บทที่ 4
การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้

เพื่อที่จะนำเอาเชื้อที่คัดเลือกได้ไปใช้ในการกำจัดซัลไฟด์ในน้ำเสียที่ออกจากถัง SRR ซึ่งมีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์โดยเฉพาะซัลไฟด์อยู่ในปริมาณสูง จึงนำเชื้อมาทดสอบความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่จากการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์ซัลเฟอร์ในรูปรีดิวซ์ เช่นซัลไฟด์เป็นแหล่งพลังงาน โดยใช้ CO_2 เป็นแหล่งคาร์บอน (chemolithoautotroph) และ/หรืออาจดำรงชีวิตอยู่ได้โดยใช้แหล่งพลังงานจากการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์ซัลเฟอร์ในรูปรีดิวซ์แต่ใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ (mixotroph) (Moat and Foster, 1995) ตลอดจนสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้ โดยพิจารณาปัจจัยทางเคมี-กายภาพ เช่น อุณหภูมิ pH ความเร็วรอบของการเขย่าซึ่งมีผลต่อปริมาณของออกซิเจนด้วย นอกจากการผสมของสารอาหาร และเซลล์จุลินทรีย์ให้ทั่วถึง และยังดูผลของการเติมอนินทรีย์และ อินทรีย์ไนโตรเจนเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการลดซัลไฟด์ของเชื้อที่คัดเลือกได้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การทดสอบการเจริญแบบ mixotroph

เลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus* sp. ไอโซเลท T307 และ TT502 ในอาหารที่ใช้แยกเชื้อคืออาหารสูตร T และ TT ตามลำดับ และเลี้ยงในอาหารสูตร A และสูตร C ซึ่งมี yeast extract เป็นส่วนประกอบ 0.2% และ 0.002% ตามลำดับเพื่อเป็นการทดสอบการเจริญแบบ mixotroph ส่วนอาหารสูตร B จะมี $Na_2S_2O_3$ เป็นแหล่งพลังงานของเชื้อเหมือนเช่นในอาหารสูตร T และ TT (ทดสอบการเจริญแบบ autotroph) เพื่อดูผลของความเข้มข้นของ $Na_2S_2O_3$ ที่เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าจากสูตร T และ TT การทดลองเริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อ T307 และ TT502 ในอาหารสูตร T (T307), TT (TT502) และแต่ละเชื้อในอาหาร A B และ C แล้วนำไปเขย่าที่ 150 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และ 50°C ตามชนิดของเชื้อเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำหัวเชื้อปริมาณ 10% ที่ได้จากสูตรเดียวกันใส่ในอาหารชนิดเดียวกันเช่นจากสูตร A ลงเลี้ยงในอาหารสูตร A แล้วดูผลทุก 12 ชม. โดยวัดค่า OD 660 nm และ pH ของอาหารเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงและหลังเลี้ยงทุกๆ 12 ชม เป็นเวลา 48 ชม แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษานี้อยู่ในภาคผนวก ข

2. การแปรผันปริมาณ yeast extract และการปรับสภาพของน้ำเสียและสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญ

2.1. ปริมาณของ yeast extract ต่อการเจริญ

เตรียม starter ในอาหาร สูตร A แล้วนำไปบ่ม ในเครื่อง Incubator shaker ที่ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (log phase) จากนั้นนำ starter (OD660 = 0.5) ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร A ที่แปรผันความเข้มข้นของ yeast extract คือ 0%, 0.05%, 0.10%, 0.15% และ 0.20%

โดยใช้ 10% inoculums size (ใช้ Flask 250 ml มีอาหารอยู่ 100 ml) โดยไปบ่มเช่นที่สภาวะเดิม ดูผลทุก 5 ชั่วโมง โดยวัดค่า pH และการเจริญโดยวัดความขุ่นที่ OD 660 nm นำค่าการเจริญในช่วง log phase มาคำนวณหาค่า Generation Time (td) และ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ดังสูตร

$\mu = 0.693/td$

2.2. พีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญ

เตรียม starter โดยเลี้ยงเชื้อ T307 ในอาหาร สูตร A ที่มีความเข้มข้นของ yeast extract 0.1% แล้วนำไปบ่มในเครื่อง Incubator shaker ที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับค่า OD660 ให้ได้ 0.5 เพื่อใช้เป็น starter โดยใช้ 2% inoculum size ในแต่ละการทดลอง และนำมาทำการทดลองดังนี้ คือ

1. ผลของพีเอชต่อการเจริญเลี้ยงในอาหารสูตร A ที่มี pH 2, 3, 4, 5, 6 , 6.5 , 7 , 7.5 , 8 , 8.5 และ 9 (ใช้ Flask 250 ml มีอาหารอยู่ 100 ml) โดยนำไปบ่มในเครื่อง Incubator shaker ที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C
2. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญโดยเลี้ยงในอาหารสูตร A ที่มี pH 7.00 นำไปบ่มในเครื่อง Incubator shaker ที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 25°C , 30°C , 35°C และ 40 °C

ทั้ง 2 การทดลอง ดูผลทุก 5 ชั่วโมง โดยวัดการเจริญจากค่า OD 660 nm. และ pH ของอาหาร คำนวณหาค่า Generation Time (td) และ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ในช่วง log phase

2.3. การเจริญของเชื้อ T307 ในน้ำเสียจากถัง SRR ที่มีการเติม yeast extract หรือ NH_4NO_3

เตรียม starter โดยเลี้ยงเชื้อ T307 ในอาหาร สูตร A ที่มีความเข้มข้นของ yeast extract 0.1% แล้วนำไปบ่มในเครื่อง Incubator shaker ที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นนำ starter ที่ได้มาเลี้ยงในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และปรับ pH = 7.00 ที่มีปริมาณ Yeast extract 0.10% และมีการทดลองเติม NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้น 0.10 0.15 0.20 0.25 กรัม/100มล เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนในน้ำเสีย และมีน้ำเสียที่ไม่ได้เติมอะไรเป็น Control โดยใช้ 5% inoculums size (ใช้ Flask 250 ml มีน้ำเสียอยู่ 100 ml) โดยนำไปบ่มในเครื่อง Incubator shaker ที่ 100 rpm ดูผลทุก 5 ชั่วโมง โดยวัดการเจริญจากการวัดค่า OD 660 nm. , pH และ หาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตอยู่ (viable count) โดยวิธี spread plate ซึ่งในกรณีนี้จะทำเฉพาะกับน้ำเสียที่เติม Yeast extract 0.10% และที่มีการเติม NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้น 0.10 กรัม/100มล และในน้ำเสียที่ไม่ได้เติมอะไรเท่านั้น

2.4. ความเร็วรอบของการเขย่าต่อการเจริญและการลดซัลไฟด์

เตรียม starter โดยเลี้ยงเชื้อ T307 ในอาหาร สูตร A ที่มีความเข้มข้นของ yeast extract 0.1% แล้วนำไปบ่มในเครื่อง Incubator shaker ที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นนำ starter ที่ได้มาเลี้ยงในน้ำเสียจากถัง SRR ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และปรับ pH = 7.00 โดยใช้ 5% inoculum size (ใช้ Flask 250 ml มีน้ำเสียอยู่ 100 ml) โดยไปบ่มที่ 0 , 50 , 70 , 100 และ 120 rpm ดูผลทุก 5 ชั่วโมง โดยวัดการเจริญที่ค่า OD 660 nm รวมถึง pH ของน้ำเสีย และที่เวลา 0 , 10 , 20 , 30 และ 40 ชั่วโมง นำน้ำเสียไปวิเคราะห์หา Total sulfide (mg/l) และ Sulfate (mg/l) โดยก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ ได้ centrifuge ที่ 6,000 RCF เป็นเวลา 25 นาที โดยมีน้ำเสียที่ไม่มีการเขย่าเป็นชุดควบคุม (Control)

2.5. การลดซัลไฟด์ของเชื้อ T307 ในน้ำเสียที่มีการปรับพีเอชภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

เตรียม starter โดยเลี้ยงเชื้อ T307 ในอาหาร สูตร A แล้วนำไปบ่มในเครื่อง Incubator shaker ที่ 100 rpm เพราะต้องการให้เซลล์เจริญดี ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัด OD660 เกิน 0.5 จึงปรับให้เป็น 0.5 จากนั้นนำ starter ที่ได้มาเลี้ยงในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่า pH 9.46 ดังนั้นจึงปรับ pH ลดลงเหลือ 7.00 โดยใช้ 10% inoculums size ติดตามผลทุก 12 ชั่วโมง โดยวัดการเจริญจากค่า OD 660 nm. , pH, ปริมาณ Total Sulfide, ปริมาณ Dissolved Sulfide ปริมาณ Un-ionzed hydrogen sulfide ค่า COD และ ค่า BOD

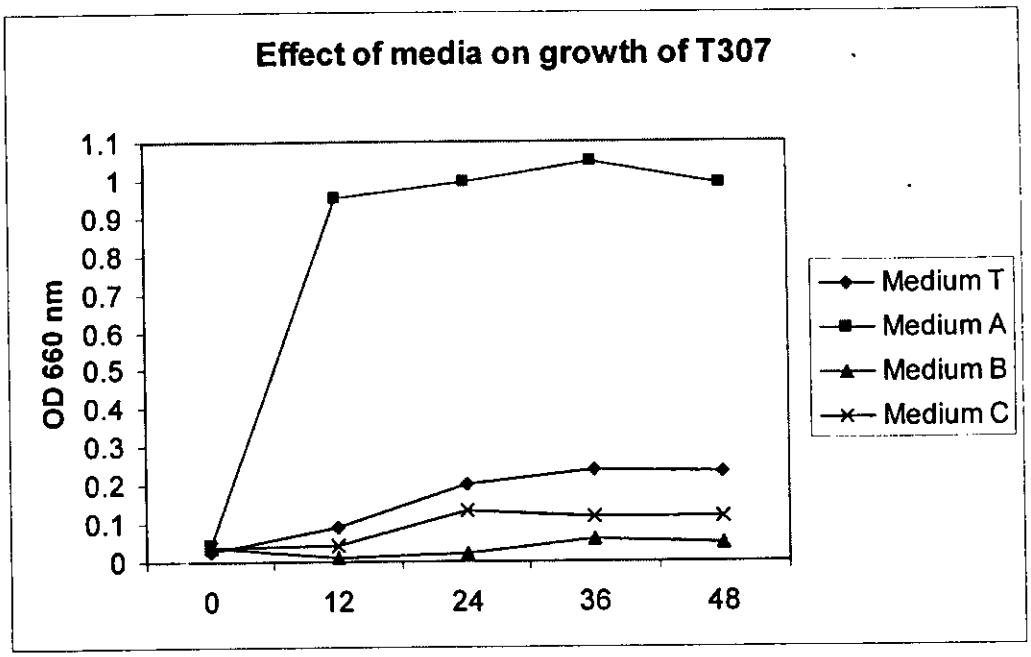
ผลการทดลอง

1. การเจริญในสภาพ mixotroph

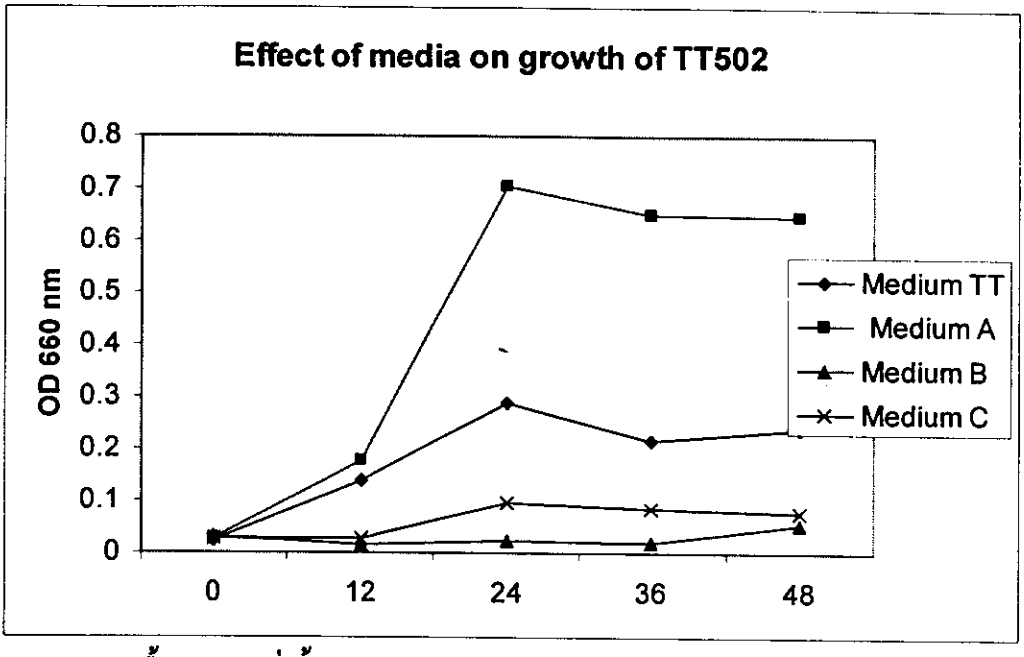
พบว่าทั้ง 2 เชื้อ คือ T307 และ TT502 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสูตร A ซึ่งมี yeast extract 0.2% โดยที่เชื้อ T307 เจริญได้ดีกว่า (OD660 = 1.00 เมื่อเลี้ยงไปได้ 12 ชม) TT502 (OD660 = 0.72 เมื่อเลี้ยงไปได้ 24 ชม) และในอาหารสูตร C ซึ่งมี yeast extract เพียง 0.002% เชื้อเจริญได้พอสมควร แสดงว่าเชื้อสามารถเจริญแบบ mixotroph ได้ และเชื้อทั้งสองต่างก็เจริญได้ดีในอาหารสูตร T และ TT (OD660 ประมาณ 0.30) ซึ่งใช้แยกเชื้อโดยเจริญได้ดีกว่า ในอาหารสูตร C (OD660 ประมาณ 0.15 สำหรับ T307 และ 0.10 สำหรับ TT502) และสูตรที่เชื้อทั้งสองเจริญได้ต่ำสุดคืออาหารสูตร B ที่มี $Na_2S_2O_3$ เข้มข้นสูงประมาณ 2 เท่าของสูตร T และ TT (รูปที่ 1 และ 2) และเมื่อพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในอาหารสูตร A พบว่าเชื้อทั้งสองทำให้ pH สูงขึ้นตามการเจริญของเชื้อ แต่เมื่อเชื้อเข้าสู่ stationary phase ค่า pH ก็เริ่มลดลง การเพิ่มของค่า pH ในช่วง log phase อาจเป็นไปได้จาก 2 สาเหตุคือการที่เชื้อใช้ yeast extract ซึ่งมีส่วนประกอบที่เป็นสารโปรตีนอยู่ (Pelczar et al. 1986) แล้วมีการปลดปล่อย

แอมโมเนียมออกมา ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อ Thiobacilli มีเอนไซม์ urease (Brierley and Brierley, 1968) และเชื้อทั้งสองที่ศึกษาก็มีเช่นกันจะแสดงผลในบทถัดไป และอีกสาเหตุหนึ่งอาจมาจาก $S_2O_3^{2-} + 4H^+ + 1/2\ O_2 \longrightarrow 2S^o + 4OH^-$ (Hallberg et al. 1996) แต่เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในอาหารสูตร B พบว่าไอโซเลท T307 มีค่า pH ค่อนข้างคงที่ดังรูปที่ 3 และเป็นกรณีไม่มี yeast extract อาจเป็นเพราะเชื้อมีการเจริญได้น้อย ในทางตรงกันข้ามไอโซเลท TT502 ดูเหมือนว่ามีการเพิ่มขึ้นของค่า pH เล็กน้อยดังนั้นการเพิ่มของค่า pH ควรมาจาก OH^- แต่ในอาหารสูตร T และ TT ที่ใช้แยกเชื้อทั้งสองการเจริญทำให้ ค่า pH มีค่าลดลงซึ่งน่ามาจาก SO_4^{2-} ที่เกิดขึ้นดังสมการ พิจารณาจากรูปที่ 3 และ 4

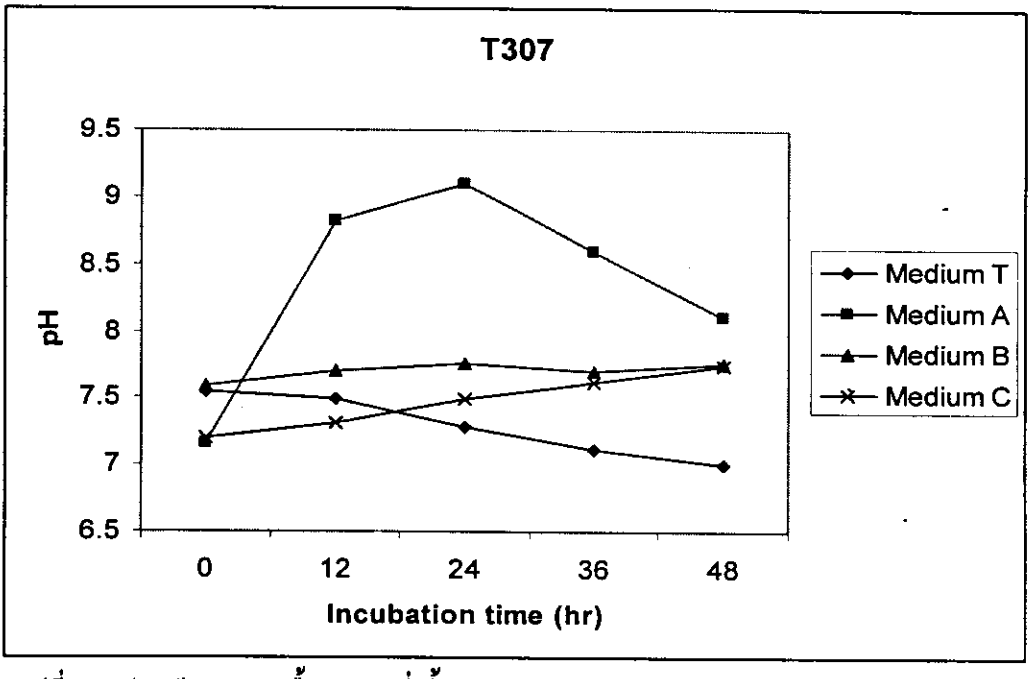
$2S^o + +2OH^- + 3O_2 \longrightarrow 2SO_4^{2-} + 2H^+$ (Hallberg et al. 1996; Oyarzun et al. 2003) และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารสูตร C เชื้อ T307 มีค่า pH เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงซึ่งการเพิ่มของค่า pH ควรมาจาก OH^- ที่เกิดขึ้นมากกว่า NH_4^+ เพราะมี yeast extract เพียง 0.002% ในอาหาร ขณะที่เชื้อ TT502 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ไม่แตกต่าง (รูปที่ 4) จากผลการศึกษานี้จึงเลือกใช้อาหารสูตร A เป็นสูตรที่ใช้เตรียมหัวเชื้อ หรือกล้าเชื้อเพื่อการกำจัดซัลไฟด์ออกจากน้ำเสียโรงงานแปรรูปน้ำยางพารา อย่างไรก็ตามการที่อาหารสูตรดังกล่าวต้องใช้ yeast extract ถึง 0.2% เป็นการทำให้ต้นทุนการเตรียมหัวเชื้อมีค่าใช้จ่ายสูงจึงได้ศึกษาต่อเพื่อหาแนวทางการใช้สารอื่นทดแทน หรือถ้าจำเป็นต้องใส่ก็ลดปริมาณลง นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งต่อไปจะศึกษาเฉพาะกับเชื้อ T307 เพราะมีการเจริญที่ดีกว่า TT502 ในสภาวะ mixotroph ซึ่งเป็นสภาวะของน้ำเสียจากถัง SRR และการที่เลือกใช้ mesophile ก็มีความเหมาะสมกับสภาพของน้ำเสียที่อุณหภูมิสูงไม่เกิน 40°C



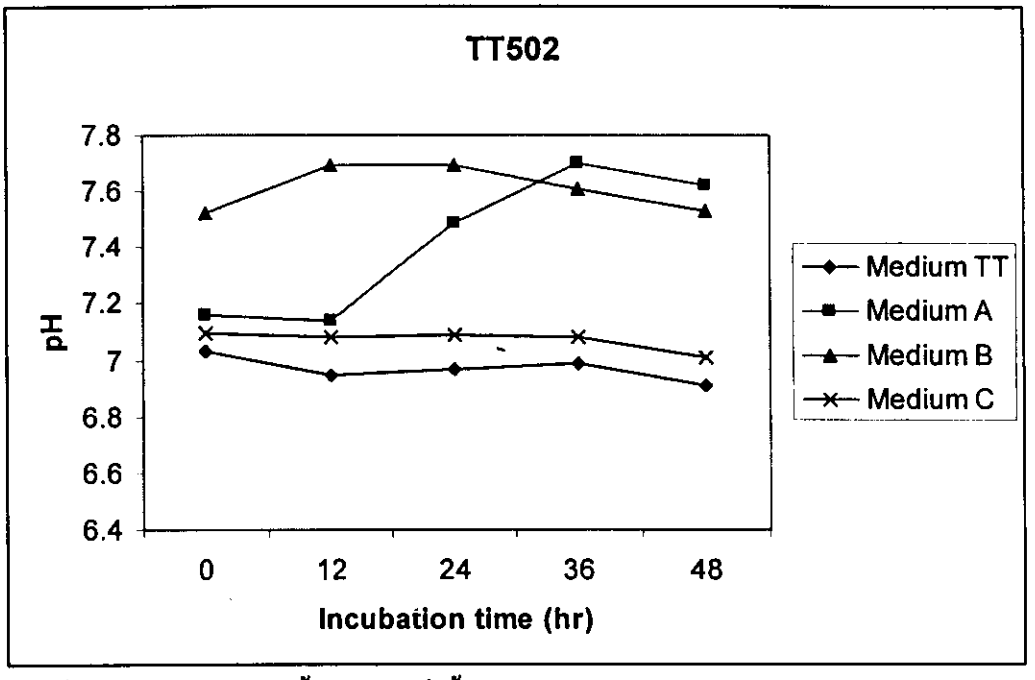
รูปที่ 1 การเจริญของเชื้อ T307 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ



รูปที่ 2 การเจริญของเชื้อ TT502 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงพีเอชของเชื้อ T307 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชของเชื้อ TT502 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ

2. ผลของปริมาณ yeast extract และการปรับสภาพของน้ำเสียและสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญ

2.1. ผลของ yeast extract ต่อการเจริญของเชื้อ T307

ผลการเจริญของ T307 ในอาหารสูตร A ที่มี yeast extract ปริมาณต่างๆกันโดยใช้กล้าเชื้อ 10% พบว่าการเจริญเพิ่มขึ้นตามปริมาณของ yeast extract ดังตารางที่ 1 แต่ได้เลือกปริมาณการเติมสารดังกล่าวที่ 0.10% เพราะเชื้อเจริญโดยที่ไม่ทำให้ pH เพิ่มขึ้นมากเหมือนกับการใช้ในปริมาณที่สูง (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) นอกจากนี้การเพิ่ม yeast extract จาก 0.05% เป็น 0.10% สามารถเพิ่มการเจริญได้ดีกว่าช่วงความเข้มข้นอื่นๆที่มีการเติมโดยสามารถลดค่า Td จาก 7.22 hr เป็น 4.44 hr จากการทดลองนี้พบว่าเชื้อมีการเจริญในสภาพ mixotroph ได้ดีกว่า chemolithoautotroph ที่มี $Na_2S_2O_3$ 0.8% เป็นแหล่งพลังงานอย่างชัดเจน

ตารางที่ 1 การเจริญของเชื้อ T307 ในอาหารสูตร A ที่มี yeast extract ปริมาณต่างๆกัน

Yeast extract (%)	μ (hr^{-1})	Generation time (hr)
0	0.0152	46
0.05	0.096	7.22
0.10	0.156	4.44
0.15	0.197	3.52
0.20	0.252	2.75

2.2. ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ T307

เชื้อ T307 เมื่อทดสอบในอาหารสูตร A ที่มี yeast extract 0.1% และกล้าเชื้อ 2% สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 5 ถึง 9 แต่ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่เป็นกรดจัด (pH 2-4) เชื้อเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางถึงเป็นด่างเล็กน้อย โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 7.0 ถึง 7.5 และรองลงมาในช่วงพีเอชที่เป็นกรดเล็กน้อย (pH 6.5) และเป็นด่างปานกลาง (pH 8-9) ไม่ได้ทดสอบพีเอชที่สูงกว่านี้ รายละเอียดดังตารางที่ 2 ผลการทดลองนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองครั้งที่ผ่านมาซึ่งใช้ yeast extract 0.1% เช่นกันโดยมีพีเอชเริ่มต้นคือ 7 เหมือนกันซึ่งมีค่า Td 4.44 ชม แต่ในการทดลองนี้มีค่า 5.03 ชม มีสาเหตุจากการลดปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นจาก 10% เป็น 2% และในตารางที่ 3 เป็นผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ T307 เมื่อทดสอบในอาหารสูตร A ที่มี yeast extract 0.1% และพีเอชเริ่มต้นของอาหารคือ 7.0 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีมากในช่วงอุณหภูมิ 25-30 °C โดยมีค่า Td ประมาณ 5 ชม และเจริญได้ดีที่ 35°C และพอสมควรที่ 40°C แต่เจริญได้น้อยมากที่ 45°C (ไม่ได้แสดงผล)

ตารางที่ 2 ผลของพีเอชต่อการเจริญของเชื้อ T307 เมื่อทดสอบในอาหารสูตร A ที่มี yeast extract 0.1%

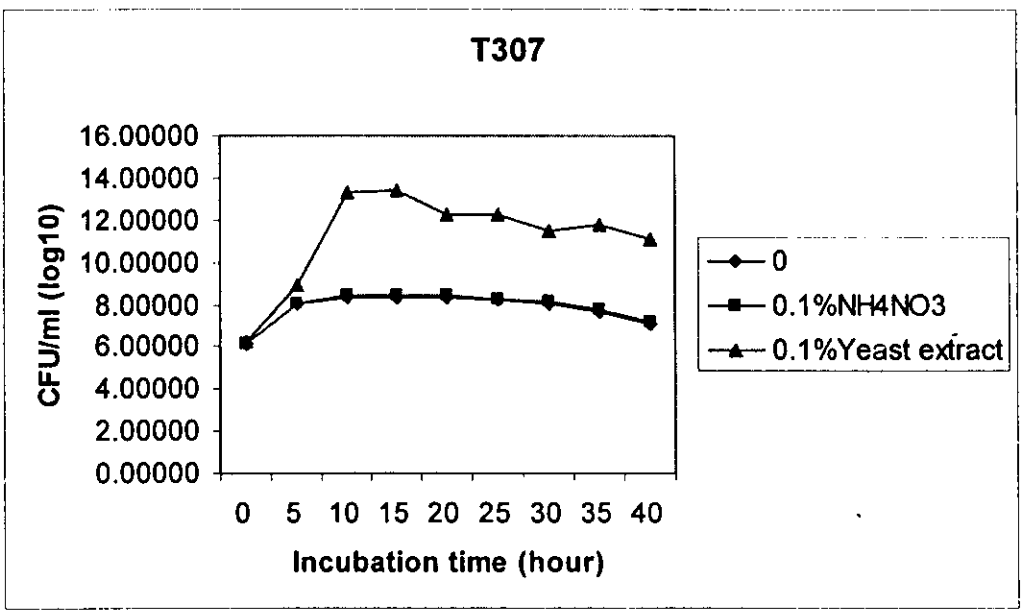
pH	μ (hr^{-1})	Generation time (hr)
6.0	0.1202	5.77
6.5	0.1260	5.50
7.0	0.1377	5.03
7.5	0.1325	5.23
8.0	0.1191	5.82
8.5	0.1165	5.95
9.0	0.1132	6.12

ตารางที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ T307 ในอาหารสูตร A ที่มี yeast extract 0.1%

Temperature (°C)	μ (hr^{-1})	Generation time (hr)
25	0.1370	5.06
30	0.1379	5.03
35	0.1176	5.89
40	0.0998	6.94

2.3. ผลการเจริญของเชื้อ T307 ในน้ำเสียที่มีการเติม yeast extract หรือ NH_4NO_3

ผลการเจริญในอาหารที่เป็นน้ำเสียจากถัง SRR ที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 พบว่าในกรณีที่มีการเติม yeast extract 0.1% เชื้อเจริญได้ดีมาก แต่ในกรณีของการเติม NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นต่างกันจาก 0.10% ถึง 0.25% พบว่าความเข้มข้นที่สูงขึ้นกดการเจริญของเชื้อ และที่ 0.10% ผลการเจริญไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมอะไร (ไม่ได้นำเสนอผลการทดลอง) จึงได้ทดลองต่อโดยนับการเพิ่มจำนวนของเชื้อในน้ำเสียที่มีการเติม yeast extract 0.1% NH_4NO_3 0.10% และไม่เติมเพื่อดูปริมาณของเชื้อว่าจะมีปริมาณมากพอในการที่จะไปกำจัดซัลไฟด์ไหมพบว่าการเติม yeast extract ทำให้จำนวนเซลล์เป็นเพิ่มจากประมาณ 6 log CFU/ml เป็น 13 log CFU/ml ภายใน 10 ชม ขณะที่ในน้ำเสียที่ไม่เติมอะไรเลยกับที่เติม NH_4NO_3 0.10% พบว่าเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นพอๆกันคือ 2 log cycle ในช่วงเวลาดังกล่าว (6 log CFU/ml เป็น 8 log CFU/ml) ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 การเจริญของเชื้อ T307 ในน้ำเสียจากถัง SRR ที่มีการเติมสารอาหารและไม่เติม

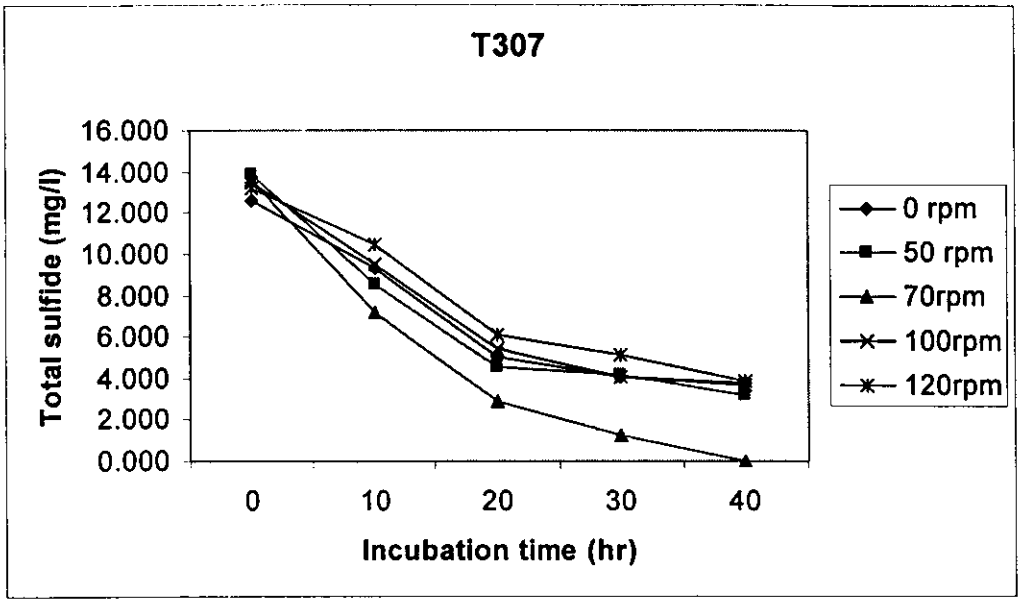
2.4. ผลของความเร็วรอบของการเขย่าต่อการเจริญและการลดซัลไฟด์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพิจารณาผลการเขย่าที่ทำให้เกิดการผสมของสารอาหารและตัวเซลล์ นอกจากนี้ยังอาจมีผลต่อปริมาณการละลายได้ของออกซิเจน ผลการทดลองพบว่าความเร็วรอบของการเขย่าไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ (ไม่ได้แสดงผล) แต่พบว่ามีผลต่อการเพิ่มค่าพีเอชของอาหารในช่วง log phase ดังตารางที่ 4 โดยที่การเขย่าที่ 50 rpm และไม่มีการเขย่า (วางตั้งไว้) พีเอชเพิ่มจาก 7 เป็น 8 ภายใน 10 ชม แต่เมื่อมีการเขย่าที่ 70 rpm และ 100 rpm ค่าพีเอชเป็น 8.2 และที่ 120 rpm มีค่าพีเอช 8.3 อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 40 ชม พบว่ามีค่าพีเอชพอๆกันคือ 8.4-8.5 ซึ่งการเพิ่มของค่าพีเอชนี้อาจมาจากการที่เชื้อออกซิไดซ์ซัลไฟด์แล้วเกิด OH^- ดังที่เคยกล่าวมาแล้ว และอาจเป็น

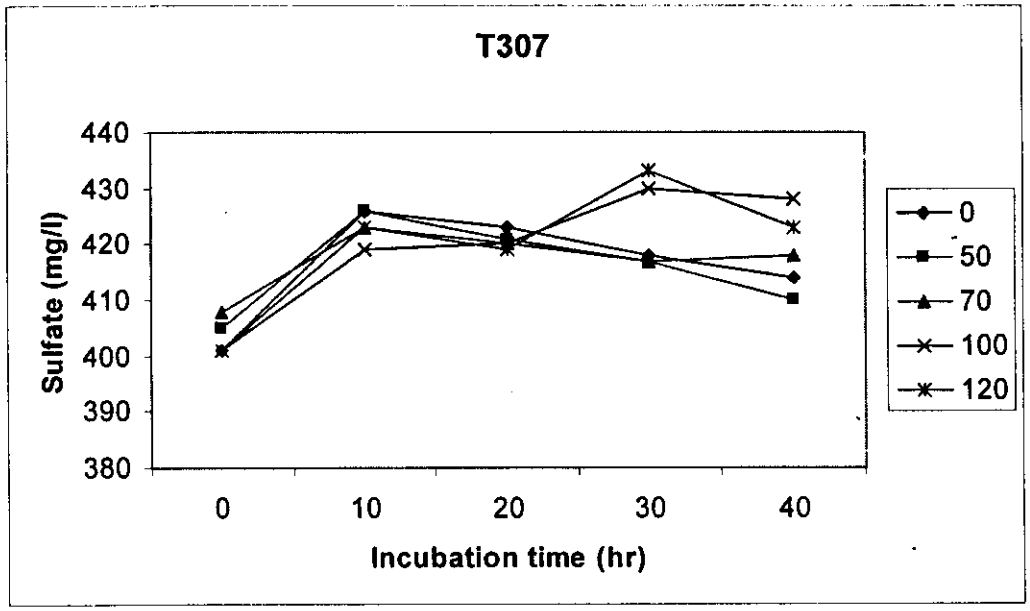
สาเหตุร่วมจากการที่เชื้อใช้สาร volatile fatty acids เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งจะได้ทดสอบการใช้สารเหล่านี้ต่อไป และเมื่อพิจารณาการลดซัลไฟด์พบว่าการเขย่าที่ 70 rpm ทำให้ซัลไฟด์ลดลงได้ถึง 100% ดังรูปที่ 6 ขณะที่การเกิดซัลเฟตก็เพิ่มขึ้นบ้างดังรูปที่ 7 ข้อสังเกตที่ได้จากทดลองนี้และการทดลองอื่นๆ ที่ไม่ได้นำเสนอผลพบว่าการที่ซัลเฟตเหลืออยู่มากถึง 400 มก/ล ทำให้เกิดซัลไฟด์ต่ำ อาจแสดงถึงประสิทธิภาพในถัง SRR ทำงานได้ไม่เต็มที่อาจเป็นเพราะสภาพในถัง SRR ขณะนั้นๆ ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของ sulfate reducing bacteria หรือเป็นเพราะช่วงเวลาที่ไปเก็บตัวอย่างการบำบัดในถังนี้ยังไม่สมบูรณ์ (ไม่ครบ retention time) และสำหรับผลการทดลองนี้ เมื่อพิจารณาปริมาณซัลเฟตที่เกิดขึ้นไม่มากนักจากเริ่มต้นซึ่งอยู่ในช่วง 400-410 มก/ล เป็นประมาณ 420-430 มก/ล ในช่วง 10 ชมแรกของการเลี้ยงเป็นเพราะการออกซิไดซ์ซัลไฟด์ส่วนใหญ่เป็นการออกซิไดซ์ที่ไม่สมบูรณ์คือจากซัลไฟด์เป็นซัลเฟอร์ (สังเกตตะกอนละเอียดสีเหลืองอ่อนได้) ไปไม่ถึงซัลเฟต ซึ่งเกี่ยวกับปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่อาจไม่สูงเท่าที่ควร โดยมีการรายงานว่าซัลไฟด์จะถูกออกซิไดซ์เป็นซัลเฟอร์ (สารตัวกลางก่อนที่จะถูกออกซิไดซ์ต่อเป็นซัลเฟต) เมื่อมีการจำกัดปริมาณออกซิเจน (<0.10 มก/ล) (www.public.iastate.edu/~samirk; http://library.wur.nl/wda/abstracts/ab3780.html; Velasco et al. 2004) แต่การเพิ่มความเร็วรอบการเขย่าอาจทำให้มีออกซิเจนเพิ่มขึ้นเพราะพบว่าความเร็วการเขย่าที่ 100 rpm และที่ 120 rpm ทำให้ซัลเฟตมีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 7) จากผลการทดลองนี้ในการศึกษาครั้งต่อไปจะใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 70 rpm เพราะลดซัลไฟด์ได้ดีและเกิดซัลเฟตน้อย

ตารางที่ 4 ผลของความเร็วรอบของการเขย่าต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในช่วง log phase ของไโซเลท T307 เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียจากถัง SRR

ความเร็วรอบของการเขย่า (rpm)	pH
0	8
50	8
70	8.2
100	8.2
120	8.3



รูปที่ 6 การลดปริมาณของซัลไฟด์ในน้ำเสียจากถัง SRR โดยเชื้อ T307 เมื่อเลี้ยงโดยมีการเขย่าต่างกัน

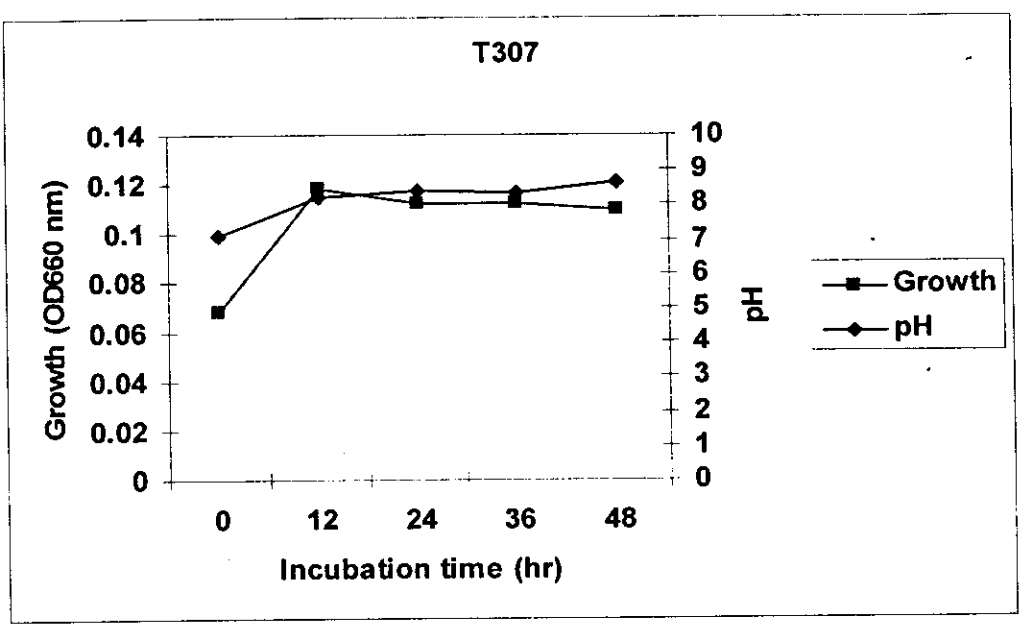


รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของซัลเฟตในน้ำเสียจากถัง SRR โดยเชื้อ T307 เมื่อเลี้ยงโดยมีการเขย่าต่างกัน

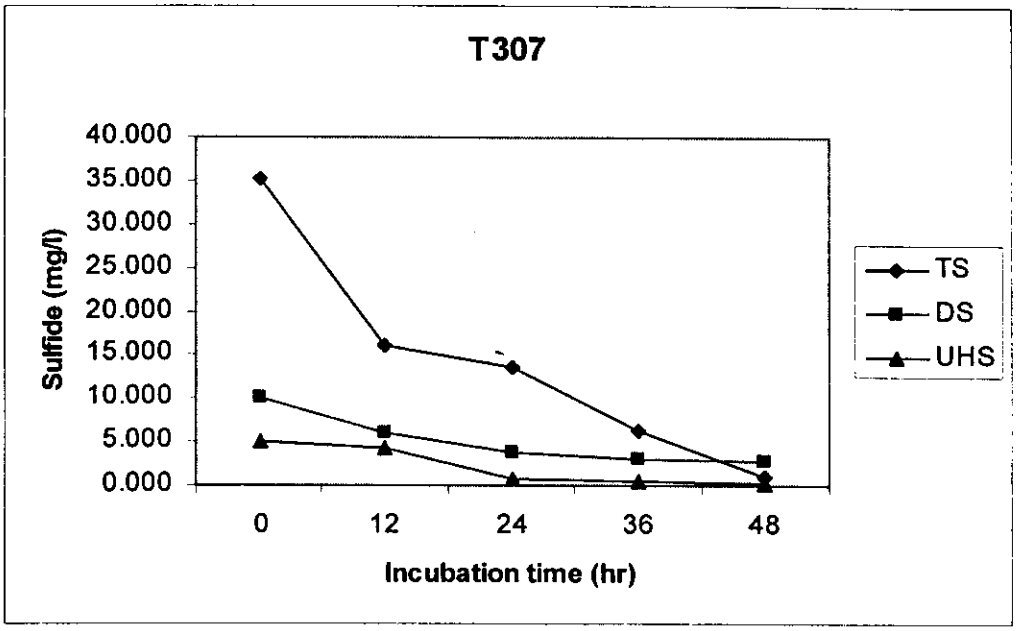
2.5. ผลการลดซัลไฟด์ของ T307ในน้ำเสียที่มีการปรับพีเอชภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

การเจริญของเชื้อ T307 ในน้ำเสียที่มีการปรับพีเอชภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่าเชื้อเจริญได้ดีพอสมควรเพราะสังเกตจากค่า OD660 มีค่าประมาณ 0.12 เมื่อเลี้ยงไปได้ 12 ชม และในช่วงเวลาดังกล่าวทำให้พีเอชเพิ่มจาก 7 เป็น 8 (รูปที่ 8) และลดซัลไฟด์ในรูป TS ได้ 57% (รูปที่ 9) แต่เมื่อเชื้อเข้าสู่ stationary phase แล้วกิจกรรมการลดซัลไฟด์ยังคงดำเนินอยู่โดยเมื่อเลี้ยง

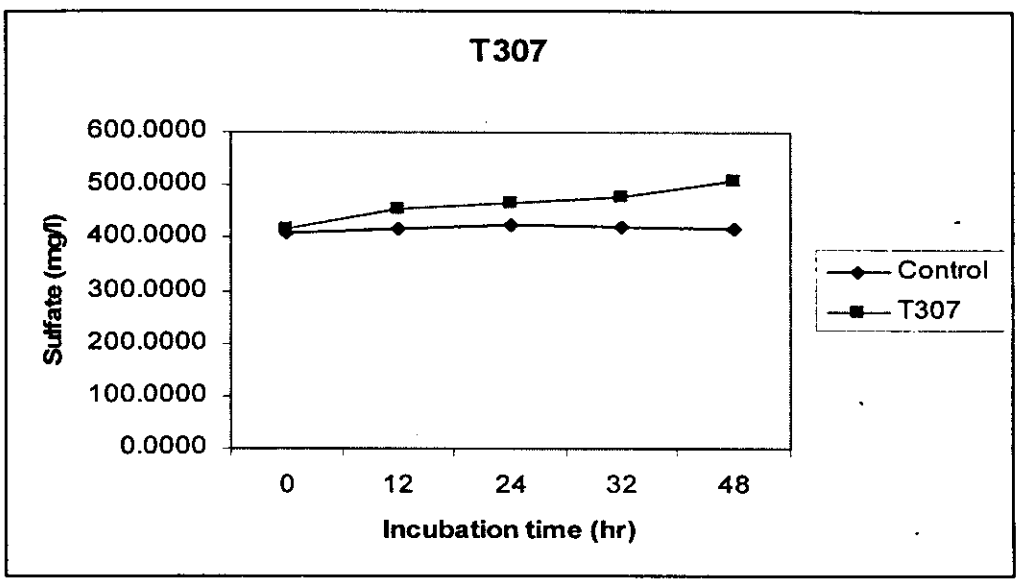
ไปจนครบ 48 ชม ก็สามารถกำจัดซัลไฟด์ไม่ว่าจะอยู่ในรูป TS และ DS ได้เกือบหมด และในรูป UHS ได้หมด ซึ่งทั้งนี้อาจเป็นที่สภาพของพีเอชมีค่าเกือบ 9 ก็เป็นได้ เพราะว่าที่พีเอชดังกล่าวทำให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์อยู่ในรูปซัลไฟด์ (S^{2-}) โดยที่ค่าพีเอชเป็น 8 ขึ้นไปจะอยู่ในรูป S^{2-} (ละลาย) เป็นส่วนใหญ่แต่ถ้าพีเอช อยู่ระหว่าง 7-9 จะอยู่ในรูป HS^- (ละลาย) เป็นส่วนใหญ่ แต่ถ้าพีเอช ต่ำกว่า 7 ก็อยู่ในรูป H_2S (UHS) เป็นส่วนใหญ่ (Sawer and McCarty, 1978; Markl, 1999) การออกซิไดซ์ซัลไฟด์ทำให้เกิดซัลเฟตขึ้นโดยเพิ่มจาก 400 มก/ล เป็น 500 มก/ล เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง ดังรูปที่ 10 และยังพบตะกอนของซัลเฟอร์เป็นสีเหลืองอ่อนอยู่ด้วย แสดงว่าในการออกซิไดซ์ซัลไฟด์ของเชื้อมีการออกซิไดซ์ที่ไม่สมบูรณ์รวมอยู่ด้วยเนื่องจากในการทดลองได้ปรับให้มีการเขย่าเพียง 70 rpm จึงอาจส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนไม่มากพอที่จะให้เกิดการออกซิไดซ์ซัลไฟด์อย่างสมบูรณ์ทั้งหมด นอกจากนี้พบว่าค่า BOD แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเพราะเชื้อเจริญแบบ mixotroph แต่กลับพบว่ามีการลดลงของค่า COD 16.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถสังเกตได้จากรูปที่ 11 เป็นเพราะเชื้อใช้สารอาหารที่ย่อยสลายได้ยากรวมถึงพวกซัลไฟด์ด้วย ในการทดลองนี้สัดส่วนของ BOD/COD มีค่าประมาณ 0.76 ซึ่งอยู่ในช่วงของน้ำเสียจากชุมชนที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.40-0.80 (เกรียงศักดิ์, 2542) อาจเป็นเพราะอาหารที่เตรียมหัวเชื้อมีการใช้ยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ และใช้หัวเชื้อสูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์



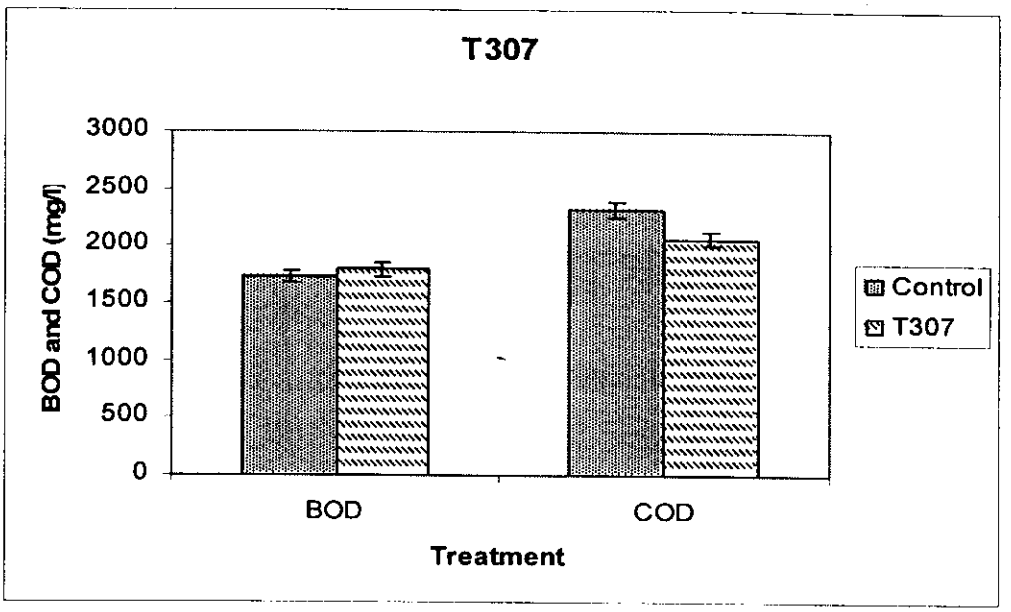
รูปที่ 8 การเจริญของเชื้อ T307 และพีเอชที่เปลี่ยนในน้ำเสียที่มีการปรับพีเอชภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ



รูปที่ 9 การลดซัลไฟด์ในน้ำเสียจากถัง SRR ของเชื้อ T307 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ



รูปที่ 10 การเพิ่มขึ้นของซัลเฟตในน้ำเสียจากถัง SRR โดยเชื้อ T307 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ



รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของค่า BOD และ COD ในน้ำเสียจากถัง SRR โดยเชื้อ T307 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

บทสรุป

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ T307 และ TT502 พบว่าเชื้อทั้งสองไอโซเลทนอกจากสามารถเจริญได้ในสภาพใช้ซัลไฟด์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นแหล่งคาร์บอน (chemolithoautotroph) เชื้อดังกล่าวยังสามารถเจริญได้ในสภาพที่ใช้แหล่งพลังงานจากซัลไฟด์ แต่ใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ (ยีสต์สกัด) ได้ (mixotroph) และเนื่องจากสภาพของน้ำเสียอุณหภูมิอยู่ในช่วง mesophile จึงเลือกศึกษาเฉพาะกับ T307 การเจริญของเชื้อ T307 ในสภาพ mixotroph ขึ้นกับปริมาณของยีสต์สกัด เช่นในกรณีที่มียีสต์สกัด 0.10% เชื้อมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.156 ชม โดยมีเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวเพิ่มเป็น 2 เท่า คือ 4.44 ชม. พีเอชที่เหมาะสมต่อการะเจริญของเชื้อคือ 7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 25-30°C และพบว่าการเติม NH_4NO_3 ในน้ำเสียที่ใช้เลี้ยง (จากถัง SRR) ไม่มีผลช่วยในเร่งการเจริญของเชื้อ และความเร็วรอบของการเขย่าทำให้เชื้อเจริญได้ดีและเกิดการออกซิไดซ์ซัลไฟด์ที่ไม่สมบูรณ์ได้ซัลเฟอร์แทนซัลเฟต (partial oxidation) คือ 70 rpm และภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ T307 สามารถลดซัลไฟด์ไม่ว่าจะอยู่ในรูป TS และ dissolved sulfide (DS) ได้เกือบหมดภายใน 48 ชม. ส่งผลให้ค่า COD ของน้ำเสียลดลง 16.67 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ค่า BOD แทบไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าเชื้อใช้พวกสารอนินทรีย์โดยเฉพาะซัลไฟด์เพื่อการเจริญเติบโต

เอกสารอ้างอิง

1. เกรียงศักย์ อุดมสินโรจน์. 2542. การบำบัดน้ำเสีย หจก. สยามสเตชั่นเนอรี่ซัพพลายส์.

2. Brierley, J.A. and Brierley, C.L. 1968. Urea as a nitrogen source for Thiobacilli. *J. of Bacteriology.* **96**, 573-

3. Hallberg K. B., Dopson, M. and Lindstrom, E.B. 1996. Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus. J. of Bacteriology.* **178**, 6-11.

4. Markl, H. 1999. Modeling of biogas reactors. In Biotechnology. 2nd ed., vol.11a ed. J. Winter, A Wiley Company, pp. 527-560.

5. Moat , A.G. and Foster, J.W. 1995. Microbial Physiology. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., Publication.

6. Oyarzun, P. Arancibia, F., Canales Christian and Aroca, G.E. 2003. Biofiltration of high concentration of hydrogen sulphide using *Thiobacillus thioparus. Process biochemistry.* **39**, 165-170.

7. Pelczar, M.J., Jr., Chen, E.C.S. and Krieg, N.R. 1986. Microbiology. McGraw-Hill International editions.

8. Sawer and Mc Carty.1978. Chemistry for Environmental Engineers.3 rd ed. Mc Graw Hill, New York.

9. Velasco, A., Alcintara, S., Razo-Flores, E. and Revah, S. 2004. Partial thiosulfate oxidation by steady-state continuous culture in a bioreactor-settler system. *J. Chem Technol. Biotechnol.* **79**, 132-139.