สารบัญ

สารบัญ	**หน้า**
บทคัดย่อภาษาไทย	X
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	XII
บทที่ 1	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
บทที่ 2	
วิธีการวิเคราะห์	7
วิธีการวิจัย	8
บทที่ 3	
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	14
บทที่ 4	68
เอกสารอ้างอิง	69
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	70
การเผยแพร่ผลงาน	71

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	วิธีการวิเคราะห์ต่างๆที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	7
2	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ในน้ำเสียโดยใช้น้ำหมักชีวภาพสับปะรด	9
3	การหาปริมาณที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ PNSBsi น้ำหมัก และเวลาการบำบัด	11
4	การหาปริมาณที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ PNSB P1 น้ำหมัก และระยะเวลาการบำบัด	11
5	ปริมาณแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ถูกกระตุ้นด้วยน้ำหมักสับปะรด และแหล่งไนโตรเจน	25
6	ผลของน้ำหมักในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และค่า ORP (oxidation-reduction potential) ภายใต้สภาวะ microaerobic-light เป็นเวลา 2 วัน	29
7	การวิเคราะห์ทางสถิติของค่า ORP ด้วย second–order model	30
8	การวิเคราะห์ทางสถิติของค่า PNSBsi ด้วย second–order model	30
9	ผลการทดสอบยืนยันผลของการกระตุ้นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงด้วยน้ำหมักชีวภาพเมื่อเทียบกับที่ได้จากการออกแบบโดยใช้ BBD	32
10	ผลของน้ำหมักสับปะรดในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ในน้ำเสียเมื่อบ่ม 48 ชั่วโมง ในสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย	33
11	ผลของความเข้มแสงที่กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงด้วยน้ำหมักสับปะรดในน้ำเสียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ microaerobic-light	34
12	การใช้น้ำหมักสับปะรด 2 % กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไอโซเลท P1 ในน้ำเสีย ในสภาวะ microaerobic-light เป็นเวลา 48 ชม	36
13	ผลการบำบัดน้ำเสียโดยใช้กล้าเชื้อ PNSBsi ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง	38
14	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติค่า COD จาก quadratic model	39
15	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติค่า suspend solid (SS) จาก quadratic model	39

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติค่า total sulfide (TS) จาก quadratic model	40
17	ผลการวิเคราะห์ค่าที่เหมาะสมจากการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่กระตุ้นด้วยน้ำหมักสับปะรดในการในการบำบัดน้ำเสียภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง	42
18	การทดสอบยืนยันผลในการบำบัดน้ำเสียด้วยน้ำหมักชีวภาพ กล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (PNSBsi) และการใช้ร่วมภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง	43
19	การทดสอบยืนยันผลในการบำบัดน้ำเสียปราศจากเชื้อด้วยการเติมน้ำหมักชีวภาพ กล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และการใช้ร่วมภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง	44
20	การวิเคราะห์ยืนยันผลของชุดทดสอบที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสีย	45
21	การใช้ Central Composite Design แสดงค่าจริงและค่าทำนายของการบำบัดโดยใช้กล้าเชื้อไอโซเลท P1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยน้ำหมักสภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง	46
22	การวิเคราะห์ทางสถิติค่า COD จาก quadratic model	47
23	การวิเคราะห์ทางสถิติค่า suspend solid (SS) จาก quadratic model	47
24	การวิเคราะห์ทางสถิติค่า total sulfide (TS) จาก quadratic model	48
25	การวิเคราะห์ค่าที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง P1 ที่กระตุ้นด้วยน้ำหมักกสับปะรด	48
26	การทดสอบยืนยันผลน้ำเสียดิบที่ผ่านการบำบัดด้วยกล้าเชื้อไอโซเลท P1 จากการกระตุ้นด้วยน้ำหมัก น้ำหมัก และการใช้ร่วมภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง	50
27	การทดสอบยืนยันผลของน้ำเสียฆ่าเชื้อที่ผ่านการบำบัดด้วยกล้าเชื้อไอโซเลท P1 จากการกระตุ้นด้วยน้ำหมัก น้ำหมัก และการใช้ร่วมภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง	51

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
	มีอากาศเล็กน้อย-มีแสง	
28	องค์ประกอบของชีวมวล (Proximate analysis) ที่ได้จากน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง โดยกลุ่มเชื้อ PNSB ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละชุด	52
29	Closest relatives of retrieved sequences obtained by BLASTN searches	54
30	ผลการวิเคราะห์ลำดับการจัดเรียงตัวของ DNA ที่ตัดจากแถบที่ปรากฏบนเจล DGGE พร้อมค่าเปอร์เซนต์ความเหมือนระหว่าง 16S rRNA gene of dominant band ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับยีนส์ที่เทียบใน NCBI database	57
31	ลักษณะของน้ำเสียและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดโดยน้ำหมักชีวภาพ (0.75%) ผสมกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ P1 (2%) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง	61
32	ปริมาณธาตุอาหารพืชของน้ำเสียและน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดโดยน้ำหมักชีวภาพ (0.75%) และกลุ่มเชื้อ P1 (2%) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง เป็นเวลา 4 วัน	62
33	น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวใบ และความยาวของต้นผักบุ้งที่อายุ 7 วัน	62
34	น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความกว้างพุ่ม ความสูงต้น และจำนวนผลของต้นพริก หลังการเก็บเกี่ยว อายุ 30 วัน	64
35	ปริมาณธาตุอาหาร และโลหะหนักในผักบุ้ง	65
36	ปริมาณธาตุอาหาร และโลหะหนักในผลพริกเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 30 วัน	66
37	การประเมินค่าใช้จ่ายในการบำบัดโดยใช้กลุ่มเชื้อ P1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ซึ่งนำไปใช้ในภาคสนาม	67

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	การเปลี่ยนของค่า Oxidation Reduction Potential (ORP) ในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	14
2	การเปลี่ยนของค่า Dissolved Oxygen (DO) ในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	15
3	การเปลี่ยนของ pH ในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	15
4	การเปลี่ยนของค่า Electrical conductivity (EC) ในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	16
5	การเปลี่ยนของค่า OD ที่แสดงการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในน้ำเสียที่กระตุ้นโดยน้ำหมักสับปะรดภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	16
6	การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในน้ำเสียที่กระตุ้นด้วยน้ำหมักสับปะรดเมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน	17
7	การเปลี่ยนแปลงของค่า ORP ในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้น 2.5% และ KNO3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	18
8	การเปลี่ยนแปลงของค่า Dissolved Oxygen (DO) ในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้น 2.5% และ KNO3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	18
9	การเปลี่ยนแปลงของค่า EC ในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้น 2.5% และ KNO3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	18
10	การเปลี่ยนแปลงของ pH ในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้น 2.5% และ KNO3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	19
11	การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้น 2.5% และ KNO3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	19

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
12	การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้น 2.5% และ KNO3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศที่เวลาเริ่มต้น (72 h)	20
13	การเปลี่ยนแปลงของค่า ORP ในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้น 2.5% และ (NH4)2SO4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	20
14	การเปลี่ยนแปลงของค่า DO ในน้ำเสียที่เติมน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้น 2.5% และ (NH4)2SO4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	21
15	การเปลี่ยนแปลงของค่า EC ในน้ำเสียโดยน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้น 2.5% และ (NH4)2SO4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	21
16	การเปลี่ยนแปลงของ pH ในน้ำเสียโดยน้ำหมักสับปะรดที่ความเข้มข้น 2.5% และ (NH4)2SO4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	21
17	การเจริญของเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในน้ำเสียโดยน้ำหมักสับปะรด ที่ความเข้มข้น 2.5% และ (NH4)2SO4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	22
18	การเปลี่ยนแปลงของค่า ORP ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	23
19	การเปลี่ยนแปลงของค่า DO ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	23
20	การเปลี่ยนแปลงของค่า EC ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	24
21	การเปลี่ยนแปลงของ pH ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	24
22	การเปลี่ยนแปลงของค่าแอมโมเนียม (NH^+_4) ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	24

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
23	การเปลี่ยนแปลงของค่าไนเตรท (NO^-_3) ในน้ำเสียโดยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	25
24	การเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศที่เวลาเริ่มต้น (72 h)	25
25	การเปลี่ยนแปลงของค่า ORP ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	26
26	การเปลี่ยนแปลงของค่า DO ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	26
27	การเปลี่ยนแปลงของค่า EC ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	27
28	การเปลี่ยนแปลงของ pH ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	27
29	การเปลี่ยนแปลงของค่า OD ที่ 660 nm ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	21
30	การเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสภายใต้ สภาวะมีแสง-ไร้อากาศที่ 72 h	28
31	การเปลี่ยนแปลงของค่าแอมโมเนียม (NH^+_4) ในน้ำเสียที่เติมแหล่งไนโตรเจน และฟอสฟอรัสภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศ	28
32	ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ทดสอบ (ปริมาณน้ำหมัก ค่า COD และ pH เริ่มต้น) ต่อค่า ORP (mV) และปริมาณแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Log CFU/ml)	31
33	ผลการเติมน้ำหมักสับปะรดที่ไม่ฆ่าเชื้อ และฆ่าเชื้อ ต่อการเจริญของ PNSB ในน้ำเสียภายใต้สภาวะ microaerobic-light (A = 0 h, B = 48 h)	33

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
34	ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (ปริมาณกล้าเชื้อ น้ำหมัก และเวลาการบำบัด) ต่อการลดค่า COD SS และ TS ในการบำบัดน้ำเสียภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง	41
35	ประชากรที่พบเสมอในกลุ่มประชากรกล้าเชื้อ PNSB ที่ถูกกระตุ้นด้วยน้ำหมักศึกษาโดย PCR-DGGE of partial 16s rRNA gene fragments	53
36	ความหลากหลาย (diversity) และความเท่าเทียบกัน (evenness) ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นด้วยน้ำหมักระหว่างกล้าเชื้อ (PNSBsi และ PNSB P1) โดย DGGE profiles และวิเคราะห์โดย Simpson's index	55
37	สัดส่วนของกลุ่มประชากรหลักที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้กล้าเชื้อ PNSB ที่เตรียมในน้ำเสียและกระตุ้นการเจริญด้วยน้ำหมัก (PNSBsi หรือ PNSB P1) โดยใช้ DGGE profile of partial 16S rRNA gene sequences	56
38	ประชากรในระบบบำบัดน้ำเสียเมื่อนำเสนอในรูป Phylogenetic tree โดยใช้ neighbor joining analysis ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแถบที่พบอยู่บน DGGE ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ primer 338FGC and 518R	58
39	รูปแบบ DGGE profile ที่เกิดจาก PCR amplification ของ *puf*M gene ของการบำบัดน้ำเสียที่ใช้กล้าเชื้อที่กระตุ้นด้วยน้ำหมัก ที่ระยะเวลาจากเริ่มต้นจนสิ้นสุดการบำบัด	59
40	บ่อเตรียมกล้าเชื้อให้แสงเวลากลางคืน	60
41	เปรียบเทียบต้นผักบุ้งในแต่ละวิธีทดลอง ในวันที่ 7 ของการปลูก	63
42	เปรียบเทียบต้นพริก และผลพริกในแต่ละวิธีทดลอง ในวันที่ 30 ของการปลูก	64

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะผู้ดำเนินการสหกรณ์โรงรมยาง ต. เนินพิจิตร อ. นาหม่อม จ. สงขลา เป็นอย่างยิ่งที่ได้อนุญาติให้ใช้สถานที่และน้ำเสียเพื่อการวิจัยนี้ตลอดจนอำนวยความสะดวกให้เป็นอย่างดีจึงทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและหน่วยงานต่างๆภายในมหาวิทยาลัยและภายนอกที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์และครุภัณฑ์เพื่อการศึกษาวิจัยเช่น หน่วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และศุนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และที่สำคัญยิ่งคือแหล่งทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555 และ 2556 (SCI550026S) ที่สนับสนุนเงินอุดหนุนงานวิจัยและเป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยในการผลิตนักศึกษาปริญญาเอก นายนัสที กรโอชาเลิศ นอกจากนี้ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่มีส่วนช่วยเสนอแนะเพื่อทำให้งานวิจัยมีคุณภาพ และขอบคุณบุคลากรสายสนับสนุนที่คอยอำนวยความสะดวกทั้งของคณะวิทยาศาสตร์และสำนักวิจัยและพัฒนา

ดวงพร คันธโชติ

(หัวหน้าโครงการวิจัย)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อบำบัดน้ำเสียจากการทำยางแผ่นของสหกรณ์โรงรมยางด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ (purple nonsulfur bacteria: PNSB) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดและกำจัดซัลไฟด์ (sulfide) ที่มาจากแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟล์ (H_2S) โดยใช้น้ำหมักสับปะรด (fermented pineapple extract: FPE) กระตุ้นเชื้อ PNSB ที่อยู่ในน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (microaerobic light conditions) เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ และเรียกกล้าเชื้อนี้ว่า stimulated indigenous purple nonsulfur bacteria (PNSBsi) เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญของ PNSB ประจำถิ่น (PNSBsi) จึงใช้วิธีทางสถิติแบบพื้นที่ผิวการตอบสนองแบบ Box-Behnken design (BBD) พบว่าการเติมน้ำหมัก FPE 2% ของน้ำเสียที่มีค่า chemical oxygen demand (COD) เท่ากับ 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วปรับ pH เริ่มต้นเป็น 7.0 สามารถทำให้ค่า oxidation reduction potential (ORP) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถกระตุ้นการเจริญของ PNSBsi ได้สูงสุด (6.31×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร) ในเวลา 2 วัน และเมื่อนำกล้าเชื้อ PNSBsi มาบำบัดน้ำเสีย ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง โดยออกแบบการทดลองแบบ central composite design (CCD) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการบำบัดน้ำเสียจากการทำนายและค่าจริงจากผลการทดลองคือใช้กล้าเชื้อ PNSBsi 7% น้ำหมัก FPE 0.8% และระยะเวลาการบำบัด (retention time: RT) 4 วัน โดยมีการลดลงของค่า COD ของแข็งแขวนลอย (suspended solids: SS) และซัลไฟด์ทั้งหมด (total sulfide: TtS) ได้ร้อยละ 91 75 และ 61 ตามลำดับ และตรวจไม่พบ H_2S กรณีที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodopseudomonas palustris* P1 ที่เตรียมโดยวิธีการเดียวกับกล้าเชื้อ PNSBsi เพียงแต่ใช้สายพันธุ์คัดเลือก P1 เป็นกล้าเชื้อและเรียกกล้าเชื้อนี้ว่า PNSB P1 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียจากการทำนายโดยการออกแบบที่ใช้ CCD คือการใช้กล้าเชื้อ PNSB P1 ร้อยละ 3 ปริมาณน้ำหมัก FPE ร้อยละ 0.9 และระยะเวลาบำบัด 4 วัน สามารถลดค่า COD SS และ TtS ได้ร้อยละ 98 79 และ 72 ตามลำดับ นอกจากนี้ตรวจไม่พบ H_2S และได้โปรตีนเซลล์เดียวหลังการบำบัด และเมื่อทำการทดลองยืนยันผลที่ได้จาก CCD (verification test) พบว่ามีค่าความคลาดเคลื่อน 4–8% โดยสามารถลดค่า COD SS และ TtS ได้ 94 75 และ 66% ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพน้อยกว่าสภาวะการใช้กล้าเชื้อร้อยละ 2 ปริมาณน้ำหมัก FPE 0.75% และระยะเวลาบำบัด 4 วันจากชุดการทดลองที่ดีที่สุดของ CCD ซึ่งสามารถลดค่า COD SS และ TtS ได้ร้อยละ 96 78 และ 71 ตามลำดับ โดยชีวมวลที่ได้ส่วนใหญ่เป็น *R. palustris* P1 ดังนั้นจึงใช้สภาวะนี้สำหรับการศึกษาต่อการศึกษาพลวัตของประชากรแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากการผลิตยางแผ่น ที่ใช้กล้าเชื้อ PNSBsi และ PNSB P1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยน้ำหมักสับปะรด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละกล้าเชื้อ โดยใช้เทคนิค nest-PCR-DGGE ในส่วนของ 16S rDNA เพื่อดูความหลากหลาย และการกระจายตัวของประชากรแบคทีเรีย พบว่าในกล้าเชื้อ PNSB P1 มีค่าทั้งสองสูงกว่าประชากรแบคทีเรียในกล้าเชื้อ PNSBsi อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) และมีแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* เป็นกลุ่มประชากรหลักในกล้าเชื้อทั้งสอง และในการบำบัดน้ำเสียเป็นเวลา 4 วัน พบว่าเฉพาะการบำบัดน้ำเสียด้วยกล้าเชื้อ PNSB P1 เท่านั้นที่มีค่าความเหมือนของ *R. palustris* ตรงกับ *R. palustris* P1 เป็น 100% ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพที่สูงในการบำบัดน้ำเสียที่เหลือซัลไฟด์น้อยและผ่านมาตรฐานน้ำทิ้งที่สามารถใช้เป็นน้ำเพื่อการเกษตรได้ และในน้ำทิ้งมีชีวมวลที่มีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นสูงกว่าการบำบัดน้ำเสียโดยใช้กล้าเชื้อ PNSBsi ขณะที่กลุ่มประชากรแบคทีเรียอื่นๆ ในการบำบัดน้ำเสียด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้งสองชนิดในช่วงเริ่มต้นได้แก่ γ-proteobacteria, β-proteobacteria, negativicutes และ flavobacteriia คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 37.5 25.0 25.0 12.5 ตามลำดับ นอกจากแบคทีเรีย 4 กลุ่มหลักนี้แล้วยังพบแบคทีเรียกลุ่ม α-proteobacteria, clostridia และ mollicutes ในช่วงเวลาต่อมาของการบำบัดเป็นเวลา 4 วัน จากผลการ

คำสำคัญ: แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ วิธีการตอบสนองพื้นที่ผิว แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ บ่อผึ่ง โปรตีนเซลล์เดียว น้ำเสียยางพารา น้ำหมักสับปะรด น้ำเพื่อการเกษตร

ABSTRACT

The aim of this research was to treat wastewater from a cooperative rubber sheet factory (CRSF) by purple nonsulfur bacteria (PNSB) for increasing efficiency and removal of sulfide from H_2S. Fermented pineapple extract (FPE) was used to stimulate the growth of PNSB in non sterile rubber sheet wastewater (RAW) under microaerobic light conditions to use as inoculum and this inoculum was named stimulated indigenous purple nonsulfur bacteria (PNSBsi). Use of response surface methodology with Box-Behnken design (BBD) found that the optimal conditions for stimulating the growth of indigenous PNSB were; addition of 2.0% FPE into RAW, which had a chemical oxygen demand (COD) of 2000 mg/L and an initial pH of 7.0 after adjustment, significantly decreased oxidation reduction potential value to be a reducing condition and this stimulated PNSBsi growth to reach a maximum of 6.31×10^7 cell/mL within 2 days. Consequently, a central composite design (CCD) was used to determine the optimal conditions for treating RAW by PNSBsi inoculum under microaerobic light conditions and the optimal conditions based on the predicted model and actual values from the CCD were 7% PNSBsi, 0.8% FPE and 4 days retention time (RT) by reducing 91% for COD, 75% for suspended solids (SS), 61% for total sulfide (TtS) and no detection of H_2S. In case of *Rhodopseudomonas palustris* P1 was prepared to be used an inoculum with the same method with PNSBsi by inoculating the strain P1 into RAW and this was called PNSB P1. Optimization conditions of RAW treatment using CCD on the basis of the predicted model found that a 3% PNSB P1, 0.9 % added FPE and a 4 day RT were the most suitable conditions as the removal of 98% COD (initial COD 3,005 mg/L), 79% of SS and 72% of TtS and no observation of H_2S. Results of the verification test had an error of only 4–8 % confirmed removal of COD (initial COD 2,742 mg/L), SS and TtS at 94, 75 and 66% respectively. However, the efficiency was less than the best set obtained from the CCD experiment (2 % PNSB P1, 0.75 % FPE and 4 days RT); upon repeating, this set could reduce 96 % COD, 78 % SS and 71 % TtS. The biomass obtained after RAW treatment from the best set consisted mostly of *R. palustris* P1 and thus conditions of this set were used for further studied. The bacterial population dynamic including PNSB in RAW treated by inocula either PNSBsi or PNSB P1 and with FPE were investigated using DGGE of nested-PCR-amplified fragments of the 16S rRNA genes. The diversity and evenness of the community in the PNSB P1 inoculum was significantly higher ($P < 0.05$) than that the community in the PNSBsi inoculum. Only *R. palustris* was dominant throughout the RAW treatment over 4 days by either PNSBsi or PNSB P1 inocula; however, a 100% similarity index to the strain P1 was found only in the RAW treatment by PNSB P1 inoculum. This corresponded to a higher efficiency to treat RAW that met standard guidelines for using as irrigation water and biomass in the effluent contained higher amount of essential amino acids when compared to PNSBsi set. Bacterial communities in

both RAW treatment processes, at starting point (t = 0) in addition of PNSB found 4 main bacterial populations belonging to 37.5% γ-proteobacteria, 25% β-proteobacteria, 25% negativicutes and 12.5% flavobacteriia. Besides the 4 main bacterial groups; α-proteobacteria, clostridia and mollicutes were also detected in both communities later during the RAW treatment for 4 days. Overall results, it can be concluded that both inocula were able to compete with other heterotrophs and *R. palustris* P1 showed higher efficiency to treat RAW than that PNSBsi by producing the quality effluent with by-product as SCP for supplementation in animal feed. The use of inoculum P1 in an oxidation pond of a CRSF under its optimal conditions completely eliminated the rotten egg odor and reduced 50% BOD_5 to 217 mg/L. The effluent was able to use as irrigation water by promoting chilli growth and obtaining a higher yield than the effluent from a control ($p<0.05$). In addition, amounts of heavy metals in chilli fruits from all effluents were in safety levels and lower than that found in a set using tap water ($p < 0.05$).

Keywords: fermented pineapple extract, hydrogen sulfide, irrigation water, oxidation pond, purple nonsulfur bacteria, response surface methodology, rubber wastewater, single cell protein