ได้ ด้วย Alkaline lysis solution I (แช่แข็ง) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ Vortex เติม Alkaline lysis solution II (ที่เตรียมใหม่) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา 5 ครั้ง (ห้าม Vortex โดยเด็ดขาด) แช่หลอดในน้ำแข็ง เติม Alkaline lysis solution III (แช่เย็น) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา แช่หลอดในน้ำแข็ง นาน 3-5 นาที ปั่นเหวี่ยงหลอดที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายส่วนใส (Supernatant) ใส่หลอดใหม่ เติมเอทานอล 95 % 2 ปริมาตรของสารละลาย (ประมาณ 900 ไมโครลิตร) ผสมโดยการพลิกหลอดไปมาเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส 10 นาทีหรือข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที นาน 10-15 นาที pipette ส่วนน้ำทิ้งด้วยไมโครไปเปด (ระวังอย่าให้ DNA pellet ที่อยู่บนหลอดหลุด) ล้าง DNA pellet โดยการเติมเอทานอล 70 % 1000 ไมโครลิตร ผสมด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วปั่นเหวี่ยง ที่ 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นคูดส่วนใสทิ้ง (ระวัง DNA pellet หลุดหาย) ล้างเช่นนี้ 2 ครั้ง จากนั้นเปิดฝาหลอดแล้ว คั่วหลอดบนกระดาษซับ จนกระทั่ง DNA pellet แห้ง สังเกตจาก DNA pellet จากสีขาวขุ่นเมื่อแห้งจะใส จากนั้นละลายดีเอ็นเอกลับมา ด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) ที่มีเอนไซม์ RNase (TE containing 20 ug/ml DNase-free RNase) ปริมาตร 15-30 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA pellet ที่ได้ เมื่อละลายเรียบร้อยแล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

### 2.2.3 การคัดเลือกโคลนที่มีความแตกต่างโดยวิธีการตัดดีเอ็นเอสายผสมด้วย

#### เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (Restriction endonuclease digestion of DNA)

นำองค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัด เช่น dH<sub>2</sub>O, 10X buffer, DNA มาละลายบนน้ำแข็ง(ยกเว้นเอนไซม์) คำนวณปริมาณของสารละลายต่างๆ ที่จะใช้ (ตารางที่ 14) แล้วนำสารละลายเหล่านั้นผสมกันในหลอด เมื่อเตรียมปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้วนำเอนไซม์ตัดจำเพาะออกจากตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้ Tip สะอาดดูดเอนไซม์ผสมลงในหลอด ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง นำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วในไมโครพิวจ์ เพื่อให้ปฏิกิริยาหลงมาด้านล่างหลอดทั้งหมด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (37 องศาเซลเซียส) 14-16 ชั่วโมงและวิเคราะห์ผลการตัดด้วย 1% Agarose gel electrophoresis

ตาราง 14 องค์ประกอบของการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

ส่วนผสมของปฏิกิริยา	ปริมาณที่ใช้ (ul/ปฏิกิริยา)
dH <sub>2</sub> O	6
10x buffer	2
DNA	10
ปริมาตรรวม	20

### 2.2.4 สกัดพลาสมิด โดยวิธี PLASMID PREP-CTAB

คัดเลือกตัวอย่างที่มีความแตกต่างมาสกัดพลาสมิดเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้โดยดูดเชื้อจากกลีเซอรอล Stock 100 ไมโครลิตร ลงใน LB + Amp<sup>+</sup> 5 มิลลิลิตร บ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม STET buffer 200 ไมโครลิตร ลงใน Suspent pellet จากนั้นเติม Lysozyme (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตรผสมโดยการ Vortex บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที และต้มตัวอย่าง 45 วินาที, ปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีจากนั้นนำไม้จิ้มฟันเขี่ยโปรตีนที่อยู่ก้นหลอดออก เติม RNaseA (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เติม CTAB (5% w/v ใน 0.5M NaCl) 10 ไมโครลิตร ผสมโดยพลิกหลอดไปมา ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที สังเกตหากมีดีเอ็นเอจะมีลักษณะขาวขุ่น ปั่นเหวี่ยง 10 นาที ดูดส่วนใสออก และเติม 1.2M NaCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมโดยการพลิกหลอดขึ้นลง (ทำให้ pellet ที่ติดอยู่ในหลอดละลายให้หมด) ทั้งไว้ 10-30 นาที เติมโคโลฟอร์ม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมโดย

เขย่า ปั่นเหวี่ยง 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที คูด่วนใสด้านบน 400-500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่โดยใช้ไมโครปิเปต P-200 โดยอย่าดูดโดนชั้นตะกอน เดิมเอทานอล 95% 2 ปริมาตร (800-1000 ไมโครลิตร) บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส 10 นาทีหรือข้ามคืน ปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที คูด่วนใส่ทิ้ง (อย่าให้ DNA pellet หลุดหาย) เดิมเอทานอล 70% ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมโดยพลิกหลอดขึ้นลงเบาๆ ปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที คูด่วนใส่ทิ้งอย่าให้ DNA pellet หลุดหายและเดิมเอทานอล 70% ปริมาตร 750 ไมโครลิตรอีกครั้งผสมโดยพลิกหลอดขึ้นลงเบาๆ ปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที คูด่วนใส่ทิ้งอย่าให้ DNA pellet หลุดหาย เปิดฝาหลอดแล้ว คั่วหลอดบนกระดาษซับจนกระทั่ง DNA pellet แห้ง สังเกตจาก DNA pellet จากสีขาวขุ่นเมื่อแห้งจะใส ละลายดีเอ็นเอกลับมาด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA ) ปริมาตร 10-30 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA pellet

### 2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA บางส่วนของแบคทีเรียที่มีขนาดประมาณ 1500 bp ศึกษาโดยส่งตัวอย่างพลาสติกที่สกัดในข้อ 7 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DNA sequencer โดยใช้ primer ชื่อ M-13FpUC(-40) 5'GTTTCCAGTCACGAC 3' และ M-13RpUC(-26) 5'CAGGAAACAGCTATGAC 3' ในการตรวจหา โดยส่งตัวอย่าง sequence ไปทำการวิเคราะห์ที่บริษัท Frist BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย

### 3. การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลของยีนส่วน 16S rRNA และ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

3.1 นำข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณส่วนยีน 16S rRNA ที่ได้จากการโคลนนิ่งแบคทีเรียทั้งหมด โดยทำการปรับและคัดเลือกลำดับเบส sequence โดยใช้โปรแกรม BIOEDIT จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์หาชนิดของแบคทีเรียใน GenBank โดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ด้วยโปรแกรม BLASTN ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA)

3.2 หลังจากนั้นนำลำดับเบสดีเอ็นเอของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่ได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนเพื่อหาชนิดของแบคทีเรียแล้ว พร้อมกับลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 113 ชนิดที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่เติมอากาศ (3D) และจำนวน 81 ชนิด

ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศ (4E) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ มาทำการหาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ในระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 2 แบบโดยนำลำดับเบสมาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรมทาง bioinformatics หลายโปรแกรมร่วมกัน คือ นำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาทำการ alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X1.83 (Chenna, 2003) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP Package ซึ่งประกอบด้วย dnadist โดยเลือกความสัมพันธ์ของ Neighbour - Joining tree ด้วยรูปแบบของ Kimura2-parameter (Kimura et al., 1908), neighbor, seqboot และ consense (Felsenstein, 1985) ตามลำดับ และทำ Bootstrap Neighbour - Joining tree (Edwards et al., 2004) แสดงผลในรูปสายวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม Tree view การสร้าง tree จะทำการวิเคราะห์หาค่า bootstrap ซึ่งค่า bootstrap มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยการสร้าง tree จะเลือกใช้ bootstrap data resampled 1000 ครั้ง เพื่อสร้างเมทริกความคล้ายคลึงในการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบส โดยกลุ่มไหนแสดงค่า bootstrap 95 เปอร์เซ็นต์หรือสูงกว่า แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับสูงของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้ (Felsenstein, 1985) และ phylogenetic tree ที่ได้จะใช้ out group คือลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรีย *Aquifex pyrophilus* ในการทำ rooting tree หรือ tree แบบตรึงราก

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียทางเคมี

จากผลการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำเข้าและน้ำออกจากระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง จำนวน 3 แห่ง ที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียดังนี้ การบำบัดขั้นต้น (Primary treatment) ด้วยตะแกรงดักขยะ/บ่อดักไขมัน และผ่านระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบ UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) ก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งและทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ทางกายภาพและทางเคมีดังนี้ บีโอดี, ซีโอดี, ฟอสฟอรัสทั้งหมด, ทีเคเอ็น, ไขมันและน้ำมัน, ของแข็งแขวนลอย, พีเอช โดยทำการวิเคราะห์ตาม Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 20<sup>th</sup> (APHA *et al.*, 1998)

ตัวอย่างน้ำจากบ่อบรรวมน้ำเสีย (Sum) และประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมในขั้นตอนการบำบัดขั้นต้น (Primary treatment) ทั้ง 3 แห่งแสดงดังตารางที่ 15-17

ตาราง 15 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ 1

ครั้งที่	ประสิทธิภาพ (%)						
	บีโอดี	ซีโอดี	ฟอสฟอรัส ทั้งหมด	ทีเคเอ็น	ไขมัน และ น้ำมัน	ของแข็ง แขวนลอย	พีเอช
1	21.90	15.38	-1.46	13.71	91.86	6.17	6.78
2	22.58	57.14	-3.96	18.56	29.63	10.11	7.01
3	27.93	50.00	4.28	30.87	-5.99	44.09	7.27
4	3.03	25.00	-8.40	15.94	43.94	14.13	7.01

จากผลการทดลองตารางที่ 15 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดของแข็งแขวนลอย (SS) ของครั้งที่ 1, 2 และ 4 มีประสิทธิภาพการบำบัดต่ำคือ 6.17, 10.11 และ 14.13 % ตามลำดับ ยกเว้นในครั้งที่ 3 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดค่อนข้างดีคือสามารถบำบัดได้สูงถึง 44.09 % สอดคล้องกับประสิทธิภาพการบำบัดบีโอดีในครั้งที่ 3 พบว่ามีประสิทธิภาพการบำบัดได้ 27.93 %

เป็นไปตามเกณฑ์การบำบัดขั้นต้นซึ่งสามารถบำบัดบีโอดีได้ 25-40 % (Tchobanoglous *et al.*, 2004) แต่ครั้งที่ 1, 2 และ 4 พบว่าต่ำกว่าเกณฑ์การบำบัดคือสามารถบำบัดได้เฉลี่ยเพียง 24.14 % เนื่องมาจากประสิทธิภาพการบำบัดของแข็งแขวนลอยค่อนข้างต่ำ สำหรับประสิทธิภาพการบำบัดฟอสฟอรัสของครั้งที่ 1, 2 และ 4 พบว่าเป็นลบคือ -1.46 %, -3.96 % และ -8.40 % ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์การบำบัดขั้นต้นที่สามารถบำบัดฟอสฟอรัสได้ 10-20 % (เกรียงศักดิ์, 2536) ส่วนประสิทธิภาพการบำบัดซีโอดีโดยรวมพบว่าค่อนข้างดีคือสามารถบำบัดได้เฉลี่ย 44.05 % ประสิทธิภาพการบำบัดไนโตรเจนในรูปทีเคเอ็นพบว่าสามารถบำบัดได้เฉลี่ย 19.77 % เป็นไปตามเกณฑ์การบำบัดขั้นต้นที่สามารถบำบัดไนโตรเจนได้ 10-20 % (เกรียงศักดิ์, 2536) และประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมัน (Grease&oil) ในครั้งที่ 1, 2 และ 4 พบว่าค่อนข้างสูงคือสามารถบำบัดได้เฉลี่ยถึง 55.14 % ยกเว้นในครั้งที่ 3 พบว่ามีประสิทธิภาพการบำบัดเป็นลบคือ -5.99 %

ตาราง 16 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ 2

ครั้งที่	ประสิทธิภาพ (%)						
	บีโอดี	ซีโอดี	ฟอสฟอรัส ทั้งหมด	ทีเคเอ็น	ไขมัน และ น้ำมัน	ของแข็ง แขวนลอย	ทีเอช
1	-13.18	33.34	8.48	-37.00	-4.17	7.23	6.42
2	-6.62	4.53	10.95	6.13	9.09	-4.68	6.63
3	82.79	70.00	5.33	16.92	91.89	65.54	6.49
4	62.65	46.15	15.98	3.92	84.74	62.46	6.30

จากตารางที่ 16 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดของครั้งที่ 1 และ 2 มีประสิทธิภาพการบำบัดต่ำในทุกพารามิเตอร์ โดยประสิทธิภาพการบำบัดตะกอนแขวนลอยของอุตสาหกรรมพบว่าสามารถบำบัดได้เพียง 7.23 % และ -4.68 % ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์การบำบัดของระบบบำบัดขั้นต้นที่ควรบำบัดตะกอนแขวนลอยได้ประมาณ 50-60 % (เกรียงศักดิ์, 2536) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสำหรับพารามิเตอร์อื่นๆ ต่ำลงด้วยเช่นกัน ดังเช่น ประสิทธิภาพในการบำบัดบีโอดี ครั้งที่ 1 และ 2 พบว่าเป็นลบ คือ -13.18 % และ -6.62 % ตามลำดับ เช่นเดียวกับ

ประสิทธิภาพการบำบัดไนโตรเจนในรูปที่เคเอ็นพบว่าต่ำเช่นกันคือเฉลี่ย -37.00 และ 6.13 % การบำบัดไขมันในครั้งที่ 1 และ 2 พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำคือ -4.17 % และ 9.09 % ตามลำดับ สำหรับประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียในครั้งที่ 3 และ 4 พบว่าประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ที่ดีในทุกพารามิเตอร์ ดังเช่นประสิทธิภาพการบำบัดบีโอดีพบว่าโดยเฉลี่ยสูงถึง 72.72 % เป็นไปตามเกณฑ์การบำบัดขั้นต้นที่ควรบำบัดได้ 25-40 % (Tchobanoglous *et al.*, 2003) ประสิทธิภาพการบำบัดของแข็งแขวนลอยพบสูงถึง 64.00 % เป็นไปตามเกณฑ์การบำบัดของระบบบำบัดขั้นต้นที่ควรบำบัดตะกอนแขวนลอยได้ประมาณ 50-60 % (เกรียงศักดิ์, 2536) และทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมที่ 3 ลดลง ประสิทธิภาพการบำบัดซีโอดีโดยเฉลี่ยบำบัดได้สูงถึง 58.08 % ประสิทธิภาพการบำบัดฟอสฟอรัสพบเฉลี่ย 10.66 % อยู่ในเกณฑ์การบำบัดขั้นต้นที่สามารถบำบัดฟอสฟอรัสได้ 10-20 % (เกรียงศักดิ์, 2535) ประสิทธิภาพการบำบัดไนโตรเจนในรูปที่เคเอ็นโดยเฉลี่ยพบ 10.42 % เป็นไปตามเกณฑ์การบำบัดขั้นต้นคือ 10-20 % (เกรียงศักดิ์, 2536) สำหรับประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันพบว่าสามารถบำบัดได้สูงถึง 88.32%

ตาราง 17 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ 3

ครั้งที่	ประสิทธิภาพ (%)						
	บีโอดี	ซีโอดี	ฟอสฟอรัส ทั้งหมด	ทีเคเอ็น	ไขมัน และ น้ำมัน	ตะกอน แขวนลอย	พีเอช
1	41.33	23.53	42.56	37.69	7.14	71.96	6.42
2	43.19	58.74	31.10	42.07	-20.00	-31.60	6.82
3	34.44	76.93	43.64	36.68	60.92	79.07	6.29
4	50.76	25.00	17.76	31.19	17.13	64.12	6.17

จากผลการทดลองตารางที่ 17 พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมที่ 3 มีประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ดีในทุกพารามิเตอร์ สามารถบำบัดบีโอดีเฉลี่ยสูงถึง 42.43 % เป็นไปตามเกณฑ์การบำบัดขั้นต้นที่ควรบำบัดได้ 25-40 % (Tchobanoglous *et al.*, 2003) ประสิทธิภาพการบำบัดซีโอดีเฉลี่ย 46.05 % ประสิทธิภาพการบำบัดตะกอนแขวนลอยพบสูงถึง 71.72 % ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์การบำบัดตะกอนแขวนลอยของระบบบำบัดขั้นต้นที่ควรบำบัดได้ 50-60 % (เกรียงศักดิ์, 2536) ประสิทธิภาพการบำบัดฟอสฟอรัสและไนโตรเจนในรูปที่เคเอ็นสามารถบำบัดได้สูงถึง

33.77 และ 36.91 % ตามลำดับ สูงกว่าเกณฑ์การบำบัดขั้นต้นที่สามารถบำบัดฟอสฟอรัสและไนโตรเจนได้ประมาณ 10-20 % (เกรียงศักดิ์, 2536) ประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันสามารถบำบัดได้เฉลี่ย 28.40 % ยกเว้นในครั้งที่ 2 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดต่ำลงคือสามารถบำบัดได้เพียง -20.00 %

การศึกษาระบบบำบัดน้ำเสียก่อนเข้าระบบ UASB และน้ำที่ออกจากระบบ UASB เพื่อศึกษาคุณลักษณะน้ำเสียหลังจากการบำบัดโดยระบบไม่ใช้ออกซิเจนหรือระบบ UASB พบว่าค่าที่ได้ของแต่ละพารามิเตอร์แตกต่างกันดังตารางที่ 18-21

ตาราง 18 ประสิทธิภาพการบำบัดของน้ำเสียในถัง UASB อุตสาหกรรมที่ 1

เดือน	pH	ประสิทธิภาพในการบำบัด (ร้อยละ)					
		BOD	COD	T-P	TKN	O&G	SS
1	6.58	30.5	41.8	0.5	11.9	-257.1	23.4
2	6.81	29.6	-6.7	16.4	0	68.6	10.1
3	6.66	68.3	-2.3	8.9	77.7	78.4	20.5
4	6.49	23.9	10	-6.8	31.4	16.7	29.5

ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีตามประสิทธิภาพของการบำบัดน้ำเสียในถัง UASB ในอุตสาหกรรมที่ 1 พบว่าระบบมีค่า pH โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 6.64 และประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียที่ศึกษาจากพารามิเตอร์ทางเคมีดังตารางที่ 18 ของ BOD, COD, T-P, TKN, O&G และ SS โดยเฉลี่ยร้อยละ 38.07, 10.7, 4.75, 30.25, -23.35 และ 83.5 ตามลำดับ

ตาราง 19 ประสิทธิภาพการบำบัดของน้ำเสียในถัง UASB อุตสาหกรรมที่ 2

เดือน	pH	ประสิทธิภาพในการบำบัด (ร้อยละ)					
		BOD	COD	T-P	TKN	O&G	SS
1	6.81	69.9	60.0	60.6	-18.3	74	67.2
2	6.89	69.7	71.4	60.7	-11.1	45	75.4
3	6.97	-95.2	-411.1	-5.6	90.7	-103.4	-1,281.6
4	6.76	27.4	-114.3	-59.9	-96.4	39.6	-520.8

ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีตามประสิทธิภาพของการบำบัดน้ำเสียในถัง UASB ใน  
 อุตสาหกรรมที่ 2 พบว่าระบบมีค่า pH โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 6.86 และประสิทธิภาพของระบบบำบัด น้ำ  
 เสียที่ศึกษาจากพารามิเตอร์ทางเคมีดังตารางที่ 19 ของ BOD, COD, T-P, TKN, O&G และ SS โดย  
 เฉลี่ยร้อยละ 17.95, -98.5, 13.95, -8.77, 13.65 และ -414.95 ตามลำดับ

ตาราง 20 ประสิทธิภาพการบำบัดของน้ำเสียในถัง UASB อุตสาหกรรมที่ 3

เดือน	pH	ประสิทธิภาพในการบำบัด (ร้อยละ)					
		BOD	COD	T-P	TKN	O&G	SS
1	6.53	22.7	20	-90.3	79.51	7.7	-766.7
2	6.75	5.7	-112.4	-109.3	-403.9	-150	-608.1
3	6.39	24.3	-375	-73.5	-162.8	-63.9	-2,074.6
4	6.17	53.4	-77.8	-60.4	-102.9	21.3	-975.6

ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีตามประสิทธิภาพของการบำบัดน้ำเสียในถัง UASB ใน  
 อุตสาหกรรมที่ 3 พบว่าระบบมีค่า pH โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 6.46 และประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสีย  
 ที่ศึกษาจากพารามิเตอร์ทางเคมีดังตารางที่ 20 ของ BOD, COD, T-P, TKN, O&G และ SS โดยเฉลี่ย  
 ร้อยละ 26.53, -136.3, -83.37, -147.52, -46.23 และ -1,106.25 ตามลำดับ

จากค่าพารามิเตอร์ในตารางที่ 18-20 พบว่าประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียบาง  
 พารามิเตอร์มีค่าติดลบ ซึ่งหมายถึงระบบไม่มีประสิทธิภาพในการทำงาน แต่ทั้งนี้การติดลบของ  
 ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียเกิดจากข้อจำกัดในการเก็บน้ำ เนื่องจากระบบบำบัดของ  
 อุตสาหกรรมที่ 3 ไม่มีส่วนที่สามารถเก็บน้ำหลังจากที่น้ำออกจากระบบบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจน  
 หรือ UASB ทำให้ต้องเก็บน้ำในระบบ DN/CN ดังภาพที่ 7 ซึ่งเป็นระบบที่ต่อจากระบบ UASB ทำ  
 ให้ค่าน้ำที่เป็นตัวแทนน้ำที่ได้จากการบำบัดในระบบ DN/CN ไม่สามารถเป็นตัวแทนที่ดีของค่าน้ำ  
 ที่ออกจากระบบบำบัด UASB ได้ เนื่องจากในระบบ DN/CN เปรียบเสมือนระบบ Anoxic ซึ่งเป็น  
 อีกกระบวนการบำบัดอีกขั้นตอนที่ไม่ได้เกิดจากการบำบัดน้ำเสียจากระบบ UASB

ตาราง 21 ลักษณะน้ำเข้า และน้ำออกเฉลี่ยจากระบบ UASB ของอุตสาหกรรมอาหารทะเล  
แช่แข็ง

พารามิเตอร์	หน่วย	ช่วง		ค่าเฉลี่ย		ประสิทธิภาพ ในการบำบัด เฉลี่ย %
		น้ำเข้า	น้ำออก	น้ำเข้า	น้ำออก	
pH	-	6.53-7.25	6.37-7.25	6.71	6.79	-
BOD	mg/l	630-1,080	380-1,230	1,359.4	790	41.9
COD	mg/l	1,200-2,800	800-6,133	1,991.6	2,466.6	-23.9
TKN	mg/l	136-378	46-583.8	233.5	212.7	8.9
T-P	mg/l	299.6-459	150.1-531.6	393.5	356.3	7.2
Oil&Grease	mg/l	90-347.1	33.8-250	141.7	86.9	38.7
SS	mg/l	237.2-854.4	213-5,223	463.7	1,507.1	-225

จากการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำเสียจากรายการที่ 18-20 ดังค่าพารามิเตอร์ทางเคมี pH, BOD, COD, TKN, TP, Oil& Grease และ SS พบว่า ค่า pH ไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับน้ำก่อนเข้าระบบบำบัด UASB และออกจากระบบ UASB โดยช่วงค่า pH ของน้ำเข้าของอุตสาหกรรมดังรายการที่ 21 ที่แสดงลักษณะน้ำเข้า และน้ำออกจากระบบ UASB อยู่ระหว่าง 6.53-7.25 ซึ่งมีแนวโน้มต่ำกว่าค่า pH ที่ใช้ในการออกแบบมีค่าอยู่ระหว่าง 6.3-7.8 Habeeb *et al.* (2010) แต่ Tchobanoglous *et al.* (2004) กล่าวว่า pH ควรมีค่าใกล้เคียง 7 ทั้งนี้ สันทัด (2549) กล่าวว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรด และแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างมีเทนมีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-7.8 ซึ่งอยู่ในช่วงของ ค่า pH ของน้ำเสียที่เป็นน้ำเข้าของอุตสาหกรรมที่ใช้ในการศึกษา นอกจากนี้ สันทัด (2549) ยังกล่าวอีกว่า ถึงแม้ว่าไม่สามารถควบคุมให้จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มเจริญเติบโต และแสดงประสิทธิภาพได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ แต่ค่า pH ที่อยู่ในช่วงดังกล่าวจะสามารถทำให้จุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มเจริญเติบโตอยู่ได้ และทำหน้าที่ในการบำบัดสารอินทรีย์เพื่อให้ได้ก๊าซมีเทน ทั้งนี้หากค่า pH ต่ำกว่าช่วงดังกล่าวจะเป็นผลโดยตรงกับแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างมีเทน และทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียลดลงได้ สำหรับค่า BOD มีค่าลดลงโดยเฉลี่ยของแต่ละเดือนของแต่ละอุตสาหกรรมประมาณร้อยละ 27 แต่หากพิจารณาประสิทธิภาพโดยเฉลี่ยของแต่ละอุตสาหกรรมพบว่าอุตสาหกรรมที่ 1 มีประสิทธิภาพในการบำบัด BOD มากที่สุดคือ ร้อยละ 37 ลำดับต่อมาคืออุตสาหกรรมที่ 3 ร้อยละ 26 และอุตสาหกรรมที่ 2 ร้อยละ 18 ดัง

ตารางที่ 18-20 ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการบำบัดของระบบ UASB เป็นการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน ควรบำบัดได้มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งควรมีค่า BOD:N:P ประมาณ 100:1.1:0.2 ซึ่งพบว่าค่า BOD:N:P ของระบบที่ใช้ในการศึกษามีค่าเท่ากับ 5.82:1:1.69 ซึ่งค่าของฟอสฟอรัสมากเกินไป และมีค่าไนโตรเจนน้อยเกินไป ทั้งนี้การที่ธาตุอาหารไม่สมบูรณ์จะมีผลให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียไม่สมบูรณ์ (สันทนต์, 2549) ซึ่งอาจเป็นผลที่ทำให้เกิดการย่อยสลายของ BOD น้อยลง ส่วนค่า COD ไม่มีค่าลดลง แต่กลับมีค่าเพิ่มขึ้นสำหรับน้ำที่ออกจากระบบ UASB ใน บางเดือน ทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดมีค่าติดลบดังตารางที่ 18-20 อาจมีผลมาจากกระบวนการผลิตที่เพิ่มมากขึ้น เพราะน้ำเสียที่เข้าสู่ระบบบำบัดเป็นน้ำเสียที่มาจากกระบวนการผลิตอาหารทะเล และกรมอุตสาหกรรมอุตสาหกรรม (2551) กล่าวว่าการผลิตอาหารทะเลมีการใช้คลอรีนผสมกับน้ำใช้ในกระบวนการผลิต โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ให้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ซึ่งคลอรีนที่เติมลงไปในช่วงแรกจะทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำ หลังจากนั้นจะทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์และสารประกอบไนโตรเจนเกิดเป็น Combined chloride residual และเหลือเป็น Free chloride residual โดยที่ Free chloride residual จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณคลอรีนที่เติมลงไป ซึ่งทำให้น้ำเสียมีคลอรีนมากกว่ากระบวนการผลิตในช่วงเดือนปกติ ซึ่งคลอรีนมีผลต่อประสิทธิภาพการบำบัด(กรมอุตสาหกรรมอุตสาหกรรม, 2551) ของระบบค่าพารามิเตอร์ทางเคมี T-P โดยจะทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดฟอสฟอรัสลดลง และยังทำให้ประสิทธิภาพของ COD มีค่าลดลง นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องปรับตัวให้มีความเคยชินกับสภาพที่มีคลอรีนสูงซึ่งจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถปรับสภาพได้อาจตาย และถูกย่อยสลายไป นอกจากนี้ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่มีปริมาณความเข้มข้นสูงมากกว่า 2.0 M จะทำให้กลุ่มประชากร methanogens น้อยลง (Joseph and Frederick, 1992) ซึ่งผลที่ตามมาคือการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นหน้าที่ของแบคทีเรีย methanogens ทั้งนี้ระบบบำบัดควรมีธาตุอาหารเสริมสำหรับแบคทีเรียคือมีค่า COD:N:P ซึ่งเป็นอัตราส่วนอาหารเสริมสร้างที่ดั้งเดิมให้กับระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน เพราะอัตราส่วนเสริมที่ต่ำมาก สามารถชี้ให้เห็นอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนจะต่ำมาก เมื่อเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียในระบบบำบัดแบบใช้ออกซิเจน (สันทนต์, 2549) โดย Tchobanoglous *et al.* (2004) แนะนำให้มีค่า COD:N:P ตอนเริ่มเดินระบบเท่ากับ 300:5:1 ในขณะที่หากมีการเดินระบบไปแล้วค่า COD:N:P ควรจะมีค่าเท่ากับ 600:5:1 แต่ค่า COD:N:P ขณะเดินระบบกลับมีค่าเท่ากับ 8.53:1:1.69 ซึ่งตรงข้ามกับค่า BOD ที่มีค่าลดลง เนื่องจากในน้ำเสียมีสารอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ยากอยู่มาก ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถ และความ ต้องการในการผลิตที่มีลักษณะสูงขึ้นในเดือนนั้นๆ ในส่วนค่า TKN และ T-P มีค่าลดลงแต่ไม่มี

ความแตกต่างกันมากระหว่างน้ำก่อนเข้าระบบ UASB และออกจากระบบ UASB โดย Elmitwalli *et al.* (2007) กล่าวว่า เมื่อใช้ระบบ UASB เพื่อบำบัดน้ำที่มาจากการทำงานสะอาดภายในบ้านเรือนจะสามารถบำบัด TKN และ T-P ได้เพียง 23-36% และ 10-24% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Terek and Ralf (2007) ที่กล่าวไว้เช่นกันว่าการบำบัด น้ำเสียจากการทำความสะอาดภายในบ้านมีประสิทธิภาพในการบำบัด TKN และ T-P 22-30% และ 15-21% ตามลำดับ อีกทั้ง สุจินดา และคณะ (2547) พบว่าความสามารถในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมประมงด้วยระบบ UASB สามารถบำบัด TKN และ T-P ได้เพียง 17.51% และ 24.64% ตามลำดับ นอกจากนี้ระบบไม่สามารถบำบัดไขมัน เพราะไขมันควรถูกบำบัดในระบบบำบัดน้ำเสียตั้งแต่ขั้นแรก จากตารางที่ 18-20 มีค่า Oil & Grease ติดลบ อาจเกิดจากการบำบัดในขั้นตอนแรกไม่สามารถบำบัดได้ดีเท่าที่ควร สังเกตได้จากตัวอย่างมีคราบไขมันเกิดขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ จึงส่งผลให้มีไขมันผ่านเข้ามาในการบำบัดขั้นที่ 2 ส่วนค่า SS ดังตารางที่ 19 และ 20 มีค่าติดลบเนื่องจากเป็นผลต่อเนื่องของระบบบำบัดที่มีค่า BOD:N:P ไม่เหมาะสม ทำให้เกิดมวลสารปริมาณมากขึ้นตามมา ประกอบกับเกิดข้อจำกัดในการเก็บน้ำเสีย เนื่องจากไม่มีท่อที่สามารถเก็บน้ำเสียสำหรับน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียของระบบ UASB ทำให้ต้องเก็บน้ำเสียที่อยู่ในระบบ DN/CN ซึ่งทำให้เกิดคลาดเคลื่อนของค่าพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำเสียที่ออกจากระบบบำบัด UASB

การบำบัดขั้นที่สองพบว่า คุณลักษณะน้ำเข้าและน้ำออกโดยเฉลี่ยจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของทั้ง 3 อุตสาหกรรม แสดงดังตารางที่ 22

ตาราง 22 คุณลักษณะน้ำเข้า - น้ำออก โดยเฉลี่ยจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของ อุตสาหกรรมที่ทำการศึกษา

พารามิเตอร์	อุตสาหกรรมที่ 1		อุตสาหกรรมที่ 2		อุตสาหกรรมที่ 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 อุตสาหกรรมซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.58-7.28 ซึ่งมีค่าเท่ากับระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มักควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.5-8.5 (สุรพล, 2538) ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีและตะกอนแบคทีเรียของระบบบำบัดน้ำเสียสามารถจมตัวได้ดี (สันทนต์, 2549) ส่วนค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำเข้าทั้ง 3 อุตสาหกรรม ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่บ่งบอกถึงปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสีย หรือบ่งบอกถึงปริมาณสารอาหารของแบคทีเรียมีค่าโดยเฉลี่ยไม่แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมที่ 3 มีค่าสูงที่สุด นอกจากนี้ น้ำเข้าของอุตสาหกรรมที่ 3 พบ ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด ค่าทีเคเอ็น ค่าของแข็งแขวนลอย และค่าน้ำมันและไขมันมีค่าสูงกว่าอุตสาหกรรมที่ 1 และ 2 เช่นกัน แต่ไม่แตกต่างกันมาก อีกทั้งค่าพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำออกทั้ง 3 อุตสาหกรรม มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับน้ำเข้าในทุกพารามิเตอร์

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมที่ 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 23

ตาราง 23 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ 1

เดือนที่	พีเอช	ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย (ร้อยละ)					
		บีโอดี	ซีโอดี	ฟอสฟอรัส ทั้งหมด	ทีเคเอ็น	ของแข็ง แขวนลอย ทั้งหมด	ไขมัน และ น้ำมัน
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

อุตสาหกรรมที่ 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 นอกจากนี้  
อุตสาหกรรมที่ 2 ยังมีประสิทธิภาพในการลดค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด  
ค่าทีเคเอ็น และค่าไขมันและน้ำมันได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 50 แสดงดังตารางที่ 24

ตาราง 24 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ 2

ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย (ร้อยละ)							
เดือนที่	พีเอช	บีโอดี	ซีโอดี	ฟอสฟอรัส ทั้งหมด	ทีเคเอ็น	ของแข็ง แขวนลอย ทั้งหมด	ไขมัน และ น้ำมัน
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

ส่วนอุตสาหกรรมที่ 3 ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.72-7.34 และมีประสิทธิภาพในการลดค่าบีโอดี  
โดยเฉลี่ยได้มากกว่าร้อยละ 90 ส่วนค่าซีโอดี ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด และค่าของแข็งแขวนลอย  
ทั้งหมด สามารถลดได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 80 ค่าทีเคเอ็นสามารถลดได้โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ  
60 ยกเว้นในเดือนที่ 1 ไม่สามารถค่าทีเคเอ็นได้ ขณะที่ค่าไขมันและน้ำมันมีประสิทธิภาพที่  
แตกต่างกันในแต่ละเดือน แสดงดังตารางที่ 25

ตาราง 25 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ 3

ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย (ร้อยละ)							
เดือนที่	พีเอช	บีโอดี	ซีโอดี	ฟอสฟอรัส ทั้งหมด	ทีเคเอ็น	ของแข็ง แขวนลอย ทั้งหมด	ไขมัน และ น้ำมัน
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 อุตสาหกรรม พบว่า อุตสาหกรรมที่ 1, 2 และ 3 มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.61-7.38 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีคืออยู่ในช่วง 6.5-8.5 (สุรพล, 2538) นอกจากนี้ทั้ง 3 อุตสาหกรรม สามารถลดค่าบีโอดีโดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 90 ทั้งนี้ประสิทธิภาพดังกล่าวเป็นไปตามค่าการออกแบบของระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่ออกแบบไว้ให้สามารถลดค่าบีโอดีได้ร้อยละ 85-95 (Tchobanoglous *et al.*, 2004) ในขณะที่อุตสาหกรรมที่ 3 สามารถลดค่าซีโอดีได้โดยเฉลี่ยมากที่สุดคือ มากกว่าร้อยละ 90 เป็นส่วนใหญ่

สำหรับค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด ค่าทีเคเอ็น และค่าไนโตรเจนและไขมัน ทั้ง 3 อุตสาหกรรมสามารถลดได้โดยเฉลี่ยในแต่ละเดือนมากกว่าร้อยละ 50 ยกเว้นอุตสาหกรรมที่ 3 ที่ข้อมูลในเดือนที่ 1 ไม่สามารถลดค่าทีเคเอ็นได้ อีกทั้งน้ำออกจากระบบมีค่าทีเคเอ็นเพิ่มขึ้นในขณะที่เดือนอื่นสามารถลดค่าทีเคเอ็นได้มากกว่าร้อยละ 63.1-98.1 ดังตารางที่ 25 เกิดจากน้ำเสียในเดือนที่ 1 มีค่าบีโอดีสูงและค่าทีเคเอ็นต่ำ มีผลทำให้อัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็น ( $BOD_5/TKN$  ratio) สูงเกินไป ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน กล่าวคือ หากอัตราส่วนบีโอดีต่อทีเคเอ็นมีค่ามากกว่า 3 ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีการบำบัดสารไนโตรเจนจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันลดลง (Tchobanoglous *et al.*, 2004; Bitton, 2005)

ส่วนค่าฟอสฟอรัสทั้งหมดเมื่อพิจารณาแล้วพบว่าอุตสาหกรรมที่ 3 สามารถลดค่าฟอสฟอรัสทั้งหมดได้มากที่สุดถึงร้อยละ 95.9-98.7 เนื่องจากอุตสาหกรรมที่ 3 ใช้ระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งที่มีการกำจัดไนโตรเจนซึ่งมีกระบวนการเดินระบบที่คล้ายคลึงกับระบบที่มีการกำจัดสารฟอสฟอรัสคือเป็นระบบที่ไม่ใช้ออกซิเจนต่อเนื่องกับระบบที่ใช้ออกซิเจน (สุบันจิต, 2548) จึงทำให้เกิดการกำจัดไนโตรเจนควบคู่กับการกำจัดฟอสฟอรัส ด้วยเหตุนี้อุตสาหกรรมที่ 3 จึงสามารถลดค่าฟอสฟอรัสทั้งหมดได้มากกว่าอุตสาหกรรมที่ 1 และ 2 ซึ่งมีคุณลักษณะของน้ำเข้าใกล้เคียงกัน

## 2. ผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากน้ำเสียในระบบน้ำเสียโดยการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

### 2.1 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยสีของโคโลนี (Recombinant clone screening by blue/white selection)

จากการนำตัวอย่างแบคทีเรียที่เก็บจากน้ำเสียในระบบบำบัดน้ำเสียแบ่งออกเป็นสองระบบคือ ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (UASB) (3D) และระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) ซึ่งของอุตสาหกรรมที่ 1 และ 2 เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง และน้ำเสียจากบ่อ แอ่น็อกซิกและบ่อแอโรบิกของอุตสาหกรรมที่ 3 ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

ที่มีการบำบัดสารในโตรเจน อย่างละ 3 ชั่วโมง นำมาผสมรวมกัน แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณยีนด้วย 16S rRNA ยีนด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำมาทำการโคลนยีนส่วน 16S rRNA ในเชื้อ *E. coli* จากผลการโคลนและทำการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening) พบว่าผลคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยสีของโคโลนี (Recombinant clone screening by blue/white selection) ซึ่งเป็นการคัดเลือกครั้งที่ 1 สามารถคัดเลือกโคลนได้ทั้งหมดจำนวน 344 โคลน โดยแบ่งเป็น โคลนจากตัวอย่างน้ำเสียในระบบบำบัดแบบเติมอากาศ (4E) และตัวอย่างน้ำเสียในระบบบำบัดแบบไร้อากาศ (3D) จำนวน 131 และ 214 โคลน ตามลำดับ โดยโคโลนีทั้งหมดนี้จะถูกคัดเลือกด้วยวิธี Rapid size screening

## 2.2 ผลการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening of recombinant clone)

จากผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด สามารถอนุมานได้ว่า โคลนที่มีขนาดใหญ่กว่า Marker มี Insert gene แทรกเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ ยกตัวอย่างเช่น ขนาดดีเอ็นเอของโคลนรหัส 4E2-33, 4E2-35, 4E2-37 4E2-39, 4E2-41, 4E2-47 มีขนาดใหญ่กว่า Marker คือ 3D2-Blue สามารถอนุมานได้ว่ามี Insert gene แทรกเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ ดังแสดงในภาพที่ 12 จากการทำ Rapid size screening ทั้ง 345 โคลน พบว่าได้โคลนที่มีขนาดตามต้องการเพียง 172 โคลน โดยเป็นโคลนจาก 4E และ 3D จำนวน 56 และ 116 โคลน ตามลำดับ โดยจะสังเกตเห็นได้ว่าการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยสีของโคโลนีไม่สามารถคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมได้ทั้งหมดเนื่องด้วยมีปัจจัยความผิดพลาดยกตัวอย่างเช่น สารเคมี X-Gal, IPTG อาจไม่ได้ประสิทธิภาพหรือวิธีการผสม X-Gal, IPTG กับอาหารแข็งโดยเราใช้วิธี Spread Plate อาจจะทำให้สาร X-Gal (5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) หรือ substrate ของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase กระจายไม่ทั่วจานเลี้ยงเชื้อจึงทำให้โคโลนีของเชื้อที่ไม่ได้รับ Insert gene เกิดเป็นสีขาวได้เช่นกัน

ทั้งนี้หากต้องการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมควรมีการคัดเลือกมากกว่าหนึ่งวิธี เพื่อความถูกต้องของผลการทดลองมากที่สุดดังการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมของงานวิจัยเล่มนี้

3D2-Blue  
 4E2-33  
 4E2-34  
 4E2-35  
 4E2-36  
 4E2-37  
 4E2-38  
 4E2-39  
 4E2-40  
 4E2-41  
 4E2-42  
 4E2-43  
 4E2-44  
 4E2-45  
 4E2-46  
 4E2-47  
 4E2-48



ภาพ 12 แสดงตัวอย่าง 4E ในการคัดเลือกขนาดดีเอ็นเอสายผสมตรวจสอบผลโดย 1.5 % Agarose gel electrophoresis

### 2.3 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีความแตกต่างโดยวิธีการตัดดีเอ็นเอสายผสมด้วย

#### เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III (Restriction endonuclease digestion of DNA)

ผลการคัดเลือกโคลนที่มีความแตกต่างด้วยวิธีการตัดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III จากโคลนทั้งหมด 172 โคลน ได้โคลนที่มีจุดตัดของเอนไซม์ในบริเวณที่แตกต่าง ดังนี้ 3D จำนวน 55 โคลน และ 4E จำนวน 51 โคลน (ไม่แสดงข้อมูล) ยกตัวอย่างดีเอ็นเอสายผสมที่มีความแตกต่างหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III จากภาพที่ 13 โคลน 3D2-172 ปรากฏขนาดของดีเอ็นเอสายผสมสองขนาดโดยมีขนาดประมาณ 2700 bp และ 1500 bp อนุมานได้ว่ามีจุดตัดของเอนไซม์ *Hind*III บนดีเอ็นเอสายผสมสองบริเวณ ขณะที่โคลน 3D2-187 ปรากฏขนาดของดีเอ็นเอสายผสมสามขนาดโดยมีขนาดประมาณ 2700 bp, 1000 bp และ 500 bp จากตัวอย่างสองโคลนนี้ทำให้ทราบว่ามีส่วน 16S rRNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน

การทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III เนื่องจากเอนไซม์นี้มีจุดตัดใน Vector 2 บริเวณคือบริเวณที่มีลำดับเบส 5' AAGCTT 3' ซึ่งเมื่อตัดสมบูรณ์จะได้บริเวณของ Insert gene ทั้งหมดจากภาพที่ 13 ทั้งนี้เพื่อง่ายแก่การการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA



ภาพ 13 คือเอ็นเอสายผสมจากตัวอย่างน้ำเสียระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ (3D) ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

#### 2.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่มีขนาดประมาณ 1500 bp โดยใช้ primer ชื่อ M-13FpUC(-40) 5'GTTTTCCCAGTCACGAC 3' และ M-13RpUC(-26) 5'CAGGAAACAGCTATGAC 3' พบว่าเมื่อนำลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA ที่ได้จากการโคลนยีนของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) และแบบไม่ใช้ออกซิเจน (UASB) (3D) มาทำการหาชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียโดยนำลำดับเบสส่วน 16S rRNA ที่มีความยาวของลำดับเบสประมาณ 800-1,500 เบสมาทำการเปรียบเทียบความเหมือนด้วยโปรแกรม BLASTN ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) (Yang et al., 2009) ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบความเหมือนของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (3D) ดังแสดงในตาราง 26 โดยให้ลำดับโคลนทั้ง 55 โคลนแทนด้วยรหัส 3D1 และ 3D2 และผลที่ได้จากการเปรียบเทียบความเหมือนของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) ดังแสดงในตาราง 27 โดยให้ลำดับโคลนทั้ง 51 โคลนแทนด้วยรหัส 4E1 และ 4E2 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนซึ่งจะใช้ค่าความเหมือนในการเปรียบเทียบเพื่อศึกษา cultured bacteria หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ คือมากกว่า 97%, 90-97% และ น้อยกว่า 90% (Yang et al., 2010) พบว่าในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (3D) ผลการวิเคราะห์เป็นแบคทีเรีย uncultured หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ จำนวน 28 โคลน และแบคทีเรีย cultured หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ จำนวน 27 โคลน โดยพบว่าในจำนวน cultured bacteria 27 โคลน ประกอบด้วย 7

โคลน ที่มีค่าความเหมือนมากกว่า 97% คือ *Rhodobacter gluconicum* (3D1-43), *Peptostreptococcus russellii* (3D2-127), *Peptostreptococcaceae bacterium* (3D2-19), *Dokdonella* sp. (3D2-27), *Streptococcus henryi* (3D2-76), *Streptococcus parauberis* (3D2-149) และ *Neisseria* sp. (3D2-186) ส่วน 15 โคลน ที่มีค่าความเหมือนระหว่าง 90-97% คือ *Clostridiaceae bacterium* (3D1-8), *Desulfovibrio desulfuricans* (3D1-37), *Acidithiobacillus caldus* (3D2-4, 3D2-173), *Rhodobacter sphaeroides* (3D2-42), *Clostridium saccharolyticum* (3D1-106, 3D1-125), *Thiothrix* sp. (3D1-124, 3D2-45), *Ruminococcus gnavus* (3D2-171, 3D2-172) *Streptococcus parauberis* (3D2-37), *Neisseria canis* (3D1-104) และ *Planctomyces brasiliensis* (3D2-122) และ อีก 4 โคลน ที่มีค่าความเหมือนน้อยกว่า 90% คือ *Synergistes* sp. (3D1-36), *Frigovirgula* sp. (3D2-187), *Clostridiales bacterium* (3D2-121) และ *Rhodobacter sphaeroides* (3D2-166) ใน แบคทีเรีย uncultured จำนวน 28 โคลน พบว่ามีค่าความเหมือนมากกว่า 97% จำนวน 12 โคลน (3D1-10, 3D1-14, 3D1-31, 3D1-41, 3D1-51, 3D1-56, 3D1-132, 3D2-16, 3D2-49, 3D2-65, 3D2-179 และ 3D2-188) ส่วนที่มีค่าความเหมือนระหว่าง 90-97% จำนวน 13 โคลน (3D1-29, 3D1-38, 3D1-49, 3D1-61, 3D1-68, 3D1-131, 3D2-8, 3D2-25, 3D2-40, 3D2-54, 3D2-59, 3D2-81, 3D2-82 และ 3D2-165) และที่มีค่าความน้อยกว่า 90% จำนวน 3 โคลน (3D1-89, 3D2-35 และ 3D2-131 )

ส่วนในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) ผลการวิเคราะห์เป็นแบคทีเรีย uncultured หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ จำนวน 8 โคลน และแบคทีเรีย cultured หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ จำนวน 43 โคลน โดยพบว่าในจำนวน cultured bacteria 43 โคลน ประกอบด้วย 35 โคลน ที่มีค่าความเหมือนมากกว่า 97% คือ *Thiothrix* sp. (4E1-4, 4E1-4, 4E1-16, 4E1-23, 4E1-28, 4E1-30, 4E1-39, 4E1-40, 4E1-44, 4E1-52, 4E1-57, 4E1-60, 4E2-8, 4E2-9, 4E2-16, 4E2-33, 4E2-37, 4E2-39, 4E2-41, 4E2-50, 4E2-52, 4E2-74, 4E2-77, 4E2-78, 4E2-79, 4E2-80, 4E2-97, 4E2-98, 4E2-105, 4E2-106, 4E2-108, 4E2-122 และ 4E2-126) และ *Rhodobacter gluconicum* (4E2-51) ส่วน 3 โคลน ที่มีค่าความเหมือนระหว่าง 90-97% คือ *Thiothrix* sp. (4E2-35, 4E2-61, 4E2-111) และอีก 5 โคลน ที่มีค่าความเหมือนน้อยกว่า 90% คือ *Brevundimonas* sp. (4E1-26), *Geobacter bemidjiensis* (4E2-12) และ *Thiothrix* sp. (4E2-27, 4E2-52, 4E2-87) ในแบคทีเรีย uncultured จำนวน 8 โคลน พบว่ามีค่าความเหมือนมากกว่า 97% จำนวน 1 โคลน (4E2-96) ส่วนที่มีค่าความเหมือนระหว่าง 90-97% จำนวน 4 โคลน (4E1-1, 4E2-47, 4E2-83 และ 4E2-101) และที่มีค่าความน้อยกว่า 90% จำนวน 3 โคลน (4E1-36, 4E2-4 และ 4E2-113)

**ตาราง 26** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (BLAST) ของลำดับเบสยีนส่วน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการโคลนยีนส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (UASB) (3D)

No	Clone	Length (bp)	Nearest relative	GenBank Accession no.	Similarity (%)
1	3D1-8	1525	<i>Clostridiaceae bacterium</i>	AB298726	92
2	3D1-10	1484	Uncultured <i>Synergistetes bacterium</i>	CU926135	98
3	3D1-14	1522	Uncultured <i>Firmicutes bacterium</i>	CU918169	99
4	3D1-29	1551	Uncultured <i>Firmicutes bacterium</i>	CU925907	92
5	3D1-31	1490	Uncultured bacterium	AB494323	98
6	3D1-36	769	<i>Synergistes</i> sp.	EU476081	86
7	3D1-37	1579	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DQ092636	94
8	3D1-38	1183	Uncultured <i>Dokdonella</i> sp.	JN679149	92
9	3D1-41	1080	Uncultured <i>Streptococcus</i> sp.	AM157443	99
10	3D1-43	1477	<i>Rhodobacter gluconicum</i>	AB077986	99
11	3D1-49	1532	Uncultured bacterium	EU234171	92
12	3D1-51	1529	Uncultured <i>Synergistetes bacterium</i>	CU926135	99
13	3D1-56	1500	Uncultured <i>Synergistetes bacterium</i>	CU926135	99
14	3D1-59	1541	Uncultured bacterium	GQ897706	95
15	3D1-61	1500	Uncultured <i>Synergistetes bacterium</i>	CU920256	95
16	3D1-68	1522	Uncultured <i>Synergistetes bacterium</i>	CU926135	99
17	3D1-89	1534	<i>Porphyromonas</i> sp.	EU012301	90
18	3D1-104	1529	<i>Neisseria canis</i>	JN713302	97
19	3D1-106	1571	<i>Clostridium saccharolyticum</i>	CP002109	95
20	3D1-124	1461	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	90
21	3D1-125	1541	<i>Clostridium saccharolyticum</i>	CP002109	95
22	3D1-131	1501	Uncultured <i>Synergistetes bacterium</i>	CU926135	99
23	3D1-132	1481	Uncultured <i>Synergistetes bacterium</i>	CU926135	99
24	3D2-4	801	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	EU421841	95
25	3D2-8	1519	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i>	JQ624286	97
26	3D2-16	1544	Uncultured bacterium	JN245694	99
27	3D2-19	1544	<i>Peptostreptococcaceae bacterium</i>	AB377177	98

ตาราง 26 (ต่อ)

No	Clone	Length (bp)	Nearest relative	GenBank Accession no.	Similarity (%)
28	3D2-25	1522	Uncultured <i>Firmicutes bacterium</i>	GQ468574	90
29	3D2-27	1503	<i>Dokdonella</i> sp.	FJ455531	98
30	3D2-35	1035	Uncultured <i>Synergistetes bacterium</i>	CU918687	89
31	3D2-37	1560	<i>Streptococcus parauberis</i>	CP002471	94
32	3D2-40	1545	Uncultured <i>Deferribacteres bacterium</i>	HQ183983	93
33	3D2-42	706	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CP000661	92
34	3D2-45	1515	<i>Thiothrix</i> sp	AB042537	93
35	3D2-49	1589	Uncultured <i>Desulfovibrionaceae bacterium</i>	AB218349	99
36	3D2-54	1496	Uncultured rumen bacterium	AB270048	91
37	3D2-59	1299	Uncultured bacterium	AY854300	90
38	3D2-65	1567	Uncultured <i>Clostridiales bacterium</i>	AB721397	99
39	3D2-76	1534	<i>Streptococcus henryi</i>	NR_044189	99
40	3D2-81	1513	Uncultured <i>Actinomycetaceae bacterium</i>	FJ542912	95
41	3D2-82	1516	Uncultured <i>Actinomycetaceae bacterium</i>	FJ542912	95
42	3D2-121	1533	<i>Clostridiales bacterium</i>	JN713382	85
43	3D2-122	1444	<i>Planctomyces brasiliensis</i>	NR_074297	92
44	3D2-127	1474	<i>Peptostreptococcus russellii</i>	AY167963	99
45	3D2-131	1495	Uncultured bacterium	AY858461	89
46	3D2-149	1514	<i>Streptococcus parauberis</i>	NR_102798	99
47	3D2-165	1488	Uncultured <i>Fusobacteria bacterium</i>	CU921109	94
48	3D2-166	828	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CP000143	85
49	3D2-171	1489	<i>Ruminococcus gnavus</i>	NR_036800	96
50	3D2-172	1571	[ <i>Ruminococcus</i> ] <i>gnavus</i>	JN713312	91
51	3D2-173	771	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	EU421841	95
52	3D2-179	1496	Uncultured <i>Synergistetes bacterium</i>	CU926135	99
53	3D2-186	1520	<i>Neisseria</i> sp.	AJ586614	99
54	3D2-187	1262	<i>Frigovirgula</i> sp.	JN713196	87
55	3D2-188	1521	Uncultured bacterium	JX27754	99

ตาราง 27 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (BLAST) ของลำดับเบสยีนส่วน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการโคลนยีนส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E)

No	Clone	Length (bp)	Nearest relative	GenBank Accession no.	Similarity (%)
1	4E1-1	1572	Uncultured <i>Verrucomicrobiales bacterium</i>	GQ406197	91
2	4E1-4	1521	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
3	4E1-5	1710	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
4	4E1-16	1510	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
5	4E1-23	1461	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
6	4E1-26	1432	<i>Brevundimonas</i> sp.	GQ495029	89
7	4E1-28	1463	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
8	4E1-30	1514	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
9	4E1-36	1036	Uncultured <i>Clostridia bacterium</i>	JN173109	88
10	4E1-39	1513	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
11	4E1-40	1504	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
12	4E1-44	1460	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
13	4E1-52	1466	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
14	4E1-57	1536	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
15	4E1-60	1506	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
16	4E1-79	1527	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042538	99
17	4E2-4	1145	Uncultured <i>Rhodobacteraceae bacterium</i>	JN625692	86
18	4E2-8	1425	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
19	4E2-9	1514	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
20	4E2-12	1565	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	NR_075007	87
21	4E2-16	1511	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
22	4E2-27	1493	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	86
23	4E2-33	1524	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
24	4E2-35	1451	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042538	92
25	4E2-37	1534	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
26	4E2-39	1513	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
27	4E2-41	1501	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99

ตาราง 27 (ต่อ)

No	Clone	Length (bp)	Nearest relative	GenBank Accession no.	Similarity (%)
28	4E2-47	1322	Uncultured <i>Thauera</i> sp.	HQ132466	91
29	4E2-50	1525	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
30	4E2-51	1465	<i>Rhodobacter gluconicum</i>	AB077986	99
31	4E2-52	1047	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	85
32	4E2-57	1524	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
33	4E2-61	1548	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	97
34	4E2-74	1442	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
35	4E2-77	1494	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
36	4E2-78	1407	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
37	4E2-79	1464	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
38	4E2-80	1447	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
39	4E2-83	1522	Uncultured <i>Chlorobi bacterium</i>	JN679178	97
40	4E2-96	1495	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i>	JQ624337	98
41	4E2-87	1074	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	85
42	4E2-97	1526	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
43	4E2-98	1476	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
44	4E2-105	1478	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
45	4E2-106	1461	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
46	4E2-108	1485	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
47	4E2-101	1501	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i>	FM253640	97
48	4E2-111	1528	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	91
49	4E2-113	1283	Uncultured <i>Dokdonella</i> sp.	JF808755	88
50	4E2-122	1524	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99
51	4E2-126	1510	<i>Thiothrix</i> sp.	AB042537	99

### 3. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (UASB) (3D) และระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E)

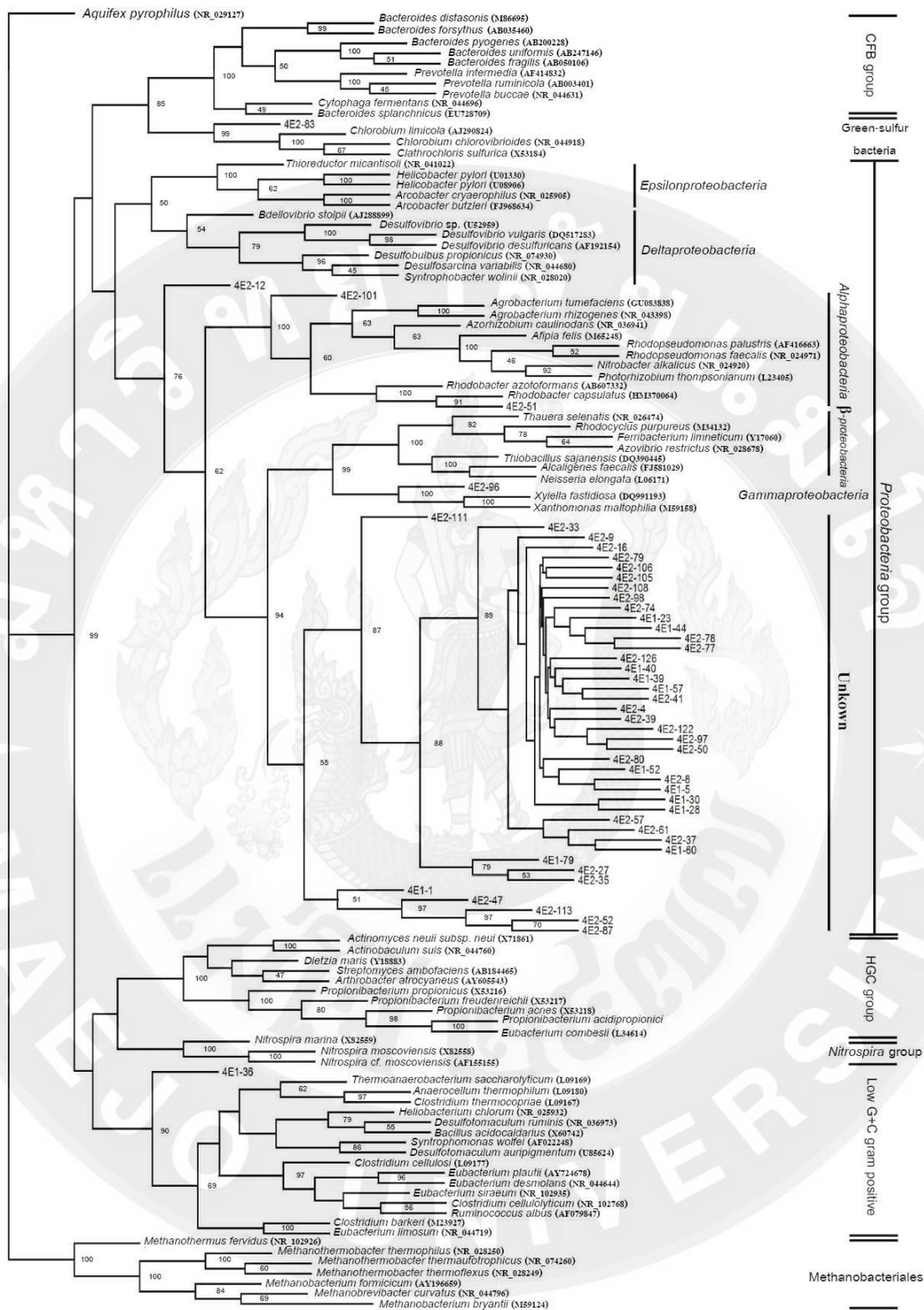
จากผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสส่วน 16S rRNA ยีนของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (3D) จำนวน 55 โคลน และลำดับเบสส่วน 16S rRNA ยีนของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) จำนวน 51 โคลน กับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าในระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 2 แบบ พบเชื้อแบคทีเรีย uncultured และ cultured ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการศึกษาแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมโดยตรงโดยปราศจากการเพาะเลี้ยงและการใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนเป้าหมายหรือยีน 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA) ทำให้ได้แบคทีเรีย uncultured หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไม่ได้เกิดขึ้น และการใช้ phylogenetic tree ในการศึกษาวิวัฒนาการความสัมพันธ์ของแบคทีเรียจึงเป็นสิ่งสำคัญในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียโดยสร้าง phylogenetic tree เพื่อทำการจัดกลุ่มของแบคทีเรีย โดยใช้ลำดับเบสที่นำมาจาก GenBank ที่ทราบชนิดแล้ว โดยแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่ส่วนใหญ่พบในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (3D) จะใช้ลำดับเบสที่มาจาก GenBank จำนวน 113 ชนิด พร้อมกับ 55 โคลนที่ได้ และในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) จะใช้ลำดับเบสที่มาจาก GenBank จำนวน 81 ชนิด พร้อมกับ 51 โคลนที่ได้ การทำ phylogenetic tree ทำให้เราทราบวิวัฒนาการความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันหรือมีวิวัฒนาการร่วมกัน จึงทำให้ทราบแบคทีเรีย uncultured ที่ได้มีความใกล้เคียงกันกับแบคทีเรียชนิดไหน มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียชนิดไหน และจัดอยู่กับแบคทีเรียในกลุ่มอะไร ซึ่งผลการทำ phylogenetic tree ของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (3D) แสดงในภาพ 14 และ แบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) แสดงในภาพ 15

จากผลการทำ phylogenetic tree ของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (3D) ดังภาพ 14 พบว่าเมื่อใช้เชื้อแบคทีเรีย *Aquifex pyrophilus* เป็น out-group ในการสร้าง tree และหาเปอร์เซ็นต์บน branch จากการทำ 1,000 bootstrap trees สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (3D) ได้เป็น 7 กลุ่ม โดยพบว่าแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (3D) ประกอบด้วยกลุ่มใหญ่ 3 กลุ่มคือ Low G+C Gram-positive bacteria (LGC GPB) เป็นจำนวน 41% ของโคลนทั้งหมด กลุ่ม *Synergister* เป็นจำนวน 31% ของโคลนทั้งหมด และกลุ่ม *Proteobacteria* จำนวน 16% ของโคลนทั้งหมด และแบคทีเรียกลุ่มย่อย 4 กลุ่มคือ High G+C Gram-positive bacteria (HGC) เป็นจำนวน 4% ของโคลนทั้งหมด,

*Planctomycete* เป็นจำนวน 2% ของโคลนทั้งหมด, *Cytophage-Flexibacter-Bacteroides* เป็นจำนวน 2% ของโคลนทั้งหมด และ Unkown Bacteria เป็นจำนวน 4% ของโคลนทั้งหมด ดังสรุปในตาราง 28

ส่วนผลการทำ phylogenetic tree ของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) ดังภาพ 15 พบว่าเมื่อใช้เชื้อแบคทีเรีย *Aquifex pyrophilus* เป็น out-group ในการสร้าง tree และหาเปอร์เซ็นต์บน branch จากการทำ 1,000 bootstrap trees สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) ได้เป็น 3 กลุ่ม โดยพบว่าแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) ประกอบด้วยกลุ่มใหญ่ 1 กลุ่มคือ *Proteobacteria* จำนวน 96% ของโคลนทั้งหมด และแบคทีเรียกลุ่มย่อย 2 กลุ่มคือ Low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB) เป็นจำนวน 2% ของโคลนทั้งหมด และ Green-Sulfur bacteria เป็นจำนวน 2% ของโคลนทั้งหมด ดังสรุปในตาราง 29





ภาพ 15 Phylogenetic tree ของลำดับเบส 16S rRNA ยีนที่ได้จากการโคลนนิ่งของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (4E) โดยใช้ *Aquifex pyrophilus* เป็น out-group ในการตรึงรากและตัวเลขที่จุดร่วม (nodes) ของ tree แสดง % ความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้าง tree ด้วย bootstrap test จำนวน 1000 ครั้ง

ตาราง 28 การกระจายตัวของยีนส่วน 16S rRNA ที่ได้จากการโคลนนิ่งของแบคทีเรียในระบบ  
บำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ (3D)

Items	Clone	
	No. of clone	% Total clone
<b>Similarity</b>		
≥ 97%	19	35
(cultured bacteria 7 clone, uncultured bacteria 12 clone)		
90–97%	29	52
(cultured bacteria 15 clone, uncultured bacteria 14 clone)		
< 90%	7	13
(cultured bacteria 4 clone, uncultured bacteria 3 clone)		
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100</b>
<b>1. Low G+C Gram-positive Bacteria (LGCGPB)</b>	<b>22</b>	<b>41%</b>
≥ 97%	4	8
(3D2-19, 3D2-76, 3D2-127, 3D2-149)		
90–97%	7	13
(3D1-8, 3D1-106, 3D2-37, 3D2-45, 3D1-125, 3D2-171, 3D2-172)		
< 90%	1	2
(3D2-121)		
<b>Uncultured groups</b>	10	18
(3D1-14, 3D1-29, 3D1-41, 3D1-59, 3D2-16, 3D2-25, 3D2-54, 3D2-65, 3D2-165, 3D2-188)		
<b>2. Synergister bacteria group</b>	<b>16</b>	<b>31</b>
90–97%	1	2
(3D1-124)		
< 90%	2	4
(3D1-36, 3D2-187)		
<b>Uncultured groups</b>	13	25
(3D1-10, 3D1-31, 3D1-51, 3D1-56, 3D1-61, 3D1-68, 3D1-131, 3D1-132, , 3D2-35, 3D2-40, 3D2-59, 3D2-131, 3D2-179)		
<b>3. Proteobacteria</b>	<b>11</b>	<b>16</b>
≥ 97%	3	4
(3D1-43, 3D2-27, 3D2-186)		

ตาราง 28 (ต่อ)

Items	Clone	
	No. of clone	% Total clone
90-97% (3D1-37, 3D1-104, 3D2-42, 3D2-173)	4	6
Uncultured groups (3D1-38, 3D2-8, 3D1-49, 3D2-49)	4	6
4. High G+C Gram-positive bacteria (HGC) Uncultured groups (3D2-81, 3D2-82)	2	4
5. <i>Planctomycete</i> 90-97% (3D2-122)	1	2
6. <i>Cytophage-Flexibacter-Bacteroides</i> 90-97% (3D1-89)	1	2
7. Unkown Bacteria 90-97% (3D2-4) <90% (3D2-166)	2 1 1	4 2 2
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100</b>

จากตาราง 28 พบว่าแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่เติมอากาศ (3D) ประกอบด้วยกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 Low G + C Gram-positive bacteria ซึ่งประกอบด้วย uncultured bacteria 10 โคลน และ cultured bacteria 12 โคลน ที่ประกอบไปด้วยแบคทีเรียชนิด *Clostridiaceae bacterium* (3D1-8), *Clostridium saccharolyticum* (3D1-106, 3D1-125), *Peptostreptococcaceae bacterium* (3D2-19), *Streptococcus parauberis* (3D2-37), *Streptococcus henryi* (3D2-76), *Clostridiales bacterium* (3D2-121), *Peptostreptococcus russellii* (3D2-127), *Streptococcus parauberis* (3D2-149), *Ruminococcus gnavus* (3D2-171, 3D2-172) ในแบคทีเรียกลุ่ม 2 *Synergister bacteria group* พบ uncultured bacteria 13 โคลน และ cultured bacteria 3 โคลน ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิด *Synergistes sp* ในแบคทีเรียกลุ่มที่ 3 *Proteobacteria* พบ uncultured bacteria 4 โคลน และ cultured bacteria 7 โคลน ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิด *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* และ *Epsilonproteobacteria* และนอกจากนี้ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่เติมอากาศยังพบแบคทีเรียกลุ่ม High G+C Gram-positive bacteria (HGC), *Planctomycete*, *Cytophage-Flexibacter-Bacteroides* และ Unkown bacteria ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าในปี 1998 Yuji และคณะ ได้รายงานความหลากหลายของแบคทีเรีย mesophilic และ thermophilic ในระบบ USAB โดยใช้

ลำดับเบส 16S rRNA ในการศึกษา ได้พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มของ mesophilic ในระบบ USAB ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย *Proteobacteria* (27%) ชนิด Deltaproteobacteria เป็นส่วนใหญ่ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะเป็นแบคทีเรียที่ทำหน้าที่เป็น syntrophic bacteria และ sulfate-reducing bacteria ส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม thermophilic จะประกอบด้วยแบคทีเรีย *Thermodesulfovibrio* group, green non-sulfur bacteria และ low G+C Gram-positive bacteria ตามลำดับ

จากคู่มือวิชาการระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนของกรมมลพิษ กล่าวว่าแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ ประกอบด้วย แบคทีเรียสร้างกรดไขมันระเหย (Acidogenic Bacteria) แบคทีเรียสร้างกรดอะซิติก (Acetogenic Bacteria) แบคทีเรียที่สร้างมีเทน (Methanogenesis Bacteria) และแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต (Sulfate Reducing Bacteria, SRB) ดังนั้นจากการศึกษาแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (USAB) ครั้งนี้จึงพบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 **Low G + C Gram-positive bacteria** ที่พบเป็นกลุ่มใหญ่จำนวน 41% ของโคลนทั้งหมดเป็นแบคทีเรียที่ทำหน้าที่สร้างกรดไขมันระเหย (Acidogenic Bacteria) ทำหน้าที่ผลิตเอโนไซม์ออกมาย่อยสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน, ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ให้เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเพื่อที่เซลล์สามารถดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ และนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยสร้างกรด และแอลกอฮอล์ได้จากการหมัก (Fermentation) กรดไขมัน (Fatty acids monosaccharides) และกรดอะมิโน (Amino acids) เช่น กรดบิวทิริก กรดอะซิติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจน เอทานอล บิวทานอล อะซิโตน เป็นต้น และนอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่ม Low G + C Gram-positive bacteria ยังเป็นแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติก (Acetogenic Bacteria) ซึ่งเมื่อผลผลิตจากแบคทีเรียสร้างกรดมีหลายชนิดดังที่กล่าว และบางชนิดยังเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่แบคทีเรียสร้างมีเทนไม่สามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารได้ ดังนั้น จึงต้องมีการเปลี่ยนสารเหล่านั้นให้กลายเป็นสารอาหารอย่างง่ายสำหรับแบคทีเรียที่สร้างมีเทน ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียพวก *Clostridium* ซึ่งแบคทีเรียพวก *Clostridium* มีอยู่ทั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดทั่วไป (Acidogenic Bacteria) และกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก (Acetogenic Bacteria) ส่วนแบคทีเรียกลุ่มที่ 2 **Synergister** จำนวน 31% ของโคลนทั้งหมด ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ก็มีความสำคัญในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งปกติจะพบแบคทีเรียกลุ่มนี้โดยทั่วไปในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เป็น anaerobic bacteria Gram-negative ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย sludge ได้ก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งมีความสำคัญต่อการผลิตก๊าซมีเทนต่อไป (Riviere et al., 2009) และกลุ่มที่ 3 **Proteobacteria** จำนวน 16% ของโคลนทั้งหมด ก็เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญเนื่องจาก *Proteobacteria* เป็นแบคทีเรีย ทำหน้าที่เป็น syntrophic bacteria และ sulfate-reducing bacteria (Yuji et al., 1998) ซึ่งแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตเป็นแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจนชนิดเค็ดขาด

ต้องการสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียชนิดเคโมเฮเทอโรโทรฟ (Chemoheterotroph) ดำรงชีพและเจริญเติบโตโดยได้รับพลังงานจากปฏิกิริยาทางเคมีในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและสารให้อิเล็กตรอน เช่น กรดไขมันระเหยหรือแอลกอฮอล์ ลักษณะเด่นของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ การใช้สารประกอบอนินทรีย์ของซัลเฟอร์บางชนิดเช่น ซัลเฟต,ซัลไฟด์ หรือ ไฮโอซัลเฟต เป็นสารรับอิเล็กตรอนในการย่อยสลายสารอาหาร แล้วเปลี่ยนสารประกอบซัลเฟอร์นั้นให้อยู่ในรูปซัลไฟด์แทน ผลผลิตที่สำคัญคือก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนเช่นเดียวกับขั้นตอนการสร้างมีเทน ดังนั้นจึงมักพบแบคทีเรียชนิดนี้ร่วมกับแบคทีเรียสร้างกรดและแบคทีเรียสร้างมีเทนในระบบไม่ใช้ออกซิเจนที่ใช้บำบัดน้ำเสียที่มีซัลเฟต ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียหลายกลุ่มดังที่กล่าวมามีทั้งการพึ่งพาอาศัย และการแข่งขันระหว่างกัน นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มย่อยที่พบคือ High G+C Gram-positive bacteria (HGC), *Planctomycete*, *Cytophage-Flexibacter-Bacteroides* และ Unknowm bacteria แม้จะพบเป็นส่วนน้อยแต่แบคทีเรียเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Hydrolytic bacteria

แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบแบคทีเรียในกลุ่มของ Methanogenic bacteria อาจเป็นเพราะเนื่องจากการเก็บตัวอย่างของน้ำเสียไม่ได้เก็บรักษาไว้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน 100% และในการทดลองไม่ได้ทำในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน 100% จึงทำให้ออกซิเจนปนเปื้อนเข้าไปในตัวอย่าง ทำให้แบคทีเรียในกลุ่มของ Methanogenic bacteria เซลล์แตกจึงทำให้ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอตั้งแต่ขั้นตอนแรกได้ เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มของ Methanogenic bacteria เป็นแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทนจะเป็นแบคทีเรียประเภทเค็ดขาด (ที่ไม่อาจทนต่อออกซิเจนได้แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย) แบคทีเรียพวกนี้จะเจริญเติบโตช้า และเลือกชนิดของอาหารมาก ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำงานวิจัยไปต่อยอดในการศึกษาแบคทีเรียที่มีบทบาทหน้าที่สำคัญในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่เติมอากาศได้ โดยทำการออกแบบ 16S rDNA probe เพื่อติดตามกลุ่มแบคทีเรียที่เราสนใจที่มีอยู่จริงในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่เติมอากาศได้ เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการบำบัดน้ำเสียหรือการผลิตก๊าซชีวภาพได้

ตาราง 29 การกระจายตัวของยีนส่วน 16S rRNA ที่ได้จากการโคลนนิ่งของแบคทีเรียในระบบ  
บำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (4E)

Items	Clone	
	No. of clone	% Total clone
<b>Similarity</b>		
≥ 97%	36	70
(cultured bacteria 35 clone, uncultured bacteria 1 clone)		
90–97%	7	14
(cultured bacteria 3 clone, uncultured bacteria 4 clone)		
< 90%	8	16
(cultured bacteria 5 clone, uncultured bacteria 3 clone)		
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>100</b>
<b>1. <i>Proteobacteria</i></b>	<b>49</b>	<b>96</b>
≥ 97%	35	69
(4E1-4, 4E1-5, 4E1-16, 4E1-23, 4E1-28, 4E1-30, 4E1-39, 4E1-40, 4E1-44, 4E1-52, 4E1-57, 4E1-60, 4E1-79, 4E2-8, 4E2-9, 4E2-16, 4E2-37, 4E2-39, 4E2-41, 4E2-50, 4E2-51 4E2-33, 4E2-57, 4E2-74, 4E2-77, 4E2-78, 4E2-79, 4E2-97, 4E2-80, 4E2-98, 4E2-105, 4E2-106, 4E2-108, 4E2-122, 4E2-126)		
90–97%	3	6
(4E2-35, 4E2-61, 4E2-111)		
< 90%	5	10
(4E2-12, 4E2-26, 4E2-27, 4E2-52, 4E2-87)		
Uncultured groups	6	12
(4E1-1, 4E2-4, 4E2-47, 4E2-96, 4E2-101, 4E2-113)		
<b>2. Low G+C Gram-positive Bacteria (LGCGPB)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Uncultured groups (4E1-36)		
<b>3. <i>Green-sulfur bacteria</i></b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Uncultured groups (4E2-83)		
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>100</b>

จากตาราง 29 แบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน (4E) พบว่าแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเดิมอากาศ ประกอบด้วยกลุ่มใหญ่ 1 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 *Proteobacteria* ซึ่งประกอบด้วย uncultured bacteria 6 โคลน และ cultured bacteria 43 โคลนที่ประกอบไปด้วยแบคทีเรียชนิด *Geobacter bemidjiensis*, *Rhodobacter gluconicum* และ *Thiothrix sp.* เป็นส่วนใหญ่ การพบแบคทีเรียในกลุ่มของ *proteobacteria* ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเดิมอากาศเป็นส่วนใหญ่อาจเป็นเพราะเนื่องจาก *proteobacteria* เป็น facultatively หรือ obligately anaerobic bacteria ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและสารให้อิเล็กตรอน เช่น กรดไขมันระเหยหรือแอลกอฮอล์ แบคทีเรียกลุ่มใช้สารประกอบอนินทรีย์ของซัลเฟอร์บางชนิดเช่น ซัลเฟต, ซัลไฟด์ หรือไทโอซัลเฟต เป็นสารรับอิเล็กตรอนในการย่อยสลายสารอาหาร แล้วเปลี่ยนสารประกอบซัลเฟตนั้นให้อยู่ในรูปซัลไฟด์แทน และนอกจากนี้ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเดิมอากาศยังพบแบคทีเรียกลุ่ม **Low G+C Gram-positive Bacteria (LGCGPB)** ซึ่งมีหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่หลงเหลือจากบ่อไม่เดิมอากาศ และยังพบแบคทีเรียกลุ่ม *Green-sulfur bacteria* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็น obligately anaerobic photoautotrophic bacteria หรือแบคทีเรียสังเคราะห์แสง พบทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ และยังพบตามแหล่งน้ำเสียและบ่อบำบัดน้ำเสีย มีบทบาทสำคัญในการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ และการตรึงไนโตรเจน (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ) นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารประกอบซัลเฟอร์ ซัลไฟด์ และไทโอซัลเฟต เป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อรีดิวส์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีแสงได้ และยังเป็นตัวให้อิเล็กตรอนต่อพืชในน้ำเพื่อผลิตออกซิเจนได้ (Bryant and Frigaard, 2006)

## สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาข้อมูลจากพารามิเตอร์คุณภาพของน้ำเสียบีโอดี ซีโอดี ทีเคเอ็น ฟอสฟอรัส ทั้งหมด ไขมันและน้ำมัน ของแฉังแขวนลอย จากการบำบัดขั้นต้น (Primary treatment) ด้วย ตะแกรงคัดขยะ/บ่อดักไขมัน และผ่านระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบ UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) ก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง ของน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ 1 พบว่า ประสิทธิภาพการบำบัดของแฉังแขวนลอย (SS) มีประสิทธิภาพการบำบัดน้อยมากเฉลี่ย เป็น 10.13 % ยกเว้นในเดือนที่ 3 พบว่าสูงถึง 44.09 % ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพการบำบัดของ พารามิเตอร์ตัวอื่นๆที่สามารถบำบัดได้สูงด้วยเช่นกัน เช่น ประสิทธิภาพการบำบัดบีโอดีสามารถ บำบัดได้ถึง 27.93% ,ประสิทธิภาพการบำบัดซีโอดีบำบัดได้สูงถึง 50.00 % ส่วนประสิทธิภาพการ บำบัดไนโตรเจนในรูปทีเคเอ็น อยู่ในเกณฑ์ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์การบำบัดใน ไตรเจนของ ระบบบำบัดขั้นต้นที่สามารถบำบัดได้ 15 % อุตสาหกรรมที่ 2 จากการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการ บำบัดของเดือนที่ 1 และ 2 มีประสิทธิภาพการบำบัดต่ำในทุกพารามิเตอร์โดยบำบัดตะกอน แฉวนลอยได้เพียง 7.23 % ซึ่งเกณฑ์การบำบัดตะกอนแขวนลอยของระบบบำบัดขั้นต้นนั้นควร บำบัดได้ประมาณ 40-60 % ประสิทธิภาพการบำบัดบีโอดี ,ไนโตรเจนในรูปทีเคเอ็นเป็นลบทั้งสอง ครั้ง ยกเว้นครั้งที่ 3 และ 4 ประสิทธิภาพการบำบัดในทุกพารามิเตอร์อยู่ในเกณฑ์ที่ดีโดยเฉพาะบีโ อดี สามารถบำบัดได้สูงเฉลี่ยเป็น 72.72% เนื่องจากสามารถบำบัดตะกอนแขวนลอยได้สูงถึง 65.54 % และ 62.46 % จึงทำให้มีปริมาณสารอินทรีย์ลดลงอุตสาหกรรมที่ 3 พบว่าระบบบำบัดของ อุตสาหกรรมมีประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ดี สามารถบำบัดบีโอดี, ซีโอดี, ของแฉังแขวนลอย ทีเคเอ็น และ ฟอสเฟตทั้งหมด ได้สูงโดยมีประสิทธิภาพในการบำบัดเฉลี่ยเป็น 42.43, 46.05, 71.72, 36.90, 39.1% ตามลำดับ สำหรับประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันสามารถบำบัดได้สูงในครั้งที่ 3 เป็น 60.92 % ซึ่งจากผลการศึกษาสามารถอธิบายได้ว่า เมื่อประสิทธิภาพการบำบัดของแฉัง แหวนลอยสูงทำให้สามารถบำบัดสารอินทรีย์ประเภทอื่น ได้ดีตามไปด้วย ทั้งนี้เนื่องจากตะกอน แหวนลอย 70 % นั้นเป็นสารอินทรีย์ร่วมกับ ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส

จากผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากน้ำเสียในระบบน้ำเสียโดยการ ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล โดยนำตัวอย่างแบคทีเรียที่เก็บจากน้ำเสียในระบบบำบัดน้ำเสียแบ่ง ออกเป็นสองระบบคือ ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (UASB) และระบบบำบัดน้ำเสีย แบบใช้ออกซิเจนซึ่งของอุตสาหกรรมที่ 1 และ 2 เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง และน้ำเสีย จากบ่อ แอน็อกซิกและบ่อแอโรบิกของอุตสาหกรรมที่ 3 ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

ที่มีการบำบัดสารในโตรเจน อย่างละ 3 ชั่วโมง นำมาผสมรวมกัน แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณยีนด้วย 16S rRNA ยีนด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำมาทำการโคลนยีนส่วน 16S rRNA ในเชื้อ *E.coli* จากผลการโคลนและทำการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening) พบว่าสามารถโคลนยีนส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (UASB) จำนวนทั้งสิ้น 116 โคลน และจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจนจำนวนทั้งสิ้น 56 โคลน

