บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การพัฒนาวิธีติดตามประชากรของ *Acinetobacter* sp.

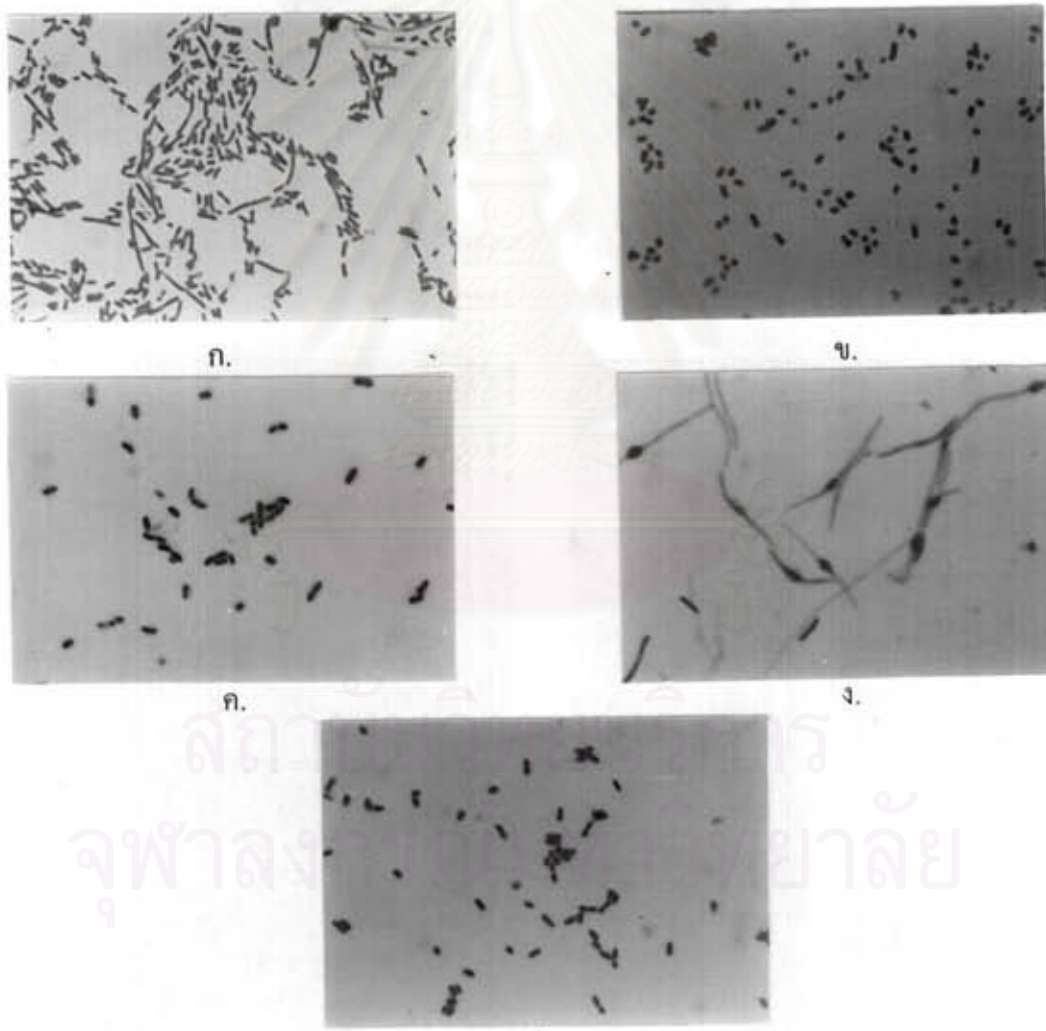
เนื่องจากระบบบำบัดน้ำเสียมีจุลินทรีย์อยู่อย่างหนาแน่นการติดตามประชากรของ *Acinetobacter* sp. จึงถูกรบกวนด้วยจุลินทรีย์อื่นๆ แม้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะสำหรับ *Acinetobacter* sp. คือ Herellea agar ก็ยังพบว่ามีเชื้ออื่นๆอีกมากมายขึ้นได้ และบางชนิดยังให้โคโลนีสีม่วงบน Herellea agar เหมือนกับ *Acinetobacter* sp. เพื่อให้การติดตามประชากร *Acinetobacter* sp. เป็นไปได้ง่ายขึ้นจึงพยายามพัฒนาอาหาร Herellea agar สำหรับติดตาม *Acinetobacter* sp. ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยใช้คุณสมบัติของ *Acinetobacter* sp. ที่ทนยาปฏิชีวนะบางชนิดได้โดยคัดเลือกยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ของระบบบำบัดแต่ไม่มีผลต่อ *Acinetobacter* sp.

4.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นประชากรหลักจากถังบำบัดชนิดให้อากาศของระบบ Three-Stage Phoredox

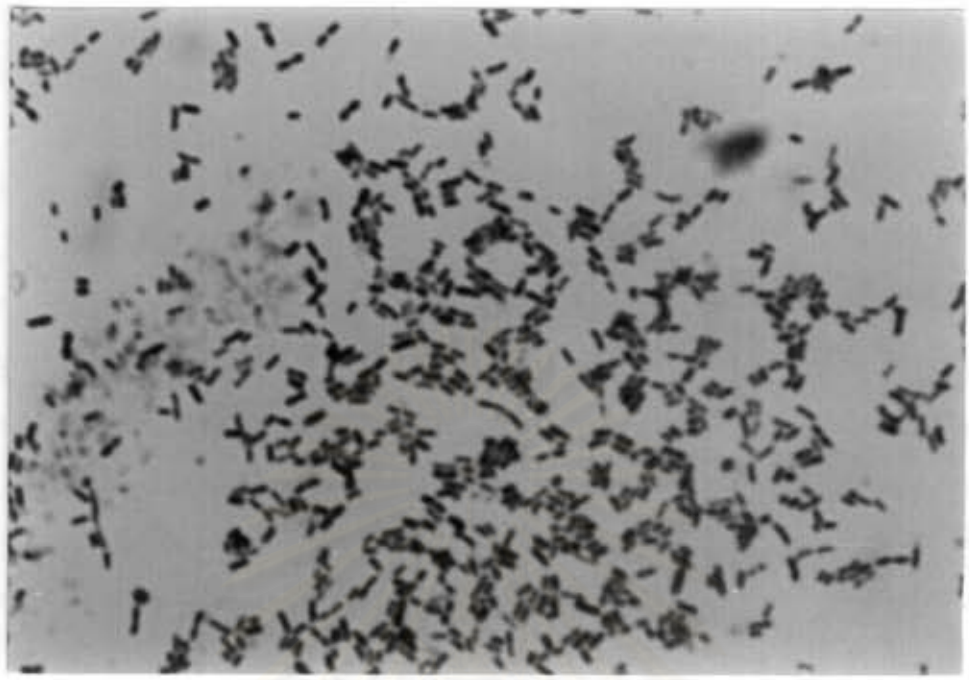
เนื่องจาก *Acinetobacter* sp. มีคุณสมบัติทนยาเพนนิซิลลินได้ จึงใช้อาหารแข็ง Herellea plus Pen G ในการแยกเชื้อแบคทีเรียจากถังบำบัดชนิดให้อากาศ พบลักษณะจุลินทรีย์แตกต่างกัน 5 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 10 เชื้อหมายเลข 6 เป็นเชื้อ *Acinetobacter* sp. TISTR 160 ย้อมติดสีแกรมลบ มักจะพบเป็นคู่ดังแสดงในรูปที่ 11 และลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง Herellea plus Pen G เมื่อบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมงจะให้สีม่วง และเมื่อบ่มต่อไปเป็นเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มดังแสดงในรูป ที่ 12 แบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดนี้ทนต่อยาเพนนิซิลลินได้ดีเช่นเดียวกับ *Acinetobacter* sp. จึงจำเป็นต้องนำไปทดสอบหายาปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อทั้ง 5 ชนิดนี้โดยไม่มีผลต่อ *Acinetobacter* sp. ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงความแตกต่างที่สังเกตได้ของแบคทีเรียที่แยกจากถังเติมอากาศ

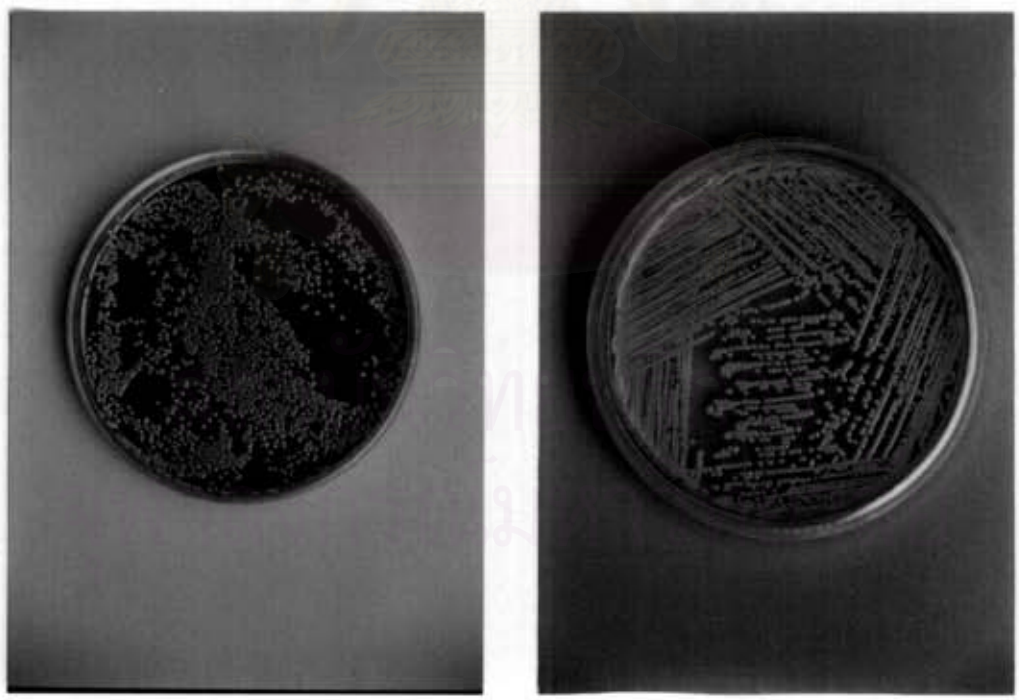
หมายเลข	สีโคโลนี	ขนาด(มม.)	motility	Oxidase	Catalase	แกรม
1	เหลือง	10	ไม่เคลื่อนที่	ผลลบ	ผลบวก	ลบ
2	ขาว	3	ไม่เคลื่อนที่	ผลลบ	ผลบวก	ลบ
3	ครีม	2.5	ไม่เคลื่อนที่	ผลลบ	ผลบวก	ลบ
4	เหลือง	3	ไม่เคลื่อนที่	ผลลบ	ผลบวก	ลบ
5	ขาว	1	ไม่เคลื่อนที่	ผลลบ	ผลบวก	ลบ
6	ม่วง	2.5	ไม่เคลื่อนที่	ผลลบ	ผลบวก	ลบ



รูปที่ 10 ลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากถังเติมอากาศเมื่อย้อมด้วยสีแกรม หมายเลข 1 (ก) หมายเลข 2 (ข) หมายเลข 3 (ค) หมายเลข 4 (ง) หมายเลข 5 (จ) อายุ 18 ชั่วโมง ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 11 ลักษณะรูปร่างของ *Acinetobacter* sp. TISTR 160 เมื่อย้อมด้วยสีแกรม อายุ 18 ชั่วโมง ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า



ก. ข.

รูปที่ 12 ลักษณะโคโลนีของ *Acinetobacter* sp. TISTR 160 บนอาหารแข็ง Herellea plus Pen G
ก. หลังบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ข. หลังบ่มมากกว่า 24 ชั่วโมง

4.1.2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกได้จากถังให้อากาศและ *Acinetobacter* sp. TISTR 160

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดทนต่อยาเพนนิซิลลินได้ดีเช่นเดียวกับ *Acinetobacter* sp. ทำให้รบกวนการนับจำนวนโคโลนีของ *Acinetobacter* sp. จึงทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะเพื่อหายาที่ช่วยลดจำนวนเชื้อรบกวนเพื่อเติมในส่วนประกอบของอาหารแข็ง Herellea plus Pen G เพื่อความสะดวกในการติดตามจำนวน *Acinetobacter* sp. ผลการทดลองพบว่ามียาปฏิชีวนะ 4 ชนิดที่เชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดไวต่อการทดสอบ ในขณะที่ *Acinetobacter* sp. สามารถต้านต่อยานั้นได้ ได้แก่ Norfloxacin, Chloramphenicol, Nitrofurantoin และ Trimethoprim ผสมกับ Sulfamethoxazole (SXT) ดังแสดงในตารางที่ 4 ยา Chloramphenicol อยู่ในรูปยาฉีดและราคาถูกจึงเลือกยา Chloramphenicol เพื่อเติมในส่วนประกอบของอาหารแข็ง Herellea plus Pen G เพื่อความประหยัดและความสะดวกในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และจะเรียกอาหารชนิดนี้ว่า Herellea plus Pen G&C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกได้จากถังเติมอากาศระบบบำบัด Three-Stage Phoredox และ *Acinetobacter* sp. TISTR 160

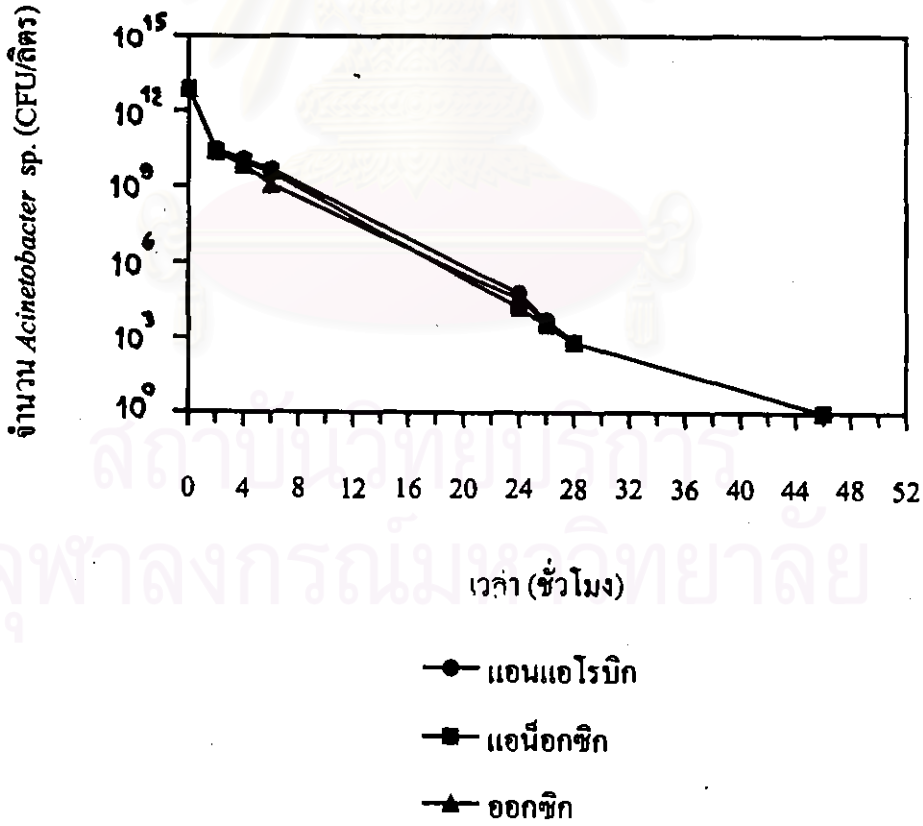
ชื่อยา	หมายเลข 1	หมายเลข 2	หมายเลข 3	หมายเลข 4	หมายเลข 5	หมายเลข 6
Amikacin	S	S	S	S	S	S
Norfloxacin	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**
Cefoperazone	S	S	S	S	S	S
Chloramphenicol	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**
Ampicillin	R	R	R	R	R	R
Erythromycin	S	R	R	R	S	S
Nitrofurantoin	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**
Cefamandole	R	S	S	S	S	R
Tetracycline	S	S	S	S	S	S
Ceftazidime	S	S	S	S	S	S
Augmentin	S	S	S	R	S	S
Cefotaxime	S	S	S	S	S	S
Kanamycin	S	S	S	S	S	S
Clindamycin	R	R	R	R	R	R
Ceftriaxone	S	S	S	S	S	S
Vancomycin	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacin	S	S	S	S	S	S
Penicillin	R	R	R	R	R	R
Gentamycin	S	S	S	S	S	S
SXT	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**
Netilmicin	S	S	S	S	S	S
Oxacillin	R	R	R	R	R	R
Imipenem	S	S	S	S	S	S

S = ไม่สามารถทนยาปฏิชีวนะ

R = ทนต่อยาปฏิชีวนะ

4.2 การติดตามประชากรของ *Acinetobacter* sp. จากระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเค็ม

หลังจากเติมเชื้อ *Acinetobacter* sp. ลงในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเค็ม แล้วทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียหลังจากเติมเชื้อ 2, 4, 6 ชั่วโมง มาเพาะเชื้อในอาหารแข็ง Herellea plus Pen G&C พบว่า *Acinetobacter* sp. มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วทั้งถังแอนแอโรบิก ถังแอนอ็อกซิก และถังออกซิก จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 7.1×10^{12} เซลล์/ลิตร ในแต่ละถังลดลงเหลือ 3.0×10^{10}, 1.2×10^{10}, 4.7×10^{9}, 6.2×10^{4}, 5.2×10^{3}, 6.6×10^{2} เซลล์/ลิตร ในถังแอนแอโรบิก ลดลงเหลือ 2.4×10^{10}, 9.2×10^{9}, 3.6×10^{9}, 1.7×10^{4}, 3.3×10^{3}, 6.6×10^{2} เซลล์/ลิตร ในถังแอนอ็อกซิก และลดลงเหลือ 2.5×10^{10}, 6.8×10^{9}, 1.2×10^{9}, 3.7×10^{4}, 4.6×10^{3}, 6.6×10^{2} เซลล์/ลิตร ในถังออกซิกในชั่วโมงที่ 2, 4, 6, 24, 26, 28 ตามลำดับและไม่พบเชื้อ *Acinetobacter* sp. ในระบบเมื่อเก็บตัวอย่างน้ำในชั่วโมงที่ 46 หลังเติมเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 13 *Acinetobacter* sp. ค่อยๆลดจำนวนลง เพราะภาวะบางอย่างอาจไม่เหมาะสม ซึ่งจะได้ทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 13 กราฟแสดงการลดจำนวนลงของ *Acinetobacter* sp. ในถังแอนแอโรบิก ถังแอนอ็อกซิก ถังออกซิก

4.3 พารามิเตอร์ต่างๆของระบบหลังการเติม *Acinetobacter* sp.

หลังจากเติม *Acinetobacter* sp. ลงในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเค็ม โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มี NaCl 2 % ฟอสฟอรัส 15 มก./ล. ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 มีค่า COD จากกลูโคส 350 มก./ล. ค่า COD จากโซเดียมอะซิเตท 150 มก./ล. พารามิเตอร์ต่างๆในถังออกซิกก่อนข้างคงที่หลังจากเดินระบบ 15 วัน โดยปริมาณฟอสฟอรัสในถังแอนแอโรบิกเฉลี่ยในระยะคงตัว (steady state) เท่ากับ 11.42 มก./ล. ถังแอน็อกซิกเท่ากับ 10.16 มก./ล. ถังน้ำออกเท่ากับ 9.71 มก./ล. คิดเป็นประสิทธิภาพการกำจัดฟอสเฟตเท่ากับ 21.4%, 30.1%, 33.2 % ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 14

ปริมาณ COD เฉลี่ยในระยะคงตัวในถังแอนแอโรบิกเท่ากับ 267 มก./ล. ถังแอน็อกซิกเท่ากับ 201 มก./ล. ถังออกซิกเท่ากับ 115 มก./ล. คิดเป็นประสิทธิภาพการกำจัด COD เท่ากับ 43.4%, 57.4%, 75.6% ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 15

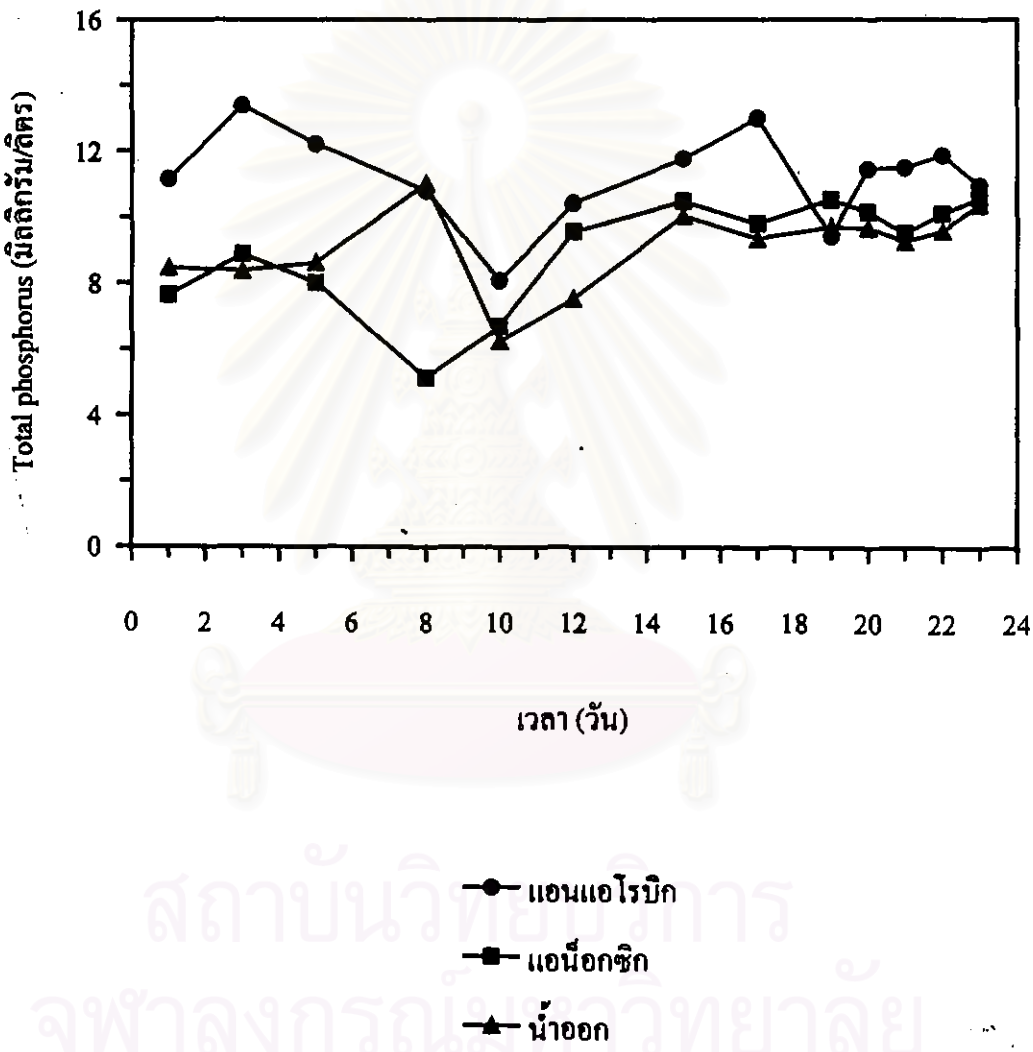
ค่า DO เฉลี่ยของระบบเมื่อเข้าสู่ระยะคงตัวในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก 0.05, 0.06, 3.65 มก./ล. ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 16

ค่า MLSS เฉลี่ยของระบบเมื่อเข้าสู่ระยะคงตัวในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกมีค่าเท่ากับ 2110, 2089, 2033 มก./ล. ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 17

ค่า pH เฉลี่ยของระบบเมื่อเข้าสู่ระยะคงตัวในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกมีค่าเท่ากับ 6.85, 7.64, 7.92 ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 18

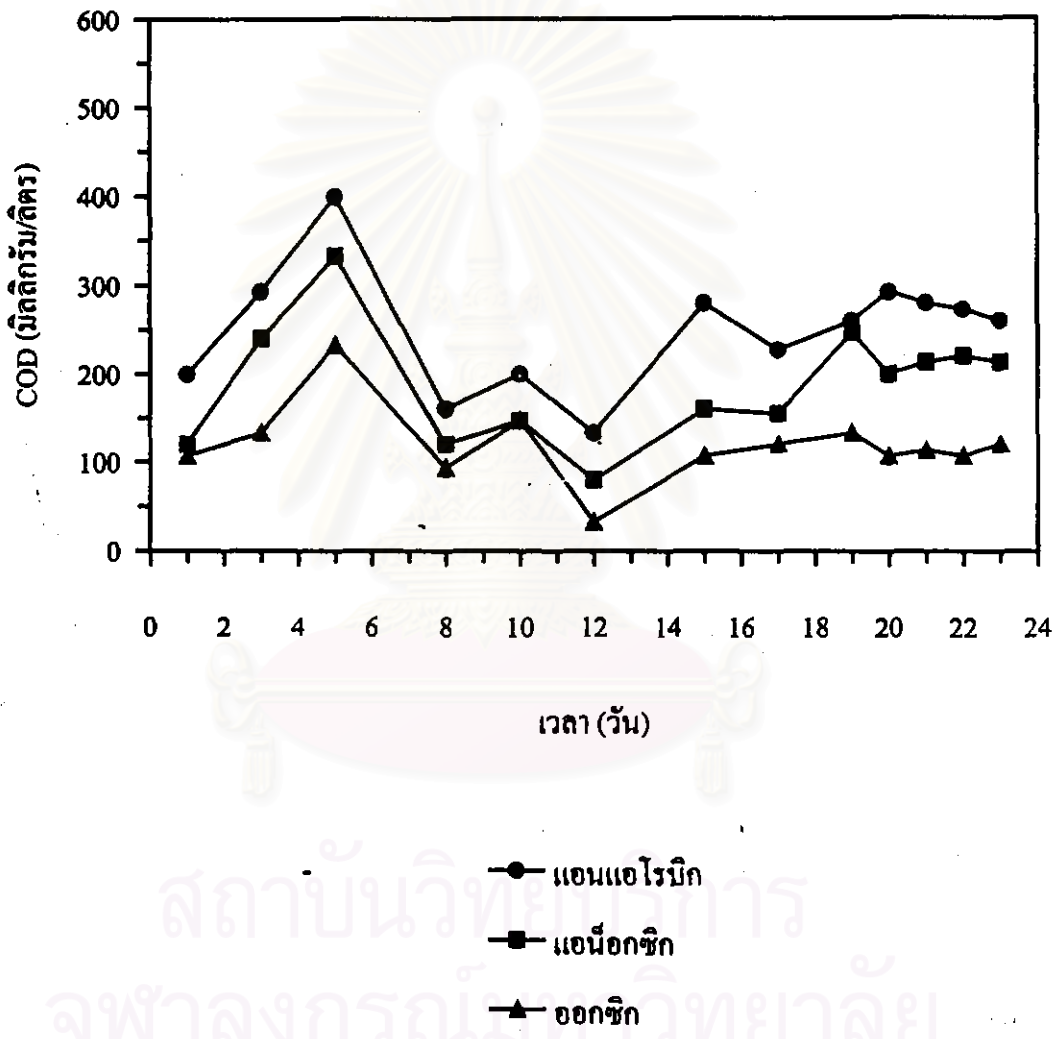
อุณหภูมิเฉลี่ยของระบบเมื่อเข้าสู่ระยะคงตัวในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกมีค่าเท่ากับ 30.9, 31.4, 30.5 องศาเซลเซียสตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 19

ซึ่งจะเห็นได้ว่าระบบยังมีความสามารถกำจัดฟอสฟอรัสได้ต่ำ และในถังแอนแอโรบิกไม่พบว่ามีการปลดปล่อยฟอสเฟตออกมา ซึ่งแสดงว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประชากรหลักนอกจากไม่ใช่ *Acinetobacter* sp. แล้วยังไม่ใช่โพลีฟอสเฟตแบคทีเรียด้วย เมื่อดูความสามารถในการลดค่า COD พบว่าแม้ระบบจะสามารถลดค่า COD ได้ถึง 75.6 % แต่ปริมาณสารอินทรีย์เมื่อคิดเป็นค่า COD แล้วก็ยังสูงถึง 115 มก./ล. ทั้งนี้อาจเนื่องจากภาวะบางอย่างไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Acinetobacter* sp. และโพลีฟอสเฟตแบคทีเรีย ซึ่งจะได้ศึกษาในขั้นต่อไป



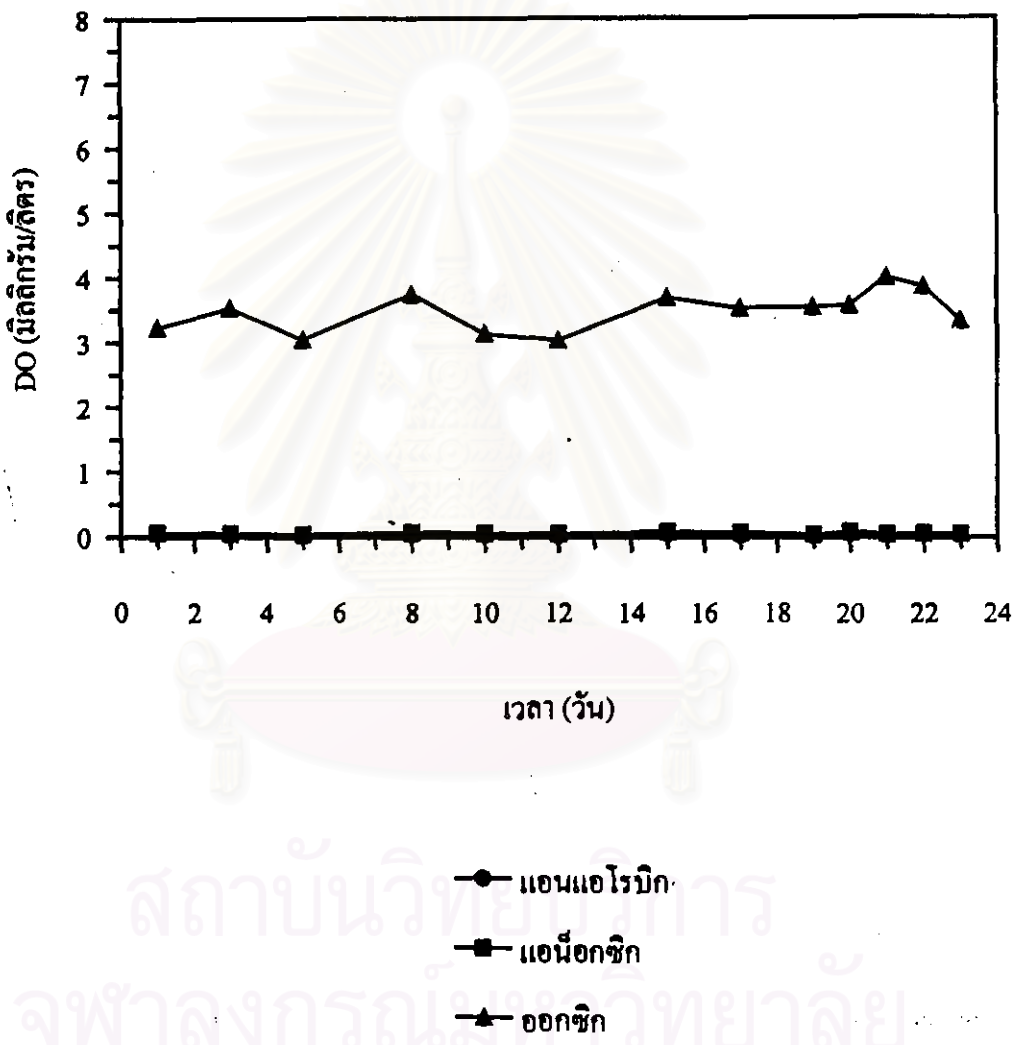
รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงฟอสฟอรัสในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



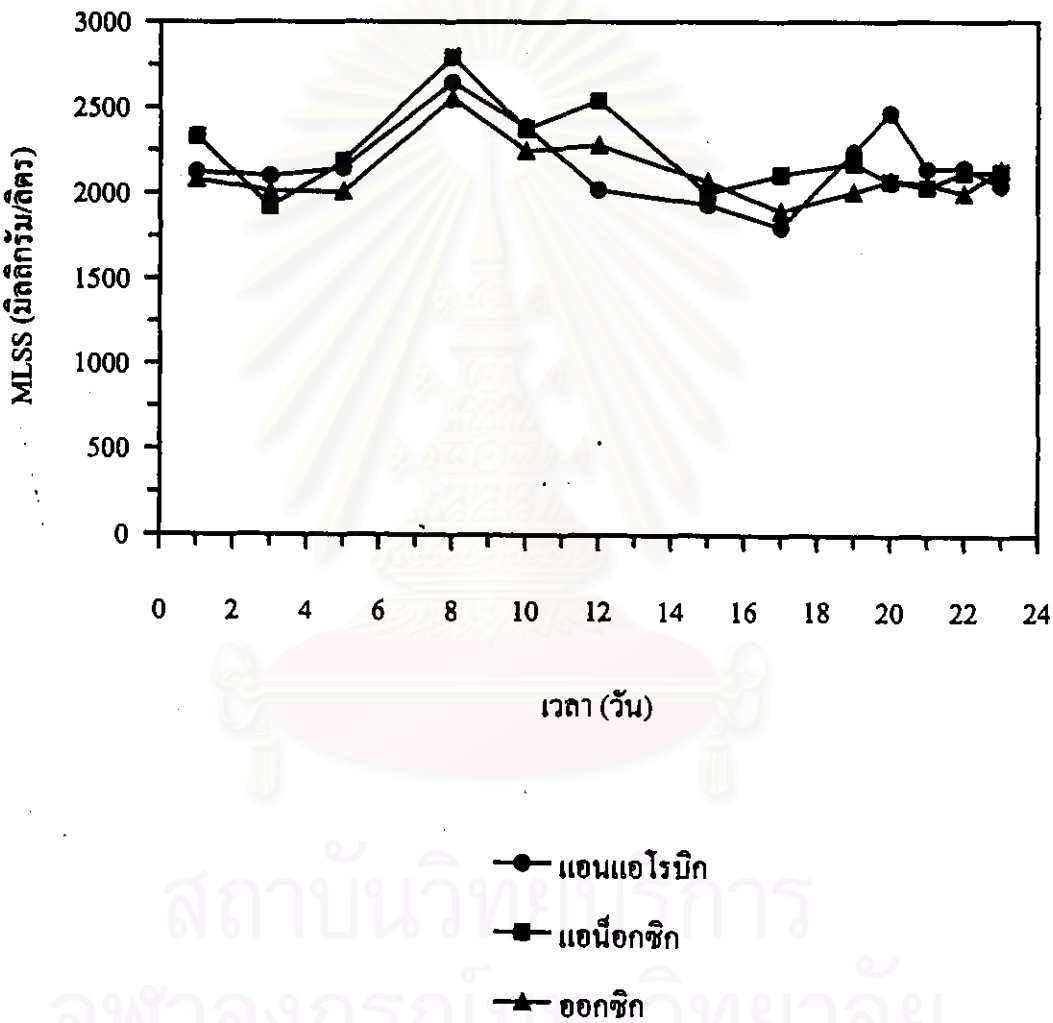
รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของค่า COD ในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก ตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



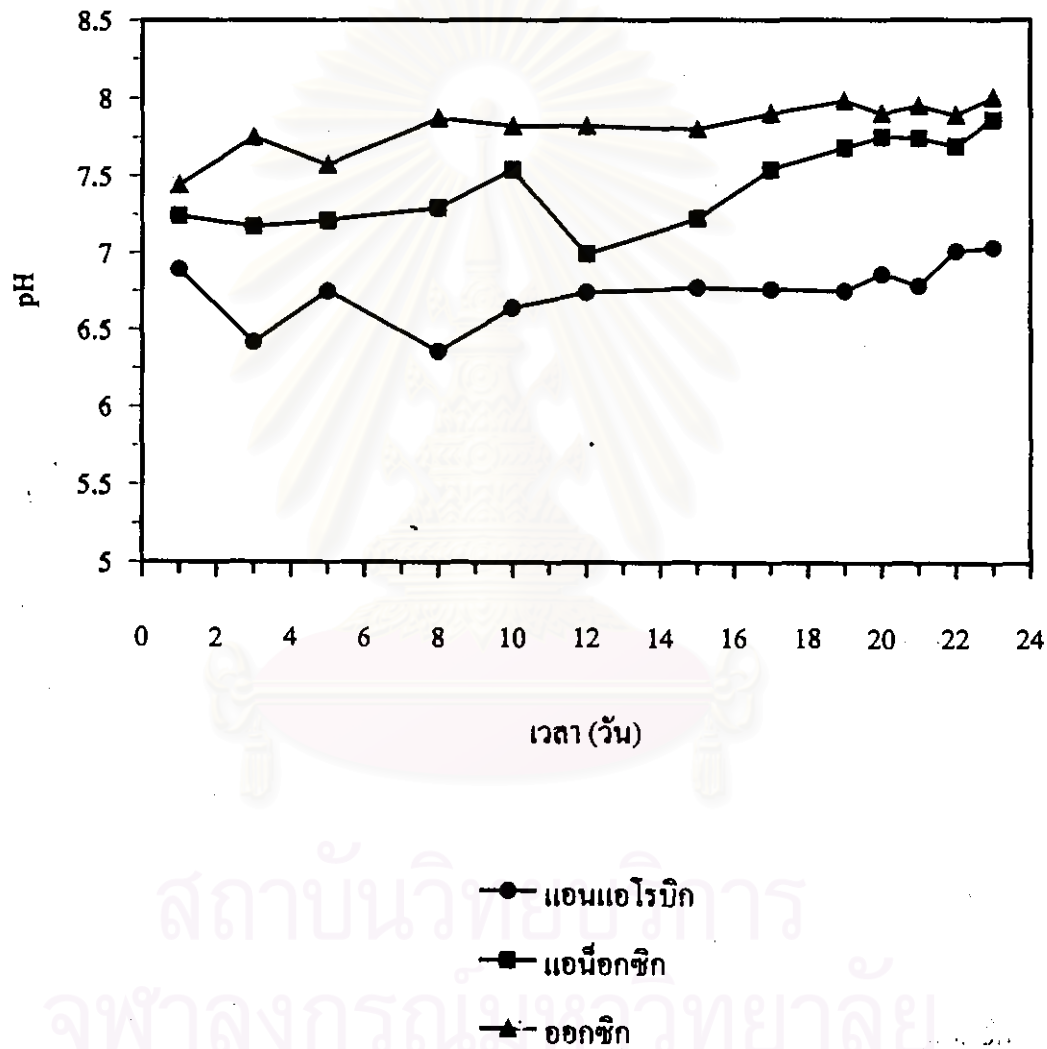
รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลง DOในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก ตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



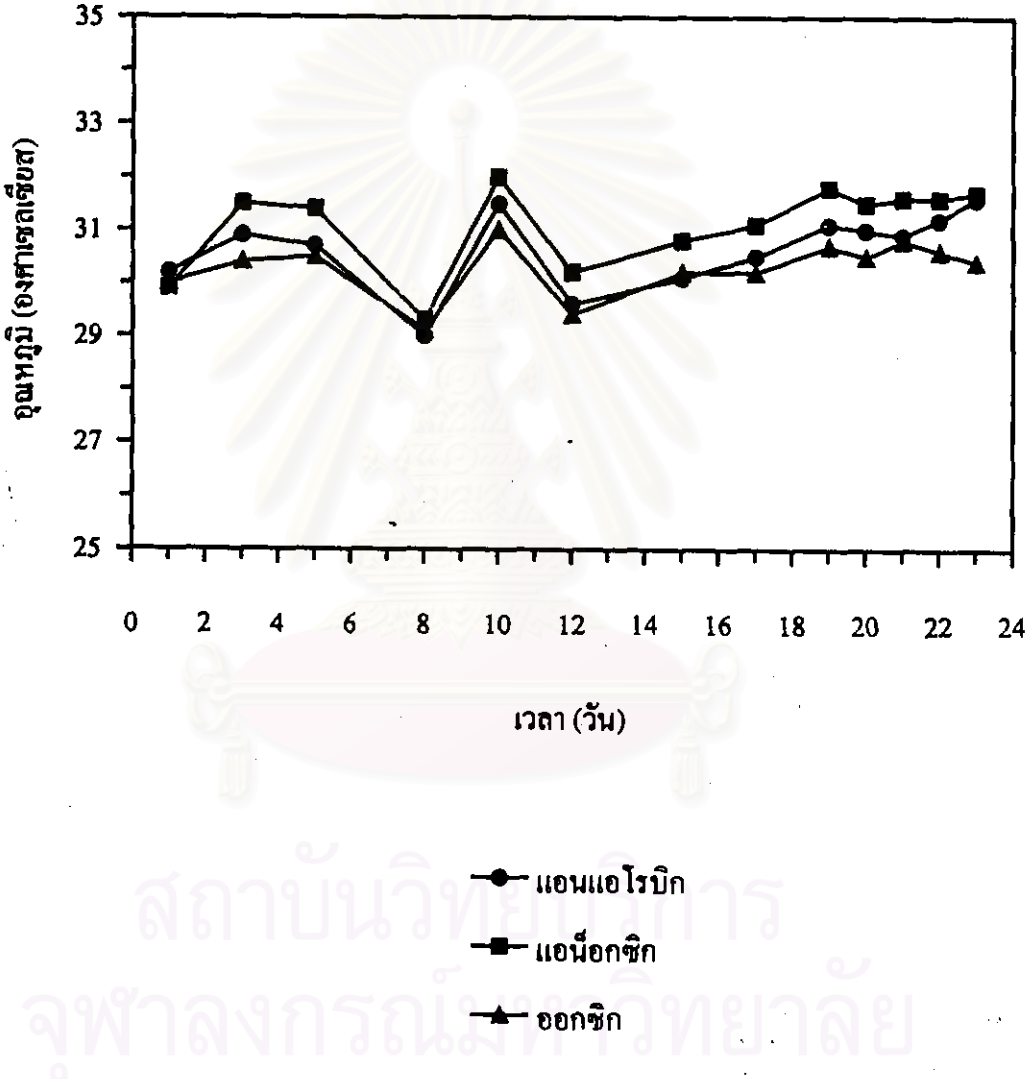
รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงค่า MLSS ในถังแอนแอโรบิก ถังแอนอ็อกซิก ถังออกซิกตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



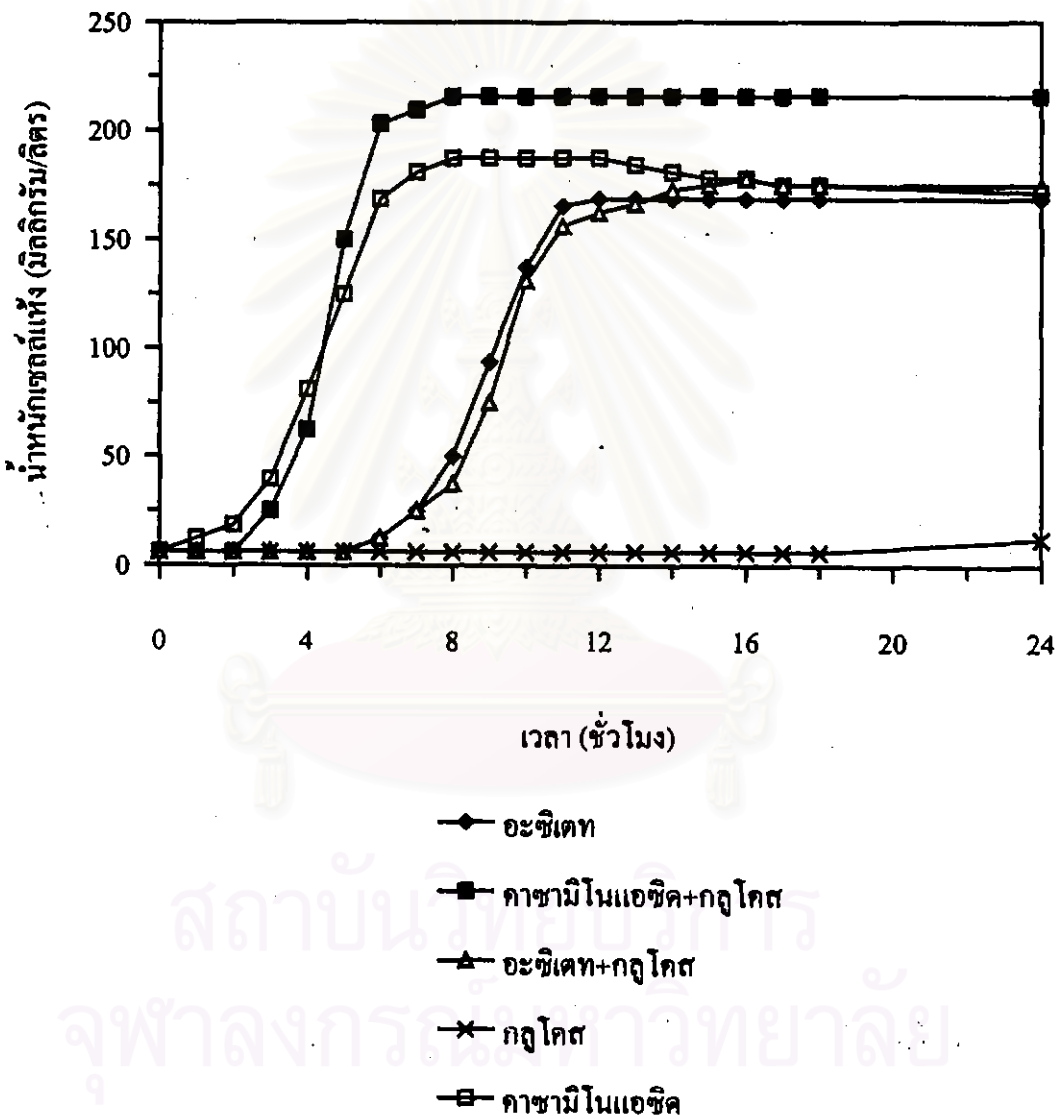
รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของ *Acinetobacter* sp. ในน้ำเสียสังเคราะห์

เลี้ยง *Acinetobacter* sp. ในน้ำเสียสังเคราะห์ตามภาคผนวก ก หมายเลข 7 (ชฎารัตน์ อนันต์, 2540) โดยเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้คาซามิโนแอซิดร่วมกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ลักษณะการเจริญที่มี Lag phase สั้นเพียง 2 ชั่วโมง และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 215.6 มก./ล ในขณะที่เมื่อใช้คาซามิโนแอซิดชนิดเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน ลักษณะการเจริญจะมี Lag phase สั้นมาก น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 187.5 มก./ล. และเมื่อใช้อะซิเตทร่วมกับกลูโคส และอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ลักษณะการเจริญคล้ายกันคือ มี Lag phase ยาว 5 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 175 , 168.8 มก./ล. ตามลำดับ และเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว พบว่าลักษณะการเจริญจะมี Lag phase ยาวมากกว่า 18 ชั่วโมง และสังเกตพบการเจริญได้ในชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 20 และให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ชั่วโมงที่ 40 เท่ากับ 106.3 มก./ล. แสดงว่า *Acinetobacter* sp. เจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้คาซามิโนแอซิดเป็นแหล่งคาร์บอนและเจริญได้พอควรเมื่อใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่เจริญได้ช้ามากเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนที่ *Acinetobacter* sp. สามารถใช้ประโยชน์ได้และเป็นสารในกลุ่มกรดระเหยง่ายที่สามารถพบได้ในธรรมชาติจึงเลือกอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 ลักษณะการเจริญของ *Acinetobacter* sp. เมื่อเจริญในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

4.5 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ต่อการเจริญและการสะสมฟอสเฟตของ *Acinetobacter* sp.

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1(ภาคผนวก ก หมายเลข 8) ซึ่งมี pH เริ่มต้นเป็น 6.0, 6.56, 6.87, 7.13, 7.43 ตามลำดับ พบว่านอกจาก pH เริ่มต้น 6.0 ซึ่งไม่พบการเจริญหลังสังเกตการเจริญกว่า 40 ชั่วโมงแล้ว ทั้งหมดมีรูปแบบการเจริญไม่แตกต่างกันคือ มี Lag phase 5 ชั่วโมง และเข้าสู่ Late log phase ประมาณชั่วโมงที่ 10-12 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 262.5, 184.38, 168.75, 156.25 มก./ล. ตามลำดับโดยพบว่าน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี pH เริ่มต้น 6.56 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งและประสิทธิภาพการกำจัดฟอสเฟตสูงสุด คือ 68% แม้ว่าจะมีการเจริญในระยะต้นช้ากว่าในน้ำเสียสังเคราะห์ pH 6.87, 7.13 และ 7.43 ก็ตาม ประสิทธิภาพการกำจัดฟอสเฟตต่ำสุดในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า pH เริ่มต้น 7.13 คือ 35.2% เมื่อสังเกตค่า pH พบว่าจะเพิ่มขึ้นตามการเจริญและเริ่มมีค่าเท่าๆกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไปรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 21, 22, 23 จากการทดลองจึงเลือกปรับสภาพ pH เริ่มต้นเป็น 6.5 สำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 5 อัตราการกำจัดฟอสเฟตและ% การสะสมฟอสเฟตเมื่อแปรผันค่า pH

pH	TU_m	CDW	PU	%PU	RPU
6.56	24	262.5	17	68	6.48
6.87	14	184.38	13.6	54.4	7.38
7.13	24	168.75	8.8	35.2	5.21
7.43	24	156.25	15.6	62.4	9.98

- น้ำเสียสังเคราะห์มีค่า COD = 3527 มก./ล. เลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส รอบการเขย่า 200 รอบ/นาที ปรับให้มีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน

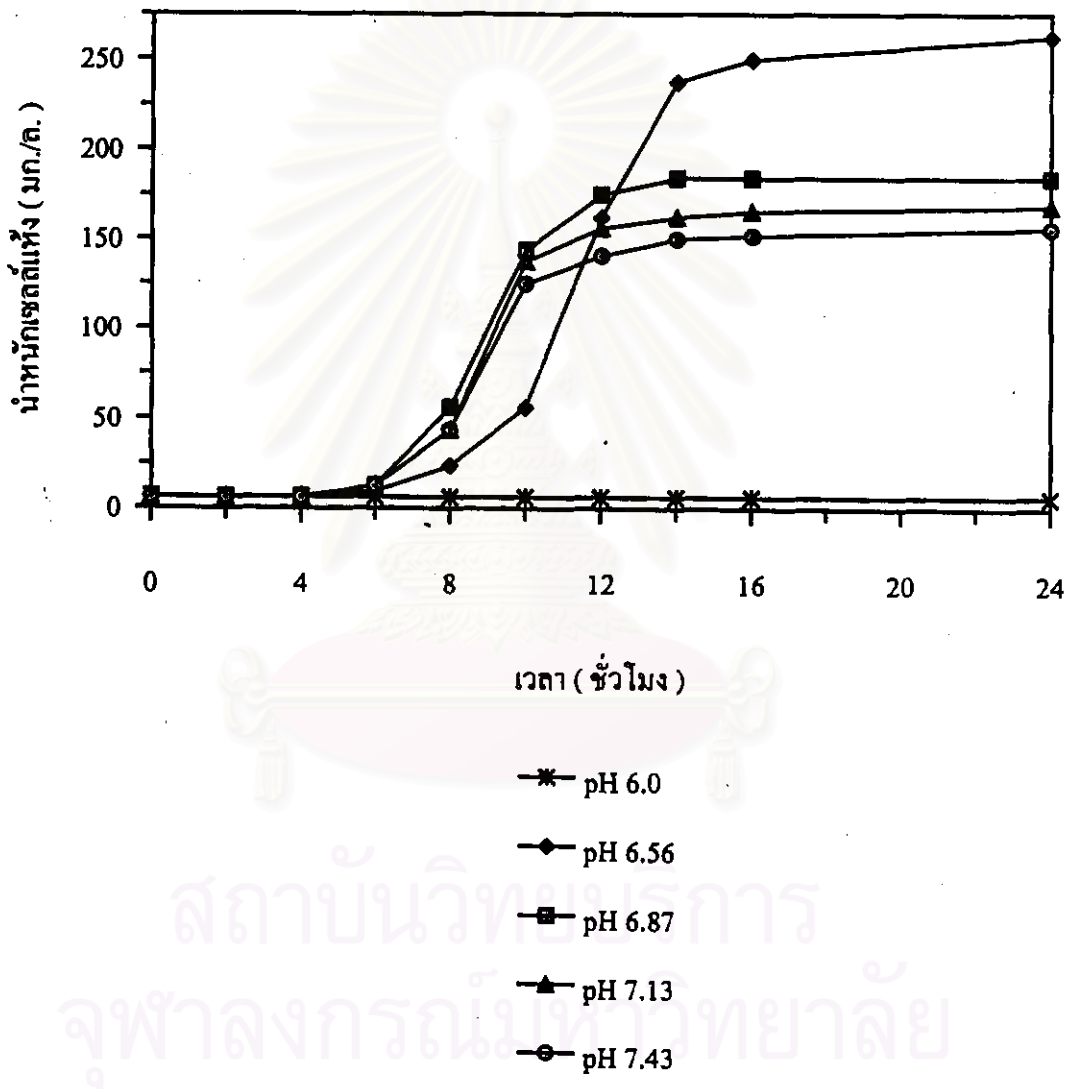
TU_m = Uptake time maximum (ชั่วโมง)

CDW = Cell dry weight (มก./ล.)

PU = Phosphate uptake (PO_4initial - PO_4TU_m) (มก./ล.)

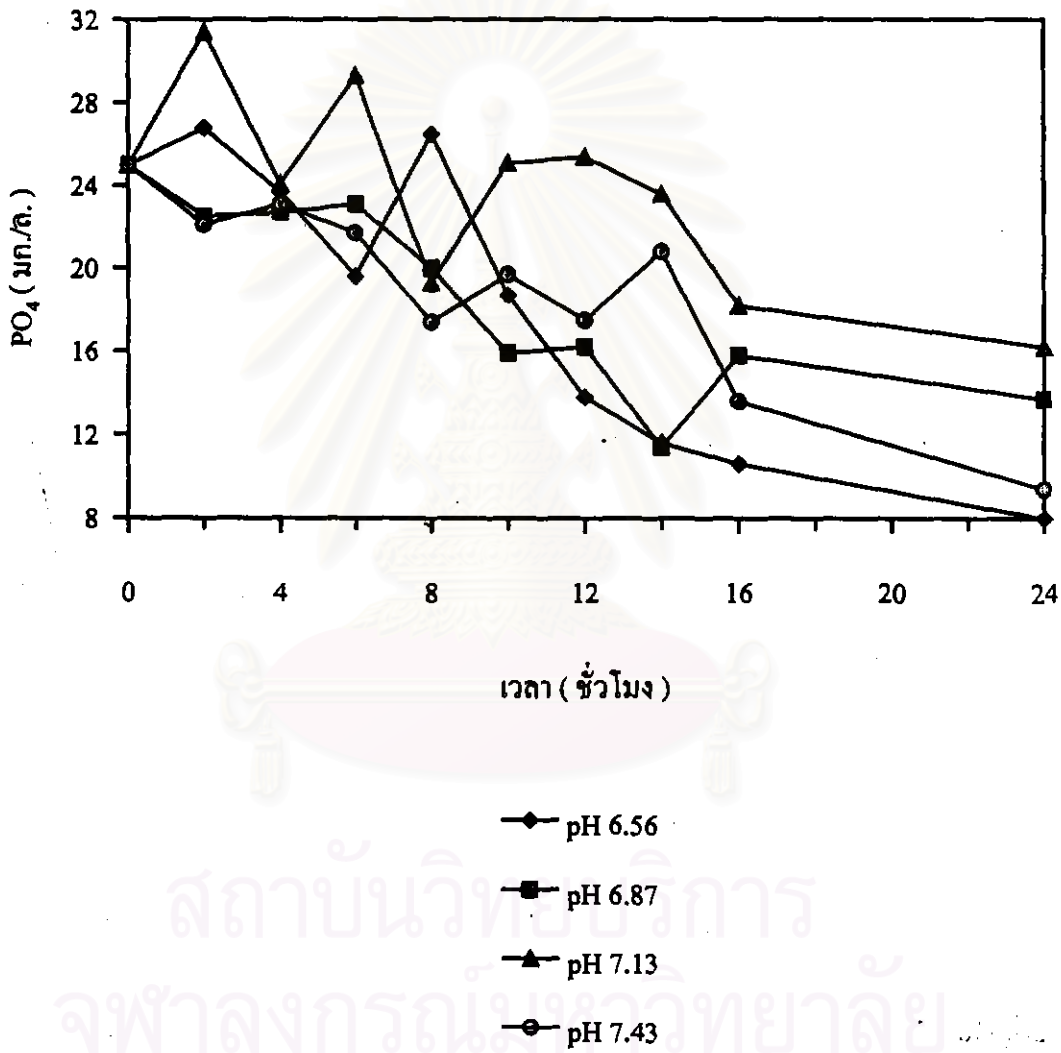
%PU = [PU/PO_4initial] x 100

RPU = Relative phosphate uptake [(PU/CDW) x 100]



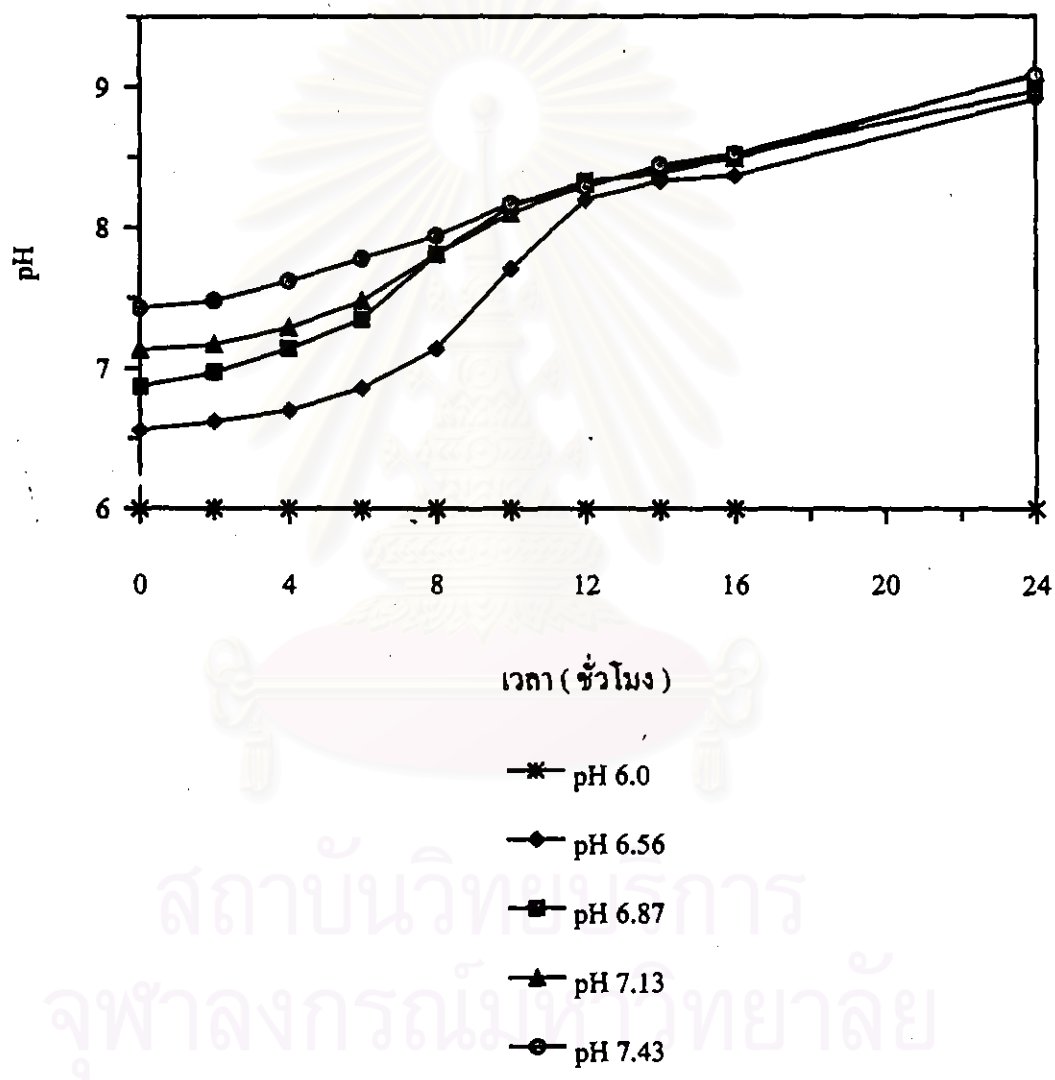
รูปที่ 21 ลักษณะการเจริญของ *Acinetobacter* sp. เมื่อน้ำเสียสังเคราะห์มี pH เริ่มต้นต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 การลดลงของฟอสฟอรัสในน้ำเสียสังเคราะห์เมื่อ *Acinetobacter* sp. เจริญในน้ำเสียสังเคราะห์ pH เริ่มต้นต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 การเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำเสียสังเคราะห์เมื่อ *Acinetobacter* sp. เจริญในน้ำเสียสังเคราะห์ pH เริ่มต้นต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ผลของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในน้ำเสียสังเคราะห์ต่อการเจริญและการสะสมฟอสเฟต ของ *Acinetobacter* sp.

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ในน้ำเสียสังเคราะห์ตามสูตรดัดแปลงที่ 2 (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) ที่มีเปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 % ตามลำดับพบว่า ลักษณะการเจริญในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1, 1.5 % ไม่แตกต่างกันคือมี Lag phase ยาว 6 ชั่วโมงซึ่งยาวกว่าเมื่อไม่มีโซเดียมคลอไรด์และให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 175, 168.75, 156.25 มก./ล. ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มโซเดียมคลอไรด์เป็น 2, 2.5 % พบว่าจะมี Lag phase ยาวขึ้นคือ 8 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับและให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 150, 143.75 มก./ล. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 24 ประสิทธิภาพการกำจัดฟอสเฟตสูงสุดเท่ากับ 58 % ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 % และประสิทธิภาพในการกำจัดฟอสฟอรัสจะค่อยๆลดลงตามลำดับโดยมีประสิทธิภาพต่ำสุดในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 % คือ 31.2 % ดังแสดงในตารางที่ 6 รายละเอียดการเปลี่ยนแปลงฟอสเฟตและการเปลี่ยนแปลง pH ดังแสดงในรูปที่ 25, 26 และเมื่อเพิ่มโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 3 % จะไม่มีการเจริญของ *Acinetobacter* sp. ภายใต้การสังเกตนาน 40 ชั่วโมง จากการทดลองจะเห็นว่า *Acinetobacter* sp. ต้องใช้เวลาในการปรับสภาวะของเซลล์นานขึ้นเมื่อเปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์สูงขึ้นและไม่พบการเจริญเมื่อสูงถึง3%จึงเลือกใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5% ซึ่งมีผลกระทบต่อเซลล์น้อยที่สุดในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 6 อัตราการกำจัดฟอสเฟตและ%การสะสมฟอสเฟตเมื่อแปรผันค่า % NaCl

% NaCl	TU_m	CDW	PU	%PU	RPU
0.5	24	175	14.2	58	8.11
1	24	168.75	13.3	53.2	7.88
1.5	24	156.25	9.6	38.4	6.12
2	24	150	7.8	31.2	5.2

- น้ำเสียสังเคราะห์มีค่า COD = 3527 มก./ล. เลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส รอบการเขย่า 200 รอบ/นาที ปรับให้มีค่า pH = 6.5 แปรผันค่า % NaCl ต่างกัน

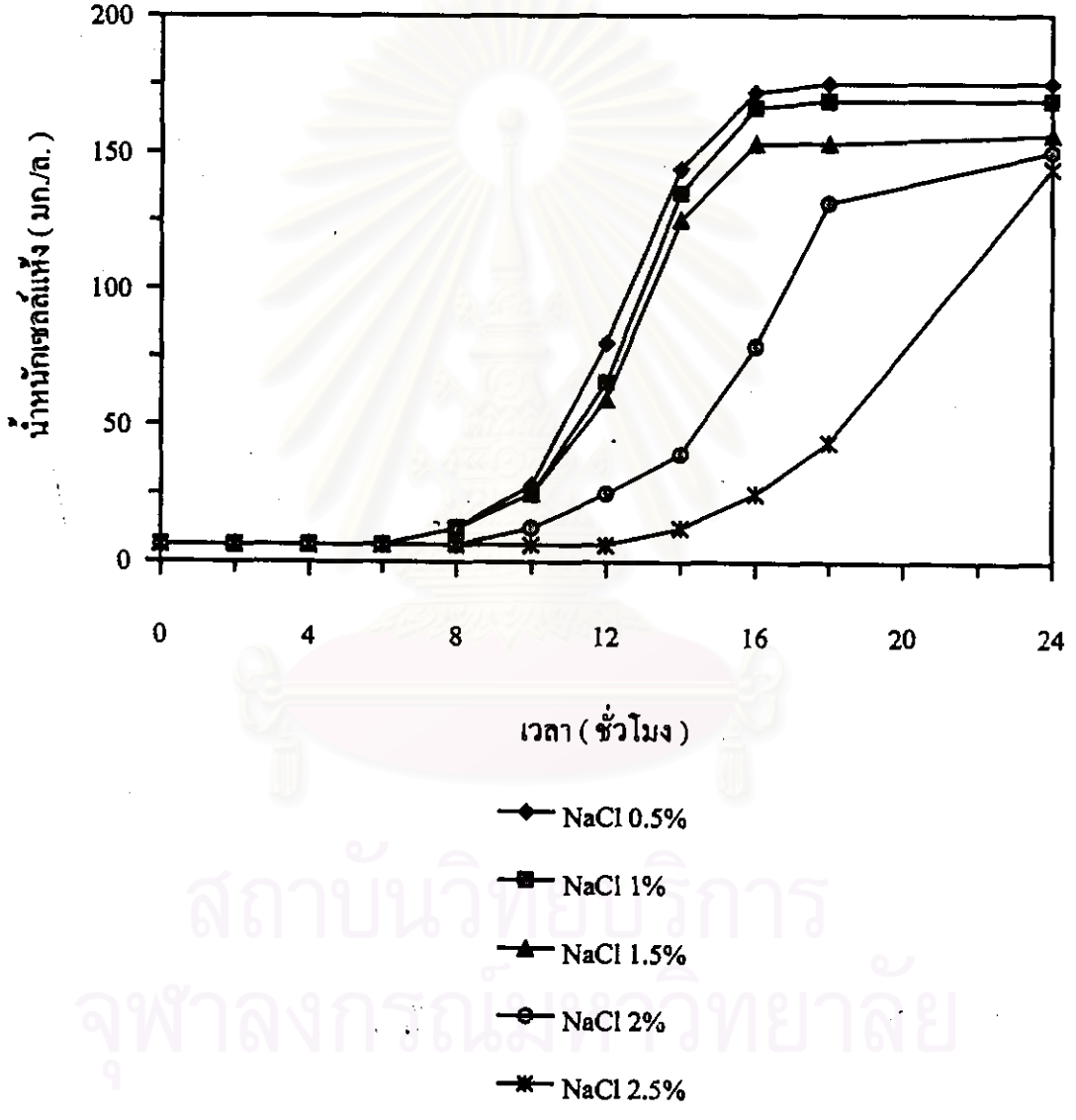
TU_m = Uptake time maximum (ชั่วโมง)

CDW = Cell dry weight (มก./ล.)

PU = Phosphate uptake (PO_4initial - PO_4TU_m) (มก./ล.)

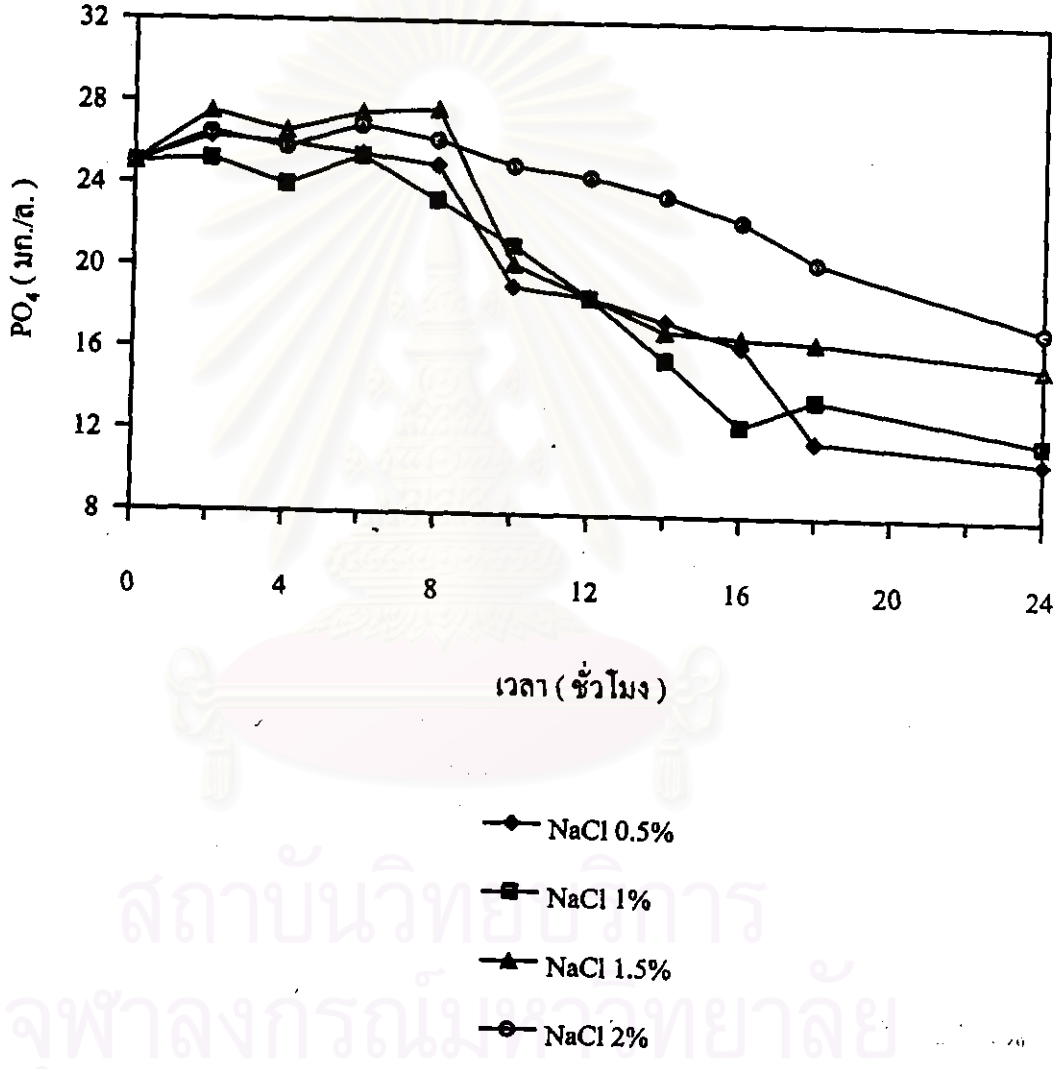
%PU = [PU/PO_4initial] x 100

RPU = Relative phosphate uptake [(PU/CDW)x 100]



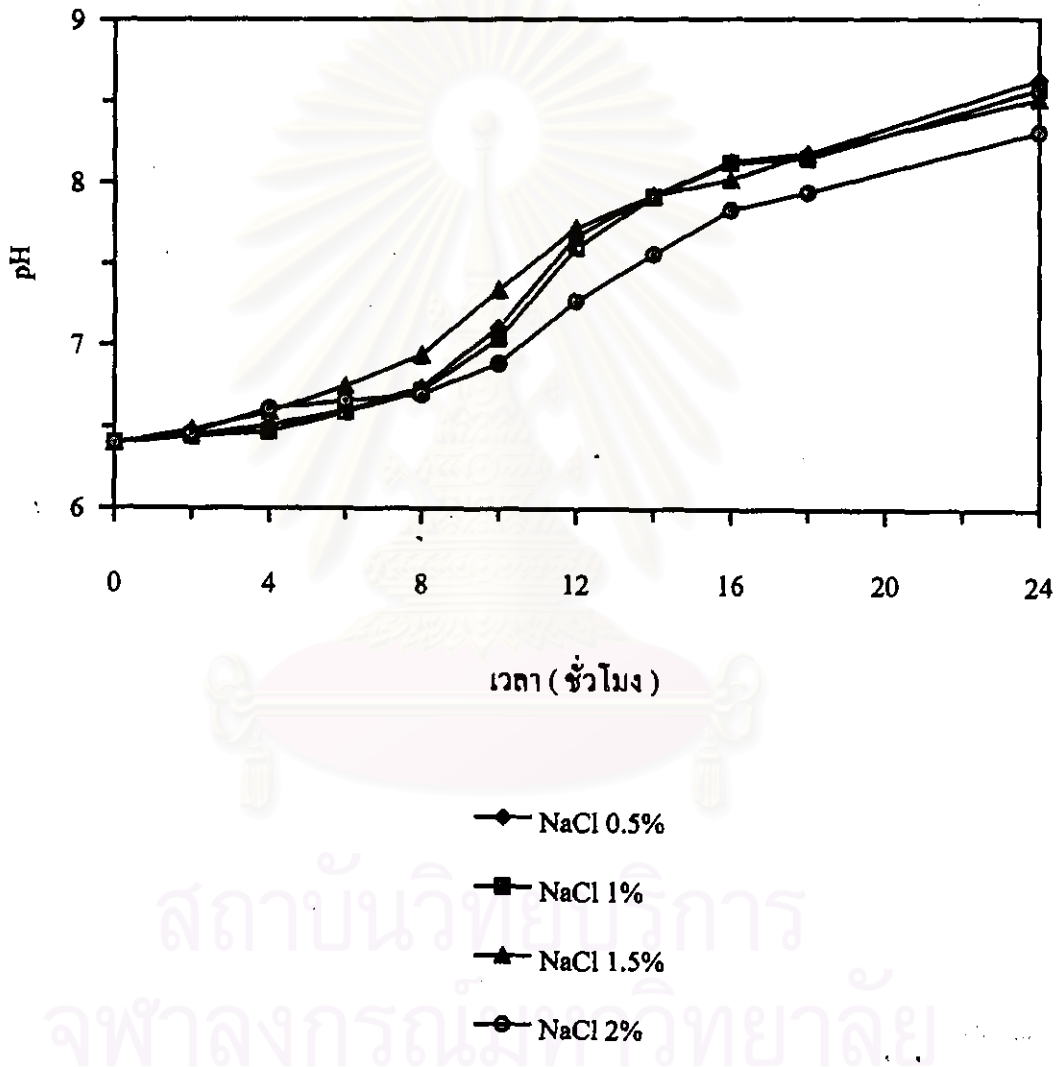
รูปที่ 24 ลักษณะการเจริญของ *Acinetobacter* sp. เมื่อน้ำเสียสังเคราะห์มี % NaCl ต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 การลดลงของฟอสฟอรัสในน้ำเสียสังเคราะห์เมื่อ *Acinetobacter* sp.เจริญในน้ำเสียสังเคราะห์ % NaCl ต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 การเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำเสียสังเคราะห์เมื่อ *Acinetobacter* sp. เจริญในน้ำเสียสังเคราะห์ % NaCl ต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 ผลของค่า COD เริ่มต้นในน้ำเสียสังเคราะห์ต่อการเจริญและการสะสมฟอสเฟตของ *Acinetobacter* sp.

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 3 (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) ที่มีค่า pH เริ่มต้น 6.5 โซเดียมคลอไรด์ 0.5 % และมีค่า COD เริ่มต้นเป็น 400, 500, 600, 700 มก./ล. ตามลำดับ พบว่าให้ลักษณะการเจริญที่ไม่แตกต่างกันคือมี Lag phase ประมาณ 4 ชั่วโมง และเข้าสู่ Log phase คล้ายกัน แต่พบว่าถ้ามี COD ซึ่งเป็นสารอาหารมาก ก็จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมากขึ้นตามไปด้วยคือ 93.75, 112.5, 128.13, 153.13 มก./ล. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 27 และมีประสิทธิภาพการกำจัดฟอสเฟตสูงสุดเมื่อน้ำเสียสังเคราะห์มีค่า COD เท่ากับ 700 มก./ล.คือ 45.2 % และมีประสิทธิภาพการกำจัดฟอสเฟตต่ำสุดเมื่อน้ำเสียสังเคราะห์มีค่า COD เท่ากับ 400 มก./ล. คือ 26 % ดังแสดงในตารางที่ 7 รายละเอียดการเปลี่ยนแปลง pH และการสะสมฟอสเฟตตลอดการเจริญแสดงในรูปที่ 28, 29 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อค่า COD สูงขึ้นซึ่งก็คือสารอาหารสำหรับเซลล์มากขึ้นนั่นเองทำให้จำนวนเซลล์ของ *Acinetobacter* sp. มากขึ้น เปอร์เซ็นต์การกำจัดฟอสเฟตจึงมากขึ้น แสดงว่าการกำจัดฟอสเฟตขึ้นกับปริมาณเซลล์ที่สะสมฟอสเฟตด้วย อย่างไรก็ตามในน้ำเสียชุมชนโดยทั่วไปมีค่า COD อยู่ในช่วง 250- 500 มก./ล. (ประยูร ฟองสถิตย์กุล และคณะ, 2541) จึงเลือกใช้ค่า COD 500 มก./ล. ในการศึกษาผลของรอบการเขย่าต่อไป

ตารางที่ 7 อัตราการกำจัดฟอสเฟตและ%การสะสมฟอสเฟตเมื่อแปรผันค่า COD

COD	TU_m	CDW	PU	%PU	RPU
400	14	93.75	6.5	26	6.93
500	14	112.5	7.2	28.8	6.4
600	16	128.13	9.5	38	7.41
700	16	153.13	11.3	45.2	7.38

- น้ำเสียสังเคราะห์มีค่าค่า pH = 6.5, 0.5% NaCl เลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส รอบการเขย่า 200 รอบ/นาที ปรับให้มีค่า COD ต่างกัน

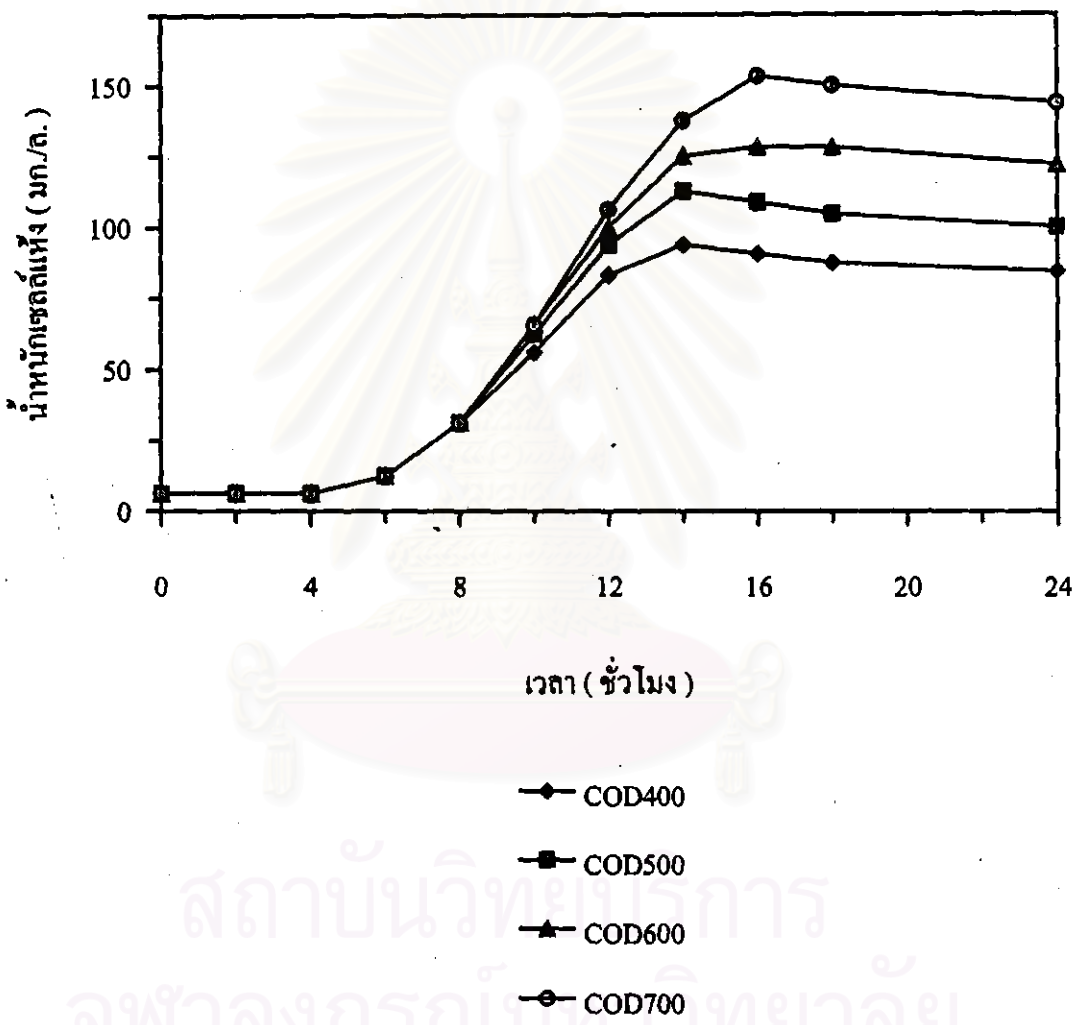
TU_m = Uptake time maximum (ชั่วโมง)

CDW = Cell dry weight (มก./ล.)

PU = Phosphate uptake (PO_4initial - PO_4TU_m) (มก./ล.)

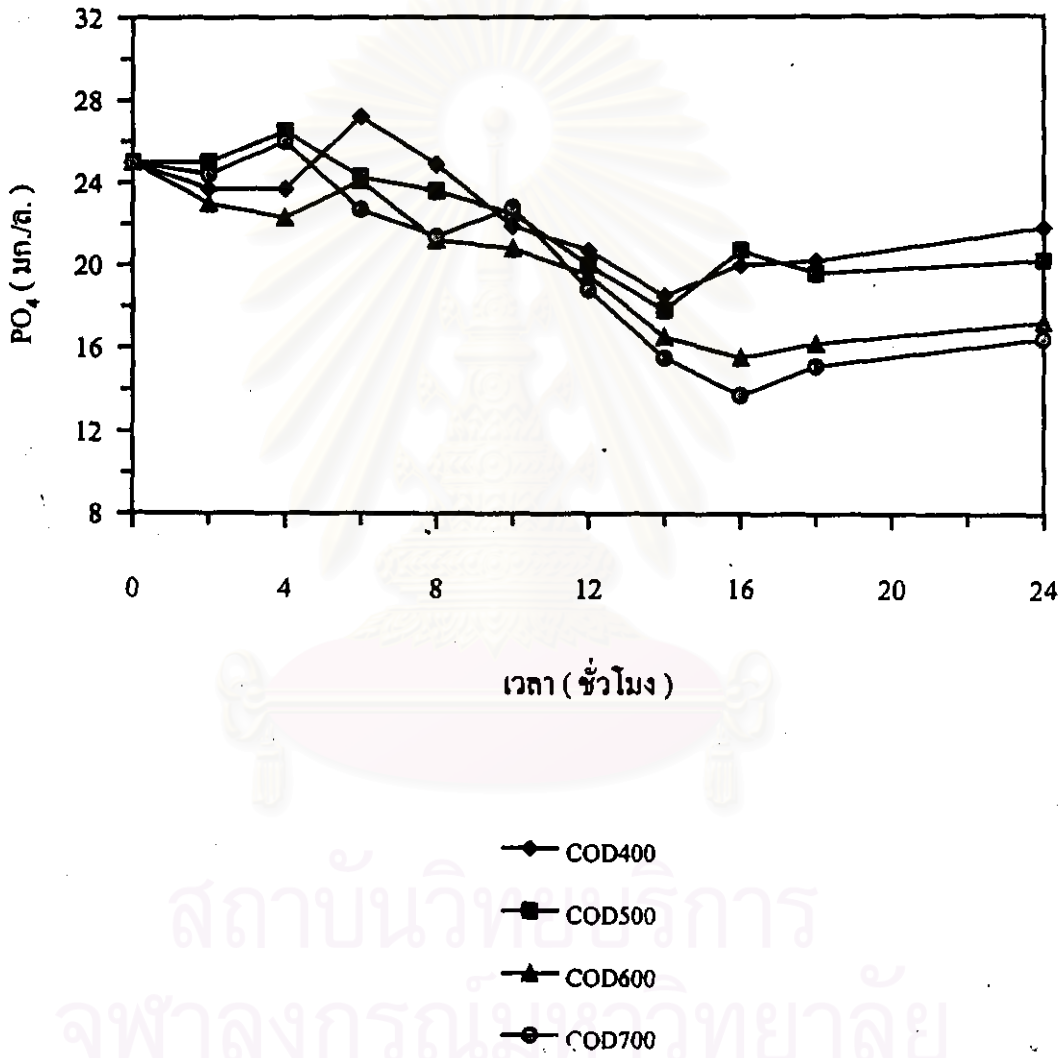
%PU = [PU/PO_4initial] x 100

RPU = Relative phosphate uptake [(PU/CDW) x 100]



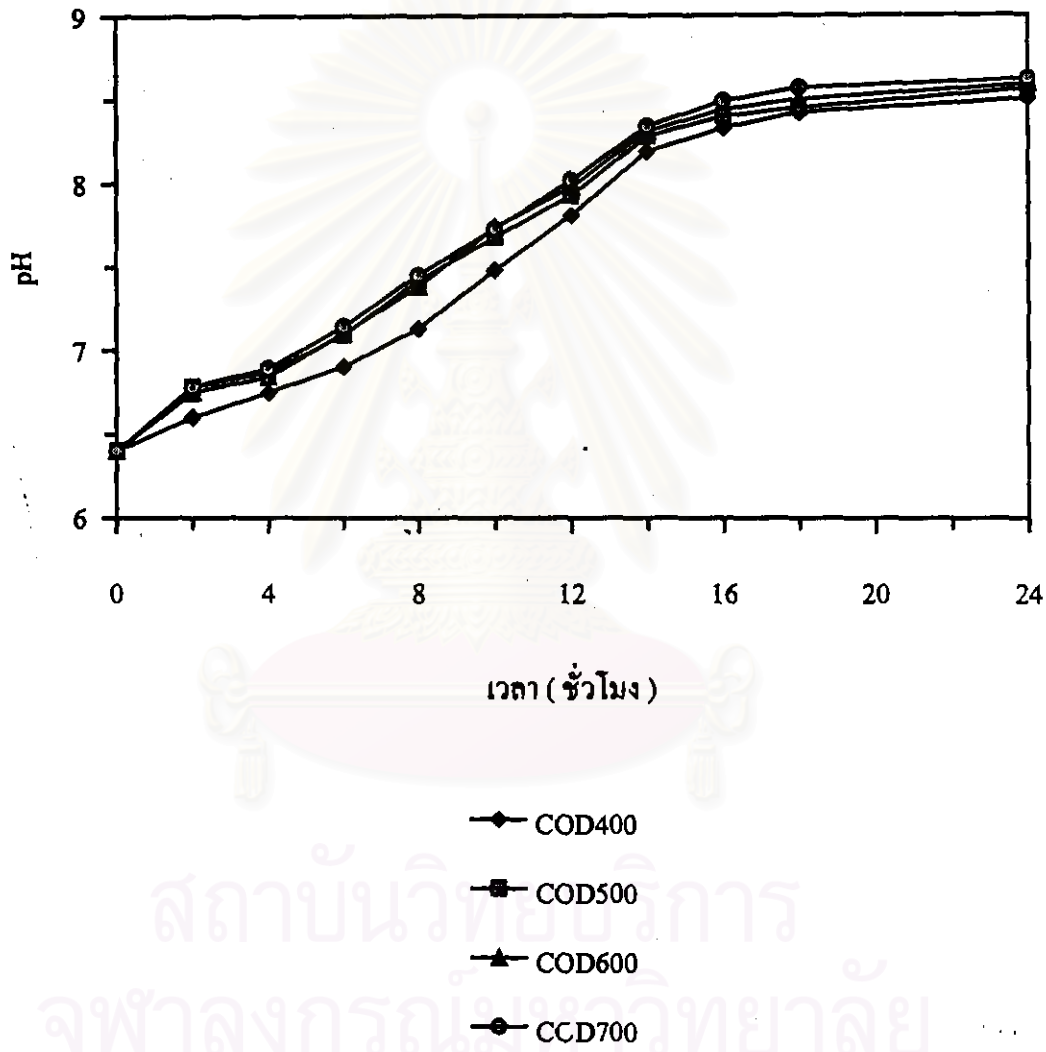
รูปที่ 27 ลักษณะการเจริญของ *Acinetobacter* sp. เมื่อน้ำเสียสังเคราะห์มีค่า COD เริ่มต้นต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 การลดลงของฟอสฟอรัสในน้ำเสียสังเคราะห์เมื่อ *Acinetobacter* sp. เจริญในน้ำเสียสังเคราะห์ COD เริ่มต้นต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 การเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำเสียสังเคราะห์เมื่อ *Acinetobacter* sp. เจริญในน้ำเสียสังเคราะห์ COD เริ่มต้นต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 ผลของรอบการเขย่าต่อการเจริญและการสะสมฟอสเฟตของ *Acinetobacter* sp. ในน้ำเสียสังเคราะห์

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ด้วยน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5, โซเดียมคลอไรด์ 0.5 %, ค่า COD 500 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่าโดยปรับให้มีรอบการเขย่าเป็น 80, 120, 160, 200, 240 รอบต่อนาที จากการสังเกตลักษณะการเจริญพบว่ารอบการเขย่า 120, 160, 200 รอบต่อนาที *Acinetobacter* sp. ให้ลักษณะการเจริญคล้ายกันคือ มี Lag phase ยาว 4 ชั่วโมง และเข้าสู่ Late log phase ที่ชั่วโมงที่ 14 และให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 112.5 มก./ล. ในขณะที่เมื่อใช้รอบการเขย่าต่ำ 80 รอบต่อนาที จะมี Lag phase ยาว 4 ชั่วโมงเช่นกัน แต่จะมีการเจริญแบบช้าๆ โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 93.75 มก./ล. และเมื่อเลี้ยงด้วยรอบการเขย่าสูง 240 รอบต่อนาที เซลล์จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมีระยะ Lag phase เพียง 2 ชั่วโมง และเข้าสู่ Late log phase ที่ชั่วโมงที่ 8 หลังจากชั่วโมงที่ 12 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งค่อยๆ ลดลงดังแสดงในรูปที่ 30 ประสิทธิภาพการกำจัดฟอสเฟตใกล้เคียงกันคือประมาณ 28 % แต่พบว่าสูงสุดเมื่อใช้ความเร็วรอบเท่ากับ 240 รอบต่อนาทีคือ 39.6 % และประสิทธิภาพการกำจัดฟอสเฟตต่ำสุดเมื่อใช้ความเร็วรอบต่ำ 80 รอบต่อนาทีคือ 21.2 % ดังแสดงในตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลง pH และการเปลี่ยนแปลงฟอสเฟตตลอดการเจริญรายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 31, 32

ตารางที่ 8 อัตราการกำจัดฟอสเฟตและ%การสะสมฟอสเฟตเมื่อแปรผันค่า RPM

RPM	TU_m	CDW	PU	%PU	RPU
80	24	93.75	5.3	21.2	5.65
120	18	110	7.2	28.8	6.55
160	16	112.5	7	28	6.22
200	14	112.5	7.2	28.8	6.4
240	12	112.5	9.9	39.6	8.8

- น้ำเสียสังเคราะห์มีค่า COD = 500 มก./ล. เลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส ปรับให้มีค่า pH = 6.5, 0.5 % NaCl ใช้รอบการเขย่าต่างกัน

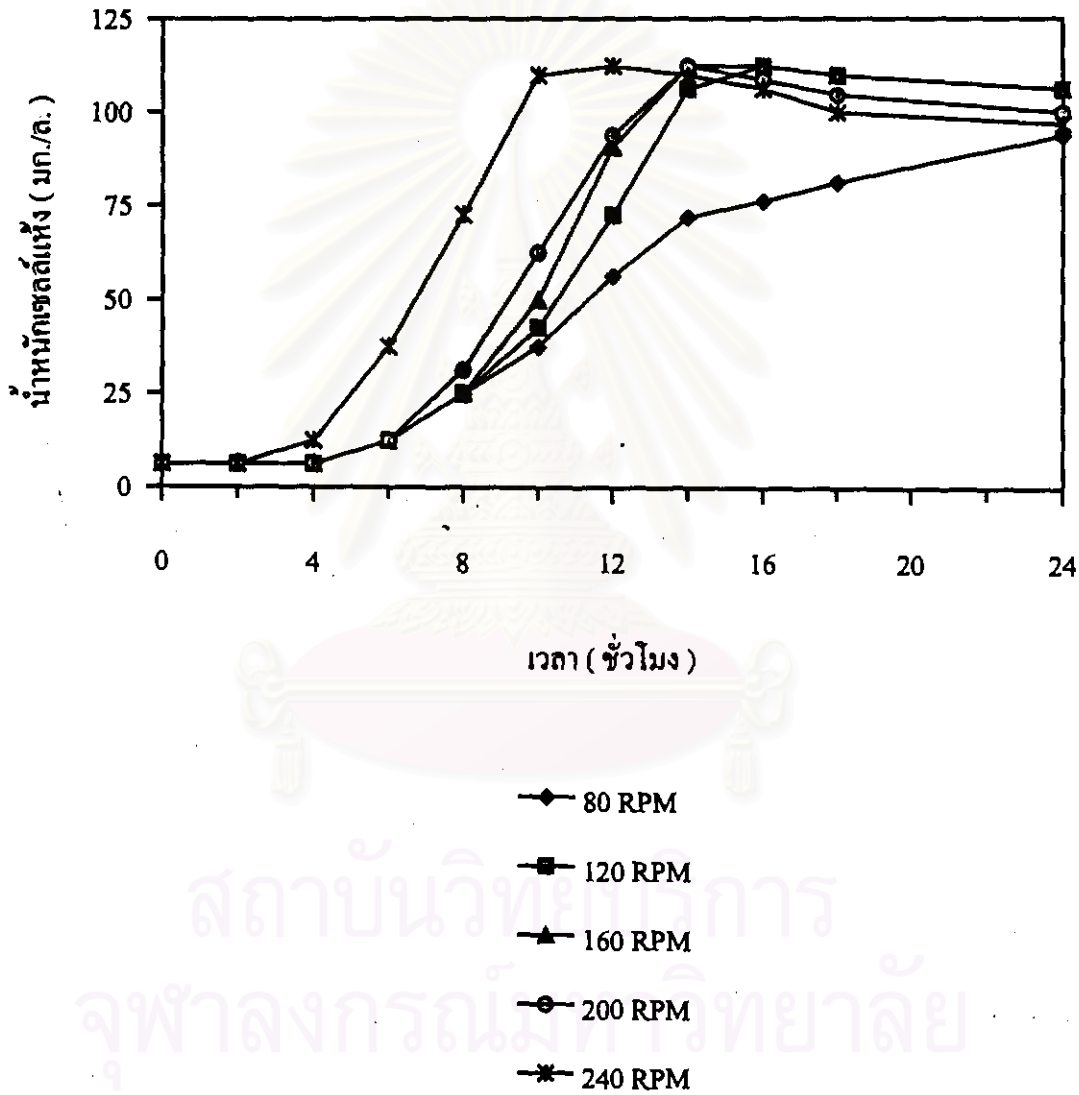
TU_m = Uptake time maximum (ชั่วโมง)

CDW = Cell dry weight (มก./ล.)

PU = Phosphate uptake (PO_4initial - PO_4TU_m) (มก./ล.)

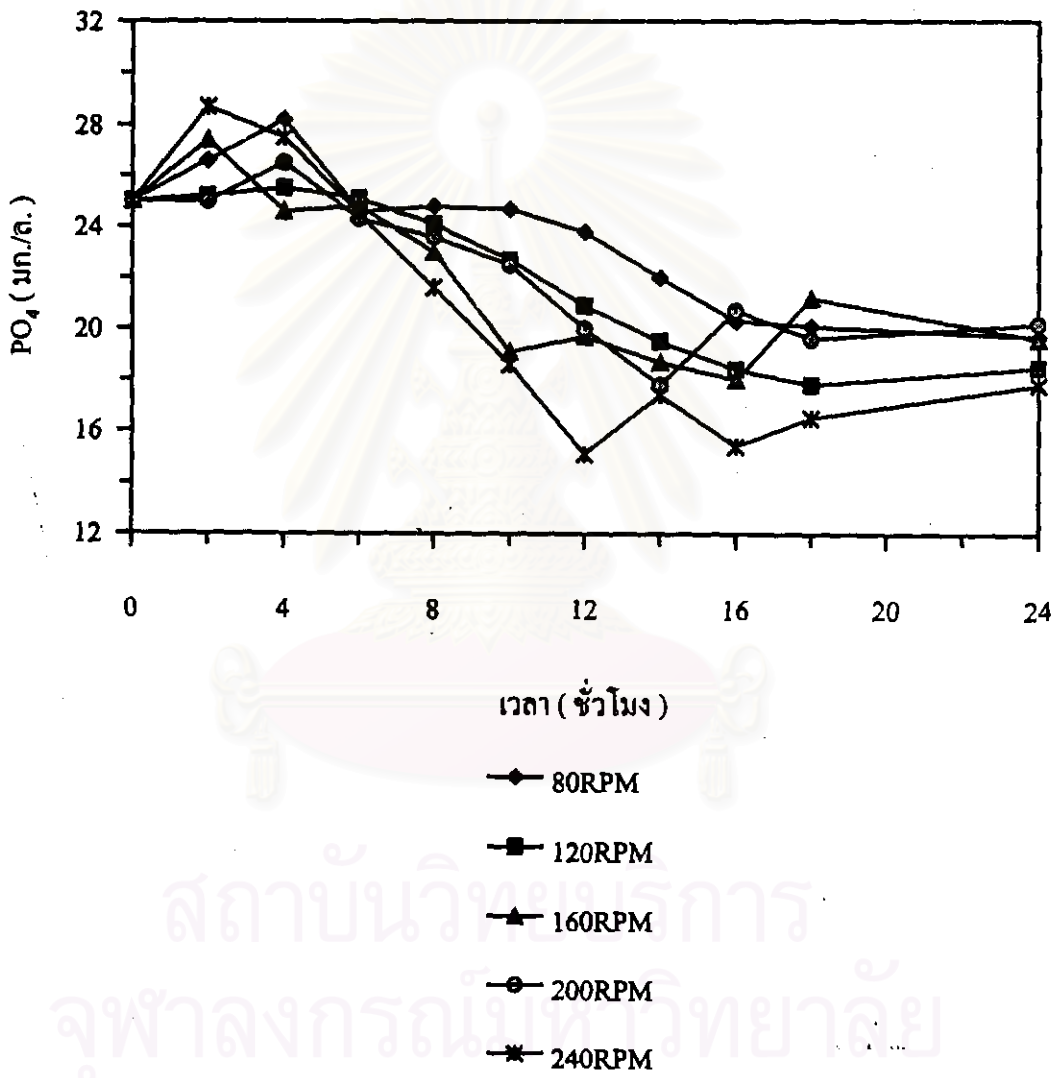
%PU = [PU/PO_4initial] x 100

RPU = Relative phosphate uptake [(PU/CDW) x 100]



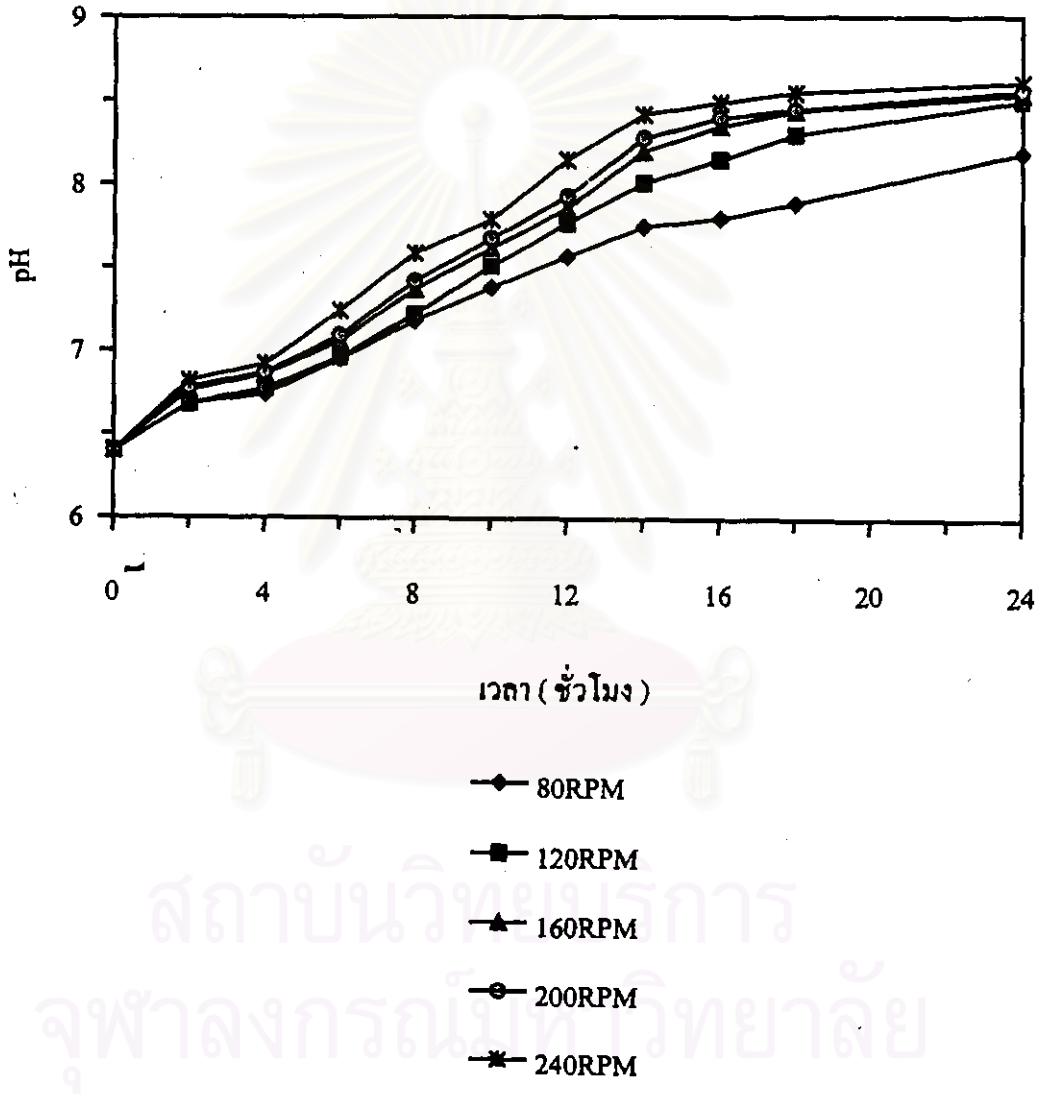
รูปที่ 30 ลักษณะการเจริญของ *Acinetobacter* sp. เมื่อใช้รอบการเขย่าต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 31 การลดลงของฟอสฟอรัสในน้ำเสียสังเคราะห์ตลอดการเจริญของ *Acinetobacter* sp. เมื่อใช้รอบการเขย่าต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 32 การเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำเสียสังเคราะห์ตลอดการเจริญ ของ *Acinetobacter* sp. เมื่อใช้รอบการเขย่าต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อในตะกอนสลัดจ์เทียบกับ *Acinetobacter* sp.

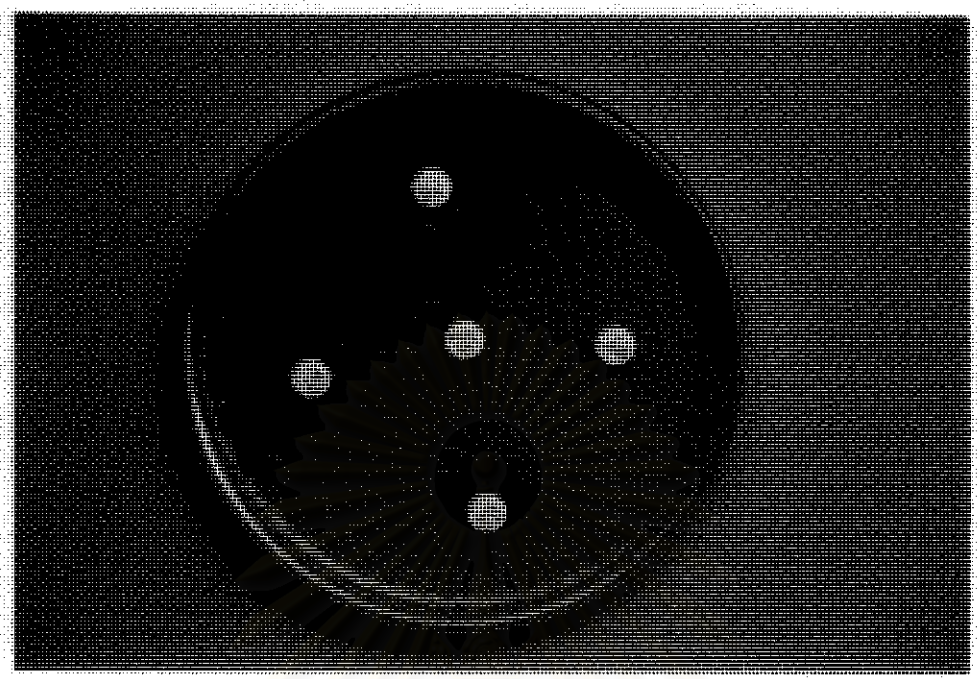
จากการติดตามปริมาณเชื้อ *Acinetobacter* sp. ด้วย Herellea plus Pen G & C พบว่ายังมีปริมาณเชื้ออื่นที่สามารถเจริญได้ในอาหารชนิดนี้ซึ่งจะรบกวนการติดตามจำนวน *Acinetobacter* sp. ได้ถ้าสมดุลของเซลล์มีปริมาณน้อยกว่าเชื้อรบกวน จึงทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อในตะกอนสลัดจ์เทียบกับความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Acinetobacter* sp. บนอาหารแข็ง Herellea ผลการทดลองพบว่ามีเชื้อบางชนิดในตะกอนสลัดจ์ดื้อต่อยา Chloramphenicol จริง และพบว่ามียาอยู่เพียงชนิดเดียวที่ *Acinetobacter* sp. ดื้อยา ในขณะที่เชื้อจากตะกอนสลัดจ์ไวต่อยาคือ Norfloxacin ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 33, 34

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อในตะกอนสลัดจ์เทียบกับเชื้อ *Acinetobacter* sp. บนอาหารแข็ง Herellea

ชื่อยา	ตะกอนสลัดจ์	*Acinetobacter* sp.
Norfloxacin	**S**	**R**
Cefoperazone	R	R
Chloramphenicol	R	R
Ampicillin	R	R
Erythromycin	R	R
Nitrofurantoin	R	R
Cefamandole	R	R
Cefotaxime	R	R
Clindamycin	R	R
Ceftriaxone	R	R
Vancomycin	R	R
Penicillin	R	R
SXT	R	R
Oxacillin	R	R

S = ไม่สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะ

R = ทนต่อยาปฏิชีวนะได้



รูปที่ 33 การดื้อต่อยา Norfloxacin ของ *Acinetobacter* sp. บนอาหารแข็ง Herellea

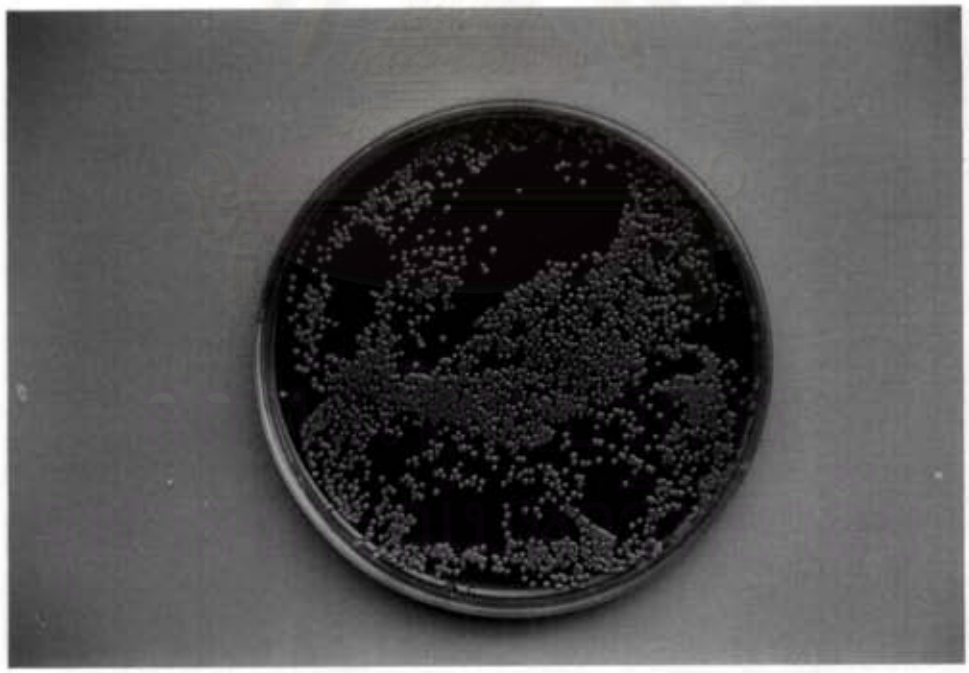
รูปที่ 34 การไวต่อยา Norfloxacin ของเชื้อในตะกอนสลัดจ์บนอาหารแข็ง Herellea

หมายเหตุ: ไวต่อยา Norfloxacin จะสังเกตเห็นเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสรอบแผ่นยาทดสอบ $\geq$ 19 มม.

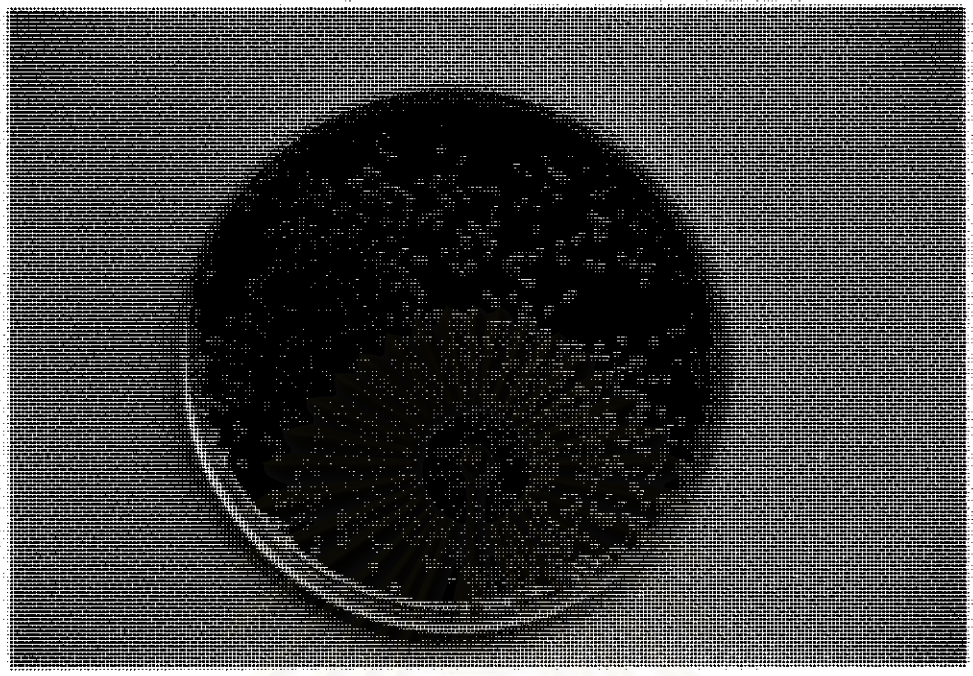
ดื้อต่อยา Norfloxacin จะไม่พบวงใสรอบแผ่นยาหรือเส้นผ่าศูนย์กลาง $\leq$ 13 มม.

4.10 ทดสอบหาปริมาณยา Norfloxacin ที่เหมาะสมในการเติมบนอาหารแข็ง Herellea

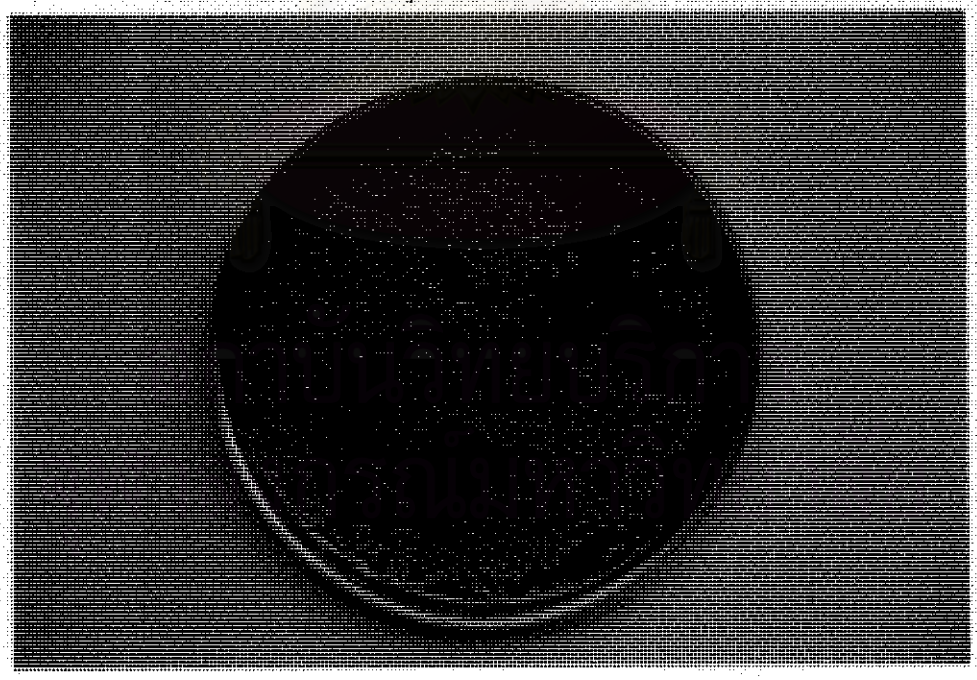
ผลการทดสอบปริมาณยา Norfloxacin ที่เหมาะสม พบว่า ปริมาณยา Norfloxacin เข้มข้น 10, 20, 30 ไมโครกรัม/มล. ไม่มีผลต่อการเจริญของ *Acinetobacter* sp. ดังแสดงในรูปที่ 35, 36, 37 ตามลำดับโดย *Acinetobacter* sp. ยังคงสามารถเจริญได้ดี และปริมาณเชื้อในแต่ละความเข้มข้นของยาก็มีจำนวนใกล้เคียงกัน ในขณะที่เมื่อใช้ปริมาณยาเพิ่มเป็น 40, 80 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ พบว่า *Acinetobacter* sp. มีจำนวนลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อใช้ยา Norfloxacin เข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มล. ในขณะที่ไม่มี *Acinetobacter* sp. เจริญได้เลยเมื่อใช้ยา Norfloxacin เข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มล. ภาพไม่ได้นำมาแสดง



รูปที่ 35 ปริมาณเชื้อ *Acinetobacter* sp. บนอาหารแข็ง Herellea ที่มีปริมาณยา Norfloxacin 10 ไมโครกรัม/มล.



รูปที่ 36 ปริมาณเชื้อ *Acinetobacter* sp. บนอาหารแข็ง Herellea ที่มีปริมาณยา Norfloxacin 20 ไมโครกรัม/มล.



รูปที่ 37 ปริมาณเชื้อ *Acinetobacter* sp. บนอาหารแข็ง Herellea ที่มีปริมาณยา Norfloxacin 30 ไมโครกรัม/มล.

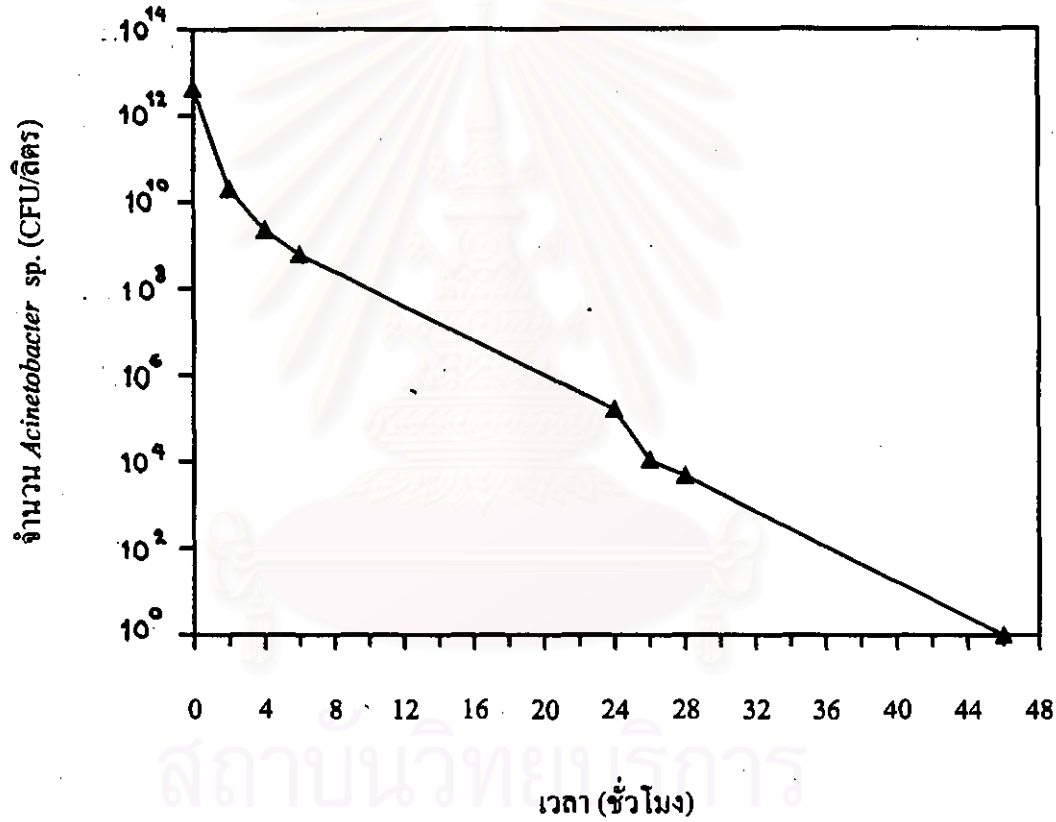
4.11 ประเมินความสามารถของเชื้อ *Acinetobacter* sp. ในการอยู่ร่วมกับเชื้ออื่นในตะกอนสลัดจ์ในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเดี่มในภาวะที่เชื้อ *Acinetobacter* sp. บริสุทธิ์สามารถเจริญได้ดี

จากการทดลองนำเชื้อ *Acinetobacter* sp. บริสุทธิ์ที่มีจำนวนเซลล์เทียบเท่า $7.1x10^{12}$ เซลล์/มล. จำนวน 1 ลิตรเลี้ยงร่วมกับตะกอนสลัดจ์จากบ่อบำบัดน้ำเสียชุมชนรวมสี่พระยาที่มีค่า MLSS ประมาณ 2000 มก./ล.จำนวน 1 ลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนตะกอนสลัดจ์ในโหลแก้วเติมอากาศ เมื่อได้ปริมาณตะกอนสลัดจ์เพียงพอ เก็บตัวอย่างน้ำมาเพาะเชื้อเพื่อดูปริมาณ *Acinetobacter* sp. บนอาหารแข็ง Herellea ที่มีปริมาณยา Norfloxacin 30 ไมโครกรัม/มล. โดยใช้ตัวอย่างน้ำที่เจือจางและไม่ได้เจือจางพบว่า *Acinetobacter* sp. ที่เติมลงไปเป็นหัวเชื้อในการเพิ่มปริมาณตะกอนสลัดจ์ไม่เหลืออยู่เลยแม้ว่าจะใช้ปริมาณ *Acinetobacter* sp. เริ่มต้นจำนวนมากในการเป็นหัวเชื้อตั้งต้นก็ตาม แสดงว่าในระบบเชื้อผสมนี้มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถเจริญได้ดีกว่า *Acinetobacter* sp. ในสภาวะการทดลองนี้

4.11.1 ติดตามประชากร *Acinetobacter* sp. จากระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเดี่ม

หลังจากเตรียมเชื้อ *Acinetobacter* sp. ที่มีช่วงการเจริญอยู่ในระยะ Mid Log phase ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเทียบเท่า $7.1x10^{12}$ เซลล์/มล. นำไปเติมในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก ในปริมาณ 1 มล./ปริมาตรน้ำเสียในถัง 1 ลิตร หลังเติมเชื้อเก็บตัวอย่างน้ำจากถังออกซิกมาติดตามปริมาณเชื้อ *Acinetobacter* sp. บนอาหารแข็ง Herellea ที่มีปริมาณยา Norfloxacin 30 ไมโครกรัม/มล. พบว่าปริมาณเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วและไม่พบเชื้ออีกเลยในชั่วโมงที่ 46 หลังเติมเชื้อในระบบดังแสดงในรูปที่ 38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 38 การลดจำนวนลงของ *Acinetobacter* sp. ในถังออกซิกของระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.11.2 พารามิเตอร์ต่างๆของระบบหลังการเติม *Acinetobacter* sp.

หลังจากเติม *Acinetobacter* sp. ลงในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเค็ม ที่ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มี NaCl 1.5 % ฟอสฟอรัส 15 มก./ล. ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.5 มีค่า COD จากกลูโคส 250 มก./ล. ค่า COD จากโซเดียมอะซิเตท 250 มก./ล. พบว่าพารามิเตอร์ต่างๆในถังออกซิกค่อนข้างคงที่หลังจากเดินระบบ 12 วัน โดยปริมาณฟอสฟอรัสในถังแอนแอโรบิกเฉลี่ยในระยะคงตัว (steady state) เท่ากับ 16.06 มก./ล. ถังแอน็อกซิกเท่ากับ 14.36 มก./ล. ถังน้ำออกเท่ากับ 13.13 มก./ล. คิดเป็นประสิทธิภาพการกำจัดฟอสเฟตในถังน้ำออกเท่ากับ 12.47 % ดังแสดงในรูปที่ 39

ปริมาณ COD เฉลี่ยในระยะคงตัวในถังแอนแอโรบิกเท่ากับ 166.23 มก./ล. ถังแอน็อกซิกเท่ากับ 55.62 มก./ล. ถังออกซิกเท่ากับ 32.02 มก./ล. คิดเป็นประสิทธิภาพการกำจัด COD เท่ากับ 66.75 %, 88.88 %, 93.60 % ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 40

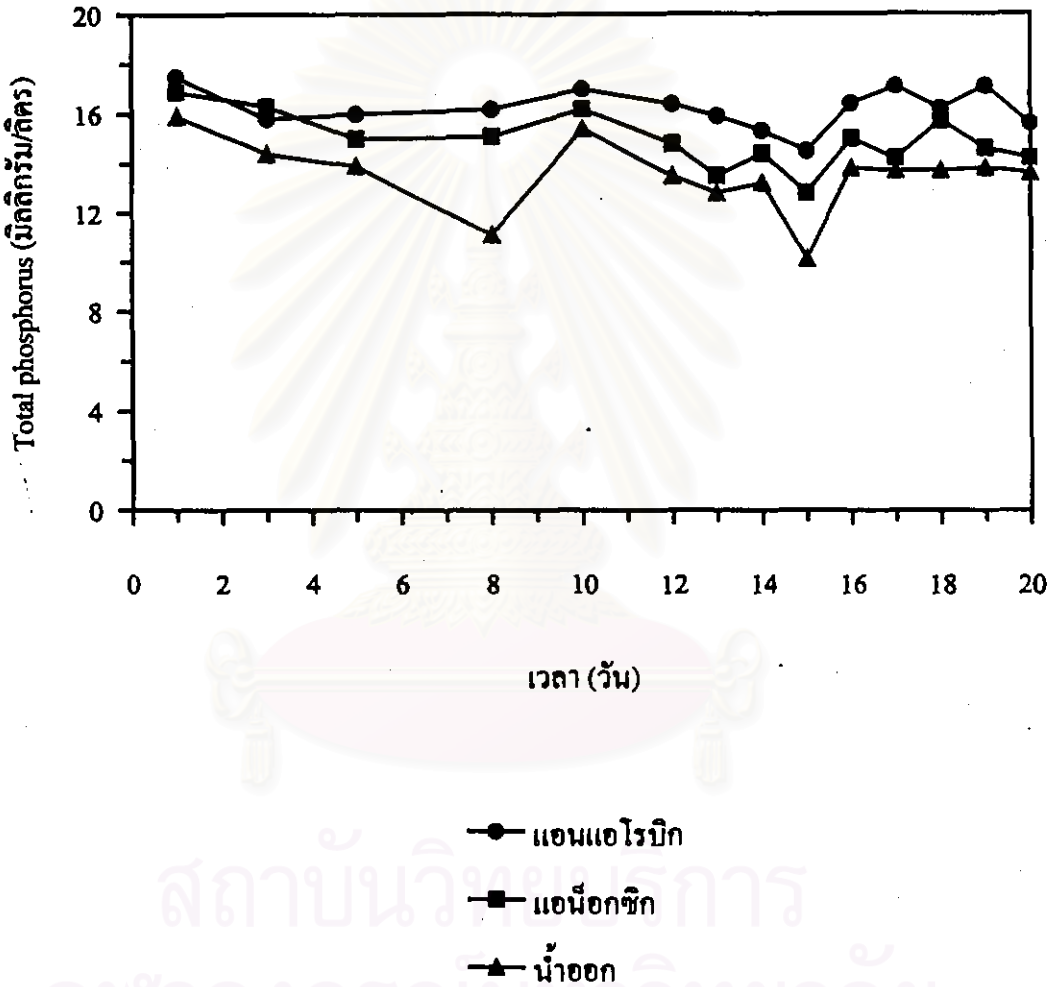
ค่า DO เฉลี่ยของระบบเมื่อเข้าสู่ระยะคงตัวในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก เท่ากับ 0.046, 0.052, 2.16 มก./ล. ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 41

ค่า MLSS เฉลี่ยของระบบเมื่อเข้าสู่ระยะคงตัวในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกมีค่าเท่ากับ 1917, 1756, 1241 มก./ล. ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 42

ค่า pH เฉลี่ยของระบบเมื่อเข้าสู่ระยะคงตัวในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกมีค่าเท่ากับ 7.02, 7.68, 7.38 ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 43

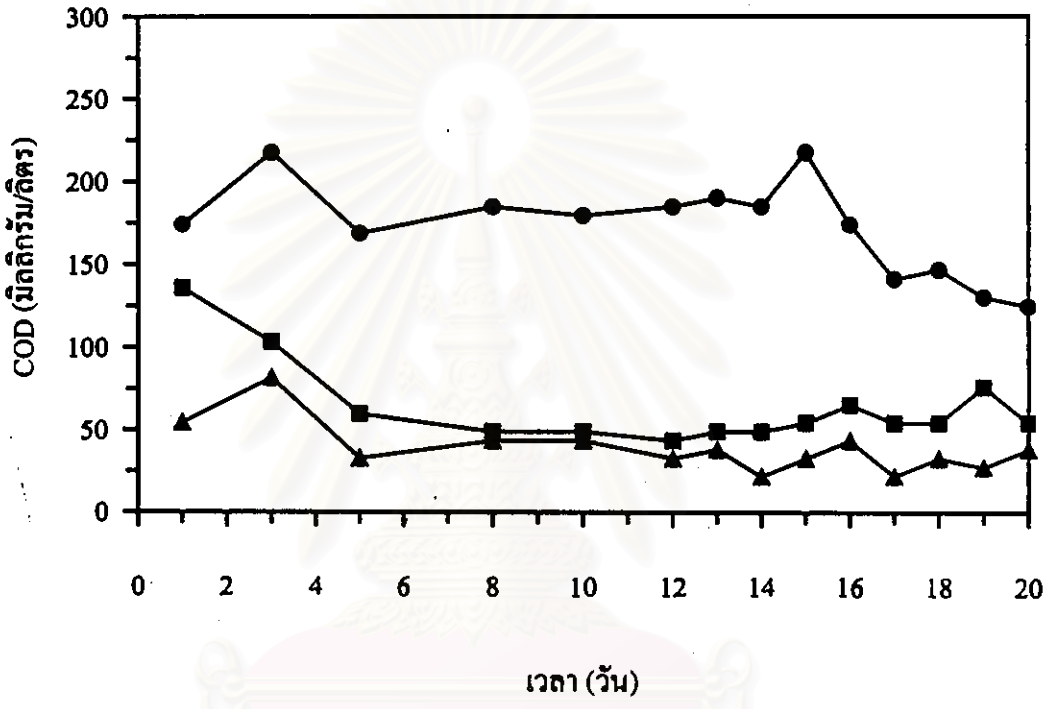
อุณหภูมิเฉลี่ยของระบบเมื่อเข้าสู่ระยะคงตัวในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก มีค่าเท่ากับ 31.1, 31.3, 30.9 องศาเซลเซียสตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 44

ซึ่งจะเห็นได้ว่าระบบมีความสามารถกำจัดฟอสฟอรัสได้ต่ำมาก แม้ในถังแอนแอโรบิกมีการปลดปล่อยฟอสเฟตออกมาเล็กน้อยซึ่งแสดงว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประชากรหลักไม่ใช่ *Acinetobacter* sp. แต่อาจเป็นโพลีฟอสเฟตแบคทีเรียชนิดอื่นแต่ล้มเหลวในการสะสมฟอสเฟตเนื่องจากการรบกวนของอะซิเตท (Randall, 1994) เมื่อดูความสามารถในการลดค่า COD พบว่าระบบสามารถลดค่า CODได้ถึง 93.60 % ซึ่งประสิทธิภาพการลด COD สูงกว่าในระบบที่มี NaCl 2 % มากแสดงว่ากลุ่มจุลินทรีย์ในสภาวะการทดลองนี้น่าจะแตกต่างกันกับกลุ่มที่ทดลองด้วย NaCl 2 %



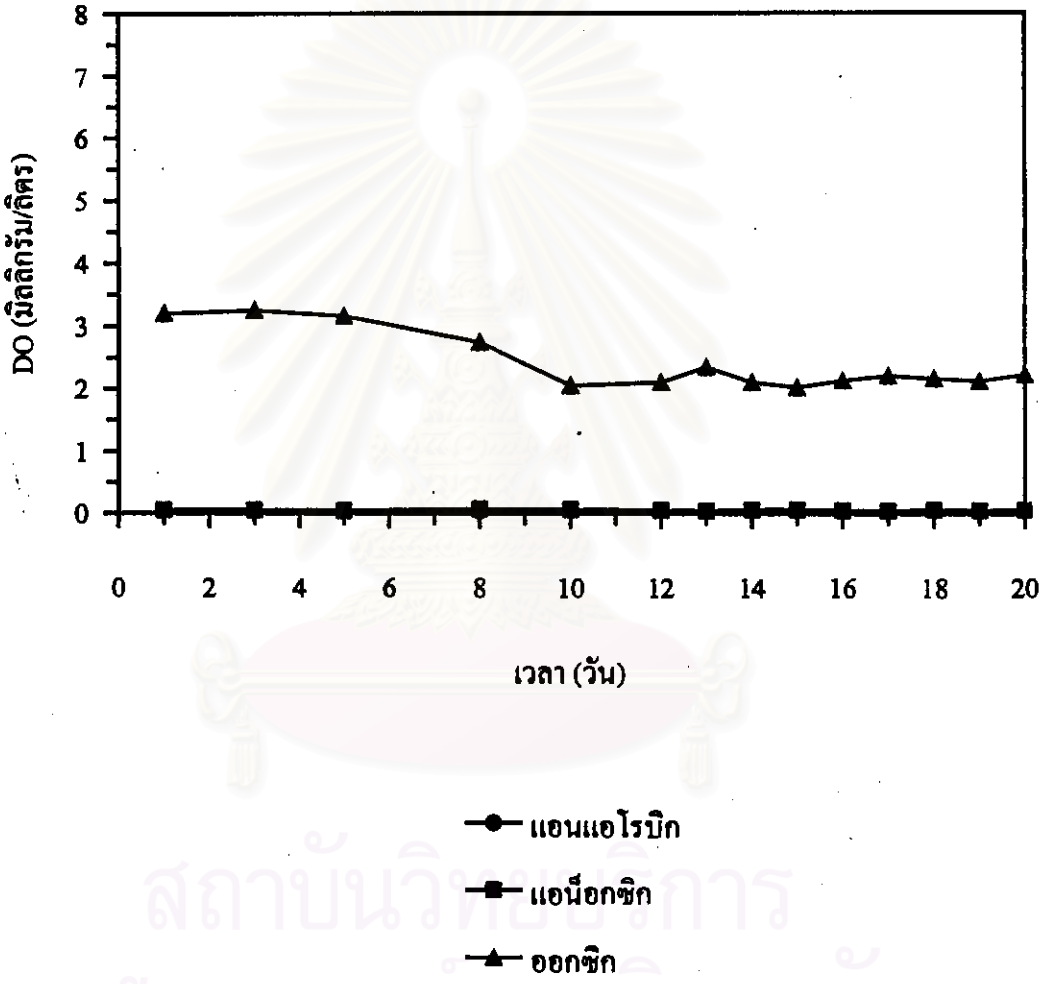
รูปที่39 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟอสฟอรัสในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



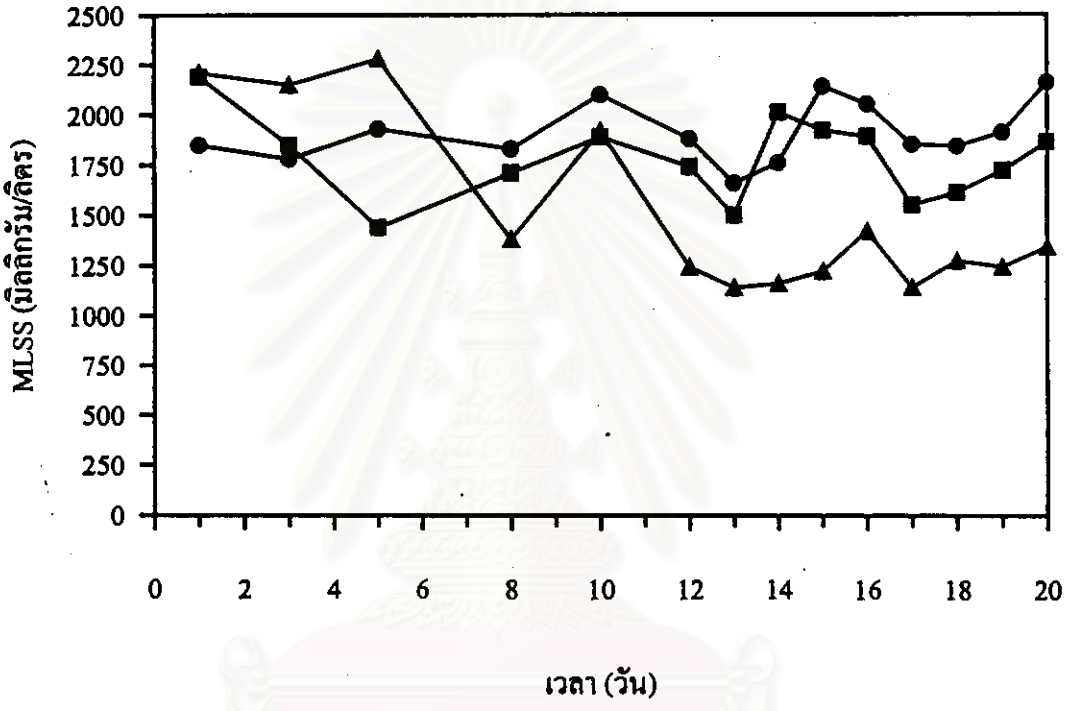
รูปที่ 40 การเปลี่ยนแปลงของค่า COD ในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก ตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



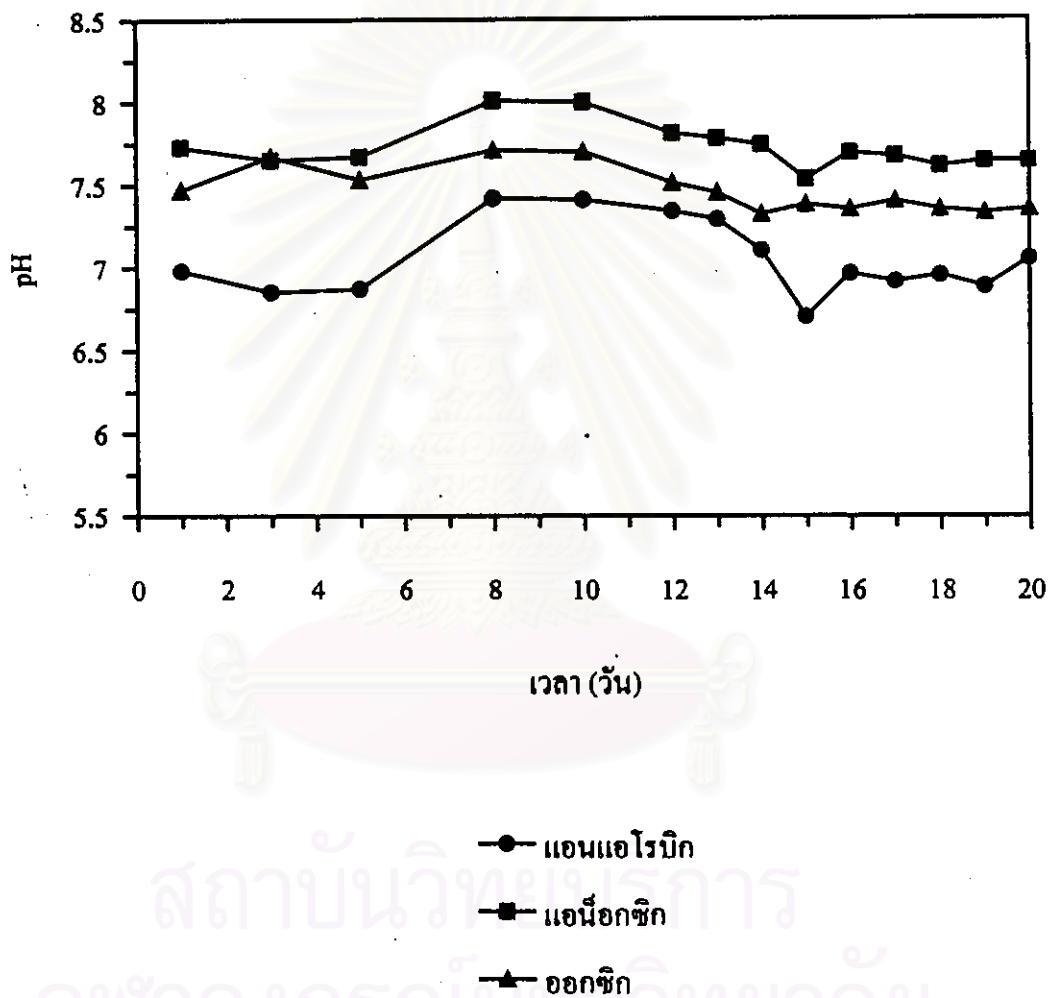
รูปที่ 41 การเปลี่ยนแปลง DO ในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก ตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



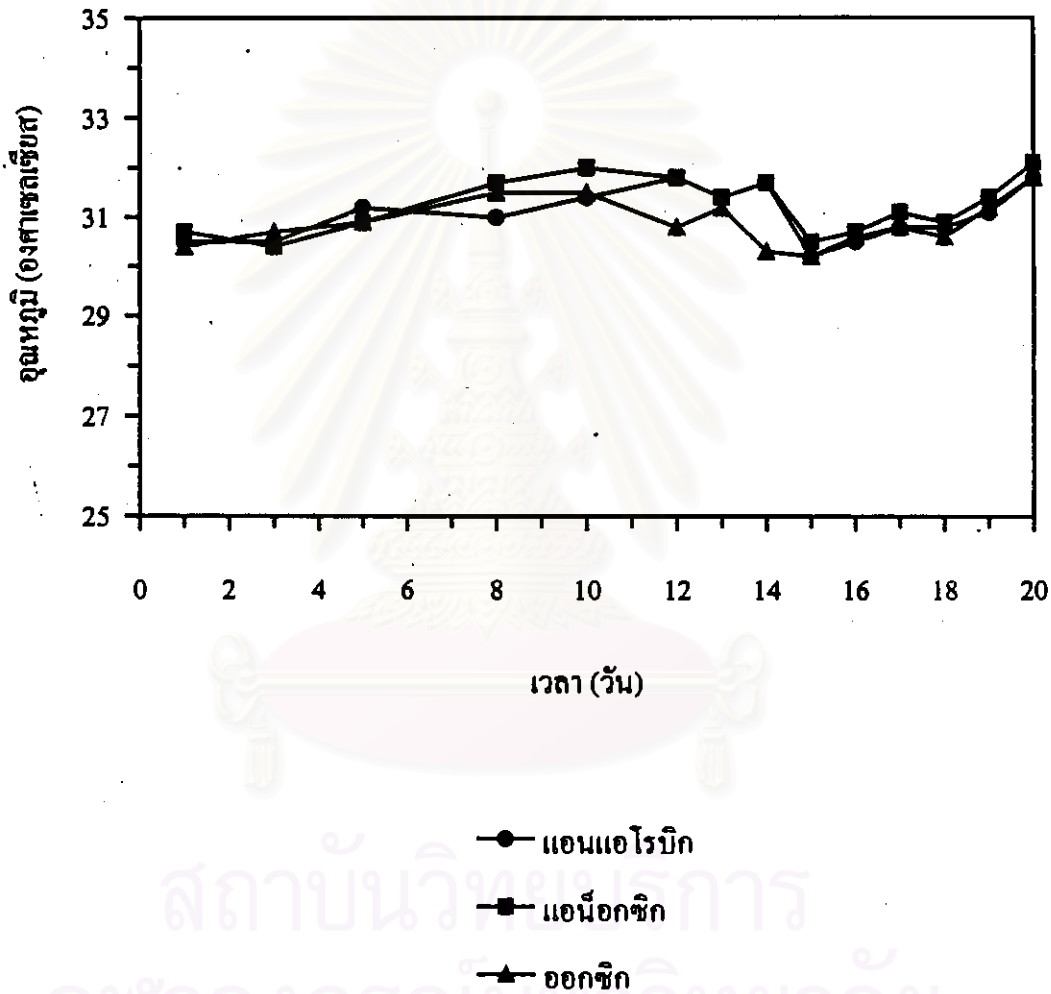
รูปที่ 42 การเปลี่ยนแปลงค่า MLSS ในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 43 การเปลี่ยนแปลง pH ในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก ตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



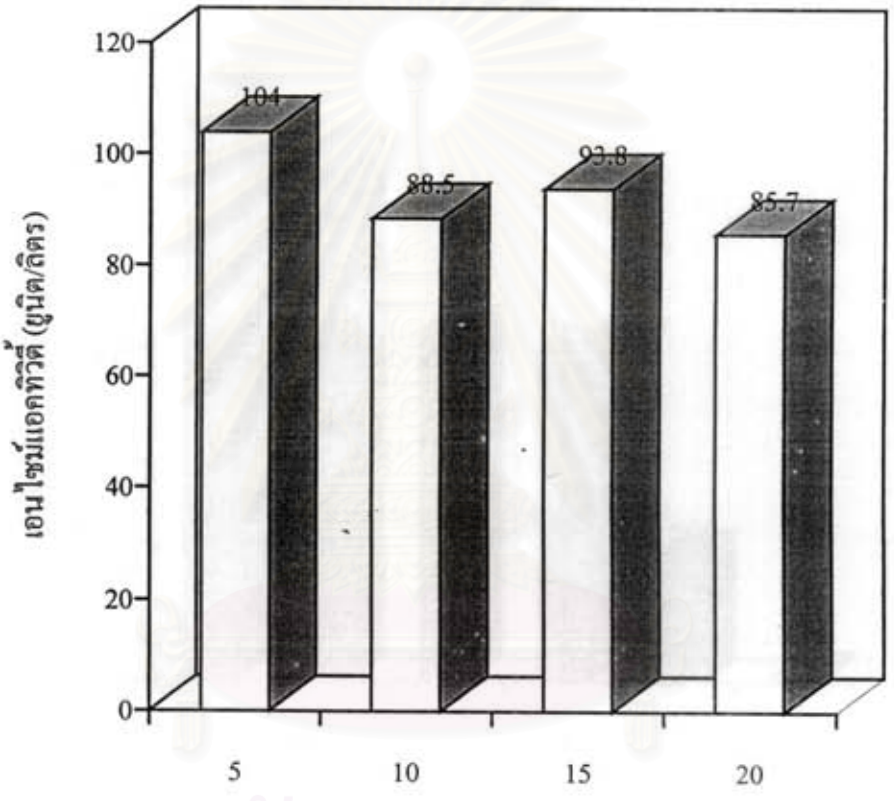
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 44 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกตลอดการเดินระบบ Three-Stage Phoredox

4.12 ปริมาณสารสกัดจากเซลล์ที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนส, โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส

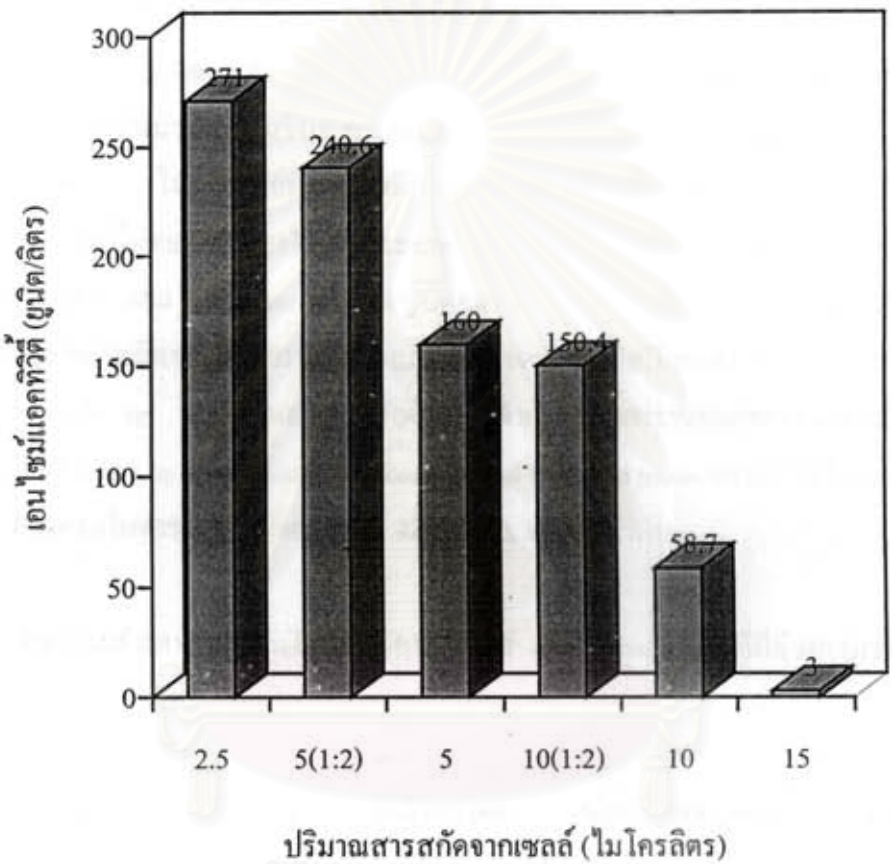
เนื่องจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์จำเป็นต้องควบคุมปฏิกิริยาให้อยู่ในอันดับศูนย์ และส่วนประกอบของน้ำยาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์มีราคาแพงจึงใช้ส่วนประกอบของน้ำยาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คงเดิมแต่แปรผันปริมาณสารสกัดจากเซลล์ที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากในสภาวะที่สารสกัดจากเซลล์มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงมากย่อมทำให้เกิดภาวะขาดแคลนสับสเตรทได้ (substrate depletion) กิจกรรมของเอนไซม์ที่วัดได้จะต่ำกว่าความเป็นจริง สามารถแก้ไขได้โดยลดปริมาณเอนไซม์ที่ใช้หรือเจือจางสารตัวอย่างนั่นเอง จากการแปรผันปริมาณสารสกัดจากเซลล์ 5, 10, 15, 20 ไมโครลิตรในการวิเคราะห์เอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนสได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 104, 88.5, 93.8, 85.7 ยูนิต/ลิตรตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 45 ซึ่งไม่แตกต่างกันมากนักจึงเลือกใช้ปริมาณสารสกัดจากเซลล์ 10 ไมโครลิตรในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนส สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรสโดยแปรผันปริมาณสารสกัดจากเซลล์ 2.5, 5, 10, 15 ไมโครลิตรและสารสกัดจากเซลล์เจือจาง 2 เท่าปริมาตร 5, 10 ไมโครลิตรตามลำดับในการวิเคราะห์เอนไซม์โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรสได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 271, 160, 58.7, 3, 240.6, 150.4 ยูนิต/ลิตรตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 46 ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณสารสกัดจากเซลล์ที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรสคือ 2.5 ไมโครลิตร หรือ 5ไมโครลิตรเมื่อเจือจางตัวอย่าง 2 เท่า ถ้าใช้ปริมาณสารสกัดจากเซลล์สูงกว่านี้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ก็จะทำให้ค่าที่วัดได้ต่ำกว่าความเป็นจริง จึงเลือกใช้ปริมาณสารสกัดจากเซลล์ 2.5ไมโครลิตร ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส เพื่อความสะดวกและลดความผิดพลาดจากการเจือจางตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 45 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนส เมื่อใช้ปริมาณสารสกัดจากเซลล์ปริมาตรต่างกันในการวิเคราะห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 46 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพีฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส เมื่อใช้ปริมาณสารสกัดจากเซลล์ปริมาตรต่างกันและเจือจาง 2 เท่า ในการวิเคราะห์

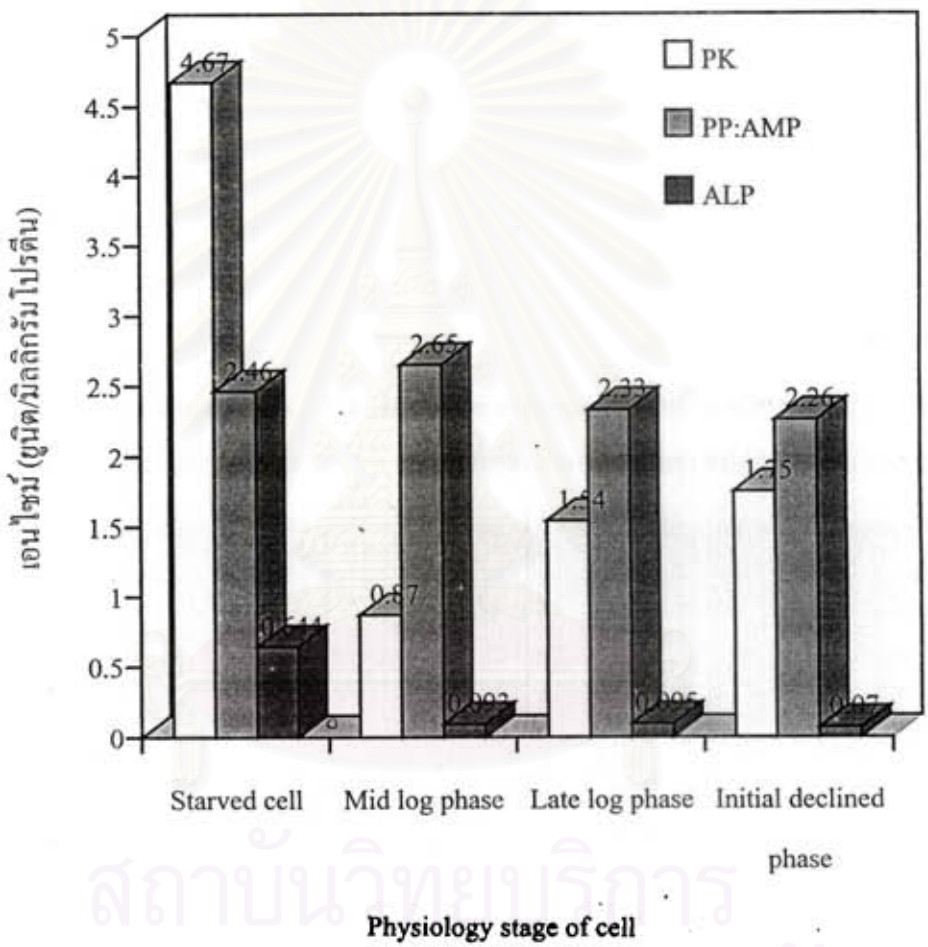
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.13 วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส, โพลีฟอสเฟตไคเนส, โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส ที่สกัดจากเซลล์ *Acinetobacter* sp. ที่เจริญในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีช่วงการเจริญต่างกัน

จากการวิเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในน้ำเลี้ยงเซลล์ระยะต่างๆ พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงสุดในเซลล์ที่ขาดแคลนฟอสเฟต คือ มีปริมาณ 0.64 ยูนิต/มก.โปรตีนในขณะที่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสต่ำในระยะการเจริญต่างๆกัน เช่นเดียวกันพบว่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนสสูงสุดในเซลล์ที่ขาดแคลนฟอสเฟตคือมีปริมาณ 4.67 ยูนิต/มก.โปรตีน ในขณะที่ในช่วงของการเจริญพบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากระยะ Mid Log phase Late Log phase Initial Declined phase ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรสมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไม่ค่อยแตกต่างในเซลล์ระยะต่างๆ แต่พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ Mid Log phase คือ 2.65 ยูนิต/มก.โปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 47 เมื่อสังเกตปริมาณโพลีฟอสเฟตแกรนูลในเซลล์ระยะต่างๆพบว่าไม่มีการสร้างโพลีฟอสเฟตแกรนูลใน *Acinetobacter* sp. ที่เจริญในอาหารที่มีฟอสเฟตจำกัด ในขณะที่เซลล์จะสะสมโพลีฟอสเฟตแกรนูลในระยะ Mid Log phase Late Log phase Initial Declined phase ประเมินได้เป็น +, ++, ++ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 48, 49, 50, 51 ตามลำดับ

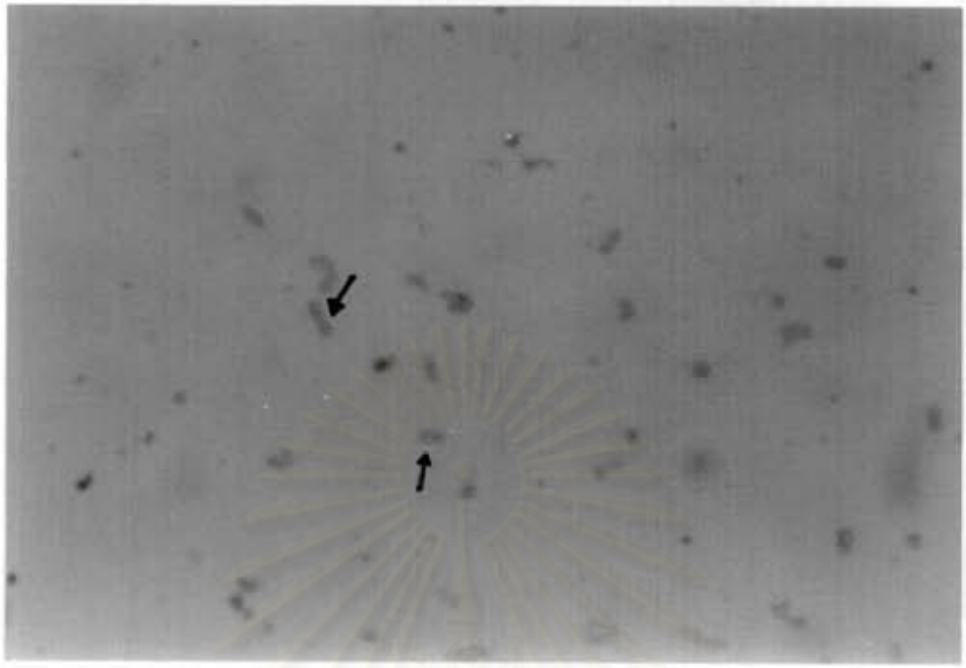
ตารางที่10 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่สกัดจากเซลล์ *Acinetobacter* sp. ที่มีช่วงการเจริญต่างกัน

ระยะการเจริญ	Specific activity (units/mg of protein)			โพลีฟอสเฟตแกรนูล
	อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	โพลีฟอสเฟตไคเนส	โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพีฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส	
Phosphate starved cell	0.64	4.67	2.46	-
Mid Log phase	0.093	0.87	2.65	+
Late Log phase	0.095	1.54	2.33	++
Initial Declined phase	0.070	1.75	2.26	++

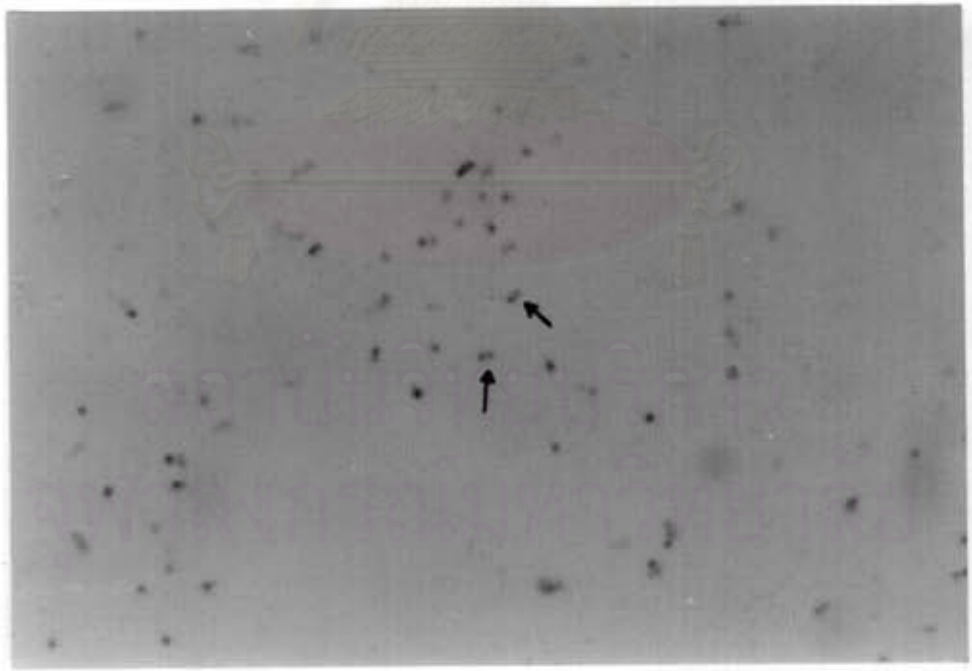


รูปที่ 47 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนส เอนไซม์โพลีฟอสเฟต:เอเอ็มพีฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อสกัดจากเซลล์ *Acinetobacter* sp.ที่มีระยะการเจริญต่างกัน

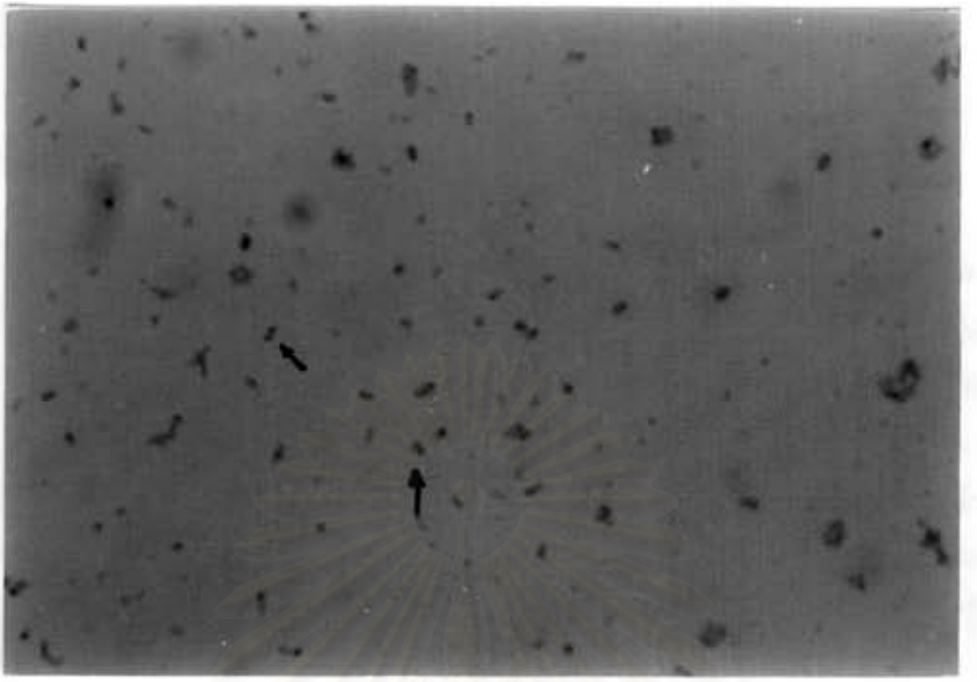
84



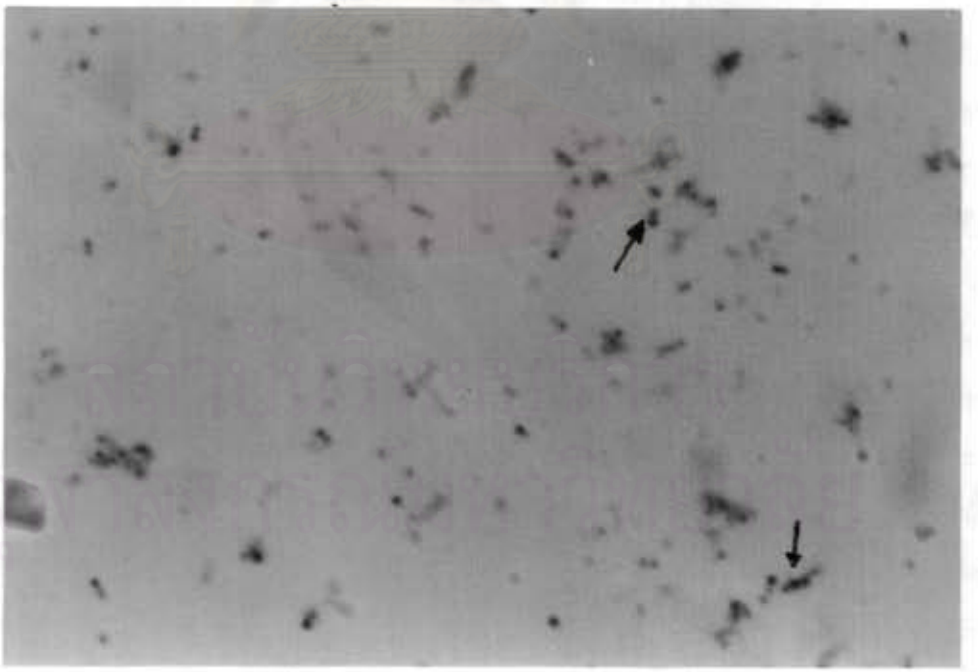
รูปที่ 48 *Acinetobacter* sp. ระยะ phosphate starved cell เมื่อย้อมด้วย Albert's stain แสดงเซลล์ที่ไม่มีโพลีฟอสเฟตแกรนูล (ศรชี้) ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 49 *Acinetobacter* sp. ระยะ Mid Log phase เมื่อย้อมด้วย Albert's stain แสดงเซลล์ที่สะสมโพลีฟอสเฟตแกรนูล (ศรชี้) ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 50 *Acinetobacter* sp. ระยะ Late Log phase เมื่อย้อมด้วย Albert's stain แสดงเซลล์ที่สะสมโพลีฟอสเฟตแกรนูล (ศรชี้) ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 51 *Acinetobacter* sp. ระยะ Initial Declined phase เมื่อย้อมด้วย Albert's stain แสดงเซลล์ที่สะสมโพลีฟอสเฟตแกรนูล (ศรชี้) ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า