บทที่ 1
การแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมาย

การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานยางที่มีกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่นการทำยางแผ่น ยางแท่ง และยางสกิม ทำให้ในน้ำเสียรวมมีซัลไฟด์สูงซึ่งเป็นผลมาจากการใช้ซัลเฟตในการหายใจของแบคทีเรียที่รีดิวซ์ซัลเฟต (Sulfate reducing bacteria: SRB) การเกิดซัลไฟด์มีผลเสียต่อระบบบำบัดเพราะความเป็นพิษของซัลไฟด์เองเมื่ออยู่ในรูปของแก๊ส (H_2S) และยังมีผลทำให้ได้แก๊สมีเทนน้อยในกรณีที่การบำบัดเป็นแบบไร้อากาศที่ต้องการแก๊สดังกล่าว ดังนั้นการใช้แบคทีเรียที่ออกซิไดซ์ซัลไฟด์ได้ เช่น (Sulfur oxidizing bacteria: SOB) หรือกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อาจใช้ซัลไฟด์ได้ (Purple nonsulfur photosynthetic bacteria: PNSB) ซึ่งพบได้บ่อยในน้ำเสีย จึงเป็นสิ่งจำเป็น นอกจากนี้ในกรณีที่น้ำเสียมีพวกไนเตรทอยู่การกำจัดไนเตรทโดยใช้แบคทีเรียที่สามารถใช้ไนเตรทในการหายใจแทนออกซิเจน (Denitrifying bacteria: Denitrifiers) จะทำให้ลดปริมาณไนเตรทในน้ำเสียและขณะเดียวกันเกิดการแข่งขันแย่งแหล่งคาร์บอนและพลังงานกับพวก SRB ทำให้ลดบทบาทของพวก SRB ดังนั้นจึงมีการแยกแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาใช้บำบัดน้ำเสียจากกระบวนการแปรรูปน้ำยางพารา

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อ

การแยกแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาใช้บำบัดน้ำเสียจากกระบวนการแปรรูปน้ำยางพาราได้แก่

1.1. Sulfur oxidizing bacteria โดยแยกเชื้อ *Thiobacillus* sp. เพราะมีศักยภาพในการกำจัดซัลไฟด์ได้ดี (ตามวัตถุประสงค์หลักการศึกษา) โดยอาหารแยกเชื้อ คือ Thiobacillus medium (inorganic medium) และ Thiobacillus thioparus medium (inorganic medium) (DSMZ, 2002) ซึ่งต่างก็มีไทโอซัลเฟตเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งนิยมใช้ในการแยกเชื้อกลุ่มดังกล่าว (Kuenen et al. 1992) สูตรอาหารอยู่ภาคผนวก วิธีการแยกอ้างตาม Kantachote and Innuwat (2004) และในกรณีที่ต้องการแยกเชื้อ *T. thioparus* เพราะมีรายงานมากพอสมควรในการใช้กำจัดซัลไฟด์ (Chung et al. 1996; Oyarzun et al. 2003)

1.2. Purple nonsulfur Photosynthetic bacteria โดยใช้อาหาร G-5 medium (Ormerod et al. 1961) สูตรอาหารอยู่ภาคผนวก วิธีการแยกอ้างตาม Kantachote et al. (2005)

1.3. Denitrifying bacteria ใช้อาหาร Nitrate medium (Rodina, 1972) สูตรอาหารอยู่ภาคผนวก ซึ่งมี Durham tube วิธีการแยกอ้างตาม ดวงพร คันธโชติ (2548) และในกรณีของ *Thiobacillus denitrificans* ซึ่งเป็น SOB ที่ใช้ไนเตรทแทนออกซิเจนในการหายใจ สูตรอาหารที่ใช้

แยกเชื้อนี้อยู่ในภาคผนวก ข และในอาหารที่เลี้ยงใส่ Durham tube ลงไปด้วยเช่นกันเพื่อตรวจสอบการเกิดแก๊ส

2. ตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างๆที่เป็นแหล่งที่จะพบเชื้อกลุ่มเป้าหมายทั้ง 3 กลุ่ม สถานที่เก็บตัวอย่างแบ่งเป็น 4 ประเภท คือ

1. น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปน้ำยางเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ยางแผ่น ยางแท่ง ยางสกิม ในเขต จ. สงขลา จ. ปัตตานี และ จ.ยะลา และจากโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น อ. จะนะ จ. สงขลาในส่วนของถัง UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) และ SRR (Sulfate reduction reactor)
2. บ่อน้ำพุร้อน จากบ่อต่างๆที่พบใน อ. เบตง จ. ยะลา
3. น้ำในนากุ้ง ในเขต จ. สงขลา จ. พัทลุง จ. นครศรีธรรมราช และ จ. ปัตตานี
4. ดินบริเวณบริเวณฝังกลบขยะ บริเวณหาดป่าตอง จ. ภูเก็ต โดยแยกเฉพาะเชื้อ *Thiobacillus* sp. เพราะตัวอย่างดินมีลักษณะเป็นสีดำ (Metal Sulfide เช่น FeS) จากการที่ Sulfate reducing bacteria ใช้ซัลเฟตในการหายใจแบบไร้อากาศแล้วเกิด H_2S และทำปฏิกิริยากับโลหะในดิน และประกอบกับดินมีลักษณะสีเหลืองอยู่ด้วยซึ่งเป็นซัลเฟอร์ที่เกิดจาก *Thiobacillus* ใช้ H_2S แล้วเกิดธาตุซัลเฟอร์ (Holt et al., 1994) ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่จะได้ *T. denitrificans* ด้วยสภาวะที่ขาดอากาศตามที่กล่าวมา

ตัวอย่างน้ำในข้อ 1-3 ใช้แยกเชื้อกลุ่มเป้าหมายทั้ง 3 กลุ่ม

3. การคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือนำเชื้อที่แยกได้ในอาหารสูตรที่ใช้แยกเชื้อแต่เปลี่ยนแหล่งพลังงานจาก $Na_2S_2O_3$ เป็น Na_2S โดยสูตรอาหารเหมือนเดิมเพียงแต่เปลี่ยนแหล่งพลังงาน จากนั้นนำเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารที่มีซัลไฟด์เป็นแหล่งพลังงานมาเลี้ยงในน้ำเสียจากการแปรรูปน้ำยางพาราในส่วนของถัง UASB และ SRR ของบริษัทฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น เพื่อดูความเป็นไปได้ในการเจริญในน้ำเสียที่ผ่านการเหวี่ยงที่ 5000 rpm นาน 15 นาที แล้วทำให้ปราศจากเชื้อ คัดเลือกเชื้อได้โดยพิจารณาจากผลการเจริญที่ OD660> 0.05-0.10

4. ข้อมูลระบบบำบัดน้ำเสีย บริษัทฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นจำกัด

เนื่องจากวัตถุประสงค์ต้องการใช้แบคทีเรียกำจัดซัลไฟด์ในน้ำเสียของบริษัทฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้นเป็นสถานที่เก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษา จึงขอกล่าวถึงข้อมูลของน้ำเสียของ

โรงงานบางส่วน ณ ที่นี้ โดยรายละเอียดระบบการบำบัดอยู่ในภาคผนวก ปริมาณน้ำเสียแบ่งตามแหล่งกำเนิดได้ 4 ชนิด

1. Serum จากการผลิตยางแท่ง ประมาณ 200 ลบ.ม./วัน
2. น้ำล้างเครื่องจักร ล๊อกจับตัวอย่างในการผลิตยางแท่ง ประมาณ 60 ลบ.ม./วัน
3. Serum จากการผลิตสกิม ประมาณ 100 ลบ.ม./วัน
4. น้ำล้างเครื่องจักรผลิตน้ำยางข้น ประมาณ 250 ลบ.ม./วัน

โดยที่ปริมาณน้ำเสียขึ้นอยู่กับปริมาณวัตถุดิบที่รับเข้าในแต่ละวันและลักษณะของน้ำเสียดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของน้ำเสียแยกตามแหล่งที่มา

รายการ	COD (mg/l)	Sulfate (mg/l)	TKN (mg/l)
Serum ยางแท่ง (UASB)	15,000	60	700
น้ำล้างเครื่องจักร	400	60	70
Serum สกิม (SRR)	11,000	3,250	600
น้ำล้างเครื่องจักรผลิตยางข้น	400	60	50
น้ำเสียรวมตามสัดส่วน	6,100	640	315

ที่มา : เอกสารแจกของโรงงาน

UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket SRR: Sulfate Reduction Reactor

ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อ

1. ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อ *Thiobacillus* sp.

1.1 ผลการแยกเชื้อ *Thiobacillus* sp.

ตารางที่ 2 แสดงผลการแยกเชื้อ *Thiobacillus* sp. ในอาหาร Thiobacillus medium แยกเชื้อได้ 81 ไอโซเลท โดยจำนวนที่แยกระหว่างพวกเจริญได้ดีที่ 30°C (Mesophile) ไม่แตกต่างจากที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50°C (Thermophile) ส่วนเชื้อ *Thiobacillus* sp. ที่เจริญใน Thiobacillus thioparus medium แยกเชื้อได้ 66 ไอโซเลท โดยเป็นพวก Thermophile 37 ไอโซเลท จากผลการทดลองที่ได้มีความน่าจะเป็นไปได้ที่เชื้อซึ่งแยกได้จะนำไปใช้กำจัดซัลไฟด์ในน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ต่ำ และอุณหภูมิระหว่างการบำบัดอาจสูงถึง 40°C และในการศึกษานี้ไม่ประสบความสำเร็จในการแยกเชื้อ *T. denitrificans* (denitrifiers) ในลักษณะเป็นเชื้อบริสุทธิ์

ตารางที่ 2 จำนวนไอโซเลทของ *Thiobacillus* sp. ที่แยกได้จากสถานที่ต่างๆ

ตัวอย่าง	Thiobacillus medium		T. thioparus medium	
	30°C	50°C	30°C	50°C
น้ำเสียโรงงานยาง	10	10	5	9
บ่อน้ำพุร้อน	13	14	10	12
น้ำนากุ้ง	9	8	8	9
ที่ฝังกลบขยะ	8	9	6	7
รวมจำนวนไอโซเลท	40	41	29	37

1.2. ผลการคัดเลือก *Thiobacillus* sp.

การคัดเลือก *Thiobacillus* sp. พิจารณาจากผลการเจริญใน Sulfide medium และในน้ำเสียจากโรงงานยางพาราตามลำดับ ผลการคัดเลือกเชื้อ *Thiobacillus* sp. ที่เจริญในอาหารที่มีซัลไฟด์เป็นแหล่งพลังงานเพื่อดูความไปได้ของเชื้อที่จะใช้บำบัดน้ำเสียในถัง SRR ซึ่งมีซัลไฟด์อยู่สูง ซึ่งเกิดจาก Sulfate reducing bacteria ใช้ซัลเฟตซึ่งมีในปริมาณสูง (ตารางที่1) แล้วเกิดซัลไฟด์ จากตารางที่ 3 พบว่ากลุ่มเชื้อที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C มีอยู่ 38 ไอโซเลทจาก 40 ที่เจริญได้ และ กลุ่มเชื้อที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50°C มีเพียง 25 ไอโซเลทจาก 41 ที่เจริญได้ แต่เมื่อพิจารณาจากการเจริญได้ดีโดยสังเกตความขุ่นพบว่ามี 15 ไอโซเลท สำหรับพวก mesophile และ 7 ไอโซเลทสำหรับ thermophile จึงนำเชื้อเหล่านี้ไปคัดเลือกต่อโดยทดลองเลี้ยงในน้ำเสียที่เก็บจากถัง UASB และ SRR (ดูตาราง 1 ประกอบ) โดยพิจารณาผลการเจริญที่ OD660> 0.05-0.10 ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 การเจริญของ *Thiobacillus* sp. ที่แยกได้ ในอาหาร Sulfide medium

การเจริญ	จำนวนไอโซเลท	
	30°C	50°C
-	2	16
+	23	18
++	11	7
+++	4	0

- = ไม่เจริญเมื่อเลี้ยงไปได้ 7 วัน
+ = เจริญต่ำ (สังเกตการเจริญเมื่อเลี้ยงไปได้ 4 วัน)
++ = เจริญปานกลาง (สังเกตการเจริญเมื่อเลี้ยงไปได้ 3 วัน)
+++ = เจริญมาก (สังเกตการเจริญเมื่อเลี้ยงไปได้ 2 วัน)

สำหรับผลการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียจากถัง UASB ซึ่งเป็นน้ำเสียที่มาจากการผลิตยางแท่ง โดยทั่วไปเชื้อมีการเจริญดีกว่าในน้ำเสียจากถัง SRR ซึ่งเป็นน้ำเสียจากการผลิตสกิมซึ่งมีซัลเฟตสูงมาก อย่างไรก็ตามการเจริญของเชื้อในน้ำเสียทั้ง 2 แหล่งไม่ดีเท่าที่ควร สาเหตุหลักน่ามาจากน้ำเสียดังกล่าวยังไม่มีการปรับสภาพให้เหมาะสม โดยอาจมีความเข้มข้นของสารบางชนิดมากไปโดยเฉพาะซัลไฟด์ในถัง SRR (ตารางที่1) ซึ่งถ้าหากมีความเข้มข้นสูงก็ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ พบว่ามี 8 ไอโซเลท ของ mesophile ที่ผ่านการคัดเลือก พบว่าแหล่งที่แยกเชื้อได้มีทั้งจากโรงงานยางของบริษัทที่เก็บตัวอย่างมาศึกษา บ้างแยกได้จากโรงงานน้ำยาง อ.ยะรัง จ. ปัตตานี ซึ่งเป็นเชื้อเจริญได้ดีที่อุณหภูมิน้ำเสียทั่วไป (ประมาณ 28-30°C จากการวัด) อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำพุร้อนจาก อ. เบตง จ.ยะลา ก็สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C ในอาหารซัลไฟด์สังเคราะห์ และอาหารน้ำเสียดูตารางที่ 3 และ 4 และสำหรับพวก thermophile ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50°C และเจริญในอาหารซัลไฟด์สังเคราะห์ได้ดีคัดเลือกมาได้ 14 ไอโซเลท เกือบทั้งหมดแยกได้จากน้ำพุร้อน (ตารางที่ 3 และ 4) เป็นเพราะว่าในน้ำพุร้อนเป็นแหล่งแร่ธาตุ โดยเฉพาะซัลเฟอร์ (Kelly and Harrison, 1989) และมีบ้างที่ แยกได้จากบริเวณที่ฝังกลบขยะ จ. ภูเก็ต ซึ่งเป็นไปได้ว่าดินบริเวณหาดป่าตองมีซัลเฟตสูง และการฝังกลบขยะทำให้ซัลเฟตถูกใช้เพื่อการหายใจแบบไร้ออกซิเจนโดย Sulfate reducing bacteria (Postgate, 1979) แล้วเกิดซัลไฟด์ขึ้น ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของ *Thiobacillus* ทำให้เชื้อคุ้นเคยกับซัลไฟด์ และทนซัลไฟด์ได้ดี ซึ่งสนับสนุนโดยข้อมูลจากการศึกษาของ Kim et al, 2002 พบว่าเมื่อระบบของ Biofilter ดำเนินไปเป็นระยะเวลานานทำให้การกำจัด H_2S และ NH_3 มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ตารางที่ 4 เชื้อ *Thiobacillus* sp. ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นต้นในน้ำเสียจากโรงงานน้ำยางข้น

รหัส	แหล่งแยก	OD 660 nm	
		UASB	SRR
T307	โรงงานน้ำยาง จ. ปัตตานี	0.10	0.09
T3016	บ่อน้ำพุร้อน	0.09	0.07
T3017	บ่อน้ำพุร้อน	0.08	0.07
T3036	ที่ฝังกลบขยะ	0.06	0.06
TT307	โรงงานน้ำยาง จ. ปัตตานี	0.07	0.07
TT308	โรงงานน้ำยาง จ. สงขลา	0.06	0.06
TT3013	โรงงานน้ำยาง จ. สงขลา	0.08	0.06
TT3021	โรงงานน้ำยาง จ. ยะลา	0.09	0.07
T5014	บ่อน้ำพุร้อน	0.08	0.06
T5015	บ่อน้ำพุร้อน	0.09	0.07
T5022	บ่อน้ำพุร้อน	0.08	0.06
T5023	บ่อน้ำพุร้อน	0.10	0.09
T5024	บ่อน้ำพุร้อน	0.09	0.07
T5038	ที่ฝังกลบขยะ	0.08	0.06
T5041	ที่ฝังกลบขยะ	0.09	0.06
TT502	โรงงานน้ำยาง จ. สงขลา	0.07	0.07
TT506	โรงงานน้ำยาง จ. สงขลา	0.08	0.06
TT5012	บ่อน้ำพุร้อน	0.06	0.06
TT5015	บ่อน้ำพุร้อน	0.07	0.07
TT5032	บ่อน้ำพุร้อน	0.08	0.08
TT5036	โรงงานน้ำยาง	0.09	0.09
TT5042	บ่อน้ำพุร้อน	0.07	0.06

2. ผลการแยกและคัดเลือก Purple nonsulfur photosynthetic bacteria (PNSB)

เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB ซึ่งแยกจากตัวอย่างต่างๆ โดยใช้อาหาร G-5 medium ภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง (Anaerobic-light) ที่อุณหภูมิห้องแยกเชื้อได้ทั้งหมด 105 ไอโซเลท และได้คัดเลือกขั้นต้นโดยเลี้ยงในอาหาร G5 ภายใต้สภาพไร้อากาศ-มีแสง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม โดยเกณฑ์การคัดเลือกคือพิจารณาจากเชื้อที่มีการเจริญเมื่อวัดค่า OD 660 มีค่ามากกว่า 0.5 ซึ่งคัดเลือกได้ 5 ไอโซเลท แล้วนำมาเลี้ยงในน้ำเสียปราศจากเชื้อของทั้ง 2 แหล่ง (UASB และ

SRR) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง และ สภาพมีอากาศ-ไร้แสงและวัดการเจริญโดยวัดค่า OD 660 เมื่อเลี้ยงไปได้ 5 วันผลการทดลองดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเจริญ (OD 660) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB ที่เจริญในน้ำเสียของถัง UASB และ SRR ภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง และ สภาพมีอากาศ-ไร้แสงที่อายุ 5 วัน

Code	Source	Anaerobic-light		Aerobic-dark	
		UASB	SRR	UASB	SRR
P1	SRR Tank	0.06	0.07	0.11	0.09
P2	SRR Tank	0.13	0.12	0.15	0.08
P3	UASB Tank	0.12	0.06	0.09	0.04
P4	UASB Tank	0.13	0.12	0.08	0.11
P5	UASB Tank	0.01	0.09	0.08	0.08

ผลการเจริญของเชื้อกลุ่ม PNSB ทั้งใน 2 สภาวะที่เลี้ยงไม่ว่าจะเป็นสภาพไร้อากาศ-มีแสง (เจริญแบบ Phototroph) และ สภาพมีอากาศ-ไร้แสง (เจริญแบบ Heterotroph) ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งเป็นจุดที่น่าสนใจในกรณีที่สามารถนำเชื้อไปใช้ได้เพราะเชื้อกลุ่ม PNSB โดยทั่วไปมีลักษณะการเจริญดีที่สภาวะหนึ่งได้ดีกว่าอีกสภาวะหนึ่ง (Imhoff and Triiper, 1989; Pfenning et al.-1989) และการที่เชื้อจะมีกิจกรรมได้ดีตลอดวันเป็นสิ่งจำเป็นที่ช่วงกลางคืนอาจให้อากาศเล็กน้อยโดยอาศัยการออกแบบของระบบให้มีการกวนเล็กน้อย เนื่องจากเป็นเชื้อที่ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ (Kohlmiller and Gest, 1951) อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทไม่สามารถใช้ซัลไฟด์ได้จากการทดสอบเลี้ยงใน sulfide medium ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าโดยส่วนใหญ่เชื้อ PNSB ไม่สามารถใช้ซัลไฟด์ได้ (Imhoff and Triiper, 1989) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kantachote et al. (2005) ที่พบว่า *Rhodopseudomonas* sp. DK6 ที่แยกและสามารถเจริญได้ดีในน้ำเสียจากการแปรรูปน้ำยางพาราก็ไม่สามารถใช้ซัลไฟด์ได้จึงไม่ได้ศึกษาเชื้อกลุ่ม PNSB ต่อในงานวิจัยนี้ แต่ได้เก็บรักษาเชื้อไว้เพื่อวัตถุประสงค์อื่น

3. ผลการแยกและคัดเลือก Denitrifiers

การแยกเชื้อ Denitrifiers โดยใช้อาหาร Nitrate broth แยกเชื้อ Denitrifiers จากแหล่งต่างๆ ได้รวม 130 ไอโซเลท (ไม่มี *T. denitrifiers* ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาแล้ว) การคัดเลือกเชื้อในขั้นต้นโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nitrate broth ในปริมาณ 10 มล. ที่อุณหภูมิ 29°C เป็นเวลา 7 วัน การคัดเลือกมีเกณฑ์พิจารณา คือ การเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส และประเมินปริมาณแก๊สที่เกิด (N_2) จากความยาวของที่ว่างในหลอดดักแก๊สแล้วคำนวณเป็นปริมาตรของแก๊ส และระยะเวลาที่เกิด (ดูผลทุกวัน)

แก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊สส่วนใหญ่เป็นแก๊สไนโตรเจน เพราะ Denitrifiers ใช้ไนเตรท (NO_3^-) แทนออกซิเจนในการหายใจเพื่อสลายสารอินทรีย์ (Rodina ,1972; Herbert, 1982) และจากนั้นยืนยันผลเมื่อเลี้ยงไปได้ 7 วัน โดยดูด Culture broth มา 1 มล ลงใน Spot plate และหยด Sulfanilic acid 2 หยด และ α-naphthylamine 2 หยด ผสมให้เข้ากัน เกิดสีแดงเป็นบวก เพราะไนเตรทถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรท์ ถ้าไม่มีสีทดสอบต่อโดยการเติมผงสังกะสี (Zn) ซึ่งจะรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์แล้วเกิดสีแดง (แสดงว่ายังมีไนเตรทอยู่ เชื้อยังใช้ไม่หมด ในกรณีที่เกิดแก๊สในหลอดดัก) และถ้าผลที่ได้ไม่มีสี แสดงว่าเชื้อใช้ไนเตรทหมด จากผลคัดเลือกเอาเฉพาะเชื้อที่สามารถใช้ไนเตรทได้หมด และมีปริมาณแก๊สในหลอดดักแก๊สมากที่สุดซึ่งมีอยู่ 5 ไอโซเลท (ตารางที่ 6) และพบว่าการประเมินโดยเกณฑ์ดังกล่าว ไอโซเลท D13 D20 และ D16 มีความสามารถมากที่สุดในการทำให้เกิดกระบวนการ Denitrification ในอาหารไนเตรท

ตารางที่ 6 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการทำให้เกิดกระบวนการ Denitrification ได้ดีในอาหารไนเตรท (Nitrate broth)

รหัส	แหล่งที่แยก	ใช้ไนเตรทในอาหารหมด	การเกิดแก๊ส N_2 (µl)
D13	น้ำนากุ้ง	+	105
D16	SRR	+	94
D18	SRR	+	86
D20	UASB	+	101
D21	UASB	+	75

บทสรุป

ผลการแยกเชื้อในกลุ่มของ SOB แยกได้ Thiobacilli ที่เป็นพวกเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) จำนวน 69 ไอโซเลทและพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophile) จำนวน 78 ไอโซเลท และนำเชื้อดังกล่าวมาเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปน้ำยางพาราที่มาจากถัง UASB (upflow anaerobic sludge blanket) และ SRR (sulfate reduction reactor) คัดเลือกกลุ่ม mesophile ได้ 8 ไอโซเลท และ thermophile ได้ 14 ไอโซเลท ส่วนการแยกเชื้อกลุ่ม PNSB แยกเชื้อได้ 105 ไอโซเลท และคัดเลือกมาได้ 5 ไอโซเลทที่มีความสามารถเจริญได้ดีในน้ำเสียจากโรงงานยางพารา (UASB และ SRR) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทไม่สามารถใช้ซัลไฟด์ได้จึงไม่ได้นำไปศึกษาต่อในงานวิจัยนี้ และสำหรับพวก denitrifiers คัดเลือกมาได้ 130 ไอโซเลท แต่มีเพียง 5 ไอโซเลทที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการรีดิวซ์ไนเตรทเป็นแก๊สไนโตรเจน (denifrification) ได้ดี และได้คัดมาเพียง 3 ไอโซเลทที่ทำให้เกิดกระบวนการดังกล่าวได้ดีมากเพื่อการศึกษาต่อ

เอกสารอ้างอิง

1. ดวงพร คันธโชติ. 2547. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ บทบาทของแบคทีเรียต่อวัฏจักรไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาเพื่อการเพาะเลี้ยงแบบยั่งยืน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททั่วไป ประจำปี 2545-2546.
2. เอกสารแยกของโรงงานบริษัทฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น จำกัด ระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน
3. Chung, Y. Huang, C. and Tseng, C. 1996. Operation optimization of *Thiobacillus thioparus* CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. J. Biotechnology. 52: 31-38.
4. DSMZ. 2002. List of media. Deutsche Sammlung zon Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb Germany.
5. Herbert, R.A. 1982. Nitrate dissimilation in marine and estuarine sediments. In: Sediment Microbiology. Pp. 53-72, Nedwell, D.B. and Brown, B. (eds.) Academic Press, London.
6. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
7. Imhoff, J.F. and Triiper, H.G. 1989. Purple nonsulfer bacteria In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 3, pp. 1658-1682, Staley', J.T. (ed.) Williams & Wilkins, Baltimore.
8. Kelly, D.P. and Harrison, A.P. 1989. Genus *Thiobacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 3. Staley, J.T. Williams & Wilkins, Baltimore.
9. Kim, H., Kim, Y.J., Chung, J.S. and Quan, X. 2002. Long-term operation of a biofilter for simultaneous removal of H_2S and NH_3. *J. Air Waste Management Assoc.* **52** (12): 1389-98.
10. Kantachote, D. and Innuwat, W. 2004. Isolation of *Thiobacillus* sp. for use in treatment of rubber sheet wastewater. Songklanakarin *J. of Science and Technology* **26** (5): 649-657.
11. Kantachote, D, Torpee, S. and Umsakul, K. 2005. The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *E. J. of Biotechnology.* **8** (3): 314-323.
12. Kohlmiller, E.F. and H. Gest. 1951. A comparative study of the light and dark fermentations of organic acid by *Rhodospirillum rubrum*. *J. of Bacteriology.* **61**:269-282.

13. Kuenen, J.G., Robertson, L.A. and Tuovinen, OH. 1992. The genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* and *Thiosphaera*. In: The Prokaryotes, Vol. 3, pp. 2636-2657. Balows, A., Triper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schlefer, K.H. (eds.), Springer-Verlag, New York.

14. Ormerod, J.G.; Ormerod, K.S. and Gest, H. 1961. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; relationships with nitrogen metabolism. *Achieves of Biochemistry and Biophysics.* **94**: 449.

15. Oyarzun, P., Arancibia, F., Canales, C. and Aroca, G.E. 2003. Biofiltration of high concentration of hydrogen sulphide using *Thiobacillus thioparus*. *Process Biochemistry.* **39**: 165-170.

16. Pfenning, N. and Triiper, H.G. (1989) Anoxygenic phototrophic bacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3, pp. 1635-1657. Staley, J.T. (Ed.) Williams & Wilkins, Baltimore.

17. Postgate, Frs., J.R. 1979. The sulphate-reducing bacteria. Cambridge University Press. London.

18. Rodina, A.G. 1972. Methods in Aquatic Microbiology University Park Press, London.