



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยออโตโทรฟิก แบคทีเรีย จากน้ำทิ้งยูเอสบี

Hydrogen Sulfide Removal by Autotrophic Bacteria from UASB Effluent

نامผู้วิจัย นางสาววลัยลักษณ์ ดวงประสพสุข

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ภัชราภรณ์ สุวรรณวิทยา, M.App.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สุชาติ เหลืองประเสริฐ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มงคล คำรงค์ศรี, Dr.Ing.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยออโตโทรฟิก แบคทีเรีย จากน้ำทิ้งยูเอสบี

Hydrogen Sulfide Removal by Autotrophic Bacteria from UASB Effluent

โดย

นางสาววลัยลักษณ์ ดวงประสพสุข

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วลัยลักษณ์ ดวงประสพสุข 2553: การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยออกโตโทรฟิค
แบคทีเรีย จากน้ำทิ้งยูเอสบี ปรินญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
(วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม) สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ภัชราภรณ์ สุวรรณวิทยา,
M.App.Sc. 89 หน้า

การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในก๊าซชีวภาพที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นกระบวนการทาง
เคมี ซึ่งมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง กระบวนการทางชีวภาพที่เปลี่ยนก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ไปอยู่ในรูป
ที่เป็นพิษน้อยลงจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ แบคทีเรียหลายประเภททั้งที่เป็น Autotrophic และ
Heterotrophic สามารถใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในการเจริญได้ ใน UASB effluent มีจุลินทรีย์
หลายประเภทอาศัยอยู่ด้วยกัน รวมทั้งกลุ่มที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วย เช่น *Thiobacillus* sp.

ในงานวิจัยนี้ใช้ UASB effluent ของโรงงานอาหาร ซึ่งมีประชากร *Thiobacillus*
denitrificans 1.4×10^4 MPN/100 มล. และ *Thiobacillus thioparus* 9.2×10^4 MPN/100 มล. อัตรา
การเจริญจำเพาะของ *Thiobacillus thioparus* ในอาหาร *Thiobacillus* medium มีค่า 0.258 ต่อวัน
สูงกว่า 0.078 ต่อวัน ของ *Thiobacillus denitrificans* ในอาหาร *Thiobacillus denitrificans* medium
เชื้อทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้ดีบนตัวกลางลูกบอลพลาสติกในคอลัมน์โปรยกรอง

ในชุดการทดลองในคอลัมน์ที่แทนที่ไรโอซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยก๊าซ
ไฮโดรเจนซัลไฟด์ พบว่าในคอลัมน์ควบคุม (ปราศจากเชื้อ) ของอาหารทั้ง 2 ชนิดก๊าซ
ไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ออกจากคอลัมน์ลดลง ร้อยละ 30 โดยที่ละลายออกมาในน้ำทิ้ง ร้อยละ 15
ส่วนในคอลัมน์ที่มีเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* กำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ร้อยละ 44-68
และ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *Thiobacillus thioparus* กำจัดได้ร้อยละ 60-82 ทั้งนี้ร้อยละ 8.89 และ 8.85
ของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ถูกกำจัดละลายอยู่ในน้ำทิ้ง โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เชื้อสามารถ
กำจัดได้คือ 1380 มก./ล. และ 2700 มก./ล. ตามลำดับ

Walailuk Doungprasopsuk 2010: Hydrogen Sulfide Removal by Autotrophic Bacteria from UASB Effluent. Master of Engineering (Environmental Engineering),
Major Field: Environmental Engineering, Department of Environmental Engineering.
Thesis Advisor: Associate Professor Patcharaporn Suwanvitaya, M.App.Sc. 89 pages.

Removal of hydrogen sulfide from biogas is commonly achieved by costly chemical process. Biological process that changes the gas into other less toxic forms is an interesting alternative. Many types of microorganisms, either autotrophic or heterotrophic, are capable of utilizing hydrogen sulfide for their growth. UASB effluent contains mixed cultures of these microorganism including *Thiobacillus* sp.

In this study, UASB effluent of food factory was used. It was found to contain 1.4×10^4 MPN/100ml of *Thiobacillus denitrificans* and 9.2×10^4 MPN/100ml *Thiobacillus thioparus*. Specific growth rate of *Thiobacillus thioparus* in *Thiobacillus* medium was found to be 0.258 d^{-1} , higher than 0.078 d^{-1} of *Thiobacillus denitrificans* in *Thiobacillus denitrificans* medium. Both isolates grew well on bioballs in biofilter column.

In biotrickling filter column experiment with hydrogen sulfide replacing sodium thiosulfate in the culture media, 30% H_2S was reduced in abiotic column with 15% found in the effluent. Higher removal percentage was achieved by inoculated column 44-68% by *Thiobacillus denitrificans* and 60-82% by *Thiobacillus thioparus*. It was also found that 8.89 and 8.85 % dissolved in the effluent. The highest concentration of H_2S with the highest removal were 1380 mg/L and 2700mg/L respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ภัชราภรณ์ สุวรรณวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ให้คำปรึกษาในการเรียน วางแผนการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนหาทุนสนับสนุนงานวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สุชาติ เหลืองประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธรรมรัตน์ กุตตะเทพ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ และขอขอบคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโททุกคนที่ได้สนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ได้อบรม ให้กำลังใจและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

วลัยลักษณ์ ดวงประสพสุข

เมษายน 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	28
อุปกรณ์	28
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	37
สรุปและข้อเสนอแนะ	49
สรุป	49
ข้อเสนอแนะ	50
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	51
ภาคผนวก	55
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	56
ภาคผนวก ข ผลการทดลอง	59
ภาคผนวก ค วิเคราะห์	76
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	89

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ	4
2	คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide)	12
3	ความสามารถในการละลายน้ำของไฮโดรเจนซัลไฟด์	12
4	ระดับความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์กับผลกระทบทางสรีรวิทยา	13
5	ลักษณะสมบัติที่ใช้วิเคราะห์ UASB effluent	31
6	ลักษณะสมบัติของ UASB effluent	37
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเชื้อที่เจริญในอาหาร Thiobacillus medium และ Thiobacillus denitrificans medium กับ เชื้อ T _{denitrificans} และ เชื้อ T _{thioparus}	39
ตารางผนวกที่		
ข1	ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นมาตรฐานของ SO ₄ ²⁻ ด้วย spectrophotometer ที่ 420 nm	60
ข2	การเปลี่ยนแปลงในอาหาร Thiobacillus medium ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ	61
ข3	การเปลี่ยนแปลงในอาหาร Thiobacillus denitrificans medium ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ	61
ข4	การเปลี่ยนแปลงในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ เมื่อแทนที่ไรโอซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiobacillus medium ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	62
ข5	การเปลี่ยนแปลงในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ เมื่อแทนที่ไรโอซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiobacillus denitrificans medium ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	64
ข6	การเปลี่ยนแปลงในคอลัมน์ที่มีเชื้อ T _{thioparus} เมื่อแทนที่ไรโอซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiobacillus medium ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	66
ข7	การเปลี่ยนแปลงในคอลัมน์ที่มีเชื้อ T _{denitrificans} เมื่อแทนที่ไรโอซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiobacillus denitrificans medium ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข8	การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus</i> medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	70
ข9	การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus denitrificans</i> medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	71
ข10	การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus</i> medium ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ <i>T. thioparus</i> เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	73
ข11	การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus denitrificans</i> medium ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ <i>T. denitrificans</i> เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	74

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ส่วนประกอบของ Upflow Anaerobic Sludge Blanket	6
2 ขั้นตอนการผลิตก๊าซชีวภาพจากระบบบำบัดน้ำเสียไร้อากาศ	8
3 path way การออกซิโดรีดักชันไฟด์ของ <i>T. denitrificans</i>	21
4 รูปแบบคอลัมน์ที่ใช้ในการทดลอง	29
5 ตัวกลางสำหรับแบคทีเรียยีสเคาะ (bioball)	29
6 แสดงระบบที่ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ	30
7 วิธีการศึกษาในงานวิจัย	36
8 ลักษณะเซลล์ของเชื้อที่เจริญบน <i>Thiobacillus denitrificans</i> Agar ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	38
9 ลักษณะเซลล์ของเชื้อที่เจริญบน <i>Thiobacillus</i> Agar ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	38
10 การเปลี่ยนแปลงในอาหาร <i>Thiobacillus denitrificans</i> medium ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ	41
11 การเปลี่ยนแปลงในอาหาร <i>Thiobacillus</i> medium ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ	41
12 ความเข้มข้นไฮโดรเจนซัลไฟด์ของคอลัมน์ไม่มีเชื้อ ที่มีการโปรยกรอง <i>Thiobacillus denitrificans</i> medium กับ <i>Thiobacillus</i> medium	42
13 การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus denitrificans</i> medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ เมื่อแทนที่ไรโอซัลเฟต ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	43
14 การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus</i> medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อเมื่อแทนที่ไรโอซัลเฟต ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	43
15 การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus denitrificans</i> medium เมื่อแทนที่ไรโอซัลเฟต ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ <i>T. denitrificans</i> ₄₂	45
16 การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus</i> medium เมื่อแทนที่ไรโอซัลเฟต ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ <i>T. thioparus</i>	45
17 การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus denitrificans</i> medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus</i> medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	47
19	การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus denitrificans</i> medium ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ <i>T. denitrificans</i> เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	48
20	การเปลี่ยนแปลงของ <i>Thiobacillus</i> medium ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ <i>T. thioparus</i> เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	48
ภาพผนวกที่		
ข1	กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ SO_4^{2-} ที่วัดด้วย spectrophotometer ที่ 420 nm	60

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

UASB	=	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
Eff, Effluent	=	น้ำออกจากระบบ
Inf, Influent	=	น้ำเข้าระบบ
In	=	ก๊าซเข้าระบบ
Out	=	ก๊าซออกจากระบบ
d	=	วัน
mg/L	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
g/L	=	กรัมต่อลิตร
°C	=	องศาเซลเซียส
<i>T_denitrificans</i>	=	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
<i>T_thioparus</i>	=	<i>Thiobacillus thioparus</i>

การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยออโตโทรฟิก แบคทีเรีย จากน้ำทิ้งยูเอเอสบี

Hydrogen Sulfide Removal by Autotrophic Bacteria from UASB Effluent

คำนำ

ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมหลายประเภทนิยมใช้กระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ ซึ่งได้ผลผลิตเป็นก๊าซชีวภาพ สามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทน (renewable energy) เป็นการลดต้นทุนการผลิต กระบวนการบำบัดน้ำเสียที่นิยมใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพ คือกระบวนการยูเอเอสบี (Upflow Anaerobic Sludge Blanket ; UASB) ก๊าซชีวภาพที่ได้จะมีส่วนประกอบของก๊าซมีเทน ร้อยละ 55-65 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 35-45 ก๊าซไนโตรเจน ร้อยละ 0-8 ก๊าซไฮโดรเจน ร้อยละ 0-1 และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ร้อยละ 0-1 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าว แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ ไฮโดรไลติกแบคทีเรีย เฟอโรเมนเตทิฟแบคทีเรีย อะซิโตจีนิคแบคทีเรีย และ เมทาโนจีนิคแบคทีเรีย และมีแบคทีเรียอีกกลุ่มสามารถเจริญได้ถ้าในระบบบำบัดน้ำเสียนั้นมีซัลเฟต หรือซัลไฟต์ปนเปื้อนอยู่ คือ ซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรีย แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายทำให้เจริญเติบโตดีกว่าเมทาโนจีนิคแบคทีเรีย และใช้ซัลเฟต หรือซัลไฟต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เปลี่ยนให้อยู่ในรูปของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งมีผลต่อกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ ทำให้ค่าความร้อนของก๊าซชีวภาพลดลง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการกักตัวของอุปกรณ์ เมื่อหลุดสู่ชั้นบรรยากาศจะถูกออกซิไดซ์เป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์รวมตัวกับไอน้ำในบรรยากาศเกิดการควบแน่นเป็นฝนกรด และเป็นอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์ ดังนั้นก่อนนำก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้มาใช้งานจึงต้องผ่านกระบวนการบำบัดเพื่อให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเหมาะแก่การใช้งานและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

วิธีการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ปนเปื้อนในก๊าซชีวภาพแบ่งได้เป็น 3 วิธี คือ วิธีทางฟิสิกส์ เป็นการกำจัดแหล่งที่ทำให้เกิดสารปนเปื้อน หรือเป็นการเคลื่อนย้ายสารปนเปื้อนที่ถูกสร้างออกมาแล้วออกจากบรรยากาศ เช่น การดูดซับด้วยเอมีน ปฏิกิริยานี้เกิดการผันกลับได้จึงไม่สามารถลดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ วิธีทางเคมี เป็นการใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ เช่น การดูดซับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ วิธีนี้สามารถดูดซับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้มีความเข้มข้นต่ำได้แต่มีผลเสียคือได้ผลิตภัณฑ์ เป็น Na_2S ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการบำบัดสูง ทั้งสองวิธีที่กล่าวมายังมีข้อจำกัดอยู่มากเช่น ไม่สามารถ

นำตัวดูดซับมาใช้ใหม่ได้ ตัวดูดซับที่ใช้แล้วก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม สารเคมีที่นำมาใช้เป็นพิษ หรือ ย่อยสลายยากทำให้เกิดการตกค้าง การใช้วิธีทางชีววิทยาซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยการใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญ และเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษต่ำ จึงเป็นวิธีที่จะช่วยแก้ปัญหาที่เกิดจากวิธีทางฟิสิกส์ และเคมีที่กล่าวมาแล้วได้

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในก๊าซชีวภาพ แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ใช้แสงเป็นแหล่งให้พลังงาน และ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน กลายเป็นกัมมะถันสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ กลุ่มแบคทีเรียไม่สังเคราะห์แสง จะขนถ่ายไฮโดรเจนซัลไฟด์จากสภาวะแวดล้อมเข้าสู่ภายในเซลล์แล้วทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อให้ได้พลังงานสำหรับการเจริญ โดยขนส่งอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจนในสภาวะมีอากาศ หรือไปยังไนเตรทในสภาวะไร้อากาศ โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ แบคทีเรียในตระกูล *Thiobacillus* sp. ซึ่งเป็น chemoautotrophic bacteria เพียงจำแนกเดียวที่ออกซิไดส์สารประกอบกำมะถัน เช่น ไฮโอซัลเฟต และไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้

งานวิจัยนี้ศึกษาการกำจัดไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วยวิธีทางชีววิทยา โดยคัดแยกเชื้อแบคทีเรียมาจาก UASB effluent ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัย (habitat) ของ *Thiobacillus* sp. (ดวงพร, 2537) จากนั้นทำการทดลอง ใช้เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ใน Bio-trickling filter column คือ เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้เจริญบนตัวกลางในคอลัมน์ โปรยกรองน้ำ หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อจากด้านบนของคอลัมน์เพื่อให้ความชื้น พ่นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้านล่างของคอลัมน์ เพื่อสะดวกต่อการใช้งานในอนาคต และนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบระบบบำบัดก๊าซชีวภาพที่ปนเปื้อนด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. คัดแยก *Thiobacillus* sp. จาก UASB effluent
2. หาอัตราการเจริญและความสามารถในการใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นแหล่งพลังงานของเชื้อที่คัดแยกมาจาก UASB effluent
3. ประเมินประสิทธิภาพการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในระบบ Biotrickling Filter

ขอบเขตของการวิจัย

1. นำทิ้งจาก UASB ที่ใช้ในการศึกษา มาจากโรงงานอาหาร
2. คัดแยกเชื้อโดยใช้ *Thiobacillus denitrificans* medium และ *Thiobacillus* medium (For the cultivation of *Thiobacillus thioautotrophicus*) และศึกษากิจกรรมของเชื้อที่คัดแยกในอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. ปรับสถานะให้เชื้อยึดเกาะบนตัวกลางพลาสติก เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร (ภาพที่5) ที่บรรจุในคอลัมน์เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.62 เซนติเมตร สูง 53.34 เซนติเมตร (ภาพที่4)
4. สร้างระบบ Bio-trickling Filter (ภาพที่ 4) โดยโปรยกรองอาหารด้านบน และ พ่นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ที่เตรียมจาก โซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S) และ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้าด้านล่างของคอลัมน์ในข้อที่ 3
5. ปรับให้เชื้อใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นแหล่งพลังงาน โดยค่อยๆแทนที่โซอิลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการพ่นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์
6. ศึกษาความสามารถในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของเชื้อที่คัดแยกมาโดยการเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่พ่นในคอลัมน์จนเชื้อไม่สามารถทนได้

การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมหลายประเภทมีการผลิตก๊าซชีวภาพจากระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งสามารถใช้เป็นพลังงานทดแทน (renewable energy) เพื่อลดต้นทุนการผลิตของโรงงาน ก๊าซชีวภาพส่วนใหญ่จะเป็นก๊าซผสมระหว่างก๊าซมีเทน (methane, CH₄) และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide, CO₂) นอกจากนี้ยังอาจจะมีก๊าซไนโตรเจน (nitrogen, N₂) ก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen, H₂) และ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide, H₂S) ปนอยู่ด้วย องค์ประกอบใน ก๊าซชีวภาพที่เกิดจากกระบวนการหมักจะมีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับวัตถุดิบที่ใช้และสภาวะของ กระบวนการหมักด้วย สัดส่วนเฉลี่ยของก๊าซชีวภาพแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ

องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ	ปริมาณ (%)
ก๊าซมีเทน (methane, CH ₄)	55-65
ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide, CO ₂)	35-45
ก๊าซไนโตรเจน (nitrogen, N ₂)	0-8
ก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen, H ₂)	0-1
ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide, H ₂ S)	0-1

ที่มา: Polprasert (1996)

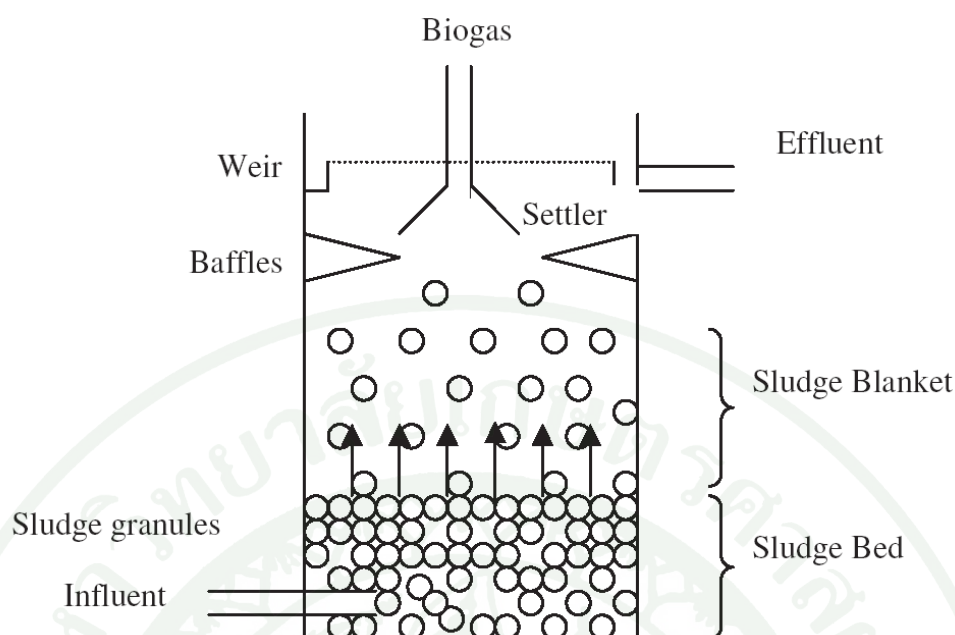
กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน

กระบวนการยูเอสบี (Upflow Anaerobic Sludge Blanket ; UASB) เป็นกระบวนการ บำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) ด้วยจุลินทรีย์ชนิดไม่ใช้ออกซิเจนอิสระ ลักษณะทั่วไปของถังปฏิกรณ์เป็นถังปิดรูปทรงกระบอกหรือรูปทรงลูกบาศก์ แสดงได้ดังภาพที่ 1 ซึ่ง ลักษณะถังแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่

1. ส่วนที่เป็นถังหมักและระบบป้อนน้ำเสีย (feed inlet system) อยู่ที่ส่วนล่างของถังปฏิกรณ์

2.ส่วนที่เป็นถังตกตะกอนอยู่ที่ส่วนบนของถังปฏิกริยา โดยจะมีการติดตั้งอุปกรณ์แยกสามสถานะ (Gas-Solids Separator ; GSS) ซึ่งทำหน้าที่แยกน้ำเสีย ตะกอนจุลินทรีย์ และก๊าซ ประกอบขึ้นด้วยระบบแผ่นกั้น (baffle system) ซึ่งเอียงทำมุมประมาณ 45-50 องศา กับแนวนอน นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ฟุ้งกระจายโดยก๊าซชีวภาพหลุดออกไปจากถังปฏิกริยา

น้ำเสียถูกป้อนเข้าทางด้านล่างของถังปฏิกริยายูเอสบี โดยผ่านระบบกระจายน้ำเสียเพื่อกระจายน้ำเสียเข้าหลายจุดตามพื้นที่หน้าตัดของถังปฏิกริยา เมื่อน้ำเสียไหลผ่านชั้นตะกอนจุลินทรีย์จะเกิดการสัมผัสระหว่างสารอินทรีย์ในน้ำเสียกับจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย เกิดเป็นเซลล์ของจุลินทรีย์ และก๊าซ โดยก๊าซเหล่านี้จะเกาะติดอยู่กับเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ ประกอบกับความเร็วของน้ำเสียที่ไหลขึ้น ทำให้เกิดการลอยตัวของตะกอนจุลินทรีย์ขึ้นสู่ด้านบน ซึ่ง Van der Meer (1979) ได้กล่าวว่าก๊าซที่เกิดขึ้นในถังปฏิกริยายูเอสบีนี้เมื่อลอยตัวขึ้นสู่ด้านบนและเกิดการสัมผัสที่ทั่วถึงระหว่างสารอินทรีย์ในน้ำเสียกับจุลินทรีย์ เมื่อน้ำเสียไหลขึ้นสู่ด้านบนของถังจะปะทะกับแผ่นกั้นของอุปกรณ์แยกสามสถานะ ทำให้เกิดการแยกน้ำเสีย ตะกอนจุลินทรีย์ และก๊าซออกจากกัน ก๊าซที่เกาะมากับกลุ่มตะกอนจุลินทรีย์จะถูกแยกออกโดยจะลอยตัวขึ้นไปยังส่วนบนผ่านท่อเก็บก๊าซเพื่อลำเลียงก๊าซที่ได้ไปยังอุปกรณ์เก็บก๊าซ น้ำเสียจะถูกแยกออกจากตะกอนจุลินทรีย์และไหลล้นออกไปนอกถังส่วนตะกอนจุลินทรีย์จะถูกดักไว้และตกลงไปยังส่วนล่างของถัง โดยเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ที่รวมตัวกันเป็นเม็ดตะกอนขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากสามารถตกตะกอนได้ดี จะตกลงมาบริเวณส่วนล่างสุดของถังปฏิกริยา ซึ่งบริเวณส่วนล่างนี้เรียกว่า ชั้นตะกอนล่าง (sludge bed) ในขณะที่บริเวณเหนือชั้นตะกอนล่างขึ้นไป จะเป็นชั้นตะกอนแขวนลอยที่ขนาดเล็กรองลงมาเรียกว่าชั้นตะกอนลอย (sludge blanket) เป็นชั้นที่ตะกอนมีความสามารถในการตกตะกอนได้น้อยกว่าชั้นตะกอนล่าง ซึ่งส่วนใหญ่แล้วการที่ระบบล้มเหลวเนื่องมาจากการที่ไม่สามารถสร้างเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่ และตกตะกอนได้ดีและมากพอ ทำให้จุลินทรีย์หลุดออกไปพร้อมกับน้ำทิ้ง



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของ Upflow Anaerobic Sludge Blanket

ที่มา: Van der Meer (1979)

กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพจากระบบบำบัดน้ำเสียไร้อากาศต้องอาศัยแบคทีเรีย 4 กลุ่ม ได้แก่แบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ แบคทีเรียสร้างอะซิเตท แบคทีเรียสร้างกรด และแบคทีเรียสร้างมีเทน โดยมีปฏิกิริยาเกิดขึ้น 4 ขั้นตอนตามลำดับดังภาพที่ 2 และสามารถอธิบายได้ดังนี้

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพจากระบบบำบัดน้ำเสียไร้อากาศ

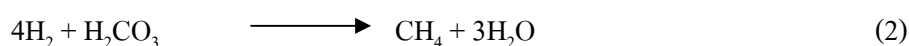
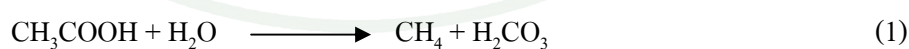
ขั้นตอนที่ 1 ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) : ไฮโดรไลซิสเป็นขั้นตอนการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน ให้กลายเป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน และกรดไขมันชนิดยาวตามลำดับ ขั้นตอนนี้สามารถเกิดขึ้นได้ภายนอกเซลล์แบคทีเรียโดยอาศัยเอนไซม์ที่แบคทีเรียปล่อยออกมาใช้ในการย่อยสลายดังกล่าว

ขั้นตอนที่ 2 การสร้างกรด (acidogenesis) : ผลผลิตของขั้นตอนที่ 1 จะถูกแบคทีเรียสร้างกรดดูดซึมเข้าไปภายในเซลล์ เพื่อไปใช้เป็นอาหารและถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันระเหย (Volatile Fatty Acid ; VFA) เช่น อะซิติก บิวไทริก โพรไพโอนิก เป็นต้น และผลิตไฮโดรเจนกับ

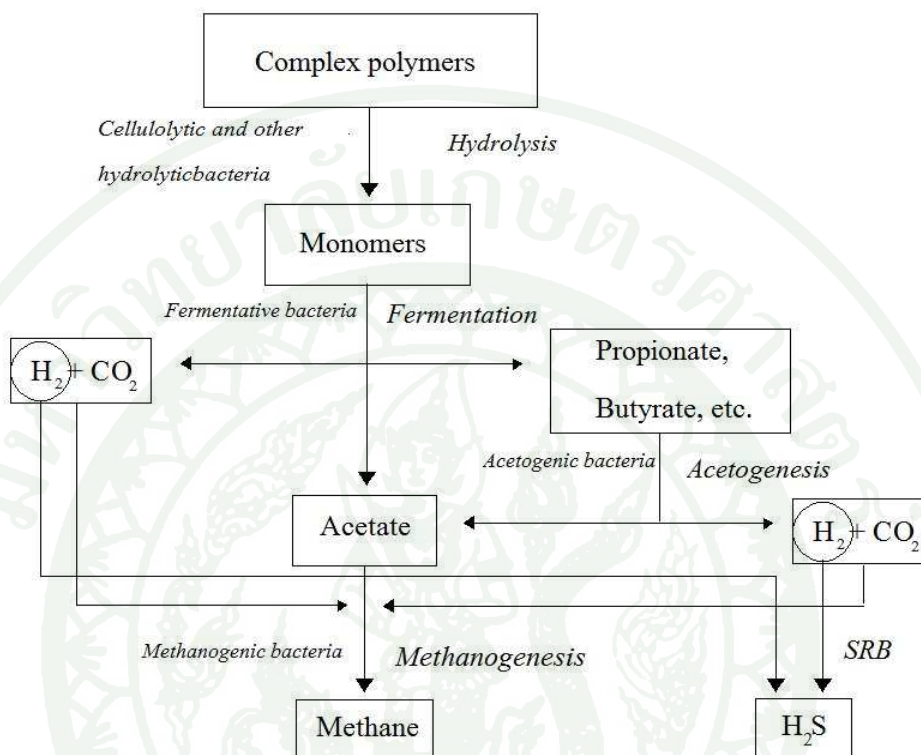
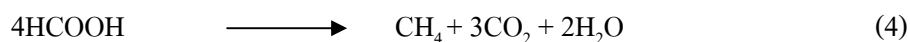
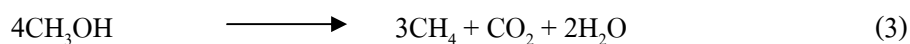
คาร์บอนไดออกไซด์ออกมาด้วย กระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลเล็กและชนิดของผลผลิตที่ได้ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ คือ ชนิดของสารตั้งต้น (substrate) และความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น ยกตัวอย่างเช่น กรดไขมันชนิดยาวถูกย่อยสลายกลายเป็นอะซิติก และไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนมีค่าต่ำ แต่จะย่อยสลายกลายเป็นบิวไทริก และโพรไพโอนิก เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่ไฮโดรเจนมีความดันพาร์เชียลสูง น้ำตาลถูกย่อยสลายเป็นกรดอะซิติก ไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์โดยผ่านวิถี embden-meyerhof ภายใต้สภาวะที่ไฮโดรเจนมีความดันพาร์เชียลต่ำ หากไฮโดรเจนมีความดันพาร์เชียลสูง ผลผลิตที่ได้ คือ กรดอะซิติก กรดโพรไพโอนิก กรดบิวไทริก ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์

ขั้นตอนที่ 3 การสร้างกรดอะซิติกจากกรดไขมันระเหยอื่นๆ (acetogenesis) : แบคทีเรียอะเซโตจีนิค (แบคทีเรียสร้างอะซิเตท) มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวเชื่อมระหว่างขั้นตอนการสร้างกรดและขั้นตอนการสร้างมีเทน การผลิตมีเทนโดยแบคทีเรียสร้างมีเทนนั้นต้องการสารตั้งต้น (substrate) เฉพาะเจาะจงมาก ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก ไฮโดรเจน เมทานอล และ เมทิลามีน (methylamine) กรดไขมันระเหยที่มีคาร์บอนมากกว่า 2 อะตอมไม่อาจใช้เป็นสารตั้งต้น (substrate) ในการผลิตมีเทนได้โดยตรง แบคทีเรียอะเซโตจีนิค (ที่ผลิตไฮโดรเจนได้ด้วย) มีความสามารถในการย่อยสลายกรดไขมันระเหยที่มีคาร์บอนมากกว่า 2 อะตอม ให้กลายเป็น กรดอะซิติกคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน ภายใต้สภาวะที่ไฮโดรเจนมีความดันพาร์เชียลต่ำกว่า 2×10^{-3} บรรยากาศ และต่ำกว่า 9×10^{-3} บรรยากาศ สำหรับการย่อยสลายกรดบิวไทริก และ กรดโพรไพโอนิก ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 4 การสร้างมีเทน (methanogenesis) : กรดอะซิติกและไฮโดรเจนจะถูกแบคทีเรียใช้สร้างมีเทนภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนอย่างเด็ดขาด



กรดอินทรีย์ระเหยที่มีคาร์บอนมากกว่า 1 อะตอม ไม่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นมีเทนได้โดยตรง แบคทีเรียจะต้องเปลี่ยนกรดอินทรีย์ระเหยต่างๆ ให้เป็นกรดอะซิติกหรือไฮโดรเจนเสียก่อนจึงจะใช้ผลิตมีเทนได้ นอกจากกรดอะซิติกและไฮโดรเจนแล้ว แบคทีเรียอาจใช้สารตั้งต้น (substrate) อย่างง่ายอีกเพียงไม่กี่ชนิดในการผลิตมีเทน เช่น เมทานอล กรดฟอร์มิก (HCOOH)



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการผลิตก๊าซชีวภาพจากระบบบำบัดน้ำเสียไร้อากาศ

ที่มา: Gerardi (2003)

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพจากระบบบำบัดน้ำเสียไร้อากาศ

กลุ่มที่ 1 ไฮโดรไลติกแบคทีเรีย (hydrolytic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์แล้วปล่อยออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง ไขมัน และโปรตีน ให้เป็นสารโมเลกุลเดี่ยวหรือสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงที่แบคทีเรียสามารถนำไปในเซลล์ได้ เช่น น้ำตาล กรดไขมัน กรดอะมิโนโดยใช้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ เซลลูโลติกแบคทีเรีย (cellulolytic bacteria) ย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose) เป็นโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide)

กลุ่มที่ 2 เฟอว์เมนเตทีฟแบคทีเรีย (fermentative bacteria)

แบคทีเรียในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในขั้นตอนในการเปลี่ยน น้ำตาล กรดไขมัน กรดอะมิโน ไปเป็นกรดอินทรีย์ระเหย เช่น อะซิเตท บิวทิเรท โพรพิโอเนท แลคเตท เอทานอล ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ การที่จะได้สารตัวใดเป็นผลผลิตนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ คือ ชนิดของสารตั้งต้น (substrate) และความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจน (hydrogen partial pressure) ในสภาวะที่มีความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนต่ำ (low hydrogen partial pressure) แบคทีเรียจะผลิตสารพวก อะซิเตท ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา แต่ในสภาวะที่มีความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนสูง (high hydrogen partial pressure) แบคทีเรียจะผลิตสารพวก โพรพิโอเนท แลคเตท บิวทิเรท และเอทานอล ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Bacteroides*, *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium* และ *Lactobacillus*

กลุ่มที่ 3 อะซิโดจีนิคแบคทีเรีย (acetogenic bacteria)

แบคทีเรียในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในขั้นตอนอะซิโดจีนิซิส (acetogenesis) สามารถย่อยสลายกรดอินทรีย์ระเหยที่มีคาร์บอนหลายอะตอม (คาร์บอนมากกว่า 2 อะตอม) และเอทานอล ให้เป็นอะซิเตท ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และยังมีหน้าที่ที่สำคัญในฐานะเป็นตัวเชื่อมระหว่างแบคทีเรียที่สร้างกรดและแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทน พบว่าก๊าซไฮโดรเจนที่สร้างขึ้นนั้นมีบทบาทสำคัญในการควบคุมปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในระบบ โดยถ้ามีก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้นในปริมาณมากจะทำให้ไฮโดรเจนไอออน (H^+) เพิ่มขึ้น พีเอช ในระบบเป็นกรดจนกระทั่งไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพวกนี้ แต่ถ้าในระบบมีพวกเมทาโนเจนิกแบคทีเรีย (methanogenic bacteria) อยู่ด้วยก๊าซไฮโดรเจนจะถูกใช้รีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้กลายเป็นก๊าซมีเทนในขั้นตอนการสร้างก๊าซมีเทน จึงทำให้ในระบบมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนไม่สูงมากจนถึงระดับที่เป็นพิษได้ ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Desulfovibrio*, *Selenomonas*, *Syntrophomonas* และ *Ruminococcus*

กลุ่มที่ 4 เมทาโนเจนิกแบคทีเรีย (methanogenic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการสร้างมีเทน (methanogenesis) แบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนอย่างแท้จริง (strictly anaerobic bacteria) เนื่องจากออกซิเจนจะเป็นพิษต่อแบคทีเรียนี้ สามารถเจริญได้ดีในพีเอชที่เป็นกลางประมาณ 6.8-7.2 อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะช้ากว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่นในขั้นตอนการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าต้องใช้เวลา 3-5 วัน มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมได้น้อยกว่า เช่น ไม่อาจทนต่อออกซิเจนแม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย หรือไม่อาจ

เจริญเติบโตได้ดีเมื่ออยู่ภายนอกช่วงพีเอชที่เหมาะสม เป็นต้นและมีข้อจำกัดคือสามารถใช้สารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนเพียงไม่กี่ชนิด เช่น อะซิเตท และสารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอมเท่านั้น เช่น ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ฟอर्मेट เมทานอล และ เมทิลลามีน ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*, *Methanothrix* และ *Methanomicrobium*

Sulfate Reducing Bacteria ในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ

แบคทีเรียอีกกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพจากระบบบำบัดน้ำเสียไร้อากาศที่มีซัลเฟตหรือซัลไฟด์ คือ กลุ่มซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรีย (Sulfate Reducing Bacteria ; SRB) เป็นแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจน (Desulfovibrio) ก่อนข้างจะทนต่อออกซิเจนและบางตัวสามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นแอมโมเนียได้ด้วย จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียชนิดเคโมเฮเทโรทรอฟ (chemoheterotroph) ดำรงชีพและเจริญเติบโตโดยได้รับพลังงานจากปฏิกิริยาทางเคมีในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ลักษณะเด่นของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือความสามารถในการรีดิวซ์ซัลเฟตทำให้ซัลเฟตเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของซัลไฟด์ เนื่องจากแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตจะใช้ซัลเฟตเป็นสารรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในการออกซิไดซ์ไฮโดรเจนโมเลกุลหรือสารประกอบอินทรีย์หลายชนิด ในกรณีที่สารให้อิเล็กตรอนคือโมเลกุลไฮโดรเจนหรืออะซิเตท ขั้นตอนดังกล่าวนี้จัดเป็นขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนเช่นเดียวกับขั้นตอนการสร้างมีเทนตามปกติ ดังนั้นในกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่มีซัลเฟตแบบไม่ใช้ออกซิเจนจึงมักจะพบแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตอยู่ร่วมกับแบคทีเรียสร้างกรดอินทรีย์ระเหยและแบคทีเรียสร้างมีเทนอยู่เสมอ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้สารตั้งต้น (substrate) ได้หลากหลาย มีค่า ORP ต่ำกว่า แบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตมีเทน คือ < -50 mV ทำให้เจริญเติบโตเร็วกว่า และ มีผลต่อกระบวนการผลิตมีเทน ทำให้ได้ผลผลิตน้อยลง และมีการปนเปื้อนจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เพิ่มขึ้น

ในการแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตอย่างกว้างๆ ตามความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์เพื่อการดำรงชีพและเจริญเติบโต สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

- แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตชนิดย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ไม่สมบูรณ์ (Incompletely Oxidizing Sulfate Reducing Bacteria ; I-SRB) โดยสารอินทรีย์ที่เหลือจากการย่อยสลายก็คือ อะซิเตท

• แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตชนิดย่อยสลายสารอินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ (Completely Oxidizing Sulfate Reducing Bacteria ; C-SRB)

ผลเสียของก๊าซปนเปื้อนที่ผสมอยู่ในก๊าซชีวภาพเป็นอันตรายและสร้างมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมดังนี้คือ

ปริมาณไอน้ำเป็นสารที่ลดค่าความร้อนของก๊าซชีวภาพ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการกัดกร่อนของอุปกรณ์ และมีคุณสมบัติในการรวมตัวกับก๊าซมีเทนทำให้เกิดผลึกของแข็งเป็นอุปสรรคต่อการใช้ก๊าซชีวภาพ

ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ หรือก๊าซไข่เน่า เป็นก๊าซที่ไม่มีสี แต่มีกลิ่นเหม็นคล้ายไข่เน่ามีน้ำหนักมากกว่าอากาศเล็กน้อย จัดเป็นก๊าซพิษ มีฤทธิ์กัดกร่อน โลหะโดยตรง ดังจะแสดงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีแสดงในตารางที่ 2 และมีความสามารถในการละลายน้ำจำกัดคือมีพฤติกรรม การละลายน้ำแปรผันไปตามอุณหภูมิดังแสดงในตารางที่ 3 ที่แสดงค่าความสามารถในการละลาย น้ำที่อุณหภูมิต่างๆ นอกจากนี้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ยังเป็นอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์โดยพิษของ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของก๊าซที่ได้รับเข้าไปดังจะแสดงผลกระทบทาง สรีระวิทยาของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในตารางที่ 4

เมื่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์หลุดสู่ชั้นบรรยากาศ จะถูกออกซิไดซ์เป็นก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ภายใต้ออกซิเจนและความชื้นที่เหมาะสมในระยะเวลา 2 วันเกิดเป็นละอองกรดกำมะถัน ที่กระจายอยู่ในบรรยากาศที่เรียกว่า acid mist และเมื่ออากาศมีความชื้นสูงจะเกิดการควบแน่นทำ ให้อนุภาคเหล่านี้ตกลงมากับฝนเรียกว่าฝนกรด (acid rain) ดังปฏิกิริยา



ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide)

Characteristic	Hydrogen sulfide
Description	colorless gas
Molecular formula	H ₂ S
Molecular weight	34.08
Density	1.4 g/L at 25 ⁰ C (air = 1)
Boiling point	-60.7 ⁰ C
Melting point	-85.5 ⁰ C
Vapor pressure	15,600 torr at 25 ⁰ C
Solubility	soluble in water, hydrocarbon solvents, ether, and ethanol
Odor threshold	8.1 ppb (11 mg/m ³)
Odor description	Resembles rotten eggs
Conversion factor	1 ppm = 1.4 mg/m ³ at 25 ⁰ C

ที่มา : HSDB (1999)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการละลายน้ำของไฮโดรเจนซัลไฟด์

Temperature ⁰ C	Solubility mg/L as S
0	6,648
5	5,646
10	4,810
15	4,150
20	3,618
25	3,175
30	2,806
35	2,491
40	2,221

ที่มา: Piscarczyk (1982)

ตารางที่ 4 ระดับความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์กับผลกระทบทางสรีระวิทยา

ความเข้มข้นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอากาศ (ส่วนในล้านส่วน : พีพีเอ็ม)	ผลกระทบทางสรีระวิทยา
0.2	เริ่มได้กลิ่น
10	ได้กลิ่นที่รุนแรงมาก เกือบ
50	อาการระคายตาและเยื่อทางเดินหายใจ
150	ประสาทรับกลิ่นไม่ทำงาน
200	ไม่ได้กลิ่น ตาแดง เจ็บในคอ
250	ถ้าสูดดมนาน อาจเกิดอาการน้ำท่วมปอด
500	½ -1 ชั่วโมง เกิดอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้ หมดสติ และหยุดหายใจ
500-1000	เกิดอาการขาดออกซิเจนในทุกระบบและหยุดหายใจ

ที่มา: Haidal (1986)

ผลกระทบที่เกิดจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

1. ก่อให้เกิดปัญหาเรื่องกลิ่น เนื่องจากก๊าซนี้มีกลิ่นคล้ายไข่เน่า ระดับความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่รับรู้ได้มีค่าต่ำมากคือ 0.0011 มิลลิกรัม/ลิตร (Cheremisinoff, 1995)
2. เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในปริมาณความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะทำให้ประสาทรับกลิ่นเกิดอาการล้ากลิ่นเหม็นจึงหายไป เมื่อมนุษย์ได้รับเข้าไปจะทำให้หมดสติและถึงเสียชีวิตได้อย่างรวดเร็วถ้ามีก๊าซนี้อยู่ในบรรยากาศมากกว่า 200-600 พีพีเอ็ม เนื่องจาก เมื่อหายใจเอาก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้าไปในระบบหายใจ (respiratory system) ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตจะจับตัวกับเมทิโมโกลบิน (methaemoglobin) เกิดสารสีเขียวของซัลไฟเมทิโมโกลบิน (sulphmethaemoglobin) ทำให้ฮีโมโกลบิน (haemoglobin) ในเลือดทำการแลกเปลี่ยนออกซิเจนไม่ได้ นอกจากนี้ยังเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำแม้ในปริมาณน้อยกว่า 1 พีพีเอ็ม ระดับความเป็นพิษยังเปลี่ยนแปลงได้ตาม พีเอช อุณหภูมิ และการแตกตัวของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เอง (Boon, 1995)

3. ทำให้เกิดการกัดกร่อนของท่อคอนกรีตหรืออุปกรณ์ที่ทำจากโลหะเนื่องจากเมื่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ถูกออกซิไดซ์จะเกิดการดักฟูลิกซึ่งมีฤทธิ์กัดกร่อน และเมื่อกรดนี้ถูกชะลงสู่แหล่งน้ำ จะเกิดสภาวะกรดที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำนั้น

4. ทำให้แหล่งน้ำมีสภาพไม่น่าดูเพราะเกิดตะกอนสีดำที่ก้นตัวของโลหะซัลไฟด์เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ทำปฏิกิริยากับโลหะ เช่น Fe^{2+} , Pb^{2+} และ Zn^{2+}

การบำบัดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ในก๊าซชีวภาพจากระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน

ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ปนเปื้อนในก๊าซชีวภาพมีผลกระทบต่อสุขภาพและอุปกรณ์ของระบบจึงต้องบำบัดเพื่อให้ก๊าซชีวภาพมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเหมาะแก่การใช้งาน วิธีที่ใช้บำบัดขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างคือ ปัจจัยทางเคมี ฟิสิกส์ และชีววิทยา ในปี 1976 Hartman ได้เสนอว่าในการเลือกวิธีการควบคุมนั้นจำเป็นต้องศึกษาลงไปรายละเอียดของการเกิดจึงจะสามารถเลือกวิธีที่เหมาะสมได้ ต่อมา Boon (1995) ได้ค้นพบว่าปัจจัยต่างๆที่ต้องพิจารณาในการเลือกวิธีที่ดีที่สุดคือ สภาพภูมิอากาศท้องถิ่น วิธีการบำบัด ประสิทธิภาพ ความสามารถของผู้ปฏิบัติงาน และทุนในการแก้ปัญหา

การบำบัดไฮโดรเจนซัลไฟด์ แบ่งได้เป็น 3 วิธีใหญ่ๆ คือวิธีทางฟิสิกส์ เคมี และชีววิทยา โดยอาจจะใช้วิธีใดวิธีหนึ่ง หรือหลายวิธีรวมกัน

1. วิธีทางเคมี การใช้สารเคมีในการบำบัดไฮโดรเจนซัลไฟด์มีดังนี้

1.1 ดูดซับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ผสมกับ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ผสมสารเคมีลงในน้ำ และพ่นลงมาสวนกับก๊าซที่ต้องการกำจัดซึ่งจะลอยสวนขึ้นด้านบน สารเคมีชนิดนี้นิยมใช้กันมาก เนื่องจากราคาไม่แพง หาซื้อได้ง่าย และสามารถกำจัด ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ดี ปฏิบัติการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยการเกิดออกซิเดชันด้วยสารเคมีสามารถแสดงได้ดังสมการ



อย่างไรก็ตามสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วยวิธีนี้จะไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ดังนั้นในการเลือกใช้วิธีนี้จึงควรพิจารณาว่าสารเคมีในการบำบัดไฮโดรเจนซัลไฟด์จะต้องใช้สารเคมีที่ไม่รบกวนต่อระบบบำบัดทางชีววิทยา และไม่เป็นพิษต่อคน สัตว์ และสิ่งมีชีวิตต่างๆ การใช้สารเคมีโดยทั่วไปแล้วจะเสียค่าใช้จ่ายมากและมีความยุ่งยาก

1.2 ปฏิกริยาออกซิเดชันในของเหลว (liquid phase oxidation) แบ่งได้ 2 วิธี ได้แก่

(1) กระบวนการ-สเตอร์ทฟอร์ด (stretford process) กระบวนการนี้ใช้วานาเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะถูกดูดซึมในสารละลายที่ประกอบด้วย โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไบคาร์บอเนต เอดีเอ (Anthraquinone Disulfonic Acid; ADA) และอัลคาไลวานาเต (alkali vanadate) ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถแสดงได้ดังสมการต่อไปนี้



แม้ว่ากระบวนการนี้จะสามารถเปลี่ยนก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้อยู่ในรูปกำมะถันที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ แต่ก็มีข้อเสียคือ ปฏิกิริยาเกิดขึ้นค่อนข้างช้า และกำมะถันที่ได้เป็นผลิตภัณฑ์ต้องนำไปล้างเนื่องจากวานาเดียมเป็นสารที่อันตราย

(2) กระบวนการโลแคท (lo-cat process) กระบวนการนี้ใช้สารละลายเหล็ก คีเลทแทนวานาเดียม นอกจากจะไม่เป็นอันตรายแล้ว การใช้เหล็กคีเลทจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้เร็วขึ้นอีกด้วย ปฏิกิริยาจะเริ่มจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะถูกเปลี่ยนสถานะจากก๊าซไปเป็นของเหลวด้วยน้ำ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีสถานะเป็นของเหลวจะแตกตัวเป็น S^{2-} ซึ่งจะทำปฏิกิริยารีดอกซ์กับเหล็ก (Fe^{3+}) ในสารละลายคีเลท ทำให้เกิดกำมะถันขึ้น กระบวนการนี้สามารถนำเหล็ก (Fe^{3+}) มาเปลี่ยนรูปเป็นเหล็ก (Fe^{2+}) กลับมาใช้ใหม่ได้ด้วยปฏิกิริยารีดอกซ์ (regeneration)

1.3 ทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะ ไอออนของโลหะบางชนิดจะรวมกับซัลไฟด์เกิดเป็นตะกอนที่ไม่ละลาย จากการศึกษาก่อนของ Baumgartner (1934) นั้นพบว่า ไอออนของทองแดง (Cu^+ , Cu^{2+})ปรอท (Hg^{2+}) เหล็ก (Fe^{2+} , Fe^{3+}) และสังกะสี (Zn^{2+}) ทำปฏิกิริยาคัดตะกอนซัลไฟด์ได้

อย่างมีประสิทธิภาพ Tomar และ Abdullah (1994) พบว่า แม้เฟอร์ริกไอออนจะใช้ได้ผลดีแต่อาจจะไม่เหมาะสมกับบางสภาวะ เช่น ในประเทศสุเวต ปริมาณของตะกอนที่มีเหล็กซัลไฟด์สูงจากบ่อบำบัดน้ำเสียจะเพิ่มขึ้น ร้อยละ 30-40 ตะกอนของเหล็กซัลไฟด์เองก็อาจจะตกค้างตามท่อทำให้เกิดการอุดตันและต้องเสียค่าบำรุงรักษาเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ถ้ามีเฟอร์ริกไอออนอยู่มากเกินไปก็จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในระบบด้วย

2. วิธีทางฟิสิกส์

การบำบัดไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยใช้วิธีทางฟิสิกส์ อาจทำเพื่อเป็นการกำจัดแหล่งที่ทำให้เกิดกลิ่น หรือเป็นการเคลื่อนย้ายกลิ่นที่ถูกสร้างออกมาแล้วออกจากบรรยากาศ ในปี 1966 Santry ได้เสนอว่า วิธีทางฟิสิกส์อาจนำไปพิจารณาใช้ร่วมกับวิธีทางเคมี หรือวิธีทางชีววิทยา ทำให้เกิดเป็นวิธีผสมขึ้น

การบำบัดไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยใช้วิธีทางฟิสิกส์อาจทำได้ดังต่อไปนี้

- กระบวนการคลอส (claus process) เป็นการเปลี่ยนไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้อยู่ในรูปซัลเฟอร์โดยเกิดปฏิกิริยาดังนี้



สำหรับประสิทธิภาพของกระบวนการนี้ ถ้าต้องการให้การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์มีประสิทธิภาพสูงจะต้องใช้จำนวนปฏิกรณ์มากขึ้น ต้นทุนก็จะสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้กระบวนการนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณออกซิเจนถ้าปริมาณออกซิเจนมากเกินไปจะเกิดซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เพิ่มขึ้นทำให้เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

- การดูดซับด้วยเอมีน (amine absorption unit) การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วยวิธีนี้มีการใช้ในการค้าอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถกำจัดก๊าซที่มีฤทธิ์เป็นกรด โดยเฉพาะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะถูกดูดซึมเข้าไปในเอมีน แต่ต้องนำไปใช้เกี่ยวเนื่องในกระบวนการอื่นด้วย

- การดูดซับ (adsorption) ด้วยแอคติเวททีดคาร์บอน Dague (1972) ได้ทำการวิจัยและพบว่านอกจากความสามารถในการดูดซับแล้วแอคติเวททีดคาร์บอนยังเป็นตัวเร่งในการเปลี่ยนไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้เป็นธาตุกำมะถันในสภาวะที่มีออกซิเจนอิสระ และสามารถกำจัดไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้มากกว่าน้ำหนักตัวมันถึง ร้อยละ 20

3. วิธีทางชีววิทยา

การบำบัดไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วยวิธีทางชีววิทยา อาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เปลี่ยนก๊าซให้อยู่ในรูปอื่นเช่น ของแข็ง หรือเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษต่ำ เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในเชิงพาณิชย์ที่ใช้กำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในก๊าซชีวภาพ ก๊าซธรรมชาติ และน้ำมันดิบ แบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนรูปก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์มี 2 ประเภท คือ

3.1 กลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

(1) กลุ่มของแบคทีเรียสีเขียว (chlorobiaceae) เป็นพวก anaerobic และ photoautotroph คือไม่สามารถเจริญในที่ที่มีออกซิเจนและได้รับพลังงานสำหรับการเจริญจากแสงเท่านั้น ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและสารประกอบอนินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน เช่น *Chlorobium thiosulfatophilum* ใช้ซัลไฟด์ (S^{2-}) หรือซัลไฟต์ (SO_3^{2-}) เป็นต้นให้อิเล็กตรอนทำให้กลายเป็นซัลเฟตในสภาพที่มีแสงเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้อยู่ในรูปกำมะถัน หรือ *Chlorobium limicola* ใช้ซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้ซัลไฟด์กลายเป็นกำมะถันแล้วสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์

(2) กลุ่มของแบคทีเรียสีม่วงและสีแดง (chromatiaceae) เป็นแบคทีเรียพวก obligate anaerobic และ obligate photoautotroph ใช้พลังงานจากแสงในการเจริญ และใช้สารประกอบอนินทรีย์กำมะถันและไฮโดรเจนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ทำให้กำมะถันกลายเป็นซัลเฟต และมีกำมะถันบางส่วนกระจายอยู่ภายในเซลล์ เช่น *Chromatium vinosum*

3.2. กลุ่มแบคทีเรียไม่สังเคราะห์แสง (nonphotosynthetic bacteria) ได้แก่แบคทีเรียในตระกูล *Thiobacillus* sp. จัดเป็นประเภท chemoautotrophic bacteria เพียง الجنس (genus) เดียวซึ่งออกซิไดซ์กำมะถันได้ จะขนถ่ายสารประกอบอนินทรีย์กำมะถัน เช่น ธาตุกำมะถัน โลหะซัลไฟด์ ไทโอซัลเฟต และซัลไฟด์ จากสภาวะแวดล้อมเข้าสู่ภายในเซลล์แล้วทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เพื่อให้ได้พลังงานสำหรับการเจริญโดยขนส่งอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจนในสภาวะมีอากาศ หรือไปยังไนเตรทในสภาวะไร้อากาศ โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถแบ่งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดซัลไฟด์ได้เป็น 2 กลุ่ม

(1) กำจัดซัลไฟด์ทางตรง แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถออกซิไดซ์ก๊าซ

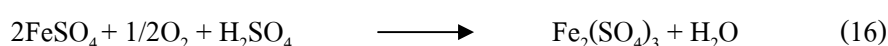
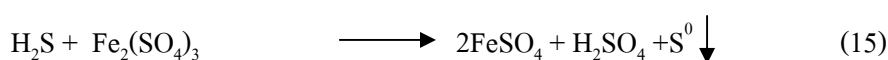
ไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้โดยตรง ให้กลายเป็นสารประกอบอนินทรีย์กำมะถัน และขับออกนอกเซลล์ ในตระกูล *Thiobacillus* sp. มีสปิชี (species) ที่มีเอ็นไซม์ซัลไฟด์ออกซิเดสและออกซิจีเนส เป็นตัวเร่งให้ซัลไฟด์ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นโซโอซัลเฟต และซัลเฟตตามลำดับ เช่น

- *Thiobacillus thiooxidans* เจริญเติบโตได้ดีที่พีเอชต่ำกว่า 1.0 และออกซิไดซ์สารประกอบอนินทรีย์กำมะถันได้ เช่น ออกซิไดซ์ซัลไฟด์ให้อยู่ในรูปซัลเฟต

- *Thiobacillus thioparus* โดยมีเอ็นไซม์ออกซิจีเนส ซึ่งมีองค์ประกอบของเหล็กทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้สารประกอบซัลไฟด์เป็นซัลเฟต เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์, methanethiol (MT), dimethyl sulfide (DMS) และ dimethyl disulfide (DMDS) ได้

- *Thiobacillus denitrificans* จัดเป็น strictly autotrophic และ facultative anaerobic กล่าวคือในสภาวะไร้อากาศ ใช้ไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ให้ผลการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสภาวะที่มีอากาศ สามารถออกซิไดซ์โซโอซัลเฟต มีเอ็นไซม์โซโอซัลเฟตซัลเฟอร์ทรานเฟอร์เรส (thiosulfate sulfurtransferase) หรือ โรดานีส (rhodanese) เป็นตัวเร่งโซโอซัลเฟตให้ออกซิไดซ์ไปเป็นซัลไฟด์กับซัลเฟต

(2) กำจัดซัลไฟด์ทางอ้อม แม้ว่าเชื้อกลุ่มนี้มีความสามารถในการกำจัดกำมะถันได้ต่ำ แต่เชื่อดังกล่าวสามารถใช้สารประกอบอนินทรีย์เหล็กเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญ เช่นการออกซิไดซ์เหล็กเฟอร์ไรต์ให้กลายเป็นเหล็กเฟอร์ริก แล้วส่งอิเล็กตรอนที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันผ่านกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจน ซึ่งเหล็กเฟอร์ริกที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยากับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ดังปฏิกิริยา



กระบวนการออกซิเดชันของไฮโดรเจนซัลไฟด์โดย *Thiobacillus* sp.

วิธีการกำจัดไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยวิธีทางชีววิทยาเป็นวิธีที่เสียค่าใช้จ่ายไม่มาก ไม่ส่งผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อม มีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถใช้ซัลไฟด์เป็นแหล่งพลังงานได้ และเลือกศึกษาแบคทีเรียในตระกูล *Thiobacillus* sp. ที่พบได้ทั่วไปในดินที่มีสีดำ และ UASB effluent (ดวงพร, 2537) แบคทีเรียในตระกูล *Thiobacillus* sp. ที่สามารถใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนมีหลายชนิด เช่นในงานวิจัยของ Grade (2003) ที่ศึกษาการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จากก๊าซชีวภาพโดยใช้เชื้อในกลุ่ม chemoautotroph bacteria (*Thiobacillus denitrificans*) ในถังปฏิกรณ์แบบ fixed-film พบว่าสามารถกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ 2.3 มิลลิโมล/ลิตร-ชั่วโมง. และงานวิจัยของ Chung *et al.* (1996) พบว่าเชื้อ *Thiobacillus thioparus* ในระบบ biofilter ที่มีการตรึงเซลล์ สามารถกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ถึง ร้อยละ 98

งานวิจัยนี้เลือกวิธีการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วยวิธีทางชีววิทยา โดย ศึกษา *Thiobacillus denitrificans* และ *Thiobacillus thioparus* เนื่องจากคุณสมบัติเด่นหลายประการคือ

Thiobacillus denitrificans เป็นแบคทีเรียซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในอาณาจักร monera ที่มีสมาชิกเป็นพวก prokaryotic cell อยู่เดี่ยวๆหรือเป็นกลุ่ม ขยายพันธุ์โดยวิธี binary fission หรือ budding เคลื่อนที่โดยใช้ flagella หรือ gliding ไม่มีรงควัตถุ ดิจีสีย้อมแกรมลบ มีขนาดเล็กและมีรูปร่างแท่งสั้น (short rod) ทำให้สามารถดูแลรักษาได้ง่ายในสภาพแขวนลอยพบในดินที่มีไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็น moderate thermophile bacteria เป็นกลุ่ม chemoautotroph คือใช้เฉพาะคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ง่ายต่อการให้สารอาหารเป็น facultative anaerobe สามารถออกซิไดซ์ ซัลไฟด์ ได้ทั้งสภาวะมีอากาศ และ ไร้อากาศผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการออกซิไดซ์ซัลไฟด์อยู่ในรูปของซัลเฟตซึ่งเป็นของแข็งทำให้สามารถแยกออกจากระบบได้ง่ายเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิ 25-50 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญเติบโตได้เท่ากับ 52 องศาเซลเซียส เจริญเติบโตได้ในช่วงพีเอช 6-8 ทำให้เกิดการกักกร่อนน้อยที่สุด สามารถใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ใช้ในเตรท (สภาวะไร้อากาศ) หรือ ออกซิเจน (สภาวะมีอากาศ) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งให้คาร์บอน

Thiobacillus thioparus เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม obligate chemoautotroph เคลื่อนที่โดยใช้ flagella ดิจีสีย้อมแกรมลบ มีขนาดเล็กรูปร่างแท่ง (rod) ขนาด 0.9-1.8 ไมโครเมตร เจริญเติบโตในช่วงพีเอช 5-9 (พีเอชที่เหมาะสม 7.5) อุณหภูมิที่เจริญเติบโตสูงสุดคือ 28 องศาเซลเซียส

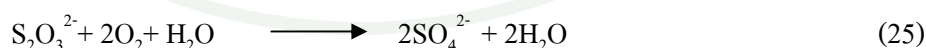
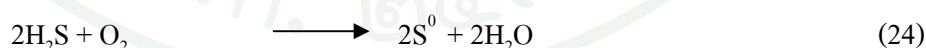
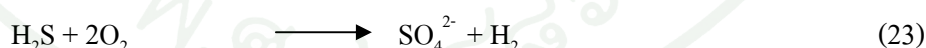
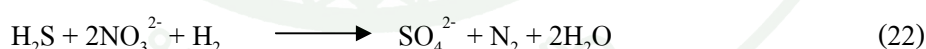
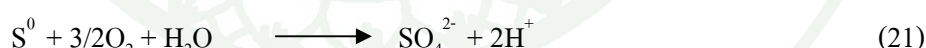
ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (strictly aerobe) สามารถออกซิไดซ์ ซัลไฟด์ ซัลไฟต์ และซัลเฟอร์ได้ดังปฏิกิริยา



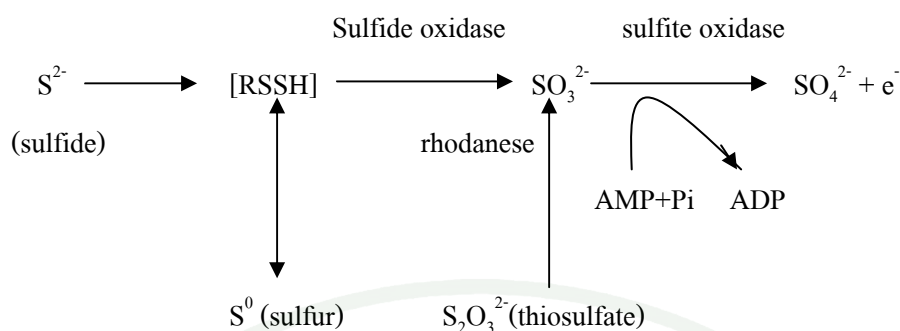
สามารถใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งให้คาร์บอน

แบคทีเรียทั้งสองชนิดอยู่ในกลุ่มเคโมออโตโทรฟ (chemoautotroph) ใช้เฉพาะคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอนแต่เพียงอย่างเดียว ในการสังเคราะห์สารซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ (CO_2 fixation) โดยผ่านทาง วัฏจักรคัลวิน (calvin cycle)

ส่วนพลังงานและ โคเอนไซม์รูปรีดิวซ์ที่จะนำมาใช้ในการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์นั้นจะ ได้มาจาก ATP และ $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยการออกซิไดซ์สารประกอบอนินทรีย์ชนิด ต่างๆสามารถออกซิไดซ์ซัลเฟอร์, ซัลไฟต์, ไฮโอซัลเฟต และสารประกอบซัลเฟอร์ เช่น โพลีไฮโดรเนต ให้เป็นซัลเฟตหรือซัลเฟอร์ ดังสมการ



อิเล็กตรอนที่ได้จากการออกซิไดซ์สารประกอบซัลเฟอร์เหล่านี้จะเคลื่อนที่เข้าสู่ electron transport system ได้พลังงานออกมา พลังงานที่ได้รับจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันนั้น บางส่วน สูญเสียไปในสภาพพลังงานความร้อนแต่ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งเป็นสารประกอบพลังงานสูงดังภาพที่ 3

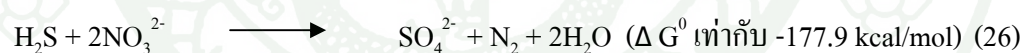


ภาพที่ 3 path way การออกซิไดซ์ซัลไฟด์ของ *T. denitrificans*

ที่มา: Kuenen (1975)

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน – รีดักชัน มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องมาจากเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้เองและมีพลังงานอิสระปล่อยออกมา ดังนั้นจึงมีค่าผลต่างของพลังงานอิสระ (free energy change, ΔG^0) เป็นลบ ตัวอย่างเช่น

1. ในสภาวะไร้อากาศ ไนเตรทสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนผลของปฏิกิริยาที่ได้ซัลเฟต ไนโตรเจน และ พลังงานอิสระ ดังสมการ



2. กรณี ออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ผลของปฏิกิริยาได้ซัลเฟตหรือซัลเฟอร์ และพลังงานอิสระ ดังสมการ



การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในก๊าซชีวภาพโดยระบบ Bio-trickling Filter

ระบบกรองชีวภาพที่นิยมใช้ในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในก๊าซชีวภาพสามารถแบ่งได้ 3 แบบคือ Biofilter, Bioscrubber และ Bio-trickling filter หลักการของ Bioscrubber คล้ายกับการดูดซับบนอนุภาคของเหลวแต่ของเหลวที่ใช้นั้นมีจุลินทรีย์ที่สามารถกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์อยู่ ดังนั้นนอกจากจะเกิดปฏิกิริยาดูดซับแล้ว ยังเกิดปฏิกิริยาชีวเคมี (bioreaction) อีกด้วย จึงมีประสิทธิภาพดีกว่า

ส่วน Biofilter และ Bio-trickling Filter นิยมใช้กันมากกว่า Bioscrubber เนื่องจากมีวัสดุกรองเป็นตัวกลางช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสกันของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์กับจุลินทรีย์ในคอลัมน์ที่ทำให้ปฏิกิริยาทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดที่ดียิ่งขึ้น

ข้อแตกต่างระหว่าง Biofilter กับ Bio-trickling Filter อยู่ที่ชนิดของวัสดุกรองที่ใช้ คือ Biofilter หรือที่เรียกกันว่า ระบบกรองแบบดั้งเดิม ใช้วัสดุกรองในธรรมชาติ ได้แก่ ดินปุ๋ย (compost) หรือ peat ซึ่งก็เป็นดินปุ๋ยอีกประเภท วัสดุกรองเหล่านี้มักจะมีจุลินทรีย์และสารอาหารที่เหมาะสมอยู่ในตัวเองอยู่แล้ว ส่วน Bio-trickling Filter หรือ ระบบกรองแบบหยด จะใช้วัสดุกรองที่เป็นวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูปร่างให้พื้นที่ผิวในการสัมผัสระหว่างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์กับจุลินทรีย์มาก ชนิดของวัสดุที่นิยมใช้คือ พลาสติก เซรามิก หรือแก้ว

ระบบกรองชีวภาพแบบดั้งเดิม กับแบบหยด มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ข้อดีของแบบดั้งเดิมคือ วัสดุกรองนั้นหาง่าย ราคาถูก มีสารอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จึงทำให้ระบบมีเสถียรภาพสูง แต่มีข้อเสียคือ การที่มีอากาศไหลผ่านคอลัมน์ตัวกรองไปนานๆ ทำให้เกิดความแห้งในวัสดุกรอง ซึ่งจุลินทรีย์ต้องการความชื้นในการเจริญเติบโต จึงต้องมีการเติมน้ำเข้าสู่ระบบอย่างเหมาะสม ถ้าระบบมีน้ำมากเกินไปก็อาจเกิดการอัดตัวของวัสดุกรองเมื่อทำงานไปนานๆ หรือเกิดภาวะน้ำท่วมในวัสดุกรอง ซึ่งทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศในระบบ ไม่เป็นผลดีต่อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต

ในงานวิจัยนี้เลือกระบบ Bio-trickling Filter เพราะใช้วัสดุกรองที่เป็นวัสดุสังเคราะห์ ป้องกันการรบกวนจากการดูดซับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของวัสดุกรอง สามารถควบคุมสารอาหารในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ และวัสดุกรองมีพื้นที่ผิวมากเหมาะแก่การเกาะของจุลินทรีย์

หลักการของระบบ Bio-trickling Filter ต่างจากระบบกำจัดอื่นๆคือแบคทีเรียจะถูกเลี้ยงให้เกาะเป็นเมือก หนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร รอบตัวกลางที่ทำด้วยวัสดุแข็ง เช่น ก้อนหินหรือแผ่นพลาสติก ถึงปฏิกิริยาของระบบนี้จึงเป็นถังกลมหรือสี่เหลี่ยมสูง ไม่น้อยกว่า 2 เมตร ในตัวถังมีตัวกลางบรรจุอยู่เต็ม น้ำทิ้งจะถูกนำมาโปรยบนผิวหน้าของถังปฏิกิริยาและจะไหลหยด (trickling) ผ่านตัวกลางลงสู่ก้นถัง ในขณะที่น้ำทิ้งไหลผ่านเมือกแบคทีเรียรอบตัวกลาง แบคทีเรียจะดูดซึมสารอินทรีย์ต่างๆเข้าไปในขณะเดียวกันก็จะทำลายสารอินทรีย์ด้วยปฏิกิริยาแบบใช้ออกซิเจน เมื่อกแบคทีเรียจึงเจริญเติบโตหนาขึ้นจนในที่สุดแบคทีเรียชั้นในที่เกาะกับตัวกลางจะตายเนื่องจากขาดอาหาร จึงทำให้เมือกแบคทีเรียหลุดจากตัวกลางปะปนมาไปกับน้ำทิ้ง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sublette *et al.* (1987) ศึกษาการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยอาศัย *Thiobacillus denitrificans* ในระบบถังปฏิกรณ์แบบกะ พบว่าภายใต้ sulfide-limiting condition (ความเข้มข้นของซัลไฟด์ภายในถังปฏิกรณ์ต่ำกว่า $1 \mu\text{m}$) ซัลไฟด์จะถูกออกซิไดซ์ไปด้วยอัตรา $4-5 \text{ mmol/h-g biomass}$ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้งหมดจะอยู่ในรูปของซัลเฟต โดยตรวจไม่พบซัลเฟอร์และไฮโดรเจนซัลไฟด์ในก๊าซที่ออกจากถังปฏิกรณ์ อัตราการออกซิไดซ์ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ สูงสุดภายใต้สภาวะไร้อากาศที่ได้จากการทดลองนี้อยู่ระหว่าง $5.4-7.6 \text{ mmol-S/hr-g biomass}$ โดยในช่วงนี้จะเริ่มมีซัลไฟด์สะสมภายในถังปฏิกรณ์และมีซัลเฟอร์เกิดขึ้น

Gadre (1988) กำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในก๊าซชีวภาพในสภาพอับอากาศโดยใช้เชื้อ *Thiobacillus denitrificans* ในถังปฏิกรณ์ชีวแบบ fixed film โดยใช้ปริมาตรของ fixed film/ปริมาตรของ filter 0.55% ($50\text{ml}/9000\text{ml}$) สามารถบำบัดได้ 6042 ml/d (STR) ที่อุณหภูมิ $26-28^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 35 days ลดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จาก 2.04% โดยปริมาตร (คิดเป็น 187 mg/d) เป็น 0.62% (คิดเป็น 57.2 mg/d) กำจัดซัลไฟด์ได้ 122.6 mg/d (ในรูปกำมะถัน 25.3 mg/d และรูปซัลเฟต 25.0 mg/d) ขณะที่คาร์บอนไดออกไซด์ลดลงคิดเป็น 7% ประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์คิดเป็น 2.3 mmol/l-hr

Guoqiang (1994) นำเชื้อ *Thiobacillus ferrooxidans* มาประยุกต์กับหอสัมผัสแพคเบด (packed bubble) ในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในช่วงความเข้มข้น $1.0-2.5 \text{ g/m}^3$ ได้มากกว่า 95% ที่อัตราการป้อนก๊าซชีวภาพ $1000 \text{ m}^3/\text{d}$ โดยทำงานร่วมกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นฟิล์มทำงานแบบกึ่งต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 30°C ที่ pH 2.0 และ residence time 4 hr ใช้อัตราการป้อนเหล็กเฟอร์รัส (ความเข้มข้นไม่เกิน 5 g/L) มากที่สุดเท่ากับ 1170.87 mg/L-h จะผลิตเหล็กเฟอร์ริก 1.0 mg/L-hr เมื่อป้อนอากาศ $30 \text{ m}^3/\text{hr}$ และอัตราการแทน (replaced) 50% เป็นเวลา 30 days ได้กำมะถันเป็นผลพลอยได้

Sublette *et al.* (1994) ศึกษาการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยอาศัย *Thiobacillus denitrificans* ที่ถูกตรึงอยู่ภายใน macroscopic flog ภายใน bubble column พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะขึ้นอยู่กับค่าการถ่ายเทมวลของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ การเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถทำได้ด้วยการเพิ่มระยะเวลาการสัมผัสระหว่าง gas phase และ liquid phase สำหรับอัตราการกำจัดก๊าซ

ไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงสุดที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ $0.40 \text{ mol m}^3/\text{h}$ ที่ aeration rate $0.19 \text{ m}_g^3/\text{min}-\text{m}_{\text{aq}}^3$, superficial gas velocity 0.87 m/s และความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ใน sour gas เท่ากับ 0.97 g/m^3

Janssen *et al.* (1995) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจนและซัลไฟด์ (O_2/S^{2-}) ที่มีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิไดซ์ซัลไฟด์ (Na_2S) โดย mixed culture ของแบคทีเรียตระกูล *Thiobacilli* ในระบบ free-cell suspension แบบ fed-batch พบว่าการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ให้แก่ระบบจะมีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยเมื่อระบบได้รับออกซิเจนมากเกินไปพอผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นซัลเฟต และจะเริ่มเกิดซัลเฟอร์ขึ้นเมื่อระบบอยู่ในสถานะที่มีออกซิเจนจำกัดโดยซัลเฟอร์เกิดขึ้นมากที่สุดที่อัตราส่วนการไหลเชิงโมลระหว่างออกซิเจนต่อซัลไฟด์ที่ใช้เท่ากับ 0.7 ที่อัตราส่วนต่ำกว่านี้ความสามารถของชีวมวลในการออกซิไดซ์ซัลไฟด์จะลดลงและเกิดไฮโอซัลเฟตเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมี

Chung *et al.* (1996) ศึกษา operating parameter ของการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยอาศัย *Thiobacillus thiooparus* ในระบบ biofilter ที่มีการตรึงเซลล์ไว้ใน calcium-alginate pellet packing material ซึ่งได้แก่ retention time อัตราการป้อนก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์และ ประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ พบว่าที่ระยะเวลาพักเก็บ 28 วินาที ประสิทธิภาพในการกำจัดสูงกว่า 98% และอัตราการป้อนซัลไฟด์ที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ $25 \text{ g/m}^3\text{-h}$ นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะเดียวกัน (volumetric flow rate ของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และ ความชื้นภายใน packed column) ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ป้อนจะมีผลต่ออัตราการเกิดซัลเฟอร์ โดยที่ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สูง (60 ppm) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่ (72%) จะเป็นซัลเฟอร์ ในขณะที่ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ต่ำ (5 ppm) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่ (75%) จะเป็นซัลเฟต

สุกเวท (2542) ศึกษาการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีอยู่ในก๊าซชีวภาพ ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยาเคมีและชีวเคมี ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ทำปฏิกิริยาเคมีกับเหล็กเฟอร์ริกภายในหอสัมผัสแบบแพกเบด ทำให้เกิดเป็นซัลเฟอร์และเหล็กเฟอร์รัส และใช้เชื้อแบคทีเรีย *Thiobacillus ferrooxidans* ออกซิไดซ์เหล็กเฟอร์รัสได้เป็นเหล็กเฟอร์ริก ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวภาพ พบว่าที่ความเข้มข้นสารละลายเฟอร์ริกซัลเฟต 1 mM ความเข้มข้นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็น 0.01% และอัตราการป้อนก๊าซเข้าหอสัมผัสคงที่เป็น 100 L/hr ค่าคงที่เสนอปรากฏของก๊าซ จะมีค่าเท่ากับ 5400 (หรือ $0.097 \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) และค่า maximum specific growth rate (μ_m) และ monod all growth saturation coefficient (k_s) มีค่าเท่ากับ $0.079/\text{hr}$ และ 0.006 M ตามลำดับ

จีวิน (2543) ศึกษาผลของอัตราการเติมออกซิเจนที่มีต่อการออกซิไดซ์ซัลไฟด์ไปเป็นซัลเฟต โดยอาศัยเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3.0 L แบบต่อเนื่อง โดยทำการศึกษาที่อัตราการป้อนสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ (NaHS) เท่ากับ 2.0 mmol-S /L-hr และเปลี่ยนแปลงอัตราเติมออกซิเจนในช่วง 1.2 – 7.4 mmol-O₂/l-hr พบว่าเมื่อระบบได้รับออกซิเจนมากเกินไปพอผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นซัลเฟต และเริ่มเกิดซัลเฟอร์ขึ้น เมื่อระบบอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดคือที่อัตราส่วนการไหลเชิงโมลระหว่างออกซิเจนซัลไฟด์ที่ใช้ (mol-O₂/l-hr) ต่ำกว่า 2.4 โดยซัลเฟอร์เกิดขึ้นมากที่สุดที่อัตราส่วนการไหลเชิงโมลระหว่างออกซิเจนต่อซัลไฟด์ที่ใช้เท่ากับ 0.9 ที่อัตราส่วนต่ำกว่านี้ความสามารถของชีวมวลในการออกซิไดซ์ซัลไฟด์จะลดลงและเกิดไฮโดรซัลเฟตขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมี

Kleerebezem and Mendez (2002) ศึกษา autotrophic denitrification สำหรับการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จากก๊าซชีวภาพและ หลังเกิดปฏิกิริยา denitrification ในน้ำเสียที่เต็มไปด้วยสารอินทรีย์ คือ แอมโมเนีย (หรือ ไนโตรเจน อินทรีย์) และ ซัลเฟต ของโรงงานปลากระป๋องโดยศึกษาพารามิเตอร์สำหรับการเกิด autotrophic denitrification ของ *Thiobacillus denitrificans* ในรูปแบบ fixed-film reactors ใช้ โซเดียมซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน พบว่า เมื่อควบคุมปริมาตรในการบำบัด (< 1gNO₃-N/L-d) และสร้าง mass balance ทำให้เห็นว่าการเกิดซัลไฟด์ออกซิเดชันเป็นธาตุซัลเฟตไม่สมบูรณ์ เพราะมีข้อจำกัดของมวลชีวภาพ และขนาดของ reactor

Yanling *et al.* (2005) ศึกษาการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยอาศัย *Thiobacillus denitrificans* ที่ถูกตรึงอยู่บน peat moss, wood chip, ceramic และ Granular Activated Carbon (GAC) พบว่า *Thiobacillus denitrificans* ถูกตรึงบน GAC ได้ดี โดยมีความต้านทานต่อ shock loading และ สามารถดำเนินงานได้ดีเมื่อเกิด pressure drop ที่ระยะเวลาการกักเก็บ 30-100 วินาที ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ก่อนเข้าระบบ 100 mg/L ระบบสามารถกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ 98% เมื่อความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ก่อนเข้าระบบ 110-120 mg/L ระบบสามารถกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้เฉลี่ย 96.8%ในระยะยาว และพบว่า wood chip เป็นวัสดุบรรจุที่ดี แต่ peat moss และ ceramic ยังมีข้อจำกัด และ ประสิทธิภาพในการกำจัดก็น้อยกว่า 90%

Yanling *et al.* (2006) ได้ศึกษาการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยอาศัย *Thiobacillus denitrificans* ที่ถูกตรึงอยู่บน Granular Activated Carbon (GAC) เพื่อหาความเป็นไปได้ของถึงปฏิกรณ์ชีวภาพในการรับ shock loading และประสิทธิภาพการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ที่อยู่บน GAC มีค่า adsorption สูง จุลินทรีย์แสดงให้เห็นว่าสามารถทนทาน shock loading และสามารถดำเนินงานได้ดีเมื่อเกิด pressure drop ที่ระยะเวลาการเก็บ 25 วินาที และความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ก่อนเข้าระบบ 100 mg/L ระบบสามารถกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ 98% (เฉลี่ย 96.8%) และพบว่าอัตราการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงสุด และค่าอิ่มตัวของถึงปฏิกรณ์ชีวภาพคือ 666.7 mg H₂S/L-d และ 20.8 mg/L ตามลำดับ.

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. คอลัมน์โพรยกรอง (ภาพที่ 4)

1.1 ท่อ acrylic เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.62 เซนติเมตร สูง 53.34 เซนติเมตร ด้านบนมีหัวโพรยตัวอย่างและ ท่อเก็บตัวอย่างก๊าซที่ผ่านคอลัมน์ ด้านล่างมีหัวฟุ้งก๊าซเข้าระบบ และมีท่อเก็บตัวอย่างน้ำออกจากคอลัมน์สูงขึ้น ไปจากขอบล่าง 5.08 เซนติเมตร มีแผ่นกั้น bioball

1.2 เครื่องสูบน้ำที่ปรับอัตราการไหลได้ (peristaltic pump)

1.3 ถังบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนเข้าระบบ

1.4 ถังเก็บก๊าซโดยการแทนที่น้ำ

1.5 ตัวกลางสำหรับแบคทีเรียยีสต์เกาะ (bioball) ลูกบอลพลาสติกทรงกลมมีรูพรุนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 5)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1 Autoclave Tomy Sx-500

2.2 Spectrophotometer HACH DR/4000U

2.3 pH meter Metrohm 827 pH lab

2.4 เครื่องชั่งละเอียด รุ่น 2100 MP2 ยี่ห้อ Sartorius

2.5 ชุดกรองสูญญากาศพร้อมกระดาดกรอง

2.6 ตู้อบที่มีเครื่องควบคุมอุณหภูมิภายใน (hot air oven)

2.7 ตู้เคสิเคเตอร์ พร้อมสารดูดความชื้น

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Lenore *et al.*, 1998, Ronald , 2005.)

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiobacillus medium (for the cultivation of *Thiobacillus thioparus*)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* medium

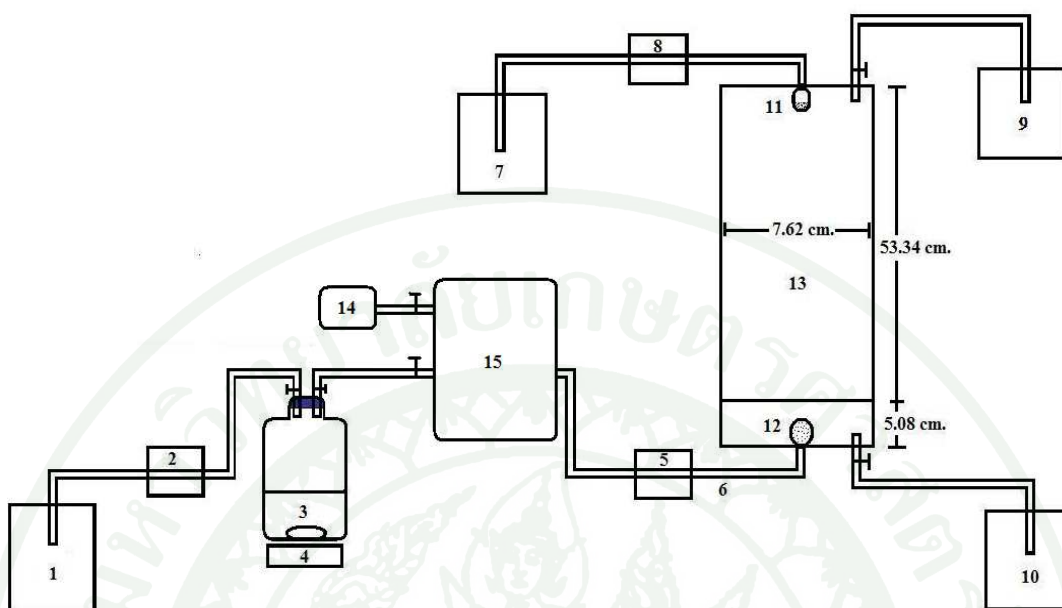
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar

3.4 วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโดยน้ำหนักแห้ง/ลิตร (dry weight)

3.5 สารเคมีวิเคราะห์ความเข้มข้นซัลเฟต (turbidimetric method)

3.6 สารเคมีวิเคราะห์ความเข้มข้นไนเตรท (cadmium reduction method)

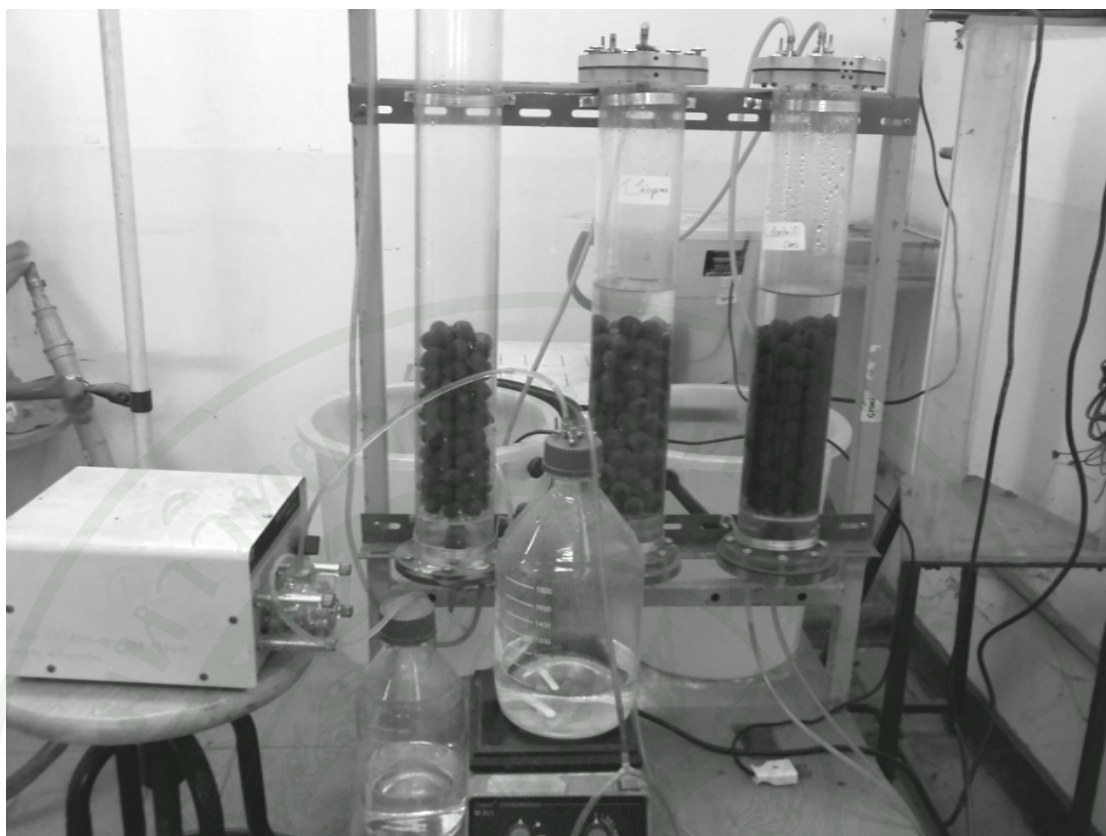
3.7 สารเคมีวิเคราะห์ความเข้มข้นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (iodometric method)



ภาพที่ 4 รูปแบบคอลัมน์ที่ใช้ในการทดลอง (1)ขวดบรรจุกรดซัลฟิวริก, (2)peristaltic pump,(3)ขวดบรรจุสารละลายโซเดียมซัลไฟด์และแท่งแม่เหล็ก, (4)magnetic stirrer, (5)Air compressor, (6)ท่อนำก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้าคอลัมน์, (7)ถังเก็บอาหารก่อนนำเข้าคอลัมน์, (8)water pump, (9)ถังเก็บตัวอย่างก๊าซหลังจากออกจากคอลัมน์, (10)ถังเก็บน้ำตัวอย่างหลังจากออกจากคอลัมน์, (11)หัวโปรยกระจายอาหารเข้าสู่คอลัมน์, (12)หัวฟุ้งก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้าสู่คอลัมน์, (13)คอลัมน์, (14)air pump, (15)mixing gas



ภาพที่ 5 ตัวกลางสำหรับแบคทีเรียยีสต์เกาะ (bioball)



ภาพที่ 6 แสดงระบบที่ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

1. วิเคราะห์คุณสมบัติของ UASB effluent

ลักษณะสมบัติของ UASB effluent ทางเคมีและทางจุลชีววิทยา (การนับจำนวนประชากร) วิเคราะห์ตามวิธีใน standard method (Lenore *et al.*, 1998) แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ลักษณะสมบัติที่ใช้วิเคราะห์ UASB effluent

ลักษณะสมบัติ	method
1. ความเข้มข้นของซัลเฟต (turbidimetric method)	4500-SO ₄ ²⁻ E
2. ความเข้มข้นของไนเตรท (cadmium reduction method)	4500-NO ₃ ²⁻ E
3. ความเข้มข้นไฮโดรเจนซัลไฟด์ละลายน้ำ	4500-S ²⁻ E
4. น้ำหนักแห้ง/ลิตร (dry weight)	2540D
5. พีเอช (pH)	4500-H ⁺
6. จำนวน MPN ของ heterotrophic aerobic bacteria (nutrient broth)	9221C
7. จำนวน MPN ของเชื้อใน <i>Thiobacillus denitrificans</i> medium	9221C
8. จำนวน MPN ของเชื้อใน <i>Thiobacillus</i> medium (for the cultivation of <i>Thiobacillus thioparus</i>)	9221C

2. การคัดแยกเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* และ *Thiobacillus thioparus* จาก UASB effluent และ การศึกษากิจกรรมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 นำ UASB effluent 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* medium และ *Thiobacillus* medium (for the cultivation of *Thiobacillus thioparus*) แบบเหลว (ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi 15 นาที) ปริมาตร 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาให้แน่น

2.2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (เก็บไว้เป็น starter)

2.3 ตรวจสอบอัตราการเจริญของเชื้อทั้งสองโดยนำตัวอย่างจากข้อ 2.2 ทั้งสองขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่ปริมาตร 1 ลิตร

2.4 ถ่ายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.3 ทั้งสองขวดลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดละ 10 หลอด ติดตามกิจกรรมของเชื้อโดยวิเคราะห์

- (1) น้ำหนักแห้ง/ลิตร (dry weight) เพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรีย
- (2) ซัลเฟต เพื่อติดตามผลิตภัณฑ์จากกิจกรรมของแบคทีเรีย โดยวิเคราะห์ด้วย

turbidimetric method

- (3) ไนเตรท เพื่อติดตามการใช้สารอาหาร โดยวิเคราะห์ด้วย cadmium reduction method

2.5 การทดลองในสถานะไม่มีเชื้อ (control)

- (1) เตรียมอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* medium และ *Thiobacillus* medium (for the cultivation of *Thiobacillus thioautotrophicus*) แบบเหลว (นิ่งมาเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi 15 นาที) ปริมาตร 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากันปิดฝาให้แน่น
- (2) ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองลงหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดละ 10 หลอดติดตามการเปลี่ยนแปลงโดยวิเคราะห์ น้ำหนักแห้ง/ลิตร ซัลเฟต และ ไนเตรท

2.6 การจัดจำแนกสกุลของเชื้อทั้งสอง

- (1) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยนำเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งสอง มาเขียนบน *Thiobacillus denitrificans* agar และ *Thiobacillus* agar ให้ได้โคโลนีเดี่ยวเพื่อทดสอบลักษณะของโคโลนีและศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการย้อมสีแกรม (Gram's stain) เพื่อตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์
- (2) ทดสอบสมบัติทางเคมี ทำการทดสอบสมบัติทางเคมีตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1975) ได้แก่การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction test) การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) (Kovac's method) เอนไซม์คะตาเลส (catalase test) ความสามารถในการเคลื่อนที่ (motile test) การผลิตอินโดล (indole production test) การทดสอบ Oxidation-Fermentation (O-F test) การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate utilization test) การทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide production test) รายละเอียดวิธีการย้อมสีแกรมและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงดังภาคผนวก ก

3. การปรับสภาพให้เชื้อยีสเกาะบนตัวกลางในคอลัมน์และปรับให้คุ้นเคยกับไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยการแทนที่ไรโอซัลเฟตด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

เนื่องจากในระบบบำบัดต้องการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* (*T_denitrificans*) และ เชื้อ *Thiobacillus thioparus* (*T_thioparus*) มีไรโอซัลเฟต ($S_2O_3^{2-}$) เป็นแหล่งพลังงาน จึงต้องเปลี่ยนแหล่งให้พลังงานโดยค่อยๆ แทนที่ไรโอซัลเฟตด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ที่อัตราส่วนไรโอซัลเฟตต่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ต่างๆ

การทดลองในขั้นตอนนี้ทำใน 2 สภาวะ คือ สภาวะไม่มีเชื้อ (abiotic) หรือใช้เป็นชุดการทดลองควบคุม และ สภาวะที่มีเชื้อโดยใช้คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* และคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus*

3.1 การเตรียมคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ (abiotic)

(1) นำเชื้อคอลัมน์ 2 คอลัมน์โดยการล้างด้วยกรรบอก่อน และ bioball โดยการนึ่งฆ่าเชื้อ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi 15 นาที)

(2) บรรจุ bioball ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในคอลัมน์ทั้ง 2 โดยคอลัมน์ที่ 1 บรรจุ อาหารเลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* medium คอลัมน์ที่ 2 บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus* medium ให้ท่วม bioball และขังไว้เป็นเวลา 2 วัน แล้วปล่อยทิ้ง 2 ใน 3 ของ คอลัมน์ แล้วโปรยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ เก็บตัวอย่างทุกวัน วิเคราะห์

(2.1) นำหนักแห้ง/ลิตร บนตัวกลางพลาสติกเพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

(2.2) องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ออกจากคอลัมน์ โดยวิเคราะห์ซัลเฟต

(3) โปรยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ในอัตรา 6 ลิตร/นาฬิกา โดยลดความเข้มข้นไรโอซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และพ่นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้าทางด้านล่างคอลัมน์ในอัตรา 6 ลิตร/นาฬิกา ผ่านหัวฟุ้ง โดยมีสัดส่วนของไรโอซัลเฟตในอาหารต่อความเข้มข้นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ 3:1 คิดเป็นความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ 0.34 กรัม-S/ลิตร ใน *Thiobacillus denitrificans* medium และ 0.68 กรัม-S/ลิตร ใน *Thiobacillus* medium ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุกวันวิเคราะห์

(3.1) นำหนักแห้ง/ลิตร บนตัวกลางพลาสติกเพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

(3.2) องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ออกจากคอลัมน์ โดยวิเคราะห์ซัลเฟต ในเตรท ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ละลายน้ำ

(4) ทำซ้ำข้อ (3) โดยเปลี่ยนสัดส่วนไนโตรเจนซัลไฟด์ในอาหารต่อความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็น 2:2 1:3 และ 0:4 คิดเป็นความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ 0.34, 0.69, 1.03, 0:1.37 กรัม-S/ลิตร ใน *Thiobacillus denitrificans* medium และ 0.68, 1.36, 2.04, 2.72 กรัม-S/ลิตร ใน *Thiobacillus* medium ตามลำดับ (แสดงวิธีคิดในภาคผนวก ก.) เก็บตัวอย่างทุกวันวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง/ลิตร ซัลเฟต ในเตรท ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์และไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ละลายน้ำ

3.2 การเตรียมคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. denitrificans* และคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. thioparus* โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วง

ช่วงที่ 1 ปรับสภาวะให้เชื้อยึดเกาะบน bioball

- (1) ฆ่าเชื้อคอลัมน์ 2 คอลัมน์โดยการล้างด้วยกรดอ่อน และ bioball โดยการนั่งฆ่าเชื้อ
- (2) บรรจุ bioball ลงในคอลัมน์ทั้ง 2
- (3) ถ่ายหัวเชื้อ (starter culture) ที่บ่มเพาะไว้ ลงในคอลัมน์ให้ท่วมสารกรอง และล้างไว้เป็นเวลา 2 วัน แล้วปล่อยทิ้ง 2 ใน 3 ของ คอลัมน์
- (4) ผสมหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ในอัตราส่วนหัวเชื้อต่ออาหาร 1:10 โปรยในคอลัมน์ให้มีปริมาตรเท่าเดิม โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุก 2 วัน ทำซ้ำประมาณ 1 สัปดาห์หรือสังเกตเห็นเชื้อบน bioball

ช่วงที่ 2 ปรับสภาวะให้เชื้อคุ้นเคยกับสภาพการเจริญเติบโตในคอลัมน์ โดยเปลี่ยนส่วนผสมในข้อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว เก็บตัวอย่างทุกวันโดยวิเคราะห์ น้ำหนักแห้ง/ลิตร และ ซัลเฟต

ช่วงที่ 3 ปรับสภาวะให้เชื้อสามารถใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์แทนไนโตรเจนซัลไฟด์ได้

- (1) โปรยอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตรา 6 ลิตร/นาฬิกา โดยลดความเข้มข้นไนโตรเจนซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และพ่นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วยอัตรา 6 ลิตร/นาฬิกา ผ่านหัวฟุ้ง โดยมีสัดส่วนของไนโตรเจนซัลเฟตในอาหารต่อความเข้มข้นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ 3:1 คิดเป็นความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ 0.34 กรัม-S/ลิตร ใน *Thiobacillus denitrificans* medium และ 0.68 กรัม-S/ลิตร ใน *Thiobacillus* medium ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุกวันวิเคราะห์

(1.1) น้ำหนักแห้ง/ลิตร บนตัวกลางพลาสติกเพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

(1.2) องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ออกจากคอลัมน์ โดยวิเคราะห์ซัลเฟต ในเตรท ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ละลายน้ำ

(2) ทำซ้ำข้อ (1) โดยเปลี่ยนสัดส่วนไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอาหารต่อความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็น 2:2 1:3 และ 0:4 คิดเป็นความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ 0.34, 0.69, 1.03, 1.37 กรัม-S/ลิตร ใน *Thiobacillus denitrificans* medium และ 0.68, 1.36, 2.04, 2.72 กรัม-S/ลิตร ใน *Thiobacillus* medium ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุกวัน วิเคราะห์ น้ำหนักแห้ง/ลิตร ซัลเฟต ในเตรท ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์และไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ละลายน้ำ

4. การศึกษาความสามารถในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในคอลัมน์

เพื่อหาความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงสุดที่เชื้อทั้งสองสามารถกำจัด โดยทำการทดลองต่อการปรับสภาวะให้คุ้นเคยกับไฮโดรเจนซัลไฟด์แล้ว ซึ่งคอลัมน์ที่มีการโปรยกรอง *Thiobacillus denitrificans* medium และ คอลัมน์ที่มีการโปรยกรอง *Thiobacillus* medium มีการปนไฮโดรเจนซัลไฟด์ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1379 มิลลิกรัม-S/ลิตร และ 2728 มิลลิกรัม-S/ลิตร ตามลำดับ ทำการทดลองใน 2 สภาวะ คือ

4.1. สภาวะที่ไม่มีเชื้อ

(1) นำคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ 2 คอลัมน์ คือ คอลัมน์ที่มีการโปรยกรอง *Thiobacillus denitrificans* medium และ คอลัมน์ที่มีการโปรยกรอง *Thiobacillus* medium ที่ปรับสภาวะให้คุ้นเคยกับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์แล้ว ค่อยๆเพิ่มปริมาณก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ครั้งละ 100 มิลลิกรัม-S/ลิตร)

(2) เก็บตัวอย่างทุกวันวิเคราะห์

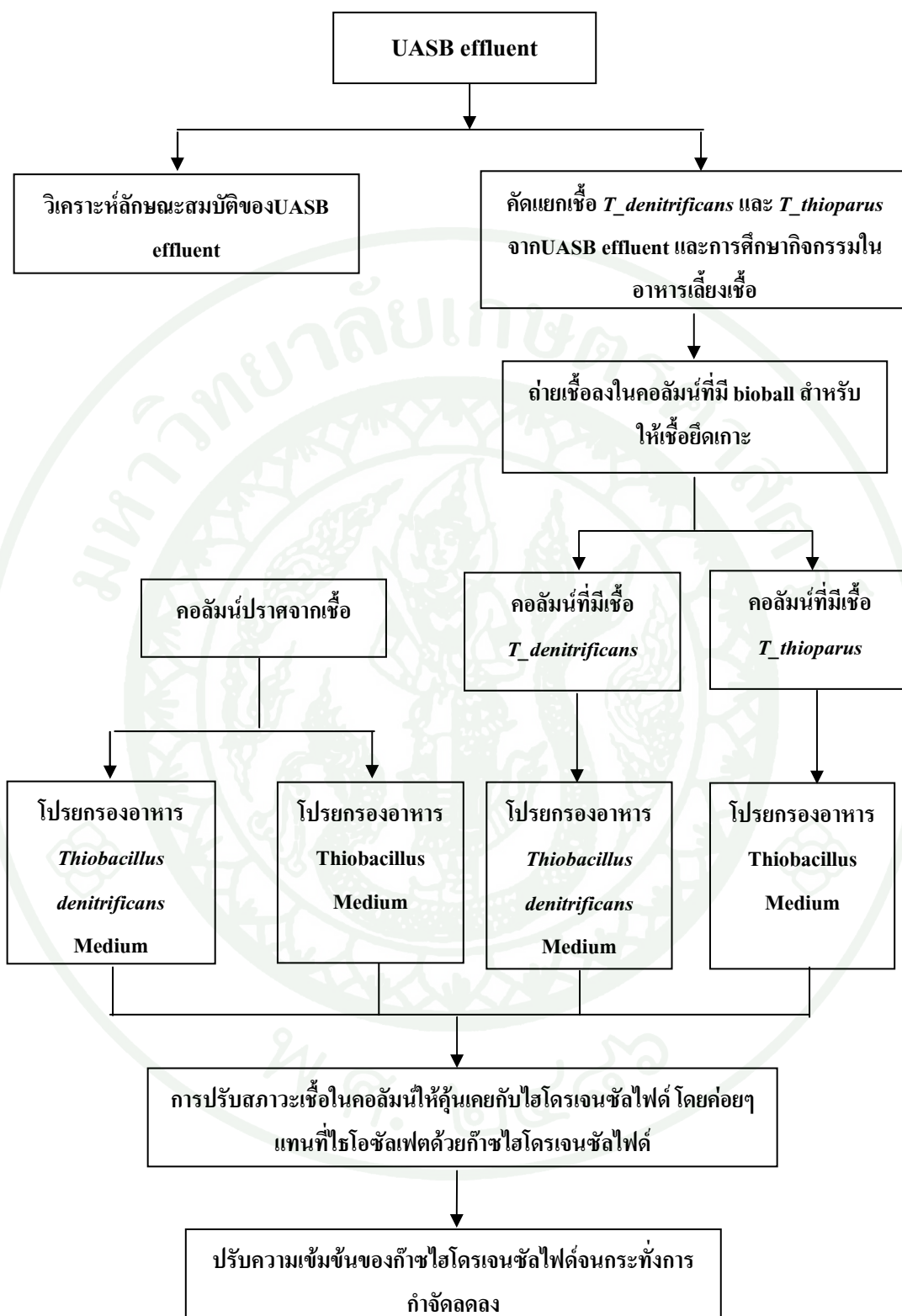
(2.1) น้ำหนักแห้ง/ลิตร บนตัวกลางพลาสติกเพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

(2.2) องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ออกจากคอลัมน์ โดยวิเคราะห์ซัลเฟต ในเตรท ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ละลายน้ำ

4.2. สภาวะที่มีเชื้อ

(1) นำคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. denitrificans* และคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. thioparus* ที่ปรับสภาวะให้คุ้นเคยกับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ปรับสภาวะแล้ว ค่อยๆเพิ่มปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ครั้งละ 100 มิลลิกรัม-S/ลิตร) จนกระทั่งเชื้อไม่สามารถทนได้

(2) เก็บตัวอย่างทุกวัน วิเคราะห์ น้ำหนักแห้ง ซัลเฟต ในเตรท ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ละลายน้ำ



ภาพที่ 7 วิธีการศึกษาในงานวิจัย

ผลและวิจารณ์

1. วิเคราะห์ลักษณะสมบัติของ UASB effluent

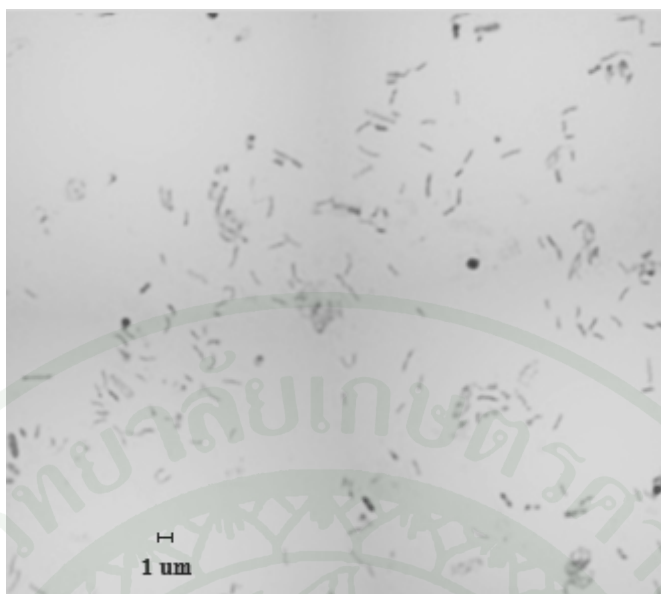
ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของ UASB effluent พบว่าใน UASB effluent มีความเข้มข้นของซัลเฟต และ ไนเตรตสูง ซึ่งเพียงพอต่อการเจริญของ autotrophic denitrificans มีประชากรของ heterotrophic aerobic bacteria 10^7 MPN/100 มิลลิลิตร และ ประชากรของเชื้อใน *Thiobacillus denitrificans* medium กับ *Thiobacillus thioparus* medium ใกล้เคียงกันในช่วง 10^4 MPN/100 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ลักษณะสมบัติของ UASB effluent

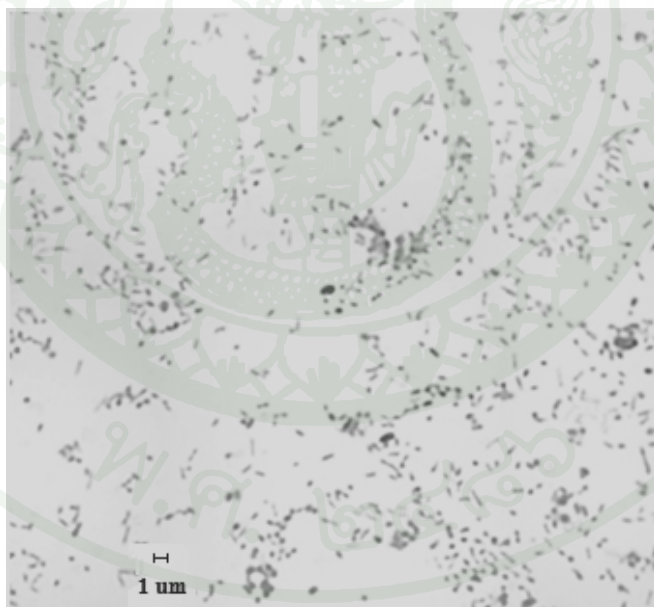
คุณสมบัติ	UASB effluent
ความเข้มข้นซัลเฟต (มิลลิกรัม/ลิตร)	390
ความเข้มข้นไนเตรต (มิลลิกรัม/ลิตร)	80
ความเข้มข้นไฮโดรเจนซัลไฟด์ละลายน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	16.4
น้ำหนักแห้ง/ลิตร (dry weight) (มิลลิกรัม/ลิตร)	700
พีเอช (pH)	7.32
จำนวน heterotrophic aerobic bacteria (MPN/100มิลลิลิตร)	6.4×10^7
จำนวนเชื้อใน <i>Thiobacillus denitrificans</i> medium (MPN/100มิลลิลิตร)	1.4×10^4
จำนวนเชื้อใน <i>Thiobacillus thioparus</i> medium (MPN/100มิลลิลิตร)	9.2×10^4

2. การคัดแยกเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* และ *Thiobacillus thioparus* จาก UASB effluent และศึกษากิจกรรมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเชื้อจาก UASB effluent ด้วย *Thiobacillus denitrificans* medium และ *Thiobacillus* medium พบการเจริญในอาหารทั้งสองชนิด และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบน *Thiobacillus denitrificans* agar และ *Thiobacillus* agar พบว่า โคโลนีมีลักษณะแบนราบขอบเรียบ ผิวหน้ำมัน สีขาวขุ่น และจากการสังเกตลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่า แบคทีเรียบน *Thiobacillus denitrificans* agar (ภาพที่8) เป็นรูปท่อนตรง (rod) เซลล์เดี่ยว ดิคลีแแกรมลบ และ แบคทีเรียบน *Thiobacillus* agar (ภาพที่9) เป็นรูปท่อนตรงสั้น (short rod) เซลล์เดี่ยว ดิคลีแแกรมลบ



ภาพที่ 8 ลักษณะเซลล์ของเชื้อที่เจริญบน *Thiobacillus denitrificans* Agar ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า



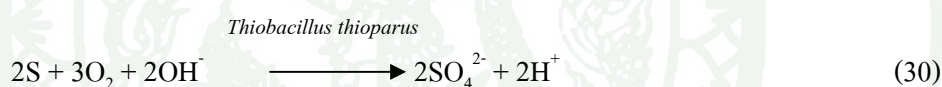
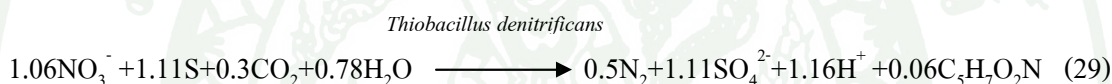
ภาพที่ 9 ลักษณะเซลล์ของเชื้อที่เจริญบน *Thiobacillus* Agar ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

เมื่อนำผลการทดสอบลักษณะทางชีววิทยาอื่นๆ (ตารางที่ 7) มาเปรียบเทียบกับลักษณะทาง
 สันฐานวิทยาของจุลินทรีย์ในหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Jame et al,
 1984) ในกลุ่ม gram-negative aerobic rods and cocci พบว่า แบคทีเรียทั้งสองเทียบเคียงได้กับ
 แบคทีเรียในสกุล *Thiobacillus* sp. คือใน *Thiobacillus denitrificans* medium มีความคล้ายคลึงกับ
 เชื้อ *Thiobacillus denitrificans* และ ใน *Thiobacillus* medium มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Thiobacillus*
thioparus

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสันฐานวิทยาและชีววิทยาของเชื้อที่เจริญในอาหาร *Thiobacillus* medium
Thiobacillus denitrificans medium กับ เชื้อ *Thiobacillus denitrificans* และ เชื้อ
Thiobacillus thioparus

Characteristics	<i>Thiobacillus</i> medium	<i>Thiobacillus</i> <i>denitrificans</i> medium	<i>Thiobacillus</i> <i>thioparus</i>	<i>Thiobacillus</i> <i>denitrificans</i>
Morphology	Short rods	Rods	Short rods	Rods
Cell length (μm)	1.0-1.5	1.0-2.0	1.0-2.0	1.0-3.0
Motility	+	+	+	+
Relation to O ₂	Aerobe	Facultative anaerobe	Aerobe	Facultative anaerobe
Temperature (°C)	30	30	25-30	28-32
pH	7.92	6.68	6.0-8.0	6.8-7.4
Catalase test	-	+	+/-	+
Oxidase test	+	+	+	+
Nitrate reduction test	+	+	+/-	+/-
Indole test	-	-	-	-
O-F test	-	-	+/-	+/-
Citrate test	+	+	+	+
Triple sugar iron	Alk/Alk+	Alk/Alk	Alk/Alk	Alk/Alk

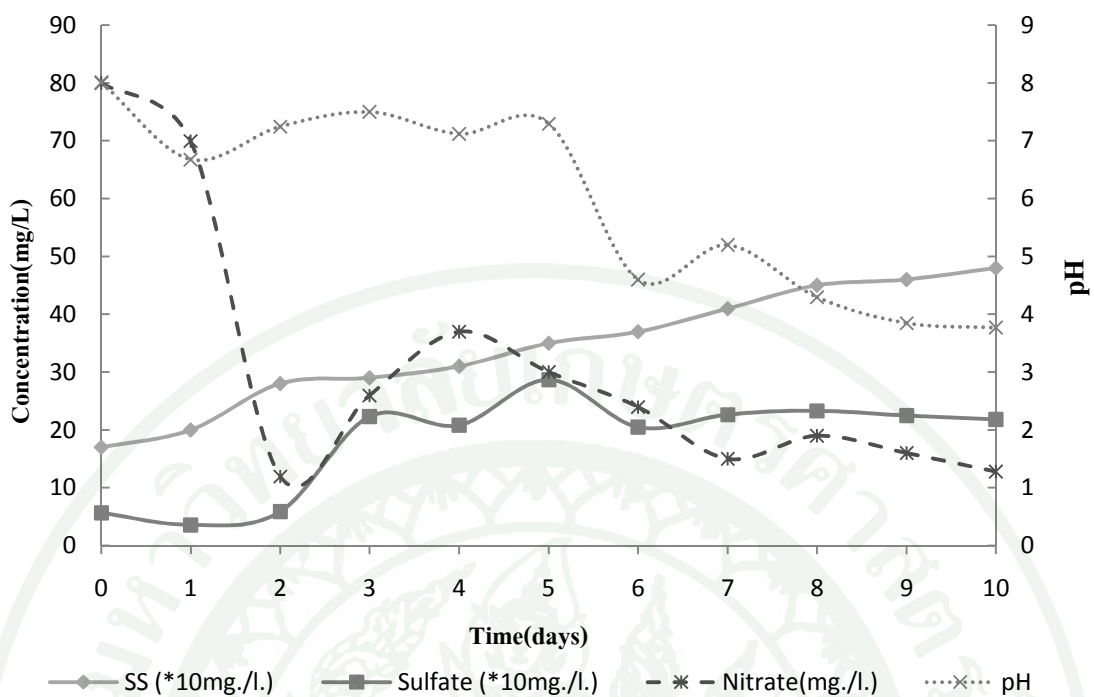
จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชุดการทดลอง (ภาพที่ 10 และ ภาพที่ 11) พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน คือ dry weight ซึ่งเป็นน้ำหนักแห้งของประชากรในขวดเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นในตรรกผลลง และ ชัลเฟตเพิ่มขึ้น(ชัลเฟตน้อยกว่าขั้นตอนวิเคราะห์คุณสมบัติของ UASB effluent เพราะเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีชัลเฟต) เนื่องจากไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนของเชื้อ *T_denitrificans* สอดคล้องกับสมการของที่ 29 (Batchelor and Lawrence, 1978) และ ชัลเฟตเป็นผลิตภัณฑ์ของ *T_thioparus* สอดคล้องกับสมการที่ 30 (Chung et al., 1996) เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญ จะพบว่า *T_denitrificans* ค่อยๆเพิ่มประชากรไปเรื่อยๆ แต่ *T_thioparus* จะเห็นช่วง exponential ชัดเจน ในวันที่ 4-10 เมื่อหาอัตราการเจริญ (growth rate, r_x) และ specific growth rate (μ) ของเชื้อทั้งสองในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้สมการที่ 31 และ 32 พบว่าในสภาวะที่มีสารอาหารพอเหมาะ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อ *T_thioparus* มีอัตราการเจริญ 155 มิลลิกรัม/ลิตร-วัน และ specific growth rate 0.258 ต่อวัน สูงกว่า *T_denitrificans* ที่มีอัตราการเจริญ 35 มิลลิกรัม/ลิตร-วัน และ specific growth rate 0.078 ต่อวัน



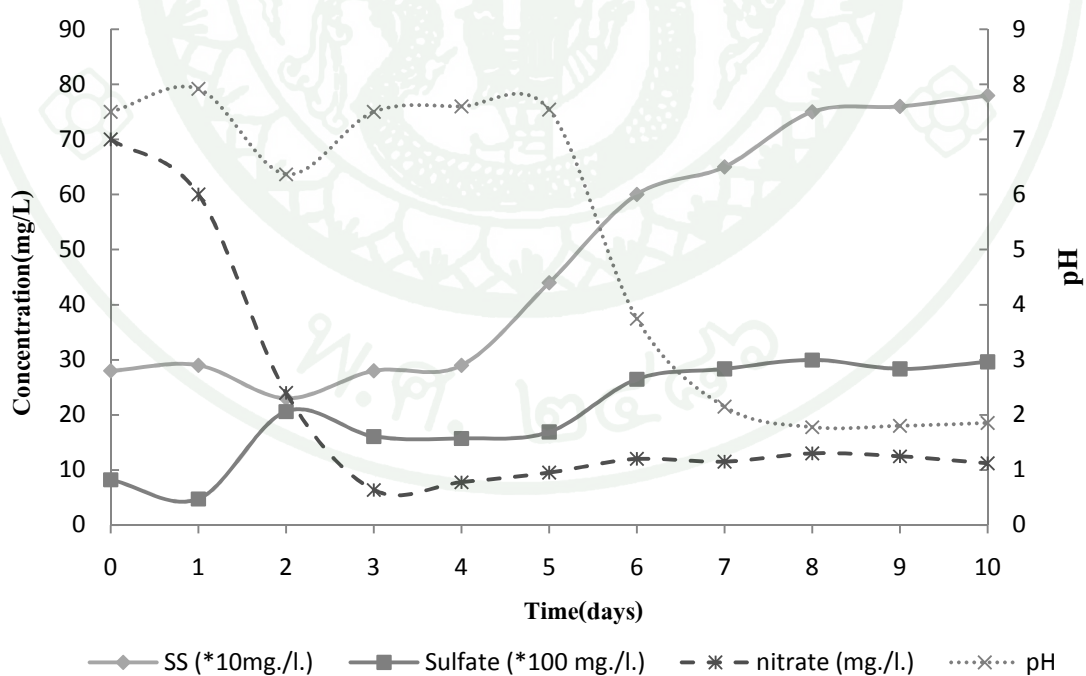
$$r_x = \frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \quad (31)$$

$$\mu = \frac{r_x}{C_x} \quad (32)$$

โดยที่	r_x	คือ อัตราการเจริญของเชื้อ (มิลลิกรัม/ลิตร-วัน)
	C_x	คือ ความเข้มข้นของเชื้อ, dry weight (มิลลิกรัม/ลิตร)
	μ	คือ Specific Growth Rate (ต่อวัน)
	t	คือ เวลา (วัน)



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงในอาหาร *Thiobacillus denitrificans* medium ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ



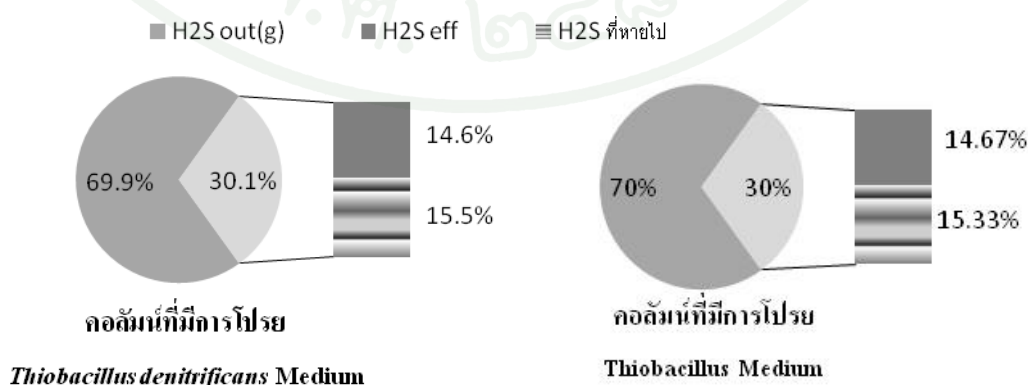
ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงในอาหาร *Thiobacillus* medium ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ

3. การปรับสภาวะให้เชื้อยีสเกาะบนตัวกลางในคอลัมน์และปรับให้คุ้นเคยกับไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยการแทนที่โซอิลเฟตด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

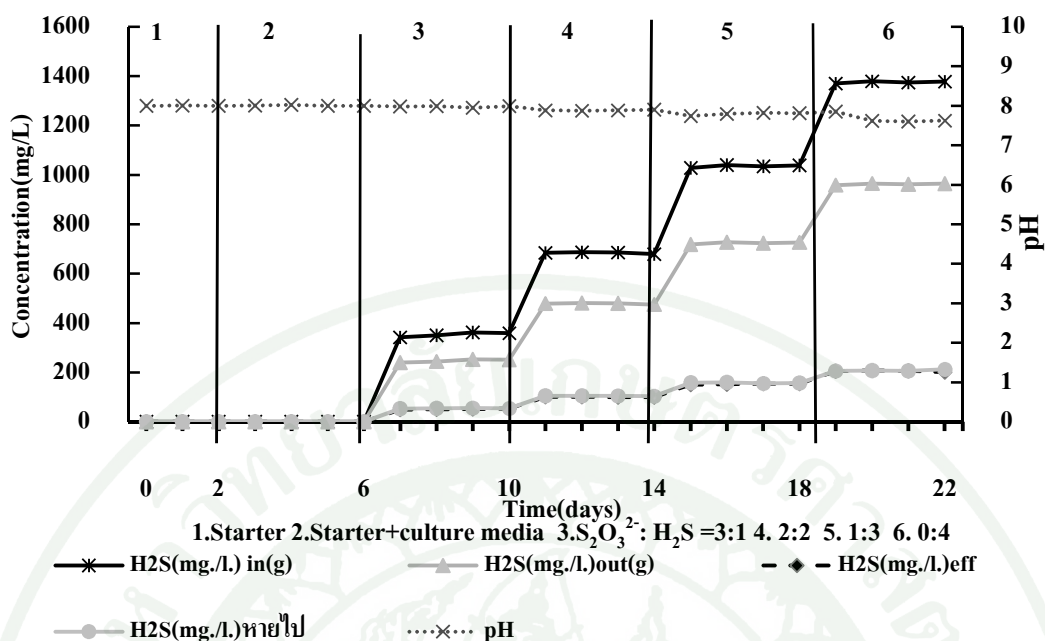
การทดลองนี้เป็นการทดลองในคอลัมน์ ซึ่งประกอบด้วย 2 สภาวะการทดลอง คือ คอลัมน์ไม่มีเชื้อ (abiotic column) และ คอลัมน์ที่มีเชื้อ โดยคอลัมน์ที่มีเชื้อ แบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* และ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus* เป็นการทดลองเพื่อให้เชื้อปรับสภาพการเจริญ ให้สามารถใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์แทนโซอิลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

3.1 การปรับสภาวะในคอลัมน์ไม่มีเชื้อ 2 คอลัมน์ คือ คอลัมน์ที่มีการโปรย *Thiobacillus denitrificans* medium และ คอลัมน์ที่มีการโปรย *Thiobacillus* medium หลังจากปรับสภาวะโดยการแทนที่โซอิลเฟตด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์แสดงดังภาพที่ 13 และ 14 ตามลำดับ

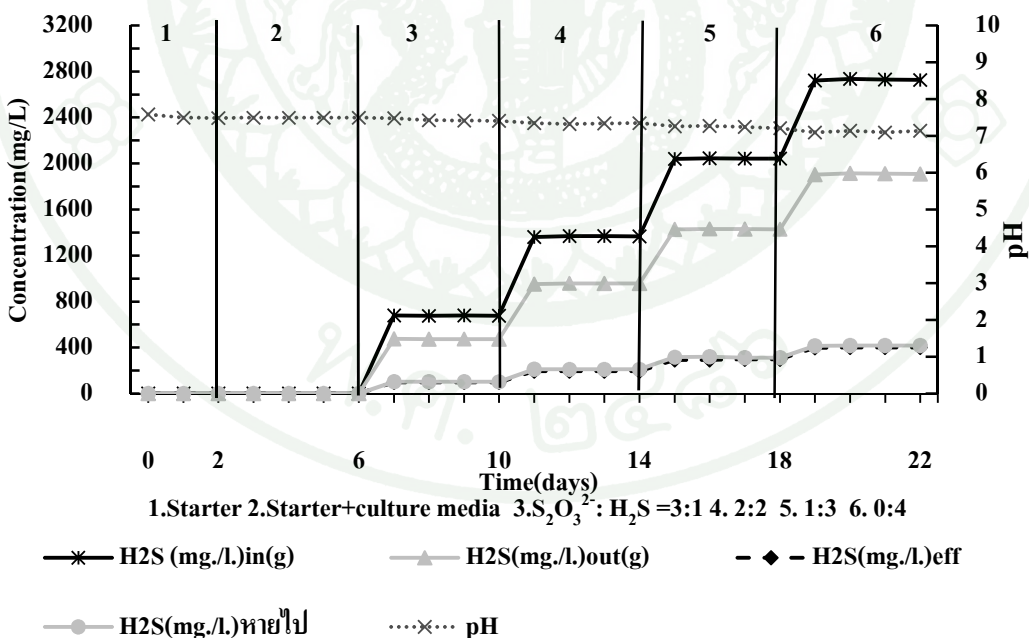
จะเห็นว่าเมื่อเชื้อเข้าสู่สภาวะที่หมายเลข 3 ซึ่งเป็นการแทนที่โซอิลเฟต ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์นั้น พบว่าความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ผ่านคอลัมน์ที่มีการโปรย *Thiobacillus denitrificans* medium กับ *Thiobacillus* medium (ภาพที่ 12) มีค่าลดลงร้อยละ 30.10 และ 30 จากขาเข้า และยังตรวจพบไฮโดรเจนซัลไฟด์ละลายในน้ำที่ออกจากระบบด้วย คิดเป็นร้อยละ 48.5 และ 48.9 ของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ลดลง (ร้อยละ 14.6 และ 14.67 จากขาเข้า) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dean (1979) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิการทดลอง) ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ละลายน้ำได้ร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก หรือ 0.0015 โมลแฟกชั่น แสดงว่าบางส่วนตกค้างสะสมในระบบ (ร้อยละ 51.5 และ 51.1 ของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ลดลง ร้อยละ 15.5 และ 15.33 จากขาเข้า) ทั้งนี้ไม่พบ biofilm สะสมบน bioball นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าพีเอชคงที่ และ ไม่มีซัลเฟตในน้ำที่ออกจากคอลัมน์



ภาพที่ 12 ความเข้มข้นไฮโดรเจนซัลไฟด์ของคอลัมน์ไม่มีเชื้อ ที่มีการโปรย *Thiobacillus denitrificans* medium กับ *Thiobacillus* medium



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของ *Thiobacillus denitrificans* medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อเมื่อแทนที่โซโอซัลเฟต ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์



ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของ *Thiobacillus* medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อเมื่อแทนที่โซโอซัลเฟต ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

3.2 การปรับสภาวะในคอลัมน์ที่มีเชื้อ (inoculated) มี 2 คอลัมน์ คือ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* และ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus* ผลดังแสดงในภาพที่ 15 และ 16 ตามลำดับ

การทดลองในส่วนนี้แบ่งเป็น 3 ช่วง

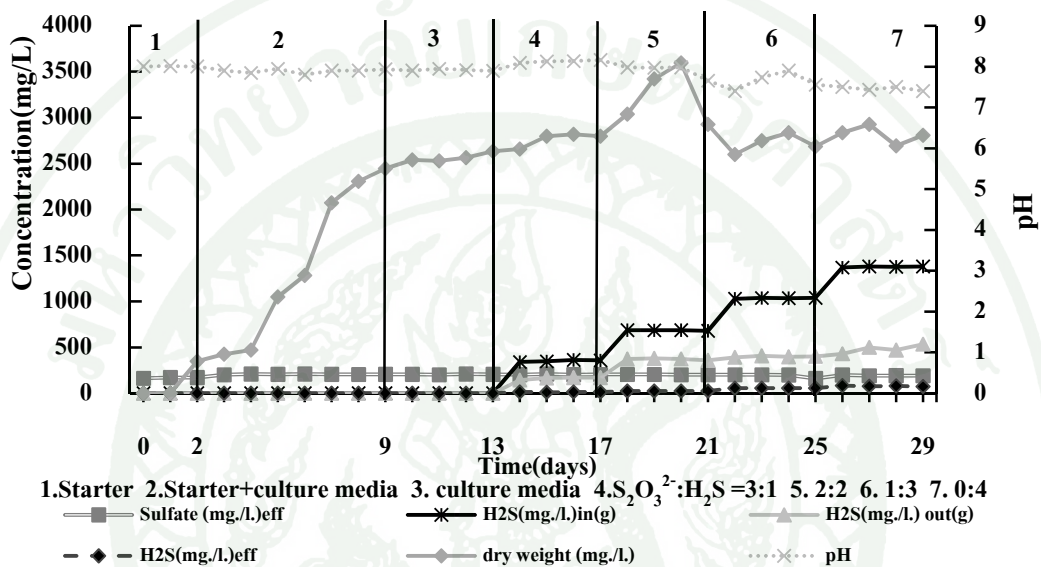
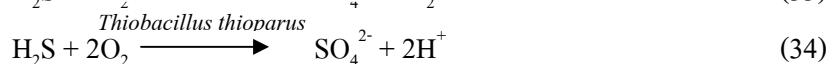
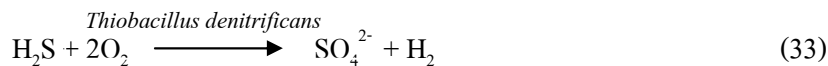
ช่วงที่ 1 (หมายเลข 1,2) เพาะเลี้ยงเชื้อให้ยืดยาวบน bioball ติดตามการสร้าง biofilm พบว่าในคอลัมน์ทั้งสองมีตะกอนสีขาวเกาะบน bioball น้ำหนักแห้ง ของ bioball ในคอลัมน์ทั้งสองเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเมื่อถึงวันที่ 7 ของการทดลอง น้ำหนักแห้ง/ลิตร ของ bioball ในคอลัมน์ทั้งสองเริ่มคงที่โดยคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus* มีค่า 4101 มิลลิกรัม/ลิตร สูงกว่า 2074 มิลลิกรัม/ลิตร ของคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* โดยที่น้ำออกจากคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* และ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus* มีปริมาณซัลเฟต 204.33 มิลลิกรัม/ลิตร, 452.84 มิลลิกรัม/ลิตร และ มีค่าพีเอช 7.93, 6.73 ตามลำดับ จากกราฟจะเห็นได้ว่าระบบเริ่มอยู่ในสภาวะคงที่จึงเริ่มทำการทดลองในช่วงต่อไป

ช่วงที่ 2 (หมายเลข 3) ปรับสภาวะให้เชื้อคุ้นเคยกับสภาพการเจริญเติบโตในคอลัมน์ โดยไปรยกรอง culture media เพียงอย่างเดียว น้ำหนักแห้ง, ซัลเฟต และ พีเอช ของคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* และ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus* มีค่าคงที่ คือ น้ำหนักแห้ง 2566, 2707 มิลลิกรัม/ลิตร ซัลเฟต 207, 449 มิลลิกรัม/ลิตร และ พีเอช 7.9, 6.2 ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อทั้งสองคุ้นเคยกับสภาพการเจริญเติบโตในคอลัมน์และเข้าสู่สภาวะคงที่ จึงเริ่มทำการทดลองในช่วงต่อไป

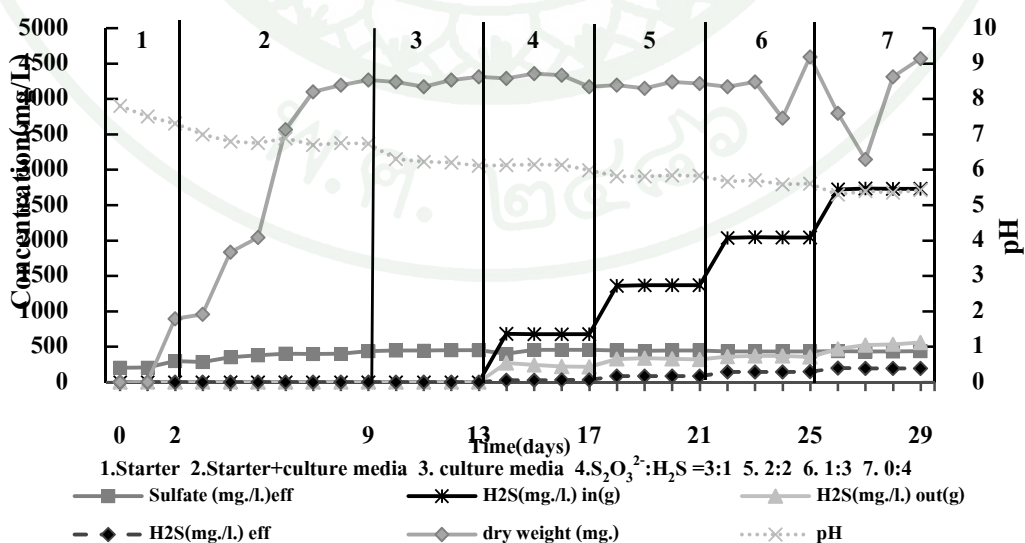
ช่วงที่ 3 (หมายเลข 4-7) การปรับสภาวะให้เชื้อสามารถใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์แทนไฮโอซัลเฟตได้ พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการแทนที่ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ประชากรของเชื้อในทั้งสองคอลัมน์มีค่าค่อนข้างคงที่ โดยที่ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ถูกกำจัดแปรผันตามสัดส่วนของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เข้าแทนที่โดยที่ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* กำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ในช่วง ร้อยละ 44-68 จากขาเข้า ในขณะที่คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus* กำจัดได้ในช่วง ร้อยละ 60-82 จากขาเข้า เป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วงแรกที่มีสัดส่วนก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ต่ำกว่าในช่วงหลัง การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ก็มีค่าต่ำด้วย ทั้งนี้เป็นเพราะในช่วงแรกยังมีไฮโอซัลเฟตเป็นแหล่งพลังงานอยู่ด้วย

จากการวิเคราะห์น้ำที่ออกจากคอลัมน์พบว่ามีซัลเฟต 192-208 มิลลิกรัม/ลิตร ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* และ 432-457 มิลลิกรัม/ลิตร ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus* ซัลเฟตซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ แต่ตรวจไม่พบในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ แสดงให้เห็นว่ามีกิจกรรมการใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในคอลัมน์ที่มีเชื้อทั้งสอง ทั้งนี้ค่าพีเอชของคอลัมน์ทั้งสองลดลงเมื่อการใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับสมการที่ 33 และ 34 ที่ Batchelor (1978) และ Chung (1996) เสนอว่าไฮโดรเจนไอออนเป็นผลจากการใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ อย่างไรก็ตามได้ตรวจพบว่ามีไฮโดรเจนซัลไฟด์ละลายอยู่ในน้ำจากคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans*

และ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus* คิดเป็น ร้อยละ 8.89 และ 8.85 ของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ลดลงตามลำดับ



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของ *Thiobacillus denitrificans* medium เมื่อแทนที่โซ โอซัลเฟต ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans*



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของ *Thiobacillus* medium เมื่อแทนที่โซ โอซัลเฟต ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus*

4. การศึกษาความสามารถในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในคอลัมน์

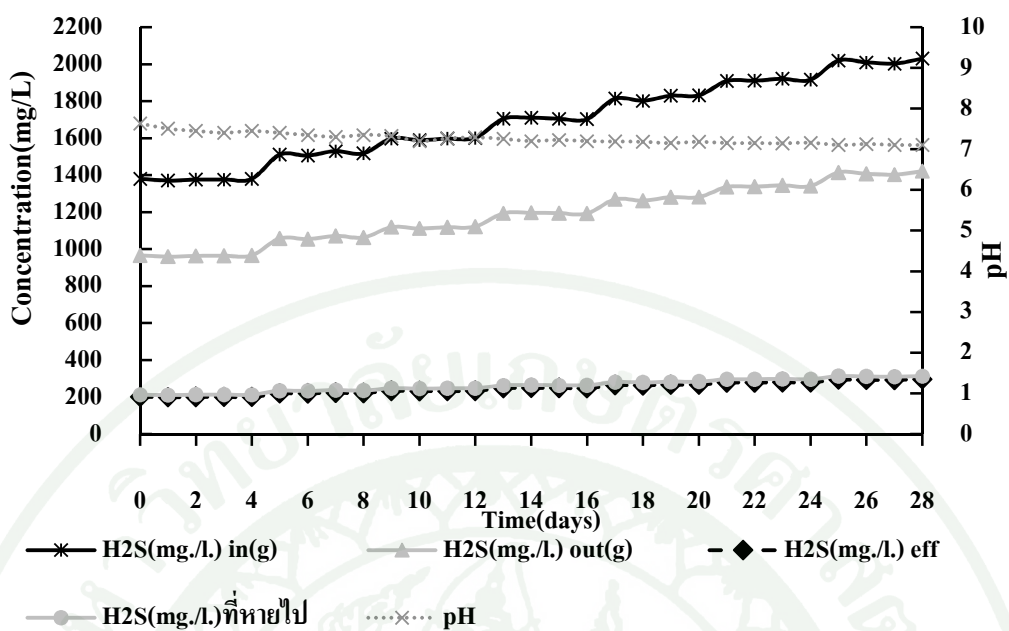
เป็นการหาความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงสุดที่เชื้อทั้งสองสามารถกำจัด โดยทำการทดลองต่อจากการปรับสภาวะให้คุ้นเคยกับไฮโดรเจนซัลไฟด์แล้ว ซึ่งคอลัมน์ที่มีการโปรย *Thiobacillus denitrificans* medium และ คอลัมน์ที่มีการโปรย *Thiobacillus* medium มีการพ่นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1379 มิลลิกรัม-S/ลิตร และ 2728 มิลลิกรัม-S/ลิตร ตามลำดับ ทำการทดลองใน 2 สภาวะ คือ

1. การทดลองในคอลัมน์ไม่มีเชื้อ

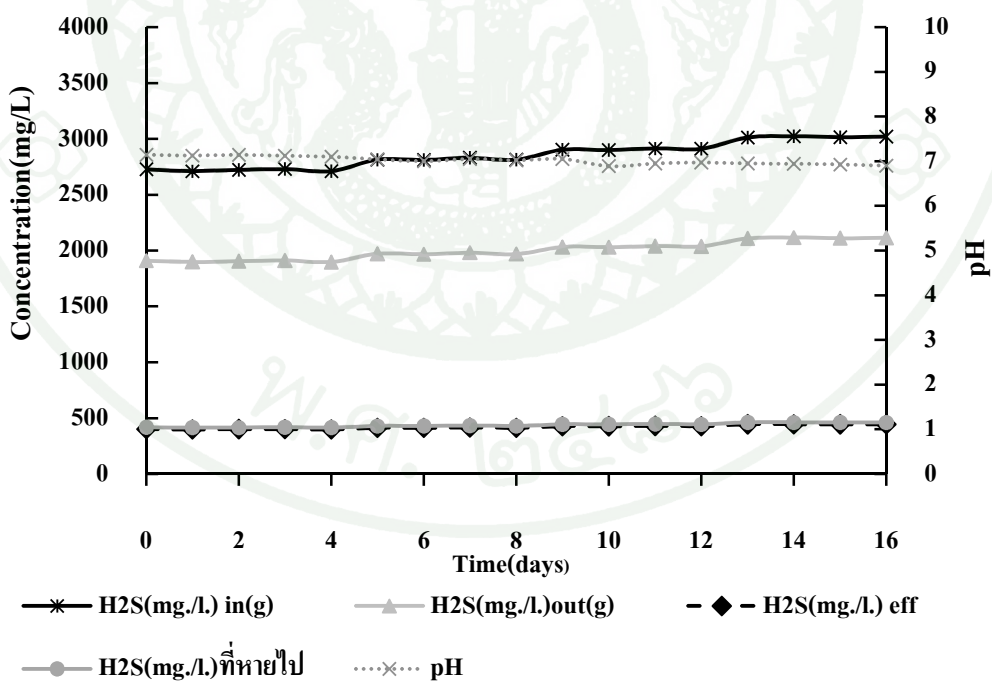
เมื่อค่อยเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อทั้งสอง คอลัมน์ ที่ทุกๆความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่พบการสร้าง biofilm โดยพบว่าก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ลดลงประมาณ ร้อยละ 30 จากขาเข้าของทุกความเข้มข้น และ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ละลายน้ำเพิ่มขึ้นตามการลดของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ คือ ร้อยละ 15 ของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ลดลง สอดคล้องงานวิจัยของ Piscarczyk (1982) ที่กล่าวไว้ว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถละลายน้ำได้สูงสุด 2806 มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ 17 และ 18) และ ไม่พบว่ามี biofilm สะสมบน bioball นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าพีเอชลดลงเล็กน้อย และ ไม่มีซัลเฟตในน้ำที่ออกจากคอลัมน์

2. การทดลองในคอลัมน์ที่มีเชื้อ (ภาพที่ 19 และ 20)

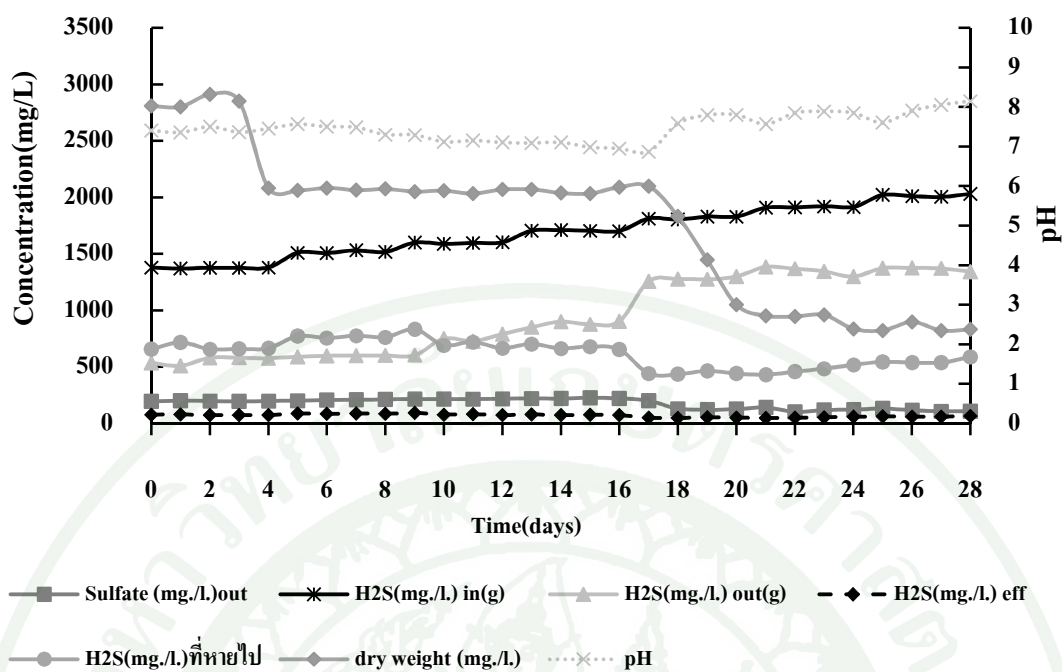
ในคอลัมน์ที่มีเชื้อพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่พ่นเข้าสู่คอลัมน์ มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยที่ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ถึง 1500 มิลลิกรัม/ลิตร ประชากรเริ่มลดลง และลดลงอย่างมากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ถึง 1800 มก./ล. ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลงเหลือ ร้อยละ 30.72 จากขาเข้า โดยจะเห็นได้ว่าปริมาณซัลเฟตที่ออกจากคอลัมน์ลดลง ปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์ละลายน้ำ และ พีเอชเพิ่มขึ้น สำหรับคอลัมน์ *T_thioparus* มีแนวโน้มเดียวกันแต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่า คือ ประชากรเริ่มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 2700 มิลลิกรัม/ลิตร เป็น 2800 มิลลิกรัม/ลิตร และ ประสิทธิภาพการกำจัดลดลงเหลือ ร้อยละ 29.82 จากขาเข้า แสดงได้ว่า เชื้อ *T_denitrificans* ทนต่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ถึงระดับ 1400 มิลลิกรัม/ลิตร และ เชื้อ *T_thioparus* ทนต่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ถึงระดับ 2700 มิลลิกรัม/ลิตร



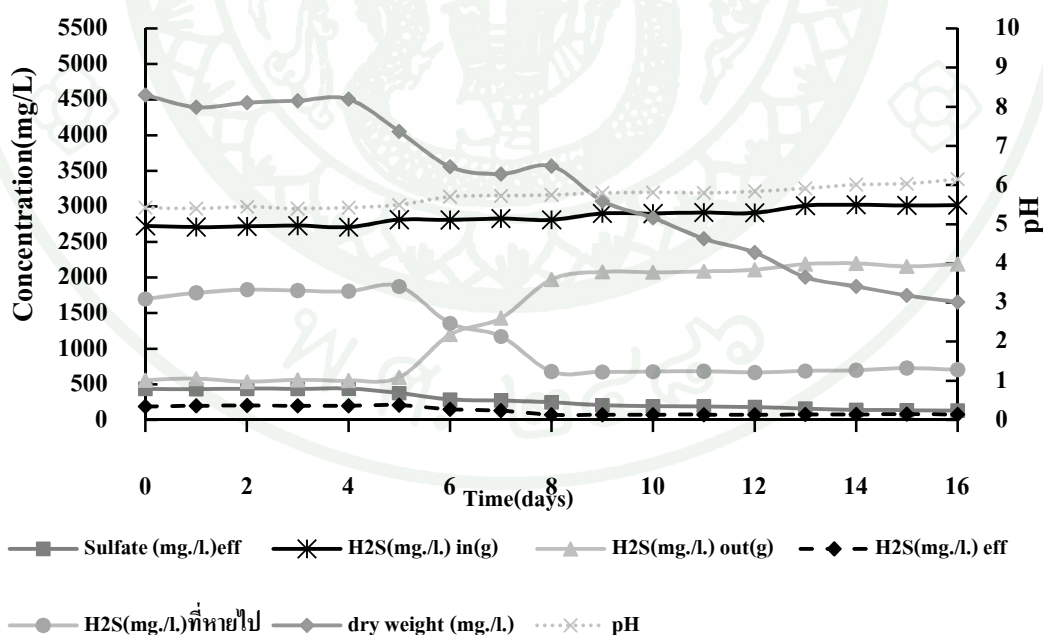
ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของ *Thiobacillus denitrificans* medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของ *Thiobacillus* medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงของ *Thiobacillus denitrificans* medium ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. denitrificans* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์



ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงของ *Thiobacillus* medium ในคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. thioparus* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

UASB effluent มีเชื้อในกลุ่ม *Thiobacillus* sp. อยู่ โดยพบประชากรอยู่ในช่วง 10^4 MPN/100 มิลลิลิตร ทั้งนี้เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความจำเพาะเจาะจง พบว่า อัตราการเจริญของเชื้อในอาหาร *Thiobacillus* Medium มีอัตราการเจริญ 155 มิลลิกรัม/ลิตร-วัน และ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.258 ต่อวัน สูงกว่าอัตราการเจริญ 35 มิลลิกรัม/ลิตร-วัน และ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.078 ต่อวัน ของเชื้อในอาหาร *Thiobacillus denitrificans* Medium

เชื้อทั้งสองกลุ่มเจริญได้ดีบนตัวกลางลูกบอลพลาสติกในคอลัมน์โปรยกรอง เมื่อแทนที่ โซเดียมไธโอซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ พบว่า ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่พ่นผ่านคอลัมน์ที่มีการโปรย *Thiobacillus denitrificans* medium และ *Thiobacillus* medium มีค่าลดลงร้อยละ 30.1 และ 30 จากขาเข้า โดยที่ ร้อยละ 14.6 และ 14.67 ของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ลดลง อยู่ในรูปละลายน้ำ ตามลำดับ ไม่พบ biofilm สะสมบน bioball ค่าพีเอช คงที่ และ ไม่มีซัลเฟตในน้ำที่ออกจากคอลัมน์ ส่วนในคอลัมน์ที่มีเชื้อ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ลดลงมากกว่าคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ คือ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. thioparus* และ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. denitrificans* ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ลดลง ร้อยละ 82.72 และ 68.64 จากขาเข้า พบในส่วนที่ละลายน้ำ ร้อยละ 8.85 และ 8.92 ของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ลดลง เชื้อใช้ไปในการสร้างเซลล์ และ ตกค้างสะสมในระบบ ร้อยละ 73.87 และ 59.72 ของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ลดลง ตามลำดับ

ในการศึกษาความสามารถในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ความเข้มข้นสูงสุดในคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. denitrificans* คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ถึง 1500 มิลลิกรัม/ลิตร ประชากรเริ่มลดลง และลดลงอย่างมากเมื่อถึง 1800 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลงเหลือ ร้อยละ 30.72 จากขาเข้า สำหรับคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. thioparus* มีแนวโน้มเดียวกันคือ ประชากรเริ่มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 2700 มิลลิกรัม/ลิตร เป็น 2800 มิลลิกรัม/ลิตร และ ประสิทธิภาพการกำจัดลดลงเหลือ ร้อยละ 29.82

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจาก *T_denitrificans* เป็นเชื้อในกลุ่ม facultative anaerobic bacteria ก็จะสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน และ *T_thioparus* เป็นเชื้อในกลุ่ม aerobic bacteria คือ เจริญเติบโตได้ในที่มีออกซิเจนเท่านั้น ดังนั้น การเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จึงต้องปรับปริมาณออกซิเจนให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต และเพียงพอกับการใช้งานต่อเชื้อทั้งสอง
2. ควรดำเนินระบบที่มีการไหลของน้ำในรูปแบบอื่น เช่น Upflow Packed-Bed Reactor คือ คอลัมน์ที่มีการไหลของน้ำในลักษณะไหลจากล่างขึ้นบน ควบคุมการไหลอย่างต่อเนื่องและคงที่ (โดยให้น้ำตัวอย่างท่วมตัวกลางตลอดเวลา)
3. ควรนำ UASB effluent มาโปรยแทนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อลดปริมาณไนเตรทในน้ำเสีย และสามารถใช้งานได้จริงในอนาคต
4. ควรนำก๊าซชีวภาพมาพ่นเข้าคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* และ คอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_thioparus* เพื่อหาประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ปนเปื้อนอยู่จริง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชีวิน อรรถสาสน์. 2543. การกำจัดซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในก๊าซเผาไหม้โดยวิธีการทางชีวภาพ (สถานะใช้อากาศ). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ดวงพร คันทิโชติ. 2537. การใช้แบคทีเรียกำจัดซัลไฟด์ในน้ำทิ้งที่ออกจากถังรีดิวซ์ซัลเฟตเพื่อลดปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์ในถังหมักแก๊สชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2537. คู่มือการออกแบบระบบระบายน้ำเสียและน้ำฝน. พิมพ์ครั้งที่ 4 วิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ.
- สุกเวท มานิชม. 2542. การศึกษาและออกแบบเครื่องปฏิกรณ์กำจัดไฮโดรเจนซัลไฟด์จากแก๊สชีวภาพโดยเชื้อ *Thiobacillus ferrooxidans*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- เสาวลักษณ์ ภูมิวนะ. 2535. แนวคิดในการวางแผนการวิจัยด้านพลังงานทดแทน: ก๊าซชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักงานสภาวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- Atlas, R.M., 2005. **Handbook of Media for Environmental Microbiology**. 2nd ed. CRC Press Taylor&Francis Group, USA.
- Batchelor, B. and A.W. Lawrence. 1978. Autotrophic denitrification using elemental sulfur. **J. Water Pollut. Control Fed.** 50: 1986–2001.
- Baumgartner, W.H. 1934. Effect of temperature and seeding on hydrogen sulfide formation in sewage. **Sew. Work.** 6(3): 399-412.
- Boon, A.G. 1995. Septicity in sewers : cause, Consequences and containment. **Wat. Sci. Tech.** 31(7): 237-253.

Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1975. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, U.S.A.

Cheremisinoff, P.N. 1995. **Handbook of Water and Wastewater Treatment Technology**. Marcel Dekker. Inc. New Jersey, USA.

Chung, Y., C. Huang and C. Tseng. 1996. Operation optimization of *Thiobacillus thioparus* CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. **Journal of Biotechnology**. 52 : 31-38.

Conde, J.L., L. Travieso and E. P. Sanchez. 1993. Biogas Purification Process Using Intensive Microalgae Cultures. **Biotechnology Letter**. 15(3): 317-320.

Dague, R.R. 1972. Fundamental of order control. **J. Wat. Control Fed.** 44(4): 583-589.

Dean, J.A., 1979. **Handbook of Chemistry**. McGraw-Hill, New York

Gadre, R.V. 1988. Removal of Hydrogensulfide from Biogas by Chemoautotrophic Fixed-Film Bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**. 34 (3): 410-414.

Gerardi, M.H. 2003. **The microbiology of anaerobic digesters**. 1st ed. Wiley-Interscience, New Jersey.

Guoqiang, Z., P. Jie, Y. Yi, and Z. Shimin. 1994. Bacterial Desulfurization of H₂S containing Biogas. **Biotechnology letters**. 16 (10): 1087-1090.

Hartman, W.J. and D.A. Long. 1976. Municipal wastewater, odor still a problem. part 2. **Water&Sewage Works**. 123(1): 38-41.

Haidal, C.R., A.H. Hall and M.D. Robinson. 1986. Hydrogen sulfide poisoning from toxic inhalation of roofing asphalt fumes. **Ann Emerg Med**. 15(1): 826-830.

Hilton, B.L. and J.A. Oleszkiewicz. 1988, Sulfide-Induced Inhibition of Anaerobic Digestion, **Journal of Environmental Engineering**. 114(6) : 1377-1391.

Hazardous Substances Data Bank. 1999. **U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD 20894**. Available Source: <http://sis.nlm.nih.gov/sis1>, June 1, 2009.

Jame, T.S., P.B. Marvin and G.H. John. 1984. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 3th ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, U.S.A.

Janssen, A.J.H., R. Sleyster, C. van der Kaa, A. Jochemsen, J. Bontsema and G. Lettinga. 1995. Biological sulfide oxidation in a fed-batch reactor. **Biotechnology and Bioengineering**. 47:327-333

Kelly, P.D. and P.A. Wood. 2000. Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the β -subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the type strain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 50: 547-550.

Kleerebezem, R. and R. Mendez. 2002. Autotrophic denitrification for combined hydrogen sulfide removal from biogas and post-denitrification. **Water science and Technology**. 45:349-356.

Piscarczyk, K. 1982. Odor Control with Potassium Permanganate, pp. 16-18. *In* **Ohio Water Pollution Control Conference**. 16th ed. The Ohio State University, Ohio.

Polprasert, C. 1996. **Organic Waste Recycling Technology and Management**. 1st ed. John Wiley and Sons Ltd., West Sussex.

Santry, L.W. 1966. Hydrogen sulfide odor control measures. **Wat. Pollute. Control Fed.** 38(3): 459-463.

- Subblette, K.L., R.P. Hesketh and S. Hasan. 1994. Microbial oxidation of hydrogen sulfide in a pilot-scale bubble column. **Biotechnology Progress**. 10: 611-614.
- Subblette, K.L. and N.D. Sylvester. 1987. Oxidation of hydrogensulfide by *Thiobacillus denitrificans*: Desulfurization of natural gas. **Biotechnology and Bioengineering**. 29: 249-257.
- Tomar, M. and T.H.A. Abdullah. 1994. Evaluation of chemicals to control the generation of malodorous hydrogen sulfide in waste water. **Wat. Res.** 28(12): 2545-2552.
- Van der Meer, R.R. 1979. **Anaerobic treatment of wastewater containing fatty acids in upflow reactors**. Ph.D. Thesis thesis. Delft University, The Netherlands.
- Vlasceanu, L., R. Popa and K.B. Kinkle. 1997. Characterization of *Thiobacillus thioautotrophicus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. **Applied and Environmental Microbiology**. 63(8): 3123-3127.
- Yangling, M.A., B.L. Yang and J.L. Zhao. 2005. Removal of H₂S by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on different matrices. **Bioresource Technology**. 97:2041-2046
- Yangling, M.A., J.L. Zhao and B.L. Yang. 2006. Removal of H₂S in waste gases by activated carbon bioreactor. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 57: 93-98





ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus medium* (for the cultivation of *Thiobacillus thioparus*)

(Ronald, 2005)

1. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10.0 g.2. KH_2PO_4 1.0 g.3. NH_4Cl 1.0 g.4. $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g.

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus denitrificans medium* (Ronald, 2005)1. KNO_3 5.0 g.2. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g.3. NaHCO_3 1.0 g.4. K_2HPO_4 0.2 g.5. MgCl_2 0.1 g.

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi 15 นาที

3. ความเข้มข้นของโซโธซัลเฟตและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในคอลัมน์ที่ศึกษาการปรับสภาวะปรับให้คุ้นเคยกับไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยการแทนที่โซโธซัลเฟตด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

3.1. ในอาหาร Thiobacillus medium (มี $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10.0 g).

$$\begin{array}{llll} \text{ใน } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} & 248 \text{ g./mol} & \text{มี S} & 64 \text{ g./mol} \\ \text{ใน } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} & 10 \text{ g./mol} & \text{มี S} & \frac{64}{248} \times 10 = 2.58 \text{ g./mol} \end{array}$$

$$\begin{array}{llll} \text{ต้องการ S} & 32 \text{ g./L} & \text{ต้องใช้ } \text{H}_2\text{S} & 34 \text{ g./L} \\ \text{ต้องการ S} & 2.58 \text{ g./L} & \text{ต้องใช้ } \text{H}_2\text{S} & \frac{34}{32} \times 2.58 = 2.72 \text{ g/L} \end{array}$$

ปริมาณ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ : H_2S ในอากาศที่ผ่านเข้าคอลัมน์
 10g./L:0g. , 7.5g./L.:0.68g. /L , 5g. /L: 1.36g. /L , 2.5g. /L:2.04g. /L , 0g. /L:2.72g. /L

3.2. ในอาหาร *Thiobacillus denitrificans* medium มี $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g.

$$\begin{array}{llll} \text{ใน } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} & 248 \text{ g./mol} & \text{มี S} & 64 \text{ g./mol} \\ \text{ใน } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} & 5 \text{ g./mol} & \text{มี S} & \frac{64}{248} \times 5 = 1.29 \text{ g./mol} \end{array}$$

$$\begin{array}{llll} \text{ต้องการ S} & 32 \text{ g. /L} & \text{ต้องใช้ } \text{H}_2\text{S} & 34 \text{ g. /L} \\ \text{ต้องการ S} & 1.29 \text{ g. /L} & \text{ต้องใช้ } \text{H}_2\text{S} & \frac{34}{32} \times 1.29 = 1.371 \text{ g. /L} \end{array}$$

ปริมาณ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ : H_2S ในอากาศที่ feed เข้า
 5g. /L:0g. /L , 3.75g. /L:0.343g. /L , 2.5g. /L: 0.6855g. /L , 1.25g. /L:1.028g. /L , 0g.:1.371g. /L



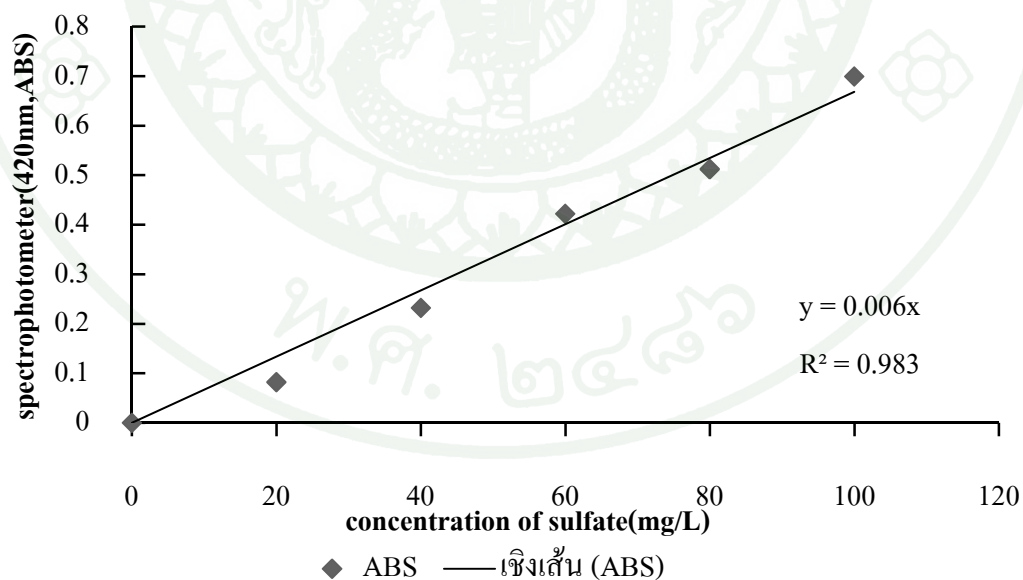
ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ข1 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นมาตรฐานของ SO_4^{2-} ด้วย spectrophotometer ที่

420 nm

ความเข้มข้น SO_4^{2-} (mg/L)	ค่าดูดกลืนแสง (ABS)
0	0.000
20	0.082
40	0.232
60	0.422
80	0.512
100	0.699



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ SO_4^{2-} ที่วัดด้วย spectrophotometer ที่ 420 nm

ตารางผนวกที่ ข2 การเปลี่ยนแปลงในอาหาร *Thiobacillus* medium ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ

Time(d)	dry weight (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	pH	NO ₃ ²⁻ (mg/L)
0	280	826.67	7.5	70
1	290	478.33	7.92	60
2	230	2063.33	6.37	24
3	280	1610.00	7.5	6.4
4	290	1575	7.6	7.8
5	440	1691	7.54	9.5
6	600	2650	3.75	12
7	650	2833.33	2.15	11.5
8	750	3000	1.78	13
9	760	2833.33	1.8	12.5
10	780	2960.00	1.85	11.2

ตารางผนวกที่ ข3 การเปลี่ยนแปลงในอาหาร *Thiobacillus denitrificans* medium ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ

Time(d)	dry weight (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	pH	NO ₃ ²⁻ (mg/L)
0	170	56.67	8.01	80
1	200	35.67	6.68	70
2	280	58.67	7.25	12
3	290	223.17	7.5	26
4	310	208.33	7.12	37
5	350	286.67	7.3	30
6	370	205	4.6	24
7	410	226.67	5.2	15
8	450	233.33	4.3	19
9	460	225	3.85	16
10	480	218.33	3.77	12.8

ตารางผนวกที่ ข4 การเปลี่ยนแปลงในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ เมื่อแทนที่โซโอซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiobacillus medium ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

	Time (d)	S ₂ O ₃ ²⁻ inf (g/L)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH
ใส่อาหารขังไว้	0	10	0	0	0	0	0	0	0	7.58
		10	0	0	0	0	0	0	0	7.5
	2	10	0	0	0	0	0	0	0	7.49
อาหาร 4:0		10	0	0	0	0	0	0	0	7.5
		10	0	0	0	0	0	0	0	7.5
		10	0	0	0	0	0	0	0	7.5
	6	10	0	0	0	0	0	0	0	7.5
อาหาร 3:1		10	0	0	0.68	680	476	99.960	0	7.48
		7.5	0	0	0.68	678	474.6	99.666	0	7.43
		7.5	0	0	0.68	679	475.3	99.813	0	7.42
	10	7.5	0	0	0.68	676	473.2	97.344	0	7.41
อาหาร 2:2		7.5	0	0	1.36	1360	952	195.840	0	7.35
		5	0	0	1.36	1370	959	197.280	0	7.32
		5	0	0	1.36	1369	958.3	197.136	0	7.34
	14	5	0	0	1.36	1367	956.9	196.028	0	7.35

ตารางผนวกที่ ข4 (ต่อ)

Time (d)	S ₂ O ₃ ²⁻ inf (g/L)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH
อาหาร1:3	5	0	0	2040	1428	292.536	319.464	0	7.26
	2.5	0	0	2045	1431.5	293.253	320.247	0	7.27
	2.5	0	0	2043	1430.1	300.321	312.579	0	7.24
	18	2.5	0	2042	1429.4	300.174	312.426	0	7.21
อาหาร0:4	2.5	0	0	2720	1904	399.84	416.16	0	7.1
	0	0	0	2734	1913.8	401.898	418.302	0	7.14
	0	0	0	2730	1911	401.31	417.69	0	7.1
	22	0	0	2728	1909.6	401.016	417.384	0	7.14

หมายเหตุ: H₂S-S(mg/L)ที่หายไป* ได้จากการคำนวณ

ตารางผนวกที่ ข5 การเปลี่ยนแปลงในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อ เมื่อแทนที่ไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* medium ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

	Time (d)	S ₂ O ₃ ²⁻ inf (g/L)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH
ใส่อาหารขังไว้	0	5	0	0	0	0	0	0	0	8
		5	0	0	0	0	0	0	0	8.01
	2	5	0	0	0	0	0	0	0	8
อาหาร 4:0		5	0	0	0	0	0	0	0	8.01
		5	0	0	0	0	0	0	0	8.02
		5	0	0	0	0	0	0	0	8
	6	5	0	0	0	0	0	0	0	8
อาหาร 3:1		3.75	0	0	0.343	343	239.929	49.474	0	7.98
		3.75	0	0	0.343	350	244.825	50.484	0	7.99
		3.75	0	0	0.343	362	253.219	52.215	0	7.95
	10	3.75	0	0	0.343	360	251.820	53.008	0	7.99
อาหาร 2:2		2.5	0	0	0.686	685.5	479.096	101.138	0	7.89
		2.5	0	0	0.686	688	480.843	101.507	0	7.88
		2.5	0	0	0.686	686.5	479.795	100.872	0	7.89
	14	2.5	0	0	0.686	680	475.252	99.917	0	7.9

ตารางผนวกที่ ข5 (ต่อ)

Time (d)	S ₂ O ₃ ²⁻ inf (g/L)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH
อาหาร1:3	1.25	0	0	1.028	1028	718.469	151.051	0	7.74
	1.25	0	0	1.028	1040	727.480	152.510	0	7.8
	1.25	0	0	1.028	1035	723.983	154.576	0	7.82
	18	1.25	0	1.028	1039	726.781	155.173	0	7.81
อาหาร0:4	0	0	0	1.371	1371	959.015	204.757	0	7.85
	0	0	0	1.371	1380	965.310	207.345	0	7.62
	0	0	0	1.371	1375	961.813	206.594	0	7.6
	22	0	0	1.371	1379	964.611	200.979	0	7.63

ตารางผนวกที่ ข6 การเปลี่ยนแปลงในคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T. thioparus* เมื่อแทนที่ไซโอซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiobacillus medium ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

	Time (d)	S ₂ O ₃ ²⁻ inf (g/L)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH	%removed H ₂ S
ใส่อาหาร+ เชื้อขังไว้ เชื้อ 1:10	0	10	182.33	203.34	0	0	0	2850.14	0	7.8	0
		10	182.33	208.955	0	0	0	2848.268	0	7.5	0
	2	10	182.33	296.435	0	0	0	2819.108	892.5267	7.3	0
		10	181.5	283.5821	0	0	0	2823.115	957.5437	7	0
		10	182	352.8094	0	0	0	2800.206	1833.991	6.8	0
		10	181.233	376.8582	0	0	0	2791.934	2043.094	6.75	0
		10	180.34	399.5453	0	0	0	2784.074	3565.446	6.89	0
		10	182.158	395.8209	0	0	0	2785.922	4101.428	6.7	0
		10	178.57	402.8358	0	0	0	2782.388	4194.643	6.75	0
		10	181.87	439.5821	0	0	0	2771.239	4264.553	6.73	0
	9	10	181.87	439.5821	0	0	0	2771.239	4264.553	6.73	0
อาหาร 4:0		10	0	445.8202	0	0	0	2708.536	4241.25	6.3	0
		10	0	448.3582	0	0	0	2707.69	4171.339	6.23	0
		10	0	450.5821	0	0	0	2706.949	4264.553	6.2	0
	13	10	0	452.8358	0	0	0	2706.198	4311.16	6.11	0

ตารางผนวกที่ ข6 (ต่อ)

Time (d)	S ₂ O ₃ ²⁻ inf (g/L)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH	%removed H ₂ S
อาหาร3:1	10	0	403.2	680	270	27.14824	3105.595	4287.857	6.13	60.29
	7.5	0	457.5	678	244	27.59706	2396.76	4357.768	6.15	64.01
	7.5	0	456.7	679	220	29.97667	2419.647	4334.464	6.14	67.60
	17	7.5	0	457.6	676	30.22902	2422.095	4171.339	5.98	68.34
อาหาร2:2	7.5	0	444.69	1360	326	84.49465	2944.132	4194.643	5.81	76.03
	5	0	444.42	1370	336	84.50365	2229.928	4148.035	5.81	75.47
	5	0	445.61	1369	328	85.1228	2235.912	4241.25	5.84	76.04
	21	5	0	446.02	1367	85.67384	2241.224	4217.946	5.83	76.59
อาหาร1:3	5	0	433.4	2040	360	145.671	2818.434	4171.339	5.67	82.35
	2.5	0	432.2	2045	368	145.4286	2101.79	4241.25	5.7	82.00
	2.5	0	433	2043	370	145.0255	2097.927	3728.571	5.59	81.89
	25	2.5	0	431.4925	2042	146.2993	2110.156	4590.803	5.6	82.57
อาหาร0:4	2.5	0	435.8209	2720	470	199.2373	2619.775	3798.482	5.3	82.72
	0	0	434.3284	2734	524	195.5224	1869.701	3145.982	5.4	80.83
	0	0	431.3433	2730	534	194.3042	1857.915	4311.16	5.35	80.44
	29	0	0	438.3582	2728	191.6234	1832.257	4567.5	5.42	79.55

ตารางผนวกที่ ข7 การเปลี่ยนแปลงในคอลัมน์ที่มีเชื้อ *T_denitrificans* เมื่อแทนที่โซโอซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus denitrificans* medium ด้วยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

	Time (d)	S ₂ O ₃ ²⁻ inf (g/L)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH	%removed H ₂ S
ใส่อาหาร+ เชื้อขังไว้ เชื้อ 1:10	0	5	60.24	165.78	0	0	0	1393.391	0	8	0
		5	60.24	170	0	0	0	1391.985	0	8.01	0
	2	5	60.24	169.4	0	0	0	1392.185	349.5536	8	0
		5	60.023	203.8358	0	0	0	1380.634	425.2902	7.9	0
		5	64.995	208.209	0	0	0	1380.833	471.1982	7.85	0
		5	75.028	205.9943	0	0	0	1384.916	1048.661	7.95	0
		5	76.050	208.209	0	0	0	1384.518	1281.696	7.8	0
		5	78.030	206.3284	0	0	0	1385.805	2074.018	7.9	0
		5	76.34	207.3821	0	0	0	1384.891	2307.053	7.9	0
	9	5	77.673	204.9553	0	0	0	1386.144	2446.875	7.93	0
อาหาร 4:0		5	0	205.8209	0	0	0	1359.964	2540.089	7.9	0
		5	0	203.2835	0	0	0	1360.81	2528.437	7.95	0
		5	0	208.3582	0	0	0	1359.119	2563.393	7.92	0
	13	5	0	204.3284	0	0	0	1360.462	2633.303	7.89	0

ตารางผนวกที่ ข7 (ต่อ)

Time (d)	S ₂ O ₃ ²⁻ inf (g/L)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH	%removed H ₂ S
อาหาร3:1	3.75	0	201.3433	343	144	14.01797	1189.296	2656.607	8.09	58.02
	3.75	0	208.3582	350	166	12.37237	1173.603	2796.428	8.13	52.57
	3.75	0	201.4925	362	170	13.35417	1182.91	2819.732	8.14	53.04
	17	3.75	0	207.5	360	12.96569	1179.296	2796.428	8.16	52.78
อาหาร2:2	2.5	0	206.7	685.5	372	24.61588	934.2698	3036.455	7.98	45.73
	2.5	0	207.6	688	380	24.06824	929.0175	3420.964	7.97	44.77
	2.5	0	203.4	686.5	374	24.63176	934.3539	3595.741	7.98	45.52
	21	2.5	0	202.2	680	25.56588	943.3198	2926.928	7.66	47.35
อาหาร1:3	1.25	0	203	1028	392	55.09216	870.384	2600.678	7.4	61.87
	1.25	0	203.2	1040	408	54.70902	866.7005	2749.821	7.74	60.77
	1.25	0	197.5	1035	396	55.55784	874.7517	2836.044	7.9	61.74
	25	1.25	0	159.7	1039	56.62961	884.2799	2686.902	7.56	61.31
อาหาร0:4	0	0	197.6	1371	430	83.97804	791.1553	2836.044	7.5	68.64
	0	0	193.4	1380	500	78.37686	737.1565	2926.928	7.43	63.77
	0	0	192.2	1375	470	80.7698	760.1635	2691.562	7.5	65.82
	29	0	0	193.2	1379	75.08941	705.5106	2808.08	7.4	61.28

ตารางผนวกที่ ข8 การเปลี่ยนแปลงของ Thiobacillus medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

Time(d)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH
0	0	0	2728	1909.6	401.016	417.384	0	7.14
1	0	0	2712	1898.4	398.664	414.936	0	7.13
2	0	0	2721	1904.7	399.987	416.313	0	7.14
3	0	0	2730	1911	401.31	417.69	0	7.12
4	0	0	2710	1897	398.37	414.63	0	7.1
5	0	0	2815	1970.5	413.805	430.695	0	7.04
6	0	0	2810	1967	413.07	429.93	0	7
7	0	0	2830	1981	416.01	432.99	0	7.05
8	0	0	2813	1969.1	413.511	430.389	0	7.02
9	0	0	2903	2032.1	426.741	444.159	0	7.05
10	0	0	2900	2030	426.3	443.7	0	6.89
11	0	0	2915	2040.5	428.505	445.995	0	6.95
12	0	0	2911	2037.7	427.917	445.383	0	6.97
13	0	0	3012	2108.4	442.764	460.836	0	6.95
14	0	0	3023	2116.1	444.381	462.519	0	6.94
15	0	0	3015	2110.5	443.205	461.295	0	6.93
16	0	0	3020	2114	443.94	462.06	0	6.9

ตารางผนวกที่ ข9 การเปลี่ยนแปลงของ *Thiobacillus denitrificans* medium ในคอลัมน์ที่ไม่มีเชื้อเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

Time(d)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH
0	0	0	1379	965.3	200.6445	213.0555	0	7.63
1	0	0	1370	959	199.335	211.665	0	7.5
2	0	0	1375	962.5	200.0625	212.4375	0	7.45
3	0	0	1376	963.2	200.208	212.592	0	7.4
4	0	0	1379	965.3	200.6445	213.0555	0	7.45
5	0	0	1510	1057	219.705	233.295	0	7.4
6	0	0	1505	1053.5	218.9775	232.5225	0	7.35
7	0	0	1530	1071	222.615	236.385	0	7.3
8	0	0	1517	1061.9	220.7235	234.3765	0	7.35
9	0	0	1598	1118.6	232.509	246.891	0	7.32
10	0	0	1588	1111.6	231.054	245.346	0	7.2
11	0	0	1597	1117.9	232.3635	246.7365	0	7.26
12	0	0	1601	1120.7	232.9455	247.3545	0	7.29
13	0	0	1704	1192.8	247.932	263.268	0	7.25
14	0	0	1709	1196.3	248.6595	264.0405	0	7.2
15	0	0	1705	1193.5	248.0775	263.4225	0	7.23
16	0	0	1702	1191.4	247.641	262.959	0	7.2

ตารางผนวกที่ ข9 (ต่อ)

Time(d)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH
17	0	0	1813	1269.1	263.7915	280.1085	0	7.19
18	0	0	1802	1261.4	262.191	278.409	0	7.18
19	0	0	1829	1280.3	266.1195	282.5805	0	7.15
20	0	0	1830	1281	266.265	282.735	0	7.18
21	0	0	1908	1335.6	277.614	294.786	0	7.15
22	0	0	1910	1337	277.905	295.095	0	7.15
23	0	0	1920	1344	279.36	296.64	0	7.14
24	0	0	1915	1340.5	278.6325	295.8675	0	7.16
25	0	0	2020	1414	293.91	312.09	0	7.1
26	0	0	2010	1407	292.455	310.545	0	7.13
27	0	0	2003	1402.1	291.4365	309.4635	0	7.1
28	0	0	2030	1421	295.365	313.635	0	7.1

ตารางผนวกที่ ข10 การเปลี่ยนแปลงของ Thiobacillus medium ในคอลัมน์ที่มีเชื้อตั้งต้นเป็น *T. thioparus* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

Time(d)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH	%removed H ₂ S
0	0	438.3582	2728	558	191.6234	1703.61	4567.5	5.42	79.55
1	0	435	2712	582.14	198.486	1786.374	4395.821	5.4	78.53
2	0	440.5	2721	538.84	203.5327	1831.794	4458.202	5.45	80.20
3	0	438.2	2730	564.745	201.9188	1817.27	4483.582	5.4	79.31
4	0	442	2710	554.21	200.8457	1807.611	4505.821	5.42	79.55
5	0	380.67	2815	600.13	208.798	1879.182	4054	5.5	78.68
6	0	290.67	2810	1200	151.311	1361.799	3560	5.7	57.30
7	0	276	2830	1430	130.8	1177.2	3457	5.73	49.47
8	0	250.4	2813	1973.98	75.55533	679.998	3567.98	5.75	29.83
9	0	210	2903	2080.34	75.266	677.394	3076.5	5.8	28.34
10	0	197.5	2900	2076	75.81667	682.35	2839.87	5.82	28.41
11	0	189.4	2915	2090.5	76.13667	685.23	2548.9	5.8	28.28
12	0	180.75	2911	2109	74.175	667.575	2354.76	5.84	27.55
13	0	159	3012	2189.9	76.91	692.19	2007.38	5.91	27.29
14	0	140.87	3023	2200	77.60433	698.439	1874.89	6.01	27.22
15	0	138.9	3015	2156.7	81.2	730.8	1750.4	6.04	28.47
16	0	130.42	3020	2190	78.65267	707.874	1657.48	6.15	27.48

ตารางผนวกที่ ข11 การเปลี่ยนแปลงของ *Thiobacillus denitrificans* medium ในคอลัมน์ที่มีเชื้อตั้งต้นเป็น *T_denitrificans* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

Time(d)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH	%removed H ₂ S
0	0	193.2	1379	534	75.08941	654.8047	2808.08	7.4	61.28
1	0	200	1370	509	79.43333	714.9	2800	7.35	62.85
2	0	198	1375	579.3	72.97	656.73	2910	7.5	57.87
3	0	193.55	1376	580.2	73.12833	658.155	2850.5	7.36	57.83
4	0	198.45	1379	575.58	73.727	663.543	2082.09	7.45	58.26
5	0	200.56	1510	586.7	85.64467	770.802	2059.943	7.56	61.15
6	0	205	1505	596.9	83.97667	755.79	2082.09	7.5	60.34
7	0	208	1530	598.7	86.19667	775.77	2063.284	7.48	60.87
8	0	210	1517	600.1	84.69	762.21	2073.821	7.3	60.44
9	0	214.4	1598	602.9	92.36333	831.27	2049.553	7.29	62.27
10	0	213.4	1588	749.3	76.75667	690.81	2058.209	7.12	52.81
11	0	215.3	1597	726.3	79.89333	719.04	2032.835	7.15	54.52
12	0	218	1601	789.23	73.91033	665.193	2070	7.1	50.70
13	0	220.5	1704	849.73	78.077	702.693	2069.4	7.09	50.13
14	0	219	1709	899.2	73.68	663.12	2038.358	7.1	47.38
15	0	225	1705	875.3	75.47	679.23	2033.4	6.98	48.66

ตารางผนวกที่ ข11 (ต่อ)

Time(d)	SO ₄ ²⁻ inf (mg/L)	SO ₄ ²⁻ eff (mg/L)	H ₂ S-S in(g) (mg/L)	H ₂ S-S out(g) (mg/L)	H ₂ S-S eff (mg/L)	H ₂ S-S(mg/L) ที่หายไป*	dry weight (mg/L)	pH	%removed H ₂ S
16	0	220	1702	902.5	72.61667	653.55	2089.55	6.95	46.97
17	0	200	1813	1256	49.03333	441.3	2096.435	6.87	30.72
18	0	130	1802	1276.5	48.21667	433.95	1830.582	7.58	29.16
19	0	120	1829	1274.9	51.41	462.69	1445.82	7.79	30.30
20	0	125	1830	1298.75	48.95833	440.625	1048.358	7.8	29.03
21	0	140	1908	1383.8	47.75333	429.78	950.582	7.56	27.47
22	0	100	1910	1367.87	50.87967	457.917	945.2836	7.85	28.38
23	0	117	1920	1343.1	53.79	484.11	958.209	7.89	30.05
24	0	120	1915	1298.7	57.63	518.67	835.8209	7.85	32.18
25	0	132	2020	1372.98	60.302	542.718	820.8955	7.6	32.03
26	0	115	2010	1374.9	59.67667	537.09	895.522	7.9	31.60
27	0	107.9	2003	1370.3	59.67333	537.06	820.8	8.05	31.59
28	0	105.879	2030	1340.4	65.4307	588.8763	830.45	8.15	33.97



ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์

1.การนับจำนวนจุลินทรีย์แบบ MPN (Most Probable Number)

ได้จากการหลักการทางสถิติ สำหรับการหาค่า MPN โดยวิธี multiple-tube technique นั้น เป็นเทคนิคที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ต้องการจะ ประเมินจำนวน ดังนั้นจำนวนจุลินทรีย์ที่ประเมินได้จึงเป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถเจริญ ได้ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเท่านั้น

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างน้ำ
2. น้ำเกลือร้อยละ 0.85 หรือน้ำกลั่น(Sterile) หลอดละ 9 มิลลิลิตร
3. Thiobacillus medium หลอดละ 9 มิลลิลิตร
4. *Thiobacillus denitrificans* medium หลอดละ 9 มิลลิลิตร
5. nutrient broth (heterotrophic aerobic bacteria) หลอดละ 9 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำโดยดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำเกลือร้อยละ 0.85 หรือน้ำ กลั่น (sterile) 9 มิลลิลิตร จะได้ระดับการเจือจาง 1:10
2. เขย่าให้เชื้อกระจายตัว ดูดตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน น้ำเกลือร้อยละ 0.85 หรือน้ำกลั่น (sterile) 9 มิลลิลิตร จะได้ระดับการเจือจาง 1:100
3. ที่แต่ละระดับการเจือจางให้ทำเหมือนกันดังนี้ คือ ดูดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปใน *Thiobacillus* medium, *Thiobacillus denitrificans* medium และ nutrient broth ระดับความเจือจาง ละ 5 หลอด
4. บ่ม 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 18-24 ชั่วโมง
5. ตรวจสอบผลจากระดับการเจือจางที่มีทั้งหลอดที่มีเชื้อเจริญและหลอดที่ไม่มีเชื้อเจริญ นับ จำนวนหลอดที่ให้ผลบวกและเทียบค่า MPN/100 มิลลิลิตร จากผลตารางคูณด้วย dilution factor จะได้จำนวนที่คาดว่าจะมีได้มากที่สุดต่อ 100 มิลลิลิตร ตัวอย่าง

2.การย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining)

การเตรียมแบคทีเรียเพื่อย้อมสี

แบคทีเรียที่นำมาย้อมสีต้องเป็นแบคทีเรียที่มีอายุน้อย อาจเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว (broth) หรืออาหารแข็ง (agar) ในช่วงเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ในการย้อมสีแบคทีเรียจะต้องทำการเตรียมเชื้อ โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1. เตรียมสไลด์

สไลด์ที่ใช้เตรียมเชื้อแบคทีเรียอาจเป็นสไลด์ใหม่หรือที่ใช้แล้วก็ได้ แต่ต้องล้างให้สะอาด ไม่มีฝุ่นหรือไขมันเกาะ การล้างสไลด์อาจล้างด้วยน้ำยาซักล้างต่างๆ ไปก็ได้ และล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วเช็ดให้แห้ง จากนั้นนำไปแช่ใน 95 % ethyl alcohol นาน แล้วจึงเช็ดให้แห้งด้วยผ้าสะอาด เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท การจับสไลด์ควรจับที่ขอบเพื่อไม่ให้คราบไขมันจากมือเปื้อนแผ่นสไลด์

2. การเตรียมเสมียร์เชื้อ

นำแบคทีเรียที่ต้องการย้อมสีมาป้ายลงบนแผ่นสไลด์แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจาย โดยใช้ลูป (loop) กระจายเชื้อบนสไลด์ให้ได้พื้นที่ประมาณ 1-2 ตารางเซนติเมตร

3. ตรึงเสมียร์เชื้อ

เป็นการทำให้เชื้อเสมียร์ติดแน่น (fixation) บนสไลด์ก่อนที่จะทำการย้อมสี เพื่อไม่ให้เชื้อหลุดออกจากสไลด์ขณะที่ย้อมสีหรือ ล้างสีออก และเป็นการทำลายเอนไซม์ในเซลล์หรือเพื่อป้องกันการเกิด autolysis โดยทั่วไปมักตรึงเชื้อด้วยความร้อนโดยนำเสมียร์เชื้อที่แห้งแล้วไปผ่านไฟ 2-3 ครั้ง แต่ไม่ควรลนไฟนานจนเกินความจำเป็นเพราะอาจทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่างได้

วัสดุ / อุปกรณ์

1. เชื้อตัวอย่างในอาหารเหลว หรือในอาหารวุ้นแข็ง
2. สไลด์
3. เข็มเขี่ยเชื้อ (loop ,needle)
4. ภาชนะย้อมสีแกรม
5. กล้องจุลทรรศน์
6. immersion oil
7. ชุดย้อมสีแกรม

สารเคมี

1. crystal violet
2. lugol's iodine
3. safranin water solution
4. ethyl alcohol

ขั้นตอนการย้อมสีแบคทีเรีย

1. หยดน้ำกลั่นปัดออกเชื้อลงบนสไลด์ ประมาณ 1 หยด
2. ใช้ลูป (loop) และเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้
3. เกยเชื้อ (smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากจนเกินไป และปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry)
4. ตรึงเชื้อ (fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ซึ่งจะทำให้เชื้อไม่หลุดออกขณะย้อมสี การตรึงเชื้อทำได้โดยการนำสไลด์ที่เกยเชื้อทิ้งไว้จนแห้งแล้วไปผ่านไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง
5. หยดสี คริสตอลไวโอเลต (crystal violet) บริเวณที่เกยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเททิ้ง
6. หยดสารละลายลูกลอไอโอดีน (lugol's iodine) บริเวณที่เกยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง สารละลายไอโอดีนจะทำหน้าที่เป็น มอแดนต์ (mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ขึ้น
7. ล้างสีออกด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (ethyl alcohol) บริเวณที่เกยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น
8. หยดสีซาฟรานิน (safranin) บริเวณที่เกยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.1 TSI (Triple Sugar Iron)(Merck, Germany)

อาหารที่ใช้ทดสอบ คือ triple sugar iron agar

วิธีทดสอบ

1. ใช้เข็มเย็บเชื้อ แตะลงใน triple sugar iron slant โดยลาก (streak) ที่ผิวของพื้นเอียง (slant) แล้วแทง(stab) ลงไปในส่วนก้นหลอดเรียกว่าทำ bult

2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเกิดสีและรายงานด้วยสัญลักษณ์

Alk/A หมายถึง หมัก glucose ไม่มี CO_2 , H_2 และ H_2S

Alk/AG หมายถึง หมัก glucose มี CO_2 และ H_2 แต่ไม่มี H_2S

Alk/A, H_2S หมายถึง หมัก glucose มี CO_2 , H_2 และ H_2S (มีสีดำของ FeS)

A/AG หมายถึง หมักได้ทั้ง glucose และ disacchaide มี CO_2 และ H_2 แต่ไม่มี H_2S

A/AG, H_2S หมายถึง หมักได้ทั้ง glucose และ disacchaide มี CO_2 , H_2 และ H_2S

A/A หมายถึง หมักได้ทั้ง glucose และ disacchaide แต่ไม่มี CO_2 , H_2 และ H_2S หรือสร้างกรดจำนวนมากจาก oxidation

Alk/Alk หมายถึง สลาย glucose โดย oxidation ของ aerobic bacteria

3.2 motility test

อาหารที่ใช้ทดสอบคือ nutrient agar(tube)

วิธีทดสอบ

1. เย็บเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาแทง(stab) ลงใน nutrient agar

2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบผลโดยสังเกตการกระจายของเชื้อจากแนวที่ stab ไว้

ผลบวก เชื้อกระจายไปจากแนวที่ stab ไว้ แสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการ

เคลื่อนที่

ผลลบ เชื้อไม่กระจายไปจากแนวที่ stab ไว้ แสดงว่าเชื้อไม่มีความสามารถในการ

เคลื่อนที่

3.3 relation to O₂

อาหารที่ใช้ทดสอบคือ nutrient broth(tube) และพาราฟิล์เหลว

วิธีทดสอบ

1. เชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาใส่ ลงใน nutrient broth 2 หลอด
2. เลือก 1 หลอดเททับด้วยพาราฟิล์เหลวด้านบนป้องกันออกซิเจนไม่ใช้ลงไป
3. บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบผลโดยสังเกตการกระจายของเชื้อในแต่ละหลอด
 - facultative anaerobe เจริญได้ทั้งสองหลอดโดยเชื้อกระจายทั่วหลอด
 - aerobe เจริญได้เฉพาะหลอดที่ไม่มีพาราฟิล์ปิดทับ
 - anaerob เจริญได้เฉพาะหลอดที่มีพาราฟิล์ปิดทับ

3.4 oxidase test

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ทดสอบ

1. kovac' s oxidase reagent (1% tetramethyl- p-phenylenediamine dihydrochloride)
2. กระจกกรอง

วิธีทดสอบ

1. เตรียมสารละลาย 1% tetramethyl- p-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำกลั่นที่ sterile แล้วหยดลงบนกระจกกรอง
2. platinum loop หรือแท่งแก้วเชื้อมาจิดลงบนกระจกกรองที่เตรียมไว้ (ไม่ควรใช้ loop ที่ทำจากเหล็กและนิโครมเพราะจะทำให้เกิดผลบวกปลอมได้
3. ตรวจสอบผล

ผลบวก เกิดสีม่วงเข้มตามรอยขีด ภายใน 10 วินาที แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

ผลลบไม่เกิดสีม่วงเข้มตามรอยขีด ภายใน 10 วินาที แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

3.5 catalase test

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ทดสอบ

1. H_2O_2 3%
2. แผ่นสไลด์

วิธีทดสอบ

1. หยด H_2O_2 3% ลงบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด
2. เชี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวมา 2 ลูปเต็มๆ แต่ละลูปหยดของ H_2O_2 3%
3. ตรวจสอบผล

ผลบวก เกิดฟองก๊าซขึ้นทันที แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส

ผลลบ ไม่เกิดฟองก๊าซขึ้นทันที แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส

3.6 indole test

อาหารที่ใช้ทดสอบ คือ tryptone broth (Merck, Germany)

สารเคมีที่ใช้คือ Kovac's oxidase reagent (1% tetramethyl- p-phenylenediamine dihydrochloride)

วิธีทดสอบ

1. เชี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวลงใน tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง
2. เติม Kovac's reagent 0.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลอง
3. ตรวจสอบผลโดยการสังเกตการเกิดสี

ผลบวก เกิดสีแดงขึ้นที่ผิวชั้นบน แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างอินโดลได้

ผลลบ ไม่เกิดสีแดงขึ้นที่ผิวชั้นบน แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างอินโดลได้ ถ้าเป็น

สีส้มจัดเป็น variable เนื่องจาก tryptophan ถูกออกซิไดซ์ไปเป็น skatole (methyl indole)

3.7 nitrate reduction test

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

สารละลาย A

sulfanilic acid 0.8 กรัม

5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B

alpha-naphtylamine 0.5 กรัม

5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร

ละลาย sulfanilic acid และ alpha-naphtylamine ใน 5 N acetic acid โดยใช้ความร้อน
ช่วยในการละลาย สำหรับสารละลาย A และ B ตามลำดับ

วิธีทดสอบ

1. เชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาลงในอาหาร nitrate broth (Merck, Germany) ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลอง
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง
3. เติมสารละลาย A และ B สารละลายละ 5 หยด ลงไปในหลอดทดลอง
4. ตรวจสอบโดยสังเกตการเกิดสีแดงบนตะกอน ถ้าไม่เกิดสีแดงให้เติมผงสังกะสีลงไป
ผลบวก ไม่เกิดสีแดงบนตะกอน แสดงว่า NO_3^- ถูกรีดิวซ์เป็น NO_2^- และ N_2
ผลลบ เกิดสีแดงบนตะกอน

3.8 O-F test

อาหารเลี้ยงเชื้อ nitrate broth มี bromthymol blue เป็น indicator ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อ
เป็นสีเขียว

วิธีทดสอบ

1. เชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 หลอดหลอดแรก ปิดทับด้วยพาราฟิลเหลว
ส่วนอีกหลอดไม่ปิดทับด้วยพาราฟิล
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบผลสังเกตสีของทั้งสองหลอด
 - สีของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองหลอดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งคู่เชื้อสามารถใช้
ออกซิเจนได้ทั้งในสถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (fermentation)
 - สีของอาหารที่ไม่มีพาราฟินปิดทับเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่า เชื้อสามารถใช้
ออกซิเจนได้ในสถานะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (oxidation)
 - ในกรณีที่ไม่มีเปลี่ยนแปลงทั้งสองหลอดเชื้อไม่สามารถใช้ออกซิเจนได้ทั้งในสภาวะ
ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (unreaction)

4. น้ำหนักแห้ง/ลิตร (dry weight)

วิธีการวิเคราะห์

1. นำกระดวยกรอง GF/C มาชั่งโดยเครื่องชั่งละเอียด สมมติได้น้ำหนัก = C กรัม นำไปวางบน evaporating dish หรือ petridish ก็ได้
2. วางกระดวยกรองลงบน Buchner's funnel ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศโดยใช้ปากกิบที่สะอาด ใช้น้ำกลั่นฉีดบนกระดวยกรองให้ทั่ว แล้วเปิดปั๊มดูดอากาศเพื่อให้กระดวยกรองแนบสนิทดีกับกรวย
3. เปิดตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิตร. (ปริมาตรที่ใช้ขึ้นกับของแข็งแขวนลอยในน้ำ) ใส่ไปบนกระดวยกรอง ที่ละน้อยพร้อมกับเปิดปั๊มดูดอากาศ พยายามให้ของแข็งกระจายไปทั่วๆ กระดวยกรอง
4. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างของแข็งที่ติดอยู่ข้างกรวยจนหมดและรองจนกว่าจะแห้ง แล้วใช้ปากกิบค่อยๆ หีบกระดวยกรองออกนำไปวางบนภาชนะที่ใส่เดิม
5. นำไปอบให้แห้งในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน dessicator แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก สมมติได้ = D กรัม

$$\text{dry weight (mg/L)} = \frac{(D - C) \times 10^6}{\text{ml sample}}$$

5. ซัลเฟต (sulfate)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องกวนสารละลายแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) แท่งกวนสารละลายแบบแม่เหล็ก (magnetic bar)

2. เครื่อง spectrophotometer ที่ 420 นาโนเมตร และ light path 4-5 เซนติเมตร

3. นาฬิกาจับเวลา (stop watch)

4. ซ้อนดวง

รีเอเจนต์

1. เตรียม buffer solution (1ลิตร)

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 30 g.

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 g.

KNO_3 1 g.

$\text{CH}_3\text{COOH}(99\%)$ 20 ml

2. BaCl_2 20-30 mesh

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานซัลเฟต โดยการละลาย Na_2SO_4 (Anhydrous) 147.9 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (สารละลาย 1 มิลลิลิตร = 100 ไมโครกรัมซัลเฟต)

วิธีการวิเคราะห์

1. ตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติม buffer solution 20 มิลลิลิตร

3. ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องกวนสารแม่เหล็กและแท่งกวนสารแม่เหล็กคนช้าๆ ค่อยๆ

เติม BaCl_2 1 ซ้อน จับเวลา 1 นาที หยุดคน

4. วัดความขุ่นของ BaSO_4 (ที่ 420 นาโนเมตร) ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 4 นาที

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

6. ไนเตรท(NO_3^-) (cadmium reduction method)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. spectrophotometer HACH DR/4000U
2. test kits Nitrate (Nitra Ver 5 Nitrate Reagent Powder Pillow))

วิธีทดลอง

- 1.เปิดโปรแกรม 2530 (HACH DR/4000U) ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร
- 2.เติมตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลงในขวดสำหรับวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 3.เติม test kits nitrate ในขวดสำหรับวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 4.กด Start Timer ที่เครื่อง พร้อมเขย่าขวด จนกว่าสัญญาณจะดัง(1นาท)
- 5.กด Start Timer อีกครั้ง รอสัญญาณดัง (5 นาที)
- 6.เติมน้ำตัวอย่าง(blank) ลงในขวดวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วใส่ลงในเครื่อง กด ZERO
(วิธีเตรียม blank ทำเช่นเดียวกับน้ำตัวอย่าง)
- 7.นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

7. ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide; H_2S) (method 4500- S^{2-})

ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide; H_2S) เคลื่อนที่ผ่านสารละลายซิงค์อะซิเตต (zinc acetate solution; $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) ในสถานะที่เป็นด่างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะถูกจับไว้ในสารละลายโดยซัลไฟด์จะรวมตัวซิงค์ได้เป็นซิงค์ซัลไฟด์ ดังสมการ



เมื่อเติมสารละลายไอโอดีนที่มากเกินไปแต่ทราบปริมาณที่แน่นอนและปรับสถานะของสารละลายในขวดปฏิกิริยาให้เป็นกรดโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกลงไป สารประกอบซัลไฟด์ในสารละลายจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับไอโอดีน ให้กำมะถันและไอโอดีนไดออดอน ดังสมการ

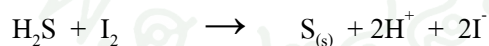
ครึ่งปฏิกิริยา



ปฏิกิริยารวม

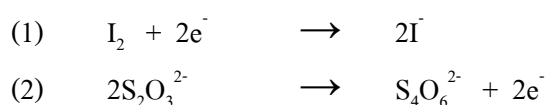


ปฏิกิริยาของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

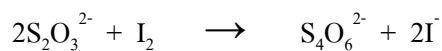


หลังจากนั้นจะต้องวิเคราะห์หาปริมาณของไอโอดีนในส่วนที่เหลือจากปฏิกิริยาโดยการไทรเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นดังสมการ

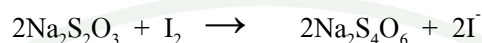
ครึ่งปฏิกิริยา



ปฏิกิริยารวม



ปฏิกิริยาของไอโอดีนกับโซเดียมไทโอซัลเฟต



เมื่อทราบปริมาณของไอโอดีนส่วนที่เหลือแล้ว ก็จะสามารถหาปริมาณไอโอดีนส่วนที่ทำปฏิกิริยากับซัลไฟด์ได้และจะสามารถคำนวณหาปริมาณซัลไฟด์ได้ต่อไป

กรณีที่ใช้สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตและสารละลายไอโอดีนที่มีความเข้มข้นเป็นอย่างไร ปริมาณซัลไฟด์ทั้งหมดคิดเทียบเป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ (S) หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$S = \{(aA - bB) \times 16,000\} / C$$

เมื่อ S = ซัลไฟด์คิดเทียบเป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) (มิลลิกรัมต่อลิตร)

a = ปริมาตรสารละลายไอโอดีนที่ใช้ (มิลลิลิตร)

b = ปริมาตรสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ (มิลลิลิตร)

C = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

A = ความเข้มข้นสารละลายไอโอดีนที่ใช้ (นอร์มัล)

B = ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ (นอร์มัล)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวลลิตกษณ์ ดวงประสพสุข
วัน เดือน ปี ที่เกิด 6 มกราคม 2529
สถานที่เกิด อำเภอเมืองสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี
ประวัติการศึกษา วท.บ. (จุลชีวินวิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ ได้รับทุนผู้ช่วยสอนจากภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2551-2552)

