บทที่ 4
ผลการทดลอง

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำและตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล

ในการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนมาจากระบบบำบัดน้ำเสียบริเวณบ่อเติมอากาศของระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานฟอกย้อมและโรงงานฟอกหนังในจังหวัดสมุทรปราการ (ภาคผนวก ง) เพื่อทำการแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้นั้น ได้ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำทิ้งทั้งก่อนและหลังผ่านระบบบำบัดน้ำเสียควบคู่กันไปด้วย พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานทั้งสองแห่ง มีประสิทธิภาพในการลดความสกปรกของน้ำเสียตามพารามิเตอร์ที่มีการตรวจวัด ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าซีโอดี และพาราไนโตรฟีนอล (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียจากค่าซีโอดีที่ลดลง กล่าวได้ว่าประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานฟอกย้อม สามารถลดค่าซีโอดีลงร้อยละ 87 ส่วนประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานฟอกหนัง สามารถลดค่าซีโอดีลงร้อยละ 84 แต่เมื่อพิจารณาปริมาณพาราไนโตรฟีนอลแล้ว พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานทั้งสองสามารถลดปริมาณพาราไนโตรฟีนอลลงได้ แต่ประสิทธิภาพต่ำ โดยการลดลงคิดเป็นร้อยละ 9 และร้อยละ 19 ตามลำดับ

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำและตะกอนที่เก็บมาจากบ่อเติมอากาศของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมทั้งสองแห่ง ด้วยวิธีการเขี่ยลากเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ผสมด้วยเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตรและพาราไนโตรฟีนอล 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แยกโคโลนีเดี่ยวและทำให้บริสุทธิ์ สามารถแยกแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานฟอกย้อมได้ 10 สายพันธุ์ และจากโรงงานฟอกหนัง 17 สายพันธุ์ เมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MBH ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตรและพาราไนโตรฟีนอล 0.1 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการย่อยพาราไนโตรฟีนอล มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ AS101 และ AS107 จากโรงงานฟอกย้อม และจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ AS201, AS202 และ AS217 จากโรงงานฟอกหนัง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 คุณภาพน้ำทิ้งของโรงงานฟอกย้อมและฟอกหนังที่ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล

จุดเก็บตัวอย่างน้ำ	ความเป็นกรดด่าง	ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พาราไนโตรฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1.โรงงานฟอกย้อม			
ก่อนเข้าระบบบำบัด	10.6	1,382	18.3
หลังผ่านระบบบำบัด	7.5	185	16.7
2.โรงงานฟอกหนัง			
ก่อนเข้าระบบบำบัด	8.2	2,470	20.1
หลังผ่านระบบบำบัด	7.2	395	16.3

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ MBH ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตรและพาราไนโตรฟีนอล 0.1 มิลลิโมลาร์ ในระยะเวลา 1 สัปดาห์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานฟอกย้อม

แบคทีเรียสายพันธุ์	การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
AS101	+
AS102	-
AS103	-
AS104	-
AS105	-
AS106	-
AS107	+
AS108	-
AS109	-
AS110	-

หมายเหตุ + คือ เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี

\- คือ ไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสีเหลืองเป็นไม่มีสี

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ MBII ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตรและพาราไนโตรฟีนอล 0.1 มิลลิโมลาร์ ในระยะเวลา 1 สัปดาห์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานฟอกหนัง

แบคทีเรียสายพันธุ์	การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
AS201	+
AS202	+
AS203	-
AS204	-
AS205	-
AS206	-
AS207	-
AS208	-
AS209	-
AS210	-
AS211	-
AS212	-
AS213	-
AS214	-
AS215	-
AS216	-
AS217	+

หมายเหตุ + คือ เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี
- คือ ไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองเป็นไม่มีสี

การทดสอบการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลของแบคทีเรียที่คัดเลือก

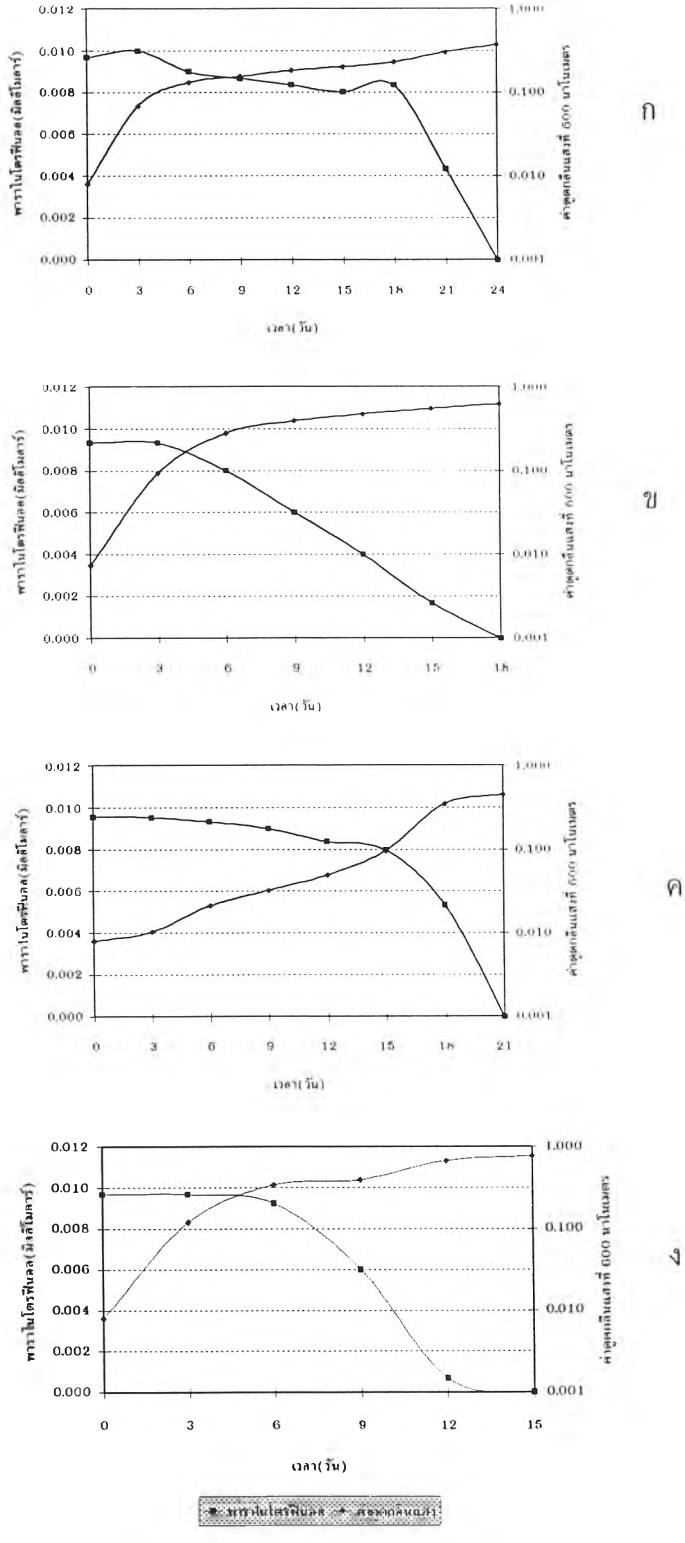
เมื่อทำการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS101, AS107, AS201, AS202 และ AS217 ในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีการแปรผันปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ โดยการทดสอบการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล เลือกทดลองในสภาพอุณหภูมิห้อง ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 28 ถึง 32 องศาเซลเซียสและสภาพความเป็นกรดด่างที่เป็นกลาง เนื่องจาก โดยปกติแบคทีเรียจะสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนต่าง ๆ ได้ดี ในภาวะที่คล้ายคลึงกับสภาพแวดล้อมซึ่งแบคทีเรียคุ้นเคยอยู่เดิม เช่น แบคทีเรียที่แยกมาจากระบบบำบัดน้ำเสีย จะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างในช่วงเดียวกับสภาพของระบบบำบัดน้ำเสียนั้น ๆ(Sarnaik and Kanekar, 1995) อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่กล่าวมาข้างต้น เป็นภาวะที่คล้ายคลึงกับระบบบำบัดน้ำเสียที่เก็บตัวอย่างมาทำการแยกแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ดังกล่าว จากการสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ AS101 มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้นเป็น 0.01 มิลลิโมลาร์ หากความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 0.025, 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ สายพันธุ์ AS107 และ AS217 มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ทุกระดับความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอล ตั้งแต่ 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ และแบคทีเรียสายพันธุ์ AS201 มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.01และ 0.025 มิลลิโมลาร์ หากเพิ่มความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอลเป็น 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ AS202ไม่สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้ที่ทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีการเติมพาราไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 0.01 0.025 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

แบคทีเรียสายพันธุ์	การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ			
	พาราไนโตรฟีนอล 0.01 มิลลิโมลาร์	พาราไนโตรฟีนอล 0.025 มิลลิโมลาร์	พาราไนโตรฟีนอล 0.05 มิลลิโมลาร์	พาราไนโตรฟีนอล 0.1 มิลลิโมลาร์
AS101	+	-	-	-
AS107	+	+	+	+
AS201	+	+	-	-
AS202	-	-	-	-
AS217	+	+	+	+

หมายเหตุ + คือ เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี
- คือ ไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองเป็นไม่มีสี

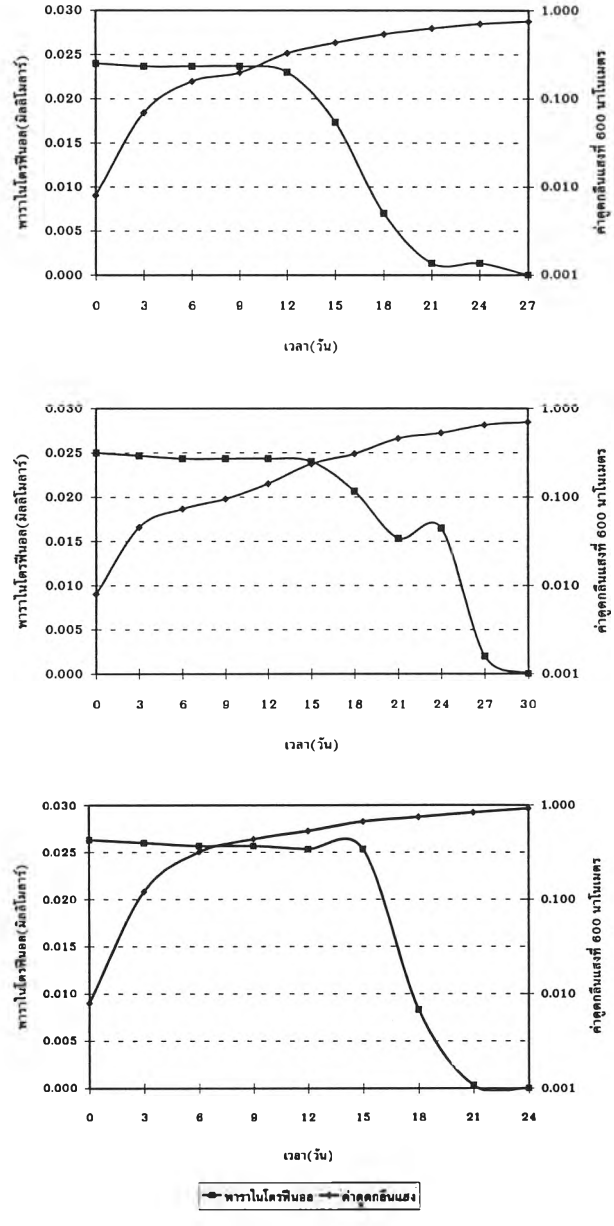
การทดลองการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ AS217 เป็นสายพันธุ์ที่ย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้ดีที่สุด โดยการย่อยสลายเริ่มขึ้นหลังจากวันที่ 6 ของการทดลอง จากนั้นปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ตกค้างในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเริ่มลดปริมาณลง จนกระทั่งตรวจไม่พบพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 15 ของการทดลอง สายพันธุ์ AS107 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพเป็นอันดับรองลงมา พบว่าปริมาณพาราไนโตรฟีนอลตกค้างในอาหารเลี้ยงเชื้อจนกระทั่งถึงวันที่ 6 ของการทดลองเช่นเดียวกันและในที่สุดจึงถูกย่อยสลายหมดไปในวันที่ 18 ส่วนการติดตามการลดลงของปริมาณพาราไนโตรฟีนอลโดยการย่อยสลายของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS201 ซึ่งเป็นสายพันธ์ที่มีประสิทธิภาพเป็นอันดับที่ 3 พบว่า พาราไนโตรฟีนอลเริ่มลดปริมาณลงหลังจากวันที่ 15 และถูกย่อยสลายจนหมดไปในวันที่ 21 ของการทดลอง สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ AS101 ย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้ช้าที่สุด ใช้เวลารวมทั้งสิ้น 24 วัน โดยพาราไนโตรฟีนอลที่ตกค้างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เริ่มลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 18 ของการทดลอง (รูปที่ 10) เมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่าการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ระดับความเข้มข้นนี้ โดยแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ฉ)



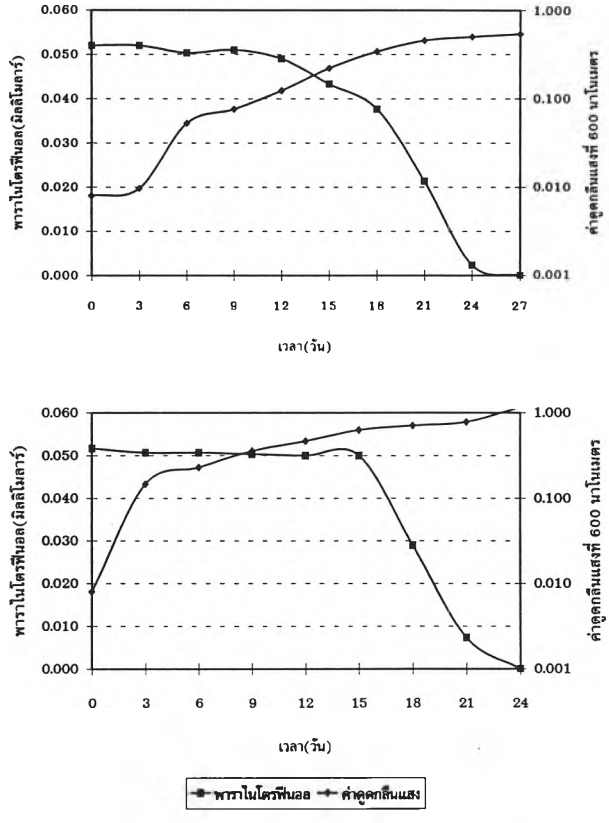
รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น กับการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS101(ก), AS107(ข), AS201(ค) และ AS217(ง)

สำหรับการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 0.025 มิลลิโมลาร์ โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ AS107, AS201 และ AS217 ผลการทดลอง พบว่า สายพันธุ์ AS217 สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้เร็วที่สุด โดยปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ตกค้างในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มลดลง หลังจากวันที่ 15 ของการทดลองและถูกย่อยสลายจนหมดในวันที่ 21 ในขณะที่สายพันธุ์ AS107 ซึ่งย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้นระดับนี้ได้ดีเป็นอันดับรองลงมา ใช้ระยะปรับตัว 12 วัน จึงจะสามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อจนกระทั่งหมดไปในวันที่ 24 ส่วนสายพันธุ์ AS201 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ย่อยได้ช้าที่สุด เริ่มย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากวันที่ 18 ของการทดลอง และตรวจไม่พบพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 30 ของการทดลอง(รูปที่ 11) เมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่าการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ฉ)

สำหรับการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ AS107 และ AS217 ผลการทดลอง พบว่า สายพันธุ์ AS217 สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้เร็วที่สุด โดยปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ตกค้างในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มลดลง หลังจากวันที่ 15 ของการทดลองและตรวจไม่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 24 ในขณะที่สายพันธุ์ AS107 ซึ่งย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้นระดับนี้ได้ดีเป็นอันดับรองลงมา ใช้ระยะปรับตัว 12 วัน (รูปที่ 12) การย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ฉ)



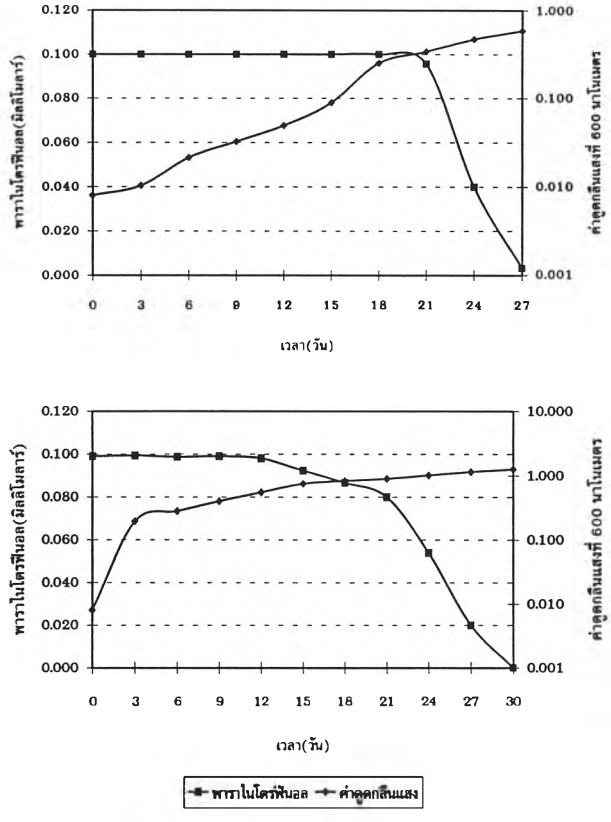
รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.025 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น กับการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107(ก), AS201(ข) และ AS217(ค)



รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น กับการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107(ก) และ AS217(ข)

การย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด คือ 0.1 มิลลิโมลาร์ มีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ AS107 และ AS217 ผลการทดลอง พบว่า สายพันธุ์ AS107 สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้หมดในวันที่ 30 ของการทดลอง โดยปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ตกค้างในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มลดลงหลังจากวันที่ 18 ของการทดลอง ในขณะที่สายพันธุ์ AS217 ใช้ระยะปรับตัว 12 วัน จึงเริ่มย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล และย่อยสลายได้หมดในวันที่ 30 ของการทดลอง(รูปที่ 13) การทดสอบทางสถิติที่ระดับความเข้มข้นนี้ การย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ฉ)

ตารางผลการทดลองการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ AS101, AS107, AS201 และ AS217 แสดงในภาคผนวก จ



รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น กับการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107(ก) และ AS217(ข)

การศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217

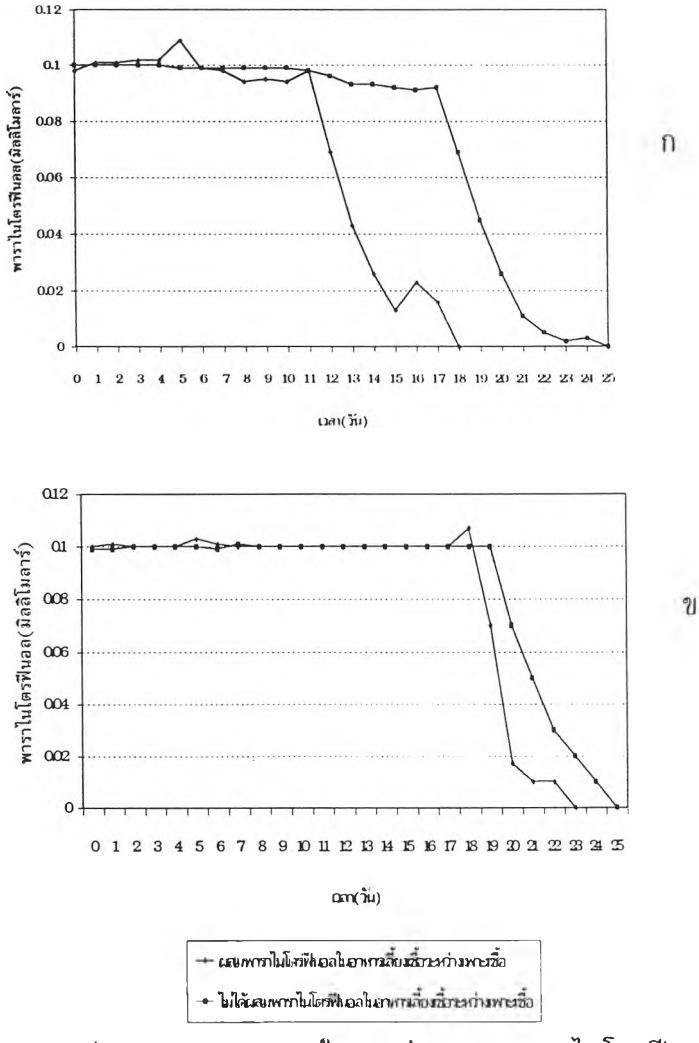
ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ทำการศึกษา ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ เมื่อทำการบ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แสดงถึงภาวะที่เชื้อมีการเจริญเติบโต พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญเติบโต โดยในการทดลองขั้นนี้ เลือกทดลองเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้ทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น คือ 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าวมี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217

จากการติดตามการเจริญเติบโตพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 สามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5 และ 7 โดยที่ความเป็นกรดด่าง 5 ระยะที่แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว (log phase) เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 48 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 600 นาโนเมตรในชั่วโมงที่ 48 เป็น 1.07 และที่ความเป็นกรดด่าง 7 แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 48 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 600 นาโนเมตรในชั่วโมงที่ 48 เป็น 1.4 ในส่วนของการติดตามผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่าที่อุณหภูมิ 20 แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 24 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 600 นาโนเมตรในชั่วโมงที่ 48 เป็น 1.27 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 48 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 600 นาโนเมตรในชั่วโมงที่ 48 เป็น 1.4 และ 40 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 48 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 600 นาโนเมตรในชั่วโมงที่ 48 เป็น 1.07

สำหรับสายพันธุ์ AS217 สามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5 และ 7 อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส โดยที่ความเป็นกรดด่าง 5 ระยะที่แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 48 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 600 นาโนเมตรในชั่วโมงที่ 48 เป็น 1.1 ที่ความเป็นกรดด่าง 7 แบคทีเรียเริ่มมีการเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 600 นาโนเมตรในชั่วโมงที่ 48 เป็น 1.28 ในส่วนของการติดตามผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 600 นาโนเมตรในชั่วโมงที่ 48 เป็น 1.28 และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 600 นาโนเมตรในชั่วโมงที่ 48 เป็น 0.9 ตารางผลการทดลองผลของความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ แสดงในภาคผนวก จ

ศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในภาวะการบ่มเพาะ (incubation) ที่มีการผสมพาราไนโตรฟีนอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกับภาวะการบ่มเพาะที่ไม่มีการผสมพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217

เมื่อทำการทดสอบการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217 ในสองภาวะ ได้แก่ ภาวะที่มีการเตรียมเซลล์โดยการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น จากนั้นผสมพาราไนโตรฟีนอล 0.1 มิลลิโมลาร์แล้วนำไปบ่มต่ออีก 3 ชั่วโมงก่อนการนำเซลล์มาใช้ศึกษาการย่อยสลาย และภาวะที่ไม่มีการผสมพาราไนโตรฟีนอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น ผลการทดสอบสำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217 พบว่าในภาวะที่มีการเตรียมเซลล์โดยการบ่มเชื้อด้วยอาหารที่มีพาราไนโตรฟีนอลผสม แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ที่ใช้ทดสอบได้เร็วกว่าภาวะที่ไม่มีการผสมพาราไนโตรฟีนอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้บ่มเพาะเชื้อ โดยสายพันธุ์ AS107 ที่บ่มเชื้อด้วยอาหารที่มีพาราไนโตรฟีนอลผสม จะสามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ได้หมดภายในเวลา 18 วัน ตรวจพบว่าพาราไนโตรฟีนอลเริ่มลดปริมาณลงอย่างชัดเจนในวันที่ 12 ของการทดสอบ สำหรับภาวะที่ไม่มีการผสมพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้บ่มเชื้อเพื่อเตรียมเซลล์ สายพันธุ์ AS107 จะสามารถย่อยพาราไนโตรฟีนอลหมดในวันที่ 25 ของการทดสอบ โดยพาราไนโตรฟีนอลเริ่มลดปริมาณลงอย่างชัดเจนในวันที่ 18 ของการทดสอบ ในกรณีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS217 ที่บ่มเชื้อด้วยอาหารที่มีพาราไนโตรฟีนอลผสม จะสามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ได้หมดภายในเวลา 23 วัน โดยพาราไนโตรฟีนอลเริ่มลดปริมาณลงอย่างชัดเจนในวันที่ 19 ของการทดสอบ ส่วนในภาวะที่ไม่มีการผสมพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้บ่มเชื้อเพื่อเตรียมเซลล์ สายพันธุ์ AS107 จะสามารถย่อยพาราไนโตรฟีนอลหมดในวันที่ 25 ของการทดสอบ โดยพาราไนโตรฟีนอลเริ่มลดปริมาณลงอย่างชัดเจนในวันที่ 19 ของการทดสอบ (รูปที่ 14) ตารางผลการทดลองแสดงในภาคผนวก จ



รูปที่ 14 กราฟแสดงความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ MBH โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107(ก) และสายพันธุ์ AS217(ข) ที่ผสมพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเพาะเชื้อและไม่ได้ผสมพาราไนโตรฟีนอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเพาะเชื้อ

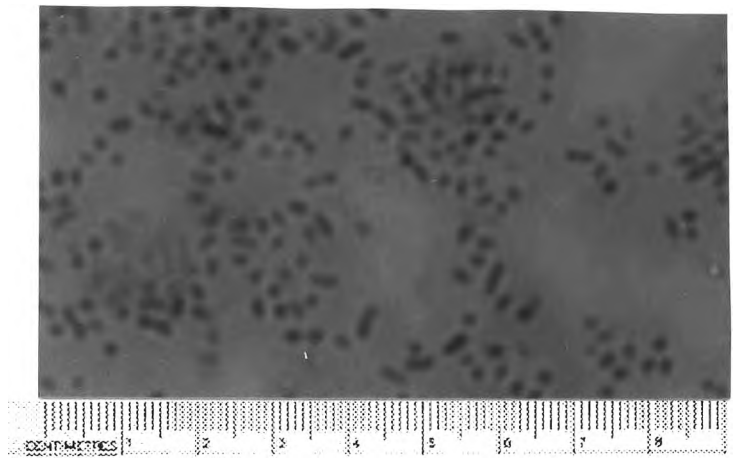
จำแนกและตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217

จากการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยจำแนกถึงระดับจีนัส จากการทดสอบดังที่กล่าวมานั้น พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217 จัดอยู่ในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ซึ่งตาม Bergey'S Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition (1994) ระบุว่าเป็นแบคทีเรียพวกแกรมลบ ที่มีรูปร่างแท่งโค้ง ขนาดตั้งแต่ 0.5-1.0 x 1.5-5.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ เนื่องจากมี polar flacgella และเป็นแบคทีเรียพวกใช้ออกซิเจน(Aerobic) โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเคดรอน ในบางสายพันธุ์สามารถใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเลคดรอน และมีบางชนิดที่เจริญได้ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะที่เป็นกรด มีหลายสปีชีส์ที่สะสม β-hydroxybutyrate ที่ปรากฏในรูปของ sudanophilic inclusions ไม่ผลิต prosthecae และไม่มี sheaths ล้อมรอบ สมบัติเฉพาะของ *Pseudomonas* sp. คือสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและตัวให้อิเลคตรอนในการสร้างพลังงานได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังสามารถสร้างกรดจากน้ำตาลได้ ถิ่นที่พบ *Pseudomonas* sp. ได้แก่ ในน้ำและดิน (Pelczar, 1986) รายละเอียดการทดสอบแสดงในตารางที่ 6 ลักษณะของโคโลนีและภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์การย้อมติดสีแกรมลบของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217 แสดงในรูปที่ 15 - 18

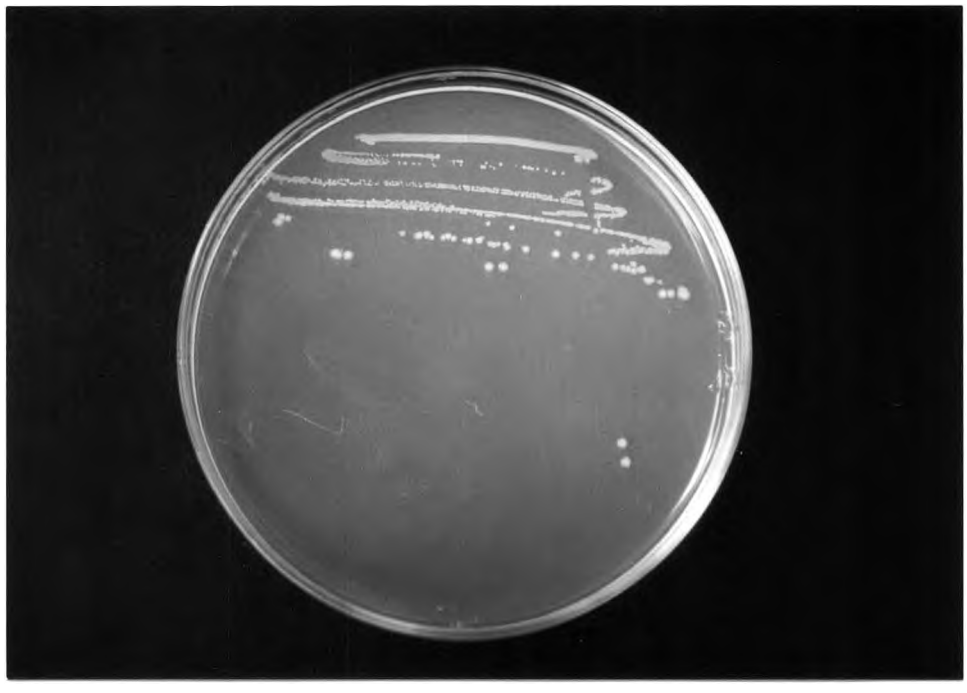
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 กับ *Pseudomonas* sp. ตามรายละเอียดอธิบายใน Bergy's Manual of Systematic Bacteriology

สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรมและรูปร่างเซลล์	การทดสอบการเคลื่อนที่	ปฏิกิริยาชีวเคมี								
				สร้างคะตะเลส	สร้างออกซิเดส	การทดสอบการสร้างอินโดล	การสร้างยูรีเอส	การใช้ไนเตรท	การใช้ซิเตรท	การสร้างเจลาติเนส	การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์	การทดสอบความสามารถของการใช้น้ำตาล
AS107	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ เป็นเมือก	แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
AS217	โคโลนีสีครีม ขอบนูน เป็นเมือก	แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Pseudomonas sp.	มีความหลากหลายของสีโคโลนี เช่น สีเหลือง, เขียว, ครีม,น้ำตาล ขอบเป็นหยักหรือเรียบ	แกรมลบ รูปร่างท่อน	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+

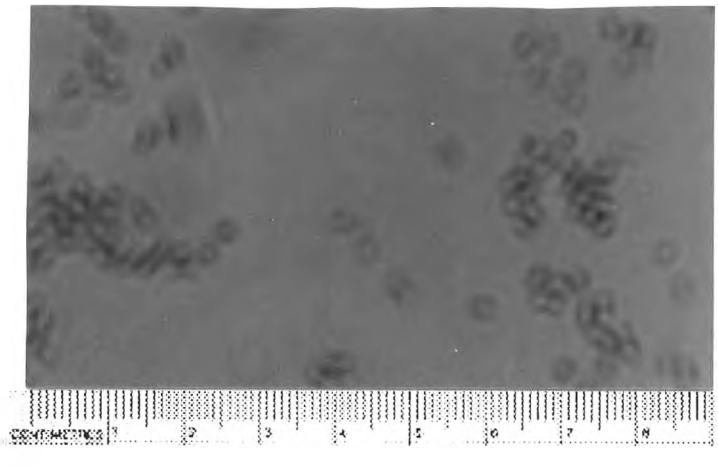
รูปที่ 15 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB



รูปที่ 16 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (X300 เท่า)แสดงลักษณะแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 อายุ 24 ชั่วโมง โดยย้อมติดสีแกรมลบ



รูปที่ 17 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS 217 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB



รูปที่ 18 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (X300 เท่า)แสดงลักษณะแบคทีเรียสายพันธุ์ AS217 อายุ 24 ชั่วโมง โดยย้อมติดสีแกรมลบ

การนำแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งของโรงงานฟอกย้อม

เมื่อทำการทดลองนำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ AS107 และ AS217 และแบคทีเรียผสมระหว่างสองสายพันธุ์ดังกล่าวมาเติมในน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกย้อม เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกย้อมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ลงไป ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าซีโอดีและปริมาณพาราไนโตรฟีนอล

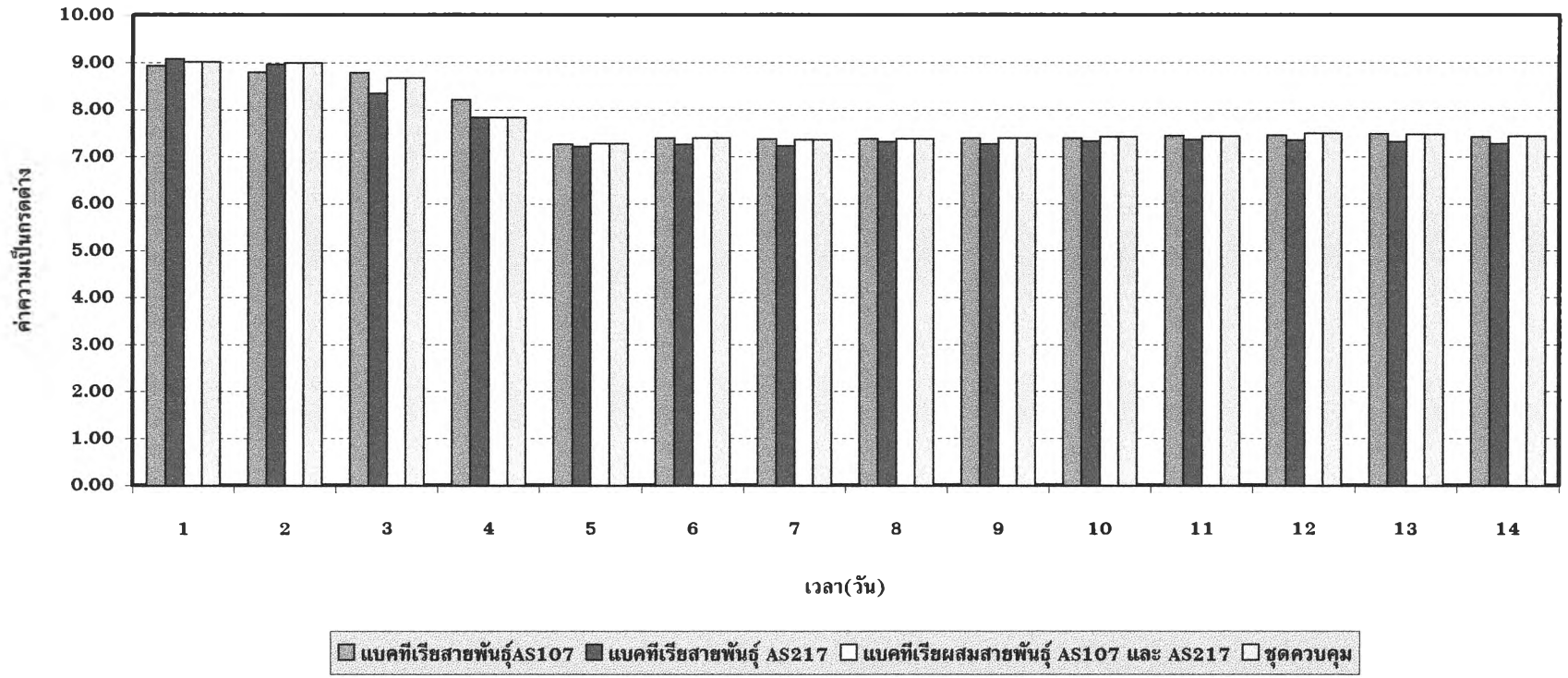
ค่าความเป็นกรดด่างในน้ำทิ้งของชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107, AS217 แบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AS107 และ AS217 พบว่าในทั้ง 3 ชุดทดลอง ค่าความเป็นกรดด่างมีค่าลดลง จากช่วงที่เป็นด่างจนเป็นกลาง ตลอดระยะเวลา 14 วัน(รูปที่ 19) ในชุดที่มีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 ค่าความเป็นกรดด่างในวันที่ 1 เป็น 8.93 และในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองเป็น 7.42 ชุดที่มีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS217 ค่าความเป็นกรดด่างในวันที่ 1 เป็น 9.08 และในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองเป็น 7.29 ชุดที่มีการเติมแบคทีเรียผสมสองสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ค่าความเป็นกรดด่างในวันที่ 1 เป็น 9.02 และในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองเป็น 7.44 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าในชุดควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในวันที่ 1 เป็น 9.01 และในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองเป็น 7.35 (ภาคผนวก จ) เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียและชุดควบคุมในแต่ละช่วงเวลาทดลอง จะไม่แตกต่างกันมากนัก

ค่าซีโอดีในน้ำทิ้งของชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107, AS217, แบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AS107 และ AS217 มีค่าลดลงตลอดช่วงระยะเวลาทดลอง 14 วัน (รูปที่ 21) ในชุดที่มีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 ค่าซีโอดีในวันที่ 1 เป็น 326 มิลลิกรัมต่อลิตร และในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองลดลงเป็น 27 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดที่มีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS217 ค่าซีโอดีในวันที่ 1 เป็น 376 มิลลิกรัมต่อลิตร และในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองลดลงเป็น 53 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดที่มีการเติมแบคทีเรียสองสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ค่าซีโอดีในวันที่ 1 เป็น 295 มิลลิกรัมต่อลิตรและในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองลดลงเป็น 37 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าในชุดควบคุมค่าซีโอดีในวันที่ 1 เป็น 287 มิลลิกรัมต่อลิตร และในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองลดลงเป็น 68 มิลลิกรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีของแต่ละชุดทดลอง คิดเป็น ร้อยละ 92 ร้อยละ 81 ร้อยละ 87 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมี

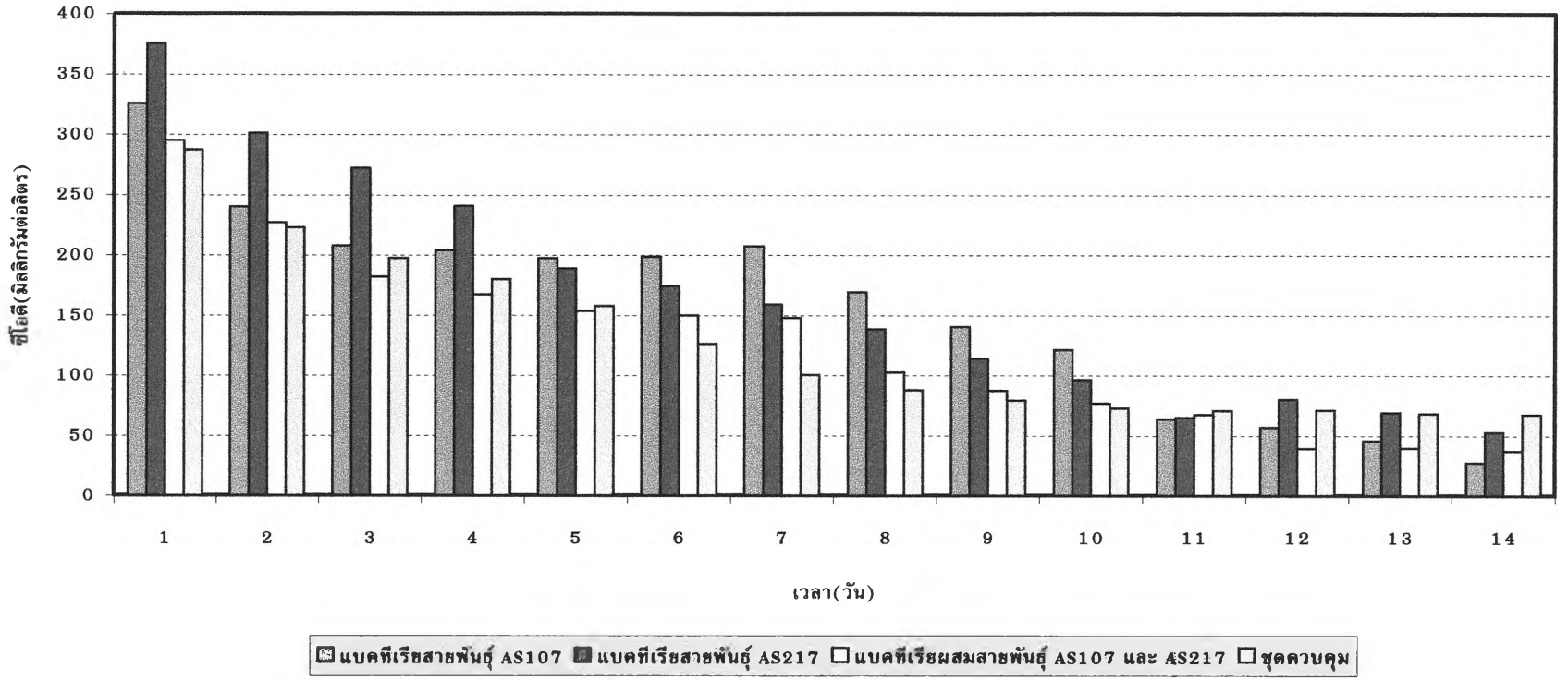
ประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีลงได้ร้อยละ 79 ซึ่งเป็นประสิทธิภาพต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองทั้ง 3 ชุด ภาคผนวก จ แสดงการเปรียบเทียบค่าซีโอดีของทุกชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียและชุดควบคุมในแต่ละช่วงเวลาทดลองเดียวกัน ในช่วง 10 วันแรก ชุดทดลองจะมีค่าซีโอดีสูงกว่าชุดควบคุม แต่เมื่อภายหลังชุดทดลองจะมีค่าซีโอดีต่ำกว่าชุดควบคุม เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดลงของซีโอดีในชุดทดลองพบว่า ในวันที่ 12 การใช้แบคทีเรียผสมสามารถลดค่าซีโอดีในน้ำทิ้งได้มากที่สุด ชุดที่เติมแบคทีเรีย AS107 มีประสิทธิภาพรองลงมาและดีกว่าชุดที่เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS217

ปริมาณพาราไนโตรฟีนอลในน้ำทิ้งของชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107, AS217, แบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AS107 และ AS217 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในชุดทดลองกับชุดควบคุมมีแตกต่างกัน (รูปที่ 22) ชุดทดลองเติมแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AS107 และ AS217 เป็นชุดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดพาราไนโตรฟีนอล โดยพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มลดปริมาณลง ตั้งแต่วันที่ 8 ของการทดลอง จากนั้นในวันที่ 13 ของการทดลอง ตรวจไม่พบพาราไนโตรฟีนอลตกค้างในน้ำทิ้งของชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AS107 และ AS217 สำหรับชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS217 ก็สามารถกำจัดพาราไนโตรฟีนอลในน้ำทิ้งให้หมดไปในวันที่ 13 ของการทดลองเช่นเดียวกัน แต่การย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลจะเริ่มขึ้นในวันที่ 10 ของการทดลอง ซึ่งช้ากว่าชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียผสม ในวันที่ 14 วันซึ่งเป็นวันสิ้นสุดการทดลอง ตรวจไม่พบพาราไนโตรฟีนอลตกค้างในน้ำทิ้งของชุดทดลองทุกชุด ในขณะที่ชุดควบคุมยังคงมีพาราไนโตรฟีนอลตกค้างอยู่ 0.005 มิลลิโมลาร์ จากปริมาณที่มีอยู่เดิมในวันที่ 1 ของการทดลอง 0.01 มิลลิโมลาร์ นับได้ว่าชุดควบคุม มีมีประสิทธิภาพในการลดพาราไนโตรฟีนอลลงเพียงร้อยละ 43 เท่านั้น ในขณะที่ชุดทดลองทุกชุดมีประสิทธิภาพร้อยละ 100

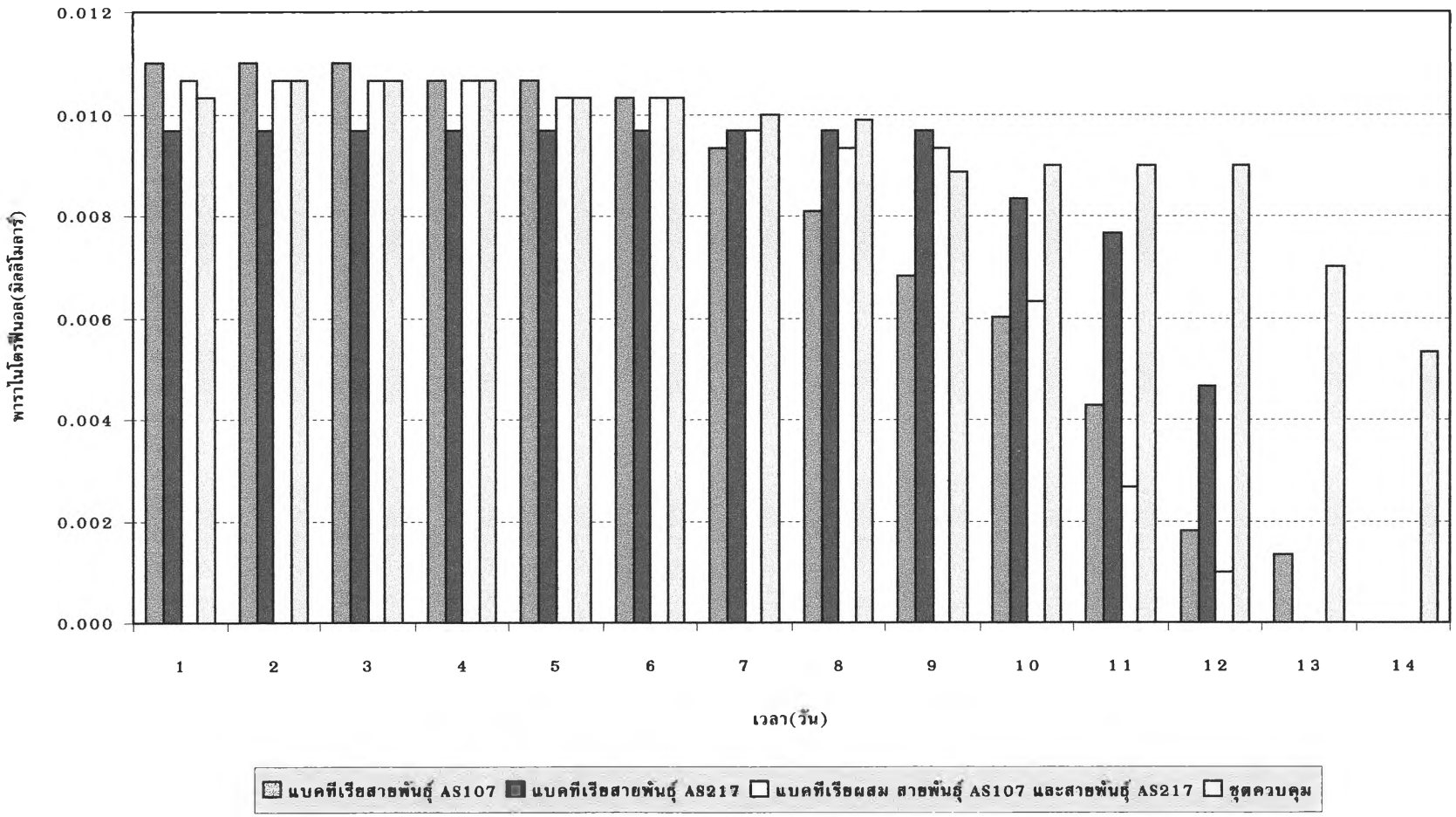
เมื่อทำการทดสอบทางสถิติ (ภาคผนวก ฉ) พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างและการเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดีของแต่ละชุดทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ตกค้างในน้ำทิ้งของแต่ละชุดทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชุดที่เติมแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AS107 และ AS217 เป็นชุดที่กำจัดพาราไนโตรฟีนอลได้ดีที่สุด



รูปที่ 19 กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของน้ำทิ้งโรงงานฟอกย้อม เมื่อเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107, AS217, แบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AS107, AS217 และชุดควบคุมตลอดระยะเวลา 14 วันของการทดลอง



รูปที่ 20 กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดีของน้ำทิ้งโรงงานฟอกย้อม เมื่อเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107, AS217, แบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AS107, AS217 และชุดควบคุม ตลอดระยะเวลา 14 วันของการทดลอง



รูปที่ 21 กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ตกค้างในน้ำทิ้งโรงงานฟอกย้อม เมื่อเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107, AS217, แบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AS107, AS217 และชุดควบคุม ตลอดระยะเวลา 14 วันของการทดลอง