855285

รายงานการวิจัย
เรื่อง

การคัดแยกจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพเพื่อการบำบัดน้ำเสีย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุนันท์ สุดใจ

และ

อาจารย์ดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

รายงานการวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
พ.ศ. 2552

ชื่อเรื่องวิจัย	การคัดแยกจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพเพื่อการบำบัดน้ำเสีย
ผู้ดำเนินงานวิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุนันท์ สุดใจ อาจารย์ดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จ. ปทุมธานี
ปีงบประมาณ	2552

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการหมักน้ำหมักชีวภาพจากเศษผักและผลไม้ โดยใช้หัวเชื้อ พด.6 ของกรมพัฒนาที่ดินเป็นระยะเวลา 90 วัน จากการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักชีวภาพ พบจำนวนแบคทีเรียสูงสุด 164×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการหมัก พบราและยีสต์สูงสุด 88×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก จากการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ พบแบคทีเรีย 29 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม แกรมบวกในจำนวนนี้พบแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกได้ 9 สายพันธุ์ พบยีสต์ 5 สายพันธุ์ และรา 5 สายพันธุ์

การศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 47.2 สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส ไลเปส และเซลลูเลส ส่วนยีสต์สร้างเอนไซม์ไลเปส และเซลลูเลส และราสามารถสร้างเอนไซม์ได้ทุกชนิด โดยทุกสายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์ไลเปส

การบำบัดน้ำเสียน้ำหมักชีวภาพมีประสิทธิภาพมากที่สุดที่ระยะเวลาการหมัก 75 วัน ซึ่งสามารถลดค่า BOD และความขุ่นได้มากที่สุด สำหรับค่า pH หลังการบำบัดน้ำเสียเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

Research Title	Selection of Microorganism in Bio-organic liquid for wast water treatment
Auther	SUNUN SUDJAI DUANGDUAN WATTANURUK
Faculty	Science and Technology Valaya-alongkorn Rajabhat University under The Royal Patronage
Year	2009

Abstract

This research has been conducted to transform vegetable and fruit waste into bio-organic liquid using พด.6 starter derived from land development department. The fermentation was carried out for 90 days. Determination of microorganism contents in the fermented material found the maximum number of bacteria was 164×10^7 colony/ml. on the fifth day of fermentation, and the highest number of mould and yeast found were 88×10^7 colony/ml. on the seventh day of fermentation. The type of microorganisms found was mostly circular shape bacteria. It was also found that 9 isolates of bacteria, 5 isolates of yeast and 5 isolates of mould can produce lactic acid.

The capability of producing enzyme was investigated as well. It has been found that bacteria with the isolate of 47.2 can produce amylase, protiase and cellulase enzyme., yeast can produce lipase and cellulase enzyme. Mould can produce every kind of enzyme and every isolate of mould can produce lipase enzyme.

Bio-organic liquid obtained was used for waste water treatment. It was found to have highest efficiency when fermented for 75 days. This can be seen from the maximum reduction of BOD and turbidity of the water treated. The pH slightly changed compared to that before the treatment.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนทุนในการทำวิจัยจากสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปีงบประมาณ 2552 จึงทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่สนับสนุนเครื่องมือที่ใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

สุนันท์ สุดใจ และ ดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์

ธันวาคม 2553

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ช
สารบัญภาพ		ซ
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
	1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
	2.1 น้ำหมักชีวภาพ	3
	2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์	6
	2.3 วัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมัก	7
	2.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายในน้ำหมักชีวภาพ	9
	2.5 น้ำ	12
	2.6 น้ำเสีย	14

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	2.7 การวัดคุณภาพน้ำ	17
	2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
บทที่ 3	วิธีการดำเนินงานวิจัย	22
	3.1 อุปกรณ์	22
	3.2 เครื่องมือ	22
	3.3 สารเคมี	23
	3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	23
	3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย	24
บทที่ 4	ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลงานวิจัย	28
	4.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักชีวภาพ	28
	4.2 ผลการวัดค่า pH ของน้ำหมักชีวภาพ	32
	4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย	34
	4.4 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราและยีสต์	37
	4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย	42
	4.6 ผลการทดสอบการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรีย	45
	4.7 ผลทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของราและยีสต์	48
	4.8 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียที่ทำการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ	50
บทที่ 5	สรุปผลงานวิจัยและข้อเสนอแนะ	55

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	2.7 การวัดคุณภาพน้ำ	17
	2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
บทที่ 3	วิธีการดำเนินงานวิจัย	22
	3.1 อุปกรณ์	22
	3.2 เครื่องมือ	22
	3.3 สารเคมี	23
	3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	23
	3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย	24
บทที่ 4	ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลงานวิจัย	28
	4.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักชีวภาพ	28
	4.2 ผลการวัดค่า pH ของน้ำหมักชีวภาพ	32
	4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย	34
	4.4 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราและยีสต์	37
	4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย	42
	4.6 ผลการทดสอบการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรีย	45
	4.7 ผลทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของราและยีสต์	48
	4.8 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียที่ทำการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ	50
บทที่ 5	สรุปผลงานวิจัยและข้อเสนอแนะ	55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในอาหาร NA	29
4.2	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในอาหาร PDA	31
4.3	การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำหมักชีวภาพ	33
4.4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย	34
4.5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์	38
4.6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา	40
4.7	ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย	43
4.8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์	46
4.9	ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของยีสต์	48
4.10	ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของรา	50
4.11	ค่า pH ของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ	51
4.12	ค่าความขุ่นของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ	52
4.13	ค่า BOD ของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ	53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	การติดสีแกรมบวกและรูปร่างกลมของแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่ 19.2	36
4.2	การติดสีแกรมลบและรูปร่างท่อนของแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่ 29.2	36
4.3	การติดสีแกรมบวกและรูปร่างท่อนของแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่ 33.1	36
4.4	การติดสีแกรมบวกและรูปร่างท่อนมีสปอร์ของแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่ 50.1	37
4.5	ลักษณะและโครงสร้างของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 7.2	38
4.6	ลักษณะและโครงสร้างของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 22.1	38
4.7	ลักษณะและโครงสร้างของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 36.1	39
4.8	ลักษณะและโครงสร้างของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 60.1	39
4.9	ลักษณะและโครงสร้างของรา สายพันธุ์ที่ 26.2	40
4.10	ลักษณะและโครงสร้างของรา สายพันธุ์ที่ 33.2	41
4.11	ลักษณะและโครงสร้างของรา สายพันธุ์ที่ 36.2	41
4.12	ลักษณะและโครงสร้างของรา สายพันธุ์ที่ 40.1	41
4.13	ลักษณะและโครงสร้างของรา สายพันธุ์ที่ 40.2	42
4.14	บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่ 47.2	44
4.15	บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่ 47.2	45
4.16	บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่ 47.2	45
4.17	บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่ 47.2	45
4.18	บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่ 19.2	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.19	การติดสีแกรมบวกรูปร่างกลมของแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่ 19.2	47
4.20	การติดสีแกรมบวกรูปร่างท่อนของแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่ 75.1	47
4.21	บริเวณวงใสที่เกิดจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 7.2	49
4.22	บริเวณวงใสที่เกิดจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 12.1	49
4.23	บริเวณวงใสที่เกิดจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 36.1	49

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

น้ำเป็นสิ่งแวดล้อมอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ และสิ่งมีชีวิตต่างๆ นอกจากนี้ยังเป็นทรัพยากรธรรมชาติ ที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาเศรษฐกิจพื้นฐานของประเทศไทยในด้านการเกษตร การประมง การคมนาคม การพัฒนาอุตสาหกรรมและพลังงาน ตลอดจนเป็นแหล่งรองรับของเสียต่างๆ จากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การชำระร่างกาย การประกอบอาหาร การขับถ่ายของเสีย อีกทั้งประเทศไทยมีสภาพทางเศรษฐกิจและสังคมที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาเกี่ยวกับมลพิษทางน้ำ การเน่าเสียรวมถึงการปนเปื้อนของโลหะหนัก และสารพิษในแหล่งน้ำ น้ำเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของเชื้อโรคต่างๆ ทำให้เกิดความรำคาญ ส่งกลิ่นเหม็น ทำลายทัศนียภาพ นอกจากนี้ปริมาณสารอินทรีย์ที่มีมากในน้ำเสีย จะทำให้เกิดการย่อยสลายโดย จุลินทรีย์ทำให้ปริมาณออกซิเจนลดลงเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ จนเกิดการเสียสมดุลทางธรรมชาติ

การแก้ไขปัญหาน้ำเสียมีหลายวิธี แต่มีเป้าหมายที่สำคัญเหมือนกัน คือ การลดความสกปรกของน้ำ การบำบัดน้ำเสียส่วนใหญ่มักจะใช้งบประมาณที่สูง เพราะต้องใช้เทคโนโลยีที่ทันสมัยและประสิทธิภาพสูง จึงสามารถบำบัดน้ำเสียได้เป็นอย่างดี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ เป็นหน่วยงานการศึกษาแห่งหนึ่ง ซึ่งมีการใช้น้ำเพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆ เป็นจำนวนมาก ทำให้ปริมาณน้ำทิ้งเกิดขึ้นปริมาณมากเช่นกัน โดยเฉพาะจากโรงอาหารของมหาวิทยาลัยที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง น้ำเสียจะถูกปล่อยลงสู่บ่อบริเวณข้างห้องสมุด การบำบัดน้ำเสียโดยการใช้เครื่องตีน้ำให้อากาศ ในบางครั้งอาจมีสิ่งที่ปนเปื้อนมากและทำให้การย่อยสลายไม่ทัน น้ำเกิดการเน่าเสียและส่งกลิ่นเหม็น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำน้ำหมักชีวภาพที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ มาใช้ในการบำบัด เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียให้ดียิ่งขึ้น

ปัจจุบันได้มีการนำน้ำหมักชีวภาพ มาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากในน้ำหมักชีวภาพมีจุลินทรีย์หลายกลุ่มและมีการนำจุลินทรีย์ธรรมชาติเข้ามาใช้เพื่อช่วยในการบำบัดน้ำเสีย โดยจุลินทรีย์จะทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ให้น้ำที่เสียกลับมาดีขึ้น และสามารถช่วยปรับสภาพของเสียให้สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ให้ดีขึ้นได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงได้มีการนำน้ำหมักชีวภาพมาใช้เพื่อช่วยในการบำบัดน้ำเสีย โดยทำการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียจากน้ำหมักชีวภาพ วิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียและบำบัดน้ำเสียโดยใช้น้ำหมักชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียให้ดีขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดและคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่มีในน้ำหมักชีวภาพ
1.2.1 เพื่อศึกษาคุณภาพของน้ำก่อนและหลังในการบำบัดน้ำเสีย โดยใช้น้ำหมักชีวภาพ
1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดที่ดีที่สุดในการบำบัดน้ำเสีย

1.3 ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย

ทำการคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์ และศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ที่มีในน้ำหมักชีวภาพ โดยใช้สูตรการทำน้ำหมักชีวภาพจากการประปานครหลวง และใช้หัวเชื้อ พด. 6 จากกรมพัฒนาที่ดินและทำการทดสอบการบำบัดน้ำเสีย โดยใช้ตัวอย่างน้ำเสียบริเวณบ่อน้ำเสียข้างห้องสมุด มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเพิ่มประสิทธิภาพของการบำบัดน้ำเสีย โดยใช้น้ำหมักชีวภาพ
1.4.2 เป็นแนวทางในการนำมาใช้ประโยชน์ ในการบำบัดน้ำเสียจากแหล่งน้ำเสียธรรมชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำหมักชีวภาพ

2.1.1 ความหมายของน้ำหมักชีวภาพ

น้ำหมักชีวภาพ มีชื่อเรียกหลากหลาย เช่น น้ำสกัดชีวภาพ น้ำเอนไซม์ น้ำจุลินทรีย์ น้ำหมักพืช น้ำไอออนิกพลาสมา เซลล์ฟูดซ์ ได้จากการหมักพืช ผัก ผลไม้ สมุนไพร กับสารให้ความหวาน เช่น น้ำตาล น้ำผึ้ง ในสภาวะที่มีแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) แรกเริ่มนั้นถูกนำมาใช้เพื่อการเกษตรและสิ่งแวดล้อม หรือแม้แต่ด้านปศุสัตว์ เช่น ส่งเสริมสุขภาพสัตว์ กระตุ้นการเจริญของพืช ทำความสะอาดบริเวณเลี้ยงสัตว์ และใช้ในครัวเรือน เช่น ผสมน้ำยาล้างจาน ซักผ้า แชมพู แม้กระทั่งใช้อาบน้ำขจัดกลิ่นตัว

น้ำหมักชีวภาพ (Bio-organic liquid obtained) หรือน้ำสกัดชีวภาพ หรือน้ำจุลินทรีย์ คือ สารสกัดธรรมชาติที่ได้จากการนำเอาพืชผักผลไม้หรือวัสดุต่างๆ ที่เป็นสารอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้ รวมไปถึงเศษอาหารจากครัวเรือนก็สามารถนำมาทำน้ำหมักชีวภาพได้ นำวัสดุดังกล่าวมาหมักกับน้ำตาลในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน โดยมีจุลินทรีย์ทำหน้าที่ย่อยสลายวัสดุต่างๆ จนได้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น คือ น้ำหมักชีวภาพ

ในความหมายโดยทั่วไปน้ำหมักชีวภาพ คือ การนำเอาเศษพืช ผัก ผลไม้ สัตว์ชนิดต่างๆ มาหมักกับน้ำตาลทำให้เกิดจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์จำนวนมาก ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะไปช่วยสลายธาตุอาหารต่างๆ ที่อยู่ในพืช มีคุณค่าในด้านของธาตุอาหารพืช เมื่อถูกย่อยสลายโดยกระบวนการย่อยสลายของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ สารต่างๆ จะถูกปลดปล่อยออกมา เช่น โปรตีน กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต เอนไซม์ วิตามิน ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ (พิณชอ กรมรัตนาพร, 2550)

กรมส่งเสริมวิชาการเกษตร (2543) ให้คำจำกัดความของน้ำหมักชีวภาพไว้ว่า น้ำหมักชีวภาพ (Bio extract) หมายถึง น้ำที่ได้จากการหมักดองพืชประเภทอวบน้ำ เช่น พืชผัก ผลไม้ หมักดองด้วยน้ำตาลในสภาพที่ไร้อากาศ น้ำที่ได้ประกอบด้วยจุลินทรีย์และสารอินทรีย์หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ น้ำสกัดชีวภาพบางแห่ง เรียกว่า สารสกัดชีวภาพ หรือปุ๋ยชีวภาพ คือ ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เกิดจากกระบวนการหมัก

2.1.2 ประเภทของน้ำหมักชีวภาพ

ประเภทของน้ำหมักชีวภาพมีหลายประเภท แต่จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ ได้แก่ แบคทีเรีย รา โดยมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ และเกิดปฏิกิริยาทางชีวภาพเคมีต่างๆ ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ มี 2 ประเภท คือ

2.1.2.1 น้ำหมักชีวภาพจากพืช ทำได้โดยการนำเศษพืชสดผสมกับน้ำตาลทรายแดงหรือกากน้ำตาล อัตราส่วน น้ำตาลทรายแดงหรือกากน้ำตาล 1 ส่วน พืชผัก 3 ส่วน หมักรวมกันในถังปิดฝา หมักทิ้งไว้ประมาณ 3 - 7 วัน จะได้ของเหลวข้นๆ สีน้ำตาล ซึ่งเรียกว่า น้ำหมักชีวภาพ

2.1.2.2 น้ำหมักชีวภาพจากสัตว์ มีขั้นตอนการทำคล้ายกับน้ำหมักจากพืช แตกต่างกันตรงวัตถุดิบที่เปลี่ยนจากพืชมาเป็นสัตว์ เช่น หัวปลา ก้างปลา หอยเชอรี่ เป็นต้น

2.1.3 จุลินทรีย์ที่พบในการหมัก

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักนั้นมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีบทบาทร่วมกัน แต่ละชนิดของจุลินทรีย์จะเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของแต่ละช่วงเวลา จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีกิจกรรมการย่อยสลายในรูปแบบเฉพาะของตัวเอง แบ่งได้ดังนี้

2.1.3.1 แบคทีเรีย เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญมาก เพราะมีการเพิ่มจำนวนเร็ว ลักษณะเป็นเซลล์เดียว ขนาด 0.001 - 0.005 มิลลิเมตร การเพิ่มจำนวนส่วนใหญ่เพิ่มโดยวิธีที่เรียกว่า binary fission คือ การแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 เป็น 4 เรื่อยไป เพราะฉะนั้นถ้าแบคทีเรียเจริญในสภาวะที่เหมาะสมแล้ว จะมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เพราะการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งอาจกินเวลาเพียง 20-30 นาที เท่านั้น ในน้ำหมักชีวภาพมักพบแบคทีเรียทุกช่วงของกระบวนการหมัก สามารถย่อยสลายเศษซากพืช ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และโพลีแซคคาร์ไรด์ (polysaccharides) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก มีรูปร่างแบบท่อน (rod) และแบบกลม (cocci) อาจอยู่เดี่ยวๆ หรือเกาะกันเป็นคู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส และระดับความเป็นกรดเบสหรือพีเอช (pH) ในช่วง 5.5 – 5.8 สามารถผลิตกรดแลคติกทำให้ค่า pH ต่ำลง ป้องกันการเกิดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียได้ เช่น รา ยีสต์ และครอสทริเดีย (clostridia) เป็นต้น ทำให้ลดความเสียหายที่เกิดจากจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ (พงศ์ศักดิ์ รัตนกุลชัยโสภณ, 2545) แบคทีเรียแลกติกที่มีที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมัก คือ แบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม Homofermentative ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก คือ กรดแลคติกประมาณ 80 – 90 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็นกรดอะซิติกและ

คาร์บอนไดออกไซด์ กระบวนการเมแทบอลิซึมจะดำเนินไปตามวิถีไกลโลไลซีส (ปาริชาติ พุ่มขจร, 2542)

แบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักควรมีคุณสมบัติ ดังนี้

- ผลิตกรดแลคติก
- สามารถผลิตสาร แบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่างๆ
- ทนต่อค่า pH ที่ต่ำกว่า 5
- เจริญได้ในที่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 – 40 องศาเซลเซียส

แหล่งที่พบแบคทีเรียแลคติก สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งต่างๆ ดังนี้

- อาหารประเภทต่างๆ เช่น อาหารประเภทเนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เครื่องดื่ม นม และผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น
- ระบบทางเดินอาหาร สิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์
- น้ำเสียในแหล่งต่างๆ เช่น น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร หรือน้ำเสียจากแหล่งธรรมชาติ

แบคทีเรียแลคติกสามารถพบได้ในที่ต่างๆ ดังที่กล่าวมา และในธรรมชาติจะมีแบคทีเรียเจริญอยู่โดยทั่วไป เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกจะเจริญได้ในแหล่งต่างๆ ที่มีสารอาหารที่ทำให้ตัวเองเจริญเติบโต อีกทั้งแบคทีเรียแลคติกยังมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยก็สามารถเจริญอยู่ได้

2.1.3.2 แอคติโนมัยสีท เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเหมือนรา เพราะสามารถสร้างเส้นใยได้ แต่จัดว่ามีลักษณะใกล้เคียงแบคทีเรียมากกว่า ในกระบวนการหมักจะพบปริมาณน้อย จะพบแอคติโนมัยสีทในช่วงวันที่ 5 – 7 ของการหมัก ในระหว่างการหมักแอคติโนมัยสีทสามารถย่อยสลายเซลลูโลสและลิกนินได้ แอคติโนมัยสีทแม้มีเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ แต่เมื่อเทียบกับแบคทีเรียและรา ส่วนใหญ่แล้วการย่อยสลายจะช้ากว่า

2.1.3.3 รา จะเจริญในช่วงเดียวกับแอคติโนมัยสีท ราจะใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ราที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายเซลลูโลส คือ ราในจีนัส *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicilium* sp. และ *Rhizopus* sp. เป็นต้น

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ ต้องมีธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นเหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ pH และความชื้นเหมาะสม ปราศจากสารพิษและจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ แหล่งอาหารต่างๆ ได้แก่

2.2.1 **แหล่งคาร์บอน**

สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่สำคัญสำหรับการเจริญ และการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ในสภาวะแวดล้อมที่มีออกซิเจนสมบูรณ์จุลินทรีย์จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 เพื่อเปลี่ยนองค์ประกอบของเซลล์ และอีกร้อยละ 50 ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงาน โดยทั่วไปกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ (ทัศนีย์ เรืองหิรัญ, 2544)

2.2.2 **แหล่งไนโตรเจน**

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ โดยน้ำหนักแห้งของเซลล์ 100 กรัม มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ 10 – 14 กรัม ไนโตรเจนนี้อยู่ในรูปของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก แหล่งไนโตรเจนที่ใช้โดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ สารอนินทรีย์ไนโตรเจน และสารอินทรีย์ไนโตรเจน สารอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ เกลือแอมโมเนีย เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท เป็นต้น ส่วนสารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น ยีสต์สกัด เพปโตน กรดอะมิโน แหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ของจุลินทรีย์ แต่ปริมาณของกรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นจากการใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ อาจไม่เท่ากัน กรดอินทรีย์บางชนิดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ สำหรับกากน้ำตาลสามารถนำมาใช้เลี้ยงจุลินทรีย์เพราะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 0.62 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเช่น *Bacillus subtilis* เจริญได้ดีในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กลูตามีน อาจีนีน โพรลีน กลูตาเมท *B. subtilis* สามารถใช้ยูเรียและไนเตรทสำหรับการเจริญได้ด้วย

2.2.3 **แร่ธาตุ**

แร่ธาตุมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่จะมีแร่ธาตุต่างๆ เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย เช่น แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม กำมะถัน แคลเซียม และคลอรีน เป็นต้น ถ้าในสารอาหารที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุต่างๆ เหล่านี้ไม่เพียงพอจะต้องเติมแร่ธาตุดังกล่าวลงไปในรูปของสารประกอบที่เหมาะสม ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเกลือ แร่

ธาตุอื่นๆ เช่น โคบอลท์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส โมลิบดินัม และสังกะสี แร่ธาตุเหล่านี้เป็นประกอบที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ซึ่งปกติแร่ธาตุต่างๆ เหล่านี้จะมีปนอยู่ในสารประกอบอื่นๆ อย่างเพียงพอ

2.3 วัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมัก

วัตถุดิบในที่นี้ หมายถึง ผลผลิตทางการเกษตร และวัตถุดิบเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการเกษตร ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น กากน้ำตาล (molasses) กากถั่วเหลือง (soybean meal) เป็นต้น วัตถุดิบเหล่านี้ประกอบด้วยสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน คาร์บอน ไนโตรเจน แร่ธาตุ และสารเสริมการเจริญ (กรดอะมิโน และวิตามิน) ในการใช้วัตถุดิบเหล่านี้ในการหมักอาจมีความจำเป็นต้องเพิ่มสารประกอบบางชนิด เนื่องจากในวัตถุดิบมีสารประกอบเหล่านั้นน้อยเกินไป

2.3.1 กากน้ำตาล

การน้ำตาล เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาลทราย กากน้ำตาลเป็นของเหลวข้น เป็นส่วนหนึ่งที่ไม่นำไปตกผลึกอีก เพราะจะเสียค่าใช้จ่ายมากไม่คุ้มค่า กากน้ำตาลนี้เรียกว่า blackstrap molasses ในกากน้ำตาลมีน้ำตาลอยู่ปริมาณร้อยละ 52 (ซูโคสร้อยละ 30 และน้ำตาลอินเวิร์ทร้อยละ 22) นอกจากนี้ยังมีสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโน และวิตามินที่ทนความร้อนและด่างได้ เช่น niacin, pantothenic acid, riboflavin และ biotin และพบว่าในกากน้ำตาลมีปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ร้อยละ 0.81, 0.63 และ 4.43 โดยน้ำหนักตามลำดับ (นฤมล ทองไว, 2545)

2.3.2 วัตถุดิบ

การผลิตน้ำหมักในประเทศไทย สามารถแยกวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตได้ ดังนี้

2.3.2.1 เศษพืช เศษผัก ที่เหลือจากการคัดเลือก แลตัดแต่งผัก ซึ่งประกอบด้วยใบ กาบใบ กิ่งก้านที่อวบน้ำ หลายชนิดสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำหมักชีวภาพได้ เช่น ผักกาด ผักโขม กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักบุ้ง ผักกวางตุ้ง เป็นต้น นอกจากผักแล้ว พืชไร่อื่นๆ ที่มีการถอนแยก หรือเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วแต่ยังสดอยู่ ก็สามารถนำมาผลิตเป็นน้ำหมักชีวภาพได้ เช่น ข้างโพด และถั่งต่างๆ เป็นต้น

2.3.2.2 ผลไม้ ผลไม้ที่คัดทิ้งทั้งดิบและสุก และเฟอร์เมนต์บางส่วนแล้ว เช่น เงาะ ลำไย มะละกอ กล้วย เป็นต้น สามารถนำมาเป็นส่วนผสมในการหมัก แต่ควรระวังเปลือกผลไม้บางชนิด เช่น ส้ม ซึ่งย่อยสลายยากอาจมีผลกระทบต่อการหมักได้

2.3.2.3 เศษสัตว์ เช่น เศษปลา เศษเนื้อ จากครัวเรือน แมลง หนอน กิ้งกือ ไส้เดือน ฯลฯ สามารถนำมารวมกันแล้วใช้เป็นส่วนผสมของการหมักน้ำหมักชีวภาพได้อย่างดี

2.3.2.4 หอยเชอรี่และไข่หอยเชอรี่ การรวบรวมตัวหอยและไข่หอยเชอรี่ นำมาบดแล้วหมักโดยกรรมวิธีที่ถูกต้อง จะได้น้ำหมักชีวภาพที่มีประสิทธิภาพชนิดหนึ่ง

2.3.2.5 เศษอาหารจากครัวเรือน วัตถุดิบจากครัวเรือนถ้ารวบรวมแล้วหมักไว้จะลดปัญหาเรื่องกลิ่น และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านน้ำหมักชีวภาพได้ แต่ต้องระมัดระวังเรื่องเชื้อโรคที่อาจแพร่ระบาดไปได้ถ้ากระบวนการหมักไม่สมบูรณ์

2.3.3 ผงเชื้อ พด. (พด. หมายถึง พัฒนาที่ดิน)

กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้ดำเนินการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวมกันหลายสายพันธุ์ อยู่ในสภาพแห้งซึ่งสะดวกแก่การนำไปใช้และการเก็บรักษา โดยมีรายละเอียดพอสังเขป ดังนี้

2.3.3.1 สารเร่ง พด.1 คือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายวัตถุดิบเหลือใช้จากการเกษตร เพื่อใช้ผลิตปุ๋ยหมักในช่วงระยะเวลาอันสั้น ประกอบด้วย แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท และรา

2.3.3.2 สารเร่ง พด.2 คือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายวัตถุดิบเหลือใช้จากพืชและสัตว์ที่สดหรืออวบน้ำ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน จะได้ของเหลวประกอบด้วยกรดอินทรีย์และฮอร์โมนสามารถนำไปใช้นำรูปของน้ำหมักชีวภาพได้ เหมาะสำหรับพืชผักและผลไม้

2.3.3.3 สารเร่ง พด.3 คือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นศัตรูกับเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชในดิน โดยมีความสามารถในการป้องกัน หรือยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำให้เกิดโรครากหรือโคนเน่า และเปลี่ยนสภาพธาตุอาหารให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ ประกอบด้วย ไตรโคเดอร์มา และบาซิลลัส

2.3.3.4 สารเร่ง พด.4 คือ สารปรับปรุงบำรุงดินที่ได้จากการผสมวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น ยิปซั่ม หินฟอสเฟต ปูนมาร์ล เปลือกกุ้ง เปลือกปู เป็นต้น นำมาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติของดินให้มี

วิ.
LZ5.1E
ส5157
2547
ค.2

ความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช และพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บกับธาตุอาหารพืช หรือยืดอายุของปุ๋ยที่ใช้ในดินได้นานยิ่งขึ้น

2.3.3.5 พด.5 เป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักและการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้จากสัตว์ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อผลิตสารสำหรับกำจัดวัชพืช

2.3.3.6 พด.6 เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยครั้งนี้ที่สุด คือ เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักและการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้จากเศษอาหาร ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อผลิตน้ำหมักชีวภาพสำหรับบำบัดน้ำเสีย ซึ่งประกอบด้วย *Saccharomyces* sp. ซึ่งเป็นยีสต์ที่ช่วยในผลิตแอลกอฮอร์และกรดอินทรีย์ *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส เพื่อช่วยในการย่อยสลายโปรตีน และไขมัน และ *Lactobacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก

2.3.3.7 พด.7 เป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักและการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้จากพืชสมุนไพร ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อผลิตสารป้องกันศัตรูพืช

2.3.3.8 พด.8 พืชปุ๋ยสด คือ พืชที่ปลูกเพื่อไถหรือฝังกลบลงไปในดิน แล้วปล่อยทิ้งไว้ในห้จุลินทรีย์ในดินย่อยสลายกลายเป็นปุ๋ยสำหรับพืช พืชปุ๋ยสดมีหลายชนิดสามารถเลือกใช้ตามความเหมาะสมของสภาพพื้นที่และลักษณะการใช้ดิน เช่น ที่ลุ่ม ที่ดอน พื้นที่ดินเค็ม หรือพื้นที่สวนไม้ผล สวนผัก

2.3.3.9 พด.9 หญ้าแฝก คือ หญ้าที่พระบามสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงมีพระราชดำริให้นำมาใช้เพื่อการอนุรักษ์ดินและน้ำ ฟื้นฟูทรัพยากรดิน และรักษาสภาพแวดล้อม เนื่องจากมีการเจริญเติบโตเป็นกอ เบียดกันแน่น มีระบบรากยาวหยั่งลึกลงไปในดิน เหมือนม่านหรือกำแพงใต้ดิน ไม่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดจึงไม่แพร่ขยายเหมือนวัชพืช (ณัฐวรรณ พิทักษ์ศิริพรรณ, 2548)

2.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายในน้ำหมักชีวภาพ

2.4.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย การยืดเกาะแบบ β-1,4-glycosidic linkage ภายในสายของเซลลูโลสประกอบด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ Endoglucanase, Cellobiohydrolase และ β-glycosidase

2.4.1.1 Endoglucanase หรือ endo-1,4-β-glucanase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ β-1,4- glycosidic linkage ภายในสายของเซลลูโลสบริเวณ amorphous แบบสุ่ม สามารถย่อยสารละลาย amorphous cellulose เช่น phosphoric acid swollen cellulose อนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำ เช่น Carboxymethycellulose (CMC) และ cello-oligosaccharide ขนาดต่างๆได้น้ำตาลกลูโคส ไดแซกคาไรด์ (disaccharide) และ โอลิโกแซกคาไรด์ (oligosaccharide) ในการย่อยสลาย CMC ทำให้ความหนืดของ CMC ลดลง

2.4.1.2 Cellobiohydrolase หรือ exo-1,4-β-glucanase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ β-1,4- glycosidic linkage ที่ปลายด้าน nonreducing end ของคริสทอลไลท์เซลลูโลส(crystalling cellulose) ให้ได้เซลโลไบโอส(cellobiose) สามารถย่อยสลาย cello-oligosaccharide-avicel กระดาษกรองและใยฝ้าย (cotton)

2.4.1.3 β-glucosidase glucohydrolase หรือ cellobiase พบทั่วไปในพืชและจุลินทรีย์หลายชนิด ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ β-glucosidise bond ภายในโมเลกุลของเซลโลไบโอสและโอลิโกแซกคาไรด์หลังจากนั้นจะได้น้ำตาล β-glucose 2 โมเลกุล

ในการย่อยสลายคริสทอลไลท์เซลลูโลส (crystalling cellulose) เกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันของระบบเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์เซลลูโลสบริสุทธิ์เพียงองค์ประกอบเดียวไม่สามารถย่อยสลายคริสทอลไลน์เซลลูโลสได้ ขณะที่การรวมกันของเอนไซม์ exo-cellulase และ endo-cellolase หรือ β-glucosidase จะส่งเสริมให้การย่อยสลายคริสทอลไลน์เกิดขึ้นได้ดีและ β-glucosidase หรือเซลโลไบโอสจะช่วยกำจัดเซลโลไบโอสออกไป เนื่องจากเซลโลไบโอสเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ exo-cellulase และ endo-cellolase

เซลลูเลสพบได้ในราหลายชนิด เช่น *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp. และ *Fusarium* sp. ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Cellomonas* sp. *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. และแอคติโนมัยซีท เช่น *Streptomyces* sp. และ *Thermomonospora* sp. เอนไซม์ดังกล่าวประกอบด้วย en-1-4-β-glucanases, exo-1- 4-β-glucanases และ 1,4-β-glucosidase ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะร่วมกันย่อยเซลลูโลสได้กลูโคส (Goksoyr and Eriksson, 1990)

มีรายงานว่า *Bacillus* หลายชนิด เช่น *Bacillus brevis, B.firmus, B.polymyx, B.pulmilu, B. subtilis, B. licheniformis,* และ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

2.4.2 เอนไซม์โปรติเอส

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ ส่วนใหญ่เป็นรากับยีสต์ มีเพียงแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ (Mizobe *et al,* 1973) เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากราส่วนมากเป็นเอนไซม์ที่สร้างและขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme)ให้ง่ายต่อการแยกสกัดและสามารถผลิตได้ในปริมาณสูง โปรติเอสทำงานได้ดีในช่วง pH กว้าง และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การเปลี่ยนแปลงรสชาติในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น ราที่ผลิตโปรติเอส ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *A .oryzae* ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์นี้ คือ *Bacillus* sp. และแอคติโนมัยซีท คือ *Thermomonospora viridis*

2.4.3 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในดิน พืช สัตว์และจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แม้กระทั้งในน้ำพุร้อนบางแหล่ง เช่น ที่จังหวัดเชียงใหม่พบแบคทีเรียที่ผลิตเอมไซม์ไลเปสได้ (นัสรียา เมืองพรหม และคณะ, 2539) แต่เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืช และสัตว์ตรงที่ความสามารถเพิ่มผลผลิต (yiele) ได้รวดเร็วซึ่งทำได้โดยการปรับสภาวะแวดล้อม(conditions) ให้เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่เป็น extracellular enzyme มีทั้งรา ยีสต์ แอคติโนมัยซีท และแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้ผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน เช่น *Alcaligenes* sp. ผลิต alkaline lipase (Kokusho *et al.*,1982) บางชนิดได้ผลิต neutral lipase เช่น *Chronmobacterium* sp. และบางชนิด เช่น *Hamicola langinosa* และ *Pseudomonas* sp. ผลิต thermostable lipase หรือจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันก็อาจผลิตเอนไซม์

เมื่อพิจารณาช่วงการเจริญที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* จุลินทรีย์บางชนิดผลิตไลเปสได้สูงสุดเมื่ออยู่ในช่วง stationary phase เช่น *Alcaligenes* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* EF2 ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดขับออกนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ มักจะพบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในสภาพกึ่งอด อาหารจะเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์มาก เนื่องจากเอนไซม์ส่วนมากถูกปล่อยออกมาในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ ซึ่งสภาพขณะนั้นสับเสตรทที่สำคัญจะเริ่มขาดแคลนแล้ว (Suzuki *et al.,* 1986)

2.4.4 **เอนไซม์อะไมเลส**

2.4.4.1 แหล่งของเอนไซม์อะไมเลส จะพบอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายแป้ง ซึ่งเป็นอาหารสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิต ปริมาณเอนไซม์ที่พบจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอวัยวะ และชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้น เช่น จะพบทั่วไปในพืช ได้แก่ มันเทศ ข้าวมอลล์ ถั่วเหลือง ฯลฯ

2.4.4.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (วิลาวัณย์ เจริญจิราตระกูล, 2539) *B. mensentericus* (Beckord *et al.*, 1945) *Clostridium acetobutylicum.* (Hockenhull and Herbert, 1945) *A. polymysea*, *Aerobacillus macerran, Bacterium cassavanu, Actinomyces microflavas, Sarcinar* sp. (Peltier and Beckort, 1945) เป็นต้น ยีสต์ *Endomycopsis fibuligera*, *E.hordei, E.capsulari, E.linderi,* (จิราภรณ์ สุขุมมาวาศี, 2518) *Trichosporon variable, Candida* sp., *Pichia* sp. (พัชรา จรูญนารถ และคณะ, 2518) เป็นต้น รา *Aspergilus niger, A.candidus, A.orzae, Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Penicilium* sp., *Monilia* sp. เป็นต้น

อะไมเลสมีบทบาทในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ เป็นอย่างมากตัวอย่างเช่น ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำเชื่อม โดยใช้ขั้นตอนการย่อยสลายแป้งให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือ เด็กซ์ตริน และมอลโตส ไซรับ ใช้ในอุตสาหกรรมการทำขนมอบ (banking) เครื่องดื่ม (beverage) แอลกอฮอล์ (alcohol) อุตสาหกรรมเยลลี่ (jelly) และอุตสาหกรรมทอผ้า โดยคุณสมบัติของเอนไซม์จะมีโครงสร้างเป็นโปรตีน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนมาต่อกันเป็นสายยาว โดยโปรตีนที่ละลายน้ำได้และมีสภาพเป็นกรดอ่อนๆ (วาทิต ชนัศรุติพันธ์, 2545)

2.5 น้ำ

น้ำเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญต่อชีวิตมนุษย์ การนำน้ำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นด้านอุปโภค บริโภคด้านอุตสาหกรรม การเกษตร และด้านอื่นๆ มีแนวโน้มที่จะใช้น้ำในปริมาณที่สูงขึ้นในปัจจุบัน แต่การนำน้ำมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างถูกต้องและคำนึงถึงผลเสียที่จะตามมานั้นน้อยมาก โดยเฉพาะการปล่อยน้ำเสียลงสู่แม่น้ำธรรมชาติ ทำให้คุณภาพของแหล่งน้ำนั้นๆ มีแนวโน้มที่จะเสื่อมโทรมลง แหล่งน้ำที่ใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่ คือ แหล่งน้ำผิวดิน เช่น แม่น้ำลำคลองบึง ทะเลสาบ รองลงมาคือ แหล่งน้ำใต้ดิน

2.5.1 ความหมายของน้ำ

โลกของเราประกอบขึ้นด้วยพื้นที่ดินและพื้นที่น้ำ โดยส่วนที่เป็นพื้นที่น้ำนั้น มีอยู่ประมาณ 3 ส่วน (75 เปอร์เซ็นต์) และเป็นพื้นที่ดิน 1 ส่วน (25 เปอร์เซ็นต์) น้ำที่มีอยู่บนพื้นที่โลกจะอยู่ในสถานะต่างๆกัน ทั้งของแข็ง ของเหลว และก๊าซ และกระจายอยู่ทั่วไปทั้งบนภาคพื้นน้ำ ได้แก่ ห้วย หนอง คลอง บึง ทะเล และมหาสมุทรบริเวณขั้วโลกในปริมาณที่แตกต่างกันดังนี้ คือ อยู่ในทะเลและมหาสมุทร 97.41 เปอร์เซ็นต์ อยู่บนพื้นดิน 2.59 เปอร์เซ็นต์ โดยได้ทำการแบ่งน้ำในทะเลออกเป็น 2 ส่วน คือ เป็นน้ำที่นำมาใช้ไม่ได้ เพราะเป็นน้ำแข็งในบริเวณขั้วโลกและบนยอดเขาสูง 2.756 เปอร์เซ็นต์ เป็นน้ำที่นำมาใช้ ได้แก่ น้ำในทะเลสาบ น้ำบนผิวดิน น้ำใต้ดิน น้ำในแม่น้ำลำคลอง น้ำในบรรยากาศและน้ำในสิ่งมีชีวิต ซึ่งน้ำที่นำมาใช้ได้ดี มีเพียง 9,000 ลูกบาศก์เมตร

น้ำเป็นทรัพยากรที่สามารถเกิดหมุนเวียนได้เรื่อยๆไม่มีวันหมดสิ้น เมื่อนำมาใช้แล้วยังสามารถนำมาใช้ได้อีก น้ำจึงเป็นทรัพยากรที่จำเป็นและสำคัญยิ่งในการดำรงชีวิตของมนุษย์ ไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าทรัพยากรธรรมชาติอื่นๆ และนอกจากนั้นยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระบบนิเวศที่มีการเคลื่อนไหวเปลี่ยนแปลงเป็นโครงข่ายอยู่อย่างต่อเนื่อง น้ำมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไม่ได้เป็นเพียงส่วนประกอบหนึ่งของร่างกายของสัตว์หรือลำต้นของพืชเท่านั้น มนุษย์ยังต้องใช้น้ำในการอุปโภคบริโภค กิจกรรมทางด้านเกษตรกรรม และอุตสาหกรรมแทบทุกชนิด นอกจากนั้นน้ำยังเป็นที่พักอาศัยของสัตว์และพืชจำนวนมากด้วย (เบญจพร นามโครต, 2549)

2.5.2 ประโยชน์จากแหล่งน้ำ

การใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำนั้นมีมากมาย อาจจำแนกออกได้เป็น ดังนี้

2.5.2.1 เพื่อการดำรงชีวิตและใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น ใช้ดื่ม ใช้ปรุงอาหาร ใช้ชำระล้างใช้ล้างรถและอื่นๆ

2.5.2.2 ความต้องการส่วนร่วม เช่น กิจกรรมต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมในกระบวนการผลิตพลังงานจากน้ำในโรงงานอุตสาหกรรมที่ต้องใช้น้ำมาก ได้แก่ โรงงานผลิตสารเคมี โรงงาน ผลิตเหล็กกล้า โรงงานทอผ้า โรงงานกลั่นน้ำมัน โรงงานผลิตเยื่อกระดาษ โรงงานผลิตกระแสไฟฟ้า และโรงงานผลิตพลังงานด้านปรมาณู

2.5.2.3 เพื่อกิจกรรมด้านเกษตรกรรม เช่น การเลี้ยงสัตว์ การชลประทาน การประมง การทำนาข้าว

2.5.2.4 เพื่อใช้ระบายน้ำโสโครก

2.5.2.5 เพื่อการคมนาคม

2.5.2.6 เพื่อผักผ่อนหย่อนใจ (เบญจพร นามโครต, 2549)

2.6 น้ำเสีย

2.6.1 ความหมายของน้ำเสีย

น้ำเสีย (waste water) คือ น้ำซึ่งผ่านการใช้งานแล้ว จะโดยชุมชนหรืออุตสาหกรรม หรือสถาบัน หรือการใช้งานประเภทอื่นก็ตามที่จะมีมลสารปะปนอยู่ ซึ่งเมื่อระบายลงสู่แม่น้ำแล้วจะก่อให้เกิดการปนเปื้อน หรืออาจกล่าวได้ว่า "น้ำเสีย'' หมายถึง น้ำที่เสื่อมคุณภาพหรือน้ำที่มีลักษณะสมบัติเปลี่ยนไปจากเดิมตามธรรมชาติ จนทำให้เกิดผลเสียหายต่อการใช้ประโยชน์ของมนุษย์ การดำรงชีพของสัตว์น้ำ เช่น มีสิ่งปฏิกูล สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ทั้งที่ละลายน้ำได้ และละลายน้ำไม่ได้ปะปนอยู่ โดยมีมนุษย์เป็นต้นเหตุสำคัญทั้งทางตรงและทางอ้อม

2.6.2 ประเภทของน้ำเสีย

2.6.2.1 น้ำเน่า ได้แก่ น้ำซึ่งแสดงการเน่าเหม็น เนื่องจากขาดออกซิเจนในน้ำเพราะสิ่งต่างๆ เหล่านี้ถูกทิ้งลงสู่แหล่งน้ำ ได้แก่

1) สารอินทรีย์ต่างๆซึ่งจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในน้ำ หากมีสารอินทรีย์มากปริมาณออกซิเจนก็จะหมดไป

2) สารจำพวกน้ำมัน เป็นอันตรายอย่างยิ่งต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ เพราะน้ำมันจะกั้นผิวน้ำไม่ให้สัมผัสกับอากาศ ทำให้อัตราการละลายของออกซิเจนในน้ำลดลง

3) สารจำพวกปุ๋ย ทำให้ปริมาณออกซิเจนลดลงได้มากเช่นกัน เพราะทำให้เกิดการเร่งการเจริญเติบโตของสาหร่ายและพืชน้ำ

2.6.2.2 น้ำเป็นพิษ คือ น้ำมีสารพิษเจือปนอยู่ เช่น กรด ด่าง เกลือแร่ โลหะหนัก สารประกอบเคมีบางชนิด แม้จะไม่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย แต่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อแหล่งน้ำได้ สารพิษเหล่านี้เกิดจากอุตสาหกรรมเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ และเมื่อสารพิษอยู่ในวงจรของห่วงโซ่อาหาร ย่อมเป็นผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์เมื่อนำมาบริโภค

2.6.2.3 น้ำเป็นสื่อนำเชื้อโรค โดยการระบายสิ่งปฏิกูลสู่แหล่งน้ำ ซึ่งจะเป็นการแพร่กระจายเชื้อโรค

2.6.2.4 น้ำร้อน เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ มักใช้น้ำในกระบวนการระบายความร้อนแล้วปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ ทำให้สิ่งมีชีวิตไม่สามารถดำรงชีพ และแพร่พันธุ์ได้ดังเดิม อีกทั้งอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงอีกด้วย

2.6.2.5 น้ำที่มีกัมมันตรังสี มักเป็นน้ำที่ใช้ระบายความร้อนจากโรงงานพลังงานปรมาณูเป็นสื่อนำกัมมันตรังสีมาสู่มนุษย์ได้ (ประกรณ์ เลิศสุวรรณไพศาล, 2545)

2.6.3 ลักษณะและส่วนประกอบของน้ำเสีย

น้ำเสียเป็นของเหลวขุ่น มีวัสดุของแข็ง (solids) แขวนลอยอยู่จะมีสีเทา และมีกลิ่นอับในน้ำเสีย อาจมีเศษอาหาร เศษกระดาษ และอื่นๆ ที่ใช้แล้วในชีวิตประจำวันของชุมชน เมื่อเวลาล่วงเลยไปน้ำเสียจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีดำ เน่า และมีกลิ่นน่ารังเกียจ มีของแข็งสีดำลอยอยู่บนผิวน้ำ

ในเขตอากาศร้อนออกซิเจนในน้ำเสียลดลงอย่างรวดเร็ว และเป็นสภาพไร้ออกซิเจน หรือเรียกว่า Septic โดยลักษณะทั่วไปจะมีกลิ่นรุนแรงและมักเกิดไฮโดรเจนซัลไฟต์ (H_2S) เพราะจุลินทรีย์แบบไร้ออกซิเจน (anaerobic microorganism) ซึ่งจะดึงเอาออกซิเจนในสารละลายซัลเฟต (SO_4^{2-}) เหลือซัลไฟต์ (S^{2-}) ไว้แทน

น้ำเสียจะประกอบด้วยน้ำและของแข็ง ซึ่งละลายหรือแขวนลอยอยู่ในน้ำนั้นปริมาณของแข็งปกติมีน้อยมากประมาณร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก นั่นคือ ในน้ำเสีย 1,000 ส่วน จะเป็นน้ำ 999 ส่วน เป็นของแข็งเพียง 1 ส่วน แต่ของแข็งปริมาณเพียงเล็กน้อยนี้เป็นปัญหาใหญ่ในการกำจัดน้ำเสีย ส่วนน้ำทำหน้าที่เป็นเพียงตัวกลางในการเคลื่อนที่ของของแข็ง

ของแข็งที่แขวนลอยและละลายอยู่ในน้ำเรียกว่า ของแข็งแขวนลอย (suspended solids) ของแข็งละลาย (dissolved solids) ของแข็งละลายและของแข็งแขวนลอยเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ของแข็งอินทรีย์ (organic solids) และของแข็งอนินทรีย์ (inorganic solids)

ของแข็งอินทรีย์ มีแหล่งกำเนิดจากสัตว์และพืช รวมถึงของเสียจากสิ่งมีชีวิตหรือพืชที่ตายแล้ว และสารประกอบอินทรีย์สังเคราะห์สิ่งเหล่านี้ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน ซึ่งอาจรวมกับไนโตรเจน ซัลเฟอร์ หรือฟอสฟอรัส กลุ่มที่สำคัญคือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน รวมทั้งผลิตผลของการสลายตัวของสารเหล่านี้ซึ่งเสื่อมสลาย (decay) หรือสลายตัว (decomposition) โดยการกระทำของแบคทีเรีย และสิ่งมีชีวิตอื่นและสามารถเผาได้

ของแข็งอนินทรีย์ เป็นสารเฉื่อย (inert) และไม่เสื่อมสลาย ยกเว้นพวกสารประกอบหรือเกลือของแร่บางอย่างเป็นซัลเฟต ภายใต้สภาวะบางกรณีจะสลายตัวเป็นสารที่ง่ายกว่า เช่น การลดของซัลเฟตไปเป็นซัลไฟต์ สารอนินทรีย์ปกติเป็นสารแร่ รวมถึงทราย กรวดโดยทั่วไปไม่เผาไหม้

ปริมาณของแข็ง ปริมาณของแข็งในน้ำเสียทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ และความสามารถของสารเหล่านี้จะเสื่อมสลายหรือสลายตัวเป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการกำจัดน้ำเสีย

ของแข็งแขวนลอยนั้น สามารถมองเห็นได้และแขวนลอยอยู่ในน้ำเป็นของแข็งที่สามารถเอาออกจากน้ำได้ โดยวิธีการกรองหรือการตกตะกอน สารแขวนลอยในน้ำเสียส่วนมากมีทราย กรวดเล็ก ดิน ของแข็ง กระดาษ ไม้ และเศษอาหาร เป็นต้น ร้อยละ 70 เป็นสารอินทรีย์ และร้อยละ 30 เป็นสารอนินทรีย์ สารอนินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นทรายและกรวดเล็กๆ (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2540)

2.6.4 **การบำบัดน้ำเสีย**

การบำบัดน้ำเสีย หมายถึง การดำเนินการเปลี่ยนสภาพของของเสียในน้ำเสีย ให้อยู่ในสภาพที่มีความเหมาะสม พอที่จะไม่ทำให้เกิดปัญหาต่อแหล่งรับน้ำเสียนั้นๆ

การบำบัดน้ำเสียก่อนที่จะปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติต่างๆ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นที่จะทำให้เกิดประสิทธิภาพดีพอที่จะไม่ทำให้ แหล่งน้ำเพื่อการอุปโภคบริโภค เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำ จนอาจทำให้เกิดการขาดแคลนแหล่งน้ำสะอาดได้ วิธีการบำบัดน้ำเสียที่ใช้กันอยู่นั้น สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

2.6.4.1 การบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางกายภาพ เป็นการบำบัดที่อาศัยแรงทางฟิสิกส์ (physical foarce) เช่น แรงโน้มถ่วง แรงหนีศูนย์กลาง แรงเหวี่ยง ฯลฯ เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออกจากน้ำเสีย โดยเฉพาะสิ่งสกปรกที่ไม่ละลายน้ำ เช่น เศษกระดาษ เศษกิ่งไม้ เศษโลหะ ถุงพลาสติกต่างๆ เป็นต้น ซึ่งหน่วยบำบัดน้ำเสียประเภทนี้ ได้แก่ การกรองด้วยตะแกรง (screening) การตกตะกอน (sedimentation) เป็นต้น

2.6.4.2 การบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางเคมี มีวัตถุประสงค์เพื่อให้สิ่งสกปรกในน้ำเสียตกตะกอน และทำลายเชื้อโรคในน้ำเสีย ซึ่งสารเคมีที่ใช้ ได้แก่ สารเคมีเพื่อสร้างตะกอน และทำให้ตกตะกอน เช่น Lime Soda , Soda Ash , Sodium Hydroxide , Alum , Ferric Sulfate, Sulfuric acid เป็นต้น และสารเคมีที่ใช้เพื่อฆ่าเชื้อโรคในน้ำเสีย เช่น Chlorine Gas, Calcium Lime เป็นต้น ระบบบำบัดน้ำเสียวิธีทางเคมีนี้มักใช้ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียทางกายภาพ

2.6.4.3 การบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีการทางชีวภาพ เป็นการบำบัดน้ำเสียโดยใช้สิ่งมีชีวิตเป็นตัวช่วยในการเปลี่ยนสภาพของของเสียในน้ำ ให้อยู่ในสภาพที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำต่อแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยเปลี่ยนเป็นแก๊ส น้ำ และเซลล์ใหม่ของมัน ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่ใช้ คือ พวกจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ พวกแบคทีเรีย โพรโทซัว สาหร่าย รา และโรติเฟอร์ หน่วยบำบัดวิธีนี้ ได้แก่ ระบบบ่อ

ผึ่งธรรมชาติ ระบบเลี้ยงตะกอนเร่ง ระบบจานหมุนชีวภาพ (rotating biological contractor) (สมฤทธิ์ อินทราทิพย์, 2521)

2.7 การวัดคุณภาพของน้ำ

ตัวชี้วัดในการวิเคราะห์ของน้ำทิ้ง เป็นข้อมูลที่จำเป็นในการออกแบบระบบกำจัดน้ำทิ้ง เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพ จึงจำเป็นที่ศึกษาถึงคุณภาพของน้ำเสีย โดยใช้กระบวนการทางเคมีเข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ การวัดค่า pH BOD และค่าความขุ่น ซึ่งมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

2.7.1 ค่า pH

pH คือ การวัดสภาพความเป็นกรด หรือเป็นเบสของสารละลาย ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย (aqeous solution) โดยใช้หลักการเคมีไฟฟ้า (electrometric method) โดยวัดความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นระหว่างขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode) กับขั้วไฟฟ้าตรวจวัด (sensing electrode) ซึ่งทำให้ความต่างศักย์ที่ได้เกิดขึ้นจากจำนวนของไฮโดรเจนไอออน (H^+) ความต่างศักย์ที่เกิดจากไอออนจะถูกเปลี่ยนให้ความต่างศักย์ไฟฟ้า (electronic-potential) แล้วขยายให้มีความต่างศักย์สูงขึ้นด้วยเครื่อง pH meter

วิธีการวัด pH ในปัจจุบันนิยมวิธีไฟฟ้าเคมี เพราะสะดวกรวดเร็วและได้ผลแน่นอน แต่มีข้อเสีย คือ ราคาแพง เครื่องมือที่ใช้วัด pH เรียกว่า pH meter ซึ่งประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าที่มีลักษณะเป็นแก้ว (glass electrode) ใช้ได้ผลดีมากได้ค่าแน่นอน ถึง 0.1 pH หน่วย pH meter ใช้ได้กว้างขวางมาก แม้แต่น้ำตัวอย่างที่มีลักษณะขุ่นหรือน้ำเสียก็ตาม ข้อควรระวัง คือ การรักษาขั้วไฟฟ้า นอกจากนี้อุณหภูมิก็มีผลต่อการวัด เพราะการเปลี่ยนแปลงในศักย์ไฟฟ้าต่อหน่วย pH จะแปรผันกับอุณหภูมิ แต่ไม่มีปัญหาเพราะ pH meter ทุกเครื่องจะมีปุ่มปรับเพื่อชดเชยอุณหภูมิ

ในการวัด pH ด้วยเครื่อง pH meter นั้น ผู้วัดจะต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ทราบค่า pH แน่นอน เพื่อเตรียมมาตรฐานเครื่องให้พร้อมก่อนที่จะใช้วัด pH ของตัวอย่าง สารละลายบัฟเฟอร์นี้เสื่อมคุณภาพได้เพราะการเจริญเติบโตของเชื้อ หรือการปะปนจากสารอื่น

2.7.2 ความต้องการออกซิเจนทางชีววิทยา (Biochemical Oxygen Demand ,BOD)

Biochemical Oxygen Demand (BOD) คือ ปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดที่ย่อยสลายได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน จากกระบวนการนี้แบคทีเรีย

จะได้รับพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและแบ่งตัวต่อไป ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการออกซิไดส์สารอาหารเหล่านี้อาจเป็นแอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ หรือขึ้นอยู่กับชนิดของสารอาหาร

ค่า BOD จะบอกถึงกำลังการสกปรกของน้ำเสียต่างๆ ในรูปของออกซิเจนซึ่งต้องการใช้เมื่อปล่อยน้ำเสียนั้นลงสู่แม่น้ำลำคลอง ซึ่งมีสภาวะที่มีออกซิเจนอยู่ การหาค่า BOD ยังมีความสำคัญในการควบคุมความสกปรกของลำธารแม่น้ำต่างๆ เพราะค่า BOD จะบอกถึงองศาความสกปรกของแหล่งน้ำนั้นได้ทันที นอกจากนี้ยังใช้ในการออกแบบในการกำจัดน้ำเสียด้วย

การหาค่า BOD เป็นการดำเนินการตรวจสอบทางชีววิธี ซึ่งเกี่ยวข้องกับการวัดค่าออกซิเจน ซึ่งแบคทีเรียใช้เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ภายใต้สภาวะที่เหมือนกับที่เกิดในธรรมชาติมากที่สุด เพื่อที่จะให้การวิเคราะห์เป็นปริมาณวิเคราะห์ จึงต้องทำให้ปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลายคงที่ นั่นคือ ค่า BOD มาตรฐานจะใช้เก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สาเหตุที่ใช้อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวก็เพราะที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับของน้ำโดยทั่วไป และการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียจะเจริญเติบโตช้าที่อุณหภูมินี้ ส่วนการเลือกใช้การเก็บเวลา 5 วัน ก็เพราะว่าถ้าน้อยกว่านี้ปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปจะน้อยมากประการสุดท้าย ถ้าใช้เวลาในการเก็บนานเกินไปอาจไม่ทันกับการที่จะปล่อยน้ำเสียต่างๆ ลงแม่น้ำลำคลอง มักเขียนสัญลักษณ์ค่า BOD ที่ใช้เวลาเก็บ 5 วันว่า BOD_5

2.7.3 ความขุ่น (turbidity)

ความขุ่น คือ น้ำที่มีพวกสารแขวนลอย ซึ่งขัดขวางทางเดินของแสงที่ผ่านน้ำนั้น ความขุ่นของน้ำเกิดจากการที่มีสารแขวนลอยที่อยู่ในน้ำ เช่น ดินละเอียดอาจเป็นพวกสารอินทรีย์สารอนินทรีย์ แพลงตอน และสิ่งมีชีวิตเล็กๆ สารพวกนี้จะทำให้เกิดการกระจัดกระจาย และการดูดกลืน (absorbed) ของแสงแทนที่จะปล่อยให้แสงผ่านไปเป็นเส้นตรง

สารแขวนลอยในน้ำ ซึ่งเป็นสาเหตุใหญ่ของการเกิดความขุ่น อาจจะมีขนาดซึ่งละเอียดมาก (เล็กกว่า10^2 มิลลิเมตร แต่ใหญ่กว่า 0.2 มิลลิเมตร) จนกระทั่งถึงความหยาบ (10^2-10^3 มิลลิเมตร) ซึ่งพวกหลังนี้จะตกตะกอนได้ง่าย แต่พวกแรกจะไม่ตกตะกอน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสาเหตุของความขุ่นในน้ำ ตามทะเล อ่างเก็บน้ำ หรือน้ำที่ค่อนข้างสงบนิ่ง ในขณะที่น้ำตามแม่น้ำซึ่งกระแสน้ำพัดแรง ความขุ่นส่วนใหญ่เนื่องจากสารแขวนลอยที่มีขนาดใหญ่ สารเคมีบางอย่างก็เป็นบ่อเกิดความขุ่นของน้ำ เช่น เหล็ก แมงกานีส ซึ่งจะพบมากในบ่อน้ำ น้ำบาดาล

ความขุ่นมีความสำคัญต่อการผลิตน้ำประปา ในแง่ความน่าดื่มน่าใช้ (aesthetic) อายุของเครื่องกรอง (filterability) และการฆ่าเชื้อโรค (disinfection)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พิทยากร ลิ่มทอง (2536) ได้ศึกษาอิทธิพลของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส ต่อการผลิตปุ๋ยหมักจากฟางข้าว โดยทำการแยกราและแอคติโนมัยซีท ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากตัวอย่างดิน เศษพืช ปุ๋ยหมัก และมูลสัตว์ โดยทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่ย่อยสลายกระดาษกรอง CMC (carboxymethylcellulose) และ Avicel คัดเลือกได้รา 4 ไอโซเลท แอคติโนมัยซีท 3 ไอโซเลท และได้ศึกษาผลการเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้สภาพเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมต่อการย่อยฟางข้าวในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และศึกษาผลการใช้จุลินทรีย์ผสม 2 ชนิด ที่คัดเลือกได้ต่อการย่อยสลายฟางข้าวในกองปุ๋ยหมัก พบว่าการใช้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟางข้าวดีที่สุดแตกต่างกับไม่ใช้เชื้อจุลินทรีย์

กัญญา ม่วงแก้ว (2544) ได้ศึกษาการปรับปรุงคุณภาพปุ๋ยหมัก โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและตรึงไนโตรเจน ได้ทำการแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและตรึงไนโตรเจนจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ตัวอย่างปลวก ดินจากรังปลวก ปุ๋ยหมัก ตัวเร่งปุ๋ยหมัก และเศษวัสดุกำลังย่อยสลาย ซึ่งเจริญได้ที่อุณหภูมิห้อง จากการศึกษาพบว่า ได้แบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ และคัดเลือกแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสร้างเอนไซม์เซลลูโลสที่ย่อย CMC กระดาษกรอง Avicel และ α-cellulose แบคทีเรียสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ในอาหารเหลวที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน มีแหล่งไนโตรเจนเป็นเปปโตน ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

สุริยา สาสนรักกิจ (2544) ศึกษาจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพ พบว่า มีจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนอยู่ในช่วง 2.70×10^{5} ถึง 9×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus circulans. B.subtilis B.cereus, Staphylococcus* sp. *Pseudomonas* sp. และยีสต์ ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนพบอยู่ในช่วง 1.10×10^{6} ถึง 2.10×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์พวกสร้างกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Streptococcus* sp. เป็นแบคทีเรียที่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแบบท่อนสั้น

นฤมล ทองไว (2545) รายงานว่า การหมักมูลฝอยจากเศษผักกระหล่ำปลีเพื่อผลิตปุ๋ยน้ำหมักสำหรับการหมักด้วยกากน้ำตาล พบว่า ปริมาณกากน้ำตาลที่เหมาะสม คือ 1 กิโลกรัมต่อเศษผัก 3 กิโลกรัม ระยะเวลาการหมักที่เหมาะสม คือ 90 วัน ปุ๋ยน้ำหมักที่ได้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15.4 ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อพืช มีปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และอินทรีย์คาร์บอน ร้อยละ 0.12 0.015 0.262 และ 1.841 ตามลำดับ

ศกุนตลา ศิริอุดม (2545) ได้ทำการตรวจนับแบคทีเรียในปุ๋ยน้ำชีวภาพ ที่หมักจากผักสด เป็นเวลา 7 วันและ 14 วัน พบว่าที่ระยะเวลาหมัก 7 วัน ปุ๋ยน้ำชีวภาพมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 97-130 $\times 10^6$ cfu/ml มีจำนวน coliform bacteria ไม่เกิน 2 MPN/100ml และตรวจไม่พบ Fecal coliform bacteria ที่ระยะเวลาหมัก 14 วัน ปุ๋ยน้ำชีวภาพมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดลดลงอยู่ในช่วง 1.72 $\times 10^6$ cfu/ml แต่มีจำนวน coliform bacteria สูงขึ้นแต่ไม่เกิน 4.40 MPN/100ml และตรวจไม่พบ Fecal coliform bacteria นอกจากนี้แบคทีเรียที่พบในกระบวนการหมัก ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างทรงกลม

จุไรรัตน์ ดวงเดือนและคณะ (2548) ได้ศึกษาวิจัยเรื่อง การบำบัดน้ำเสียจากแหล่งชุมชน โดยใช้ตัวกลางจุลินทรีย์ และท่อลมเติมอากาศ เพื่อการหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ งานวิจัยนี้แบ่งการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนการออกแบบและจัดสร้างระบบน้ำเสียทางชีววิทยา โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญเติบโตบนตัวกลางที่เป็นท่อลอนพลาสติกและเติมอากาศอย่างช้าๆเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ การกระจายตัวของออกซิเจนให้มีประสิทธิภาพสูงสุดและขั้นตอนการบำบัดน้ำเพื่อหมุนเวียนการนำกลับมาใช้ใหม่ ด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้โพลีอะลูมิเนียม-คลอไรด์ (PAC) เป็นสารในการสร้างตะกอน ทำการศึกษาทดสอบประสิทธิภาพของระบบ โดยใช้ตัวอย่างน้ำเสียจากศูนย์กลางสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ที่ผ่านการเพิ่มค่าสกปรกด้วยน้ำจากถังปฏิกูล น้ำเสียที่มีค่าสกปรก BOD เฉลี่ย 150 มก./ลิตร มีภาวะบรรทุกสารอินทรีย์เฉลี่ย 0.33 กิโลกรัม BOD/ชั่วโมง พบว่า ระบบบำบัดน้ำเสีย ที่สร้าง สามารถบำบัดน้ำเสียได้ดีที่อัตราการไหลของน้ำเสีย 50 ลบ.ม./วัน โดยระบบการบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา สามารถลดค่า BOD ได้เฉลี่ย 94.05 เปอร์เซ็นต์ ลดค่า COD ได้เฉลี่ย 97.55 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อผ่าน การบำบัดทางเคมี พบว่าประสิทธิภาพการลดค่า BOD ของทั้งสองระบบ โดยรวมได้เฉลี่ย 97.96 เปอร์เซ็นต์ ลดค่า COD ได้เฉลี่ย 97.55 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบค่าของแข็งแขวนลอยในน้ำ ซึ่งน้ำที่ผ่านการบำบัด จะมีคุณภาพที่สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ ได้ตามเอนกประสงค์

สมศักดิ์ นุกูลอุดมพานิชย์ (2548) ศึกษาวิจัยเรื่อง การบำบัดน้ำเสียโดยใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติ (Effective Microorganism , EM) : กรณีศึกษาบ่อพักน้ำเสียโรงพยาบาลคีรีมาศ ผลการวิจัยพบว่าคุณภาพน้ำในบ่อพักน้ำเสียก่อนการฉีดสารพ่น EM มีค่า pH เท่ากับ 8.0 สารแขวนลอยมีค่าเท่ากับ 71.5 mg/L ตะกอนหนักมีค่าเท่ากับ 0.6 mg/L ส่วน BOD มีค่าเท่ากับ 54.2 mg/L เป็นน้ำมันและไขมันมีค่าเท่ากับ 43.2 mg/L ในส่วนของคุณภาพน้ำในบ่อพักน้ำเสียหลังฉีดพ่นสาร EM พบว่า มีค่า pH เท่ากับ 8.0 สารแขวนลอยมีค่าเท่ากับ 63 mg/L ตะกอนหนักมีค่าเท่ากับ 0.3 mg/Lส่วน BOD มีค่าเท่ากับ 51mg/L น้ำมันและไขมันมีค่าเท่ากับ 38.5 mg/L ในส่วนของประสิทธิผลของรูปแบบการแก้ปัญหาน้ำเสียโดยใช้สาร EM พบว่า ประสิทธิผลในการลดปริมาณสารแขวนลอยร้อยละ 11.89 ลด

ปริมาณน้ำมันและไขมันร้อยละ 10.88 ลดปริมาณตะกอนหนักร้อยละ 90 สามารถลดกลิ่นเหม็นได้ดี และสาร EM ไม่มีประสิทธิผลในการลดความเป็นกรด-ด่าง และค่า BOD 10.88 ลดปริมาณตะกอนหนักร้อยละ 50 สามารถลดกลิ่นเหม็นได้ดีและสุดท้ายสาร EM ไม่มีประสิทธิผลในการลดค่า pH และค่า BOD

เบญจพร นามโคตร (2549) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง การบำบัดน้ำเสีย โดยใช้ EM : กรณีศึกษาสระน้ำหลังอาคาร 2 สถาบันราชภัฏนครปฐม จากผลการวิจัยพบว่า คุณภาพของน้ำของสระน้ำหลังอาคาร 2 ก่อนฉีดพ่นสาร EM พบว่าค่า DO มีค่าเท่ากับ 1.70 ml/L ค่า BOD มีค่าเท่ากับ 10.39 ml/L ค่า COD มีค่าเท่ากับ 17.23 ml/L ค่า pH มีค่าเท่ากับ 7.80 สารแขวนลอย มีค่าเท่ากับ 1.79 ml/L ค่าความขุ่น15.56 NTU มีค่าเท่ากับ 10.39 ml/L หลังจากฉีดพ่นสาร EM พบว่าค่า DO มีค่าเท่ากับ 9.55 ค่า BOD มีค่าเท่ากับ 8.76 ml/L ค่า COD มีค่าเท่ากับ 13.78 ml/L ค่า pH มีค่าเท่ากับ 7.80 สารแขวนลอยมีค่าเท่ากับ 1.17 ml/L ค่าความขุ่นมีค่าเท่ากับ 6.38 NTU ประสิทธิภาพในการแก้ปัญหาน้ำเสีย โดยใช้สาร EM พบว่า สาร EM มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณค่า DO ได้ร้อยละ 82.20 ลดค่า BOD COD สารแขวนลอยและความขุ่น ได้ร้อยละ 15.70, 20.02, 34.64, 59.00 ตามลำดับ สาร EM สามารถลดกลิ่นเหม็นได้ดี แต่สาร EM ไม่มีประสิทธิผลในการเปลี่ยนแปลงค่า pH

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 จานเพาะเชื้อ (plate)
3.1.2 กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 10, 50, 100, 500, 1,000 มิลลิลิตร
3.1.3 กระบอกอบปิเปตต์ (sterile pipette can)
3.1.4 กระบอกอบจานเพาะเชื้อ (sterile petri dish can)
3.1.5 เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
3.1.6 ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
3.1.7 แผ่นสไลด์ (slide)
3.1.8 กระจกปิดสไลด์ (cover glass)
3.1.9 หลอดทดลองขนาดกลาง (tube)
3.1.10 ช้อนตักสาร (spoon)
3.1.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
3.1.12 ที่ตั้งหลอดทดลอง (rack)
3.1.13 แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
3.1.14 แท่งแก้วเขี่ยเชื้อ (spreader)
3.1.15 บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100 มิลลิลิตร
3.1.16 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 50, 100, 500 มิลลิลิตร
3.1.17 ขวดแก้ว (duran) ขนาด 250, 500 มิลลิลิตร
3.1.18 กระบอกฉีดแอลกอฮอล์
3.1.19 บีกเกอร์สแตนเลส
3.1.20 ขวดฉีดน้ำกลั่น

3.2 เครื่องมือ

3.2.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (balance) ยี่ห้อ Ohaus รุ่น NOB 110
3.2.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (balance) ยี่ห้อ Adventurer รุ่น AK3130
3.2.3 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (auto clave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น ES-315

3.2.4 ตู้อบความร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น 100-315
3.2.5 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Denver รุ่น 215
3.2.6 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH 30RF 200
3.2.7 เตาไฟฟ้า (hot plate)

3.3 สารเคมี

3.3.1 คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethycellulose)
3.3.2 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
3.3.3 แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)
2.3.4 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
3.3.5 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)
3.3.6 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)
3.3.7 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4)
3.3.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
3.3.9 กลูตามิก (glutamic)
3.3.10 กลูโคส ($C_6H_{14}O_7$)
3.3.11 ไตรบลูไทลิน (tributyrin)
3.3.12 สารละลายคองโก เรด (congo red solution)
3.3.13 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
3.3.14 สารละลายไอโอดีน (Iodine solution)
3.3.15 ไฮโดรคลอริก (HCl)
3.3.16 ทาร์ทาริก แอซิค (tartaric acid)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 สกิมมิลล์ (skim milk)
3.4.2 วุ้นผง (agar)
3.4.3 โซลูเบิล สตาร์ช์ (soluble starch)
3.4.4 บีฟเอ็กแทร็ก (beef extract)
3.4.5 ยีสต์แอ็กแทร็ก (yeast extract)
3.4.6 เปปโตน (peptone)
3.4.7 นิวเตรียนท์ อาการ์ (nutrient agar)

3.4.8 โปเตโต้ เดร็กโตส อาการ์ (potato dextrose agar)

3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การทำน้ำหมักชีวภาพ

งานวิจัยนี้ได้ทำน้ำหมักชีวภาพ โดยใช้สูตรการทำน้ำหมักชีวภาพ จากการประปานครหลวง และใช้หัวเชื้อ พด.6 ของกรมพัฒนาที่ดิน ซึ่งมีสูตรการทำ ดังนี้

กากน้ำตาล	1	ลิตร
ผักหรือผลไม้สับ	3	กิโลกรัม
น้ำ	1	ลิตร

อัตราส่วนที่ใช้ คือ 1: 3 : 1

3.5.2 ขั้นตอนการทำน้ำหมักชีวภาพ

3.5.2.1 นำเศษผัก ผลไม้ มาสับให้ละเอียด

3.5.2.2 เตรียมถังขนาด 5 ลิตร ที่มีฝาปิด นำมาล้างให้สะอาด

3.5.2.3 เตรียมน้ำสะอาด 1 ลิตร เทใส่ลงในถัง แล้วนำกากน้ำตาลอีก 1 ลิตร มาใส่ลงในถัง คนให้เข้ากัน

3.5.2.4 นำเศษผัก ผลไม้ที่สับแล้ว มาเทใส่ลงในถัง แล้วเทหัวเชื้อ พด.6 1 ถุงเทใส่ลงไปด้วยแล้วคนให้เข้ากัน

3.5.2.5 ปิดฝาถัง เก็บไว้ในที่ร่ม ไม่มีแสงสว่างส่องถึง

3.5.2.6 หมั่นทำการคนน้ำหมักชีวภาพทุกๆ 7 วัน

3.5.3 การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักชีวภาพ

เก็บตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ โดยทำการเก็บในสัปดาห์แรกจะเก็บทุกๆ 2 วัน สัปดาห์ต่อไป เก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 2 ครั้ง จนครบ 3 เดือน แล้วทำการตรวจนับและคัดแยกจุลินทรีย์ และวัดค่า pH

3.5.3.1 การตรวจนับแบคทีเรียในน้ำหมักชีวภาพ การตรวจนับแบคทีเรียในน้ำหมักชีวภาพ ใช้วิธีการนับแบบ total count technique ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

1) ทำการเจือจาง (dilution) ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพที่ 10^{-1}–10^{-7} ด้วยน้ำกลั่นที่ ฆ่าเชื้อปิเปตต์น้ำหมักชีวภาพ ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ (ตัวอย่างละ2 ซ้ำ) เทอาหาร NA (ภาคผนวก ก) ลงบ นจานเพาะเชื้อ ผสมอาหารและตัวอย่างให้เข้ากัน โดยวิธีการ Pour Plate Technique

2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน

3) นับจำนวน โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.3.2 การตรวจนับ รา และยีสต์ในน้ำหมักชีวภาพ

1) ทำการเจือจาง (dilution) ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพที่ 10^{-1}–10^{-7} ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ ปิเปตต์น้ำหมักชีวภาพ ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ (ตัวอย่างละ2ซ้ำ) เทอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) ลงบนจานเพาะเชื้อ ผสมอาหารและตัวอย่างให้เข้ากัน โดยวิธีทำการ Pour Plate Technique

2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน สำหรับยีสต์ และ 5-7 วัน สำหรับรา

3) นับจำนวน โคโลนีของรา และยีสต์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.3.3 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยคัดแยกโคโลนีที่แตกต่างกัน แล้วนำมาทำการแยกเชื้อ มีขั้นตอนดังนี้

1) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลนไฟจนร้อนแดง และทิ้งให้เย็นสักครู่หนึ่ง

2) แตะเชื้อที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ มาขีด (streak) บนผิววุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อ แบคทีเรียใช้อาหาร NA ส่วนรา และยีสต์ ใช้อาหาร PDA

3) บ่มเป็นเวลา 1-2 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ส่วนราบ่มเป็นเวลา 3-5 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสังเกตลักษณะโคโลนี แบคทีเรียจะสังเกตสี ขอบของโคโลนี ความโปร่งแสง ทึบแสง หรือความนูน ราจะสังเกตลักษณะของเส้นใย สีของเส้นใยและสปอร์ ส่วนยีสต์จะสังเกตสีของโคโลนี ขอบ ความมันวาว เป็นต้น

4) นำโคโลนีที่แยกได้เก็บเป็น stock culture ลงในอาหารวุ้นเอียง อาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย ส่วนอาหาร PDA เก็บรา และยีสต์ จากนั้นมาทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

3.5.4.1 การศึกษาแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการนำเชื้อแบคทีเรียจาก stock culture ที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง มาทำการย้อมแกรม (gram stain) ดูรูปร่าง การจัดเรียงตัว การติดสีแกรมของเซลล์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่ติดสีม่วงของคริสทอลไวโอเลต (crystal violet) เรียกว่า แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) และพวกที่ติดสีแดงของซัฟฟานิน (saffanin) เรียกว่า แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) จากนั้นนำแบคทีเรียที่มีสปอร์ (endospore) มาทำการย้อมสปอร์ (spore stain) เพื่อดูรูปร่าง และตำแหน่งของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.5.4.2 การศึกษารา และยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการนำเชื้อราจาก stock culture ที่เจริญบนอาหาร PDA มาทำการ ย้อมสี Lactophenol cotton blue ดูรูปร่าง และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะของเส้นใย ผนังกั้นเส้นใย ลักษณะของสปอร์ ส่วนยีสต์ทำการย้อมสี Mathylene blue ดูรูปร่างและการแตกหน่อ การสร้าง pseudomycelium ของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

3.5.5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์

3.5.5.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก stock culture ไปทำการจุด (point inoculation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลส โดยการเททับด้วยคองโก เรด (congo red) 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเททิ้ง จากนั้นเททับด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมล 1 มิลลิลิตร สังเกตวงใสที่ไม่ติดสีของ congo red รอบโคโลนีที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลส

3.5.5.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก stock culture ไปทำการจุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง โดยการเททับด้วยสารละลายไอโอดีน (gram iodine) สังเกตวงใสที่ไม่ติดสีของ Iodine ที่เกิดจากการย่อยสลายแป้ง

3.5.5.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก stock culture ไปทำการจุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตวงใสรอบๆ โคโลนี

3.5.5.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก stock culture ไปทำการจุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ tributirin agar (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตวงใสรอบๆ โคโลนี

3.5.6 การทดสอบการสร้างกรดแลคติก

นำตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาทำการจุด (point inoculation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ที่เติม $CaCO_3$ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดวงใส (clear zone) รอบๆโคโลนี ถ้าหากเกิดวงใส แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแลคติก

3.5.7 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจาก บริเวณสระน้ำข้างห้องสมุด มหาวิทยาราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์ โดยเก็บตอน 10 โมงเช้า จะเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 จุด จุดละ 3 ซ้ำ โดยเก็บบริเวณ

ใต้ผิวน้ำ จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ การวัดค่าพีเอช โดยใช้ pH meter วัดค่าความขุ่น โดยใช้เครื่อง Turbidity และหาค่า BOD

3.5.7.1 การหาค่า BOD มีขั้นตอน ดังนี้

1) หากตัวอย่างน้ำมีความสกปรกน้อย คือมีค่าความขุ่นน้อยและไม่มีกลิ่นเหม็น ให้ทำการรินตัวอย่างน้ำโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ ลงในขวด BOD ขนาด 300 มิลลิลิตร จนเต็มขวดแล้วเตรียมตัวอย่างเพิ่มอีกอย่างน้อย 2 ความเจือจาง แต่ถ้าตัวอย่างน้ำมีความสกปรกมากให้ลดปริมาณหรือเจือจางตัวอย่างน้ำ มิฉะนั้นปริมาณออกซิเจนในตัวอย่างไม่เพียงพอที่จะย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ เมื่อได้ปริมาตรที่เหมาะสมแล้ว เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่เตรียมไว้สำหรับเจือจางจนเต็มขวด BOD แล้วจึงเตรียมตัวอย่างเพิ่มอีกอย่างน้อย 2 ความเจือจางเช่นเดียวกัน

2) เจือจาง (dilution) ทำการรินตัวอย่างน้ำลงในกระบอกตวงตามปริมาตรที่ต้องการแล้วจึงรินใส่ขวด BODโดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้วจึงเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่เตรียมไว้สำหรับเจือจางจนเต็มขวด BOD

3) ในการเตรียมตัวอย่างในแต่ละความเจือจาง จะต้องทำการเตรียมเพิ่มให้ได้ความ เจือจางละ 2 ขวด ทำ blank จำนวน 3 ขวด ในการทำ BOD แต่ละครั้งโดยเติมน้ำกลั่นสำหรับเจือจางจนเต็มขวด BOD

4) บันทึกปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ใช้ทำแต่ละ dilution ของตัวอย่างน้ำ

5) นำตัวอย่างน้ำมาวัดค่าการละลายออกซิเจนเริ่มต้น (DO_0) โดยวิธีการไทเทรต

6) ปิดจุกให้สนิทพร้อมทั้งหล่อน้ำกลั่นที่ปากขวด

7) บันทึกค่าออกซิเจนละลายอิ่มตัวเริ่มต้น (DO_0)

8) นำขวด BOD ที่บรรจุตัวอย่างน้ำเข้าตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 20 $\pm$1 ^{o}C เป็นเวลา 5 วัน

9) เมื่อครบ 5 วัน ให้นำตัวอย่างน้ำในขวด BOD มาวัดค่าออกซิเจนละลาย ($D0_5$)

10) บันทึกค่าออกซิเจนละลายอิ่มตัว (DO_5)

11) ตรวจสอบค่า DO_0-DO_5 ของ blank ควรน้อยกว่า 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) โดยถ้ามากกว่านี้ผลการวิเคราะห์อาจไม่น่าเชื่อถือเท่าที่ควร อาจจะต้องพิจารณาการวิเคราะห์ใหม่

3.5.8 การบำบัดน้ำเสียด้วยน้ำหมักชีวภาพ

เก็บตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ เมื่อทำการหมักครบ 10 วัน 20 วัน 30 วัน 45 วัน 60 วัน 75 วัน และ 90 วันจากนั้นนำมาเติมลงในน้ำเสียตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์คุณภาพน้ำเริ่มต้นไว้แล้ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นมาทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำภายหลังการบำบัด ได้แก่ ค่าพีเอช ค่าความขุ่นและค่า BOD

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักชีวภาพ

จากการทดลอง พบว่า น้ำหมักชีวภาพเมื่อผ่านการหมักไป 5 วัน น้ำหมักชีวภาพจะมีฝ้าสีขาวขึ้นปกคลุมบริเวณผิวหน้า เศษผัก ผลไม้ที่ใช้ในการหมัก มีกลิ่นค่อนข้างแรง มีกลิ่นของกากน้ำตาล มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม หนืด เศษผัก ผลไม้ ที่ใช้ในการหมักมีลักษณะอ่อนนุ่ม ยุ่ย เละ และมีค่าพีเอชลดลง เมื่อหมักไปประมาณ 1 เดือนจนถึง 3 เดือน กลิ่นของน้ำหมักก็จะมีกลิ่นที่รุนแรงขึ้น มีกลิ่นเหม็น มีฝ้าสีขาวเพิ่มมากขึ้นหนากว่าเดิม เศษผัก ผลไม้ที่ใช้ในการหมัก มีลักษณะเละรวมเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อนำมาทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำหมักอายุ 3-90 วันจะพบว่าจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่เกิดขึ้นในน้ำหมักชีวภาพ โดยในช่วงแรกของการหมัก น้ำหมักอายุ 3-22 วันพบว่าไม่มีเชื้อราเกิดขึ้น แต่หลังจากน้ำหมักอายุ 26-40 วัน จะพบว่ามีเชื้อราเกิดขึ้นบริเวณส่วนบนของน้ำหมัก มีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว

จากการทดลองได้มีการเก็บตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ เพื่อทำการเก็บตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่มีในน้ำหมักชีวภาพ ผลการนับจำนวนแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ จากน้ำหมักชีวภาพ โดยวิธีการนำเอาตัวอย่างมาทำการเจือจางแล้วนำมาทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) สำหรับการแยกแบคทีเรีย ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 4.1 ส่วนเชื้อราและยีสต์ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 4.2 จากนั้นจึงคัดแยกโคโลนีที่แตกต่างกันมาทำการ Streak บนผิวหน้าอาหา NA เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรีย ส่วนเชื้อราและยีสต์ ทำการคัดแยกโคโลนีที่แตกต่างกันมาทำการ Streak บนผิวหน้าอาหาร PDA เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ของเชื้อราและยีสต์

ตารางที่ 4.1 จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในอาหาร NA

อายุน้ำหมัก (วัน)	จำนวนโคโลนีในอาหาร NA (CFU/ml)			ค่าเฉลี่ย (CFU/ml)
	ถังที่ 1	ถังที่ 2	ถังที่ 3	
3	220×10^{6}	228×10^{6}	216×10^{6}	221×10^{6}
5	230×10^{6}	152×10^{7}	109×10^{7}	164×10^{7}
7	123×10^{7}	98×10^{7}	114×10^{7}	111×10^{7}
12	88×10^{6}	98×10^{7}	100×10^{7}	95×10^{7}
15	279×10^{5}	260×10^{5}	265×10^{5}	268×10^{5}
19	205×10^{5}	211×10^{5}	200×10^{5}	227×10^{5}
22	226×10^{5}	180×10^{5}	201×10^{5}	202×10^{5}
26	222×10^{5}	192×10^{5}	180×10^{5}	198×10^{5}
29	101×10^{5}	97×10^{5}	129×10^{5}	109×10^{5}
33	100×10^{5}	97×10^{5}	115×10^{5}	104×10^{5}
36	87×10^{5}	92×10^{5}	95×10^{5}	91×10^{5}
40	60×10^{5}	72×10^{5}	89×10^{5}	74×10^{5}
43	72×10^{5}	60×10^{5}	87×10^{5}	73×10^{5}
47	89×10^{5}	72×10^{5}	53×10^{5}	71×10^{5}
54	70×10^{5}	71×10^{5}	72×10^{5}	71×10^{5}
57	72×10^{5}	69×10^{5}	58×10^{5}	65×10^{5}
60	52×10^{5}	60×10^{5}	50×10^{5}	54×10^{5}
75	52×10^{5}	48×10^{5}	50×10^{5}	50×10^{5}
90	43×10^{5}	50×10^{5}	40×10^{5}	44×10^{5}

จากการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในน้ำหมักชีวภาพทั้ง 3 ถัง พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นมีจำนวนใกล้เคียงกัน คือ ถังที่ 1 พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 220×10^{6} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ถังที่ 2 พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 228×10^{6} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ส่วนถังที่ 3 พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 216×10^{6} โคโลนีต่อมิลลิลิตร จำนวนแบคทีเรียในการหมักมีจำนวนสูงสุด164 $\times10^{7}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อระยะเวลาการหมัก 5 วัน จากนั้นจึงมีจำนวนลดลง เมื่อระยะเวลาการการหมัก 15 วัน และค่อนข้างคงที่ จนถึงระยะเวลาของการหมัก 33 วัน หรือประมาณ 1 เดือน จากนั้นจำนวนแบคทีเรียจะลดลงอีกครั้ง เมื่อระยะเวลาการหมัก 36 วัน และลดลงค่อนข้างคงที่และต่อเนื่อง จนถึงระยะเวลาการหมัก 90 วัน จากการทดลอง พบว่า เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มมากขึ้น การ

เปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ไปในทิศทางเดียวกัน คือ หลังจากเพิ่มจำนวนสูงสุดแล้วจึงมีจำนวนลดลงอย่างช้าๆ

การตรวจพบจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพทั้งหมดนั้น เกิดจากเชื้อที่ปะปนมากับวัสดุทางการเกษตร โดยจุลินทรีย์ที่ตรวจพบเกิดจากการหมักของวัสดุที่ใช้ในการหมัก คือ เศษผักและผลไม้ และหัวเชื้อ พด.6 โดยมีเศษผัก ผลไม้ กากน้ำตาล เป็นแหล่งอาหารให้จุลินทรีย์ ที่อาศัยอยู่ตามเศษผักและผลไม้ มาใช้ในการย่อยสลาย เพื่อใช้เป็นอาหาร

เนื่องจากในน้ำหมักชีวภาพมีจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งในน้ำหมักชีวภาพนั้น มีสภาวะและสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เชื้อแบคทีเรียสามารถใช้คาร์บอนที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ และมีความสามารถในการใช้ไนโตรเจนได้กว้างขวาง เช่น สารอินทรีย์ไนโตรเจน และสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เป็นต้น ทำให้ในช่วงแรกของการหมัก เชื้อแบคทีเรียสามารถใช้สารอาหารจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญ ในช่วงแรกของการหมัก จำนวนของเชื้อแบคทีเรียจะค่อยๆเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นช่วง log phase ของกราฟการเจริญ คือ เป็นระยะที่แบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทุกตัวไม่ได้แบ่งตัวพร้อมกัน เป็นระยะที่มีการเจริญมากที่สุดเซลล์ว่องไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมาก ระยะต่อมาเชื้อแบคทีเรียจะมีจำนวนคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก เนื่องจากสารอาหารเริ่มหมด ซึ่งเป็นช่วง stationary phase อัตราการแบ่งตัวเพิ่มเท่าอัตราการตาย หลังจากนั้นจะเป็นช่วง death phase จำนวนของเชื้อแบคทีเรียจึงค่อยๆลดลง ซึ่งเป็นช่วงที่สารอาหารถูกนำไปใช้เกือบหมด (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ , 2544)

ในงานวิจัยของศกุนตลา ศิริอุดม (2545) ได้ทำการตรวจนับแบคทีเรียในปุ๋ยน้ำชีวภาพ ที่หมักจากผักสดเป็นเวลา 7 วันและ 14 วัน พบว่าที่ระยะเวลาหมัก 7 วัน ปุ๋ยน้ำชีวภาพมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 97-130 $\times 10^6$ cfu/ml มีจำนวน coliform bacteria ไม่เกิน 2 MPN/100ml และตรวจไม่พบ Fecal coliform bacteria ที่ระยะเวลาหมัก 14 วัน ปุ๋ยน้ำชีวภาพมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดลดลงอยู่ในช่วง 1.72 $\times 10^6$ cfu/ml แต่มีจำนวน coliform bacteria สูงขึ้นแต่ไม่เกิน 4.40 MPN/100ml และตรวจไม่พบ Fecal coliform bacteria นอกจากนี้แบคทีเรียที่พบในกระบวนการหมัก ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างทรงกลม

ตารางที่ 4.2 จำนวนโคโลนีของราและยีสต์ในอาหาร PDA

อายุน้ำหมัก (วัน)	จำนวนโคโลนีในอาหาร PDA (cfu/ml)			ค่าเฉลี่ย (CFU/ml)
	ถังที่ 1	ถังที่ 2	ถังที่ 3	
3	66×10^{6}	50×10^{6}	42×10^{6}	52×10^{6}
5	125×10^{6}	103×10^{6}	100×10^{6}	109×10^{6}
7	90×10^{7}	92×10^{7}	83×10^{7}	88×10^{7}
12	86×10^{7}	98×10^{7}	78×10^{7}	87×10^{7}
15	72×10^{6}	54×10^{6}	50×10^{6}	58×10^{6}
19	102×10^{5}	94×10^{5}	85×10^{5}	68×10^{5}
22	89×10^{5}	76×10^{5}	50×10^{5}	71×10^{5}
26	80×10^{5}	65×10^{5}	56×10^{5}	67×10^{5}
29	78×10^{5}	51×10^{5}	50×10^{5}	59×10^{5}
33	92×10^{5}	45×10^{5}	33×10^{5}	56×10^{5}
36	70×10^{5}	58×10^{5}	32×10^{5}	53×10^{5}
40	50×10^{5}	49×10^{5}	32×10^{5}	43×10^{5}
43	47×10^{5}	45×10^{5}	25×10^{5}	39×10^{5}
47	44×10^{5}	36×10^{5}	30×10^{5}	36×10^{5}
54	40×10^{5}	35×10^{5}	34×10^{5}	36×10^{5}
57	47×10^{5}	22×10^{5}	20×10^{5}	29×10^{5}
60	25×10^{5}	32×10^{5}	27×10^{5}	28×10^{5}
75	33×10^{5}	25×10^{5}	12×10^{5}	23×10^{5}
90	25×10^{5}	16×10^{5}	8×10^{5}	16×10^{5}

จากการตรวจนับเชื้อรา และยีสต์ มีจำนวนเริ่มต้น 52×10^{6} โคโลนีต่อมิลลิลิตร และมีจำนวนเพิ่มขึ้นในระยะเวลาการหมัก 7 วัน คือมีจำนวน 88×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร และคงที่อยู่ภายในระยะเวลาการหมักนาน 12 วัน จึงค่อยลดลง ช่วงที่พบราส่วนมากจะพบวันที่ 26-40 วันของการหมัก (ข้อมูลไม่ได้แสดง) โดยพบที่บริเวณผิวหน้าของน้ำหมัก เนื่องจากราเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ รา ดำรงชีวิตแบบ aerobe คือ ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังสามารถทนความเป็นกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น รา สามารถใช้อาหารได้หลายชนิด เนื่องจากเป็นพวกเฮเทอโรโทรพ โดยสามารถเจริญอยู่ในอาหารที่มี

ความเข้มข้นของน้ำตาลมากๆ ซึ่งในน้ำหมักชีวภาพนี้จะมีผัก ผลไม้ และกากน้ำตาล ช่วยในการเจริญเติบโตของรา (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ , 2544)

ยีสต์จะพบทุกช่วงระยะเวลาการหมัก เนื่องจากในการย่อยสลายน้ำตาลโดยเชื้อยีสต์ เช่น กลูโคส อาจเกิดในลักษณะไม่ใช้ออกซิเจน ในสภาพที่มีออกซิเจนในกระบวนการหายใจ จะเกิดออกซิเดชันของกลูโคสอย่างสมบูรณ์ จนได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ถ้าเกิดออกซิเดชันไม่สมบูรณ์ จะได้กรดและสารมัธยันตร์ (intermediate) อื่นๆ ได้แก่ แอลกอฮอล์ กรด และเอสเทอร์ เป็นต้น ก่อนที่เชื้อยีสต์จะเกิดกระบวนการหมักสารโมเลกุลใหญ่ เช่น พอลีแซกคาไรด์ จะต้องถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไฮโดรเลส และเอนไซม์อื่นๆ เช่น แล็กเทส และคาตาเลส เป็นต้น ในทำนองเดียวกัน ในกระบวนการหายใจ เชื้อยีสต์สามารถใช้พอลีแซกคาไรด์ (แป้ง) น้ำตาล แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก และสารอินทรีย์อื่นๆได้ (นงลักษณ์สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544) ยีสต์พวก *Saccharomyces cerevisiae* ในกระบวนการหมักสามารถใช้กากน้ำตาล เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญได้ เมื่อใช้ระยะเวลาการหมักนานขึ้น อาหารจากกากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนมีปริมาณลดลง จึงเป็นสภาพที่จำกัดการเจริญของเชื้อยีสต์ ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การหมักมีจำนวนเชื้อยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นในงานวิจัยนี้ กระบวนการหมักที่เกิดเป็นแบบไม่เติมอากาศ ซึ่งเชื้อยีสต์สามารถใช้กรดในการเจริญได้

4.2 ผลการวัดค่าพีเอช (pH) ของน้ำหมักชีวภาพ

ในช่วงแรกของการหมัก เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ จะเจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว โดยใช้สารอาหารจากกากน้ำตาลในการเจริญ และมีการสร้างกรดขึ้น โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถใช้น้ำตาลได้ผลพลอยได้เป็นกรดแลคติก ส่งผลให้ในช่วงแรกของการหมักมีพีเอชลดลง

การใส่กากน้ำตาลในปริมาณที่เพียงพอในช่วงแรกของการหมัก ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาล และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ กับน้ำตาลที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์พืชโดยกิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียไปทำลายองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช มาเป็นแหล่งอาหารในการเจริญ เกิดผลพลอยได้เป็นกรดแลคติก จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (Malburg *et al.*,1992)

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำหมักชีวภาพ

อายุน้ำหมัก (วัน)	ถังที่ 1	ถังที่ 2	ถังที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	5.12	5.13	5.13	5.12
3	4.03	4.00	4.00	4.01
5	3.95	3.98	3.99	3.97
7	3.92	3.95	3.96	3.94
12	3.89	3.90	3.92	3.90
15	3.85	3.89	3.90	3.88
19	3.84	3.85	3.89	3.86
22	3.82	3.85	3.87	3.84
26	3.80	3.79	3.81	3.80
29	3.78	3.80	3.79	3.79
33	3.75	3.77	3.77	3.76
36	3.75	3.74	3.75	3.74
40	3.74	3.72	3.73	3.73
43	3.72	3.71	3.72	3.71
47	3.70	3.71	3.70	3.70
50	3.70	3.69	3.69	3.69
54	3.67	3.69	3.68	3.68
57	3.60	3.60	3.62	3.60
60	3.50	3.54	3.60	3.54
75	3.44	3.40	3.47	3.43
90	3.32	3.35	3.39	3.35

จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชที่แตกต่างกัน จุลินทรีย์แต่ละชนิดจึงมีความสามารถเจริญได้ในอาหารที่แตกต่างกัน พีเอชเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกิจกรรมเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยพีเอช ของสารในกระบวนการหมักแบบใช้ออกซิเจนจะมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ คือ เมื่อเริ่มการหมัก พีเอช ลดลงเล็กน้อยระหว่าง 2-3 วันแรกของการทดลอง เนื่องจากเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีการปรับตัวให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีการเจริญเติบโตน้อย หลังจากนั้นจุลินทรีย์เริ่มมีการใช้อาหาร และมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นทำให้ พีเอชลดลงจากเดิม ต่อมาเมื่อจุลินทรีย์มีการ

เจริญมากขึ้น ทำให้มีการใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต จึงเกิดการหมักแบบไร้ออกซิเจน ซึ่งให้ผลผลิตเป็นกรดไขมัน (volatile fatty acid)

Han and Srinivasan (1968) กล่าวว่า เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 4.7-6.8 สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ คือ ช่วงพีเอช 6-8 เพื่อให้กิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นได้สูงสุด และจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีด้วย จึงต้องกำหนดระยะเวลาการหมักให้เหมาะสม เพื่อให้การเปลี่ยนแปลงของพีเอชอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และการเจริญของจุลินทรีย์

4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

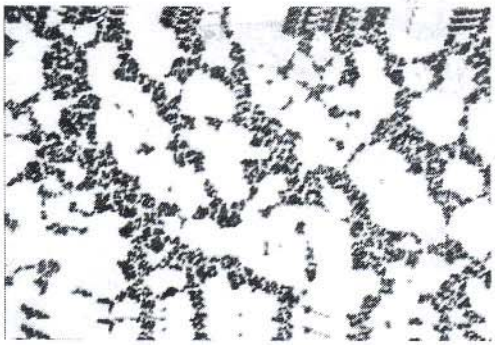
จากการเก็บตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพเพื่อทำการคัดแยกจุลินทรีย์ พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรีย ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันได้ทั้งหมด 29 สายพันธุ์ จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมสีแกรม (gram stain) และย้อมสปอร์ (spore stain) ผลการศึกษา (ตารางที่ 4.4) พบว่า แบคทีเรียที่พบจะมีทั้งที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ มีสปอร์ มีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม แกรมบวก ท่อน แกรมบวก ท่อนแกรมลบและท่อนแกรมบวก มีสปอร์ โดยแบคทีเรียรูปร่างกลมแกรมบวก มีจำนวน17 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 3.2, 5.2, 7.1, 12.1, 19.2, 26.1, 36.1, 43.1, 47.2, 54.1, 54.2, 54.3, 57.2, 57.3, 60.1, 90.1 และ 90.2 รูปร่างท่อน แกรมบวก มีจำนวน 7 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 3.1, 5.3, 7.2, 12.3, 26.3, 33.1, 33.2 และ 75.1รูปร่างท่อน แกรมลบ มีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 7.2 และ 29.2 รูปร่างท่อน แกรมบวก มีสปอร์ มีจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 50.1, 50.2 และ 75.2

ตารางที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบคทีเรีย

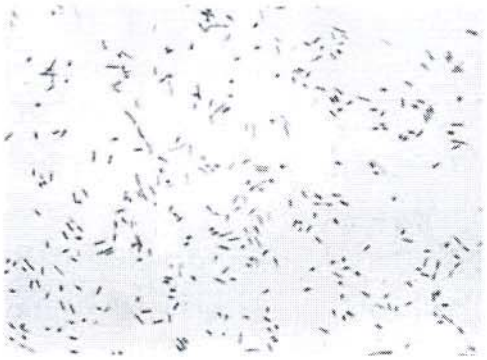
สายพันธุ์	ลักษณะ	แกรม	ตำแหน่งของสปอร์	ลักษณะโคโลนี
3.1	ท่อน	+	-	โคโลนีกลมใหญ่ สีเหลืองอ่อน มันวาว ทึบแสง ขอบเรียบ
3.2	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น มันวาว ทึบแสงขอบเรียบ
5.1	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีขาว มันวาว ทึบแสง ขอบขรุขระ
5.2	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น นูน ไม่มันวาว ขอบขรุขระ
5.3	ท่อน	+	-	โคโลนีกลม สีเหลืองอ่อน นูน มันวาว ขอบขรุขระ
7.1	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น นูน ทึบแสง ขอบเรียบ
7.2	ท่อน	-	-	โคโลนีกลม สีเหลืองอ่อน นูน มันวาว ขอบเรียบ
12.1	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีเหลืองอ่อน ขอบหยัก
12.3	ท่อน	+	-	โคโลนีกลม สีขาว มันวาว นูน ขอบเรียบ

ตารางที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบคทีเรีย (ต่อ)

สายพันธุ์	ลักษณะ	แกรม	ตำแหน่งของสปอร์	ลักษณะโคโลนี
19.2	กลม	+	-	โคโลนีกลมเล็ก สีขาว ใส ขอบเรียบ
26.1	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีเหลือง จุดเล็ก มันวาว ขอบเรียบ
26.3	ท่อน	+	-	โคโลนีกลมแผ่ออกมา สีเหลือง มันวาว ขอบเรียบ
29.2	ท่อน	-	-	โคโลนีกลม สีครีม โปร่งแสง เยิ้ม ขอบเรียบ
33.1	ท่อน	+	-	โคโลนีกลม สีครีม ทึบแสง ขอบเรียบ
33.2	ท่อน	+	-	โคโลนีกลม สีเหลืองอ่อน เยิ้ม ใส มันวาว ขอบขรุขระ
36.1	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น ลาม ทึบแสง ขอบหยัก
43.1	กลม	+	-	โคโลนีกลมใหญ่ สีขาว ทึบแสงขอบใส เรียบ
47.2	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีเหลืองใส มันวาว ขอบขรุขระ
50.1	ท่อน	+	ตรงกลาง	โคโลนีกลม สีขาว ลาม ด้าน ทึบแสง ขอบหยัก
50.2	ท่อน	+	ตรงกลาง	โคโลนีกลม สีขาว ด้าน ทึบแสง ขอบหยัก
54.1	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีครีมเล็ก มันวาว ขอบเรียบ
54.2	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีขาว จุดเล็ก มันวาว
54.3	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีครีม ด้าน ขอบเรียบ
57.2	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีเหลือง ใส มันเยิ้ม ขอบหยัก
57.3	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีครีม ลาม โปร่งแสง ขอบเรียบ
60.1	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีครีม ลามทั่วจานเพาะเชื้อ ขอบหยัก
75.1	ท่อน	+	-	โคโลนีกลมใหญ่ สีครีม แผ่ลามเป็นคลื่น ขอบหยัก
75.2	ท่อน	+	ตรงกลาง	โคโลนีกลม สีขาว ลาม ด้าน ทึบแสง ขอบหยัก
90.1	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีครีม ลาม โปร่งแสง ขอบเรียบ
90.2	กลม	+	-	โคโลนีกลม สีครีมเล็ก มันวาว ขอบเรียบ

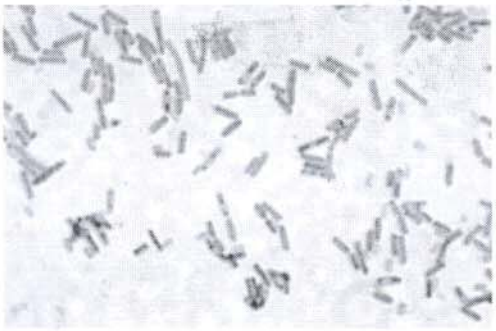


ภาพที่ 4.1 การติดสีแกรมบวกและรูปร่างกลมของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 19.2



ภาพที่ 4.2 การติดสีแกรมลบและรูปร่างท่อนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 29.2

ภาพที่ 4.3 การติดสีแกรมบวกและรูปร่างท่อนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 33.1



ภาพที่ 4.4 การติดสีแกรมบวกและรูปร่างท่อนมีสปอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 50.1

แบคทีเรียที่พบในน้ำหมักชีวภาพ โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เจริญในช่วงอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic phase) คือเจริญในช่วงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นแบคทีเรียตามธรรมชาติในเศษวัสดุนั้น และจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ในช่วงแรกของกระบวนการหมัก ได้แก่ กลุ่มของแบคทีเรียรูปแท่งและรูปกลม ติดสีแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ เช่น *Micrococcus* sp. มีลักษณะกลม แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ *Lactobacillus* sp. มีลักษณะเป็นท่อน แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ แบคทีเรียรูปแท่งติดสีแกรมลบ ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomodaceae* แบคทีเรียรูปแท่งที่สร้างสปอร์ เช่น *Bacillus circulans* และ *Bacillus stearothermophilus* เป็นต้น (Kutzner, 2000)

ในน้ำหมักชีวภาพพบจุลินทรีย์หลายกลุ่ม มีทั้งที่ต้องการออกซิเจน และไม่ต้องการออกซิเจน มักเป็นกลุ่มแบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., นอกจากนี้ยังอาจพบเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger* และ ยีสต์ ได้แก่ *Canida* sp. ซึ่งคุณภาพของน้ำหมัก ชีวภาพขึ้นกลับองค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ จุลินทรีย์ที่มีในกระบวนการหมัก และสภาวะ แวดล้อมขณะหมัก

ในงานวิจัยของสุริยา สาสนรักกิจ (2544) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำหมัก 4 ตัวอย่าง พบว่า มีจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศประมาณ 1.1×10^{5} CFU/ml และจุลินทรีย์ที่สร้างกรดมีประมาณ 2.5×10^{7} CFU/ml ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคติก เมื่อตรวจสอบแล้วพบว่า เป็น *Lactobacillus* sp. และ *Streptococcus* sp. เมื่อทดสอบจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp. และ Yeast ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศจะเป็นพวกสร้างกรด คือ แบคทีเรียแลคติก และพวกสร้าง H_2S ซึ่งจะตรวจพบว่าเป็นพวกแกรมลบท่อนสั้น

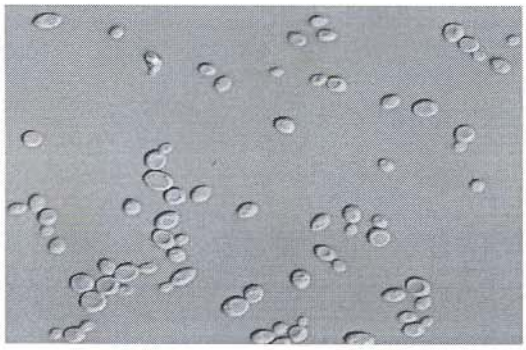
4.4 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราและยีสต์

ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ 5 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้น้ำหมักชีวภาพ โดยวิธีการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรรศน์ และสังเกตุลักษณะโคโลนี ดังแสดงในตาราง 4.5 ซึ่งยีสต์ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ที่ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ยีสต์

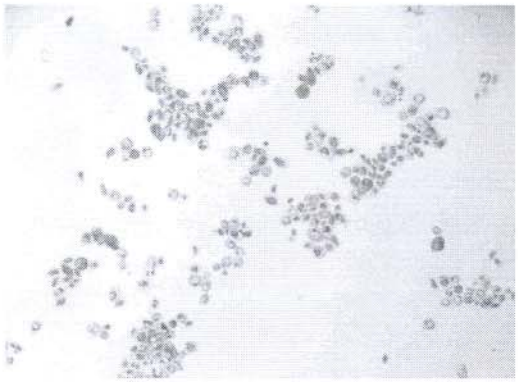
ที่พบในน้ำหมักชีวภาพ มี 4 แบบ คือ แบบที่ 1 (สายพันธ์ที่ 7.2 และ 60.1) คือ มีลักษณะเป็นเซลล์รูปไข่ แตกหน่อ แบบที่ 2 (สายพันธ์ที่ 12.1) คือ มีลักษณะเซลล์กลม แตกหน่อ แบบที่ 3 (สายพันธ์ที่ 19.2) คือ มีลักษณะเป็นท่อนขนาดใหญ่ และแบบที่ 4 (สายพันธ์ที่ 36.1) มีลักษณะเป็นท่อนต่อกันมี pseudomycelium

ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์

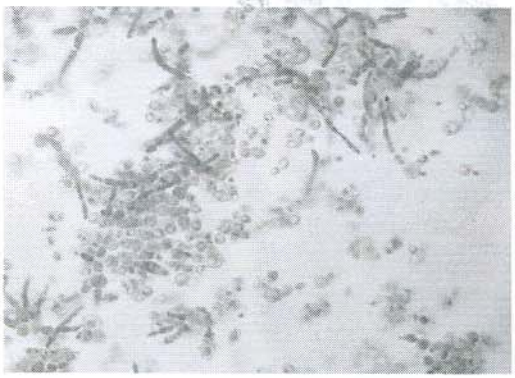
สายพันธุ์	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ลักษณะโคโลนี
7.2	เซลล์รูปไข่ แตกหน่อ	โคโลนีกลม สีเหลือง ใส มันวาว มีลักษณะเยิ้ม
12.1	เซลล์กลม แตกหน่อ	โคโลนีกลม สีขาวอมเหลือง ขอบหยัก
19.2	ท่อนใหญ่	โคโลนีกลม สีขาวอมเหลือง นูน ขอบหยัก
36.1	ท่อนต่อกัน มี pseudomycelium	โคโลนีกลม สีเหลืองอมขาว มันวาว ไม่เยิ้ม
60.1	เซลล์รูปไข่ แตกหน่อ	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น ด้าน ขอบหยัก



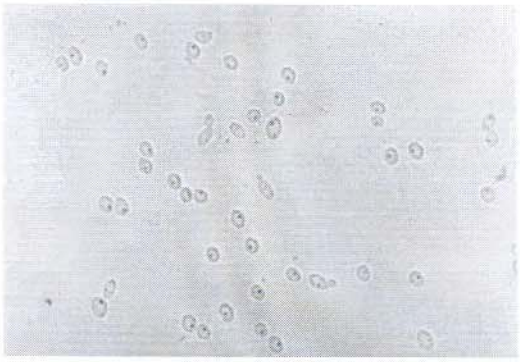
ภาพที่ 4.5 ลักษณะและโครงสร้างของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 7.2



ภาพที่ 4.6 ลักษณะและโครงสร้างของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 12.1



ภาพที่ 4.7 ลักษณะและโครงสร้างของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 36.1



ภาพที่ 4.8 ลักษณะและโครงสร้างของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 60.1

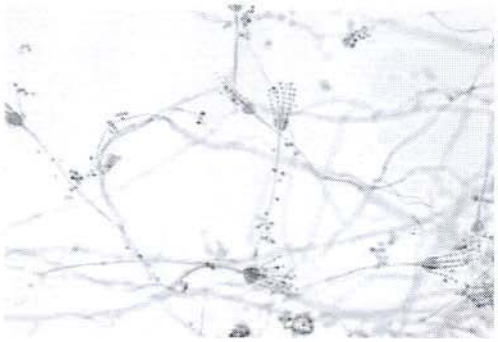
ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต เซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม หรือรี นอกจากนี้อาจมีรูปร่างเป็นรูปถั่ว รูปเลมอน ทรงกระบอก สามเหลี่ยม หรือยาวเป็นสาย ขนาดของยีสต์แตกต่างกันในแต่ละชนิด ลักษณะเด่นของยีสต์คือ เป็นพวกเซลล์เดียวและมีหน่อ การแตกหน่อบางครั้งไม่หลุดออกจากกัน แต่เกาะกันเป็นกลุ่ม บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงโดยเซลล์ตรงกลางยาวต่อกันเป็นสาย เรียกซูโดไมซีเลียม (pseudomycelium) (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539) ในสภาพมีออกซิเจนแต่ถ้าหากมีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลให้เอทานอลแทนการหายใจให้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ หรือการหายใจถูกยับยั้งด้วยการหมัก ยีสต์บางชนิดสามารถเติบโตได้เฉพาะในสภาพมีออกซิเจนไม่มีความสามารถในการหมัก (oxidative yeast) ยีสต์พวกนี้ได้แก่ *Rhodotorula* sp. , *Sporobolomyces* sp., และ *Endomycopsis* sp.

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

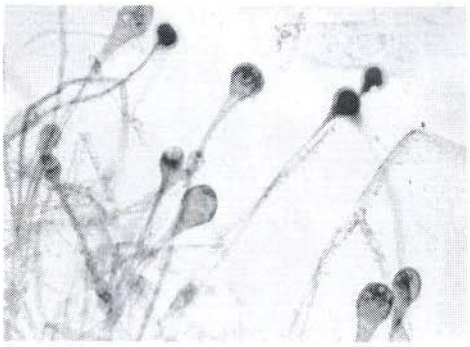
ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้น้ำหมักชีวภาพ โดยวิธีการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และลักษณะโคโลนี ดังแสดงในตาราง 4.6

ตารางที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา

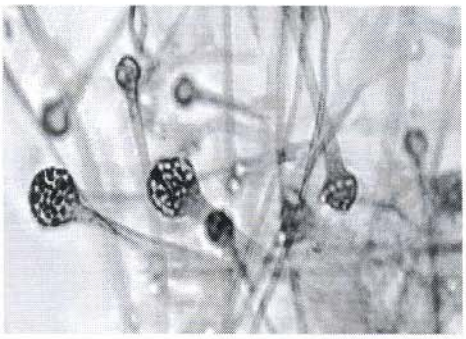
สายพันธุ์	ลักษณะ	ลักษณะโคโลนี
26.2	Hypha มี septum ลักษณะของ conidiophore คล้ายไม้กวาด	เส้นใยในระยะแรกมีสีขาวหลัง จากนั้นมีสีเขียวออกน้ำตาล
33.2	Sporagiophore ซึ่งแยกออกจาก aseptate hypha มี Rhizoid	เส้นใยสีเขียวสั้น ปนสีขาว คล้ายสำลีฟูๆ เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว
36.2	Hypha ไม่มี septum มี stolon ซึ่งเป็น Hypha มี Rhizoid	เส้นใยสีขาวสั้น ต่อมามีสีเทา เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีลักษณะฟูคล้ายสำลี
40.1	Hypha มี septum มีลักษณะคล้ายขวดส่วนปลายของ steigma มี conidia	เส้นใยมีสีขาว หลังจากนั้นเส้นใยมีสีเหลืองปนอยู่เมื่อเก็บไว้นานๆ
40.2	Hypha มี septum ส่วน conidiophoreไม่มีแขนง	เส้นใยสีขาวในระยะแรก เส้นใยฟุ้งกระจายเต็ม plate หลังจากนั้นเส้นใยมีสีเทา



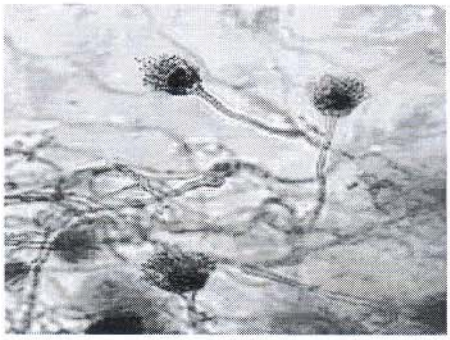
ภาพที่ 4.9 ลักษณะโครงสร้างของรา สายพันธุ์ที่ 26.2



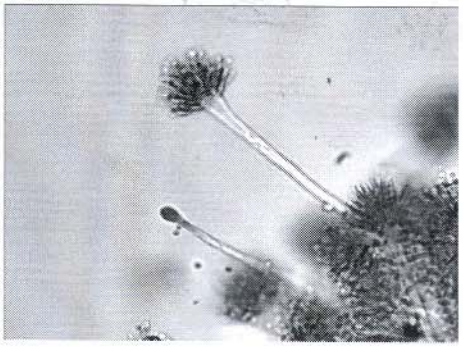
ภาพที่ 4.10 ลักษณะโครงสร้างของรา สายพันธุ์ที่ 33.2



ภาพที่ 4.11 ลักษณะโครงสร้างของรา สายพันธุ์ที่ 36.2



ภาพที่ 4.12 ลักษณะโครงสร้างของรา สายพันธุ์ที่ 40.1



ภาพที่ 4.13 ลักษณะโครงสร้างของรา สายพันธุ์ที่ 40.2

จากการศึกษาเชื้อราที่เกิดขึ้นในน้ำหมักชีวภาพ พบว่า จากการศึกษาลักษณะของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่พบในน้ำหมักชีวภาพนั้น มีดังนี้ สายพันธุ์ที่ 26.2 มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ที่ 33.2 มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา *Mucor* sp. สายพันธุ์ที่ 36.2 มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา *Rhizopus* sp. ส่วนสายพันธุ์ที่ 40.1 และ 40.2 มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา *Aspergillus* sp.

จากการคัดแยกเชื้อราจากน้ำหมักชีวภาพ พบว่า เชื้อราที่มีในน้ำหมักชีวภาพมีหลายชนิด ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับเศษวัสดุที่นำมาใช้ในการหมัก ความชื้น อุณหภูมิ และระยะเวลาในการหมัก (ภาวนา ศรีสุริยจันทร์ , 2548) พบว่า เชื้อราจะใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน เชื้อราที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายเซลลูโลส คือเชื้อราในจีนัส *Aspergillus* sp. , *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. และ *Rhizopus* sp. เป็นต้น

4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย

ผลจากการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพ มาทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด คือ ทดสอบเอนไซม์อะไมเลส โดยการใช้อาหาร Starch Agar ทดสอบเอนไซม์โปรติเอสทดสอบโดยการใช้อาหาร Skim milk Agar ทดสอบเอนไซม์ไลเปส โดยการใช้อาหาร Tributyrin agar ทดสอบเอนไซม์เซลลูเลสโดยการใช้อาหาร Carboxymethyl cellulose agarโดยวิธีการนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทำ point inoculation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ซึ่งถ้ามีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอาหารเหล่านี้ได้ จะสังเกตได้จากการเกิดบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นบริเวณรอบๆโคโลนีของตัวอย่างแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากน้ำหมักชีวภาพ จะสร้างเอนไซม์แตกต่างกัน ซึ่งสังเกตได้จากการเกิดบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นบริเวณรอบๆโคโลนีของตัวอย่างแต่ละสายพันธุ์มีขนาดแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย

อายุน้ำหมัก (วัน)	สายพันธุ์	amylase	protease	lipase	cellulase
3	3.1	-	-	-	-
3	3.2	-	-	-	-
5	5.1	-	+	-	-
5	5.2	-	-	-	-
5	5.3	-	-	-	+
7	7.1	-	-	-	+
7	7.2	-	-	-	+
12	12.1	-	-	-	-
12	12.3	-	-	-	+
19	19.2	-	-	-	+
26	26.1	-	-	-	-
26	26.3	-	-	-	-
29	29.2	-	-	-	-
33	33.1	-	+	+	+
33	33.2	-	+	+	+
36	36.1	-	+	+	+
43	43.1	-	+	+	+
47	47.2	+	+	+	+
50	50.1	+	+	-	-
50	50.2	+	+	+	-
54	54.1	-	-	-	+
54	54.2	-	-	-	-
54	54.3	-	-	-	+
57	57.2	-	-	+	-
57	57.3	-	-	-	+
60	60.1	-	-	+	+
75	75.1	-	-	-	-
75	75.2	+	+	-	-

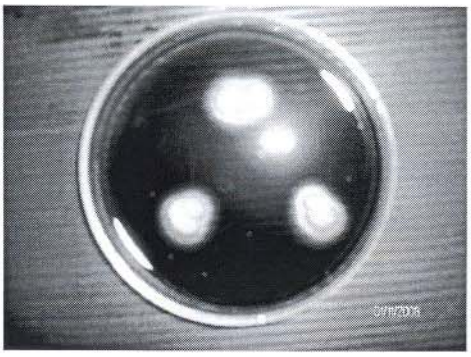
ตารางที่ 4.7 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย (ต่อ)

อายุน้ำหมัก (วัน)	สายพันธุ์	amylase	protease	lipase	cellulase
90	90.1	-	-	+	+
90	90.2	-	-	-	+

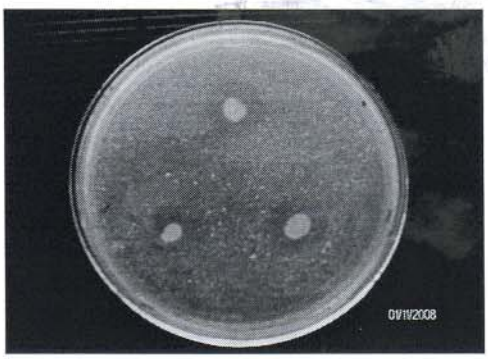
หมายเหตุ : เครื่องหมาย + หมายถึง เกิดโซนใส
เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่เกิดโซนใส

แบคทีเรียที่ทำการทดสอบเอนไซม์มีทั้งหมด 29 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสมีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ 47.2, 50.1, 50.2 และ 75.2 แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสมีจำนวน 9 สายพันธุ์ คือ 5.1, 33.1, 33.2, 36.1, 43.1, 47.2, 50.1, 50.2 และ 75.2 แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปส มีจำนวน 9 สายพันธุ์ คือ 33.1, 33.2, 36.1, 43.1, 47.2, 50.2, 57.2, 60.1และ 90.2 ส่วนแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสมีจำนวน 17 สายพันธุ์ คือ 5.3, 7.1, 7.2, 12.3, 19.2, 29.1, 33.1, 33.2, 36.1, 43.1, 47.2, 54.1, 54.3, 57.3, 60.1, 90.1 และ 90.2 จากการทดสอบพบว่า มีแบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่มีการสร้างเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 47.2

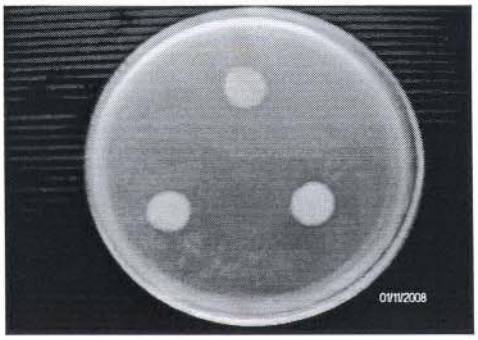
แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะสร้างเอนไซม์ได้แตกต่างกันไป โดยทั่วไปแบคทีเรียที่ใช้บำบัดน้ำเสียมีสายพันธุ์หลัก ๆ ได้แก่ *Bacillus* sp. เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ดีและสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดเช่น เอนไซม์อะไมเลส ใช้ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส เอนไซม์โปรติเอส ใช้ในการย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน เป็นต้น ซึ่งการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับสายพันธ์ *Bacillus* sp. คือ สายพันธุ์ที่ 50.1, 50.2 และ 75.2 แบคทีเรีย นำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ในรูปของสารละลาย สารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งอาหารจึงต้องถูกย่อยก่อนด้วยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมาในช่วงการเจริญเติบโตหรือการแบ่งเซลล์ การที่แบคทีเรียสร้างเอนไซม์และปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์เพื่อย่อยแป้งโปรตีนและอินทรีย์อื่นๆ



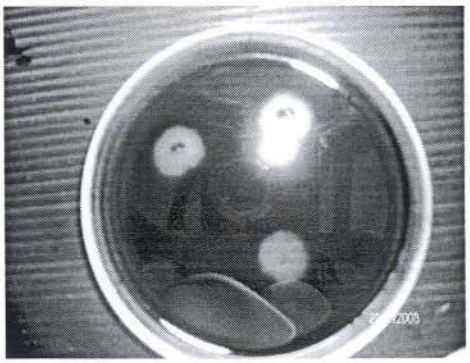
ภาพที่ 4.14 บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์อะไมเลส ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 47.2



ภาพที่ 4.15 บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 47.2



ภาพที่ 4.16 บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์ไลเปส ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 47.2



ภาพที่ 4.17 บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 47.2

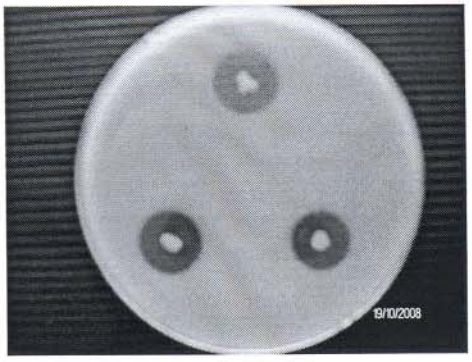
4.6 ผลการทดสอบการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรีย

ผลจากการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพทั้งหมด 29 สายพันธุ์ มาทดสอบการสร้างกรดโดยใช้หลักการทำปฏิกิริยาของกรดกับ $CaCO_3$ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS Agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากน้ำหมักชีวภาพสามารถผลิต

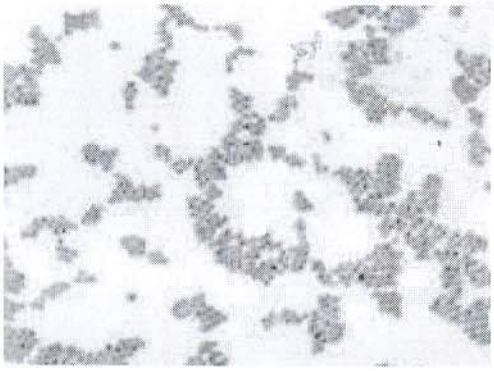
กรดและปล่อยออกมาทำปฏิกิริยากับสาร $CaCO_3$ ในอาหาร MRS Agar ซึ่งสังเกตได้จากการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคโลนีที่มีการเจริญของแบคทีเรียแลคติก โดยได้แบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 9 สายพันธุ์

ตารางที่ 4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

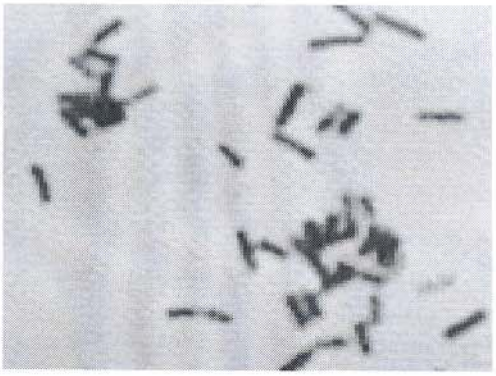
อายุน้ำหมัก	สายพันธุ์	ลักษณะ	แกรม
5	5.3	ท่อน	+
19	19.2	กลม	+
26	26.1	กลม	+
33	33.2	ท่อน	+
54	54.1	กลม	+
54	54.3	กลม	+
57	57.3	กลม	+
75	75.1	ท่อน	+
90	90.2	กลม	+



ภาพที่ 4.18 บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่ 19.2



ภาพที่ 4.19 การติดสีแกรมบวกรูปร่างกลมของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่ 19.2



ภาพที่ 4.20 การติดสีแกรมบวกรูปร่างท่อนของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่ 75.1

จากการทดสอบเบื้องต้นถึงความสามารถในการผลิตกรดของแบคทีเรีย พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 29 สายพันธุ์ ที่คัดแยกมาจากน้ำหมักชีวภาพ มีความสามารถที่ผลิตกรดที่แตกต่างกันออกไปแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งทราบได้จากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆขอบโคโลนีที่มีการเจริญของแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มีขนาดวงใส (clear zone) ต่างกัน เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตกรดและปล่อยออกมาทำปฏิกิริยากับ $CaCO_3$ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ทำให้เกิดวงใส (clear zone)) รอบๆ โคโลนีที่มีการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการสลายน้ำตาล เพื่อนำไปผลิตเป็นกรดแลคติก รูปร่างของเซลล์มีลักษณะเป็นท่อน ได้แก่ *Lactobacillus* sp. บางชนิดมีรูปร่างกลม ได้แก่ *Streptococcus* sp. และ *Pediococcus* sp. แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะมีส่วนเกี่ยวข้องอย่างมากในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ ที่กระบวนการผลิตมีน้ำตาลมาเกี่ยวข้อง แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกอาศัยอยู่ในธรรมชาติมากมายหลายแหล่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งในที่ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างกรดแลคติก กรดฟอร์มิค เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียชนิดนี้มีความต้องการสารอาหารพวกสารประกอบอินทรีย์มีโครงสร้างซับซ้อนพบในกระบวนการหมักมีการเจริญได้ดีใน

สภาพที่ไม่ออกซิเจน แต่ก็มีความสามารถเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนด้วย น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของแบคทีเรียชนิดนี้ (พิสิฐ ศรีสุริยจันทร์, 2540)

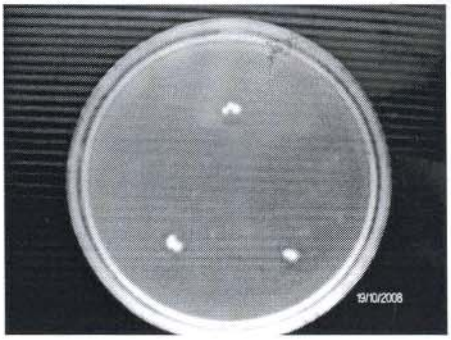
4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของราและยีสต์

ผลจากการนำเชื้อราที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพทั้งหมด 5 สายพันธุ์ และยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพทั้งหมด 5 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด คือ ทดสอบเอนไซม์อะไมเลส โดยการใช้อาหาร Starch Agar ทดสอบเอนไซม์โปรติเอส โดยการใช้อาหาร skim milk agar ทดสอบเอนไซม์ไลเปส โดยการใช้อาหาร tributyrin agar และทดสอบเอนไซม์เซลลูเลส โดยการใช้อาหาร carboxymethyl cellulose agar โดยวิธีการนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทำ point inoculation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ซึ่งถ้ามีเชื้อราและยีสต์ ที่สามารถย่อยสลายเอนไซม์เหล่านี้ได้ จะสังเกตได้จากการเกิดบริเวณใสที่เกิดขึ้นบริเวณรอบๆ โคโลนีของตัวอย่างราและยีสต์ พบว่าราและยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากน้ำหมักชีวภาพมีการสร้างเอนไซม์แตกต่างกัน ซึ่งสังเกตได้จากการเกิดบริเวณใส ดังแสดงในตารางที่ 4.9

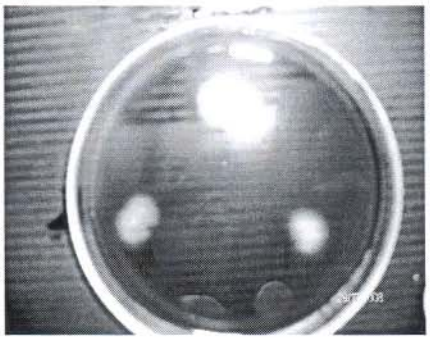
ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของยีสต์

อายุน้ำหมัก (วัน)	สายพันธุ์	amylase	protease	lipase	cellulase
7	7.2	-	-	+	-
12	12.1	-	-	-	+
19	19.2	-	-	-	-
36	36.1	-	-	+	-
60	60.1	-	-	-	-

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + หมายถึง สร้างโซนใส
เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่สร้างโซนใส



ภาพที่ 4.21 บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 7.2



ภาพที่ 4.22 บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 12.1

ภาพที่ 4.23 บริเวณวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ สายพันธุ์ที่ 36.1

ยีสต์ที่ทำการทดสอบเอนไซม์มีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ พบว่า ไม่พบยีสต์ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์โปรติเอส ยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปส มีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ 7.2 และ 36.1ส่วนยีสต์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสมีจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ 12.1

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกประเภทหนึ่ง ที่มีผู้ศึกษาถึงคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจนถึงระดับการค้า เนื่องจากยีสต์ที่ใช้ศึกษาไม่ก่อให้เกิดโรคและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ พบว่ายีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ *Candida rugosa* ซึ่ง

จะขึ้นอยู่กับกระบวนการหมักและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ พีเอช เป็นต้น (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล , 2539)

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของรา

อายุน้ำหมัก (วัน)	สายพันธุ์	amylase	protease	Lipase	cellulase
26	26.3	+	-	+	-
33	33.2	-	+	+	+
36	36.2	+	+	+	-
40	40.1	+	+	+	+
40	40.2	+	+	+	-

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + หมายถึง สร้างโซนใส
เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่สร้างโซนใส

ราที่ทำการทดสอบเอนไซม์มีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ พบว่าราที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสมีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ 26.3, 36.2, 40.1 และ 40.2 ราที่สร้างเอนไซม์โปรติเอส มีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ 33.2, 36.2, 40.1 และ 40.2 ราที่สร้างเอนไซม์ไลเปส มีจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ 26.3, 33.2, 36.2, 40.1 และ 40.2 ราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสมีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ 33.2 และ 40.1

ราถือว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ดี และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร เช่น *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีและเอนไซม์เซลลูเลสได้ เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม (ณกัญภัทร จินดา, 2549)

4.8 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียที่ทำการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ

4.8.1 ผลการวัดค่าพีเอช (pH)

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย บริเวณข้างห้องสมุด มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ มาทำการวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่อง pH meter จากนั้นนำมาทดสอบการบำบัดน้ำเสีย โดยใช้น้ำหมักชีวภาพ โดยอัตราส่วนที่ใช้ในการบำบัด คือ 90:10 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ในถังปริมาตร 5 ลิตร ที่มีฝาปิด ตั้งไว้เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปวัดค่า pH ของน้ำเสียก่อนใส่น้ำหมักชีวภาพลงไป และภายหลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ค่า pH ของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ

อายุน้ำหมัก (วัน)	ถังที่ 1		ถังที่ 2		ถังที่ 3		ค่าเฉลี่ย	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
10 วัน	4.03	3.98	4.00	3.96	4.05	3.98	4.02	3.97
20 วัน	3.99	3.78	3.98	3.81	3.99	3.85	3.98	3.81
30 วัน	3.91	3.79	3.93	3.78	3.94	3.79	3.92	3.78
45 วัน	3.98	3.82	3.98	3.80	3.97	3.84	3.97	3.82
60 วัน	3.91	3.73	3.93	3.77	3.94	3.75	3.92	3.75
75 วัน	3.98	3.90	3.99	3.90	3.99	3.92	3.98	3.90
90 วัน	3.99	3.80	3.98	3.88	3.98	3.85	3.90	3.84

ผลจากการทดสอบการวัดค่า pH ของน้ำเสียบริเวณข้างห้องสมุด มหาวิทยาลัยราชภัฏ-วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ โดยใช้น้ำหมักชีวภาพ พบว่า ค่า pH ของน้ำเสียก่อนบำบัดในช่วง 10 วันแรก มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.02 ส่วนหลังการบำบัดน้ำเสียด้วยน้ำหมักชีวภาพ พบว่า ค่า pH ลดลง ซึ่งเป็นลักษณะเช่นนี้ตลอดระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 90 วัน ซึ่งค่า pH ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ดังนั้นค่า pH หลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการบำบัดน้ำเสียมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

ในงานวิจัยของสมศักดิ์ นุกูลอุดมพานิชย์ (2548) ศึกษาวิจัยเรื่อง การบำบัดน้ำเสียโดยใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติ (Effective Microorganism , EM) : กรณีศึกษาบ่อพักน้ำเสียโรงพยาบาลศรีมาศ ผลการวิจัยพบว่า คุณภาพน้ำในบ่อพักน้ำเสียก่อนการฉีดสารพ่น EM มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.0 หลังฉีดพ่นสาร EM พบว่า มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 สาร EM ไม่มีประสิทธิผลในการลดความเป็นกรด-ด่าง

4.8.2 ผลการศึกษาหาค่าความขุ่น

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย บริเวณข้างห้องสมุด มาทำการวัดค่าความขุ่น โดยใช้เครื่อง Turbidity โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียมาวิเคราะห์หาความขุ่น หลังจากนั้นนำมาทดสอบการบำบัดน้ำเสียโดยใช้น้ำหมักชีวภาพ จากนั้นเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาความขุ่นภายหลังการบำบัด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ค่าความขุ่นของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ (หน่วย NTU)

อายุน้ำหมัก (วัน)	ถังที่ 1		ถังที่ 2		ถังที่ 3		ค่าเฉลี่ย		ลดลง
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	
10 วัน	878.2	739.2	864.3	741.2	892.4	703.3	878.3	727.9	150.4
20 วัน	737.6	603.2	793.6	613.4	719.4	621.8	750.2	612.8	137.4
30 วัน	648.4	514.8	670.8	532.2	655	536.8	658	525.9	132.1
45 วัน	820.3	603.4	843.1	655.3	823.4	647.8	828.9	635.5	193.4
60 วัน	827.4	624.3	893.1	673.4	888.3	609.2	884.6	635.6	193.1
75 วัน	788.3	593.4	798.6	578.6	790.3	592.4	792.4	588.1	204.3
90 วัน	789.1	607.1	788.7	615.2	790.1	618.5	787.3	613.6	175.7

ผลจากการทดสอบการหาค่าความขุ่น ของน้ำเสียก่อนการบำบัดในช่วงแรกมีค่าเท่ากับ 878.3 NTU น้ำเสียหลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพมีค่าเท่ากับ 727.9 NTUซึ่งลด150.4 NTU ซึ่งจะสังเกตได้ว่าน้ำหมักชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดก็คือในช่วง 75 วัน ซึ่งสามารถลดค่าความขุ่นได้ 204.3 NTU

ดังนั้นค่าความขุ่นหลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการบำบัด พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลดลงในทุกช่วงอายุของน้ำหมักชีวภาพ และช่วงของอายุน้ำหมักที่ลดค่าความขุ่นได้มากที่สุดคือในช่วง 75 วัน โดยที่ค่าความขุ่นที่สามารถลดลงได้นั้น อาจเนื่องมาจากว่าในน้ำหมักชีวภาพมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถช่วยลดค่าความขุ่นลงได้ โดยช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์วัตถุในน้ำเสียให้มีขนาดเล็กลง และยังมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำได้สูง ทำให้น้ำเสียมีสภาพที่ดีขึ้นไม่ส่งกลิ่นเหม็น

ในงานวิจัยของเบญจพร นามโคตร (2549) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง การบำบัดน้ำเสีย โดยใช้ EM :กรณีศึกษาสระน้ำหลังอาคาร 2 สถาบันราชภัฏนครปฐม จากผลการวิจัยพบว่า คุณภาพน้ำของสระน้ำหลังอาคาร 2 ก่อนฉีดพ่นสาร EM พบว่า ค่าความขุ่น15.56 NTU หลังจากฉีดพ่นสาร EM พบว่า ค่าความขุ่นมีค่าเท่ากับ 6.38 NTU

ในงานวิจัยของ มูลนิธิชุมชนตลาดไท (2548) ได้ทำการศึกษาการบำบัดน้ำเสียด้วยน้ำหมักชีวภาพ ในคลองที่ชุมชนวัดกลาง เขตอำเภอบางกะปิ อยู่ติดกับคลองแสนแสบ ขนาดของคลองที่วัดได้ คือ กว้าง 6 เมตร ยาว 800 เมตร และลึก 1.5 เมตร คิดเป็นปริมาตรน้ำในคลองประมาณ 6,400 ลูกบาศก์เมตร อัตราส่วนน้ำหมักชีวภาพที่ใช้ คือ คือน้ำชีวภาพ 1 ส่วน ต่อน้ำ 5,000 ส่วน ปริมาณน้ำหมักชีวภาพที่ต้องใช้ในแต่ละครั้ง คือ 1,260 ลิตร มีการแบ่งเทน้ำหมักออกเป็น7 จุด ตลอดแนวคลอง เพื่อให้น้ำหมักชีวภาพกระจายไปทั่วคลอง หลังจากนั้นมีการเก็บตัวอย่างน้ำไปตรวจวัดคุณภาพ เพื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำก่อนบำบัด ซึ่งจะมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำอีกครั้ง

หลังจากมีการบำบัดแล้ว 1 เดือน มีการเทน้ำหมักชีวภาพเพื่อบำบัดอาทิตย์ละครั้ง หลังจากทำไปได้ 3 ครั้ง ปรากฏว่า สภาพน้ำจึงเริ่มเปลี่ยนแปลง โดยน้ำเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวและใสขึ้น ไม่มีกลิ่นเหม็นเหมือนแต่ก่อน และปรากฏว่ามีไรแดงเกิดขึ้นมากมาย มีปลาเข้ามาอาศัยอยู่ สภาพทางกายภาพของคลองเปลี่ยนแปลงดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัด

4.8.3 ผลการศึกษาการหาค่า BOD

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย บริเวณข้างห้องสมุด มาทำการหาค่า BOD โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียมาวิเคราะห์หา BOD หลังจากนั้นนำมาทดสอบการบำบัดน้ำเสียโดยใช้น้ำหมักชีวภาพ จากนั้นเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาค่า BOD ภายหลังการบำบัด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ค่า BOD ของน้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ

อายุน้ำหมัก (วัน)	ถังที่ 1		ถังที่ 2		ถังที่ 3		ค่าเฉลี่ย		ลดลง
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	
10วัน	6.1	5.8	6.3	5.4	6.3	5.7	6.2	5.6	0.6
20วัน	5.3	4.6	5	4.3	5.6	4.3	5.3	4.4	0.9
30 วัน	5.6	4.3	5.5	4.2	5.4	4.2	5.5	4.2	0.3
45 วัน	5.9	3.7	5.5	3.8	5.7	3.7	5.7	3.7	1.7
60 วัน	6.2	4.1	6.4	3.8	6.2	3.7	6.2	3.7	2.5
75 วัน	6.4	4.1	6.4	3.9	6.6	3.9	6.4	3.9	2.5
90 วัน	6.2	5.1	6.4	5.3	6.3	5.1	6.3	5	1.3

ผลจากการทดสอบการหาค่า BOD ของน้ำเสียก่อนการบำบัดในช่วงแรกมีค่าเท่ากับ 6.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) ส่วนน้ำเสียหลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพมีค่าเท่ากับ 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) ซึ่งลดลง 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) ซึ่งจะสังเกตได้ว่า น้ำหมักชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดก็คือในช่วง 75 วัน ซึ่งสามารถลดค่า BOD ได้ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L)

ดังนั้น ค่า BOD หลังการบำบัดด้วยน้ำหมักชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการบำบัด พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงลดลงในทุกช่วงอายุของน้ำหมักชีวภาพ และช่วงของอายุน้ำหมักที่ลดค่า BOD ได้มากที่สุด คือ ในช่วง 75 วัน

ค่า BOD หมายถึง ค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ค่า BOD จะเป็นตัวบ่งบอกถึงความสกปรกของน้ำที่นำมาตรวจ และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับการบำบัดน้ำได้ การที่ค่า BOD ลดลงเนื่องจากว่า ในน้ำหมักชีวภาพมีจุลินทรีย์หลายชนิด การที่ใส่น้ำหมักชีวภาพลงไปในน้ำเสียนั้น เพื่อเข้าไปช่วยเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์เข้าไปในน้ำเสีย เพื่อช่วยให้ทำงาน

อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จึงสามารถลดค่าปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสารอินทรีย์ชนิดที่ย่อยสลายได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

ในงานวิจัยของเบญจพร นามโคตร (2549) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง การบำบัดน้ำเสีย โดยใช้ EM : กรณีศึกษาสระน้ำหลังอาคาร 2 สถาบันราชภัฏนครปฐม จากผลการวิจัยพบว่า คุณภาพของน้ำของสระน้ำหลังอาคาร 2 ก่อนฉีดพ่นสาร EM พบว่า ค่า BOD มีค่าเท่ากับ 10.39 ml/L หลังจากฉีดพ่นสาร EM พบว่า ค่า BOD มีค่าเท่ากับ 8.76 ml/L

ในงานวิจัยของสมบัติ อุยตระกูล (2532) ได้ทำการศึกษาทดลองใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติบำบัดน้ำเสีย และการพัฒนาอนามัยสิ่งแวดล้อมนิคมขนมจีน จังหวัดฉะเชิงเทรา พบว่า การใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติร่วมกับการเติมอากาศ ในสัดส่วนของ จุลินทรีย์ 1: 1,000 และ 1:5,000 สามารถลดค่า BOD ได้ร้อยละ 97.89 และ 97.17 ตามลำดับ ส่วนค่าตะกอนแขวนลอย (SS) ลดลงร้อยละ 92.23 และ 93.23 ตามลำดับ โดยใช้เวลา 20 วัน ค่า BODและค่าตะกอนแขวนลอยอยู่ในระดับเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งของกระทรวงอุตสาหกรรม สำหรับการใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติเพียงอย่างเดียว (ไม่เติมอากาศ) ที่สัดส่วนของจุลินทรีย์ธรรมชาติเป็น 1:1,000 และ 1:1,500 นั้น สามารถลดค่า BOD ได้ร้อยละ 95.08 และ 96.84 ส่วนตะกอนแขวนลอยลดลงได้ร้อยละ 86.73 และ 86.08 ตามลำดับ โดยใช้เวลา 21 วัน นอกจากนี้การใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติยังสามารถลดกลิ่นเหม็นได้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพในน้ำหมักชีวภาพ พบว่า น้ำหมักชีวภาพมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นรุนแรง และมีฝ้าปกคลุมอยู่ที่ผิวหน้าของน้ำหมัก จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำหมักชีวภาพนั้น พบว่า มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่อยู่ในน้ำหมัก จึงได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ในน้ำหมัก

การศึกษาหาจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำหมักชีวภาพ ได้แบคทีเรียทั้งหมด 29 สายพันธุ์ ยีสต์ 5 สายพันธุ์ และรา 5 สายพันธุ์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย รา ยีสต์ พบว่า แบคทีเรียที่พบในน้ำหมักนั้น เป็นแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยมีแบคทีเรียรูปร่างกลม (cocci) และรูปร่างท่อน (rod) มีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ที่พบในน้ำหมักชีวภาพ มี 4 แบบ คือ แบบที่ 1 (สายพันธ์ที่ 7.2 และ 60.1) คือ มีลักษณะเป็นเซลล์รูปไข่ แตกหน่อ แบบที่ 2 (สายพันธ์ที่ 12.1) คือ มีลักษณะเซลล์กลม แตกหน่อ แบบที่ 3 (สายพันธ์ที่ 19.2) คือ มีลักษณะเป็นท่อนขนาดใหญ่ และแบบที่ 4 (สายพันธ์ที่ 36.1) มีลักษณะเป็นท่อนต่อกัน มี pseudomycelium ส่วนราที่พบในน้ำหมักนั้น จะมี hypha septum conidiophore rhizoid conidia

การศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยทำการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ เอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส ผลการศึกษา พบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ทั้ง 4 ชนิด คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 47.2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม แกรมบวก ยีสต์สามารถสร้างเอนไซม์ได้ชนิดเดียว คือ เอนไซม์ไลเปส ส่วนราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ทั้ง 4 ชนิด คือ ราสายพันธุ์ที่ 40.1

การศึกษาการใช้น้ำหมักชีวภาพ ในการบำบัดน้ำเสีย พบว่า อายุน้ำหมักที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการบำบัดน้ำเสีย คือ อายุน้ำหมัก 75 วัน เนื่องจากว่าสามารถลดค่า BOD และค่าความขุ่นได้มากที่สุด ส่วนค่า pH นั้นมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส ของแบคทีเรีย รา ยีสต์ที่คัดเลือกได้

2. นำแบคทีเรีย รา ยีสต์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์เอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปสได้ ไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสีย

3. ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ที่มีในน้ำหมักชีวภาพ ที่สามารถนำมาบำบัดน้ำเสียได้

4. ศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์แต่ละชนิด เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2543. **วารสารการผลิตปุ๋ยชีวภาพ.**กรุงเทพฯ.

กรองจิตต์ ช้างแก้ว. 2541. **ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus* sp.** สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กัญญา ม่วงแก้ว. 2544. **การปรับปรุงคุณภาพปุ๋ยหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและตรึงไนโตรเจน.** สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์แวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิราภรณ์ สุขุมมาวาศี. 2518. **การศึกษาทางชีวภาพของลูกแป้งข้าวหมาก.** รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา.วิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จุไรรัตน์ ดวงเดือน ดวงฤดี ศุภติมัสโร. 2548. **การศึกษาคุณภาพน้ำในคลองรังสิต จังหวัดปทุมธานี.** รายงานการวิจัย สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

ณกัญภัทร จินดา. 2549. **เอนไซม์ไลเปส: การผลิตและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ.** คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฐวรรณ พิทักษ์ศิริพรรณ. 2548. **การแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขยะมูลฝอยทางชีวภาพ**. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ดวงพร คันธโชติ วิราวัณย์ เจริญจิระตระกูล และณรงค์ฤทธิ์ อัศวเรืองพิภพ.2547. **บทบาทของจุลินทรีย์ในกระบวนการน้ำหมักชีวภาพจากพืช.** ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เตือนใจ รัตนพงศ์ และทิพวรรณ สิทธิรังสรรค์. 2545. **ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทัศนี เรืองหิรัญ. 2544. **นานาภูมิปัญญาปุ๋ยน้ำชีวภาพ.** หนังสือพิมพ์กสิกร.74(4) : 14-23

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2548. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นฤมล ทองไว. 2545. **การแปรสภาพของเสียหรือวัสดุชีวภาพที่มีค่าทางการค้าต่ำจากโรงงานอุตสาหกรรมให้เป็นกรดแลคติก โดยแลคติกแอซิคแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นัสรียา เมืองพรหม ภาวิณี คณาสวัสดิ์ และสุรีย์ ฟูตระกูล. 2539. **แอคติวิตี้ของไลเปสที่ส่งออกนอกเซลล์แบคทีเรียทนความร้อนจากน้ำพุร้อนจังหวังเชียงใหม่**. J. Sci . Fac . CMU . 23 (1):9-13.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2547. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เบญจพร นามโครต. 2549. **การบำบัดน้ำเสียโดยใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติ(EM): กรณีศึกษาสระน้ำมรกต.**รายงานการวิจัย. สถาบันราชภัฏนครปฐม.

ปาริชาติ พุ่มขจร. 2542. **การทดสอบ antibacterial activity ของเชื้อแลคติกแอสิคแบคทีเรียที่แยก**

จากอาหารหมัก. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ประกรณ์ เลิศสุวรรณไพศาล. 2545. **ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์โดยใช้พืชท้องถิ่น.** รายงานการวิจัย สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม.

พงศ์ศักดิ์ รัตนกุลชัยโสภณ . 2545. **การคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากเนื้อสัตว์.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พิณซอ กรมรัตนาพร. 2550. **น้ำหมักชีวภาพ.** สถานีฟาร์มฝึกนักศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิทยากร ลิ่มทอง. 2536. **รายงานการวิจัย เรื่อง การวิเคราะห์การจัดการวัสดุเหลือใช้เพื่อผลิตปุ๋ยหมักในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ.

พัชรา จรูณนารถ ลีลาวดี เทพารักษ์ และสมศรี อังสุภานิช. 2518. **Fodder yeast.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิสิฐ ศรีสุริยจันทร์. 2540. **การบำบัดน้ำเสียโดยใช้แบคทีเรียแลคติก.** บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาวนา ศรีสุริยจันทร์. 2548. **การผลิตเอนไซม์ไลเปส .** ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. 2540. **คู่มือการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.** พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ.

วาทิต ชนัศรุติพันธ์. 2545. **จลนศาสตร์การเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสโดย *Aspergillus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. **จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร.** กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

สมใจ ศิริโภค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก**. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.

สมศักดิ์ นุกูลอุดมพาณิชย์. 2548. **การบำบัดน้ำเสียโดยใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติ:1กรณีศึกษาบ่อพักน้ำเสียโรงพยาบาลศีรีมาศ.**รายงานการวิจัย. สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม.

สมฤทธิ์ อินทราทิพย์. 2521. **สุขภาพสิ่งแวดล้อม**. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ.

สุริยา สาสนรักกิจ. 2544. **ปุ๋ยน้ำชีวภาพ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ศกุนตลา ศิริอุดม. 2545. **แบคทีเรียจากน้ำสกัดชีวภาพ.** ปัญหาพิเศษสาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อานัฐ ต้นโช. 2551. **แนวคิด หลักการ เทคนิคปฏิบัติในประเทศไทย เกษตรธรรมชาติ ประยุกต์.** กรุงเทพฯ.

Beckord, L. D. and G. L. peltier. 1945. **Source of amylase producting bacteria**. J. bact. 50 : 711-714.

Goksoyr. T. and Eriksson, J. 1990. **Cellulose In Economic Microbiology Vol.5**. Acadamic

Press, New York : 283-329.

Hockenhull, D.J.D. and Herbert, D. 1945. **The amylase and maltose of *Clostridium acetibutylium***. J. Biol. Chem. 39:102-106.

Kokusho.,Y.,H. Machida and s. Iwasaki. 1982. **Studies on alkaline lipase : isolution and Identification of lipase producing micro-organism**. Agr.Bio.chem.46(5) pp. 1159-1464.

Kutzner, H.J. 2000. **Microbiology of composting**. In J. Khen & J. winter (eds). Biotechnology, vol.11c Environmental process III solid waste and waste gas treatment, prepation of drinking water, pp.39-100. Weinheim : Wiley-VCH.

Majda and lonsane, B.K., 1988. **Definition, Characteristics and Potential, In Solid State Cultivation,** Elsevier Applied Science, Barking, Essex, pp.1-13.

Mizobe, F., Takahashi, K. and Ando, T., 1973. **The structure and function of acid protease I. specific inactivation of an acid protease from *Rhizopus* Chinerrsis by diazoacetyl- DL-norieucinc Methyl Ester**. Journal of Biochemistry. 73 : pp. 61-67.

Peltier, G.L. and L.D. Beckort. 1945. **Sources of amylase producing bacteria**. J. Bact. 50 : 711-714.

Schuchardt , F. 2000. **Composting of plant residues and waste plant material**. In J. Khen & J. winter (eds). Biotechnology, vol.11c Environmental process III solid waste and waste gas treatment, prepation of drinking water, pp.102-125. Weinheim : Wiley-VCH.

Suzuki, M., W. Yamamoto and M. Mizugaki. 1986. **Purification and general properties of a metal-intensive lipase from *Rhizopus japonicu s* NR 400**. J. Biochem. 100 : 1207- 1213.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethycellulose)	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
ยีสต์แอ็กแทร็ก (Yeast extract)	2.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH6.8±0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar+$CaCo_3$

กลูโคส ($C_6H_{14}O_7$)	20	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
บีฟแอ็กแทร็ก (beef extract)	10	กรัม
ยีสต์แอ็กแทร็ก (Yeast extract)	5	กรัม
โซเดียม อะซิเตรด (Sodium acetate)	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมซิเตรท (Tri-ammonium citrate)	2	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$)	0.1515	กรัม
Tween 80	1.5	มิลลิลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCo_3$)	0.5	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH6.2 ±0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

เปปโตน (peptone)	5.0	กรัม
บีฟแอ็กแทร็ก (beef extract)	3.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 5.6 ±0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

โปเตโต้ (potato)	200	กรัม
เดร็กโตส (dextrose)	20	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 5.6 ±0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar (SA)

โซลูเบิล สตาร์ช (soluble starch)	2.0	กรัม
เปปโตน (peptone)	5.0	กรัม
บีฟแอ็กแทร็ก (beef extract)	3.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.8 ±0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar

สกิมมิลล์ (skim milk)	2.0	กรัม
กลูโคส ($C_6H_{14}O_7$)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7±0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar

เปปโตน (peptone)	5	กรัม
ยีสต์แอ็กแทร็ก (yeast extract)	3	กรัม
ไตรบูไตรริน (tributyrin)	10	มิลลิลิตร
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.5±0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15นาที

ภาคผนวก ข

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล (iodine crystal)	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodine), KI	2.0	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	300	มิลลิลิตร

ละลายไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบ 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตคริสตอลไวโอเลต (ammonium oxalate crystal violet solution)

สารละลาย ก

คริสตอลไวโอเลต (crystal)	3.0	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	20.0	มิลลิลิตร

สารละลาย ข

แอมโมเนียมออกซาเลต (ammonium oxalate)	0.8	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	50	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก และ สารละลาย ข เข้าด้วยกัน กรองก่อนนำไปใช้ เก็บไว้ในขวดสีชา

3. สารละลายซัฟฟานีน (saffanin solution)

ซัฟฟานีน (saffanin)	0.25	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	20.0	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	50.0	มิลลิลิตร

ละลายซัฟฟานีนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ เติมน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน กรองก่อนนำไปใช้ เก็บไว้ในขวดสีชา

4. สีย้อมสปอร์ (endospore stain)

มาลาไคท์ กรีน (malachite green)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	100.0	มิลลิลิตร

ละลายมาลาไคท์ กรีน ในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

5. สารละลาย คองโก เรด (congo red 1%)

คองโก เรด (congo red)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	100	มิลลิลิตร

ละลายคองโก เรด ในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl 1 M)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	58.44	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

8. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 NaOH)

โซเดรียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	4	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	1,000	มิลลิลิตร

ผสมโซเดรียมไฮดรอกไซด์ลงในน้ำกลั่นคนให้เข้ากันแล้วจึงเก็บไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์หาค่า BOD

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution)

ละลายโปรตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 8.5 กรัม ไดโปรตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2PHO_4) 21.75 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 33.4 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้เป็น 1 ลิตร

2. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate solution)

ละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 22.5 กรัม ในน้ำกลั่น และทำให้เจือจางเป็น 1 ลิตร

3. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride solution)

ละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 27.5 กรัม ในน้ำกลั่น และทำให้เจือจางเป็น 1 ลิตร

4. สารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ (ferric chloride colution)

ละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ ($FeCl_3$) 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น และทำให้เจือจางเป็น 1 ลิตร

5. สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ (sodium sulfite solution)

ละลายโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) 1.575 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

6. สารละลายกรดและด่าง (acid and alkali solution)

6.1 สารละลายกรด

ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น (conc sulfuric acid) 28 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นซึ่งคนไปด้วย และทำเจือจางให้เป็น 1 ลิตร

6.2 สารละลายด่าง

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 กรัม ลงในน้ำกลั่น และทำเจือจางให้เป็น 1 ลิตร

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – นามสกุล	นางสุนันท์ สุดใจ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	26 พฤษภาคม 2496
สถานที่เกิด	ปทุมธานี
ประวัติการศึกษา	กศ.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน
	วท.ม.(การสอนชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตำแหน่งปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
	มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
งานวิจัย	- การศึกษาอนุกรมวิธานของเฟิร์นที่เป็นอิพิไฟท์ในบางท้องที่ในจังหวัดเชียงใหม่
	- การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงในเขตจังหวัดปทุมธานี ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี แหล่งทุน : สำนักวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ผลงานวิชาการ	- ตำราชีววิทยา 1
	- เอกสารประกอบการสอนชีววิทยา 2

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – นามสกุล	นางดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	22 กรกฎาคม 2515
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับ 2 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน
	วท.ม.(เทคโนโลยีชีวภาพ) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ตำแหน่งปัจจุบัน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
	มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ผลงานวิชาการ	พ.ศ. 2549 – การผลิตกรดแลกติกจากผลไม้เมืองร้อน (PRODUCTION OF LACTIC ACID FROM TOPICAL FRUITS) แหล่งทุน : สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
	พ.ศ. 2551 – การคัดเลือกและจัดจำแนกจุลินทรีย์กลุ่มทนความร้อนจากกระบวนการผลิตยาปราศจากเชื้อ (Selection and Identification of Heat Resistant Microorganism from Sterile Pharmaceutical Products) แหล่งทุน : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ