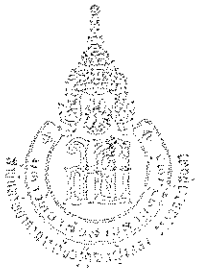


การบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยจุลินทรีย์คัดแยกและหัวเชื้ออีเอ็ม

Treatment of Expired Carbonated Soft Drink by Isolated Microorganisms and Effective Microoganisms

พิชามญช์ โป๊ะบุญชื่น

Pichamon Poboonchern

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Environmental Management

Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ว
TP 630 พ 82 2552 ฉ.2
312258
11 ธ.ค. 2552

ชื่อวิทยานิพนธ์	การบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยจุลินทรีย์คัดแยกและหัวเชื้ออีเอ็ม
ผู้เขียน	นางสาวพิชามญช์ โป๊ะบุญชื่น
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.ธันวดี เตชะภัททวรกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

.....กรรมการ

(ดร.ธันวดี เตชะภัททวรกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยจุลินทรีย์คัดแยกและหัวเชื้ออีเอ็ม
ผู้เขียน	นางสาวพิชามญช์ โป๊ะบุญชื่น
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำอัดลมที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลในปริมาณสูง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดเบื้องต้นสำหรับน้ำอัดลมหมดอายุด้วยจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้นของบริษัทผู้ผลิตและน้ำหมักอีเอ็ม โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีจำนวนทั้งหมด 29 สายพันธุ์ ประกอบด้วยแบคทีเรีย (B) 10 สายพันธุ์ ยีสต์ (Y) 15 สายพันธุ์ เชื้อรา (F) 2 สายพันธุ์ และแอคติโนมัยสีท (A) 2 สายพันธุ์ ผลจากการคัดเลือกโดยพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม พบว่า แบคทีเรียที่มีค่า μ_{max} สูงสุดคือ B_6 มีค่าเท่ากับ 0.025 ต่อนาที สำหรับยีสต์ที่มีค่า μ_{max} สูงสุดคือ Y_{14} มีค่าเท่ากับ 0.692 ต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ภายในกลุ่มเดียวกัน และทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ในขั้นที่ 2 โดยพิจารณาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล พบว่า แบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} สามารถกำจัดปริมาณน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลเท่ากับ 66.27 ± 1.04 และ 69.90 ± 0.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} โดยใช้ลำดับเบสของ 16s rRNA gene และ 26s rRNA gene ประมาณ 500 เบสในการเปรียบเทียบ พบว่า B_6 คือ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* และ Y_{14} คือยีสต์ *Pichia galeiformis partial* จากนั้นศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลของจุลินทรีย์คัดแยก พบว่า การเลี้ยงยีสต์ Y_{14} และเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} (ผสมในอัตราส่วน 1:1) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำอัดลมหมดอายุที่มีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 85.96 ± 0.49 และ 87.02 ± 1.16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

นอกจากนี้ยังได้เตรียมน้ำหมักอีเอ็ม 3 สูตร เพื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการ

บำบัดน้ำอัดลมหมดอายุเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์คัดแยก ผลการคัดเลือกสูตรของน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 1 โดยพิจารณาจากปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็ม พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 ซึ่งใช้กากน้ำตาลเป็นส่วนผสมมีปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่แตกต่างทางสถิติจากน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุ ($p > 0.05$) และการคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 2 โดยพิจารณาประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงกว่าน้ำหมักสูตร 3 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยสามารถกำจัดน้ำตาลได้เท่ากับ 77.10 ± 1.91 และ 75.65 ± 1.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 85.25 ± 2.99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ปริมาณน้ำหมักอีเอ็มเท่ากับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงในสภาวะที่เขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในระดับห้องปฏิบัติการของยีสต์ Y_{14} เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} และน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล ซีโอดีและบีโอดีสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีประสิทธิภาพเท่ากับ 84.03 ± 0.54 80.16 ± 0.37 และ 84.14 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดขั้นต้นของบริษัทผู้ผลิต พบว่า การเติมน้ำหมักอีเอ็มในถังบำบัดขั้นต้นทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล ซีโอดีและบีโอดีสูงกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากับ 44.97 ± 0.42 34.04 ± 0.27 และ 38.73 ± 1.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีประสิทธิภาพในการลดค่าความเข้มสีได้เพียงเล็กน้อย

นอกจากนี้ ได้ศึกษาผลพลอยได้ในรูปของเอทานอลที่เกิดขึ้นหลังจากการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 7 วัน พบว่า การบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในระดับห้องปฏิบัติการด้วยยีสต์ Y_{14} ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 4.92 ± 1.14 กรัมต่อลิตร เมื่อมีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นและเติม $(NH_4)_2SO_4$ โดยไม่มีการกวนผสม และการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในระดับอุตสาหกรรมโดยการเติม น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดขั้นต้น พบว่า มีเอทานอลเกิดขึ้นภายหลังจากการบำบัดมากกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 5.62 ± 0.09 กรัมต่อลิตร

Thesis Title	Treatment of Expired Carbonated Soft Drink by Isolated Microorganisms and Effective Microoganisms
Author	Miss Pichamon Poboonchern
Major Program	Environmental Management
Academic Year	2009

ABSTRACT

This research is to study of expired carbonated soft drink, a waste from carbonated soft drink process which contains high sugar concentration, COD and BOD. The objective of this study was to increase the efficiency of expired carbonated soft drink pretreatment by isolated microorganisms from pretreatment unit of carbonated soft drink manufacturing and effective microorganisms (EM) cultures. The microorganisms isolated consisted of 29 isolates including 10 isolates of bacteria (B), 15 isolates of yeast (Y), 2 isolates of fungi (F) and 2 isolates of actinomyces (A). The result of 1st screening which considered their maximum specific growth rate (μ_{max}) showed bacteria B_6 and yeast Y_{14} had highly μ_{max} than other strains by 0.025 min^{-1} and 0.692 h^{-1}, respectively. Then two strains were tested their sugar biodegradability in 2nd screening. It was found that B_6 and Y_{14} yielded significantly highest efficiencies ($p \leq 0.05$) (66.27 ± 1.04 and 69.90 ± 0.83 %, respectively. Both two isolated strains (B_6 and Y_{14}) were further identified using 16s and 26s rRNA-PCR technique, respectively. The results showed that B_6 and Y_{14} were *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* and *Pichia galeiformis partial*, respectively. Afterthat the appropriate condition for their sugar biodegradability were studied. Under optimum conditions, using 5 % inoculum of mixed culture (B_6 mixed with Y_{14} by ratio 1:1) and Y_{14} into expired carbonated soft drink which was added 1 g/L of $(NH_4)_2SO_4$ showed the highest efficiency of sugar biodegradability with 85.96 ± 0.49 and 87.02 ± 1.16 % when adjusted initial pH to be 4 and 5, respectively under agitating condition (100 rpm) for 5 days.

In addition, the EM cultures were also determined their sugar biodegradability efficiencies in comparing with the isolated microorganisms. The 1st screening of EM cultures was

the total number of microorganisms counted from spread plate and pour plate method. The results showed that the EM culture formular I which used molasses had the highest of total microorganisms number but is was not significantly different ($p > 0.05$) from the formular III which used expired carbonated soft drink instead of molasses. Then these two formular were tested their sugar biodegradability. It was found that the EM culture formular I had slightly higher efficiency than formular III but they were not significantly different ($p > 0.05$) with 77.10 ± 1.91 and 75.65 ± 1.47 %, respectively. Under optimum conditions, the EM cultures formular III showed the highest efficiency of sugar biodegradability with 89.25 ± 2.99 % when using 0.4 % (v/v) inoculum and incubated with an agitation rate of 50 rpm for 5 days

The yeast (Y_{14}), mixed culture (B_6 and Y_{14}) and EM culture formular III were compared their efficiencies for expired carbonated soft drink treatment under optimal conditions in labolatory scale. The EM culture formular III showed the significantly highest sugar, COD and BOD removal efficiencies with 84.03 ± 0.54, 80.16 ± 0.37 and 84.14 ± 0.96 %, respectively ($p \leq 0.05$). Furthermore, the EM culture (formular III) was also used to treat expired carbonated soft drink at manufacturing. It was found that the addition of EM culture formular III in the primary wastewater treatment unit of the manufacturing yielded higher sugar, COD and BOD removal efficiencies than control of treatment (no adding EM culture) with 44.97 ± 0.42, 34.04 ± 0.27 and 38.73 ± 1.05 %, respectively but resulting in low color removal efficiency.

Moreover, the by-product (ethanol) production in samples were measured, the highest ethanol production obtained was 4.92 ± 1.14 g/L from Y_{14} culture in expired carbonated soft drink adjusted initial pH and added with $(NH_4)_2SO_4$ without agitation. For the ethanol production in primary treatment unit at the manufacturing, the ethanol produced was 5.62 ± 0.09 g/L which was increased by adding EM culture into the treatment unit.

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องด้วยความกรุณาอย่างสูงในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ การแก้ไขข้อบกพร่องจากคณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ คือ ดร.ธันวดี เตชะภัททวรกุล และรองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา ขอขอบพระคุณบริษัท หาดทิพย์ จำกัด (มหาชน) ตำบลบ้านพรุ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สำหรับความกรุณาอนุเคราะห์ข้อมูลและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างน้ำเสียเป็นอย่างดี นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้รับความคิดเห็นและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อีกด้วย

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสำนักงานประสานงาน ชุดโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิตสกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว. - อุตสาหกรรม ที่ได้สนับสนุนทุนในการทำวิทยานิพนธ์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการขับเคลื่อนกระบวนการในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณณัตติพงศ์ แก้วทอง คุณรัชนีกร หมวดพล คุณฟางทิพย์ ทองศรี คุณบุษยมาศ เหมณี และคุณณัฐวุฒิ หม่องห้อง รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อมทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์และคอยให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่ออุดมศักดิ์ โป๊ะบุญชื่น คุณแม่สมศรี โป๊ะบุญชื่น รวมถึงน้องๆ ที่ให้ความเข้าใจและเป็นกำลังใจในการต่อสู้กับปัญหาอุปสรรคต่างๆ จนสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

พิชามญช์ โป๊ะบุญชื่น

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(12)
สารบัญตารางภาคผนวก	(16)
สารบัญภาพประกอบ	(17)
สารบัญภาพประกอบภาคผนวก	(21)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(23)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 การตรวจเอกสาร	3
1.2.1 กระบวนการผลิตน้ำอัดลม	3
1.2.2 ลักษณะสมบัติของน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ	6
1.2.3 การบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา	7
1.2.4 การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบด้วยจุลินทรีย์	8
1.2.5 การคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสีย	16
1.2.6 ชนิดและคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับระบบบำบัดน้ำเสีย	16
1.2.7 จุลินทรีย์อีเอ็ม (Effective Microorganisms; EM)	21
1.2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการบำบัดน้ำเสียของจุลินทรีย์	26
1.3 วัตถุประสงค์	31
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	32
1.5 ขอบเขตการวิจัย	32
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	34
2.1 วัสดุ อุปกรณ์	34

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 2 (ต่อ)

2.2 วิธีการวิเคราะห์ 35

2.3 วิธีการทดลอง 36

2.3.1 การศึกษาสมบัติทางเคมีของน้ำอัดลมหมดอายุ 36

2.3.2 การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำอัดลมหมดอายุ 37

2.3.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ 37

2.3.3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 (primary screening) พิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) 37

2.3.3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 (secondary screening) พิจารณาจากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุ

2.3.4 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของจุลินทรีย์คัดแยก 39

2.3.4.1 พีเอชที่เหมาะสม 39

2.3.4.2 ความเข้มข้นของ ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม 39

2.3.4.3 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม 40

2.3.4.4 สภาวะการเขย่าที่เหมาะสม 40

2.3.5 การเตรียมน้ำหมักอีเอ็มจากกากน้ำตาลและน้ำอัดลมหมดอายุ 40

2.3.6 การคัดเลือกสูตรน้ำหมักอีเอ็มเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ 41

2.3.6.1 การคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 1 (primary screening) โดยพิจารณาจากปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็มแต่ละสูตรด้วยวิธีการ spread plate และ pour plate 41

2.3.6.2 การคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 2 (secondary screening) โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล 41

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 2 (ต่อ)

2.3.7 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของน้ำหมักอีเอ็ม

2.3.7.1 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 41

2.3.7.2 สภาวะการเขย่าที่เหมาะสม 42

2.3.8 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มในระดับห้องปฏิบัติการ 42

2.3.9 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำหมักอีเอ็มในระดับอุตสาหกรรม 42

2.3.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากถังบำบัดขั้นต้น 43

บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ 44

3.1 สมบัติทางเคมีของน้ำอัดลมหมดอายุ 44

3.2 จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่คัดแยกจากถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น 46

3.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ 51

3.3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ในขั้นที่ 1 (primary screening) โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) 51

3.3.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ในขั้นที่ 2 (Secondary screening) โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล 54

3.4 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของจุลินทรีย์คัดแยก 56

3.4.1 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม 56

3.4.2 ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสม 62

3.4.3 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม 68

3.4.4 สภาวะการเขย่าที่เหมาะสม 75

3.5 สมบัติของน้ำหมักอีเอ็มที่เตรียมจากกากน้ำตาลและน้ำอัดลมหมดอายุ 81

3.6 การคัดเลือกสูตรน้ำหมักอีเอ็มเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำอัดลม 82

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 (ต่อ)	
3.6.1 การคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 1 (primary screening) โดยพิจารณาจากปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็มแต่ละสูตรด้วยวิธีการ spread plate และ pour plate	82
3.6.2 การคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 2 (secondary screening) โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล	87
3.7 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของน้ำหมักอีเอ็ม	88
3.7.1 ปริมาณน้ำหมักอีเอ็มที่เหมาะสม	88
3.7.2 สภาวะการเขย่าที่เหมาะสม	90
3.8 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในระดับห้องปฏิบัติการ	92
3.9 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำหมักอีเอ็มในระดับอุตสาหกรรม	107
3.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากน้ำอัดลมหมดอายุ	112
3.11 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในระดับอุตสาหกรรม	112
บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	114
4.1 บทสรุป	114
4.2 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยเพิ่มเติม	116
บรรณานุกรม	117
ภาคผนวก	126
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์	127
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์	132
ภาคผนวก ค ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ	152
ประวัติผู้เขียน	184

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1-1 ลักษณะสมบัติของน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 6

ตารางที่ 1-2 ลักษณะการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย 17

ตารางที่ 1-3 ลักษณะการดำรงชีวิตของเชื้อรา 21

ตารางที่ 2-1 วิธีการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ของน้ำอัดลมหมดอายุ 35

ตารางที่ 3-1 ลักษณะสมบัติทางเคมีของน้ำอัดลมหมดอายุ 46

ตารางที่ 3-2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่คัดแยกจากน้ำอัดลมหมดอายุ 47

ตารางที่ 3-3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดของจุลินทรีย์ (primary screening) 53

ตารางที่ 3-4 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์โดยพิจารณาประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล (secondary screening) เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 55

ตารางที่ 3-5 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 57

ตารางที่ 3-6 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 58

ตารางที่ 3-7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 60

ตารางที่ 3-8 ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลและค่า $Y_{X/S}$ ของแบคทีเรีย B_6 ยีสต์ Y_{14} และเชื้อผสมระหว่าง B_6 กับ Y_{14} เมื่อเลี้ยงในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 61

ตารางที่ 3-9 ผลของความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 63

ตารางที่ 3-10 ผลของความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 65

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 3-11 ผลของความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยง เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ ซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 66

ตารางที่ 3-12 ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล และค่า $Y_{X/S}$ ของจุลินทรีย์ B_6, Y_{14} และเชื้อผสม เมื่อเลี้ยงในน้ำอัดลมหมดอายุ ซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6, 4 และ 5 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 68

ตารางที่ 3-13 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยง แบคทีเรีย B6 ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 69

ตารางที่ 3-14 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 71

ตารางที่ 3-15 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงเชื้อผสม ระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 73

ตารางที่ 3-16 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลและค่า $Y_{X/S}$ ของจุลินทรีย์ B_6, Y_{14} และเชื้อผสม เมื่อเลี้ยงในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอช เริ่มต้นเป็น 6, 4 และ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2, 1 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 74

ตารางที่ 3-17 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 76

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 3-18 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 77

ตารางที่ 3-19 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ ซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 79

ตารางที่ 3-20 ความเร็วรอบการเขย่าที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลและค่า $Y_{X/S}$ ของจุลินทรีย์ B_6, Y_{14} และเชื้อผสม เมื่อเลี้ยงในน้ำอัดลมหมดอายุ ซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6, 4 และ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2, 1 และ 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10, 5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 80

ตารางที่ 3-21 สมบัติของน้ำหมักอีเอ็ม 81

ตารางที่ 3-22 ผลการคัดเลือกสูตรของน้ำหมักอีเอ็มโดยพิจารณาประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 87

ตารางที่ 3-23 ผลของปริมาณน้ำหมักอีเอ็มต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 89

ตารางที่ 3-25 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุของยีสต์ Y_{14} ที่สภาวะต่างๆ และชุดควบคุม หลังจากเลี้ยงเชื้อในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 95

ตารางที่ 3-26 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุของเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} ที่สภาวะต่างๆและชุดควบคุม หลังจากเลี้ยงเชื้อในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 96

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 3-27	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุของน้ำหมักอีเอ็ม ในสภาวะที่มีการกวนผสมและชุดควบคุม หลังจากเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	97
ตารางที่ 3-28	ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในสภาวะที่เหมาะสม หลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	98
ตารางที่ 3-29	ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำอีเอ็ม)	109

สารบัญตารางภาคผนวก

หน้า

ตารางที่ ค-1 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยก ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 152

ตารางที่ ค-2 ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็ม 3 สูตร จากวิธีการ spread plate และ pour plate เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน 158

ตารางที่ ค-3 ผลการคัดเลือกสูตรของน้ำหมักอีเอ็มโดยพิจารณาประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 160

ตารางที่ ค-4 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลของน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 เมื่อเติมในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 162

ตารางที่ ค-5 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น เป็นเวลา 7 วัน 182

สารบัญภาพประกอบ

หน้า

ภาพที่ 1-1 การปรับปรุงคุณภาพน้ำ 4

ภาพที่ 1-2 การเตรียมน้ำเชื้อสำเร็จ 5

ภาพที่ 1-3 การผลิตน้ำอัดลม 5

ภาพที่ 1-4 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักอีเอ็ม 22

ภาพที่ 1-5 กรอบแนวคิดการวิจัย 23

ภาพที่ 3-1 จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่คัดแยกจากน้ำอัดลมหมดอายุของบริษัท จำกัด (มหาชน) 51

ภาพที่ 3-2 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง 55

ภาพที่ 3-3 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4, 5, 6, 6.5, 7 และชุดควบคุม (ไม่ปรับพีเอชเริ่มต้น) ที่อุณหภูมิห้อง 57

ภาพที่ 3-4 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 และชุดควบคุม (ไม่ปรับพีเอชเริ่มต้น) ที่อุณหภูมิห้อง 59

ภาพที่ 3-5 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5, 4, 5, 6, 7 และชุดควบคุม (ไม่ปรับพีเอชเริ่มต้น) ที่อุณหภูมิห้อง 60

ภาพที่ 3-6 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1 1.5, 2 กรัมต่อลิตร และชุดควบคุม (ไม่เติม $(NH_4)_2SO_4$) ที่อุณหภูมิห้อง 64

ภาพที่ 3-7 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1 1.5, 2 กรัมต่อลิตร และชุดควบคุม (ไม่เติม $(NH_4)_2SO_4$) ที่อุณหภูมิห้อง 65

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 3-8 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1, 1.5, 2 กรัมต่อลิตร และชุดควบคุม (ไม่เติม $(NH_4)_2SO_4$) ที่อุณหภูมิห้อง 68

ภาพที่ 3-9 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1, 3, 5, 10 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ที่อุณหภูมิห้อง 70

ภาพที่ 3-10 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1, 3, 5, 10 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ที่อุณหภูมิห้อง 72

ภาพที่ 3-11 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1, 3, 5, 10 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ที่อุณหภูมิห้อง 73

ภาพที่ 3-12 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 50, 100 150, 200 รอบต่อนาที และชุดควบคุม (ไม่มีการเขย่า) ที่อุณหภูมิห้อง 76

ภาพที่ 3-13 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 50, 100, 150 200 รอบต่อนาที และชุดควบคุม (ไม่มีการเขย่า) ที่อุณหภูมิห้อง 78

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 3-14 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 50, 100, 150, 200 รอบต่อนาที และชุดควบคุม (ไม่มีการเขย่า) ที่อุณหภูมิห้อง 79

ภาพที่ 3-15 ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็ม 3 สูตร จากวิธีการ spread plate (ก) และ pour plate (ข) เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน 83

ภาพที่ 3-16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ในน้ำหมักอีเอ็ม 3 สูตร หลังจากการหมักที่ระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ด้วยวิธีการ spread plate และ pour plate ประกอบด้วย น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 (ก) น้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 (ข) และ น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 (ค) 85

ภาพที่ 3-17 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง 88

ภาพที่ 3-18 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 1 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) ที่อุณหภูมิห้อง 90

ภาพที่ 3-19 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำอัดลมหมดอายุ และเขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 50, 100, 150 200 รอบต่อนาที และชุดควบคุม (ไม่มีการเขย่า) ที่อุณหภูมิห้อง 92

ภาพที่ 3-20 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและ น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 99

ภาพที่ 3-21 การเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดีหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็ม สูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 101

ภาพที่ 3-22 การเปลี่ยนแปลงของค่าบีโอดีหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็ม สูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 101

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 3-23 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มสีหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน 103

ภาพที่ 3-24 การเปลี่ยนแปลงปริมาณมวลชีวภาพหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง 105

ภาพที่ 3-25 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง 105

ภาพที่ 3-26 การผลิตเอทานอลหลังการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุโดยจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็ม ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 107

ภาพที่ 3-27 การลดลงของปริมาณน้ำตาลและปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นหลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 110

ภาพที่ 3-28 การเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดีและบีโอดีหลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น 111

ภาพที่ 3-29 การผลิตเอทานอลหลังการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุโดยน้ำหมักอีเอ็มภายในถังบำบัดขั้นต้น เป็นเวลา 7 วัน 112

สารบัญภาพประกอบภาคผนวก

		หน้า
ภาพที่ ก-1	กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลซูโครสที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร	128
ภาพที่ ก-2	แผ่นสเกลสำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์	129
ภาพที่ ก-3	เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์	130
ภาพที่ ก-4	การกรองตัวอย่างด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ	131
ภาพที่ ข-1	แสดง DNA sequencing Electropherogram ของแบคทีเรีย B_6 (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis*)	132
ภาพที่ ข-2	ผลการทำ Alignment กับ sequence จากฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ของแบคทีเรีย B_6 (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis*)	133
ภาพที่ ข-3	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย B_6 (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis*) เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar เป็นเวลา 1 วัน	136
ภาพที่ ข-4	ลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรีย B_6 (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis*) เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar เป็นเวลา 1 วัน	136
ภาพที่ ข-5	แสดง DNA sequencing Electropherogram ของยีสต์ Y_{14} (*Pichia galeiformis partial*)	137
ภาพที่ ข-6	ผลการทำ Alignment กับ sequence จากฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ของของยีสต์ Y_{14} (*Pichia galeiformis partial*)	138
ภาพที่ ข-7	ลักษณะโคโลนีของยีสต์ Y14 (*Pichia galeiformis partial*) เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar เป็นเวลา 2 วัน	141
ภาพที่ ข-8	ลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ Y_{14} (*Pichia galeiformis partial*) เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar เป็นเวลา 2 วัน	141
ภาพที่ ข-9	ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่าย หลังจากการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 1 วัน	142
ภาพที่ ข-10	ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 3 วัน	143

สารบัญภาพประกอบภาคผนวก (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ ข-11 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 7 วัน 144

ภาพที่ ข-12 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 1 วัน 145

ภาพที่ ข-13 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 3 วัน 146

ภาพที่ ข-14 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 7 วัน 147

ภาพที่ ข-15 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยน้ำหมักอีเอ็ม (กวนผสม) เป็นเวลา 1 วัน 148

ภาพที่ ข-16 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยน้ำหมักอีเอ็ม (กวนผสม) เป็นเวลา 3 วัน 149

ภาพที่ ข-17 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยน้ำหมักอีเอ็ม (กวนผสม) เป็นเวลา 7 วัน 150

ภาพที่ ข-18 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุที่ยังไม่ผ่านการบำบัด 151

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

COD	=	Chemical Oygen Demand คือ ปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ใช้ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ด้วยวิธีทางเคมีทั้งในรูของแข็งและในรูปที่ไม่ละลายน้ำ
BOD	=	ปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์
TN	=	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด
g/L	=	กรัมต่อลิตร
mg/L	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
$Y_{x/s}$	=	ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นภายในช่วงเวลาที่สารอาหาร (น้ำตาล) ถูกใช้ไป มีหน่วยเป็นกรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป (g_x/g_s)

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

น้ำอัดลม หมายถึง เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ แต่มีส่วนผสมที่ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบและประเภทที่ไม่มีน้ำตาลหรือโซดา น้ำอัดลมเป็นสินค้าที่มีความต้องการของตลาดสูง เนื่องจากในประเทศไทยมีปัจจัยที่เอื้ออำนวยอย่างอากาศร้อน หรือความต้องการพลังงานของผู้บริโภคเพื่อผ่อนคลายความเหนื่อยล้า แม้ในปัจจุบันภาวะการตลาดมีการขยายตัวไม่สูงมากนักเหมือนในอดีต แต่ภาวะการตลาดของน้ำอัดลมก็ไม่เคยซบเซา นอกจากนี้ อุตสาหกรรมน้ำอัดลมยังมีความเชื่อมโยงกับอุตสาหกรรมอื่นๆ ทั้งในลักษณะ Backward Linkage ได้แก่ อุตสาหกรรมที่ผลิตส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการผลิตน้ำอัดลม เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล ภาชนะบรรจุ เช่น แก้ว ฝาจีบ สีและกลิ่นสังเคราะห์ เป็นต้น รวมทั้งความสัมพันธ์ในลักษณะ Forward Linkage เช่น อุตสาหกรรมโฆษณาอีกด้วย โดยเฉพาะการนำรายได้ในรูปของภาษีสรรพสามิตและจัดได้ว่าเป็นอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าสูงซึ่งปัจจุบันมีมูลค่าทางการตลาดประมาณ 40,000 ล้านบาท สำหรับการแบ่งประเภทของน้ำอัดลมตามระบบตลาดที่มีการซื้อขายในปัจจุบัน สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ 1) เครื่องดื่มประเภทน้ำดำ (black carbonated drinks) 2) เครื่องดื่มประเภทน้ำสี หรือน้ำผลไม้ (fruit flavoured drinks) และ 3) เครื่องดื่มน้ำประเภทไม่มีสี (lime drinks) ประกอบด้วยน้ำและสารให้ความหวาน เช่น น้ำตาลซูโครสเป็นหลัก ในอดีตการผลิตน้ำอัดลมเป็นแบบชนิดธรรมดาที่ไม่ใช่แบบจำกัดพลังงานหรือที่เรียกกันว่าแบบไอเอท ซึ่งใช้น้ำตาลทรายเป็นสารให้ความหวานเพียงอย่างเดียวโดยนำมาผสมน้ำและต้มจนเป็นน้ำเชื่อม จากนั้นจึงทำการกรอง แต่ในปัจจุบันมีการใช้สารให้ความหวานชนิดอื่นเพิ่มขึ้นมา เช่น น้ำเชื่อมข้าวโพด (corn syrup) น้ำเชื่อมข้าวโพดแบบฟรุคโตสสูง (High Fructose Corn Syrup: HFCS) หรือแอสปาแทม (สารทดแทนความหวาน) เป็นต้น น้ำอัดลมเป็นเครื่องดื่มที่มีฟองของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเกิดจากผลึกกรดซิตริกที่ละลายน้ำจนเป็นกรดซิตริก เมื่อกรดซิตริกทำปฏิกิริยากับโซดาไบคาร์บอเนตที่เติมลงไปจะเกิดเป็นฟองก๊าซขึ้นมา นอกจากนี้ น้ำอัดลมมีองค์ประกอบของสารปรุงแต่งรส สารปรุงแต่งกลิ่นและวัตถุกันเสีย ซึ่งน้ำอัดลมมีคุณค่าทางโภชนาการมาจากน้ำตาลโดยร่างกายสามารถนำไปใช้เป็นพลังงาน ดังนั้น น้ำอัดลมจึงเป็นเครื่องดื่มที่ทำให้ผู้บริโภคได้พลังงานเพียงอย่างเดียว (empty calories) (http://www.stou.ac.th/study/sumrit/11-51(500)/page1-11-51(500).html)

ในสภาวการณ์ปัจจุบันบริษัทผลิตน้ำอัดลมสามารถผลิตน้ำอัดลมออกจำหน่ายได้เป็นจำนวนมากตามความต้องการของตลาด แต่ในกระบวนการผลิตน้ำอัดลมจะมีน้ำเสียเกิดขึ้น 2 ส่วน คือ น้ำเสียจากเครื่องล้างขวด และน้ำทิ้งทั่วไป ประกอบด้วย น้ำล้างจากเครื่องบรรจุ น้ำล้างพื้น และน้ำจากห้องผสม เป็นต้น (เฉลา ศรีทวี, 2535) และมีของเสียอีกประเภทหนึ่งซึ่งเป็นความรับผิดชอบของบริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลม นั่นคือ น้ำอัดลมหมดอายุ ประกอบด้วยน้ำอัดลมที่หมดอายุตามระยะเวลาการผลิตโดยเก็บคืนจากตัวแทนจำหน่าย และน้ำอัดลมที่ไม่ได้มาตรฐานจากกระบวนการผลิต เนื่องจากบริษัทที่เป็นกรณีศึกษาเป็นผู้ผลิตน้ำอัดลมรายใหญ่ในพื้นที่ภาคใต้ จึงมีปริมาณน้ำอัดลมหมดอายุที่ต้องกำจัดโดยเฉลี่ย 50 ลูกบาศก์เมตรต่อเดือน ประกอบกับน้ำอัดลมหมดอายุมีสมบัติที่แตกต่างจากน้ำเสียจากกระบวนการผลิตส่วนอื่น คือ มีปริมาณน้ำตาลและค่าความเป็นกรดสูง ทำให้มีข้อจำกัดในการรองรับภาระบรรทุกของระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งเป็นระบบบ่อ ประกอบด้วย บ่อหมัก บ่อเติมอากาศ บ่อตกตะกอน และบ่อเลี้ยงปลา (เฉลา ศรีทวี, 2535) ดังนั้นจึงไม่สามารถกำจัดน้ำอัดลมหมดอายุเหล่านี้โดยการปล่อยสู่ระบบบำบัดน้ำเสียได้ทันที ทั้งนี้บริษัทฯ มีระบบการจัดการน้ำอัดลมหมดอายุก่อนปล่อยเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน คือ การสร้างถังเก็บกักน้ำอัดลมหมดอายุปริมาตร 50 ลูกบาศก์เมตร ในพื้นที่ของบริษัทซึ่งใช้เป็นถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้นโดยอาศัยจุลินทรีย์จากสารเร่งพด. 6 ในการบำบัด จากนั้นปล่อยน้ำอัดลมหมดอายุเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียในปริมาณน้อยๆ (ประมาณ 370 ลิตรต่อวัน) เพื่อป้องกันการเกิดภาวะ shock load ของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย (Kirzhner *et al.*, 2008)

อย่างไรก็ตามระบบการจัดการน้ำเสียในเบื้องต้นยังมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้บริษัทฯ ต้องประสบปัญหาน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณมากเกินความสามารถในการเก็บกักของถังบำบัดขั้นต้นเป็นบางครั้งซึ่งก่อให้เกิดความยุ่งยากในการจัดการ ดังนั้น บริษัทฯ จึงต้องการหาแนวทางในการลดระยะเวลาการเก็บกักและเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำอัดลมหมดอายุ โดยสามารถปล่อยน้ำอัดลมหมดอายุลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสียได้มากขึ้นและทำให้บริษัทฯ มีพื้นที่ ในการเก็กกักน้ำอัดลมหมดอายุเพียงพอเมื่อมีปริมาณมากเกินไป ทั้งนี้การเลือกระบบการจัดการน้ำเสียต้องพิจารณาปัจจัยหลายๆ ด้าน เช่น ความสามารถในการรองรับภาระบรรทุกและสมบัติของน้ำเสียที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ต้นทุนในการดำเนินการและดูแลรักษา (Satyawali and Balakrishnan, 2008) สำหรับการแก้ปัญหาน้ำเสียมีวิธีการบำบัดหลายรูปแบบซึ่งมีประสิทธิภาพในการบำบัดที่แตกต่างกัน โดยมีเป้าหมายเช่นเดียวกันในการลดค่าความสกปรกของน้ำเสียก่อนที่จะปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียบางประเภทนำเทคโนโลยีมาใช้ในการบำบัดทำให้มีต้นทุนสูงซึ่งไม่สอดคล้องกับสภาพเศรษฐกิจในปัจจุบัน แต่การบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยาเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีความ

สกปรกสูง เช่น โรงงานผลิตแอลกอฮอล์ เนื่องจากใช้ต้นทุนต่ำและมีประสิทธิภาพในการบำบัดสูง โดยอาศัยจุลินทรีย์ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Pant and Adholeya, 2007)

ผู้วิจัยโดยความเห็นชอบของบริษัทจึงสนใจศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา โดยทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้นของบริษัทที่เป็นกรณีศึกษา แต่จะเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดใดต้องผ่านการคัดเลือกโดยพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตและความสามารถในการกำจัดปริมาณน้ำตาล รวมทั้งศึกษาปัจจัยทางด้านโภชนาการและด้านกายภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์และนำมาศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในขั้นต้นโดยเปรียบเทียบกับ น้ำหมักอีเอ็ม ซึ่งการบำบัดน้ำเสียโดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางซึ่งเป็นการประหยัดต้นทุนและพลังงานที่มีอย่างจำกัด (นิพล กุลฑล, 2549) และพบว่าน้ำหมักอีเอ็มประกอบด้วยจุลินทรีย์และสารอินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ ฮอร์โมน และธาตุอาหารต่างๆ เอนไซม์บางชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์วัตถุให้เป็นสารอินทรีย์ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ ทั้งนี้บริษัทฯ มีปริมาณน้ำอัดลมหมดอายุที่เกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอ การวิจัยครั้งนี้จึงเลือกการศึกษาระบบบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ แบบกะ (batch system)

1.2 การตรวจเอกสาร

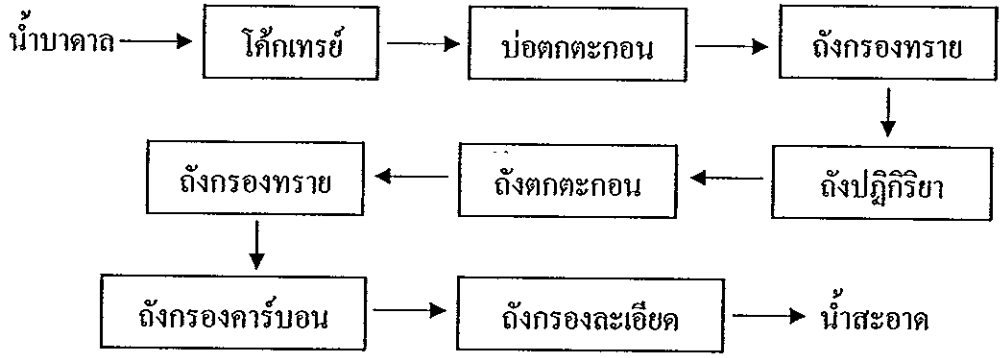
1.2.1 กระบวนการผลิตน้ำอัดลม

เนื่องจากโรงงานผลิตน้ำอัดลมในประเทศไทยมีอยู่หลายแห่งซึ่งมีกรรมวิธีการผลิตเหมือนกัน แต่อาจมีขั้นตอนอื่นๆ เพิ่มขึ้นเฉพาะในขั้นตอนการเตรียมน้ำสะอาดเท่านั้น เนื่องจากใช้แหล่งน้ำดิบต่างกัน และวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิต ประกอบด้วย น้ำสะอาด น้ำตาลทราย หัวน้ำเชื้อ (concentrate base) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

สำหรับกรรมวิธีในการผลิตน้ำอัดลมเริ่มจากการนำน้ำบาดาลมาผ่านการปรับปรุงคุณภาพน้ำขั้นต้น โดยการเติมออกซิเจนในถาดโค้กเทรย์เพื่อแยกเอาสารละลายเหล็กออกจากน้ำดิบ และเติมคลอรีนเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วผ่านการกรองด้วยถังกรองทราย จากนั้นจึงผ่านการปรับคุณภาพน้ำอีกครั้งหนึ่งโดยการใช้สารเคมี ขั้นตอนนี้จะใช้ Lime Process คือ การใช้ $FeSO_4$ $Ca(OH)_2$ และ $Ca(OCl)_2$ หลังจากนั้นต้องผ่านการกรองตะกอนที่ยังแขวนลอยด้วยถังกรองทรายและผ่านถังกรอง activated carbon เพื่อกำจัดสี กลิ่น และคลอรีนที่ตกค้างในน้ำ น้ำจากขั้นตอนนี้จะต้องผ่านถังกรองละเอียด (polishing filter) อีกครั้งหนึ่ง เพื่อกรองสิ่งเจือปนเล็กๆ ที่มีขนาด 10 ไมครอน (ภาพที่ 1-1)

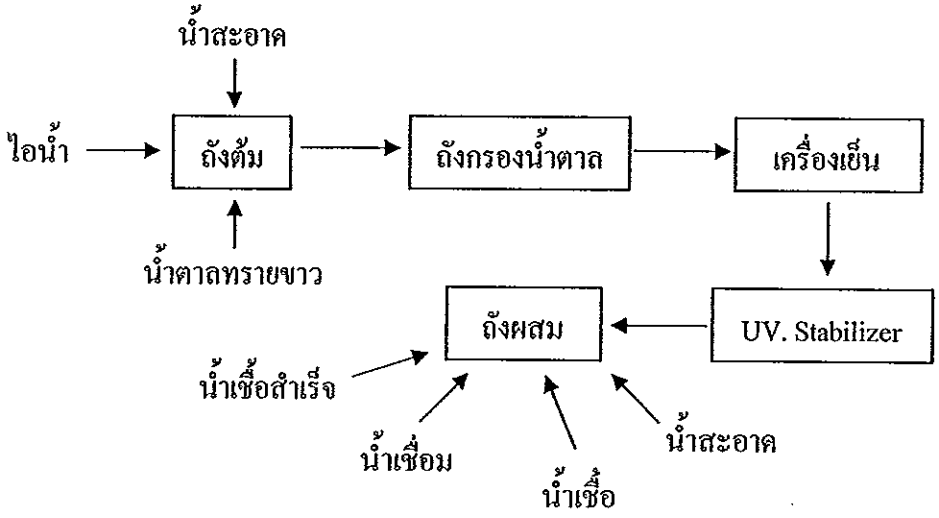
น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ จะถูกผสมกับน้ำที่สะอาดแล้วในถังต้มที่มีอุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส เพื่อละลายน้ำตาลและฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นน้ำตาลจะถูกกรองและทำให้เย็นแล้วฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลตอีกครั้งหนึ่ง ก่อนที่จะนำไปผสมกับน้ำเชื้อสำเร็จที่ผลิตส่งมาจากต่างประเทศเป็นส่วนๆ เพื่อผลิตน้ำเชื้อสำเร็จรูป (finished syrup) (ภาพที่ 1-2)

น้ำเชื้อสำเร็จจะถูกส่งไปผสมกับน้ำสะอาดในสัดส่วน ประมาณ 4:1 ถึง 5:1 ทำให้เย็นแล้วอัดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และบรรจุขวดโดยเครื่องบรรจุขวดอัตโนมัติ พร้อมทั้งปิดฝาทันที แล้วผ่านการตรวจสอบทุกขั้นตอนเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพที่สม่ำเสมอและดีเยี่ยม ภาชนะบรรจุมีทั้งกระป๋องและขวด ขวดที่ใช้มีทั้งชนิดที่ใช้แล้วทิ้ง (one-way bottles) และชนิดหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ (returnable bottles) สำหรับขวดชนิดที่หมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่เป็นขวดแก้วต้องผ่านกระบวนการล้างอย่างดี โดยผ่านเครื่องล้างขวดอัตโนมัติซึ่งภายในจะมีอุณหภูมิสูง และมีสารทำความสะอาด ได้แก่ โซดาไฟ และฟอสเฟต ช่วยในการล้างด้วย นอกจากนี้มีการฉีดทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดหลาย ครั้ง ก่อนออกมาจากเครื่องล้าง และมีการตรวจสอบก่อนผ่านเข้าเครื่องบรรจุ (ภาพที่ 1-3) (เฉลา ศรีทวี, 2535)



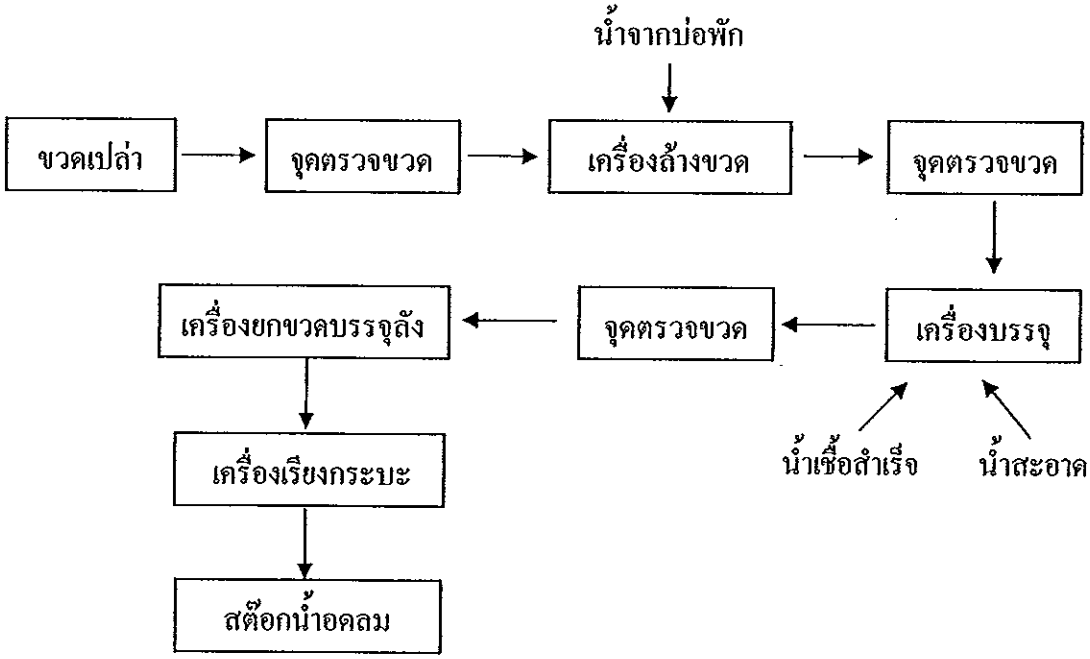
ภาพที่ 1-1 การปรับปรุงคุณภาพน้ำ

ที่มา: เฉลา ศรีทวี (2535)



ภาพที่ 1-2 การเตรียมน้ำเชื้อสำเร็จ

ที่มา: เฉลา ศรีทวี (2535)



ภาพที่ 1-3 การผลิตน้ำอัดลม

ที่มา: เฉลา ศรีทวี (2535)

1.2.2 ลักษณะสมบัติของน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ

จากรายงานวิจัย (ตารางที่ 1-1) พบว่า น้ำเสียจากอุตสาหกรรมที่ใช้น้ำตาลในกระบวนการผลิตมีปริมาณสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีและบีโอดีอยู่ในเกณฑ์สูงกว่ามาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (กรมโรงงานอุตสาหกรรมและสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2545) นอกจากนี้ยังค่าความเป็นกรดสูงและน้ำเสียส่วนใหญ่มีสีเป็นองค์ประกอบ ซึ่งน้ำเสียเหล่านี้ยังไม่ได้มีการนำกลับมาใช้ประโยชน์มากนัก นอกจากระบายลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งการปล่อยลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสียอาจทำให้เกิดภาวะ shock load ต่อจุลินทรีย์ในระบบ หากประสิทธิภาพหลังจากการบำบัดไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติอาจเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำและทำให้แหล่งน้ำเน่าเสียในที่สุด นอกจากนี้ หากน้ำทิ้งปนเปื้อนไปยังบริเวณพื้นที่การเกษตรจะทำให้ดินมีค่าความเป็นกรดมากขึ้นโดยเฉพาะการยับยั้งการงอกและเจริญของพืช (Singh *et al.*, 2004)

ตารางที่ 1-1 ลักษณะสมบัติของน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ

พารามิเตอร์ / น้ำเสีย	COD	BOD	TN	สี	pH	อ้างอิง
	กรัมต่อลิตร					
โรงงานกลั่นสุรา (น้ำกากส่า)	110-150	50-60	5-7	น้ำตาลเข้ม	3-4.5	Mohana และคณะ (2009)
โรงงานน้ำตาล	125-148	42-59	8-13	-	6.8-7.2	Guimaraes และคณะ (2005)
โรงงานผลิตเบียร์	47-62	12-25	-	-	4.7-5.3	Parawira และคณะ (2005)

1.2.3 การบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา

การบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางชีววิทยา คือ การกำจัดสารอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายหรือสารแขวนลอยขนาดเล็กที่ไม่สามารถตกตะกอนได้โดยอาศัยแรงโน้มถ่วงของโลก โดยการใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากธรรมชาติมาย่อยสลายสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์บางชนิดที่มีอยู่ในน้ำเสียในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของผลผลิตสุดท้ายและเซลล์ของจุลินทรีย์ สำหรับจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ เชื้อรา สาหร่าย และโพรโตซัว เนื่องจากระบบบำบัดทางชีววิทยาจะใช้จุลินทรีย์ในการทำงานเป็นหลัก ดังนั้น น้ำเสียที่นำมาบำบัดด้วยวิธีดังกล่าวควรผ่านกระบวนการบำบัดในขั้นต้นมาก่อน เพื่อทำให้น้ำเสียมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ไม่ควรมีสารที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งพบว่าน้ำเสียที่สามารถนำมาบำบัดโดยวิธีทางชีววิทยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ น้ำเสียจากชุมชนและน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีสารอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548) สำหรับองค์ประกอบต่างๆ ในการบำบัดน้ำเสียทางวิธีชีววิทยา (กรมโรงงานอุตสาหกรรมและสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2545) ประกอบด้วย

- ถังปฏิกิริยา (reactor) ซึ่งใช้เป็นที่ให้แบคทีเรียทำปฏิกิริยาย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย

- การควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

- การแยกตะกอนจุลินทรีย์ออกจากน้ำที่ออกจากน้ำที่ออกจากถังปฏิกิริยาสำหรับปฏิกิริยาชีวเคมีที่จุลินทรีย์ใช้ในการเผาผลาญสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ได้แก่ปฏิกิริยาชีวเคมีแบบใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ (พิมล เรียนวัฒนา และชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, 2539) ดังนี้

1) ปฏิกิริยาชีวเคมีแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic reaction) เกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนอิสระโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเผาผลาญสารอินทรีย์ แต่จะใช้ออกซิเจนที่มีอยู่ในสารประกอบแทน เช่น NO_3^- หรือ SO_4^{2-} ทำให้สารอินทรีย์สลายตัวเพื่อให้พลังงานและสารประกอบอื่นๆ ที่มักมีกลิ่นเหม็น เช่น H_2S จุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนอิสระในกลุ่มนี้ ได้แก่ anaerobic และ facultative microorganisms โดยมีปฏิกิริยาดังสมการที่ 1

$$\text{C H O N S (สารอินทรีย์)} + \text{แบคทีเรีย} \longrightarrow H_2O + CH_4 + N_2 + H_2S + CO_2 + \text{พลังงาน} \quad (1)$$

2) ปฏิกิริยาชีวเคมีแบบใช้ออกซิเจน (aerobic reaction) เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนอิสระในการเผาผลาญสารอินทรีย์เพื่อให้ได้พลังงานในการดำรงชีวิตและนำพลังงานไปสร้างเป็นเซลล์ใหม่ของจุลินทรีย์ และสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยานี้เป็นสารที่มีเสถียรภาพและ

ไม่มีกลิ่นเหม็นที่สำคัญคือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อยตามสมการที่ 2 และ 3 ดังนี้

- ปฏิกิริยาการใช้ออกซิเจนในการทำลายสารอินทรีย์เพื่อให้ได้พลังงาน

$$CHONS\ (\text{สารอินทรีย์}) + O_2 + \text{แบคทีเรีย} \longrightarrow CO_2 + H_2O + NO_2 + SO_4^{2-}, \text{etc} + \text{พลังงาน} \quad (2)$$

- การนำพลังงานที่ได้ไปสร้างเป็นเซลล์ใหม่

$$CHONS\ (\text{สารอินทรีย์}) + O_2 + \text{แบคทีเรีย} + \text{พลังงาน} \longrightarrow C_5H_7O_2N\ (\text{เซลล์ใหม่แบคทีเรีย}) \quad (3)$$

1.2.4 การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบด้วยจุลินทรีย์

เนื่องจากการบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีความสกปรกสูงและมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ โดยเฉพาะน้ำเสียจากภาคอุตสาหกรรม เช่น น้ำกากส่าจากกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ และในปัจจุบันพบว่าการนำจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ยีสต์ หรือเชื้อรามาใช้กำจัดสีและสารอินทรีย์ออกจากน้ำเสียได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากมีงานวิจัยต่างๆ ที่กล่าวถึงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการกระบวนการบำบัดทางชีววิทยา นอกจากนี้ น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยวิธีทางชีววิทยารวมทั้งตะกอนจุลินทรีย์มีความคงตัวสูงและไม่เป็นอันตรายจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อีก เช่น การทำปุ๋ยและอาหารสัตว์ (Satyawali *et al.*, 2008) แต่โดยทั่วไปจะนิยมใช้ระบบบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนเพื่อบำบัดน้ำกากส่าในขั้นแรกมากกว่าระบบบำบัดแบบใช้ออกซิเจน เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่สิ้นเปลืองพลังงานในการเติมออกซิเจนเพื่อลดค่าความสกปรกในน้ำเสีย อีกทั้งจุลินทรีย์ต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตในปริมาณน้อย เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เนื่องจากสารอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ถูกย่อยสลายจะเปลี่ยนไปเป็นก๊าซชีวภาพมากกว่านำไปสร้างเซลล์ใหม่ของจุลินทรีย์ จึงทำให้ลดความยุ่งยากในการจัดการตะกอนของจุลินทรีย์หลังการบำบัด (Pant and Adholeya, 2007) นอกจากการบำบัดด้วยวิธีทางชีววิทยา พบว่า วิธีการบำบัดทางเคมี-กายภาพสามารถนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบได้เช่นกันซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น กระบวนการดูดซับ การตกตะกอนและรวมตะกอน การออกซิเดชัน และเทคโนโลยีเมมเบรน เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้มักจะใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มาจากกระบวนการแบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยทำหน้าที่ในการลดปริมาณสารอินทรีย์และความเข้มสีที่เหลืออยู่หลังจากการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีข้อจำกัดคือ ใช้ต้นทุนในการบำบัดค่อนข้างสูง เนื่องจากมีการใช้สารเคมีและอุปกรณ์ในการการติดตั้งระบบต่างๆ มากกว่าการบำบัดด้วยวิธีทางชีววิทยา (Mohana *et al.*, 2009)

1.2.4.1 การบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจน

ระบบบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนอาศัยจุลินทรีย์หลายชนิดทำงานร่วมกัน ซึ่งสามารถแบ่งขั้นในการย่อยสลายออกเป็น 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์

โมเลกุลใหญ่เป็นโมเลกุลเล็ก การเปลี่ยนสารอินทรีย์โมเลกุลเล็กเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile fatty acid; VFA) และการเปลี่ยนกรดอินทรีย์เป็นก๊าซมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการบำบัดน้ำกากส่า เนื่องจากสามารถรองรับภาระบรรทุกจากปริมาณสารอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าการบำบัดแบบใช้ออกซิเจน อย่างไรก็ตามการบำบัดด้วยวิธีนี้มีความไวต่อปริมาณสารอินทรีย์ที่มากเกินไป พีเอชในระบบบำบัดมีค่าลดลง และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศเจริญเติบโตได้ช้าจึงทำให้การบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนใช้ระยะเวลานานขึ้นในกรณีที่ใช้ระบบบำบัดแบบธรรมดา (conventional anaerobic process) แต่สามารถลดระยะเวลาในการบำบัดให้น้อยลง โดยการใช้ระบบบำบัดที่มีอัตราการย่อยสลายสูง (high rate anaerobic process) (Tewari *et al.*, 2007) ซึ่งระบบบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายรูปแบบซึ่งใช้เทคโนโลยีที่แตกต่างกัน มีความยากง่ายแตกต่างกัน แต่มีวัตถุประสงค์เดียวกันคือต้องการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในน้ำเสียโดยเสียค่าใช้จ่ายและมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด และสามารถควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียได้ง่ายที่สุด อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถเลือกระบบบำบัดน้ำเสียที่สามารถแก้ปัญหาได้ทั้งหมดซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ ด้าน เช่น สมบัติและปริมาณของน้ำเสีย คุณภาพน้ำที่ต้องการหลังการบำบัด ต้นทุนและพื้นที่ในการบำบัด เป็นต้น สำหรับการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบโดยใช้ระบบบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้ (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2548)

1) ระบบบำบัดแบบธรรมดา (conventional anaerobic process)

เป็นวิธีการบำบัดที่อาศัยธรรมชาติมากที่สุด โดยใช้เครื่องจักรกลหรือมีการพัฒนาน้อยมาก ดังนั้น การควบคุมค่ากำหนดต่างๆ (parameter) ที่ทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสูงขึ้นย่อมเป็นไปได้ยาก เช่น ระบบบำบัดไม่สามารถควบคุมปริมาณตะกอนจุลินทรีย์ในถังปฏิกิริยาส่งผลให้ประสิทธิภาพในการบำบัดต่ำ แต่อย่างไรก็ตาม ระบบบำบัดน้ำเสียดังกล่าวเป็นระบบบำบัดอย่างง่าย ทำให้มีความสะดวกในการควบคุมระบบโดยไม่ต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญมากนัก ตลอดจนไม่ต้องพึ่งพาเทคโนโลยีมากนัก ทำให้ระบบบำบัดแบบธรรมดาเป็นที่นิยมใช้กันในภาคอุตสาหกรรมและชุมชนในอดีตหรือแม้กระทั่งในปัจจุบันซึ่งมีอยู่หลายระบบ เช่น

1.1) ระบบบ่อหมักไร้อากาศหรือบ่อเหม็น (anaerobic pond)

เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบง่ายที่สุด ลักษณะเป็นบ่อปิด มีความลึกตั้งแต่ 3 เมตรขึ้นไป เพื่อป้องกันไม่ให้ออกซิเจนละลายลงไปในบ่อบำบัดและต้องการรักษาสภาพไร้อากาศ ซึ่งใช้ระยะเวลาในการบำบัดประมาณ 1 เดือน โดยมีการป้อนน้ำเสียเข้าทางตอนล่างของบ่อบำบัดเพื่อให้เกิดการตะตอนและเกิดการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศเกิดเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย

โดยจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างกรด (acid former bacteria) และกรดอินทรีย์ระเหยง่ายจะเกิดการย่อยสลายต่อโดยจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่ง คือ จุลินทรีย์กลุ่มสร้างก๊าซมีเทน อย่างไรก็ตาม ระบบบำบัดน้ำเสียดังกล่าวต้องใช้พื้นที่มากในการสร้างจึงเหมาะสมสำหรับพื้นที่ที่ราคาที่ดินไม่แพงมากนัก เช่น บริเวณชนบทและมีผู้คนอาศัยไม่หนาแน่น เพราะอาจจะมีกลิ่นเหม็นระเหยออกจากระบบบำบัด ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของระบบบำบัดน้ำเสียประเภทนี้ และนิยมใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูงๆ เช่น งานวิจัยของ Singh และคณะ (2004) ศึกษาการใช้บ่อบำบัดแบบไร้อากาศแบบอนุกรม 2 บ่อ ในการบำบัดน้ำกากก่า ผลจากการศึกษาพบว่า สามารถกำจัดสารอินทรีย์ในรูปบีโอดีได้ประมาณ 82-92 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 3 สัปดาห์ แต่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นและการปนเปื้อนของน้ำใต้ดิน และพบว่าในประเทศอินเดียนิยมบำบัดน้ำกากส่าโดยใช้ระบบบ่อหมักไร้อากาศเช่นกัน ซึ่งสามารถลดค่าบีโอดีอยู่ในช่วง 80-85 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบำบัดเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน (Roa, 1972)

1.2) ถังหมักย่อยสลายแบบธรรมดา (conventional anaerobic digester)

เป็นระบบที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อกำจัดตะกอนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระบบบำบัดแบบใช้ออกซิเจน เช่น ระบบตะกอนเร่ง ประกอบด้วยถังหมักใบเดียวหรือหลายใบและเป็นถังปิดที่มีการป้อนตะกอนจุลินทรีย์เข้าระบบหรือถังหมัก มีทางน้ำล้นเพื่อระบายน้ำใสออกจากบ่อ มีทางระบายก๊าซชีวภาพออกจากถังหมัก และทางระบายกากตะกอนที่ผ่านการย่อยสลายออกทางด้านล่างของถัง ซึ่งระบบถังหมักแบบธรรมดามีอยู่ด้วยกันหลายรูปแบบ คือ ถังปฏิกิริยาถังเดียว (Single stage digester) หรือถังปฏิกิริยา 2 ถัง (two stage digester) และแบบที่มีการกวนผสมภายในถังอย่างสมบูรณ์และแบบไม่มีการกวนผสม เพื่อให้เข้าใจถึงระบบการทำงานที่แตกต่างกันของถังหมักย่อยสลายแบบธรรมดาแต่ละชนิดสามารถแบ่งถังปฏิกิริยาได้เป็น 2 แบบ ดังนี้

- ถังหมักชนิดอัตราการกำจัดต่ำ (low rate anaerobic digester) เป็นถังหมักชนิดที่ไม่มีการกวนผสมภายในถังปฏิกิริยาทำให้ตะกอนจุลินทรีย์แยกชั้นกับน้ำเสีย โดยตะกอนหนักจะจมอยู่ก้นถัง ตะกอนเบาอยู่ชั้นบน และส่วนบนสุดของถังปฏิกิริยาจะเป็นส่วนของน้ำใส แต่ชั้นตะกอนเบาในถังปฏิกิริยาอาจหนามากจนทำให้ระดับน้ำใสในถังเหลือน้อยมาก ซึ่งเป็นการลดปริมาตรของถังบำบัดจนทำให้ระยะเวลาการเก็บกักของน้ำเสียในถังปฏิกิริยาน้อยลง ทำให้เกิดการลัดวงจรของน้ำเสียในถังปฏิกิริยาได้ง่าย และในที่สุดจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการบำบัด

- ถังหมักชนิดอัตราการกำจัดสูง (high rate anaerobic digester) เป็นถังหมักชนิดที่มีการกวนผสมภายในถังปฏิกิริยาเพื่อให้ตะกอนจุลินทรีย์สัมผัสกับน้ำเสียได้ดีขึ้น (complete mixing) ทำให้เกิดการลัดวงจรของน้ำเสียในถังปฏิกิริยาได้น้อยมาก แต่น้ำเสียที่ผ่านการ

บำบัดแล้วจะมีลักษณะขุ่นเนื่องจากมีตะกอนจุลินทรีย์แขวนลอยอยู่ ดังนั้น จึงต้องมีการแยกตะกอนของจุลินทรีย์ออกจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วก่อนปล่อยทิ้ง และตะกอนจุลินทรีย์ที่แยกออกมามีความจำเป็นต้องนำกลับเข้าสู่ถังปฏิกิริยาอีก เนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่อยู่ในระบบบำบัดแบบไร้อากาศต่ำมาก ซึ่งมีอายุตะกอนประมาณ 10-30 วัน หากไม่นำตะกอนของจุลินทรีย์ที่แยกออกจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วกลับเข้าสู่ถังปฏิกิริยาอีก จะทำให้ความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ในถังปฏิกิริยาลดลง Pathade (1999) รายงานว่า ถังหมักชนิดอัตราการกำจัดสูงที่มีการกวนผสมในถังปฏิกิริยาโดยใช้ถังปฏิกิริยาแบบถังเดียวและแบบ 2 ถัง สามารถกำจัดซีโอดีได้ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 10-15 วัน ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการบำบัดขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ช้าที่สุดในระบบบำบัดเพื่อให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสูงสุด ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการบำบัดนาน ทำให้การบำบัดด้วยวิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ พบว่าการบำบัดน้ำกากส่าในถังหมักชนิดอัตราการกำจัดต่ำที่ไม่มีการกวนผสมในถังปฏิกิริยาแบบถังเดียว มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้อยกว่าถังปฏิกิริยาที่มีการกวนผสม เช่นจากการงานวิจัยของ Kumar และคณะ (1997) ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัด น้ำกากส่าด้วยแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ซึ่งอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe ผลจากการศึกษาพบว่า สามารถลดค่าซีโอดีและความเข้มสีในน้ำกากส่าได้เพียง 57 และ 31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากการบำบัดเป็นเวลา 7 วัน

2) ระบบบำบัดแบบอัตราการย่อยสลายสูง (high rate anaerobic process)

เนื่องจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบธรรมดา (conventional anaerobic process) มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียไม่สูงมากนัก ต้องใช้เวลาในการบำบัดค่อนข้างนาน รวมทั้งขนาดของระบบบำบัดมีขนาดใหญ่ซึ่งอาจจะเป็นปัญหาสำหรับการบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณมากและมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูง ดังนั้น จึงมีการพัฒนาระบบบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยนำเทคโนโลยีและเครื่องจักรกลมาใช้ในระบบบำบัดมากขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดระยะเวลาในการบำบัด รวมทั้งสามารถลดขนาดของระบบบำบัดได้อีกด้วย ซึ่งมีหลักการง่ายๆ คือ การเพิ่มความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียหรือถังหมักให้สูงขึ้นรวมทั้งรักษาระดับความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ให้คงที่ โดยมีการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถตกตะกอนได้ดีหรือเกิดเป็นฟล็อก (floc) ได้ง่าย และมีการหมุนเวียนตะกอนของจุลินทรีย์กลับเข้าสู่ถังปฏิกิริยาเพื่อควบคุมความเข้มข้นให้คงที่ หรืออาจจะใช้ตัวกลางที่มีพื้นที่ผิวมากๆ มาเป็นที่ยึดเกาะสำหรับจุลินทรีย์เป็นแผ่นฟิล์ม (biofilm) เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในถังปฏิกิริยา รวมทั้งป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์หลุดออกจากถังปฏิกิริยาได้ง่าย นอกจากนี้ อาจจะมีการ

ควบคุมอัตราการปล่อยน้ำเสียเข้าสู่ระบบบำบัดหรือถังปฏิกิริยาให้เหมาะสม ซึ่งระบบบำบัดแบบอัตราการย่อยสลายสูงที่ใช้ในปัจจุบันมีอยู่หลายระบบ เช่น

2.1) ระบบบำบัดแบบไร้อากาศแบบ upflow anaerobic sludg blanket (UASB)

เป็นระบบบำบัดที่จุลินทรีย์แขวนลอยในถังปฏิกิริยา (Suspended growth system) ซึ่งสามารถใช้กับน้ำเสียของโรงงานทุกประเภท โดยจะสูบน้ำสียเข้าสู่ถังปฏิกิริยาทางด้านล่างในอัตราที่เหมาะสม เพื่อให้ตะกอนจุลินทรีย์ในถังหมักสามารถเกาะตัวกันแน่นเป็นเม็ด (granular biosludge) ซึ่งมีความหนาแน่นสูงมากอยู่รวมกันเป็นชั้นหนาทางด้านล่างของถังปฏิกิริยา เนื่องจากมีการใช้ตะกอนจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูงอยู่ตลอดเวลา และเป็นลักษณะตะกอนหนัก ซึ่งยากที่ตะกอนของจุลินทรีย์จะหลุดออกจากถังปฏิกิริยา โดยไม่ต้องมีการหมุนเวียนตะกอนจากถังตกตะกอนเข้าสู่ระบบบำบัดอีก ซึ่งจากงานวิจัยของ Fang และคณะ (1994) พบว่า ระบบบำบัดน้ำเสียแบบ UASB ขึ้นอยู่กับการรวมตัวของจุลินทรีย์เป็นตะกอนหนัก โดยเฉพาะเป็นระบบที่ไม่ต้องมีการกวนผสมและการหมุนเวียนตะกอนของจุลินทรีย์ (Akunna and Clark., 2000) โดยระบบสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอัตราภาระสารอินทรีย์และอุณหภูมิได้เป็นอย่างดี และเป็นระบบบำบัดที่มีขนาดกะทัดรัดกว่าการใช้ระบบบำบัดแบบธรรมดา (Syutsubo *et al.*, 1997) เมื่อศึกษาการใช้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบ UASB ในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ พบว่า พบว่า สามารถลดค่าซีโอดีและบีโอดีในน้ำเสียจากโรงงานกลั่นแอลกอฮอล์ได้เท่ากับ 90 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 วัน ตามลำดับ และสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ (Wolmarans and de Villiers, 2002) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Goodwin และ Stuart (1994) ซึ่งศึกษาการใช้ระบบ UASB ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตเบียร์ โดยสามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้ใกล้เคียงกันเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 7 วัน

2.2) ระบบบำบัดน้ำเสียแบบถังกรองไร้อากาศ (anaerobic filter)

เป็นระบบบำบัดที่ให้จุลินทรีย์หรือเมือกจุลินทรีย์ยึดเกาะบริเวณตัวกลาง (attached growth system) เพื่อเพิ่มปริมาณตะกอนของจุลินทรีย์และป้องกันการหลุดออกจากถังปฏิกิริยาซึ่งทำให้มีประสิทธิภาพในการบำบัดให้สูงขึ้น และเป็นระบบที่ไม่มีการหมุนเวียนตะกอนเช่นเดียวกับระบบบำบัดแบบ UASB โดยประสิทธิภาพในการบำบัดจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณตะกอนของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย ถังกรองไร้อากาศเป็นระบบที่เหมาะสมสำหรับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไม่มากนัก และพบว่าขนาดของถังปฏิกิริยามีขนาดเล็กกว่าถังปฏิกิริยาของระบบบำบัดแบบไร้อากาศอื่นๆ เนื่องจากความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียมีค่าสูงมาก เนื่องจากเป็นระบบที่ใช้ตัวกลางในการยึดเกาะของจุลินทรีย์ ดังนั้นการพิจารณาเลือกใช้ตัวกลางจึงมีความสำคัญโดยต้องเลือกใช้ตัวกลางที่มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง

เพื่อให้มีพื้นที่ในการเกาะของจุลินทรีย์มากที่สุด มีน้ำหนักเบา และมีความไวต่อปฏิกิริยาต่ำ ซึ่งถังกรองไร้อากาศสามารถแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ ถังกรองไร้อากาศแบบไหลขึ้น (upflow anaerobic filter) และถังกรองไร้อากาศแบบไหลลง (downflow anaerobic filter) ซึ่งแตกต่างกันที่ตำแหน่งของการป้อนน้ำเสีย แต่ถังกรองไร้อากาศแบบไหลลงมีข้อจำกัดคือ ต้องใช้กับน้ำเสียที่มีปริมาณสารแขวนลอยไม่มากนัก นอกจากนี้ อาจจะมีการนำน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วบางส่วนกลับเข้าสู่ถังกรองไร้อากาศทั้ง 2 แบบ อีกครั้ง ทั้งนี้เพื่อทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดดีขึ้น Vijayaraghavan และRamanujam (2000) รายงานว่า ถังกรองไร้อากาศมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดซีโอดีประมาณ 75-98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ตัวกลางสำหรับการยึดเกาะของจุลินทรีย์จำพวก polyurethane, granular activated carbon (GAC) และ polyvinyl chloride (PVC) โดยใช้ระยะเวลาในการบำบัดน้อยลงและสามารถทนต่อสารพิษรวมทั้งสภาวะที่มีปริมาณของสารอินทรีย์มากเกินไปได้เป็นอย่างดี โดย Tokuda และคณะ (1999) ศึกษาประสิทธิภาพของถังกรองไร้อากาศแบบไหลขึ้น (upflow anaerobic filter; UAF) ในการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตเบียร์ ซึ่งพบว่าสามารถลดค่าซีโอดีได้เท่ากับ 76 เปอร์เซ็นต์โดยอาศัยตัวกลางยึดเกาะสำหรับจุลินทรีย์ชนิดพิเศษ คือ ตัวกลางชนิด Pelia 4555, Herding GmbH, Germany ขณะที่ถังกรองไร้อากาศแบบไหลลง (downflow anaerobic filter; DAF) มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีได้เช่นเดียวกับถังกรองไร้อากาศแบบไหลขึ้น โดยสามารถลดค่าซีโอดีได้อยู่ในช่วง 55-85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ polyvinyl chloride (PVC) เป็นตัวกลางยึดเกาะสำหรับจุลินทรีย์ (Athanasopoulos, 1987)

1.2.4.2 การบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน

เนื่องจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนยังมีสารอินทรีย์ในปริมาณสูงและมีค่าความเข้มสีลดลงเล็กน้อย จึงไม่สามารถปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้โดยตรง ดังนั้น การบำบัดแบบใช้ออกซิเจนจึงมีความสำคัญในการบำบัดขั้นที่ 2 ซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัดสีและปริมาณสารอินทรีย์ที่เหลืออยู่ในรูปของซีโอดีและบีโอดี โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อรา และสาหร่าย ซึ่งสามารถใช้ในรูปของเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อผสม (Mohana *et al.*, 2009) ดังนี้

1) การบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยาโดยใช้แบคทีเรีย

เนื่องจากแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย จึงนิยมนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูงหลังจากผ่านกระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนมาแล้ว ซึ่งมีงานวิจัยต่างๆ ที่ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดสารอินทรีย์และความเข้มสีในน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ Kumar และคณะ (1997) พบว่า *Lactobacillus* sp. (facultative anaerobe) ที่คัดแยกได้จากบ่อหมักไร้อากาศ

ของโรงงานผลิตไวน์ มีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีและความเข้มสีในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตไวน์ได้เท่ากับ 57 และ 31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อไม่มีการปรับสภาวะใดๆ เชื้อผสมของแบคทีเรียในกลุ่ม Acetogenic bacteria สามารถกำจัดสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีและความเข้มสีในน้ำเสียกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ที่ใช้มันฝรั่งเป็นวัตถุดิบได้เท่ากับ 77 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Cibis *et al.*, 2002) ขณะที่การบำบัดน้ำกากส่าในสภาวะที่มีการเขย่าเท่ากับ 200 รอบ/นาที และเติมสารอาหารที่เหมาะสมโดยใช้ Acetogenic bacteria BP 103 พบว่า สามารถกำจัดสีดีขึ้นซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากับ 76.4 เปอร์เซ็นต์ (Sirianuntapiboon *et al.*, 2004) นอกจากนี้พบว่า มีหลายๆ งานวิจัยที่นำแบคทีเรียในรูปของเชื้อผสมมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียนอกเหนือจากการใช้ในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ เช่น Jain และคณะ (2002) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ จากน้ำกากส่าในระบบบำบัดแบบตะกอนเร่ง ประกอบด้วย *Xanthomonas fragairae, Bacillus megaterium* และ *Bacillus cereus* โดยเชื้อผสมของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถลดค่าซีโอดีและความเข้มสีในน้ำกากส่าอยู่ในช่วง 55-68 และ 38-58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีได้ดีกว่าเชื้อผสมของแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ที่คัดแยกจากน้ำกากส่าเช่นกัน ประกอบด้วย *Pseudomonas Enterobacter, Aeromonas, Stenotrophomonas, Acienetobacter* และ *Klebsiella* ซึ่งสามารถลดค่าซีโอดีได้เพียง 44 เปอร์เซ็นต์ (Ghosh *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Petruccioli และคณะ (2000) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตสุราโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่ยึดเกาะกับตัวกลางและแขวนลอยอยู่ภายในถังปฏิกิริยาซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย *Bacillus* และ *Pseudomonas* ผลจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียสามารถลดค่าซีโอดีได้ประมาณ 71.5 เปอร์เซ็นต์

2) การบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยาโดยใช้เชื้อรา

นอกจากการใช้แบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ในปริมาณสูงแล้ว พบว่า นักวิจัยได้มีการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบโดยใช้เชื้อราในกลุ่ม Basidiomyceyes และ Ascomycetes เช่นกัน ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการกำจัดสีและสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีและบีโอดีออกจากน้ำเสีย และอาจจะมีผลพลอยได้ที่มีประโยชน์เกิดขึ้นหลังจากการบำบัด เช่น สารเมตาบอไลท์จากเชื้อราไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์ วิตามิน หรือสารปฏิชีวนะต่างๆ และโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์ (single cell protien) ซึ่งเป็นอาหารสำหรับสัตว์ นอกจากนี้พบว่า เชื้อราที่มีเส้นใยทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พีเอช สารอาหาร และการเติมอากาศแต่สามารถเจริญเติบโตได้ช้ากว่าแบคทีเรีย (Knapp *et al.*, 2001) และปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่าย ซึ่งมีงานวิจัยต่างๆ ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำตาล

เป็นองค์ประกอบโดยใช้เชื้อรา เช่น Miranda และคณะ (1996) ใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* 180 ในการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ซึ่งใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารอาหาร ค่าพีเอช และแหล่งคาร์บอน ผลจากการศึกษาพบว่า เชื้อรา *Aspergillus niger* 180 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีเท่ากับ 69 เปอร์เซ็นต์ และ 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 10 และ 5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยความเข้มสีลดลงสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาล นอกจากนี้พบว่า สามารถกำจัดสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีได้ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยสามารถกำจัดซีโอดีได้ดีกว่าการใช้กากน้ำตาล ขณะที่ Chopra และคณะ (2004) ศึกษาการใช้เชื้อรา *Coriolus versicplor* ในการบำบัดน้ำกากส่า พบว่า เชื้อรามีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีและความเข้มสีในน้ำกากส่าประมาณ 53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเติมสารอาหารในรูปของกลูโคสและ peptone และพบว่ามีประสิทธิภาพในการบำบัดน้อยกว่างานวิจัยของ Kumar และคณะ (1998) ซึ่งใช้เชื้อรา *Coriolus hirsutus* ในการบำบัดน้ำกากส่าได้เช่นกัน โดยสามารถกำจัดซีโอดีและค่าความเข้มสีได้เท่ากับ 90 และ 71-75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของยีสต์ซึ่งเป็นเชื้อราเซลล์เดียว เนื่องจากสามารถเจริญได้รวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา มีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้น้อย และสามารถผลิตเซลล์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง (Friedrich, 2004) เช่น จากงานวิจัยของ Sirianuntapiboon และคณะ (2004) พบว่า ยีสต์ *Citeromyces* WR-43-6 สามารถกำจัดสีและสารอินทรีย์ออกจากน้ำเสียจากโรงงานผลิตสุราแสงโสม (น้ำกากส่า) ได้เป็นอย่างดีและมีประสิทธิภาพค่อนข้างคงที่ โดยสามารถลดค่าความเข้มสีและบีโอดีได้เท่ากับ 75 และ 76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหลังจากการบำบัด พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลงสอดคล้องกับค่าความเข้มสี เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนเตรต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 ขณะที่ Selim และคณะ (1991) และ Rajor และคณะ (2002) รายงานว่า ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำกากส่าดีกว่า *Citeromyces* WR-43-6 ซึ่งสามารถลดค่าความเข้มสีและซีโอดีได้เท่ากับ 82.7 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำกากส่าเท่ากับ 5 แต่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากในน้ำกากส่ามีปริมาณไนโตรเจนที่เพียงพอแล้ว นอกจากนี้ มีการใช้ยีสต์ในรูปของเชื้อผสมระหว่าง *Hansenula fabianii* และ *Hansenula anomala* ในการบำบัดน้ำกากส่าเช่นกัน แต่พบว่าเชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีได้เพียง 28.5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

1.2.5 การคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำเสียและแหล่งต่างๆ มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการจุลินทรีย์ที่มีความคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมนั้นๆ นำมาศึกษาคุณสมบัติจำเพาะที่ต้องการและใช้ในการบำบัดน้ำเสีย สุมาลี เหลืองสกุล และคณะ (2541) กล่าวว่า ที่ใดมีสารประกอบอยู่ที่นั่นย่อมต้องมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบนั้นด้วยเสมอ ยกตัวอย่างเช่น Malandra และคณะ. (2003) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์จากกระบวนผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นเชื้อตามธรรมชาติที่ติดมา กับอุ่นที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักประกอบด้วย แบคทีเรียและยีสต์จำนวน 8 และ 7 สายพันธุ์ ตามลำดับ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้น พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นเชื้อแกรมบวก รูปกลม ส่วนยีสต์เป็นเชื้อในกลุ่ม *Candida* sp., *Kloeckera* sp. และ *Saccharomyces* sp. ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ ถูกนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานสุราหรือน้ำทิ้งจากชุมชนซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนของน้ำมันสูงขึ้นเรื่อยๆ จนบ่อดักไขมันที่ติดตั้งไว้ตามบ้านเรือนไม่สามารถดักไขมันไว้ได้หมด งามนิจ นนทโส และคณะ (2540) จึงทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งชุมชนเพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและนำไปใช้ในการย่อยสลายน้ำเสียที่มีปริมาณไขมันสูง ขณะที่ Ertugrul และคณะ (2007) คัดแยก *Bacillus* sp. จากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มเพื่อนำมาศึกษา การผลิตเอนไซม์ไลเปส ขณะที่ประเทศปากีสถานมีการเก็บตัวอย่างน้ำจากโรงงานฟอกหนังมาคัดแยกโปรโตซัว (*Euplotes mutabilis*) เพื่อนำไปบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนัก (Rehman *et al.*, 2007) และสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้จากของเสียโรงงานผลิตเรซิน (Arutchelvan *et al.*, 2005) นอกจากนี้ ได้มีการแยกเชื้อ *Thiobacillus* sp. จากน้ำเสียชุมชนและน้ำเสียจากโรงงานผลิตยางพารา เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานยางแผ่น (Kantachote and Innuwat, 2004) นอกจากการคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำเสียแล้ว ยังสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้จากแหล่งอื่นๆ อีกด้วย เช่น Ohmomo และคณะ (2004) สามารถแยกเชื้อยีสต์ 205 สายพันธุ์ จากตัวอย่างผักและผลไม้ดอง ผักและผลไม้ เน่าเสีย โดยนำเชื้อที่คัดแยกมาได้มาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำกากส่าของโรงงานผลิตสุราแสงโสม และคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 จากอาหารหมักดองประเภทปลาร้าเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำกากส่าเช่นกัน (Sirianuntapipoon and Tondee, 2008)

1.2.6 ชนิดและคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับระบบบำบัดน้ำเสีย

1.2.6.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์เซลล์เดียวในกลุ่มโปรคาริโอต มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปแท่ง รูปกลม รูปเกลียว และเส้นใย การสืบพันธุ์พบได้ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ สามารถพบได้ทั่วๆ ไปไม่ว่าจะเป็นดิน น้ำ อากาศ มีทั้งชนิดที่ให้ประโยชน์และบางชนิดเป็นโทษ (บัญญัติ

สุขศรีงาม, 2532) การที่แบคทีเรียมีรูปร่างแตกต่างกันเป็นการปรับตัวให้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ดีขึ้น เช่น เซลล์รูปกลมทำให้รูปร่างคงทนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ดี แต่พวกที่มีรูปท่อนจะมีพื้นที่ผิวมากกว่าพวกที่มีรูปกลมจึงช่วยในการแลกเปลี่ยนสารอาหารกับสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าพวกที่มีรูปกลม และพวกที่มีรูปร่างบิดเป็นเกลียวเมื่อมีการเคลื่อนที่จะเคลื่อนในลักษณะตะปูควงหรือสว่านจึงไม่ค่อยมีแรงเสียดทานจากสิ่งแวดล้อมในขณะเคลื่อนที่ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) สำหรับลักษณะการดำรงชีวิตของแบคทีเรียสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2-1 เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การขาดแคลนอาหาร อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป ความเป็นกรด-ด่างสูงเกินไป ทำให้แบคทีเรียบางชนิดมีการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า เอนโดสปอร์ ซึ่งเป็นระยะพักตัวและหยุดการเจริญเติบโต หากสภาวะแวดล้อมไม่ขัดต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแล้ว อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารเท่านั้น (Metcalf and Eddy, 2004)

ตารางที่ 1-2 ลักษณะการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย

ปัจจัย	ลักษณะการดำรงชีวิต
ชนิดของเซลล์	โพรคาริโอต
pH ที่เหมาะสม	6.5-7.5
อุณหภูมิที่เหมาะสม	20-37 องศาเซลเซียส (มีโซไฟล์)
ความต้องการออกซิเจน	มีทั้งต้องการออกซิเจนจนถึงไม่ต้องการออกซิเจน
ความต้องการแสง	ต้องการสำหรับพวกที่สังเคราะห์แสงได้
ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ	0.5-1 เปอร์เซ็นต์
ความต้องการคาร์บอน	สารอนินทรีย์ และ/หรือสารอินทรีย์คาร์บอน
ความทนทานต่อสารปฏิชีวนะ	ทนต่อยากริซิโอฟูลวิน แต่ไวต่อยาเพนิซิลิน เตตราไซคลิน และคลอแรมเฟนิคอล

ที่มา: นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ (2547)

1.2.6.2 ยีสต์

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ (2547) กล่าวว่า ยีสต์เป็นเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย ขนาดของยีสต์แตกต่างกันตั้งแต่ความกว้าง 1-5 ไมโครเมตร และความยาว 5-30 ไมโครเมตร หรือมากกว่า มักมีรูปไข่แต่บางชนิดมีรูปร่างยาวและบางชนิดเป็นทรงกลม ยีสต์มีรูปร่างโดยเฉพาะในแต่ละชนิด แม้จะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ก็ยัง

มีความแตกต่างที่ขนาดและรูปร่างของแต่ละเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุและสภาพแวดล้อม การสืบพันธุ์ของยีสต์เป็นแบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งตัว (fission) เนื่องจากเป็นเซลล์เดียวจึงเจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าเชื้อราที่เป็นเส้นใย และมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่า เนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่าเชื้อรา ยีสต์มีปฏิกิริยาทางสรีรวิทยาแตกต่างกัน เช่นเดียวกับสัณฐานวิทยาและกลไกการสืบพันธุ์ เช่น ปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคส ซึ่งอาจเกิดในลักษณะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (กระบวนการหมัก) หรือแบบใช้ออกซิเจน (กระบวนการหายใจ) สำหรับกระบวนการที่เป็นแบบฉบับมากที่สุด คือ การย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน หรือกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งผลผลิตสุดท้ายจะได้เอทิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการที่ 4

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \quad (4)$$

ส่วนในสภาพที่มีออกซิเจนในกระบวนการหายใจจะเกิดการออกซิไดส์กลูโคสอย่างสมบูรณ์จนได้ผลิตภัณฑ์คือคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ถ้าเกิดออกซิเดชันไม่สมบูรณ์จะได้กรดและสารตัวกลางอื่นๆ ผลผลิตที่มีความสำคัญได้แก่ แอลกอฮอล์ กรด เอสเทอร์ กลีเซอรอล และอัลดีไฮด์ ก่อนที่ยีสต์จะเกิดกระบวนการหมักได้นั้น สารโมเลกุลใหญ่ เช่น ไดแซ็กคาไรด์ ไตรแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์จะต้องถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (hydrolase) โดยชนิดของเอนไซม์ไฮโดรเลส แตกต่างไปตามจีนัสและสปีชีส์ของยีสต์ซึ่งใช้คุณสมบัตินี้ในการแยกความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยีสต์ยังมีเอนไซม์อื่นๆ ที่ยีสต์สามารถผลิตได้ซึ่งมีความสำคัญทางการค้า เช่น แล็กเทส อินเวอร์เทส และคาตาเลส ในทำนองเดียวกัน ยังมีความแตกต่างของสารประกอบที่จะถูกย่อยสลายโดยกระบวนการหายใจของยีสต์แต่ละชนิด เช่น ยีสต์บางชนิดสามารถใช้น้ำตาลเพนโทส (D-xylose และ D-ribose) พอลิแซ็กคาไรด์ (แป้ง) น้ำตาลแอลกอฮอล์ (mannitol และ sorbitol) กรดอินทรีย์ เช่น กรดแล็กติก กรดอะซิติก กรดซิตริก และสารอินทรีย์อื่นๆ แตกต่างกันออกไป สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ยีสต์สามารถใช้ได้คือ ไนโตรเจนที่เป็นทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์โดยจะนำไปสร้างโปรตีนในเซลล์ และยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียไอออนได้ดี

นอกจากนี้พบว่า ความสามารถในการใช้ไนเตรต ไนไตรต์และการดึงหมู่อะมิโนออกจากกรดอะมิโน สามารถแยกความแตกต่างของยีสต์แต่ละสายพันธุ์หรือแต่ละสปีชีส์ได้ นอกจากความต้องการแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ยีสต์ยังต้องการซัลเฟอร์ซึ่งอาจอยู่ในรูปของซัลเฟต หรือสารอินทรีย์ซัลเฟอร์ เช่น ซีสเทอีน หรือเมทิโอนีน และแร่ธาตุอื่นๆ ที่ยีสต์ต้องการเพื่อการเจริญเติบโต ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม สำหรับสารที่ต้องการในปริมาณเล็กน้อย (trace elements) ได้แก่ โบรอน ทองแดง สังกะสี แมงกานีส เหล็ก

ไอโอดีน และโมลิบดีนัม ทั้งนี้เพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้มากที่สุด ยีสต์สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0 ถึง 47 องศาเซลเซียส บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ที่ 20–30 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ก่อโรคเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30 - 37 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปยีสต์เจริญดีที่สุดในอาหารที่มีความเป็นกรดระหว่าง pH 3.5 ถึง 3.8 ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ และมียีสต์บางกลุ่มเป็นพวกที่ชอบแรงดันออสโมซิสสูง (osmophilic yeast) สามารถเจริญอยู่ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูงๆ ได้โดยมีความชื้นจำกัด เช่น *Saccharomyces sp.* เป็นยีสต์ที่นิยมใช้ในการหมักแอลกอฮอล์โดยใช้สารตั้งต้นที่เป็นวัตถุดิบจำพวกน้ำตาล ได้แก่ กากน้ำตาล หัวผักกาดหวาน น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ซึ่งยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้รวดเร็วและทนต่อแอลกอฮอล์ความเข้มข้นสูงๆ ได้

การผลิตเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ เช่น การทำไวน์จะอาศัยยีสต์ *Saccharomyces ellipsoideus* ในการหมักซึ่งต้องมีความเข้มข้นของน้ำตาลก่อนการหมักประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ หรือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ทำขนมปังก็มีความสามารถในการหมักน้ำตาลเช่นกัน และเป็นเชื้อที่สามารถเจริญได้รวดเร็วอีกด้วย จากรายงานของ Siriauntapiboon และ Tondee (2000) พบว่า มีการพัฒนานำเชื้อยีสต์มาใช้แทนแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยาโดยเฉพาะน้ำเสียที่มีความสกปรกสูง เช่น น้ำเสียที่มีองค์ประกอบของไนโตรเจนในปริมาณสูง ขณะที่ *Candida utilis* เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลายชนิดและมีส่วนร่วมในกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล (pentose phosphate pathway) โดยสามารถเปลี่ยนน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของน้ำกากส่าให้เป็นชีวมวลเพื่อผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวซึ่งใช้เป็นอาหารให้สัตว์น้ำเนื่องจากมีกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูงซึ่งช่วยให้สัตว์น้ำมีความต้านทานโรคมากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำกากส่าได้อีกทางหนึ่ง (Lee *et al.*, 2001)

1.2.6.3 เชื้อรา

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตจัดอยู่ในกลุ่มของ Eucaryote เป็นพวกเฮเทอโรโทรฟซึ่งใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548) ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบแอโรบ (aerobe) และบางพวกเป็นแฟคัลเตตีฟแอนแอโรบ (facultative anaerobe) มีลักษณะที่ประกอบด้วยเซลล์หลายเซลล์เรียงตัวเป็นเส้นใย แต่จะมีบางชนิดที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ในกลุ่มของยีสต์ มีผนังเซลล์ประกอบด้วยเซลลูโลส หรือไคติน เส้นใยของราแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ส่วนที่ยึดเกาะอาหาร (vegetative mycelium) มีหน้าที่ดูดซึมอาหารที่ย่อยแล้วเพื่อนำไปเลี้ยงทัลลัสส่วนต่าง ๆ และส่วนที่ยื่นไปในอากาศ (reproductive mycelium) ทำหน้าที่สร้างสปอร์เพื่อการ

สำนักวิทยบริการการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

สืบพันธุ์ ราเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยสามารถเจริญอยู่ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมากๆ ได้ เช่น แยม เยลลี่ ซึ่งปกติความเข้มข้นขนาดนี้จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อสภาพความเป็นกรดได้กว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วย ตัวอย่างเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาล ได้แก่ *Penicillium* sp. *Aspergillus sp. Mucor* sp. และ *Rhizopus* sp. เป็นกลุ่มเชื้อราที่สามารถสังเคราะห์และขับเอนไซม์ออกจากเซลล์มาอยู่ในอาหาร ในทางอุตสาหกรรมสามารถเลี้ยงเชื้อราให้สร้างเอนไซม์ และทำให้เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ ซึ่งเอนไซม์จากเชื้อรากลุ่มนี้ เช่น อะมิเลส ซึ่งย่อยแป้งให้เป็นเดกซ์ทรินและน้ำตาลอินเวอร์เทสสามารถย่อยซูโครสให้เป็นกลูโคสและฟรุคโตส (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2547) สำหรับลักษณะการดำรงชีวิตของเชื้อราสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1-1 สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์ (2549) รายงานว่า จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีประโยชน์ในระบบบำบัดน้ำเสียเช่นกัน แม้ว่าจะมีความสำคัญน้อยกว่าแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์กลุ่มนี้เริ่มมีความสำคัญมากขึ้นไม่ว่าจะใช้เป็นตัวชี้วัดถึงสภาวะหรือประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสีย และมีการพัฒนานำมาใช้เป็นจุลินทรีย์สำคัญในระบบบำบัดน้ำเสียเพื่อย่อยสลายสิ่งสกปรกในน้ำเสียแทนแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น การนำเชื้อราหลายสายพันธุ์ไม่ว่าจะเป็น *Aspergillus nige, Aspergillus oryzae* และ *Rhizoctonia* sp. มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตสุราหรือแอลกอฮอล์โดยเฉพาะการบำบัดสีของน้ำกากส่า (molasses wastewater) เนื่องจากเชื้อราส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่า หากนำเชื้อรามาประยุกต์ใช้ในกระบบบำบัดน้ำเสียแล้วควรจะเป็นระบบบำบัดแบบเติมอากาศ

ตารางที่ 1-3 ลักษณะการดำรงชีวิตของเชื้อรา

ปัจจัย	ลักษณะการดำรงชีวิต
ชนิดของเซลล์	ยูคาริโอต
pH ที่เหมาะสม	3.8-5.6
อุณหภูมิที่เหมาะสม	22-30 องศาเซลเซียส (แซโพรไฟต์) 30-37 องศาเซลเซียส (ปรสิต)
ความต้องการออกซิเจน	ต้องการออกซิเจนแท้จริง บางพวกเป็นแฟคัลเตตีฟ
ความต้องการแสง	ไม่ต้องการ
ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ	4-5 เปอร์เซ็นต์
ความต้องการคาร์บอน	สารอินทรีย์คาร์บอน
ความทนทานต่อสารปฏิชีวนะ	ทนต่อเพนิซิลิน เตตราไซคลิน คลอแรมเฟนิคอล แต่ไวต่อยากริซิโอฟูลวินรา

ที่มา: นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ (2547)

1.2.7 จุลินทรีย์อีเอ็ม (Effective Microorganisms; EM)

เนื่องจากกระแสการต่อต้านการใช้สารเคมีปัจจุบันมีมากขึ้นทั้งในและต่างประเทศ และความหวาดกลัวสารพิษที่อาจตกค้างในอาหารและสภาพแวดล้อมที่เป็นอันตรายต่อตัวผู้ใช้ สาเหตุดังกล่าวก่อให้เกิดแรงกระตุ้นให้มีการศึกษาวิจัยทางชีววิธีในการกำจัดศัตรูพืชกันอย่างกว้างขวางนับตั้งแต่การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ในการกำจัดหนอน ไส้เดือนฝอยกำจัดหนอน และไวรัสเอ็นพีวี (Nucleopolyhedronvirus; NPV) กำจัดหนอน นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาหาเชื้อจุลินทรีย์เพื่อกำจัดโรคพืชต่างๆ เช่นกัน (เปรมปรี ณ สงขลา, 2337) จากแนวคิดดังกล่าวเป็นการใช้สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีอยู่ในธรรมชาติมาเป็นตัวควบคุมสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ก่อให้เกิดโทษแก่ผลผลิตทางการเกษตรเพื่อเป็นในการลดปริมาณการใช้สารเคมี ซึ่งจุลินทรีย์ที่เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการประยุกต์ใช้แนวความคิดนี้ คือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพหรือจุลินทรีย์อีเอ็ม

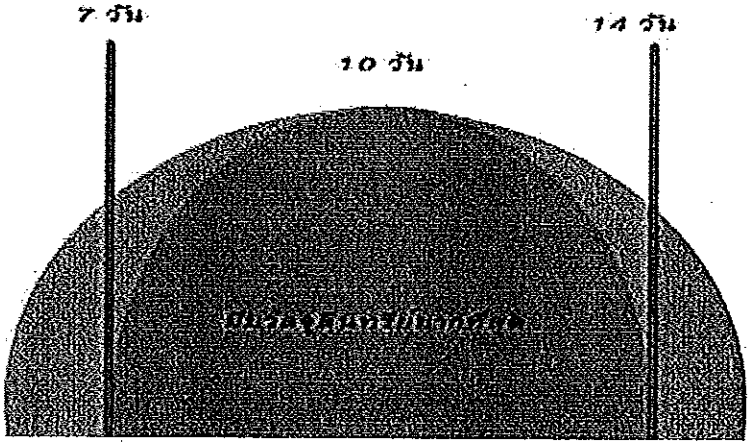
1.2.7.1 ลักษณะทั่วไปของอีเอ็ม

อีเอ็มเป็นของเหลวสีน้ำตาล กลิ่นหอมอมเปรี้ยวอมหวาน เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ต่างๆ ในอีเอ็ม เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งได้จากธรรมชาตินำมาเพาะเลี้ยงและขยายให้จุลินทรีย์แต่ละชนิดเพิ่มจำนวนด้วยปริมาณที่สมดุลกันด้วยเทคโนโลยีพิเศษโดยให้

อาหารจากธรรมชาติ เช่น น้ำตาล รำข้าว โปรตีน และสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ไม่สามารถใช้ร่วมกับสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อต่างๆ ได้ อีเอ็มเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เช่น คน สัตว์ พืช และแมลงที่เป็นประโยชน์ และยังช่วยปรับสภาพความสมดุลของสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทุกคนสามารถนำไปเพาะขยายเพื่อช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ได้ด้วยตนเอง นอกจากนี้ต้องเก็บรักษาในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมไม่ร้อนเกินไปหรือเย็นเกินไป (นิพล กุณฑล, 2549)

1.2.7.2 การขยายอีเอ็ม

ผู้ที่ได้เรียนรู้เรื่องอีเอ็มขยายในช่วงแรก ทำการผสมอัตราส่วนของ อีเอ็ม: กากน้ำตาล:น้ำ เท่ากับ 1: 1: 100 หมักไม่น้อยกว่า 6 ชั่วโมง - 3 วัน ขยายต่อได้ไม่เกิน 5 ครั้ง ต่อมาก็มีการปรับเปลี่ยนเป็น 1:1:50 ขยายต่อเนื่องได้ 3 ครั้ง ปัจจุบันตั้งแต่ ปี 2542 เป็นต้นมา มีการใช้อัตราส่วนในการขยายอีเอ็มเป็น 1: 1: 20 โดยไม่มีการขยายต่อซึ่งเทคนิคการใช้อีเอ็มจะเปลี่ยนตามผลการวิจัยของ (EM Research Organization; EMRO) ผลการวิจัยบ่งบอกว่า อัตราส่วน 1: 1: 20 ให้ผลดีที่สุดหรือมีประสิทธิภาพสูงสุด หากขยายต่ออีกจะทำให้จุลินทรีย์บางกลุ่มหายไปโดยเฉพาะกลุ่มจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่มีความสำคัญที่สุดด้วย เทคโนโลยีอีเอ็มจำเป็นต้องปรับเทคนิควิธีที่ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้น การขยายอีเอ็มในปัจจุบันนี้ คือ จะใช้ส่วนผสมของ อีเอ็ม: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1:1:20 และหมักเป็นระยะเวลา 7 วัน เนื่องจากมวลจุลินทรีย์จะมีความหนาแน่นมากที่สุดในเวลา 7 วัน (ภาพที่ 1-4) จากนั้นก็จะมีจำนวนลดลง ดังนั้น จึงมีคำแนะนำให้ใช้ระยะเวลาในการหมัก 7 วัน และต้องใช้ให้หมดภายใน วัน (http://www.emkyusei.com/index1.htm)



ภาพที่ 1-4 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักอีเอ็ม

ที่มา: http://www.emkyusei.com/index1.htm

1.2.7.3 จุลินทรีย์ในองค์ประกอบของอีเอ็ม

อีเอ็มที่นำไปใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันมีสูตรเดียวที่เรียกว่า อีเอ็มรวม หรือ ซุปเปอร์อีเอ็ม (Super EM หรือ EM 1) ซึ่งมีจุลินทรีย์เป็นองค์ประกอบที่ได้คัดและเลือกสรรมาอย่างดีแล้วจากธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศไทยหรือจากธนาคารจุลินทรีย์ มีองค์ประกอบดังนี้ (สุพรชัย มั่งมีสิทธิ์, 2547)

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มจุลินทรีย์เชื้อราที่มีเส้นใย (filamentous fungi) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งการย่อยสลายอินทรีย์สาร สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ในด้านอุตสาหกรรมใช้ทำอาหารบางชนิด เช่น การทำเนยแข็ง เป็นต้น มีคุณสมบัติต้านทานความร้อนได้ดี ปกติใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตเหล้า ผลิตปุ๋ยหมักโดยช่วยย่อยสลายอินทรียวัตถุให้มีอณูเล็กลงและรากพืชสามารถดูดไปใช้เป็นอาหารได้ง่าย กลุ่มเชื้อราที่สำคัญ ได้แก่ *Penicillium* spp. *Trichoderma* spp. และ *Aspergillus* spp.

- กลุ่มที่ 2 กลุ่มจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง (photosynthetic microorganisms) ทำหน้าที่สังเคราะห์สารอินทรีย์ให้แก่ดิน เช่น ธาตุไนโตรเจน (N), กรดอะมิโน (amino acid), น้ำตาล (sugar) สามารถบำบัดมลพิษในน้ำเสียที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมเป็นพิษต่าง ๆ นอกจากนั้นยังช่วยสร้างความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับจุลินทรีย์ *Azotobacter* spp. ด้วย ในการสังเคราะห์ธาตุไนโตรเจนในดิน กลุ่มจุลินทรีย์ที่สำคัญ เช่น *Chlorobium* spp., *Chromatium* spp. และ *Rhodospirillum* spp.

- กลุ่มที่ 3 กลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก (zymogenic or fermenting microorganisms) ทำหน้าที่เป็นตัวกระทำให้ดินเปลี่ยนสภาพต้านทานโรค (disease resistant) เข้าสู่วงจรในการย่อยสลายแบบหมัก และแบบสังเคราะห์ (fermentation and synthetic microorganisms) เป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยหมัก เป็นตัวกระตุ้น *Azotobacter* และ *Mycorhizae* ให้ทำงานได้ดีในดิน ช่วยลดการพังทลายของดิน ป้องกันโรคและแมลงศัตรูพืชบางชนิดของพืชและสัตว์ จุลินทรีย์หลัก ๆ ได้แก่ ray fungi (Actinomycetes), ยีสต์ (yeast) แบคทีเรีย เช่น *Streptomyces* spp. และพวกราหมักต่างๆ เช่น *Sacharomyces* spp.

- กลุ่มที่ 4 กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงธาตุไนโตรเจน (nitrogen-fixing microorganisms) มีทั้งพวกที่เป็นสาหร่าย (algae) และพวกแบคทีเรีย (bacteria) ทำหน้าที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศลงสู่ดิน ผลิตสารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น โปรตีน (protein), กรดอะมิโน (amino acids), กรดอินทรีย์ (organic acids), แป้ง (starch or carbohydrates), น้ำตาล (sugar), กรดไขมัน (fatty acids), ฮอร์โมน (hormones), และวิตามิน (vitamins) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้แก่ *Azotobacter spp.*, *Anabaena* spp. และ *Rhizobium* spp.

- กลุ่มที่ 5 กลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติค (lactic acids bacteria) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรียที่เป็นโทษ จุลินทรีย์พวกนี้ส่วนใหญ่เป็นพวกไม่ต้องการอากาศหายใจ (anaerobic microorganisms) ในสภาวะปกติทำหน้าที่เปลี่ยนสภาพดิน จากดินเน่าเปื่อยหรือดินก่อโรคให้กลายเป็นดินที่ต้านทานโรค ซึ่งช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชต่าง ๆ ให้มีจำนวนน้อยลงหรือให้หมดไป และสามารถทำให้อินทรียสารในดินมีประโยชน์มากขึ้นและอยู่ในสภาพไร้ออกซิเจนหรือสภาพไร้อากาศ นอกจากนั้นยังช่วยย่อยสลายเปลือกของเมล็ดพันธุ์พืช ช่วยให้เมล็ดงอกเร็วกว่าปกติอีกด้วย ส่วนใหญ่กว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยจุลินทรีย์แบคทีเรียจำพวก *Lactobacillus* spp. เป็นหลัก

1.2.7.4 การนำอีเอ็ม ไปใช้ประโยชน์

อนิวรรต เฉลิมพงษ์ (2537) อ้างถึงใน สุพรชัย มั่งมีสิทธิ์ (2547) กล่าวถึงประโยชน์ของกลุ่มจุลินทรีย์อีเอ็ม ดังนี้

- ด้านเกษตรกรรม

1) ช่วยปรับความเป็นกรด-ด่างในดินและน้ำ

2) ช่วยแก้ปัญหาแมลงศัตรู และโรคระบาดต่างๆ

3) ผสมน้ำและกากน้ำตาลเพื่อรดดินเพื่อช่วยปรับสภาพดินให้ร่วนซุย อุ้มน้ำ และอากาศผ่านได้ดี

4) ช่วยย่อยสลายอินทรียวัตถุ เพื่อให้เป็นอาหารแก่พืช พืชสามารถดูดซึมไปเป็นอาหารได้ดี ไม่ต้องใช้พลังงานมาก เหมือนกับการใช้ปุ๋ยเคมี

5) ช่วยสร้างฮอร์โมนพืช ทำให้ได้ผลผลิตสูงและคุณภาพดี

6) ช่วยกำจัดกลิ่นเหม็นในฟาร์มปศุสัตว์

7) ช่วยกำจัดน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ เช่น ปศุสัตว์ บ้านเรือน โรงงานอุตสาหกรรม

8) ช่วยกำจัดแมลงวัน โดยตัดวงจรชีวิตของแมลงวัน ไม่ให้เข้าดักแด้

9) ใช้ผสมน้ำรดพืชผัก และต้นไม้ ทำให้พืชผักเจริญเติบโตงอกงาม และได้ผลผลิตมากมีคุณภาพดี

10) ใช้ผสมน้ำแช่เมล็ดพันธุ์ทำให้อัตราการงอกของเมล็ดดีและช่วยป้องกันโรคที่เกิดจากแมลง

- ด้านการประมง

1) ช่วยควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำได้

2) แก้ปัญหาโรคพยาธิในน้ำ ซึ่งเป็นอันตรายต่อกุ้ง ปลา กบ หรือสัตว์น้ำ

3) ช่วยลดปริมาณขี้เลนในบ่อ และทำให้เลนไม่เน่าเหม็น สามารถนำไปผสมเป็นปุ๋ยหมักใช้กับพืชต่างๆ ได้

- ด้านสิ่งแวดล้อม

1) ช่วยปรับสภาพเศษอาหารจากครัวเรือน ให้กลายเป็นปุ๋ยที่มีประโยชน์ต่อพืชผัก

2) ช่วยปรับสภาพน้ำเสียจากอาคารบ้านเรือน โรงงาน โรงแรมหรือแหล่งน้ำเสีย

3) ช่วยดับกลิ่นเหม็นจากกองขยะที่หมักมานาน

1.2.7.5 การเก็บรักษาอีเอ็ม (สุพรชัย มั่งมีสิทธิ์, 2547)

จุลินทรีย์อีเอ็มเป็นสิ่งมีชีวิต จึงมีข้อพึงระวังในการใช้และเก็บรักษาเพื่อให้ผลการใช้เต็มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ มีวิธีการเก็บรักษาดังนี้ คือ

1) สามารถเก็บรักษาได้นานประมาณ 1 ปี หรืออย่างน้อย 6 เดือน ในกรณีที่ยังไม่เปิดฝาทั้งสองชั้นของภาชนะที่ใช้บรรจุ เก็บในอุณหภูมิปกติไม่เกิน 45-50 องศาเซลเซียส อย่าเก็บไว้ในตู้เย็น

2) ทุกครั้งที่แบ่งใช้ต้องรีบปิดฝาให้สนิท

3) การนำจุลินทรีย์อีเอ็มไปขยายต่อ ควรใช้ภาชนะที่สะอาด และใช้ให้หมดภายในเวลาที่เหมาะสม

4) การเก็บไว้หลาย ๆ วัน โดยไม่มีการเคลื่อนไหว ในภาชนะจะมีฝ้าขาวเหนือผิวน้ำ นั่นคือการทำงานของจุลินทรีย์ที่พักตัว เมื่อเขย่าแล้วทิ้งไว้ชั่วขณะ ฝ้าสีขาวจะสลายตัวกลับไปอยู่ในจุลินทรีย์เหมือนเดิม

5) เมื่อนำไปขยายเชื้อในน้ำและกากน้ำตาล จุลินทรีย์จะมีกลิ่นหอมและเป็นฟองสีขาว ๆ ภายใน 2-3 วัน ถ้าไม่มีฟองดังกล่าวแสดงว่าการหมักขยายเชื้อยังไม่ได้ผล

6) จุลินทรีย์อีเอ็ม เมื่อนำไปขยายเชื้อแล้ว ควรใช้ภายใน 7 วันหลังจากที่หมักได้ที่แล้ว ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเสื่อมคุณภาพที่อาจเกิดขึ้นจากความไม่สะอาดของน้ำ ภาชนะ และสิ่งแปลกปลอมจากอากาศ เพราะจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่ต้องการอากาศ

7) ถ้าใช้ไม่หมดภายใน 3 วัน ต้องปิดฝาให้สนิทด้วยพลาสติก เพื่อไม่ให้อากาศเข้า ก่อนใช้ทุกครั้งต้องตรวจดูก่อนว่ายังมีกลิ่นหอมอมเปรี้ยวหรือไม่ ถ้ามีแสดงว่ายังใช้ได้

1.2.7.6 ตัวอย่างงานวิจัยที่นำจุลินทรีย์อีเอ็มมาใช้ประโยชน์

อรุณวรรณ และคณะ (2539) พบว่า อีเอ็มมีเป็นสารยับยั้งการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยเชื้อ *Proteus vulgaris* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในดิน น้ำเสีย กองขยะ และมีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Peptone Iron Agar (PI) และใส่สารทดสอบแต่ละชนิดด้วยขนาดความเจือจางต่างๆ กัน พบว่า อีเอ็มที่เพาะขยายและ

สารละลายน้ำตาลหมักมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งมากที่สุด รองลงมาเป็นอีเอ็มหัวเชื้อ ส่วนสารละลายกากน้ำตาลไม่ฆ่าเชื้อและสารละลายกากน้ำตาลฆ่าเชื้อไม่มีฤทธิ์การยับยั้ง และมีรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์อีเอ็มในการบำบัดน้ำเสียจากครัวเรือน โรงแรม โรงพยาบาล ภัตตาคาร และร้านอาหาร โดยเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ทั่วๆ ไป ที่อยู่ในธรรมชาติโดยใช้น้ำเสีย 3 ชนิด เป็นตัวแทนน้ำเสียต่างๆ ได้แก่ น้ำทิ้งจากชุมชน น้ำเสียเทียมจากเทศบาล และน้ำเสียเทียมแป้ง ทำการทดลองในระบบเบ็ดเสร็จ ผลจากการศึกษาพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ในอีเอ็มสามารถเจริญในน้ำเสียได้ทุกชนิดและลดค่าซีโอดี ไนโตรเจน และฟอสเฟตได้ แต่มีประสิทธิภาพไม่ได้ดีกว่าเชื้อผสมของจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีอยู่ในแหล่งที่มาของน้ำเสียชนิดนั้นๆ

นอกจากนี้ มีการศึกษาการใช้อีเอ็มเพื่อบำบัดน้ำเสียของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์บริเวณหลังที่ทำการไปรษณีย์ในช่วงเดือนมกราคม 2542 ถึงเดือนเมษายน 2548 ซึ่งน้ำเสียมีแหล่งที่มาจากหอพักนักศึกษา โรงอาหาร ธนาคารไทยพาณิชย์ เป็นต้น โดยเติมอีเอ็มในบ่อบำบัดสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ผลจากการศึกษาพบว่า น้ำเสียมีค่าบีโอดีลดลงจาก 41.22 มิลลิกรัม/ลิตร เป็น 9.57 มิลลิกรัม/ลิตร หรือมีประสิทธิภาพเท่ากับ 76.77 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ของแข็งแขวนลอยลดลงเช่นกันจาก 72.65 เป็น 23.92 มิลลิกรัม/ลิตร หรือลดลงเท่ากับ 67.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดมีค่าบีโอดีและของแข็งแขวนลอยต่ำกว่าระดับมาตรฐานที่กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมกำหนดไว้ (นิพล กุลฑล, 2549)

1.2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการบำบัดน้ำเสียของจุลินทรีย์

1.2.8.1 ปัจจัยทางโภชนาการ

- แหล่งพลังงาน

จุลินทรีย์แต่ละได้พลังงานในการดำรงชีวิตมาจากแหล่งต่างๆ กัน จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้จะได้พลังงานมาจากแสง ในขณะที่จุลินทรีย์พวก chemoorganotroph จะได้พลังงานจากการออกซิไดส์สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร และจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นพวก chemoorganotroph ซึ่งโดยทั่วไปจะได้พลังงานจากสารประกอบคาร์บอน เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังอาจใช้มีเทนหรือเมธานอล เป็นแหล่งพลังงานได้อีกด้วย (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548)

- แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในสร้างเซลล์ (สมใจ ศิริโภค, 2547) โดยแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ต้องการมี 2 แหล่ง

ด้วยกัน คือ สารอนินทรีย์และอินทรีย์คาร์บอน สำหรับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งอนินทรีย์คาร์บอนสำหรับพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางกลุ่ม ส่วนสารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ และพบว่าธาตุคาร์บอนจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการทำหน้าที่ของเซลล์ เนื่องจากเป็นธาตุโครงสร้างหลักๆ ในองค์ประกอบของเซลล์ (ดวงพร คันธโชติ, 2545) โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม autotroph ต้องการก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเปลี่ยนเป็นคาร์โบไฮเดรต ในขณะที่พวก heterotroph ต้องการแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารอินทรีย์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

มีรายงานการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อยีสต์ *Citeromyces* sp. WR-43-6 ผลจากการทดสอบ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลได้หลายชนิด เช่น กลูโคส, ซูโครส, มอลโทส และแลคโทส ได้เป็นอย่างดี และเมื่อศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำกากส่า พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับยีสต์ *Citeromyces* sp. WR-43-6 คือ น้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ (Sirianuntapiboon *et al.*, 2004) สำหรับยีสต์ *Issatchenkia orientalis* สามารถเจริญเติบโตได้และมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำกากส่าได้ดีเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสหรือฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (Tondee *et al.*, 2007) ในขณะที่ Lee และ Kim (2001) ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์ *Candida utilis* เพื่อใช้เป็นอาหารของสัตว์น้ำโดยเลี้ยงยีสต์ในสารละลายกากน้ำตาล ผลจากการศึกษาพบว่า การเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ทำให้ยีสต์ *Candida utilis* มีปริมาณมวลชีวภาพสูงสุด และพบว่ายังสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำกากส่าได้อีกทางหนึ่งซึ่งสามารถลดค่าซีโอดีได้เท่ากับ 68.39 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน คือ *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 โดยสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตน้ำกากส่าและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีได้เท่ากับ 68.12 เปอร์เซ็นต์ (Tondee and Sirianuntapiboon, 2008) นอกจากนี้ Benito และคณะ (1996) รายงานว่า เชื้อรา *Aspergillus niger* สามารถบำบัดน้ำกากส่าในรูปของซีโอดี บีโอดีและความเข้มสีได้ดีที่สุดเท่ากับ 72.16, 70.05 และ 69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำกากส่าดีกว่าการใช้กากน้ำตาล

- แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการไนโตรเจนแตกต่างกันออกไป แต่เมื่อจุลินทรีย์ อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดสารอาหารจะทำให้ความสามารถของจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียน้อยลง เนื่องจากน้ำเสียจากอุตสาหกรรมบางประเภทมีปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอต่อความ

ต้องการของจุลินทรีย์ เช่น น้ำเสียจากโรงงานแป้บซี่-โคล่า โรงงานน้ำตาล และโรงงานมันสำปะหลัง เป็นต้น (เฉลา ศรีทวี, 2535) และในกรณีที่น้ำเสียขาดแคลนสารอาหารต้องมีการเติมสารอาหารตามความเหมาะสม โดยจุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ สำหรับแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียมและไนเตรท เป็นต้น ซึ่งแอมโมเนียอาจใช้ในรูปแก๊สหรือสารละลายแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 แต่มีข้อจำกัดคือ แอมโมเนียเป็นแก๊สที่อันตรายเนื่องจากสามารถระเหยได้ง่าย ดังนั้นจึงต้องเก็บในภาชนะที่ป้องกันการระเหยและทนต่อการกัดกร่อนได้เป็นอย่างดี สำหรับเกลือแอมโมเนียมที่มีราคาถูกที่สุด คือ แอมโมเนียมซัลเฟตจึงเป็นที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม (สมใจ ศิริโภค, 2547) และยังได้อิออนของซัลเฟตเพิ่มเติมจาก $(NH_4)_2SO_4$ อีกด้วย (พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545) โดยปกติแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไปและจะเกิด SO_4^{-2} ขึ้น แต่ในทางตรงข้ามการใช้แอมโมเนียและไนเตรทจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะที่เป็น แต่ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์อาจใช้ในรูปของกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปจุลินทรีย์สามารถเจริญในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่สามารถนำไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ไปใช้ได้ทั้งหมดโดยสามารถใช้ได้เพียง 30-70 เปอร์เซ็นต์ และขึ้นอยู่กับลักษณะของน้ำเสียด้วย โดยสารอินทรีย์ไนโตรเจนจะไม่เป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์จนกว่าจะถูกย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เป็น alkanolamine และกรดอะมิโน (เฉลา ศรีทวี, 2535) แต่สำหรับแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น *Lactobacillus hilgardii W-NS* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์โดยเฉพาะ peptone และ yeast extract ได้ดีกว่าสารอนินทรีย์ (Ohmomo *et al.*, 1998) และวัตถุดิบที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ กากถั่วเหลือง fish meal casein และ yeast extract เป็นต้น (สมใจ ศิริโภค, 2547) นอกจากนี้พบว่า จุลินทรีย์สามารถใช้ yeast extract, peptone, tryptone และกากถั่วเหลือง เป็นแหล่งสารอินทรีย์ไนโตรเจนได้ดี ขณะที่จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นกรด อะมิโนแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์อื่นๆ ที่อาศัยอยู่ร่วมกันสามารถนำไปใช้ได้ และมีจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้เอง ประกอบด้วย *Azotobacte, Rhizobium* และ *Clostridium* โดยทำหน้าที่ในการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้กลายเป็นอินทรีย์ไนโตรเจน (สุมาลี เหลืองสกุล และคณะ, 2542)

Tondee และคณะ (2007) รายงานว่า แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำกากส่า และการเติมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบพวกเกลือแอมโมเนียม เช่น NH_4Cl และ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีและ

สารอินทรีย์ในรูปซีโอดีและบีโอดีได้สูงสุดเท่ากับ 91.2, 80 และ 77.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์โดยเฉพาะ yeast extract ไม่เหมาะสมสำหรับยีสต์ *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246 ส่วนยีสต์ *Citeromyces* sp. WR-43-6 มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตสุราแสงโสมได้ดีที่สุด เมื่อใช้ $NaNO_3$ ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน (Sirianuntapiboon *et al.*, 2004) ในขณะที่ Tondee และ Sirianuntapiboon (2008) พบว่า แบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 สามารถลดค่าความเข้มสีในน้ำกากส่าได้มากที่สุดเท่ากับ 68.12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ yeast extract ปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน นอกจากนี้มีการใช้ยูเรียเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ปริมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์ *Candida utilis* โดยเลี้ยงเชื้อในสารละลายกากน้ำตาล (Kim and Lee, 2001)

- แร่ธาตุชนิดอื่นๆ

แร่ธาตุชนิดอื่น ๆ ที่นิยมเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Mg, P ,K, S, Ca และ Cl ซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งจุลินทรีย์มักจะได้รับแร่ธาตุเหล่านี้จากสภาพแวดล้อมในขยะหรือน้ำเสียที่มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์แล้ว (ธีระ เกรอต, 2539) นอกจากนี้ยังมี trace element ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น Co, Cu, Fe, Mn, Mo และ Zn แต่โดยทั่วไปมักจะพบธาตุเหล่านี้อยู่ในวัตถุดิบที่ปนเปื้อนมากับน้ำเสียแล้วเช่นกัน โดยเฉพาะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ (Jimenez *et al.*, 2003)

แต่มีงานวิจัยส่วนหนึ่งที่ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ จุลินทรีย์เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียโดยการเติมธาตุอาหารบางอย่างลงในน้ำกากส่า ได้แก่ โพแทสเซียมฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท โดยการใช้ชนิดและปริมาณของธาตุอาหารที่แตกต่างกันจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำกากส่า และผลจากการศึกษาพบว่า โพแทสเซียมฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีและลดค่าซีโอดีของเชื้อรา *Aspergillus niger* เพิ่มขึ้นจาก 25 เป็น 68 เปอร์เซ็นต์ และ 48 เป็น 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่การใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีเพิ่มขึ้นจาก 40 เป็น 68 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดค่าซีโอดีได้อยู่ในช่วง 65-70 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากน้ำกากส่าที่ใช้ในการทดลองมีองค์ประกอบของแอมโมเนียมไนเตรตอยู่แล้วซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง 1-1.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งเปลี่ยนรูปมาจากสารอินทรีย์ไนโตรเจน แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเป็น 1.8 กรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีจาก 34 เป็น 68.5 เปอร์เซ็นต์ (Benito *et al.*, 1996) และการบำบัดน้ำกากส่าโดยใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 พบว่า นอกเหนือจากการเติมแหล่ง

ไนโตรเจนแล้ว ผู้วิจัยได้มีการเติมแร่ธาตุชนิดอื่นๆ อีกด้วย คือ KH_2PO_4 และ $MgSO_4$ ในปริมาณ 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่การบำบัดน้ำกากส่าโดยใช้ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246 และ *Citeromyces* sp. WR-43-6 มีการเติม KH_2PO_4 ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เช่นกันแต่ไม่มีการเติม $MgSO_4$ (Tondee *et al.*, 2007; Sirianuntapiboon *et al.*, 2004)

1.2.8.2 ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อม

- อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่มีผลต่ออัตราการเจริญและการตายของจุลินทรีย์ เพราะอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์และรูปแบบโครงสร้างสามมิติของโปรตีน จึงมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด อุณหภูมิที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด ถึงแม้จะเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่มาจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันก็มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกันด้วย ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ และในที่สุดทำให้จุลินทรีย์ตายเนื่องจากเมตาบอลิซึมหยุดทำงาน (ดวงพร คันธโชติ, 2545) นอกจากนี้พบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในขยะหรือน้ำเสียจะเป็นพวก mesophile และ thermophile โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตแตกต่างกันซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) และสามารถแบ่งจุลินทรีย์ตามช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้ดีออกเป็น 3 กลุ่ม (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

- ออกซิเจน

ความต้องการออกซิเจนขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน (aerobic microorganisms) มีความต้องการออกซิเจนเพื่อใช้สร้างพลังงาน เนื่องจากไม่สามารถสร้างพลังงานโดยกระบวนการหมักได้ จึงถือว่าเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนอย่างแท้จริง เช่น *Bacillus, Pseudomonas* และจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราเป็นต้น กลุ่มที่ 2 คือ จุลินทรีย์ที่เจริญในที่มีออกซิเจนหรือไม่มีก็ได้ (facultative microorganisms) จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถสร้างพลังงานได้จากกระบวนการหายใจหรือกระบวนการหมัก และไม่จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการสังเคราะห์ต่าง ๆ เช่น *Escherichia,Proteus* และ *Enterobacter* เป็นต้น กลุ่มที่ 3 คือ จุลินทรีย์ที่เจริญในที่มีออกซิเจนน้อย (microaerophilic microorganisms) พวกนี้มีความต้องการออกซิเจนน้อยกว่า 0.2 บรรยากาศ เนื่องจากออกซิเจนอาจจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์เหล่านั้น เช่น *Lactobacillus, Neisseria* เป็นต้น และกลุ่มที่ 4 คือ จุลินทรีย์ที่เจริญในที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic microorganisms) เนื่องจากออกซิเจนจะรวมตัวกับน้ำเป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์คาตาเลส เช่น

Clostridium Methanobacterium Fusobacterium เป็นต้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

- ความเป็นกรด-ด่าง

วัตถุประสงค์ของการควบคุมสภาวะความเป็นกรด-ด่างในถังปฏิกิริยาคือการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการบำบัดน้ำเสียสามารถเจริญเติบโตได้ดีและเป็นการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการให้มีในระบบบำบัดน้ำเสียหยุดหรือลดการเจริญเติบโต (สมใจ ศิริโภค, 2547) โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจิญได้ดีในช่วงพีเอชต่างกัน โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 สำหรับเชื้อราส่วนใหญ่และยีสต์เจริญได้ที่พีเอชต่ำและค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 5 แต่อาจเจริญได้ที่พีเอชมากกว่า 7 ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีทเจริญได้ดีที่พีเอชเป็นด่างประมาณ 8 นอกจากนี้พบว่า พีเอชจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์ คือ เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารไปนานๆ จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเปลี่ยนไป เนื่องจากจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีจะปล่อยสารบางอย่างออกมาซึ่งอาจจะเป็นฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง ทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไป และไปขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย ดังนั้น ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจำเป็นต้องใส่สารบางอย่างซึ่งจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ในการช่วยต้านทานการเปลี่ยนค่าพีเอช สำหรับสารทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ได้แก่ KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 เป็นต้น (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2549)

- แรงดันออสโมติก

กระบวนการออสโมติกเกิดขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารในสารละลายที่อยู่ภายในเซลล์และนอกเซลล์ไม่เท่ากัน ทำให้เกิดแรงดันออสโมติก สารละลายที่มีแรงดันออสโมติกสูงกว่าภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ เรียกว่า สารละลายไฮเพอร์ทอนิก (hypertonic solution) ส่วนสารละลายที่มีแรงดันออสโมติกต่ำกว่า เรียกว่า ไฮโพทอนิก (hypotonic solution) โดยแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถปรับตัวให้ทนอยู่ในสภาพที่มีแรงดันออสโมติกสูงๆ ได้ (ธีระ เกรอต, 2539)

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.3.1 เพื่อคัดเลือกและเทียบเคียงจุลินทรีย์ที่มีปรื้องต้นะสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสเพื่อใช้ในการบำบัดเบื้องต้นสำหรับน้ำอัดลมหมดอายุ

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็ม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

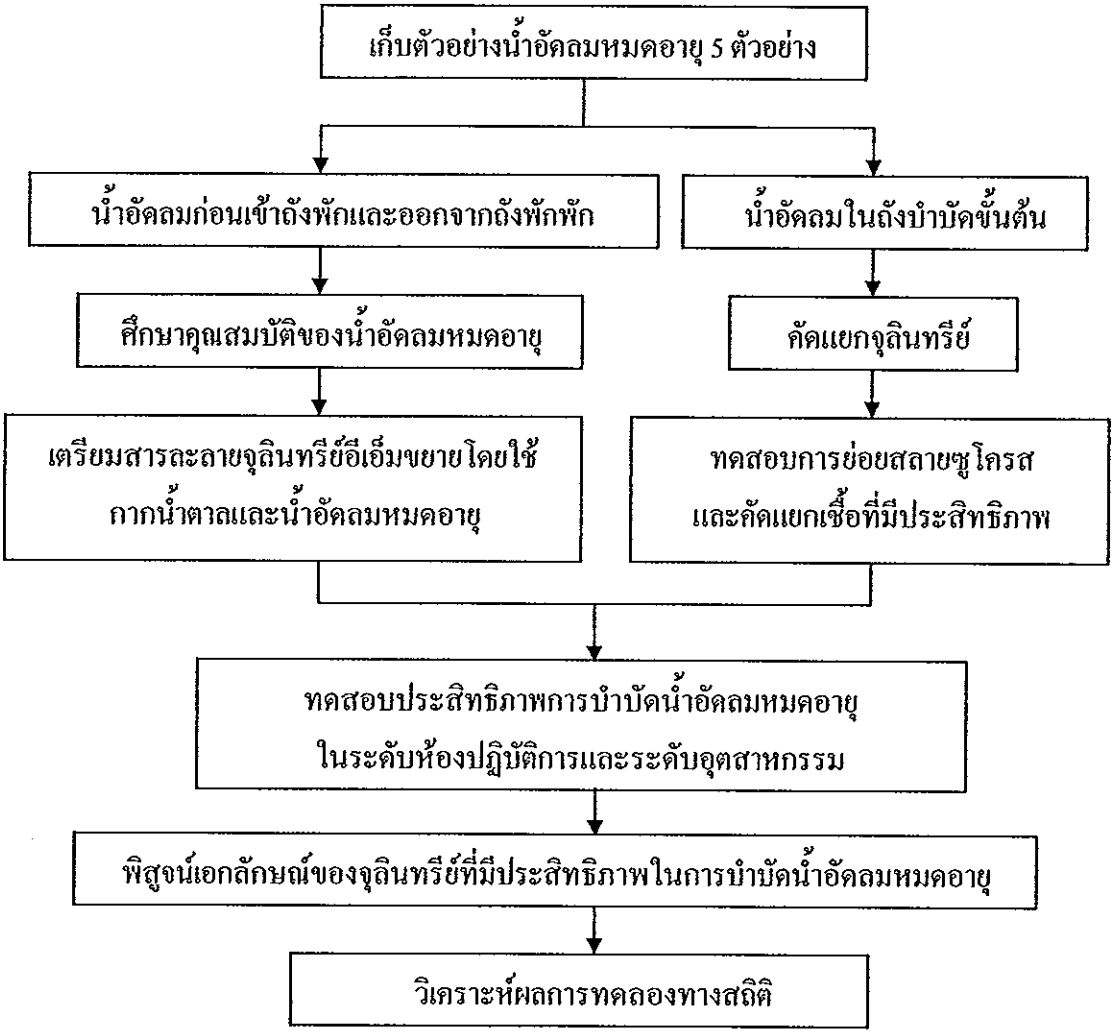
1.4.1 ทราบถึงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดแยก และน้ำหมักอีเอ็มในการบำบัดเบื้องต้นสำหรับน้ำอัดลมหมดอายุ รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัด

1.4.2 ใช้น้ำอัดลมหมดอายุส่วนหนึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตอีเอ็มขยายเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียหรือกิจกรรมอื่นๆ ของโรงงาน

1.4.3 บริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลมสามารถนำข้อมูลจากการศึกษาไปใช้ออกแบบถังบำบัดเบื้องต้นเพื่อใช้แก้ปัญหาการสะสมของน้ำอัดลมหมดอายุ โดยเฉพาะเมื่อน้ำอัดลมหมดอายุเข้าสู่โรงงานในปริมาณมาก รวมทั้งอาจใช้น้ำอัดลมหมดอายุส่วนหนึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตอีเอ็มขยายเพื่อใช้ในการช่วยในการบำบัดน้ำเสียหรือกิจกรรมอื่น ๆ ของโรงงานต่อไป

1.5 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้น้ำอัดลมหมดอายุจาก บริษัท หาดทิพย์ จำกัด (มหาชน) นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียในระบบจำลองโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาจากถังบำบัดขั้นต้นเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็ม และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ ผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นความรู้ที่สามารถนำไปใช้ขยายผลการศึกษาในระดับอุตสาหกรรม เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงระบบการจัดการน้ำอัดลมหมดอายุต่อไป ตามกรอบแนวคิดการวิจัย (ภาพที่ 1-5)



ภาพที่ 1-5 กรอบแนวคิดการวิจัย

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

2.1.1 น้ำเสีย (wastewater) เป็นน้ำอัดลมหมดอายุของบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน)ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 เก็บจากขวดบรรจุภัณฑ์ (ยังไม่ผ่านการบำบัด) ประกอบด้วย น้ำโค้ก น้ำสไปรท์ น้ำเขียว น้ำส้ม และน้ำแดง โดยนำตัวอย่างแต่ละชนิดมาผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน และส่วนที่ 2 เก็บบริเวณปลายท่อของถังบำบัดขั้นต้น (ผ่านการบำบัด) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง)

2.1.2 หัวเชื้อจุลินทรีย์ (inoculum) คัดแยกจากถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้นของบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน) และอีเอ็มจากการขยายโดยใช้กากน้ำตาลและน้ำอัดลมหมดอายุ

2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มรา และยีสต์ Plate count agar (PCA) สำหรับกลุ่มแบคทีเรียทั่วไป Glucose Yeast Extract Malt Extract (GYM) สำหรับแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท Deman Rogosa and Sharpe Agar (MRS AGAR) สำหรับแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลลัส และอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้างต้นที่เตรียมเป็นอาหารเหลวซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบแทนน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบเดิม

2.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาล ซีโอดี บีโอดี และปริมาณกรดไขมันระเหยง่าย

2.1.5 เครื่องมือ

1) เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

2) แก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography-Flame Ionization Detector; GC-FID)

3) สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer)

4) High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

5) ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

6) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

7) เครื่องกวนผสม

8) เครื่องเขย่า (rotary shaker)

2.1.6 อุปกรณ์

1) ถังบำบัดขนาด 8 ลิตร
2) อุปกรณ์ที่ใช้ในการ spread plate และ pour plate
3) anaerobic jar
4) เทอร์โมมิเตอร์
5) Ebulliometer

2.2 วิธีการวิเคราะห์

ตารางที่ 2-1 วิธีการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ของน้ำอัดลมหมดอายุ

ค่าพารามิเตอร์	การวิเคราะห์	อ้างอิง
น้ำตาลทั้งหมด	phenol sulfuric acid total sugar method	Dubois *et al.* (1956) อ้างถึงใน ดวงพร คันธโชติ และคณะ (2548)
น้ำตาลซูโครส	Agilent 1100 series HPLC (Reverse phase high performance liquid chromatography)*	Milandra *et al.* (2003)
ซีโอดี	closed reflux, titrimetric method	APHA, AWWA and WEF (2005)
บีโอดี	azide modification of Winkler method	APHA, AWWA and WEF (2005)
ไนโตรเจนทั้งหมด	CE Instruments Flash 1112 Series EA N/Protein Analyzer (Dynamic Flash Combustion)**	Jimenez *et al.* (2004)
ความเข้มสี	UV-Visible Spectrophotometer at 480 nm	APHA, AWWA and WEF (2005)

ตารางที่ 2-1 วิธีการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ของน้ำอัดลมหมดอายุ (ต่อ)

ค่าพารามิเตอร์	การวิเคราะห์	อ้างอิง
เอทานอล	Ebulliometer	คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม (2549)
กรดไขมันระเหยง่าย (VFA)	HP 6890 Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (Gas Chromatography)***	Aharya *et al.* (2008)
พีเอช	pH meter	APHA, AWWA and WEF (2005)

หมายเหตุ * สภาวะการทดสอบ: column (Zorbax Carbohydrate 4.6*150 min, 5 μm), flow rate (0.5 mL/min, temperature 35 °C), mobile phase (acetronitrile: water เท่ากับ 75:25), detector (refractive index detector) และ injection volume (10 μl)

** สภาวะการทดสอบ: left furnance temp (900 ° C), right furnance temp (680 °C) oven temperature (50 °C), carrier flow (140 mL/min), reference flow (100 mL/min) และ oxygen flow (300 mL/min)

*** สภาวะการทดสอบ: inlet temperature (240 °C), oven temp (60 °C) ramp to 100 ° C at 4 ° C/min hold for 2 minutes, ramp to 230 ° C at 15 ° C/min hold for 5 minutes, detector temp (280 ° C) และ column (HP-INNOWax 30 m × 250 μm × 0.25 μm)

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การศึกษาสมบัติทางเคมีของน้ำอัดลมหมดอายุ

เก็บตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุจากจากขวดบรรจุภัณฑ์ (ไม่ผ่านการบำบัด) ประกอบด้วย น้ำโค้ก น้ำสไปรท์ น้ำเขียว น้ำส้ม และน้ำแดง โดยนำตัวอย่างแต่ละชนิดมาผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน และจากปลายท่อของถังบำบัดขั้นต้น (ผ่านการบำบัด) มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ซีโอดี บีโอดี ความเข้มสี พีเอช โดยทำการวิเคราะห์ทันทีหลังการเก็บตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุ และศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุของถังบำบัดขั้นต้น (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

2.3.2 การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำอัดลมหมดอายุ

นำตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุจากถังบำบัดขั้นต้นมากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกของแข็งแขวนลอยและคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย ยีสต์ ราและแอคติโนมัยสีท ด้วยวิธีการ spread plate และ pour plate โดยเจือจางตัวอย่างด้วย sterile normal saline 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^{-1}-10^{-7} ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3}-10^{-7} มาอย่างละ 0.1 และ1 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะของจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่ม สำหรับวิธีการ spread plate และ pour plate ตามลำดับ ซึ่งประกอบด้วย Plate count agar (PCA) Potato Dextrose Agar (PDA) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Gentamicin 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย Deman Rogosa and Sharpe Agar (MRS AGAR) และ Glucose Yeast Extract Malt Extract (GYM) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) โดย PCA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-5 วัน MRS บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน และ GYM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นบันทึกลักษณะรูปร่าง สีของโคโลนี และคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่แตกต่างกันนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมและถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ลงในอาหารวุ้นเอียง (slant) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.3.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ

2.3.3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 (primary screening) พิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max})

1) การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Initial inoculum)

- แบคทีเรียทั่วไป เขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารวุ้นเอียง PCA slant อายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 5 loop ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Broth (PCB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และเจือจางให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5

- แบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลลัส เขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารวุ้นเอียง MRS slant จำนวน 5 loop ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Deman Rogosa Sharpe Broth (MRS Broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และเจือจางให้ได้ OD เท่ากับ 0.5

- ยีสต์ เขี่ยเชื้อยีสต์จากหลอดอาหารวุ้นเอียง PDA slant อายุ 48 ชั่วโมง จำนวน 5 loop ลงในฟลาสก์ที่มีอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับ

จำนวนยีสต์โดยใช้ Haemacytometer และคำนวณปริมาณเชื้อที่มีอยู่ให้เป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

- เชื้อรา เติมน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 ร้อยละ 0.1 (ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารวุ้นเอียง PDA อายุ 5 วัน จากนั้นนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราโดยใช้ Heamacytometer และคำนวณปริมาณสปอร์ที่มีอยู่ให้เป็นสปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2) การตรวจวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

- แบคทีเรียและยีสต์ นำเชื้อเริ่มต้นมา 3 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้แก่ Plate Count Broth (PCB) สำหรับแบคทีเรียทั่วไป Deman Rogosa Sharpe Broth (MRS Broth) สำหรับแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลลัส และ Potato Dextrose Broth (PDB) สำหรับยีสต์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) โดย PCB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส PDB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มบนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที และ MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่า จากนั้นตรวจวัดการเจริญของ จุลินทรีย์โดยการเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ โดยปีเปตตัวอย่างจากแต่ละฟลาสก์มาครั้งละ 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า OD ที่ 660 นาโนเมตร (ฐปน ชื่นบาล และคณะ, 2548) และ 620 นาโนเมตร (คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, 2543) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ นำค่าความขุ่นที่ได้มาเขียนกราฟการเจริญเทียบกับระยะเวลา จากนั้นคำนวณค่า doubling time และหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) จากกราฟการเจริญของจุลินทรีย์

- เชื้อรา นำเชื้อเริ่มต้นมา 3 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิห้อง วางบนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที และตรวจวัดการเจริญของเชื้อราโดยเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยแต่ละครั้งนำฟลาสก์ที่บรรจุอาหารมาครั้งละ 3 ใบ นำมากรองผ่านกระดาษกรอง cellulose nitrate filter ซึ่งมีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ที่ทราบน้ำหนักคงที่ นำกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่โถดูดความชื้นและปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักที่ได้อีกครั้งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเท่ากับน้ำหนักกระทงที่มีเส้นใย-น้ำหนักกระทงเปล่า คำนวณค่าน้ำหนักแห้งเป็นกรัมต่อลิตร นำค่าน้ำหนักแห้งที่ได้มาเขียนกราฟการเจริญเทียบกับระยะเวลา จากนั้นคำนวณ ค่า doubling time และหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) จากกราฟการเจริญของจุลินทรีย์

2.3.3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 (secondry screening) พิจารณาจากประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอน Primary screening จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรีย B_3 B_6 B_8 และ ยีสต์ Y_{10} Y_{11} Y_{14} โดยให้แบคทีเรียมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 และยีสต์มีปริมาณเท่ากับ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตเชื้อมาปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำอัดลมหมดอายุ (ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และกำหนดชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ที่สภาวะปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่าง (ทั้งขวด) ครั้งละ 3 ขวด ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) และค่าพีเอช

2.3.4 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของจุลินทรีย์คัดแยก

2.3.4.1 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

นำตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาปรับพีเอชเริ่มต้นที่ระดับต่างๆ ด้วยสารละลาย 0.5 M NaOH ดังนี้

- แบคทีเรีย (B_6) ปรับพีเอชเริ่มต้น 4, 5, 6, 6.5 และ 7
- ยีสต์ (Y_{14}) ปรับพีเอชเริ่มต้น 3.5, 4, 4.5, 5 และ 5.5
- เชื้อผสม (B_6 ผสมกับ Y_{14}) ปรับพีเอชเริ่มต้น 3.5, 4, 5, 6 และ 7
- ชุดควบคุม ไม่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น

จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเติมเชื้อเริ่มต้นที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอน Secondary screening ได้แก่ แบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} ซึ่งใช้ในรูปเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) และเชื้อผสมโดยนำเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (mixed culture) ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่าง (ทั้งขวด) ครั้งละ 3 ขวด ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) และค่าพีเอช

2.3.4.2 ความเข้มข้นของ ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

เติมแหล่งไนโตรเจนในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1 1.5, 2 กรัมต่อลิตร ในน้ำอัดลมหมดอายุปริมาตร 50 มิลลิลิตร และกำหนดชุดควบคุมโดยไม่มีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.4.1 และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย B_6 ยีสต์ Y_{14} และเชื้อผสม

ระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่าง (ทั้งขวด) ครั้งละ 3 ขวด ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) และค่าพีเอช

2.3.4.3 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

นำน้ำอัดลมหมดอายุปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาเติมแหล่งไนโตรเจน ในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$ และปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.4.2 และ 2.3.4.1 ตามลำดับ ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย B_6 ยีสต์ Y_{14} และเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ปริมาณ 1, 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และกำหนดชุดควบคุมโดย ไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่าง (ทั้งขวด) ครั้งละ 3 ขวด ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) และค่าพีเอช

2.3.4.4 สภาวะการเขย่าที่เหมาะสม

นำน้ำอัดลมหมดอายุปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาเติมแหล่งไนโตรเจนในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$ และปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.4.2 และ 2.3.4.1 ตามลำดับ ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเติมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย B_6 ยีสต์ Y_{14} และเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.4.3 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง) บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าโดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที และกำหนดชุดควบคุมโดยไม่มีการเขย่า เก็บตัวอย่าง (ทั้งขวด) ครั้งละ 3 ขวด ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) และค่าพีเอช

2.3.5 การเตรียมน้ำหมักอีเอ็มจากกากน้ำตาลและน้ำอัดลมหมดอายุ

นำหัวเชื้อของอีเอ็มคิวเซมาขยายด้วยกากน้ำตาลและน้ำอัดลมหมดอายุโดยใช้อัตราส่วนดังนี้

- สูตรที่ 1 อีเอ็มคิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20
- สูตรที่ 2 อีเอ็มคิวเซ: น้ำอัดลมหมดอายุ: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20
- สูตรที่ 3 อีเอ็มคิวเซ: น้ำอัดลมหมดอายุ: น้ำ เท่ากับ 1: 6: 20

บ่มในภาชนะปิดสนิท เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสังเกตลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี ตะกอน การเกิดฝ้า กลิ่น และวัดค่าพีเอชของน้ำหมักอีเอ็ม

2.3.6 การคัดเลือกสูตรน้ำหมักอีเอ็มเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ

2.3.6.1 การคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 1 (primary screening) โดยพิจารณาจากปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็มแต่ละสูตรด้วยวิธีการ Spread plate และ Pour plate

เก็บตัวอย่างน้ำหมักอีเอ็มในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 นำมาตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มได้แก่ แบคทีเรียทั้งหมด (total bacterial count) ยีสต์และเชื้อรา (yeast and fungi) และแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (lactic acid bacteria) โดยวิธีการ spread plate plate และ pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม โดยนำน้ำหมักอีเอ็มที่เตรียมได้มาเจือจางใน sterile normal saline 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^{-1}- 10^{-7} ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3}-10^{-7} มาอย่างละ 0.1 และ 1 มิลลิลิตร สำหรับการ spread plate plate และ pour plate ตามลำดับ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะสำหรับจุลินทรีย์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) โดย PCA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-5 วัน และ MRS บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นทำการตรวจนับจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตในจานเพาะเชื้อระหว่าง 30-300 โคโลนี

2.3.6.2 การคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 2 (secondary screening) โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล

เติมอีเอ็มขยาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำอัดลมหมดอายุ (ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และกำหนดชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ที่สภาวะปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่าง (ทั้งขวด) ครั้งละ 3 ขวด ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) และค่าพีเอช

2.3.7 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของน้ำหมักอีเอ็ม

2.3.7.1 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

นำน้ำอัดลมหมดอายุปริมาตร 50 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมน้ำหมักอีเอ็มที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.6.2 ปริมาณ 0.1 0.2, 0.4 และ 1 เปอร์เซ็นต์ และกำหนดชุดควบคุมโดยไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น (ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่าง (ทั้งขวด) ครั้งละ 3 ขวด ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) และค่าพีเอช

2.3.7.2 สภาวะการเขย่าที่เหมาะสม

นำน้ำอัดลมหมดอายุปริมาตร 50 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมน้ำหมักอีเอ็มในปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.7.2 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง) บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าโดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที และกำหนดชุดควบคุมโดยไม่มีการเขย่าเก็บตัวอย่าง (ทั้งขวด) ครั้งละ 3 ขวด ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) และค่าพีเอช

2.3.8 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มในระดับห้องปฏิบัติการ

เติมเชื้อเริ่มต้นของจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มในปริมาณ 5 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลงในถังบำบัดที่บรรจุน้ำอัดลมหมดอายุปริมาตร 5 ลิตร ซึ่งเป็นระบบบำบัดแบบกะ (Batch type system) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง) เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่เริ่มทดลอง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ค่าซีโอดี ค่าบีโอดี ความเข้มสี ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) ค่าพีเอช และปริมาณเอทานอล แบ่งออกเป็น 4 ชุด การทดลอง ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม: ไม่ปรับสภาวะและไม่มีการกวนผสม)
- ชุดการทดลองที่ 2 (ปรับสภาวะที่เหมาะสม)
- ชุดการทดลองที่ 3 (กวนผสม)
- ชุดการทดลองที่ 4 (ปรับสภาวะที่เหมาะสมและกวนผสม)

หมายเหตุ: การปรับสภาวะได้แก่ การปรับค่าพีเอชและเติม $(NH_4)_2SO_4$

สำหรับน้ำหมักอีเอ็มแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม: ไม่มีการกวนผสม)
- ชุดการทดลองที่ 2 (กวนผสม)

2.3.9 การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำหมักอีเอ็มในระดับอุตสาหกรรม

เติมเชื้อเริ่มต้นของจุลินทรีย์อีเอ็ม 0.4 เปอร์เซ็นต์ ลงในถังบำบัดขั้นต้นของบริษัท หาดทิพย์ จำกัด (มหาชน) ที่มีปริมาณน้ำอัดลมหมดอายุปริมาตร 50 ลูกบาศก์เมตร ซึ่งเป็นระบบบำบัดแบบกะ (batch type system) โดยกำหนดชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 7 วัน ตั้งแต่วันที่เริ่มทดลอง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ค่าซีโอดี ค่าบีโอดี ความเข้มสี ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) ค่าพีเอช และปริมาณเอทานอล จากนั้นศึกษา

ผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นหลังการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ โดยนำน้ำอัดลมหมดอายุของทุกชุดการทดลองที่ผ่านการบำบัดเป็นเวลา 7 วัน มาวัดปริมาณเอทานอลด้วยอุปกรณ์ Ebulliometer (ภาคผนวก ก)

2.3.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากน้ำอัดลมหมดอายุ

ตรวจหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดแยกจากถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น ได้แก่ แบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} โดยใช้ลำดับเบสของ 16s และ 26s rRNA gene ประมาณ 500 เบส ในการเปรียบเทียบ ตามลำดับ โดยส่งวิเคราะห์ที่หน่วยเครื่องมือกลาง (CIF) และ MU - OU: CRC คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 สมบัติทางเคมีของน้ำอัดลมหมดอายุ

ตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย 1) น้ำอัดลมหมดอายุที่เก็บจากขวดบรรจุภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการบำบัด ซึ่งประกอบด้วย น้ำโค้ก น้ำสไปรท์ น้ำเขียว น้ำส้ม และน้ำแดง โดยนำตัวอย่างแต่ละชนิดมาผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน และ 2) น้ำอัดลมหมดอายุที่เก็บจากปลายท่อของถังบำบัดขั้นต้นที่ผ่านการบำบัดของบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน) น้ำอัดลมหมดอายุเป็นของเหลวที่มีสีซึ่งเกิดจากสีสังเคราะห์ของน้ำอัดลมแต่ละประเภทผสมกัน มีฟองก๊าซและกลิ่นหอมของสารปรุงแต่งกลิ่นและรส (http://www.stou.ac.th/study/sumrit/11-51(500)/page1-11-51(500).html) ผลจากการวิเคราะห์สมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุจากการเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง (ตารางที่ 3-1) พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุจากขวดบรรจุภัณฑ์ (ไม่ผ่านการบำบัด) ประกอบด้วยน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับ 146.2 ± 2.77 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำอัดลมหมดอายุ คือ น้ำตาลซูโครสประมาณ 14-15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (ข้อมูลจากบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน)) น้ำอัดลมหมดอายุมีปริมาณน้ำตาลน้อยกว่าน้ำกากส่าซึ่งมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 46 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวัดปริมาณสารอินทรีย์ในรูปของค่าซีโอดี (chemical oxygen demand; COD) และบีโอดี (biological oxygen demand; BOD) ของน้ำอัดลมหมดอายุพบว่า มีค่าเท่ากับ 104,116 ± 428 และ 49,957 ± 293 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำเสียจากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบซึ่งมีค่าซีโอดีและบีโอดีอยู่ในช่วง 100,000-50,000 และ 25,000-50,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Nandy *et al.*, 2002) แต่ในทางกลับกันน้ำอัดลมหมดอายุมีค่าซีโอดีและบีโอดีสูงกว่าน้ำเสียจากโรงงานผลิตสุราซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 16,600-58,000 และ 8,900-30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Akunna and Clark, 2000) นอกจากนี้พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุมีอัตราส่วนของค่าบีโอดีต่อซีโอดี เท่ากับ 0.48 แสดงให้เห็นว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายง่ายได้ด้วยวิธีทางชีววิทยา (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2542) สำหรับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ตรวจพบในน้ำอัดลมมีค่าน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หากเปรียบเทียบกับน้ำกากส่าแล้วน้ำกากส่าจะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมากกว่าน้ำอัดลมโดยมีปริมาณเท่ากับ 0.53 และ 0.07-0.14 กรัมต่อลิตร (Krzywonos *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2006) นอกจากนี้น้ำอัดลมหมดอายุมีสภาวะเป็นกรดซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.43 ± 0.84 โดยมีค่าใกล้เคียงกับน้ำเสียจากโรงกลั่นสุราซึ่งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3-4 (Malandra *et al.*, 2003; Krzywonos *et al.* 2009) นอกจากนี้พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุเป็นน้ำเสียที่มีสีซึ่งวัดค่าความเข้มสีได้

เท่ากับ 3.25 ± 0.13 ที่ความยาวคลื่นแสง 480 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับสีของน้ำกากส่า พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุมีค่าความเข้มสีน้อยกว่าน้ำกากส่าซึ่งมีค่าความเข้มสีเท่ากับ 78.2 เมื่อวัดที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 475 นาโนเมตร (Tondee and Sirianuntapiboon, 2008)

สำหรับการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของน้ำอัดลมหมดอายุจากปลายท่อของถังบำบัดขั้นต้น (ผ่านการบำบัด) พบว่า ทุกพารามิเตอร์มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำอัดลมหมดอายุที่เก็บจากขวดบรรจุภัณฑ์ (ไม่ผ่านการบำบัด) โดยน้ำอัดลมหมดอายุที่ผ่านการบำบัดมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับ 50.7 ± 3.03 กรัมต่อลิตร ซีโอดีและบีโอดีมีค่าเท่ากับ 50,324 ± 281 และ 13,761 ± 327 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับความเข้มสีและพีเอชมีค่าเท่ากับ 2.88 ± 1.05 และ 3.26 ± 1.62 ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของถังบำบัดขั้นต้นซึ่งบริษัทที่เป็นกรณีศึกษาใช้อยู่ในปัจจุบัน พบว่า สามารถกำจัดน้ำตาล ซีโอดี บีโอดี และความเข้มสีได้เท่ากับ 65.32 ± 3.71, 51.67 ± 6.21, 72.45 ± 5.93 และ 11.32 ± 0.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีระยะเวลาเก็บกักน้ำอัดลมหมดอายุประมาณ 4.5 เดือน เนื่องจากถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้นของบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบง่ายซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับถังหมักย่อยสลายแบบธรรมดาที่ไม่มีการใช้เทคโนโลยีหรือเครื่องจักรกล เช่น ไม่มีการกวนผสม ทำให้ประสิทธิภาพของการบำบัดน้ำเสียไม่สูงมากนัก รวมทั้งยังใช้เวลาในการบำบัดค่อนข้างนาน (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2549) อีกทั้งบริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลมมีปริมาณน้ำอัดลมหมดอายุที่ต้องกำจัดโดยเฉลี่ย 50 ลูกบาศก์เมตรต่อเดือน ประกอบกับน้ำอัดลมหมดอายุมีปริมาณสารอินทรีย์และค่าความเป็นกรดสูง ทำให้มีข้อจำกัดในการรับภาระบรรทุกของระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งเป็นระบบบ่อ (เฉลา ศรีทวี, 2535) ดังนั้นจึงไม่สามารถกำจัดน้ำอัดลมหมดอายุเหล่านี้โดยการปล่อยลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสียได้ทันที ทำให้บริษัทฯ ต้องประสบปัญหาจากการที่มีปริมาณน้ำอัดลมหมดอายุมากเกินความสามารถในการเก็บกักของถังบำบัดขั้นต้นซึ่งก่อให้เกิดความยุ่งยากในการจัดการ

ตารางที่ 3-1 ลักษณะสมบัติทางเคมีของน้ำอัดลมหมดอายุ

พารามิเตอร์	ไม่ผ่านการบำบัด	ผ่านการบำบัด	ประสิทธิภาพในการบำบัด (เปอร์เซ็นต์)
น้ำตาล	146.20 ± 2.77	50.70 ± 3.03	65.32 ± 3.71
COD	104,116 ± 428	50,324 ± 281	51.67 ± 6.21
BOD	49,957 ± 293	13,761 ± 327	72.45 ± 5.93
total nitrogen	น้อยกว่า 0.10	*	-
ความเข้มสี (480 nm)	3.25 ± 0.13	2.88 ± 1.05	11.32 ± 0.62
pH	3.43 ± 0.84	3.26 ± 1.62	-

หมายเหตุ: ทุกค่ามีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นความเข้มสีและพีเอช

* ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์

3.2 จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่คัดแยกจากถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น

การบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีชีววิทยาเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในการกำจัดสารอินทรีย์ออกจากน้ำเสีย (กรมโรงงานอุตสาหกรรม และสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2545) โดยเฉพาะน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีความสกปรกสูง เช่น น้ำกากส่า (Pant and Adholeya, 2007) และน้ำอัดลมซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ (เฉลา ศรีทวี, 2535) ซึ่งอาศัยจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์เพื่อนำไปสร้างเซลล์ใหม่และจุลินทรีย์จะได้พลังงานเพิ่มขึ้นเพื่อใช้ในการทำกิจกรรมต่างๆ อีกด้วย (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548) จากการคัดแยกจุลินทรีย์จากถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้นเพื่อนำมาใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ ผลจากการคัดแยกจุลินทรีย์โดยวิธีการ spread plate และ pour plate พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกมาได้มีทั้งจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (aerobe) และจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ทั้งหมด 29 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากลักษณะที่สังเกตด้วยตาเปล่าและลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 3-2) ซึ่งสามารถคัดแยกยีสต์ (Y) ได้มากที่สุดจำนวน 15 สายพันธุ์ คิดเป็น 51.72 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ แบคทีเรีย (B) 10 สายพันธุ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งแกรมลบรูปแท่ง แกรมลบรูปกลมและแกรมบวกรูปกลมคิดเป็น 13.79, 10.34, 6.90 และ 3.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เชื้อรา (F) 2 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อราที่มีเส้นใยแบบมีผนังกั้นและไม่มีผนังกั้นอย่างละ 3.45 เปอร์เซ็นต์ และแอคติโนมัยสีท (A) 2 สายพันธุ์ คิดเป็น 6.9 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3-1) สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์ (2549) รายงานว่า ระบบบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดทำงานร่วมกันในการบำบัด

สารอินทรีย์ โดยคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของน้ำเสียจะเป็นปัจจัยในการกำหนดชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในน้ำเสีย เช่น พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และประกฤติ สุขสวัสดิ์ (2525) รายงานว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นที่สามารถคัดแยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตสุรา ประกอบด้วย *Candida utilis* (303.2), *Saccharomyces cerevisiae* (313.22), *Saccharomyces cerevisiae* (M-30), *Hansenula anomala* (308.3) และ *Pichia* sp. (316.1) (316.2) ขณะที่ Petruccioli และคณะ (2002) ตรวจพบแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ในถังบำบัดแบบเติมอากาศของโรงงานผลิตสุราซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas fluorescens* นอกจากนี้พบว่า จุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และแบคทีเรียสามารถอยู่ร่วมกันได้ในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตแอลกอฮอล์แบบ jet-loop activated sludge ได้แก่ ยีสต์ *Trichosporon capitatum*, *Geotrichum peniculatum*, *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.

ตารางที่ 3-2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่คัดแยกจากน้ำอัดลมหมดอายุ

จุลินทรีย์คัดแยก	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สังเกตด้วยตาเปล่า)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สังเกตจากกล้องจุลทรรศน์)
B1 (facultative anaerobe)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ1.5-2 มิลลิเมตร	ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง เรียงตัวเป็นสายสั้นๆ
B2 (facultative anaerobe)	กลม นูน ขอบไม่เรียบ สีขาวครีม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร	ติดสีแกรมลบ รูปกลม เรียงตัวเป็นคู่ สาม
B3 (aerobe)	กลม แบน ขอบเรียบ สีเหลืองอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร	ติดสีแกรมลบ รูปกลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
B4 (facultative anaerobe)	กลม แบน ขอบเรียบ สีขาวมันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-2.5 มิลลิเมตร	ติดสีแกรมบวก รูปแท่งสั้นๆ เรียงตัวเป็นกลุ่ม

ตารางที่ 3-2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่คัดแยกจากน้ำอัดลมหมดอายุ (ต่อ)

จุลินทรีย์คัดแยก	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สังเกตด้วยตาเปล่า)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สังเกตจากกล้องจุลทรรศน์)
B5 (anaerobe)	กลม แบน ขอบเรียบ สีเหลืองอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร	ติดสีแกรมลบ รูปกลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
B6 (facultative anaerobe)	กลม นูน ขอบไม่เรียบ สีครีม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-5 มิลลิเมตร	ติดสีแกรมบวก รูปแท่งสั้นๆ มีสปอร์ตรงกลาง เรียงตัวแบบกระจาย
B7 (aerobe)	กลม นูน ขอบเรียบ สีเหลืองอมส้ม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร	ติดสีแกรมลบ รูปกลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
B8 (aerobe)	กลม นูน ขอบเรียบ สีขาวครีม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร	ติดสีแกรมบวก รูปกลม มีสปอร์ตรงกลาง เรียงตัวเป็นกลุ่ม
B9 (facultative anaerobe)	กลม แบน ขอบไม่เรียบ สีเหลืองเข้ม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-2 มิลลิเมตร	ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง เรียงตัวแบบกระจาย
B10 (anaerobe)	กลม แบน ขอบเรียบ สีขาวครีม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-2 มิลลิเมตร	ติดสีแกรมบวก รูปกลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
Y1 (facultative anaerobe)	กลมนูน ขอบเรียบ สีส้ม มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร	รูปร่างทรงกระบอก ขนาดใหญ่ multilateral budding

ตารางที่ 3-2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่คัดแยกจากน้ำอัดลมหมดอายุ (ต่อ)

จุลินทรีย์คัดแยก	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สังเกตด้วยตาเปล่า)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สังเกตจากกล้องจุลทรรศน์)
Y2 (aerobe)	กลม นูน ขอบเรียบ สีเหลืองอ่อน มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร	รูปร่างรี ขนาดใหญ่ unipolar budding
Y3 (aerobe)	กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ สีครีม ผิวด้าน เส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 2-2.5 มิลลิเมตร	รูปร่างรี ขนาดเล็ก multipolar budding
Y4 (facultative anaerobe)	กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ สีขาว ผิวด้าน เส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร	รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดใหญ่ unipolar budding
Y5 (facultative anaerobe)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีม มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-2.5 มิลลิเมตร	รูปร่างกลมรี ขนาดใหญ่ bipolar budding
Y6 (aerobe)	กลม แบน ขอบไม่เรียบ สีครีม ผิวด้าน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร	รูปร่างกลม ขนาดเล็ก unipolar budding
Y7 (aerobe)	กลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร	รูปร่างกลมรี ขนาดเล็ก unipolar budding
Y8 (facultative anaerobe)	กลม นูน ขอบไม่เรียบ สีเหลืองครีม มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-2.5 มิลลิเมตร	รูปร่างรี ขนาดเล็ก bipolar budding

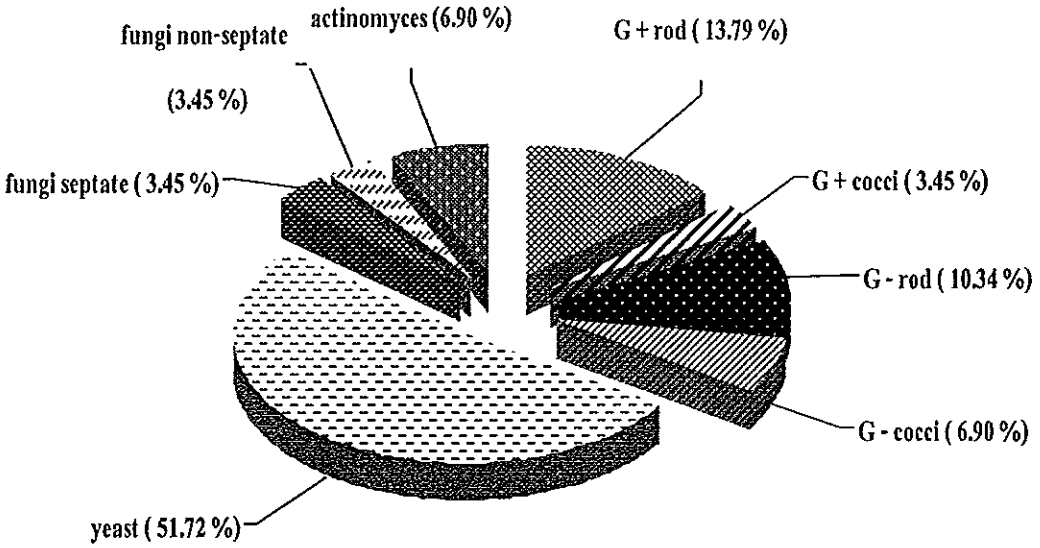
ตารางที่ 3-2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่คัดแยกจากน้ำอัดลมหมดอายุ (ต่อ)

จุลินทรีย์คัดแยก	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สังเกตด้วยตาเปล่า)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สังเกตจากกล้องจุลทรรศน์)
Y9 (aerobe)	กลม นูน ขอบเรียบ สีขาว ผิวด้าน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-2 มิลลิเมตร	รูปร่างรี ขนาดใหญ่ bipolar budding
Y10 (facultative anaerobe)	กลม นูน ขอบเรียบ สีขาวครีม ผิวด้าน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร	แท่งเรียว ขนาดเล็ก unipolar budding
Y11 (facultative anaerobe)	กลม แบน ขอบเรียบ สีเหลืองอ่อน ผิวด้าน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร	รูปร่างรี ขนาดเล็ก multipolar budding
Y12 (aerobe)	กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ สีครีม มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตร	รูปร่างรี ขนาดใหญ่ bipolar budding
Y13 (aerobe)	กลม นูน ขอบเรียบ สีขาวครีม มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-3 มิลลิเมตร	รูปร่างทรงกระบอก ขนาดเล็ก binary fission
Y14 (facultative anaerobe)	กลม นูน ขอบเรียบ สีเหลืองครีม มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-3 มิลลิเมตร	รูปร่างกลมรี ขนาดเล็ก bipolar budding
Y15 (facultative anaerobe)	กลม แบน ขอบเรียบ สีเหลืองเข้ม ผิวด้าน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-3 มิลลิเมตร	รูปร่างทรงกระบอก ขนาดใหญ่ unipolar budding

ตารางที่ 3-2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่คัดแยกจากน้ำอัดลมหมดอายุ (ต่อ)

จุลินทรีย์คัดแยก	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สังเกตด้วยตาเปล่า)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สังเกตจากกล้องจุลทรรศน์)
A1 (facultative anaerobe)	เส้นใยสีขาว เกาะแน่นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ สปอร์สีเทาเปียขุย	ติดสีแกรมบวก รูปเป็นเส้นใยสานกัน
A2 (facultative anaerobe)	เส้นใยสีน้ำตาลเข้ม เกาะแน่นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ สปอร์สีขาวเปียขุย	ติดสีแกรมบวก รูปเป็นเส้นใยสานกัน

หมายเหตุ: B (แบคทีเรีย), Y (ยีสต์), F (เชื้อรา) และ A (แอคติโนมัยสีท



ภาพที่ 3-1 จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่คัดแยกจากน้ำอัดลมหมดอายุของบริษัท จำกัด (มหาชน)

3.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ

3.3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ในขั้นที่ 1 (primary screening) โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max})

เนื่องจากบริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลมที่เป็นกรณีศึกษามีปริมาณน้ำอัดลมหมดอายุที่มากเกินความสามารถในการเก็บกักของถังบำบัดขั้นต้น ดังนั้น จึงต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วมาใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ ทั้งนี้เพื่อช่วยลดระยะเวลาในการ

เก็บกักน้ำอัดลมโดยสามารถปล่อยลงสู่ระบบบำบัดในปริมาณมากขึ้น จึงทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาได้ ยกเว้นจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ช้าจึงไม่นิยมนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ผลจากการศึกษา (ตารางที่ 3-3) พบว่า แบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดได้แก่ B_6 B_3 และ B_8 โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.019, 0.017 และ 0.014 ต่อนาที ตามลำดับ ซึ่งมีระยะการเจริญอย่างรวดเร็ว (log phase) อยู่ในช่วง 12-20 นาทีแรกของเลี้ยงเชื้อ สำหรับยีสต์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดได้แก่ Y_{14} Y_{10} และ Y_{11} โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.693, 0.578 และ 0.462 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีระยะการเจริญอย่างรวดเร็ว (log phase) อยู่ในช่วง 18-25 ชั่วโมงแรกของเลี้ยงเชื้อ และเชื้อรา F_1 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.385 ต่อวัน ซึ่งมีระยะการเจริญอย่างรวดเร็ว (log phase) อยู่ในช่วง 3-5 วันแรกของเลี้ยงเชื้อ จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุด รองลงมาคือ ยีสต์ และเชื้อรา ตามลำดับ เนื่องจากแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์เซลล์เดียว มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนและแพร่พันธุ์โดยการแบ่งเซลล์แบบทวีคูณ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548) ส่วนยีสต์เป็นราที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีเร็วกว่าเชื้อราที่เป็นเส้นสาย อีกทั้งยังมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่าเนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่า (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) และปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์กลุ่มอื่นได้น้อยรวมทั้งเซลล์ของยีสต์มีปริมาณสารอาหารสูง (Friedrich, 2004) ในขณะที่ สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์ (2549) รายงานว่าในสภาพแวดล้อมทั่วไปของน้ำเสียซึ่งมีทั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราและแบคทีเรียเจริญเติบโตรวมกัน เมื่อระยะเวลาผ่านไป ส่วนใหญ่แล้วจะมีปริมาณของแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา ทั้งนี้เป็นเพราะแบคทีเรียมีขนาดเล็กกว่าจึงสามารถย่อยอาหารและเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าเชื้อรา

ตารางที่ 3-3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดของจุลินทรีย์ (Primary screening)

จุลินทรีย์	ไอโซเลท	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max})
แบคทีเรีย *	B_1	0.007
	B_2	0.014
	B_3	0.019
	B_4	0.007
	B_5	0.008
	B_6	0.025
	B_7	0.013
	B_8	0.017
	B_9	0.012
	B_{10}	0.009
ยีสต์ **	Y_1	0.327
	Y_2	0.385
	Y_3	0.304
	Y_4	0.406
	Y_5	0.181
	Y_6	0.268
	Y_7	0.353
	Y_8	0.429
	Y_9	0.315
	Y_{10}	0.576
	Y_{11}	0.464
	Y_{12}	0.338
	Y_{13}	0.188
	Y_{14}	0.692
	Y_{15}	0.241
เชื้อรา ***	F_1	0.392
	F_2	0.288

หมายเหตุ: * ต่อนาที, ** ต่อชั่วโมง และ *** ต่อวัน

3.3.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ในขั้นที่ 2 (secondary screening) โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล

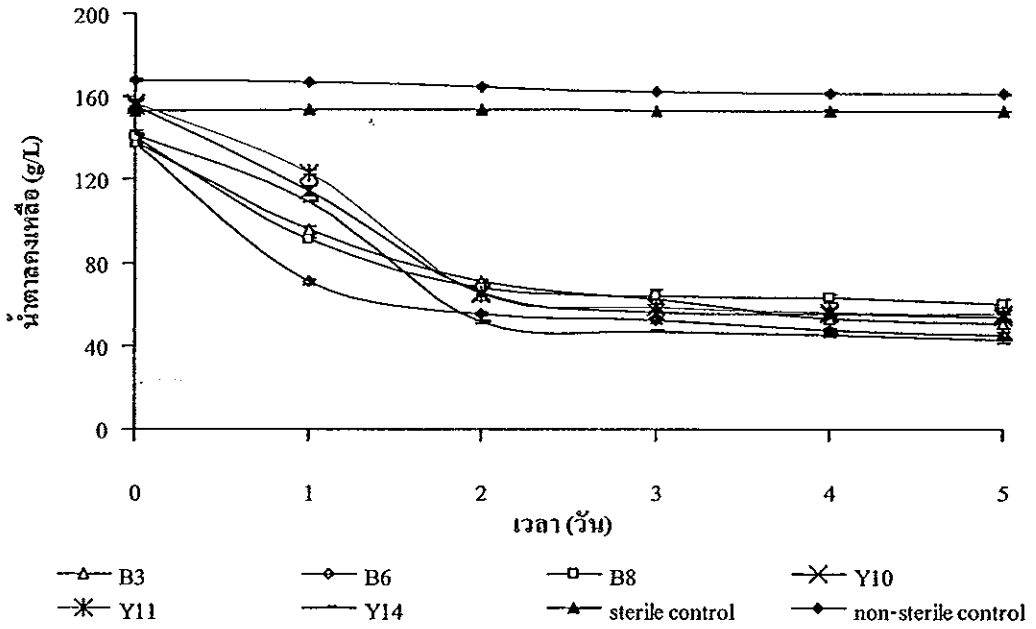
เนื่องจากน้ำอัดลมหมดอายุเป็นน้ำเสียที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูงซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้น จึงทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดน้ำตาลมาใช้เพื่อบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุโดยการนำจุลินทรีย์โตเร็วที่คัดเลือกได้จากขั้นแรกจำนวน 6 สายพันธุ์มาคัดเลือกต่อในขั้นที่ 2 ซึ่งใช้เชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย (ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5) และยีสต์ (1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในน้ำอัดลมหมดอายุ (ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ผลจากการศึกษา พบว่า แบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ภายในกลุ่มเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากับ 69.90 ± 0.83 และ 66.27 ± 1.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 3-4) โดยมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่เท่ากับ 42.6 ± 1.25 และ 46.8 ± 1.01 กรัม/ลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 141.4 ± 1.62 และ 137.8 ± 0.76 กรัม/ลิตร โดยพบว่าจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลได้ดีในช่วงวันที่ 1-2 หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 5 (ภาพที่ 3-2) ผลจากการศึกษาแตกต่างจากงานวิจัยของ Sirianuntapiboon and Tondee (2008) ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (9×10^{12} เซลล์/มิลลิลิตร) ในน้ำกากส่าที่มีการปรับสภาวะให้เหมาะสมโดยเติมกลูโคส yeast extract, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$ และปรับพีเอชเท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ภายใต้สภาวะกึ่งไร้อากาศ พบว่า *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 สามารถลดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ถึง 95.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณน้ำตาลมีแนวโน้มลดอย่างรวดเร็วในช่วง 5 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อและเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 8

ผลจากการเลี้ยงยีสต์ Y_{14} และแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน พบว่า แบคทีเรีย B_6 มีปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) ต่ำกว่ายีสต์ Y_{14} ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.02 และ 0.04 g_B/g_S ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และหลังจากการเลี้ยงยีสต์ Y_{14} และแบคทีเรีย B_6 เป็นเวลา 5 วัน พบว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีค่าพีเอชลดลงเท่ากับ 2.95 และ 3.03 จากค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.15 และ 3.12 ตามลำดับ (ภาพที่ 3-3) ซึ่งผลจากการศึกษาสอดคล้องกับค่าพีเอชที่ลดลงของน้ำกากส่าหลังจากการบำบัดโดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999)

ตารางที่ 3-4 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์โดยพิจารณาประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล (Secondary screening) เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

จุลินทรีย์	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังการเลี้ยงเชื้อ
B_3	63.31 ± 1.47^{a}	0.05 ± 0.04^{a}	3.11 ± 0.01
B_6	66.27 ± 1.04^{b}	0.02 ± 0.01^{bc}	3.03 ± 0.01
B_8	56.97 ± 2.10^{c}	0.04 ± 0.03^{a}	3.03 ± 0.08
Y_{10}	64.51 ± 0.75^{ad}	0.06 ± 0.16^{a}	3.02 ± 0.07
Y_{11}	64.78 ± 1.33^{abd}	0.05 ± 0.08^{a}	3.11 ± 0.04
Y_{14}	69.90 ± 0.83^{e}	0.04 ± 0.05^{b}	2.95 ± 0.02
ชุดควบคุม (ปลอดเชื้อ)	0.07 ± 0.02^{f}	0 ± 0.11^{c}	3.06 ± 0.05
ชุดควบคุม (ไม่ปลอดเชื้อ)	4.04 ± 3.03^{g}	0 ± 0.07^{c}	3.01 ± 0.10

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-2 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกในน้ำอัดลมหมดอายุที่อุณหภูมิห้อง

เนื่องจากแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ภายในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นจึงคัดเลือก

จุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ นำไปใช้เพื่อบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในขั้นตอนต่อไป ซึ่งสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ (2548) รายงานว่า จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ เชื้อรา สาหร่าย และโปรโตซัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotrophic bacteria อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนานำเอาเชื้อราและยีสต์มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียแทนแบคทีเรีย เช่น การใช้ *Aspergillus niger* และ *Rhizoctonia* sp. ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตสุรา (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2549) และใช้ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246 ในการบำบัดน้ำเสียจากแหล่งเดียวกัน (Tondee *et al.*, 2007)

3.4 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของจุลินทรีย์คัดแยก

3.4.1 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

ปัจจัยแรกที่ทำการศึกษา คือ ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณน้ำตาลของจุลินทรีย์คัดแยกโดยแปรผันค่าพีเอชดังนี้ แบคทีเรีย B_6 กำหนดค่าพีเอชเท่ากับ 4, 5 , 6, 6.5 และ 7 สำหรับยีสต์ Y_{14} กำหนดค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5, 4, 4.5, 5 และ 5.5 และเชื้อผสมระหว่าง B_6 และ Y_{14} กำหนดค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5, 4, 5, 6 และ 7

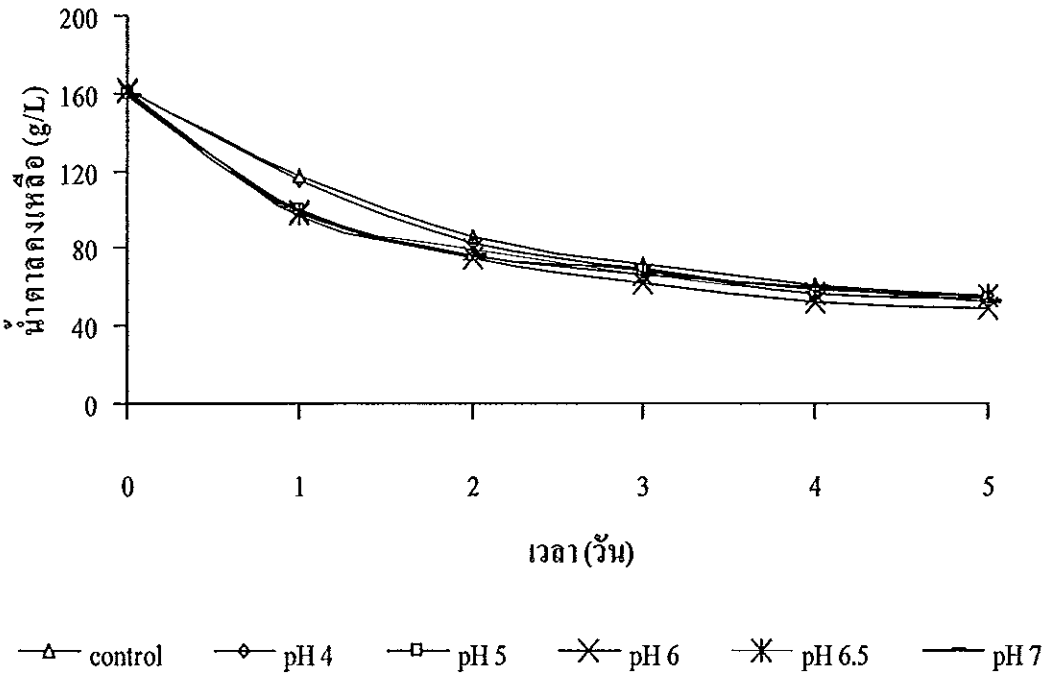
ผลจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย B_6 สามารถลดปริมาณน้ำตาลได้มากที่สุดเท่ากับ 68.48 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 โดยมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เท่ากับ 48.92 ± 1.57 กรัม/ลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 160.57 ± 0.85 กรัม/ลิตร ซึ่งการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 ทำให้แบคทีเรีย B_6 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดควบคุม (ไม่ปรับพีเอช) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างจากการปรับพีเอชเริ่มต้นที่ระดับอื่นๆ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3-5) โดยทุกชุดการทดลองแบคทีเรีย B_6 สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 1-2 หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ในวันที่ 5 (ภาพที่ 3-3)

เมื่อมีการปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 ทำให้แบคทีเรีย B_6 มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4, 6.5 และ 7 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลลดลงมากที่สุดในขณะที่มีปริมาณมวลชีวภาพเกิดขึ้นใกล้เคียงกัน แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากชุดควบคุม (ไม่ปรับพีเอชเริ่มต้น) และชุดการทดลองที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 ($p > 0.05$) และหลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมเป็นเวลา 5 วัน พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุมีค่าพีเอชลดลงในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 3-5)

ตารางที่ 3-5 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

พีเอชเริ่มต้น	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	66.03 ± 2.62^{a}	0.04 ± 0.14^{ab}	2.93 ± 0.15
4	66.51 ± 1.10^{ab}	0.05 ± 0.32^{b}	3.57 ± 0.29
5	67.29 ± 1.62^{ab}	0.04 ± 0.28^{ab}	4.45 ± 0.05
6	68.48 ± 0.14^{b}	0.02 ± 0.09^{a}	5.43 ± 0.03
6.5	67.40 ± 0.94^{ab}	0.05 ± 0.06^{b}	5.90 ± 0.21
7	67.22 ± 1.06^{ab}	0.06 ± 0.03^{b}	6.55 ± 0.07

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-3 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4, 5, 6, 6.5, 7 และชุดควบคุม (ไม่ปรับพีเอชเริ่มต้น) ที่อุณหภูมิห้อง

ในขณะที่ยีสต์ Y_{14} สามารถลดปริมาณน้ำตาลได้ดีที่สุดเท่ากับ 71.28 ± 0.88 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5

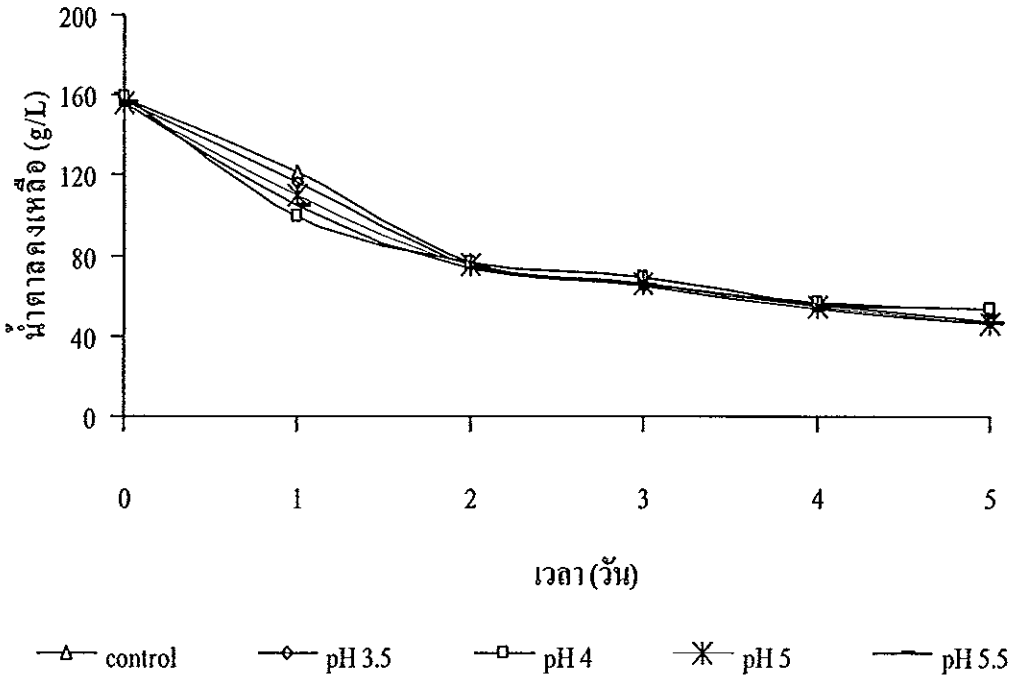
วัน เท่ากับ 44.86 ± 1.26 กรัม/ลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 156.3 ± 1.01 กรัม/ลิตร โดยการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นที่ระดับต่างๆ (3.5-5) พบว่า ยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ลดปริมาณน้ำตาลได้ดีกว่าชุดควบคุม (ไม่ปรับพีเอชเริ่มต้น) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-6) และในทุกชุดการทดลองยีสต์ Y_{14} สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ในวันที่ 5 (ภาพที่ 3-4)

เมื่อมีการปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 4 พบว่า ยีสต์ Y_{14} มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.5 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ ($p > 0.05$) และพบว่าค่าพีเอชของน้ำอัดลมหมดอายุในทุกชุดการทดลองมีค่าลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (ตารางที่ 3-6)

ตารางที่ 3-6 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

พีเอชเริ่มต้น	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	65.58 ± 0.92 [a]	0.06 ± 0.15 [a]	2.89 ± 0.02
3.5	70.33 ± 1.29 [b]	0.06 ± 0.03 [a]	3.04 ± 0.16
4	71.28 ± 0.88 [b]	0.04 ± 0.26 [a]	3.57 ± 0.08
4.5	70.34 ± 1.40 [b]	0.04 ± 0.11 [a]	4.29 ± 0.15
5	70.28 ± 1.44 [b]	0.05 ± 0.36 [a]	4.57 ± 0.20
5.5	70.24 ± 0.63 [b]	0.07 ± 0.04 [b]	5.30 ± 0.03

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-4 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 และชุดควบคุม (ไม่ปรับพีเอชเริ่มต้น) ที่อุณหภูมิห้อง

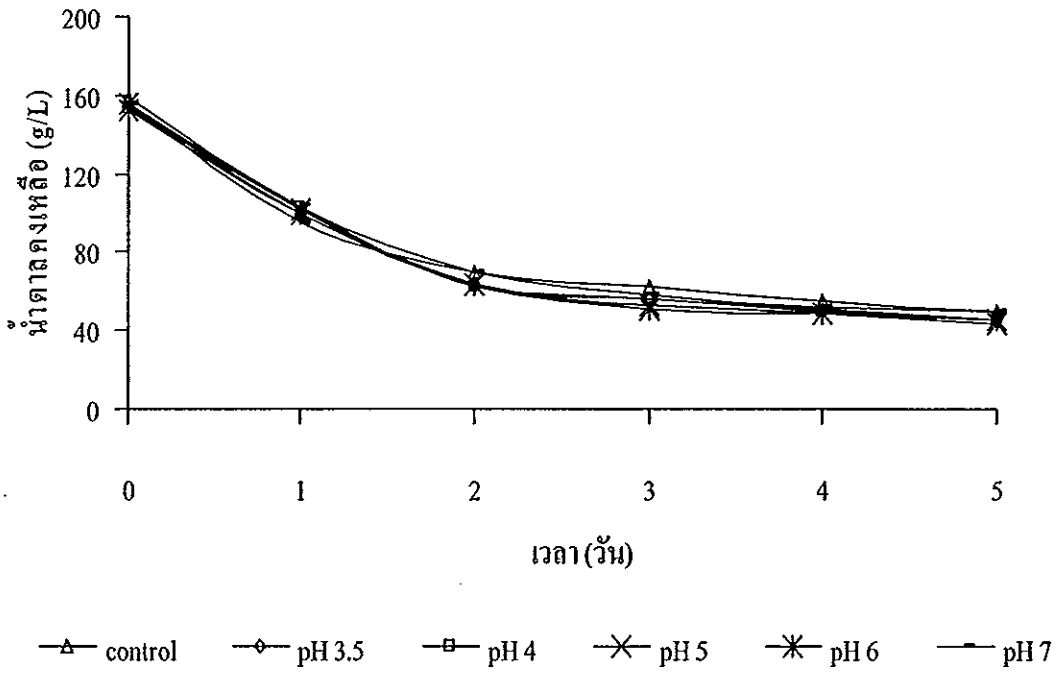
สำหรับค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} คือ พีเอชเท่ากับ 5 ซึ่งทำให้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 72.12 ± 1.12 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เท่ากับ 44.85 ± 1.26 กรัม/ลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 156.9 ± 1.01 กรัม/ลิตร ซึ่งการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 ทำให้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างจากระดับพีเอชอื่นๆ ($p > 0.05$) ยกเว้นการปรับพีเอชเป็น 7 มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลน้อยกว่าที่ระดับพีเอชอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-7) โดยทุกชุดการทดลองเชื้อผสมสามารถใช้น้ำตาลได้ดีที่สุดในช่วง 2 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ในวันที่ 5 (ภาพที่ 3-5)

เมื่อมีการปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 พบว่า เชื้อผสมมีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดควบคุม (ไม่ปรับพีเอชเริ่มต้น) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ ($p > 0.05$) และน้ำอัดลมหมดอายุมีค่าพีเอชลดลงในทุกชุดการทดลองหลังจากเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เป็นเวลา 5 วัน (ตารางที่ 3-7)

ตารางที่ 3-7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

พีเอชเริ่มต้น	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	68.63 ± 1.41^{a}	0.07 ± 0.06^{a}	3.01 ± 0.09
3.5	70.73 ± 1.22^{ab}	0.06 ± 0.09^{ab}	3.24 ± 0.27
4	70.54 ± 1.40^{ab}	0.06 ± 0.04^{ab}	3.63 ± 0.19
5	72.12 ± 1.12^{b}	0.04 ± 0.12^{b}	3.57 ± 0.20
6	70.34 ± 1.29^{ab}	0.05 ± 0.29^{ab}	5.59 ± 0.08
7	67.86 ± 1.55^{ac}	0.05 ± 0.09^{ab}	6.41 ± 0.41

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-5 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5, 4, 5, 6, 7 และชุดควบคุม (ไม่ปรับพีเอชเริ่มต้น) ที่อุณหภูมิห้อง

ผลจากการศึกษาสรุปได้ว่า ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการลดปริมาณน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของแบคทีเรีย B_6, ยีสต์ Y_{14} และเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6

กับยีสต์ Y_{14} ได้แก่ ค่าพีเอชเท่ากับ 6, 4 และ 5 ตามลำดับ โดยเชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลสูงสุด รองลงมาคือ ยีสต์ Y_{14} และแบคทีเรีย B_6 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 72.12 ± 1.12, 71.28 ± 0.88 และ 68.48 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการลดปริมาณน้ำตาลของจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่มในสภาวะที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม พบว่า แบคทีเรีย B_6 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลน้อยกว่าเชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่เชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อพิจารณาค่า $Y_{X/S}$ ของจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า แบคทีเรีย B_6 มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่ายีสต์ Y_{14} และเชื้อผสมแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3-8)

ตารางที่ 3-8 ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลและค่า $Y_{X/S}$ ของแบคทีเรีย B_6 ยีสต์ Y_{14} และเชื้อผสมระหว่าง B_6 กับ Y_{14} เมื่อเลี้ยงในน้ำอัดลมหมดอายุที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

จุลินทรีย์	พีเอชเริ่มต้น	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)
B_6	6	68.48 ± 0.14 [a]	0.02 ± 0.09 [a]
Y_{14}	4	71.28 ± 0.88 [b]	0.04 ± 0.26 [a]
เชื้อผสม	5	72.12 ± 1.12 [b]	0.04 ± 0.12 [a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งได้ทำการศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6-7 Tondee และ Sirianuntapiboon (2008) ทำการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* No.PV71-1861 ในการบำบัดน้ำกากส่าโดยแปรผันค่าพีเอชในช่วง 3-7 ผลจากการศึกษาพบว่า เมื่อปรับพีเอชเป็น 6 เชื้อสายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตและลดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำกากส่าได้สูงสุดเท่ากับ 95.50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 8 วัน ในขณะที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการบำบัดน้ำกากส่าโดยเชื้อผสมของ *Bacillus* spp. จำนวน 7 สายพันธุ์ มีค่าเท่ากับ 7 ซึ่งสามารถลดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีที่สุดเท่ากับ 94.34 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 5 วัน โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Krzywonos *et al*, 2009) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Nakajima-Kambe และคณะ (1999) ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus smithii* สามารถบำบัดน้ำกากส่าได้ดีเมื่อปรับค่าพีเอชเป็น 7 ในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 55

องศาเซลเซียส โดยเชื้อมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีของน้ำกากส่าได้เท่ากับ 35.5 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 20 วัน ส่วนงานวิจัยที่ทำศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 5 เช่น ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* No.SF9-246 สามารถบำบัดน้ำกากส่าได้ดีที่สุดเมื่อปรับพีเอชเป็น 5 โดยมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลได้เท่ากับ 94.74 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน เนื่องจากพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงที่เป็นกรดจึงส่งผลให้ *Issatchenkia orientalis* No.SF9-246 สามารถเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์เด่นที่อยู่ในระบบบำบัดได้โดยไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทั้งนี้ต้องมีสภาวะที่เป็นกรดตลอดระยะเวลาการบำบัด (Tondee *et al.*, 2007) และจากการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและการลดค่าซีโอดีในน้ำกากส่าโดยใช้ยีสต์ *Hansenula* sp. พบว่า ยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำกากส่าเป็น 5 เช่นกัน โดยที่ค่าพีเอชดังกล่าวให้มวลชีวภาพเท่ากับ 3.41 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าซีโอดีในน้ำกากส่าได้เท่ากับ 54.28 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน (Shojaosadati *et al.*, 1999)

3.4.2 ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสม

จากการศึกษาความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลของจุลินทรีย์คัดแยกโดยกำหนดระดับความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5, 1 1.5 และ 2 กรัมต่อลิตร เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม พบว่า แบคทีเรีย B_6 สามารถลดปริมาณน้ำตาลได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เติมลงไปในน้ำอัดลมหมดอายุ โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมที่มีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร สามารถลดปริมาณน้ำตาลได้ดีที่สุดเท่ากับ 71.91 ± 1.42 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 46.41 ± 2.15 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 144.76 ± 1.34 กรัม/ลิตร ซึ่งการเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรีย B6 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-9) โดยทุกชุดการทดลองแบคทีเรีย B_6 สามารถใช้น้ำตาลได้มากที่สุดในวันที่ 1 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ในวันที่ 5 (ภาพที่ 3-6)

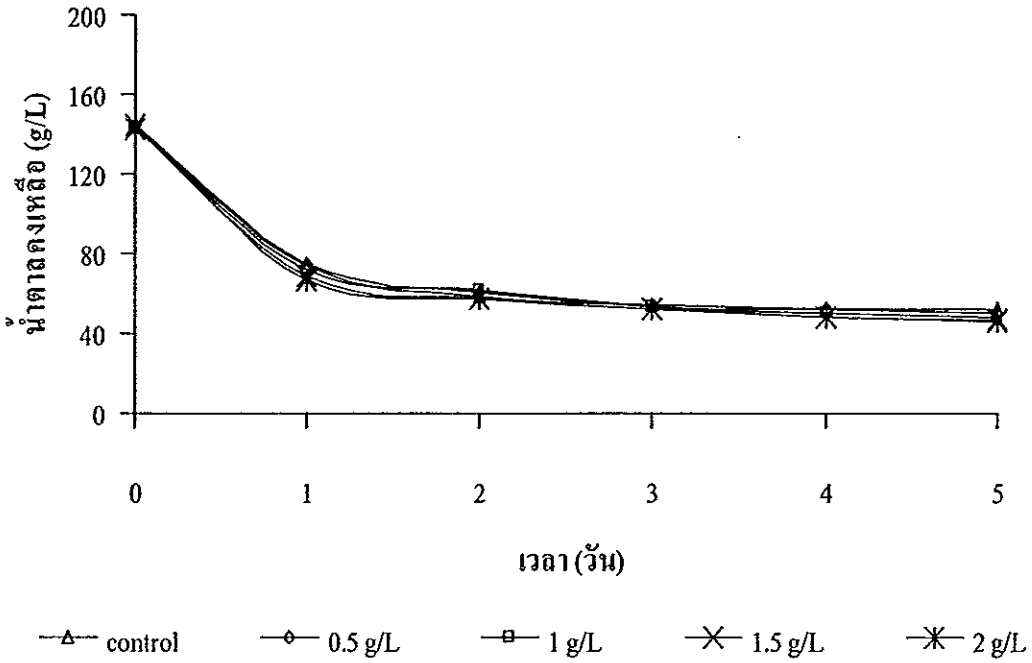
เมื่อเติม $(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 2 กรัม/ลิตร พบว่า แบคทีเรีย B_6 มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 กรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองอื่นๆ ($p > 0.05$) และหลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุจากทุกชุดการทดลองมีค่าพีเอชลดลง (ตารางที่ 3-9)

จากการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำกากส่าโดยยีสต์ *Citeromyces* sp. WR-43-6 ผลจากการศึกษาพบว่า ยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถลดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีที่สุดเท่ากับ 82.16 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 5 วัน เมื่อใช้ $NaNO_3$ ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ (Sirianuntapiboon *et al.* 2004) หรือการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้น 2 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นแหล่ง อนินทรีย์ไนโตรเจนเช่นกันในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตสุราโดยใช้เชื้อผสมของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งมีประสิทธิภาพในการบำบัดซีโอดีเท่ากับ 75.91 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 7 วัน (Krzywonos *et al.*, 2008) ในขณะที่แบคทีเรีย *Lactobacillus plantarun* No. PV71-1861 สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้ทั้งในรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ในการบำบัดน้ำกากส่า คือ yeast extract ที่มีความเข้มข้น 4 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ $NaNO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ และหลังการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เติมแหล่งไนโตรเจนทุกชนิดทำให้พีเอชของน้ำกากส่ามีค่าลดลงน้อยกว่า 4 (Tondee and Sirianuntapiboon, 2008)

ตารางที่ 3-9 ผลของความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	63.62 ± 1.09^{a}	0.04 ± 0.25^{ab}	5.59 ± 0.15
0.5	66.75 ± 1.41^{b}	0.05 ± 0.08^{a}	5.53 ± 0.27
1	66.90 ± 0.63^{b}	0.04 ± 0.13^{ab}	5.54 ± 0.06
1.5	67.17 ± 0.91^{b}	0.04 ± 0.06^{ab}	5.46 ± 0.40
2	70.91 ± 1.42^{c}	0.03 ± 0.38^{b}	5.45 ± 0.14

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-6 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1, 1.5, 2 กรัมต่อลิตร และชุดควบคุม (ไม่เติม $(NH_4)_2SO_4$) ที่อุณหภูมิห้อง

เมื่อเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัม/ลิตร พบว่า ยีสต์ Y_{14} มีความสามารถในการกำจัดน้ำตาลได้ดีที่สุดเท่ากับ 74.20 ± 0.55 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เท่ากับ 41.75 ± 2.05 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 149.6 ± 1.83 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นดังกล่าวทำให้ยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-10) และพบว่าทุกชุดการทดลองยีสต์ Y_{14} สามารถใช้น้ำตาลได้ดีในช่วงวันที่ 1-2 หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 5 (ภาพที่ 3-7) นอกจากนี้พบว่า ยีสต์ Y_{14} ต้องการ $(NH_4)_2SO_4$ น้อยกว่าแบคทีเรีย B_6 เนื่องจากยีสต์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของเซลล์ประมาณ 7.5-11 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่แบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของเซลล์มากกว่ายีสต์ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 12-15 เปอร์เซ็นต์ (สมใจ ศิริโภค, 2547)

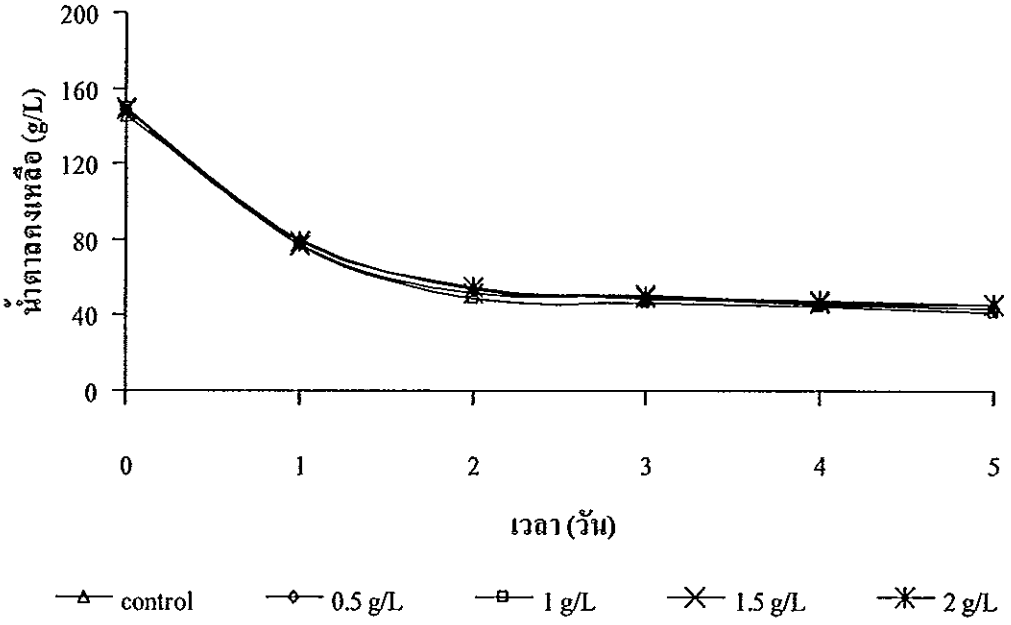
นอกจากนี้พบว่า เมื่อเติม $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในน้ำอัดลมหมดอายุ ทำให้ยีสต์ Y_{14} มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1.5 และ 2 กรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดควบคุม (ไม่มีการเติม

$(NH_4)_2SO_4$) และชุดการทดลองที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5 กรัม/ลิตร ($p > 0.05$) และพบว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีค่าพีเอชลดลงในทุกชุดการทดลอง หลังจากเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน (ตารางที่ 3-10)

ตารางที่ 3-10 ผลของความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	68.60 ± 1.19^{a}	0.04 ± 0.18^{abc}	3.61 ± 0.04
0.5	71.50 ± 0.87^{b}	0.03 ± 0.36^{ab}	3.45 ± 0.02
1	74.20 ± 0.55^{c}	0.02 ± 0.07^{a}	3.40 ± 0.08
1.5	69.70 ± 1.93^{ab}	0.05 ± 0.23^{bc}	3.44 ± 0.10
2	69.50 ± 0.54^{a}	0.06 ± 0.11^{c}	3.49 ± 0.13

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-7 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงยีสต์ Y14 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1, 1.5, 2 กรัมต่อลิตร และชุดควบคุม (ไม่เติม $(NH_4)_2SO_4$) ที่อุณหภูมิห้อง

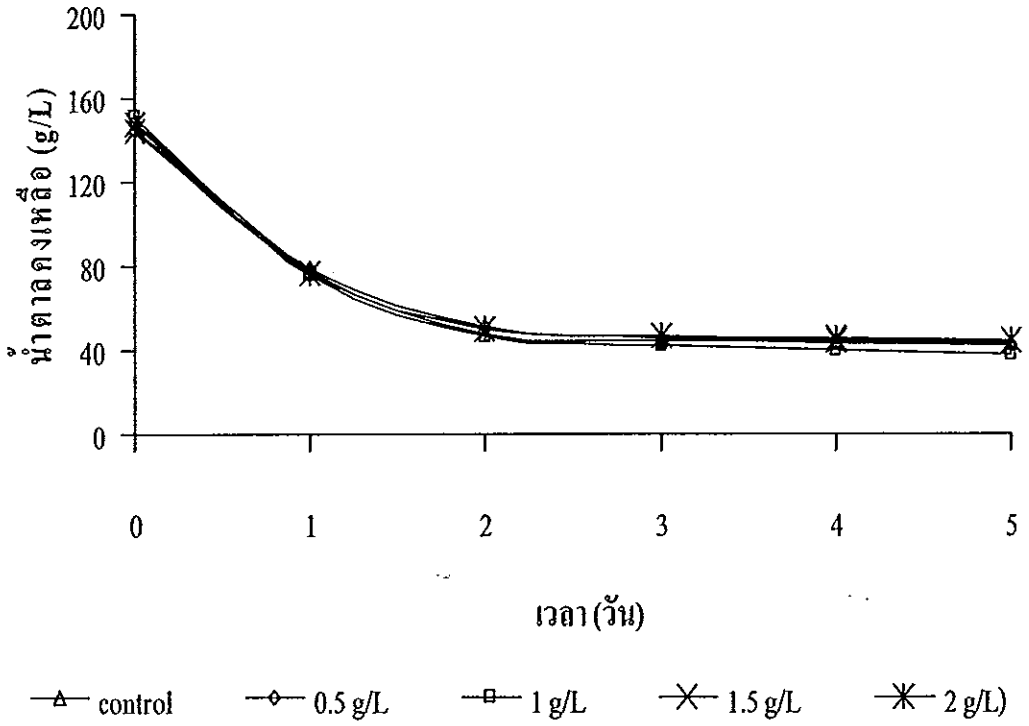
ขณะที่เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} สามารถลดปริมาณน้ำตาลได้ดีที่สุดเท่ากับ 74.83 ± 0.57 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติม $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในน้ำอัดลมหมดอายุ โดยมีน้ำตาลคงเหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 38 ± 1.31 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 151.62 ± 1.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นดังกล่าวทำให้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-11) และพบว่าทุกชุดการทดลองเชื้อผสม สามารถใช้น้ำตาลได้ดีในช่วง 2 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 5 (ภาพที่ 3-8)

เมื่อเติม $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในน้ำอัดลมหมดอายุ พบว่าเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดควบคุม (ไม่เติม $(NH_4)_2SO_4$) และชุดการทดลองที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5 และ 1.5 กรัมต่อลิตร ($p > 0.05$) และพบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อผสมในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน ทำให้น้ำอัดลมหมดอายุมีค่าพีเอชลดลงในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 3-11)

ตารางที่ 3-11 ผลของความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	70.57 ± 0.77^{ad}	0.06 ± 0.08^{a}	4.72 ± 0.01
0.5	72.20 ± 1.23^{ab}	0.03 ± 0.01^{bc}	4.63 ± 0.22
1	74.83 ± 0.57^{c}	0.02 ± 0.12^{b}	4.56 ± 0.07
1.5	70.00 ± 1.50^{d}	0.04 ± 0.27^{abc}	4.77 ± 0.03
2	69.10 ± 1.31^{d}	0.05 ± 0.19^{c}	4.76 ± 0.18

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-8 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1, 1.5, 2 กรัมต่อลิตร และชุดควบคุม (ไม่เติม $(NH_4)_2SO_4$) ที่อุณหภูมิห้อง

ผลจากการศึกษาสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุสำหรับแบคทีเรีย B_6 คือ 2 กรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ Y_{14} และเชื้อผสมคือ 1 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลสูงสุด รองลงมาคือ ยีสต์ Y_{14} และแบคทีเรีย B_6 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 74.83 ± 0.57, 74.20 ± 0.55 และ 70.91 ± 1.42 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์ (2549) โดยพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีองค์ประกอบที่เป็นไนโตรเจนน้อยกว่ายีสต์ จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลของจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อมีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นเหมาะสม พบว่าแบคทีเรีย B_6 มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลได้น้อยกว่าเชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ขณะที่เชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อพิจารณาค่า $Y_{X/S}$ พบว่า ยีสต์ Y14 และเชื้อผสมระหว่าง

แบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าแบคทีเรีย B_6 แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3-12)

ตารางที่ 3-12 ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลและค่า $Y_{X/S}$ ของจุลินทรีย์ B_6, Y_{14} และเชื้อผสม เมื่อเลี้ยงในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6, 4 และ 5 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

จุลินทรีย์	$(NH_4)_2SO_4$ (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)
B_6	2	70.91 ± 1.42^a	0.03 ± 0.38^a
Y_{14}	1	74.20 ± 0.55^b	0.02 ± 0.07^a
เชื้อผสม	1	74.83 ± 0.57^b	0.02 ± 0.12^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

3.4.3 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียแต่ละครั้งไม่ควรมากหรือน้อยจนเกินไป ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ (มั่นสิน ตัณฑุลเวศน์, 2525) ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลของจุลินทรีย์คัดแยก โดยกำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1, 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ในสภาวะที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นและเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสม

ผลจากการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เติมลงไปในน้ำอัดลมหมดอายุ ทำให้แบคทีเรีย B_6 สามารถลดปริมาณน้ำตาลได้ดีขึ้นตามลำดับ โดยการใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (วัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร) พบว่า แบคทีเรีย B_6 สามารถลดปริมาณน้ำตาลคงเหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 42.3 ± 3.64 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 158.2 ± 1.84 กรัมต่อลิตร หรือมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 74.65 ± 0.72 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เชื้อเริ่มต้นในปริมาณดังกล่าว ทำให้แบคทีเรีย B_6 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-13) โดยแบคทีเรีย B6 สามารถใช้น้ำตาลได้มากที่สุดในวันที่ 1 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ในวันที่ 5 ในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 3-9)

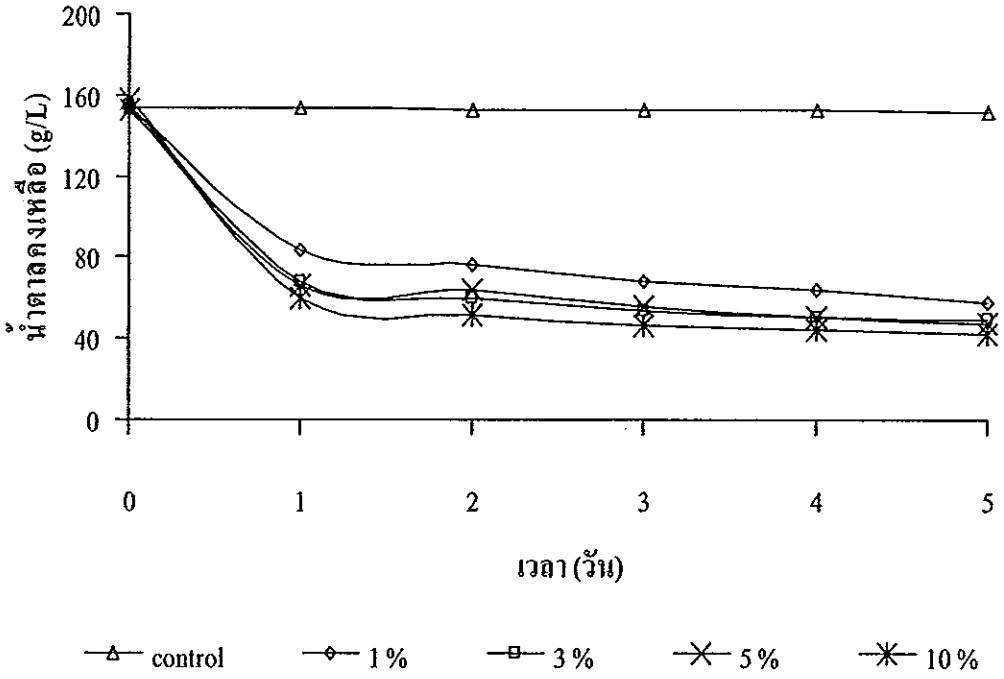
หลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน พบว่า แบคทีเรีย B_6 มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ อย่างมี

นัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองที่ใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$) ในขณะที่การใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่า $Y_{x/s}$ สูงกว่าชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพีเอชหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุจากทุกชุดการทดลองมีค่าพีเอชลดลง (ตารางที่ 3-13)

ตารางที่ 3-13 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	1.06 ± 0.31^{a}	0.01 ± 0.06^{a}	5.78 ± 0.02
1	60.54 ± 0.07^{b}	0.05 ± 0.22^{b}	5.12 ± 0.18
3	65.92 ± 0.24^{c}	0.04 ± 0.15^{bc}	5.04 ± 0.20
5	68.39 ± 0.18^{c}	0.04 ± 0.08^{bc}	5.09 ± 0.04
10	74.65 ± 0.72^{d}	0.04 ± 0.15^{c}	4.76 ± 0.09

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-9 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1, 3, 5, 10 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับยีสต์ Y_{14} สามารถลดปริมาณน้ำตาลได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เติมลงในน้ำอัดลมหมดอายุจนถึง 5 เปอร์เซ็นต์ ($1x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร) ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 76.49 ± 1.22 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในวันที่ 5 เท่ากับ 40.5 ± 2.003 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 157.21 ± 1.63 กรัมต่อลิตร ซึ่งการใช้เชื้อเริ่มต้นในปริมาณดังกล่าวทำให้ยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นของยีสต์ Y_{14} เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลลดลง (ตารางที่ 3-14) และพบว่ายีสต์ Y_{14} สามารถใช้น้ำตาลได้ดีในช่วงวันที่ 1-2 หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 5 ในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 3-10)

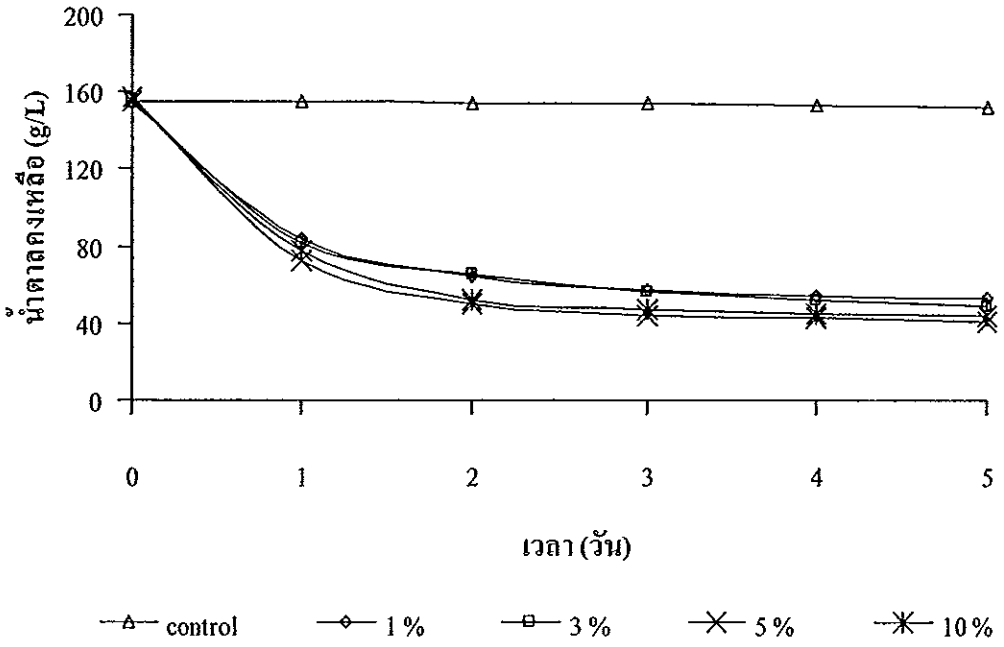
หลังจากเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน พบว่า ยีสต์ Y_{14} มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองที่ใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$) ในขณะที่การใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่า $Y_{X/S}$ สูงกว่า

ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอช ของน้ำอัดลมหมดอายุหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน พบว่า ทุกชุดการทดลองมีค่าพีเอชลดลง (ตารางที่ 3-14)

ตารางที่ 3-14 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	1.67 ± 0.02^{a}	0.01 ± 0.06^{a}	3.81 ± 0.07
1	60.04 ± 1.05^{b}	0.06 ± 0.01^{bc}	3.52 ± 0.02
3	68.20 ± 0.87^{c}	0.05 ± 0.15^{b}	3.51 ± 0.24
5	76.49 ± 1.33^{d}	0.05 ± 0.03^{b}	3.49 ± 0.16
10	72.53 ± 1.39^{c}	0.07 ± 0.10^{c}	3.54 ± 0.08

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-10 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1, 3, 5, 10 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} สามารถลดปริมาณน้ำตาลได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจนถึง 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำตาลจนเหลืออยู่ในวันที่ 5 เท่ากับ 40.6 ± 1.314 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 162.9 ± 1.002 กรัมต่อลิตร หรือมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลเท่ากับ 77.67 ± 0.766 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการใช้เชื้อเริ่มต้นในปริมาณดังกล่าวทำให้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่การเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลลดลง (ตารางที่ 3-15) และพบว่าเชื้อผสมมีแนวโน้มในการลดปริมาณน้ำตาลได้ดีในช่วง 2 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 5 ในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 3-11)

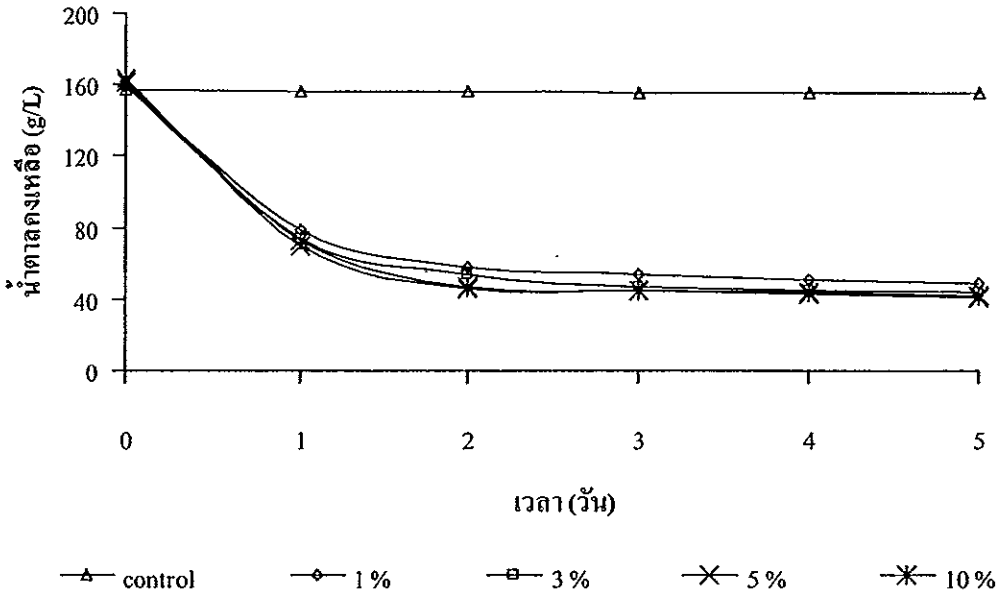
เมื่อเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นของเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน พบว่า เชื้อผสมมีค่า $Y_{B/S}$ ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 และ 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองที่ใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$) ในขณะที่การใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ

5 เปอร์เซ็นต์ มีค่า $Y_{B/S}$ สูงกว่าชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และหลังจากการเลี้ยงเชื้อผสมในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุในทุกชุดการทดลองมีค่าลดลง (ตารางที่ 3-15)

ตารางที่ 3-15 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	1.67 ± 0.02^{a}	0.01 ± 0.05^{a}	4.73 ± 0.06
1	60.04 ± 1.05^{b}	0.05 ± 0.13^{b}	4.18 ± 0.08
3	68.20 ± 0.87^{c}	0.04 ± 0.25^{bc}	3.97 ± 0.03
5	76.49 ± 1.33^{d}	0.03 ± 0.08^{c}	3.83 ± 0.11
10	72.53 ± 1.39^{c}	0.04 ± 0.04^{b}	4.29 ± 0.18

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-11 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1, 3, 5, 10 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ที่อุณหภูมิห้อง

ผลจากการศึกษาสรุปได้ว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสำหรับแบคทีเรีย B_6 (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 เท่ากับ 0.5) คือ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีสต์ Y_{14} ($1x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร) และเชื้อผสม (ผสมในอัตราส่วนเท่ากับ 1:1) มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลสูงสุด รองลงมาคือ ยีสต์ Y14 และแบคทีเรีย B_6 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลเท่ากับ 77.67 ± 0.77, 76.49 ± 1.33 และ 74.65 ± 0.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลของจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นในปริมาณที่เหมาะสม พบว่า แบคทีเรีย B_6 มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลน้อยกว่าเชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ขณะที่เชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม มีค่า $Y_{X/S}$ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3-16)

ตารางที่ 3-16 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลและค่า $Y_{X/S}$ ของจุลินทรีย์ B_6, Y_{14} และเชื้อผสม เมื่อเลี้ยงในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6, 4 และ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2, 1 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

จุลินทรีย์	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)
B_6	10	74.65 ± 0.72^a	0.04 ± 0.15^a
Y_{14}	5	76.49 ± 1.33^b	0.05 ± 0.03^a
เชื้อผสม	5	77.67 ± 0.77^b	0.03 ± 0.08^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากการศึกษาข้างต้นพบว่า การเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำอัดลมหมดอายุเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการลดปริมาณน้ำตาลต้องใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียมากกว่าเชื้อเริ่มต้นของยีสต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียด้วยจุลินทรีย์ต่างๆ Tondee และ Sirianuntapiboon (2008) ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 เท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (5×10^{12} เซลล์/มิลลิลิตร) ในการบำบัดน้ำกากส่า เป็นเวลา 8 วัน พบว่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการบำบัดดีขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้น ขณะที่ Sirianuntapiboon และคณะ (2004) ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของยีสต์ *Citeromyces* sp. WR-43-6 เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ (4×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) ในการบำบัดน้ำกากส่าซึ่งใช้ปริมาณที่น้อยกว่า

แบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 นอกจากนี้ สุมาลีเหลืองสกุล และคณะ (2542) รายงานว่า การบำบัดน้ำเสียจากโรงอาหารโดยใช้เชื้อผสมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ Sk10 และ T2 (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร เท่ากับ 1.35 และ 1.72 ตามลำดับ สามารถใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในการบำบัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3.4.4 สภาวะการเขย่าที่เหมาะสม

การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่าทำให้เกิดการกวนผสมระหว่างน้ำเสียและจุลินทรีย์ภายในถังปฏิกิริยาเพื่อให้ปฏิกิริยาชีวเคมีในระบบบำบัดน้ำเสียเกิดได้สมบูรณ์ที่สุด (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2549) งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาสภาวะการเขย่าที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณน้ำตาลของจุลินทรีย์คัดแยกในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน โดยกำหนดแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 50,100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ในสภาวะที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น รวมทั้งมีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ และเชื้อเริ่มต้นในปริมาณที่เหมาะสม

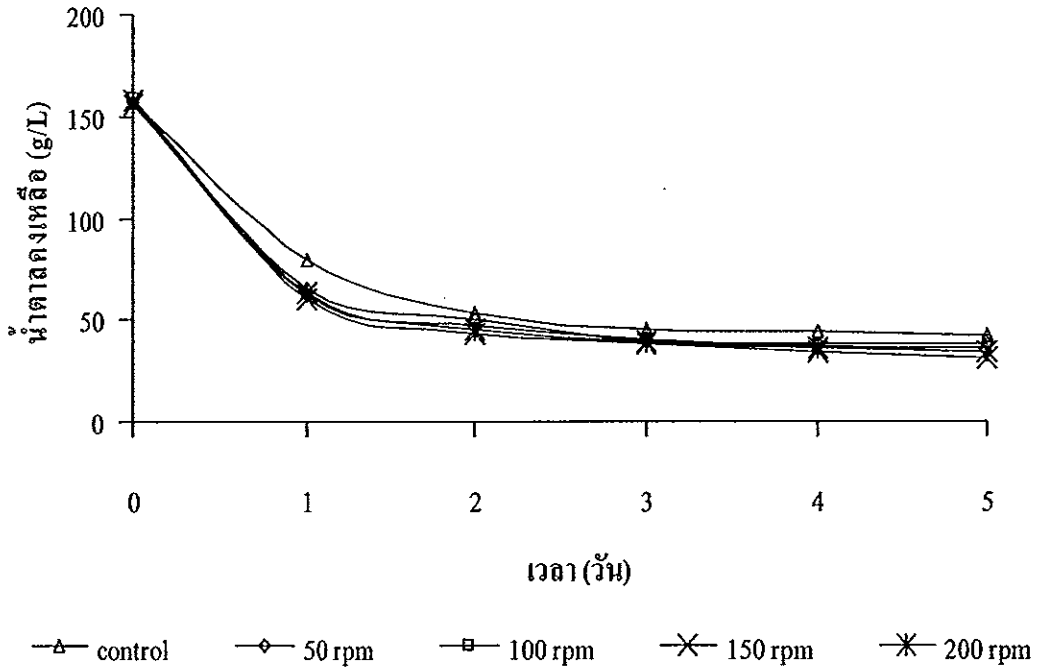
ผลจากการศึกษา พบว่า แบคทีเรีย B_6 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 80.29 ± 0.71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจนถึง 150 รอบต่อนาที โดยมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในวันที่ 5 เท่ากับ 31.29 ± 2.35 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 152.83 ± 1.71 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่าดังกล่าวทำให้แบคทีเรีย B_6 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่การใช้ความเร็วรอบในการเขย่าที่เพิ่มขึ้นเป็น 200 รอบต่อนาที ทำให้แบคทีเรีย B_6 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลลดลง (ตารางที่ 3-17) โดยทุกชุดการทดลองแบคทีเรีย B_6 สามารถใช้น้ำตาลได้มากที่สุดในวันที่ 1 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ในวันที่ 5 (ภาพที่ 3-12)

เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 150 รอบต่อนาที พบว่าแบคทีเรีย B_6 มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 50 รอบต่อนาที และชุดควบคุม (ไม่มีการเขย่า) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากการเขย่าทำให้เกิดการกวนผสมระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับน้ำเสียเท่านั้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองที่ใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 100 และ 200 รอบต่อนาที ($p > 0.05$) และพบว่าหลังจากการเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน ทำให้น้ำอัดลมหมดอายุมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 3-17)

ตารางที่ 3-17 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ความเร็วรอบการเขย่า (รอบต่อนาที)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	71.62 ± 1.28^{a}	0.05 ± 0.08^{a}	5.20 ± 0.08
50	75.88 ± 1.24^{b}	0.04 ± 0.16^{a}	5.24 ± 0.05
100	77.48 ± 0.78^{c}	0.04 ± 0.22^{ab}	5.08 ± 0.14
150	80.29 ± 0.71^{d}	0.02 ± 0.07^{b}	4.90 ± 0.19
200	76.78 ± 0.59^{bc}	0.03 ± 0.14^{ab}	5.03 ± 0.08

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-12 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย B_6 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 50, 100, 150, 200 รอบต่อนาที และชุดควบคุม (ไม่มีการเขย่า) ที่อุณหภูมิห้อง

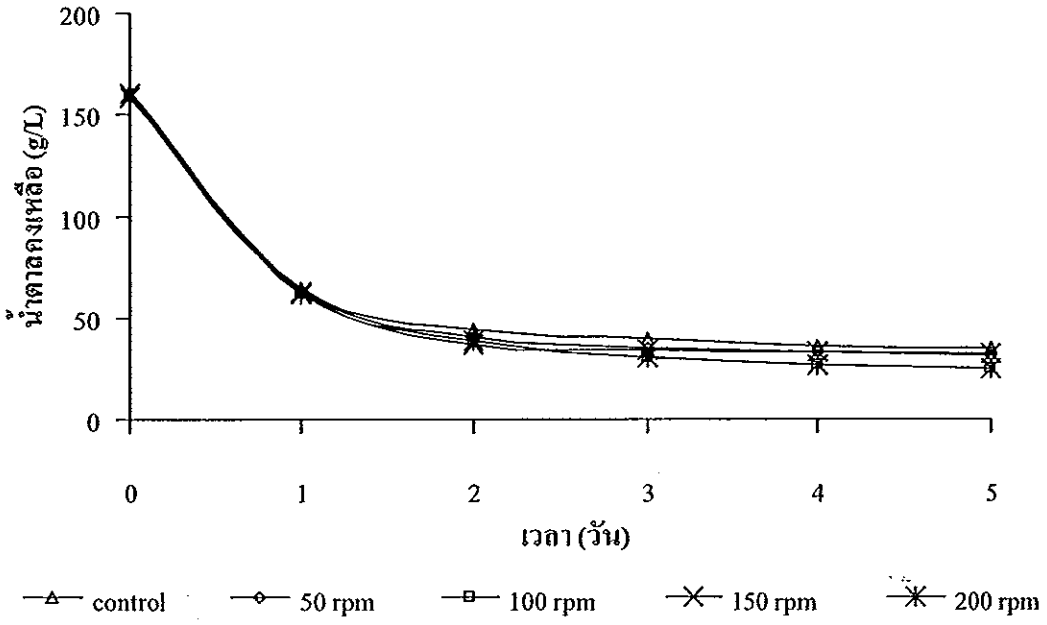
สำหรับยีสต์ Y_{14} สามารถลดปริมาณน้ำตาลได้ดีที่สุดเท่ากับ 85.96 ± 0.49 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจนถึง 100 รอบต่อนาที โดยมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในวันที่ 5 เท่ากับ 24.66 ± 1.91 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 158.2 ± 0.533 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่าดังกล่าวทำให้ยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่พบว่ายีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลลดลงเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 150 และ 200 รอบต่อนาที (ตารางที่ 3-18) โดยยีสต์ Y_{14} สามารถใช้น้ำตาลได้มากที่สุดในช่วงวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ในวันที่ 5 ในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 3-13)

เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที พบว่ายีสต์ Y_{14} มีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยหลังจากการเลี้ยงเชื้อในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 3-18)

ตารางที่ 3-18 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ความเร็วรอบการเขย่า (รอบ/นาที)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	76.18 ± 0.55^{a}	0.04 ± 0.04^{a}	3.12 ± 0.07
50	82.29 ± 1.91^{b}	0.03 ± 0.09^{a}	3.08 ± 0.31
100	85.96 ± 0.49^{c}	0.02 ± 0.16^{a}	3.03 ± 0.05
150	79.14 ± 0.84^{d}	0.04 ± 0.10^{a}	3.29 ± 0.17
200	77.92 ± 0.72^{d}	0.03 ± 0.08^{a}	3.20 ± 0.14

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-13 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงยีสต์ Y14 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 50, 100, 150, 200 รอบต่อนาที และชุดควบคุม (ไม่มีการเขย่า) ที่อุณหภูมิห้อง

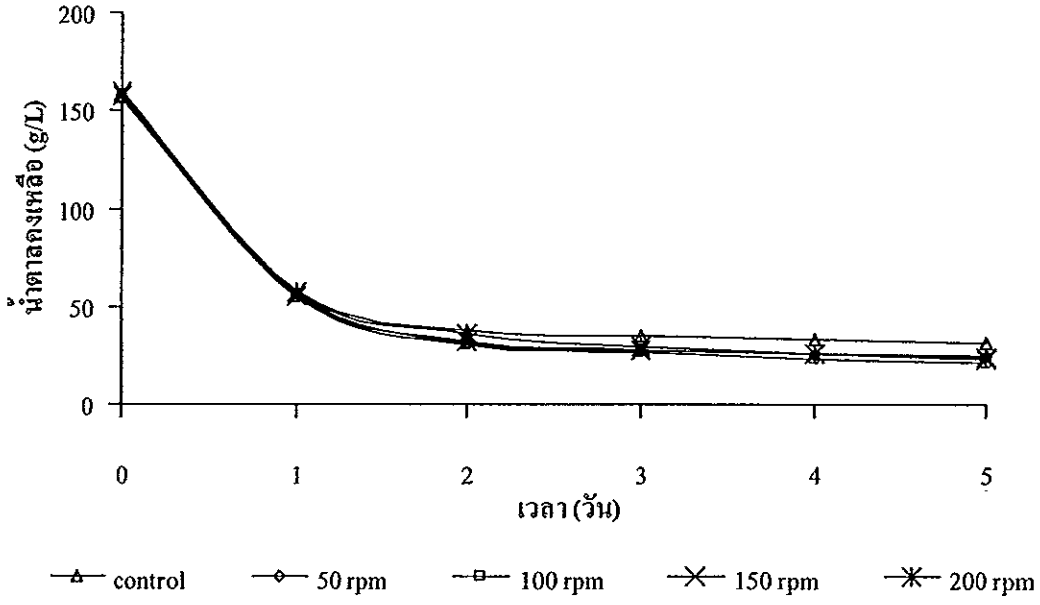
เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุที่มีการเขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ทำให้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 87.02 ± 1.16 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในวันที่ 5 เท่ากับ 21.69 ± 2.25 กรัม/ลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 155.3 ± 1.89 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่าดังกล่าวทำให้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-19) และสามารถใช้น้ำตาลได้มากที่สุดในช่วงวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ในวันที่ 5 ในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 3-14)

เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในน้ำอัดลมหมดอายุที่มีเขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อผสมมีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) และพบว่าน้ำอัดลมหมดอายุจากทุกชุดการทดลองมีค่าพีเอชลดลงหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (ตารางที่ 3-19)

ตารางที่ 3-19 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ความเร็วรอบการเขย่า (รอบ/นาที)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	79.13 ± 1.06[a]	0.03 ± 0.21[a]	3.36 ± 0.15
50	84.03 ± 0.36[b]	0.03 ± 0.16[a]	3.29 ± 0.08
100	87.02 ± 1.16[c]	0.02 ± 0.07[a]	3.22 ± 0.07
150	84.94 ± 0.80[b]	0.03 ± 0.13[a]	3.23 ± 0.26
200	84.12 ± 0.63[b]	0.04 ± 0.11[a]	3.36 ± 0.13

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-14 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} ในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 50, 100, 150, 200 และชุดควบคุม (ไม่มีการเขย่า) ที่อุณหภูมิห้อง

ผลจากการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลของจุลินทรีย์คัดแยก พบว่า เชื้อผสมมีความสามารถในการกำจัดน้ำตาลได้ดีที่สุดเท่ากับ 87.02 ± 1.164 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที รองลงมาคือ ยีสต์ Y_{14} และ แบคทีเรีย B_6 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลได้เท่ากับ 85.96 ± 0.49 และ 80.29 ± 0.71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงที่สภาวะการเขย่าเท่ากับ 100 และ 150 รอบต่อนาที ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการลดปริมาณน้ำตาลของจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม โดยใช้เลี้ยงเชื้อเริ่มต้นในสภาวะการเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสม พบว่า เชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลได้ดีกว่าแบคทีเรีย B_6 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลของเชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ Y_{14} (ตารางที่ 3-20) ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} นำไปใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ

ตารางที่ 3-20 ความเร็วรอบการเขย่าที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลและค่า $Y_{X/S}$ ของจุลินทรีย์ B_6, Y_{14} และเชื้อผสม เมื่อเลี้ยงในน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6, 4 และ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 2, 1 และ 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10, 5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

จุลินทรีย์	ความเร็วรอบการเขย่า (รอบต่อนาที)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)
B_6	10	80.29 ± 0.71^{a}	0.02 ± 0.07^{a}
Y_{14}	5	85.96 ± 0.49^{b}	0.02 ± 0.16^{a}
เชื้อผสม	5	87.02 ± 1.16^{b}	0.02 ± 0.07^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกในน้ำอัดลมหมดอายุจะใช้ความเร็วรอบในการเขย่าที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียต้องการความเร็วรอบในการเขย่ามากกว่ายีสต์และเชื้อผสม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่นๆ ที่ทำการศึกษาการบำบัดน้ำกากส่าโดยจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ Krzywonos *et al.* (2009) รายงานว่า การใช้เชื้อผสมของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำกากส่าต้องใช้อัตราการกวนผสมเท่ากับ 250 รอบต่อนาที ในขณะที่การบำบัดน้ำกากส่าด้วยเชื้อยีสต์ *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246 ใช้ความเร็วรอบในการเขย่าน้อยกว่าแบคทีเรีย คือ 125 รอบต่อนาที (Tondee *et al.*, 2007) ซึ่งใกล้เคียงกับการบำบัดน้ำกากส่าโดย

เชื้อผสมระหว่างยีสต์กับแบคทีเรียโดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที (Malandra *et al.*, 2003)

3.5 สมบัติของน้ำหมักอีเอ็มที่เตรียมจากกากน้ำตาลและน้ำอัดลมหมดอายุ

ผลจากการศึกษาลักษณะสมบัติของน้ำหมักอีเอ็มหลังจากการหมักเป็นเวลา 7 วัน โดยสังเกตสี กลิ่น การเกิดฝ้า และวัดค่าพีเอช (ตารางที่ 3-21) พบว่า น้ำหมักอีเอ็มทุกสูตรมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล มีกลิ่นหอมจากการหมัก โดยน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 มีสีเข้มที่สุด เนื่องจากใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการขยายหัวเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 และสูตร 3 ซึ่งขยายเชื้อโดยใช้น้ำอัดลมหมดอายุ นอกจากนี้ พบการสร้างฝ้าสีขาวปกคลุมผิวหน้าของน้ำหมักอีเอ็ม โดยน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 มีชั้นของฝ้าหนากว่าสูตร 2 เมื่อวัดค่าพีเอชของน้ำหมักอีเอ็ม พบว่า ทุกสูตรมีค่าพีเอชใกล้เคียงกันซึ่งมีสภาวะที่เป็นกรด โดยสูตรที่ใช้น้ำอัดลมเป็นวัตถุดิบในขยายหัวเชื้อมีค่าพีเอชต่ำกว่าการใช้กากน้ำตาล และน้ำหมักอีเอ็มที่ได้จากการวิจัยนี้มีสมบัติสอดคล้องกับน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากงานวิจัยอื่นๆ คือ มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล กลิ่นหอมจากการหมัก และมีสภาวะที่เป็นกรดเช่นเดียวกัน (วรรณลดา สุนันทพงศ์ศักดิ์ อ้างถึงใน นัยนา ศรีชัยและคณะ, 2547; ดวงพร คันธโชติ และคณะ, 2548)

ตารางที่ 3-21 สมบัติของน้ำหมักอีเอ็ม

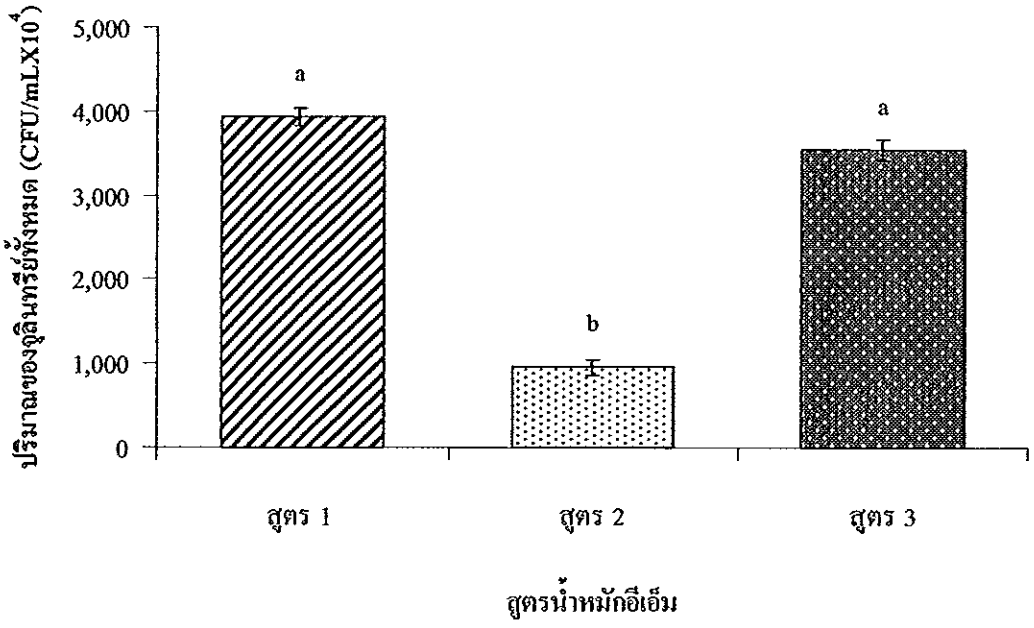
สูตรน้ำหมักอีเอ็ม	สี	กลิ่น	การเกิดฝ้า	พีเอช
สูตร 1 อีเอ็มดิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ (1:1:20)	น้ำตาลเข้ม	หอม	สีขาว ชั้นหนา	3.89
สูตร 2 อีเอ็มดิวเซ: น้ำอัดลม: น้ำ (1:1:20)	น้ำตาล	หอม	สีขาว ชั้นบาง	3.56
สูตร 3 อีเอ็มดิวเซ: น้ำอัดลม: น้ำ (1: 6: 20)	น้ำตาล	หอม	สีขาว ชั้นหนา	3.33

หมายเหตุ: หอมเป็นกลิ่นที่เกิดจากการหมักที่ดี

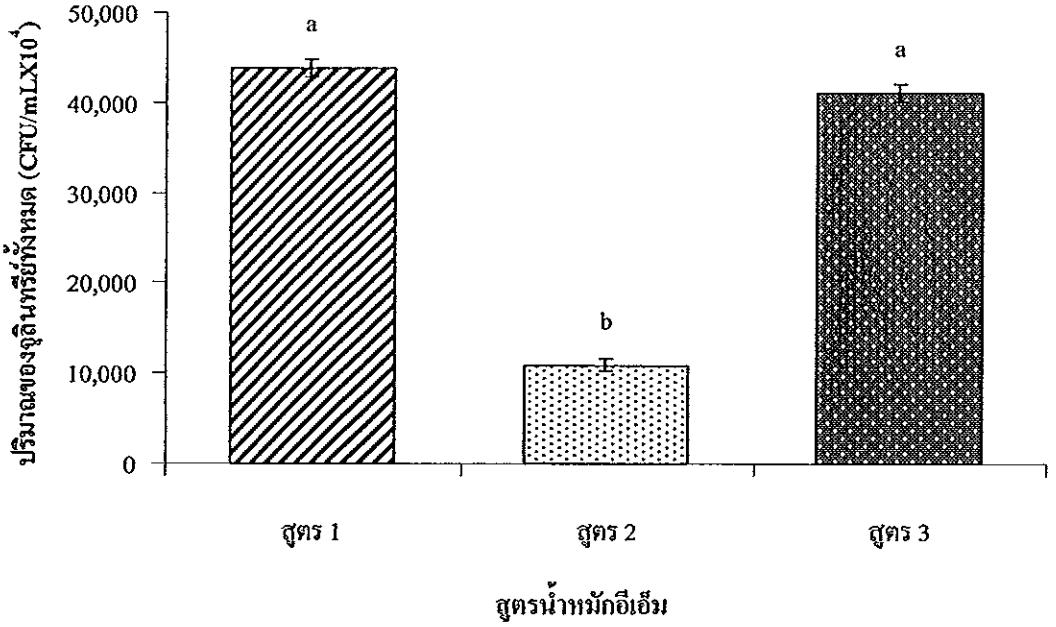
3.6 การคัดเลือกสูตรน้ำหมักอีเอ็มเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำอัดลม

3.6.1 การคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 1 (primary screening) โดยพิจารณาจากปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็มแต่ละสูตรด้วยวิธีการ spread plate และ pour plate

ผลจากการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็มทั้ง 3 สูตร ด้วยวิธีการ spread plate พบว่า หลังจากการหมักเป็นเวลา 7 วัน น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 (อีเอ็มดิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20) มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ $3.9\times10^{7} \pm 9.8\times10^{5}$ CFU/mL เนื่องจากน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการขยายหัวเชื้อซึ่งในกากน้ำตาลมีองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มากกว่าในน้ำอัดลม เช่น ไนโตรเจน ฟอสเฟต และซัลเฟต ฯลฯ (สืบศักดิ์ กลิ่นสอน และคณะ, 2547) รองลงมาคือ น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 (อีเอ็มดิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1: 6: 20) และสูตร 2 (อีเอ็มดิวเซ: น้ำอัดลมหมดอายุ: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20) ซึ่งมีจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ $3.5\times10^{7} \pm 1.0\times10^{6}$ และ $9.5\times10^{6} \pm 8.6\times10^{5}$ CFU/mL ตามลำดับ โดยพบว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากน้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 มีสัดส่วนของปริมาณน้ำตาลน้อยกว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 แต่จากการเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 3-15 (ก)) และผลจากการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็มด้วยวิธีการ pour plate พบว่า หลังจากหมักเป็นเวลา 7 วัน น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 (อีเอ็มดิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20) มีจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ $4.4\times10^{8} \pm 8.1\times10^{6}$ รองลงมาคือ น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 (อีเอ็มดิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1: 6: 20) และสูตร 2 (อีเอ็มดิวเซ: น้ำอัดลมหมดอายุ: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20) เช่นเดียวกับการนับจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ Spread plate ซึ่งมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ $4.1\times10^{8} \pm 9.7\times10^{6}$ และ $1.1\times10^{8} \pm 8.8\times10^{5}$ CFU/mL ตามลำดับ โดยพบว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากในน้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 มีปริมาณน้ำตาลน้อยกว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 แต่จากการเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 3-15 (ข))



(ก)



(ข)

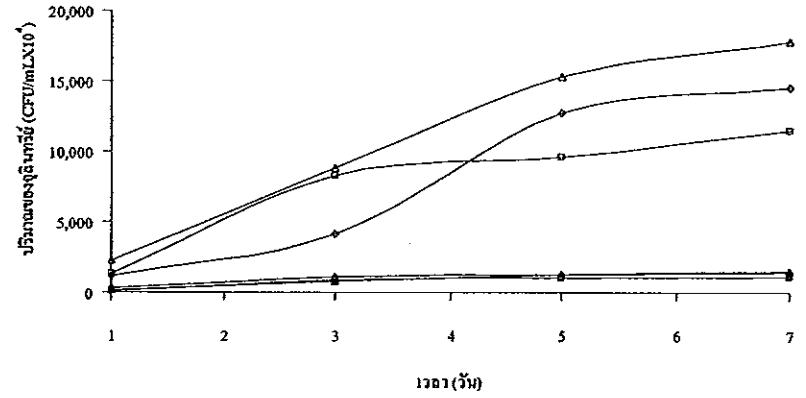
ภาพที่ 3-15 ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็ม 3 สูตร จากวิธีการ spread plate (ก) และ pour plate (ข) เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

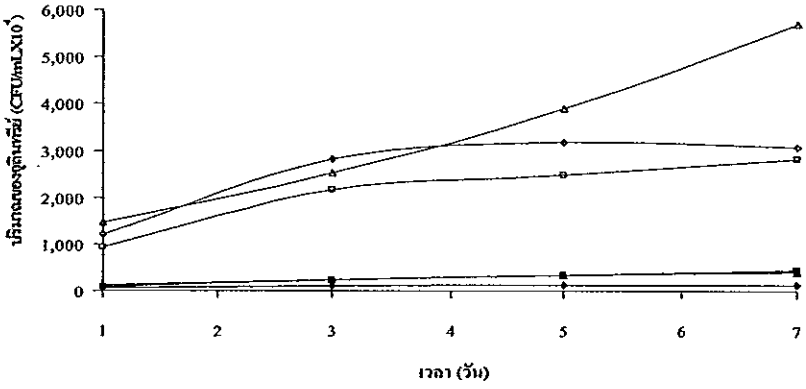
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ และแนวโน้มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มทั้ง 3 สูตร ด้วยวิธีการ spread plate และ pour plate พบว่า หลังจากการหมักเป็นเวลา 7 วัน น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 ประกอบด้วยแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกมากที่สุด รองลงมาคือ แบคทีเรียทั้งหมดและยีสต์ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.4\times10^{7} \pm 3.4\times10^{5}$, $1.1\times10^{7} \pm 4.2\times10^{5}$ และ $1.1\times10^{7} \pm 8.4\times10^{4}$ CFU/mL จากวิธีการ spread plate และมีปริมาณเท่ากับ $1.8\times10^{8} \pm 3.2\times10^{5}$, $1.2\times10^{8} \pm 2.6\times10^{6}$ และ $1.8\times10^{8} \pm 5.1\times10^{6}$ จากวิธีการ pour plate โดยจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ มีปริมาณใกล้เคียงกัน เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 พบว่า จุลินทรีย์ทุกกลุ่มสามารถเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 7 (ภาพที่ 3-16 (ก))

สำหรับน้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 จากวิธีการ spread plate ประกอบด้วยยีสต์มากที่สุด รองลงมาคือ แบคทีเรียสร้างกรดแลคติก และแบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $4.4\times10^{6} \pm 2.6\times10^{4}$, $4.0\times10^{6} \pm 4.4\times10^{6}$ และ $1.2\times10^{6} \pm 2.4\times10^{4}$ CFU/mL และวิธีการ pour plate ประกอบด้วยแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกมากที่สุด รองลงมาคือ ยีสต์ และแบคทีเรียทั้งหมดซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $5.7\times10^{7} \pm 1.6\times10^{4}$, $2.8\times10^{7} \pm 2.4\times10^{4}$ และ $2.4 \times10^{7} \pm 4.2\times10^{3}$ CFU/mL โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 7 ยกเว้นแบคทีเรียทั้งหมดมีปริมาณลดลงในวันที่ 7 เนื่องจากน้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 มีปริมาณน้ำตาลน้อยกว่าสูตร 1 และสูตร 3 เมื่อเวลาระยะเวลาการหมักนานขึ้นอาจจะทำให้ปริมาณน้ำตาลไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (ภาพที่ 3-16 (ข)) ขณะที่น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 จากวิธีการ spread plate ประกอบด้วยแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกมากที่สุด รองลงมาคือ ยีสต์ และแบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.4\times10^{7} \pm 2.5\times10^{5}$, $1.2\times10^{7} \pm 3.3\times10^{5}$ และ $9.7\times10^{6} \pm 6.2\times10^{5}$ CFU/mL และวิธีการ pour plate ประกอบด้วยแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกมากที่สุด รองลงมาคือ แบคทีเรียทั้งหมด และยีสต์ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.5\times10^{8} \pm 3.6\times10^{6}$, $1.4\times10^{8} \pm 5.2\times10^{5}$ และ $1.2 \times10^{8} \pm 3.4\times10^{5}$ CFU/mL โดยจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ มีปริมาณใกล้เคียงกัน และพบว่าจุลินทรีย์ทุกกลุ่มในน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 สามารถเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 7 เช่นเดียวกับน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 แต่พบว่า จุลินทรีย์ มีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 เล็กน้อย (ภาพที่ 3-16 (ค))

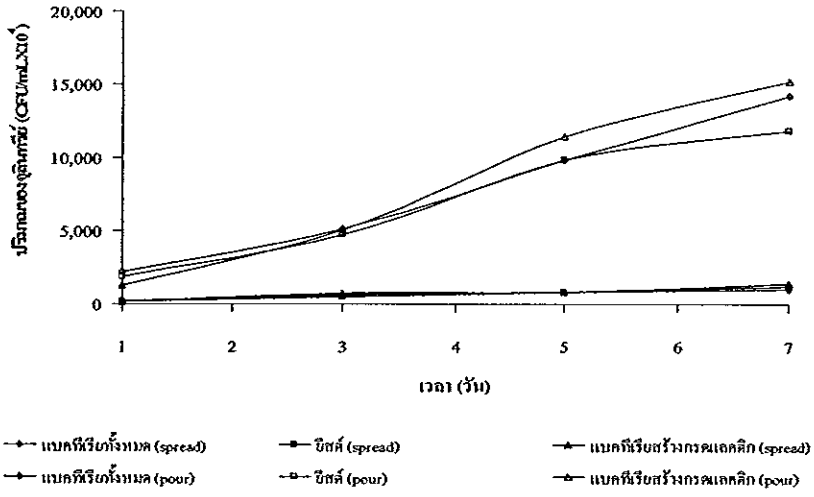
นอกจากนี้พบว่า น้ำหมักอีเอ็มทุกสูตรมีปริมาณเชื้อราน้อยกว่า 30 โคโลนี สอดคล้องกับงานวิจัยของ ศิริพร กลอดแก้ว (2552) ซึ่งเตรียมน้ำหมักอีเอ็มโดยใช้กากน้ำตาลเป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ในอัตราส่วนของอีเอ็มคิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 3-16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ในน้ำหมักอีเอ็ม 3 สูตร หลังจากการหมักที่ระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ด้วยวิธีการ spread plate และ pour plate ประกอบด้วย น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 (ก) น้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 (ข) และน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 (ค)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจนับด้วยวิธีการ spread plate และวิธีการ pour plate พบว่า จุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็มทุกสูตรที่นับได้จากวิธีการ Pour plate มีปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์ที่นับได้จากวิธีการ Spread plate เนื่องจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในหัวเชื้ออีเอ็มมีทั้งกลุ่มที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศอาศัยอยู่รวมกัน (สุพรชัย มั่งมีสิทธิ์, 2547) ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศสามารถเจริญได้เพิ่มขึ้นจากการนับเชื้อด้วยวิธีการ pour plate (Means *et al.*, 1981)

จากการศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในน้ำหมักอีเอ็มด้วยวิธีการ spread plate และ pour plate พบว่า เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก เนื่องจากบรรจุภัณฑ์ของหัวเชื้ออีเอ็มมีลักษณะแบบปิดซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก และยังเป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นที่สามารถตรวจพบในน้ำสกัดชีวภาพที่ได้จากพืชเช่นกัน เนื่องจากน้ำสกัดชีวภาพจากพืชมีปริมาณน้ำตาลสูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หรือ 7.14 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ซึ่งเป็นปริมาณน้ำตาลที่มากพอสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ และทำการหมักในสภาวะที่มีปริมาณอากาศจำกัด จึงทำให้แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ (Bacttcock and Azam-Ali, 2003 อ้างถึงใน ดวงพร คันธโชติ และคณะ, 2548) และอาจจะมีจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์เจริญได้ในน้ำสกัดชีวภาพอีกด้วย (ดวงพร คันธโชติ และนาตยา ทับกระแดะ, 2538; ดวงพร คันธโชติ และไกรสร พุ่มพวง, 2538 อ้างถึงใน ดวงพร คันธโชติ และคณะ, 2548) ในขณะที่สุภาพร พงศ์ธรพฤกษ์ (2549) รายงานว่า จุลินทรีย์ที่พบในน้ำหมักชีวภาพส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกและยีสต์ และสามารถพบแบคทีเรีย สังเคราะห์แสงได้เช่นกันแต่มีปริมาณน้อยกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ สำหรับกลุ่มจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มที่มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย คือ แบคทีเรียในตระกูล *Bacillus* spp. โดยเฉพาะ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* นอกจากนี้ พบว่า อาจจะมีจุลินทรีย์ในจีนัสอื่นๆ อีกด้วย เช่น *Saccharomyces*, *Enterococci* (*Streptococcus*) และ *Lactobailli* แต่ไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อ *Escherichia coli* (วรรณลดา สุนันทพงศ์ศักดิ์ อ้างถึงใน นัยนา ศรีชัย และคณะ, 2547)

3.6.2 การคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 2 (secondary screening) โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล

จากการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมัก 3 สูตร พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และ 3 มีปริมาณจุลินทรีย์มากกว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และ 3 มาใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ผลจากการศึกษา พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 (อีเอ็มคิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20) มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลได้ดีกว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 (หัวเชื้ออีเอ็ม: น้ำอัดลมหมดอายุ: น้ำ เท่ากับ 1: 6: 20) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากับ 77.10 ± 1.91 และ 75.65 ± 1.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลของชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ในสภาวะปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ พบว่า ชุดควบคุมในสภาวะไม่ปลอดเชื้อมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลสูงกว่าชุดควบคุมในสภาวะปลอดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากับ 4.20 ± 0.08 และ 0.13 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3-22) เนื่องจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำอัดลมหมดอายุในระหว่างการเก็บตัวอย่าง และพบว่าจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มทั้ง 2 สูตร สามารถใช้น้ำตาลได้ดีในช่วงวันที่ 1-3 หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยและเริ่มจนถึงวันที่ 5 (ภาพที่ 3-17)

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มทั้ง 2 สูตร พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีค่า $Y_{x/s}$ ต่ำกว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.04 และ 0.03 g_x/g_s ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชหลังจากเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 ลงในน้ำอัดลมหมดอายุ ทำให้น้ำอัดลมหมดอายุมีค่าพีเอชลดลงซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.03 และ 3.02 จากค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.17 และ 3.14 ตามลำดับ (ตารางที่ 3-22)

ตารางที่ 3-22 ผลการคัดเลือกสูตรของน้ำหมักอีเอ็มโดยพิจารณาประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

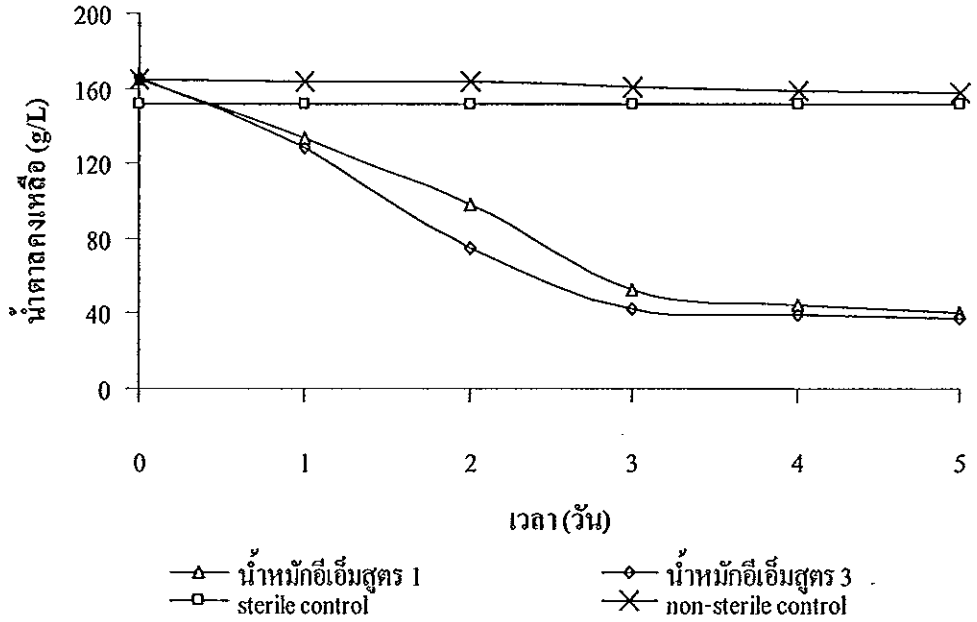
น้ำหมักอีเอ็ม	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
สูตร 1	77.10 ± 1.91 [a]	0.04 ± 0.05 [a]	3.03 ± 0.13
สูตร 3	75.65 ± 1.47 [a]	0.03 ± 0.14 [a]	3.02 ± 0.08
ชุดควบคุม (ปลอดเชื้อ)	0.13 ± 0.07 [b]	0.02 ± 0.04 [a]	3.10 ± 0.10
ชุดควบคุม (ไม่ปลอดเชื้อ)	4.20 ± 0.08 [c]	0.02 ± 0.07 [a]	3.11 ± 0.05

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

สูตร 1 อีเอ็มคิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ (1: 1: 20)

สูตร 2 อีเอ็มคิวเซ: น้ำอัดลมหมดอายุ: น้ำ (1: 1: 20)

สูตร 3 อีเอ็มคิวเซ: น้ำอัดลมหมดอายุ: น้ำ (1: 6: 20)



ภาพที่ 3-17 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง

เนื่องจากน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลน้อยกว่าสูตร 1 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุแทนน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 ซึ่งใช้ต้นทุนในการผลิตน้อยกว่า เนื่องจากมีการใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นวัตถุดิบในการขยายหัวเชื้อแทนการใช้กากน้ำตาล

3.7 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3

3.7.1 ปริมาณน้ำหมักอีเอ็มที่เหมาะสม

ผลจากการศึกษาพบว่า เมื่อเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ในน้ำอัดลมหมดอายุ ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 74.65 ± 0.49 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 46.58 ± 3.107 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 158.22 ± 4.21 กรัมต่อลิตร และการเติมน้ำหมักอีเอ็มในปริมาณดังกล่าว ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-23) โดยน้ำหมักอีเอ็มสามารถใช้น้ำตาลได้มากที่สุดในช่วงวันที่ 1-4 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 5 ในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 3-18) แต่จากการทดลองใช้น้ำหมักอีเอ็มในการบำบัดน้ำทิ้งของบริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลมที่เป็นกรณีศึกษา โดยใช้อัตราส่วนของการเตรียมน้ำหมักอีเอ็มคือ หัวเชื้ออีเอ็ม: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20 เช่นกัน พบว่า การใช้

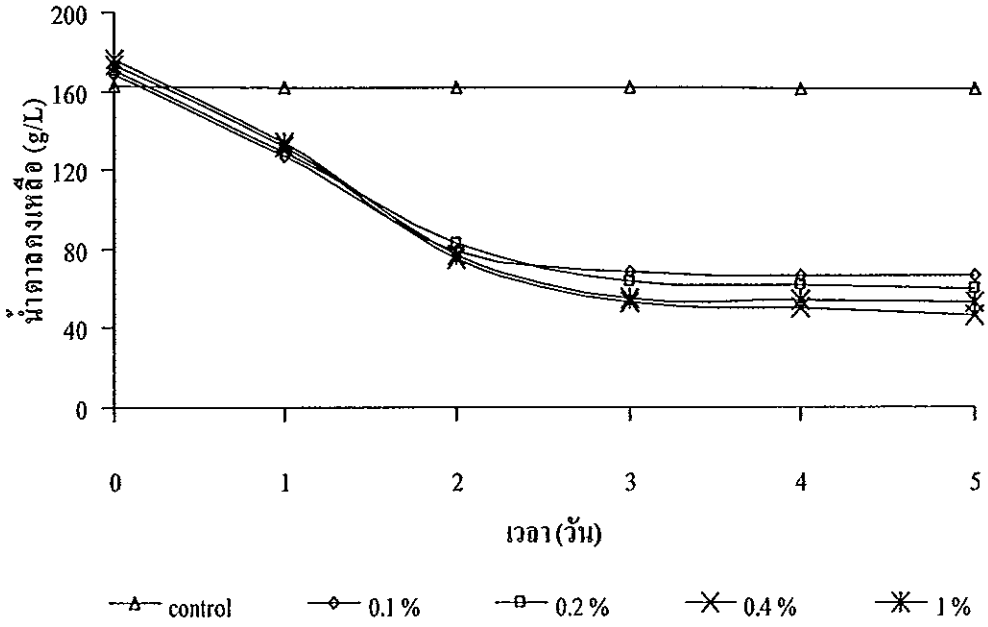
น้ำหมักอีเอ็มในปริมาณที่น้อยกว่าคือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีสูงสุด เนื่องจากน้ำทิ้งของบริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลมมีค่าความสกปรกน้อยกว่าน้ำอัดลมหมดอายุ รวมทั้งน้ำหมักอีเอ็มมีการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการขยายหัวเชื้อหากเติมในปริมาณที่มากเกินไปจะเป็นการเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งอีกด้วย (ข้อมูลจากบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน))

หลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในน้ำอัดลมเป็นเวลา 5 วัน พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีค่า $Y_{X/S}$ ไม่แตกต่างทางสถิติจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มเท่ากับ 0.2 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$) แต่มีค่า $Y_{X/S}$ สูงกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) และชุดการทดลองที่เติมน้ำหมักอีเอ็มในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างทางกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และพบว่าการเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่าพีเอชของน้ำอัดลมหมดอายุลดลง (ตารางที่ 3-23)

ตารางที่ 3-23 ผลของปริมาณน้ำหมักอีเอ็มต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ปริมาณน้ำหมักอีเอ็ม (เปอร์เซ็นต์)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	1.06 ± 0.15^{a}	0.01 ± 0.03^{a}	3.32 ± 0.08
0.1	60.54 ± 0.36^{b}	0.01 ± 0.12^{a}	3.18 ± 0.17
0.2	65.92 ± 0.47^{c}	0.03 ± 0.09^{a}	3.03 ± 0.24
0.4	74.65 ± 0.49^{d}	0.03 ± 0.27^{a}	2.93 ± 0.05
1	69.39 ± 1.03^{e}	0.03 ± 0.04^{a}	3.07 ± 0.11

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-18 การลดลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 1 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) ที่อุณหภูมิห้อง

3.7.2 สภาวะการเขย่าที่เหมาะสม

จากการศึกษาสภาวะการเขย่าที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณน้ำตาลของน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน โดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 50 100 150 และ 200 รอบต่อนาที โดยไม่มีการปรับพีเอชและไม่เติมแหล่งไนโตรเจน พบว่า การเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำอัดลมหมดอายุที่มีการเขย่าที่สภาวะ 50 รอบต่อนาที พบว่า จุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มใช้น้ำตาลได้เกือบหมดซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลเท่ากับ 89.25 ± 2.99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในวันที่ 5 เท่ากับ 33.7 ± 3.26 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 172.49 ± 0.85 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะดังกล่าวทำให้น้ำหมักอีเอ็มมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-24) เนื่องจากในหัวเชื้ออีเอ็มมีจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ไม่ต้องการอากาศเจริญอยู่ด้วย หากถ้ามีการเขย่ามากจนเกินไปจะเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในถังบำบัดซึ่งจะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ใช้อากาศ (มั่นสิน ตัณฑุลเวศน์, 2542)

โดยทุกชุดการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ในน้ำหมักใช้น้ำตาลได้มากที่สุดในวันที่ 1-4 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นมีปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 5 (ภาพที่ 3-19)

หลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในน้ำอัดลมหมดอายุเป็นเวลา 5 วัน ในสภาวะที่มีการเขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 50 รอบต่อนาที พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีค่า $Y_{x/s}$ ไม่แตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ ($p > 0.05$) แต่มีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองที่เขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 150 รอบต่อนาที โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และพบว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีค่าพีเอชลดลงหลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 เป็นเวลา 5 วัน ในสภาวะที่เขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 50 รอบต่อนาที (ตารางที่ 3-24)

ตารางที่ 3-24 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบต่อนาที)	ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	พีเอชหลังจากการเลี้ยงเชื้อ
ชุดควบคุม	77.48 ± 1.19^{a}	0.02 ± 0.04^{a}	3.08 ± 0.08
50	85.25 ± 2.99^{b}	0.02 ± 0.27^{a}	2.90 ± 0.11
100	76.80 ± 0.88^{a}	0.02 ± 0.31^{a}	3.04 ± 0.07
150	73.88 ± 0.83^{c}	0.03 ± 0.10^{a}	3.23 ± 0.12
200	71.82 ± 0.59^{c}	0.02 ± 0.12^{a}	3.18 ± 0.04

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

สำหรับเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล ซีโอดี บีโอดีและความเข้มสีสูงสุดเท่ากับ 81.10 ± 1.93, 78.07 ± 1.38, 80.24 ± 0.56 และ 6.75 ± 0.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อมีการปรับสภาวะของน้ำอัดลมหมดอายุ (ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$) เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร) ร่วมกับการกวนผสมด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที โดยมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเชื้อผสมมีค่า $Y_{X/S}$ ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองที่มีการปรับสภาวะของน้ำอัดลม ($p > 0.05$) นอกจากนี้พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุมีค่าพีเอชลดลงเท่ากับ 4.26 ± 0.03 หลังจากการบำบัดเป็นเวลา 7 วัน จากพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 (ตารางที่ 3-26)

ในขณะที่การกวนผสมด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 50 รอบต่อนาที ทำให้หมักอีเอ็มสูตร 3 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล ซีโอดี บีโอดีและความเข้มสีสูงสูงกว่าชุดควบคุม (ไม่มีการกวนผสม) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากับ 84.14 ± 0.54, 80.16 ± 0.37, 84.14 ± 0.96 และ 5.46 ± 0.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่น้ำหมักอีเอ็มมีค่า $Y_{X/S}$ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุม ($p > 0.05$) และพบว่าน้ำอัดลมหมดอายุที่ผ่านการบำบัดด้วยน้ำหมักอีเอ็มมีค่าพีเอชลดลงเท่ากับ 3.18 ± 0.14 จากค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.46 ± 0.21 (ตารางที่ 3-27)

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล ซีโอดี บีโอดีและความเข้มสีของยีสต์ Y_{14}, เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} และน้ำหมักอีเอ็มในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่ม พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 สามารถลดปริมาณน้ำตาลได้มากที่สุด รองลงมาคือ เชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลเท่ากับ 84.03 ± 0.54, 81.10 ± 1.93 และ 79.72 ± 0.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในวันที่ 7 เท่ากับ 26.42 ± 8.95, 29.24 ± 8.93 และ 31.40 ± 10.50 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 165.39 ± 0.51, 154.70 ± 0.26 และ 154.81 ± 0.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยน้ำหมักอีเอ็มมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงกว่าเชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลของเชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3-28)

การเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2-5 วันแรก ขณะที่การใช้เชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} ทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 1-3 ของการบำบัด หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 7 (ภาพที่ 3-21) ผลการศึกษาพบว่า น้ำหมักอีเอ็ม เชื้อผสม และยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลได้น้อยกว่างานวิจัยอื่นๆ ซึ่งใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเช่นกัน

Tondee และ Sirianuntapiboon (2008) รายงานว่า แบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* No.PV71-1861 สามารถลดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำกากส่าจากกระบวนการผลิตสุราได้เท่ากับ 95.9 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ภายใต้สภาวะกึ่งไร้อากาศ เมื่อมีการปรับสภาวะของน้ำกากส่าให้เหมาะสมโดยการเติมสารอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส, yeast extract, KH_2PO_4 และ $MgSO_4.7H_2O$ ในปริมาณ 2, 0.4, 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำกากส่าเท่ากับ 6 ขณะที่การบำบัดน้ำกากส่าโดยใช้เชื้อผสมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จำนวน 7 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 94.34 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 5 วัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำกากส่าที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ภายใต้สภาวะที่มีการกวนผสม การเติมอากาศ (Krzywonos *et al.*, 2009) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่างานวิจัยครั้งนี้เติมสารอาหารในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่านั้น จึงมีประสิทธิภาพน้อยกว่างานวิจัยอื่นๆ

ตารางที่ 3-25 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุของยีสต์ Y_{14} ที่สภาวะต่างๆ และชุดควบคุม หลังจากเลี้ยงเชื้อในน้ำอัดลมหมดอายุที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ชุดการทดลอง	% Sugar removal	% COD removal	% BOD removal	% Color removal	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	ค่าพีเอชหลังจากการบำบัด
ชุดควบคุม *	72.51 ± 0.79^{a}	70.04 ± 0.75^{a}	74.45 ± 1.69^{a}	5.64 ± 0.15^{a}	0.04 ± 0.03^{a}	3.74 ± 0.03
ปรับสภาวะ **	73.18 ± 0.91^{a}	72.92 ± 0.63^{b}	74.26 ± 0.78^{a}	6.28 ± 0.47^{b}	0.04 ± 0.03^{a}	3.58 ± 0.10
กวนผสม ***	78.32 ± 0.65^{b}	74.71 ± 0.50^{c}	77.37 ± 0.66^{b}	7.94 ± 0.76^{c}	0.05 ± 0.03^{a}	3.43 ± 0.03
ปรับสภาวะและกวนผสม ****	79.72 ± 0.59^{b}	75.04 ± 0.48^{c}	77.56 ± 0.76^{b}	8.12 ± 0.32^{c}	0.02 ± 0.03^{b}	3.36 ± 0.10

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

* ไม่มีการปรับสภาวะและกวนผสม

** ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร

*** กวนผสมด้วยอัตราความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที

**** ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร และกวนผสมด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที

ตารางที่ 3-26 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุของเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} ที่สภาวะต่างๆและชุดควบคุม หลังจากเลี้ยงเชื้อในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ชุดการทดลอง	% Sugar removal	% COD removal	% BOD removal	% Color removal	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	ค่าพีเอชหลังจากการบำบัด
ชุดควบคุม *	73.90 ± 0.51^{a}	73.38 ± 0.67^{a}	77.56 ± 0.76^{a}	4.18 ± 0.44^{a}	0.04 ± 0.03^{a}	4.74 ± 0.08
ปรับสภาวะ **	74.61 ± 0.90^{a}	74.88 ± 1.09^{b}	77.67 ± 0.59^{a}	4.52 ± 0.77^{b}	0.03 ± 0.14^{ab}	4.50 ± 0.17
กวนผสม ***	77.76 ± 0.92^{b}	76.42 ± 0.56^{c}	77.79 ± 0.37^{a}	5.81 ± 0.59^{c}	0.04 ± 0.06^{a}	4.35 ± 0.05
ปรับสภาวะและกวนผสม ****	81.10 ± 1.93^{c}	78.07 ± 1.38^{d}	80.24 ± 0.56^{b}	6.75 ± 0.16^{d}	0.02 ± 0.11^{b}	4.26 ± 0.03

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

* ไม่มีการปรับสภาวะและกวนผสม

** ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และเติม $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร

*** กวนผสมด้วยคความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที

**** ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร และกวนผสมด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที

ตารางที่ 3-27 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุของน้ำหมักอีเอ็มในสภาวะที่มีการกวนผสมและชุดควบคุม หลังจากเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ชุดการทดลอง	% Sugar removal	% COD removal	% BOD removal	% Color removal	$Y_{X/S}$ (g_X/g_S)	ค่าพีเอชหลังจากการบำบัด
ชุดควบคุม *	77.42 ± 0.51^{a}	77.06 ± 0.64^{a}	80.55 ± 0.97^{a}	2.53 ± 0.16^{a}	0.03 ± 0.09^{a}	3.23 ± 0.23
กวนผสม **	84.03 ± 0.54^{b}	80.16 ± 0.37^{b}	84.14 ± 0.96^{b}	5.46 ± 0.32^{b}	0.02 ± 0.05^{a}	3.18 ± 0.14

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

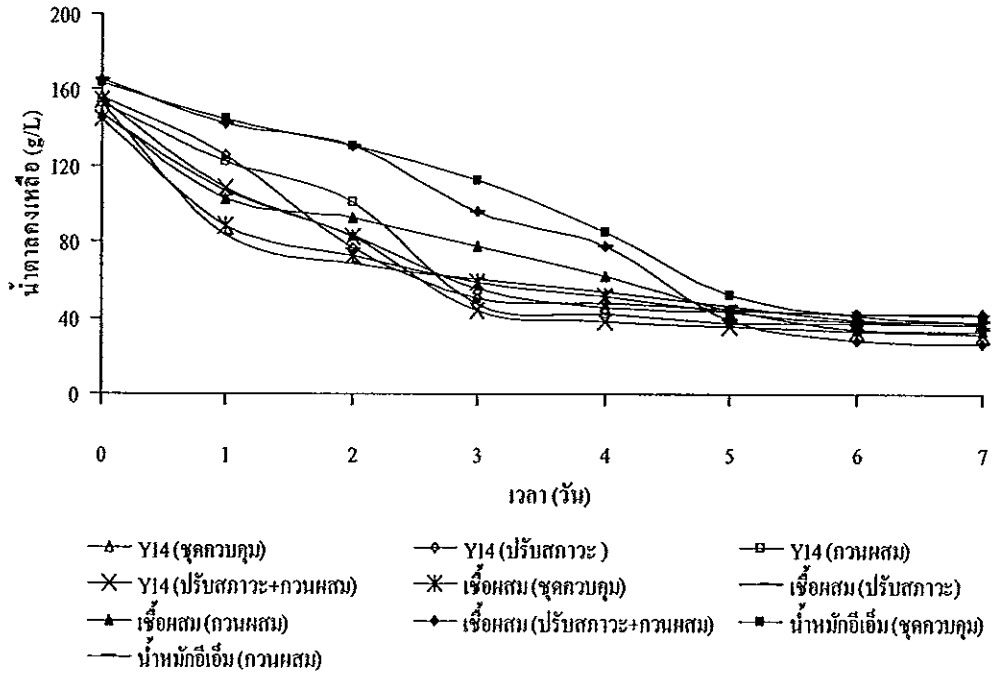
* ไม่มีการปรับสภาวะและกวนผสม

** กวนผสมด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 50 รอบ/นาที

ตารางที่ 3-28 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในสภาวะที่เหมาะสม หลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ชุดการทดลอง	% Sugar removal	% COD removal	% BOD removal	% Color removal	$X_{B/S}$ (g_X/g_S)	ค่าพีเอชหลังจากการบำบัด
ยีสต์ Y_{14}	79.72 ± 0.59^{a}	75.04 ± 0.48^{a}	77.56 ± 0.76^{a}	8.12 ± 0.32^{ab}	0.02 ± 0.03^{a}	3.36 ± 0.10
เชื้อผสม	81.10 ± 1.93^{c}	78.07 ± 1.38^{b}	80.24 ± 0.56^{b}	6.75 ± 0.16^{a}	0.02 ± 0.11^{a}	4.26 ± 0.03
น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3	84.14 ± 0.54^{b}	80.16 ± 0.37^{c}	84.14 ± 0.96^{c}	5.46 ± 0.32^{b}	0.02 ± 0.05^{a}	2.98 ± 0.11

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

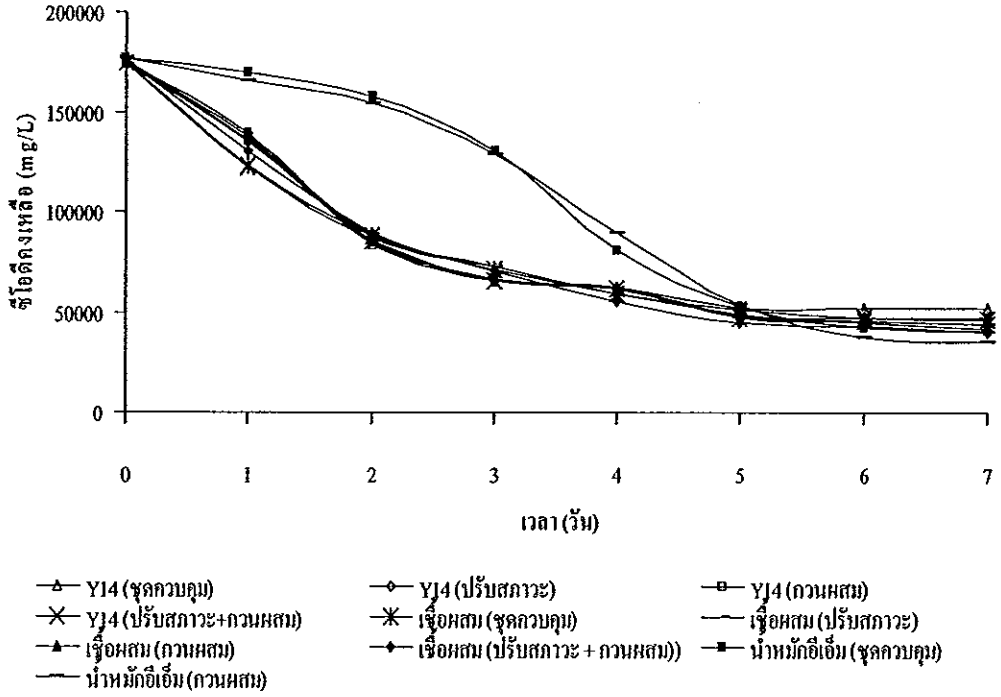


ภาพที่ 3-20 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

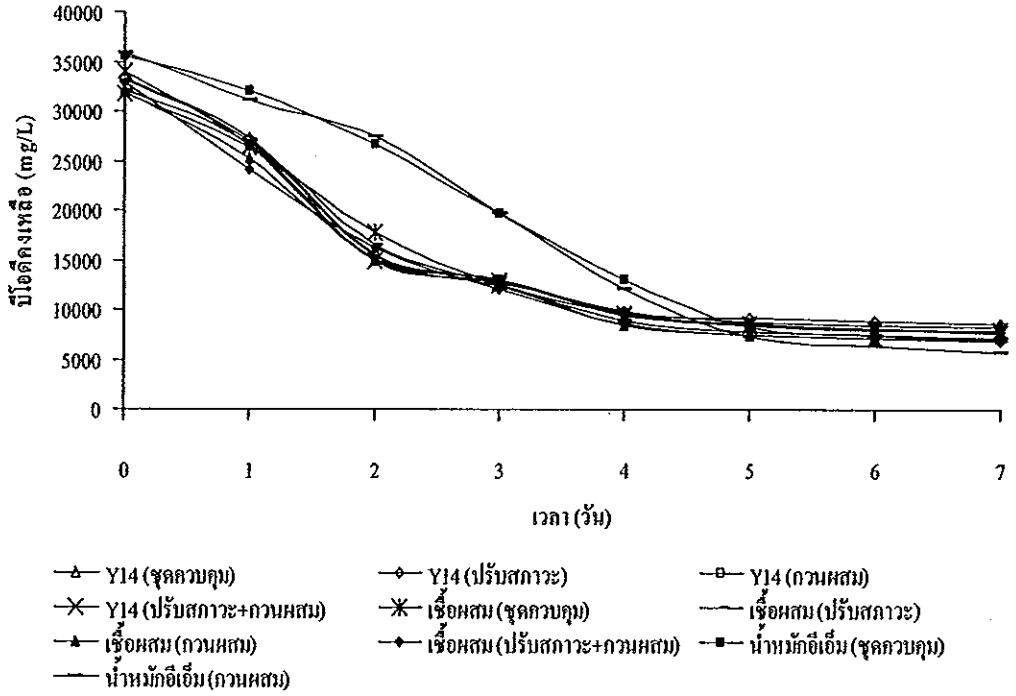
เมื่อพิจารณาความสามารถในการกำจัดสารอินทรีย์โดยวัดในรูปซีโอดีและบีโอดีพบว่า หลังจากการบำบัดเป็นเวลา 7 วัน น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 สามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ได้มากที่สุด รองลงมาคือ เชื้อผสม และยีสต์ Y_{14} ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีเท่ากับ 80.16 ± 0.37, 78.07 ± 1.38 และ 75.04 ± 0.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสามารถลดค่าซีโอดีเหลืออยู่ในวันที่ 7 เท่ากับ 34,261-35,975, 39,185-41,053 และ 43,038-44,184 มิลลิกรัมต่อลิตร จากค่าซีโอดีเริ่มต้นของน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 176,339-177,605, 174,267-175,697 และ 174,202-175,184 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพในการกำจัดบีโอดีเท่ากับ 84.14 ± 0.96, 80.24 ± 0.56 และ 77.56 ± 0.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสามารถลดค่าบีโอดีลงเหลือ 5,420-5,976, 6,303-7,341 และ 7,127-8,143 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 จากค่าบีโอดีเริ่มต้นของน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 35,616-36,240, 32.431-33,827 และ 33,726-34,308 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยน้ำหมักอีเอ็มมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ ในรูปซีโอดีและบีโอดีสูงกว่าเชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-28) ซึ่งการใช้น้ำหมักอีเอ็มในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุทำให้ค่าซีโอดีลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2-5 ขณะที่เชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} สามารถลดค่าซีโอดีได้อย่างรวดเร็วในวันที่ 1-4 หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 7 (ภาพที่ 3-21) และน้ำหมักอีเอ็มมีแนวโน้มในการลดค่าบีโอดีอย่างรวดเร็วในวันที่ 2-5 ขณะที่เชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} สามารถลดค่า

บีโอดีได้อย่างรวดเร็วในวันที่ 1-4 หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 7 (ภาพที่ 3-22) โดยค่าซีโอดีและบีโอดีมีแนวโน้มที่ลดลงสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาล และผลจากการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 เชื้อผสม และยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดบีโอดีได้มากกว่าซีโอดี เนื่องจากน้ำอัดลมหมดอายุมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ง่ายเช่นเดียวกับการใช้ Acetogenic bacteria BP103 ในการบำบัดน้ำกากส่าจากโรงงานสุราแสงโสมที่มีการเจือจาง 10 เท่า ในระบบ sequencing batch reactor ซึ่งมีการเติมอากาศและการกวนผสมด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 60 รอบต่อนาที ผลจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถกำจัดบีโอดีได้มากกว่าซีโอดีและมีประสิทธิภาพในการกำจัดบีโอดีและซีโอดีเท่ากับ 24.1 ± 3.3 และ 23.2 ± 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากการบำบัดเป็นเวลา 7 วัน (Sirianuntapiboon and Prasertsong, 2007)

นอกจากนี้มีงานวิจัยอื่นๆ ได้ศึกษาการใช้จุลินทรีย์คัดแยกเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ออกจากน้ำเสียเช่นกัน โดย Malandra และคณะ (2003) พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ MEA-5 (*Candida krusei*) ที่คัดแยกได้จากน้ำเสียโรงกลั่นสุรามีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีของน้ำเสียโรงกลั่นสุราในสภาวะที่มีการเติมอากาศและไร้อากาศได้เท่ากับ 95 และ 46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ผลจากการใช้จุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุแสดงให้เห็นว่า น้ำหมักอีเอ็มสามารถกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำอัดลมหมดอายุได้ดีกว่าเชื้อผสมที่คัดแยกมาจากถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ อรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ และคณะ (2539) ที่มีการนำน้ำหมักอีเอ็มมาใช้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารอาหารในน้ำเสียจากครัวเรือน โรงแรม โรงพยาบาล ภัตตาคาร และร้านอาหาร โดยเปรียบเทียบกับเชื้อผสมจากธรรมชาติที่มีอยู่ในแหล่งน้ำเสียนั้นๆ ผลจากการศึกษา พบว่า จุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มสามารถเจริญได้ในน้ำเสียทุกชนิดและมีประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีในน้ำเสียได้แต่ไม่ดีกว่าเชื้อผสมจากธรรมชาติ ซึ่งแตกต่างจากการใช้น้ำหมักอีเอ็มและจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ติดมากับมูลสุกรในการบำบัดน้ำมูลสุกร โดยพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่ม สามารถลดค่าซีโอดีในน้ำมูลสุกรได้ใกล้เคียงกันโดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ (อรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ และคณะ, 2539)



ภาพที่ 3-21 การเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดีหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



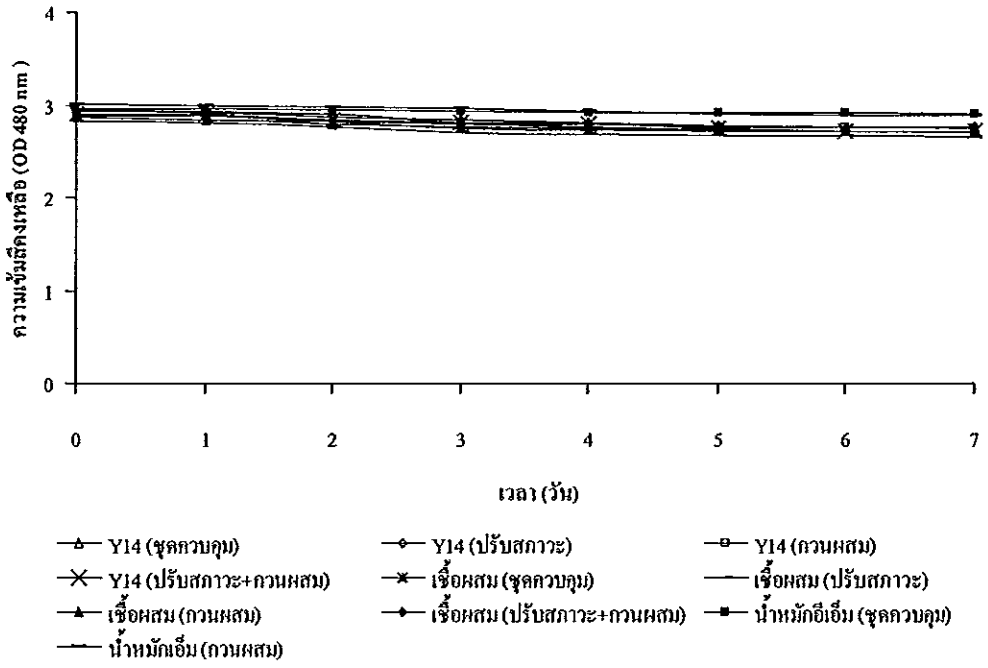
ภาพที่ 3-22 การเปลี่ยนแปลงของค่าบีโอดีหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

แต่ในทางกลับกันพบว่า จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มมีประสิทธิภาพในการกำจัดความเข้มสีได้เล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการกำจัดน้ำตาล ซีโอดีและบีโอดี เนื่องจากสีที่ใช้ในน้ำอัดลมเป็นสีสังเคราะห์ (Tennant, 2008) ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ย่อยสลายได้ยาก (Tay and Jeyaseelan, 1995) ผลจากการศึกษาพบว่า ยีสต์ Y_{14} สามารถลดความเข้มสีได้มากที่สุด รองลงมาคือ เชื้อผสมและน้ำหมักอีเอ็ม ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดความเข้มสีเท่ากับ 8.12 ± 0.32, 6.75 ± 0.16 และ 5.46 ± 0.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีความเข้มสีเหลืออยู่ในวันที่ 7 เท่ากับ 2.71 ± 0.52, 2.70 ± 0.23, และ 2.88 ± 0.39 จากความเข้มสีเริ่มต้นของน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 2.91 ± 0.51, 2.87 ± 0.32, และ 3.01 ± 0.85 โดยยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดความเข้มสีได้ดีกว่าเชื้อผสมและน้ำหมักอีเอ็มอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่เชื้อผสมและน้ำหมักอีเอ็มมีประสิทธิภาพในการกำจัดความเข้มสีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3-28) โดยยีสต์ Y_{14} เชื้อผสม และน้ำหมักอีเอ็มมีแนวโน้มในการลดความเข้มสีที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 3-23) ผลจากการศึกษาพบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีได้น้อยที่สุด เนื่องจากการเตรียมน้ำหมักอีเอ็มใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นวัตถุดิบในการขยายเชื้อและอีเอ็มหัวเชื้อเป็นสารที่มีสีเช่นกัน เมื่อนำไปใช้ในการบำบัดจึงทำให้ความเข้มสีในถังบำบัดเพิ่มขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดสีของน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 น้อยกว่ายีสต์ Y_{14} และเชื้อผสม

สำหรับงานวิจัยอื่นๆ ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีในน้ำกากส่าโดยใช้จุลินทรีย์และพบว่าจุลินทรีย์สามารถลดค่าความเข้มสีได้ดีแตกต่างจากการกำจัดสีในน้ำอัดลมเนื่องจากสีของน้ำกากส่าเป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา browning reaction และ การย่อยสลายน้ำตาลที่อุณหภูมิสูง (Benito *et al.*, 1996) เมื่อจุลินทรีย์มีการใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตจะทำให้ค่าความเข้มสีลดลงสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาล เนื่องจากสีที่เกิดขึ้นเป็นองค์ประกอบของน้ำตาลโดยตรง จากรายงานการวิจัยของ Tondee *et al.* (2007) พบว่า ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีในน้ำกากส่าได้เท่ากับ 91.2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการบำบัดเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่า 125 รอบต่อนาที ซึ่งมีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และเติมสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ในน้ำกากส่า ได้แก่ กลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ NH_4Cl และKH_2PO_4 อย่างละ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสภาวะที่ใกล้เคียงกัน ยีสต์ *Citeromyces* sp. WR-43-6 สามารถลดค่าความเข้มสีได้น้อยกว่า *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีในน้ำกากส่าเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 8 วัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่า 125 รอบ/นาที ซึ่งมีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และเติมสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับ

จุลินทรีย์ในน้ำกากส่า ประกอบด้วย กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ $NaNO_3$ และKH_2PO_4 อย่างละ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Sirianuntapiboon *et al.*, 2004)

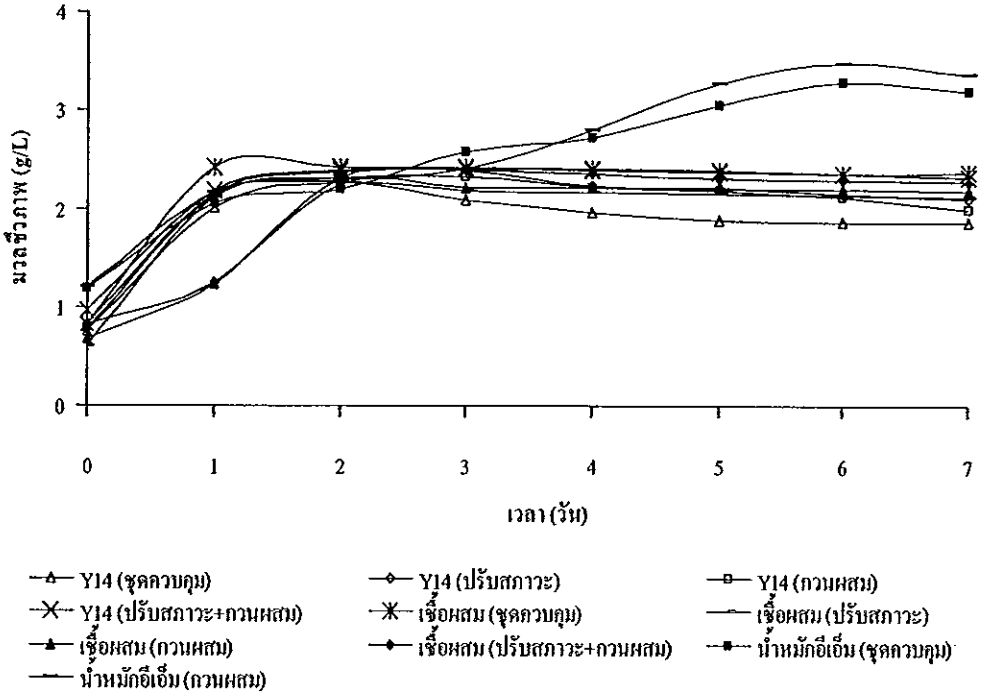
นอกจากนี้ มีการนำแบคทีเรียมาใช้ในการกำจัดสีในน้ำกากส่าเช่นกัน Sirianuntapiboon และคณะ. (2007) ศึกษาการใช้แบคทีเรียในกลุ่ม Acetogenic bacteria เพื่อบำบัดสีจากน้ำเสียของกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ ในสภาวะที่มีการเติมออกซิเจนและสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดย Acetogenic bacteria สามารถกำจัดสีในน้ำกากส่าได้เท่ากับ 76.4 เปอร์เซ็นต์ และเพื่อให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีดีขึ้นควรเติมน้ำตาลโดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส และ ฟรุคโตส เพื่อชักนำให้เชื้อปล่อยเอนไซม์ sugar oxidase ซึ่งช่วยในการกำจัดสีของน้ำกากส่าได้อีกทางหนึ่ง ขณะที่แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* สามารถกำจัดสีของน้ำกากส่าได้เท่ากับ 76 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะไม่ปลอดเชื้อ และมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีเพิ่มขึ้นเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ เนื่องจากการใช้อุณหภูมิสูงในสำหรับการทำให้ปราศจากเชื้อในน้ำกากส่าทำให้โมเลกุลสีมีขนาดเล็กลง (Dahiya *et al.*, 2001) เนื่องจากน้ำกากส่าเป็นน้ำเสีย ที่มีความเข้มสีในปริมาณสูง ดังนั้น การเจือจางน้ำเสียเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ดีขึ้น แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องเพิ่มขนาดของระบบบำบัดเนื่องจากมีการใช้น้ำในปริมาณที่มากขึ้น และใช้ระยะเวลาในการบำบัดนานขึ้นอีกด้วย (Moriya *et al.*, 1990)



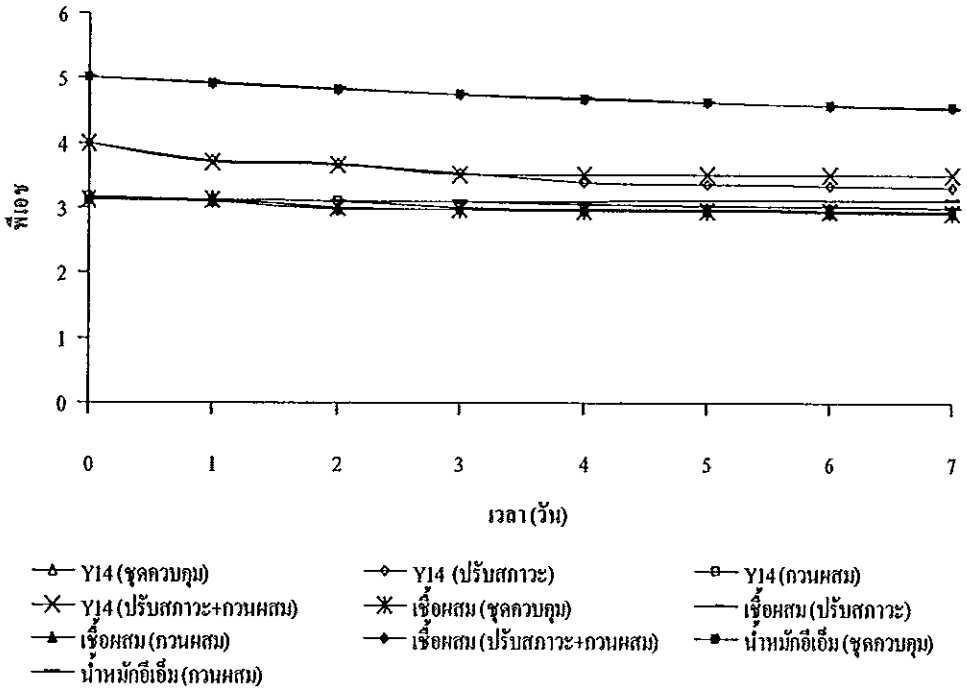
ภาพที่ 3-23 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มสีหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่า จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มที่นำมาใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุสามารถใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตโดยมีค่า $Y_{X/S}$ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.02 g_X/g_S (ตารางที่ 3-28) เนื่องจากการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุเป็นกระบวนการออกซิเดชันแบบไม่สมบูรณ์และมีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นหลังจากการบำบัดในรูปของกรดไขมันระเหยง่ายและเอทานอลทำให้มีค่า $Y_{X/S}$ ไม่สูงมากนักซึ่งช่วยลดปัญหาในการกำจัดกากตะกอนของจุลินทรีย์ภายหลังจากการบำบัด และพบว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีแนวโน้มในการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อจนวันที่ 6 และมีปริมาณลดลงเล็กน้อยในวันที่ 7 สำหรับเชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} สามารถเจริญเติบอย่างรวดเร็วในช่วง 1-2 วันแรกของการบำบัด หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 7 (ภาพที่ 3-24)

นอกจากนี้พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุหลังจากการบำบัดด้วยจุลินทรีย์ยีสต์ Y_{14} เชื้อผสมและน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.32 ± 0.05, 4.56 ± 0.13 และ 2.98 ± 0.11 ตามลำดับ (ตารางที่ 3-28) โดยค่าพีเอชของน้ำอัดลมหมดอายุในถังปฏิกิริยามีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 3-25) เนื่องจากจุลินทรีย์ในทุกชุดการทดลองมีการผลิตกรดขึ้นมาซึ่งเป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาล (Pandey *et al.*, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่าย (เชิงคุณภาพ) ในน้ำอัดลม ผลจากการวิเคราะห์พบว่า ตัวอย่างน้ำอัดลมหลังจากการบำบัดเป็นเวลา 7 วัน มีองค์ประกอบกรดไขมันระเหยง่ายเกิดขึ้นประกอบด้วย acetic acid, propionic acid, iso-butyric acid, butyric acid, iso-valeric acid และ valeric acid (ภาคผนวก ข) ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการลดลงของค่าพีเอชในถังปฏิกิริยา

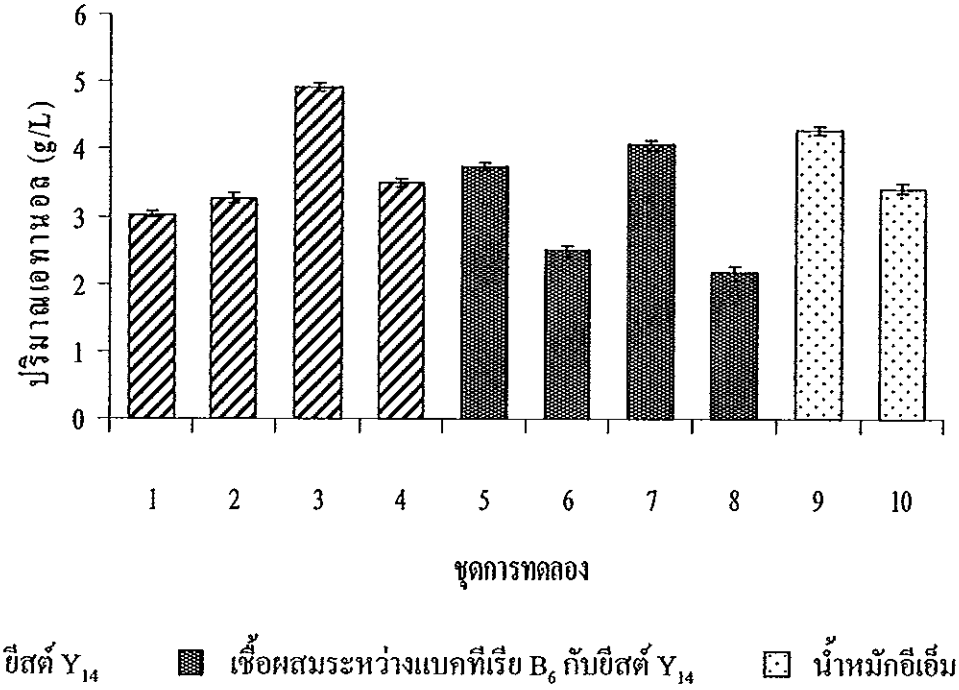


ภาพที่ 3-24 การเปลี่ยนแปลงปริมาณมวลชีวภาพหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 3-25 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง

ภายหลังจากการบำบัดน้ำกากส่าด้วยวิธีทางชีววิทยาทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ลดลงและมีสารผลิตภัณฑ์พลอยได้เกิดขึ้นซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น กรดอินทรีย์ต่างๆ โดยเฉพาะเอทานอลซึ่งเป็นพลังงานทดแทนที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบและไม่ก่อให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Pant and Adholeya, 2007) ดังนั้น จึงทำการศึกษาผลพลอยได้หลังจากการบำบัดในรูปของเอทานอล ผลจากการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในระดับห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ทุกชุดการทดลองมีเอทานอลเกิดขึ้นโดยชุดการทดลองที่ 3 (ยีสต์ Y_{14} = ปรับสภาวะ) มีปริมาณเอทานอลในวันที่ 7 สูงสุด รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 9 (น้ำหมักอีเอ็ม = ชุดควบคุม) และชุดการทดลองที่ 7 (เชื้อผสม = ปรับสภาวะ) โดยมีค่าเท่ากับ 4.92 ± 1.14, 4.28 ± 1.20 และ 4.06 ± 0.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 3-26) ซึ่งการผลิตเอทานอลหลังจากการบำบัดสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากน้ำอัดลมหมดอายุมีองค์ประกอบของน้ำตาลเป็นหลักทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์และแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่ใช้ในการบำบัดภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน (Gosh, 1990)



ภาพที่ 3-26 การผลิตเอทานอลหลังการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุโดยจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็ม ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

หมายเหตุ : 1 = Y_{14} (ชุดควบคุม) 2 = Y_{14} (กวนผสม) 3 = Y_{14} (ปรับสภาวะ)
4 = Y_{14} (กวนผสม+ปรับสภาวะ) 5 = เชื้อผสม (ชุดควบคุม) 6 = เชื้อผสม (กวนผสม)
7 = เชื้อผสม (ปรับสภาวะ) 8 = เชื้อผสม (กวนผสม+ปรับสภาวะ)
9 = น้ำหมักอีเอ็ม (ชุดควบคุม) 10 = น้ำหมักอีเอ็ม (กวนผสม)

3.9 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในระดับอุตสาหกรรม

จากการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าน้ำหมักอีเอ็มมีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้น จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในถังบำบัดขั้นต้นของโรงงานที่เป็นกรณีศึกษาโดยใช้เวลาในการบำบัด 7 วัน และทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) ซึ่งอาศัยการทำงานของเชื้อตามธรรมชาติที่อยู่ในถังบำบัดขั้นต้นกับชุดทดลองที่เติมน้ำหมักอีเอ็มปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์

ผลจากการศึกษาพบว่า การเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดขั้นต้นเป็นเวลา 7 วัน สามารถลดปริมาณน้ำตาลในถังบำบัดขั้นต้นได้ดีกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-29) ซึ่งจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มมีประสิทธิภาพในการกำจัด

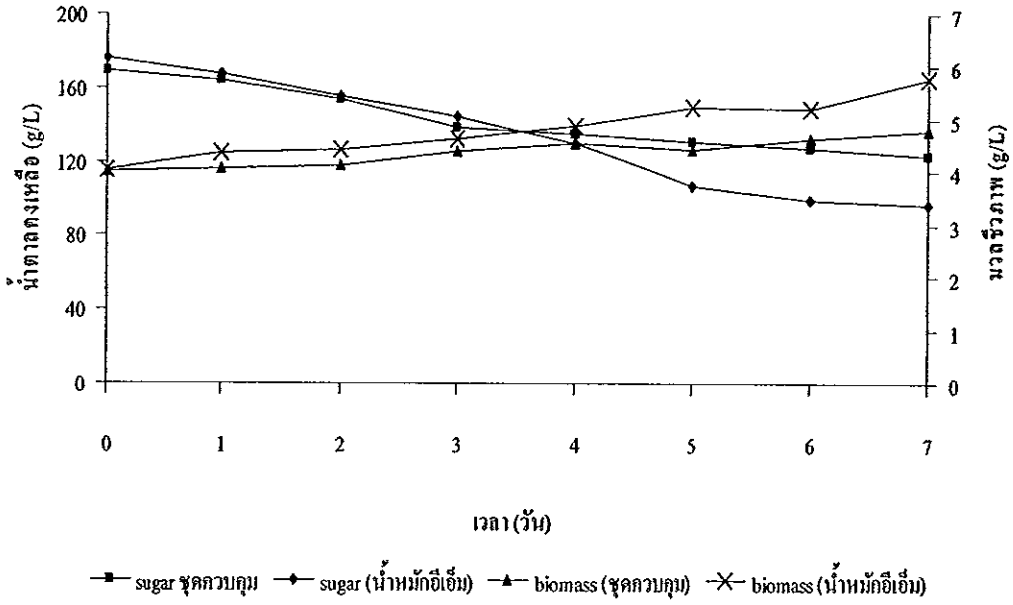
น้ำตาล เท่ากับ 44.97 ± 0.42 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในวันที่ 7 เท่ากับ 96.8 ± 3.2 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 175.98 ± 5.04 กรัมต่อลิตร และการเติมน้ำหมักอีเอ็มใน ถังบำบัดขั้นต้นทำให้ปริมาณน้ำตาลมีแนวโน้มค่อยๆ ลดลงในช่วง 4 วันแรก และปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 7 (ภาพที่ 3-27) อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลได้ไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากไม่มีการกวนผสมภายในถังบำบัดขั้นต้นและจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มอาจจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตโดยจุลินทรีย์ในสารเร่งพด. 6 รวมทั้งจุลินทรีย์ต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นจึงมีน้ำตาลเหลืออยู่ในปริมาณมากภายหลังจากการบำบัด

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่า ชุดการทดลองที่เติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีค่า $Y_{X/S}$ เท่ากับ 0.07 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-29) โดยมีแนวโน้มของปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มที่ใช้ในการทดสอบรวมกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในถังบำบัดขั้นต้น ในขณะที่ชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) มีค่าปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 และลดลงในวันที่ 5 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงวันที่ 7 (ภาพที่ 3-27) นอกจากนี้พบว่าน้ำอัดลมหมดอายุหลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.44 ± 0.15 (ตารางที่ 3-29)

ตารางที่ 3-29 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำอีเอ็ม)

ชุดการทดลอง	% Sugar removal	% COD removal	% BOD removal	% Color removal	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	ค่าพีเอชหลังจากการบำบัด
ชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม)	29.43 ± 0.59 [a]	32.53 ± 0.70 [a]	30.45 ± 0.68 [a]	4.02 ± 0.01 [a]	0.1 ± 0.13 [a]	3.48 ± 0.22
น้ำหมักอีเอ็ม	44.97 ± 0.42 [b]	34.04 ± 0.27 [b]	38.73 ± 1.05 [b]	2.80 ± 0.04 [b]	0.07 ± 0.06 [b]	3.44 ± 0.15

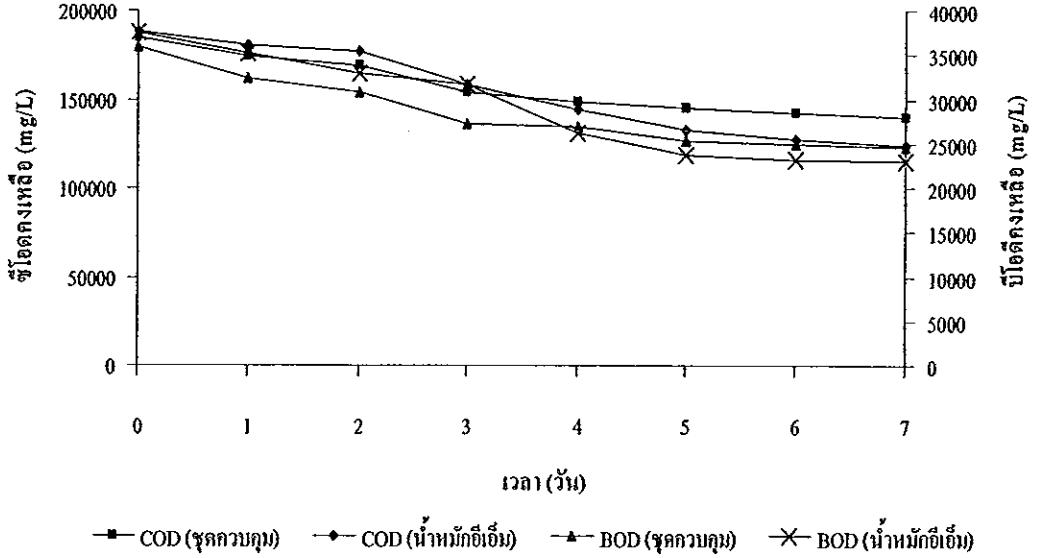
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3-27 การลดลงของปริมาณน้ำตาลและปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นหลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เมื่อพิจารณาความสามารถในการกำจัดสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีและบีโอดี พบว่า การเติมน้ำหมักอีเอ็มในถังบำบัดขั้นต้นเป็นเวลา 7 วัน มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์สูงกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-29) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีเท่ากับ 34.04 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าซีโอดีเหลืออยู่ในวันที่ 7 เท่ากับ 124,185 มิลลิกรัมต่อลิตร จากค่าซีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ 188,263 ± 625 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพในการกำจัดบีโอดีเท่ากับ 38.73 ± 1.05 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าบีโอดีเหลืออยู่ในวันที่ 7 เท่ากับ 22,995 ± 1,127 มิลลิกรัมต่อลิตร จากบีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ 37,532 ± 418 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งการใช้น้ำหมักอีเอ็มในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุทำให้ค่าซีโอดีลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 4 วันแรกของการบำบัด หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 7 ขณะที่ค่าบีโอดีมีแนวโน้มที่ลดลงเช่นเดียวกับค่าซีโอดี (ภาพที่ 3-28) และพบว่าค่าซีโอดีและบีโอดีมีแนวโน้มที่ลดลงสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาล แม้ค่าซีโอดีและบีโอดีลดลงแต่พบว่ายังมีค่าอยู่ในเกณฑ์สูง เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการบำบัดเพียง 7 วัน ในขณะที่ถังบำบัดขั้นต้นมีปริมาตรมากกว่าถังบำบัดในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้น การใช้ระยะเวลาบำบัดนานขึ้นเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดได้ (ปรีชา มุณีศรี, 2539) และพบว่าการบำบัดแบบใช้ออกซิเจนเป็นสิ่งจำเป็นหลังจากการบำบัดแบบไร้อากาศเพื่อทำให้การบำบัดมีประสิทธิภาพสูงสุด (Pathade, 1999) นอกจากนี้ การ

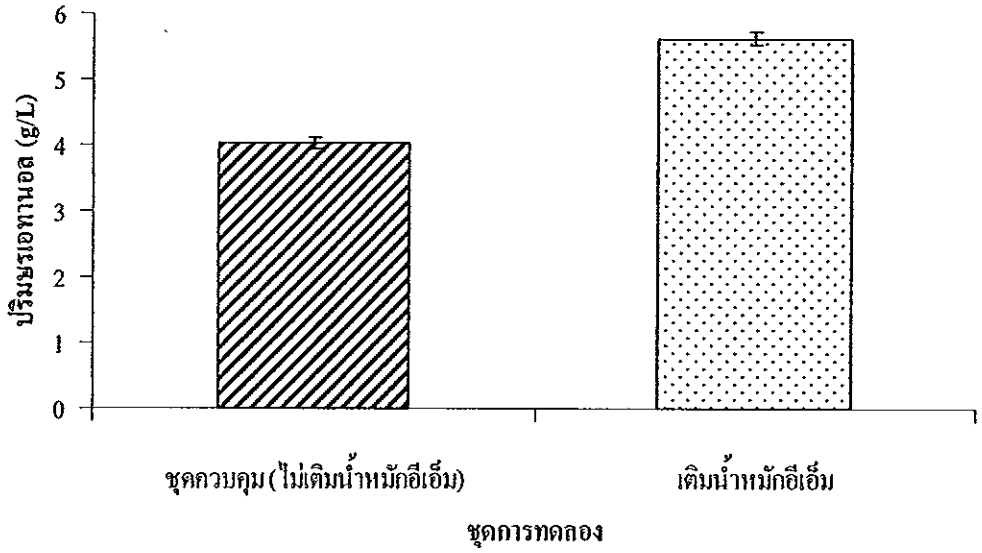
บำบัดน้ำเสียต้องศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ร่วมด้วย เช่น ค่าพีเอชเริ่มต้น สารพิษ การกวนผสม และอุณหภูมิ เป็นต้น (ฐปน ชื่นบาล, 2548)



ภาพที่ 3-28 การเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดีและบีโอดีหลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น

แต่ในทางกลับกันพบว่า การเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดขั้นต้นสามารถลดค่าความเข้มสีได้น้อยกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3-29) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดความเข้มสีเพียง 2.80 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเข้มสีลดลงเล็กน้อยจาก 2.65 ± 0.4 เป็น 2.57 ± 0.23 และพบว่าการเติมน้ำหมักอีเอ็มและชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) ทำให้ความเข้มสีมีแนวโน้มลดลงใกล้เคียงกัน ขณะที่การใช้น้ำสกัดชีวภาพในการบำบัดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่า น้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นกว่าเดิม (ธนกฤต พรหมทอง, 2552) และหลังจากการเติมน้ำหมักอีเอ็มเป็นเวลา 7 วัน พบว่า พีเอชของน้ำอัดลมหมดอายุมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยและมีสภาวะที่เป็นกรด จากรายงานของ Fannin (1987) อ้างถึงใน Jimenez และคณะ. (2003) พบว่า การบำบัดน้ำกากส่าในระบบไร้อากาศโดย *Penicillium decumbens* มีค่าพีเอชค่อนข้างคงที่อยู่ในช่วง 7.8-8.4 เนื่องมาจากภายในระบบบำบัดมีระบบบัฟเฟอร์ของ carbonate และ bicarbonate ซึ่งเกิดจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์ซึ่งไม่สามารถระเหยออกจากถังบำบัดได้ และจากการศึกษาผลพลอยได้ภายหลังจากการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในถังบำบัดขั้นต้นของบริษัทที่เป็นกรณีศึกษา

พบว่า การเติมน้ำหมักอีเอ็มและชุดควบคุมมีเอทานอลเกิดขึ้นเช่นกันซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 5.62 ± 0.09 และ 4.03 ± 0.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 3-29)



ภาพที่ 3-29 การผลิตเอทานอลหลังการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุโดยน้ำหมักอีเอ็ม ภายในถังบำบัดขั้นต้น เป็นเวลา 7 วัน

3.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากน้ำอัดลมหมดอายุ

ผลจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} โดยใช้ลำดับเบส ของ 16s และ 26s rRNA gene ประมาณ 500 เบสในการเปรียบเทียบ พบว่า แบคทีเรีย B_6และยีสต์ Y_{14} คือ *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* และ *Pichia galeiformis partial* ตามลำดับ (ภาคผนวก ข)

3.11 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในระดับอุตสาหกรรม

เนื่องจากระบบการจัดการน้ำอัดลมหมดอายุของบริษัทที่เป็นกรณีศึกษา คือ การนำน้ำอัดลมหมดอายุที่หมดอายุตามระยะเวลาโดยเก็บคืนจากตัวแทนจำหน่าย และน้ำอัดลมที่ไม่ได้มาตรฐานจากกระบวนการผลิต มาเก็บกักในถังบำบัดขั้นต้นซึ่งอาศัยจุลินทรีย์ในสารเร่งพด. 6 ในการย่อยสลายก่อนที่จะนำไปบำบัดโดยระบบบำบัดรวมต่อไป แต่ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุของถังบำบัดขั้น พบว่า ถังบำบัดขั้นมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์และความเข้มสีไม่ดีเท่าที่ควรและต้องใช้เวลาในการบำบัดนานประมาณ 4.5 เดือน ทำให้ปล่อยน้ำอัดลมลงสู่ระบบบำบัดรวมได้ในปริมาณน้อยๆ ซึ่งในกรณีที่บริษัทมีน้ำอัดลมหมดอายุที่ต้องกำจัดในปริมาณมากจึงทำให้เกิดปัญหา คือ พื้นที่สำหรับเก็บกักน้ำอัดลม

หมดอายุไม่เพียงพอ ดังนั้นบริษัทฯ จึงมีความต้องการหาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำอัดลมหรือลดระยะเวลาการเก็บกักเพื่อให้ระบบบำบัดน้ำเสียสามารถรองรับภาระบรรทุกได้มากขึ้น

จากการศึกษาการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุเบื้องต้นด้วยจุลินทรีย์ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์สูงสุดเมื่อบำบัดในสภาวะที่มีการกวนผสมโดยไม่ต้องเติมสารอาหารและปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำอัดลมหมดอายุ ดังนั้น ในกรณีที่ถังบำบัดขั้นต้นสามารถรองรับปริมาณน้ำอัดลมหมดอายุได้เพียงพอ บริษัทควรพิจารณาเลือกใช้น้ำหมักอีเอ็มเพื่อนำไปบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ ซึ่งสามารถเตรียมได้ง่าย และใช้ต้นทุนต่ำเนื่องจากใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นวัตถุดิบในการขยายหัวเชื้อ สำหรับการบำบัดจะใช้น้ำอัดลมหมดอายุในปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และใช้ระยะเวลาในการบำบัด 7 วัน ซึ่งเป็นระบบบำบัดแบบกะที่เหมาะสมกับปริมาณของน้ำอัดลมหมดอายุที่เข้าสู่โรงงานไม่สม่ำเสมอ แต่จากการทดลองใช้น้ำหมักอีเอ็มเทลงในถังบำบัดขั้นต้นเป็นเวลา 7 วัน พบว่า สามารถกำจัดสารอินทรีย์และความเข้มสีได้บางส่วนแต่ดีกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) เนื่องจากไม่มีการกวนผสม และใช้ระยะเวลาในการบำบัดน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับการบำบัดที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ทั้งนี้ ควรมีการติดตั้งระบบการกวนผสมภายในถังบำบัดขั้นต้นเพื่อให้จุลินทรีย์มีโอกาสสัมผัสกับน้ำเสียมากขึ้นและทำให้น้ำหมักอีเอ็มมีประสิทธิภาพในการบำบัดอัดลมสูงสุด แต่ในกรณีที่มีน้ำอัดลมหมดอายุในปริมาณที่มากเกินความสามารถในการรองรับของถังบำบัดขั้นต้น ทางบริษัทอาจมีการสร้างถังบำบัดขนาดเล็กแยกจากถังบำบัดขั้นต้นเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุส่วนเกินซึ่งอาจเลือกใช้จุลินทรีย์คัดแยกในการบำบัด และเป็นการลดระยะเวลาในการบำบัดรวมทั้งลดปริมาณเชื้อเริ่มต้นและสารเคมีที่ใช้ในการปรับสภาวะของน้ำอัดลม ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็มสามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่และสามารถกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำอัดลมหมดอายุได้มากที่สุด

บทที่ 4
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 บทสรุป

4.1.1 จากการศึกษาสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุ พบว่า น้ำอัดลมหมดอายุที่เก็บจากขวดบรรจุภัณฑ์ มีองค์ประกอบของน้ำตาลทั้งหมด สารอินทรีย์ในรูปของซีโอดีและบีโอดีเท่ากับ 146.2 ± 2.76 กรัมต่อลิตร 104,116 ± 428 และ 49,957 ± 293 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำอัดลมหมดอายุมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.43 ± 0.84 และวัดค่าความเข้มสีเท่ากับ 3.25 ± 0.13 เมื่อศึกษาสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุที่เก็บจากปลายท่อของถังบำบัดขั้นต้นของบริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลม พบว่า ทุกพารามิเตอร์มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำอัดลมหมดอายุที่เก็บจากขวดบรรจุภัณฑ์ โดยถังบำบัดขั้นต้นมีประสิทธิภาพในการกำจัดปริมาณน้ำตาล ซีโอดี บีโอดี และความเข้มสีได้เท่ากับ 65.32 ± 3.71, 51.67 ± 6.21, 72.45 ± 5.93 และ 11.32 ± 0.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีระยะเวลาเก็บกักน้ำอัดลมหมดอายุประมาณ 4.5 เดือน

4.1.2 เมื่อทำการคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ จากถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้นของบริษัทที่เป็นกรณีศึกษา พบว่า สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 29 ไอโซเลท ประกอบด้วยยีสต์มากที่สุด รองลงมาคือ แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยสีทเท่ากับ 15, 10, 2 และ 2 สายพันธุ์ หรือคิดเป็น 51.72, 34.48, 6.90 และ 6.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.1.3 ผลของการคัดเลือกจุลินทรีย์ในขั้นที่ 1 (primary screening) พบว่า แบคทีเรียและยีสต์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดคือ แบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} และจากการคัดเลือกจุลินทรีย์ในขั้นที่ 2 (secondary screening) พบว่า แบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 66.27 ± 1.04 และ 69.90 ± 0.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายในเวลา 5 วัน เมื่อเปรียบกับจุลินทรีย์ภายในกลุ่มเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.1.4 ผลจากการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุของจุลินทรีย์คัดแยก พบว่า ยีสต์ Y_{14} และเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 85.96 ± 0.49 และ 87.02 ± 1.16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำอัดลมหมดอายุที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4 และ 5 ตามลำดับ และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีการเขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

4.1.5 เมื่อทำการคัดเลือกสูตรของน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 1 ด้วยวิธีการ spread plate และ pour plate พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 (อีเอ็มดิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20) มีจุลินทรีย์

ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือ น้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 (อีเอ็มดิวเซ: กากน้ำตาล: น้ำ เท่ากับ 1: 6: 20) และสูตร 2 (อีเอ็มดิวเซ: น้ำอัดลมหมดอายุ: น้ำ เท่ากับ 1: 1: 20) โดยน้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 มีจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่าน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในน้ำหมักอีเอ็ม พบว่า จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ในน้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 และสูตร 3 มีแนวโน้มในการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 7 ส่วนน้ำหมักอีเอ็มสูตร 2 มีปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 7 ยกเว้นแบคทีเรียทั้งหมดมีปริมาณลดลงในวันที่ 7

4.1.6 ผลการคัดเลือกสูตรของน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 2 พบว่า น้ำหมักอีเอ็มสูตร 1 สามารถกำจัดน้ำตาลได้มากกว่าน้ำหมักสูตร 3 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากับ 77.10 ± 1.91 และ 75.65 ± 1.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการกำจัดน้ำตาล ในน้ำอัดลมหมดอายุ โดยน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 85.25 ± 2.99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ปริมาณน้ำหมักอีเอ็มเท่ากับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่เขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 50 รอบต่อนาที

4.1.7 ผลจากการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์ Y_{14} เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 กับยีสต์ Y_{14} รวมทั้งน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 เป็นเวลา 7 วัน พบว่า จุลินทรีย์ทุกกลุ่มมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำตาล สารอินทรีย์ในรูปซีโอดีและบีโอดี รวมทั้งความเข้มสีสูงสุดในสภาวะการบำบัดที่เหมาะสม โดยน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล สารอินทรีย์ในรูปซีโอดีและบีโอดีได้สูงสุดเท่ากับ 84.03 ± 0.54, 80.16 ± 0.37 และ 84.14 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีประสิทธิภาพสูงกว่าเชื้อผสมและยีสต์ Y_{14} อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ยีสต์ Y_{14} สามารถลดความเข้มสีได้สูงสุดเท่ากับ 8.12 ± 0.32 เปอร์เซ็นต์ โดยมีประสิทธิภาพสูงกว่าเชื้อผสมและน้ำหมักอีเอ็มอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และจากการศึกษาผลพลอยได้หลังการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในระดับห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ยีสต์ Y_{14} ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 4.92 ± 1.14 กรัมต่อลิตร เมื่อมีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ และปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำอัดลมหมดอายุ

4.1.8 เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดขั้นต้นของบริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลม พบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล สารอินทรีย์ในรูปซีโอดีและบีโอดีสูงกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยมีประสิทธิภาพเท่ากับ 44.97 ± 0.42, 34.04 ± 0.27 และ 38.73 ± 1.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในทางกลับกันพบว่า การเติมน้ำหมักอีเอ็มสามารถลดค่าความเข้มสีได้น้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีเพียง 2.80 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากการเติม

น้ำหมักอีเอ็มในถังบำบัดขั้นต้นเป็นเวลา 7 วัน พบว่า มีเอทานอลเกิดขึ้นมากกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำหมักอีเอ็ม) ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 5.62 ± 0.09 กรัมต่อลิตร

4.1.9 จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์ โดยใช้ลำดับเบสของ 16s และ 26s rRNA gene ประมาณ 500 เบสในการเปรียบเทียบ พบว่า แบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} คือ *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* และ *Pichia galeiformis partial* ตามลำดับ

4.2 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยเพิ่มเติม

4.2.1 ควรมีการกวนผสมในการถังบำบัดขั้นต้นเพื่อให้จุลินทรีย์มีโอกาสสัมผัส น้ำเสียได้มากขึ้นและช่วยในการละลายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

4.2.2 ควรศึกษาการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุในระดับโรงงานต้นแบบก่อนที่จะทำการศึกษาในระดับอุตสาหกรรมเพื่อตรวจสอบเสถียรภาพของระบบบำบัด

4.2.3 เนื่องจากน้ำอัดลมหมดอายุมีองค์ประกอบที่อาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้น จำเป็นต้องหาวิธีในการกำจัดองค์ประกอบเหล่านี้ก่อนที่จะนำไปบำบัด เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสามารถทำได้ไม่ยาก

4.2.4 การเจือจางน้ำก่อนการบำบัดเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยให้ประสิทธิภาพในการบำบัดดีขึ้นและอาจทำให้มีการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นและการปรับสภาวะของน้ำอัดลมหมดอายุน้อยลง แต่ทั้งนี้ต้องมีการลงทุนและใช้เนื้อที่ในการบำบัดมากขึ้น

4.2.5 การบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยจุลินทรีย์นอกจากจะช่วยลดค่าความสกปรกแล้ว พบว่า หลังจากการบำบัดจะมีเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดขึ้นและผลพลอยได้ที่มีศักยภาพที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ คือ เอทานอล ดังนั้น ควรพิจารณาหาแนวทางในนำสิ่งเหล่านี้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป ทั้งนี้ เพื่อให้เกิดความคุ้มทุนในการบำบัดมากที่สุด

4.2.6 ควรศึกษาการกระตุ้นจุลินทรีย์ในถังบำบัดขั้นต้นของบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน) มาใช้เป็นหัวเชื้อในการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุแทนหัวเชื้ออีเอ็ม

บรรณานุกรม

กรมโรงงานอุตสาหกรรมและสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. 2545. **ตำราบำบัดมลพิษน้ำ ฉบับที่ 5**. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.

ข้อมูลจากบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน)

งามนิจ นนทโส, นิยม กำลังดี, ประสาท โพธิ์นิ่มแดง, พลสัณห์ มหาขันธ์, สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์ และสุวรรณา เนียมสนิท. 2540. การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมัน. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เฉลา ศรีทวี. 2535. "สารอาหารที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำอัดลมด้วยระบบ Aerated Lagoon". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ดวงพร คันธโชติ, วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ ณรงค์ฤทธิ์ อัศวเรืองพิภพ. 2548. ลักษณะของน้ำสกัดชีวภาพจากพืชในภาคใต้ของประเทศไทย. **ว. สงขลานครินทร์**. 27(3): 601-615.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นัยนา ศรีชัย, อ้อย ชูหมุน และลำไย ชูทอง. 2547. ผลของการเติมน้ำหมักชีวภาพต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะน้ำทิ้ง. รายงานการเสนอผลงานวิจัย การประชุมวิชาการเพื่อนำเสนอผลงานวิจัย วันที่ 2 กรกฎาคม 2547 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

นัสที กรโอชาเลิศ. 2552. การใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงและน้ำหมักชีวภาพในการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศจากสหกรณ์ผลิตยางแผ่นรมควัน. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิพล กุณฑล. 2549. รายงานการศึกษาใช้จุลินทรีย์ EM บำบัดน้ำเสีย กรณีศึกษา: บ่อบำบัดน้ำเสียของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ (หลังที่ทำการไปรษณีย์คอหงส์). กองอาคารสถานที่ สำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2532. **จุลชีววิทยา**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ปรีชา มุณีศรี. 2539. การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้จุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2537. การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชไฮเทคที่ต้องทำความเข้าใจ ตอนที่ 1. **ว. เคหการเกษตร.** 18(12): 175-183.

พิมล เรียนวัฒนา และชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์. 2539. **เคมีสภาวะแวดล้อม.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 215 น.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และมล.ประกฤติ สุขสวัสดิ์. 2525. รายงานการวิจัยการผลิต Single Cell Protein จากน้ำทิ้งโรงงานสุรา. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธนกฤต พรหมทอง. 2552. การกำจัดสีและสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยจุลินทรีย์ EM และเฟนตันรีเอเจนต์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เกรอต. 2539. **วิศวกรรมน้ำเสีย การบำบัดทางชีวภาพ.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. 2525. **การออกแบบขั้นกระบวนการของระบบกำจัดน้ำเสียโดยวิธีชีววิทยา เล่มที่ 1.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. 2542. **วิศวกรรมการประปา.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริพร กลอดแก้ว. 2552. ผลของจุลินทรีย์อีเอ็มในการต้านทานโรคและการเจริญเติบโตของแตงกวา. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สถาบันส่งเสริมเกษตรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2551. **คู่มือการประยุกต์ใช้ EM.** พิมพ์ครั้งที่ 8. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ ก.พล.

สมใจ ศิริโภค. 2547. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2549. **ระบบบำบัดน้ำเสีย.** กรุงเทพฯ: บริษัทสำนักพิมพ์ท้อป จำกัด.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2548. **จุลชีววิทยาของน้ำเสีย.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพรชัย มั่งมีสิทธิ์. 2547. เทคนิคการใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในงานกสิกรรมไร้สารพิษ ประมง ปศุสัตว์และสิ่งแวดล้อม. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร. หน้า 15-16.

สุพรชัย มั่งมีสิทธิ์. 2547. รายงานประสบการณ์ การใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในวิถีการผลิตของชุมชนบางขุนไทร: กรณีทำนาโดยการใช้ปุ๋ยโบกาฉิ.สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุภาพร พงศ์ธรพฤกษ์. 2549. รายงานการวิจัยการศึกษาทดลองบำบัดน้ำเสียของมหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์โดยใช้น้ำสกัดชีวภาพและพืชน้ำ. โปรแกรมวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์.

สุมาลี เหลืองสกุล, สมใจ ศิริโภค และขจีนาฏ โพธิเวชกุล. 2541. รายงานการวิจัยการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สุมาลี เหลืองสกุล, สมใจ ศิริโภค และขจีนาฏ โพธิเวชกุล. 2542. รายงานการวิจัยการวิเคราะห์ชนิดและการศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการาเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

อนิวรรต เฉลิมพงษ์. 2537. **จุลินทรีย์อีเอ็ม สารมหัศจรรย์สร้างสรรค์ชีวิตและสิ่งแวดล้อมป่าไม้.** สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

อรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ, อารี ไชยาภินันท์ และเสาวนีย์ สุนทรพิทักษ์. 2539. การลดปริมาณสารอาหารในน้ำเสียโดยอีเอ็ม. ว.เกษตรศาสตร์. 30 (วิทย)

Aharya, B.K., Mohana, S. and Madamwar, D. 2008. Anaerobi treatment of distillery spent wash - A study on upflow anaerobic fixed film bioreactor. Bioresoure Technology. 99: 4621-4626.

Akunna, I.C. and Clark, M. 2000. Performance of a granular-bed anaerobic baffled reactor (GRABBR) treating whisky distillery wastewater. Bioresource Technology. 74: 257-261.

APHA, AWWA and WEF. 2005. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 21st edition, Washington DC: American Public Health Association.

Arutchelvan, V., Kanakasabai, V., Nagarajan, S. and Muralikrishnan, V. 2005. Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. Journal of Hazardous Materials. 127: 238-243.

Athanasopoulos, N. 1987. Anaerobic treatment of beet molasses alcoholic fermentation wastewater in a downflow filter. Resource and Conservation. 15(1-2): 147-150.

Benito, G.G., Cristobal, S.N., Miranda, P.M. and Nieto, H.C. 1996. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. Bioresource Technology. 57: 229-235.

Chopra, P., Singh, D., Verma, V. and Puniya, A.K. 2004. Bioremediation of melanoidins containing digested spent wash from cane-molasses distillery with white rot fungus, Coriolus versicolor. Journal of Industrial Microbiology. 44: 197-200.

Cibis, E., Kent, C.A., Krzywonos, M., Garncarek, Z., Garncarek, B. and Miskiewicz, T. 2002. Biodegradation of a potato slops from a rural distillery by thermophilic aerobic bacteria. Bioresource Technology. 85: 57-61.

Dahiya, J., Singh, D. and Nigam, P. 2001. Decolourization of molasses wastewater by cells of *Pseudomonas fluorescens* immobilized on pourous cellulose carrier. Bioresource Technology. 78: 111-114.

Ertugrul, S., Donmez, G. and Takac, S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. Journal of Hazardous Materials. 149: 720-724.

Fang, H.H.P. and Chui, Y.Y. 1994. Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewater. Water Science and Technology. 30: 87-96.

Friedrich, J. 2004. Bioconservation of distillery waste. Fungal biotechnology in agriculture, food and environmental applications. 26: 431-442

Ghosh, M., Verma, S.C., Mengoni, A. and Tripathi, A.K. 2004. Enrichment and identification of bacteria capable of reducing chemical oxygen demand of anaerobically treated molasses spent wash. Applied Microbiology. 96: 1278-1286.

Goodwin, J.A.S. and Stuart, J.B. 1994. Anaerobic digestion of malt whisky distillery pot ale using upflow anaerobic sludge blanket reactors. Bioresource Technology. 49(1): 75-81.

Gosh, S. 1990. Principles and potentials of biphasic fermentation , in: Report: International Conference on Biogas: Technologies and Implementation Strategies, January 10-15, Pune, India, 1990.

Guimaraes, C., Porto, P., Oliveira, R. and Mota, M. 2005. Continuous decolourization of a sugar refinery wastewater in a modified rotating biological contactor of *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurythane foam disks. Process biochemistry. 40: 535-540.

Jain, N., Minocha, A.K. and Verma, C.L. 2002. Degradation of predigested distillery effluent by isolated bacterial strains. Ind. J. Exp. Bot. 40: 101-105.

Jimenez, A.M., Borja, R. and Martin A. 2003. Aerobic-anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. Process Biochemistry. 38: 1275-1284.

Jimenez, A.M., Borja, R. and Martin A. 2004. A comparative kineti evaluation of the anaerobic digestion of untreated molasses and molasses previously fermented with *Peniillium deumbens* in bath reators. Biochemical Engineering Journal. 18: 121-132.

Kantachote, D. and Innuwat, W. 2004. Isolation of *Thiobacillus* sp. For use in treatment of rubber sheet wastewater. Songklanakarin Journal Science Technology. 26(5): 649-657.

Kirzhner, F., Zimmels, Y. and Shraiber, Y. 2008. Combined treatment of highly contaminated winery wastewater. Separation and Purification Technology. 63: 38-44.

Krzywonos, M., Cibis, E., Lasik, M., Nowak, J. and Miskiewiz, T. 2009. Thermo- and mesophilic aerobic batch biodegradation of high-strength distillery wastewater (potato stillage) -Utilisation of main arbon sources. Bioresoure Technology. 100: 2507-2514.

Krzywonos, M., Cibis, E., Miskiewiz, T. and Kent, C.A. 2008. Effect of temperature on the efficiency of the thermo- and mesophilic aerobic batch biodegradation of high-strength distillery wastewater (potato stillage). 99: 7816-7824.

Kumar, V., Wati, L., FitzGibbon, F., Nigan, P., Banat, I.M., Singh, D. and Marchant, R. 1997. Bioremediation and decolorization of anaerobically digested distillery spent wash. Biotechnology Letters. 19: 311-313.

Kumar, V., Wati, L., Nigan, P., Banat, I.M., Tadav, B.S., Singh, D. and Marchant, R. 1998. Decolourization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. Process Biochemistry. 33: 83-88.

Lee, B.K., Joong, L. and Kim, K. 2001. Prodution of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. Aquacultural engineering. 25: 111-124.

Malandra, L., Gideon, W., Zietsman, A. and Viljoen-Bloom, M. 2003. Microbiology of a biological contactor for winery wastewater treatment. Water Resource. 37: 4125-4134.

Metcalf and Eddy Inc., 2004. Wastewater Engineering Treatment Disposal and Reuse. 4th ed. (Institutional Edition). New York: McGraw-Hill.

Miranda, M.P., Benito, G.G., Cristobal, N.S. and Nieto, C.H. 1996. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergilus niger*. Bioresource Technology. 57: 229-235.

Mohana, S., Acharya, K.B. and Madamwar, D. 2009. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. Journal of Hazardous Materials. 163: 12-25.

Moriya, K., Iefugi, H., Shimoi, H. and Sato, S.I. 1990. Treatment of distillery wastewater discharged from beet molasses-spirits production using yeast. Journal of Fermentation and Bioengineering. 69(2): 138-140.

Nakajima-Kambe, T., Shimomura, M., Nomura, N., Chanpompong, T. and Nakahara, T. 1999. Biosience and Bioengineering. 87: 119-121.

Nandy, T., Shastry, S. and Kaul, S.N. 2002. Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresoure recovery. Journal of Environmental Management. 65: 25-38.

Ohmomo, S., Yoshikawa, H., Nozaki, K., Nakajima, A., Daengsubha, W. and Nakamura, I. 1988. Continuous decolorization of molasses wastewater using immobilized *Lactobacillus hilgardii* cell. Agricultural and Biological Chemistry. 52: 2437-2441.

Pandey, R.A., Malhotra, S., Tankhiwale, A., Pande, S., Pathe, P.P. and Kual, S.N. 2003. Treatment of biologically treated distillery effluent - a case study. International Journal of Environmental Studies. 60(3): 263-275.

Pant, D. and Adholeya, A. 2007. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. Bioresources Technology. 98: 2321-2334.

Parawira, W., Kudita, I., Nyandoroh, G. and Zvauya, R. 2005. A study of industrial anaerobic treatment of opaque beer brewery wastewater in a tropical climate using a full-scall UASB reactor seeded with activated sludge. Process Biochemistry. 40: 593-599.

Pathade, G.R. 1999. A review of current technologies for distillery wastewater treatment. Technoscience Publications. 35: 180-239.

Petruccioli, M. Duarte, J.C. Eusibio, A. and Federici, F. 2002. Aerobic treatment of winery wastewater using bioreactors with free and immobilized activated sludge. Bioprocess and Biosystems Engineering. 31: 821-829.

Rajor, R., Singh, R. and Mathur, R.P. 2002. Color removal of distillery waste by *Sacharomyces*. Indian Journal of Environmental Protection. 22(2): 1241-1252.

Rao, S.B. 1972. A low cost waste treatment method for disposal of distillery waste (spent wash). Water Resources. 6: 1275-1282.

Rehman, A., Shakoori, F.R. and Shakoori, A.R. 2008. Heavy metal resistant freshwater ciliate, *Euplotes mutabilis*, isolated from industrial effluents has potential to decontaminate wastewater of toxic metals. Bioresources Technology. 99: 3890-3895.

Satyawali, Y. and Balakrishnan, M. 2008. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. Journal of environmental Management. 86: 481-479.

Selim, M.H. Elshafei, A.M. and El-Diwany, A.I. 1991. Production of single cell protein from yeast strains grown in *Egyptian vinasses*. Bioresources Technology. 36(2): 157-160.

Shojaosadati, S.A., Khalilzadeh, R., Jalilzadeh, A. and Sanaei, H.R. 1999. Biconversion of molasses stillage to protein as an economic treatment of this effluent. Resources, Conservation and Recycling. 27(1-2): 125-138.

Singh, P.N., Robinson, T. and Singh, D. 2004. Treatment of industrial effluents-distillery effluent. Bioresources Technology. 43: 135-141.

Sirianuntapiboon, S. and Prasertsong, K. 2007. Treatment of molasses wastewater by acetogenic bateria BP103 in sequencing bath reator (SBR) system. Bioresources Technology. 99: 1806-1815.

Sirianuntapiboon, S., Phothilangka, P. and Ohmomo, S. 2004. Decolourization of molasses wastewater by a strains no. BP103 of acetogenic bacteria. Bioresources Technology. 91: 31-39.

Sirianuntapiboon, S. and Tondee, T. 2000. Appliation of Packed Cage RB System for treating Waste Water Contaminated with Nitrogenous Compounds. Thammasat J. Sc. Tech. 5(1): 16-17.

Sirianuntapiboon, S., Zohsalam, P. and Ohmomo, S. 2004. Decolorization of molasses wastewater by *Citeromyces* sp. WR-43-6. Process Biochemistry. 39: 917-924.

Syutsubo, K., Haranda, H., Ohashi, A. and Suzuki, H. 1997. An effective start-up of thermophilic UASB reactor by seeding mesophilically-grown granular sludge. Water Science and Technology. 36(6-7): 391-39.

Tay, J.H. and Jeyaseelan, S. 1995. Membrane filtration for reuse of wastewater from beverage industry. Resource, Conservation and Recycling. 15: 33-40.

Tennant, D.R. 2008. Sreening potential intakes of olour additives used in non-alccoholic beverages. Food and Chemical Toxicology. 46: 1985-1993.

Tewari, P.K. and Batra, V.S., Balakrishnan. 2007. Water management initiatives in sugarcane molasses based distilleries in India. Resources. Conservation and Recycling. 52: 351-367.

Tokuda, M., Fujiwara, Y. and Kida, K. 1999. Pilot plant test for the removal of organic matter, N and P from whisky pot ale. Process Biochemistry. 35(3-4): 267-275.

Tondee, T. and Sirianuntapiboon, S. 2008. Decolorization of molasses wastewater by *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861. Bioresource Technology. 99: 6258-6265.

Tondee, T., Sirianuntapiboon, S. and Ohmomo, S. 2007. Deolorization of molasses wastewater by yeast *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246. Bioresoure Tehnology. 99: 5511-5519.

Vijayaraghavan, K. and Ramanujam, T.K. 2000. Performance of anaerobic contact filter in series for treating distillery spentwash. Bioprocess and Biosystems Engineering. 22(2): 109-114.

Wolmaran, B. and de Villires, G.H. 2002. Start-up of a UASB treatment plant on distillery wastewater. Water SA. 28(1). 63-68.

Yu, H.Q., Zhao, Q. and Tang, Y. 2006. Anaerobic treatment of winery wastewater using labolatory-scale multi- and single-fed filters at ambient temperatures. Process Biochemistry. 41: 2447-2481.

สรีลา ทั้งรักษ์. 2548. "น้ำอัดลม" ภัยที่คาดไม่ถึง.
http://www.stou.ac.th/study/sumrit/11-51(500)/page1-11-51(500).html (สืบค้นเมื่อ 18 มีนาคม 2551)

นิตยสารเกษตรคิวเซ. EM ขยายไม่ใช่หัวเชื้อ EM. 2548. http://www.emkyusei.com/index1.html (สืบค้นเมื่อ 7 มีนาคม 2551)

นิตยสารเกษตรคิวเซ. การแก้ปัญหากลิ่นเหม็นและบำบัดน้ำเสียในโรงงานยาง.
http://www.emkyusei.com/ubon1.htm#top (สืบค้นเมื่อ 25 กุมภาพันธ์ 2551)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric acid total sugar (Dubois *et al.*, 1956)

วิธีการวิเคราะห์

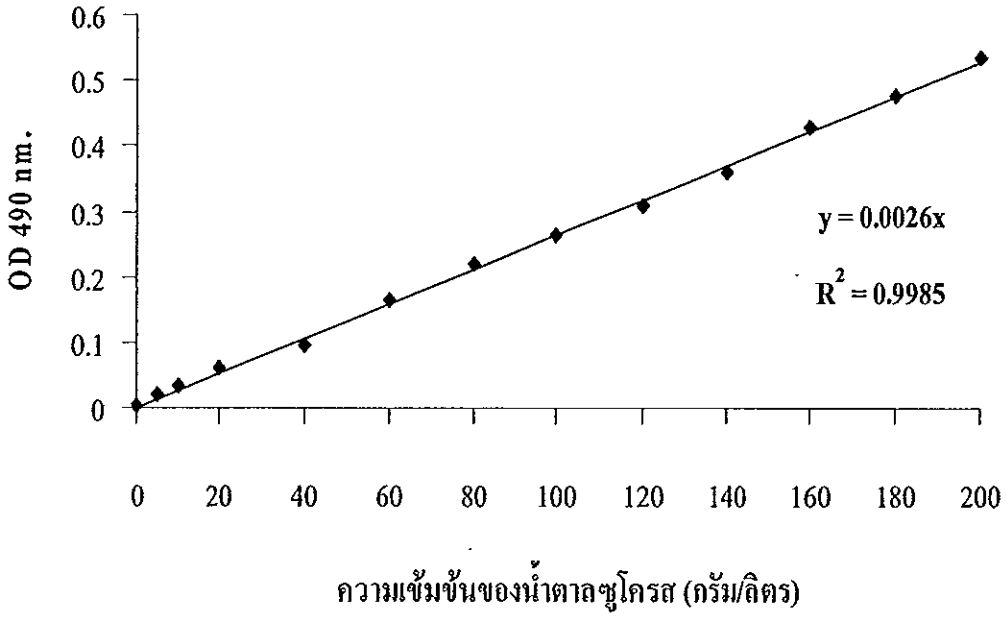
1. ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง(แช่ในน้ำแข็ง) เติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 2-3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปแล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1601) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
4. นำค่า OD ที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่า } OD_{490}\text{ nm})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$

กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส

เจือจางสารละลายน้ำตาลซูโครสให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140,160,180 และ 200 กรัม/ลิตร แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง นำค่า OD ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ก-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลซูโครสที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) ตามวิธีของ Zoecklein และคณะ (1995)

Ebulliometer เป็นเครื่องมือที่ใช้หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยการหาจุดเดือดแล้วเปิดเทียบกับแผ่นสเกลไว้สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (DUJARDIN-SALLERON scale) เครื่องมือประกอบด้วยโลหะทรงกระบอก 2 ส่วนคือ ส่วน A และ B ต่อกัน ทรงกระบอกส่วน A จะเป็นที่บรรจุสารละลายที่ต้องการหาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยบรรจุสารละลายที่ต้องการวัดลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้ สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิ ใส่น้ำสำหรับหล่อเย็นลงในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E ส่วน F เป็นที่ใช้สำหรับเปิดถ่ายสารละลายออก และท่อ G เป็นตำแหน่งสำหรับรวมเปลวไฟจากตะเกียง แสดงในภาพที่

วิธีการวิเคราะห์

2.1 การหาจุดเดือดของน้ำกลั่น

ก. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้

ข. เติมน้ำหล่อเย็นลงในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E

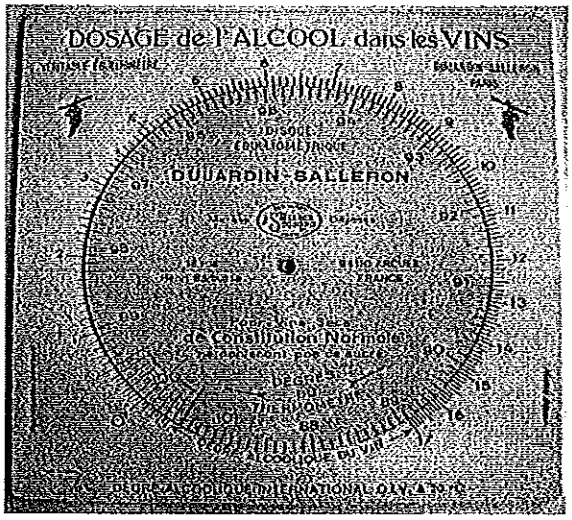
ค. จุดตะเกียงแล้ววางใต้ท่อ G

ง. เมื่อน้ำเดือดแล้วอ่านค่าอุณหภูมิที่คงที่ (ประมาณ 15-30 วินาที)

จ. นำค่าของอุณหภูมิที่ได้ไปปรับสเกล โดยให้ขีดศูนย์ของสเกลวงนอกตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำกลั่น

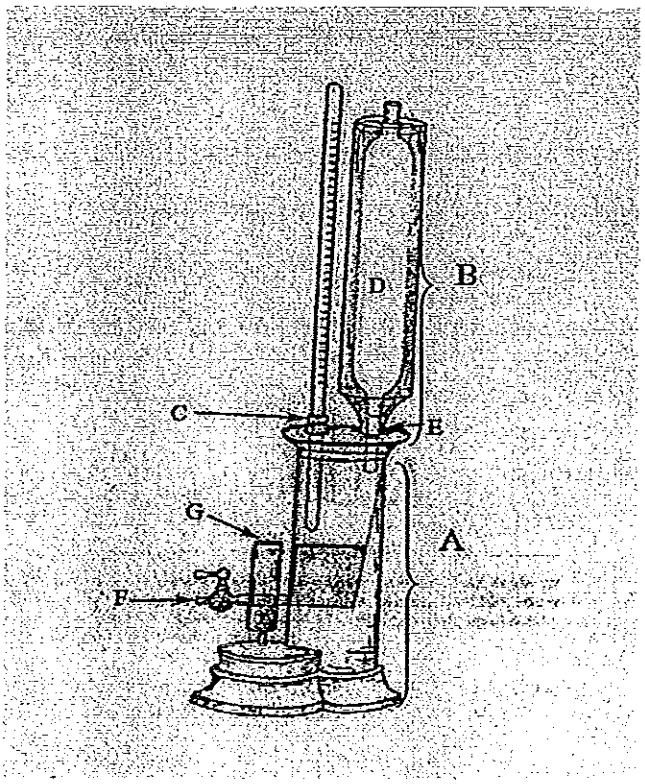
2.2 การหาจุดเดือดของตัวอย่าง

เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้ จากนั้นนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1.1 ตั้งแต่ข้อ ช. ถึง ง. การอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์อ่านค่าจากสเกลวงนอกที่ตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของสารละลายตัวอย่างที่ได้ หน่วยของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้คือ เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร



ภาพที่ ก-2 แผ่นสเกลสำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์

ที่มา: http//www.dujardin-salleron.net



ภาพที่ ก-3 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์

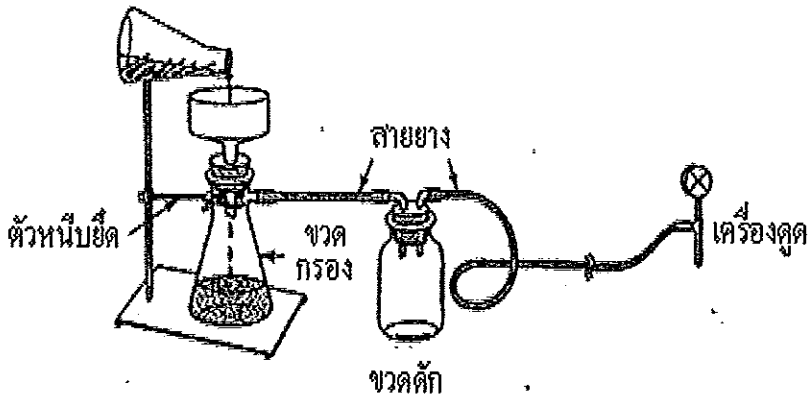
3. การวิเคราะห์หามวลชีวภาพ

วิธีการวิเคราะห์

1. นำกระดาษกรอง cellulose nitrate filter (Sartorius) ขนาด 0.45 μm ไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (Dasicater) ชั่งน้ำหนักกระดาษก่อนนำไปกรอง (W_1)
2. กรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง โดยใช้แรงดึงสุญญากาศจากเครื่องกรอง (Vaccuum filter)
3. นำกระดาษกรองที่มีตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (Dasicater) แล้วนำกระดาษกรองไปชั่งน้ำหนักหามวลชีวภาพของตัวอย่าง (W_2) หน่วยที่ได้คือ กรัมต่อลิตร

การคำนวณ

มวลชีวภาพ = $(W_2) - (W_1)$



ภาพที่ ก-4 การกรองตัวอย่างด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ
ที่มา: http//www. chemsci.kku.ac.th

4. ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ($Y_{X/S}$)

การคำนวณ

$$Y_{X/S}\text{ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)} = \frac{\text{ปริมาณมวลชีวภาพที่เกิดขึ้น}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป}}$$

5. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max})

วิธีการวิเคราะห์

1. นำค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียและยีสต์ และค่าน้ำหนักแห้งของเชื้อรา มาเขียนกราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
2. หาค่าระยะเวลาที่จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (doubling time) จากกราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
3. คำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max})

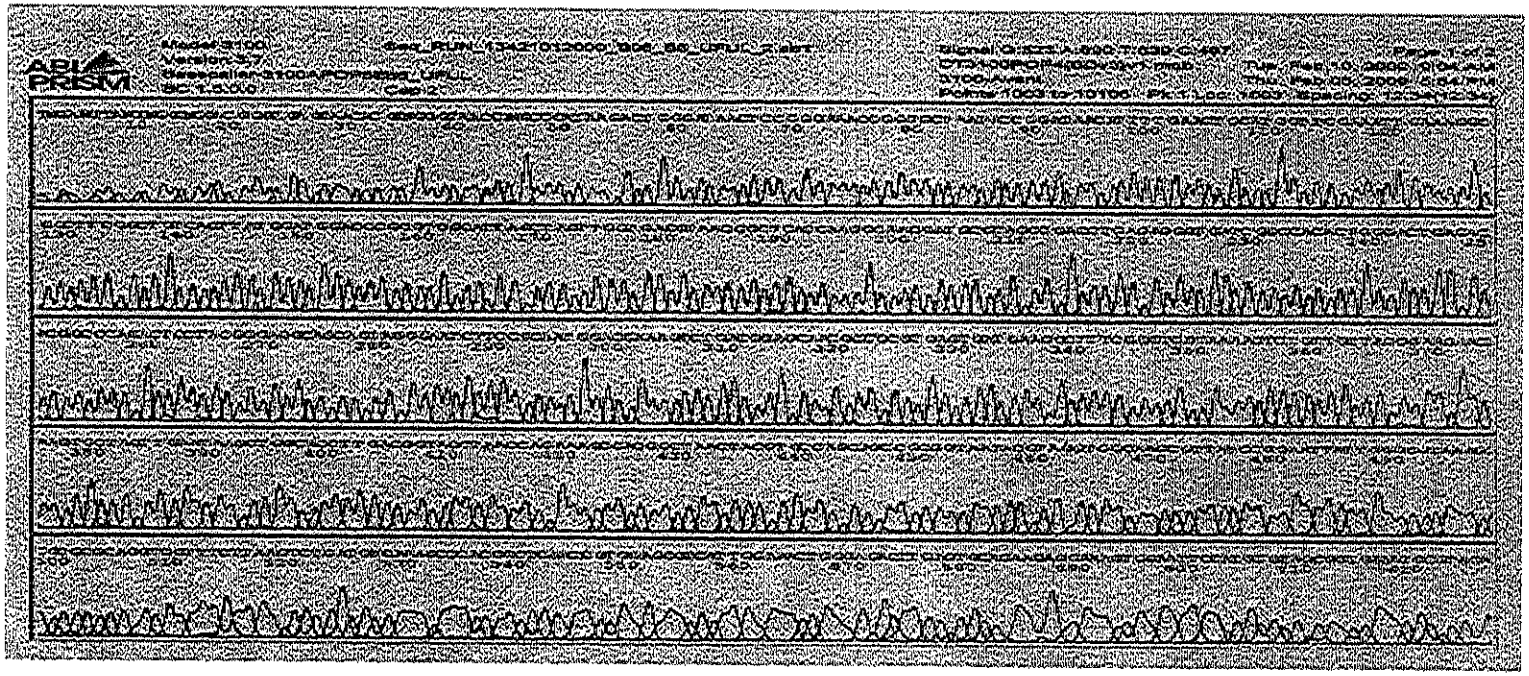
การคำนวณ

$$\mu_{max}\text{ (ต่อเวลา)} = \frac{0.693}{\text{doubling time}}$$

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์

1. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์คัดแยก



ภาพที่ ข-1 แสดง DNA sequencing Electropherogram ของแบคทีเรีย B_6 (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis*)

B6

Program BLASTN 2.2.19+

Description
All GenBank-EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

Query Length 554

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU429672.1	Bacillus thuringiensis serovar israelensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
EU429671.1	Bacillus thuringiensis serovar tenebrionis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
EU429665.1	Bacillus thuringiensis serovar berliner 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
EU429660.1	Bacillus thuringiensis serovar colmeri 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ603035.1	Bacillus cereus strain sr6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601659.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601658.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601657.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601655.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601649.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%

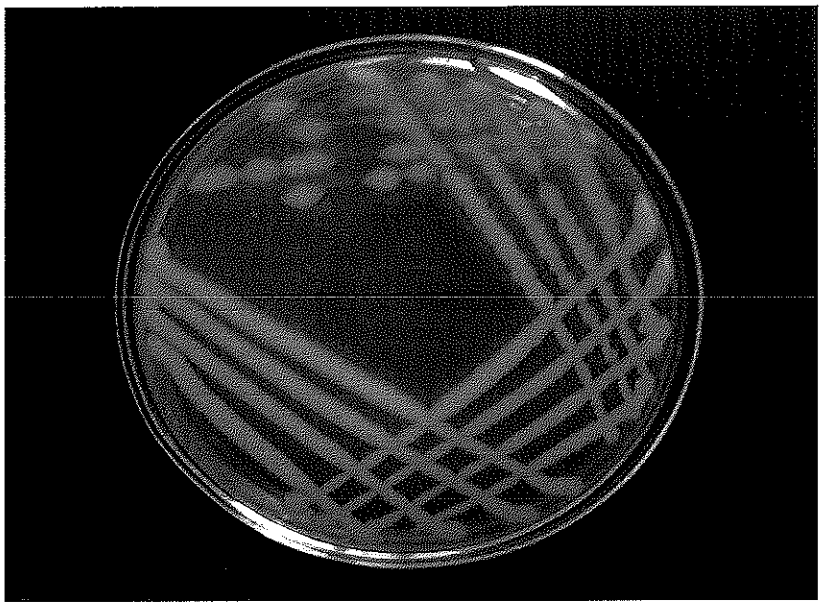
ภาพที่ ข-2 ผลการทำ Alignment กับ sequence จากฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ของแบคทีเรีย B_6 (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis*)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ601646.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601644.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601643.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601640.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601639.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601638.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601636.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601635.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601634.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601633.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601632.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ601631.1	Bacillus sp. enrichment culture clone SYW1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%
FJ527727.1	Bacillus thuringiensis strain Db4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%

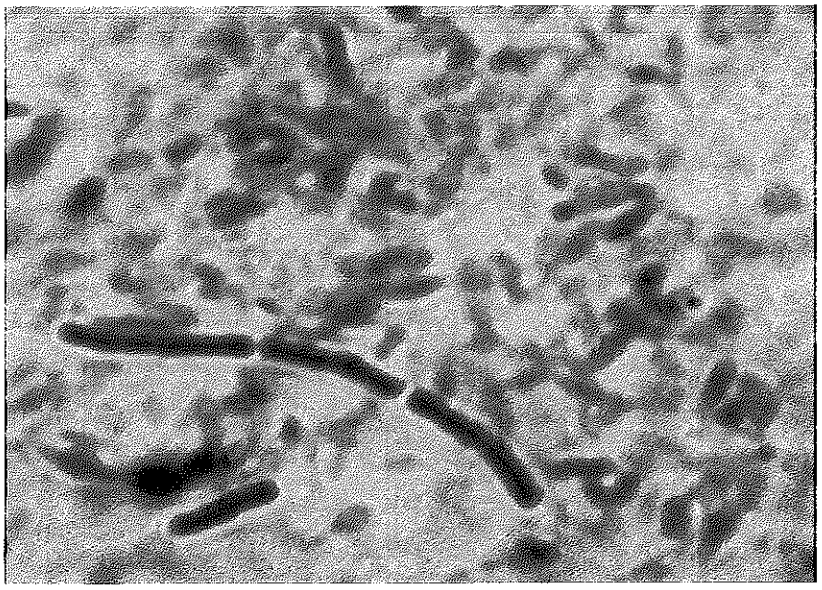
ภาพที่ ข-2 (ต่อ) ผลการทำ Alignment กับ sequence จากฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ของแบคทีเรีย B6 (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis*)

```
gb|EU429672.1| Bacillus thuringiensis serovar israelensis 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence
Length=1520

 Score = 1024 bits (554),  Expect = 0.0
 Identities = 554/554 (100%), Gaps = 0/554 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    GCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACT  60
            ||| |||||||| |||| |||||||||||||  ||||| ||| |||||||||| |||||
Sbjct  99   GCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACT  158

Query  61   GCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTCATGGATGGACCCGCGTCGCAT  120
            || |||| ||| |||||||||| |||||||||||| ||||||||| |||| |||||
Sbjct  159  GCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTCATGGATGGACCCGCGTCGCAT  218

Query  121  TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT  180
            |||||| |||||||||||||||||||  |||||||||| ||| ||||||||||
Sbjct  219  TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT  278

Query  181  GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  240
            |||| |||||||||| |||| |||||||||||| |||| |||||||||| ||||||||
Sbjct  279  GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  338

Query  241  CTTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGG  300
            |||||||| ||| ||||| |||||||  |||||| ||||||||| ||| |||||||||
Sbjct  339  CTTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGG  398

Query  301  GTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGAC  360
            |||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct  399  GTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGAC  458

Query  361  GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG  420
            |||| ||| |||| |||| |||||||||||||| |||| ||| |||| ||| ||||
Sbjct  459  GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG  518

Query  421  GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGAT  480
            ||| |||||||| ||| |||||||||||| ||||| ||| |||||||| ||||
Sbjct  519  GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGAT  578

Query  481  GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA  540
            ||||||| ||| |||||||||||||||| |||||||||||| ||| |||| ||||||
Sbjct  579  GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA  638

Query  541  GAGGAAAGTGGAAT  554
            |||||| |||||||
Sbjct  639  GAGGAAAGTGGAAT  652
```

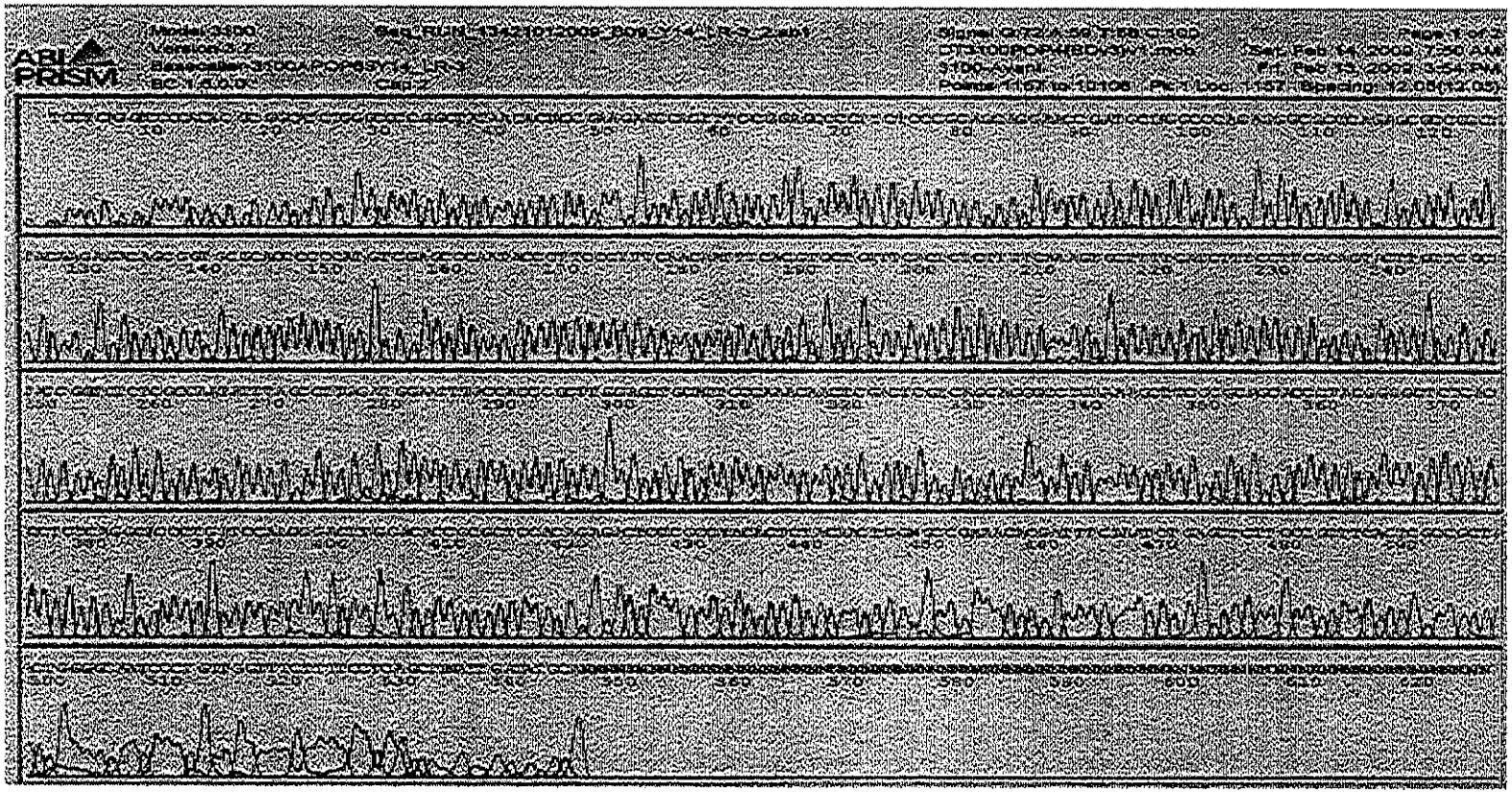
ภาพที่ ข-2 (ต่อ) ผลการทำ Alignment กับ sequence จากฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ของแบคทีเรีย B_6 (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis*)



ภาพที่ ข-3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย B_6 (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis*) เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) เป็นเวลา 1 วัน



ภาพที่ ข-4 ลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรีย B_6 (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis*) เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) เป็นเวลา 1 วัน



ภาพที่ ข-5 แสดง DNA sequencing Electropherogram ของยีสต์ Y_{14} (*Pichia galeiformis partial*)

Program BLASTN 2.2.19+

Description
All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

Query Length 524

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AM882676.1	Pichia galeiformis partial 26S rRNA gene, strain YS119	942	942	100%	0.0	99%
EU019217.1	Pichia galeiformis isolate C6-3 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%
EF564425.1	Pichia galeiformis strain NX1C 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%
EF564424.1	Pichia galeiformis strain NX1A 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%
EF564422.1	Pichia galeiformis strain GS13E 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%
AM275341.1	Pichia sp. YS104 partial 16S rRNA gene, isolate YS104	942	942	100%	0.0	99%
AJ749826.1	Pichia galeiformis 26S rRNA gene, isolate ESAB5	942	942	100%	0.0	99%
AY529508.1	Pichia membranifaciens isolate 59 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	99%	0.0	99%
AY529506.1	Pichia membranifaciens isolate 90 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	939	939	100%	0.0	99%
EF644453.1	Pichia galeiformis strain KEL3 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	937	937	100%	0.0	99%
AY242327.1	Candida sp. JW01-7-11-1-4-y1 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	937	937	100%	0.0	99%
EU441912.1	Pichia galeiformis strain D 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	935	935	99%	0.0	99%
DQ104714.1	Pichia sp. CBS 209 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene,	935	935	98%	0.0	99%

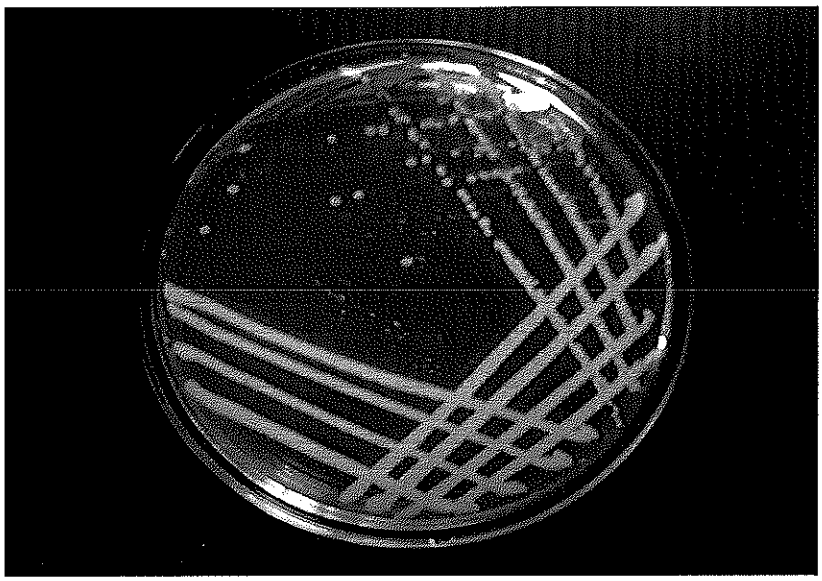
ภาพที่ ข-6 ผลการทำ Alignment กับ sequence จากฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ของของยีสต์ Y_{14} (*Pichia galeiformis partial*)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
	partial sequence					
AY529502.1	Pichia membranifaciens isolate 83 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	928	928	97%	0.0	99%
DQ655692.1	Pichia galeiformis strain NRRL Y-27938 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	926	926	100%	0.0	98%
EF550223.1	Pichia manshurica strain NRRL Y-17349 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	922	922	97%	0.0	99%
DQ104719.1	Pichia sp. CBS 241 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	922	922	97%	0.0	99%
U75738.1	Pichia galeiformis 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	922	922	97%	0.0	99%
AB041002.1	Pichia manshurica gene for 26S rRNA, partial sequence	922	922	97%	0.0	99%
DQ869076.1	Pichia galeiformis strain WQGB55 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	918	918	98%	0.0	98%
AY529507.1	Pichia membranifaciens isolate 77 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	918	918	97%	0.0	99%
EF550187.1	Pichia galeiformis isolate W2S21.8 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	915	915	100%	0.0	98%
EF564423.1	Pichia galeiformis strain GSSLZ2 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	915	915	100%	0.0	98%
DQ466534.1	Pichia membranifaciens isolate G46 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	905	905	95%	0.0	99%
AB438162.1	Pichia galeiformis gene for 26S rRNA, partial sequence, strain: RS3	900	900	95%	0.0	99%
EU416316.1	Pichia manshurica isolate 9b 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	900	900	95%	0.0	99%
AB045137.1	Pichia sp. IFO 1788 gene for 26S rRNA, partial sequence	900	900	97%	0.0	98%
EU416321.1	Pichia manshurica isolate 10b 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	896	896	95%	0.0	99%
EU416318.1	Pichia manshurica isolate 9a 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	896	896	95%	0.0	99%
EF554809.1	Pichia galeiformis strain GDB 802 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	893	893	94%	0.0	99%
EU416320.1	Pichia manshurica isolate 32 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	891	891	94%	0.0	99%
EU416317.1	Pichia manshurica isolate 20b 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	891	891	94%	0.0	99%

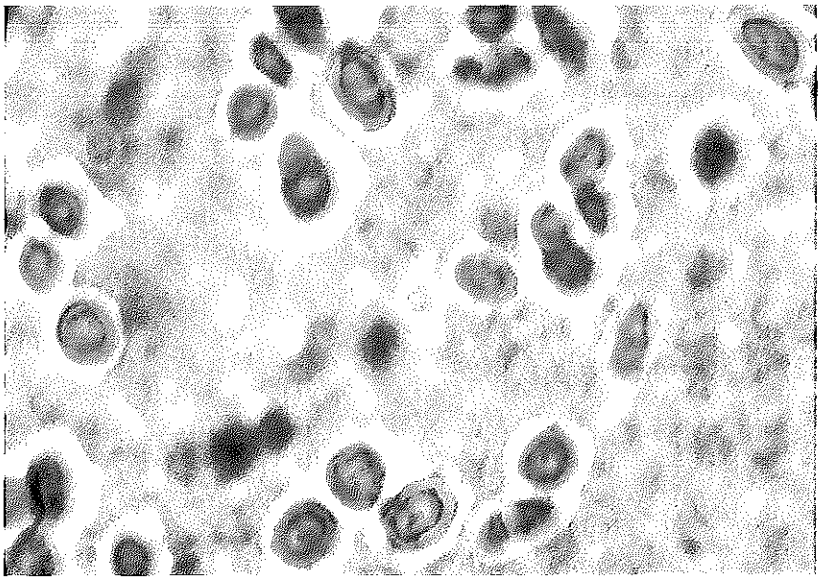
ภาพที่ ข-6 (ต่อ) ผลการทำ Alignment กับ sequence จากฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ของของยีสต์ Y_{14} (*Pichia galeiformis partial*)

```
gb|AY887676.1  Pichia galeiformis partial 26S rRNA gene, strain YS119
Length=569

 Score =  942 bits (510),  Expect = 0.0
 Identities = 520/524 (99%), Gaps = 3/524 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    CCCACACGCGGCATCTCGGCCCCGGCTATAACACTACCGAAGACCCACTTTCCGGAGCCC  60
            |||||| ||||:|||| ||||||||||||  ||| |:||| :|||:|||| |||||.|
Sbjct  530  CCCACACGCGGCATCT-GGCCCCGGCTATAACACT-CCGAAGAGCCACTTTCCGGAGCCC  473

Query  61   CTTCTCCCCGCAGCAGGAACCGATGCTAGGCCCAGAGGGCGCCCAGAGCGCCGCCTACAAG  120
            ||||||  |||||||| |||||:||| ||  '|||||'|||: |||||||::|||. .|
Sbjct  472  CTTCTCCCCGCAGCAGGAACCGATGCT-GGCCCAGAGGGCGCCCAGAGCGCCGCCTACAAG  414

Query  121  AGACAGCGGGTGCGCACCCCCCACATGTCGAGCCCAATACCCTTCCCTTTCAACAATTTCACG  180
            ! ||||:||||||||';|||| ||||||;|||||' ,||| |||| ||| ;||||;|||
Sbjct  413  AGACAGCCGTGCCGCACCCCCCACATGTCGAGCCCAATACCCTTCCCTTTCAACAATTTCACG  354

Query  181  CGCTGCTTCACTCTCCTTTCAAAGTGCTTTTCATCCTTCCTTCACAGTACTTGTTCGCTA  240
            |'||| |||| ||| ';|||| :||||||:|||||| ||||||||||:|||||||||||||
Sbjct  353  CGCTGCTTCACTCTCCTTTCAAAGTGCTCTTCATCCTTCCTTCACAGTACTTGTTCGCTA  294

Query  241  CCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCCTTAGATGGAATCTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTC  300
            ''|||'|||| ||| ||||||:||||||:|||||;  |||:|||||||| |||| ||||
Sbjct  293  CCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCCTTAGATGGAATTTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTC  234

Query  301  CCAAACAACTCGACTCGTCAGCAGGGCCTCAAAAGCTTCGCCGCAGCACCCTACGGGGCTC  360
             ||||||||':|||:|||||||||||'  ||||||||||||!|||| |||||||| ||||
Sbjct  233  CCAAACAACTCGACTCGTCAGCAGGGCCTCAAAAGCTTCGCCGCAGCACCCTACGGGGCTC  174

Query  361  TCACCCTCTCAGGCACCCTGTTCCAAGGGACTTGGACACCGCGCTCCACAGAGACTCCCG  420
            ||||||||| |||||||||!|||||| .||||||:|||| ||| |||| ||| :||||
Sbjct  173  TCACCCTCTCAGGCACCCTGTTCCAAGGGACTTGGACACCGCGCTCCACAGAGACTCCCG  114

Query  421  CCTACACTCTACAACTCGTGCCCGAAACACGATTTCAAATCTGAGCTCTTGCCGCTTCACT  480
            ||||||||::|||||||||| ||||||||||||'  |||| :|||||||  ;||||:|||||
Sbjct  113  CCTACACTCTACAACTCGTGCCCGAAACACGATTTCAAATCTGAGCTCTTGCCGCTTCACT  54

Query  481  CGCCGCTACTGGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCAGCTT  524
            |||| ||| |||| |||: ;|||||:|||||| ;|||' ||||
Sbjct  53   CGCCGCTACTGGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCAGCTT  10
```

ภาพที่ ข-6 (ต่อ) ผลการทำ Alignment กับ sequence จากฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ของของยีสต์ Y_{14} (*Pichia galeiformis partial*)



ภาพที่ ข-7 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ Y14 (*Pichia galeiformis partial*) เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 2 วัน

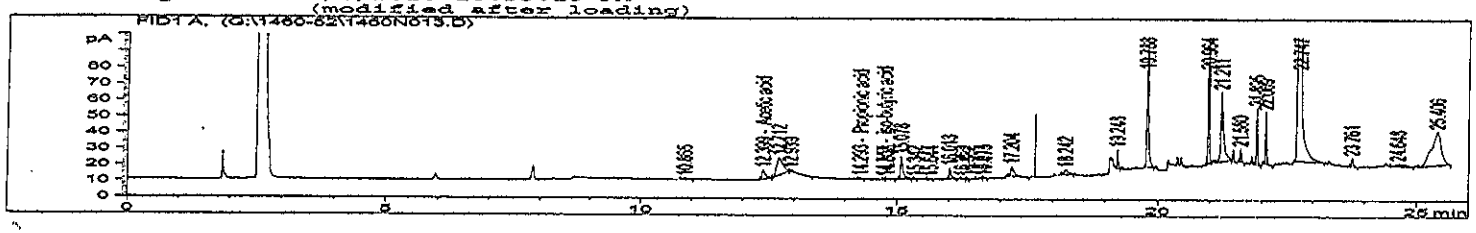


ภาพที่ ข-8 ลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ Y_{14} (*Pichia galeiformis partial*) เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 2 วัน

2. ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่าย (เชิงคุณภาพ) ของน้ำอัดลมหมดอายุ

Data File G:\1460-52\1460N013.D Sample Name: Soda 9

Injection Date	: 6/4/2009 5:05:51 PM	Seq. Line	: 7
Sample Name	: Soda 9	Vial	: 7
Acq. Operator	: Waraporn Ratsameepakai	Inj	: 1
		Inj Volume	: 1 µl
Acq. Method	: C:\HPCHEM\1\METHODS\1460-52.M		
Last changed	: 4/6/2009 10:37:25 PM by Waraporn Ratsameepakai		
Analysis Method	: G:\1460N011.M		
Last changed	: 9/6/2010 10:55:18 PM (modified after loading)		



Area Percent Report

Sorted By	: Signal
Calib. Data Modified	: 9/6/2010 10:51:30 PM
Multiplier	: 1.0000
Dilution	: 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.399	PB +	0.0674	20.571685	0.545514	Acetic acid
2	14.293	PBA ++	0.0423	1.505566	0.039935	Propionic acid
3	14.757	PB +	0.0217	4.787976e-1	0.009914	isobutyric acid
4	15.600	+++	0.00000	0.000000	0.000000	butyric acid
5	16.106	+++	0.00000	0.000000	0.000000	isovaleric acid
6	16.835	+	0.00000	0.000000	0.000000	valeric acid
Totals :				30.63631	0.5843	

Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

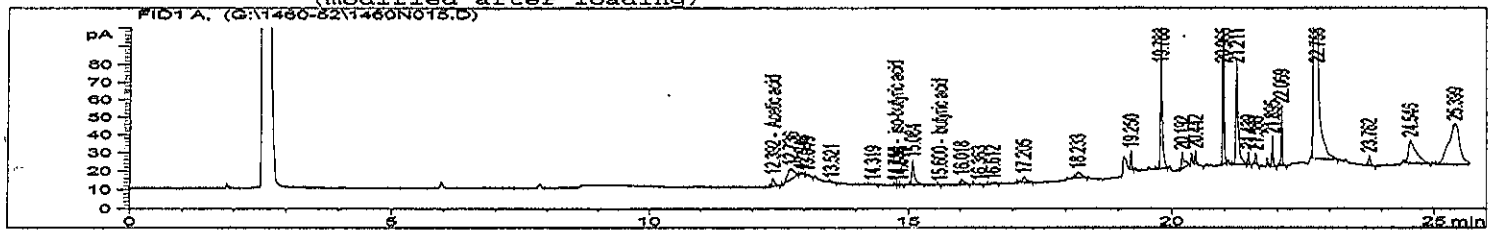
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Time reference compound(s) not found

*** End of Report ***

ภาพที่ ข-9 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่าย หลังจากการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 1 วัน

Data File G:\1460-52\1460N015.D Sample Name: Soda 10

```
Injection Date    : 6/4/2009 6:10:16 PM          Seq. Line :  8
Sample Name       : Soda 10                        Vial :  8
Acq. Operator     : Waraporn Ratsameepakai          Inj :  1
                                                Inj Volume : 1 µl
Acq. Method       : C:\HPCHEM\1\METHODS\1460-52.M
Last changed      : 4/6/2009 10:37:25 PM by Waraporn Ratsameepakai
Analysis Method   : G:\1460N011.M
Last changed      : 9/6/2010 10:55:59 PM
                    (modified after loading)
```




```
                          Area Percent Report

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      9/6/2010 10:51:30 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: FID1 A,
```

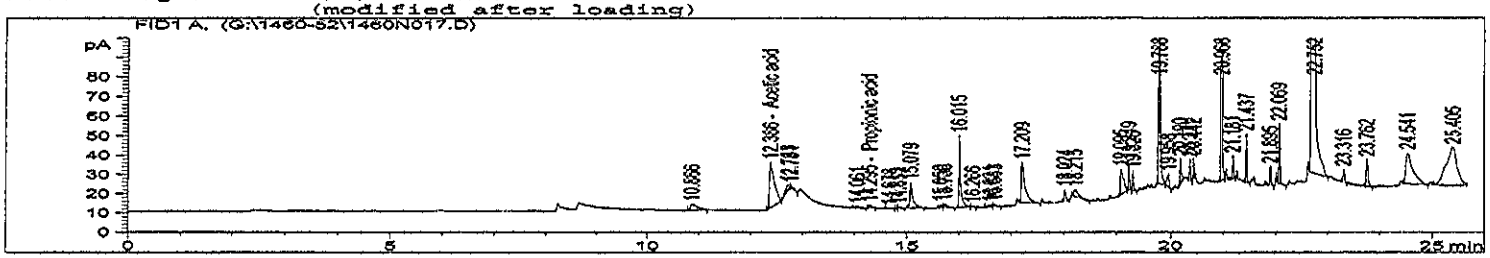
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.392	PBA +	0.0537	16.33611	0.26072	Acetic acid
2	14.293	++	0.0000	0.00000	0.00000	Propionic acid
3	14.756	PB +	0.0219	5.73889e-1	0.00905	iso-butyric acid
4	15.600	BBA ++	0.0217	2.53576e-1	0.00400	butyric acid
5	16.106	++	0.0000	0.00000	0.00000	iso-valeric acid
6	16.835	+	0.0000	0.00000	0.00000	valeric acid
Totals :				17.36357	0.2738	

```
 Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Time reference compound(s) not found

                          *** End of Report ***
```

ภาพที่ ข-10 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 3 วัน

Data File G:\1460-52\1460N017.D Sample Name: Soda 12

```
Injection Date    : 6/4/2009 7:14:33 PM          Seq. Line :   9
Sample Name       : Soda 12                        Vial :   9
Acq. Operator     : Waraporn Ratsameepakai          Inj :   1
                                                Inj Volume : 1 µl
Acq. Method       : C:\HPCHEM\1\METHODS\1460-52.M
Last changed      : 4/6/2009 10:37:25 PM by Waraporn Ratsameepakai
Analysis Method   : G:\1460N011.M
Last changed      : 9/6/2010 10:58:43 PM
                    (modified after loading)
```




```
                          Area Percent Report

Sorted By                 :      Signal
Calib. Data Modified      :      9/6/2010 10:51:30 PM
Multiplier                :      1.0000
Dilution                  :      1.0000

Signal 1: FID1 A,
```

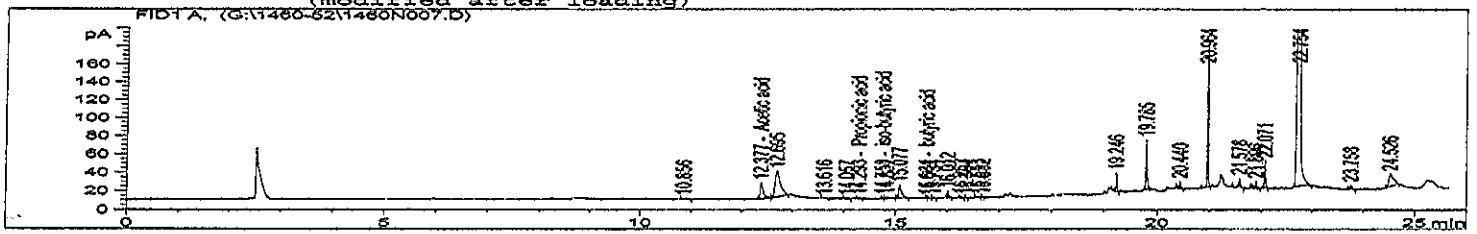
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.386	PB +	0.0835	148.66284	2.39239	Acetic acid
2	14.295	PBA +	0.0470	5.71487	0.09197	Propionic acid
3	14.757	+	0.0000	0.00000	0.00000	iso-butyric acid
4	15.600	+	0.0000	0.00000	0.00000	butyric acid
5	16.106	+	0.0000	0.00000	0.00000	iso-valeric acid
6	16.835	+	0.0000	0.00000	0.00000	valeric acid
Totals :				154.37772	2.4844	

```
 Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Time reference compound(s) not found

                          *** End of Report ***
```

ภาพที่ ข-11 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 7 วัน

Data File G:\1460-52\1460N007.D Sample Name: Soda 5

Injection Date : 6/4/2009 1:52:55 PM Seq. Line : 4
Sample Name : Soda 5 Vial : 4
Acq. Operator : Waraporn Ratsameepakai Inj : 1
Inj Volume : 1 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1460-52.M
Last changed : 4/6/2009 10:37:25 PM by Waraporn Ratsameepakai
Analysis Method : G:\1460N003.M
Last changed : 9/6/2010 10:41:43 PM
(modified after loading)



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 9/6/2010 10:40:12 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.377	PB +	0.0578	71.35184	1.31326	Acetic acid
2	14.293	PBA +	0.0338	1.57547	0.02900	Propionic acid
3	14.758	PB +	0.0226	1.00686	0.01853	iso-butyric acid
4	15.604	PB +	0.0151	1.305646-1	0.00240	butyric acid
5	16.106	+	0.0000	0.00000	0.00000	iso-valeric acid
6	16.835	+	0.0000	0.00000	0.00000	valeric acid
Totals :				74.06474	1.3632	

Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

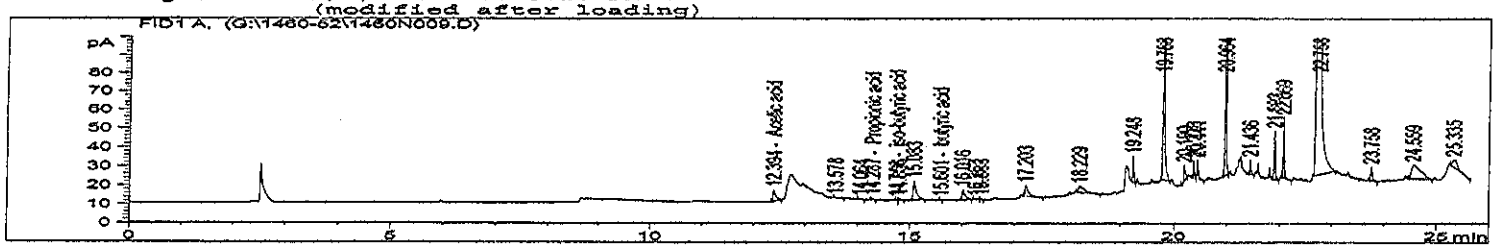
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Time reference compound(s) not found

*** End of Report ***

ภาพที่ ข-12 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 1 วัน

Data File G:\1460-52\1460N009.D Sample Name: Soda 6

```
Injection Date    : 6/4/2009 2:57:15 PM          Seq. Line :  5
Sample Name       : Soda 6                         Vial :  5
Acq. Operator     : Waraporn Ratsameepakai          Inj :  1
                                                Inj Volume : 1 µl
Acq. Method       : C:\HPCHEM\1\METHODS\1460-52.M
Last changed      : 4/6/2009 10:37:25 PM by Waraporn Ratsameepakai
Analysis Method   : G:\1460N003.M
Last changed      : 9/6/2010 10:45:20 PM
                    (modified after loading)
```



Area Percent Report

```
Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      9/6/2010 10:44:25 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: FID1 A,
```

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.394	FBA +	0.0598	23.74186	0.36188	Acetic acid
2	14.287	BBA +	0.0291	1.81923	0.02773	Propionic acid
3	14.758	PB +	0.0206	1.69806e-1	0.00259	iso-butyric acid
4	15.601	BB +	0.0204	3.32112e-1	0.00506	butyric acid
5	16.106	+	0.0000	0.00000	0.00000	iso-valeric acid
6	16.835	+	0.0000	0.00000	0.00000	valeric acid
Totals :				26.06301	0.3973	

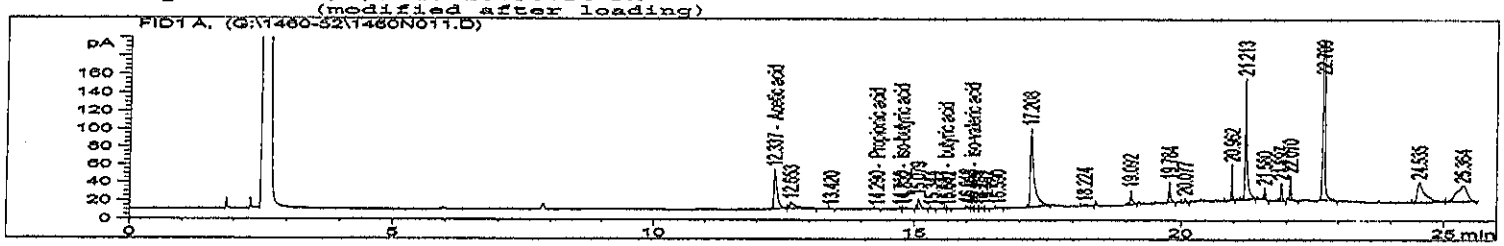
```
 Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Time reference compound(s) not found
```

*** End of Report ***

ภาพที่ ข-13 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 3 วัน

Data File G:\1460-52\1460N011.D Sample Name: Soda 8

Injection Date : 6/4/2009 4:01:31 PM Seq. Line : 6
Sample Name : Soda 8 Vial : 6
Acq. Operator : Waraporn Ratsameepakai Inj : 1
Inj Volume : 1 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1460-52.M
Last changed : 4/6/2009 10:37:25 PM by Waraporn Ratsameepakai
Analysis Method : G:\1460N011.M
Last changed : 9/6/2010 10:50:54 PM
(modified after loading)



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 9/6/2010 10:45:54 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.337	PB +	0.0584	180.85355	6.56256	Acetic acid
2	14.290	BBA +	0.0353	1.38587	0.05029	Propionic acid
3	14.756	PB +	0.0219	5.19305e-1	0.01884	iso-butyric acid
4	15.601	PB +	0.0179	2.96560e-1	0.01076	butyric acid
5	16.100	BB +	0.0226	2.02274	0.07340	iso-valeric acid
6	16.835	+	0.0000	0.00000	0.00000	valeric acid
Totals :				185.07802	6.7159	

Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

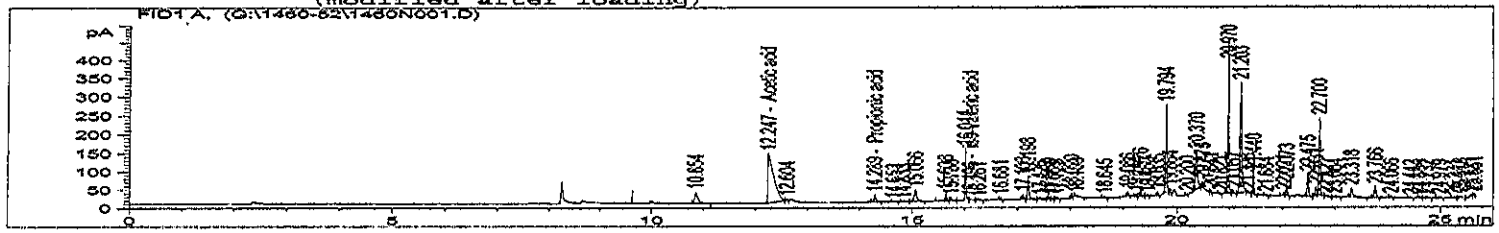
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Time reference compound(s) not found

*** End of Report ***

ภาพที่ ข-14 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย B_6 และยีสต์ Y_{14} (กวนผสม + ปรับสภาวะ) เป็นเวลา 7 วัน

Data File G:\1460-52\1460N001.D Sample Name: Soda 1

```
Injection Date    : 6/4/2009 10:40:06 AM          Seq. Line :  1
Sample Name       : Soda 1                          Vial :  1
Acq. Operator     : Waraporn Ratsameepakai           Inj :  1
                                                Inj Volume : 1 µl
Acq. Method       : C:\HPCHEM\1\METHODS\1460-52.M
Last changed      : 4/6/2009 10:37:25 PM by Waraporn Ratsameepakai
Analysis Method   : G:\1460N001.M
Last changed      : 9/6/2010 15:45:02 PM
                    (modified after loading)
```



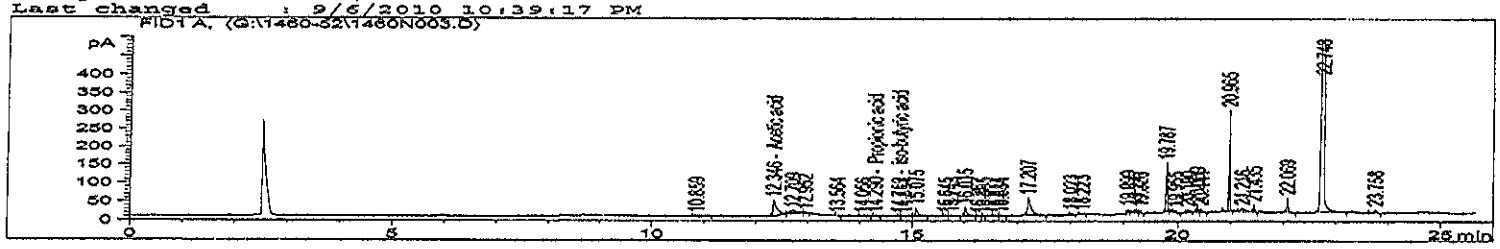

```
                          Area Percent Report

Sorted By                 :        Signal
Calib. Data Modified      :        9/6/2010 10:15:31 PM
Multiplier                :        1.0000
Dilution                  :        1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak RetTime  Type    Width      Area       Area     Name
  #   [min]           [min]    [pA*s]        %
----|-------|------|-------|----------|---------|----------------------
   1  12.247 PB   +   0.1006 1088.37830 21.34119 Acetic acid
   2  14.289 BBA  +   0.0364   49.07701  0.96231 Propionic acid
   3  14.755      ++   0.0000    0.00000  0.00000 iso-butyric acid
   4  15.600      ++   0.0000    0.00000  0.00000 butyric acid
   5  16.106 BB   ++   0.0144    1.44021  0.02824 iso-valeric acid
   6  16.835      +    0.0000    0.00000  0.00000 valeric acid

Totals :                      1138.89552  22.3317

 Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Time reference compound(s) not found

                          *** End of Report ***
```

ภาพที่ ข-15 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยน้ำหมักอีเอ็ม (กวนผสม) เป็นเวลา 1 วัน

Data File G:\1460-52\1460N003.D Sample Name: Soda 2

Injection Date : 6/4/2009 11:44:16 AM Seq. Line : 2
Sample Name : Soda 2 Vial : 2
Acq. Operator : Waraporn Ratsameepakai Inj : 2
Inj Volume : 1 µl

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1460-52.M
Last changed : 4/6/2009 10:37:25 PM by Waraporn Ratsameepakai
Analysis Method : G:\1460N003.M
Last changed : 9/6/2010 10:39:17 PM



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 9/6/2010 10:37:42 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.346	PB +	0.0678	222.92014	3.84792	Acetic acid
2	14.290	PBA +	0.0397	4.71941	0.08146	Propionic acid
3	14.759	PB +	0.0226	4.14340e-1	0.00715	iso-butyric acid
4	15.600	+	0.0000	0.00000	0.00000	butyric acid
5	16.106	+	0.0000	0.00000	0.00000	iso-valeric acid
6	16.835	+	0.0000	0.00000	0.00000	valeric acid
Totals :				228.05389	3.9365	

Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

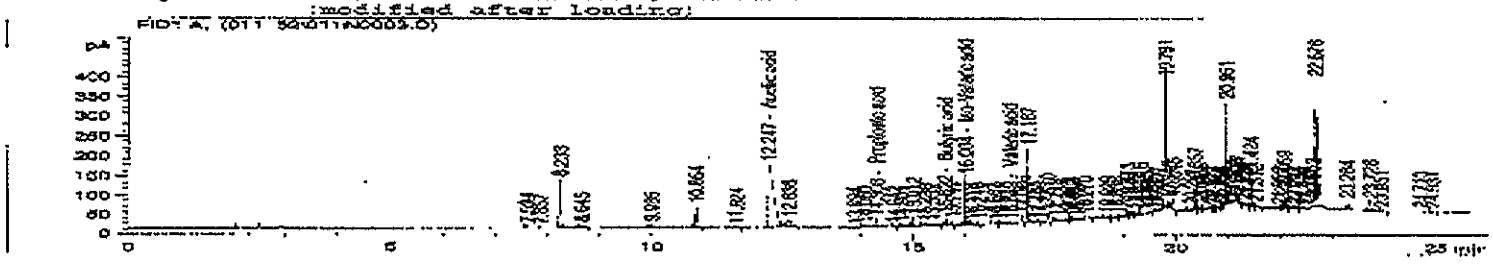
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Time reference compound(s) not found

*** End of Report ***

ภาพที่ ข-16 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยน้ำหมักอีเอ็ม (กวนผสม) เป็นเวลา 3 วัน

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\011_52\011N0005.D Sample Name: sample

```
Injection Date     : 4/24/2009 3:30:15 PM          Sig. Ino :    2
Sample Name        : sample                          Vial :    2
Acq. Operator      : Sathida                          Inj :    1
                                                 Inj Volume : 1 ul

Acq. Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\011_52.M
Last changed       : 4/24/2009 1:42:48 PM by Sathida
Analysis Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\011_52.M
Last changed       : 5/1/2009 6:50:13 PM by tassana
                     (modified after loading)
```



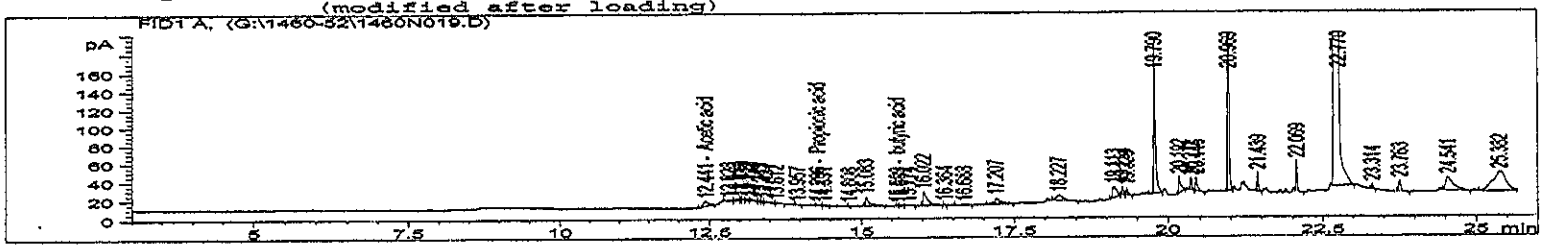

```
                         Area Percent Report

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      5/1/2009 6:50:13 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      2.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak RetTime  Type    Width     Area      Area     Name
  #   [min]           [min]  [pA*s]        %
----|-------|------|-------|----------|---------|--------------------
   1  12.247 PB   +  0.0942  1202.50879 46.30975 Acetic acid
   2  14.308 BBA  +  0.0296    40.62244  1.57117 Propionic acid
   3  15.625 BBA  +  0.0263    42.92695  1.66030 Butyric acid
   4  16.004 PBA  +  0.0229   214.40113  8.28472 Iso-Valeric acid
   5  16.849 BBA  +  0.0243     7.51673  0.29075 Valeric acid

Totals :                    1507.77604  29.1583

 Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

                         *** End of Report ***
```

ภาพที่ ข-17 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากการบำบัดด้วยน้ำหมักอีเอ็ม (กวนผสม) เป็นเวลา 7 วัน

Data File G:\1460-52\1460N019.D Sample Name: Soda 13

Injection Date : 6/4/2009 8:18:43 PM Seq. Line : 10
Sample Name : Soda 13 Vial : 10
Acq. Operator : Waraporn Ratsameepakai Inj : 1
Inj Volume : 1 µl

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1460-52.M
Last changed : 4/6/2009 10:37:25 PM by Waraporn Ratsameepakai
Analysis Method : G:\1460N011.M
Last changed : 9/6/2010 11:02:57 PM
(modified after loading)



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 9/6/2010 11:00:43 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type		Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.441	PB	+	0.0880	36.10220	0.44459	Acetic acid
2	14.296	PB	+	0.0386	1.37235	0.01690	Propionic acid
3	14.757		++	0.0000	0.00000	0.00000	iso-butyric acid
4	15.599	PB	++	0.0190	1.14951e-1	0.00142	butyric acid
5	16.106		++	0.0000	0.00000	0.00000	iso-valeric acid
6	16.835		+	0.0000	0.00000	0.00000	valeric acid
Totals :					37.58950	0.4629	

Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Time reference compound(s) not found

*** End of Report ***

ภาพที่ ข-18 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายของน้ำอัดลมหมดอายุที่ยังไม่ผ่านการบำบัด

ภาคผนวก ค
ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ในขั้นที่ 2 (Secondary screening) โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการ กำจัดน้ำตาล

ตารางที่ ค-1 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำตาลหลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์คัดแยกในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
% sugar removal	Between Groups	17781.802	7	2540.257	1552.076	.000
	Within Groups	26.187	16	1.637		
	Total	17807.989	23			
$Y_{x/s}$	Between Groups	.002	5	.000	1.879	.172
	Within Groups	.003	12	.000		
	Total	.005	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
% sugar removal	B3	B6	-3.53333(*)	1.044568	.004	-5.74772	-1.31895
		B8	6.34333(*)	1.044568	.000	4.12895	8.55772
		Y10	-1.20000	1.044568	.268	-3.41439	1.01439
		Y11	-1.47333	1.044568	.178	-3.68772	.74105
		Y14	-6.55667(*)	1.044568	.000	-8.77105	-4.34228
		CS	63.24333(*)	1.044568	.000	61.02895	65.45772

2. การคัดเลือกสูตรน้ำหมักอีเอ็มเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำอัดลม

2.1 การคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 1 (Primary screening) โดยพิจารณาจากปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็มแต่ละสูตรด้วยวิธีการ Spread plate และ Pour plate

ตารางที่ ค-2 ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักอีเอ็ม 3 สูตร จากวิธีการ Spread plate และ Pour plate เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
spread plate	Between Groups	341287524200000000	2	17064376210000000	2999.892	.000
	Within Groups	341299800000000	6	56883300000000		
	Total	341628824000000000	8			
pour plate	Between Groups	111329824420983400	2	55664912210491700	7.535	.023
	Within Groups	44326978904100420	6	7387829817350070		
	Total	155656803325083900	8			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
number (spread)	EM 1	EM 2	424110000(*)	6158100.35	.000	409041671.25	439178328.74
		EM 3	230000000	6158100.35	.010	7931671.25	38068328.74
	EM 2	EM 1	-44110000(*)	6158100.35	.000	-43917828.74	-40901671.25
		EM 3	-4211000(*)	6158100.35	.000	-41617328.74	-3861671.25

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
number (spread)	EM 3	EM 1	-230000000	6158100.35	.010	-48061838.74	-79471671.25
		EM 2	10111000 (*)	6158100.35	.000	286041671.25	416178328.74
number (pour)	EM 1	EM 2	189333.33(*)	7179910.78	.038	214145277.91	357593388.75
		EM 3	-79559841.66	7019910.78	.300	-21283897.08	92164213.75
	EM 2	EM 1	-189333.33(*)	7019910.78	.038	-35759388.75	-14145277.91
		EM 3	-26542175(*)	7179910.78	.009	-43713230.41	-93705119.58
	EM 3	EM 1	79559841.66	7079910.78	.300	-92164213.75	251283897.08
		EM 2	265429175(*)	7019910.78	.009	193705119.58	437153230.41

2.2 การคัดเลือกน้ำหมักอีเอ็มในขั้นที่ 2 (Secondary screening) โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล

ตารางที่ ค-3 ผลการคัดเลือกสูตรของน้ำหมักอีเอ็มโดยพิจารณาประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
% sugar removal	Between Groups	16686.454	3	5562.151	3834.115	.000
	Within Groups	11.606	8	1.451		
	Total	16698.059	11			
$Y_{x/s}$	Between Groups	32.768	3	10.923	108414.091	.000
	Within Groups	.001	8	.000		
	Total	32.769	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
% sugar removal	EM1	EM3	2.0633	.98343	.069	-.2045	4.3311
		CS	77.5767(*)	.98343	.000	75.3089	79.8445
		CN	73.5067(*)	.98343	.000	71.2389	75.7745
	EM3	EM1	-2.0633	.98343	.069	-4.3311	.2045
		CS	75.5133(*)	.98343	.000	73.2455	77.7811
		CN	71.4433(*)	.98343	.000	69.1755	73.7111
	CS	EM1	-77.5767(*)	.98343	.000	-79.8445	-75.3089
		EM3	-75.5133(*)	.98343	.000	-77.7811	-73.2455
		CN	-4.0700(*)	.98343	.003	-6.3378	-1.8022
	CN	EM1	-73.5067(*)	.98343	.000	-75.7745	-71.2389

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) agitate (rpm)	(J) agitate (rpm)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
% sugar removal	CN	EM3	-71.4433(*)	.98343	.000	-73.7111	-69.1755
		CS	4.0700(*)	.98343	.003	1.8022	6.3378
$Y_{x/s}$	EM1	EM3	.0767(*)	.00820	.000	.0578	.0956
		CS	3.3483(*)	.00820	.000	3.3294	3.3672
		CN	3.3373(*)	.00820	.000	3.3184	3.3562
	EM3	EM1	-.0767(*)	.00820	.000	-.0956	-.0578
		CS	3.2717(*)	.00820	.000	3.2528	3.2906
		CN	3.2607(*)	.00820	.000	3.2418	3.2796
	CS	EM1	-3.3483(*)	.00820	.000	-3.3672	-3.3294
		EM3	-3.2717(*)	.00820	.000	-3.2906	-3.2528
		CN	-.0110	.00820	.216	-.0299	.0079
	CN	EM1	-3.3373(*)	.00820	.000	-3.3562	-3.3184
		EM3	-3.2607(*)	.00820	.000	-3.2796	-3.2418
		CS	.0110	.00820	.216	-.0079	.0299

3. ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยจุลินทรีย์คัดแยกและน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในระดับห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ ค-4 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาลของน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 เมื่อเติมในน้ำอัดลมหมดอายุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
% sugar removal	Between Groups	374.152	9	41.572	49.474	.000
	Within Groups	16.806	20	.840		
	Total	390.958	29			
COD	Between Groups	205.744	9	22.860	39.165	.000
	Within Groups	11.674	20	.584		
	Total	217.418	29			
BOD	Between Groups	237.362	9	26.374	34.166	.000
	Within Groups	15.439	20	.772		
	Total	252.801	29			
Color	Between Groups	11913.652	9	1323.739	4685.747	.000
	Within Groups	5.650	20	.283		
	Total	11919.302	29			
$Y_{X/S}$	Between Groups	.000	2	.000	.214	.813
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.001	8			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
% sugar removal	Y14 (control)	Y14 (agi)	-3.81(*)	.748	.000	-5.3744	-2.2521
		Y14 (opt.)	-.67	.748	.381	-2.2313	.8917
		Y14 (opt.+agi)	-7.21(*)	.748	.000	-8.7713	-5.6483
		Mix (control)	-1.39	.748	.078	-2.9513	.1711
		Mix (agi)	-5.25(*)	.748	.000	-6.8146	-3.6920
		Mix (opt.)	-2.49(*)	.748	.003	-4.0548	-.9326
		Mix (opt.+agi)	-8.59(*)	.748	.000	-10.1541	-7.0324
		EM (control)	-4.91(*)	.748	.000	-6.4704	-3.3523
		EM (agi)	-11.63(*)	.748	.000	-13.1984	-10.0726
	Y14 (agi)	Y14 (control)	3.81(*)	.748	.000	2.2572	5.3744
		Y14 (opt.)	3.14(*)	.748	.000	1.5872	4.7044
		Y14 (opt.+agi)	-3.39(*)	.748	.000	-4.9577	-1.8351
		Mix (control)	2.42(*)	.748	.004	.8672	3.9840
		Mix (agi)	-1.44	.748	.069	-3.0071	.1219
		Mix (opt.)	1.32	.748	.093	-.2481	2.8815
		Mix (opt.+agi)	-4.78(*)	.748	.000	-6.3431	-3.2184
		EM (control)	-1.10	.748	.157	-2.6631	.4614
		EM (agi)	-7.82(*)	.748	.000	-9.3861	-6.2585
	Y14 (opt.)	Y14 (control)	.6700	.74846	.381	-.8991	2.2314
		Y14 (agi)	-3.14(*)	.74846	.000	-4.7014	-1.5821
		Y14 (opt.+agi)	-6.54(*)	.74846	.000	-8.1021	-4.9780
		Mix (control)	-.72	.74846	.348	-2.2821	.8417
		Mix (agi)	-4.58(*)	.74846	.000	-6.1454	-3.0228

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
% sugar removal	Y14 (opt.)	Mix (opt.)	-1.82(*)	.74846	.024	-3.3846	-.2621
		Mix (opt.+agi)	-7.92(*)	.74846	.000	-9.4846	-6.3621
		EM (control)	-4.24(*)	.74846	.000	-5.8046	-2.6821
		EM (agi)	-10.96(*)	.74846	.000	-2.5246	-9.4021
	Y14 (opt.+agi)	Y14 (control)	7.21(*)	.74846	.000	5.6487	8.7713
		Y14 (agi)	3.39(*)	.74846	.000	1.8354	4.9579
		Y14 (opt.)	6.54(*)	.74846	.000	4.9787	8.1013
		Mix (control)	5.82(*)	.74846	.000	4.2587	7.3813
		Mix (agi)	1.95(*)	.74846	.017	.3954	3.5179
		Mix (opt.)	4.71(*)	.74846	.000	3.1554	6.2779
		Mix (opt.+agi)	-1.38	.74846	.079	-2.9446	.1779
		EM (control)	2.29(*)	.74846	.006	.7354	3.8579
		EM (agi)	-4.42(*)	.74846	.000	-5.9846	-2.8621
	Mix (control)	Y14 (control)	1.39	.74846	.078	-.1713	2.9513
		Y14 (agi)	-2.42(*)	.74846	.004	-3.9846	-.8621
		Y14 (opt.)	.72	.74846	.348	-.8413	2.2813
		Y14 (opt.+agi)	-5.82(*)	.74846	.000	-7.3813	-4.2587
		Mix (agi)	-3.86(*)	.74846	.000	-5.4246	-2.3021
		Mix (opt.)	-1.10	.74846	.156	-2.6646	.4579
		Mix (opt.+agi)	-7.20(*)	.74846	.000	-8.7646	-5.6421
		EM (control)	-3.52(*)	.74846	.000	-5.0846	-1.9621
		EM (agi)	-10.24(*)	.74846	.000	-6.8046	-8.6821
	Mix (agi)	Y14 (control)	5.2533(*)	.74846	.000	3.6921	6.8146

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
% sugar removal	Mix (agi)	Y14 (agi)	1.44	.74846	.069	-.1213	3.0013
		Y14 (opt.)	4.58(*)	.74846	.000	3.0221	6.1446
		Y14 (opt.+agi)	-1.95(*)	.74846	.017	-3.5179	-.3954
		Mix (control)	3.86(*)	.74846	.000	2.3021	5.4246
		Mix (opt.)	2.76(*)	.74846	.001	1.1987	4.3213
		Mix (opt.+agi)	-3.34(*)	.74846	.000	-4.9013	-1.7787
		EM (control)	.34	.74846	.655	-1.2213	1.9013
		EM (agi)	-6.38(*)	.74846	.000	-7.9413	-4.8187
	Mix (opt.)	Y14 (control)	2.49(*)	.74846	.003	.9321	4.0546
		Y14 (agi)	-1.32	.74846	.093	-2.8813	.2413
		Y14 (opt.)	1.82(*)	.74846	.024	.2621	3.3846
		Y14 (opt.+agi)	-4.71(*)	.74846	.000	-6.2779	-3.1554
		Mix (control)	1.10	.74846	.156	-.4579	2.6646
		Mix (agi)	-2.76(*)	.74846	.001	-4.3213	-1.1987
		Mix (opt.+agi)	-6.10(*)	.74846	.000	-7.6613	-4.5387
		EM (control)	-2.42(*)	.74846	.004	-3.9813	-.8587
		EM (agi)	-9.14(*)	.74846	.000	-3.7013	-7.5787
	Mix (opt.+agi)	Y14 (control)	8.59(*)	.74846	.000	7.0321	10.1546
		Y14 (agi)	4.7800(*)	.74846	.000	3.2187	6.3413
		Y14 (opt.)	7.9233(*)	.74846	.000	6.3621	9.4846
		Y14 (opt.+agi)	1.3833	.74846	.079	-.1779	2.9446
		Mix (control)	7.2033(*)	.74846	.000	5.6421	8.7646
		Mix (agi)	3.3400(*)	.74846	.000	1.7787	4.9013

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
% sugar removal	Mix (opt.+agi)	Mix (opt.)	6.10(*)	.74846	.000	4.5387	7.6613
		EM (control)	3.68(*)	.74846	.000	2.1187	5.2413
		EM (agi)	-3.04(*)	.74846	.001	-4.6013	-1.4787
	EM (control)	Y14 (control)	4.91(*)	.74846	.000	3.3521	6.4746
		Y14 (agi)	1.10	.74846	.157	-.4613	2.6613
		Y14 (opt.)	4.24(*)	.74846	.000	2.6821	5.8046
		Y14 (opt.+agi)	-2.29(*)	.74846	.006	-3.8579	-.7354
		Mix (control)	3.52(*)	.74846	.000	1.9621	5.0846
		Mix (agi)	-.34	.74846	.655	-1.9013	1.2213
		Mix (opt.)	2.42(*)	.74846	.004	.8587	3.9813
		Mix (opt.+agi)	-3.68(*)	.74846	.000	-5.2413	-2.1187
		EM (agi)	-6.72(*)	.74846	.000	-8.2813	-5.1587
	EM (agi)	Y14 (control)	11.63(*)	.74846	.000	10.0721	13.1946
		Y14 (agi)	7.82(*)	.74846	.000	6.2587	9.3813
		Y14 (opt.)	10.96(*)	.74846	.000	9.4021	12.5246
		Y14 (opt.+agi)	4.42(*)	.74846	.000	2.8621	5.9846
		Mix (control)	10.24(*)	.74846	.000	8.6821	11.8046
		Mix (agi)	6.38(*)	.74846	.000	4.8187	7.9413
		Mix (opt.)	9.14(*)	.74846	.000	7.5787	10.7013
		Mix (opt.+agi)	3.04(*)	.74846	.001	1.4787	4.6013
		EM (control)	6.72(*)	.74846	.000	5.1587	8.2813
COD	Y14 (control)	Y14 (agi)	-4.67(*)	.62381	.000	-5.9712	-3.3688
		Y14 (opt.)	-2.87(*)	.62381	.000	-4.1779	-1.5754

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
COD	Y14 (control)	Y14 (opt.+agi)	-4.99(*)	.62381	.000	-6.2946	-3.6921
		Mix (control)	-3.33(*)	.62381	.000	-4.6346	-2.0321
		Mix (agi)	-6.38(*)	.62381	.000	-7.6812	-5.0788
		Mix (opt.)	-4.84(*)	.62381	.000	-6.1412	-3.5388
		Mix (opt.+agi)	-7.03(*)	.62381	.000	-8.3312	-5.7288
		EM (control)	-7.02(*)	.62381	.000	-8.3212	-5.7188
		EM (agi)	-10.12(*)	.62381	.000	-5.4212	-8.8188
	Y14 (agi)	Y14 (control)	4.67(*)	.62381	.000	3.3688	5.9712
		Y14 (opt.)	1.79(*)	.62381	.009	.4921	3.0946
		Y14 (opt.+agi)	-.32	.62381	.610	-1.6246	.9779
		Mix (control)	1.33(*)	.62381	.045	.0354	2.6379
		Mix (agi)	-1.71(*)	.62381	.013	-3.0112	-.4088
		Mix (opt.)	-.170	.62381	.788	-1.4712	1.1312
		Mix (opt.+agi)	-2.36(*)	.62381	.001	-3.6612	-1.0588
		EM (control)	-2.35(*)	.62381	.001	-3.6512	-1.0488
		EM (agi)	-5.45(*)	.62381	.000	-6.7512	-4.1488
	Y14 (opt.)	Y14 (control)	2.87(*)	.62381	.000	1.5754	4.1779
		Y14 (agi)	-1.79(*)	.62381	.009	-3.0946	-.4921
		Y14 (opt.+agi)	-2.11(*)	.62381	.003	-3.4179	-.8154
		Mix (control)	-.45	.62381	.473	-1.7579	.8446
		Mix (agi)	-3.50(*)	.62381	.000	-4.8046	-2.2021
		Mix (opt.)	-1.96(*)	.62381	.005	-3.2646	-.6621
		Mix (opt.+agi)	-4.15(*)	.62381	.000	-5.4546	-2.8521
		EM (control)	-4.143(*)	.62381	.000	-5.4446	-2.8421

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
COD	Y14 (opt.)	EM (agi)	-7.24(*)	.62381	.000	-8.544	-5.942
	Y14 (opt.+agi)	Y14 (control)	4.99(*)	.62381	.000	3.692	6.294
		Y14 (agi)	.32	.62381	.610	-.977	1.624
		Y14 (opt.)	2.11(*)	.62381	.003	.815	3.417
		Mix (control)	1.66(*)	.62381	.015	.358	2.961
		Mix (agi)	-1.38(*)	.62381	.038	-2.879	-.085
		Mix (opt.)	.15	.62381	.808	-1.479	1.454
		Mix (opt.+agi)	-2.03(*)	.62381	.004	-3.337	-.735
		EM (control)	-2.02(*)	.62381	.004	-3.327	-.726
		EM (agi)	-5.12(*)	.62381	.000	-6.479	-3.825
	Mix (control)	Y14 (control)	3.33(*)	.62381	.000	2.021	4.634
		Y14 (agi)	-1.33(*)	.62381	.045	-2.679	-.035
		Y14 (opt.)	.45	.62381	.473	-.846	1.757
		Y14 (opt.+agi)	-1.66(*)	.62381	.015	-2.912	-.358
		Mix (agi)	-3.04(*)	.62381	.000	-4.379	-1.745
		Mix (opt.)	-1.50(*)	.62381	.025	-2.879	-.205
		Mix (opt.+agi)	-3.69(*)	.62381	.000	-4.979	-2.395
		EM (control)	-3.68(*)	.62381	.000	-4.979	-2.385
		EM (agi)	-6.78(*)	.62381	.000	-8.079	-5.485
	Mix (agi)	Y14 (control)	6.38(*)	.62381	.000	5.088	7.681
		Y14 (agi)	1.71(*)	.62381	.013	.4088	3.011
		Y14 (opt.)	3.50(*)	.62381	.000	2.201	4.80
		Y14 (opt.+agi)	1.38(*)	.62381	.038	.0854	2.689
		Mix (control)	3.04(*)	.62381	.000	1.745	4.347

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
COD	Mix (agi)	Mix (opt.)	1.54(*)	.62381	.023	.2388	2.8412
		Mix (opt.+agi)	-.65	.62381	.310	-1.9512	.6512
		EM (control)	-.64	.62381	.317	-1.9412	.6612
		EM (agi)	-3.74(*)	.62381	.000	-5.0412	-2.4388
	Mix (opt.)	Y14 (control)	4.84(*)	.62381	.000	3.5388	6.1412
		Y14 (agi)	.17	.62381	.788	-1.1312	1.4712
		Y14 (opt.)	1.96(*)	.62381	.005	.6621	3.2646
		Y14 (opt.+agi)	-.15	.62381	.808	-1.4546	1.1479
		Mix (control)	1.50(*)	.62381	.025	.2054	2.8079
		Mix (agi)	-1.54(*)	.62381	.023	-2.8412	-.2388
		Mix (opt.+agi)	-2.19(*)	.62381	.002	-3.4912	-.8888
		EM (control)	-2.18(*)	.62381	.002	-3.4812	-.8788
		EM (agi)	-5.28(*)	.62381	.000	-6.5812	-3.9788
	Mix (opt.+agi)	Y14 (control)	7.03(*)	.62381	.000	5.7288	8.3312
		Y14 (agi)	2.36(*)	.62381	.001	1.0588	3.6612
		Y14 (opt.)	4.15(*)	.62381	.000	2.8521	5.4546
		Y14 (opt.+agi)	2.03(*)	.62381	.004	.7354	3.3379
		Mix (control)	3.69(*)	.62381	.000	2.3954	4.9979
		Mix (agi)	.65	.62381	.310	-.6512	1.9512
		Mix (opt.)	2.19(*)	.62381	.002	.8888	3.4912
		EM (control)	.01	.62381	.987	-1.2912	1.3112
		EM (agi)	-3.09(*)	.62381	.000	-4.3912	-1.7888
	EM (control)	Y14 (control)	7.02(*)	.62381	.000	5.7188	8.3212
		Y14 (agi)	2.35(*)	.62381	.001	1.0488	3.6512

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
COD	EM (control)	Y14 (opt.)	4.14(*)	.62381	.000	2.8421	5.4446
		Y14 (opt.+agi)	2.02(*)	.62381	.004	.7254	3.3279
		Mix (control)	3.68(*)	.62381	.000	2.3854	4.9879
		Mix (agi)	.640	.62381	.317	-.6612	1.9412
		Mix (opt.)	2.18(*)	.62381	.002	.8788	3.4812
		Mix (opt.+agi)	-.01	.62381	.987	-1.3112	1.2912
		EM (agi)	-3.10(*)	.62381	.000	-4.4012	-1.7988
	EM (agi)	Y14 (control)	10.12(*)	.62381	.000	8.8188	11.4212
		Y14 (agi)	5.45(*)	.62381	.000	4.1488	6.7512
		Y14 (opt.)	7.24(*)	.62381	.000	5.9421	8.5446
		Y14 (opt.+agi)	5.12(*)	.62381	.000	3.8254	6.4279
		Mix (control)	6.78(*)	.62381	.000	5.4854	8.0879
		Mix (agi)	3.74(*)	.62381	.000	2.4388	5.0412
		Mix (opt.)	5.28(*)	.62381	.000	3.9788	6.5812
		Mix (opt.+agi)	3.09(*)	.62381	.000	1.7888	4.3912
		EM (control)	3.10(*)	.62381	.000	1.7988	4.4012
BOD	Y14 (control)	Y14 (agi)	-1.02	.71737	.170	-2.5164	.4764
		Y14 (opt.)	.19	.71737	.787	-1.2997	1.6931
		Y14 (opt.+agi)	-3.10(*)	.71737	.000	-4.5997	-1.6069
		Mix (control)	-3.10(*)	.71737	.000	-4.5997	-1.6069
		Mix (agi)	-3.22(*)	.71737	.000	-4.7164	-1.7236
		Mix (opt.)	-3.33(*)	.71737	.000	-4.8297	-1.8369
		Mix (opt.+agi)	-4.78(*)	.71737	.000	-6.2797	-3.2869
		EM (control)	-6.09(*)	.71737	.000	-7.5931	-4.6003

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
BOD	Y14 (control)	EM (agi)	-9.69(*)	.71737	.000	-1.1864	-8.1936
	Y14 (agi)	Y14 (control)	1.02	.71737	.170	-.4764	2.5164
		Y14 (opt.)	1.21	.71737	.105	-.2797	2.7131
		Y14 (opt.+agi)	-2.08(*)	.71737	.009	-3.5797	-.5869
		Mix (control)	-2.08(*)	.71737	.009	-3.5797	-.5869
		Mix (agi)	-2.20(*)	.71737	.006	-3.6964	-.7036
		Mix (opt.)	-2.31(*)	.71737	.004	-3.8097	-.8169
		Mix (opt.+agi)	-3.76(*)	.71737	.000	-5.2597	-2.2669
		EM (control)	-5.07(*)	.71737	.000	-6.5731	-3.5803
		EM (agi)	-8.67(*)	.71737	.000	-8.1664	-7.1736
	Y14 (opt.)	Y14 (control)	-.19	.71737	.787	-1.6931	1.2997
		Y14 (agi)	-1.21	.71737	.105	-2.7131	.2797
		Y14(opt.+agi)	-3.30(*)	.71737	.000	-4.7964	-1.8036
		Mix (control)	-3.30(*)	.71737	.000	-4.7964	-1.8036
		Mix (agi)	-3.41(*)	.71737	.000	-4.9131	-1.9203
		Mix (opt.)	-3.53(*)	.71737	.000	-5.0264	-2.0336
		Mix (opt.+agi)	-4.98(*)	.71737	.000	-6.4764	-3.4836
		EM (control)	-6.29(*)	.71737	.000	-7.7897	-4.7969
		EM (agi)	-9.88(*)	.71737	.000	-1.3831	-8.3903
	Y14 (opt.+agi)	Y14 (control)	3.10(*)	.71737	.000	1.6069	4.5997
		Y14 (agi)	2.08(*)	.71737	.009	.5869	3.5797
		Y14 (opt.)	3.30(*)	.71737	.000	1.8036	4.7964
		Mix (control)	.00	.71737	1.000	-1.4964	1.4964

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
BOD	Y14 (opt.+agi)	Mix (agi)	-.11	.71737	.872	-1.6131	1.3797
		Mix (opt.)	-.23	.71737	.752	-1.7264	1.2664
		Mix (opt.+agi)	-1.68(*)	.71737	.030	-3.1764	-.1836
		EM (control)	-2.99(*)	.71737	.000	-4.4897	-1.4969
		EM (agi)	-6.58(*)	.71737	.000	-8.0831	-5.0903
	Mix (control)	Y14 (control)	3.10(*)	.71737	.000	1.6069	4.5997
		Y14 (agi)	2.08(*)	.71737	.009	.5869	3.5797
		Y14 (opt.)	3.30(*)	.71737	.000	1.8036	4.7964
		Y14(opt.+agi)	.00	.71737	1.000	-1.4964	1.4964
		Mix (agi)	-.11	.71737	.872	-1.6131	1.3797
		Mix (opt.)	-.23	.71737	.752	-1.7264	1.2664
		Mix (opt.+agi)	-1.68(*)	.71737	.030	-3.1764	-.1836
		EM (control)	-2.99(*)	.71737	.000	-4.4897	-1.4969
		EM (agi)	-6.58(*)	.71737	.000	-8.0831	-5.0903
	Mix (agi)	Y14 (control)	3.22(*)	.71737	.000	1.7236	4.7164
		Y14 (agi)	2.20(*)	.71737	.006	.7036	3.6964
		Y14 (opt.)	3.41(*)	.71737	.000	1.9203	4.9131
		Y14(opt.+agi)	.11	.71737	.872	-1.3797	1.6131
		Mix (control)	.11	.71737	.872	-1.3797	1.6131
		Mix (opt.)	-.11	.71737	.876	-1.6097	1.3831
		Mix (opt.+agi)	-1.56(*)	.71737	.041	-3.0597	-.0669
		EM (control)	-2.87(*)	.71737	.001	-4.3731	-1.3803
		EM (agi)	-6.47(*)	.71737	.000	-7.9664	-4.9736
		Y14 (control)	3.33(*)	.71737	.000	1.8369	4.8297

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
BOD	Mix (opt.)	Y14 (agi)	2.31(*)	.71737	.004	.8169	3.8097
		Y14 (opt.)	3.53(*)	.71737	.000	2.0336	5.0264
		Y14 (opt.+agi)	.23	.71737	.752	-1.2664	1.7264
		Mix (control)	.23	.71737	.752	-1.2664	1.7264
		Mix (agi)	.11	.71737	.876	-1.3831	1.6097
		Mix (opt.+agi)	-1.45	.71737	.057	-2.9464	.0464
		EM (control)	-2.76(*)	.71737	.001	-4.2597	-1.2669
		EM (agi)	-6.35(*)	.71737	.000	-7.8531	-4.8603
	Mix (opt.+agi)	Y14 (control)	4.78(*)	.71737	.000	3.2869	6.2797
		Y14 (agi)	3.76(*)	.71737	.000	2.2669	5.2597
		Y14 (opt.)	4.98(*)	.71737	.000	3.4836	6.4764
		Y14 (opt.+agi)	1.68(*)	.71737	.030	.1836	3.1764
		Mix (control)	1.68(*)	.71737	.030	.1836	3.1764
		Mix (agi)	1.56(*)	.71737	.041	.0669	3.0597
		Mix (opt.)	1.45	.71737	.057	-.0464	2.9464
		EM (control)	-1.31	.71737	.082	-2.8097	.1831
		EM (agi)	-4.90(*)	.71737	.000	-6.4031	-3.4103
	EM (control)	Y14 (control)	6.09(*)	.71737	.000	4.6003	7.5931
		Y14 (agi)	5.07(*)	.71737	.000	3.5803	6.5731
		Y14 (opt.)	6.29(*)	.71737	.000	4.7969	7.7897
		Y14 (opt.+agi)	2.99(*)	.71737	.000	1.4969	4.4897
		Mix (control)	2.99(*)	.71737	.000	1.4969	4.4897
		Mix (agi)	2.87(*)	.71737	.001	1.3803	4.3731
		Mix (opt.)	2.76(*)	.71737	.001	1.2669	4.2597

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
BOD	EM (control)	Mix (opt.+agi)	1.31	.71737	.082	-.1831	2.8097
		EM (agi)	-3.59(*)	.71737	.000	-5.0897	-2.0969
	EM (agi)	Y14 (control)	9.69(*)	.71737	.000	8.1936	11.1864
		Y14 (agi)	8.67(*)	.71737	.000	7.1736	10.1664
		Y14 (opt.)	9.88(*)	.71737	.000	8.3903	11.3831
		Y14 (opt.+agi)	6.58(*)	.71737	.000	5.0903	8.0831
		Mix (control)	6.58(*)	.71737	.000	5.0903	8.0831
		Mix (agi)	6.47(*)	.71737	.000	4.9736	7.9664
		Mix (opt.)	6.35(*)	.71737	.000	4.8603	7.8531
		Mix (opt.+agi)	4.90(*)	.71737	.000	3.4103	6.4031
		EM (control)	3.59(*)	.71737	.000	2.0969	5.0897
color	Y14 (control)	Y14 (agi)	65.00(*)	.43398	.000	64.0981	65.9086
		Y14 (opt.)	65.53(*)	.43398	.000	64.6281	66.4386
		Y14 (opt.+agi)	65.00(*)	.43398	.000	64.0947	65.9053
		Mix (control)	67.62(*)	.43398	.000	66.7214	68.5319
		Mix (agi)	66.06(*)	.43398	.000	65.1581	66.9686
		Mix (opt.)	66.00(*)	.43398	.000	65.0981	66.9086
		Mix (opt.+agi)	65.86(*)	.43398	.000	64.9547	66.7653
		EM (control)	69.27(*)	.43398	.000	68.3714	70.1819
		EM (agi)	66.34(*)	.43398	.000	65.4414	67.2519
		Y14 (control)	-65.00(*)	.43398	.000	-9.9086	-64.0981
		Y14 (opt.)	.53	.43398	.236	-.3753	1.4353
		Y14 (opt.+agi)	-.0033	.43398	.994	-.9086	.9019
		Mix (control)	2.62(*)	.43398	.000	1.7181	3.5286

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
color	Y14 (control)	Mix (agi)	1.06(*)	.4339	.024	.157	1.963
		Mix (opt.)	1.00(*)	.4339	.032	.097	1.903
		Mix (opt.+agi)	.85	.4339	.062	-.046	1.769
		EM (control)	4.27(*)	.4339	.000	3.361	5.176
		EM (agi)	1.34(*)	.4339	.006	.431	2.246
	Y14 (opt.)	Y14 (control)	-65.53(*)	.4339	.000	-66.436	-64.621
		Y14 (agi)	-.53	.4339	.236	-1.433	.373
		Y14 (opt.+agi)	-.53	.4339	.233	-1.436	.379
		Mix (control)	2.09(*)	.4339	.000	1.181	2.996
		Mix (agi)	.53	.4339	.236	-.373	1.433
		Mix (opt.)	.47	.4339	.292	-.433	1.373
		Mix (opt.+agi)	.32	.4339	.460	-.576	1.239
		EM (control)	3.74(*)	.4339	.000	2.831	4.646
		EM (agi)	.81	.4339	.076	-.099	1.716
	Y14 (opt.+agi)	Y14 (control)	-65.00(*)	.4339	.000	-65.903	-64.097
		Y14 (agi)	.00	.4339	.994	-.909	.906
		Y14 (opt.)	.53	.4339	.233	-.379	1.436
		Mix (control)	2.62(*)	.4339	.000	1.724	3.539
		Mix (agi)	1.06(*)	.4339	.024	.151	1.966
		Mix (opt.)	1.00(*)	.4339	.032	.091	1.906
		Mix (opt.+agi)	.86	.4339	.061	-.043	1.763
		EM (control)	4.27(*)	.4339	.000	3.374	5.189
		EM (agi)	1.34(*)	.4339	.006	.444	2.259
		Y14 (control)	-67.62(*)	.43398	.000	-68.531	-66.724

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
color	Mix (control)	Y14 (agi)	-2.62(*)	.43398	.000	-3.5286	-1.7181
		Y14 (opt.)	-2.09(*)	.43398	.000	-2.9986	-1.1881
		Y14 (opt.+agi)	-2.62(*)	.43398	.000	-3.5319	-1.7214
		Mix (agi)	-1.56(*)	.43398	.002	-2.4686	-.6581
		Mix (opt.)	-1.62(*)	.43398	.001	-2.5286	-.7181
		Mix (opt.+agi)	-1.76(*)	.43398	.001	-2.6719	-.8614
		EM (control)	1.65(*)	.43398	.001	.7447	2.5553
		EM (agi)	-1.28(*)	.43398	.008	-2.1853	-.3747
	Mix (agi)	Y14 (control)	-66.06(*)	.43398	.000	-66.9686	-65.1581
		Y14 (agi)	-1.060(*)	.43398	.024	-1.9653	-.1547
		Y14 (opt.)	-.53	.43398	.236	-1.4353	.3753
		Y14 (opt.+agi)	-1.06(*)	.43398	.024	-1.9686	-.1581
		Mix (control)	1.56(*)	.43398	.002	.6581	2.4686
		Mix (opt.)	-.06	.43398	.891	-.9653	.8453
		Mix (opt.+agi)	-.20	.43398	.644	-1.1086	.7019
		EM (control)	3.21(*)	.43398	.000	2.3081	4.1186
		EM (agi)	.28	.43398	.521	-.6219	1.1886
	Mix (opt.)	Y14 (control)	-66.00(*)	.43398	.000	-66.9086	-65.0981
		Y14 (agi)	-1.00(*)	.43398	.032	-1.9053	-.0947
		Y14 (opt.)	-.47	.43398	.292	-1.3753	.4353
		Y14 (opt.+agi)	-1.00(*)	.43398	.032	-1.9086	-.0981
		Mix (control)	1.62(*)	.43398	.001	.7181	2.5286
		Mix (agi)	.06	.43398	.891	-.8453	.9653
		Mix (opt.+agi)	-.14	.43398	.745	-1.0486	.7619

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
color	Mix (opt.)	EM (control)	3.27(*)	.4339	.000	2.361	4.176
		EM (agi)	.34	.4339	.438	-.569	1.246
	Mix (opt.+agi)	Y14 (control)	-65.86(*)	.4339	.000	-66.763	-64.957
		Y14 (agi)	-.85	.4339	.062	-1.769	.046
		Y14 (opt.)	-.32	.4339	.460	-1.239	.576
		Y14 (opt.+agi)	-.86	.4339	.061	-1.763	.043
		Mix (control)	1.76(*)	.4339	.001	.864	2.679
		Mix (agi)	.20	.4339	.644	-.709	1.106
		Mix (opt.)	.14	.4339	.745	-.769	1.046
		EM (control)	3.41(*)	.4339	.000	2.514	4.329
		EM (agi)	.48	.4339	.275	-.416	1.399
	EM (control)	Y14 (control)	-69.27(*)	.4339	.000	-70.189	-68.374
		Y14 (agi)	-4.27(*)	.4339	.000	-5.176	-3.361
		Y14 (opt.)	-3.74(*)	.4339	.000	-4.646	-2.831
		Y14 (opt.+agi)	-4.27(*)	.4339	.000	-5.189	-3.374
		Mix (control)	-1.65(*)	.4339	.001	-2.553	-.747
		Mix (agi)	-3.21(*)	.4339	.000	-4.116	-2.301
		Mix (opt.)	-3.27(*)	.4339	.000	-4.176	-2.361
		Mix (opt.+agi)	-3.41(*)	.4339	.000	-4.329	-2.514
		EM (agi)	-2.93(*)	.4339	.000	-3.833	-2.027
	EM (agi)	Y14 (control)	-66.34(*)	.4339	.000	-67.259	-65.444
		Y14 (agi)	-1.34(*)	.4339	.006	-2.246	-.431
		Y14 (opt.)	-.81	.4339	.076	-1.716	.099
		Y14 (opt.+agi)	-1.34(*)	.4339	.006	-2.259	-.414

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
color	EM (agi)	Mix (control)	1.28(*)	.43398	.008	.3747	2.1853
		Mix (agi)	-.28	.43398	.521	-1.1886	.6219
		Mix (opt.)	-.34	.43398	.438	-1.2486	.5619
		Mix (opt.+agi)	-.48	.43398	.275	-1.3919	.4186
		EM (control)	2.93(*)	.43398	.000	2.0247	3.8353
$Y_{X/S}$	Y14 (control)	Y14 (agi)	-.0033	.01075	.760	-.0258	.0191
		Y14 (opt.)	.0100	.01075	.363	-.0124	.0324
		Y14 (opt.+agi)	.0200	.01075	.078	-.0024	.0424
		Mix (control)	.0033	.01075	.760	-.0191	.0258
		Mix (agi)	-.0067	.01075	.542	-.0291	.0158
		Mix (opt.)	.0033	.01075	.760	-.0191	.0258
		Mix (opt.+agi)	.0167	.01075	.137	-.0058	.0391
		EM (control)	.0067	.01075	.542	-.0158	.0291
		EM (agi)	.0167	.01075	.137	-.0058	.0391
	Y14 (agi)	Y14 (control)	.0033	.01075	.760	-.0191	.0258
		Y14 (opt.)	.0133	.01075	.229	-.0091	.0358
		Y14 (opt.+agi)	.0233(*)	.01075	.042	.0009	.0458
		Mix (control)	.0067	.01075	.542	-.0158	.0291
		Mix (agi)	-.0033	.01075	.760	-.0258	.0191
		Mix (opt.)	.0067	.01075	.542	-.0158	.0291
		Mix (opt.+agi)	.0200	.01075	.078	-.0024	.0424
		EM (control)	.0100	.01075	.363	-.0124	.0324
		EM (agi)	.0200	.01075	.078	-.0024	.0424
	Y14 (opt.)	Y14 (control)	-.0100	.01075	.363	-.0324	.0124

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
$Y_{x/s}$	Y14 (opt.)	Y14 (agi)	-.0133	.01075	.229	-.0358	.0091
		Y14 (opt.+agi)	.0100	.01075	.363	-.0124	.0324
		Mix (control)	-.0067	.01075	.542	-.0291	.0158
		Mix (agi)	-.0167	.01075	.137	-.0391	.0058
		Mix (opt.)	-.0067	.01075	.542	-.0291	.0158
		Mix (opt.+agi)	.0067	.01075	.542	-.0158	.0291
		EM (control)	-.0033	.01075	.760	-.0258	.0191
		EM (agi)	.0067	.01075	.542	-.0158	.0291
	Y14(opt.+agi)	Y14 (control)	-.0200	.01075	.078	-.0424	.0024
		Y14 (agi)	-.0233(*)	.01075	.042	-.0458	-.0009
		Y14 (opt.)	-.0100	.01075	.363	-.0324	.0124
		Mix (control)	-.0167	.01075	.137	-.0391	.0058
		Mix (agi)	-.0267(*)	.01075	.022	-.0491	-.0042
		Mix (opt.)	-.0167	.01075	.137	-.0391	.0058
		Mix (opt.+agi)	-.0033	.01075	.760	-.0258	.0191
		EM (control)	-.0133	.01075	.229	-.0358	.0091
		EM (agi)	-.0033	.01075	.760	-.0258	.0191
	Mix (control)	Y14 (control)	-.0033	.01075	.760	-.0258	.0191
		Y14 (agi)	-.0067	.01075	.542	-.0291	.0158
		Y14 (opt.)	.0067	.01075	.542	-.0158	.0291
		Y14 (opt.+agi)	.0167	.01075	.137	-.0058	.0391
		Mix (agi)	-.0100	.01075	.363	-.0324	.0124
		Mix (opt.)	.0000	.01075	1.000	-.0224	.0224
		Mix (opt.+agi)	.0133	.01075	.229	-.0091	.0358

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
$Y_{x/s}$	Mix (control)	EM (control)	.0033	.01075	.760	-.0191	.0258
		EM (agi)	.0133	.01075	.229	-.0091	.0358
	Mix (agi)	Y14 (control)	.0067	.01075	.542	-.0158	.0291
		Y14 (agi)	.0033	.01075	.760	-.0191	.0258
		Y14 (opt.)	.0167	.01075	.137	-.0058	.0391
		Y14 (opt.+agi)	.0267(*)	.01075	.022	.0042	.0491
		Mix (control)	.0100	.01075	.363	-.0124	.0324
		Mix (opt.)	.0100	.01075	.363	-.0124	.0324
		Mix (opt.+agi)	.0233(*)	.01075	.042	.0009	.0458
		EM (control)	.0133	.01075	.229	-.0091	.0358
		EM (agi)	.0233(*)	.01075	.042	.0009	.0458
	Mix (opt.)	Y14 (control)	-.0033	.01075	.760	-.0258	.0191
		Y14 (agi)	-.0067	.01075	.542	-.0291	.0158
		Y14 (opt.)	.0067	.01075	.542	-.0158	.0291
		Y14 (opt.+agi)	.0167	.01075	.137	-.0058	.0391
		Mix (control)	.0000	.01075	1.000	-.0224	.0224
		Mix (agi)	-.0100	.01075	.363	-.0324	.0124
		Mix (opt.+agi)	.0133	.01075	.229	-.0091	.0358
		EM (control)	.0033	.01075	.760	-.0191	.0258
		EM (agi)	.0133	.01075	.229	-.0091	.0358
	Mix (opt.+agi)	Y14 (control)	-.0167	.01075	.137	-.0391	.0058
		Y14 (agi)	-.0200	.01075	.078	-.0424	.0024
		Y14 (opt.)	-.0067	.01075	.542	-.0291	.0158
		Y14 (opt.+agi)	.0033	.01075	.760	-.0191	.0258

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
$Y_{x/s}$	Mix(opt.+agi)	Mix (control)	-.0133	.01075	.229	-.0358	.0091
		Mix (agi)	-.0233(*)	.01075	.042	-.0458	-.0009
		Mix (opt.)	-.0133	.01075	.229	-.0358	.0091
		EM (control)	-.0100	.01075	.363	-.0324	.0124
		EM (agi)	.0000	.01075	1.000	-.0224	.0224
	EM (control)	Y14 (control)	-.0067	.01075	.542	-.0291	.0158
		Y14 (agi)	-.0100	.01075	.363	-.0324	.0124
		Y14 (opt.)	.0033	.01075	.760	-.0191	.0258
		Y14 (opt.+agi)	.0133	.01075	.229	-.0091	.0358
		Mix (control)	-.0033	.01075	.760	-.0258	.0191
		Mix (agi)	-.0133	.01075	.229	-.0358	.0091
		Mix (opt.)	-.0033	.01075	.760	-.0258	.0191
		Mix (opt.+agi)	.0100	.01075	.363	-.0124	.0324
		EM (agi)	.0100	.01075	.363	-.0124	.0324
	EM (agi)	Y14 (control)	-.0167	.01075	.137	-.0391	.0058
		Y14 (agi)	-.0200	.01075	.078	-.0424	.0024
		Y14 (opt.)	-.0067	.01075	.542	-.0291	.0158
		Y14 (opt.+agi)	.0033	.01075	.760	-.0191	.0258
		Mix (control)	-.0133	.01075	.229	-.0358	.0091
		Mix (agi)	-.0233(*)	.01075	.042	-.0458	-.0009
		Mix (opt.)	-.0133	.01075	.229	-.0358	.0091
		Mix (opt.+agi)	.0000	.01075	1.000	-.0224	.0224
		EM (control)	-.0100	.01075	.363	-.0324	.0124

4. ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในระดับอุตสาหกรรม

ตารางที่ ค-5 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุ หลังจากเติมน้ำหมักอีเอ็มสูตร 3 ในถังบำบัดน้ำอัดลมหมดอายุขั้นต้น เป็นเวลา 7 วัน

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	Dependent Variable	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
sugar	Equal variances assumed	.236	.653	-6.071	4	.004	-2.5367	.41786	-3.69685	-1.37649
	Equal variances not assumed			-6.071	3.641	.005	-2.5367	.41786	-3.74331	-1.33002
COD	Equal variances assumed	3.365	.141	-3.475	4	.025	-1.5100	.43454	-2.71647	-.30353
	Equal variances not assumed			-3.475	2.583	.051	-1.5100	.43454	-3.02825	.00825
BOD	Equal variances assumed	.698	.450	-4.547	4	.010	-3.2833	.72204	-5.28804	-1.27862
	Equal variances not assumed			-4.547	3.440	.015	-3.2833	.72204	-5.42351	-1.14316
color	Equal variances assumed	3.473	.136	48.448	4	.000	1.2197	.02517	1.14977	1.28956
	Equal variances not assumed			48.448	2.416	.000	1.2197	.02517	1.12740	1.31193

Independent Samples Test

	Dependent Variable	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
$Y_{X/S}$	Equal variances assumed	7.965	.048	2.030	4	.112	.0700	.03448	-.02573	.16573
	Equal variances not assumed			2.030	2.279	.164	.0700	.03448	-.06226	.20226

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวพิชามญช์ โป๊ะบุญชื่น

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010920019

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับสอง	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว. - อุตสาหกรรม

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

พิชามญช์ โป๊ะบุญชื่น ธันวดี เตชะภัททวรกุล สุขสาโรจน์ และดวงพร คันธโชติ. 2552. การบำบัดน้ำอัดลมเบื้องต้นด้วยจุลินทรีย์. การประชุมวิชาการวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 10. 1-3 เมษายน 2552.