



วิทยานิพนธ์

การศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการออกซิเดชัน
แอมโมเนียมในสภาพไร้อากาศ (อนาโมกซ์)

**The Study of Microbial Selection for Anaerobic Ammonium
Oxidation Process (ANAMMOX)**

นางศิริพร ศรีพิบูลย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการออกซิเดชันแอมโมเนียมในสภาพไร้อากาศ (อนาโมกซ์)

The Study of Microbial Selection for Anaerobic Ammonium Oxidation Process
(ANAMMOX)

นามผู้วิจัย นางศิริพร ศรีพิบูลย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มงคล ดำรงค์ศรี, Dr.Eng.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์เฉลิมราช วันทวิน, D.Eng.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงศ์ศักดิ์ หนูพันธ์, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัญญา สิริวิทยาปกรณ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มงคล ดำรงค์ศรี, Dr.Eng.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 5 เดือน ๕.๖. พ.ศ. ๒๕๕๖

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการออกซิเดชันแอมโมเนียในสภาพไร้อากาศ
(อนาโมกซ์)

The Study of Microbial Selection for Anaerobic Ammonium Oxidation Process (ANAMMOX)

โดย

ศิริพร ศรีพิบูลย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

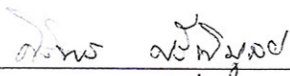
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

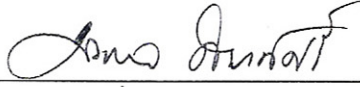
พ.ศ.2551

ศิริพร ศรีพิบูลย์ 2551: การศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการออกซิเดชัน
แอมโมเนียมในสภาพไร้อากาศ (อนาerobic) ปริญญาวิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต
(วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม) สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์มงคล คำรงค์ศรี, Dr.Ing. 98 หน้า

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์สำหรับกระบวนการบำบัดไนโตรเจนในสภาวะไร้อากาศ เริ่ม
โดยนำสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสีย 3 แห่ง ได้แก่ ระบบบ่ไร้อากาศของโรงงานวันเส้น ระบบเอ
เอสที่ออกแบบให้กำจัดไนโตรเจนได้ของโรงควบคุมคุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์และหนองแขม
เป็นเชื้อเริ่มต้นเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์แบบเจาะจง ในปฏิกรณ์ซีเควนซ์คัมเพกซ์ในสภาวะไร
้อากาศ ดำเนินการที่ 48 ชั่วโมงต่อวัฏจักร การคัดเลือกเชื้อที่มีความเหมาะสม ทำโดยนำเชื้อที่เลี้ยง
ได้ 3 เดือนมาทดสอบหาอัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะโดยใช้ไนไตรต์ หลังจากนั้นจึงทำการ
เพิ่มจำนวน (enrichment) โดยศึกษาอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ที่เหมาะสม และปรับเพิ่ม
ความเข้มข้นโดยคงอัตราส่วนในน้ำเข้า เพื่อหาค่าอัตราการสูงสุดที่ยังคงให้ประสิทธิภาพการ
บำบัดมากกว่าร้อยละ 90

ผลการทดลองพบว่าสลัดจ์จากโรงบำบัดหนองแขมมีความเหมาะสมที่สุด โดยให้ค่าอัตรา
การกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะโดยใช้ไนไตรต์ของเชื้อที่เลี้ยงไว้ 3 เดือน เท่ากับ 0.031 gN/gVSS-d
และเมื่อทำการเพิ่มจำนวนเชื้อโดยเพิ่มความเข้มข้นที่อัตราส่วนที่ทดสอบได้คือแอมโมเนียมต่อไน
ไตรต์เท่ากับ 1 ต่อ 1.39 จนถึงความเข้มข้นไนโตรเจนรวมเท่ากับ 980 mgN/l ที่เวลา 9 เดือน พบว่า
อัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะเพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่าเป็น 0.29 gN/gVSS-d อัตราการรับ
ไนโตรเจนทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ $0.593 \text{ kgN/m}^3\text{-d}$ การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค
ฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไรเซชัน พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบ
ระหว่างที่เลี้ยงไว้ที่ 3 เดือนและ 9 เดือน ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนรวมเท่ากับ 96.6 และ 980
 mgN/l ตามลำดับ โดยที่ 3 เดือนพบ *Beta Proteobacteria* และ *Alpha Proteobacteria* ซึ่งเป็นชั้น
(class) ที่จุลินทรีย์ *Nitrosomonas* และ *Nitrobacter* ถูกจัดอยู่เท่ากับร้อยละ 44.5±6.9 และ 16.2±8.2
ตามลำดับ ในขณะที่ 9 เดือนพบปริมาณลดลงเหลือเพียงร้อยละ 1.9±1.1 และ 1.4±1.1 ตามลำดับ
และพบจุลินทรีย์กลุ่ม ANAMMOX ที่ตรวจวัดโดยโพรบ Amx820 สูงถึงร้อยละ 85.6±7.6


ลายมือชื่อนิติ

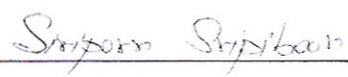

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

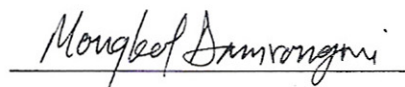
29 / 05 / 2551

Siriporn Sripiboon 2008: The Study of Microbial Selection for Anaerobic Ammonium Oxidation Process (ANAMMOX). Doctor of Engineering (Environmental Engineering), Major Field: Environmental Engineering, Department of Environmental Engineering. Thesis Advisor: Mr. Mongkol Damrongsri, Dr.Eng. 98 pages.

The selection of the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) bacteria began with start-up cultures from 3 sources, i.e. sludge from anaerobic pond treated wastewater of a noodle factory, and from biological nitrogen removal activated sludge processes of Ratanakosin and Nongkhaem municipal wastewater treatment plants. The sludge was cultured in a specific media in sequencing batch reactors operated on a 48-hour cycle. After 3 months, the specific ammonium removal rates by nitrite were measured. The culture with the highest removal rate was selected for enrichment. The enrichment was carried out by find out optimum ratio of ammonium:nitrite. At the optimum ratio, the total nitrogen loading was increased until reached the highest loading, at which the system removal efficiency was maintained at higher 90%.

The results indicated that the most suitable culture was obtained from Nongkaem wastewater treatment plant with specific ammonium removal rate of 0.031 gN/gVSS-d. The found optimum ratio of ammonium:nitrite was 1:1.39. The maximum total nitrogen concentration at the optimum ratio was up to 980 mgN/l, which was equal to loading of 0.593 kgN/m³-d. After cultured for 9 months from the start-up, the specific ammonium removal rate by nitrite had increased by 10 times to be 0.29 gN/gVSS-d, more than 90% removal efficiency, at the highest loading. The Fluorescent in situ hybridization (FISH) technique indicated differences in the microbial community in the culture at 3- and 9- month (total-N concentrations of 96.6 and 980 mgN/l respectively). The 3-month culture found *Beta Proteobacteria* and *Alpha Proteobacteria*, which belong to *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*, at 44.5%±6.9 and 16.2 %±8.2 respectively; while the 9-month culture found only 1.9% ±1.1 and 1.4% ±1.1 respectively, and found ANAMMOX bacteria (measured by probe Amx820) up to 85.6% ±7.6.


Student's signature

 29 / 05 / 2008
Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล ดำรงค์ศรี ประธานกรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมราช วันทวิน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ หนูพันธุ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัญญา สิริวิทยาปกรณ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก และรองศาสตราจารย์ ดร.ตระกูล อร่ามรักษ์ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทดลอง คุณผ่องศรี เผ่าภูรี นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง และภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือวิเคราะห์จุลินทรีย์

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้

ศิริพร ศรีพิบูลย์

เมษายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	26
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	52
สรุป	52
ข้อเสนอแนะ	54
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	55
ภาคผนวก	62
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์อินซิติว บริไดเซชัน	63
ภาคผนวก ข ลักษณะน้ำเสียสังเคราะห์	68
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลองของระบบซีควนซิงค์แบทช์ ที่ใช้วัฏจักร ของการเดินระบบเท่ากับ 48 ชั่วโมง (NK-ASBR1)	70
ภาคผนวก ง คัดเลือกแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมด้วยกระบวนการ ออกซิเดชันแอมโมเนียในสภาพไร้อากาศ	73
ภาคผนวก จ ศึกษาหาค่าอัตราส่วนแอมโมเนียต่อไนไตรต์ และศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณจุลินทรีย์ในรูป เอ็มแอลวีเอสเอส กับอัตราการกำจัดแอมโมเนีย	77

สารบัญ (ต่อ)

ภาคผนวก จ การเดินระบบด้วยถังปฏิกริยาแบบซีเควนซิ่งค์แบบทซ์ เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ Anammox	85
ภาคผนวก ข การทดสอบแบบแบทซ์ในขวดชมพู เพื่อศึกษาไคเนติกส์ของ ระบบมีเชื้อจุลินทรีย์ Anammox ร้อยละ 85	91
ภาคผนวก ข การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณผลิต	96

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดและปริมาณของสารที่ยับยั้งกระบวนการ ANAMMOX	17
2	ชนิดของถังปฏิกริยา และอัตราการบำบัด	18
3	ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียม และไนไตรต์ด้วยกระบวนการต่างๆ	18
4	เปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณผลิตของกระบวนการแบบต่างๆ	20
5	ค่าไคเนติกส์ของจุลินทรีย์	22
6	ชนิดของโพรบ ที่ใช้ตรวจจุลินทรีย์ในกลุ่ม Anammox ในปัจจุบัน	23
7	ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์และไนเตรต ที่ใช้ในการเริ่มต้นระบบเพื่อ คัดเลือกแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม	27
8	ความเข้มข้นของแอมโมเนียม และไนไตรต์ที่ใช้ในการทดลองแบบเบทช์เพื่อ หาค่าไคเนติกส์	31
9	โพรบที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการกำจัดไนโตรเจน	33
10	การตรวจวัดจุลินทรีย์เชิงคุณภาพด้วยวิธีฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไฮบริโดเซชัน ของตัวอย่างตะกอนจากถังรีแอกเตอร์สไลด์จังก์จากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม	44
11	ปริมาณร้อยละด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของกลุ่มแบคทีเรียย่อยเมื่อเทียบกับ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด โดยใช้โพรบ EUBmixed	45
12	เปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์อายุ 5 เดือน กับอายุ 9 เดือน	50

ตารางผนวกที่

ข1	องค์ประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์	68
ค1	ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์และไนเตรตของน้ำที่เข้าถังปฏิกริยาซีแวน ซิงค์เบทช์โดยใช้วัฏจักรการเดินระบบเท่ากับ 48 ชั่วโมง	70
ค2	ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์และไนเตรตในน้ำที่ออกจากถังปฏิกริยา ASBR1 ที่ใช้วัฏจักรการเดินระบบเท่ากับ 48 ชั่วโมง	71
ง1	ปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของเชื้อจุลินทรีย์โรงงานวันเส้น	73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ง2	ปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของเชื้อจุลินทรีย์โรงควบคุมคุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์	73
ง3	ข้อมูลปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของเชื้อจุลินทรีย์โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม	74
ง4	ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียมที่เวลา 43 ชั่วโมง	74
ง5	ประสิทธิภาพการกำจัดไนไตรต์ที่เวลา 43 ชั่วโมง.	75
จ1	ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ตามเวลาเมื่ออัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1: 0.67	77
จ2	ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ตามเวลาเมื่ออัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:1.39	78
จ3	ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ตามเวลาเมื่ออัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:2.24	79
จ4	ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ตามเวลาเมื่ออัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:2.98	80
จ5	อัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะ (SARR) และอัตราการกำจัดไนไตรต์จำเพาะ (ANRR) เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์	81
ฉ1	ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ของการเดินระบบ NK-ASBR2 อย่างต่อเนื่อง	85
ฉ2	วัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นจากถัง NK-ASBR2 เมื่อความปริมาณแอมโมเนียมเท่ากับ 210 และไนไตรต์เท่ากับ 294 มก.ไนโตรเจน/ลิตร	88
ช1	อัตราการลดลงของแอมโมเนียมและไนไตรต์ที่เวลา 0-45 นาที..	91
ช2	อัตราการลดแอมโมเนียมและไนไตรต์ที่เวลา 0-15 นาที	93

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 กระบวนการไนทริฟิเคชัน-ดีไนทริฟิเคชัน	6
2 รูปแบบทั่วไปของกระบวนการไนทริฟิเคชัน-ดีไนทริฟิเคชัน	9
3 รูปแบบของกระบวนการ SHARON ตามด้วยกระบวนการดีไนทริฟิเคชันและอนามอกซ์	13
4 แผนผังแสดงอุปกรณ์และถังปฏิกริยาที่ใช้ในการทดลอง	24
5 แผนผังการเดินระบบถังปฏิกริยา ASBR1 ใช้ 1 รอบวัฏจักรเท่ากับ 48 ชั่วโมง.	26
6 การลดลงของแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของถังปฏิกริยา SIT-ASBR1	36
7 การลดลงของแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของถังปฏิกริยา RAT-ASBR1	36
8 การลดลงของแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของถังปฏิกริยา NK-ASBR1	37
9 การเดินระบบในถังปฏิกริยา NK-ASBR2	39
10 ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ กับค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียมและปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ในน้ำออก	41
11 ความสัมพันธ์ระหว่าง อัตราการกำจัดแอมโมเนียม กับเอ็มแอลวีเอสเอส	43
12 เซลล์ <i>B.anammoxidans</i> and <i>K.stuttgartiensis</i> ที่ติดโพรบ Amx820 จับกันเป็นคลัสเตอร์	47
13 เซลล์ของแบคทีเรีย <i>B.anammoxidans</i> and <i>K.stuttgartiensis</i> รูปร่างแหวนที่ติดโพรบ Amx820	47
14 สัดส่วนการเกิดก๊าซสะสม อัตราการกำจัดแอมโมเนียมและ อัตราการกำจัดไนไตรต์	48
15 ความสัมพันธ์ระหว่าง $X / (dS_0/dt)$ กับ $1/S_0$	49

ภาพผนวกที่

จ1	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่ออัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:0.67, เอ็มแอลวีเอสเอส เฉลี่ยเท่ากับ 680 mg/l.	77
----	--	----

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
จ2 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่ออัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:1.39, เอ็มแอลวีเอสเอสเฉลี่ยเท่ากับ 701.67 มิลลิกรัม/ลิตร	78
จ3 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่ออัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:2.24, เอ็มแอลวีเอสเอสเฉลี่ยเท่ากับ 695 มิลลิกรัม/ลิตร	79
จ4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่ออัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:2.97, เอ็มแอลวีเอสเอสเฉลี่ยเท่ากับ 635 มิลลิกรัม/ลิตร	80
จ5 การลดลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อเอ็มแอลวีเอสเอสเท่ากับ 490 มิลลิกรัม/ลิตร	81
จ6 การลดลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อเอ็มแอลวีเอสเอสเท่ากับ 710 มิลลิกรัม/ลิตร	82
จ7 การลดลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อเอ็มแอลวีเอสเอสเท่ากับ 925 มิลลิกรัม/ลิตร	82
จ8 การลดลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อเอ็มแอลวีเอสเอสเท่ากับ 1070 มิลลิกรัม/ลิตร	83
จ9 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการกำจัดไนโตรเจนทั้งหมด ต่อปริมาณเอ็มแอลวีเอสเอส (TNRR) ต่อปริมาณเอ็มแอลวีเอสเอส	83
ฉ1 ปริมาณก๊าซสะสมที่เกิดขึ้นตามเวลา เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมเท่ากับ 148 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และไนไตรต์เท่ากับ 254 มก.ไนโตรเจน/ลิตร	89
ข1 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{X}{dS/dt}$ และ $\frac{1}{S_0}$	94

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ANAMMOX	Anaerobic ammonium oxidation
ASBR	Anaerobic sequencing batch reactor
CANON	Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite in one single reactor
OLAND	Oxygen limited autotrophic nitrification denitrification
SHARON	Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrite
K_s	Half velocity constant, substrate concentration at one-half the maximum growth Rate
r_g	rate of bacteria growth
r_{SU}	substrate utilization rate
S	concentration of growth limiting substrate in solution
X	concentration of microorganism
Y	maximum yield growth
μ_{max}	Maximum specific growth rate
ARR	ammonium removal rate
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DNA	Deoxyribonucleic acid
NRR	nitrite removal rate
SARR	specific ammonium removal rate
SNRR	specific nitrite removal rate
TNRR	Total nitrogen removal rate
เอ็่มแอลเอสเอส	Mixed liquor suspended solids, MLSS
เอ็่มแอลวีเอสเอส	Mixed liquor volatile suspended solids, MLVSS
มก.	มิลลิกรัม
ก.	กรัม
กก.	กิโลกรัม
ลบ.ม	ลูกบาศก์เมตร
ชม.	ชั่วโมง

การศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการออกซิเดชันแอมโมเนียมในสภาพไร้อากาศ (อนาโมกซ์)

The Study of Microbial Selection for Anaerobic Ammonium Oxidation Process (ANAMMOX)

คำนำ

ระบบบำบัดน้ำเสียส่วนใหญ่ที่มีอยู่ปัจจุบันในประเทศไทย ใช้ระบบบำบัดชนิดแอโรบิก เช่น แอควีเวตเตดสแตจ์ ระบบแผ่นหมุนชีวภาพ และระบบโปรยกรอง และระบบแอนแอโรบิก เป็นระบบบำบัดขั้นที่สอง ที่สามารถกำจัดปริมาณสารอินทรีย์ออกจากน้ำเสีย แต่ไม่สามารถกำจัดธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้ ทำให้น้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วเมื่อปล่อยลงสู่แหล่งรับน้ำ เช่น ลำคลอง หนอง บึง มีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเหลืออยู่ ก่อให้เกิดปัญหาสาหร่าย และพืชน้ำเจริญเติบโตเป็นจำนวนมาก ในแหล่งน้ำจืดและชายฝั่งทะเล นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาการคั่งค่อม และน้ำเน่าเสียตามมาอีก อย่างไรก็ตามประเทศแถบยุโรป เช่น เนเธอร์แลนด์ เบลเยียม เยอรมัน ได้มีการศึกษาวิจัยการกำจัดธาตุอาหารกันอย่างกว้างขวาง ขณะที่ในประเทศไทยเราก็มุ่งให้ความสำคัญในเรื่องนี้มากขึ้น เช่น โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม ที่เข้มงวดในการดูแลน้ำที่ผ่านการบำบัดไม่ให้มีปริมาณไนโตรเจนเกินมาตรฐาน

กระบวนการบำบัดไนโตรเจนที่ใช้กันทั่วไป คือ กระบวนการฟิสิกส์-เคมี เช่น การเติมคลอรีนเบรกพอยท์ การแลกเปลี่ยนประจุ การเป่าอากาศ และกระบวนการทางชีววิทยาในทรีฟิเคชัน-ดีไนทรีฟิเคชัน อย่างไรก็ตามนิยมใช้กระบวนการทางชีววิทยามากกว่าเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่า หลักการของกระบวนการไนทรีฟิเคชัน-ดีไนทรีฟิเคชัน แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ กระบวนการไนทรีฟิเคชัน เป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์ออกซิโดไรเซอร์ใช้ออกซิเจนเพื่อออกซิไดซ์แอมโมเนียมไปเป็นไนไตรต์ และไนเตรตในที่สุด และกระบวนการดีไนทรีฟิเคชัน เป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์เฮเทอโรโทรฟิก ใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเพื่อรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นก๊าซไนโตรเจน ดังนั้นน้ำเสียที่ยังมีปริมาณสารแอมโมเนียม เมื่อปล่อยออกสู่แหล่งรับน้ำ จะทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำลดลง อย่างไรก็ตามน้ำเสียที่มีแอมโมเนียมสูงๆ แต่มีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ เช่น น้ำทิ้งจากการบำบัดตะกอนจุลินทรีย์ ไม่เหมาะสมที่จะบำบัดแอมโมเนียมด้วยกระบวนการไนทรีฟิเคชัน-ดีไนทรีฟิเคชัน

ชั้น เนื่องจากมีปริมาณสารอินทรีย์ไม่เพียงพอ ต้องเติมสารอินทรีย์คาร์บอนจากภายนอกเข้าไปในระบบ ซึ่งระบบบำบัดทั่วไปนิยมใช้เมทานอล ทำให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูง

แต่ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ได้มีงานวิจัยมากมายที่นำเสนอกระบวนการบำบัดในโตรเจนแบบใหม่ ที่สามารถลดค่าใช้จ่ายได้อย่างมาก เช่น กระบวนการชาร์อน-อนามอกซ์ (SHARON-ANAMMOX) แคนนอน (CANON) และโอแลนด์ (OLAND) ที่สามารถลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดได้มากกว่าร้อยละ 90 และมีความเหมาะสมกับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียมสูงมาก แต่มีสารอินทรีย์ต่ำ (Verstraete and Philips, 1998., Jetten et al., 2001) กระบวนการใหม่ๆ เหล่านี้ มีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องเป็นกลุ่มที่ต้องการใช้ออกซิเจนน้อยหรือไม่ใช้เลย และไม่ใช้สารอินทรีย์คาร์บอน เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์กลุ่มออโทโทรฟิก

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้สนใจเฉพาะการกำจัดแอมโมเนียมในโตรเจนด้วยกระบวนการทางชีววิทยาแบบอนามอกซ์ โดยใช้แหล่งที่มาของจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศไทย เช่น จุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน และโรงงานอุตสาหกรรมบางชนิด มาคัดเลือกให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการออกซิเดชันแอมโมเนียมในสภาวะไร้อากาศได้ ซึ่งมีผลดีต่อการปรับปรุงระบบบำบัดน้ำเสีย ทำให้ค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียต่ำลง เพื่อเป็นแรงจูงใจให้ผู้ที่เกี่ยวข้องตระหนักถึงได้มากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาหาแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม ที่นำมาใช้ในการเริ่มกระบวนการออกซิเดชันแอมโมเนียมในสภาพไร้อากาศ (อนาโมกซ์) ในน้ำเสีย
2. ศึกษาอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ที่เหมาะสมต่อระบบอนาโมกซ์
3. ศึกษาอัตราการกำจัดแอมโมเนียมและไนไตรต์ ของกระบวนการออกซิเดชันแอมโมเนียม
ในสภาพไร้อากาศ (อนาโมกซ์) เมื่อปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียมและไนไตรต์เพิ่มขึ้น โดยควบคุมอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์คงที่

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ด้วยขนาดถังปฏิกริยาระดับโต๊ะปฏิบัติการ (Lab scale)
2. ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ในการทดลอง

การตรวจเอกสาร

กระบวนการในการกำจัดไนโตรเจนในน้ำเสีย

การพิจารณาเลือกวิธีการกำจัดไนโตรเจนในน้ำเสียที่เหมาะสม ต้องคำนึงถึงสิ่งเหล่านี้คือ (1) สารประกอบไนโตรเจนอยู่ในรูปใด และมีปริมาณความเข้มข้นเท่าไร (2) ระดับคุณภาพน้ำทิ้งที่ต้องการ (3) ค่าใช้จ่ายในการบำบัด (4) ความน่าเชื่อถือของระบบ และ (5) ความยืดหยุ่นของระบบ (U.S. EPA., 1975) ในการบำบัดน้ำเสียขั้นปฐมภูมิ และการบำบัดขั้นทุติยภูมิ สามารถกำจัดไนโตรเจนได้เพียงร้อยละ 10-30 (Metcalf and Eddy, 1991) กระบวนการในการกำจัดไนโตรเจนที่มีในปัจจุบัน มีหลายวิธี เช่น กระบวนการทางเคมี-ฟิสิกส์ กระบวนการทางชีววิทยาในทรีฟิเคชัน-ดีไนทรีฟิเคชัน และกระบวนการทางชีววิทยารูปแบบใหม่ๆ เช่น SHARON-ANAMMOX (single reactor system for high ammonium removal over nitrite- anaerobic ammonium oxidation), CANON (completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor) และ OLAND (oxygen limited autotrophic nitrification denitrification) เป็นต้น

1. การกำจัดไนโตรเจนด้วยกระบวนการเคมี-ฟิสิกส์

กระบวนการกำจัดไนโตรเจนด้วยกระบวนการเคมี-ฟิสิกส์ มีหลายวิธีประกอบด้วย

1.1 การเติมคลอรีนเบรกพอยท์ เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถกำจัดแอมโมเนียในไนโตรเจนในน้ำเสียได้ โดยการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นก๊าซไนโตรเจน ดังสมการที่ (1) (U.S. EPA., 1975) หรือ (2) (Metcalf and Eddy, 1991)



จากสมการที่ (1) พบว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแอมโมเนียใช้คลอรีนประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไฮโดรเจนออกไซด์ที่เกิดขึ้นทำให้ค่าพีเอชของระบบต่ำลง ต้องทำการปรับให้เป็นกลางด้วยปูนขาว หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ส่วนสมการที่ (2) พบว่าอัตราส่วนของคลอรีนเทียบในรูปคลอรีนต่อแอมโมเนียในไนโตรเจน จะได้เท่ากับ 7.6 ต่อ 1 แต่ในทางปฏิบัติใช้ 8 ต่อ 1 ถึง 10 ต่อ 1 อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียบางประการคือ คลอรีนที่เหลือเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ และหากน้ำเสียนั้นมีสารอื่นๆ ที่ใช้

คลอรีนก็ทำให้ปริมาณคลอรีนที่ต้องการใช้มีค่าสูง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดไตรฮาโลมีเทน ซึ่งอาจจะมีผลกระทบต่อระบบน้ำใช้ และยังต้องใช้ผู้ดูแลระบบที่มีทักษะสูง

1.2 การแลกเปลี่ยนประจุ เป็นกระบวนการที่ใช้เรซินจับไอออนที่ต้องการกำจัด เช่น แอมโมเนียมไอออน เรซินที่ใช้ได้มีทั้งเรซินธรรมชาติ เช่น ซีโอไลต์ และเรซินสังเคราะห์ โดยการผ่านน้ำเสียที่มีแอมโมเนียมไอออนเข้าไปในคอลัมน์ที่มีเรซิน กระบวนการนี้สามารถกำจัดแอมโมเนียมได้ถึงร้อยละ 90-97 โดยที่ปริมาณไนโตรเจนไนเตรต และสารอินทรีย์คาร์บอนไม่กระทบต่อกระบวนการนี้ อย่างไรก็ตามต้องทำการกรองน้ำก่อนเข้าสู่คอลัมน์ เพื่อป้องกันการอุดตันในคอลัมน์ ส่วนค่าใช้จ่ายของกระบวนการนี้จะสูงในขั้นตอนการลงทุนสร้างระบบ

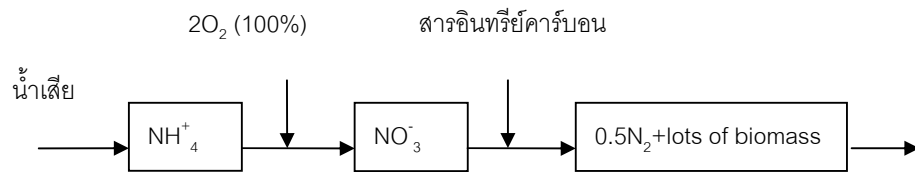
1.3 การเป่าอากาศ ในโตรเจนที่ต้องการกำจัดต้องอยู่ในรูปก๊าซแอมโมเนีย โดยการเติมปูนขาวเพื่อปรับให้ค่าพีเอชในน้ำเพิ่มสูงขึ้นถึง 10 หรือ 11.5 ทำให้แอมโมเนียมที่ละลายอยู่ในน้ำเสียเปลี่ยนมาอยู่ในรูปก๊าซแอมโมเนีย อย่างไรก็ตามกระบวนการนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศหนาว ข้อเสียของกระบวนการนี้คือ การเกิดตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตในหอเป่าอากาศและอุณหภูมิมีผลกระทบอย่างมากต่อกระบวนการ

2. การกำจัดไนโตรเจนด้วยกระบวนการทางชีววิทยาแบบไนทริฟิเคชัน-ดีไนทริฟิเคชัน

โดยทั่วไปน้ำเสียมักมีไนโตรเจนอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนและเกลือแอมโมเนียม เมื่อผ่านการบำบัดด้วยกระบวนการใช้อากาศที่เรียกว่า กระบวนการไนทริฟิเคชัน สารอินทรีย์ไนโตรเจนและแอมโมเนียมก็จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไนโตรค์และไนเตรตในที่สุด แต่กระบวนการนี้เป็นเพียงแค่การเปลี่ยนรูปของไนโตรเจน ความจริงแล้วไนโตรเจนยังไม่ได้ถูกกำจัดออกจากน้ำทิ้ง เนื่องจากยังคงมีไนโตรเจนอยู่ในรูปของไนเตรตอยู่ ดังนั้นจึงต้องกำจัดไนเตรตออกจากน้ำเสีย ซึ่งต้องใช้สารอินทรีย์คาร์บอนไปทำหน้าที่เป็นสารให้อิเลคตรอน เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องอยู่ในกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิก เรียกกระบวนการในขั้นตอนนี้ว่าแอนีออกซิเคชันไนทริฟิเคชัน และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือก๊าซไนโตรเจนที่สามารถระบายออกสู่บรรยากาศ

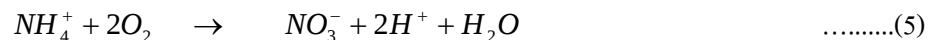
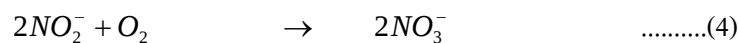
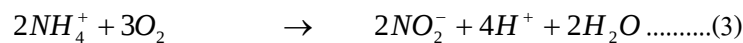
2.1 กระบวนการไนทริฟิเคชัน-ดีไนทริฟิเคชัน

รูปแบบของกระบวนการไนทริฟิเคชัน-ดีไนทริฟิเคชัน แสดงดังภาพที่ 1

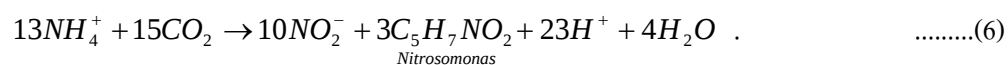


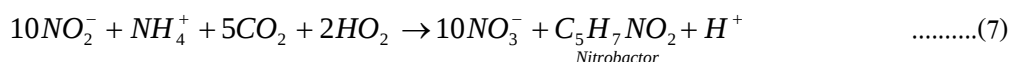
ภาพที่ 1 กระบวนการไนตริฟิเคชัน-ดีไนตริฟิเคชัน

2.1.1 กระบวนการไนตริฟิเคชัน มีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง 2 กลุ่มที่มีความแตกต่างกันที่ปฏิกิริยาการให้พลังงาน โดยกลุ่มที่ 1 ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียมไปเป็นไนไตรต์ดังสมการที่ (3) เรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่าแอโรบิกแอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ ได้แก่ *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, และ *Nitrospira* กลุ่มที่ 2 ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ไนไตรต์ไปเป็นไนเตรตดังสมการ (4) เรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่าแอโรบิกไนไตรต์ออกซิไดเซอร์ ได้แก่ *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, และ *Nitrospira* (Schmidt et al., 2003) และสมการที่ (5) เป็นปฏิกิริยารวม ที่จุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มออโทโทรฟิกที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์คาร์บอนในการสังเคราะห์เซลล์



จากสมการที่ (5) จะเห็นว่า 1 โมลของแอมโมเนียมจะทำปฏิกิริยากับ 2 โมลออกซิเจน (64 กรัม ออกซิเจน/18 กรัมแอมโมเนียม เท่ากับ 64 กรัมออกซิเจน/14 กรัมไนโตรเจน หรือเท่ากับ 4.57 กรัม ออกซิเจน/1 กรัมไนโตรเจน) สมการการสังเคราะห์เซลล์แสดงดังสมการ (6) และ (7) (US.EPA.,1975)





ดังนั้นเมื่อรวมทั้งสมการการสังเคราะห์เซลล์และการออกซิเดชันแล้วจะได้สมการที่ (8)



จากการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การปริมณผลิต พบว่าของ *Nitrosomonas* มีค่า 0.04-0.13 กรัมวีเอสเอส/กรัมแอมโมเนียมไนโตรเจน ในขณะที่ *Nitrobactor* มีค่าเท่ากับ 0.02-0.07 กรัมวีเอสเอส/กรัมแอมโมเนียมไนโตรเจน (US.EPA,1975) และจากสมการที่ (8) พบว่าการออกซิไดซ์แอมโมเนียมต้องใช้ऑคาร์โลไนต์ถึง 7.07 กรัมऑคาร์โลไนต์/กรัมแอมโมเนียมไนโตรเจน และใช้ออกซิเจนเท่ากับ 4.6 กรัมออกซิเจน/กรัมแอมโมเนียมไนโตรเจน แต่ในการทดลองจริงต้องใช้ऑคาร์โลไนต์ถึง 7.14 กรัมऑคาร์โลไนต์/กรัมแอมโมเนียมไนโตรเจน การที่กระบวนการไนตริฟิเคชันใช้ไบคาร์บอเนต จึงทำให้ระดับของกรดคาร์บอนิกเพิ่มขึ้นดังสมการ (9)

$$pH = pK_1 - \log \frac{H_2CO_3}{HCO_3^-} \quad \text{.....(9)}$$

มีผลทำให้พีเอชของระบบลดลงอย่างมาก ดังนั้นเพื่อลดผลกระทบต้องทำการเป่าไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบ

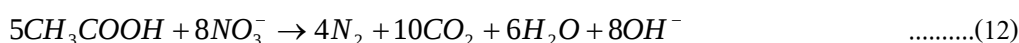
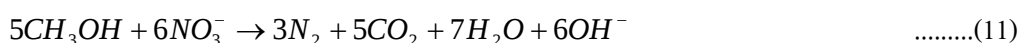
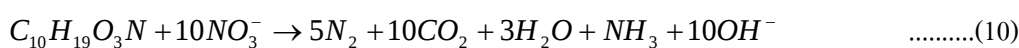
ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม ระบบต้องมีพีเอชอยู่ที่ 7.5 ถึง 8.0 เนื่องจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน มีการใช้สภาพด่าง ทำให้พีเอชในถังปฏิกริยาลดลง ในการดูแลระบบจะต้องหมั่นตรวจสอบสภาพความเป็นด่างในน้ำ เพื่อป้องกันการลดลงของค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 30-36 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับหรือมากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็เพียงพอต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันแล้ว แต่ถ้าค่าออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับ 0.2-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจทำให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันขึ้นพร้อมๆ กัน (ธงชัย, 2544)

2.1.2 กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน เป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์เฮเทอโรโทรฟิก ไปออกซิไดซ์สารอินทรีย์คาร์บอนที่อยู่ในน้ำเสีย โดยใช้ไนเตรตหรือไนไตรต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ในสภาวะขาดออกซิเจน หรือแอนีอิก anoxic ได้แก่ *Pseudomonas demitricans* และ *Pseudomonasstutzeri* ซึ่งมีลำดับการรีดักชันจากไนเตรต ไปเป็นไนไตรต์ ไนตริกออกไซด์ ใน

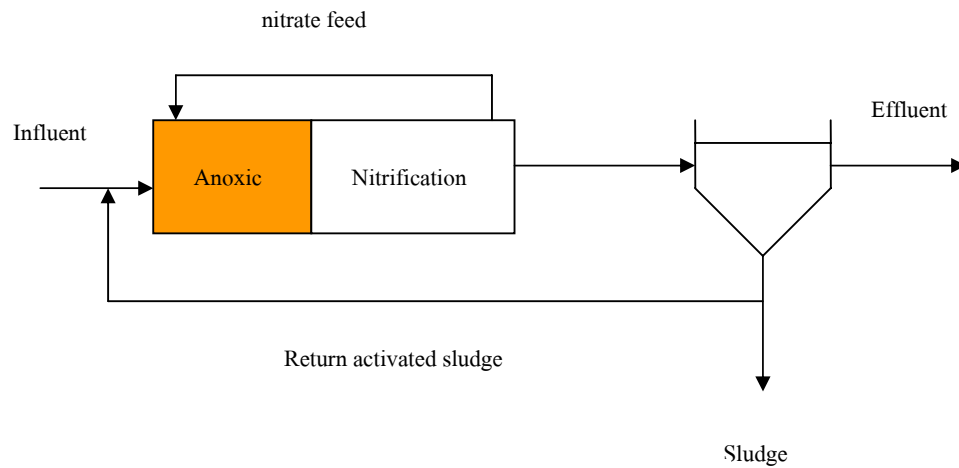
ตรัสออกไซด์ และเป็นก๊าซไนโตรเจนในที่สุด (Madigan and Martinko, 2006)



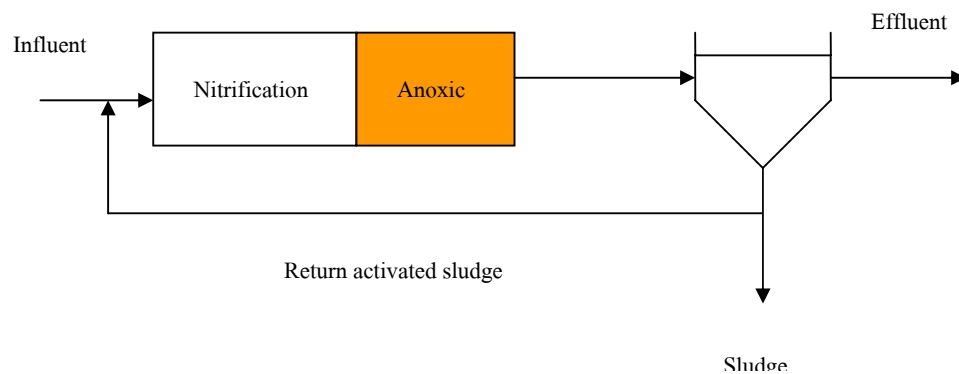
โดยกระบวนการนี้จะเกิดได้ดีต้องมีสารอินทรีย์คาร์บอนในปริมาณที่มากพอ อย่างไรก็ตาม อัตราส่วนซีโอดีต่อไนเตรตที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารอินทรีย์คาร์บอน (Metcalf and Eddy, 2003) เช่น ใช้น้ำเสียชุมชน เมธานอล และอะซิเตท เป็นสารอินทรีย์คาร์บอน แสดงในสมการ (10), (11) และ (12) ตามลำดับ



ผู้ดูแลระบบมักใช้เมธานอล (CH_3OH) เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากมีราคาถูกกว่าสารคาร์บอนในรูปแบบอื่น ทั้งยังมีกำลังรีดิวซ์สูง และทำให้กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน มีค่าสัมประสิทธิ์การผลิตต่ำด้วย กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน จะได้สภาพต่างกลับมามีค่าเท่ากับ 3.57 กรัมแคลเซียมคาร์บอเนต/กรัมไนโตรเจนในไนโตรเจนที่ถูกรีดิวซ์ไป ซึ่งสภาพต่างที่ได้กลับคืนมามีค่าน้อยกว่าสภาพต่างที่ถูกใช้ไปในกระบวนการไนทริฟิเคชัน ทำให้ต้องเติมสภาพต่างเข้าไปในกระบวนการไนทริฟิเคชัน-ดีไนทริฟิเคชัน กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน เป็นกระบวนการที่ผลิตความเป็นด่าง ทำให้ระดับของพีเอชค่อนข้างคงที่ รูปแบบทั่วไปของกระบวนการไนทริฟิเคชัน-ดีไนทริฟิเคชัน แสดงในภาพที่ 2 (Metcalf and Eddy., 2003) โดยภาพที่ 2ก เป็นรูปแบบการดีไนทริฟิเคชันก่อน และภาพที่ 2ข เป็นรูปแบบการดีไนทริฟิเคชันทีหลัง



(2ก) การดีไนตริฟิเคชันที่หลัง

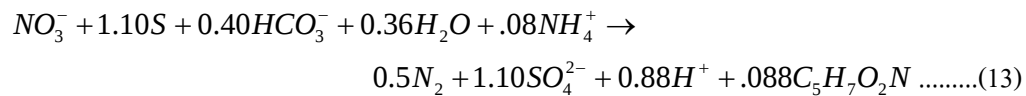


(2ข) การดีไนตริฟิเคชันที่หลัง

ภาพที่ 2 รูปแบบทั่วไปของกระบวนการไนตริฟิเคชัน-ดีไนตริฟิเคชัน

2.2 กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน ที่ใช้สารอนินทรีย์เป็นสารให้อิเลคตรอน

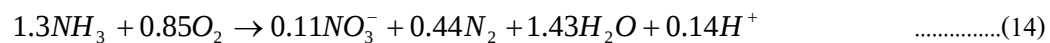
2.2.1 ในกรณีที่น้ำเสียมีค่าอัตราส่วนซีโอดีต่อไนโตรเจนต่ำ หรือไม่มีสารอินทรีย์คาร์บอน จุลินทรีย์ออกโตโทฟิกบางกลุ่ม เช่น *Thiobacillus denitrificans* สามารถดีไนตริฟายได้โดยใช้สารอนินทรีย์บางชนิด เช่น ซัลเฟอร์ ซัลไฟด์ หรือไฮโดรซัลเฟต เป็นสารให้อิเลคตรอนดังสมการที่ (13) เรียกว่าแบคทีเรียซัลเฟอร์ดีไนตริฟายอิง หรือแบคทีเรียออกโตโทฟิกลดีไนตริฟิเคชัน ที่มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดของจุลินทรีย์, $\mu_{\max} = 0.3-0.4$ ชั่วโมง⁻¹ ความเข้มข้นของสารอาหารที่อัตราโตจำเพาะเท่ากับ $0.5 \mu_{\max}$, K_s เท่ากับ 5-10 มิลลิกรัม/ลิตร และสัมประสิทธิ์ปริมาณการผลิตสูงสุด (Y_{NO_3}) เท่ากับ 0.4-0.5 กรัมวีเอสเอส/กรัมไนเตรดไนโตรเจน (ธงชัย, 2544)



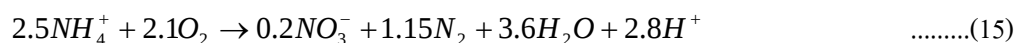
3. การกำจัดไนโตรเจนรูปแบบใหม่ (Innovative Processes for Nitrogen Removal)

3.1 แคนนอน (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite in one single reactor, CANON)

การออกซิไดซ์แอมโมเนียมไปเป็นไนไตรต์ จุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้ออกซิเจน แต่การที่จุลินทรีย์เปลี่ยนแอมโมเนียมและไนไตรต์ไปเป็นก๊าซไนโตรเจนนั้นต้องอยู่ในสภาวะไร้อากาศ อย่างไรก็ตามในงานวิจัยของ (Third et al., 2001 และ Sliemers et al., 2003) สามารถทำให้จุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มนี้อยู่ร่วมกันได้ และเรียกกระบวนการแบบนี้ว่า “CANON” โดยมีปฏิกิริยาดังนี้สมการที่ (14) ดังนี้



Jetten et al., 2001 ได้นำเชื้อ Anammox มาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบซีเควนชิงค์ ในสภาวะจำกัดออกซิเจนเท่ากับ 0.32 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลานาน 5 เดือน พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ *Brocadia .anammonoxidans* ที่สามารถกำจัดแอมโมเนียมได้สูงถึง 420 มิลลิกรัม/ลิตร ดังสมการที่ (15)



และพบว่ามี *Brocadia anammoxidans* ในถังปฏิกรณ์จำนวนร้อยละ 70 และในเวลาต่อมาก็พบว่ามี *Nitrosomonas eutropha* มากขึ้นแต่ไม่พบจุลินทรีย์กลุ่มแอโรบิกไนไตรต์ออกซิไดเซอร์ เช่น *Nitrobacter winogradskii* และ *Nitrospira moscoviensis*

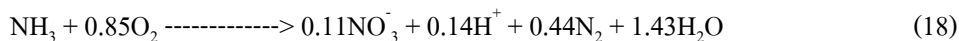
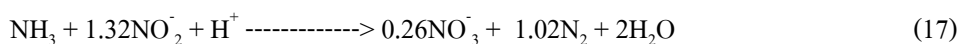
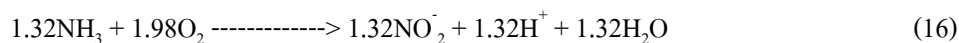
Sliemers et al., 2003 ได้นำเชื้อจุลินทรีย์ Anammox มาเลี้ยงในสภาวะจำกัดปริมาณออกซิเจน ตรวจพบว่ามีการเกิดฟายเออร์เกิดขึ้น แต่ไม่พบจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรต์ออกซิไดเซอร์

ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์กลุ่มแอนแอโรบิกแอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ยังคงทำงานได้ โดยมีศักยภาพในการกำจัดแอมโมเนียได้สูงถึงร้อยละ 85 โดยมีไนเตรตเกิดขึ้นเพียงร้อยละ 15 และไม่ต้องใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเลย ดังนั้นระบบจึงคงเป็นออโทโทรฟิกดีไนทริฟิเคชัน

Pynaert et al., 2003 ได้ศึกษาการกำจัดแอมโมเนียมด้วยถังปฏิกริยาแบบจานหมุนชีวภาพ โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีเฉพาะแอมโมเนียม พบว่าระบบสามารถกำจัดแอมโมเนียมได้สูงถึงร้อยละ 89 และทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่ามีจุลินทรีย์ออโทโทรฟิก 2 กลุ่มคือ แอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ คือ *Nitrosomonas* ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแอมโมเนียมไปเป็นไนไตรต์ โดยมีออกซิเจนเป็นสารรับอิเล็กตรอน เรียกขั้นตอนนี้ว่าไนไตรเตชัน (nitrification) และจุลินทรีย์อีกกลุ่มคือแบคทีเรียแอนแอโรบิกแอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ คือ *Kuenenia stuttgartiensis* ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียมโดยใช้ไนไตรต์เป็นสารรับอิเล็กตรอน

3.2 โอแลนด์ (Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification, OLAND)

เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากจุลินทรีย์ออโทโทรฟิก ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียมไปเป็นก๊าซไนโตรเจนโดยใช้ไนไตรต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ในสภาวะจำกัดปริมาณออกซิเจน ถูกพัฒนาขึ้นมาใช้กับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียมสูงๆ ข้อได้เปรียบของกระบวนการ OLAND เมื่อเทียบกับกระบวนการไนทริฟิเคชัน-ดีไนทริฟิเคชัน คือ ระบบนี้สามารถลดการใช้ ออกซิเจนได้ถึงร้อยละ 63 และลดการเติมสารอินทรีย์คาร์บอนได้อย่างสมบูรณ์ (Kuai and Verstraete, 1998) หลักการทำงานของกระบวนการสามารถแบ่งได้เป็นขั้นตอนได้เป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 *Nitrosomonas* ทำหน้าที่เปลี่ยนแอมโมเนียมไปเป็นไนไตรต์ โดยมีออกซิเจนเป็นสารรับอิเล็กตรอน ขั้นตอนที่ 2 *Kuenenia stuttgartiensis* ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียมไปเป็นก๊าซไนโตรเจน โดยมีไนไตรต์เป็นสารรับอิเล็กตรอน (Strous et al., 1998) สมการของกระบวนการนี้แสดงดังสมการที่ (16) (17) และ (18) (Pynaert et al., 2004)



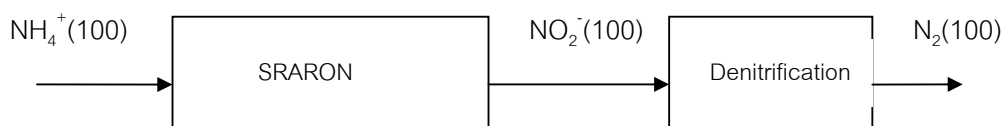
Schmidt and Bock, 1997 รายงานว่า แบคทีเรีย *Nitrosomonas eutropha* สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียมไปเป็นก๊าซไนโตรเจน ในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนไดออกไซด์ (NO_2) เป็นสารออกซิเดนต์ Windey et al., 2005 พบว่ากระบวนการ OLAND ในถังปฏิกรณ์แบบจานหมุนชีวภาพสามารถบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็มได้ โดยทำการทดลองใช้ความเข้มข้นของความเค็มเท่ากับ 30 กรัมโซเดียมคลอไรด์/ลิตร และมีประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนได้ถึงร้อยละ 84 ที่ภาระบรรทุกปริมาตรไนโตรเจนเท่ากับ 725 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน โดยผลกระทบของความเค็มทำให้ค่ากิจกรรมไนไตรต์ชั้นจำเพาะลดลงร้อยละ 23 และกิจกรรมอนามอกซ์จำเพาะลดลงร้อยละ 58

Kuia and Verstraete., 1998 ได้ศึกษากระบวนการ OLAND ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ เป็นตัวหลักมีค่าอัตราไนไตรท์ชั้นจำเพาะเท่ากับ 0.1 กรัมไนโตรเจน/กรัมวีเอสเอส/วัน มีการใช้อัตราไนไตรต์ไป 4.1 กรัมอัตราไนไตรต์/กรัมแอมโมเนียมไนโตรเจนที่กำจัดได้ องค์ประกอบของก๊าซผลิตภัณฑ์พบว่าร้อยละ 20 เป็นก๊าซไนโตรเจนไดออกไซด์ (N_2O) และอีกร้อยละ 80 เป็นก๊าซไนโตรเจน

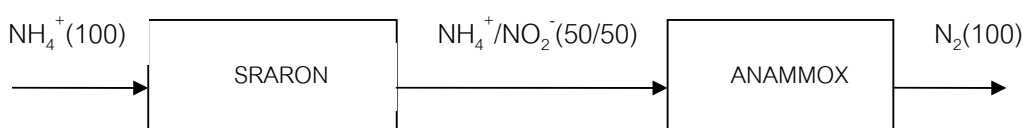
Jetten et al., 2001 แสดงให้เห็นว่าไนไตรฟายเออร์ และอนามอกซ์ สามารถอยู่ร่วมกันได้ในสภาวะจำกัดออกซิเจน โดยไนไตรฟายเออร์ ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียมไปเป็นไนไตรต์ ในขณะที่อนามอกซ์จะเปลี่ยนไนไตรต์ที่เป็นพิษและแอมโมเนียมไปเป็นก๊าซไนโตรเจน นอกจากนี้ยังให้ความแตกต่างระหว่างระบบ OLAND และ CANON คือ OLAND เป็นกิจกรรมไนไตรฟิเคชันที่เกิดจากจุลินทรีย์แอโรบิกไนไตรฟายเออร์ ขณะที่ CANON เกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างอนามอกซ์และไนไตรฟายเออร์

3.3 ชารอน (Single Reactor High Activity Ammonium Removal Over Nitrite, SHARON)

เป็นกระบวนการพาร์เซียลไนไตรฟิเคชัน ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียมไปเป็นไนไตรต์ โดยยับยั้งปฏิกิริยาไม่ให้ไนไตรต์เปลี่ยนไปเป็นไนเตรต ภาพที่ 3ก แสดงกระบวนการ SHARON ตามด้วยกระบวนการดีไนไตรฟิเคชัน และภาพที่ 3ข แสดงกระบวนการ SHARON ที่ตามด้วยกระบวนการอนามอกซ์



3ก

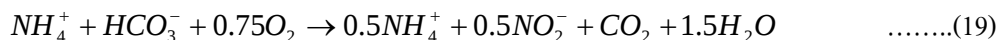


3ข

ภาพที่ 3 รูปแบบของกระบวนการ SHARON ตามด้วยกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน และอนามมอกซ์

วิธีการในการยับยั้งไม่ให้ไนไตรต์เปลี่ยนไปเป็นไนเตรต ทำได้โดยการกำหนดให้ค่าเวลาเก็บกัก สูงกว่าอัตราการเติบโตของจุลินทรีย์ในกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดเซอร์ แต่ต่ำกว่าอัตราการเติบโตของจุลินทรีย์ในกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดเซอร์ เมื่อใช้ค่าเวลาเก็บกักประมาณ 1 วัน ทำให้จุลินทรีย์ถูกล้างออกจากถังไป และเดินระบบที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่จุลินทรีย์พวกแอมโมเนียออกซิไดเซอร์โดดเด่น หรือใช้วิธีจำกัดปริมาณออกซิเจนให้น้อยกว่า 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร หรือร้อยละ 5 ของอากาศอิ่มตัว พบว่าไนไตรต์ออกซิไดเซอร์ ไม่สามารถเติบโตได้ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไนไตรต์เท่านั้น (Schmidt et al., 2003)

กระบวนการ SHARON เมื่อนำมารวมกับกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน หรือที่เรียกว่าเส้นทางไนไตรต์ วิธีการนี้ทำให้ประหยัดการเติมอากาศและใช้สารอินทรีย์คาร์บอนน้อยกว่ากระบวนการไนทริฟิเคชัน-ดีไนทริฟิเคชัน แบบทั่วไป ดังรูป 3 ก หรือการนำมารวมกับกระบวนการ ANAMMOX ดังรูป 3 ข สมการของกระบวนการ SHARON แสดงในสมการที่ 19 ดังนี้ (van Dongen et al., 2001)

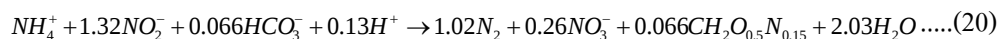


3.4 อนาโมกซ์ (Anaerobic Ammonium Oxidation, ANAMMOX)

กระบวนการในการกำจัดแอมโมเนียมทางชีววิทยาที่รู้จักกันทั่วไปว่าเป็นกระบวนการที่เป็นใช้อากาศ Schmidt and Bock., 1997 รายงานว่าจุลินทรีย์ *Nitrosomonas eutropha* สามารถทำการไนตริฟายด์และดีไนตริฟายด์ แอมโมเนียมไปเป็นไนไตรต์และไนตริกออกไซด์ (NO) โดยมีไฮดราซีนเป็นสารผลิตภัณฑ์ตัวกลาง ในสภาวะไร้อากาศ โดยใช้ก๊าซไนโตรเจนไดออกไซด์ (NO₂) นอกจากนี้ Mulder et al., 1995 ยังพบว่าการดีไนตริฟิเคชัน ด้วยจุลินทรีย์ *Nitrosomonas eutropha* ในสภาวะแอน็อกซิก สามารถเกิดขึ้นได้โดยการใช้ไฮโดรเจนเป็นสารให้อิเลคตรอน และไนไตรต์เป็นสารรับอิเลคตรอน

นอกจากนี้ Mulder et al., 1995 ยังสังเกตพบว่าการปฏิบัติไนตริฟิเคชัน แบบขั้นฟลูอิดไคซ์ ที่รับน้ำเสียจากถังปฏิกริยาสร้างมีเทน แอมโมเนียมหายไปถึง 0.4 กก.ไนโตรเจน/ลบ.ม/วัน จากการคำนวณด้วยสมดุลมวล พบว่าใช้แอมโมเนียม 5 โมลต่อไนเตรต 3 โมล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซไนโตรเจน 4 โมล จากงานวิจัยใหม่ๆ ยังพบว่าสามารถกำจัดแอมโมเนียมในน้ำเสีย โดยเปลี่ยนไปเป็นก๊าซไนโตรเจนในสภาวะไร้อากาศ เมื่อใช้ไนไตรต์เป็นตัวรับอิเลคตรอน (Mulder et al., 1995, van de Graaf et al., 1995 และ 1996, Strous et al., 1997, และ van Dongen et al., 2001) เรียกกระบวนการนี้ว่า ANAMMOX

กระบวนการ ANAMMOX ถูกพบครั้งแรกที่โรงบำบัดน้ำในทวีปเคชันขนาดจำลอง ของระบบบำบัดน้ำเสียที่ Gist-Brocades เมือง Delft ประเทศเนเธอร์แลนด์ ซึ่งสังเกตพบว่าแอมโมเนียมในน้ำออกสู่อุณหภูมิพร้อมไปกับไนเตรต และเกิดก๊าซไนโตรเจนเพิ่มขึ้น (Mulder et al, 1995) Schmidt et al., 2003 แสดงให้เห็นว่าถึง ANAMMOX ขนาดที่ใช้งานจริงมีที่ระบบบำบัดน้ำเสียเมือง Rotterdam ซึ่งได้มีการประเมินว่าจะคืนทุนในเวลา 7 ปี เนื่องจากไม่ต้องเติมเมทานอล และที่ van Dongen et al., 2001 มหาวิทยาลัย Delft เติบโตระบบ ANAMMOX ด้วยถังปฏิกริยาแบบซีเควนซิงค์แบบทซ์ โดยใช้ น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของไนไตรต์ 420 มิลลิกรัม/ลิตร และแอมโมเนียม 420 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าสามารถกำจัดไนไตรต์ได้สมบูรณ์และแอมโมเนียมได้ร้อยละ 80 ได้ สมการของปฏิกริยาดังนี้



การกำจัดแอมโมเนียมในขณะที่ไม่มีการอินทรีย์คาร์บอน แต่ใช้ไบคาร์บอเนต เป็นแหล่งคาร์บอน และในสภาวะแอโนกซ์ิก แบคทีเรียใช้แอมโมเนียมเป็นสารให้อิเลคตรอนเปลี่ยนไนไตรต์ซึ่งเป็นสารรับอิเลคตรอนไปเป็นก๊าซไนโตรเจน และบางส่วนของไนไตรต์ ไปเป็นไนเตรต (Strous et al., 1998) พบว่าจุลินทรีย์ในระบบเป็นกลุ่มออโทโทรฟิกที่ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน จากสมการที่ 20 จะเห็นว่า 1 โมลแอมโมเนียมจะทำปฏิกิริยาพอดีกับ 1.32 โมลไนไตรต์ ผลผลิตหลักที่ได้ส่วนใหญ่เป็นก๊าซไนโตรเจน และไนเตรตเพียงเล็กน้อย เป็นระบบที่ต้องทำพาร์เซียลไนตริฟิเคชันมาก่อน โดยเปลี่ยนแอมโมเนียม 1 ส่วนให้เป็นไนไตรต์ครึ่งส่วน และใช้แอมโมเนียมที่เหลือครึ่งส่วนนั้นทำปฏิกิริยากับไนไตรต์ครึ่งส่วนที่ได้ ซึ่งเกิดขึ้นได้เนื่องจากเมื่อแอมโมเนียมถูกออกซิไดซ์ไปแล้วร้อยละ 50 ทำให้พีเอชจะลดลงเป็น 6.7 สภาวะเช่นนี้สามารถป้องกันการออกซิเดชันแอมโมเนียมส่วนที่เหลืออยู่ได้ แต่ต้องจำกัดปริมาณออกซิเจนที่ให้กับถังไนตริฟิเคชัน (Strous et al., 1997)

3.4.1 ธรรมชาติชีววิทยาของจุลินทรีย์ Anammox

ทำการทดลองในแบทช์ได้ค่าอัตราการออกซิเดชันแอมโมเนียมจำเพาะเท่ากับ 0.08 นาโนโมลแอมโมเนียม/นาทีก่อน/น้ำหนักตะกอนแห้ง ในขณะที่ค่านี้หากวัดในโรงงานนำร่องพบว่ามีค่าเท่ากับ 1.2 นาโนโมลแอมโมเนียม/นาทีก่อน/น้ำหนักตะกอนแห้ง สาเหตุที่การทดลองทั้ง 2 แบบมีค่าไม่เท่ากันเนื่องจากการทดลองในแบทช์มีข้อจำกัดของการกระจายตัวของอาหารเข้าไปในเมื่อดูจุลินทรีย์ (Jetten et al., 1999)

3.4.2 กลไกสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ ANAMMOX

Jetten et al., 1999 ได้ศึกษาความเป็นไปได้ของการเมแทบอลิซึม ด้วยการติดตามดู ^{15}N พบว่าไฮดรอกซิลามีนเป็นตัวสารรับอิเลคตรอน โดยไฮดรอกซิลามีนนี้ได้มาจากไนไตรต์ และมีผลิตภัณฑ์ตัวกลางสำคัญ คือไฮดราซีน แอมโมเนียมและไฮดรอกซิลามีนถูกเปลี่ยนเป็นไฮดราซีนด้วยเอนไซม์เมมเบรนบาวน์เอนไซม์คอมเพล็กซ์ ไฮดราซีนถูกออกซิไดซ์เป็นก๊าซไนโตรเจนที่บริเวณไซโทพลาสซึม การรีดิวซ์ไนไตรต์และการออกซิไดซ์ไฮดราซีนเกิดขึ้นในตำแหน่งที่แตกต่างกัน แต่ใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกัน หรือแอมโมเนียมและไฮดรอกซิลามีนถูก

เปลี่ยนเป็นไฮดราซีนด้วยเอนไซม์เมมเบรนบาวน์เอนไซม์คอมเพล็กซ์ไฮดราซีน จะถูกออกซิไดซ์เป็นก๊าซไนโตรเจนที่บริเวณเปอริพลาซึม แต่ใช้เอนไซม์ต่างกัน

Schalk et al., 1998, และ Jetten et al., 2001 รายงานว่าไฮดราซีนเป็นสารที่เกิดขึ้นได้เฉพาะในกระบวนการ ANAMMOX เพราะเป็นที่รู้กันทั่วไปว่าสารประกอบนี้ไม่พบในกระบวนการทางชีววิทยา ดังนั้นเราสามารถตรวจสอบการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ Anammox ได้ง่าย ๆ ด้วยการตรวจหาปริมาณไฮดราซีน

3.4.3 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม

ค่าพีเอชที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 6.7-8.3 (ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 8) (Jetten et al., 1999, Egli et al., 2001, และ Schmidt et al., 2003) อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20-43 องศาเซลเซียส (ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส) (Strous et al., 1999, และ Schmidt et al., 2003) เชื้อแบคทีเรียของ Anammox มีความอ่อนไหวต่อปริมาณออกซิเจน โดย Strous et al., 1997 พบว่าเมื่อมีปริมาณออกซิเจนในอากาศอยู่ร้อยละ 2, 1 และ 0.5 จะไม่พบการออกซิไดซ์แอมโมเนียมเกิดขึ้น ต้องอยู่ในภาวะไม่มีออกซิเจน (Jetten et al., 1999) สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ไนไตรต์ เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของสารที่ยับยั้งกระบวนการ ANAMMOX

สารยับยั้ง	ความเข้มข้น	อ้างอิง
Oxygen	0-0.2 มิลลิโมล	Jetten et al., 1999
Phosphate	> 2 มิลลิโมล	Jetten et al., 1999
Phosphate	> 20 มิลลิโมล	Egli et al., 2001
Phosphate	> 60 มก.ฟอสฟอรัสต่อลิตร ^a	Schmidt et al., 2003
Phosphate	>600 มิลลิโมล ^b	Schmidt et al., 2003
Nitrite	> 0.1 ก.ไนโตรเจนต่อลิตร	Strous et al., 1999
Nitrite	> 13 มิลลิโมล	Egli et al., 2001
Nitrite	> 20 มิลลิโมล	Jetten et al., 1999
Nitrite	70 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ^a	Schmidt et al., 2003
Nitrite	180 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ^b	Schmidt et al., 2003

^a สำหรับ *Candidatus Brocadia anammoxidans*

^b สำหรับ *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*

กระบวนการ ANAMMOX ถูกยับยั้งด้วยไนไตรต์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 20 มิลลิโมล และในสถานะที่มีความเข้มข้นของไนไตรต์อยู่มากเป็นเวลานานกว่า 12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สูญเสียความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียมภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Jetten et al., 1999)

3.4.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้น

มากกว่าร้อยละ 90 คือ ก๊าซไนโตรเจน โดยมีไนเตรตไนโตรเจนในปริมาณที่เล็กน้อย และเมื่อวิเคราะห์ก๊าซที่เกิดขึ้นโดยละเอียดยังพบว่ามีก๊าซอื่นๆ ประกอบด้วย N_2O ร้อยละ 0.03-0.06, NO ร้อยละ 0.00005 และ NO_2 ร้อยละ 0.0005 (Strous et al., 1998)

3.4.5 รูปแบบต่างๆ ของถังปฏิกริยา ได้มีผู้วิจัยนำกระบวนการ ANAMMOX มาทดลองในถังปฏิกริยาหลายรูปแบบ ซึ่งแต่ละแบบสามารถรับอัตราการบำบัดได้แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2 และประสิทธิภาพของถังปฏิกริยาแสดงในตารางที่ 3 (Strous et al., 1997)

ตารางที่ 2 ชนิดของถังปฏิกริยา และอัตราการบำบัด

ชนิดของถังปฏิกริยา	พารามิเตอร์	ค่า	อ้างอิง
ฟลูอิดไคซ์เบด	อัตราการกำจัดไนโตรเจนสูงสุด	0.7 กก.แอมโมเนียมไนโตรเจน/ ลบ.ม./วัน	Strous et al., 1997
		1.5 กก.ไนโตรเจนทั้งหมด/ลบ.ม/ วัน	Mulder et al., 1995
	อัตราการกำจัดแอมโมเนียมสูงสุด	0.4 กก.แอมโมเนียมไนโตรเจน/ ลบ.ม./วัน	
ซีแวนซิงค์แบทช์	อัตราการใช้แอมโมเนียมสูงสุดจำเพาะ	45 ± 5 นาโนโมล/กก.โปรตีน/ นาที่	Strous et al., 1998
ซีแวนซิงค์แบทช์ แบบมีตะกอน	อัตราการกำจัดไนโตรเจนสูงสุด	0.75 กก.ไนโตรเจนทั้งหมด/ลบ.ม/ วัน	van Dongen et al., 2001
	อัตราการใช้ในโตรเจนสูงสุดจำเพาะ	0.82 กก.ไนโตรเจน/กก.วีเอสเอส/วัน	
แบบอากาศยกตัว และ ซีแวนซิงค์ แบทช์	อัตราการใช้ในโตรเจนสูงสุดจำเพาะ	0.9 กก.ไนโตรเจน/กก.วีเอสเอส/วัน (อากาศยกตัว)	Dapena-Mora et al., 2004
		0.44 ไนโตรเจน/กก.วีเอสเอส/วัน (ซีแวนซิงค์แบทช์)	

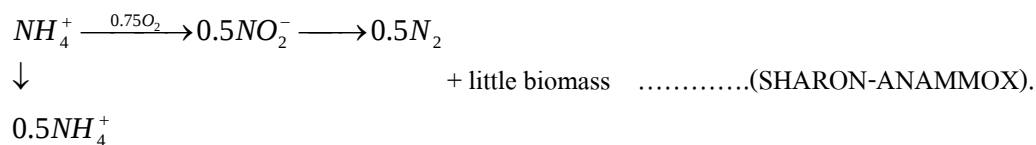
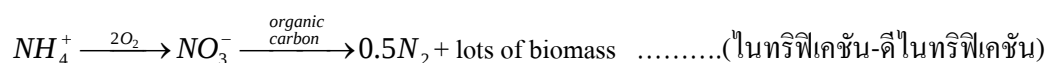
ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียม และไนไตรต์ด้วยกระบวนการต่างๆ

พารามิเตอร์	ฟลูอิดไคซ์เบด (ใช้น้ำเสียสังเคราะห์)	ชั้นตรึง	ฟลูอิดไคซ์เบด (ใช้น้ำออกของถังหมักตะกอน)
เวลาในการทดลอง (วัน)	84	115	150
แอมโมเนียเข้า (กก.ไนโตรเจน/ ลิตร)	0.07-0.84	0.07-0.84	1.1-2.1
แอมโมเนียออก (กก.ไนโตรเจน/ ลิตร)	0.02-0.28	0.00-0.13	0.00-0.56
ไนไตรต์เข้า (กก.ไนโตรเจน/ลิตร)	0.07-0.84	0.07-0.84	0.07-0.84
ไนไตรต์ออก (กก.ไนโตรเจน/ ลิตร)	0.00	0.00	0.00
ร้อยละการกำจัดแอมโมเนีย	84	88	82
ร้อยละการกำจัดไนไตรต์	99	99	99
การกำจัดไนโตรเจนรวม (กก. ไนโตรเจน/วัน)	1.8	1.1	1.5

เนื่องจากจุลินทรีย์ Anammox เป็นจุลินทรีย์กลุ่มออโทโทรฟิก จึงมีอัตราการเจริญเติบโตช้า ซึ่งเป็นปัญหาอย่างมากในการที่จะนำกระบวนการนี้มาใช้งานจริง รายงานค่าจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ของจุลินทรีย์ anammox เท่ากับ 30 วัน (Van de Graff et al., 1996), 11 วัน (Strous et al., 1998) และ 1.8 วัน (Isaka et al., 2005) นอกจากนี้ Strous et al., 1998 ได้แนะนำว่าถึงปฏิกิริยาแบบซีแวนซิงค์แบทช์ เป็นถึงที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเติบโตช้า เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการเก็บกักตะกอนให้อยู่ได้นานขึ้น สารอาหารมีการกระจายตัวดี และมีความคงตัวในการเดินระบบได้เป็นเวลานานๆ ส่วนถึงปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไคซ์เบด เมื่อนำมาใช้ในขนาดโต๊ะปฏิบัติก็มีปัญหา เนื่องจากการเดินระบบทำได้ยาก และบางครั้งไม่สามารถเก็บกักตะกอน ได้เพียงพอที่จะรักษาเชื้อจุลินทรีย์ Anammox ไว้ได้ และเมื่อเดินระบบนานๆ ประมาณ 1 ปี ก็เกิดปัญหาในการควบคุมพีเอช และเกิดความเสียหายกับเครื่องสูบน้ำ ส่วนจุลินทรีย์ที่อยู่บนฟิล์ม พบว่าในแต่ละการทดลอง ความหนาของฟิล์ม และความหนาแน่นของเชื้อ ไม่คงที่ตลอดทั่วถึงปฏิกิริยา ทำให้เกิดปัญหาในการกวนผสมที่ไม่ทั่วถึง โดยบางส่วนในถึงปฏิกิริยาเชื้อจุลินทรีย์ก็จะขาดสารอาหาร

3.5 กระบวนการ SHARON ต่อด้วย ANAMMOX

การรวมเอากระบวนการ SHARON ต่อด้วย ANAMMOX ซึ่งมีข้อที่ได้เปรียบเหนือกว่ากระบวนการไนตริฟิเคชัน-ดีไนตริฟิเคชัน หลายประการดังนี้ (Fux et al., 2002) สามารถลดปริมาณการใช้ออกซิเจนได้ถึงร้อยละ 62.5



ไม่ต้องเติมสารอินทรีย์คาร์บอนให้กับระบบดังนั้นจึงลดปริมาณการใช้ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ของ Anammox เป็นจุลินทรีย์ออโทโทรฟิก ตะกอนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นมีน้อย เนื่องจากจุลินทรีย์มีสัมประสิทธิ์ปริมาณผลิตต่ำเพียง 0.066 ± 0.01 โมลเซลล์/โมลแอมโมเนียม

หรือ 0.121 ± 0.018 โมลเซลล์/โมล ไนโตรเจน (Strous et al., 1998) และตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณผลิตของกระบวนการ ANAMMOX กับกระบวนการอื่นๆ

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณผลิตของกระบวนการแบบต่างๆ

กระบวนการ	สัมประสิทธิ์การผลิตเซลล์
แอกทิเวเต็ดสลัดจ์	0.6 ก.วีเอสเอส/ก.บีโอดี
ดีไนทริฟิเคชัน	0.8 ก.วีเอสเอส/ก.ไนเตรด
การย่อยแบบแอนแอโรบิก	0.075 ก.วีเอสเอส/ก.บีโอดี
ไนทริฟิเคชัน	0.2 ก.วีเอสเอสต่อก.แอมโมเนียม
ANAMMOX	0.066 ± 0.01 โมลเซลล์ต่อโมลแอมโมเนียม (Strous et al., 1998)

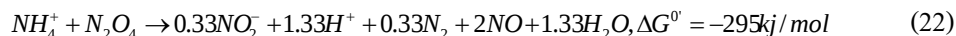
4. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการกำจัดไนโตรเจน

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการกำจัดไนโตรเจนมีอยู่ 3 กลุ่ม คือ แอโรบิกแอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ แอโรบิกไนไตรต์ออกซิไดเซอร์ และแอนแอโรบิกแอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์พวกเคมีโตรอฟ คือใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน และได้พลังงานจากปฏิกิริยาทางเคมี ออกซิเดชัน-รีดักชันของสารอนินทรีย์

4.1 จุลินทรีย์กลุ่มแอโรบิกแอมโมเนียมออกซิไดเซอร์

แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม *Beta proteobacteria* ประกอบด้วย *Nitrosomonas* และ *Nitrosospira* (Mobarry et al., 1996) อีกชนิดหนึ่งอยู่ในกลุ่ม *Gamma-proteobacteria* คือ *Nitrosococcus* (Madigan and Martinko, 2006) ในกระบวนการ SHARON จะพบมี *Nitrosomonas eutropha* เป็นกลุ่มเด่น จุลินทรีย์แอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะแอโรบิก แสดงดังสมการที่ 21 ได้ผลิตภัณฑ์หลักคือ ไนไตรต์ ขณะที่สภาวะไร้อากาศ ดังสมการที่ 22 ได้ผลิตภัณฑ์หลักคือ ก๊าซไนโตรเจน ไนไตรต์และไนตริกออกไซด์





การรีดิวซ์ไนไตรต์ในสภาวะแอน็อกซิก จะได้ก๊าซไนโตรเจน ซึ่งสามารถลดไนโตรเจนได้ถึงร้อยละ 45 ± 15 โดยมีค่ากิจกรรมแอมโมเนียมออกซิเดชันค่อนข้างต่ำเพียง 2.5 นาโนโมลแอมโมเนียม/กรัมโปรตีน/นาที และมีค่าเวลาการเพิ่มขึ้นเป็นสองของจำนวนจุลินทรีย์เท่ากับ 30 วัน ที่ค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณผลิตเท่ากับ 0.13 ± 0.019 กรัมตะกอนแห้ง/แอมโมเนียมไนโตรเจน และค่า K_s เมื่อมีแอมโมเนียมเป็นสารอาหารเท่ากับ 20 ไมโครโมล ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.7-8.3 ทั้งในสภาวะมีอากาศ และไร้อากาศ ใช้เอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิเจนเนส (AMO) ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียมทำให้ได้ไฮดรอกซิลามีน (Schmidt et al., 2003) ในภาวะมีอากาศ (ออกซิเจนมากกว่า 0.8 มก.ออกซิเจน/ลิตร) แอมโมเนียมจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไนไตรต์ แต่ถ้าภาวะที่มีออกซิเจนน้อยกว่า 0.8 มก.ออกซิเจน/ลิตร แอมโมเนียมจะเปลี่ยนเป็น NO , N_2O และ N_2 (Poth and Focht, 1985) *Nitrosomonas eutropha* สามารถไนทริฟาย และดีไนทริฟายได้พร้อมกันในสภาวะมีอากาศ เมื่อมี NO_2 หรือ NO โดยมีอัตราส่วนของ $NH_3:NO_x$ เท่ากับ 1000:1 และ 5000:1 (Schmidt et al., 2003)

ค่ากิจกรรมแอโรบิกแอมโมเนียมออกซิเดชัน มีค่าเท่ากับ 33 ไมโครโมลแอมโมเนียม/กรัมโปรตีน/นาทีและเพิ่มเป็น 280 ไมโครโมลแอมโมเนียม/กรัมโปรตีน/นาที เมื่อกระตุ้นด้วยการเติม NO_x และเมื่อ NO_2 เท่ากับ 50 พีพีเอ็ม จะได้ค่ากิจกรรมไนทริฟิเคชัน เป็น 150 ไมโครโมลไนไตรต์/กรัมโปรตีน/นาที (Zart and Bock., 1998)

4.2 จุลินทรีย์กลุ่มแอโรบิกไนไตรต์ออกซิไดเซอร์

เป็นการออกซิไดซ์ไนไตรต์ไปเป็นไนเตรต เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ออโทโทรฟิก ที่อยู่ในกลุ่ม *Alpha proteobacteria* เช่น *Nitrobacter* กลุ่ม *Gamma proteobacteria* เช่น *Nitrococcus* และไฟลัม *Nitrospira* (Schmidt et al., 2003) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณผลิตเท่ากับ 0.036 กรัมตะกอนแห้ง/กรัมไนไตรต์ไนโตรเจน และค่า μ_{max} เท่ากับ $0.04 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ (Both et al., 1992) แต่ *Nitrobacter* สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีสารอินทรีย์ *Nitrobacter* บางชนิด สามารถดีไนทริฟิเคชันได้ในสภาวะแอน็อกซิก โดยไนเตรตถูกใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่มาจากสารประกอบอินทรีย์ได้ (Bock., 1976) ไฮดรอกซิลามีน แอมโมเนียม และ NO เป็นสารยับยั้ง แอโรบิกไนไตรต์ออกซิไดเซอร์ (Sundermeyer et al., 1981)

4.3. จุลินทรีย์กลุ่มแอนแอโรบิกแอมโมเนียออกซิไดเซอร์ (Anammox)

4.3.1 ชนิดของจุลินทรีย์ (Jetten et al., 1999) พบว่าเชื้อที่เด่นในถังเป็น Gram-negative และเมื่อเลี้ยงในช่วงทำให้เชื้อมีจำนวนมากขึ้นด้วยน้ำเสียสังเคราะห์จะพบว่าตะกอนจุลินทรีย์ จะเปลี่ยนสีจากน้ำตาลเป็นแดง การตรวจพิจารณาจุลินทรีย์โดยเทคนิค 16S rDNA แล้วพบว่าอยู่ใน กลุ่ม planctomycetes

จุลินทรีย์ในกระบวนการ ANAMMOX ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Planctomycete มี 2 ชนิด ได้แก่ *Candidatus Brocadia anammoxidans* สังเกตพบที่ประเทศเนเธอร์แลนด์ (Jetten et al., 2001) และ *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* พบในการบำบัดน้ำเสียหลายแห่งในประเทศเยอรมันและ สวิตเซอร์แลนด์ (Egli et al. 2001) ซึ่งได้มีผู้วิจัยหาค่าไคเนติกส์ของจุลินทรีย์ ดังแสดงอยู่ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าไคเนติกส์ของจุลินทรีย์

พารามิเตอร์	หน่วย	อ้างอิง
$\mu_{\max}$, เวลาการเพิ่มขึ้นเป็นสองของ จำนวนจุลินทรีย์	0.0027 ต่อชั่วโมง, 11 วัน	Strous et al., 1999., Jetten et al., 1999
$\mu_{\max}$, เวลาการเพิ่มขึ้นเป็นสองของ จำนวนจุลินทรีย์	0.001 ต่อชั่วโมง, 29 วัน	Fux et al, 2002.
เวลาการเพิ่มขึ้นเป็นสองของจำนวนจุลินทรีย์	21 วัน	Jetten et al., 2001
สัมประสิทธิ์ปริมาณผลิต	0.066 ± 0.01 โมลคาร์บอนต่อ โมลแอมโมเนีย	Strous et al., 1998

Egli et al., 2001 รายงานว่าจุลินทรีย์ *Candidatus B. anammoxidans* และ *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* มีลักษณะทั่วไปเหมือนกัน คือมีไฮดราซีน (N_2H_4) และไฮดรอกซิลามีน (NH_2OH) เป็นผลิตภัณฑ์ตัวกลาง และเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Electron microscopy) พบว่ามีรูปร่างเซลล์มีลักษณะเป็นรูปโค้นัท ที่มีโปรตีนอยู่ตรงกลางเซลล์ ภายในบรรจุไรโบโซม และดีเอ็นเอ โดยลักษณะที่เป็นโค้นัทหรือรูปวงแหวน (Jetten et al., 2001) สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยวิธี ฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไรโบไรโดเซนชัน ซึ่งจะเห็นการติดสีฟลูออเรสเซนต์เข้ม เหมือนกันแต่

K.stuttgartiensis มีความทนทานต่อฟอสเฟตสูงถึง 20 มิลลิโมลและไนไตรต์สูงถึง 13 มิลลิโมล และทำงานได้เมื่อมีความเข้มข้นของเซลล์ต่ำ

4.3.2 การระบุชนิดของจุลินทรีย์ในระบบ ปัจจุบันนิยมใช้วิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิติว บรีโดเซนชัน โดยใช้โพรบ (probes) ซึ่งโพรบแต่ละชนิดก็จะเฉพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ โดยเฉพาะ (Jetten et al., 2001) ตารางที่ 6 ได้แสดงโพรบในปัจจุบันที่ใช้ตรวจวัดเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Anammox

ตารางที่ 6 ชนิดของโพรบที่ใช้ตรวจจุลินทรีย์ในกลุ่ม Anammox ในปัจจุบัน

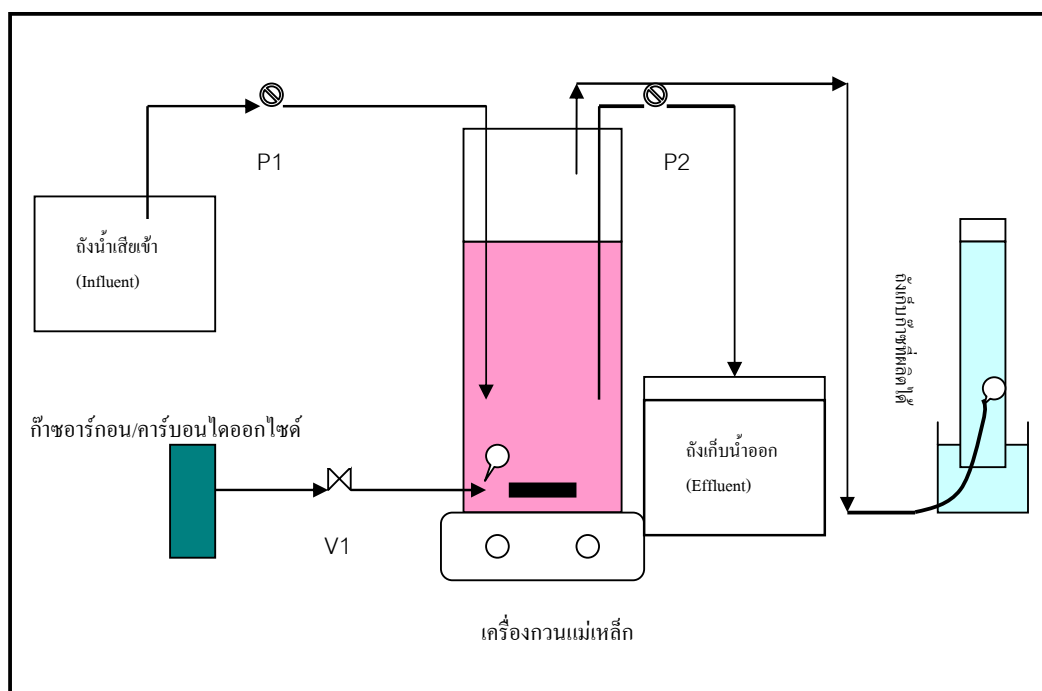
ชนิดของ โพรบ	ลำดับ (5'-3')	ตรวจพบเฉพาะเจาะจง	อ้างอิง
Pla46	GACTTGCATGCCTAATCC	Order <i>Planctomycetales</i>	Egli et al., 2001
Amx820	AAAACCCCTCTACTTAG TGCCC	Candidatus <i>B. anammoxidans</i>	Egli et al., 2001, Toh et al., 2002, Slikers et al., 2004, Guven et al., 2004, Trigo et al., 2006
Amx1240	TTTAGCATCCCTTTGT ACCAACC	Candidatus <i>B. anammoxidans</i>	Egli et al., 2001
Kst1275	TCGGCTTTATAGGTTT CGCA	Candidatus <i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	Egli et al., 2001
AMX809F	GCCGTAAACGATGGG GCACT	Candidatus <i>B. anammoxidans</i> , Candidatus <i>K. stuttgartiensis</i>	Tsushima et al., 2007
AMX818F	ATGGGCAATMRGTAG AGGGGTTT	Candidatus <i>B. anammoxidans</i> , Candidatus <i>K. stuttgartiensis</i>	Tsushima et al., 2007
AMX1066R	AACGTCTCACGACACG AGCTG	Candidatus <i>B. anammoxidans</i> , Candidatus <i>K. stuttgartiensis</i>	Tsushima et al., 2007
AMX667R	ACCAGAAGTTCCACTCTC	ANAMMOX	van der Star et al., 2007
AMX361	AGAATCTTTCGCAATG CCCG-F	ANAMMOX	van der Star et al., 2007
AMX381	1-AAGGGTGACGAAG CGACGCC	most ANAMMOX	van der Star et al., 2007
AMX382	1-AAGGTGACGAAGCGACGCC	<i>Kuenenia</i> and <i>Brocadia</i>	van der Star et al., 2007

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ถังปฏิกรณ์

1.1. ถังปฏิกรณ์แบบแอนแอโรบิกเอสบีอาร์ (Anaerobic Sequencing Batch Reactor, ASBR) ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ใช้ถังปฏิกรณ์แบบ ASBR ซึ่งมีลักษณะเป็นถังทรงกระบอก โดยมีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้เครื่องสูบน้ำเข้า (influent pump,P1) เครื่องสูบน้ำออก (effluent pump,P2) ท่อเป่าก๊าซอาร์กอน-คาร์บอนไดออกไซด์ ถังเก็บผลิตภัณฑ์ก๊าซที่เกิดขึ้น (gas production) ใช้แท่งแม่เหล็กในการกวน (magnetic stirrer) เพื่อกวนผสมตะกอนจุลินทรีย์กับน้ำเสีย ติดตั้งอุปกรณ์แสดงแผนผังดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แผนผังแสดงอุปกรณ์และถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1 ถังปฏิกรณ์แบบ ASBR1 ขนาด 5 ลิตร ทำจากพลาสติกอะคลิติกใส ที่มี

เส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 45 เซนติเมตร ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 5 ลิตร และมีปริมาตรใช้งานเท่ากับ 4 ลิตร ด้านล่างของถังเจาะรูกระจายก๊าซผสมระหว่างอาร์กอนและคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อให้ระบบอยู่ในภาวะไร้อากาศ

1.1.2 ถังปฏิกิริยาแบบ ASBR2 ขนาด 1.5 l. ทำจากพลาสติกอะคริลิกใส มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร สูง 20 เซนติเมตร ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 1.5 ลิตร มีปริมาตรใช้งานเท่ากับ 1 ลิตร

1.1.2 ถังปฏิกิริยาแบบ ASBR2 ขนาด 1.5 l. ทำจากพลาสติกอะคริลิกใส มี

1.3 การกวนผสมตะกอนใช้แท่งแม่เหล็ก โดยควบคุมอัตราเร็วการหมุนที่ 50 รอบต่อนาที

1.4 ถังพลาสติกสำหรับใส่น้ำเสียสังเคราะห์ขนาด 5 ลิตร

1.5 ถังพลาสติกสำหรับรองรับน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วขนาด 5 ลิตร

1.6 กระบอกตวงขนาด 1 ลิตร ใช้เก็บก๊าซผลิตภัณฑ์

1.7 เครื่องสูบน้ำแบบ Peristaltic pump

1.8 เครื่องกวนแม่เหล็ก

1.9 ก๊าซผสมอาร์กอน-คาร์บอนไดออกไซด์

2. ขวดที่ใช้ในการทดสอบแบบแบทช์ (Batch Test)

2.1 ขวดซีรัม (serum) ขนาด 125 มิลลิลิตร

มีลักษณะเป็นขวดแก้ว ปิดผนึกด้วยจุกยาง (butyl rubber stoppers) และฝาอะลูมิเนียม (aluminum crimps) ใช้ในการทดลองแบบแบทช์เพื่อศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนและไนโตรเจน โดยแต่ละขวดซีรัมจะใส่จุลินทรีย์และสารอาหาร และถูกเก็บมาทดสอบที่ละขวดตามเวลา รักษาภาวะไร้อากาศในขวดโดยการเป่าไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน-คาร์บอนไดออกไซด์

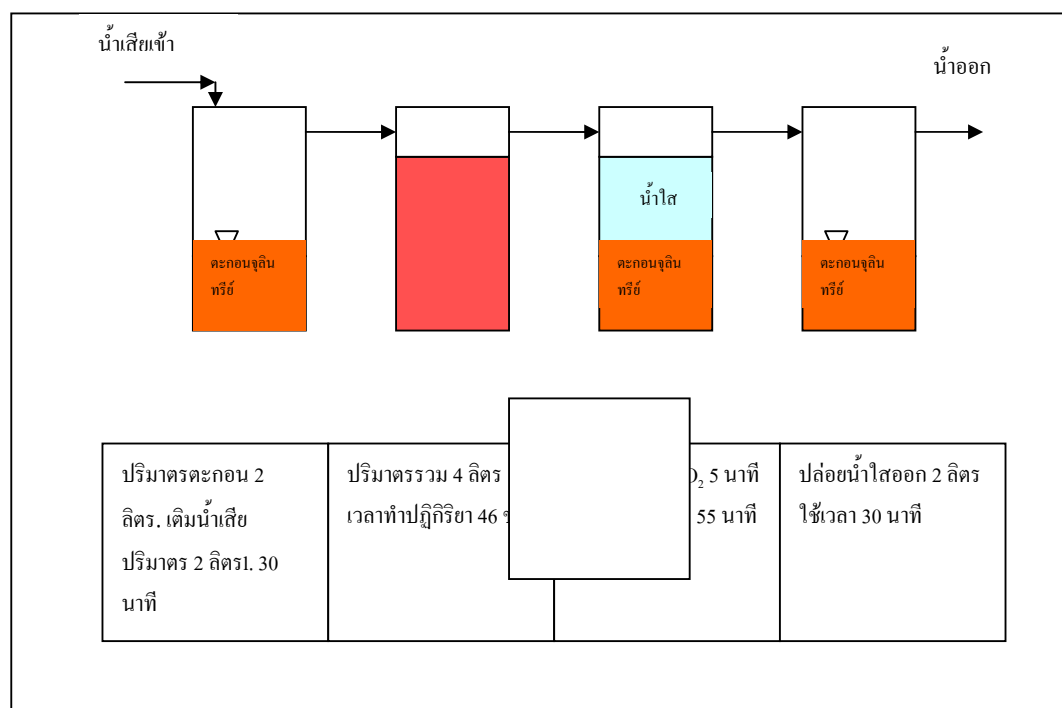
2.2 ขวดชมพู่ขนาด 250 ml. (erlenmeyer flask)

มีลักษณะเป็นขวดแก้ว ขนาด 250 ml. ปิดจุกด้วยจุกยางสีดำ พันรอยต่อของขวดกับจุกด้วยแผ่นพาราฟิน เจาะจุกยางจำนวน 3 ช่องเพื่อต่อท่อ โดยท่อที่ 1 เป็นท่อสูบน้ำเสียเข้า ท่อที่ 2 เป็นท่อเก็บตัวอย่างน้ำ ท่อที่ 3 เป็นท่อเป่าก๊าซเข้าไปในขวด การรักษาภาวะไร้อากาศในขวด โดยเป่าไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน-คาร์บอนไดออกไซด์

วิธีการ

1. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์แอนแอโรบิกแอมโมเนียออกซิเดชัน (Anammox) จากแหล่งที่มาต่างกัน

1.1 การเริ่มต้นระบบ โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังซีควนซ์แบทช์ ASBR1 (anaerobic sequencing batch reactor) เพื่อคัดเลือกแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบ ASBR ขนาด 5 ลิตร โดยกำหนดให้ 1 วัฏจักรของการเดินระบบเท่ากับ 48 ชั่วโมง ซึ่งประกอบด้วยเติมน้ำเสียเข้า ปริมาตร 2 ลิตร นาน 30 นาที ทำให้ปริมาตรรวมในถังเท่ากับ 4 ลิตร ระบบทำปฏิกิริยา 46 ชั่วโมง. เป่าก๊าซอาร์กอน-คาร์บอนไดออกไซด์ 5 นาที ปลอยให้ตกตะกอน 55 นาที และระบายน้ำออกปริมาตร 2 ลิตร ใช้เวลา 30 นาที แสดงแผนผังการเดินระบบในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แผนผังการเดินระบบถังปฏิกรณ์ ASBR1 ใช้ 1 รอบวัฏจักรเท่ากับ 48 ชั่วโมง.

ทำการทดลองโดยนำเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งที่มา 3 แหล่งมาใส่ในถังปฏิกริยาซีเวนซิงค์แบบทซ์ (ASBR) คือ โรงงานวันเส้นเรียกถึง SIT-ASBR1 โรงควบคุมคุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์เรียกถึง RAT-ASBR1 และ โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขมเรียกถึง NK-ASBR1 เติมน้ำดิบตามภาพที่ 5 โดยมีรายละเอียดของตำแหน่งที่เก็บเชื้อจุลินทรีย์ และปริมาณสารอาหารที่ใส่ลงไปแสดงดังตารางที่ 7 น้ำเสียที่ใช้ในการทดลอง เป็นน้ำเสียสังเคราะห์ โดยน้ำเสียที่ใส่เข้าระบบในช่วงแรกของการเดินระบบ ใช้อาหารหลักประกอบด้วยแอมโมเนียม และไนเตรต ส่วนธาตุอาหารอื่นๆ แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข แล้วเก็บตัวอย่างน้ำออก มาวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ทำเช่นนี้ทุกวัฏจักรจนกระทั่งระบบสามารถกำจัดแอมโมเนียมได้ จึงเปลี่ยนมาใช้ น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอาหารหลักเป็นแอมโมเนียมและไนไตรต์ โดยควบคุมอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์คงที่เท่ากับ 1 ต่อ 1.3 ตลอดการทดลอง

ตารางที่ 7 ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์และไนเตรต ที่ใช้ในการเริ่มต้นระบบเพื่อคัดเลือกแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม

แหล่งของเชื้อ	ตำแหน่งที่เก็บ	แอมโมเนียม (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)	ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)	ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)
SIT-ASBR1	บ่อไร้อากาศ	28	-	140
		28	36.4	-
RAT-ASBR1	ถังรีเทิร์นตะกอน	28	-	140
		28	36.4	-
NK-ASBR1	ถังรีเทิร์นตะกอน	28	-	140
		28	36.4	-

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียม และไนไตรต์เท่ากับ 28 และ 36.4 มก.ไนโตรเจน/ลิตร คงที่ตลอด 3 เดือน และเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียม และไนไตรต์เท่ากับ 42 และ 54.6 มก.ไนโตรเจน/ลิตร จนกระทั่งระบบอยู่ในสภาวะคงตัว

1.2 การทดลองแบบแบบทซ์เพื่อเปรียบเทียบอัตราการกำจัดแอมโมเนียม และไนไตรต์ของเชื้อจุลินทรีย์จากโรงงานวันเส้น (SIT-ASBR1) โรงควบคุมคุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์ (RAT-ASBR1) และ โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม (NK-ASBR1)

นำเชื้อจุลินทรีย์จาก SIT-ASBR1, RAT-ASBR1 และ NK-ASBR1 ที่ถูกเลี้ยงด้วยแอมโมเนียมและไนไตรต์มานาน 3 เดือนจนกระทั่งอยู่ในสภาวะคงตัว ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 42 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และไนไตรต์ 54.6 มก.ไนโตรเจน/ลิตร มาใส่ในขวดทดลองซีรัมขนาด 125 มิลลิลิตร แหล่งละ 4 ขวด ใช้เชื้อจุลินทรีย์ 25 มิลลิลิตร และน้ำเสียสังเคราะห์ 75 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มิลลิลิตร เป่าไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน-คาร์บอนไดออกไซด์เพื่อรักษาสภาพไร้อากาศ

เขย่าขวดซีรัมตลอดเวลาเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์และน้ำเสียผสมกันจนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บตัวอย่างน้ำที่ละขวดตามเวลา เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ ไนเตรต ปริมาณจุลินทรีย์ในรูปเอ็มแอลเอสเอส และปริมาณจุลินทรีย์ในรูปรูปร่างเอ็มแอลวีเอสเอส เพื่อเปรียบเทียบอัตราการกำจัดแอมโมเนียม และอัตราการกำจัดไนไตรต์ของจุลินทรีย์จากทั้ง 3 แหล่ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วเลือกแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่มี อัตราการกำจัดแอมโมเนียม และอัตราการกำจัดไนไตรต์ สูงที่สุดเพื่อคัดเลือกมาใช้ในการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ Anammox

2. การเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrichment) Anammox ในถังปฏิกรณ์ NK-ASBR2

นำเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ซีควนซิงค์แบทช์NK-ASBR1 ที่ถูกเลี้ยงด้วยแอมโมเนียมและไนไตรต์นาน 3 เดือนจนกระทั่งอยู่ในสภาวะคงตัว มาใส่ในถังแอนแอโรบิกซีควนซิงค์แบทช์ขนาด 1.5 ลิตร (NK-ASBR2) จำนวน 400 มิลลิลิตร และเติมน้ำเสียสังเคราะห์อีก 600 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 1 ลิ. เติมน้ำเสียสังเคราะห์ให้ 1 วัฏจักร เท่ากับ 24 ชั่วโมง. รายละเอียดของกระบวนการประกอบด้วย เติมน้ำเสียสังเคราะห์เข้าปริมาตร 600 มิลลิลิตร นาน 10 นาที ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร เป่าก๊าซอาร์กอน/คาร์บอนไดออกไซด์ 5 นาที ปล่อยให้ระบบทำปฏิกิริยา 23 ชั่วโมง. เป่าก๊าซอาร์กอน-คาร์บอนไดออกไซด์อีก 5 นาที ปล่อยให้ตกตะกอน 25 นาที คูดน้ำใสออก 600 มิลลิลิตร ใช้เวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างน้ำเสียเข้า และน้ำออก ไปวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต แต่ละวัฏจักรจะค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมและไนไตรต์ในน้ำเข้า โดยดูแลให้ระบบสามารถลดแอมโมเนียมได้ประสิทธิภาพมากกว่าร้อยละ 85 และหยุดเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมในน้ำเข้า เมื่อระบบมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียมได้ต่ำกว่าที่กำหนด โดยเริ่มต้นด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียมเท่ากับ 39.2 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และไนไตรต์เท่ากับ 52.86 มก.ไนโตรเจน/ลิตร ควบคุมอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์คงที่เท่ากับ 1:1.3 ตลอดการทดลอง

3. การทดลองเพื่อศึกษาอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$) ที่เหมาะสม

นำเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกิริยาที่เลี้ยงเชื้อที่นำมาจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม ที่มีอายุ 3 เดือน ถูกเลี้ยงที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 42 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และไนไตรต์ 54.6 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และอยู่ในสภาวะคงตัว มาใส่ในขวดทดลองแบบซีรัมเหมือนการทดลองในข้อ 1.2 แปรเปลี่ยนอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ 4 ค่าตั้งแต่ 1:0.5, 1:1.39, 1:2.24 และ 1:2.97 ตามลำดับโดยใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 30.33:20.39, 29.63:41.25, 30.75:68.77 และ 31.45:93.55 มก.ไนโตรเจน/ลิตร ตามลำดับ แล้วเก็บตัวอย่างน้ำตามเวลามาทำการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ ไนเตรต ปริมาณจุลินทรีย์ในรูปเอ็มแอลวีเอสเอส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อเลือกอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ที่เหมาะสม ที่ให้ค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียม และ อัตราการกำจัดไนไตรต์ สูงที่สุด

4. การทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณจุลินทรีย์ กับอัตราการกำจัดแอมโมเนียม

นำเชื้อจุลินทรีย์มา เหมือนข้อ 3 มาใส่ในขวดซีรัมเหมือนการทดลองในหัวข้อ 1.2 ใส่ปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์เข้มข้นเท่ากับ 42 และ 54.6 มก.ไนโตรเจน/ลิตร เท่ากันทุกขวด ทดลอง เปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นของจุลินทรีย์ในรูปเอ็มแอลวีเอสเอส ในแต่ละขวดให้แตกต่างกัน 4 ค่าคือ 490, 710, 925 และ 1070 มิลลิกรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำตามเวลา มาทำการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ปริมาณจุลินทรีย์ในรูปเอ็มแอลวีเอสเอส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การตรวจวัดเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

แบ่งการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์เป็น 3 ตัวอย่างดังนี้

5.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บมาจากถังรีเทิร์นสลัดจ์ของโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม เรียกตัวอย่างนี้ว่า “NK0”

5.2 เชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกิริยาซีควนซิงค์แบทช์ เลี้ยงเชื้อที่นำมาจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม โดยจุลินทรีย์ได้ผ่านการปรับตัวให้สามารถอยู่ในสภาวะแอนแอโรบิกมานาน 3 เดือน

ถูกเลี้ยงให้อยู่ในสภาวะคงตัวที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 42 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และไนไตรต์ 54.6 มก.ไนโตรเจน/ลิตร เรียกตัวอย่างนี้ว่า “NK1”

5.3 เชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิริยาซีแวนซิงค์แบทช์ เลี้ยงเชื้อที่นำมาจากโรงควบคุมคุณภาพ น้ำหนองแขม โดยจุลินทรีย์ได้ผ่านการปรับตัวให้สามารถอยู่ในสภาวะแอนแอโรบิกมานาน 9 เดือน ที่ปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียมเท่ากับ 210 และไนไตรต์เท่ากับ 284 มก.ไนโตรเจน/ลิตร เรียกตัวอย่างนี้ว่า “NK2”

6. การทดลองแบบแบทช์เพื่อหาค่าไคเนติกส์ของเชื้อแบคทีเรีย Anammox ที่มีอยู่ในถังปฏิริยา ร้อยละ 85±7.6

การทดลองแบบแบทช์ ทำการทดลองโดยนำเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิริยาซีแวนซิงค์แบทช์ เลี้ยงเชื้อที่นำมาจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม โดยจุลินทรีย์ได้ผ่านการปรับตัวให้สามารถ อยู่ในสภาวะแอนแอโรบิกมานาน 9 เดือน และอยู่ในสภาวะคงตัว จุลินทรีย์มีความสามารถรับภาระ บรรทุกของไนโตรเจนได้สูงสุด ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมและไนไตรต์เท่ากับ 392 และ 588 มก.ไนโตรเจน/ลิตร นำมาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ 125 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำเสียสังเคราะห์อีก 25 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรรวม 150 มิลลิลิตรเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียมและไนไตรต์ แสดงรายละเอียดในตารางที่ 8 โดยควบคุมอัตราส่วน อัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์คงที่เท่ากับ 1:1.3 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 15, 30 และ 45 นาที นำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ ไนเตรต และปริมาณจุลินทรีย์เอ็มแอลไอเอสเอส

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของแอมโมเนียม และไนไตรต์ที่ใช้ในการทดลองแบบเบทช์เพื่อหาค่าไคเนติกส์

เบทช์ที่	ความเข้มข้นแอมโมเนียม (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)	ความเข้มข้นไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)
1	7.00	9.10
2	10.50	12.25
3	18.20	31.98
4	40.60	73.28
5	60.20	89.43
6	78.40	117.92
7	105.00	165.03
8	116.20	174.32
9	180.60	252.30
10	208.60	277.62
11	226.80	293.52

พารามิเตอร์และวิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ทางเคมี

การตรวจสอบระบบจะตรวจพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ ไนเตรต ในน้ำเข้าและน้ำออก โดยมีวิธีการวิเคราะห์แต่ละพารามิเตอร์ดังนี้ แอมโมเนียม ไนไตรต์ ไนเตรต และปริมาณความเข้มข้นของจุลินทรีย์ในรูปเอ็มแอลเอสเอส (mixed liquor suspended solids, MLSS) และเอ็มแอลวีเอสเอส (mixed liquor volatile suspended solids, MLVSS) เป็นวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐานอเมริกา (APHA/AWWA/WEF, 1998) ส่วนค่าพีเอชใช้พีเอชมิเตอร์

นอกจากนี้การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไนไตรต์และไนเตรต ยังตรวจสอบแบบสุ่มด้วยวิธี Ion Chromatography ใช้เครื่องยี่ห้อ Methrom 761 Compact Ion Chromatograph (Methrom, Herisau, Switzerland) ต่อด้วย conductivity detector. เดินเครื่องด้วยพารามิเตอร์ดังนี้ column metrosep A supp 5, eluents Na_2CO_3 and NaHCO_3 , flow 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที, sample loop 20 ไมโครลิตร.

2. การระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิตูไฮบริไดเซชัน

การระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ใช้วิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิตูไฮบริไดเซชัน เก็บตัวอย่างตะกอน จุลินทรีย์จากถังเลี้ยงเชื้อได้ทำการตรึงตัวอย่างแล้ว มาทำการกระจายเซลล์ด้วยเครื่อง Ultrasonicator (Kubota INSONATOR201M, Japan) แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิตูไฮบริไดเซชัน ตามวิธีของ Amann, R., 1995 รายละเอียดวิธีการทำอยู่ในภาคผนวก ก ทำการตรวจสอบไลค์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence (Olympus BX51, Japan) ถ่ายภาพด้วยกล้อง CCD (Olympus DP70, Japan) และโปรแกรมบันทึกภาพ DP Controller (Olympus, Japan) สำหรับการนับจำนวนเซลล์ ทำโดยการถ่ายภาพโพรบเป้าหมายคู่กับโพรบสำหรับแบคทีเรียทั้งหมด (EUBmix) ในพื้นที่เดียวกันเป็นจำนวน 20 พื้นที่ แล้วนำมานับจำนวนด้วยโปรแกรม วิเคราะห์ภาพ Daime (digital Image analysis in microbial ecology, Version 1.1) คำนวณปริมาณแบคทีเรียเป้าหมายเป็นร้อยละต่อแบคทีเรียทั้งหมด

ตารางที่ 9 โพรบที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการกำจัดไนโตรเจน

ชื่อโพรบ	ลำดับ (5'-3)'	ชนิดของจุลินทรีย์	อ้างอิง
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Most bacteria	Amann et al., 1990
GAM42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT	<i>Gammaproteobacteria</i>	Manz et al., 1992)
BET42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	<i>Betaproteobacteria</i>	Manz et al., 1992)
ALF1b	CGT TCG YTC TGA GCC AG	<i>Alphaproteobacteria</i>	Manz et al., 1992)
Nso1225	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	<i>Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria</i>	Mobary et al., 1996)
Nso190	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	<i>Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria</i>	Mobary et al., 1996)
NEU	CCC CTC TGC TGC ACT CTA	Most halophilic and halotolerant <i>Nitrosomonas</i> spp.	Wagner et al., 1995)
Ntspa714	CCT TCG CCA CCG GCC TTC	Phylum <i>Nitrospira</i>	Loy 2002
NIT3	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	<i>Nitrobacter</i> spp.	Wagner et al., 1996
Amx820	AAA ACC CCT CTA CTT AGT GCC C	Candidatus <i>Brocadia</i> <i>anammoxidans</i> and Candidatus <i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	Schmid et al., 2000

โพรบ Nso1225 และ Nso190 ใช้ตรวจเชื้อจุลินทรีย์ในชั้น (class) ครอบคลุมแบคทีเรีย *Nitrospira briensis*, *Nitrosovibrio tenuis*, *Nitrosolobus multiformis*, *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas eutropha* และ *nitrosococcus mobilis* โพรบ NIT3 ใช้ตรวจเชื้อจุลินทรีย์ในชั้น *Alphaproteobacteria* ซึ่งประกอบด้วย *Nitrobacter* sp., *Nitrobacter winogradskyi*, และ *Nitrobacter hamburgensis*

ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์แอนแอโรบิกแอมโมเนียมออกซิเดชัน (Anammox) จากแหล่งที่มาต่างกัน

1.1 การเริ่มต้นระบบจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แอนแอโรบิกซีแวนซิงค์แบบชัณขนาด 5 ลิตร (ASBR1) แหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่เลือกใช้มาจาก 3 แหล่งคือ โรงงานวันเส้น เรียก “SIT-ASBR1” โรงควบคุมคุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์ เรียก “RAT-ASBR1” และ โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม เรียก “NK-ASBR1” ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 แหล่งมาจากระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์ ที่มีการออกแบบให้สามารถกำจัดธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส แต่ระบบบำบัดน้ำเสียเหล่านี้ไม่สามารถบำบัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการทำงานของจุลินทรีย์ มีค่าปริมาณทีโอซีในโตรเจนน้อยกว่า 2.5 (พงศศักดิ์ และคณะ, 2551) ซึ่งงานวิจัยหลายฉบับที่สนับสนุนการใช้เชื้อจุลินทรีย์จากระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์เพื่อการเริ่มต้นระบบ (van Dongen et al., 2001, Toh et al., 2002, Dong and Tollner, 2003, Tsushima et al., 2007)

โรงงานวันเส้น เป็นโรงงานผลิตวันเส้นจากเมล็ดถั่วเขียว ลักษณะน้ำเสียมีปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนต่ำ แต่สารอินทรีย์ไนโตรเจนค่อนข้างสูง ระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้ ประกอบด้วย บ่อไร้อากาศ บ่อผึ่ง และตามด้วยระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์เป็นระบบสุดท้าย ก่อนปล่อยน้ำที่บำบัดแล้วออกสู่ลำน้ำสาธารณะ การเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการทดลองเก็บจากบ่อไร้อากาศ

โรงควบคุมคุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์เป็นระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน ลักษณะน้ำเสียมีปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนต่ำ และค่าไนโตรเจนสูง ระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้เป็นระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์แบบสองขั้นตอน ที่ออกแบบให้มีการกำจัดธาตุอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัส และฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีนก่อนปล่อยออกสู่ลำคลองสาธารณะ ส่วนโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขมเป็นระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนเหมือนกัน ลักษณะน้ำเสียมีปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนต่ำ และค่าไนโตรเจนสูง เช่นเดียวกับลักษณะน้ำเสียของโรงควบคุมคุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์ ระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้เป็นระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์ ที่สามารถกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้ ทั้งยังมีระบบบำบัดตะกอนรวม ที่รับบำบัดตะกอนจากโรงบำบัดน้ำเสียต่างๆ ของกรุงเทพมหานคร น้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วได้

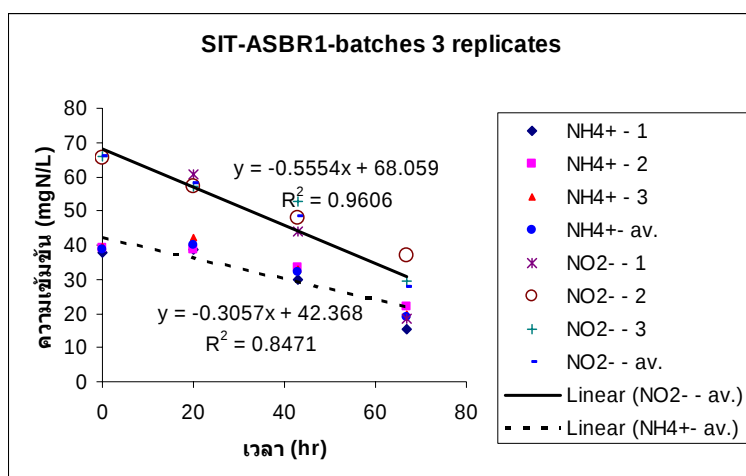
เติมอากาศเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนก่อนปล่อยออกสู่ลำน้ำสาธารณะ การเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จากทั้ง 2 แหล่งนี้ มาใช้ในการทดลองเก็บจากถังรีเทิร์นสลัดจ์ของระบบบำบัดน้ำเสีย

ทุกถังปฏิกริยา SIT-ASBR1, RAT-ASBR1 และ NK-ASBR1 การเริ่มต้นระบบในช่วงแรก ใช้สารอาหารประกอบด้วยแอมโมเนียม 26 มก.ไนโตรเจน/ลิตร ไนเตรต 140 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และไบคาร์บอเนต 1250 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่ใช้สารอินทรีย์คาร์บอน ในขั้นตอนเริ่มต้นระบบ มีการใช้ไนเตรตเป็นสารรับอิเล็กตรอนแทนไนไตรต์ สาเหตุสำคัญที่ใช้ไนเตรตแทนไนไตรต์ เนื่องจากปริมาณไนเตรตที่มีมากเกินไป สามารถป้องกันการเกิดซัลเฟตรีดักชัน ในการเกิดซัลเฟตรีดักชัน จะได้ซัลไฟด์เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นพิษกับจุลินทรีย์กลุ่ม Anammox ที่ต้องการ (van Dongen et al., 2001) ภายในเวลา 3 สัปดาห์แรก ระบบไม่สามารถกำจัดแอมโมเนียมและไนไตรต์ได้เลย จนกระทั่งในวันที่ 22 พบว่าระบบสามารถกำจัดแอมโมเนียมได้ร้อยละ 50 จึงเปลี่ยนสารอาหารเป็นแอมโมเนียม 26 มก.ไนโตรเจน/ลิตร ไนไตรต์ 36.4 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และไบคาร์บอเนต 1250 มิลลิกรัม/ลิตร โดยควบคุมอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ที่ใช้ตลอดการทดลองเท่ากับ 1:1.3 ซึ่งเป็นค่าอัตราส่วนที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ Anammox ตามการคำนวณด้วยการสมดุลมวลในงานวิจัย (van Dongen et al., 2001) เติมน้ำด้วยน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วของสารอาหารคงที่อย่างต่อเนื่องนาน 3 เดือน เพื่อให้ระบบอยู่ในสภาวะคงตัว หลังจากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ไปทำการทดลองแบบเบทช์ต่อเพื่อคัดเลือกแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อไป

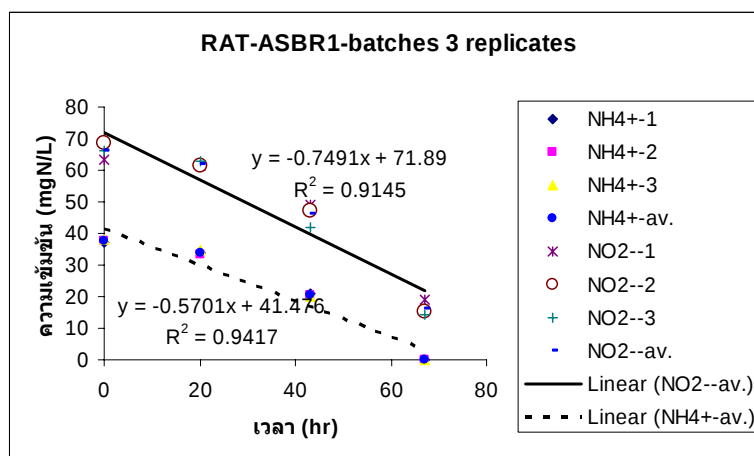
ลักษณะทางกายภาพภายในถังปฏิกริยาทั้งสามถัง ในช่วง 3 สัปดาห์แรกที่ระบบยังไม่สามารถกำจัดแอมโมเนียมได้ พบว่าตะกอนจุลินทรีย์จาก SIT-ASBR1 มีสีแดงดำ เป็นดินตะกอนมีน้ำหนักมาก , RAT-ASBR1 มีสีเทาดำ เนื่องจากตะกอนจุลินทรีย์อยู่ในสภาพขาดออกซิเจน และ NK-ASBR1 ตะกอนมีสีดำมาก น้ำที่ผ่านการบำบัดออกจากถังทุกถังในแต่ละวัฏจักรของการเดินระบบพบว่า มีสีขุ่นดำ และมีฟองอากาศเกิดขึ้นภายในถัง คาดว่ายังไม่มียูนิคัลจุลินทรีย์ Anammox อยู่ในระบบ (ไม่มีการตรวจวัดด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิตูไฮบริไลเซชัน) เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่ม Anammox มีอัตราการเติบโตช้า ตามรายงานวิจัยของ van de Graff et al., 1996 ทำให้ในระยะนี้ยังไม่มียูนิคัลจุลินทรีย์มาออกซิไดซ์แอมโมเนียมในสภาพไร้อากาศได้ แต่เมื่อระบบสามารถลดแอมโมเนียมได้แล้ว จึงเปลี่ยนสูตรสารอาหารใหม่เป็น แอมโมเนียมและไนไตรต์ โดยไม่ใช้ไนเตรต สีของเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงนี้เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน

1.2 การทดลองแบบเบทช์เพื่อเปรียบเทียบอัตราการลดแอมโมเนียม และไนไตรต์ของ เชื้อจุลินทรีย์จาก SIT-ASBR1, RAT-ASBR1 และ NK-ASBR1

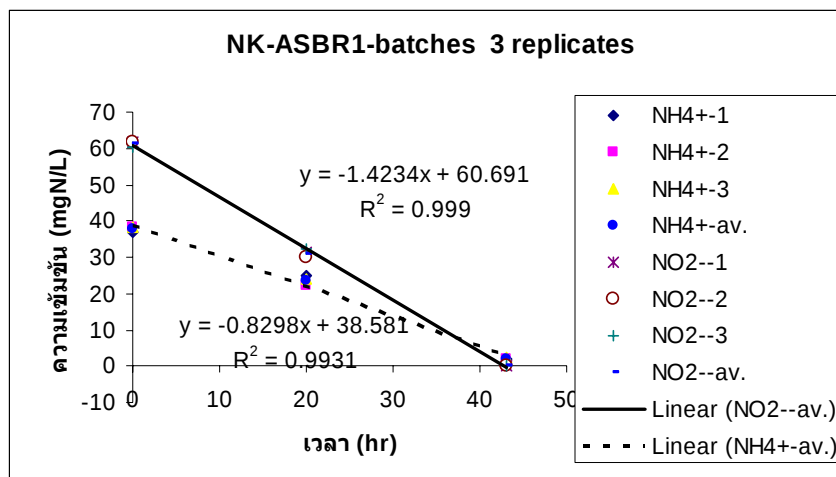
การนำเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกริยา SIT-ASBR1, RAT-ASBR1 และจาก NK-ASBR1 ที่ถูกเลี้ยงด้วยแอมโมเนียมและไนไตรต์นาน 3 เดือนจนกระทั่งอยู่ในสภาวะคงตัว มาทดสอบแบบเบทช์ในขวดซีรัมขนาด 125 มิลลิลิตร ได้ผลการทดลองดังตารางในภาคผนวกที่ 6, 7 และ 8



ภาพที่ 6 การลดลงของแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของถังปฏิกริยา SIT-ASBR1



ภาพที่ 7 การลดลงของแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของถังปฏิกริยา RAT-ASBR1



ภาพที่ 8 การลดลงของแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของถังปฏิกรณ์ NK-ASBR1

จากภาพที่ 6, 7 และ 8 จะเห็นว่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียม ของ SIT-ASBR1, RAT-ASBR1 และ NK-ASBR1 เท่ากับ 0.3057, 0.5701 และ 0.8298 มก.ไนโตรเจน/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ และอัตราการลดลงของไนไตรต์เท่ากับ 0.5554, 0.7491 และ 1.4234 มก.ไนโตรเจน/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะ เท่ากับ 0.012, 0.025 และ 0.031 กรัมไนโตรเจน/กรัมวีเอสเอส/วัน ตามลำดับ และคิดเป็นอัตราการกำจัดไนไตรต์จำเพาะ เท่ากับ 0.021, 0.032 และ 0.054 กรัมไนโตรเจน/กรัมวีเอสเอส/วัน ตามลำดับหรือคิดเป็นอัตราการกำจัดไนโตรเจนทั้งหมดจำเพาะ เท่ากับ 0.033, 0.057 และ 0.085 กรัมไนโตรเจน/กรัมวีเอสเอส/วัน ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ NK-ASBR1 มีอัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะ และค่าอัตราการกำจัดไนไตรต์จำเพาะ สูงที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์จาก SIT-ASBR1 และ RAT-ASBR1 และเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kuai and Verstraete, 1998 ที่ได้นำเชื้อจุลินทรีย์ในทรีฟอง มาจำกัดปริมาณออกซิเจน พบว่ามีค่าอัตราการกำจัดไนโตรเจนทั้งหมด เท่ากับ 0.061 และ 0.011 กรัมไนโตรเจน/กรัมวีเอสเอส/วัน ขึ้นกับปริมาณการบริโภคนไนโตรเจน โดยคาดว่า *Nitrosomonas* spp. ใช้ไนไตรต์เป็นสารรับอิเล็กตรอน และแอมโมเนียมเป็นสารให้อิเล็กตรอน

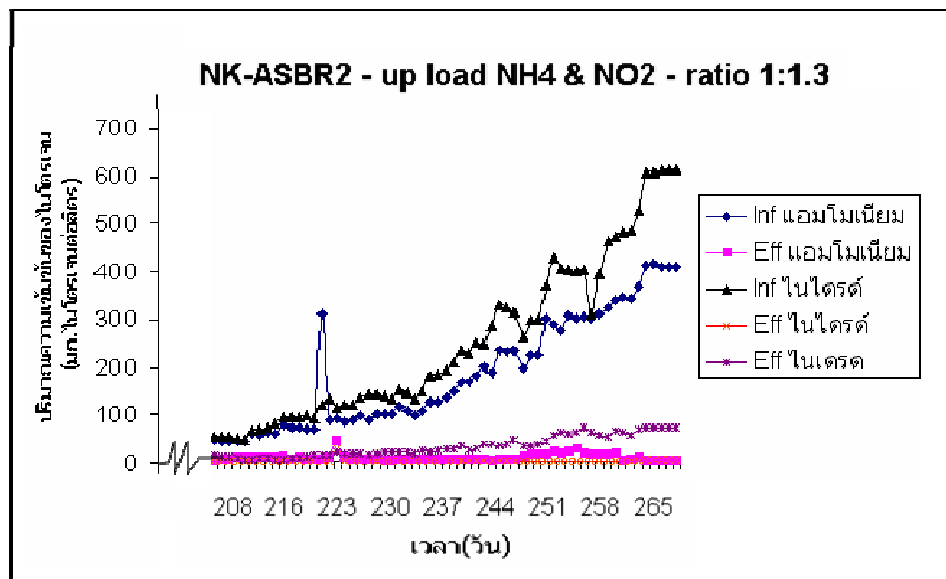
อัตราส่วนของอัตราการกำจัดไนโตรเจน กับอัตราการกำจัดไนไตรต์ ของเชื้อจุลินทรีย์จาก SIT-ASBR1, RAT-ASBR1 และ NK-ASBR1 มีค่าเท่ากับ 1:1.817, 1:1.1314 และ 1:1.715 ตามลำดับ จะเห็นว่าค่าอัตราส่วนของ SIT-ASBR1 และ NK-ASBR1 มีค่าสูงกว่า 1:1.3 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เกิดจากปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Anammox สาเหตุน่าจะมาจากการใช้ไนไตรต์

ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มดีไนทริฟายเออร์ ที่มีอยู่เดิมในสลัดจ์ของเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต้นกำเนิดที่เก็บมา ซึ่งใช้ในไตรต์เป็นสารรับอิเล็กตรอน และใช้การย่อยสลายเชื้อจุลินทรีย์พวกที่ตายภายในถัง เป็นสารอินทรีย์คาร์บอนที่ให้อิเล็กตรอน

ผลการทดลองนี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จาก NK-ASBR1 มีความเหมาะสมที่จะนำมาเริ่มต้นระบบเพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Anammox ที่สามารถกำจัดแอมโมเนียมในสภาพไร้อากาศได้ โดยไม่ต้องการใช้สารอินทรีย์คาร์บอน แต่สามารถใช้สารอินทรีย์ออกแกนิกคาร์บอน เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ออกโทโทรฟิก (van de Graff et al., 1996, Strous et al., 1998) โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม มีระบบบำบัดตะกอนจุลินทรีย์รวมอยู่ด้วยทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีความคุ้นเคยกับปริมาณแอมโมเนียมที่เข้าระบบน้ำเสียสูงกว่าโรงควบคุมคุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์ ที่เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่บำบัดเฉพาะน้ำทิ้งจากชุมชนที่มีปริมาณไนโตรเจนไม่สูงนัก ส่วนเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งโรงงานวันเส้น นั้นซึ่งแม้ว่าจะเป็นแหล่งที่คุ้นเคยกับการกำจัดไนโตรเจนอยู่แล้ว เนื่องจากวันเส้นผลิตมาจากถั่วเขียวที่มีโปรตีนสูง แต่จากกระบวนการผลิตมีการใช้กรดซัลฟริกในการล้างเส้น (ศิริพร, 2539) ทำให้ในน้ำเสียมียุณหภูมิสูงเกินไป อาจมีผลกับการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย Anammox

2. การเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrichment) Anammox ในถังปฏิกริยา NK-ASBR2

นำเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกริยาซีแวนซิงค์เบทซ์ NK-ASBR1 ที่ถูกเลี้ยงด้วยแอมโมเนียมและไนไตรต์นาน 3 เดือนจนกระทั่งอยู่ในสภาวะคงตัว มาใส่ในถังปฏิกริยา NK-ASBR2 เริ่มต้นเลี้ยงด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียมและไนไตรต์เท่ากับ 39.20 และ 52.86 มก.ไนโตรเจน/ลิตรตามลำดับ และค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของทั้งแอมโมเนียมและไนไตรต์ไปเรื่อยๆ จนได้ค่าสูงสุดของแอมโมเนียม และไนไตรต์ ผลการทดลองแสดงอยู่ในภาพผนวกที่ ๘ และภาพที่ 9



ภาพที่ 9 การเดินระบบในถังปฏิกรณ์ NK-ASBR2

จากภาพที่ 9 จะเห็นว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมและไนไตรต์ได้อย่างต่อเนื่องทุกวัฏจักร จากความเข้มข้นของแอมโมเนียมและไนไตรต์เท่ากับ 39.2 และ 54.6 มก. ไนโตรเจน/ลิตรตามลำดับ เพิ่มความเข้มข้นขึ้นอีกวัฏจักรละประมาณ 14 มก. ไนโตรเจน/ลิตร สามารถเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมและไนไตรต์ไปได้สูงสุดถึง 392 และ 588 มก. ไนโตรเจน/ลิตร อย่างไรก็ตามในช่วงการเพิ่มความเข้มข้น เกิดการผิดพลาดในการเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ในวันที่ 224 ซึ่งต้องการเติมแอมโมเนียมเพียง 78 มก. ไนโตรเจน/ลิตร แต่ได้เติมแอมโมเนียมเข้าไปสูงถึง 295.65 มก. ไนโตรเจน/ลิตร ตรวจพบหลังจากเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนน้ำออก และเติมน้ำเสียเข้าไปใหม่ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 78 มก. ไนโตรเจน/ลิตร แต่เมื่อครบรอบวัฏจักร 24 ชั่วโมง พบว่าระบบยังคงสามารถกำจัดแอมโมเนียมได้สูงถึงร้อยละ 99 และไนไตรต์ได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่มีความผิดปกติเกิดขึ้นกับระบบเลย แสดงว่าระบบมีความคงตัว และความยืดหยุ่นสูงมาก

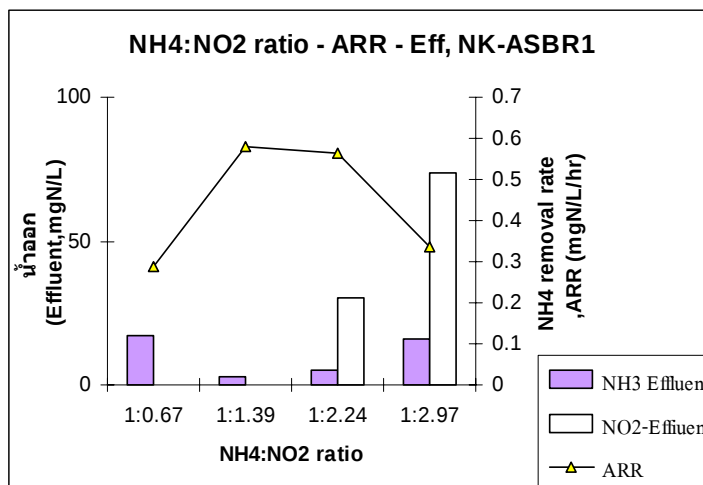
เห็นได้ว่าระบบสามารถรับการเพิ่มภาระบรรทุกแอมโมเนียม และภาระบรรทุกไนไตรต์ได้อย่างต่อเนื่อง เริ่มต้นใช้ภาระบรรทุกแอมโมเนียม ตั้งแต่ 0.024 จนถึง 0.24 กก. ไนโตรเจน/ลบ.ม./วัน และภาระบรรทุกไนไตรต์ เริ่มต้นจาก 0.032 ไปจนถึง 0.353 กก. ไนโตรเจน/ลบ.ม./วัน ซึ่งจะเห็นว่าทั้งภาระบรรทุกแอมโมเนียม และภาระบรรทุกไนไตรต์ สามารถเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าในเวลาเพียง 60 วัน และมีประสิทธิภาพสูง โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียมและไนไตรต์เฉลี่ยร้อยละ

ละ 95 และ 99.5 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Dapena-Mora et al., 2004) และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ไปตรวจวัดด้วยวิธีฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไฮบริโดเซชัน พบว่ามีในถังปฏิกริยามีเชื้อแบคทีเรีย *B. anammoxidans* สูงถึงร้อยละ 85.6 ± 7.6 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Anammox (Egli et al., 2001, Toh et al., 2002, Slikers et al., 2004, Gueven et al., 2004, Trio et al., 2006) หรือคิดเป็นภาระบรรทุกของไนโตรเจนทั้งหมดได้สูงสุดถึง 0.593 กก.ไนโตรเจน/ลบ.ม/วัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ (van Dongen et al., 2001) ที่เดินระบบด้วยถังปฏิกริยา ANAMMOX แบบถังซีแวนซิงค์แบทช์ รับน้ำเสียจากระบบการ SHARON ได้ค่าภาระบรรทุกแอมโมเนียมและภาระบรรทุกไนไตรต์ 0.35 กก.แอมโมเนียมไนโตรเจน/ลบ.ม/วัน และ 0.36 กก.ไนไตรต์ไนโตรเจน/ลบ.ม/วัน ตามลำดับ และการทดลองของ (Dapena-Mora et al., 2004) ได้ค่าภาระไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 2.0 และ 0.75 กก.ไนโตรเจน/ลบ.ม/วัน ในถังปฏิกริยาแบบอากาศยกตัวและซีแวนซิงค์แบทช์ ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางด้านกายภาพ ช่วงเริ่มต้นระบบ เป็นการนำเชื้อจุลินทรีย์มาจากถังปฏิกริยา NK-ASBR1 ที่มีอายุ 3 เดือน ตะกอนจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน แต่เมื่อค่าภาระไนโตรเจนทั้งหมดค่อยๆ เพิ่มสูงและอายุตะกอนนานขึ้น เชื้อจุลินทรีย์ก็ค่อยๆ เปลี่ยนเป็นชมพูแดงอ่อน จนถึงชมพูแดงเข้มเมื่ออายุตะกอนเท่ากับ 9 เดือน และสามารถรับภาระบรรทุกของไนโตรเจนทั้งหมดได้เท่ากับ 0.593 กก.ไนโตรเจน/ลบ.ม/วัน และเป็นระยะที่ในถังปฏิกริยามีเชื้อจุลินทรีย์ Anammox สูงถึงร้อยละ 85 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Jetten et al., 1999 และ Egli et al., 2001)

3. ศึกษาอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ที่เหมาะสม

นำเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกริยาซีแวนซิงค์แบทช์เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม ที่มีอายุ 3 เดือน ถูกเลี้ยงที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 42 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และไนไตรต์ 54.6 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และอยู่ในสภาวะคงตัว มาทดสอบแบบแบทช์ในขวดซีรัม ผลการทดลองแสดงในตารางภาคผนวกที่ จ ภาพที่ 10 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ในน้ำออก กับ ค่า อัตราการกำจัดแอมโมเนียม และอัตราการกำจัดไนไตรต์ เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ นำเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกริยาที่มีอายุ 3 เดือน



ภาพที่ 10 ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ กับค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียมและปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ในน้ำออก

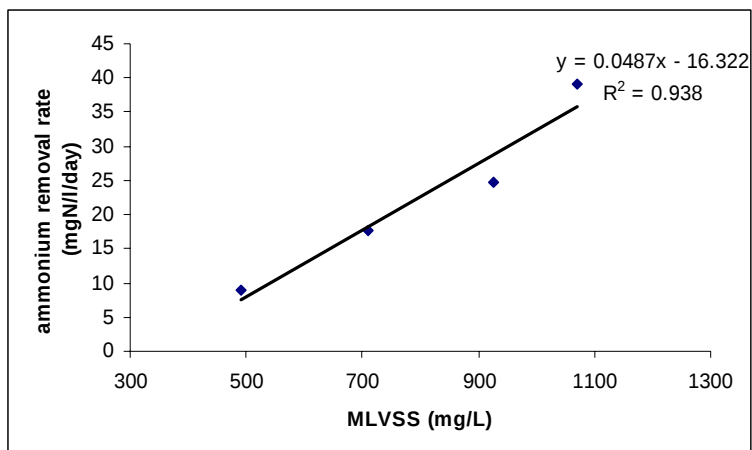
จากภาพที่ 10 จะเห็นว่าเมื่อเปลี่ยนแปลงค่าอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ เป็น 1:0.67, 1:1.39, 1:2.24 และ 1:2.97 ทำให้ปริมาณความเข้มข้นแอมโมเนียมในน้ำออกแตกต่างกัน ดังนี้ 17.13, 2.94, 5.02 และ 16.10 มก.ไนโตรเจน/ลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นไนไตรต์ในน้ำออกเท่ากับ 0, 0, 30.13 และ 73.58 มก.ไนโตรเจน/ลิตร ตามลำดับ กล่าวคือ เมื่ออัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:0.67 และ 1:1.39 ความเข้มข้นไนไตรต์ในน้ำออกถูกกำจัดหมด ส่วนความเข้มข้นแอมโมเนียมค่อยๆ ลดลงตามค่าอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ ที่สูงขึ้น และมีปริมาณน้อยที่สุดที่อัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:1.39 แต่เมื่อค่าอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เป็น 1:2.24 และ 1:2.97 ทั้งความเข้มข้นแอมโมเนียมและไนไตรต์ในน้ำออกกลับมีค่าสูงขึ้น แสดงว่าปริมาณไนไตรต์ที่เพิ่มขึ้นไม่ได้ช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์กำจัดแอมโมเนียมให้หมดไป แต่กลับไปยับยั้งการกำจัดแอมโมเนียมของเชื้อจุลินทรีย์

เมื่อพิจารณาค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียม พบว่าที่ค่าอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:0.67, 1:1.39, 1:2.24 และ 1:2.98 มีค่าเท่ากับ 0.2866, 0.579, 0.5647 และ 0.3371 มก.ไนโตรเจน/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่ออัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เพิ่มสูงขึ้น ค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียม จะเพิ่มสูงตามขึ้นไปด้วย โดยที่อัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:1.39 มีสูงที่สุด แต่เมื่อค่าอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เพิ่มสูงเกินกว่า 1:1.39 กลับทำให้ค่า อัตราการกำจัดแอมโมเนียมลดลง สาเหตุเนื่องจากในปฏิกิริยา ANAMMOX

แอมโมเนียมจะเป็นสารให้อิเลคตรอน ขณะที่ไนไตรต์เป็นสารรับอิเลคตรอน ดังนั้นเมื่ออัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:0.67 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่มีแอมโมเนียมอยู่ 1 ส่วนและไนไตรต์ 0.67 ส่วน พบว่าไนไตรต์ถูกใช้หมดไปโดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยกว่า 22 ชั่วโมง ทำให้ไม่มีสารรับอิเลคตรอน ปฏิกิริยาจึงหยุด ยังคงเหลือปริมาณแอมโมเนียมอยู่มากในระบบ ขณะที่อัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:1.39 ที่เวลาเก็บกัก 46 ชั่วโมง แอมโมเนียมลดลงไปร้อยละ 90 และไนไตรต์ลดลงอย่างสมบูรณ์ ส่วนที่อัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:2.24 และ 1:2.97 ไนไตรต์ซึ่งเป็นสารรับอิเลคตรอนมีปริมาณที่มากเกินไป ทำให้อัตราการกำจัดแอมโมเนียมลดลง แสดงว่าปริมาณความเข้มข้นไนไตรต์ที่มากเกินไปจะยับยั้งปฏิกิริยา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (Strous et al., 1999, Jetten et al., 1999, Egli et al., 2001) ดังนั้นอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:1.39 จึงเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด ทำให้ทั้งปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ถูกกำจัดหมด และมีค่า อัตราการกำจัดแอมโมเนียมสูงสุด ซึ่งอัตราส่วนที่ได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ (van Dongen et al., 2001) ซึ่งได้เสนอสมการของปฏิกิริยา ANAMMOX โดยวิธีคำนวณได้อัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ที่เหมาะสมเท่ากับ 1:1.32

4. การทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณจุลินทรีย์ และอัตราการกำจัดแอมโมเนียม

นำเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกิริยาซีควนซิงค์แบบซีลิ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม ที่มีอายุ 3 เดือน ถูกเลี้ยงที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 42 มก./ไนโตรเจน/ลิตร และไนไตรต์ 54.6 มก./ไนโตรเจน/ลิตร และอยู่ในสภาวะคงตัว มาทดสอบแบบเบตซ์ในขวดซีรัม ผลการทดลองแสดงในตารางภาคผนวกที่ ๑ และภาพที่ 11 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอมโมเนียเอสกับอัตราการกำจัดแอมโมเนียม



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง อัตราการกำจัดแอมโมเนียม กับเอ็มแอลวีเอสเอส

จะเห็นว่า อัตราการกำจัดแอมโมเนียม มีค่าเพิ่มสูงขึ้นแปรผันตรงกับการปริมาณเอ็มแอลวีเอสเอส โดยทดลองเปลี่ยนแปลงปริมาณเอ็มแอลวีเอสเอส 4 ค่าดังนี้ 490, 710, 925 และ 1070 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ค่า อัตราการกำจัดแอมโมเนียมเท่ากับ 8.99, 17.65, 24.67 และ 39.16 มก.ไนโตรเจน/ลิตร/วัน ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะเท่ากับ 0.0487 กรัมไนโตรเจน/กรัมวีเอสเอส/วัน เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kuai and Verstrate, 1998 ทดลองกระบวนการ OLAND ในถังปฏิกรณ์แบบซีเควนเชียลแบทช์ ได้อัตราการกำจัดแอมโมเนียมเท่ากับ 49 มก.ไนโตรเจน/ลิตร/วัน และอัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะเท่ากับ 0.016 กรัมไนโตรเจน/กรัมวีเอสเอส/วัน จะเห็นว่ากระบวนการ ANAMMOX ในถังปฏิกรณ์ NK-ASBR1 มีค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะสูงกว่ากระบวนการ OLAND ถึง 4 เท่า

5. การตรวจวัดจุลินทรีย์ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

5.1 เชื้อจุลินทรีย์จากถังรีเทิร์นสลัดจ์ของโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม

นำเชื้อจุลินทรีย์จากถังรีเทิร์นสลัดจ์ของโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม มาทำการระบุชนิดของจุลินทรีย์ในเชิงคุณภาพด้วยวิธีฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไฮบริไดเซชัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การตรวจวัดจุลินทรีย์เชิงคุณภาพด้วยวิธีฟลูออเรสเซนต์อินซิดูไฮบริโดเซชันของตัวอย่างตะกอนจากถังรีเทิร์นสลัดจ์จากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม

โพรบ	ผลการตรวจวัดเชื้อจุลินทรีย์
GAM42a	+++ / ++++++++
BET42a	++ / ++++++++
ALF1b	++ / ++++++++
Nso1225	+ / ++++++++
Nso190	+ / ++++++++
NEU	+ / ++++++++
NIT3	0
Ntspa714	0

หมายเหตุ

- เปรียบเทียบสัดส่วนโดยประมาณให้สเกลเต็ม 10 จำนวนบวกด้านซ้ายเป็นของโพรบกลุ่มเฉพาะ ส่วน

ด้านขวาเป็นของ โพรบ EUBmixed

- 0 = ตรวจไม่พบ

ลักษณะทางด้านกายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ตะกอนจากถังรีเทิร์นสลัดจ์จากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม มีลักษณะเป็นตะกอนสีดำ ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับงานด้านการกำจัดไนโตรเจน พบเชื้อในกลุ่ม *Gamma proteobacteria* เมื่อตรวจด้วยโพรบ GAM42a ในปริมาณที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 30 ในขณะที่เชื้อที่อยู่ในกลุ่ม *Alpha proteobacteria* ตรวจด้วยโพรบ ALF1b และ *Betaproteobacteria* ที่ตรวจด้วยโพรบ BET42a พบว่ามีปริมาณเท่ากันคือ ร้อยละ 20

การตรวจด้วยโพรบกลุ่มแบคทีเรียในทริฟายอิง ในกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดเซอร์ เมื่อตรวจด้วยโพรบ Nso1225, Nso190 และ NEU มีปริมาณที่เท่ากันคือร้อยละ 10 แต่ตรวจไม่พบแบคทีเรียในกลุ่มไนไตรคออกซิไดเซอร์ ทั้งเชื้อ *Nitrobacter* spp. เมื่อตรวจด้วยโพรบ NIT3 และเชื้อ *Nitrospira* spp. เมื่อตรวจด้วยโพรบ Ntspa714

5.2 เชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกริยาซีแวนซิงค์แบทช์ เลี้ยงเชื้อที่นำมาจากโรงควบคุมคุณภาพ น้ำหนองแขม โดยจุลินทรีย์ได้ผ่านการปรับตัวให้สามารถอยู่ในสภาวะแอนแอโรบิกมานาน 3 เดือน (NK-1) และเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ผ่านการปรับตัวให้สามารถอยู่ในสภาวะแอนแอโรบิกมานาน 9 เดือน (NK-2)

นำเชื้อจุลินทรีย์ NK-1 และ NK-2 มาตรวจวัดชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี ฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไรเคชัน เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ได้ผลการทดลอง แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณร้อยละด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของกลุ่มแบคทีเรียย่อยเมื่อเทียบกับ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด โดยใช้โพรบ EUBmixed

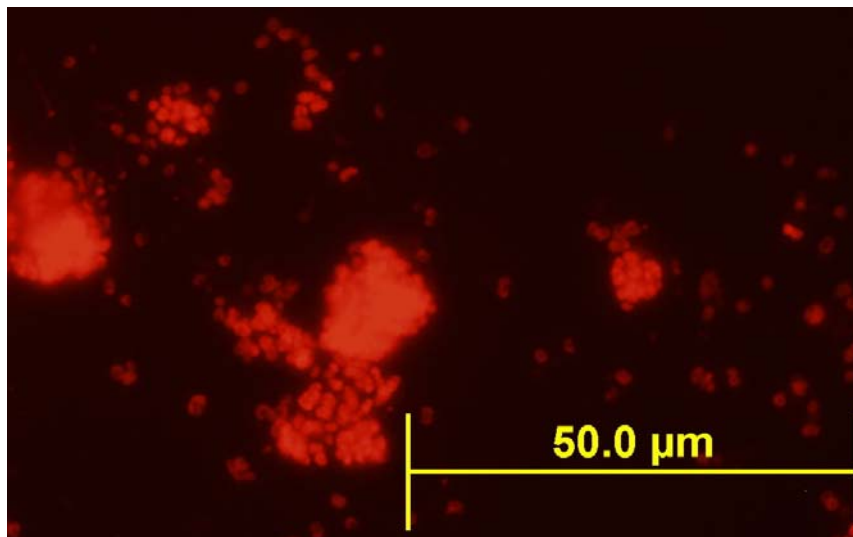
โพรบ	ปริมาณของแบคทีเรียชนิดต่างๆ		หมายเหตุ
	NK-1	NK-2	
ALF1b	16.2 ± 8.2	1.4 ± 1.1	
BET42a	44.5 ± 6.9	1.9 ± 1.1	
GAM42a	7.1 ± 6.8	4.4 ± 2.8	
Nso1225	20.1 ± 4.1	0	ตัวแทนแบคทีเรียกลุ่ม AOB
Nso190	-	0	ตัวแทนแบคทีเรียกลุ่ม AOB
NEU	-	0	ตัวแทนแบคทีเรียกลุ่ม AOB
NIT3	0	0	ตัวแทนแบคทีเรียกลุ่ม NOB
Ntspa714	18.2 ± 4.4	0	ตัวแทนแบคทีเรียกลุ่ม NOB
Amx820	-	85.6 ± 7.6	<i>B.anammoxidans</i> and <i>K.stuttgartiensis</i>

หมายเหตุ เครื่องหมาย - หมายถึงไม่ได้ทำการตรวจวัด

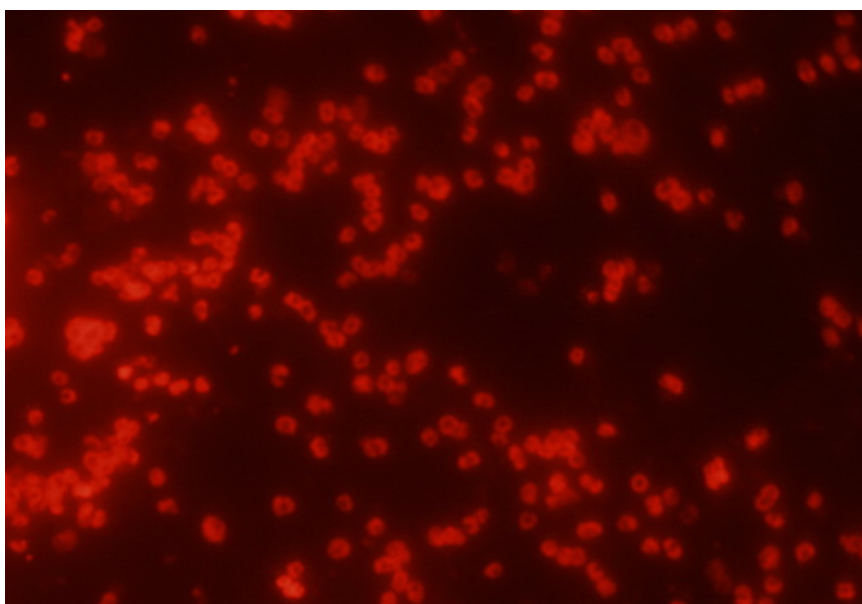
0 หมายถึงตรวจไม่พบ

นำเชื้อจุลินทรีย์ NK-1 มาทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับงานด้านการกำจัดไนโตรเจน พบว่ามีกลุ่มแบคทีเรียที่สำคัญในไฟลัม Proteobacteria คือ *Beta proteobacteria* (โพรบ BET42a) เป็นกลุ่มเด่น รองลงมาคือเป็น *Alpha proteobacteria* (โพรบ ALF1b) และ *Gamma proteobacteria* (โพรบ GAM42a) คือมีร้อยละ 44.5±6.9, 16.2±8.2 และ 7.1±6.8 ตามลำดับ ส่วนการตรวจสอบแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชัน พบแบคทีเรียในกลุ่ม แอมโมเนียมออกไซด์ไฮดรอกไซด์ ซึ่งใช้โพรบ Nso1225 เป็นตัวแทน มีอยู่ร้อยละ 20.1 และตรวจสอบแบคทีเรียในกลุ่มไนไตรต์ออกไซด์ไฮดรอกไซด์ คือ *Nitrobacter* spp. และ *Nitrospira* spp. ด้วยโพรบ NIT3 และโพรบ Ntspa714 ปรากฏว่าไม่พบ *Nitrobacter* spp. แต่พบแบคทีเรีย *Nitrospira* อยู่ในปริมาณร้อยละ 18.2±4.4

ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ NK-2 ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับงานด้านการกำจัดไนโตรเจน การนับจำนวนแบคทีเรียจากภาพพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Gamma proteobacteria* (โพรบ GAM42a) กลุ่ม *Beta proteobacteria* (โพรบ BET42a) และกลุ่ม *Alpha proteobacteria* (โพรบ ALF1b) มีเพียงร้อยละ 4.4±2.8, 1.9±1.1 และ 1.4±1.1 ตามลำดับ แต่ไม่พบแบคทีเรียในกลุ่มและแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกไซด์ไฮดรอกไซด์ แต่เมื่อตรวจด้วยโพรบ Amx820 พบแบคทีเรีย *B. anammoxidans* and *K. stuttgartiensis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Anammox สูงถึงร้อยละ 85.65±7.64 แสดงดังภาพที่ 12 และ 13 เมื่อขยายภาพจะเห็นเป็นรูปร่างคล้ายวงแหวน มีการจับเป็นคลัสเตอร์อย่างหนาแน่นทำให้การนับจำนวนแบคทีเรียกลุ่มนี้ค่อนข้างยากและทำให้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Egli et al., 2001) ที่ทำการเริ่มต้นระบบแบคทีเรีย Anammox จากฟิล์มจุลินทรีย์พวกไนตริฟายอิง พบว่ามีจำนวนสูงถึงร้อยละ 88 และเซลล์มีลักษณะคล้ายโดนัทจับตัวกันเป็นคลัสเตอร์อย่างหนาแน่น และการวิจัยของ (Jetten et al., 2001) ทำการทดลองนำเชื้อ *B. anammoxidans* มาเริ่มต้นในระบบงานหมุนชีวภาพ ที่จำกัดปริมาณออกซิเจนให้ต่ำกว่า 0.32 มิลลิลิตร/ลิตร เมื่อเลี้ยงไปนาน 5 เดือน นำมาตรวจวัดองค์ประกอบของเชื้อจุลินทรีย์พบว่า มีเช่น *B. anammoxidans* เป็นกลุ่มเด่นถึงร้อยละ 70 และพบแบคทีเรีย *N. eutropha* แต่ไม่พบเชื้อในกลุ่มไนไตรต์ออกไซด์ไฮดรอกไซด์ เช่น *Nitrobacter winogradskii* หรือ *Nitrospira moscoviensis* เลย



ภาพที่ 12 เซลล์ *B.anammoxidans* and *K.stuttgartiensis* ที่ติดโพรบ Amx820 จับกันเป็นคลัสเตอร์



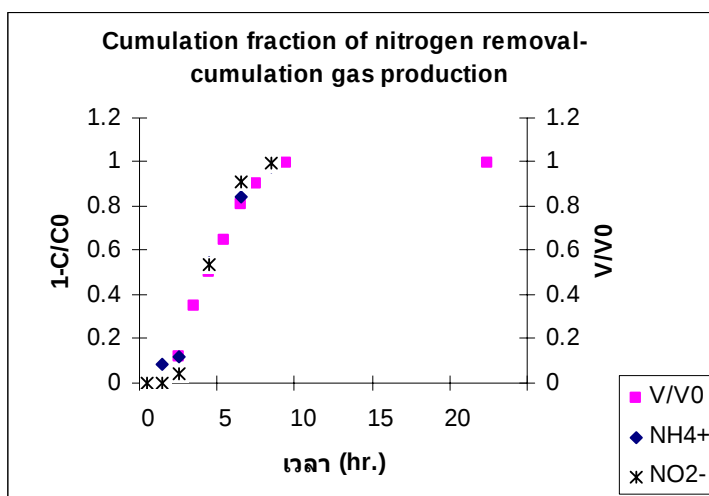
ภาพที่ 13 เซลล์ของแบคทีเรีย *B.anammoxidans* and *K.stuttgartiensis* รูปวงแหวนที่ติด

โพรบAmx820

6. การทดลองแบบเบทช์เพื่อหาค่าไคเนติกส์ของเชื้อแบคทีเรีย Anammox ที่มีอยู่ในถังปฏิกรณ์ ร้อยละ 85 ± 7.6

6.1 วัดอัตราการเกิดปริมาตรก๊าซของถังปฏิกรณ์ เปรียบเทียบกับอัตราการกำจัด แอมโมเนียม และอัตราการกำจัดไนไตรต์

ทำการบันทึกปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มเติมน้ำเสียเข้าระบบ และตรวจวัดปริมาณ แอมโมเนียมและไนไตรต์ในน้ำออกตามเวลา ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 14 และตาราง ภาคผนวกที่ ฅ2



ภาพที่ 14 สัดส่วนการเกิดก๊าซสะสม อัตราการกำจัดแอมโมเนียมและ อัตราการกำจัดไนไตรต์

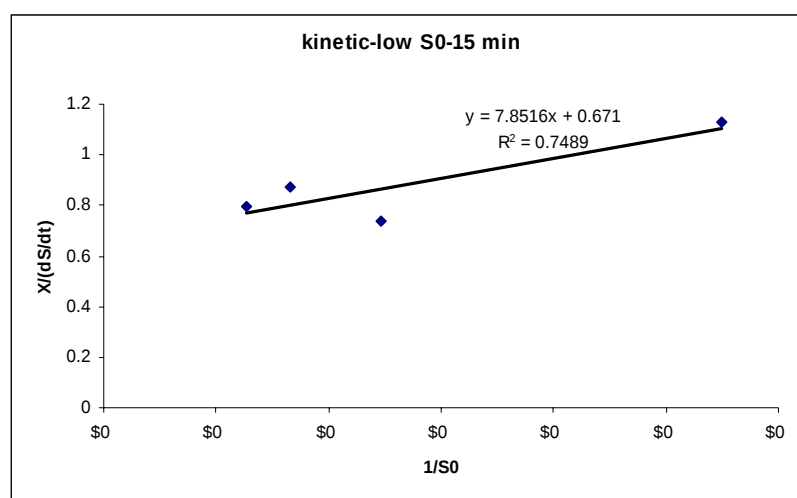
จากภาพที่ 14 จะเห็นไม่มีก๊าซเกิดขึ้นในช่วง 2 ชั่วโมงแรก และในขณะเดียวกันระบบก็ไม่สามารถกำจัดปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ได้ หลังจาก 2 ชั่วโมงผ่านไป ระบบจึงสามารถผลิตก๊าซและกำจัดปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ได้ด้วยอัตราเร็วเดียวกัน จนกระทั่งในชั่วโมงที่ 8 ไม่มีปริมาณก๊าซเกิดขึ้นและระบบสามารถกำจัดแอมโมเนียมและไนไตรต์หมดไป

อัตราการกำจัดแอมโมเนียมและ อัตราการกำจัดไนไตรต์ มีความสัมพันธ์แปรผันตาม ปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น ดังนั้นการสังเกตปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น สามารถนำมาใช้เป็นพารามิเตอร์ใน

การดูแลระบบ แทนการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมหรือไนไตรต์ทางเคมี ซึ่งผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการวิจัยของ (Mulder et al., 1995) พบว่าก๊าซที่เกิดขึ้นแปรผันตามอัตราการใช้ แอมโมเนียม และสามารถนำไปใช้เป็นตัวแปรในการควบคุมดูแลระบบโดยไม่ต้องตรวจวัดหา ปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ด้วยวิธีทางเคมี

6.2 การทดลองเพื่อศึกษาจลนศาสตร์ของเชื้อจุลินทรีย์ Anammox

นำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์มาจากถังปฏิกรณ์ NK-ASBR2 มาทดลองในขวดเบทช์แบบขวด ชมพู วัดค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียม (dS_0/dt) แล้วนำมาพล็อตกราฟระหว่าง $X/(dS_0/dt)$ กับ S_0 ความสัมพันธ์แสดงดังภาพที่ 15 และตารางผลการทดลองในภาคผนวกที่ ข1



ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่าง $X / (dS_0/dt)$ กับ $1/S_0$

ใช้เทคนิคอัตราเริ่มต้น (0-15 นาที) และความสัมพันธ์ของ Monod model ในการพล็อต กราฟโดยนำข้อมูลที่มีค่าแอมโมเนียมตั้งต้นต่ำๆ (S_0) คือ 18.2, 40.6, 60.2 และ 78.4 มก.ไนโตรเจน/ ลิตร มาใช้ มีปริมาณไนไตรต์อยู่ในช่วง 31.98 ถึง 117.92 มก.ไนโตรเจน/ลิตร เนื่องจากปริมาณของ ไนไตรต์ที่เกิน 100 มก.ไนโตรเจน/ลิตร ทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยา จากภาพที่ 15 ได้ความชันของ กราฟเท่ากับ 7.8516 และจุดตัดแกน Y เท่ากับ 0.671 ซึ่งจากการคำนวณจะสามารถหาค่า K_s ได้ เท่ากับ 11.706 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และค่า μ_{max} เท่ากับ 0.0038 9 ต่อชั่วโมง ทำให้ได้ค่าจุลินทรีย์ เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเท่ากับ 7.60 วัน ซึ่งงานวิจัยของ Strous et al., 1999 ได้เสนอค่า K_s ไว้เท่ากับ 0.1

มก.ไนโตรเจน/ลิตร ในงานวิจัยของอื่นๆ ได้เสนอค่า $\mu_{\max}$ ไว้หลายค่า 0.0012 ต่อชั่วโมง (Hao et al., 2002), 0.0027 ต่อชั่วโมง (van Dongen et al., 2001) และ 0.016 ต่อชั่วโมง (Isaka et al., 2006) รายละเอียดการคำนวณแสดงในภาคผนวกที่ 2 และการคำนวณค่า Y_g แสดงในภาคผนวกที่ 3

6.3 เปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกริยาซีแวนซิงค์แบทช์ เลี้ยงเชื้อที่นำมาจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม โดยจุลินทรีย์ได้ผ่านการปรับตัวให้สามารถอยู่ในสภาวะแอนแอโรบิกมานาน 3 เดือน (NK-ASBR1) กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ผ่านการปรับตัวให้สามารถอยู่ในสภาวะแอนแอโรบิกมานาน 9 เดือน (NK-ASBR2)

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์อายุ 5 เดือน กับอายุ 9 เดือน

พารามิเตอร์	NK-ASBR1	NK-ASBR2
อัตราการกำจัดแอมโมเนียม จำเพาะ (กรัมไนโตรเจน/กรัม วีเอสเอส/วัน)	0.031 (ที่ $\text{NH}_4^+ = 37.66$ มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	0.29 (ที่ $\text{NH}_4^+ = 43.4$ มก. ไนโตรเจน/ลิตร)
อัตราการกำจัดไนไตรต์ จำเพาะ (กรัมไนโตรเจน/กรัม วีเอสเอส/วัน)	0.054 (ที่ $\text{NO}_2^- = 61.28$ มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	0.36 (ที่ $\text{NO}_2^- = 73.28$ มก. ไนโตรเจน/ลิตร)
อัตราส่วนของอัตราการกำจัด แอมโมเนียมจำเพาะต่ออัตรา การกำจัดไนไตรต์จำเพาะ	1:1.72	1.416 (ค่าเฉลี่ย)
ชนิดจุลินทรีย์	<i>Nitrosomonas</i> ร้อยละ 20.1±4.1 <i>Nitrospira</i> ร้อยละ 18.2±4.4	<i>B.anammoxidans</i> ร้อยละ 85.6±7.6

จากตารางที่ 12 การเปรียบเทียบอัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะ ของเชื้อจุลินทรีย์ NK-ASBR1 ที่มีอายุ 3 เดือน กับเชื้อจุลินทรีย์ NK-ASBR2 ที่มีอายุ 9 เดือน พบว่าค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะของ NK-ASBR2 สูงกว่า NK-ASBR1 ประมาณ 10 เท่า แต่เป็นค่าที่ต่ำกว่างานวิจัยของ Jetten et al., 1999 ที่ได้เปรียบเทียบค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะของกระบวนการ ANAMMOX กับระบบมีเชื้อ *Nitrosomonas eutropha* ทำหน้าที่ออกซิเดชันแอมโมเนียมในสภาพไร้อากาศ พบว่ากระบวนการ ANAMMOX มีค่าสูงกว่า *Nitrosomonas*

eutropha ถึง 25 เท่า แสดงว่าในถัง NK-ASBR1 นอกจากจะมี *Nitrosomonas* และ *Nitrospira* อาจจะมีเชื้อจุลินทรีย์ Anammox อยู่ด้วย แต่ในการทดลองในช่วงนี้ไม่ได้ทำการตรวจวัด

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์แอนแอโรบิกแอมโมเนียมออกซิเดชัน (Anammox) จากแหล่งที่มาต่างกัน

การเดินระบบถังปฏิกริยาแบบซีเวนซิงค์แบทช์ขนาด 5 ลิตร ในสภาวะไร้อากาศ เพื่อเริ่มต้นระบบ นำเชื้อจุลินทรีย์จากโรงงานวันเส้น โรงควบคุมคุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์ และโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม พบว่าใช้เวลาในการเดินระบบมากกว่า 3 สัปดาห์จึงสามารถลดแอมโมเนียมได้ร้อยละ 50 หลังจากเดินระบบต่อเนื่องนาน 3 เดือน ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 42 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และไนไตรต์ 54.6 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และอยู่ในสภาวะคงตัว นำมาเปรียบเทียบกับอัตราการกำจัดแอมโมเนียม และอัตราการกำจัดไนไตรต์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกริยาที่มีเชื้อจุลินทรีย์จากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขมมีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้ในการเริ่มต้นระบบ ANAMMOX โดยมีค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียม และอัตราการกำจัดไนไตรต์เท่ากับ 0.83 และ 1.42 มก.ไนโตรเจน/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ อัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะ และอัตราการกำจัดไนไตรต์จำเพาะเท่ากับ 0.031 และ 0.054 กรัมไนโตรเจน/กรัมวีเอสเอส/วัน ตามลำดับ และประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียม และไนไตรต์เท่ากับร้อยละ 94.42 และ 100 ตามลำดับ

อัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์ Anammox ในถังปฏิกริยาที่มีเชื้อจุลินทรีย์จากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม คือ 1:1.39 หากอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนไตรต์สูงกว่านี้ ไนไตรต์ส่วนเกินจะไปยับยั้งปฏิกริยา ค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียมแปรผันตามปริมาณเอ็มแอลวีเอสเอสมีค่าเท่ากับ 8.99 ถึง 39.16 มก.ไนโตรเจน/ลิตร/วัน โดยมีค่าอัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะและอัตราการกำจัดไนไตรต์จำเพาะ เท่ากับ 0.049 และ 0.08 กรัมไนโตรเจน/กรัมวีเอสเอส/วัน ตามลำดับ

การทำให้เชื้อ Anammox มีจำนวนมากขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ในถังปฏิกริยาซีเวนซิงค์แบทช์

สามารถเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมและไนไตรต์ได้อย่างต่อเนื่องทุกวัฏจักร จากความเข้มข้นของแอมโมเนียม และไนไตรต์เท่ากับ 39.2 และ 52.86 มก.ไนโตรเจน/ลิตร ตามลำดับ

สามารถเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมและไนไตรต์ไปได้สูงสุดถึง 392 และ 588 มก. ไนโตรเจน/ลิตร ตามลำดับ โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียมและไนไตรต์เฉลี่ยร้อยละ 95 และ 99.5 ตามลำดับ คิดเป็นภาระบรรทุกแอมโมเนียมและไนไตรต์ที่ระบบสามารถรับได้เท่ากับ 0.24 และ 0.353 กก.ไนโตรเจน/ลบ.ม/วัน เห็นได้ว่าสามารถเพิ่มภาระบรรทุกขึ้นเป็น 10 เท่า ในถึงปฏิกิริยานี้มีค่าจลนศาสตร์ของเชื้อจุลินทรีย์ Anammox ดังนี้ค่า K_s เท่ากับ 11.706 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และค่า μ_{max} เท่ากับ 0.0038 ชั่วโมง⁻¹ ค่าจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่ากับ 7.60 วัน

การตรวจวัดจุลินทรีย์ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

เชื้อจุลินทรีย์จากรีเทิร์นสลัดจ์ของโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม มีเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Gamma proteobacteria* มากที่สุดถึงร้อยละ 30 และพบแบคทีเรียกลุ่ม *Alpha proteobacteria* และ *Beta proteobacteria* จำนวนเท่ากันคือร้อยละ 20 และพบแบคทีเรียในกลุ่มแอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ร้อยละ 10 แต่ไม่พบแบคทีเรียในกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดเซอร์ และ *Nitrospira*

เชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกิริยาซีควนซ์แบทช์ เลียงเชื้อที่นำมาจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขมโดยจุลินทรีย์ได้ผ่านการปรับตัวให้สามารถอยู่ในสภาวะแอนแอโรบิกมานาน 3 เดือน ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในถัง *Beta proteobacteria* ซึ่งเป็นชั้น (class) ที่จุลินทรีย์ *Nitrosomonas* จัดอยู่มากที่สุดถึงร้อยละ 44.5±6.9 รองลงมาคือ แบคทีเรียกลุ่ม *Alpha proteobacteria* เป็นชั้น (class) ที่จุลินทรีย์ *nitrobacter* จัดอยู่ร้อยละ 16.2±8.2 และ *Gamma proteobacteria* พบร้อยละ 7.1±6.8 นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในกลุ่มแอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ถึงร้อยละ 20.1±4.1 และ *Nitrospira* spp. ร้อยละ 18.2±4.4 แต่ไม่พบแบคทีเรีย *Nitrobacter* spp.

เชื้อจุลินทรีย์จากถังปฏิกิริยาซีควนซ์แบทช์ขนาด 1.5 ลิตร เลียงเชื้อที่นำมาจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม โดยจุลินทรีย์ได้ผ่านการปรับตัวให้สามารถอยู่ในสภาวะแอนแอโรบิกมานาน 9 เดือน ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่ม *Gamma proteobacteria* (โพรบ GAM42a) กลุ่ม *Beta proteobacteria* (โพรบ BET42a) และกลุ่ม *Alpha proteobacteria* (โพรบ ALF1b) ร้อยละ 4.4±2.8, 1.9±1.1 และ 1.4±1.1 ตามลำดับ ไม่พบแบคทีเรียไนไตรต์ฟายอิงที่อยู่ในกลุ่มแอมโมเนียมออกซิไดเซอร์ และแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดเซอร์ แต่พบแบคทีเรีย *Candidatus Brocadia anammoxidans* และ *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Anammox สูงถึงร้อยละ 85.65±7.64

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองนี้ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ในการเริ่มต้นระบบจนได้เชื้อจุลินทรีย์ Anammox จึงควรนำไปใช้ทดลองกับน้ำเสียจริง เพื่อให้สามารถนำไปใช้ออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียจริง
2. นำเชื้อจุลินทรีย์ Anammox ไปใช้ทดลองในถังปฏิกรณ์แบบอื่นๆ เพื่อศึกษาเกี่ยวกับการบรรทุกไนโตรเจน และความเหมาะสมของถังปฏิกรณ์ที่จะนำไปใช้ออกแบบ
3. ใช้วิธีเทคนิคใหม่ในการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ธงชัย พรธนะสวัสดิ์. 2544. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.
- ศิริพร คุณาวิชา. 2539. การศึกษาการกำจัดไนเตรทจากระบบบำบัดน้ำเสียของ โรงงานปูนเส้น โดยวิธีออกซิเจน-แอนแอโรบิกที่มีตัวกลาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พงศ์ศักดิ์ หนูพันธ์ กุลยา สาริชีวิน พิพัฒน์ ฐริปัญญาคูณ เฉลิมราช วันทวิน และจุงโกะ มูนา กาด้า มา. 2551. ประสิทธิภาพการลดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในระบบบำบัดรวมของ น้ำเสียในกรุงเทพ. การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 7 สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
- Amann, R.I. 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In Akkerman, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (Eds.), **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Netherlands.
- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 1919-1925.
- APHA, AWWA and WEF. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed., American Public Health Association, Washington, D.C., USA.
- Bock, E. 1976. Growth of Nitrobacter in the presence of organic matter.II. Chemoorganic growth of Nitrobacter agilis. **Arch. Microbiol.** 108 : 305-312.
- Both, G.J. Gerards, S. and Laanbroek, H.J. 1992. Kinetics of nitrite oxidation in two nitrobacter species grown in nitrite limited chemostats. **Arch. Microbiol.** 157, 436-441.

- Dapena-Mora, A. Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Jetten, M.S.M. and Mendez, R. 2004. Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR. **J. Biotechnol.** 110: 159-170.
- Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., Van der Meer, J.R. and Zehnder, A.J.B. 2001. Enrichment and characterization of anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. **Arch. Microbiol.** 175: 198-207.
- Fux, C., Bohler, M., Huber, P. Brunner, I. and Siegrist, H. 2002. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. **J. Biotechnol.** 99: 295-306.
- Guyen, D., van der Pas, S., Schmid, M.C., Strous, M. Jetten, M.S.M., Sozen, S., Orhon, D. And Schmidt, I. 2004. Implementation of the anammox process for improved nitrogen removal. **J. Environ. Sci. Health.** 39(7): 1729-1738.
- Isaka, K., Date, Y., Sumino, T., Yoshie, S. and Tsuneda, S. 2005. Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor. **Appl. Microbiol. Biotech.**
- Jetten, M.S.M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., van Dongen, U.G.J.M., van de Graaf, A.A., Logemann, S., Mkuyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M. and Kuenen, J.G. 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. **FEMS Microbiol.** 22(5): 421-437.
- Jetten, M.S.M., Wagner, M., Fuerst, J., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, G.J. and Strous, M. 2001. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process. **Current opinion in biotechnol.** 12: 283-288.
- Kuai, L. and Verstraete, W. 1998. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic system. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4500-4506.

- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Ernst, H.M.J., Schleifer, K.-H., and Wagner, M. 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 5064-5081.
- Manz, W., Amann, R. I., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. **Syst. Appl. Microbiol.** 15: 593-600.
- Metcalf & Eddy, INC. Wastewater Engineering Treatment, Disposal, and reuse. 3rd ed. 1991.
- Metcalf & Eddy, INC. Wastewater Engineering Treatment, Disposal, and reuse. 4th ed. 2003.
- Michael T. Madigan and John M. Martinko. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Pearson Education, Inc., United States of America.
- Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain V., Rittmann, B.E. and Stahl, D.A. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 2156-2162.
- Mulder A., van de Graaf A.A., Robertson L.A., Kuenen J.G. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiol. Ecol.** 16: 177-184.
- Poth, M. and Focht, D.D. 1985. ¹⁵N kinetic analysis of N₂O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 1134-1141.
- Pynaert, K., Smets, B.F., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S.D. and Verstrete, W. 2003. Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a high loaded lab-

- scale rotating biological contactor. **Appl. Environ. Microbiol.** 69:3626-3635.
- Pynaert, K., Smets, B.F., Beheydt, D., Verstraet, W. 2004. Start-up of autotrophic nitrogen removing reactors via sequential biocatalyst addition. **Environ. Sci. Technol.** 38: 1228-1235.
- Rittmann, G.E., McCarty, P.L. 2001. Environmental biotechnology: Principles and applications. The McGraw-Hill companies, Inc., Singapore.
- Schalk, J., Oustad H., Kuenen J.G, and Jetten M.S.M. 1998. The anaerobic oxidation of hydrazine- a novel reaction in microbial nitrogen metabolism. **FEMS Microbiol. Lett.** 158: 61-67.
- Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, Metzger, M., Schleifer, K.H. and Wagner, M. 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. **Syst. Appl. Microbiol** 23: 93-106.
- Schmidt, I. and Bock, E. 1997. Anaerobic ammonium oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. **Arch. Microbiol.** 167: 106-111.
- Schmidt, I., Sliekers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten M.S.M. and Strous, M. 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. **FEMS Microbiol. Rev.** 27: 481-492.
- Sliekers, A.O., Haaijer, S.H., Schmid, M., Harhangi, H., Verwegen, K., Kuenen, G.J. and Jetten, M.S.M. 2004. Nitrification and anammox with urea as the Energy source. **Sys. Appl. Microbiol.** 27: 271-278.
- Sliekers, A. O., Derwort, N., Compos Gomez, J.L., Strous, M., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M.

2002. Complete autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. **Water res.** 36: 2475-2482.
- Sliekers, A.O., Third, K.A., Abma, W., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. 2003. CANON and anammox in a gas lift reactor. **FEMS. Microbiol. Letters.** 218: 339-344.
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. **Appl Microbiol. Biotechnol.** 50: 589-596.
- Strous, M., Kuenen, J. G., and Jetten, M.S.M. 1999. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 3248-3250.
- Strous, M., van Gerven, E., Kuenen, J. G., and Jetten, M.S.M. 1997. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 2446-2448.
- Sundermeyer, H. and Bock, E. 1981. Energy metabolism of autotrophically and heterotrophically grown cells of *nitrospira winogradskyi*. **Ach. Microbiol.** 130: 250-254.
- Third, K.A., Sliekers, A.O., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. 2001. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation. **Syst. Appl. Microbiol.** 24: 588-596.
- Toh, S.K., Webb, R.I. and Ashbolt, N.J. 2002. Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewater. **Microb. Ecol.** 43: 154-167.
- Trigo, C., Campos, J.L., Garrido, J.M. and Mendez, R. 2006. Start-up of the anammox process in a membrane bioreactor. **J. Biotechnol.** 126: 475-487.

- Tsushima, I., Kindaichi, T. and Okabe S. 2007. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. **Water res.** 41: 785-794.
- U.S. Environmental Protection Agency, Technology Transfer, October 1975. Process Design Manual for Nitrogen Control. 393 p.
- van de graaf, A.A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M.S.M, Roberston, L.A., Kuenen, J.G. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1246-1251
- van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Roberston L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G. 1996. Autotrophic growth anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. **Microbiol.** 142: 2187-2196.
- van Dongen, L.G.J.M., Jetten, M.S.M. and van Loosdrecht, M.C.M. The Combine Sharon/Anammox Process. First published 2001.
- van Dongen, U., Jetten, M.S.M. and Van Loosdrecht, M.C.M. 2001. The SHARON-Anammox process for treatment ammonium rich wastewater. **Water Sci. Technol.** 44: 153-160.
- van der Star, W.R.L., Abma, W.R., Blommers, D., Mulder, J.W., Tokutomi, T., Strous, M., Picioreanu, C. and van Loosdrecht, M.C.M. 2007. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. **Water Res.** Doi:10.1016/j.watres. 2007. 03. 044.
- Verstraete, W., Philips, S. 1998. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. **Environ. Pollut.** 102: 717-726.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.-P., Flood, J. and Amann, R. 1996. In Situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. **Water Sci. Technol.** 34: 237-244.

- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.-P. and Scheifer, K.-H. 1995. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. **Syst. Appl. Microbiol.** 18: 251-264.
- Windey, K., De Bo, I. and Verstraete, W. 2005. Oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification (OLAND) in a rotating biological contactor treating high-salinity wastewater. **Water Res.** 39: 4512-4520.
- Zart, D., and Bock, E. 1998. High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO_2 or NO . **Arch. Microbiol.** 169: 282-286.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไฮบริไดเซชัน
(ปรับปรุงจาก Amann, R. 1995)

การระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไฮบริดเซชัน

1. การตรึงตัวอย่าง

- 1) ดูดตัวอย่างที่บด 1 มิลลิกรัม ใส่ใน eppendor tube ขนาด 1.5 มิลลิกรัม
- 2) Spin down ตัวอย่างที่ 1,000-2,000 รอบต่อนาที 1-2 นาที
- 3) ดูดน้ำส่วนใสด้านบนออก จนเกือบหมด
- 4) เติมน้ำ Fixative ให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 1 มิลลิกรัม หรือเท่ากับส่วนที่ดูดออกจากข้อ 3 เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex นาน 1-2 นาที
- 5) นำไป incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2-24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับลักษณะของตะกอน (ตัวอย่างเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง)
- 6) นำตัวอย่างมา spin down 1,000-2,000 รอบต่อนาที นาน 1-2 นาที ดูดน้ำ Fixative ออกจนเกือบหมด (หรือเท่ากับปริมาณที่ใช้ในข้อ 4)
- 7) ล้างตัวอย่างโดยการเติมน้ำ 1xPBS (ใช้ปริมาตรเท่ากับที่ดูดออกจากข้อ 6) ทำการเขย่าผสมตัวอย่าง แล้วทำการ spin down ตัวอย่างดูดส่วนใสทิ้ง แล้วทำซ้ำอีกครั้ง
- 8) เติมน้ำ 1xPBS:Ethanol(absolute) ที่อัตราส่วน 1:1 โดยเติมน้ำผสมในปริมาณที่เท่ากับที่ดูดออกจากข้อ 7 ทำให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 1 มิลลิกรัม ซึ่งเท่ากับปริมาตรเริ่มต้นที่ดูดตัวอย่าง

2. การทำ Hybridization cell

- 1) ดูดตัวอย่างที่ทำการ Fix cell เรียบร้อยแล้ว 2-3 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ที่ได้ทำการเคลือบด้วย Poly-L-lysine
- 2) นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 นาที (จนแห้ง) จากนั้นนำสไลด์ มาทำการ dehydration โดยการแช่ใน ethanol ที่ความเข้มข้น 50, 80, 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ละครั้งให้แช่ทิ้งไว้นาน 3-5 นาที จากนั้นนำสไลด์ มาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- 3) ทำการเตรียมสาร hybrid solution (ต้องทราบปริมาณของเปอร์เซ็นต์ Formamide ที่ใช้ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตามชนิดโพรบ)
- 4) เตรียมโพรบที่จะใช้โดยอัตราส่วนของ โพรบ:hybrid solution = 1:9 โดยแต่ละจุดบนสไลด์ ใช้จุดละ 15 ไมโครลิตร โดยหยดสารผสมนี้ทับจุดตัวอย่าง

- 5) นำสไลด์มาใส่ในกล่องพลาสติกทึบแสงปิดฝา แล้วนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 1-1.5 ชั่วโมง
- 6) ทำการเตรียม washing solution ในหลอดพลาสติกมีฝาปิดขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที
- 7) นำสไลด์จากขั้นตอนที่ 5 ใส่ในหลอดพลาสติกที่บรรจุ washing solution (จากข้อ 6) ดังกล่าว เพื่อทำการ Washing พร้อมกับทำการปรับอุณหภูมิของ water bath เป็น 48 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ นาน 15-20 นาที หลังจากนั้นล้างซ้ำเช่นเดิมอีกครั้ง
- 8) ล้างด้วยน้ำสะอาด (DI) 2-3 ครั้ง แล้วใช้ลูกยางปล่อยให้น้ำออกจากตัวอย่าง
- 9) หยด DAPI เข้มข้น 300 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร (15 มิลลิลิตร) ให้ทั่วตัวอย่างบนสไลด์ ทิ้งไว้ 15-20 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำสะอาด (DI) 2-3 ครั้ง แล้วใช้ลูกยางเป่าให้น้ำออกจากตัวอย่าง
- 10) หยดสาร Slow fade (Anti fade) ให้ครอบคลุมเนื้อที่ที่หยดตัวอย่าง แล้วปิดทับด้วย cover slide
- 11) นำไปส่องกล้อง

3. การทำ Hybridization เม็ดตะกอนที่ผ่านการ section

- 1) นำสไลด์ที่มีตัวอย่างมาแช่ใน Xylene 10 นาที หรือจนกว่าสารที่เคลือบตัวอย่างจะละลายหมด
- 2) นำไปแช่ใน Ethanol (Lab grade) นาน 15 นาที
- 3) ทำเช่นเดียวกับการ Hybridization cell จากขั้นตอนที่ 3-11

4. การเตรียมสาร

4.1 สาร Fixative

- 1) ชั่ง paraformaldehyde 1 กรัม ละลายในน้ำ DI 16.5 มิลลิลิตร
- 2) ทำให้เย็นแล้วเติม 3xPBS buffer 8.25 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (เก็บไว้ได้นาน 1 เดือน)
- 3) ปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 7.2 ด้วย 10 โมลของ NaOH อาจให้ความร้อนช่วยที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส

4.2 เตรียม 3xPBS (เตรียม 500 มิลลิลิตร)

- 1) ต้องการเตรียม NaCl 390 มิลลิโมล (เตรียมจาก NaCl 3 โมล โดยใช้ปริมาตร 65 มิลลิลิตร)
 - 2) ต้องการเตรียม NaPO₄ buffer 30 มิลลิโมล (เตรียมจาก NaPO₄ 0.5 โมล โดยใช้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร)
 - 3) ปรับปริมาตรจนได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ
- ** NaPO₄ buffer 0.5 โมล ได้จากการผสม NaPO₄ 0.5 โมล ปริมาตร 28 มิลลิลิตร + Na₂HPO₄ 0.5 โมล ปริมาตร 72 มิลลิลิตร

4.3 การเตรียม Hybrid solution (ต้องการเตรียม 1 มิลลิลิตร)

- 1) ต้องการ X% formamide (%FA) สมมติต้องการ 35 เปอร์เซ็นต์ formamide ดังนั้นต้องใช้ 350 ไมโครลิตร
- 2) ต้องการ NaCl 0.9 โมล เตรียมจาก NaCl 3 โมล จำนวน 300 ไมโครลิตร
- 3) ต้องการ SDS 0.01 % เตรียมจาก SDS 1 % จำนวน 10 ไมโครลิตร
- 4) ต้องการ Tris-HCl 20 ไมโครโมล จาก Tris-HCl 1 โมล จำนวน 20 ไมโครลิตร
- 5) ที่เหลือเติมน้ำ DI ที่ฆ่าเชื้อ

4.4 การเตรียม Tris-HCl 1 โมล จำนวน 200 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris-base [Tris(hydroxymethyl) aminomethane ; NH₂C(CH₂OH)₃] ปริมาณ 24.23 กรัม ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 โดยใช้ HCl conc. จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส, ความดัน 15 psi

4.5 การเตรียม Washing solution (ต้องการเตรียม 100 มิลลิลิตร)

- 1) คูเปอร์เซ็นต์ formamide ที่ให้ว่าต้องการใช้ X ไมโครโมล โดยเตรียมจาก NaCl 3 โมล
 - 2) ต้องการ Tris-HCl 20 ไมโครโมล เตรียมจาก Tris-HCl 1 โมล
 - 3) ต้องการ 0.01 เปอร์เซ็นต์ SDS เตรียมจาก 1 เปอร์เซ็นต์ SDS
 - 4) ที่เหลือเป็นน้ำ DI ที่ไม่ต้องฆ่าเชื้อ
- *** การคำนวณ ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

4.6 เตรียม DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)

ทำการเจือจาง DAPI จากขวด (stock) มาที่ความเข้มข้น 90 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส การเตรียม DAPI สำหรับใช้งาน ให้ใช้ 10 ไมโครลิตร ของ 90 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร ผสมกับ 300 ไมโครลิตร ของ 1xPBS เมื่อใช้เสร็จแล้วให้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานในครั้งต่อไป

5. การเตรียมแผ่นสไลด์

- 1) แช่สไลด์ใน acid alcohol 5 นาที
- 2) ทำการเคลือบด้วย poly-L-lysine (ใช้ความเข้มข้น 0.01% w/v) โดยจุ่มสไลด์ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

*** acid alcohol ใช้ 1% HCl (1 ml. conc HCl) ใน 70% Ethanol 99 ml.

ภาคผนวก ข

ลักษณะน้ำเสียสังเคราะห์

ปรับปรุงจาก (van Dongen et al., 2001 and Egli et al., 2001)

ตารางภาคผนวก ข1 องค์ประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์

สารเคมี	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)
KHCO_3	1.25
KH_2PO_4	0.025
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.00625
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Vary
NaNO_2	Vary
Micro-elements 1 ใช้ 2 มล.ต่อลิตร ¹	
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5
Micro-elements 2 ใช้ 1 มล.ต่อลิตร ¹	
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.99
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.43
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.24
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.22
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.19
Na_2SeO_3	

ภาคผนวก ค

ข้อมูลการทดลองของระบบซีเควณชิงค์เบตซ์ที่ใช้วัฏจักรของการเดินระบบ
เท่ากับ 48 ชั่วโมง

ตารางภาคผนวกที่ ค1 ปริมาณแอมโมเนียม ไนโตรต์และไนเตรตของน้ำที่เข้าถังปฏิกิริยาซีเควน
ซิงค์แบทช์โดยใช้วัฏจักรการเดินระบบเท่ากับ 48 ชั่วโมง

วันที่เดินระบบ	ลักษณะน้ำเสียที่เข้าถังปฏิกิริยา (มก.ไนโตรเจนต่อลิตร)		
	แอมโมเนียม	ไนโตรต์	ไนเตรต
1	26.00	-	140
8	25.20	-	140
14	22.4	-	140
23	24.50	-	140
35	21.00	36.40	-
37	21.84	36.40	-
44	23.92	36.40	-
49	23.92	36.40	-
61	24.76	27.70	-
84	26.00	36.40	-
91	26.00	36.40	-
98	26.00	36.40	-
101	42.00	54.60	-

ตารางภาคผนวกที่ ๒ ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์และไนเตรดในน้ำที่ออกจากถังปฏิริยาซี
ควอนซิงค์แบทช์ที่ใช้วัฏจักรการเดินระบบเท่ากับ 48 ชั่วโมง

วันที่เดินระบบ	ลักษณะน้ำเสียที่ออกจากถังปฏิริยา (มก.ไนโตรเจนต่อลิตร)		
	แอมโมเนียม	ไนไตรต์	ไนเตรด
1	25.00	1.947	140
8	23.10	4.87	140
14	21.00	1.67	140
23	13.30	2.05	140
32	14.00	42.61	
35	12.60	14.30	
37	13.86	14.30	
44	18.90	25.57	
49	14.00	25.57	
61	18.90	15.52	
84	12.60	4.50	
91	15.40	6.44	
98	11.20	1.83	
101	0	1.821	

ภาคผนวก ง

การทดลองแบบแบบทชีในขวดซีรัมขนาด 125 มล. เพื่อคัดเลือกแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่
เหมาะสมด้วยกระบวนการออกซิเดชันแอมโมเนียมในสภาพไร้อากาศ

ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของเชื้อจุลินทรีย์โรงงานวันเส้น
(SIT-ASBR1)

เวลา (ชั่วโมง)	การทดลองซ้ำ 1		การทดลองซ้ำ 2		การทดลองซ้ำ 3	
	(มก.ไนโตรเจน/ลิตร)		(มก.ไนโตรเจน/ลิตร)		(มก.ไนโตรเจน/ลิตร)	
	แอมโมเนียม	ไนไตรต์	แอมโมเนียม	ไนไตรต์	แอมโมเนียม	ไนไตรต์
0	37.8	65.78	39.06	65.52	39.62	65.95
20	38.64	60.48	38.5	57.07	42.28	57.00
43	29.82	43.82	33.6	48.03	33.04	52.75
67	15.26	28.39	21.98	35.76	19.6	29.53

เอ็มแอลวีเอสเอสเท่ากับ 630 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของเชื้อจุลินทรีย์โรงควบคุม
คุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์ (RAT-ASBR1)

เวลา (ชั่วโมง)	การทดลองซ้ำ 1		การทดลองซ้ำ 2		การทดลองซ้ำ 3	
	(มก.ไนโตรเจน/ลิตร)		(มก.ไนโตรเจน/ลิตร)		(มก.ไนโตรเจน/ลิตร)	
	แอมโมเนียม	ไนไตรต์	แอมโมเนียม	ไนไตรต์	แอมโมเนียม	ไนไตรต์
0	37.1	63.53	37.8	68.35	38.08	66.29
20	33.6	61.57	33.18	61.55	34.58	62.76
43	20.86	49.02	20.30	47.10	19.88	42.09
67	0.00	18.84	0.00	15.00	0.00	14.43

เอ็มแอลวีเอสเอสเท่ากับ 553 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 3 ข้อมูลปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลาของเชื้อจุลินทรีย์โรง
ควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม (NK-ASBR1)

เวลา (ชั่วโมง)	การทดลองซ้ำ 1		การทดลองซ้ำ 2		การทดลองซ้ำ 3	
	(มก.ไนโตรเจน/ลิตร)		(มก.ไนโตรเจน/ลิตร)		(มก.ไนโตรเจน/ลิตร)	
	แอมโมเนียม	ไนไตรต์	แอมโมเนียม	ไนไตรต์	แอมโมเนียม	ไนไตรต์
0	36.82	61.94	38.08	61.77	38.08	60.14
20	24.78	31.37	22.12	29.79	24.22	32.17
43	1.96	0.00	1.82	0.00	2.52	0.00

เอ็มแอลวีเอสเอสเท่ากับ 633 มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 4 ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียมที่เวลา 43 ชั่วโมง. (ค่าเฉลี่ยการทดลอง
3 ซ้ำ)

แหล่งที่มาของจุลินทรีย์	แอมโมเนียม(มก.ไนโตรเจน/ลิตร)			
	เข้า	ออก	ร้อยละ	ร้อยละ เฉลี่ย
SIT-ASBR1 ซ้ำ 1	37.8	29.82	21.11	17.23
ซ้ำ 2	39.06	33.60	13.98	
ซ้ำ 3	39.62	33.04	16.61	
RAT-ASBR1 ซ้ำ 1	37.10	20.86	43.77	45.95
ซ้ำ 2	37.80	20.30	46.30	
ซ้ำ 3	38.08	19.88	47.79	
NK-ASBR1 ซ้ำ 1	36.82	1.96	94.68	94.43
ซ้ำ 2	38.08	1.82	95.22	
ซ้ำ 3	38.08	2.52	93.38	

ตารางภาคผนวกที่ ๖5 ประสิทธิภาพการกำจัดไนโตรเจนที่เวลา 43 ชั่วโมง. (ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ)

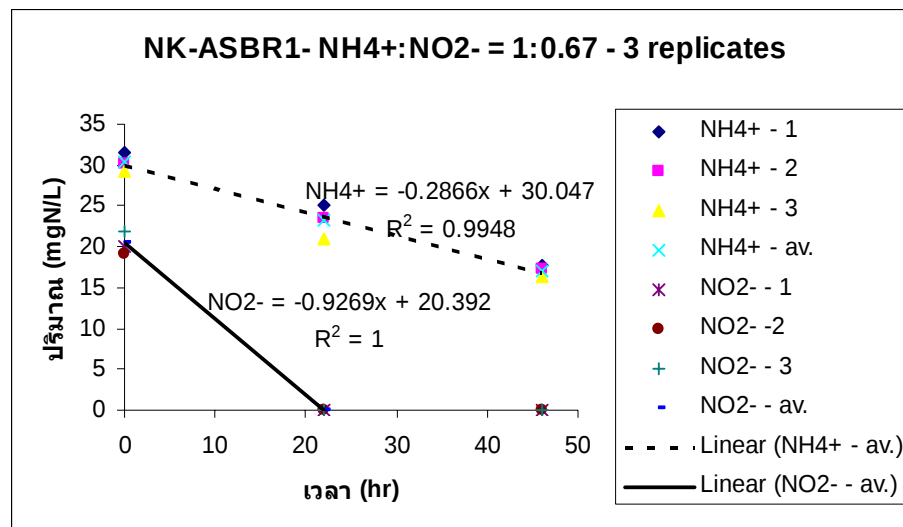
แหล่งที่มาของจุลินทรีย์	ไนโตรเจน (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)			
	เข้า	ออก	ร้อยละ	ร้อยละเฉลี่ย
SIT-ASBR1 ซ้ำ 1	65.78	43.82	33.38	26.70
ซ้ำ 2	65.52	48.03	26.69	
ซ้ำ 3	65.95	52.75	20.02	
RAT-ASBR1 ซ้ำ 1	63.53	49.02	22.84	30.20
ซ้ำ 2	68.35	47.10	31.24	
ซ้ำ 3	66.29	42.09	36.51	
NK-ASBR1 ซ้ำ 1	61.94	0.00	100	100
ซ้ำ 2	61.77	0.00	100	
ซ้ำ 3	60.14	0.00	100	

ภาคผนวก จ

ศึกษาหาค่าอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณจุลินทรีย์ใน
รูป เอ็มแอลวีเอสเอส กับอัตราการกำจัดแอมโมเนียม

ตารางภาคผนวกที่ จ1 ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ตามเวลาเมื่ออัตราส่วน
แอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1: 0.67

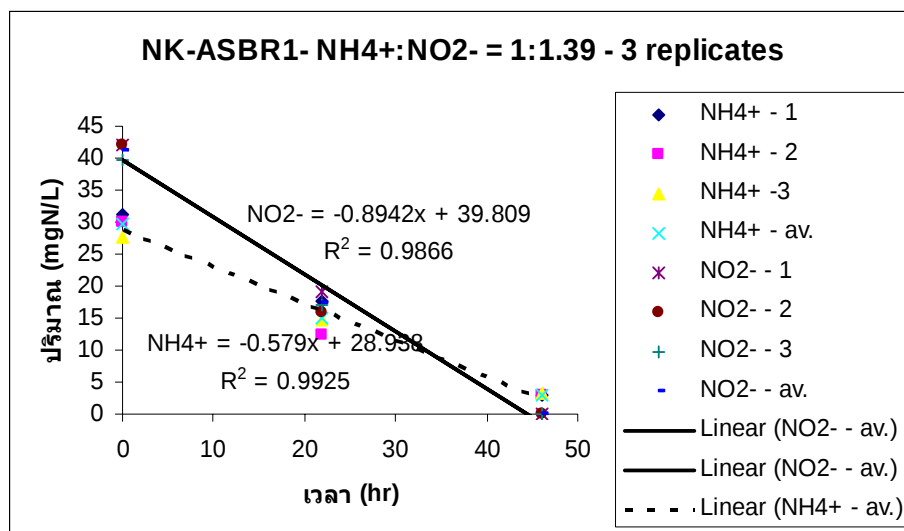
เวลา (ชั่วโมง)	การทดลอง ซ้ำ 1 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)			การทดลอง ซ้ำ 2 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)			การทดลอง ซ้ำ 3 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)		
	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
0	31.64	20.05	6.46	30.10	19.23	7.64	29.26	21.90	9.61
22	25.20	0.00	11.60	23.52	23.52	12.38	20.86	0.00	11.51
46	17.64	0.00	9.32	17.36	17.36	14.61	16.38	0.00	12.94
MLVSS	630			710			700		



ภาพภาคผนวกที่ จ1 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อ
อัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ 1:0.67, เอ็มแอลวีเอสเอสเฉลี่ยเท่ากับ 680
มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางภาคผนวกที่ ๑2 ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ตามเวลาเมื่ออัตราส่วน
แอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:1.39

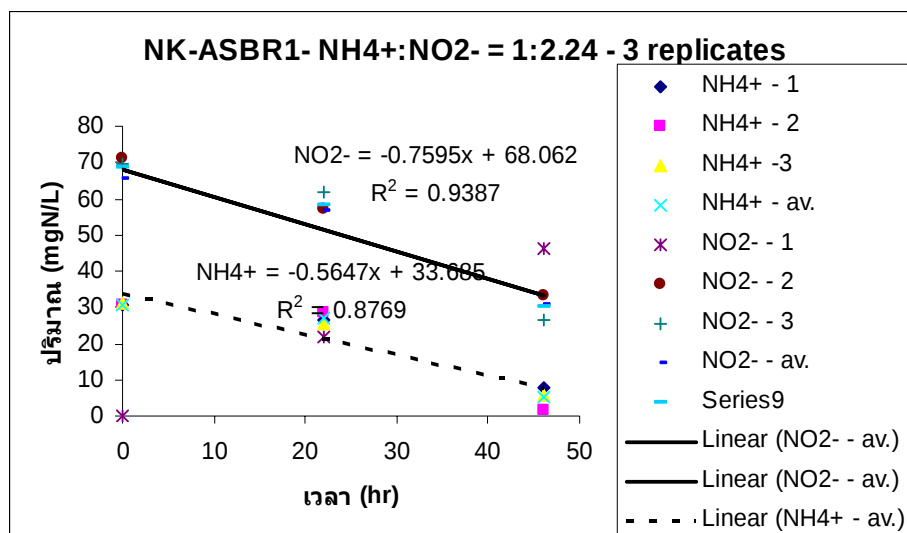
เวลา (ชั่วโมง.)	การทดลอง ซ้ำ 1 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)			การทดลอง ซ้ำ 2 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)			การทดลอง ซ้ำ 3 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร.)		
	NH ⁺ ₄	NO ⁻ ₂	NO ⁻ ₃	NH ⁺ ₄	NO ⁻ ₂	NO ⁻ ₃	NH ⁺ ₄	NO ⁻ ₂	NO ⁻ ₃
0	31.22	41.98	11.23	30.10	41.10	10.80	27.58	39.78	10.38
22	17.64	19.11	12.93	12.32	15.79	14.40	14.64	17.20	12.81
46	2.80	0.00	13.46	2.80	0.00	15.42	3.22	0.00	17.19
MLVSS	655			790			660		



ภาพภาคผนวกที่ ๑2 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อ
อัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์ = 1:1.39, เอ็มแอลวีเอสเอส
เฉลี่ยเท่ากับ 701.67 มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางภาคผนวกที่ จ3 ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ตามเวลาเมื่ออัตราส่วน
แอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:2.24

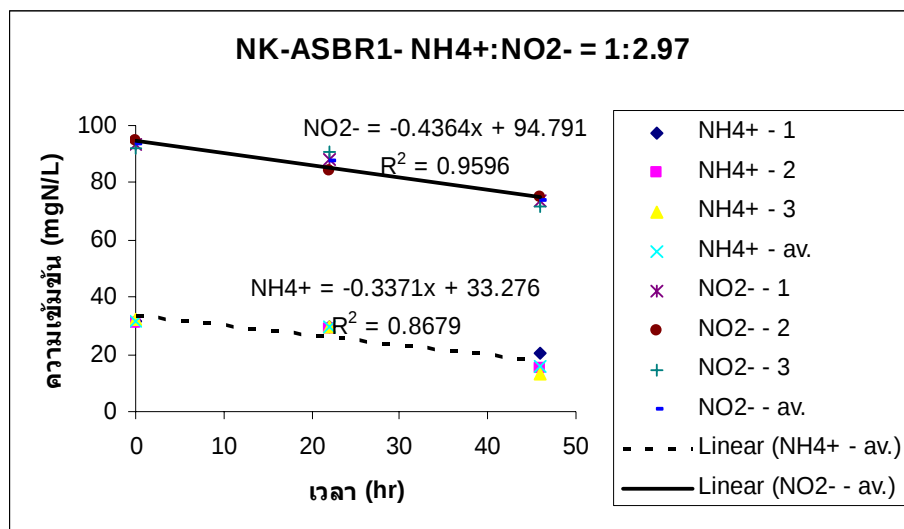
เวลา (ชั่วโมง.)	การทดลอง ซ้ำ 1 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร.)			การทดลอง ซ้ำ 2 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร.)			การทดลอง ซ้ำ 3 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร.)		
	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
0	30.52	71.42	13.23	30.66	69.53	13.80	31.08	65.37	12.99
22	26.46	56.89	14.18	28.70	61.58	18.14	25.48	56.51	18.31
46	7.78	33.01	16.47	1.40	26.72	18.67	5.88	30.66	20.68
66	0.00	22.77	20.89	0.00	16.79	23.49	0.00	18.51	23.71
MLVSS	645			750			690		



ภาพภาคผนวกที่ จ3 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อ
อัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:2.24, เอ็มแอลวีเอสเอส
เฉลี่ยเท่ากับ 695 มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางภาคผนวกที่ จ4 ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรต ตามเวลาเมื่ออัตราส่วน
แอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:2.98

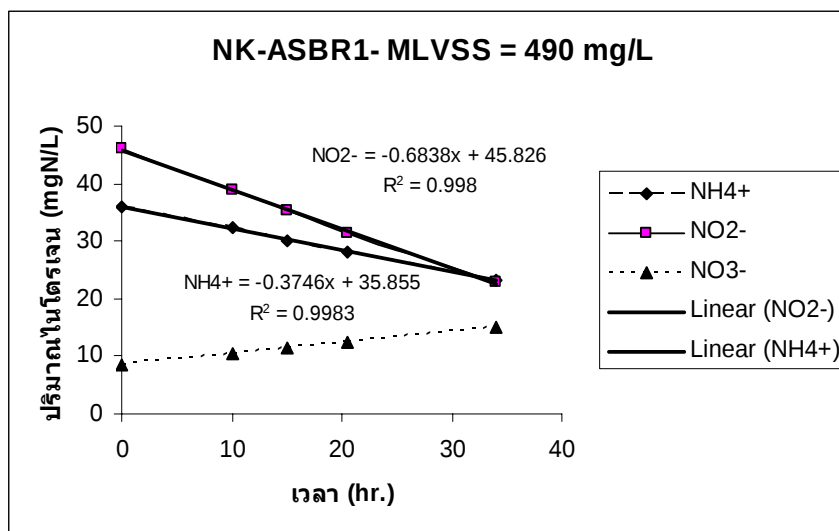
เวลา (ชั่วโมง.)	การทดลอง ซ้ำ 1 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร.)			การทดลอง ซ้ำ 2 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร.)			การทดลอง ซ้ำ 3 (มก.ไนโตรเจน/ลิตร.)		
	NH ⁺ ₄	NO ⁻ ₂	NO ⁻ ₃	NH ⁺ ₄	NO ⁻ ₂	NO ⁻ ₃	NH ⁺ ₄	NO ⁻ ₂	NO ⁻ ₃
0	31.36	93.42	10.97	30.80	94.80	11.39	32.20	92.43	7.35
22	29.68	87.90	12.00	28.84	84.04	17.06	29.54	90.76	16.39
46	16.20	73.83	15.01	15.12	75.08	17.49	13.02	71.84	18.64
66	4.16	36.80	21.17	5.69	36.57	28.69	4.48	45.62	24.26
MLVSS	585			700			620		



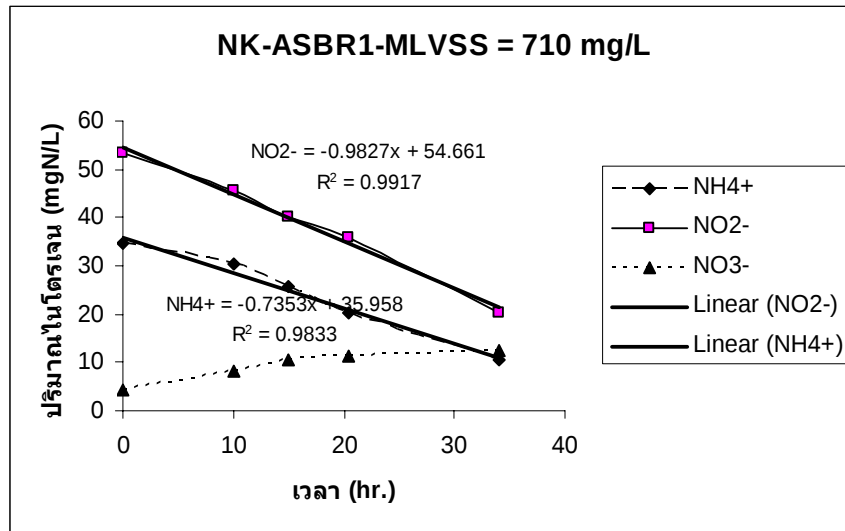
ภาพภาคผนวกที่ จ4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อ
อัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์เท่ากับ 1:2.97, เอ็มแอลวีเอสเอส
เฉลี่ยเท่ากับ 635 มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางภาคผนวกที่ ๑5 อัตราการกำจัดแอมโมเนียมจำเพาะ (SARR) และอัตราการกำจัดไนไตรต์จำเพาะ (ANRR) เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนไตรต์

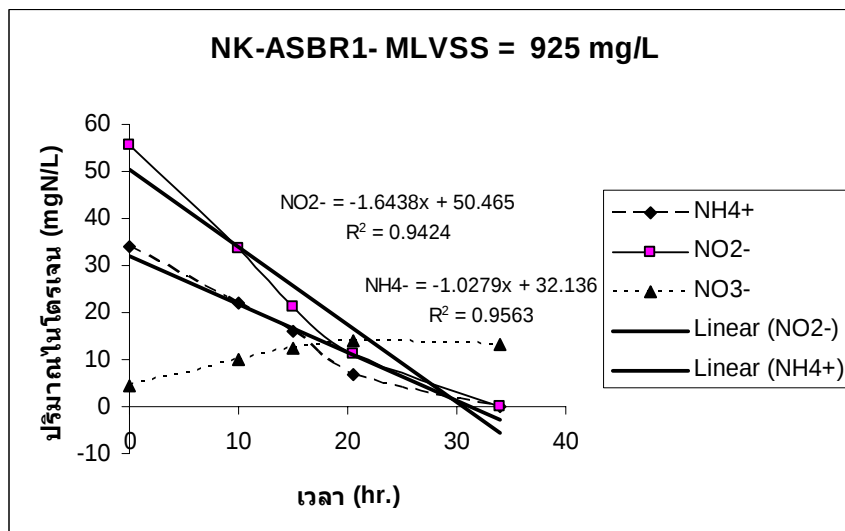
อัตราส่วน $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$	SRR (มก. ไนโตรเจน/ ลิตร/ชั่วโมง)	NRR (มก. ไนโตรเจน/ ลิตร/ชั่วโมง)	MLVSS เฉลี่ย (mg/l)	SARR (gN/gVSS/d)	SNRR (gN/gVSS/d)
1:0.67	0.2866	0.9269	680	0.0101	0.0327
1:1.39	0.5790	0.8942	701.67	0.0198	0.0306
1:2.24	0.5647	0.7595	695	0.0195	0.0262
1:2.97	0.3317	0.4364	635	0.0125	0.0165



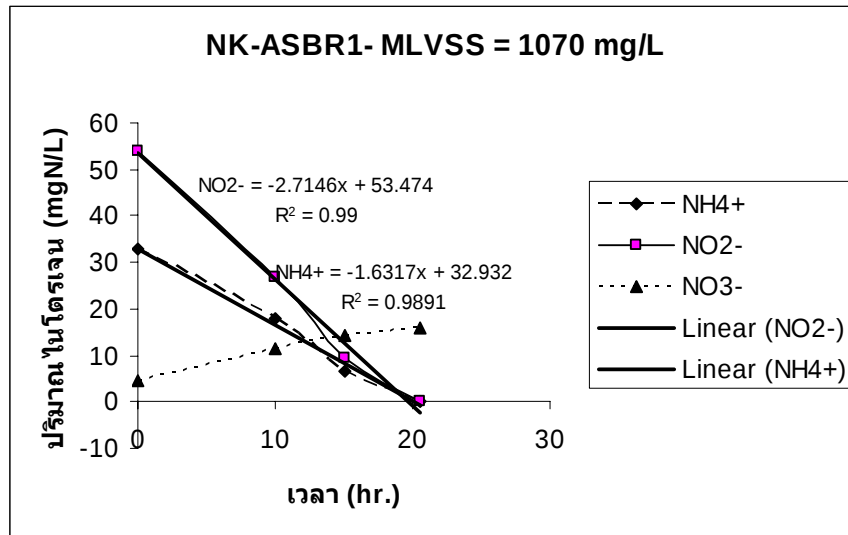
ภาพภาคผนวกที่ ๑5 การลดลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อเอ็มแอลวีเอสเอสเท่ากับ 490 มิลลิกรัม/ลิตร



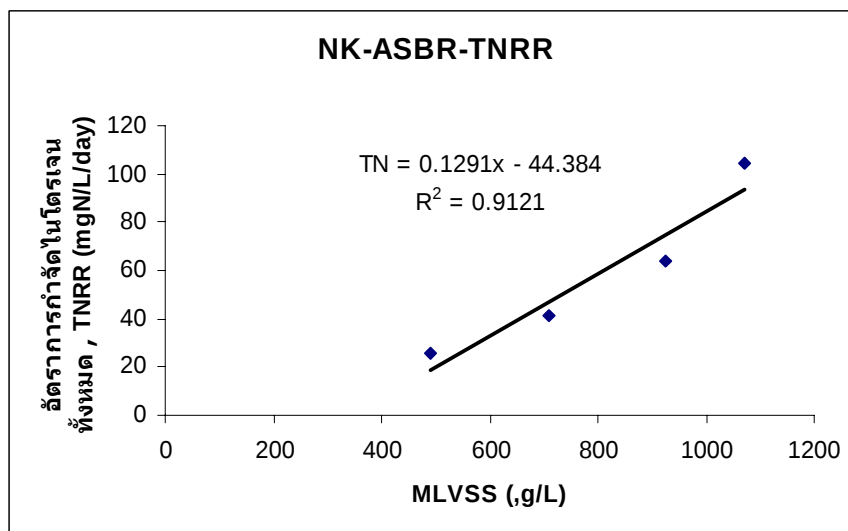
ภาพภาคผนวกที่ ๖6 การลดลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อเอ็มแอลวีเอส
เอสเท่ากับ 710 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพภาคผนวกที่ ๖7 การลดลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อเอ็มแอลวีเอส
เอสเท่ากับ 925 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพภาคผนวกที่ ๖๘ การลดลงของปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ตามเวลา เมื่อเอ็มแอลวีเอสเท่ากับ 1070 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพภาคผนวกที่ ๖๙ ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการกำจัดไนโตรเจนทั้งหมด ต่อปริมาณเอ็มแอลวีเอส (TNRR) ต่อปริมาณเอ็มแอลวีเอส

ภาคผนวก จ

การเดินระบบด้วยถังปฏิกริยาแบบซีคอนซิงค์แบบซ้เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ Anammox

ตารางภาคผนวกที่ ๑1 ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรตของการเดินระบบ
NK-ASBR2 อย่างต่อเนื่อง

วันที่	จำนวนวัน	แอมโมเนียม (มก. ไนโตรเจน/ลิตร.)		ไนไตรต์(มก. ไนโตรเจน/ลิตร.)		ไนเตรต(มก. ไนโตรเจน/ลิตร.)
		เข้า	ออก	เข้า	ออก	ออก
1/7/2549	208	39.20	0.00	52.86	1.82	11.76
2/7/2549	209	41.58	0.00	48.99	0.03	11.76
3/7/2549	210	39.48	2.74	48.03	0.03	9.42
4/7/2549	211	40.20	3.60	48.78	0.02	8.38
5/7/2549	212	40.73	4.88	44.47	0.013	4.82
6/7/2549	213	40.42	5.96	43.19	0.014	3.30
7/7/2549	214	54.07	6.64	62.35	0.012	1.82
9/7/2549	216	52.75	4.83	64.56	0.012	5.02
10/7/2549	217	57.71	7.27	67.09	0.59	6.10
11/7/2549	218	54.22	6.86	76.82	0.015	4.01
12/7/2549	219	71.93	8.57	88.79	0.014	4.43
13/7/2549	220	66.36	3.77	89.10	0.018	4.97
14/7/2549	221	67.12	4.82	88.29	0.013	6.61
15/7/2549	222	64.85	4.04	91.56	0.011	9.22
16/7/2549	223	64.29	3.50	84.59	0.050	13.19
17/7/2549	224	295.65	2.21	112.42	0.015	11.74
18/7/2549	225	83.85	4.96	126.46	0.016	11.15
19/7/2549	226	84.98	40.54	106.52	24.21	16.85
20/7/2549	227	80.08	7.08	111.93	0.015	15.26
21/7/2549	228	83.78	1.96	113.78	0.016	15.72
22/7/2549	229	92.96	3.51	127.52	0.010	16.05
23/7/2549	230	81.20	3.14	133.55	0.010	13.67
24/7/2549	231	95.48	2.05	134.78	0.010	16.34
25/7/2549	232	95.72	0	130.13	0.053	19.57

ตารางภาคผนวกที่ ๑1 (ต่อ) ปริมาณแอมโมเนียม ไนโตรต์ และไนเตรดของการเดินระบบ
NK-ASBR2 อย่างต่อเนื่อง

วันที่	จำนวน วัน	แอมโมเนียม (มก. ไนโตรเจน/ลิตร.)		ไนโตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร.)		ไนเตรด (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)
		เข้า	ออก	เข้า	ออก	ออก
26/7/2549	233	95.42	0.54	124.13	0.013	17.98
27/7/2549	234	110.08	2.21	144.77	0.009	18.11
28/7/2549	235	99.50	2.52	138.04	0.019	18.50
29/7/2549	236	92.41	2.8	125.68	0.012	14.43
30/7/2549	237	99.82	2.77	139.37	0.013	20.03
31/7/2549	238	120.23	2.72	170.65	0.019	19.86
1/8/2549	239	118.44	1.85	173.05	0.018	22.89
4/8/2549	242	159.18	4.54	222.96	0.011	30.50
5/8/2549	243	158.62	3.47	216.37	0.013	22.10
6/8/2549	244	170.38	3.19	239.53	0.011	23.85
7/8/2549	245	189.14	3.58	235.56	0.043	32.93
8/8/2549	246	177.52	0.95	272.89	0.024	32.97
9/8/2549	247	221.76	4.20	314.81	0.010	29.22
10/8/2549	248	219.80	3.47	308.73	0.026	35.05
11/8/2549	249	223.44	3.95	298.88	0.010	42.90
12/8/2549	250	185.36	8.01	251.09	0.005	32.06
13/8/2549	251	212.80	11.68	284.43	0.007	31.82
14/8/2549	252	215.04	12.99	285.09	0.008	34.42
15/8/2549	253	285.88	12.46	355.29	0.018	38.62
16/8/2549	254	275.52	19.18	408.58	0.010	51.50
17/8/2549	255	263.76	13.83	388.91	0.007	58.77
18/8/2549	256	293.16	17.98	385.42	0.018	56.01
19/8/2549	257	286.44	23.91	380.74	0.009	58.18
20/8/2549	258	291.76	16.18	384.56	0.027	67.40

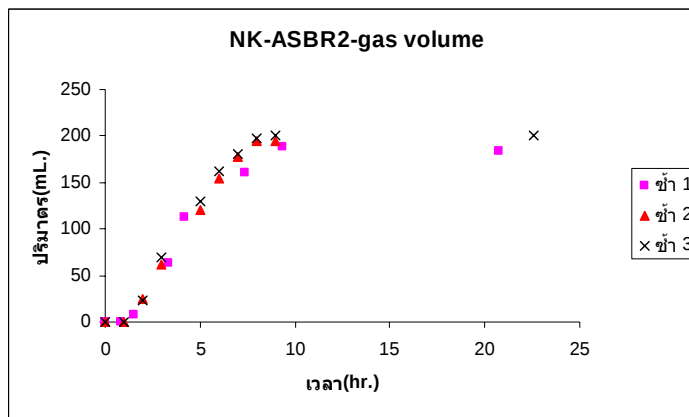
**ตารางภาคผนวกที่ ๑1 (ต่อ) ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรดของการเดินระบบ
NK-ASBR2 อย่างต่อเนื่อง**

วันที่	จำนวน วัน	แอมโมเนียม (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)		ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)		ไนเตรด (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)
		เข้า	ออก	เข้า	ออก	ออก
21/8/2549	259	288.05	13.38	296.50	0.042	57.87
22/8/2549	260	297.36	12.96	375.73	0.026	51.93
23/8/2549	261	309.96	13.22	443.07	0.014	49.18
24/8/2549	262	323.00	15.37	452.26	0.049	61.46
25/8/2549	263	330.40	0.00	461.90	0.00	59.48
26/8/2549	264	326.90	4.54	464.96	0.014	50.55
27/8/2549	265	352.80	5.10	503.01	0.022	63.28
28/8/2549	266	393.40	0.34	582.27	2.307	68.24
29/8/2549	267	397.20	0.67	582	2.3	68.69
30/8/2549	268	392.00	0.50	588	2.3	67.83
31/8/2549	269	392.00	0.50	588	2.3	67.83
1/9/2549	270	392.00	0.50	588	2.3	67.83

ตารางภาคผนวกที่ ๑๒ วัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นจากถัง NK-ASBR2 เมื่อความปริมาณแอมโมเนียม
เท่ากับ 210 และไนโตรเจนเท่ากับ 294 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

เวลา (ชั่วโมง.)	ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น (มล.)			NH ₄ ⁺ (มก. ไนโตรเจน/ ลิตร)	NO ₂ ⁻ (มก. ไนโตรเจน/ ลิตร)
	ชั่วโมง 1	ชั่วโมง 2	ชั่วโมง 3		
0	0	0	0	148.00	254
1	0	0	0	152.15	233
2	-	25	23	141.90	224
3	60	60	70	-	-
4	103	95	100	69.27	115
5	-	120	130	-	-
6	137	155	162	13.10	39
7	160	177	180	0.54	6
8	183	195	198	-	-
9	183	195	200	-	-
22	183	195	200	-	-

หมายเหตุ - หมายถึงไม่ได้ทำการตรวจวัด



ภาพภาคผนวกที่ ๑1 ปริมาณก๊าซสะสมที่เกิดขึ้นตามเวลา เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมเท่ากับ 148 มก.ไนโตรเจน/ลิตร และไนไตรต์เท่ากับ 254 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

ภาคผนวก ข
การทดสอบแบบเบทซ์ในขวดชมพูเพื่อศึกษาไโคเนติกส์ของ
ระบบมีเชื้อจุลินทรีย์ Anammox ร้อยละ 85

ตารางภาคผนวกที่ ข1 อัตราการลดลงของแอมโมเนียมและไนไตรต์ที่เวลา 0-45 นาที.

เบทซ์ที่	เวลา (นาที)	NH_4^+ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)	NO_2^- (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)
1	0	18.2	31.98
	10	9.8	20.14
	20	9.8	17.27
	30	14	22.22
2	0	40.6	73.27
	15	21	34.41
	30	29.4	39.91
	45	23.8	42.08
3	0	60.2	89.43
	15	43.4	69.06
	30	35	55.71
	45	40.6	61.28
4	0	78.4	117.92
	15	61.6	97.31
	30	64.4	100.96
	45	47.6	73.95
5	0	105	165.03
	15	68.6	103.23
	30	71.4	113.42
	45	65.8	100.31
6	0	116.2	174.32
	15	96.6	147.96
	30	79.8	125.25
	45	84	126.49

ตารางภาคผนวกที่ ข1 (ต่อ) อัตราการลดลงของแอมโมเนียมและไนไตรต์ที่เวลา 0-45 min.

แบคทีเรีย	เวลา (min)	NH_4^+ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)	NO_2^- (มก.ไนโตรเจน/ลิตร)
7	0	180.6	252.30
	15	147.0	192.29
	30	126.0	165.17
	45	120.4	176.04
8	0	208.6	277.62
	15	149.8	218.37
	30	128.8	169.78
	45	151.2	189.46
9	0	226.8	293.52
	15	168	261.59
	30	179.2	232.55
	45	154	218.02

ตารางภาคผนวกที่ ข2 อัตราการลดแอมโมเนียมและไนไตรต์ที่เวลา 0-15 นาที

NH_4^+ มก.ไนโตรเจน/ลิตร	NO_2^- มก.ไนโตรเจน/ ลิตร	MLVSS มก./ล.	$d\text{NH}_4^+/dt$ มก.ไนโตรเจน/ ลิตร/นาที	$d\text{NO}_2^-/dt$ มก.ไนโตรเจน/ ลิตร/นาที	$d\text{NO}_2^-/d\text{NH}_4^+$
18.20	31.98	1368.42	0.84	1.184	1.41
40.60	73.28	1388.89	1.307	2.591	1.28
60.20	89.43	1410.00	1.12	1.358	1.21
78.40	117.92	1283.33	1.12	1.374	1.23
105.00	165.03	1333.33	2.427	4.12	1.69
116.20	174.32	1295.24	1.307	1.757	1.34
180.60	252.30	1366.67	2.24	4.001	1.79
208.6	277.62	1126.32	3.92	3.95	1.01
226.80	293.52	1400.00	3.92	2.129	0.54
ค่าเฉลี่ย					<u>1.42</u>

หมายเหตุ ไม่คิดที่ความเข้มข้นของไนไตรต์เท่ากับ 277.62 และ 293.52 มก.ไนโตรเจน/ลิตร,
การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์, r_g

$$r_g = \mu X \quad (\text{ข1})$$

การย่อยสลายสารอาหาร, r_{SU}

$$r_g = -Yr_{SU} \quad (\text{ข2})$$

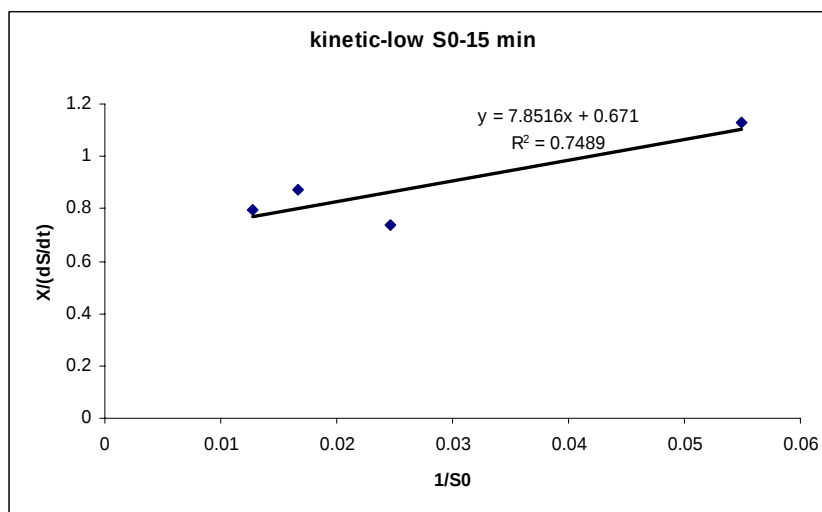
สมการของ Monod,

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{ข3})$$

ดังนั้น

$$\begin{aligned} -Yr_{SU} &= \frac{\mu_m S}{K_s + S} \cdot X \\ -\frac{r_{SU}}{X} &= \frac{1}{Y} \left[\frac{\mu_m S}{K_s + S} \right] \\ \frac{X}{dS/dt} &= \frac{YK_s}{\mu_m S} + \frac{Y}{\mu_m} \end{aligned} \quad (\text{ข4})$$

นำสมการที่ ๔ ไปพล็อตกราฟระหว่าง $\frac{X}{dS/dt}$ และ $\frac{1}{S_0}$ จะได้สมการที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยความชันของกราฟคือค่า $\frac{YK_s}{\mu_m}$ และจุดตัดแกน y คือค่า $\frac{Y}{\mu_m}$



ภาพภาคผนวกที่ ข1 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{X}{dS/dt}$ และ $\frac{1}{S_0}$

กราฟมีจุดตัดแกน y เท่ากับ	$\frac{Y}{\mu_m}$	=	0.671	gVSS/(d/gNH ₄ ⁺)
จากภาคผนวกที่ ฅ	Y	=	0.062	gVSS/gNH ₄ ⁺
จะได้	μ_m	=	0.0924	d ⁻¹
ความชันของกราฟ,	$\frac{YK_s}{\mu_m}$	=	7.8516	mgVSS/(l.d)
	K _s	=	11.701	มก.ไนโตรเจน/ลิตร

ภาคผนวก ข
การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณผลิต

การคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณผลผลิตจากปฏิกิริยาพลังงาน (Rittmann and McCarty, 2001)

เนื่องจากจุลินทรีย์ Anammox ถูกจัดอยู่ในกลุ่มออกโตโทรฟิก จึงสมมติให้ $\varepsilon = 0.6$

วิธีทำ

$$\Delta G_p = 35.09 - \Delta G_C^{0'} \quad (1)$$

ΔG_p = พลังงานที่ให้ในการเปลี่ยนคาร์บอนไปเป็นกรดไพรูเวต

ΔG_p สำหรับจุลินทรีย์ autotrophic มีค่าเท่ากับ 113.8 kJ/eq.

ΔG_{PC} พลังงานที่ใช้เปลี่ยนกรดไพรูเวตไปเป็นเซลล์ มีค่าโดยประมาณ 3.33 kJ/g.C (McCarty., 1971)

$$\Delta G_{PC} = 3.33 * \text{มวลของจุลินทรีย์ต่ออิเล็กตรอนสมมูล}$$

มวลของจุลินทรีย์ต่ออิเล็กตรอนสมมูล = 25.7/20 (ในกรณีที่แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน)

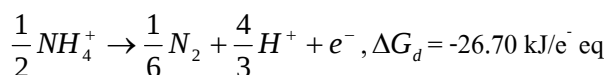
$$= 1.285 \text{ kJ/e}^- \text{ eq}$$

$$\Delta G_s = \frac{\Delta G_p}{\varepsilon^n} + \frac{\Delta G_{PC}}{\varepsilon} \quad (2)$$

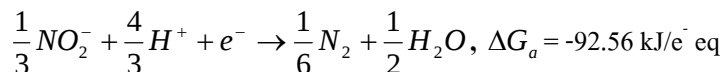
$n = +1$ (เมื่อ ΔG_p มีค่าเป็นบวก). ดังนั้น

$$\begin{aligned} \Delta G_s &= \frac{113.8}{0.6^1} + \frac{1.285}{0.6} \\ &= 191.808 \text{ kJ/e}^- \text{ eq} \end{aligned}$$

แอมโมเนียมเป็นสารให้อิเล็กตรอน



ไนไตรต์เป็นสารรับอิเล็กตรอน



$$\Delta G_r = \Delta G_a + \Delta G_d$$

ΔG_r = พลังงานของการเกิดปฏิกิริยา

ΔG_a = พลังงานของสารรับอิเล็กตรอน

ΔG_d = พลังงานของสารให้อิเล็กตรอน

$$\Delta G_r = -92.56 - 26.70 = -119.26$$

$$A = - \frac{\frac{\Delta G_p}{\varepsilon^n} + \frac{\Delta G_{PC}}{\varepsilon}}{\varepsilon \Delta G_r}$$

$$A = - \frac{\frac{113.8}{0.6^1} + \frac{1.285}{0.6}}{0.6 * (-119.26)}$$

$$= 2.68$$

$$f_s^0 = \frac{1}{1+A} \text{ and } \dots f_e^0 = 1 - f_s^0$$

$$f_s^0 = \frac{1}{1+2.68} = 0.272$$

$$Y = \frac{f_s^0 (M_c \cdot g \cdot cell / molcells)}{(n_e e^- eq / mol \cdot cells) (\frac{17}{3} gNH_4^+ / e^- eq)}$$

เมื่อ M_c คือสูตรของน้ำหนักโมเลกุลของเซลล์จุลินทรีย์

n_e คือจำนวนอิเล็กตรอนสมมูล

(Strous., 1998) สูตรของจุลินทรีย์ $CH_2O_{0.5}N_{0.15}S_{0.05}$ ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 25.7 g/mole

และแหล่งของไนโตรเจนคือ แอมโมเนียม ดังนั้น $n_e = 20 e^- eq./mole$

จะได้

$$Y = 0.227 f_s^0$$

$$Y = 0.227 \cdot 0.272 = 0.062 \text{ g.C/gNH}_4^+ \text{ กรัมเซลล์ต่อกรัม}$$

แอมโมเนียม
