



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ จังหวัดจันทบุรี  
เพื่อบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็ม

Isolation of Actinomycetes from Saline Field Soil for Saline  
Wastewater Treatment

โดย

นางสาวพิมพ์ปวีณ์ เรืองเกษตรกิจ และคณะ  
คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทเงินรายได้  
คณะเทคโนโลยีทางทะเล  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐  
มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ ๐๗/๒๕๖๐

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ จังหวัดจันทบุรี  
เพื่อบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็ม

Isolation of Actinomycetes from Saline Field Soil for Saline  
Wastewater Treatment

โดย

นางสาวพิมพ์ปวีณ์ เรืองเกษตรกิจ และคณะ  
คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

มีนาคม ๒๕๖๒

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ เลขที่สัญญา ๐๗/๒๕๖๐

## บทคัดย่อ

การบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์จากโรงงานอุตสาหกรรมมักมีเกลือเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารอินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถถูกกำจัดได้อย่างสมบูรณ์ด้วยการทำงานของแบคทีเรียทั่วไป ดังนั้นแอกติโนมัยซีทที่เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือและสามารถเปลี่ยนสารตกค้างในน้ำเสียไปเป็นแหล่งพลังงาน จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้สำหรับการย่อยสลายสารอินทรีย์ดังกล่าว งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะหาแอกติโนมัยซีทชนิดที่มีความสามารถในการสร้างสารเมแทบอลิต์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลาย เช่น เซลลูเลส และอะไมเลส และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ได้ จากเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 9 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากดินนาเกลือ เทศบาลบ้านป่าแดง ตำบลท่าใหม่ อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี พบการย่อยสับสเตรตได้ดีที่สุดในเชื้อ Chanthaburi3 และรองลงมาคือเชื้อ S18 โดยสามารถวัดวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็ม 30 และ 40 ppt ตามลำดับ บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 6.2 ความเร็วรอบในการเขย่าอยู่ที่ 110 รอบต่อนาที เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการบำบัด COD ในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่มีความเค็ม 30 ppt พบว่าเชื้อ Chanthaburi3 มีอัตราการลดลงร้อยละของ COD สูงสุดในวันที่ 13 ของการทดลอง เท่ากับ  $73.04 \pm 8.98$  มีค่าพีเอชเฉลี่ยเท่ากับ  $6.25 \pm 0.05$  ค่าออกซิเจนในน้ำ (DO) เฉลี่ยเท่ากับ  $5.56 \pm 0.08$  (mg/L) ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (TSS) เฉลี่ยเท่ากับ 0.03 (mg/L) และพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด ในวันที่ 2 ของการทดลองมีค่าเท่ากับ  $839.56 \pm 955.37$  (ug/ml) สนับสนุนให้เห็นว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกจากนาเกลือมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์และสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสได้ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## Abstract

Treatment of wastewater contaminated with organic substances from industrial plants often has salt as a component. In which most organic substances cannot be eliminated by the work of common bacteria. Therefore, actinomycetes that thrive in a salt-containing environment and convert residues in wastewater into energy sources. Then suitable for use in the degradation of such organic substances. The aim of this research is to find the actinomycetes salty with the ability to create metabolites with degradation activities such as cellulase and amylase. To the ability to digest cellulose and can be used to check the effectiveness of synthetic wastewater treatment from actinomycetes, consisting of 9 isolates, isolated from saline field soil Ban Pa Daeng, Tha Mai Sub-district, Tha Mai District, Chanthaburi Province. The best digestion of substrate in "Chanthaburi3" and followed by "S18" was able to measure reducing sugar in culture media with salinity of 30 and 40 ppt, respectively. Incubating for 4 days at 30 °C, pH value is 6.2. The shaking speed is 110 rpm when the COD treatment efficiency is tested in synthetic wastewater. at 30 ppt salinity found that "Chanthaburi3" had the highest percentage of COD reduction on the 13th day of the experiment equal to  $73.04 \pm 8.98$ , with an average PH value of  $6.25 \pm 0.05$ , the mean oxygen in water (DO) was equal to  $5.56 \pm 0.08$  (mg / L) The average total dissolved solids (TSS) was 0.03 (mg / L) and the maximum reducing sugar content on day 2 of the experiment was equal to  $839.56 \pm 955.37$  (ug / ml). Supports that the actinomycetes isolated from saline field soil are effective in the digestion of organic matter and can produce amylase and cellulase. Which can be applied to industrial level in the future

## สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
Abstract .....	ค
สารบัญเรื่อง .....	ง
สารบัญตาราง .....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ซ
บทที่ 1.....	1
บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย .....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย .....	2
บทที่ 2.....	3
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes).....	3
2.1.1 ชีวิตวิทยาทั่วไปของแอคติโนมัยซีท.....	3
2.1.2 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีท.....	3
2.1.3 การแพร่กระจายของแอคติโนมัยซีทในสิ่งแวดล้อม .....	7
2.1.4 บทบาทและความสำคัญของแอคติโนมัยซีท .....	7
2.2 น้ำเสีย (Wastewater).....	9
2.2.1 แหล่งที่มาของน้ำเสีย (สุภาพร พงศ์ธรพฤษ, 2549).....	9
2.2.2 ลักษณะและส่วนประกอบของน้ำเสีย .....	10
2.3 การบำบัดน้ำเสีย .....	10
2.3.2 กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางเคมี (Chemical treatment).....	11
2.3.3 กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological treatment).....	11
2.4 ไฮโดรไลติกเอนไซม์ .....	14

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

2.4.1 เอนไซม์เซลลูเลส .....	15
2.4.2 เอนไซม์อะไมเลส .....	16
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
บทที่ 3 .....	20
วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
3.1 สถานที่ทำการทดลอง .....	20
3.2 สถานที่เก็บตัวอย่าง.....	20
3.3 ระยะเวลาทำการทดลอง .....	20
3.4 วัสดุและอุปกรณ์ .....	20
3.5 สารเคมี.....	21
3.6 วิธีการทดลอง.....	22
3.6.1 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากนาเกลือ .....	22
3.6.2 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ .....	22
3.6.3 การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ดี โดยการศึกษากิจกรรมของไฮโดรไลติกเอนไซม์ .....	23
3.6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ Reducing sugar ใน supernatant ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (Wood and Bhat, 1988).....	23
3.6.5 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใน supernatant ด้วยวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976).....	23
3.6.6 ประสิทธิภาพการบำบัด COD ของแอกติโนมัยซีท (APHA, 1992).....	23
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล .....	24
บทที่ 4 .....	25
ผลการวิจัย.....	25
4.1 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากนาเกลือ จังหวัดจันทบุรี .....	25
4.1.1 ลักษณะทั่วไปของพื้นที่เก็บตัวอย่าง .....	25
4.1.2 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากนาเกลือ .....	25

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

4.2 การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ดี โดยการศึกษากิจกรรมของไฮโดรไลติกเอนไซม์.....	29
4.2.1 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกิจกรรมของอะไมเลส (Amylase activity).....	29
4.2.2 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกิจกรรมของเซลลูเลส (Cellulase activity).....	30
4.3 ประสิทธิภาพการบำบัด COD ของแอกติโนมัยซีท โดยวัดอัตราการลดลงของ COD.....	31
บทที่ 5.....	35
อภิปรายและสรุปผล .....	35
5.1 อภิปราย.....	35
5.1.1 ลักษณะทั่วไปของพื้นที่เก็บตัวอย่าง .....	35
5.1.2 ผลการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากนาเกลือ .....	35
5.1.3 ผลการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ดี โดยการศึกษากิจกรรมของไฮโดรไลติกเอนไซม์ .....	36
5.1.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัด COD ของแอกติโนมัยซีท โดยวัดอัตราการลดลงของ COD .....	39
5.2 สรุปผล.....	40
5.3 ข้อเสนอแนะ .....	40
บรรณานุกรม .....	41

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 2 - 1 ชนิดของไฮโดรไลติกเอนไซม์ .....	15
ตารางที่ 4-1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ .....	26
ตารางที่ 4-2 ตารางแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (Unit/ml) .....	30
ตารางที่ 4-3 ตารางแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดจากกิจกรรมเซลลูเลส (Unit/ml) .....	31
ตารางที่ 4-4 ตารางแสดงปริมาณ COD (mg/ml) และค่าร้อยละการลดลงของ COD (%) .....	32
ตารางที่ 4-5 ตารางแสดงค่าคุณภาพน้ำเสียตลอดการทดลองของเชื้อ Chanthaburi3 .....	32
ตารางที่ 4-6 ตารางแสดงค่าคุณภาพน้ำเสียตลอดการทดลองของเชื้อ S18 .....	33
ตารางที่ 4-7 ตารางแสดงค่าคุณภาพน้ำเสียตลอดการทดลองของชุดควบคุม .....	33
ตารางที่ 4-8 ตารางแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ Chanthaburi3 และ S18 .....	34

## สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง .....	4
ภาพที่ 2.2 การสร้างสปอร์เดี่ยว .....	5
ภาพที่ 2.3 การสร้างสปอร์สาย .....	5
ภาพที่ 2.4 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ Streptomyces .....	6
ภาพที่ 4.1 ลักษณะพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง .....	25
ภาพที่ 4.2 ลักษณะดินตัวอย่างจากนาเกลือ .....	25
ภาพที่ 4.3 ปริมาณโปรตีน (mg/ml) ในน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส (supernatant) .....	29
ภาพที่ 5.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) .....	37
ภาพที่ 5.2 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มิลลิลิตร) .....	37
ภาพที่ 5.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) .....	38
ภาพที่ 5.4 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส(หน่วย/มิลลิลิตร) .....	38
ภาพที่ 5.5 อัตราการลดลงของ COD (%) .....	39
ภาพที่ 5.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ .....	40

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แอกติโนมัยซีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะคล้ายเชื้อรา พบได้มากในสิ่งแวดล้อมทั้งทางบกและทางน้ำ มีความสำคัญต่อระบบนิเวศในด้านผู้ย่อยสลายตามธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากแอกติโนมัยสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายได้หลากหลายชนิด เช่น อะไมเลส เซลลูเลส ไซลาเนส และโคติเนส เป็นต้น (กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน, 2555) นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติโนมัยซีทสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง เช่น สภาวะความเค็มสูง ความเป็นกรด-ด่างสูง การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และเจริญได้ในสภาวะแห้งแล้ง (Fatemeh and Joachim, 2016) ดังนั้นแอกติโนมัยซีทก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถบำบัดน้ำเสียได้ เพราะเอนไซม์ชนิดต่างๆที่แอกติโนมัยซีทผลิตขึ้นมานั้น มีความหลากหลายสูง และเนื่องจากแอกติโนมัยซีทเป็นผู้ย่อยสลายตามธรรมชาติ จึงสามารถนำมาใช้ในการบำบัดของเสียอินทรีย์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจนำเชื้อแอกติโนมัยซีททนเค็มที่มีความสามารถในการสร้างสารเมแทบอลิต์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลาย เช่น ไฮโดรไลติกเอนไซม์ (Hydrolytic enzyme) ทั้งนี้เพื่อจะได้ทราบถึงความสามารถในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเค็มและแบัคเป็นองค์ประกอบหลัก และข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็แนวทางในการนำเชื้อแอกติโนมัยซีทไปประยุกต์ใช้กับการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานได้ต่อไป

กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพมีปัจจัยสำคัญคือจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ในน้ำเสีย (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553) โดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียมักมีประสิทธิภาพไม่สูงพอที่จะบำบัดน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ หรือบางกรณีอาจมีปริมาณจุลินทรีย์ไม่เพียงพอที่จะบำบัดน้ำเสียเหล่านั้น ฉะนั้นจึงต้องเติมจุลินทรีย์ให้กับระบบ (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553) โดยชนิดจุลินทรีย์ที่เติมเข้าสู่ระบบเพื่อบำบัดน้ำเสียจะคัดเลือกโดยดูจากประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารตั้งต้นชนิดนั้น ๆ การบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์จากโรงงานอุตสาหกรรมมักมีเกลือเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารอินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถถูกกำจัดได้อย่างสมบูรณ์ด้วยการทำงานของแบคทีเรียทั่วไป ดังนั้นแอกติโนมัยซีทที่เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือและสามารถเปลี่ยนสารตกค้างในน้ำเสียไปเป็นแหล่งพลังงาน จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้สำหรับการย่อยสลายสารอินทรีย์ดังกล่าว นอกจากนี้แอกติโนมัยซีทยังสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzymes) ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์ย่อยเซลลูโลส เอนไซม์ย่อยโปรตีนและสารอินทรีย์ต่าง ๆ เป็นต้น จึงอาจนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกแอกติโนมัยซีทออกจากดินตะกอนในนาเกลือ และนำเชื้อที่แยกให้บริสุทธิ์เลี้ยงในอาหารที่มีความเค็มที่แตกต่างกัน แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่มีความเค็มสูงได้

### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความสามารถของแอกติโนมัยซีททนเค็มที่แยกได้จากดินนาเกลือในการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์

1.2.2 เพื่อนำแอกติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้ศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็ม 30

ppt

### 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้จะได้สายพันธุ์แอคติโนมัยซีททนเค็มที่มีความสามารถในการสร้าง ไฮโดรไลติกเอนไซม์ และบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ได้

### 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินนาเกลือ บริเวณป่าแดง ตำบลโขมง อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี และเชื้อแอคติโนมัยซีทจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จำนวน 5 ไอโซเลท (เอกอนงค์ คงแก้ว, 2558) ทดสอบคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ดี โดยการศึกษากิจกรรมของไฮโดรไลติกเอนไซม์และเจริญได้ในอาหารที่มีความเค็ม จากนั้นคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่มีความเค็ม 30 ppt

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes)

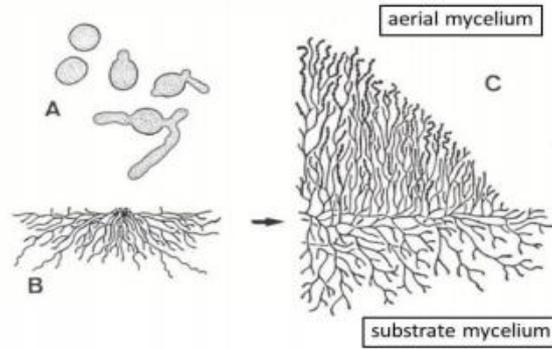
แอคติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำพวกหนึ่งที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรา มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างใหญ่ มีผิวที่หยาบ และรูปร่างแบบพิลานนท์ที่ต่อกันเป็นเส้นยาว ซึ่งมีลักษณะคล้ายเชื้อราแต่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าเชื้อรา คือประมาณ 0.5-1.2 ไมโครเมตร ผนังเซลล์มีลักษณะคล้ายแบคทีเรียแกรมบวกส่วนความคล้ายคลึงกับฟังไจ คือมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual spore) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะเจริญเป็นเส้นใย เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45-65 องศาเซลเซียส แอคติโนมัยซีทจะมีปริมาณเท่ากับชีวมวลของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เพราะว่าแอคติโนมัยซีทจะมีความสามารถพิเศษในการย่อยสลายสารประกอบที่แบคทีเรียและเชื้อราไม่สามารถย่อยสลายได้ จึงพบแอคติโนมัยซีทมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นหลังจากที่จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ มีจำนวนลดลงแล้ว ทำให้ส่งผลต่อการเจริญของแอคติโนมัยซีทในดินจึงพบในดินประมาณ 10 -33 เปอร์เซ็นต์ (Waksman *et al.*, 1967)

##### 2.1.1 ชีวิตวิทยาทั่วไปของแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทเป็นโปรคาริโอตที่มีความหลากหลายของรูปร่างลักษณะอย่างมาก เพียงตัวอย่างจากสกุล *Streptomyces* สกุลเดียวก็ทำให้มองเห็นถึงความหลากหลายของรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาการศึกษาทางด้านชีวิตวิทยาของแอคติโนมัยซีทเริ่มแพร่หลายมากขึ้น และใน ความก้าวหน้านี้ ทำให้ต้องมีการเปลี่ยนคำนิยามที่เคยเรียกแอคติโนมัยซีทจากเดิมว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะเป็นเส้นใย มีการแตกแขนงของกิ่งก้านในช่วงเวลาหนึ่งของวงชีวิตมาเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวีนินและไฮโดรซัน (C+G) สูง นอกจากนี้ยังเป็นที่ยอมรับกันว่าความแตกต่างของคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ได้ทำให้นักวิจัยมีความสนใจในเรื่องนี้มากขึ้น โดยเฉพาะได้ทำการศึกษารูปร่างลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งยังเป็นสิ่งที่มีความสำคัญในการช่วยบอกถึงความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาได้ (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2548)

##### 2.1.2 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีท

โคโลนีของแอคติโนมัยซีทเกิดจากการรวมกันของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารแข็ง (ภาพที่ 2.2) เริ่มจากการลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยวอับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่หัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม

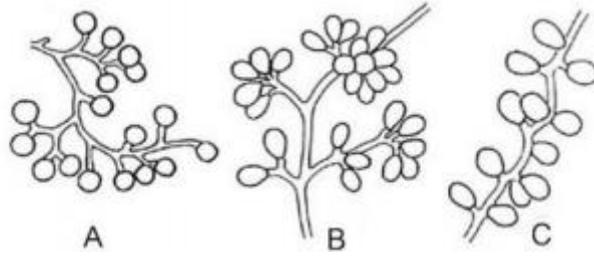


ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยซีตที่เรียกบนอาหารแข็ง (Vobis, 1981)

- A: อับสปอร์มีการพัฒนาเป็นเส้นใย
- B: สายใยอาหารเจริญแทงผ่านลงไปใ้อาหาร (substrate mycelium)
- C: เส้นใยเจริญเหนืออาหารและมีการสร้างสปอร์ (aerial mycelium)

ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่นใน *Streptomyces* มีทั้งเส้นใยแบบ aerial mycelium และ substrate mycelium ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนีใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีเส้นใยแบบ aerial mycelium ส่วน *Sporichthya* การสร้างเส้นใยถูกจำกัดทำให้มี aerial mycelium ทำให้โคโลนีของแอคติโนมัยซีตที่เรียกฟูหรือเรียบแบนบางครั้งลักษณะคล้ายหนังสัตว์ มีความหลากหลายตั้งแต่นุ่ม เหนียว จนถึงแข็ง ผิวหน้าโคโลนี อาจเรียบ นูน ขรุขระหรือเป็นเกล็ด ขนาดโคโลนีขึ้นกับสปีชีส์อายุและสภาวะการเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (Lacey, 2009) แอคติโนมัยซีตมีการสร้างสปอร์แบ่งเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอกดังนี้

1. การสร้างสปอร์เดี่ยว เรียกว่า *Monosporous* พบในหลายสกุล ใน *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (Sporophore) เกิดขึ้นบนสายใยอาหารสปอร์ติดอยู่ที่ฐานหรือพองตัว จากนั้นมีการสร้างผนังกันและสร้างเป็นผนังสปอร์ในส่วนของสกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยว บนสายใยอากาศ ที่ปลายก้านชูสปอร์ ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทำให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์สกุลอื่นๆที่สร้างสปอร์เดี่ยวคือ *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ ปลายสายใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนง ถ้าใช้ศัพท์ทางราอาจเรียกว่าการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* ว่า aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจากปลายเส้นใยที่แตกแขนงมีการโป่งออก ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* (ภาพที่ 2.2)



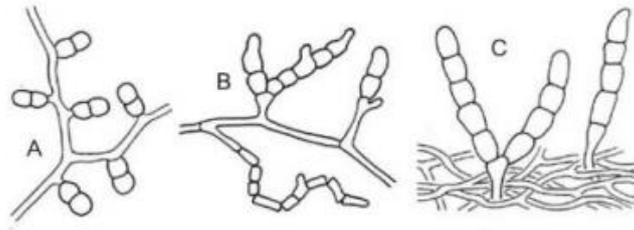
ภาพที่ 2.2 การสร้างสปอร์เดี่ยว (Vobis, 1981)

A: *Micromonospora*

B: *Thermomonospora*

C: *Saccharomonospora*

2. การสร้างสปอร์เป็นสาย ในแอคติโนมัยซีทมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมากสามารถแบ่งลักษณะของสายสปอร์ โดยพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนของสปอร์นั้นคือ di หรือ bisporous, oligosporous หรือ polysporous สาย bisporous ประกอบด้วย สปอร์คู่ต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้าง สปอร์ที่พบได้ยาก สปอร์ทรงรี 2 สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรงหรือเกิดบนก้อนชูสปอร์สั้นๆ (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะสปอร์เป็นสาย (Wildermuth, 1970)

A: การสร้างแบบ disporous ของ *Microbispora*

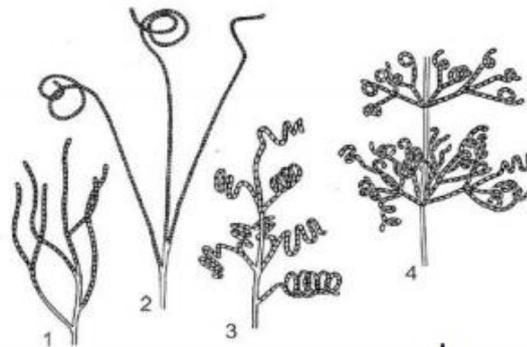
B และ C: การสร้างสปอร์ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ

นอกจากนี้สกุล *Actinobispora* มีสปอร์แบบ disporous เช่น การสร้างสปอร์เริ่มจากนั้นมีการพองออกและสร้างผนังกันตรงกลางแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์แบบ oligosporous พัฒนาจากสปอร์สายสั้นๆ ส่วนมากพบ 7-10 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ *Nocardia brevicatena* สร้างสายสปอร์สั้นๆ คือ 2-7 สปอร์ (ภาพที่ 2.3) บนสายใยอาหารในสปีชีส์ *Saccharopolyspora rectivirgula* ในสายสปอร์มีสปอร์ต่อกันน้อยกว่า 5 สปอร์ บนด้านข้างหรือปลายของก้อนชูสปอร์ *N. brevicatena* และ *S. rectivirgula* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน สปีชีส์ในสกุล *Actinomadura* และ *Microtetraspora* สร้างสปอร์สายสั้นๆบนสายใยอากาศจำนวนสปอร์บนสายสปอร์มีตั้งแต่ 4 สปอร์ และจนถึง 10 -20 สปอร์ สายสปอร์อาจตรง เป็นขอ มีลักษณะเป็นวงเปิด (open loop) หรือเป็นเกลียว (spiral) ซ้อน 1 ชั้นจนถึง 4 ชั้น *Actinomadura pusila* ในสกุล *Streptovercillium* มีลักษณะเฉพาะคือ ก้านชูสปอร์อยู่เป็นวงรอบเส้นใยแกนสายสปอร์เป็นเกลียวซ้อนติดกันกับเส้นใยแกนที่มีสาย

สปอร์จะเกิดการบิดสายสปอร์สั้นอาจจะตรงโค้งงอปลายเป็นขอ การสร้างสปอร์ในสกุล *Macrospora*, *Microcelosporia* และ *Elytrosporangium* มีลักษณะสปอร์ใหญ่บนสายสปอร์สั้นหรือสายสั้นๆ บนสายใยอาหารสายสปอร์สั้นพบใน *Sporichthya polymorpha* ซึ่งสายใยอากาศมีสปอร์เป็นรูปแท่งจนถึงสปอร์กกลม *Catellatopora* สายสปอร์มีลักษณะตรงจนโค้งงอ มีสปอร์ 5 – 30 สปอร์ ซึ่งแทงขึ้นมาจากอาหาร เป็นสายสั้นไม่แตกแขนงหรือมีก้านชูสปอร์ที่แตกแขนง

แอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์แบบ polysporous ที่สำคัญสปีชีส์ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการสร้างสปอร์เป็นสายมากกว่า 50 สปอร์ (ภาพที่ 2.3) สปอร์ของ *Streptomyces* และแอคติโนมัยซีทชนิดอื่นๆ ที่มี สปอร์มากกว่ามักเรียกว่า Arthospores ซึ่งสอดคล้องกับ Arthospores ของกลุ่มรา ในกลุ่ม Deuteromycota ที่มีการสร้างสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย ความแตกต่างของลักษณะของสาย สปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* มีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

- (1) Rectiflexibiles ลักษณะของสายสปอร์ตรงหรือโค้งงอ
- (2) Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิดหรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1–3 ชั้น
- (3) Spira สายสปอร์เป็นเกลียวแยกได้เป็น 2 แบบคือเป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่นและเป็นเกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาวยึดไม่ติดกันแน่น
- (4) Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายกันหอย และแตกแขนงกันแน่น ในบางกรณีสายสปอร์เป็นเกลียวขดกันแน่นและแยกออกมาทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์ หรือ Pycnidia นอกจากนี้ในวงศ์ *Pseudoncardiaceae* เกิดสายสปอร์บนสายใยอาหารและสายใยอากาศ อีกสกุลที่มีสปอร์เป็นสายยาว คือ *Nocardiosis* ซึ่งเกิดขึ้นบนสายใยอากาศ อาจเป็นสายใยตรง งอ หรือ ซิกแซก (Wendisch *et al.*, 1989)



ภาพที่ 2.4 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces* (Wildermuth, 1970)

- (1) Rectiflexibiles
- (2) Retinaculiaperti
- (3) Spira
- (4) Verticillat

3. สปอร์ที่สร้างอยู่ในอับสปอร์ แอคติโนมัยซีทหลายๆ สกุลมีการสร้างสปอร์อยู่ มีอับสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายเป็น vesicel โดยสปอร์จะถูกปล่อยออกมาจากภายนอกเมื่อแก่ก็จะเหลือเพียงอับสปอร์ว่างๆ อับสปอร์ของแอคติโนมัยซีทมีรูปร่างและลักษณะหลายแบบ มีตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-50 ไมโครเมตร ขนาดที่พบได้ทั่วไปคือ 10 ไมโครเมตร และรูปร่างลักษณะของอับสปอร์มีตั้งแต่ทรงคล้ายกระบอง (clavate) คล้ายท่อยาว คล้ายขวด คล้ายระฆัง (campanulate) คล้ายลูกแพร์ (pyriform) หรือมีลักษณะกลมแป้น (globose) หรืออาจมีรูปร่างไม่แน่นอนมีลักษณะเป็นก้อนๆ การเรียกชื่ออับสปอร์เรียกตามจำนวนที่พบอยู่ภายในอับสปอร์ เช่น อับสปอร์ที่มี 2-5 อยู่ภายในเรียกว่า oligosporous sporangia ถ้ามี 1 สปอร์เรียกว่า monosporous sporangia และถ้ามีอยู่ 2 สปอร์เรียกว่า biosporous sporangia อับสปอร์ที่สร้างสปอร์อยู่มากภายในจะเรียกว่า polysporous sporangia โคตรสร้างการเรียกสปอร์มีหลายลักษณะ โดยมีตั้งแต่บิดเกลียว หรือเรียงตัวขนานเป็นแถว

### 2.1.3 การแพร่กระจายของแอคติโนมัยซีทในสิ่งแวดล้อม

แอคติโนมัยซีทสามารถเจริญได้ในสภาพดินที่มีสภาวะแวดล้อมแตกต่างกัน ทั้งในดินที่มีสภาพธรรมชาติ กองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงมากๆ ในโคลน แม่น้ำ ใต้ทะเลสาบ แต่โดยปกติมักจะเจริญอยู่ผิวดินหรือในดินที่ไม่ลึกไปกว่า 4 เซนติเมตร พบว่าในดินทั่วไปมีจำนวนใกล้เคียงกับแบคทีเรีย แต่ถ้าในดินที่มีสภาพที่เป็นต่างจะพบแอคติโนมัยซีทในจำนวนมากกว่า เช่น ดินที่มี pH 6.5-8 จะมีจำนวนสูงถึง 95% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แต่ในดินที่เป็นต่างต่างๆ ไปจะพบประมาณ 10-70% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด สภาพที่เหมาะสมแก่การเจริญของแอคติโนมัยซีทได้แก่ บริเวณทุ่งหญ้าธรรมชาติ ทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ แต่ในดินที่ทำการเกษตรจะพบน้อย และจะไม่ค่อยพบในดินที่ค่อนข้างเป็นกรด การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินในป่าเบญจพรรณและป่าเต็ง รังเขตรักษาพันธุ์สัตว์ห้วยขาแข้ง (กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน, 2555) การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณนาเกลือซึ่งไอโซเลตที่คัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อยู่ในดินทำให้มีการทนต่อความเค็มและทนความแห้งแล้ง เนื่องจากความสามารถในการทนความแห้งแล้งได้ดี จึงพบแอคติโนมัยซีทในดินเขตร้อนมากกว่าเขตอบอุ่น โดยสภาพดินแห้งจะมีจำนวนมาก การทนความร้อน โดยทั่วไปสปอร์ของแอคติโนมัยซีทจะทนความร้อนได้สูงกว่าเซลล์ปกติเพียงเล็กน้อยเท่านั้น พบว่าสปอร์ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ความสามารถในการแข่งขัน จากลักษณะการเจริญที่ช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้ไม่สามารถที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้ในสภาพธรรมชาติ แต่แอคติโนมัยซีทจะมีความสามารถพิเศษในการย่อยสลายสารประกอบที่แบคทีเรียและเชื้อราไม่สามารถย่อยสลายได้ จึงพบแอคติโนมัยซีทมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นหลังจากที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มีจำนวนลดลงแล้ว (งามนิจ นนทโส, 2547) สภาพที่เหมาะสมกับแอคติโนมัยซีท คือสภาพที่ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้ เช่น ดินที่ค่อนข้างเป็นด่าง แห้งแล้ง และอุณหภูมิสูง เป็นต้น (ชินินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา, 2546)

### 2.1.4 บทบาทและความสำคัญของแอคติโนมัยซีท

บทบาทส่วนใหญ่ของแอคติโนมัยซีทมักเกิดในเชื้อสกุล *Streptomyces* เนื่องจากเป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตได้รวดเร็ว และมีปริมาณมากในธรรมชาติ ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุด ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค และยังเป็นกลุ่มที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีททั้งหมด (McCarthy and Williams, 1990 อ้างถึงใน กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน, 2555) อย่างไรก็ตาม มีบาง species ที่ก่อให้เกิดโรคในพืช เช่น *S.scabies* ก่อให้เกิดโรค Potato scab และ *S.acidiscabies* ที่ก่อให้เกิดโรค acid scab ในดิน ทำ

ให้ pH ของดินเป็นกรด (Kieser *et al*, 2007 อ้างถึงใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, 2553 ) แต่อย่างไรก็ตามแอกติโนมัยซีทที่หายากก็ยังเป็นกลุ่มที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีความสามารถหลากหลายสำหรับบทบาทของแอกติโนมัยซีทมีดังนี้

#### 2.1.4.1 ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย

เชื้อแอกติโนมัยซีทในธรรมชาติส่วนใหญ่มีถิ่นอาศัยอยู่ในดินจึงมี ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบของสารอินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบอินทรีย์จากพืชและสัตว์จะทนทานต่อการย่อยสลาย และจะมีแบคทีเรียหรือเชื้อราอยู่มาก ส่วนแอกติโนมัยซีทจะเจริญตามมาภายหลัง เพราะเชื้อแอกติโนมัยซีทจะเจริญเติบโตได้ช้า และจะเจริญดีเมื่อจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งได้ลดปริมาณลงแล้ว คือในช่วงที่มีสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ทนทานต่อการย่อยสลายอยู่มาก แอกติโนมัยซีทที่มีหลากหลายชนิดและหลายสายพันธุ์ จะช่วยย่อยสลายสารพวก กรดอินทรีย์ น้ำตาลชนิดต่างๆ แป้ง ไขมัน และโปรตีน (Alexander, 1977 อ้างถึงใน จามจรี และคณะ, 2555)

#### 2.1.4.2 ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน

เอนไซม์ที่แอกติโนมัยซีทสามารถผลิตได้มีหลายชนิดได้แก่ xylanase, cellulose, amylase และ chitinase เป็นต้น ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนซึ่งเป็นโครงสร้างของสัตว์และพืชโครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงต่อกันเป็นสายยาว เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (จิรพรรณ ใจอินผล, 2550) แอกติโนมัยซีทบางชนิด เช่น *Streptomyces rubiginosus*, *streptomyces bambergensis* และ *Streptomyces violaceoniger* สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถช่วยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นน้ำตาลฟรุกโทสได้ ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์แอกติโนมัยซีทช่วยผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เช่น การใช้แอกติโนมัยซีทชนิด *Thermomonospora* ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ไซแลนที่ทำงานที่อุณหภูมิสูงซึ่งเอนไซม์นี้มีประโยชน์ในการผลิตน้ำตาลไซโลสจากชังข้าวโพด นอกจากนั้น มีการใช้แอกติโนมัยซีทบางชนิดในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารพิษชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ย่อยสลายสารพิษอะลิฟาติก-อะโรมาติก โคโพลีเอสเตอร์ส (Aliphatic-Aromatic Copolyesters และ 1,4 -ไดออกเซน (1,4-Dioxane) (<https://th.wikipedia.org/wiki/แอกติโนมัยซีท>)

#### 2.1.4.3 ความสามารถในการทนต่อความเค็ม

แอกติโนมัยซีทสามารถทนต่อความเค็มได้ดีโดยที่เซลล์ของแอกติโนมัยซีททนเค็ม และ แอกติโนมัยซีทชอบเค็มปานกลางสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านสิ่งแวดล้อมเพราะสามารถผลิต พอลิเมอร์ชีวภาพ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและ ช่วยการตกตะกอน เพื่อนำไปใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันในทะเล และ ตกตะกอนสารพิษ สำหรับเซลล์ของแบคทีเรียชอบเค็ม ปานกลางสามารถดูดซับโลหะหนักและยาปราบศัตรูพืชไว้ภายในเซลล์และสามารถย่อยสลายสารมลพิษที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมที่มีและไม่มีเกลือ (Alexander, 1977 อ้างถึงใน จามจรี และคณะ, 2555)

#### 2.1.4.4 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและฟอสเฟต

แอกติโนมัยซีทสามารถตรึงไนโตรเจนและฟอสเฟตที่อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ แอกติโนมัยซีทบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เช่นสกุล *Nocardia* และยังมีแอกติโนมัยซีทที่อยู่ร่วมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ คือ *Frankia* นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสามารถของ *Streptosporangium* ที่แยกได้จากดินที่เป็นกรดในการละลายหินฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ โดยเชื้อในกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ (ชนิกานต์ คุ่มนง, 2554)

#### 2.1.4.5 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม

แอกติโนมัยซีทสามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมเชื้อที่สร้างเอนไซม์ช่วยย่อยสลายประกอบอินทรีย์ คือ *Streptomyces* และ *Thermomospora* ส่วนเชื้อที่สร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายไคติน ได้แก่ *S.griseus*, *S.antibioticus* และ *Amycolatopces orientalis* (นฤมล เกื้อนกุล, 2550)

## 2.2 น้ำเสีย (Wastewater)

น้ำเสีย (Wastewater) หมายถึง น้ำที่เสื่อมคุณภาพหรือน้ำที่มีลักษณะคุณสมบัติเปลี่ยนไปจากเดิมตามธรรมชาติ จนทำให้เกิดความเสียหายต่อการใช้ประโยชน์ของมนุษย์ การดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ เช่น มีสิ่งปนเปื้อน สารอินทรีย์ และอนินทรีย์ ทั้งที่ละลายน้ำได้และละลายน้ำไม่ได้ปะปนอยู่ด้วย ซึ่งน้ำเสียที่เกิดขึ้นเหล่านี้มนุษย์เป็นต้นเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดขึ้นทั้งทางตรงและทางอ้อม (สุภาพร พงศ์ธรพฤษ, 2549) น้ำเสียมีที่มาจากหลายสาเหตุ ทั้งน้ำเสียจากสารอินทรีย์วัตถุ และน้ำเสียที่เกิดจากการใช้สารเคมีในที่ต่างๆ การกำจัดน้ำเสียในแต่ละสาเหตุก็แตกต่างกันออกไป ในน้ำเสียมีค่าปริมาณออกซิเจนจะมีน้อยกว่าค่ามาตรฐานทั่วไป รวมถึงค่า pH , BOD , COD ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานเช่นกัน โดยปกติความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำเสียมีอิทธิพลอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากสารอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นอาหารของจุลินทรีย์ มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอินทรีย์มากจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และมีผลทำให้อัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์สูงคือ มีอาหารมากทำให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและกระจายอยู่ทั่วไปแทนที่จะรวมตัวกันเป็นก้อน (Floc) ทำให้เกิดการตกตะกอนได้ไม่ดีในขณะเดียวกันถ้าอัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์ คือมีอาหารน้อยจำนวนจุลินทรีย์น้อยลงเกิดตะกอนจุลินทรีย์และตกตะกอนได้เร็ว แต่ก็ไม่สามารถจับตะกอนเล็กๆ ตกลงมาได้หมดทำให้น้ำที่ออกจากถังตกตะกอนขุ่น

### 2.2.1 แหล่งที่มาของน้ำเสีย (สุภาพร พงศ์ธรพฤษ, 2549)

1. น้ำเสียจากคนและสัตว์ ได้แก่อุจจาระ ปัสสาวะ และมูลสัตว์ที่ลงสู่ท่อน้ำเสีย
2. น้ำเสียจากครัวเรือน ได้แก่ น้ำซักผ้า น้ำอาบ น้ำจากห้องน้ำ น้ำล้างชาม น้ำในครัว น้ำจากการประกอบอาหาร เป็นต้น
3. น้ำฝน และน้ำล้างถนน น้ำฝนที่ไหลไปตามพื้นดินจะพาเอาดินทราย ไปไม้ และขยะ ลงสู่ท่อน้ำเสีย ในบางแห่งมีระบบท่อระบายน้ำฝนโดยเฉพาะต่างหากเพื่อไม่ให้ปะปนไปกับน้ำเสียชนิดอื่นๆ
4. น้ำใต้ดินที่ไหลซึมเข้าสู่ท่อระบายน้ำ ท่อระบายน้ำจะฝังอยู่ใต้ดิน และบางแห่งอาจจะมีการวางอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำใต้ดิน น้ำใต้ดินสามารถซึมเข้าสู่ท่อตามข้อต่อได้ อัตราการซึมคิดเป็นลิตรต่อวันต่อเอเคอร์ของพื้นที่

5. น้ำเสียจากอุตสาหกรรม น้ำเสียจากกระบวนการอุตสาหกรรมขึ้นอยู่กับชนิดของการทำ อุตสาหกรรมอาจจะมีสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ปะปนอยู่ ซึ่งจำเป็นต้องมีการจัดการเบื้องต้นหรือการ กำจัดอย่างสมบูรณ์ก่อนที่จะระบายน้ำเสียสู่แหล่งน้ำสาธารณะหรือท่อระบายน้ำ

### 2.2.2 ลักษณะและส่วนประกอบของน้ำเสีย

น้ำเสียเป็นของเหลวขุ่น มีวัสดุแข็ง (Solids) แขนวลอยอยู่ เมื่อตอนที่น้ำเสียใหม่ๆจะมีสีเทาและ มีกลิ่นอับในน้ำ ในน้ำเสียจะประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ โลหะหนัก สารพิษ น้ำมัน ธาตุอาหาร และจุลินทรีย์แขวนลอยอยู่ เมื่อเวลาผ่านไปน้ำเสียจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีดำ เน่า และมีกลิ่นเหม็น (วิทยา เพียร วิจิตร, 2525) สามารถแยกตามองค์ประกอบและลักษณะสมบัติน้ำเสียที่แสดงโดยพารามิเตอร์ได้ดังนี้

(1) พีเอช (pH) เป็นค่าที่บอกถึงความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเสีย ทั่วไปสิ่งมีชีวิตในน้ำและจุลินทรีย์ใน ถึงบำบัดจะดำรงชีพได้ดีในสภาวะเป็นกลาง คือ pH ประมาณ 6-8

(2) บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand) เป็นค่าที่บอกถึงปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการ ย่อยสลายสารอินทรีย์ ถ้าค่าบีโอดีสูงแสดงว่าความต้องการออกซิเจนสูง นั่นคือมีความสกปรกหรือสารอินทรีย์ ในน้ำมาก (Tchobanoglous *et al.*, 2004)

(3) ปริมาณของแข็ง (Solids) หมายถึงปริมาณสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำเสียทั้งในลักษณะที่ไม่ละลายน้ำ และที่ละลายน้ำ (Dissolved Solids) ของแข็งบางชนิดมีน้ำหนักเบาและแขวนลอยอยู่ในน้ำ (Suspended Solids) บางชนิดหนักและจมตัวลงเบื้องล่าง (Settleable Solids) ของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ อาจสร้างปัญหาใน การอุดตัน เครื่องเติมอากาศ และถ้าปล่อยทิ้งในปริมาณมากจะทำให้เกิดความสกปรกและตื่นเขินในลำน้ำ ธรรมชาติ ตลอดจนบดบังแสงแดดที่ส่องลงสู่ท้องน้ำ (Tchobanoglous *et al.*, 2004)

(4) ไนโตรเจน (Nitrogen) เป็นธาตุจำเป็นในการสร้างเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไนโตรเจนจะเปลี่ยนสภาพ เป็นแอมโมเนีย ถ้าหากในน้ำมีออกซิเจนพอเพียงก็จะถูกย่อยสลายไปเป็นไนไตรต์และไนเตรท ดังนั้นการปล่อย น้ำเสียมีสารประกอบไนโตรเจนสูงจึงทำให้ออกซิเจนที่มีอยู่ในน้ำลดน้อยลง (Tchobanoglous *et al.*, 2004)

(5) ไขมันและน้ำมัน (Grease and Oil) ได้แก่ น้ำมันและไขมันจากพืชและสัตว์ที่ใช้ในการทำอาหาร สบู่ออกจากการอาบน้ำ ฟองสารซักฟอกจากการชำระล้าง สารเหล่านี้มีน้ำหนักเบาและลอยน้ำ ทำให้เกิดสภาพไม่ น่าดูและขวางกั้นการซึมของออกซิเจนจากอากาศสู่แหล่งน้ำ นอกจากนี้ยังมีค่าบีโอดีสูงเพราะเป็นสารอินทรีย์

(6) ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand) คือค่าปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการย่อยสาร อนินทรีย์ด้วย วิธีการทางเคมี มักใช้เทียบหาค่าบีโอดี ซึ่งปกติ COD: BOD ของน้ำเสียชุมชนประมาณ 2-4 เท่า (Tchobanoglous *et al.*, 2004)

## 2.3 การบำบัดน้ำเสีย

การเลือกระบบบำบัดน้ำเสียขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ลักษณะของน้ำเสีย ระดับการบำบัดน้ำ เสียที่ต้องการ สภาพทั่วไปของท้องถิ่น ค่าลงทุนก่อสร้าง ค่าดำเนินการดูแลรักษา และที่ดินที่ใช้ในการก่อสร้าง เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ระบบบำบัดน้ำเสียที่เลือกมีความเหมาะสมกับแต่ละท้องถิ่น ซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่าง กัน การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีการนี้ เป็นการให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติใช้สารอินทรีย์ที่เจือปนในน้ำเสียเป็นอาหาร สารอินทรีย์ ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ จะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานๆคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และเซลล์ใหม่ ทำให้น้ำเสียมีสารอินทรีย์ลดลง

จนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานตามกฎหมายที่ยอมให้ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ แบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยทั่วไปพัฒนาจากจุลินทรีย์จากบ่อเกรอะซึ่งมีจุลินทรีย์ที่หลากหลาย เมื่อเดินระบบไปนานพอจนมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ตามธรรมชาติทำให้เหลือแต่จุลินทรีย์ชนิดที่เหมาะสมและปริมาณของจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพในการบำบัดสูง เติมนลงในระบบบำบัดน้ำเสียจะช่วยระบบบำบัดเข้าสู่ภาวะเสถียรเร็วขึ้น (Emad, 2011) จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตหัวเชื้อ เช่น แลคติกแอซิดแบคทีเรีย, แบคทีเรียสังเคราะห์แสง, แอคติโนมัยซีท, ยีสต์และ รา เป็นต้น โดยการบำบัดน้ำเสียสามารถแบ่งได้ตามกลไกที่ใช้ในการกำจัดสิ่งเจือปนในน้ำเสียได้ ดังนี้

### 2.3.1 กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางกายภาพ (Physical treatment)

กระบวนการนี้เป็นวิธีการแยกเอาสิ่งสกปรกเจือปนออกจากรน้ำเสีย เช่น ของแข็งขนาดใหญ่ กระดาษ พลาสติก เศษอาหาร กรวด ทราย ไขมันและน้ำมัน โดยใช้อุปกรณ์ในการบำบัดทางกายภาพ คือ ตะแกรงตกขยะ ถังดักกรวดทราย ถังดักไขมันและน้ำมัน และถังตกตะกอน ซึ่งจะเป็นการลดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่มีในน้ำเสียเป็นหลัก (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

### 2.3.2 กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางเคมี (Chemical treatment)

กระบวนการนี้เป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยใช้สารเคมีเข้าทำปฏิกิริยากับสิ่งเจือปนในน้ำเสีย วิธีการนี้จะใช้สำหรับน้ำเสียที่มีส่วนประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้คือ ค่าความเป็นกรด - ด่าง สูงหรือต่ำเกินไป มีสารพิษ มีโลหะหนัก มีของแข็งแขวนลอยที่ตกตะกอนยาก มีไขมันและน้ำมันที่ละลายน้ำ มีไนโตรเจน (N) หรือฟอสฟอรัส (P) สูงเกินไป และมีเชื้อโรค ทั้งนี้อุปกรณ์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีการทางเคมีได้แก่ ถังกวนเร็ว ถังกวนช้า ถังตกตะกอน ถังกรอง และถังฆ่าเชื้อโรค (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

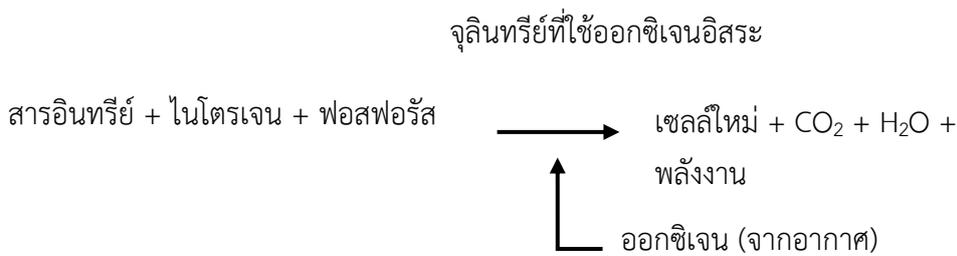
### 2.3.3 กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological treatment)

การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเป็นการบำบัดน้ำเสียที่อาศัยจุลินทรีย์เป็นตัวทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (biodegradable organic compound) โดยใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอาหาร และสารตั้งต้นในกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เพื่อการดำรงชีวิตการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ และได้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ซึ่งในกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพสามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบหลักๆ คือ แบบใช้ออกซิเจนในกระบวนการบำบัด (Aerobic process) เช่น ในกระบวนการเอเอส ระบบฟิล์มตรึง สระเติมอากาศ เป็นต้น และแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic process) เช่น ถังกรองไร้อากาศ ระบบยูเอเอสบี เป็นต้น โดยวิธีการบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทได้แก่ (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

2.3.3.1 กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (Aerobic wastewater treatment) เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยใช้จุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนละลายน้ำในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยปฏิกิริยาการย่อยสลายจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ

**ขั้นตอนที่ 1** เป็นกระบวนการนำสารอินทรีย์เข้าเซลล์ โดยจุลินทรีย์จะส่งเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เกาะติดที่ผนังเซลล์ เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของโมเลกุลขนาดเล็กที่จะสามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้

**ขั้นตอนที่ 2** เป็นกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ที่จะผลิตพลังงานไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ และการสร้างเซลล์ใหม่ โดยสามารถเขียนสมการรวมได้ดังนี้



เมื่อสารอินทรีย์ในน้ำเสียถูกเปลี่ยนรูปมาเป็นจุลินทรีย์เซลล์ใหม่ จะรวมตัวกันเกิดเป็นฟล็อกหรือตะกอนจุลินทรีย์ (Biological flocculation) เมื่อรวมตัวกันมากขึ้นก็จะมีน้ำหนักมากขึ้นและจะจมตัวลงสู่ด้านล่างจึงทำให้สามารถแยกออกจากน้ำเสียได้ง่ายขึ้น (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

ชนิดของระบบบำบัดน้ำเสียตามลักษณะของจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบบำบัดแบบใช้อากาศ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

**ก) ระบบบำบัดน้ำเสียที่ตะกอนจุลินทรีย์แขวนลอยอยู่ในน้ำเสีย (Suspended Growth)**

เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่ตะกอนจุลินทรีย์กระจายอยู่ในน้ำเสีย หรือแขวนลอยอยู่ในน้ำเสีย ทำหน้าที่ในการกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียที่ตะกอนจุลินทรีย์แขวนลอยอยู่ในน้ำเสียยังสามารถแบ่งได้อีกหลายรูปแบบเช่น

**1. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (Activated Sludge)** เป็นวิธีบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีการทางชีววิทยาโดยใช้แบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic bacteria) เป็นตัวหลักในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ระบบแอกติเวเตดสลัดจ์เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่ได้รับความนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย สามารถบำบัดได้ทั้งน้ำเสียจากชุมชน และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม แต่การเดินระบบประเภทนี้จะมีความยุ่งยากซับซ้อนเนื่องจากจำเป็นต้องมีการควบคุมสภาวะแวดล้อมและลักษณะทางกายภาพต่างๆให้เหมาะสมแก่การทำงาน และการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ เพื่อให้ระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดสูงสุด (อนุพันธ์ อธิรัตน์ และคณะ, 2545) โดยมีหลักการในการบำบัดคือ การเติมอากาศ และการตกตะกอน (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

**2. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสปีอาร์ (Sequencing batch reactor)** หลักการทำงานของระบบจะเหมือนกับระบบแอกติเวเตดสลัดจ์แต่ต่างกันที่ไม่มีถังตกตะกอน ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการก่อสร้างและลดพื้นที่ก่อสร้าง ระบบสามารถลดการเกิดแบคทีเรียแบบเส้นใยที่เป็นสาเหตุของการไม่จมตัวของตะกอนในขั้นตอนการตกตะกอนได้ (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

3. บ่อฝัง (Oxidation pond) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่ต้องการพื้นที่ในการสร้างระบบบำบัดค่อนข้างมาก แต่มีค่าใช้จ่ายในเรื่องการดูแลรักษาต่ำ และไม่ต้องลงทุนกับเครื่องจักรมาก ออกซิเจนที่ให้กับระบบส่วนใหญ่ได้จากการละลายของออกซิเจนที่อยู่ในอากาศที่สัมผัสกับผิวน้ำ และจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายที่เจริญอยู่ในบ่อบำบัดน้ำเสียดังกล่าว (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

ข) ระบบบำบัดน้ำเสียที่ตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียยึดเกาะกับตัวกลาง (Attached Growth System) เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพการบำบัดน้อยกว่าระบบบำบัดน้ำเสียแบบที่ตะกอนจุลินทรีย์แขวนลอยอยู่ในน้ำเสีย โดยสามารถแบ่งระบบออกได้หลายประเภทเช่น

1. ระบบโปรยกรอง (Conventional tricking filter) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่จุลินทรีย์เติบโตบนวัสดุตัวกลาง โดยวัสดุตัวกลางจะไม่มีเคลื่อนที่ น้ำเสียจะถูกปล่อยลงจากด้านบนให้มาสัมผัสกับวัสดุตัวกลางที่มีจุลินทรีย์ยึดเกาะอยู่เมื่อน้ำเสียสัมผัสกับจุลินทรีย์ก็จะมีกร่อยสลายสารอินทรีย์ทำให้เกิดการบำบัดเกิดขึ้น (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

2. ระบบจานหมุนแบบชีวภาพ (Rotating biological contactor: RBC) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่ให้น้ำเสียไหลผ่านตัวกลางลักษณะทรงกระบอก ซึ่งวางจุ่มอยู่ในถังบำบัด ตัวกลางทรงกระบอกนี้จะหมุนอย่างช้าๆ เมื่อหมุนขึ้นพื้นน้ำและสัมผัสกับอากาศ จุลินทรีย์ที่อาศัยยึดติดอยู่กับวัสดุตัวกลางจะใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่สัมผัสติดอยู่กับวัสดุตัวกลางขึ้นมา และเมื่อจานหมุนจมลงก็จะนำน้ำเสียขึ้นมาบำบัดใหม่สลับกันเช่นนี้ตลอดเวลา (อนุพันธ์ อธิรัตน์ และคณะ, 2545)

2.3.3.2 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ (Anaerobic wastewater treatment) เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยจุลินทรีย์จะใช้สารประกอบอื่นเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน เปลี่ยนสารอินทรีย์ให้กลายเป็น  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  และ  $\text{H}_2\text{S}$  ซึ่งมีกลไกการย่อยสลายแบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอนดังนี้ คือ (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

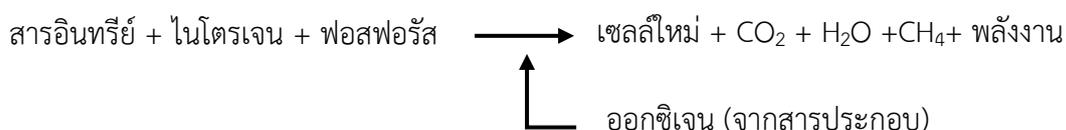
ขั้นตอนที่ 1 เป็นกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) โดยอาศัยเอนไซม์ที่ถูกส่งออกมาออกเซลล์เพื่อเปลี่ยนสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารโมเลกุลเล็ก

ขั้นตอนที่ 2 เป็นกระบวนการสร้างกรด (Acidogenesis) โดยแบคทีเรียสร้างกรดซึ่งจะเปลี่ยนผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในขั้นตอนที่ 1 ไปเป็นกรดไขมันระเหย (Volatile fatty acid, VFA)

ขั้นตอนที่ 3 เป็นกระบวนการสร้างกรดอะซิติกจากกรดไขมันระเหย (Acetogenesis) โดยแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนิค (Acetogenic bacteria) จะเปลี่ยนกรดไขมันระเหยไปเป็นผลผลิตสำคัญในการสร้างก๊าซมีเทน ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน

ขั้นตอนที่ 4 เป็นกระบวนการสร้างมีเทน (Methanogenesis) โดยผลผลิตที่ได้จากแบคทีเรียสร้างกรดในขั้นตอนที่ 3 จะถูกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทนโดยแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างมีเทน (Methanogenic bacteria) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ชนิดแรก คือ แบคทีเรียที่สร้างมีเทนจากคาร์บอนไดออกไซด์ และได้พลังงานจากไฮโดรเจน ชนิดที่สอง คือ แบคทีเรียที่สร้างมีเทนจากกรดอะซิติก (Acetotrophic bacteria) ซึ่งใช้ไฮโดรเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และใช้แหล่งไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งสามารถเขียนให้อยู่ในรูปของสมการโดยรวมได้ ดังนี้

### จุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนอิสระ



ชนิดและระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ เช่น

#### ก) บ่อแอนแอโรบิก (Anaerobic ponds)

มีลักษณะเป็นบ่อดินขนาดใหญ่มีความลึก 3 - 4 เมตร และไม่มีฝาปิดใช้เวลาเก็บกักน้ำหลายวัน สารอินทรีย์ในน้ำเสียจะถูกลดลงโดยปฏิกิริยาแบบไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งอาจมีกลิ่นเหม็นรบกวนได้ (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

#### ข) ถังกรองไร้อากาศ (Anaerobic filter)

ส่วนประกอบที่สำคัญคือถังสูงที่มีลักษณะคล้ายถังกรอง ภายในบรรจุด้วยหินขนาด 1.5 - 2 นิ้ว หรืออาจใช้ตัวกลางเป็นพลาสติกแทนได้ น้ำเสียจะไหลจากข้างล่างขึ้นข้างบนลักษณะเช่นนี้จะทำให้น้ำท่วมตัวกลางตลอดเวลา (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

#### ค) ระบบชั้นลอยตัวไร้ออกซิเจน (Anaerobic fluidized bed)

ระบบนี้คล้ายกับถังกรองไร้อากาศตรงที่มีน้ำไหลจากข้างล่างขึ้นข้างบน มีสารตัวกลางขนาดเล็ก เป็นที่เกาะของจุลินทรีย์อัตราการไหลของน้ำเสียต้องสูงมากถึงปฏิกิริยาที่ใช้ในระบบจึงอาจมีขนาดเล็ก (พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ, 2553)

## 2.4 ไฮโดรไลติกเอนไซม์

เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาแตกสลายเมื่อมีน้ำในปฏิกิริยาโดยมีการสลายพันธะโคเวเลนต์ระหว่าง C - O, C - N, C - C, C - P, P - O และพันธะอื่นๆในสับสเตรต ซึ่งมักเป็นการสลายที่พันธะสำคัญ เช่น พันธะเพปไทด์ในโปรตีน พันธะไกลโคซิดิกในคาร์โบไฮเดรตพันธะเอสเทอร์ในลิพิด และพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ในกรดนิวคลีอิก เป็นต้น ดังสมการที่ 1 สำหรับการแบ่งกลุ่มย่อยจะแบ่งตามพันธะที่ถูกย่อย เช่น กลุ่มย่อย 3.1 เป็นการย่อยที่พันธะเอสเทอร์ ขณะที่กลุ่มย่อย 3.4 เป็นการย่อยที่พันธะเพปไทด์ ดังแสดงในตาราง 2 - 3 (จิตติมา เจริญพานิช, 2553)



โดยเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรไลติกเอนไซม์ปัจจุบันพบว่ามีทั้งสิ้น 641 ชนิด แบ่งเป็นหลายชนิดตามลักษณะพันธะของสับสเตรตที่ถูกย่อยสลาย ตามตาราง 2 - 3 สำหรับรายละเอียดของไฮโดรไลติก เอนไซม์แต่ละกลุ่มที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหาร อาทิ ไฮโดรเลสที่ย่อยสลายพันธะไกลโคซิด เรียกว่า ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่งที่รู้จักกันดีได้แก่ อะไมเลส, เซลลูเลส, อินเวอร์เทส, เดกซ์แทรนเนส, เบตา

– กาแลคโตซิเดส และแพคตินเนส ไฮโดรเลสที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์ เรียกว่า โปรติเอส และไฮโดรเลสที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ เรียกว่า เอสเทอร์เรส ได้แก่ ไลเปส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558)

#### ตารางที่ 2 - 1 ชนิดของไฮโดรไลติกเอนไซม์

EC No.	ลักษณะปฏิกิริยา (ชนิดเอนไซม์)	สับสเตรต (ตัวอย่าง)	จำนวนเอนไซม์
EC 3.1	Acting on ester bond (Esterase) ได้แก่ ไลเปส, เอสเทอร์เรส ซึ่งสลายพันธะเอสเทอร์ในลิปิต	$\begin{array}{c} R_1 - C - O - R_2 \\    \\ O \end{array}$	195
EC 3.2	Acting on glycosy bond (Glycosidases)	Carbohydrate	118
EC 3.3	Acting on ether bond	$R_1 - CH_2 - O - CH_2 - R_2$	8
EC 3.4	Acting on peptide bond (Proteases)	$\begin{array}{c} R_1 - C - N - R_2 \\    \\ O \end{array}$	156
EC 3.5	Acting on C - N bond other than peptide bond เช่น ยูรีเอสสลายยูเรีย	$\begin{array}{c} NH_2 - C - NH_2 \\    \\ O \end{array}$	109
EC 3.6	Acting on acid anhydride bond	Phosphoryl - containing anhydrides	40
EC 3.7	Acting on C - C bond	Ketonic substances	6
EC 3.8	Acting on halide bond	C - halide compound P - halide compound	5
EC 3.9	Acting on P - N bond		1
EC 3.10	Acting on S - N bond		2
EC 3.11	Acting on C - P bond		1

ที่มา : (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558)

#### 2.4.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลโดยเฉลี่ย 63,000 ดาลตัน (homogeneous *Myrothecium verrucaria cellulase*) และค่าความเป็นกรด - ด่าง 5.5 - 6.0 ปัจจุบันมีการโคลนยีนควบคุมการใช้เซลลูโลสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (อรุณ ชาญชัยเขาวีวัฒน์, 2558) เซลลูเลสเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน (complexed enzymes) ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด ดังนี้

เอนไซม์  $C_1$  หรือเรียก hydrogen bondase ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสลายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม คือ ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง สำหรับสับสเตรตของเซลลูเลส ลำดับต่อไปคือ เอนไซม์  $C_x$ , กลูตาเนส ทั้งนี้พบว่าไม่มีหลักฐานการย่อยสลายพันธะไกลโคซิด (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558)

เอนไซม์  $C_x$  หรือ  $\beta$ -1,4 glucanases เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรตที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ คือ สามารถย่อยสลายพันธะ  $\beta$ -1,4 ของสับสเตรตสังเคราะห์ เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558)

ปีตา-กลูโคซิเดส ( $\beta$ -Glucosidase) หรือเซลโลไบเอส (cellobiase) เป็นเอนไซม์ที่มีสับสเตรตเป็นเซลโลไบโอสถึงเซลโลเฮกซาโอส แต่อัตราการย่อยสลายแตกต่างกัน คือ อัตราเร็วลดลงเมื่อความยาวสายพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น และผลผลิตที่ได้คือ กลูโคสซึ่งมีโครงสร้างเปลี่ยนจากเดิม (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558)

#### 2.4.2 เอนไซม์อะไมเลส

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของพอลิกลูโคไซด์ (Polyglucoside) ที่  $\alpha$ -1,4 glucosidic bond ของแป้งและไกลโคเจน ได้โมเลกุลของกลูโคส มอลโทส และเดกทริน การนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์คือใช้ในการหมักของเหลือทิ้งประเภทแป้งเพื่อผลิตเอทานอลและ biomass ใช้ในการผลิตเบียร์ คาร์โบไฮเดรตต่ำ และมีการศึกษายีนควบคุมการสร้างกลูโคอะมิเลสจาก *Schwanniomyces* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งถูกโคลนให้แก่ยีสต์ที่ใช้ผลิตเบียร์เป็นผลสำเร็จ (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558) ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส สามารถแบ่งได้ 3 ชนิดคือ

แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.1 เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลแป้ง (starch) และไกลโคเจน (glycogen) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1 – 4 แบบสุ่มทำให้โมเลกุลของสตาร์ช และไกลโคเจนถูกไฮโดรไลซ์ได้น้ำตาล เช่น น้ำตาลมอลโทส (maltose) และกลูโคส (glucose) อย่างรวดเร็ว เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส สามารถพบทั่วไปในระบบทางเดินอาหาร (digestive system) ของมนุษย์ และสัตว์ เช่น ในน้ำลายและน้ำย่อยจากตับอ่อน ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เอนไซม์นี้ในการไฮโดรไลซ์แป้ง ในขั้นตอนการทำ liquefaction เพื่อลดความหนืดของสารละลายสตาร์ช ภายหลังจากเกิดเจลาติไนซ์ (gelatinization) เพื่อผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์, 2546)

ปีตา-อะไมเลส (beta-amylase) รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.2 เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์แป้งที่ตำแหน่งแอลฟา 1 – 4 ของพันธะไกลโคไซด์ที่เฉพาะส่วนปลายสายด้านที่เป็นนอนรีดิวส์ (non reducing end) เข้ามาทีละ 2 หน่วย ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทส (maltose) เอนไซม์นี้ไม่พบในน้ำย่อยของมนุษย์ แต่พบในรา แบคทีเรีย เช่น *Bacillus cereus* และพบในผลไม้ระหว่างการสุก (ripe) (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์, 2546)

แกมมา-อะไมเลส กลูโคอะไมเลส หรือ อะมิโลกลูโคซิเดส ชื่อตามระบบ  $\gamma$ -1,4-glucan glucohydrolase รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.3 เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สายพอลิเมอร์ของแป้งได้ทั้งที่พันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา 1 – 4 และแอลฟา 1 – 6 จึงสามารถไฮโดรไลซ์โมเลกุลของอะไมโลเพกทิน (amylopectin) ซึ่งโมเลกุลมีสายแขนง โดยจะไฮโดรไลซ์จากส่วนปลายด้านนอนรีดิวส์ (non reducing end) เข้ามาทีละ 1 หน่วยได้น้ำตาลกลูโคส สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ เช่น รา แบคทีเรีย (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์, 2556)

## 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Idriss M. Al Turk และ Manal J. Kiki (2011) ทำการศึกษาการกำจัดโลหะหนักออกจากตัวอย่างน้ำเสียอุตสาหกรรมจริง (A-B-C-D) โดย halophilic actinomycetes ที่แยกได้จากตัวอย่างดินเค็มที่เก็บจากตะวันตกของซาอุดีอาระเบีย เชื้อที่แยกได้พบว่าเป็น *Nocardioopsis halophila* และ *Nocardioopsis rosea* จากการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA ผลการศึกษาพบว่าทั้งสองสายพันธุ์นี้ไม่สามารถเจริญเติบโตบนตัวอย่างน้ำเสีย A, C, และ D ในขณะที่พบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักได้ทั้งหมด (100%) จากตัวอย่างน้ำเสีย B ที่มี Zn และ Pb (12.82, 29.84 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามลำดับ แม้จะมีระยะเวลาพักตัวนานถึง 8 สัปดาห์ นอกจากนี้การศึกษายังเผยให้เห็นถึงผลกระทบของกลูโคส (1%) ที่เพิ่มในตัวอย่างน้ำเสีย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่แยกได้ในสัปดาห์ที่ 4 และสามารถนำไปใช้เพื่อดูดซับโลหะหนักได้เร็วขึ้นหลังจากเติมกลูโคส (1%) โดยพบว่า *N. halophila* สามารถกำจัด Cr ได้ทั้งหมด (100%) และ *N. rosea* สามารถกำจัด Zn ได้ทั้งหมด (100%) จากตัวอย่างน้ำเสีย C ที่มี Al, Cr และ Zn ที่ 38.37, 17.20 และ 7.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Hozzein *et al.* (2012) ได้ศึกษาและวิจัยในด้านการบำบัดน้ำเสียที่มีการบำบัดน้ำเสียจะเน้นไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม คือการได้รับผลประโยชน์การบำบัดจากของเสีย ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายของการศึกษาเพื่อแยกแอกติโนมัยซีทบางสายพันธุ์จากระบบบำบัดน้ำเสีย Beni-Suef เพื่อศึกษาความสามารถของแอกติโนมัยซีทในการบำบัดทางชีวภาพและการกำจัดของหนักโลหะจากน้ำเสีย มีแอกติโนมัยซีท 17 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากน้ำเสีย 3 ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของขั้นตอนหลักของการบำบัดในโรงงาน ได้แก่ น้ำเสียก่อนบำบัด, ถึงตกตะกอนและน้ำทิ้งแอกติโนมัยซีท จากนั้นคัดเลือกแอกติโนมัยซีท 10 สายพันธุ์ ที่มีสัณฐานวิทยาแตกต่างกันและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่โดดเด่น และพบว่ามีอยู่ในจำพวก *Nocardia*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Gordonia* และ *Nocardioopsis* ในการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการบำบัดน้ำเสียจะการประเมินโดยการวัดค่า BOD, COD และรวมสารแขวนลอย (TSS) และทดสอบความสามารถในการกำจัดโลหะหนัก เช่น Cu, Fe, Mn, ตะกั่วและสังกะสี ผลการศึกษาพบว่าส่วนใหญ่ แอกติโนมัยซีทที่คัดเลือกมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียและมีความสามารถในการลดค่า BOD, COD และ TSS และสามารถลดความเข้มข้นของโลหะหนักที่ทดสอบได้อย่างเด่นชัด สายพันธุ์ *Streptomyces* C11 ถูกพบว่ามีประสิทธิภาพมากที่สุด ในการบำบัดน้ำเสียและการกำจัดของหนักจากน้ำเสียดิบ

ชัยสิทธิ์ นิชะสม และคณะ (2556) ศึกษาการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพของเกษตรกรในจังหวัดพัทลุง และการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับพัฒนาเป็นหัวเชื้อเพื่อการผลิตปุ๋ยจากการศึกษารูปแบบสารพันธุกรรมของกลุ่มแบคทีเรียและอาร์เคียด้วยเทคนิค DGGE ในปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ 15 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแอกติโนมัยซีทและ *Bacillus* sp. จากตัวอย่างโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารในห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างไฮโดรไลติกเอนไซม์ (เซลลูเลส โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส) และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Fusarium* sp. *Alternaria* sp. *Curvularia* sp. และ *Colletotrichum gloeosporioides* สามารถคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่สร้างเอนไซม์ โปรติเอส ไลเปส เซลลูเลส และอะไมเลสได้ จำนวน 200, 98, 173 และ 81 ไอโซเลท ตามลำดับ และไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จำนวน 209 ไอโซเลท และสามารถคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส เซลลูเลส และอะไมเลสได้ จำนวน 130, 15, 160 และ 22 ไอโซเลท ตามลำดับ และ

ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้จำนวน 38 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกจะรวบรวมไว้เพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพต่อไป

ปวีณา สุขสะอาด และคณะ (2557) ศึกษาแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากการคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือด้วยอาหาร humic acid vitamin agar และ starch casein agar ที่ผสมเกลือและไม่ผสมเกลือได้จำนวน 455 ไอโซเลท โดยเป็นไอโซเลทที่คัดแยกได้จากอาหารที่ผสมเกลือและไม่ผสมเกลือจำนวน 93 และ 362 ไอโซเลท ตามลำดับ จากการศึกษาชนิดของกรด diaminopimelic ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์และลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแอคติโนมัยซีทกลุ่ม non-streptomycetes มีจำนวนมากกว่ากลุ่ม streptomycetes นาไอโซเลททั้งหมดมาตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าแอคติโนมัยซีทจำนวน 50 ไอโซเลท (11 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้ง *Candida albicans* และจำนวน 239 ไอโซเลท (52 เปอร์เซ็นต์) สามารถสร้างเอนไซม์ L-asparaginase เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท HA25-07 ซึ่งมีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุด พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Streptomyces variabilis* NBRC 12825T (100%)

สาวิณี หมวกยม (2558) ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดซีโอติของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากร่องน้ำทิ้งฟาร์มกุ้ง ทำการคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากตะกอนดินร่องน้ำทิ้งฟาร์มกุ้ง ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา โดยใช้อาหาร International Streptomyces Project Agar (ISP Agar) ความเค็ม 25 ppt พบว่าสามารถคัดแยกแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท คือ SP1, SP2, SP3, SP4, SP5 และ SP6 เมื่อวัดเติบโตโดยใช้วิธีการวัดค่าความขุ่นและน้ำหนักเปียกพบว่าไอโซเลท SP6 มีการเติบโตได้ดีที่สุด ความสามารถในการย่อยเซลลูโลสของแอคติโนมัยซีทบนอาหารแข็ง carboxymethyl cellulose (CMC) และใช้ Congo red เพื่อตรวจสอบวงใส ผลการทดลองพบว่า SP6 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยที่มีขนาดวงใสเฉลี่ย  $0.50 \pm 0.05$  เซนติเมตร และเมื่อนำไอโซเลท SP6 มาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดซีโอติในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเค็มแตกต่างกัน ได้แก่ 10, 25 และ 30 ppt พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดซีโอติมากที่สุดเมื่อใช้น้ำเสียที่มีความเค็มต่ำ 10 ppt โดยสามารถลดซีโอติได้ถึง 32.08 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 25 และ 30 ppt ที่สามารถลดลงได้ถึง 31.49 และ 25.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกอนงค์ คงแก้ว (2558) ศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีททนเค็มสำหรับบำบัดซีโอติในน้ำเสียที่มีความเค็ม คัดแยกแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินตะกอนนาเกลือ ในจังหวัดจันทบุรี โดยใช้อาหารแข็งสูตร ISP 2 ที่มีความเค็ม 25 และ 50 ppt พบว่าสามารถแยกเชื้อได้จำนวน 10 และ 9 ไอโซเลท ตามลำดับ โคโลนีแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น คล้ายผงแป้ง ย่นและขรุขระ มีสีดำ ขาว เทา เหลือง ม่วง และชมพู และติดสีแกรมบวก จากนั้นคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์และเจริญเติบโตได้ดีโดยใช้อาหารแข็งสูตร Carboxymethyl Cellulose พบว่าเมื่อใช้อาหารที่มีความเค็ม 25 ppt คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลท คือ S2, S4 และ S10 และความเค็ม 50 ppt มี 3 ไอโซเลท คือ S11, S5 และ S19 ซึ่งไอโซเลท S19 มีการเจริญเติบโตและสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์สูงที่สุด เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท S19 มาบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็มแตกต่างกัน คือ 10, 25 และ 30 ppt พบว่าไอโซเลท S19 สามารถลดค่า COD ได้ 34.5 % ในน้ำเสียที่มีความเค็ม 30 ppt

ชยาภรณ์ เขียนนอก (2559) ศึกษาการใช้แอสติโนมายซีทที่แยกจากปาชายเลนเพื่อบำบัดซีโอดีในน้ำเสียความเค็มแตกต่างกัน สามารถแยกได้เชื้อแอสติโนมายซีทจำนวน 10 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถย่อยสารอินทรีย์ได้ดีโดยใช้อาหารแข็งสูตร Carboxymethyl cellulose (CMC) agar และทดสอบด้วยวิธีสี Congo red พบว่าคัดเลือกได้จำนวน 3 ไอโซเลท คือ MF2, MF5 และ MF8 ทั้งนี้พบว่าแอสติโนมายซีทไอโซเลท MF5 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร CMC ความเค็ม 25 ppt มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์มากที่สุด โดยมีพื้นที่วงใส  $2.45 \pm 0.32$  ตารางเซนติเมตร และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์ของเชื้อไอโซเลท MF5 โดยเติมเซลล์ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 10, 25 และ 30 ppt ผลการทดลองพบว่าที่ความเค็ม 25 ppt เชื้อ MF5 มีการบำบัดซีโอดีในน้ำเสียได้ผลดีที่สุด เท่ากับ 25.4 % ซึ่งสูงกว่า 10 และ 30 ppt ตามลำดับ

จิตติมา เจริญพานิช (2559) ศึกษาการหาจุลินทรีย์ได้ทะเลลึกที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสชอบอุณหภูมิสูงและมีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งผลิตตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพชนิดใหม่ สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทะเลจำนวน 12 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลของเกาะจาน แสมสาร ที่ระดับความลึก 9 และ 24 เมตร พบจำนวน 3 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยพบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด ( $6.57 \pm 0.25$  หน่วยต่อมิลลิลิตร) ในแบคทีเรียได้ทะเลไอโซเลทที่ 7 ซึ่งมีการระบุชนิดว่าเป็น *Bacillus megaterium* โดยสามารถวัดแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงที่สุดหลังจากการบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  และค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ที่ความเร็วในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เมื่อทำบริสุทธ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอสโดยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นเกลืออิ่มตัวร้อยละ 60-80 และการไดอะไลซิส พบเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 125 เท่า โดยมีมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ประมาณ 61 กิโลดาลตัน เมื่อทำปฏิกิริยากับสับสเตรทอะโซเคซีน พบสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์คือ ค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิเท่ากับ  $37^{\circ}\text{C}$  เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงค่าพีเอชเป็นต่าง (ค่าพีเอช 7.0-9.0) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิสูงหลากหลายระหว่าง  $60$  และ  $80^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าเกลือของโลหะไม่ส่งผลยับยั้งการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่กลับเสริมแอกติวิตี และเอนไซม์ยังมีความเสถียรในสภาวะที่มีสารลดแรงตึงผิวสารฟอกขาว และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง การชอบทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เป็นต่างและความสามารถในการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่มีเกลือของโลหะ ตัวทำละลายอินทรีย์ สารลดแรงตึงผิว และสารซักฟอก สนับสนุนใหญ่เห็นถึงศักยภาพของเอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้ในการนำมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสำหรับประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

พัฒน ศิลปะชัย และคณะ (2560) ศึกษากิจกรรมไฮโดรไลติกเอนไซม์จากแอสติโนมายซีททะเล เพื่อบำบัดซีโอดีในน้ำเสียจากโรงงานแป้งมัน จากการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์พบว่าแอสติโนมายซีท RY3-37 สามารถผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ได้ดีที่สุด นำเชื้อมาบำบัดน้ำเสียโดยเลี้ยงหัวเชื้อในอาหารเหลวสูตร OYC ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง  $6.2 \pm 0.5$  อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน น้ำเสียจากโรงงานแป้งมันโดยมีค่า COD เริ่มต้น 234,665 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.2 และน้ำตาลรีดิวซ์ เริ่มต้น 31,207.87 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้อัตราส่วนหัวเชื้อร้อยละ 10 เติบโตอากาศตลอดระยะเวลาการทดลองวัดค่า COD ทุกวัน เป็นเวลา 16 วัน พบว่าแอสติโนมายซีท RY3-37 มีอัตราการบำบัด COD ในน้ำเสียได้ดีกว่าชุดควบคุม ในวันที่ 11 โดยสามารถลดค่า COD ได้ร้อยละ 75 และมีค่า COD เป็น 58,666 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สถานที่ทำการทดลอง

ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

#### 3.2 สถานที่เก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่นาเกลือบริเวณป่าแดง ตำบลโขมง อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี โดยเก็บตัวอย่างบริเวณผิวดินซุดลึกลงไปประมาณ 5 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างละ 500 กรัม นำมาคัดแยกเชื้อแอสคิตินอัมยซีทในห้องปฏิบัติการต่อไป

#### 3.3 ระยะเวลาทำการทดลอง

เมษายน 2560 ถึง มีนาคม 2562

#### 3.4 วัสดุและอุปกรณ์

- เข็มเย็บเย็บ (Needle)
- จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish)
- แห้งแก้วรูปสามเหลี่ยม (Spreader)
- ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
- ออโต้ปิเปตและทิป
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ขวดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- หลอดทดลองพร้อมฝา
- ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
- ปีกเกอร์ ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
- แห้งแก้วคนสาร
- กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
- วัสดุที่จะให้เซลล์ของเชื้อแอสคิตินอัมยซีทยึดติด
- ถังบรรจุน้ำเสีย
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- เครื่องวัดความเค็ม (Refractometer)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องวัด DO (DO meter)
- เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- ตู้อบ (Hot air oven)

- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- เครื่องเขย่า
- หลอดย่อยสลาย (Digestion Tubes)

### 3.5 สารเคมี

#### 3.5.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 3.5.1.1 อาหาร International Streptomyces Project Agar (ISP2 Agar)

- Yeast Extract
- Malt Extract
- Glucose
- Agar

##### 3.5.1.2 อาหาร Carboxymethyl cellulose Broth & Agar (CMC Broth & Agar)

- Yeast extract
- Ferric sulfate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ )
- Zinc sulphate ( $\text{ZnSO}_4$ )
- Potassium phosphate monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Potassium phosphate dibasic ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- Carboxymethyl cellulose (CMC)
- Agar

##### 3.5.1.3 อาหาร Oatmeal yeast extract และ carboxy methyl cellulose (OYC)

- Oatmeal
- Carboxymethyl cellulose
- Yeast extract

#### 3.5.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อแอคติโนมัยซีท

- Safanin O
- Crystal violet
- 70% Ethyl alcohol
- Iodine solution
- Congo red
- Acetate buffer 0.2 M
- 0.1% Dinitrosalicylic acid (DNS)
- Hydrochloric acid (HCl)
- Sodium Chloride (NaCl)
- Sodium Hydroxide (NaOH)

#### 3.5.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Wood and Bhat, 1988)

- 3,5 - Dinitrosalicylic acid ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$ )
- Phenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ )

- Sodium sulfite ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )
- Potassium hydrogen phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- Sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ )

#### 3.5.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976)

- Bovine serum albumin (BSA)
- Dye reagent

#### 3.5.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่า COD วิธีรีฟลักซ์แบบปิด/การติเตรท (ไพฑูรย์ หมายมั่นสมสุข, 2553)

- Potassium Dichromate ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )
- Sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- Silver Sulfate ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ )
- Mercuric Sulfate ( $\text{HgSO}_4$ )
- Ferrous Ammonium Sulfate ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- 1,10 – Phenanthroline Monohydrate ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- Ferrous Sulfate Heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

### 3.6 วิธีการทดลอง

#### 3.6.1 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากนาเกลือ

นำดินตัวอย่างไปทำ pre-treatment ด้วยวิธีการนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Ruan, 1994) เพื่อกำจัดแบคทีเรียและเชื้อราในดิน เป็นการลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการลงและกระตุ้นสปอร์ของแอกติโนมัยซีทที่อยู่ในระยะพักตัวให้พร้อมที่จะเติบโต (จิรพรรณ ใจอินผล, 2550) จากนั้นแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยการ Spread plate และ Streak plate โดยชั่งดินที่ผ่านการ pretreatment มาชั่งน้ำหนักดินหลังอบและบดดินให้ละเอียดแบ่งใส่ถุงซิปล 10 ถุง ถุงละ 25 กรัม นำมาละลายในน้ำทะเลที่ความเค็ม 30 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว นำมาเจือจางด้วยเทคนิค tenfold dilution ให้ได้ความเจือจางอยู่ในช่วง  $10^{-1}$  -  $10^{-4}$  ปีเปตสารที่การเจือจางต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยกระจาย (spread) ลงบนอาหารแข็ง International Streptomyces Project Agar (ISP2 Agar) ที่ความเค็ม 30 ppt และบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเกิดโคโลนีบนอาหาร จึงแยกโคโลนีเดี่ยวขีด (streak) ลงบนอาหารแข็ง ISP2 Agar ที่ความเค็ม 30 ppt บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเกิดโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร จึงคัดเลือกโคโลนี (pick colony) ที่มีลักษณะแตกต่างกันลงในอาหารแข็งเลี้ยง ISP2 Agar ที่ความเค็ม 30 ppt 10 โคโลนี บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

#### 3.6.2 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้

นำแอกติโนมัยซีทบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากดินนาเกลือ และเชื้อแอกติโนมัยซีทจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จำนวน 5 ไอโซเลท (เอกอนงค์ คงแก้ว, 2558) มาขีดบนอาหาร ISP2 Agar ที่ความเค็ม 30 ppt ที่บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง เส้นใย พื้นที่ผิวและขนาดของเซลล์แอกติโนมัยซีท (Ruan, 1994)

### 3.6.3 การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสับสเตรตได้ดี โดยการศึกษากิจกรรมของไฮโดรไลติกเอนไซม์

การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสับสเตรตได้ดี โดยการศึกษากิจกรรมของไฮโดรไลติกเอนไซม์ ประกอบด้วยกิจกรรมของอะไมเลสและเซลลูเลส (Amylase and Cellulase activity) โดยนำเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากดินนาเกลือ และเชื้อแอกติโนมัยซีทจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จำนวน 5 ไอโซเลท (เอกอนงค์ คงแก้ว, 2558) ทำการเลี้ยงในอาหารเหลว OYC ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเจาะชั้นวุ้นเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็ม 30 และ 40 ppt ค่าความเป็นกรดต่าง  $6.2 \pm 0.5$  บมเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส การเขย่าอยู่ที่ 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนดให้ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น และปริมาณโปรตีน และนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) เพื่อนำมาคัดเลือกเชื้อที่ดีที่สุดโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD)

### 3.6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ Reducing sugar ใน supernatant ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (Wood and Bhat, 1988)

นำแอกติโนมัยซีทเลี้ยงในอาหารเหลว CMC โดยใช้หัวเชื้อประมาณ 10% เติมลงในอาหารเหลว CMC นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 26 °C 3-8 วัน จากนั้นปิเปตหัวเชื้อปริมาตร 1 ml ใส่ Micro tube นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 10000 รอบ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 26 °C ปิเปตส่วน supernatant 60 ไมโครลิตร ผสมกับ Dinitrosalicylic acid 60 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ลบค่าของ blank (0.075) ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

### 3.6.5 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใน supernatant ด้วยวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

นำแอกติโนมัยซีทเลี้ยงในอาหารเหลว CMC โดยใช้หัวเชื้อประมาณ 10% เติมลงในอาหารเหลว CMC นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 26 °C 3-8 วัน จากนั้นปิเปตหัวเชื้อปริมาตร 1 ml ใส่ Micro tube นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 10,000 รอบ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 26 °C ปิเปตส่วน supernatant ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน Micro plate เติมสารละลาย Dilution Dye (1:4) (Dye reagent : น้ำ) 200 ไมโครลิตร นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm จากนั้นคำนวณหาค่าความเข้มข้นโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

### 3.6.6 ประสิทธิภาพการบำบัด COD ของแอกติโนมัยซีท (ไพฑูรย์ หมายมั่นสมสุข, 2553)

นำเชื้อไอโซเลทที่คัดเลือกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัด COD ในน้ำเสียสังเคราะห์ มีความเค็ม 30 ppt แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง และแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ คือ

**ชุดควบคุม:** เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเค็ม 30 ppt ปริมาตร 5,000 มิลลิลิตร และไม่เติมหัวเชื้อ

**ชุดการทดลอง:** เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเค็ม 30 ppt ปริมาตร 4,500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร

โดยทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีค่าความเป็นกรดต่าง  $6.2 \pm 0.5$  เดิมอากาศอากาศตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างน้ำตรวจวัดค่า COD, pH และน้ำตาลรีดิวซ์ ทุกวันเป็นเวลา 24 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD)

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการทดลองของการตัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ, การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ดี และประสิทธิภาพการบำบัด COD ของแอกติโนมัยซีท มาวิเคราะห์ข้อมูลสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบพหุคูณ โดยวิธี Tukey's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม R version 3.3.1 (Ihaka and Gentleman, 1996 อ้างถึงใน พัฒน ศิลปชัย, 2560)

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 การตัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากนาเกลือ จังหวัดจันทบุรี

#### 4.1.1 ลักษณะทั่วไปของพื้นที่เก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่นาเกลือบริเวณป่าแดง ตำบลโขมง อำเภอนาทม จังหวัดจันทบุรี (ภาพที่ 4.1) โดยเก็บตัวอย่างบริเวณผิวดินชุดลึกลงไปประมาณ 5 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างละ 500 กรัม นำมาตัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 4.1 ลักษณะพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง



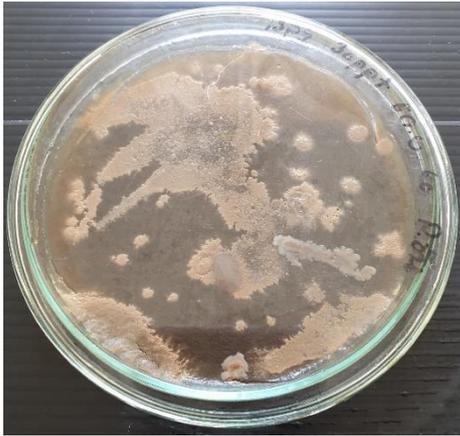
ภาพที่ 4.2 ลักษณะดินตัวอย่างจากนาเกลือ

#### 4.1.2 การตัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากนาเกลือ

เมื่อนำดินบริเวณนาเกลือไปผ่านการ pre-treatment ที่ 100 องศาเซลเซียส และนำดิน 25 กรัม ผสมให้เข้ากันละลายลงในน้ำจากนาเกลือปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีความเค็มความเค็ม 30 ppt ใส่ลงในหลอด

ทดลองฟลาเกลียว นำมาเจือจางด้วยเทคนิค tenfold dilution ให้ได้ความเจือจางอยู่ในช่วง  $10^{-1}$  -  $10^{-4}$  ปิเปตสารที่การเจือจางต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยกระจาย (spread) ลงบนอาหารแข็ง International Streptomyces Project Agar (ISP2 Agar) ที่ความเค็ม 30 ppt และบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเกิดโคโลนีบนอาหาร จึงแยกโคโลนีเดี่ยวขีด (streak) ลงบนอาหารแข็ง ISP2 Agar ที่ความเค็ม 30 ppt บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเกิดโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร จึงคัดเลือกโคโลนี (pick colony) ที่มีลักษณะแตกต่างกันลงในอาหารแข็งเอียง ISP2 Agar ที่ความเค็ม 30 ppt 10 โคโลนี บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี พบว่าโคโลนีส่วนใหญ่มีสีขาว เหลือง และชมพู ลักษณะผิวหน้าของโคโลนีมีผิวขรุขระ นูน และเหี่ยวย่น มีขอบหยัก โดยสามารถคัดแยกได้จากดินนาเกลือ จำนวน 4 ไอโซเลท และเชื้อแอกติโนมัยซีทจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี (เอกอนงค์ คงแก้ว, 2558) จำนวน 5 ไอโซเลท ดังแสดงตามตารางที่ 4-1

**ตารางที่ 4-1** ลักษณะสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ (Chanthaburi 1-4) และตัวอย่างเชื้อแอกติโนมัยซีทจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี (S12 - 14 และ S18 - 19) บนอาหารแข็ง ISP2 ที่ความเค็ม 30 ppt

ไอโซเลท	ลักษณะสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีท
MT1	

MT2



MT3



MT4



S12



S13



S14



S18

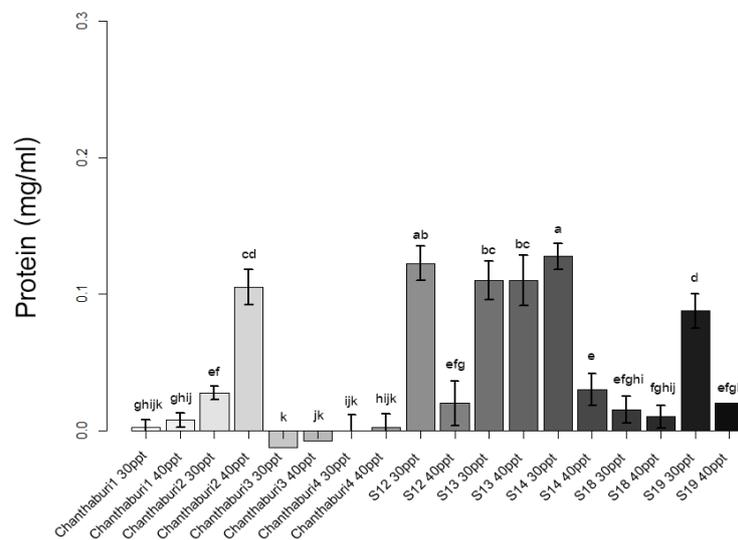


S19



## 4.2 การคัดเลือกแอคติโนไมซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ดี โดยการศึกษากิจกรรมของไฮโดรไลติกเอนไซม์

การคัดเลือกแอคติโนไมซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ดี โดยการศึกษากิจกรรมของไฮโดรไลติกเอนไซม์ จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมของอะไมเลสและเซลลูเลส (Amylase and Cellulase activity) พบว่าเชื้อ Chanthaburi3 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 30 ppt มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแอคติโนไมซีทอีก 8 ไอโซเลต และรองลงมาคือ S18 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 40 ppt และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส (supernatant) ทำการหาค่าปริมาณโปรตีนเมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าเชื้อ S14 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 30 ppt มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด คือ  $0.1275 \pm 0.0095$  mg/ml และไม่พบปริมาณโปรตีนในเชื้อ Chanthaburi3 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 30 ppt และ 40 ppt (ภาพที่ 4.3) ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ Chanthaburi3 และ S18 นำไปใช้ทดลองการบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็มต่อไป



ภาพที่ 4.3 ปริมาณโปรตีน (mg/ml) ในน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส (supernatant)

### 4.2.1 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกิจกรรมของอะไมเลส (Amylase activity)

ผลการศึกษากิจกรรมของอะไมเลส (Amylase activity) จากตัวอย่างเชื้อแอคติโนไมซีทจากดินนาเกลือ (Chanthaburi 1-4) และตัวอย่างเชื้อแอคติโนไมซีทจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี (S12 - 14 และ S18 - 19) รวม 9 ไอโซเลต พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดในเชื้อ Chanthaburi3 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 30 ppt ( $1.81 \pm 0.09$  mg/ml) รองลงมาคือ S18 และ S19 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 40 ppt ซึ่งมีค่าเท่ากัน ( $1.72 \pm 0.06$  และ  $1.72 \pm 0.02$  mg/ml) น้อยที่สุดคือเชื้อ S14 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 40 ppt ( $1.14 \pm 0.05$  mg/ml) และกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เท่ากับ  $6.04 \pm 0.32$ ,  $5.75 \pm 0.19$ ,  $5.75 \pm 0.08$  และ  $3.81 \pm 0.16$  Unit/ml ตามลำดับ ดังแสดงตามตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ตารางแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (Unit/ml)

ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัย ซีท	ปริมาณน้ำตาล รีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	กิจกรรม เอนไซม์ (Unit/ml)	กิจกรรมจำเพาะ (Unit/mg)
Chanthaburi1 30ppt	1.16±0.11 <sup>hij</sup>	0.0025±0.005 <sup>ghijk</sup>	3.87±0.38 <sup>hij</sup>	353.61±1146.05 <sup>ab</sup>
Chanthaburi1 40ppt	1.30±0.08 <sup>fg</sup>	0.0075±0.005 <sup>ghij</sup>	4.32±0.28 <sup>fg</sup>	455.27±238.61 <sup>ab</sup>
Chanthaburi2 30ppt	1.16±0.09 <sup>hij</sup>	0.0275±0.005 <sup>ef</sup>	3.86±0.29 <sup>hij</sup>	151.51±22.09 <sup>ab</sup>
Chanthaburi2 40ppt	1.17±0.05 <sup>ghi</sup>	0.1050±0.0129 <sup>cd</sup>	3.90±0.18 <sup>ghi</sup>	36.02±5.01 <sup>abc</sup>
Chanthaburi3 30ppt	1.81±0.09 <sup>a</sup>	-0.0125±0.005 <sup>k</sup>	6.04±0.32 <sup>a</sup>	-697.53±322.66 <sup>c</sup>
Chanthaburi3 40ppt	1.47±0.14 <sup>de</sup>	-0.0075±0.005 <sup>jk</sup>	4.90±0.46 <sup>de</sup>	-647.16±138.66 <sup>c</sup>
Chanthaburi4 30ppt	1.40±0.12 <sup>ef</sup>	0.0000±0.0115 <sup>ijk</sup>	4.67±0.42 <sup>ef</sup>	-259.75±994.65 <sup>bc</sup>
Chanthaburi4 40ppt	1.20±0.05 <sup>ghi</sup>	0.0025±0.009 <sup>hijk</sup>	4.01±0.17 <sup>ghi</sup>	-14.10±538.35 <sup>abc</sup>
S12 30ppt	1.09±0.04 <sup>ij</sup>	0.1225±0.012 <sup>ab</sup>	3.63±0.15 <sup>ij</sup>	29.14±2.64 <sup>abc</sup>
S12 40ppt	1.02±0.07 <sup>j</sup>	0.0200±0.016 <sup>efg</sup>	3.41±0.23 <sup>j</sup>	122.27±30.11 <sup>ab</sup>
S13 30ppt	1.11±0.06 <sup>ij</sup>	0.1100±0.014 <sup>bc</sup>	3.71±0.20 <sup>ij</sup>	33.22±3.45 <sup>abc</sup>
S13 40ppt	1.13±0.02 <sup>hij</sup>	0.1100±0.018 <sup>bc</sup>	3.78±0.07 <sup>hij</sup>	36.62±6.37 <sup>abc</sup>
S14 30ppt	1.26±0.05 <sup>gh</sup>	0.1275±0.0096 <sup>a</sup>	4.19±0.18 <sup>gh</sup>	33.06±1.37 <sup>abc</sup>
S14 40ppt	1.14±0.05 <sup>hij</sup>	0.0300±0.0115 <sup>e</sup>	3.81±0.16 <sup>hij</sup>	119.02±42.95 <sup>ab</sup>
S18 30ppt	1.55±0.05 <sup>cd</sup>	0.0150±0.0100 <sup>efghi</sup>	5.17±0.17 <sup>cd</sup>	681.51±163.47 <sup>a</sup>
S18 40ppt	1.72±0.06 <sup>ab</sup>	0.0100±0.0082 <sup>fghij</sup>	5.75±0.19 <sup>ab</sup>	478.99±191.87 <sup>ab</sup>
S19 30ppt	1.65±0.05 <sup>bc</sup>	0.0875±0.0125 <sup>d</sup>	5.50±0.17 <sup>bc</sup>	64.48±10.22 <sup>abc</sup>
S19 40ppt	1.72±0.02 <sup>ab</sup>	0.0200±0.000 <sup>efgh</sup>	5.75±0.08 <sup>ab</sup>	245.11±9.97 <sup>ab</sup>

#### 4.2.2 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกิจกรรมของเซลลูเลส (Cellulase activity)

ผลการศึกษากิจกรรมของอะไมเลส (Amylase activity) จากตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ (Chanthaburi 1-4) และตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีทจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี (S12 - 14 และ S18 - 19) รวม 9 ไอโซเลท พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดในการเชื้อ Chanthaburi3 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 30 ppt (1.82±0.16 mg/ml) รองลงมาคือ S18 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 40 ppt (1.73±0.14 mg/ml) น้อยที่สุดในเชื้อ S12 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 30 (0.91±0.07 mg/ml) และกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เท่ากับ 6.05±0.39, 5.77±0.48 และ 3.02±0.25 unit/ml ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ตารางแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดจากกิจกรรมเซลลูเลส (Unit/ml)

ตัวอย่างเชื้อแอกติโนมัยซีท	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	กิจกรรมเอนไซม์ (Unit/ml)	กิจกรรมจำเพาะ (Unit/mg)
Chanthaburi1 30ppt	1.03±0.15 <sup>hij</sup>	0.0025±0.005 <sup>ghijk</sup>	3.44±0.50 <sup>hij</sup>	385.67±1036.49 <sup>abc</sup>
Chanthaburi1 40ppt	1.21±0.14 <sup>efg</sup>	0.0075±0.005 <sup>ghij</sup>	4.02±0.46 <sup>efg</sup>	413.22±176.73 <sup>abc</sup>
Chanthaburi2 30ppt	1.28±0.11 <sup>def</sup>	0.0275±0.005 <sup>ef</sup>	4.27±0.38 <sup>def</sup>	166.63±18.65 <sup>abcd</sup>
Chanthaburi2 40ppt	1.06±0.08 <sup>ghij</sup>	0.1050±0.0129 <sup>cd</sup>	3.53±0.28 <sup>ghij</sup>	32.50±3.17 <sup>bcd</sup>
Chanthaburi3 30ppt	1.82±0.16 <sup>a</sup>	-0.0125±0.005 <sup>k</sup>	6.05±0.39 <sup>a</sup>	-700.56±325.96 <sup>e</sup>
Chanthaburi3 40ppt	1.01±0.10 <sup>hij</sup>	-0.0075±0.005 <sup>jk</sup>	3.38±0.32 <sup>hij</sup>	-446.46±94.91 <sup>de</sup>
Chanthaburi4 30ppt	1.11±0.05 <sup>fgh</sup>	0.0000±0.0115 <sup>ijk</sup>	3.70±0.18 <sup>fgh</sup>	-204.03±777.79 <sup>cde</sup>
Chanthaburi4 40ppt	0.94±0.06 <sup>j</sup>	0.0025±0.0095 <sup>hijk</sup>	3.15±0.21 <sup>j</sup>	-0.74±414.65 <sup>bcd</sup>
S12 30ppt	0.91±0.07 <sup>j</sup>	0.1225±0.0125 <sup>ab</sup>	3.02±0.25 <sup>j</sup>	24.38±3.98 <sup>bcd</sup>
S12 40ppt	1.25±0.14 <sup>ef</sup>	0.0200±0.0163 <sup>efg</sup>	4.18±0.48 <sup>ef</sup>	147.90±25.48 <sup>abcd</sup>
S13 30ppt	1.14±0.06 <sup>fgh</sup>	0.1100±0.0141 <sup>bc</sup>	3.82±0.21 <sup>fgh</sup>	34.24±3.28 <sup>bcd</sup>
S13 40ppt	0.94±0.04 <sup>j</sup>	0.1100±0.0182 <sup>bc</sup>	3.13±0.14 <sup>j</sup>	30.23±3.94 <sup>bcd</sup>
S14 30ppt	1.27±0.05 <sup>ef</sup>	0.1275±0.0095 <sup>a</sup>	4.24±0.17 <sup>ef</sup>	33.50±2.06 <sup>bcd</sup>
S14 40ppt	0.95 ±0.07 <sup>j</sup>	0.0300±0.0115 <sup>e</sup>	3.18±0.23 <sup>ij</sup>	97.28±25.34 <sup>bcd</sup>
S18 30ppt	1.62±0.02 <sup>bc</sup>	0.0150±0.0100 <sup>efghi</sup>	5.39±0.08 <sup>bc</sup>	712.63±178.28 <sup>a</sup>
S18 40ppt	1.73±0.14 <sup>ab</sup>	0.0100±0.0081 <sup>fghij</sup>	5.77±0.48 <sup>ab</sup>	473.82±179.0 <sup>ab</sup>
S19 30ppt	1.46±0.04 <sup>cd</sup>	0.0875±0.0125 <sup>d</sup>	4.86±0.14 <sup>cd</sup>	56.82±8.25 <sup>bcd</sup>
S19 40ppt	1.35±0.08 <sup>de</sup>	0.0200±0.000 <sup>efgh</sup>	4.50±0.29 <sup>de</sup>	191.81±13.22 <sup>abcd</sup>

#### 4.3 ประสิทธิภาพการบำบัด COD ของแอกติโนมัยซีท โดยวัดอัตราการลดลงของ COD

จากการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมของอะไมเลสและเซลลูเลส (Amylase and Cellulase activity) พบว่าเชื้อ Chanthaburi3 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 30 ppt มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด และรองลงมาคือ S18 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 40 ppt จึงนำเชื้อแอกติโนมัยซีท Chanthaburi3 และ S18 มาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัด COD ในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่มีความเค็ม 30 ppt โดยทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ยตลอดการทดลองที่  $6.25 \pm 0.05$  ค่าออกซิเจนในน้ำ (DO) เฉลี่ยเท่ากับ  $5.56 \pm 0.08$  (mg/L) ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (TSS) เฉลี่ยเท่ากับ 0.03 (mg/L) (ตาราง 4-6 – 4-8) และเก็บตัวอย่างน้ำตรวจวัดค่า COD และน้ำตาลรีดิวซ์ ทุกวันเป็นเวลา 24 วัน พบว่าในช่วงวันที่ 0-4 ไม่พบความแตกต่างของการลดลงของร้อยละ COD ช่วงวันที่ 6 เป็นต้นไปพบว่าเชื้อ Chanthaburi3 มีค่าการลดลงของร้อยละ COD สูงสุดในวันที่ 13 ของการทดลอง ( $73.04 \pm 8.98$ ) จนถึงวันที่ 16-24 พบว่าการลดลงของ COD

เริ่มคงที่ ดังแสดงในตารางที่ 4-5 และพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดในเชื้อ Chanthaburi3 ในวันที่ 2 ของการทดลองมีค่าเท่ากับ  $839.56 \pm 955.37$  (ug/ml) ดังแสดงในตารางที่ 4-9

ตารางที่ 4-4 ตารางแสดงปริมาณ COD (mg/ml) และค่าร้อยละการลดลงของ COD (%)

วันที่	COD (mg/ml)			COD reduction (%)		
	Control	Chanthaburi3	S18	Control	Chanthaburi3	S18
0	$116000 \pm 12132^a$	$122666 \pm 8262^a$	$125333 \pm 10930^a$	$0.00 \pm 10.45^a$	$0.00 \pm 6.74^a$	$0.00 \pm 8.72^a$
2	$84000 \pm 4382^a$	$84000 \pm 4382^a$	$93333 \pm 28918^a$	$27.58 \pm 3.77^a$	$31.52 \pm 3.57^a$	$25.53 \pm 23.07^a$
4	$76000 \pm 8390^a$	$76000 \pm 8390^a$	$74666 \pm 17282^a$	$34.48 \pm 7.23^a$	$38.04 \pm 6.84^a$	$40.43 \pm 13.79^a$
6	$66667 \pm 6532^a$	$62666 \pm 3266^{aa}$	$70000 \pm 4000^b$	$42.53 \pm 5.63^b$	$48.92 \pm 2.66^a$	$44.15 \pm 3.19^{ab}$
9	$62667 \pm 6022^b$	$44000 \pm 6693^a$	$60000 \pm 9798^b$	$45.98 \pm 5.19^b$	$64.13 \pm 5.45^a$	$52.13 \pm 7.82^b$
13	$59733 \pm 9635^b$	$33066 \pm 11023^a$	$57600 \pm 4048^b$	$48.50 \pm 8.31^b$	$73.04 \pm 8.98^a$	$54.04 \pm 3.23^b$
16	$54400 \pm 6712^b$	$39467 \pm 7482^a$	$50133 \pm 7482^b$	$53.10 \pm 5.79^b$	$67.83 \pm 6.10^a$	$60.00 \pm 5.97^b$
20	$51200 \pm 4048^b$	$39467 \pm 4818^a$	$48000 \pm 3505^b$	$55.86 \pm 3.49^c$	$67.83 \pm 3.93^a$	$61.70 \pm 2.80^b$
24	$49066 \pm 3305^b$	$40533 \pm 3305^a$	$45867 \pm 2613^b$	$57.70 \pm 2.85^c$	$66.96 \pm 2.69^a$	$63.41 \pm 2.09^b$

ตารางที่ 4-5 ตารางแสดงค่าคุณภาพน้ำเสียตลอดการทดลองของเชื้อ Chanthaburi3

วันที่	TSS (g)	pH	DO (mg/L)	Salinity (ppt)
0	$0.01 \pm 0.00^a$	$6.29 \pm 0.02^a$	$4.61 \pm 0.40^a$	$30 \pm 0^a$
2	$0.02 \pm 0.00^a$	$6.43 \pm 0.01^a$	$5.44 \pm 0.15^a$	$30 \pm 0^a$
4	$0.02 \pm 0.00^a$	$6.46 \pm 0.01^a$	$5.45 \pm 0.09^{ab}$	$30 \pm 0^a$
6	$0.03 \pm 0.01^a$	$6.33 \pm 0.06^a$	$5.65 \pm 0.07^a$	$30 \pm 0^a$
9	$0.02 \pm 0.00^a$	$6.21 \pm 0.09^{ab}$	n/a	$30 \pm 0^a$
13	$0.02 \pm 0.00^a$	$6.13 \pm 0.07^b$	n/a	$30 \pm 0^a$
16	$0.03 \pm 0.00^a$	$6.06 \pm 0.03^b$	$6.40 \pm 0.17^a$	$30 \pm 0^a$
20	$0.04 \pm 0.00^a$	$6.09 \pm 0.04^a$	$5.93 \pm 0.71^a$	$30 \pm 0^a$
24	$0.02 \pm 0.00^b$	$6.16 \pm 0.05^a$	$6.17 \pm 0.16^a$	$30 \pm 0^a$

ตารางที่ 4-6 ตารางแสดงค่าคุณภาพน้ำเสียตลอดการทดลองของเชื้อ S18

วันที่	TSS (g)	pH	DO (mg/L)	Salinity (ppt)
0	0.01±0.00 <sup>a</sup>	6.19±0.02 <sup>b</sup>	3.50±0.40 <sup>b</sup>	30±0 <sup>a</sup>
2	0.02±0.00 <sup>a</sup>	6.37±0.04 <sup>ab</sup>	5.53±0.03 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>
4	0.02±0.00 <sup>a</sup>	6.48±0.04 <sup>a</sup>	5.38±0.10 <sup>b</sup>	30±0 <sup>a</sup>
6	0.04±0.01 <sup>a</sup>	6.37±0.02 <sup>a</sup>	5.36±0.10 <sup>b</sup>	30±0 <sup>a</sup>
9	0.02±0.00 <sup>a</sup>	6.32±0.03 <sup>a</sup>	n/a	30±0 <sup>a</sup>
13	0.03±0.00 <sup>a</sup>	6.34±0.06 <sup>a</sup>	n/a	30±0 <sup>a</sup>
16	0.02±0.00 <sup>a</sup>	6.26±0.10 <sup>a</sup>	6.20±0.08 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>
20	0.04±0.00 <sup>b</sup>	6.32±0.03 <sup>a</sup>	6.15±0.13 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>
24	0.04±0.00 <sup>a</sup>	6.20±0.14 <sup>a</sup>	6.27±0.59 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>

ตารางที่ 4-7 ตารางแสดงค่าคุณภาพน้ำเสียตลอดการทดลองของชุดควบคุม

วันที่	TSS (g)	pH	DO (mg/L)	Salinity (ppt)
0	0.01±0.00 <sup>a</sup>	6.17±0.03 <sup>b</sup>	3.87±0.59 <sup>ab</sup>	30±0 <sup>a</sup>
2	0.02±0.00 <sup>a</sup>	6.33±0.02 <sup>b</sup>	5.22±0.22 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>
4	0.02±0.00 <sup>a</sup>	6.50±0.06 <sup>a</sup>	5.55±0.02 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>
6	0.03±0.00 <sup>a</sup>	6.19±0.15 <sup>a</sup>	5.56±0.11 <sup>ab</sup>	30±0 <sup>a</sup>
9	0.03±0.01 <sup>a</sup>	6.15±0.09 <sup>b</sup>	n/a	30±0 <sup>a</sup>
13	0.03±0.00 <sup>a</sup>	6.17±0.05 <sup>b</sup>	n/a	30±0 <sup>a</sup>
16	0.03±0.00 <sup>a</sup>	6.18±0.02 <sup>ab</sup>	6.46±0.18 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>
20	0.04±0.00 <sup>ab</sup>	6.02±0.30 <sup>a</sup>	6.21±0.18 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>
24	0.02±0.00 <sup>ab</sup>	6.13±0.18 <sup>a</sup>	6.18±0.24 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>

ตารางที่ 4-9 ตารางแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ Chanthaburi3 และ S18

วันที่	Reducing sugar (ug/ml)		
	Control	Chanthaburi3	S18
0	359.62±49.62 <sup>c</sup>	603.09±30.97 <sup>a</sup>	531.07±35.22 <sup>b</sup>
2	24.12±72.38 <sup>b</sup>	839.56±955.37 <sup>a</sup>	127.32±120.88 <sup>b</sup>
4	270.16±164.40 <sup>a</sup>	128.86±122.82 <sup>b</sup>	155.56±117.12 <sup>ab</sup>
6	75.50±113.29 <sup>a</sup>	125.26±119.02 <sup>a</sup>	132.97±126.88 <sup>a</sup>
9	99.59±118.15 <sup>b</sup>	246.45±18.27 <sup>a</sup>	236.16±12.98 <sup>a</sup>
13	184.26±105.88 <sup>ab</sup>	198.15±113.62 <sup>a</sup>	74.49±11.83 <sup>b</sup>
16	179.73±103.04 <sup>a</sup>	196.71±112.88 <sup>a</sup>	160.08±121.27 <sup>a</sup>
20	252.26±13.78 <sup>a</sup>	197.17±114.35 <sup>a</sup>	217.69±83.77 <sup>a</sup>
24	0.00±0.00 <sup>b</sup>	127.06±121.03 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผล

จากการศึกษาและคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ จ.จันทบุรี และเชื้อแอกติโนมัยซีทจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จำนวน 5 ไอโซเลท เพื่อใช้บำบัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่มีความเค็ม 30 ppt สามารถสรุปได้ดังนี้

#### 5.1 อภิปราย

##### 5.1.1 ลักษณะทั่วไปของพื้นที่เก็บตัวอย่าง

การศึกษาและคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ เพื่อใช้บำบัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่มีความเค็ม ผลพบว่าดินนาเกลือมีความเค็มประมาณ 30-50 ppt มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 – 31 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.98 – 5.00 ลักษณะดินมีสีน้ำตาล เก็บตัวอย่างโดยใช้อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน (Soil Auger) กดลึกลงไปจากผิวดินประมาณ 5 เซนติเมตร ซึ่งเป็นช่วงความลึกที่เหมาะสมของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้และเป็นแอกติโนมัยซีทที่สามารถทนเค็ม โดยจามจรี เกตุบัวขาว และคณะ (2555) กล่าวว่าแอกติโนมัยซีทสามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน แต่โดยปกติมักจะเจริญอยู่ผิวดินหรือในดินไม่ลึกไปกว่า 4 เซนติเมตร ซึ่งจะพบเชื้อแอกติโนมัยซีทสูงถึงร้อยละ 95 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด ในดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-8 ซึ่งสอดคล้องกับ Ding *et al.* (2007) ที่พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่แอกติโนมัยซีทเจริญได้ดีที่สุดจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 5.6-6.0 และมีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0-9.5 แอกติโนมัยซีทจะมีปริมาณเท่ากับชีวมวลของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เพราะว่าแอกติโนมัยซีทจะมีความสามารถพิเศษในการย่อยสลายสารประกอบที่แบคทีเรียและเชื้อราไม่สามารถย่อยสลายได้ จึงพบแอกติโนมัยซีทมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นหลังจากที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มีจำนวนลดลงแล้ว ทำให้ส่งผลต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทในดินจึงพบในดินประมาณ 10 -33 เปอร์เซ็นต์ (อ้างถึงใน เอกอนงค์ คงแก้ว, 2558)

##### 5.1.2 ผลการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากนาเกลือ

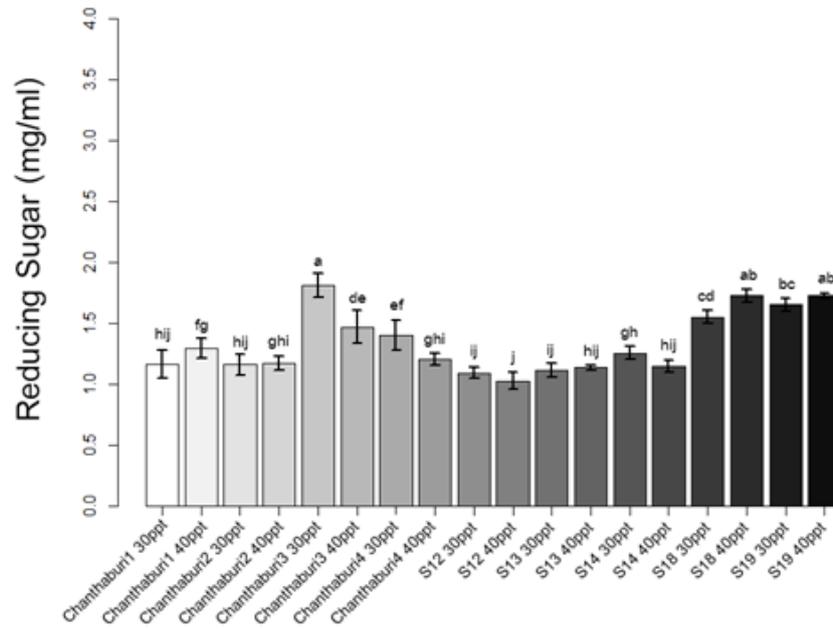
โคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทมีลักษณะคล้ายผงแป้ง พื้นผิวน้ำย่น ขรุขระ นูน เรียบ ขอบมีรอยหยัก โคโลนีมีสีมีสีขาว ครีม เหลือง และชมพู ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทพบว่าเป็นเส้นใย เรียงต่อกันเป็นกิ่งก้าน มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก และย้อมแกรมติดสีแกรมบวก (เอกอนงค์ คงแก้ว, 2558) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Waksman *et al.* (1967) แอกติโนมัยซีทมีลักษณะโคโลนีค่อนข้างใหญ่ มีผิวที่หยาบ และรูปร่างแบบ ฟิลาเมนต์ที่ต่อกันเป็นเส้นยาว ซึ่งมีลักษณะคล้ายเชื้อราแต่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าเชื้อรา คือประมาณ 0.5-1.2 ไมโครเมตร ผนังเซลล์มีลักษณะคล้ายแบคทีเรียแกรมบวกส่วนความคล้ายคลึงกับฟังไจ คือมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual spore) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะเจริญเป็นเส้นใย เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45-65 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ Lacey (2009) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์และแอกติโนมัยซีทจากดินเค็มและพบว่าแอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Streptomyces* โดยความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 8 และจากดาร์ริกา วสุนธรากุล (2552) ได้สำรวจความหลากหลายของแบคทีเรียและแอกติโนมัยซีทในปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดของโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพองค์การบริหารส่วน ตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ผลการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปท่อนติดสีแกรมบวกและแอกติโนมัยซีท

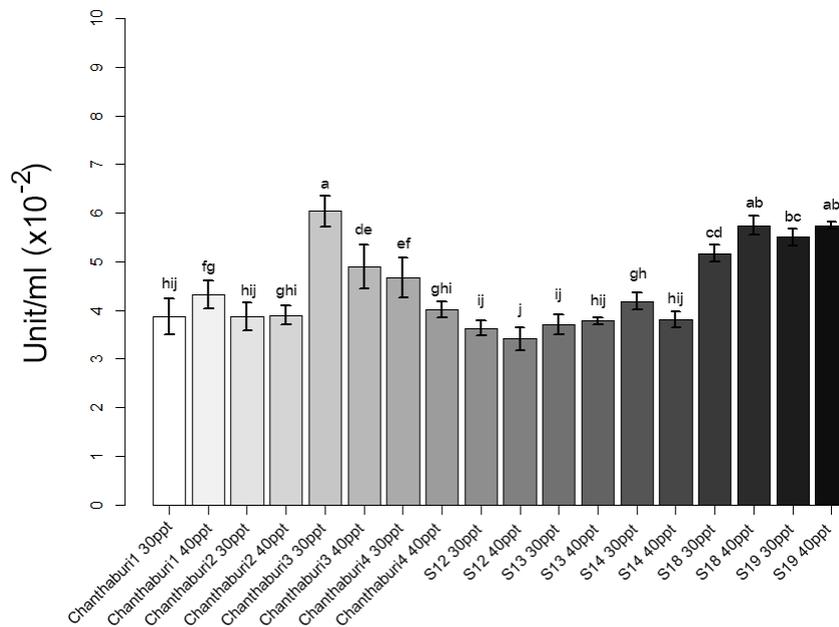
เป็นกลุ่มที่ทนหรือชอบร้อน (thermophile) ผลการศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis พบว่าโครงสร้างแบคทีเรียและแอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ชอบเค็ม (halophile) คือแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Halomonas* และแอกติโนมัยซีทที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับ *Dietzia* คิดเป็นร้อยละ 64 และ 71 ของจำนวนโคลนทั้งหมด

### 5.1.3 ผลการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสับสเตรตได้ดี โดยการศึกษากิจกรรมของไฮโดรไลติกเอนไซม์

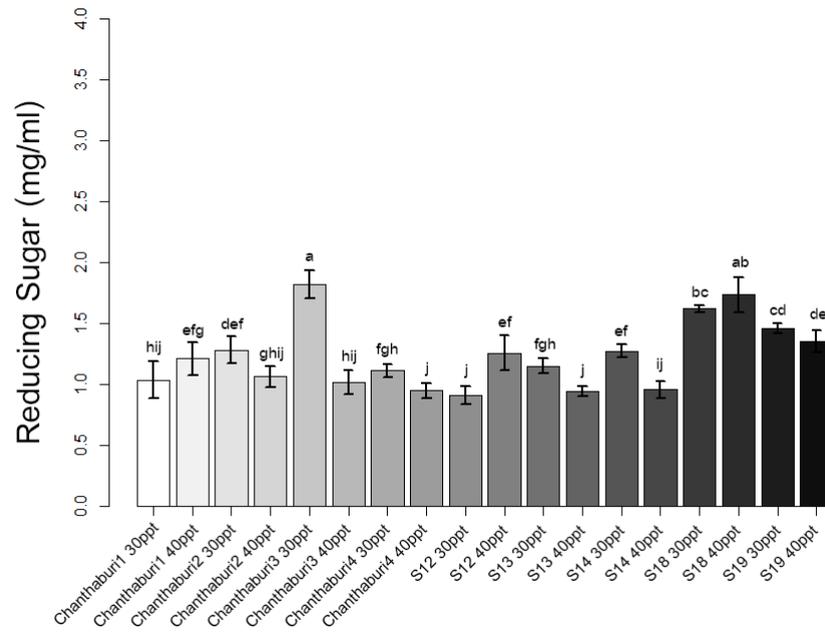
ผลจากการศึกษาแอกติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลทในอาหารเหลว OYC ความเค็ม 30 และ 40 ppt พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทที่นำมาศึกษามีความสามารถในการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ทุกไอโซเลท โดยเชื้อที่มีการย่อยสลายสับสเตรตไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดคือเชื้อ Chanthaburi3 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 30 ppt โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เท่ากับ 1.81 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือเชื้อ S18 ที่เลี้ยงด้วยความเค็ม 40 ppt มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เท่ากับ 1.72 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาพที่ 5.1) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เท่ากับ 6.04 และ 5.75 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 5.2) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เท่ากับ 1.82 และ 5.77 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 5.3) และมีค่ากิจกรรมจากเอนไซม์เซลลูเลส เท่ากับ 6.05 และ 1.73 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 5.4) ซึ่งจากผลการศึกษาเชื้อ Chanthaburi3 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแอกติโนมัยซีทอีก 8 ไอโซเลท นั้นบ่งบอกถึงว่าเชื้อแอกติโนมัยซีท Chanthaburi3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์เซลลูเลส จากการศึกษาของพัฒนา ศิลปะชัย และคณะ (2560) พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีททะเล RY3-37 ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนแม่น้ำพังราด จังหวัดระยอง สามารถ ผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ได้ดีที่สุด และจากงานวิจัยของรัตนารักษ์ ศรีวิบูลย์ (2558) ที่ได้ศึกษาลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีท RY3-37 พบว่าเชื้อนี้อยู่ในจีนัส *Micromonospora* ซึ่งจีนัสนี้สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ และอีกทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ และจากการศึกษาของ Gulve and Deshmukh (2011) ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนจากชายฝั่ง Konkan ของรัฐมหาราษฏระ ประเทศอินเดีย พบเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวนถึง 65 ไอโซเลท และ 34 ไอโซเลท จากเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งหมด 107 ไอโซเลท ที่ตรวจพบกิจกรรมของอะไมเลส และเซลลูเลส ตามลำดับ



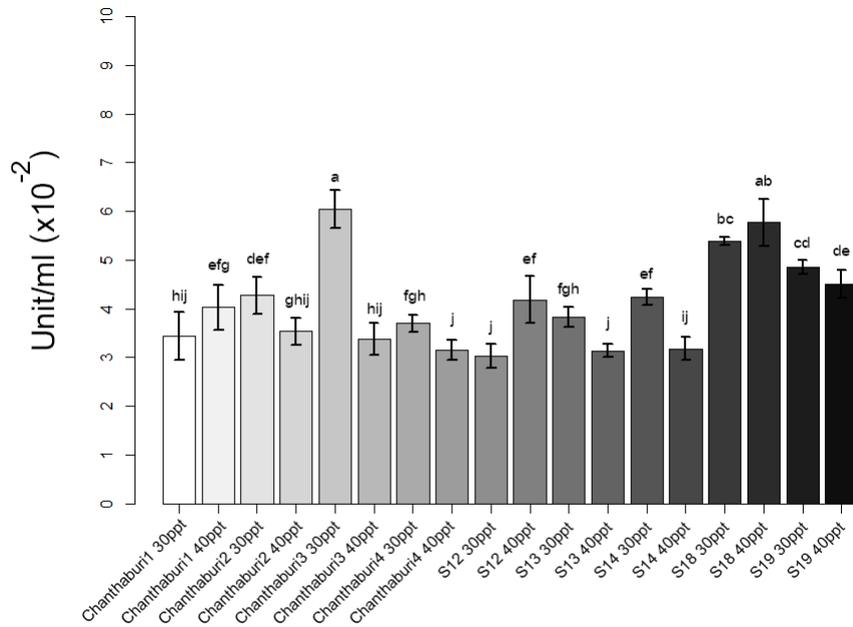
ภาพที่ 5.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



ภาพที่ 5.2 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)



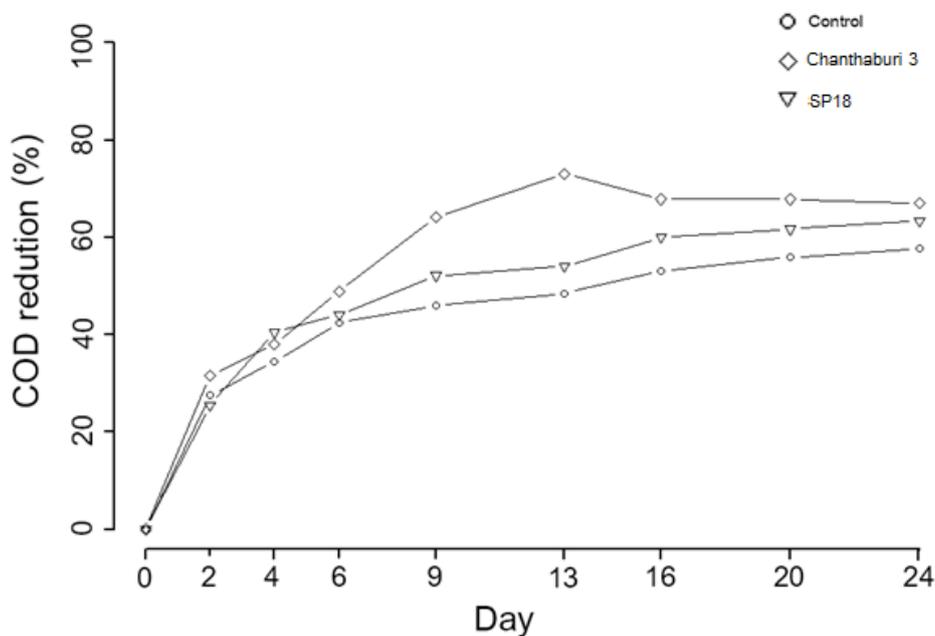
ภาพที่ 5.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



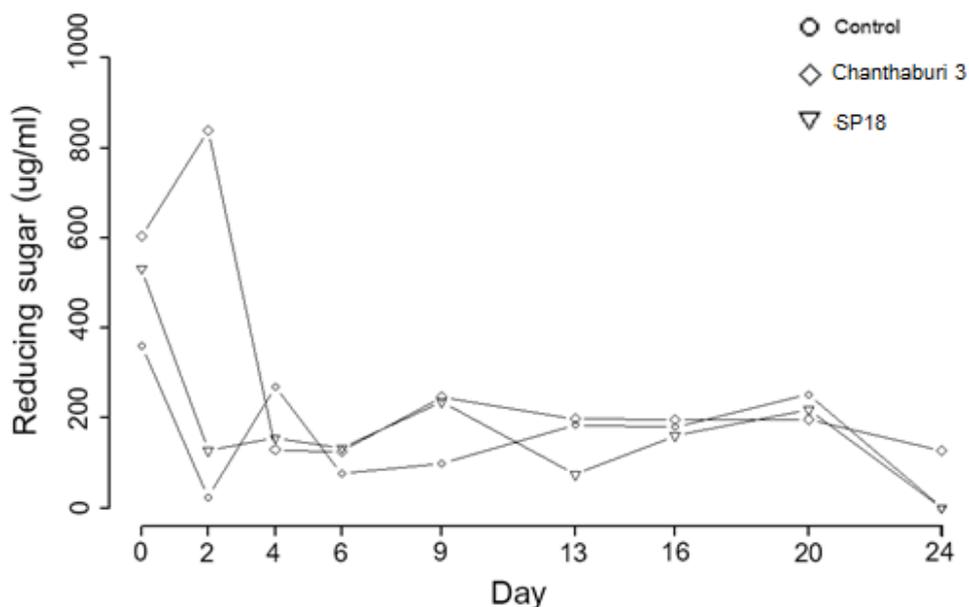
ภาพที่ 5.4 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส(หน่วย/มิลลิลิตร)

#### 5.1.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัด COD ของแอกติโนมัยซีท โดยวัดอัตราการลดลงของ COD

จากผลการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ดี จำนวน 9 ไอโซเลท พบว่าเชื้อ Chanthaburi3 และ S18 มีความสามารถในการย่อยสลายได้ดีที่สุด จึงนำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทมาศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็ม โดยการวัดอัตราการลดลงของ COD โดยน้ำเสียที่นำมาศึกษามีค่า COD เริ่มต้นเฉลี่ยของทุกชุดการทดลอง เท่ากับ 121,333 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าในช่วงวันที่ 0-4 ไม่พบความแตกต่างของการลดลงของร้อยละ COD เนื่องจากเชื้ออยู่ในระยะพักตัว หลังจากนั้นช่วงวันที่ 6 เป็นต้นไป พบว่าเชื้อ Chanthaburi3 มีความแตกต่างของการลดลงของร้อยละ COD ซึ่งมีค่าการลดลงของร้อยละ COD สูงสุดในวันที่ 13 ของการทดลอง วันที่ 16-24 พบว่าการลดลงของ COD เริ่มคงที่ (ภาพที่ 5.5) และในช่วงวันที่ 2-6 พบการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงว่าเชื้อมีการนำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย (ภาพที่ 5.6) การศึกษาของเอกอนงค์ คงแก้ว (2558) ทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีททนเค็มสำหรับบำบัด COD ในน้ำเสียที่มีความเค็ม แตกต่างกัน 3 ระดับ พบว่าความเค็ม 30 ppt พบว่ามีอัตราการบำบัด COD มากที่สุด อยู่ที่ 34.5% ในวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของพัฒน์ ศิลปะชัย (2560) พบว่าเชื้อ RY3-37 มีระยะพักตัวของเชื้อในช่วงวันที่ 1-2 ของการทดลอง มีอัตราการลดลงของ COD มากที่สุดในช่วงวันที่ 6-9 ของการทดลอง และพบว่าสามารถกระตุ้นให้เชื้อมีการบำบัด COD เพิ่มขึ้นเมื่อเติมเกลือให้ได้ความเค็ม 17 ppt และมีอัตราการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าชุดควบคุม ในช่วงวันที่ 2-7 ของการทดลอง



ภาพที่ 5.5 อัตราการลดลงของ COD (%)



ภาพที่ 5.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

## 5.2 สรุปผล

5.2.1 สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือได้จำนวน 4 ไอโซเลท และใช้ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีทจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จำนวน 5 ไอโซเลท พบว่าทั้ง 9 ไอโซเลท มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสเตรตไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้

5.2.2 คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 2 ไอโซเลทมาศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย ด้วยการวัดอัตราการลดลงของ COD พบว่าเชื้อ Chanthaburi3 สามารถลดค่า COD ได้ร้อยละ 73.04 ในวันที่ 13 ของการทดลอง

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ทดลองใช้แอคติโนมัยซีท Chanthaburi3 กับแหล่งน้ำเสียประเภทอื่นๆ ที่มีความเค็ม เช่น โรงงานผลิตแอมโมเนีย ปะหัง โรงงานผลิตน้ำปลา โรงงานผลิตซีอิ๊ว เป็นต้น

5.3.2 ศึกษาเพิ่มเติมด้านชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้

5.3.3 เลือกช่วงเวลาฤดูกาลในการเก็บตัวอย่าง ควรเลือกในช่วงฤดูที่เหมาะสมเนื่องจากการศึกษาทำการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูมรสุมทำให้สามารถคัดแยกเชื้อได้ในจำนวนน้อย

## บรรณานุกรม

- กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. (2555). *ความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียในดิน*. สาขาวิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- จามจุรี เกตุบัวขาว. (2555). *การคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากมูลสัตว์เพื่อใช้ในการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตร*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- จิตติมา เจริญพานิช. (2553). *เอนไซม์วิทยา (พิมพ์ครั้งที่ 2)*. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- จิรพรรณ ใจอินผล. (2550). *การคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากดินในถ้ำน้ำลอดที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของฟังไจ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา. (2546). *เชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชยาภรณ์ เขียนนอก (2559). *การใช้แอกติโนมัยซีทที่แยกจากป่าชายเลนเพื่อบำบัดซีโอดีในน้ำเค็มความเค็มแตกต่างกัน*. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ชัยสิทธิ์ นิยะสม, วิชุดา เกตุใหม่ และสมพงศ์ โอทอง (2556). *การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพของเกษตรกรในจังหวัดพัทลุง และการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับพัฒนาเป็นหัวเชื้อเพื่อการผลิตปุ๋ย*. สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง.
- ดารีกา วสุนธรากุล. (2552). *การสำรวจความหลากหลายของกลุ่มแบคทีเรียและแอกติโนมัยซีทในปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- นฤมล เกื้อนกุล. (2550). *การศึกษาการใช้สารสีจากแอกติโนมัยซีทเพื่อเป็นสีย้อมในห้องปฏิบัติการชีววิทยา*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.
- ปวีณา สุขสะอาด และคณะ. (2557). *แอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ*. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50: สาขาวิทยาศาสตร์, สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, หน้า 164-171.
- ปราณี อานแป๊ะ. (2558). *เอนไซม์ทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ. (2553). *จุลินทรีย์ทางการค้าในกระบวนการบำบัดน้ำเสียโรงงานปลาป่น*. ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พัฒน์ ศิลปะชัย และคณะ (2560). *การศึกษากิจกรรมไฮโดรไลติกเอนไซม์จากแอกติโนมัยซีททะเลเพื่อบำบัดซีโอดีในน้ำเสียจากโรงงานแป้งมัน*. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานพนธ์. (2546). *ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส*. วันที่ค้นข้อมูล 9 กรกฎาคม 2559, เข้าถึงได้จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1174/amyaseอะไมเลส>

- รัตน์ภรณ์ ศรีวิบูลย์. (2548). การเก็บรวบรวมและตรวจหาแอกติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. (2553). *Streptomyces* spp: แบคทีเรียคุณค่าสงจากธรรมชาติ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และหน่วยความร่วมมือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพ แห่งมหาวิทยาลัยมหิดล และมหาวิทยาลัยโอซาก้า (MU-OU:CRC) คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วิทยา เพียรวิจิตร. (2525). เทคโนโลยีการกำจัดน้ำเสีย. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.
- สาวิณี หมวกยม (2558). ประสิทธิภาพการบำบัดซีโอดีของแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากร่องน้ำทิ้งฟาร์มกุ้ง. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สุภาพร พงศ์ธรพฤษ์. (2549). การศึกษาทดลองบำบัดน้ำเสียในแหล่งน้ำเสียของมหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์โดยใช้น้ำสกัดชีวภาพ และพืชน้ำ. สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์.
- เอกอนงค์ คงแก้ว (2558). ประสิทธิภาพของแอกติโนมัยซีททนเค็มสำหรับบำบัดซีโอดีในน้ำเสียที่มีความเค็ม. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อรุณ ชานูชัยเชาว์วิวัฒน์. (2558). ยีสต์และเทคโนโลยีของยีสต์. กรุงเทพฯ: ก้าวไทยแอดแอดเวอร์ไทซิง.
- อนุพันธ์ อธิรัตน์ และคณะ. (2545). น้ำเสียชุมชนและระบบบำบัดน้ำเสีย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- Bradford, M.M. (1976). *Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Emad, M. (2011). Prospects of effective microorganism's technology in wastes treatment in Egypt. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5, 243-248.
- Fatemeh, M. and Joachim, W. (2016). Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity. *Frontiers Microbiol.* 6:1514.
- Gulve, R. M. and Deshmukh, A. M. (2011). Enzymatic activity of actinomycetes isolated from marine sediments, *Science and Technology*, 3(5): 80-83.
- Hozzein. N., Ahmed, M. and Tawab, M. (2012). Efficiency of some actinomycete isolates in biological treatment and removal of heavy metals from wastewater. *Riyadh. Saudi*. 11, 1163-1168.
- Lacey, J. (2009). Actinomycetes in Composts. Annual Agriculture and Environment. *Academic Press. San Diego*. 2, 50-58.
- McCarthy, A.J.: & Williams, S.T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment a review. *Gene* 115: 189-192.
- Ruan, J.S. (1994). Rapid isolation and identification of actinomycetes in Southeast Asia Regional Training Workshop on Rapid Method Microbiology and Biotechnology. *Bangkok*. 9, 19-28.

- Tchobanoglous, G., Theisen, H. (2004). Actinomycetes. Engineering Principles and Management Issues. *McGraw Hill*. 13, 19-28.
- Vobis, G. (1981). Sporangiate Actinoplaneten Actinomycetales micrtaro aquatischen Lebenszyklus. *Forum Mikrobiol.* 11, 416-424.
- Waksman, S.A. and Lechevalier, M.A. (1967). *The Actinomycetes: A Summary of Current Knowledge*. The Ronald Press Company. New York. 250 p.
- Wendisch K., Rainey, F. and Kroppenstedt, R. (1989). *Thermocrispum* gen. nov. a new genus of the order Actinomycetales, and description of *Thermocrispum municipale* sp. nov. and *Thermocrispum agreste* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 45, 67-77.
- Wildermuth, H. (1970). Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Applied Microbiology.* 60, 43-50.
- Wood, T.M. and Bhat, K.M. (1988). Methods of measuring cellulase activities. *Methods in Ezymology.*, 160: 87-117.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร International Streptomyces Project Agar (ISP2 Agar) ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร

Yeast Extract	4	กรัม
Malt Extract	10	กรัม
Glucose	4	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม

ปรับความเป็นกรด – ต่างให้เท่ากับ 7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหาร Carboxymethyl cellulose Agar (CMC Agar) ต่อปริมาตรน้ำ 1

Carboxymethyl cellulose	5	กรัม
Yeast Extract	1	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3	กรัม
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5	กรัม
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
ZnSO <sub>4</sub>	0.001	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรด – ต่างให้เท่ากับ 7

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหาร Carboxymethyl cellulose Broth (CMC Broth) ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร

Carboxymethyl cellulose	5	กรัม
Yeast Extract	1	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3	กรัม
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5	กรัม
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
ZnSO <sub>4</sub>	0.001	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรด – ต่างให้เท่ากับ 7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหาร Oatmeal yeast extract และ carboxy methyl cellulose (OYC) ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร

Oatmeal	10	กรัม
Carboxymethyl cellulose	2	กรัม
Yeast extract	4	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 30 ppt ปริมาตร 1 ลิตร และนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Dinitrosalicylic acid reagent (DNS) (Wood and Bhat, 1988)

Dinitrosalicylic acid ( $C_7H_4N_2O_7$ )	10	กรัม
Phenol ( $C_6H_5OH$ )	2	กรัม
Sodium sulfite ( $Na_2SO_3$ )	0.5	กรัม
Potassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ )	200	กรัม
2% (w/v) NaOH	500	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

ภาคผนวก ข

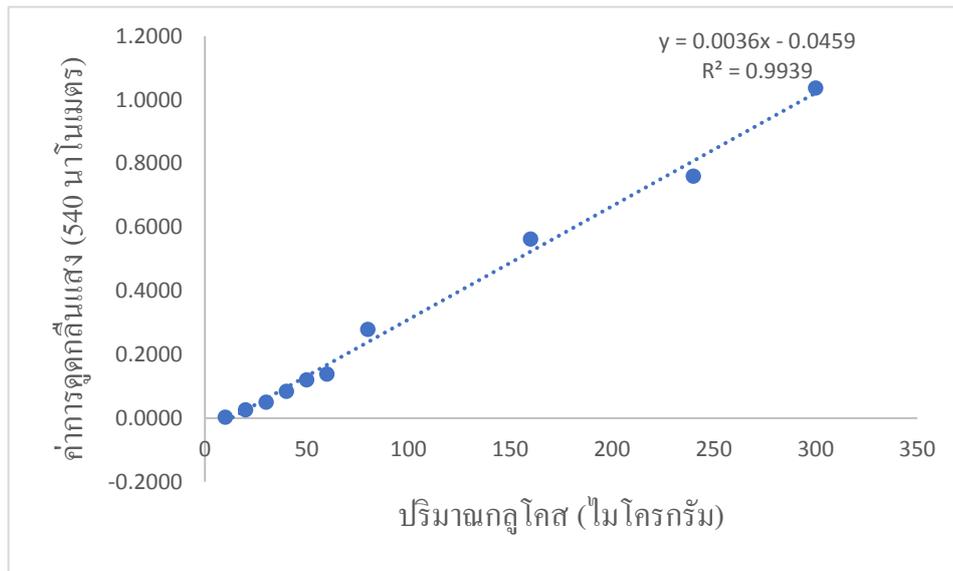
วิธีการวิเคราะห์และกราฟมาตรฐาน

## 1. การเตรียมกราฟมาตรฐาน Reducing sugar และการวิเคราะห์หาปริมาณ Reducing sugar ใน supernatant ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (Wood and Bhat, 1988)

1. เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 0.001 กรัม และ 0.005 กรัม ตามลำดับ ละลายในน้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 17 ppt 1 มิลลิลิตร
2. นำสารละลายกลูโคสที่เตรียมไว้ นำไปเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นต่างๆ ตามตารางที่ 1
3. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลทที่ค่าความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสง ในเชิงสมการเส้นตรงเพื่อใช้หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง
5. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างโดยใช้ supernatant 60 ไมโครลิตร ผสมกับ Dinitrosalicylic acid 60 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ลบค่าของ blank (0.075) ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ปริมาณกลูโคส ( $\mu\text{g}$ )	สารละลายกลูโคส 1 mg / ml ( $\mu\text{l}$ )	สารละลายกลูโคส 5 mg / ml ( $\mu\text{l}$ )	น้ำทะเล ( $\mu\text{l}$ )	ค่าการดูดกลืน แสง (540 nm)
10	10	-	50	0.003
20	20	-	40	0.026
30	30	-	30	0.050
40	40	-	20	0.085
50	50	-	10	0.121
60	60	-	-	0.139
80	-	16	44	0.279
160	-	32	28	0.563
240	-	48	12	0.761
300	-	60	-	1.038
ตัวอย่าง		60	-	



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

## 2. การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีนและการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใน supernatant ด้วยวิธีการของ แบริดฟอร์ด (Bradford, 1976)

### ก) การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

1. เตรียม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA โดยชั่ง Bovine serum albumin (BSA) 0.0100 กรัม ละลายใน 0.01 M PBS ประมาณ 8 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้ BSA ละลายแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. เตรียม 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 100 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. เตรียม 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 500 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4. เตรียม 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 500 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5. เตรียม 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 500 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6. เตรียม 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 500 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

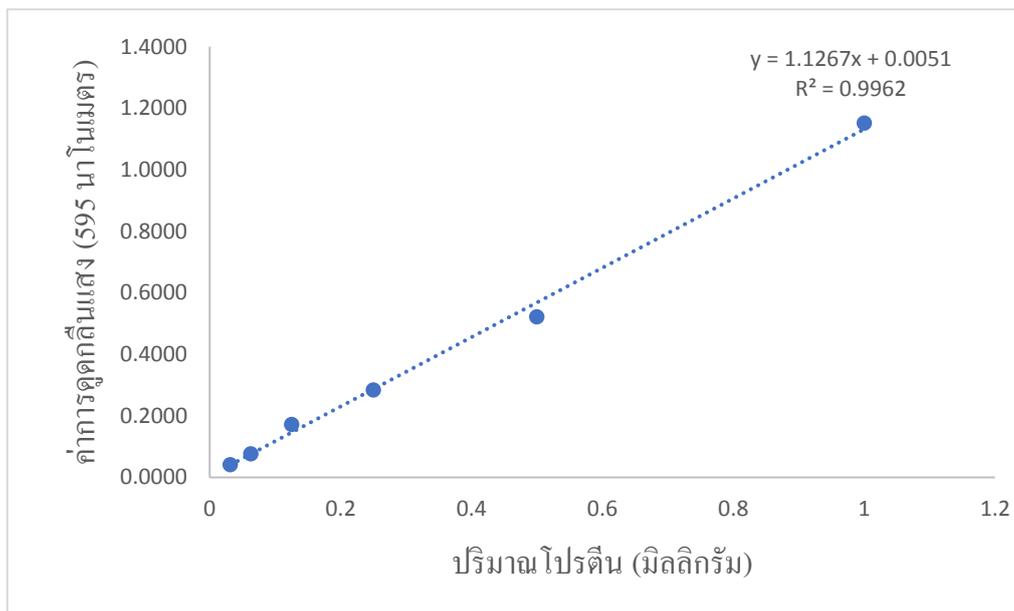
7. เตรียม 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 500 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

### ข) การสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปตโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมนลงในไมโครเพลท เติม Dye reagent ที่เจือจางอัตราส่วน 1 : 4 (Dye reagent : น้ำ) ลงในไมโครเพลท ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

### ค) การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปต Supernatant ที่ผ่านการ Centrifuge ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมนลงในไมโครเพลท เติม Dye reagent ที่เจือจางอัตราส่วน 1 : 4 (Dye reagent : น้ำ) ลงในไมโครเพลท ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานโปรตีน

### 3. การวิเคราะห์ค่า COD วิธีรีฟลักซ์แบบปิด/การติเตรท (ไพทอริย์ หมายมั่นสมสุข, 2553)

#### ก) การเตรียมสาร

1. น้ำย่าย่อยสลายสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium Dichromate Digestion Solution) ความเข้มข้น 0.0167 โมลาร์

ซึ่งสารมาตรฐานปฐมภูมิ (primary standard) โพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium Dichromate) หนัก 4.913 กรัม ซึ่งถูกทำให้แห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง (Desiccator) ใส่ลงไปใต้น้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 167 มิลลิลิตร เติมนอร์ควิควิลล์เฟด 33.3 กรัม คนให้ละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเจือจางให้มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

## 2. กรดซัลฟิวริกรีเอเจนต์

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Silver Sulfate;  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ) จำนวน 5.5 กรัมต่อกรดซัลฟิวริก (Sulfuric Acid) จำนวน 1 กิโลกรัม หรือ ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต จำนวน 22 กรัมในกรดซัลฟิวริก 4.0 กิโลกรัม โดยต้องใช้เวลาในการละลายนาน 1 - 2 วัน แต่ถ้าต้องการละลายให้เร็วขึ้นก็อาจจะใช้วิธีการกวนอย่างต่อเนื่องซึ่งวิธีนี้จะสามารถละลายซิลเวอร์ซัลเฟตได้ภายในเวลา 30 นาที

## 3. เฟอโรอิน อินดิเคเตอร์

ละลาย 1,10 - Phenanthroline Monohydrate ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) หนัก 1.48 กรัมและ Ferrous Sulfate Heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) หนัก 0.7 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วทำให้เจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตหรือสารละลายมาตรฐานไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous Ammonium Sulfate; FAS) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต [ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ] 39.2 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร สารละลายนี้ต้องเทียบมาตรฐานกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้ในการย่อยสลายทุกครั้งที่จะนำมาใช้

## 5. กรดซัลฟามิก

เพื่อแก้สารแทรกสอดเนื่องจากไนไตรต์ในตัวอย่างน้ำ โดยใช้กรดซัลฟามิก (Sulfamic Acid) 10 มิลลิกรัม เพื่อกำจัดไนไตรต์ทุกๆ 1 มิลลิกรัม โดยใช้ภาชนะย่อยสลายก่อนที่จะนำไปรีฟลักซ์

## 6. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทและ/หรือสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท (Potassium Phthalate;  $\text{HCOOC}_6\text{H}_4\text{COOK}$ ) ซึ่งอบให้แห้งจนน้ำหนักคงที่แล้วที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส หนัก 425 กรัมในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะมีค่าซีไอดี 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ในทางทฤษฎีโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทมีค่าซีไอดี 1.176 มิลลิกรัมออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ต่อมิลลิกรัม

ละลายกลูโคส หนัก 469 มิลลิกรัมในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะมีค่าซีไอดี 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ในทางทฤษฎีกลูโคส มีค่าซีไอดี 1.067 มิลลิกรัมออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ต่อ มิลลิกรัม

## ข) วิธีการหาความเข้มข้นของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous Ammonium Sulfate)

เติมสารเคมีตามตารางในภาชนะย่อยสลาย แต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วไทเทรตด้วยเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous Ammonium Sulfate) ใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 0.05 - 0.1 มิลลิลิตร ทำประมาณ 1 - 2 หลอด ไทเทรต จนถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

**ตารางที่ 1** แสดงปริมาตรของตัวอย่างและสารละลายอื่นๆที่ต้องใช้ในการหาค่าซีโอดี

Sample size (mL)	Std. Dichromate 0.0417 M (mL)	Sulfuric Acid Reagent (mL)	HgSO <sub>4</sub> (g)	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (M)	Final Volume (mL)
10	5	15	0.2	0.05	70
20	10	30	0.4	0.10	140
30	15	45	0.6	0.15	210
40	20	60	0.8	0.20	280
50	25	75	1.0	0.25	350

### ค) การคำนวณ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) คำนวณได้จากสมการ

$$M_f = (6V_p M_p) / V_f$$

เมื่อ  $M_f$  = ความเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นโมลาร์

$V_f$  = ปริมาตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นมิลลิลิตร

$V_p$  = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้เป็นมิลลิลิตร

$M_p$  = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตเป็นโมลาร์

### ง) วิธีการวิเคราะห์

- ล้างหลอดย่อยสลาย (Digestion Tubes) และฝาจุกด้วยกรดซัลฟิวริก ร้อยละ 20 ก่อนนำไปใช้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์
- เลือกใช้ปริมาตรของตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม ตามตารางที่ 2

#### หมายเหตุ

ในกรณีที่ใช้น้ำย่าย่อยสลายสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium Dichromate Digestion Solution) ความเข้มข้น 0.0167 โมลาร์ ค่าซีโอดีของตัวอย่างน้ำ ควรอยู่ระหว่าง 50 – 400 มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร ถ้าตัวอย่างน้ำมีค่าซีโอดีมากกว่านี้จะต้องทำการเจือจางตัวอย่างน้ำนั้นก่อน เพื่อให้ตัวอย่างน้ำที่เจือจางแล้วมีซีโอดีอยู่ในช่วงของการวิเคราะห์

การปิเปตตัวอย่างน้ำในปริมาณน้อยๆควรใช้ความระมัดระวังอย่างมากเนื่องจากอาจเกิดความผิดพลาดได้ง่าย วิธีที่อาจจะนำมาใช้เพื่อแก้ปัญหานี้ คือการชั่งรีเอเจนต์และตัวอย่างรวมทั้งสารละลายอื่นๆ ที่ใช้แทนการปิเปตโดยต้องคำนวณหาความหนาแน่นของสารละลายหรือรีเอเจนต์ที่ใช้ หรืออาจจะใช้ไมโครปิเปตแทนก็ได้

- นำตัวอย่างน้ำมาใส่หลอดย่อยสลายหรือแอมพูลที่เตรียมไว้ เติมสารละลายที่ใช้ในการย่อยสลายซึ่งได้แก่ สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต
- ค่อยๆเทกรดซัลฟิวริกหรือเจเนตลงไปในหลอดโดยให้กรดซัลฟิวริกหรือเจเนตไหลลงก้นหลอดแก้ว เพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ใต้ชั้นตัวอย่างน้ำและน้ำย่าย่อยสลาย
- ปิดจุกหลอดแก้วให้แน่นหรือถ้าใช้แอมพูลก็ให้เชื่อมให้สนิท แล้วคว่ำหลอดแก้วไปมาหลายๆครั้งเพื่อผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึง

## ข้อควรระวัง

- ในขณะที่ผสมในภาชนะให้ใส่หน้ากากป้องกัน (face shield) และให้ใส่ถุงมือเพื่อป้องกันความร้อนด้วย
- ต้องผสมของผสมให้เข้ากันให้ดีก่อนนำไปรีฟลักซ์ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความร้อนสะสมอยู่เฉพาะที่กันหลุด เพราะอาจทำให้ระเบิดได้

6. นำหลอดทดลองเหล่านี้ไปใส่ในเครื่องย่อยสลาย (block digestion) หรือเตาอบ (Hot Air Oven) ซึ่งได้ทำให้ร้อนถึงอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ก่อน ใช้เวลารีฟลักซ์นาน 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องโดยนำหลอดทดลองมาวางไว้ใน test tube rack (ที่วางหลอดทดลอง)

หมายเหตุ ฝาจุกของหลอดทดลองที่อาจเกิดการชำรุดในขณะที่ทำการย่อยสลายในเตาอบ จะทำให้เกิดการปนเปื้อนและทำให้มีการสูญหายของสารอินทรีย์ได้ ดังนั้นจึงควรที่จะต้องระมัดระวังสำหรับการย่อยสลายในเตาอบจะใช้อุณหภูมิที่  $150 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7. เปิดฝาจุก แล้วจึงใส่แท่งแม่เหล็กที่หุ้มด้วยทีเอฟอี (TFE- coated Magnetic bar) ถ้าใช้แอมพูลให้เทของผสมลงในภาชนะที่ใหญ่กว่าเพื่อนำไปไทเทรต เติมเพอโรอินอินดิเคเตอร์ 0.05 - 0.1 มิลลิลิตร (1 หรือ 2 หยด) คน โดยใช้เครื่องกวนชนิดใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) อย่างเร็วในขณะที่ไทเทรตด้วย 0.1 โมลาร์เพอร์สแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous Ammonium Sulfate) จุดยุติจะเปลี่ยนอย่างรวดเร็วจากฟ้าอมเขียวเป็นน้ำตาลแดง ถึงแม้บางครั้งสีฟ้าอมเขียวอาจจะกลับมาให้เห็นอีกในระยะเวลาอันสั้นก็ตาม ให้ถือว่าจุดยุติอยู่ที่สีน้ำตาลแดงครั้งแรก

8. ด้วยวิธีทำเช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ โดยการรีฟลักซ์น้ำกลั่น (blank) แล้วไทเทรตแบลนด์ซึ่งมีรีเอเจนต์และปริมาตรน้ำกลั่นเท่ากับปริมาตรของตัวอย่างน้ำที่ใช้

9. ด้วยวิธีทำเช่นเดียวกันแต่ใช้สารละลายซีโอติมาตรฐานแทนตัวอย่างน้ำ โดยใช้รีเอเจนต์ต่างๆ เหมือนกับที่ใช้กับตัวอย่างน้ำ แล้วคำนวณหาค่าซีโอติเพื่อตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์ว่าถูกต้องหรือไม่

**ตารางที่ 2** ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่างๆของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย

ขนาดของภาชนะย่อยสลาย	ตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)	สารละลายในการย่อยสลาย (มิลลิลิตร)	กรดซัลฟิวริกรีเอเจนต์ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)
<u>หลอดย่อยสลาย</u>				
16 x 100 มม.	2.5	1.5	3.5	7.5
20 x 150 มม.	5.0	3.0	7.0	15.0
25 x 150 มม.	10.0	6.0	14.0	30.0
<u>แอมพูลมาตรฐาน</u>				
10 มม.	2.5	1.5	3.5	7.5

### การคำนวณหาซีโอดี

$$\text{COD} = (A-B)(8000M)/C$$

เมื่อ COD = ค่าซีโอดี หน่วยเป็นมิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร

A = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการติเตรทแบลงค์  
หน่วยเป็นมิลลิลิตร

B = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการติเตรทตัวอย่าง  
หน่วยเป็นมิลลิลิตร

M = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตหน่วยเป็นโมลาร์

C = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ หน่วยเป็นมิลลิลิตร