สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการบำบัดน้ำเสียของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* กับเชื้อ *Bacillus subtilis*

T040054

นางสาวอรษา อยู่บัว

นางสาวอรุณวดี ธนวิภารัตน์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 40054
วัน, เดือน, ปี 24 ก.ค. 2544

.b.....
.i.....

ลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Comparative efficiency of wastewater treatment by *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillis subtilis*

Miss Orasa Yubua

Miss Arunwadee Thanavipharat

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Major of Environmental Resource Chemistry

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการบำบัดน้ำเสียของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* กับ *Bacillus subtilis*

โดย นางสาวอรษา อยู่บัว

นางสาวอรุณวดี ธนวิภารัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ยุพา ตันทวี

ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

---------- หัวหน้าภาควิชาเคมี

(ผศ.ดร. สมศักดิ์ วรมังคลชัย)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

---------- ประธานกรรมการ

(ผศ. นงนุช เภตรานุวัฒน์)

---------- กรรมการ

(อาจารย์สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล)

---------- กรรมการ

(ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล)

---------- กรรมการ

(อาจารย์ยุพา ตันทวี)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการบำบัดน้ำเสียของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* กับ *Bacillus subtilis*
นักศึกษา	นางสาวอรษา อยู่บัว นางสาวอรุณวดี ธนวิภารัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ยุพา ตันทวี ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล
ภาควิชา	เคมี
สาขา	เคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2543

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการบำบัดน้ำเสียของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* กับ *Bacillus subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า ซีโอดีอยู่ในช่วง 1,000 – 1,300 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งสองในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* และ *Bacillus subtilis* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 และ 14 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความสามารถในการบำบัดน้ำเสียของจุลินทรีย์ทั้งสอง โดยแปรค่าพีเอชเป็น 3 ,4 , 5 , 6 และ 7 พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* เจริญได้ดีที่สุดในน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอช 5.0 คือมีความหนาแน่นของเซลล์ในรูปความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.1560 ขณะเดียวกันสามารถลดค่าไนโตรเจน , ฟอสเฟตและซีโอดีลงได้ร้อยละ 53.19 , 35.65 และ 72.61 ตามลำดับ ในขณะที่ *Bacillus subtilis* เจริญได้ดีที่สุดในน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอช 7.0 คือ มีความหนาแน่นของเซลล์ในรูปความขุ่นที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรเป็น 0.0945 สามารถลดค่าไนโตรเจน , ฟอสเฟตและซีโอดีลงได้ร้อยละ 40.0 , 36.67 และ 53.72 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Comparative efficiency of wastewater Treatment by *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis*
Name	Miss Orasa Yubua Miss Arunwadee Thanavipharat
Special Project Advisor	Mrs. Yupa Tantawee Asst.Prof Duangjai Ochaikul
Department	Chemistry
Major	Environmental Resource Chemistry
Academic Year	2000

Abstract

In this project, the comparative efficiency of wastewater treatment by *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis*. The concentrations of COD in synthetic wastewater were between 1000-1300 mg/l. Optimum growth time for *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis* were studied for 24 hours. *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis* were found that optimum time was 18 and 14 hours, respectively. When the pH of synthetic wastewater was studied by adjusted pH to range 3 – 7. The result showed that at pH 5.0 was the best condition for *Saccharomyces cerevisiae*. Optical density (OD,660 nm) was 0.1560 and the removal of Nitrogen, Phosphate and Chemical Oxygen Demand (COD) were 53.19%, 35.65%, and 72.61%, respectively. Whereas *Bacillus subtilis* was found that at pH 7.0 was the best condition. Optical density (OD,595 nm) was 0.0945 and the removal of Nitrogen, Phosphate and Chemical Oxygen Demand (COD) were 40.0%, 36.67% and 53.72%, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ผู้ทำโครงงานพิเศษขอขอบพระคุณ

อาจารย์ ยุพา ตันทวี ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ที่กรุณาให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือในการดำเนินโครงงานพิเศษนี้มาโดยตลอด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้อีกท่านหนึ่ง ที่เอื้อเฟื้อเชื้อยีสต์สำหรับการทดลอง ตลอดจนคำแนะนำอื่นๆ ที่ทำให้โครงงานสำเร็จได้ในที่สุด

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี ที่อำนวยความสะดวกในการเบิกจ่ายเครื่องมือ, อุปกรณ์ และสารเคมี

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ, อุปกรณ์ และสารเคมี

เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาเคมีที่ให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายขอขอบคุณบิดา มารดา และคนในครอบครัวทุกคน ที่คอยช่วยเหลือดูแลเอาใจใส่และให้กำลังใจตลอดมา

อรษา อยู่บัว

อรุณวดี ธนวิภารัตน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วารสารปริทัศน์	2
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย	5
1.4 ขอบเขตของโครงงานวิจัย	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงงานวิจัย	5
1.6 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	6
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
2.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับยีสต์	7
2.2 ลักษณะทั่วไปของ *Saccharomyces cerevisiae*	15
2.3 การใช้ยีสต์ในทางอุตสาหกรรม	18
2.4 การหาความหนาแน่นของเซลล์ยีสต์โดยวัดความขุ่น	21
2.5 การวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดจากปริมาณไนโตรเจน	21
2.6 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์	22
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสีย	23
2.8 เมตาบอลิซึมภายในเซลล์ยีสต์	25
2.9 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับแบคทีเรีย	36
2.10 การจำแนกประเภทของแบคทีเรีย	37
2.11 แบคทีเรียสกุล Bacillus	40
2.12 การเจริญของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ	41
2.13 องค์ประกอบสำคัญที่มีผลต่อการตายของจุลินทรีย์	44
2.14 ระบบบำบัดน้ำเสีย Activated Sludge	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 การวิจัยและการดำเนินงาน	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	46
3.2 แหล่งที่มาของตัวอย่างน้ำเสีย	47
3.3 การวางแผนการทดลอง	48
3.4 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น (starter)	49
3.5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์	49
3.6 การทดลองแบบเป็นครั้ง	49
3.7 การตรวจวิเคราะห์	50
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* และเชื้อ *B. subtilis*	57
4.2 การศึกษาผลของค่าพีเอชในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีต่อค่าการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* และ *B. subtilis* รวมทั้งค่า COD และปริมาณสารอินทรีย์ที่ลดลง	60
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	68
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	70
ภาคผนวก ข ข้อมูลการทดลอง	73
เอกสารอ้างอิง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 สัณฐานวิทยาของยีสต์มีความแตกต่างกัน 8

รูปที่ 2.2 แสดงยีสต์ที่กำลังแตกหน่อสร้างเซลล์ลูกใหม่ซึ่งเกิดในเวลาประมาณ 30 นาที ถ่ายภาพแต่ละภาพห่างกัน 10 นาที 9

รูปที่ 2.3 *Saccharomyces cerevisiae* แสดงให้เห็นหน่อ (bud) และร่องรอยของหน่อ (bud scar) (ลูกศรชี้) (x 1,600) 10

รูปที่ 2.4 แสดงยีสต์ *Schizosaccharomyces octosporus* ที่แบ่งเซลล์ตามขวาง 11

รูปที่ 2.5 วงจรชีวิตของ *Saccharomyces cerevisiae* a และ α 11

รูปที่ 2.6 วงจรชีวิต *Schizosaccharomyces* การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดโดยการแบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 (binary fission) 12

รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะของ *S.cerevisiae* ที่มีอายุ 3 วันในอาหาร malt extract 15

รูปที่ 2.8 แสดงการเจริญของยีสต์ในอาหาร yeast extract-glucose agar medium 16

รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะเซลล์แม่เกิดการ budding เกิดหน่อของเซลล์ลูก 16

รูปที่ 2.10 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงยีสต์ ที่อุณหภูมิ 25°C 17

รูปที่ 2.11 ขั้นตอนการผลิตยีสต์ที่ใช้ทำขนมปังทางการค้า 20

รูปที่ 2.12 การหาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 22

รูปที่ 2.13 แผนภูมิเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ยีสต์ ยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน 27

รูปที่ 2.14 วิถีไกลโคลิซิส 30

รูปที่ 2.15 วัฏจักรเครบส์ 32

รูปที่ 2.16 แผนภูมิการหายใจ 33

รูปที่ 2.17 รูปร่างและลักษณะการรวมตัวของแบคทีเรีย 37

รูปที่ 2.18 กราฟการเจริญของจุลินทรีย์ในการเลี้ยงแบบแบตช์ 43

รูปที่ 2.19 ลักษณะการตายของจุลินทรีย์ 44

รูปที่ 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ 53

รูปที่ 3.2 การเลี้ยงเชื้อบนเครื่องการเขย่า 53

รูปที่ 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อหลังนำไปปั่นเหวี่ยง 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.4 กล้าเชื้อเริ่มต้น 54

รูปที่ 3.5 น้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชต่างๆ 55

รูปที่ 3.6 น้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัดด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 55

รูปที่ 3.7 น้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* 56

รูปที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ของค่า OD ที่เวลาต่างๆของ ยีสต์ *S. cerevisiae* 59

รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ของค่า OD ที่เวลาต่างๆของแบคทีเรีย *B. subtilis* 59

รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ หลังการบำบัดที่พีเอชต่างๆ 60

รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์หลังการบำบัดที่พีเอชต่างๆ 61

รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *S.cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชต่างๆ 62

รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *B. subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชต่างๆ 63

รูปที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงของ *S.cerevisiae* และ *B. subtilis* ที่พีเอชต่างๆ 63

รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณฟอสเฟตที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *S.cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชต่างๆ 64

รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณฟอสเฟตที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *B. subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชต่างๆ 65

รูปที่4.10 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟตที่ลดลงของ *S.cerevisiae* และ *B. subtilis* ที่พีเอชต่างๆ 65

รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณซีโอดีที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *S.cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชต่างๆ 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณซีโอดีที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *B. subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชต่างๆ 67

รูปที่ 4.13 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณซีโอดีที่ลดลงของ *S. cerevisiae* และ *B. subtilis* ที่พีเอชต่างๆ 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงยีสต์ 14

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อ *S. cerevisiae* อายุ 24 ชั่วโมง 17

ตารางที่ 2.3 ผลผลิตจากยีสต์ 18

ตารางที่ 2.4 แสดงความแตกต่างระหว่างสปอร์ กับเวเจตเททีฟเซลล์ 39

ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เวลาต่างๆ 57

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* ที่เวลาต่างๆ 58

ตารางสรุปผลการทดลอง 68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันมีอุตสาหกรรมผลิตอาหารและเครื่องดื่มเกิดขึ้นจำนวนมาก ซึ่งในระหว่างกระบวนการผลิตจะมีของเหลือทิ้งออกมากับน้ำเสียโดยน้ำเสียส่วนใหญ่ที่ออกมาจากอุตสาหกรรมเบียร์ อุตสาหกรรมขนมปัง อุตสาหกรรมผลิตนมเนย น้ำเชื่อม อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ และอุตสาหกรรมเครื่องปรุงอาหารอื่นๆ พบว่ามีปริมาณสารอินทรีย์อยู่สูง เช่นโรงงานผลิตสุรามีค่า COD เท่ากับ17,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า BOD_5 เท่ากับ 9,520 มิลลิกรัมต่อลิตร (Vu Anh-Tuan,1976) ถ้าปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมจะทำให้เกิดปัญหาด้านมลภาวะ และเกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและระบบนิเวศน์ ดังนั้นจึงได้นำน้ำทิ้งส่วนนี้มาใช้เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ซึ่งนอกจากจะลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมแล้วยังสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น โดยผลิตในรูปโปรตีนเซลล์เดียว เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนเสริมในอาหารสัตว์ สำหรับการบำบัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียอุตสาหกรรมทั่วไปนิยมใช้ระบบตะกอนเร่งที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ แต่พบว่าแบคทีเรียมีขนาดเล็กอยู่ในช่วง 1 ถึง 10 ไมโครเมตร (นงลักษณ์ และปรีชา ,2539) จึงทำให้การจมตัวเกิดขึ้นได้ช้าประสิทธิภาพในการกำจัดไม่สูง ดังนั้นจึงหันมาให้ความสนใจในการนำเอาเซลล์ยีสต์มาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากโดยทั่วไปขนาดเซลล์ยีสต์จะใหญ่กว่าแบคทีเรียคือมีความกว้างและความยาวอยู่ในช่วง 1 ถึง 5 และ 5 ถึง 30 ไมโครเมตร ตามลำดับ (นงลักษณ์ และปรีชา,2539) จึงเกิดการจมตัวได้ดีนอกจากนี้เซลล์ยีสต์ยังมีลักษณะแข็งแรงทนทานต่อภาวะต่างๆ ไม่ต้องการสารอาหารซับซ้อนและพบทั่วไปในอุตสาหกรรม หากทำการเปรียบเทียบวิธีการบำบัดโดยใช้ยีสต์กับแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในระบบตะกอนเร่งพบว่าค่าใช้จ่ายในด้านการติดตั้งระบบและด้านการบำรุงรักษาต่ำ สามารถบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณของของแข็ง ซัลไฟด์ oil และ grease สูงๆ ได้ดี ไม่เกิด bulking ตกตะกอนได้ดีและง่ายต่อการควบคุมการเดินระบบ(Nishihara,2000)

จากรายงานการวิจัยการบำบัดน้ำเสียจากโรงสุราโดยใช้ Torula yeasts (Vu Anh – Tuan ,1976)และการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิต Pepsi – Cola โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Torula Utilis* (Tan Tong Choon,1976) พบว่ายีสต์มีความสามารถในการลดค่า COD ได้ 80 % และ 95% ตามลำดับ ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการนำเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มาใช้ในการลดค่า COD และองค์ประกอบอื่นๆในน้ำเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วารสารปริทัศน์

Nolte และคณะ (1942) ศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์และการผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำเสียที่ได้จากอุตสหกรรมผลิตน้ำผลไม้พบว่า เซลล์ยีสต์ที่ผลิตได้เฉลี่ยได้เป็น 46 % และ Torula yeast เป็นยีสต์ที่เหมาะสมที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆเนื่องจากให้ผลผลิตและโปรตีนสูงและใช้เวลาสั้นในการเกิดการหมักอย่างสมบูรณ์

Peterson และคณะ (1945) ได้รายงานผลของงานวิจัยที่ทำที่ U.S. Forest lab .ซึ่งทำการหมักของเหลวที่ได้จากกระบวนการ hydrolysis เนื้อไม้ 13 ชนิด แบบเป็นครั้ง โดยทำการทดสอบกับยีสต์ 9 ชนิดพบว่า *Torula Utilis* NO.3 ,*Candida Tropicalis* และ *Mycotorula Lipolytica p.13* เป็นยีสต์ที่เหมาะสมในการหมัก การทำให้ยีสต์คุ้นเคยกับน้ำตาลที่ได้จากการใช้กรดย่อยเนื้อไม้ (wood sugar) มีผลทำให้ผลผลิตยีสต์ที่ได้เพิ่มขึ้นซึ่งองค์ประกอบในด้านอุณหภูมิ พีเอช อัตราการเติมอากาศ เวลาในการหมัก และปัจจัยอื่นๆนั้นมีผลต่อการผลิตเซลล์ยีสต์

Kurth (1946) ศึกษาการเจริญของยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Torula Utilis NO 3* , *Mycotorula Lipolytica p.13* และ *Hansenula Suaveolens Y838* ในน้ำเสียจากการผลิตแอลกอฮอล์จากเนื้อไม้พบว่า Toruls yeast ที่ผลิตได้อาจจะใช้น้ำตาลมากเกิน 50% นอกจากนี้ต้องพิจารณาถึงตัวแปรต่างๆรวมถึง สารอาหารอนินทรีย์,การเติมอากาศ ,พีเอชเริ่มต้น , ขนาดของเชื้อ ,ความเข้มข้นของ Reducing sugar และอุณหภูมิของอาหารซึ่งในจำนวนที่กล่าวมาการเติมอากาศเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุด มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของยีสต์และการใช้น้ำตาล

Harris และคณะ (1948) ศึกษาการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ Torula ในของเหลวที่ได้จากกระบวนการ Hydrolysis เนื้อไม้และน้ำตาลส่วนที่ไม่สามารถหมักได้ที่เหลือหลังจากการหมักแอลกอฮอล์ โดยในการทดลองแบบเป็นครั้งความเข้มข้นของน้ำตาลจะถูกแปรค่าอยู่ในช่วง 10,000 –20,000 มก./ล.สำหรับของเหลวที่ได้จากกระบวนการ Hydrolysis เนื้อไม้และ 500 – 10,000 มก. /ล. สำหรับน้ำตาลส่วนที่ไม่สามารถหมักได้ พบว่าความเข้มข้นที่ 10,000 มก ./ ล. และ 6,700 มก ./ล. ตามลำดับ เหมาะสมมากที่สุด และพีเอชเพิ่มขึ้นระหว่างการเจริญเติบโตเนื่องจากมีการใช้กรดอินทรีย์และความเป็นกรดที่ต้องการทำให้พีเอชอยู่ในช่วง 5 ถึง 5.5 ในการทดลองแบบต่อเนื่องจะแปรค่าอัตราการเจือจางพบว่ายีสต์จะเจริญอย่างรวดเร็วที่พีเอช 6 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เข้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มายังถังหมักเป็น 46,000มก ./ล. เวลาที่อยู่ในระบบเป็น 2.5 ชั่วโมง และ 200 ถึง 250 ลูกบาศก์ฟุตของอากาศต่อน้ำหนักของยีสต์ อุณหภูมิในการทดลองอยู่ในช่วง 29 °C ถึง 30°C

Inskeep และคณะ (1951) ;Holderby และ Moggio(1960) รายงานถึงเทคนิคในการผลิตยีสต์แห้งจากสารอาหารประเภทซัลไฟด์ พบว่า reducing sugar 15,000มก ./ล. ที่ 80 °C (26.6°F) ถูกป้อนเข้าถังหมัก Waldhof ที่มี holding time 4 ชั่วโมงอัตราการเติมอากาศเข้าถังหมัก 1,700 ลูกบาศก์ฟุตต่อนาที มี $(NH_4)_2HPO_4$ และ KCl เป็นสารอาหารจะทำให้การเพาะพันธุ์ยีสต์เกิดขึ้นได้ดี น้ำที่ผ่านการบำบัดมีค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบน้ำตาลที่หมักได้เท่ากับ 2,000 มก./ล.และลดค่า BOD ได้ 65 %

Wasserman และคณะ (1958) ได้ใช้การขยายพันธุ์และการเจริญของ *Saccharomyces fragilis* ในโรงงานสุราเพื่อที่จะศึกษาถึงผลของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส พีเอชเริ่มต้นที่มีต่อการเจริญของยีสต์ พบว่าค่า พีเอชเริ่มต้นควรมีค่าอยู่ระหว่าง 5 ถึง 5.7 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ผลผลิตสูงสุด และปริมาณของเชื้อมีความสำคัญมากและมีผลต่อการลดเวลาของการหมักลง นอกจากนี้ Wasserman ได้วิเคราะห์ความต้องการออกซิเจนโดยอาศัยการเจริญของยีสต์พบว่าคาร์โบไฮเดรต 35% จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และพลังงานดังนั้นการเติมออกซิเจนจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการออกซิเดชั่นสารประกอบอินทรีย์ และกลไกของยีสต์

Milbury และคณะ (1968) ได้ศึกษาการบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมของกระบวนการผลิตธัญพืช โดยใช้ยีสต์ในระบบตะกอนเร่ง ซึ่งการทดลองยีสต์ที่เลือกใช้คือ Torula yeast เนื่องจากมันเจริญได้อย่างรวดเร็ว ในส่วนของระบบถังเติมอากาศและถังตกตะกอนที่ใช้มีขนาด 15 ลิตร และ 4.5 ลิตร ตามลำดับซึ่งอากาศจะถูกเติมโดยการปั่นกวนและผสมด้วยแท่งแม่เหล็ก เวลาที่อยู่ในระบบจะแปรค่าจาก 6 ถึง 10 ชั่วโมง อัตราการหมุนเวียนกลับเป็น 25 % ของอัตราที่ป้อนเข้าและอัตราการทิ้งตะกอนเป็น 1 % ของปริมาตรของถังเติมอากาศ ผลการทดลองพบว่า พีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4 ถึง 5 เมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 22 °C ถึง 30 °C

Stokes(1971) ได้ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของยีสต์พบว่ายีสต์จะสามารถเจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิแคบๆ ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ เอนไซม์ในเซลล์จะไม่ปกติเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นถึงขีดจำกัดสูงสุดซึ่งก่อนหน้าของการเกิดผลของการไม่เป็นปกติของเซลล์จะ ปรากฏ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างชัดเจน การเพิ่มอุณหภูมิจะเพิ่มอัตราการเกิดเมแทบอลิซึมและเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตซึ่ง ยีสต์จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วมากเมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง20 ถึง 35 องศาเซลเซียส การทดลอง เพื่อดูการขยายพันธุ์ของยีสต์ในน้ำเสียอุตสาหกรรมเป็นตัวกลางในการแพร่พันธุ์ โดยจะทำการเดิน ระบบในช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 34 องศาเซลเซียส (Rose,1961)

Thanh และ Simard (1973) ศึกษาการบำบัดทางชีวภาพของน้ำเสียชุมชนโดยใช้ Torula Yeast พบว่ากลูโคสเป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญของยีสต์และผลของอุณหภูมิ และ พีเอชของอาหารจะมี ความสำคัญมากในการลดไนโตรเจน และฟอสเฟตในน้ำเสียชุมชน หลังจากนั้น Thanh และWu (1975) ได้ศึกษาการบำบัดน้ำเสียของโรงงานมันสำปะหลังโดยใช้ Torula yeast พบว่าสามารถลด ค่า COD ได้ 75 % เมื่อเดินระบบที่พีเอช 3.5 ถึง 4 เป็นเวลา 24 ชั่งโมง

Wanpen (1975) ศึกษาการเจริญของ *Saccharomyces paplis* และ *Candida utilis* ในน้ำเสีย จากการผลิตเนย พบว่าสามารถกำจัด COD ได้ 80 % และ 53 % หลังจากการเติมอากาศ 96 ชั่วโมงโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces fragilis* และ *Candida utilis* ต่อปริมาณน้ำเสีย 5% W/V

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. ศึกษาความสามารถในการนำยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* มาใช้ในการลดปริมาณสารอินทรีย์ ในน้ำเสีย
2. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Bacillus subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์
3. ศึกษาผลของค่าพีเอช ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีต่อค่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Bacillus subtilis*

1.4 ขอบเขตของโครงงานวิจัย

1. ศึกษาความสามารถในการนำยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* กับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* มาใช้ในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียสังเคราะห์
2. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Bacillus subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่เวลาต่างๆ
3. ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความสามารถในการบำบัดด้วยยีสต์และแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยแปรค่าพีเอช เป็น 3, 4, 5, 6, และ 7
4. ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการบำบัดน้ำเสียของ *Saccharomyces cerevisiae* กับ *Bacillus subtilis* ในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียสังเคราะห์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงงานวิจัย

1. แนวทางในการศึกษาการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ด้านการลดมลภาวะให้กับสิ่งแวดล้อม ซึ่งน่าจะมีประโยชน์และเป็นพื้นฐานต่อการวิจัยในอนาคต
2. เป็นการพัฒนาของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมให้มีมูลค่าสูงขึ้น และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดและกำจัดมลภาวะแวดล้อมอีกทางหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาวิจัย
2. ทำการศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการ
3. สรุปผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการศึกษาทดลอง
4. เขียนรายงานและเสนอการศึกษาวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับยีสต์

ยีสต์หมายถึงราที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งตัว (fission) เนื่องจากเป็นเซลล์เดี่ยวจึงเจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าเชื้อราที่เป็นเส้นสาย และมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่า เนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่าและแตกต่างไปจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ เพราะมีขนาดใหญ่กว่า และสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันด้วย

มียีสต์อยู่ปริมาณ 350 สปีชีส์ แยกเป็นจีนัสต่างๆ ได้ปริมาณ 39 จีนัส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นแล้ว จะเห็นว่าการแบ่งหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของยีสต์มีน้อยมาก เนื่องจากสาหร่าย แบคทีเรียและโพรโทซัว มีหลายพันธุ์สปีชีส์

ยีสต์เกี่ยวข้องกับมนุษย์มาเป็นเวลาหลายศตวรรษ โดยมีบทบาทเกี่ยวการหมักน้ำผลไม้ การทำให้ขนมปังขึ้นฟู ทำให้อาหารบางชนิดมีคุณค่าทางอาหาร ในปัจจุบันยีสต์ยิ่งมีความสำคัญมากขึ้น เพราะใช้ในการกระบวนการหมักต่างๆ การสังเคราะห์ เช่น วิตามิน ไขมัน และ โปรตีน จากน้ำตาลอย่างง่ายและแอมโมเนียมไนโตรเจน นอกจากนี้ยังใช้ยีสต์เพื่อการศึกษาชีวเคมีพื้นฐานและกระบวนการทางเมแทบอลิซึมของยูคาริโอติกเซลล์อย่างไรก็ตามมียีสต์บางชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับพืชและสัตว์ และทำความเสียหายให้แก่อาหาร เสื้อผ้า และวัสดุอื่นๆ

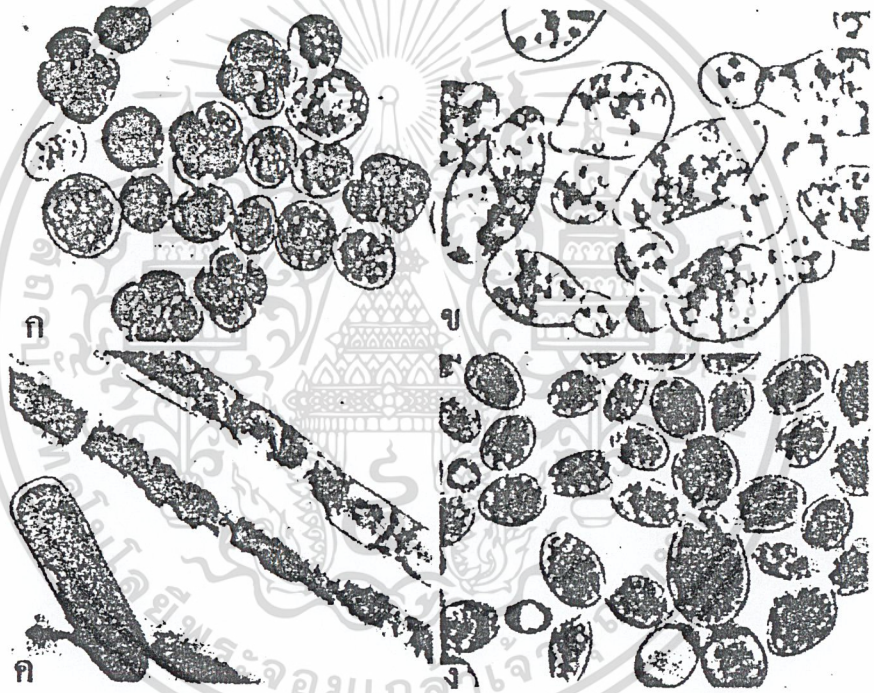
2.1.1 นิเวศวิทยาของยีสต์ (Ecology of Yeasts)

จากการสำรวจยีสต์ พบว่า ยีสต์สามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมทุกชนิดทั้งน้ำจืด น้ำเค็ม ปากอ่าว และพบมากที่สุดที่ชายฝั่งเนื่องจากมีสารอาหารสะสมมาก อย่างไรก็ตามก็ยังพบยีสต์ในกลางมหาสมุทรที่มีความลึก 4,000 เมตร ในทะเลดำจำนวนยีสต์มีมากที่ระดับ 1,000 เมตรแรกของระดับน้ำ แต่ยิ่งลึกลงไปจะพบยีสต์เพียง 25% อาจเนื่องจากความเข้มข้นของออกซิเจนลดลง และมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนซัลไฟด์มาก ในทะเลสาบออนตาริโอพบยีสต์ได้ทั้งในน้ำ และในตะกอนดิน จำนวนยีสต์จะแตกต่างไปตามความลึกอาจเนื่องจากปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจนและไนเตรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 สัณฐานวิทยาของยีสต์ (Morphology of Yeasts)

โดยทั่วไปขนาดเซลล์ยีสต์ใหญ่กว่าแบคทีเรีย แต่ยีสต์ที่ขนาดเล็กที่สุดก็ยังไม่ใหญ่เท่าแบคทีเรียใหญ่ที่สุด ขนาดของยีสต์แตกต่างกันตั้งแต่ ความกว้าง 1-5 ไมโครเมตร และความยาว 5-30 ไมโครเมตร หรือมากกว่า มักมีรูปไข่ แต่บางชนิดมีรูปร่างยาวและบางชนิดเป็นทรงกลม ดังรูปที่ 2.1 ยีสต์แต่ละชนิดจะมีรูปร่างโดยเฉพาะ แม้จะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ก็ยังมีความแตกต่างที่ขนาดและรูปร่างของแต่ละเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุและสภาพแวดล้อม ยีสต์ไม่มีแฟลกเจลลาหรืออวัยวะอื่นในการเคลื่อนที่



รูปที่ 2.1 สัณฐานวิทยาของยีสต์มีความแตกต่างกัน(ที่มา :นงลักษณ์ และ ปรีชา,2539)

ก. *Saccharomyces cerevisiae* แสดงทั้งเวเจเตตีฟเซลล์ เซลล์กำลังแตกหน่อ และเอสโคสปอร์ (x 73)

ข. *Saccharomyces ludwigii* (ประมาณ x 110)

ค. *Geotrichum candidum* (ประมาณ x 110)

ง. *Pichia membranaefasiens* (x 88)

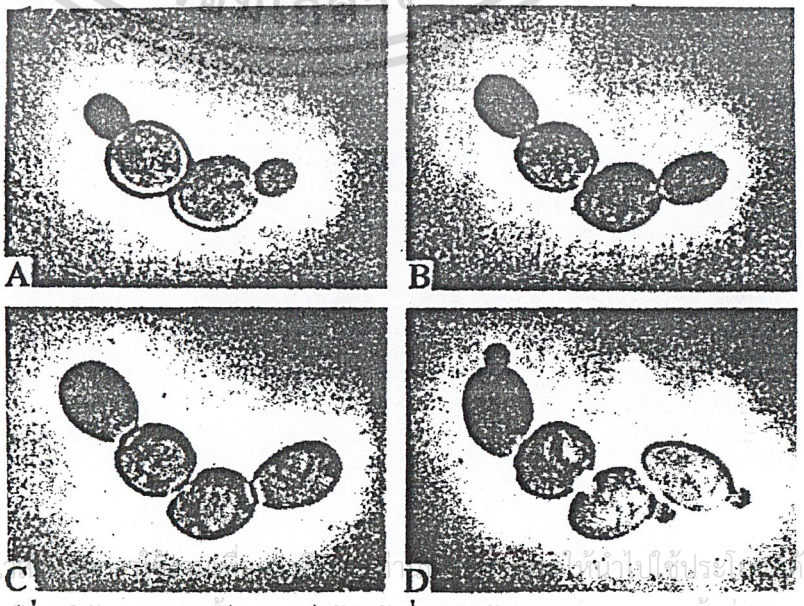
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ลักษณะของเชื้อ (Cultural Characteristics)

ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมโคโลนีของยีสต์มีขนาด รูปร่าง และโครงสร้างแตกต่างกัน เช่นเดียวกับแบคทีเรีย บางชนิดอาจมีโคโลนีเรียบ บางชนิดย่น ขรุขระ บางชนิดแบนราบหรือนูนสูงขึ้น บางชนิดขอบเรียบ บางชนิดขอบไม่แน่นอนหรือคล้ายเส้นขน โคโลนีอายุน้อยมีความหนืดคล้ายแป้งเปียก เมื่ออายุมากขึ้นจะยิ่งหนาและแห้งมากขึ้น และอาจสร้างรงควัตถุด้วย การเจริญในอาหารเหลวมีลักษณะสำคัญ บางชนิดเจริญที่ก้นหลอดและตกตะกอน บางชนิดเจริญอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งหลอด บางชนิดเจริญเฉพาะผิวหน้าอาหาร เป็นแผ่นหรือฟิล์มปกคลุม

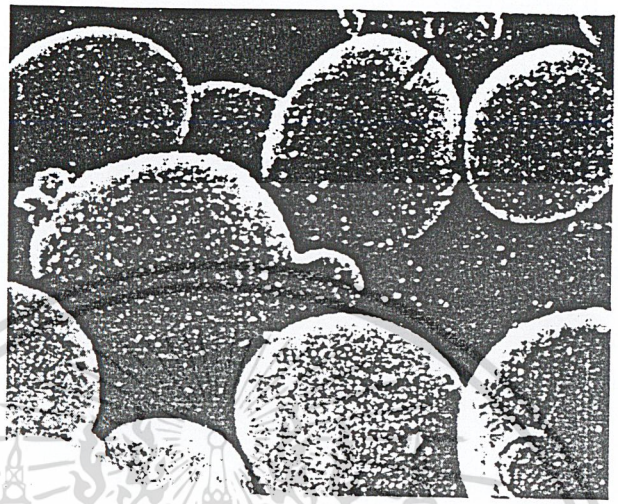
2.1.4 การสืบพันธุ์ของยีสต์ (Reproduction of Yeasts)

ยีสต์อาจสืบพันธุ์โดยสร้างสปอร์ แตกหน่อ หรือแบ่งตัว ส่วนใหญ่เป็นการแตกหน่อ ดังรูปที่ 2.2 โดยมีการส่งท่อออกจากนิวเคลียร์แวคิวโอล ซึ่งใกล้กับนิวเคลียร์ของเซลล์พ่อแม่เดิม ชี้ออกไปที่ผนังเซลล์ที่ใกล้กับแวคิวโอลมากที่สุด ที่ผิวนอกของเซลล์จะมีส่วนยื่นออกไปเป็นตุ่ม ซึ่งเกิดจากผนังเซลล์ตรงนั้นอ่อนแอลง ท่อนั้นจะผ่านเข้าสู่ส่วนที่ยื่นซึ่งจะขยายใหญ่ออก และบรรจุสารของนิวเคลียสและไซโทพลาซึมจากเซลล์พ่อแม่เดิม ผนังเซลล์ของหน่อ (bud) จะมีสารที่สร้างขึ้นใหม่ เมื่อหน่อใหญ่เท่าเซลล์พ่อแม่แล้ว องค์ประกอบของนิวเคลียสของเซลล์ทั้งสองจะจัดเรียงตัวใหม่เพื่อให้เซนโตรโซมของแต่ละเซลล์อยู่ไกลจากจุดที่เซลล์ติดกันอยู่ หลังจากการแบ่งนิวเคลียสสิ้นสุดลงจะมีผนังกั้นเกิดขึ้นเพื่อแยกเซลล์พ่อแม่เดิมกับหน่อใหม่ออกจากกันถึงแม้ว่าหน่ออาจติดอยู่กับเซลล์เดิม และมีการสร้างหน่อใหม่อีกก็ตาม ในช่วงชีวิตยีสต์ที่เจริญเต็มที่อาจแตกหน่อได้โดยเฉลี่ย 24 เซลล์ การแตกหน่อจะเกิดขึ้นที่ตำแหน่งต่างๆของผิวเซลล์ และมีการแตกหน่อ (birth scar หรือ bud scar) ติดอยู่กับเซลล์แม่ซึ่งเป็นผลจากการแบ่งเซลล์โดยการแตกหน่อ ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.2 แสดงยีสต์ที่กำลังแตกหน่อสร้างเซลล์ลูกใหม่ซึ่งเกิดในเวลาประมาณ 30 นาที ถ่ายภาพแต่ละภาพห่างกัน 10 นาที(ที่มา:นงลักษณ์ และปรีชา,2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



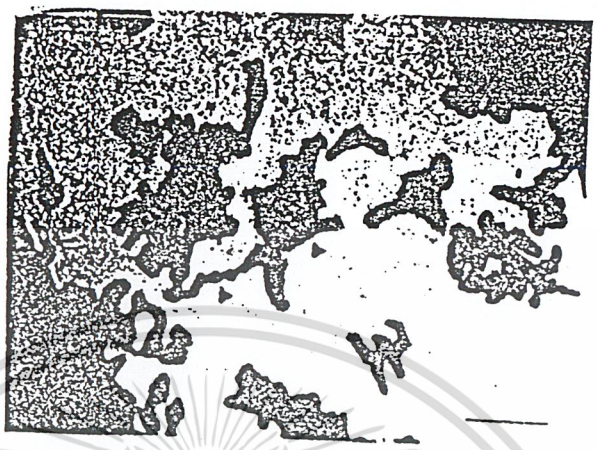
รูปที่ 2.3 *Saccharomyces cerevisiae* แสดงให้เห็นหน่อ (bud) และร่องรอยของหน่อ (bud scar) (ลูกศรชี้) (x 1,600) (ที่มา : นงลักษณ์ และปรีชา ,2539)

การแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสอง เป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งคล้ายกับการสืบพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยเซลล์ยีสต์จะบวมขึ้นหรือยืดยาวออก เกิดการแบ่งนิวเคลียร์ และแบ่งเป็นสองเซลล์ เช่น *Schizosaccharomyces* สืบพันธุ์โดยการแบ่งตัวตามขวาง ในขณะที่เกิดการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เซลล์อาจจะแบ่งโดยไม่แยกออกจากกัน ทำให้เซลล์ติดต่อกันเป็นสายโซ่ยาว ดังรูปที่ 2.4 และ 2.6

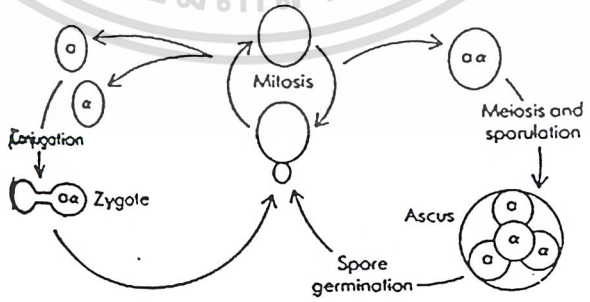
การสืบพันธุ์อีกวิธีหนึ่ง คือ การแตกหน่อและแบ่งตัว (bud-fission) ซึ่งมีทั้งวิธีแตกหน่อและแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสองรวมกัน พบใน *Saccharomycodes* และ *Nadsonia* หน่อจะเกิดขึ้นที่ขั้วหนึ่งของเซลล์ แล้วมีผนังกั้นระหว่างเซลล์พ่อแม่กับเซลล์ลูก

การสร้างสปอร์ โดยทั่วไปหมายถึงการสร้างสปอร์เพศ เช่น แอสโคสปอร์ (รูปที่ 2.5 และ 2.6) หรือเบสิดิโอสปอร์ นิวเคลียร์ของสปอร์เหล่านี้เกิดจากการแบ่งตัวแบบไมโอซิส ส่วนการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น โคนิเดีย อาร์โธรโคนิเดีย บลาสโตโคนิเดีย บัลลิสโตสปอร์ และแคลมิโดโคนิเดีย มีนิวเคลียสที่เกิดจากการแบ่งตัวไมโทซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

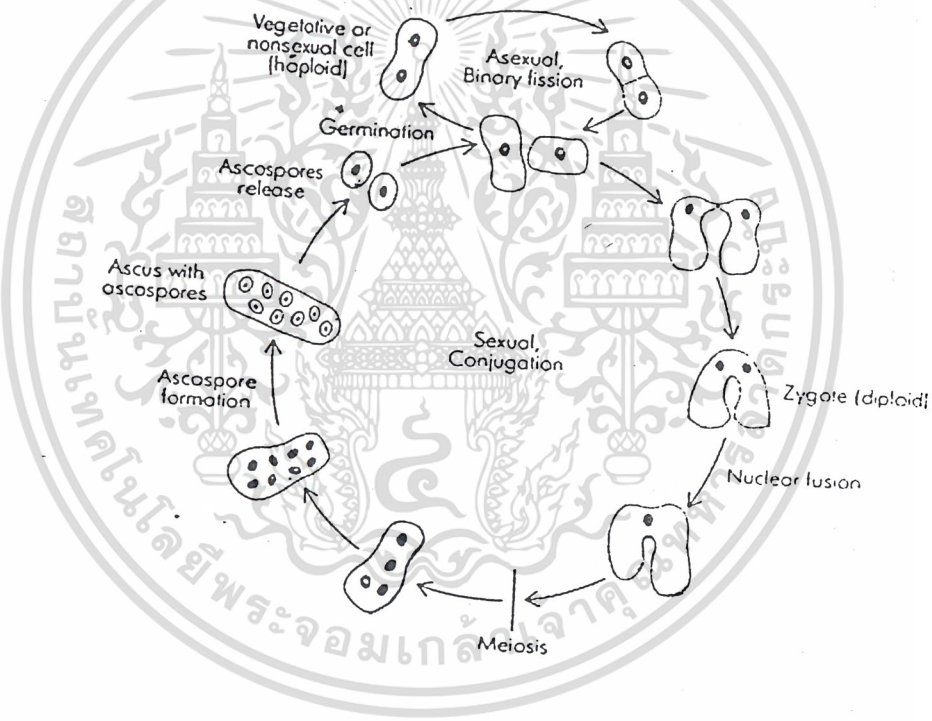


รูปที่ 2.4 *Schizosaccharomyces octosporus* เป็นยีสต์ที่แบ่งเซลล์ตามขวางในภาพสามารถเห็นเวเจเททีฟเซลล์รวมทั้งแอสโคสปอร์ ในแอสคัส (ลูกศรชี้) 1 ขีดเท่ากับ 10 ไมโครเมตร (ที่มา : นงลักษณ์และปรีชา ,2539)



รูปที่ 2.5 วงจรชีวิตของ *Saccharomyces cerevisiae* a และ α หมายถึงอัลลีลในการผสมพันธุ์ (mating type alleles)เซลล์ที่ไม่ได้บอกไว้อาจเป็น a , α หรือ aα(ที่มา : นงลักษณ์และปรีชา ,2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 วงจรชีวิตของ *Schizosaccharomyces* การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดโดยการแบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 (binary fission) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยวิธี คอนจูเกชันของเซลล์ที่มาเข้าคู่กันและสร้างแอสโคสปอร์(ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเพียงครึ่งเดียว)(ที่มา : นงลักษณ์ และปรีชา ,2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 สรีรวิทยาของยีสต์ (Physiology of Yeasts)

ในพวกยีสต์พบว่าปฏิกิริยาทางสรีรวิทยาแตกต่างกันเช่นเดียวกับสัณฐานวิทยาและกลไกการสืบพันธุ์ การย่อยสลายน้ำตาล เช่น กลูโคสอาจเกิดในลักษณะไม่ใช้ออกซิเจน(กระบวนการหมัก) หรือแบบใช้ออกซิเจน(การหายใจ) กระบวนการที่เป็นแบบฉบับ(typical) มากที่สุดคือการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนหรือที่รู้จักกันว่า กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งผลผลิตสุดท้ายจะได้เอทิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

ในสภาพที่มีออกซิเจนในกระบวนการหายใจ จะเกิดออกซิเดชันกลูโคสอย่างสมบูรณ์ จนได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ถ้าเกิดออกซิเดชันไม่สมบูรณ์จะได้กรดและสารตัวกลางอื่นๆ ผลผลิตที่มีความสำคัญได้แก่ แอลกอฮอล์ กรด เอสเทอร์ กรีเซอรอล และอัลดีไฮด์ ก่อนที่ยีสต์จะเกิดกระบวนการหมักได้ สารโมเลกุลใหญ่ เช่น ได- ไตร- และพอลิแซ็กคาไรด์จะต้องถูกย่อยด้วยเอนไซม์(ไฮโดเลส) ชนิดของเอนไซม์ไฮโดเลสแตกต่างไปตามจีนัสและสปีชีส์ของยีสต์ ซึ่งใช้สมบัตินี้ในการแยกความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยีสต์ยังมีเอนไซม์อื่นๆ เช่น แล็กเทส อินเวอร์เทส และคาตาเลสซึ่งมีความสำคัญทางการค้า

ในทำนองเดียวกัน ในกระบวนการหายใจยังมีความแตกต่างของสารประกอบที่จะถูกย่อยโดยยีสต์ชนิดต่างๆ ยีสต์บางชนิดสามารถใช้เพนโทส (ดี-ไซโลส ดี-ไรโบส) พอลิแซ็กคาคาไรด์ (แป้ง) น้ำตาลแอลกอฮอล์ (แมนนิทอล ซอร์บิทอล) กรดอินทรีย์ เช่น กรดแล็กติก กรดอะซิติก กรดซิตริก และสารอินทรีย์อื่นๆ

ยีสต์ได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อนำไปสร้างโปรตีน และยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียไอออนได้ ความสามารถในการใช้ไนเตรตและไนไตรต์ และสามารถดึงหมู่อะมิโนออกจากกรดอะมิโน ช่วยแยกความแตกต่างของยีสต์แต่ละสายพันธุ์หรือแต่ละสปีชีส์ได้

ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปซัลเฟต หรือสารอินทรีย์ซัลเฟอร์ เช่น ซีสเทอีน หรือเมทิโอนีน แร่ธาตุอื่นๆที่ยีสต์ต้องการเพื่อการเจริญ ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม สารที่ต้องการในปริมาณเล็กน้อย (trace element) คือ โบรอน ทองแดง สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ไอโอดีน และโมลิบดีนัม เพื่อให้ยีสต์เจริญเติบโตมากที่สุด

ยีสต์พวกที่ชอบแรงดันออสโมซิสสูง (osmophilic yeast) สามารถเจริญอยู่ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูงๆได้ โดยมีความชื้นจำกัด

ยีสต์สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0 ถึง 47 องศาเซลเซียส บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้ อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมสำหรับยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ที่ 20-30 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ก่อโรคเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส

โดยทั่วไปยีสต์เจริญดีที่สุดในอาหารที่มีความเป็นกรดระหว่าง pH 3.5 ถึง 3.8 ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียส่วนใหญ่

การเลี้ยงยีสต์ในห้องทดลอง โดยใช้ก๊าซออกซิเจนเพื่อเร่งการเจริญเติบโต อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เช่น อาหารวุ้นแข็ง (nutrient agar) และอาหารเหลว (nutrient broth) สามารถใช้เลี้ยงยีสต์ได้ อาหารที่ใช้แยกยีสต์ คือ 5% มอลต์เอกซ์แทรกซ์อะการ์ (5% maltextract agar) อาหารชนิดอื่นๆ คือ วิคเกอร์แฮม มีเดียม (Wickerham' s medium) ดังตารางที่ 2.1 และอาหารที่เตรียมจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ผลไม้และผัก ทำให้ยีสต์เจริญได้ดีด้วย

ตารางที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงยีสต์

อาหารวิคเกอร์แฮม

องค์ประกอบของอาหาร	เปอร์เซ็นต์
มอลต์เอกซ์แทรกต์	0.3
ยีสต์เอกซ์แทรกต์	0.3
เพปโทน	0.5
กลูโคส	1.0
วุ้น	2.0

อาหารกระตุ้นการสร้างสปอร์ (sporulation medium)

องค์ประกอบของอาหาร	ปริมาณ
โซเดียมอะซีเตต (แอนไฮดรัส)	0.5 กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	1.0 กรัม
วุ้น	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ลักษณะทั่วไปของ *Saccharomyces cerevisiae*

การเจริญในอาหาร malt extract

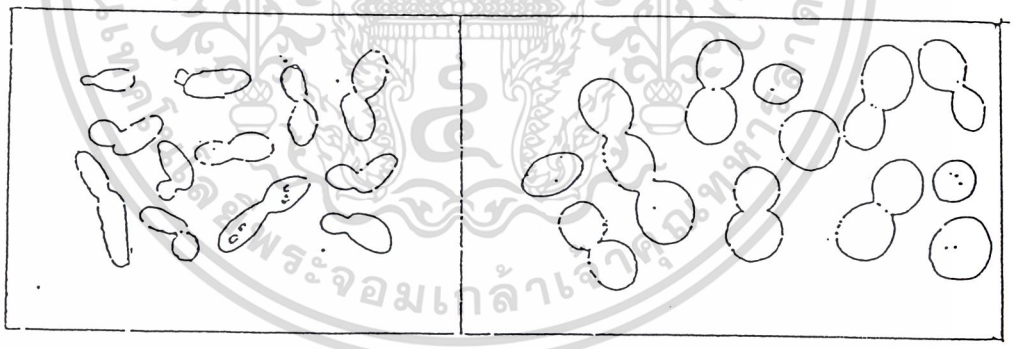
เซลล์อายุ 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีลักษณะกลม หรือ ค่อนข้างกลม,รีจนเกือบเป็นทรงกระบอก บางครั้งจะพบเป็นท่อนยาวมากกว่า 30 ไมครอน จะพบเป็นเซลล์เดี่ยวๆ , เป็นคู่ ,สายสั้น หรือเป็นกลุ่ม (ดังรูปที่ 2.7) อายุ 1 เดือน ที่ 20 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์จะตกตะกอน บางครั้งจะจับตัวเป็นวง (ring) และเป็นฝ้าอยู่ที่ผิวหน้า (film) (Volesky H.A. May- Philips, 1995)

การเจริญในอาหาร malt agar

เซลล์อายุ 1 เดือนที่ 20 องศาเซลล์เซียส รอยที่ขีด (streak) จะมีลักษณะเป็นครีมสีน้ำตาลอ่อน นูนเล็กน้อยและมีผิวเรียบ

โครงสร้างของ ascospore

1 ascus มีอยู่ 1-4 ascospore มีรูปร่างกลมรี



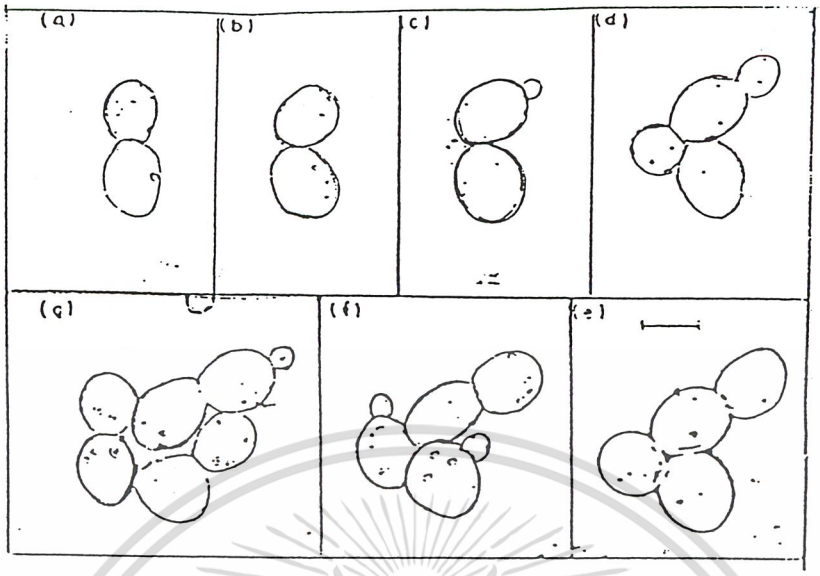
รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะของ *S.cerevisiae* ที่มีอายุ 3 วันในอาหาร malt extract

ที่มา:Kreger- Van(1984)

การเจริญในอาหาร yeast extract –glucose agar medium (Kreger-Van, 1984)

ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การเจริญจะมีลักษณะคล้ายกับการเจริญใน malt extract คือ จะเกิดการแตกหน่อ (budding) ดังรูปที่ 2.8 กล่าวคือ จากภาพ (a)-(f) ยีสต์จะใช้เวลา 30 นาที และอีกประมาณครึ่งชั่วโมงก็จะได้ยีสต์ที่เกิดจากการแตกหน่อดังภาพ (g)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

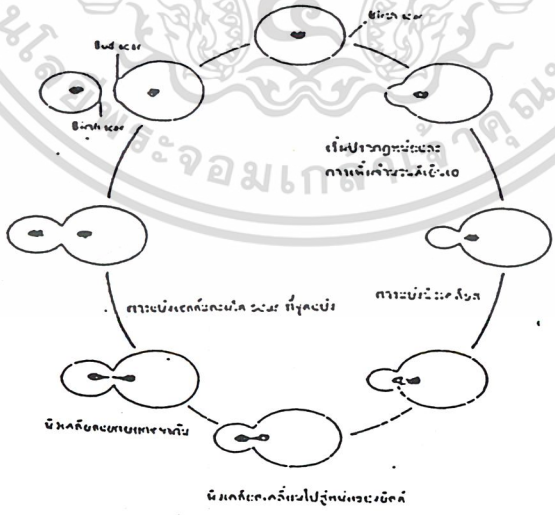


รูปที่ 2 .8 แสดงการเจริญของเซลล์ยีสต์ในอาหาร yeast extract-glucose agar medium

ที่มา : ชัยชาญ(2539)

ลักษณะการสืบพันธุ์

การแตกหน่อของเซลล์ยีสต์เกิดจากเซลล์แม่ ซึ่งเซลล์แม่หนึ่งเซลล์สามารถเกิดเซลล์ลูกโดยการ budding ได้ 5-6 เซลล์ลูก ดังรูปที่ 2.9 จะเห็นลักษณะของเซลล์ลูกที่มีขนาดประมาณ 1 Um ในช่วงต้นการแตกหน่อ

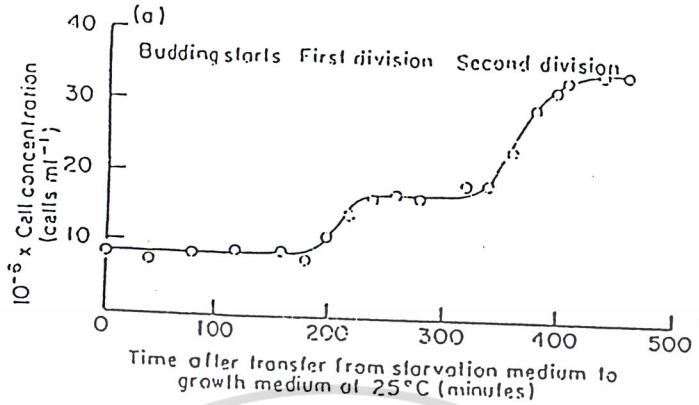


รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะเซลล์แม่เกิดการ budding เกิดหน่อของเซลล์ลูก

ที่มา : ชัยชาญ(2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.10 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงยีสต์ ที่อุณหภูมิ 25°c

ที่มา : ชัยชาญ(2539)

โครงสร้างส่วนประกอบของผนังเซลล์ใน *S. cerevisiae*

เมื่อยีสต์มีอายุได้ 24 ชั่วโมงในอาหาร malt extract หรือ malt agar ที่อุณหภูมิ 27 ° c เมื่อนำยีสต์มาวิเคราะห์ผนังเซลล์จะประกอบไปด้วยส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อ S. cerevisiae อายุ 24 ชั่วโมง

ส่วนประกอบของผนังเซลล์	% น้ำหนักแห้งของเซลล์เมื่อมีอายุ 24 ชั่วโมง
Cell wall	
Protein	15.7 ± 1.7
Total CHO	82.6 ± 4.5
Mannan	38.6 ± 2.1
Glucan	43.1 ± 2.3
Chitin	1.0 ± 0.1
Protine : Total CHO	0.19
Whole cells	
Protein	36.6 ± 2.0
Total CHO	40.7 ± 3.6
Ptotein : Total CHO	0.90

ที่มา : Simmoms,Pand Singleton (1996)

จากตารางส่วนประกอบของผนังเซลล์เหล่านี้เป็นส่วนสำคัญในการซับโลหะหนักในน้ำเสียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

40054

2.3 การใช้ยีสต์ในทางอุตสาหกรรม

ประโยชน์ที่สำคัญที่สุดของยีสต์ที่เราทราบกันดี คือ การผลิตเอทิลแอลกอฮอล์จากวัตถุดิบพวกคาร์โบไฮเดรตซึ่งกระบวนการนี้ใช้ในการทำเบียร์ สุรา ไวน์ ในโรงงานสารเคมีและครัวเรือน เป็นต้น ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลผลิตจากยีสต์

ผลผลิต	จุลินทรีย์	ประโยชน์
ยีสต์ผงฟู เบียร์ ไวน์ ขนมปัง	*Saccharomyces cerevisiae*	อุตสาหกรรมขนมปัง อุตสาหกรรมเบียร์
ซีอิ๊ว	*S. rouxii*	เครื่องปรุงอาหาร
ขนมปัง(Sour French bread)	*Candida milleri*	ขนมปัง
เอทิลแอลกอฮอล์	*S. cerevisiae* *Kluyveromyces fragilis*	เชื้อเพลิง ตัวทำละลาย
ไรโบเฟลบิน	*Eremothecium ashbyi*	วิตามินเสริม
โปรตีนจากจุลินทรีย์	*Candida utilis* *Saccharomycopsis lipolytica*	อาหารเสริมของสัตว์จากน้ำเสียของโรงงานกระดาษ โปรตีนที่ได้จากผลผลิตของปิโตรเลียม

ที่มา : ดุษณี (2537)

การผลิตเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์มีวิธีแตกต่างกันบ้าง เช่น

การผลิตเบียร์ (Beer) จุลินทรีย์ที่ใช้หมักเบียร์ คือ ยีสต์ที่สำคัญมีอยู่สองสายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* หรือมักเรียกว่า top yeast เพราะเมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุดลง ยีสต์สายพันธุ์นี้จะลอยขึ้นผิวบน อีกสายพันธุ์หนึ่ง คือ *Saccharomyces carlsbergensis* หรือเรียกว่า bottom yeast เพราะยีสต์ชนิดนี้จะจมลงก้นถังเมื่อการหมักสิ้นสุดลง วัตถุดิบที่ใช้ คือ ข้าวมอลต์ที่กำลังงอก (barley malt) และแป้ง (starch adjuncts) ผสมกับน้ำอุ่นหลังจากปล่อยให้เอนไซม์ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลแล้วจะได้น้ำวอร์ท (wort) เอามากรองแล้วต้มกับฮอป (hops) เพื่อให้น้ำวอร์ทเข้มข้นและทำลายจุลินทรีย์แล้วนำมาหมักด้วยยีสต์ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาในระยะแรกของการหมักเป็นแบบใช้อากาศ ต่อมาเปลี่ยนเป็นแบบไม่ใช้อากาศและควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ให้อยู่ระหว่าง 8-12 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 5.0-5.4 pH สุดท้าย 4.0-4.8 การหมักขั้นต้นใช้เวลา 5-9 วัน ยีสต์จะหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ และเกิดการเปลี่ยนแปลงกับโปรตีนและสารอื่นๆทำให้เกิดรสชาติที่ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำไวน์ (wine) อาศัยเชื้อ *S. ellipsoideus* สายพันธุ์ต่างๆ ความเข้มข้นของน้ำตาลก่อนหมักควรอยู่ประมาณร้อยละ 22 ปฏิกิริยาตอนแรกเกิดในสภาพที่มีอากาศ ต่อมาจะเป็นสภาพที่ไม่ใช้อากาศ อุณหภูมิที่เหมาะกับการหมักควรต่ำกว่า 29.4 องศาเซลเซียสและแตกต่างกันไปตามสถานที่ สายพันธุ์ยีสต์ และชนิดของไวน์ การหมักกินเวลา 7-11 วัน

ยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง (Baker's yeast)

การใช้ยีสต์ทำขนมปังเกิดขึ้นนานมาแล้วตั้งแต่สมัยยิว อียีปต์ กรีก โรมัน ในปัจจุบันมีการคัดเลือกสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่จะให้ขนมปังมีกลิ่น รสตามต้องการ และสามารถหมักน้ำตาลได้มากและรวดเร็ว และเชื้อยีสต์ยังเจริญได้รวดเร็วด้วย ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการหมักจะทำให้ขนมขึ้นฟูดี คุณภาพของขนมปังจะขึ้นกับการเลือกชนิดยีสต์และสภาพการบ่ม รวมทั้งชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ด้วย

ในโรงงานผลิตยีสต์เพื่อใช้ทำขนมปังจะใส่เชื้อต้นตอ (stock) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาล น้ำแช่ข้าวโพด (corn-steep liquor) และทำการปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4-5 เพื่อลดการเจริญของแบคทีเรีย และให้อากาศในขณะบ่มเชื้อด้วย ในที่สุดจะเก็บเซลล์ในการปั่น (Centrifuge) และล้างเซลล์ในน้ำแล้วกรองและอัดเป็นก้อน ดังรูปที่ 2.11

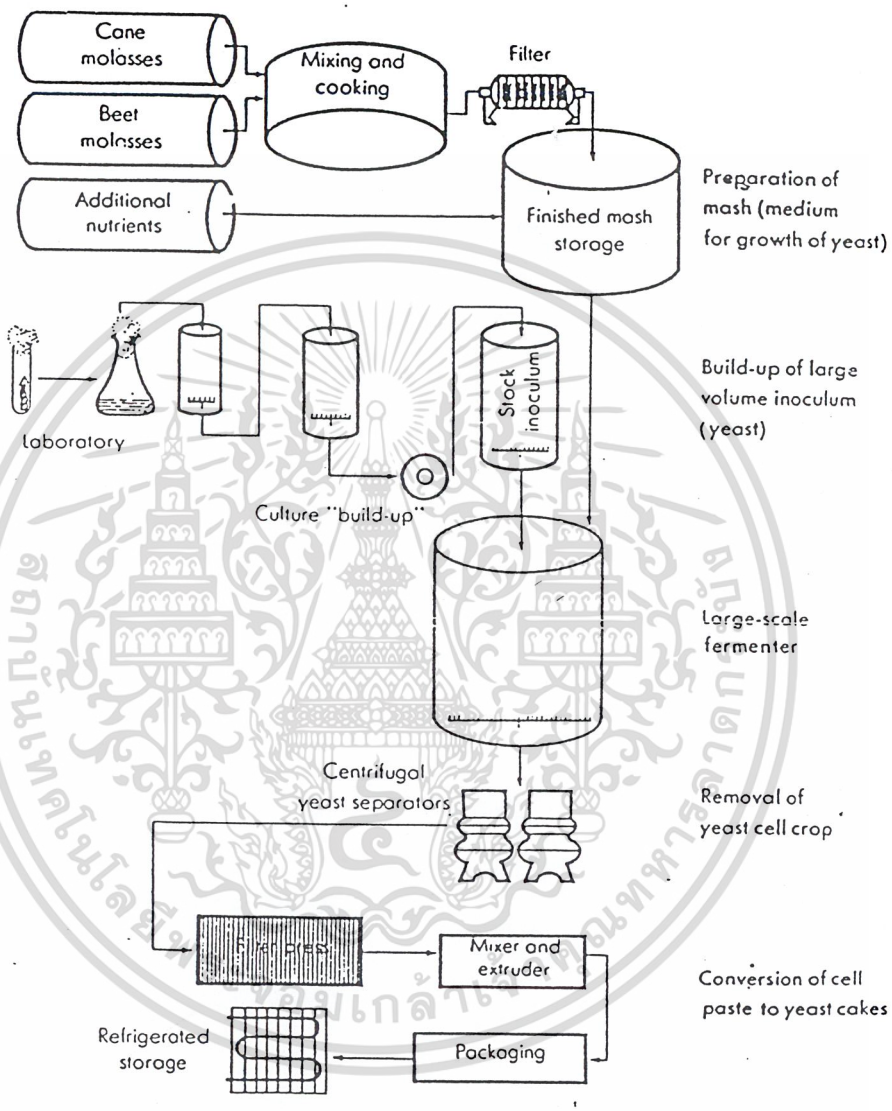
ยีสต์ที่ใช้เป็นอาหาร (Food Yeast)

การเลี้ยงยีสต์จำนวนมากสามารถเลี้ยงเป็นแหล่งอาหารของคนและสัตว์โดยใช้ของเสียที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นการลดปัญหามลภาวะและได้ผลิตยีสต์ที่ใช้เป็นอาหารโปรตีนด้วย

การเลี้ยงแบคทีเรีย รา และสาหร่ายให้ได้ปริมาณมากๆ อาจใช้เป็นแหล่งของอาหารเสริมหรือทดแทนให้แก่คนและสัตว์ได้ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่น่าสนใจมากเพราะเลี้ยงง่ายและมีคุณค่าอาหารสูง เนื่องจากประกอบด้วยไนโตรเจนประมาณ 7-9 % ส่วนใหญ่ในรูปของโปรตีน ส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ พิวรีน พิริมิดินและวิตามินบีรวม นอกจากนี้ยังประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต ไขมันอีกด้วย ผลผลิตของยีสต์ที่ได้ขึ้นกับสายพันธุ์และชนิดของเชื้อยีสต์รวมทั้งสภาพการเพาะยีสต์

ในสหรัฐอเมริกา การผลิตยีสต์ที่เป็นอาหารให้ได้ปริมาณมากในการค้า จะใช้ของเสียจากโรงงานกระดาษ (ที่มีกากซัลไฟต์) เป็นแหล่งของอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้ยังใช้วัตถุดิบอย่างอื่น เช่น กากน้ำตาล มันฝรั่ง ของเสียจากอุตสาหกรรมนม เป็นต้น การใช้ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์ นอกจากการเป็นการลดปัญหาการกำจัดของเสีย แล้วยังได้ประโยชน์จากยีสต์ที่ใช้เป็นอาหารโปรตีนอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 ขั้นตอนการผลิตยีสต์ที่ใช้ทำขนมปังทางการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การหาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดความขุ่น (Turbidimetric method)

การหาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดความขุ่นอาศัยหลักที่ว่าจุลินทรีย์ในสารละลายสามารถดูดกลืนแสง และกระจายแสงที่ผ่านตัวมัน ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่มากกว่า 10^7-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะมีความขุ่นที่มองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ปริมาณแสงที่ดูดกลืนไว้และกระจายออกไปจะเป็นสัดส่วนกับความหนาแน่นของเซลล์ และเซลล์ขนาดใหญ่จะขัดขวางทางเดินของแสงมากกว่าเซลล์ขนาดเล็ก

เครื่องมือที่ใช้วัดความขุ่น สเปกโทรโฟโตมิเตอร์(spectrophotmeter) แคลอริมิเตอร์ (calorimeter) โดยนำสารละลายของเซลล์ใส่ในหลอดวัดและอ่านค่าเปอร์เซนต์ที่แสงผ่านออกมา (% transmittance) ดังนั้นถ้าสารละลายของเซลล์ขุ่นมาก เปอร์เซนต์ที่แสงผ่านออกมาจะยิ่งน้อย โดยทั่วไปจะอ่านค่าความขุ่น (optical density หรือ OD) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นหรือจำนวนเซลล์(รูปที่ 2.13)

วิธีนี้มีข้อดี คือ ทำได้สะดวก รวดเร็ว และใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับจำนวนเซลล์หรือน้ำหนักของเซลล์ได้ โดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์เป็นระยะๆ ขณะเดียวกันนำสารละลายของเซลล์มาทำให้แห้งเพื่อหาน้ำหนักแห้งหรือนำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อเป็นระยะๆด้วย แล้วนำมาเขียนกราฟระหว่างค่าความขุ่นกับน้ำหนักแห้งของเซลล์หรือกับจำนวนโคโลนีของ เซลล์จะได้กราฟมาตรฐาน (standard curve) ดังนั้นเมื่อทำการทดลองในครั้งต่อไป เมื่อวัดค่าความขุ่นของสารละลาย เราก็สามารถหาค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์หรือจำนวนโคโลนีของเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานนี้

ส่วนข้อเสีย คือ เชื้อที่นำมาวัดจะต้องมีปริมาณมากพอที่จะเกิดความขุ่น และไม่สามารถตรวจวัดเชื้อที่มีสีเข้ม หรือมีสารอื่นนอกจากแบคทีเรียปะปนอยู่ นอกจากนี้การวัดโดยวิธีนี้เป็นการวัดเซลล์ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตด้วย เพราะทำให้เกิดความขุ่นเหมือนกัน

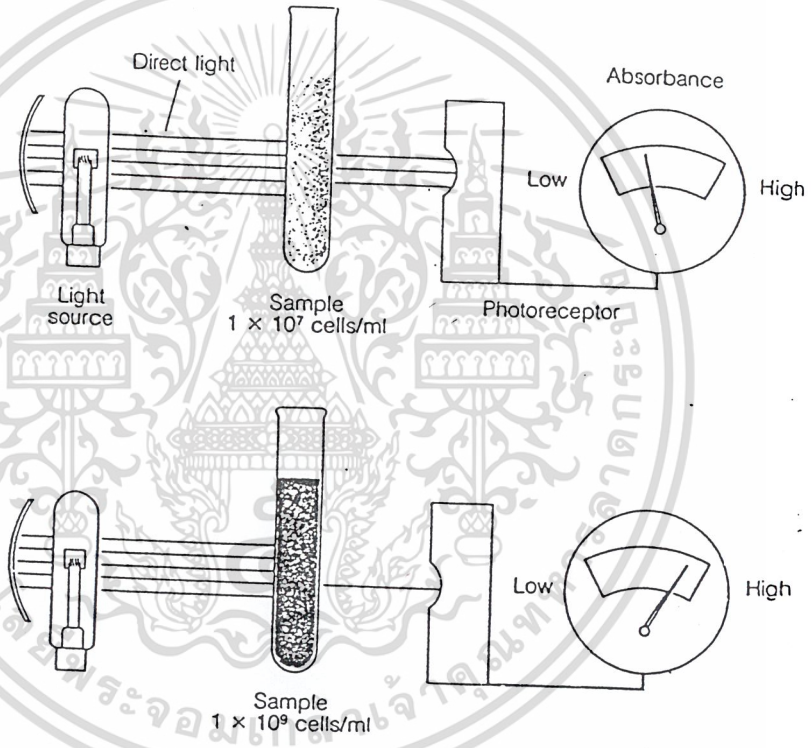
2.5 การวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดจากปริมาณไนโตรเจน

องค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์คือโปรตีน ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงสามารถวัดประชากรของแบคทีเรียได้จากปริมาณไนโตรเจน โดยทั่วไปแบคทีเรียมีไนโตรเจนประมาณร้อยละ 14 ของน้ำหนักแห้ง การวัดการเจริญโดยวิธีนี้ต้องล้างเซลล์ให้สะอาดปราศจากอาหารที่อาจติดมากับเซลล์ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีทางเคมี ซึ่งวิธีนี้ใช้แรงงานมาก และต้องใช้เซลล์แบคทีเรียจำนวนมาก วิธีนี้จึงไม่เหมาะสมกับการวัดการเจริญของจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการทั่วๆไปแต่เหมาะกับการวิจัยทางจุลชีววิทยาเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

วิธีนี้เป็นการหามวล (mass) ของเซลล์ ซึ่งจะแปรผันตามจำนวนเซลล์ จึงเป็นวิธีวัดการเจริญของแบคทีเรียอีกวิธีหนึ่ง วิธีนี้จะต้องทำให้เซลล์แห้งจนน้ำหนักคงที่ และต้องไม่มีสารอื่นปะปนมาด้วย และต้องใช้เซลล์แบคทีเรียจำนวนมาก วิธีนี้เสียเวลามากจึงเหมาะสำหรับในงานวิจัยเท่านั้น



รูปที่ 2.12 การหาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ความขุ่นของเชื้อสามารถวัดได้จากปริมาณแสงที่ผ่านทะลุไป แล้วตรวจจับด้วยเครื่องรับแสงที่อ่านผลออกมาเป็นค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ คือ

- เชื้อยีสต์
- อุณหภูมิของตัวกลาง
- พีเอชของตัวกลาง
- สารอาหารอนินทรีย์และความเข้มข้น
- การเติมอากาศและการปั่นกวน

ในกรณีของการเดินระบบแบบเป็นครั้งพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์คือ

- ขนาดของเชื้อยีสต์
- ความเข้มข้นของสารตั้งต้นในตัวกลาง
- ระยะเวลาในการหมัก

ถ้าการเดินระบบเป็นแบบต่อเนื่องจะพบว่าอัตราการเจือจางน้อยกว่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดและจากปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้นการปนเปื้อนของแบคทีเรียและการเกิดฟองเป็นปัญหาที่มักเกิดขึ้นในการเพาะพันธุ์ยีสต์

1. ชนิดของเชื้อยีสต์

Candida utilis ,*Candida tropicalis* , *Mycotorula* , *Lipolytica* , *Hansanula* ,*Suaveolens*, *Saccharomyces fragelis* จัดเป็นยีสต์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในของเสียโดย *Torulopsis utilis* เป็นยีสต์ที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดลดปริมาณสารตั้งต้น น้ำตาลและสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ใช่น้ำตาล (Hospodka,1966) นอกจากนี้ยังให้ผลผลิตยีสต์ที่มีโปรตีนและวิตามินเป็นองค์ประกอบสูงอีกด้วย

2. ค่าพีเอชของตัวกลาง

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ถูกยับยั้งการเจริญที่พีเอช 4.5 ถึง 5.5 (Shyder,1970) และMilbury(1968) พบว่าในช่วงพีเอช 5.5 ถึง 7.0 มวลของแบคทีเรีย , โปรโตซัวและจุลินทรีย์อื่นๆสามารถเจริญอยู่ได้ ในส่วนที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียพีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ต่างๆถ้ามีพีเอชอยู่ในช่วงที่เหมาะสมจะทำให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและให้ผลผลิตสูงสุด (Munro,1970) ในการเดินระบบแบบครั้ง(Wasserman,1958) พบว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Saccharomyces fragelis* ในไวน์ อยู่ระหว่าง 5.0 ถึง 6.0 ในการเพิ่มจำนวนแบบต่อเนื่องของ *Torulopsis utilis* ในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตธัญพืช (Milbury ,1968) พบว่าการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3 ถึง 6 จะทำให้การกำจัดสารตั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้น ในระหว่างการเจริญเติบโตจะมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเนื่องมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดสามารถที่จะผลิตอัลคาไลน์ (Wasserman,1958)และบางชนิดอาจจะผลิตกรดได้ (Thanh : Simard ,1973)

3. อุณหภูมิของตัวกลาง

Rose และ Evison (1965) พบว่าอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญเติบโตของ Torula yeast เป็น 5° C และอุณหภูมิสูงสุดจะมีค่าสูงกว่า 35° C ,Peterson (1945) และ Kurth(1946) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโตของ *Torulopsis utilis* ในของเหลวที่ได้จากการย่อยเนื้อไม้ด้วยกรดเป็น 30 °C อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของยีสต์โดยลดความสามารถในการละลายของออกซิเจนดังนั้นระบบการเติมอากาศจึงมีความจำเป็นในการเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัด

4. สารอาหารและความเข้มข้น

การเจริญเติบโตของยีสต์จำเป็นต้องใช้สารอาหารหลายชนิดเช่นไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม Peterson(1945) พบว่ายูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยสัดส่วนของสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์จะมี ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส :โพแทสเซียม: น้ำตาล เท่ากับ 3.4 :1.6 : 1.1 : 100 กรัมตามลำดับ

5. การเติมอากาศและการปั่นกวน

การเพิ่มจำนวนของยีสต์ที่มีการใช้ออกซิเจนนั้นจะขึ้นอยู่กับอัตราการเติมอากาศและการปั่นกวน Kayer,1969 แนะนำให้ทำการศึกษาปริมาณอากาศที่ต้องเติมก่อนจะนำไปใช้ในการเดินระบบเนื่องจากถ้ามีการเติมอากาศมากเกินความจำเป็น จะทำให้ราคาในการดำเนินงานสูงขึ้นและเกิดฟองได้ ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญเติบโตของยีสต์ บางกรณียีสต์อาจมีการเปลี่ยนแปลง เมตาบอลึซึม จึงทำให้ผลผลิตยีสต์ลดลงและไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ

6. ขนาดของการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ในการเลี้ยงเชื้อแบบครั้งถ้าใช้ปริมาณเชื้อมากจะทำให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์และใช้ระยะเวลาสั้น(Holoderby,1959;Kurth,1946;Wasserman,1958;Peterson,1945) Peterson (1945)ใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 1 กรัมของน้ำหนักแห้งต่อ 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระดับมาตรฐาน Wasserman (1958)เพิ่มขนาดของการเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นซึ่งปริมาณมวลยีสต์เป็นครึ่งหนึ่งของปริมาณยีสต์สุดท้ายที่เกิดจะสามารถลดเวลาที่ต้องการสำหรับที่จะใช้ให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์เป็น 3 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ความเข้มข้นเริ่มต้นของ reducing sugar

ความเข้มข้นของน้ำตาลในของเสียจะมีผลต่อการขยายพันธุ์ของยีสต์โดย Prescott(1940) แนะนำว่าควรรักษาระดับน้ำตาลไว้ที่ระดับต่ำ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตเซลล์ยีสต์มากกว่าสำหรับใช้ในการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญของยีสต์ในตัวกลางนั้นๆจะขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นเพียงแค่ที่ระดับต่ำๆเท่านั้น การเจริญของยีสต์ที่ระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงๆจะมีอัตราการเจริญสูงที่สุด และไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ในระหว่างนั้นถ้ามีการเติมอากาศอย่างเพียงพอจะทำให้มีการใช้ประโยชน์จากสารตั้งต้นและสามารถยับยั้งการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ได้ อย่างไรก็ตามการใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงๆควรจะควบคู่ไปกับการใช้เชื้อปริมาณมากๆ เพื่อทำให้เวลาที่ใช้ในการหมักอย่างสมบูรณ์สั้นลง

8. การทำให้เคยชินกับสภาพแวดล้อม

การทำให้ยีสต์คุ้นเคยกับอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลต่อเวลาที่ใช้ในการหมัก มีการศึกษาพบว่าการเจริญเติบโตของยีสต์จะช้าลง เมื่อนำยีสต์ถ่ายลงในน้ำเสียโดยตรง (Kurth ,1946) โดยไม่ผ่านการทำให้ยีสต์คุ้นเคยกับน้ำเสียก่อน

9. เวลาที่ใช้ในการหมัก

เวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นขนาดของการเพาะเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและการเติมอากาศ การใช้เวลาในการหมักน้อยจะทำให้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ถูกปล่อยออกมากับน้ำทิ้งสูง ในขณะที่การใช้เวลามากจะทำให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์ลดผลผลิตโดยกลไกการเปลี่ยนแปลงสารอาหารให้เป็นพลังงานภายในยีสต์ การใช้เชื้อปริมาณมากอุณหภูมิที่เหมาะสมและการเติมอากาศอย่างเพียงพอจะสามารถลดเวลาที่ใช้ในการหมักลงได้

10. อัตราการเจือจาง

ในการขยายพันธุ์อย่างต่อเนื่องพบว่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นในน้ำเสียที่ถูกปล่อยออกมาและความเข้มข้นของมวลยีสต์จะสัมพันธ์กับอัตราการเจือจางน้ำเสีย

2.8 เมแทบอลิซึมภายในเซลล์ยีสต์

ยีสต์เป็นที่รู้จักกันดีว่า เป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการหมัก โดยเฉพาะขบวนการหมักที่มีแอลกอฮอล์เกิดขึ้นตามสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \qquad \Delta G = -56 \text{ Kcal}$$

กลูโคส เอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saccharomyces cerevisiae นอกจากจะมีคุณสมบัติในการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแล้ว ยีสต์ยังมีเมแทบอลิซึมการหายใจอีกด้วย คือ ในสภาพที่มีออกซิเจนสามารถออกซิไดซ์กลูโคสให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O \quad \Delta G = -688 \text{ Kcal}$$

ปฏิกิริยาต่างๆของยีสต์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ขึ้นอยู่กับสภาวะในการเจริญเติบโต ยีสต์สามารถเปลี่ยนจากขบวนการหมักเป็นขบวนการหายใจได้ซึ่ง ขบวนการหายใจให้พลังงานมากกว่าขบวนการหมัก

พาสเตอร์ (Pasteur) เป็นคนแรกที่แสดงให้เห็นว่ายีสต์ประเภทที่หมักน้ำตาลได้เมื่อเปลี่ยนให้อยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน ความสามารถในการหมักของยีสต์ลดลง และกลูโคสบางส่วนเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ เรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า " Pasteur effect " นั่นคือมีการยับยั้งขบวนการหมักโดยการหายใจ ยีสต์สามารถปรับการดำรงชีพได้ตามสภาวะแวดล้อม จึงได้นำหลักการนี้มาใช้ในการผลิตยีสต์ที่ทำขนมปัง ในสภาวะที่มีออกซิเจนและมีน้ำตาลเพียงเล็กน้อย ยีสต์ที่ใช้ทำขนมปังจะเปลี่ยนน้ำตาลทั้งหมดให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ

ยีสต์หลายชนิดที่จัดอยู่ในพวกที่ต้องการออกซิเจน ยีสต์เหล่านี้ขาดคุณสมบัติในการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ ตัวอย่างได้แก่ *Rhodotorula* , *Cryptococcus* , *Candida* , และ *Toruloapsis*

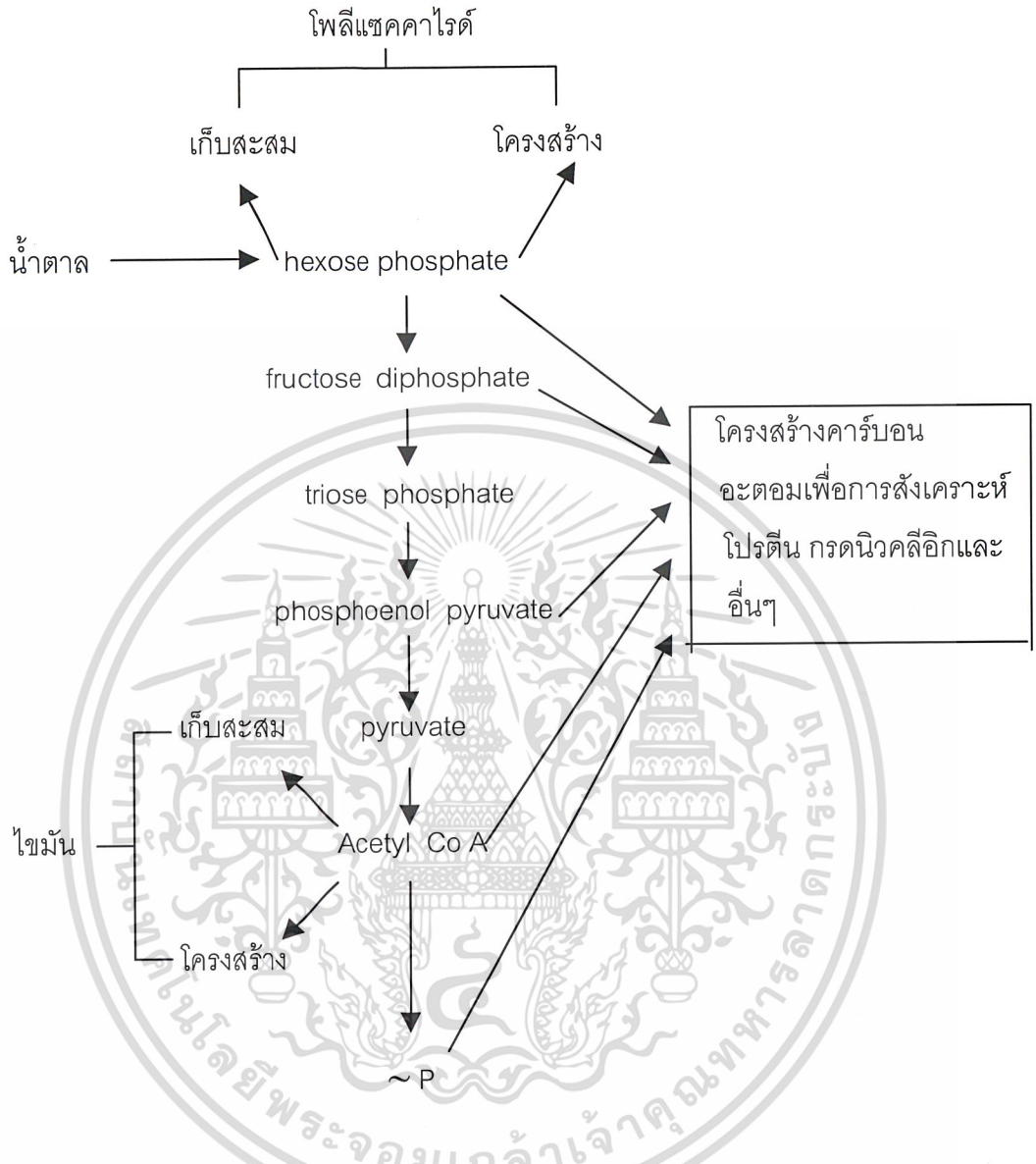
นอกจากนี้มียีสต์ที่มีคุณสมบัติทั้งสองอย่างคือ มีความสามารถในการใช้ออกซิเจนได้ดี แต่มีความสามารถในการหมักเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ตัวอย่างเช่น *Debaryomyces* และ *Pichia* และยังมีบางชนิดอีกด้วยที่มีคุณสมบัติตรงกันข้ามกับพวกที่กล่าวแล้วคือ เป็นยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการหายใจไม่ดี แต่สามารถหมักได้ดีมาก ได้แก่ *Saccharomyces carlsbergensis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่นิยมใช้ในการผลิตเบียร์

เมแทบอลิซึมภายในเซลล์ยีสต์มี 2 แบบคือ

1. เมแทบอลิซึมการหมัก
2. เมแทบอลิซึมการหายใจ

ยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนตามรูป 2.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 แผนภูมิเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ยีสต์ ยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน

ที่มา : ลัดดาวัลย์(2536)

2.8.1เมแทบอลิซึมการหมัก

น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของยีสต์ น้ำตาลผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ด้วยระบบขนส่งที่ผนังเซลล์ หรือที่เยื่อไซโตพลาสซึมและการหมักเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม

กลูโคสจะเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคลิซิส (glycolysis parthway) จนกระทั่งได้ไพรูเวท 2 โมเลกุล ไพรูเวทจะสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์ในปฏิกิริยาของไพรูเวท ดีคาร์บอกซีเลส (pyruvate decarboxylase) กลายเป็นอะซิตาลดีไฮด์ (acetaldehyle) ปฏิกิริยาสุดท้ายของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักแอลกอฮอล์ คือปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ในปฏิกิริยานี้ อะซิตาลดีไฮด์จะถูกรีดิวซ์ให้กลายเป็นเอทานอล

การหมักแอลกอฮอล์มีขั้นตอนพอสรุปได้ดังนี้

กลูโคส

↓

วิถีไกลโคลิซิส

↓

ไพรูเวท

↓

อะซิตาลดีไฮด์

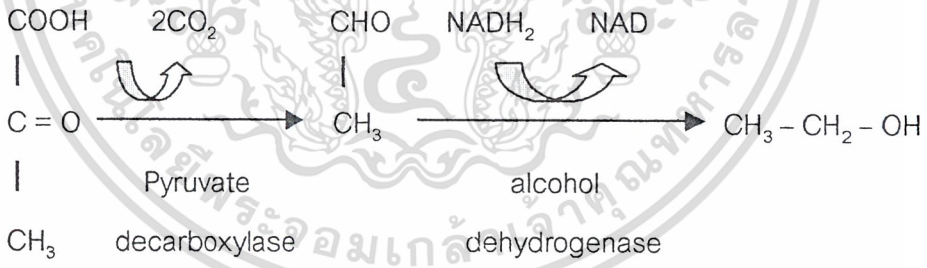
↓

เอทานอล

ผลผลิตที่ได้รับจากไกลโคลิซิส

2pyruvate , 2 ATP , 2 $NADH_2$

การหมักแอลกอฮอล์ : ไกลโคลิซิส + 2 ขั้นตอน



(2) pyruvate ⟶ (2) acetaldehyde ⟶ (2) ethanol

ผลผลิตที่เกิดจากการหมักแอลกอฮอล์ :

2ethanol + $2CO_2$ + 2ATP

เมื่ออาหารขาดแหล่งไนโตรเจน และยีสต์ไม่เจริญเติบโต ยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนกลูโคสบางส่วนเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ *S. cerevisiae* ในระยะพักตัว และมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาล 70% ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ ส่วนน้ำตาลที่เหลืออีก 30% ยีสต์เก็บสะสมไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kluyer ได้ตั้งกฎขึ้นเพื่อเป็นพื้นฐานในการหมัก 3 ข้อ คือ

กฎข้อที่ 1. ถ้ายีสต์ไม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ ยีสต์นั้นจะไม่สามารถหมักน้ำตาลชนิดใดๆได้ทั้งสิ้น

กฎข้อที่ 2. ถ้ายีสต์สามารถหมักกลูโคสได้ ยีสต์นั้นก็สามารถหมักฟรุคโตสและแมนโนสได้แต่อาจจะไม่สามารถหมักกาแลคโตสได้

กฎข้อที่ 3. ถ้ายีสต์สามารถหมักมอลโตสได้ ยีสต์นั้นจะไม่สามารถหมักแลคโตสได้ ในทางตรงกันข้าม ถ้ายีสต์ไม่หมักมอลโตสได้ ยีสต์นั้นก็จะหมักแลคโตสได้ ยกเว้น *Brettamomyces clausenii* ที่สามารถหมักได้ทั้งมอลโตสและแลคโตส

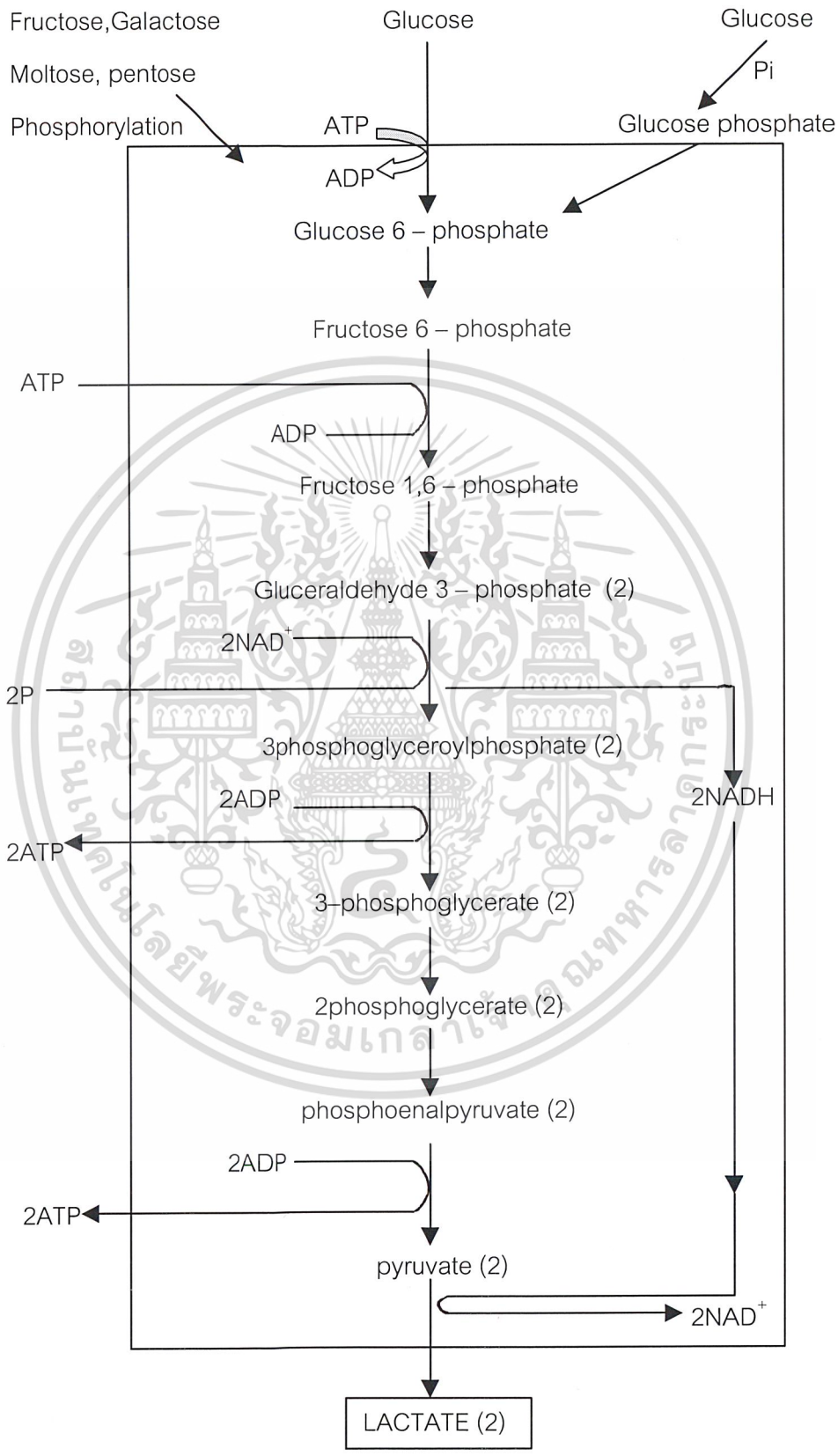
มีเหตุผลสำหรับอธิบายกฎของ Kluyer ได้ดังนี้ ในขบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตประเภทไดแซคคาไรด์ ไตรแซคคาไรด์ หรือโพลีแซคคาไรด์ ผ่านขั้นตอนที่เปลี่ยนเป็นน้ำตาลเฮกโตส หรือน้ำตาลที่ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม ดังนั้นถ้ายีสต์ไม่สามารถหมักน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมยีสต์ก็จะไม่สามารถหมักโอลิโกแซคคาไรด์ได้ (oligosaccahride) ยีสต์สามารถใช้เอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) ในปฏิกิริยาฟอสโฟลิเลชั่น ให้กับน้ำตาลทั้งสามชนิดคือ กลูโคส ฟรุกโตส และแมนโนสให้กลายเป็น hexose-6-phosphate แต่ในการหมักกาแลคโตสต้องมีเอนไซม์ กาแลคโตไคเนส ยีสต์ที่มีเอนไซม์เฮกโตไคเนสอาจจะไม่มีเอนไซม์กาแลคโตไคเนส ดังนั้นจึงเห็นได้ว่ายีสต์ชนิดที่สามารถหมักน้ำตาลทั้งสามดังกล่าวได้ แต่อาจจะไม่สามารถหมักกาแลคโตสได้

เอนไซม์ที่ผิวเซลล์ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรต น้ำตาล เมลิไบโอส (melibiose) ราฟฟิโนส (raffinose) อินูลิน (inulin) หรือแป้งให้เป็นน้ำตาลที่ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม เสียก่อนที่จะผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ แต่ไดแซคคาไรด์ทั้งสองคือ แลคโตสและมอลโตสผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ในรูปของไดแซคคาไรด์และถูกย่อยภายในเซลล์

โดยทั่วไปยีสต์ที่เลี้ยงในโมโนแซคคาไรด์และน้ำตาลกลูโคส ยีสต์จะมีเอนไซม์ที่ใช้ย่อยไดแซคคาไรด์ ไตรแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์อยู่เพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงต้องเลี้ยงยีสต์นั้นในอาหารที่มีน้ำตาลที่ต้องการย่อยก่อนเพื่อเป็นการเหนี่ยวนำให้ยีสต์สร้างเอนไซม์ที่ต้องการได้

ถึงแม้ว่ามียีสต์เป็นจำนวนมากที่สามารถหมักน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ไดแซคคาไรด์ และไตรแซคคาไรด์ แต่พบว่ามียีสต์ที่สามารถหมักโพลีแซคคาไรด์ได้ เช่นอินูลิน และแป้งอยู่เพียงส่วนน้อยเท่านั้น ตัวอย่างยีสต์ที่หมักอินูลินได้ดีคือ *Saccharomyces fragilis* ส่วน *Endomycopsis fibuligera* หมักแป้งได้ค่อนข้างดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.14 วิถีไกลโคลิซีส

ที่มา : ลัดดาวัลย์ (2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลที่ยีสต์หมักได้มีกลูโคส กาแลคโตส มอลโตส ซูโคส แลคโตสและเทรฮาโรส เมลิไบโอสและราฟฟิโนส และยังพบว่ายีสต์ยังหมักไตรแซคคาไรด์ เมลิไซโตส (melizitose) และไดแซคคาไรด์เซลลิไบโอส (cellibiose)ได้

ถึงแม้ว่ายีสต์สามารถใช้เพนโตส (pentose)หรือน้ำตาลที่ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอมในการเจริญเติบโตได้ แต่ยังไม่เคยปรากฏว่ายีสต์สามารถหมักน้ำตาลเพนโตสได้และยีสต์สามารถใช้เซลโลไบโอสในการเจริญเติบโตได้ แต่เซลโลไบโอสไม่เหมาะที่จะใช้ในการหมัก

โดยทั่วไปยีสต์หมักได้แอลกอฮอล์ 12 – 14 % แต่ในบางครั้งอาจได้แอลกอฮอล์สูงถึง 18-19%ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์และสภาพแวดล้อมด้วย

2.8.2เมแทบอลิซึมการหายใจ

นักชีววิทยาที่มีชื่อเสียงหลายคนคือ Warburg ,Wieland , Keilin,Krebs,Korbelg และนักวิทยาศาตร์อื่นๆอีกมากมายได้ศึกษาความสามารถในการหายใจของยีสต์ วิถีการหายใจที่รู้จักกันดีคือ วิถีกรดซิตริก (Citric acid cycle)หรือ tricarboxylic acid cycle (TCA) หรือวัฏจักรเคลบส์ (Krebs cycle)และพบว่ามีวัฏจักรออกซิเลส (oxylate cycle)และวัฏจักรเพนโตส (Pentose cycle)หรือเฮกโซส โมโนฟอสเฟทชันท์ (hexose monophosphate shunt cycle)

เมแทบอลิซึมการหายใจยีสต์จะเปลี่ยนกลูโคสผ่านวิถีไกลโคลิซีสให้กลายเป็นไพรูเวทและเผาผลาญไพรูเวทให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดขึ้นภายในไมโตคอนเดรียเท่านั้น ไพรูเวทสามารถผ่านเข้าไมโตคอนเดรียได้โดยอิสระไพรูเวทสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็นอะซิทิลโคเอ (acetyl coenzyme A) ต่อจากนั้นอะซิทิลโคเอจะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์และถูกเผาผลาญให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์หมด

การหายใจมีขั้นตอนพอสรุปได้ดังนี้

กลูโคส

↓

วิถีไกลโคลิซิส

↓

ไพรูเวท

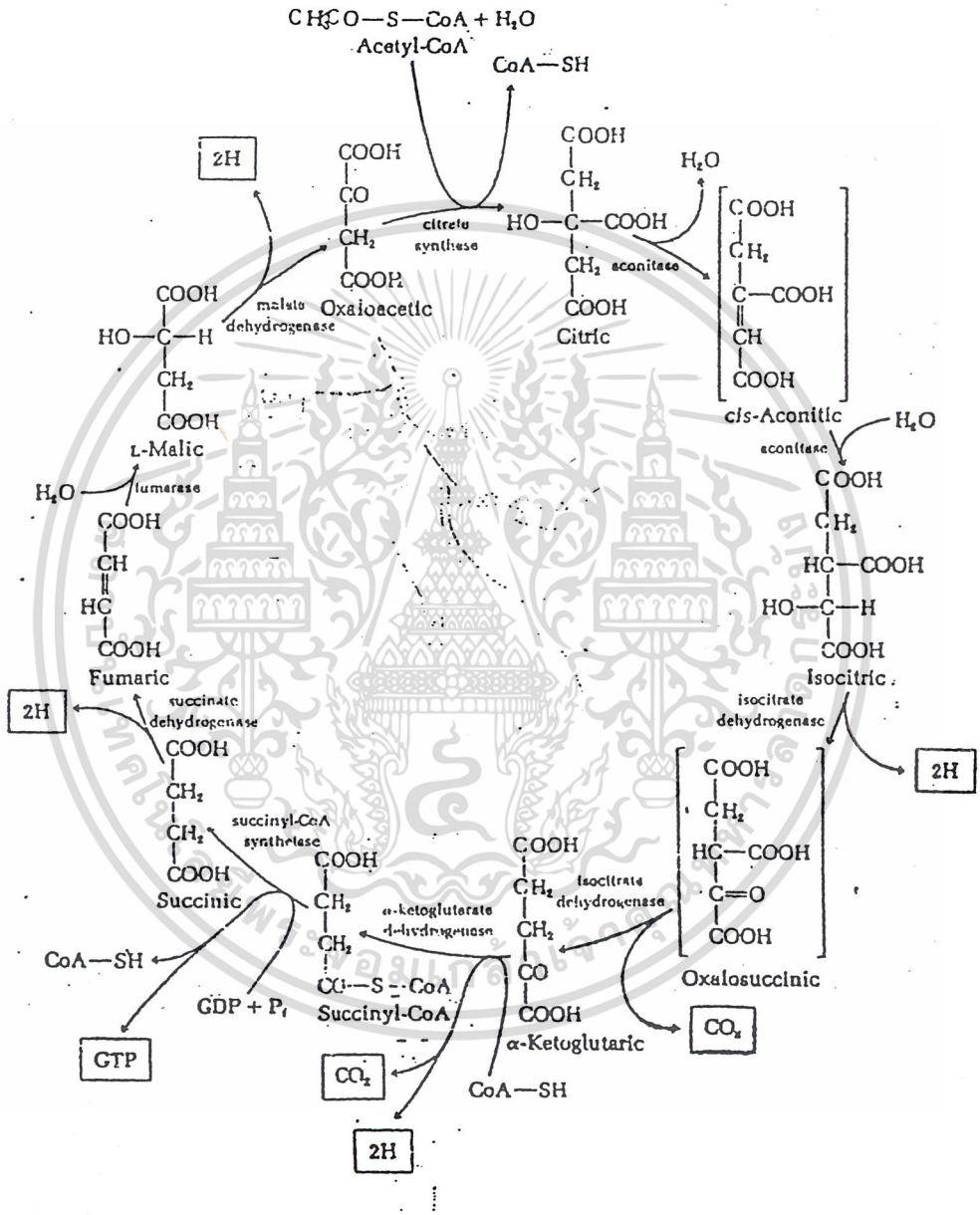
↓

อะซิทิลโคเอ

↓

วัฏจักรเครบส์

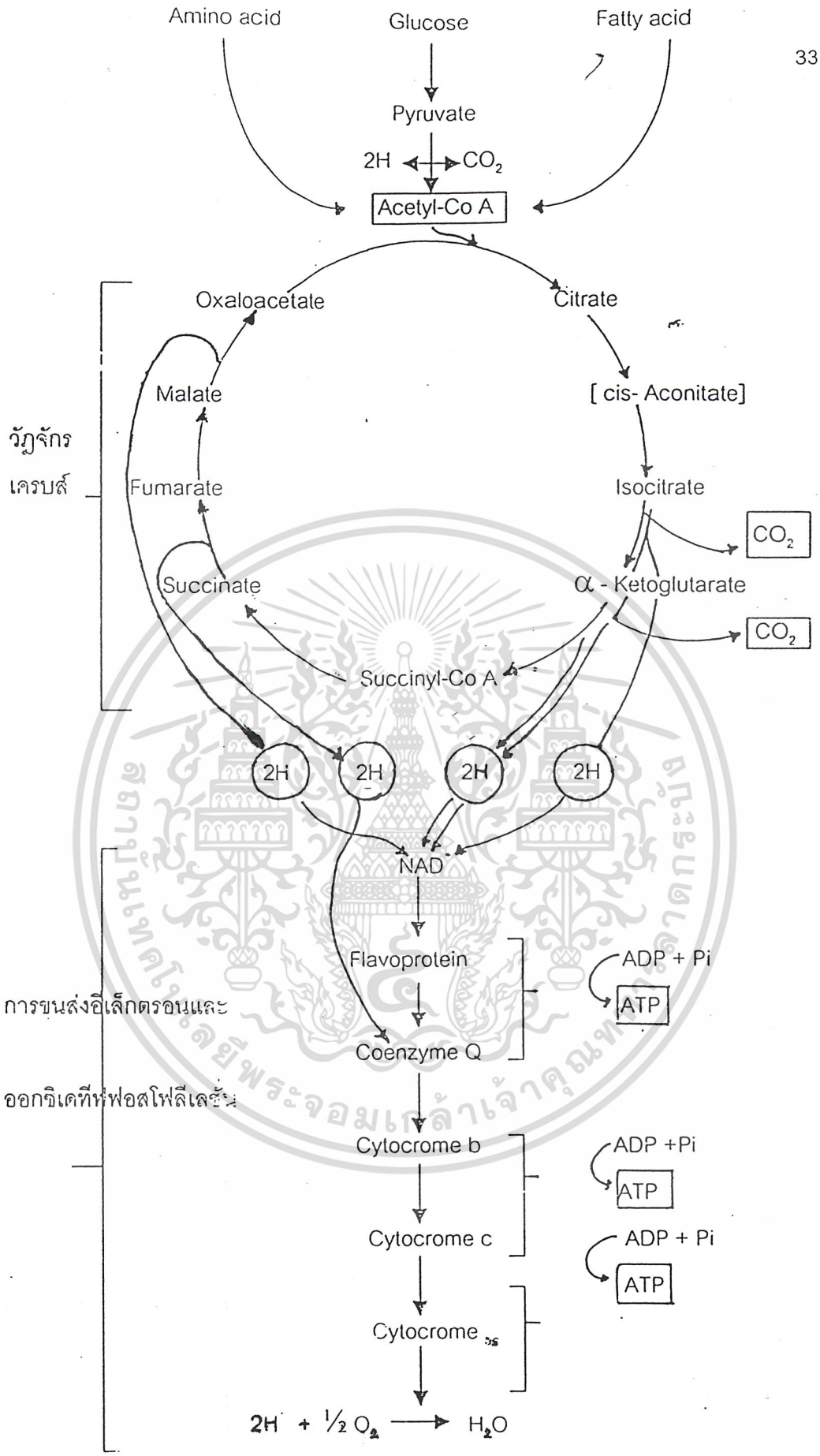
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.15 วัฏจักรเครบส์

ที่มา : ลัดดาวัลย์ (2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.16 แผนภูมิการหายใจ

ที่มา : ลัดดาวัลย์ (2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิตเมแทบอลิซึมการหายใจ

pyruvate ⟶ acetyl Co A ⟶ TCA cycle

(2) pyruvate ⟶ (2) 3 CO_2

glucose ⟶ 2 pyruvate ⟶ 6CO_2

สารตั้งต้นที่ยีสต์ใช้ในการหายใจมีมากกว่าที่ใช้ในการหมัก เช่นเพนโตส เมทิลเพนโตส แอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์

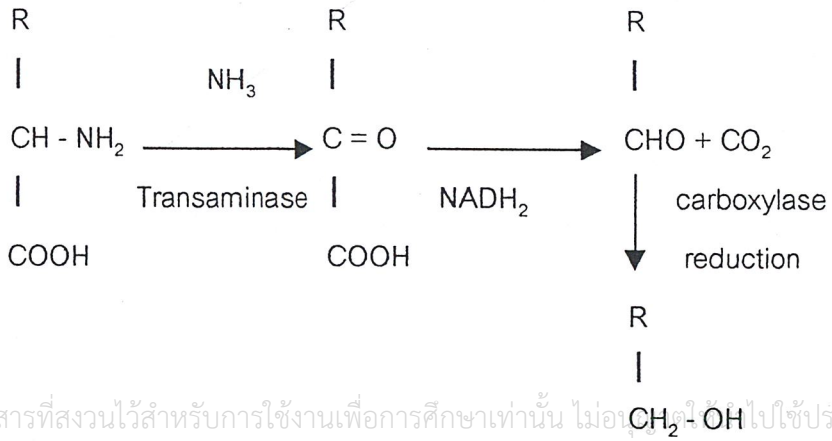
Cryptococcus สามารถเจริญในน้ำตาลเพนโตสได้ดีกว่าน้ำตาลเฮกโซส ตัวอย่างน้ำตาลเพนโตสได้แก่ ไซโรสและอะราบิโนส

เมตาบอลิซึมที่กล่าวมาทั้งสองแบบให้พลังงานแตกต่างกัน การหมักแอลกอฮอล์ได้ 2 ATP ส่วนไกลโคลิซิสและการหายใจได้ 38 ATP

ผลพลอยได้จากเมแทบอลิซึม

ผลพลอยได้จากเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ยีสต์ แตกต่างกันตามสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลพลอยได้จากการหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ได้ประมาณร้อยละ 95 และยีสต์ยังสร้างสารอื่นๆได้อีกด้วย เช่นกลีเซอรอล กรดซัคซินิค แอลกอฮอล์ชั้นสูง 2,3 –บิวเทนไดออล อะซิตาลดีไฮด์ กรดซิตริกและกรดแลคติก

เนื่องจากแอลกอฮอล์ชั้นสูงมีผลต่อคุณภาพเครื่องดื่มประเภทที่มีแอลกอฮอล์ จึงได้มีการศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์กันอย่างมากมาย ยีสต์เกือบทุกชนิดผลิตแอลกอฮอล์มวลโมเลกุลสูงได้เล็กน้อย แอลกอฮอล์มวลโมเลกุลสูงประกอบด้วยเอมิลแอลกอฮอล์ , ไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ และโพรพิลแอลกอฮอล์ Ehrlich พบว่าแอลกอฮอล์ที่มีมวลโมเลกุลสูงเกิดมาจากกรดอะมิโนที่ปล่อยแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ออกไป จนกระทั่งกลายเป็นแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่ากรดอะมิโน 1อะตอมดังสมการ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายใต้สภาพที่มีออกซิเจน มีผลพลอยได้เกิดขึ้นค่อนข้างสูง ผลพลอยได้จะแตกต่างกันตามชนิดของยีสต์ เช่น *Brettanomyces* เปลี่ยนกลูโคสหรือเอทานอลให้กลายเป็นกรดอะซิติกได้ ส่วนกรดอะซิติกที่ได้จาก *Hansenula* จะเชื่อมต่อกับเอทานอลให้กลายเป็นเอธิลอะซิเตท

ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนคือกรดซัคซินิค กรดที่ไม่ระเหยหรือกรดไซโมนิค (zymonic acid) เกิดขึ้นได้จากยีสต์หลายชนิด เช่น *Kloeckera brevis*,*Hansenula subpelliculosa*, *Trichoderma capitatum*

Zymonic acid

แอลกอฮอล์ที่มีจำนวน OH หลายกรุ๊ป เช่น กลีเซอรอล อิริทริทอล (erythritol) อะราบิทอล (arabitol) และแมนนิทอล เป็นผลผลิตจาก *Saccharomyces*,*Torulopsis* และ *Candida*

<u>รงควัตถุของยีสต์</u>

โคโลนีของยีสต์ส่วนใหญ่มีสีขาว สีขาวแกมเทา หรือสีขาวแกมเหลือง มียีสต์บางชนิดสร้างรงควัตถุสีเหลืองคือ *Sporobolomyces* *Rhodotorula* และ *Cryptococcus*

Rhodotorula สร้างสารสีเฉพาะเป็นสีสดใส มีสีเหลืองและสีแดง รงควัตถุที่ *Rhodotorula* สร้างขึ้นเป็นสารประกอบของ torulin และ torularhodin ส่วน *Cryptococcus* สังเคราะห์สีได้เพียงเล็กน้อย โคโลนีมีสีเหลือง สีชมพู หรือไม่มีสี

ในกรณีที่ไม่มีรงควัตถุสีชมพู *Rhodotorula* และ *Cryptococcus* จะสร้างสีเหลืองเบตาแคโรทีน (β - carotene)

ยีสต์ที่สร้างรงควัตถุสีดำเรียก "ยีสต์ดำ" คือ *Pullularia* ในระยะแรก ยีสต์มีโคโลนีสีขาว หลังจากนั้นประมาณ 2-3 วัน โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีชมพู สีเขียว สีน้ำตาลเข้ม จนกระทั่งกลายเป็นสีดำ ของสารเมลาลิน (melalin) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและสารละลายอินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้ยังมียีสต์บางชนิดปล่อยสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ เช่น ฟอสโฟแมนแนนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับแบคทีเรีย

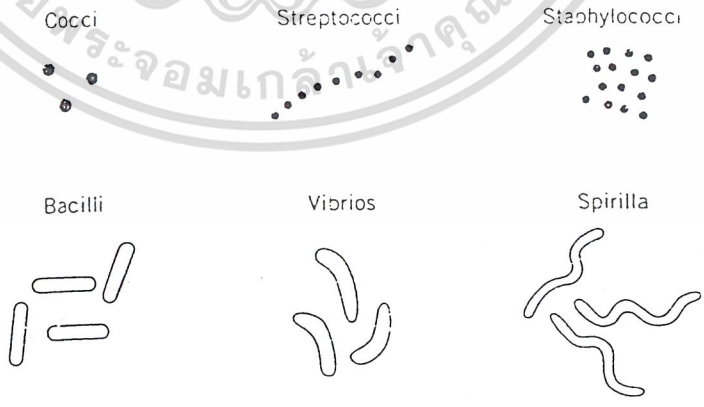
แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์เซลล์เดียวที่มีขนาดเล็กมาก ไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นพืชหรือสัตว์ และพบได้ทุกแห่งในธรรมชาติ เช่น น้ำ ดิน และอากาศ เป็นต้น (ลัดดาวัลย์,2536) มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแบ่งเซลล์แบบ binary fission ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ แบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ(นวลพรรณและมงคล, 2542) ดังนี้

รูปร่างกลม (cocci) ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร การเรียงตัวของเซลล์พบเป็นคู่ เป็นกลุ่ม หรือ เรียงต่อกันเป็นสาย ดังแสดงในรูปที่ 2.17 ตัวอย่างเช่น *Staphylococcus, Streptococcus*

รูปร่างแท่งทรงกระบอก (bacilli) เซลล์มีขนาดกว้าง 0.5-5.0 ไมโครเมตร ยาว 1.5-3.0 ไมโครเมตร ตัวอย่างเช่น *Bacillus, Pseudomonas, Aeromonas*

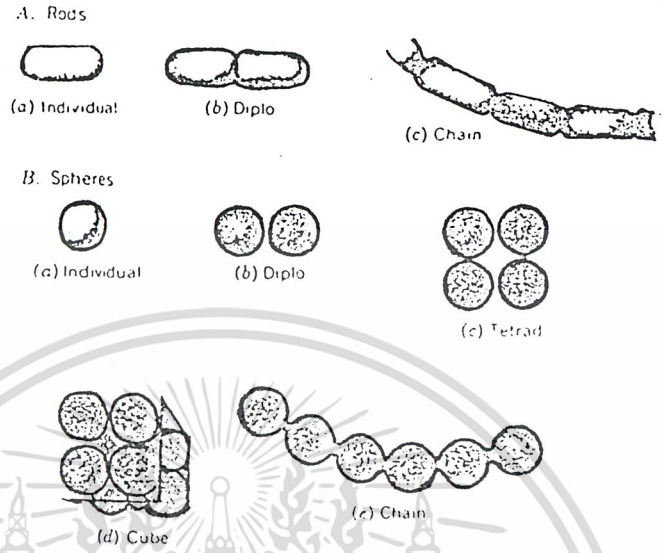
รูปร่างแท่งโค้งงอ (vibrio) ตัวอย่างเช่น *Vibrio cholera*

รูปร่างเกลียว (spirilla) ลักษณะของเซลล์เป็นแท่งยาวโค้งงอหลายโค้ง เซลล์มีขนาดกว้าง 0.5-5.0 ไมโครเมตร ยาว 6.0-15.0 ไมโครเมตร ตัวอย่างเช่น *Spirillum volutans* เซลล์แบคทีเรียประกอบด้วยน้ำร้อยละ 80 และส่วนที่เป็นของแข็งร้อยละ 20 ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์ร้อยละ 90 และสารอินทรีย์ร้อยละ 10 เซลล์แบคทีเรียมีสูตรโดยทั่วไป คือ $C_6H_7O_2N$



ก. รูปร่างแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ข. ลักษณะการรวมตัวของแบคทีเรีย

รูปที่ 2.17 รูปร่างและลักษณะการรวมตัวของแบคทีเรีย
ที่มา : ลัดดาวัลย์ (2536)

2.10 การจำแนกประเภทของแบคทีเรีย

ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย จำเป็นต้องศึกษาถึงรูปร่าง ขนาด การรวมตัว โครงสร้างและปฏิกิริยาการติดสีย้อม โดยลักษณะรูปร่างที่สำคัญพิเศษ ได้แก่ การสร้างแคปซูล การสร้างสปอร์และการรวมตัวของเซลล์

1. การสร้างแคปซูล การสร้างแคปซูลที่เป็นเมือกเหนียว ทำให้อาหารมีลักษณะเป็นเมือกหรือยางเหนียว ทำให้เสื่อมคุณภาพหรือเน่าเสีย แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างแคปซูล เพื่อทำให้สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความร้อน สารเคมี เป็นต้น แคปซูลเป็นสารประกอบพวกพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น เดกซ์ทริน(dextrin) เดกซ์แทรน(dextran) ลีแวน(levan) ปริมาณของสารเมือกที่แบคทีเรียสร้างขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ซึ่งแบคทีเรียชนิดสร้างแคปซูลได้ (capsule-forming bacteria) จะสร้างเมือกในสภาวะหนึ่ง แต่จะสร้างน้อย หรือไม่สร้างในอีกสภาวะหนึ่งซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์จะมีผลเช่นเดียวกันต่อการสร้างแคปซูลของจุลินทรีย์นั้น

2. การสร้างสปอร์ การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียเพื่อให้สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความร้อน ความแห้ง รังสีอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียทั่วไปเมื่อมีอาหารสมบูรณ์และมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะเจริญและแบ่งตัวไปตามปกติ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ขาดสารอาหารหรือได้รับความร้อน ฯลฯ แบคทีเรียก็จะตายไป แต่บางชนิดจะปรับตัวเปลี่ยนแปลงเซลล์สร้างเป็นสปอร์ขึ้นเพื่อให้สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ และเมื่ออาหารสมบูรณ์หรือสิ่งแวดล้อมดีขึ้น สปอร์ก็จะงอกกลับเป็นเซลล์ตามเดิม

แบคทีเรียส่วนใหญ่ในอาหารจะไม่สร้างสปอร์ แต่แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Clostridium* เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะสร้างสปอร์ขึ้น สปอร์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดหรือสายพันธุ์จะมีคุณสมบัติในการทนสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้แตกต่างกัน

การเกิดสปอร์มักจะเกิดในปลายระยะเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase) การสร้างสปอร์จะเกิดขึ้นได้ดีหากมีกลูโคสและไนโตรเจนเพียงพอ และมีออกซิเจนหากเป็นชนิดแอโรบ (aerobe) หรือไม่มีออกซิเจนหากเป็นแอนแอโรบ โปรตีนของเซลล์ก็จะเปลี่ยนเป็นโปรตีนของสปอร์ ในระหว่างที่มีการสร้างสปอร์ สปอร์จะเริ่มหักเหแสงและเริ่มย้อมไม่ติดสี น้ำในเอนโดสปอร์เป็นน้ำที่ไม่เป็นอิสระและมีอยู่เพียงร้อยละ 25 ของน้ำที่มีในเวเจตเททีฟเซลล์ (vegetative cells) มีความต้องการแคลเซียมไอออนมากขึ้นและมีการสร้างกรดไดพิโคลินิก(dipicolinic acid, DPA) ซึ่งจะรวมตัวกับแคลเซียมไอออนเกิดเป็นเกลือแคลเซียมไดพิโคลิเนต (calcium dipicolinate) นอกจากนี้เอนโดสปอร์จะมีเปลือกหุ้มสปอร์ที่ไม่ยอมให้สารต่างๆ ซึมเข้าข้างในซึ่งทำให้สปอร์สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมสปอร์จะเริ่มงอกภายใน เวลา 2-3 ชั่วโมง ซึ่งจะต้องมีสารจำเป็นต่อการงอกอื่นได้แก่ สารประกอบ ไนโตรเจน คาร์บอน กรดอะมิโน วัตถุดิบในการสร้างกรดนิวคลีอิก เป็นต้น หรืออาจกระตุ้นให้สปอร์งอกโดยใช้การช็อคด้วยความร้อน (heatshocking) โดยใช้อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เมื่อสปอร์เริ่มจะงอกกรดไดพิโคลินิกและสารอื่นๆ จะไหลออก สปอร์จะสูญเสียความคงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนอกจากนี้ สปอร์เมื่องอกจะย้อมติดสีแกรมและสูญเสียคุณสมบัติในการหักเหแสง ในระยะนี้เซลล์จะมีการสังเคราะห์โปรตีนและส่วนประกอบต่างๆ ที่เยื่อหุ้มสปอร์เปลี่ยนแปลงกลายเป็นผนังเซลล์และสูญเสียคุณสมบัติในการสะท้อนแสง เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมสปอร์ก็จะงอกกลายเป็นเวเจตเททีฟเซลล์และมีการแบ่งตัวขยายพันธุ์ตามปกติต่อไป

3. การรวมตัวของเซลล์ การรวมตัวหรือจับกลุ่มของเซลล์เป็นคุณสมบัติเฉพาะของแบคทีเรียบางชนิดที่จะเกิดในบางสภาวะ อาจจะจับกันเป็นก้อน (clump) หรือเป็นสายยาว (chain) ทำให้แบคทีเรียถูกทำลายได้ยากกว่าเซลล์ที่แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างสปอร์กับเวเจตเททีฟเซลล์

เวเจตเททีฟเซลล์	สปอร์
1. ไม่สะท้อนแสง	1. สะท้อนแสง
2. มีเมแทบอลิซึมสูง	2. มีเมแทบอลิซึมต่ำ
3. ไม่มี DPA	3. มี DPA
4. มีไดซัลไฟด์ (S-S) น้อย	4. มีไดซัลไฟด์ (S-S)มาก
5. มีขนาดค่อนข้างใหญ่	5. มีขนาดค่อนข้างเล็ก
6. มีผนังเซลล์	6. มีเปลือกหนาหุ้ม
7. มี DNA	7. มี1/2 DNA
8. มี mRNA	8. ไม่มี mRNA
9. ไม่ทนความร้อน	9. ทนความร้อน
10. มี polyhydroxy butyrate (PHB)	10. ไม่มี PHB
11. มีปริมาณแร่ธาตุต่ำมี Ca^{2+} 0.2-0.4%	11. มีปริมาณแร่ธาตุสูง มี Ca^{2+} 1- 4.5%
12. มีไขมัน 3-6%	12. มีไขมัน 3-15%
13. มีโปรตีน 40%	13. มีโปรตีน 70%
14. มีคาร์โบไฮเดรตมากกว่า	14. มีคาร์โบไฮเดรตน้อยกว่า

ที่มา : ลัดดาวัลย์ (2536)

แบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ แบคทีเรียที่สามารถใช้พลังงานแสงแดดโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงเหมือนพืชชั้นสูงทั่วไป (Photosynthetic bacteria) และแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการออกซิไดส์สารเคมีต่างๆ (Chemosynthetic bacteria)

สำหรับแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการออกซิไดส์สารเคมียังแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

- แบคทีเรียที่ออกซิไดส์สารอินทรีย์ได้ เช่น สามารถใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งอาหารของมันได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้ถูกเรียกว่า ออโตโทรฟิคแบคทีเรีย (autotrophic bacteria) ปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้แสดงในสมการที่ 1 และ 2

$$NH_3 + \text{Oxygen} \xrightarrow{\text{Nitrosomonas}} NO_2^- + \text{Energy} \quad (1)$$

$$NO_2^- + \text{Oxygen} \xrightarrow{\text{Nitrosomonas}} NO_3^- + \text{Energy} \quad (2)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- แบคทีเรียที่ออกซิไดส์สารอินทรีย์ได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถใช้สารอนินทรีย์เป็นอาหารได้ จะต้องใช้สารอินทรีย์เท่านั้น แบคทีเรียกลุ่มนี้ถูกเรียกว่า เฮทเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย (heterotrophic bacteria) และเป็นกลุ่มที่สำคัญที่สุด กล่าวคือเป็นกลุ่มที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ในน้ำเสีย โดยสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะความต้องการอากาศหรือออกซิเจนในการเจริญ ดังนี้

-แอโรบิกแบคทีเรีย (Aerobic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจนอิสระในการเจริญและเผาผลาญสารอินทรีย์เพื่อให้ได้พลังงาน ตัวเซลล์ และผลผลิตอื่นๆ เช่น ความร้อน น้ำ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนีย เกลือซัลเฟต เป็นต้น แบคทีเรียกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการให้อากาศมากๆ ในถังปฏิกิริยา ซึ่งทำได้โดยการกวนหรือการเป่าอากาศลงในน้ำเสีย

-แอนแอโรบิกแบคทีเรีย (Anaerobic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ หรือออกซิเจนอิสระในการเจริญ แต่จะใช้ออกซิเจนที่อยู่ในสารประกอบอินทรีย์หรืออนินทรีย์เพื่อให้ได้พลังงาน ตัวเซลล์ และผลผลิตอื่นๆ เช่น ความร้อน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ แอมโมเนีย และสารอินทรีย์อื่นๆ แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ ได้แก่ แบคทีเรียสร้างกรด (acidogenic bacteria) แบคทีเรียสร้างมีเทน (methanogenic bacteria) เป็นต้น

-แฟคัลเททีฟแอนแอโรบิกแบคทีเรีย (Facultative anaerobic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศหรือออกซิเจนอิสระ

การย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียทั้งแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจนได้แสดงไว้ในสมการที่ 3-7

$$\text{Aerobic : Organics} + \text{Oxygen} \longrightarrow CO_2 + H_2O + \text{Energy} \quad (3)$$

$$\text{Anaerobic : Organics} + NO_3^- \longrightarrow CO_2 + N_2 + \text{Energy} \quad (4)$$

$$\text{Organics} + SO_4^{2-} \longrightarrow CO_2 + H_2S + \text{Energy} \quad (5)$$

$$\text{Organics} \longrightarrow \text{Organic acids} + CO_2 + H_2O + \text{Energy} \quad (6)$$

$$CH_4 + CO_2 + \text{Energy} \quad (7)$$

2.11 แบคทีเรียสกุล Bacillus

แบคทีเรียสกุล Bacillus เป็นแบคทีเรียรูปท่อนย้อมติดสีแกรมบวกมีทั้งที่เป็นแอโรบและฟาคัลเททีฟ และมีทั้งที่เป็นพวกมีโซฟายล์(mesophile)และเทอร์โมฟายล์(thermophile) มีทั้งพวกที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อยโปรตีนได้ดีปานกลางและพวกที่ไม่สามารถย่อยโปรตีนได้เลย บางชนิดทำให้เกิดแก๊สแต่บางชนิดไม่ทำให้เกิดแก๊ส บางชนิดสามารถย่อยไขมันได้ในขณะที่บางชนิดย่อยไม่ได้ การเกิดสปอร์มักไม่ทำให้เซลล์บวม แหล่งที่มาคือดิน โดยทั่วไปสปอร์ของ *B. subtilis* ซึ่งเป็นพวกมีโซฟายล์ทนความร้อนได้ไม่เท่าสปอร์ของพวกเทอร์โมฟายล์ และสปอร์ของพวกออบบลิเกตเทอร์โมฟายล์ (obligate thermophile) เช่น *B. stearothermophilus* จะทนความร้อนได้ดีกว่าสปอร์ของพวกฟาคัลเททีฟเทอร์โมฟายล์(facultative thermophile) เช่น *B. coagulans* ชนิดที่สามารถย่อยโปรตีนได้เร็วมักทำให้เกิดเคิร์ด เช่น *B. cereus* ชนิดที่ผลิตกรดและแก๊สได้แก่ *B. polymyxa* และ *B. macerans* พวกมีโซฟายล์หลายชนิดที่ผลิตกรดได้จากกลูโคส แต่มักมีจำนวนน้อยและถูกทำให้เป็นกลางด้วยแอมโมเนียที่เกิดจากอาหารที่มีไนโตรเจน พวกเทอร์โมฟิลิก แฟลตซาวร์แบคทีเรีย (thermophilic flatsour bacteria)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียได้แก่ อาหาร ซึ่งใช้เป็นแหล่งของพลังงานและใช้ในการสร้างเซลล์ สารอาหารที่แบคทีเรียต้องการประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน กำมะถัน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ซึ่งจัดเป็นธาตุอาหารหลักนอกจากนี้ต้องมีธาตุอาหารรองซึ่งแบคทีเรียต้องการในปริมาณน้อย เช่น แมงกานีส สังกะสี เหล็ก โซเดียม เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าสภาวะแวดล้อม มีส่วนสำคัญในการเจริญของแบคทีเรีย คือ พีเอช พบว่าแบคทีเรียมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย โดยทั่วไปช่วงพีเอชสำหรับการเจริญจะมีค่าระหว่าง 5-9 และค่าที่เหมาะสมที่สุด คือ พีเอช 7 (นวลพรรณและมงคล, 2542) อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเจริญของแบคทีเรีย แบคทีเรียแบ่งเป็นสามกลุ่มตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ ไซโครฟิลิกแบคทีเรีย (psychrophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 15-20 องศาเซลเซียส เมโซฟิลิกแบคทีเรีย(mesophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 20-45 องศาเซลเซียส และเทอร์โมฟิลิกแบคทีเรีย (thermophilic bacteria) เป็นพวกที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45-55 องศาเซลเซียส

2.12 การเจริญของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ

โดยทั่วๆ ไประบบบำบัดน้ำเสียโดยวิธีทางชีววิทยาจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดเจริญปะปนกันอยู่ในระบบ จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีการเจริญแตกต่างๆกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คือ ปริมาณและชนิดของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย อุณหภูมิ พีเอช และปริมาณอากาศหรือออกซิเจน ดังนั้นการเข้าใจถึงลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อใช้ในการออกแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การควบคุมระบบการทำงาน ตลอดจนการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น ถ้าการเจริญของจุลินทรีย์ในระบบเป็นไปอย่างเหมาะสมก็จะทำให้ระบบบำบัดน้ำเสียมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งจะพบว่าจุลินทรีย์ที่มีบทบาทและมีปริมาณมากที่สุด คือแบคทีเรีย

ในระบบบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปจะพบจุลินทรีย์อยู่มากมายหลายชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเข้าใจถึงลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดที่ปนกันอยู่ (mixed cultrue) ในรูปที่ 2.18 แสดงถึงจำนวนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไป จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงจะถูกควบคุมโดย ค่าเอฟต่อเอ็ม (food to microorganisms ratio, F/M) ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนระหว่างปริมาณอาหารสำหรับจุลินทรีย์(บีโอดี/วัน) กับปริมาณของเซลล์จุลินทรีย์(เอ็มแอลเอสเอส, MLSS)

การเจริญของจุลินทรีย์แบบแบตซ์ (batch) ซึ่งเป็นการเจริญในระบบปิด โดยมีการให้อาหารแก่จุลินทรีย์เพียงครั้งเดียว ลักษณะการเจริญที่ได้แบ่งเป็น 5 ระยะดังนี้

1. ระยะแล็ก (Lag phase) เป็นระยะแรกของการเจริญ จุลินทรีย์มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมและสารอาหารใหม่ที่ได้รับ จำนวนเซลล์จะคงที่ในขณะที่ภายในเซลล์มีการสร้างสารต่างๆ และเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญ ระยะนี้จะสั้นหรือยาวขึ้นอยู่กับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในถังบำบัดน้ำเสียว่ามีมากน้อยเท่าใด

2. ระยะการเจริญแบบล็อก (Log growth phase) เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วมาก เนื่องจากมีสารอาหารในปริมาณสูง อัตราการเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียจะสูงสุด ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์จะอยู่เป็นเซลล์อิสระและส่วนมากจะเป็นแบคทีเรีย ถ้าวัดค่าเอฟต่อเอ็มในระยะนี้จะมีค่ามากกว่า 1

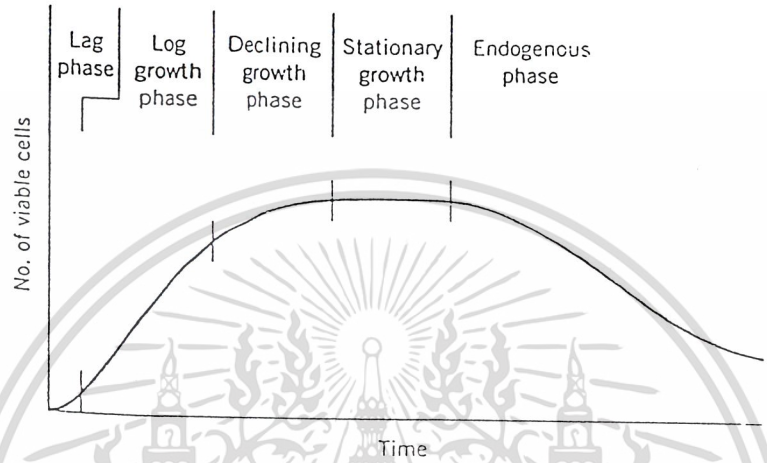
3. ระยะลดการเจริญ (Declining growth phase) เป็นระยะที่พบว่าการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์เริ่มลดลงเนื่องจากมีสารอาหารเหลืออยู่จำกัด แต่มีเพียงพอสำหรับการเจริญของเซลล์ ทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง

4. ระยะการเจริญคงที่ (Stationary growth phase) เป็นระยะที่มีจำนวนจุลินทรีย์มากที่สุด สารอาหารต่างๆ จะลดน้อยลงในขณะเดียวกันมีของเสียจากการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการเจริญจึงถูกจำกัด จุลินทรีย์บางส่วนยังสามารถเจริญต่อไปแต่บางส่วนจะเริ่มตายไป พบว่าอัตราการเจริญในระยะนี้เป็นศูนย์ จุลินทรีย์ในระยะนี้จะเกาะกลุ่มเป็นฟล็อกชีวภาพได้ดี ทำให้ตกตะกอนได้ง่าย

5. ระยะเอนโดจีเนียส (Endogeneous phase) ระยะนี้สารอาหารเหลือน้อยลงไปอีกหรือไม่มีเลย อัตราการตายของจุลินทรีย์จะเพิ่มสูงกว่าอัตราการเจริญทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงมาก ค่าเอฟต่อเอ็มอยู่ระหว่างช่วง 0.4-0.1 ในระยะปลายพบว่าค่าเอฟต่อเอ็มจะต่ำกว่า 0.1 ในระยะนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียมีจำนวนลดลงและพบว่ามีโปรโตซัวเพิ่มมากขึ้น จุลินทรีย์ที่เหลืออยู่จะกินจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ตาย ถ้าไม่มีการเพิ่มสารอาหารใหม่ลงไปจุลินทรีย์ก็จะตายหมดในที่สุด



รูปที่ 2.18 กราฟการเจริญของจุลินทรีย์ในการเลี้ยงแบบแบตช์

ที่มา : นวลพรรณและมงคล (2542)

การบำบัดน้ำเสียโดยวิธีทางชีววิทยาแบบใช้อากาศ จุลินทรีย์ในน้ำเสียจะใช้สารอินทรีย์และธาตุอาหาร (nutrient) เพื่อเปลี่ยนเป็นเซลล์ใหม่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และผลผลิตอื่นๆ ดังสมการ

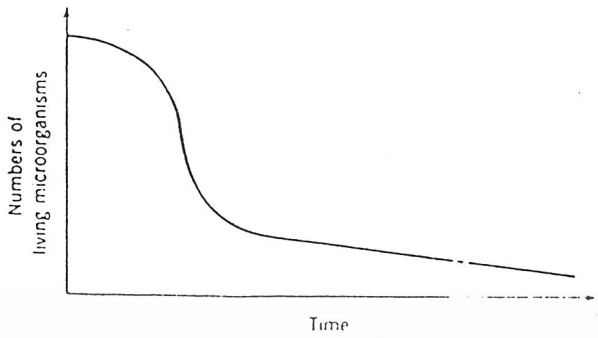
$$\text{สารอินทรีย์} + \text{ธาตุอาหาร} \xrightarrow[\text{จุลินทรีย์}]{\text{อากาศ}} C_5H_7O_2N + CO_2 + H_2O + NH_3 + \text{พลังงาน}$$

จะเห็นได้ว่าสารอินทรีย์ในน้ำเสียจะถูกเปลี่ยนมาเป็นเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งสามารถแยกออกจากน้ำได้โดยการตกตะกอนในถังตกตะกอนขั้นที่สอง น้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วก็จะกลายเป็นน้ำสะอาดและปล่อยทิ้งไปได้โดยไม่เกิดการเน่าเสีย

การตายของจุลินทรีย์

การตายของจุลินทรีย์ที่เกิดจากสาเหตุเช่นความเป็นกรด-ด่าง สูงหรือต่ำเกินไป อุณหภูมิไม่เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 2.19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.19 ลักษณะการตายของจุลินทรีย์
ที่มา : ลัดดาวัลย์(2536)

2.13 องค์ประกอบสำคัญที่มีผลต่อการตายของจุลินทรีย์

1. ความร้อน ความร้อนมีส่วนทำให้โปรตีนถูกทำลาย ตัวอย่างเช่น ถ้าจุลินทรีย์ประเภท mesophilic จะอยู่ไม่ได้เมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 45 องศาเซลเซียส และถ้าจุลินทรีย์เป็นประเภท thermophilic จะอยู่ไม่ได้เมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 85 องศาเซลเซียส
2. สารเคมี สารเคมีบางชนิดมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค ตัวอย่างเช่น คลอรีน ฟีนอล เป็นต้น นอกจากนี้ผงซักฟอกบางชนิดมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรคได้ด้วย
3. โลหะหนัก โลหะบางชนิดมีพิษต่อจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น ปรอท ตะกั่ว เงิน และอาร์เซนิค เป็นต้น
4. สารปฏิชีวนะ สารประกอบบางชนิดมีคุณสมบัติที่ไปทำลายกระบวนการย่อยสลายสารอาหารของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น ซัลฟานิลาไมด์ เพนนิซิลิน เป็นต้น
5. พีเอช พีเอชมีผลอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต โดยทั่วไปจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่พีเอชน้อยกว่า 4 หรือมากกว่า 9.5 (ลัดดาวัลย์,2536) การควบคุมพีเอชจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในระบบบำบัดน้ำเสีย เพื่อให้จุลินทรีย์เติบโตได้ดีที่สุด

2.14 ระบบบำบัดน้ำเสีย Activated Sludge

ระบบกำจัดน้ำเสียแบบนี้เป็นการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ ในสภาวะที่ต้องการ O_2 น้ำเสียจะเข้าสู่ถังเป่าอากาศซึ่งจุลินทรีย์จะย่อยสารอินทรีย์ในถังนี้ และส่งต่อไปยังถังตกตะกอน ซึ่งในถังนี้ activated sludge จะตกตะกอนและปล่อยน้ำออกไป ทำให้น้ำที่ออกจากถังนี้ใสและมีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ บางส่วนของ sludge จะกลับคืนสู่ถังเป่าอากาศอีก ส่วนที่เหลือจะถูกกำจัดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับระบบ activated sludge จะมีทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว โรติเฟอร์ และบางครั้งมีพวกหนอนด้วย แต่แบคทีเรียเป็นกลุ่มที่สำคัญที่สุด เพราะมันเป็นตัวย่อยสลายสารอินทรีย์ ปฏิกิริยาใน activated sludge เกิดจากแบคทีเรียทุกชนิด

ลักษณะของสารอินทรีย์ในของเสียที่ถูกย่อยสลายจะสามารถบอกได้ว่า แบคทีเรียชนิดใดมีบทบาทสำคัญ ในของเสียที่มีโปรตีนสูงจะพบพวก *Alcaligenes. Flavobacterium* และ *Bacillus* ในขณะที่พวกคาร์โบไฮเดรทหรือไฮโดรคาร์บอน จะมีพวก *Psuedomonas* อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การวิจัยและการดำเนินงาน

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ตอนที่ 1 การเตรียมเชื้อยีสต์และเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ในการทดลอง

1. เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จากภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จากภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
3. เครื่องแก้ว
4. เครื่องชั่ง
5. เครื่องเขย่า (Shaker), Gellenkamp Orbital Shaker
6. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven), Gellenkamp Orbital Incubator
7. เครื่องวัดพีเอช (pH meter), Denver Instrument Model 250
8. มอลต์เอกซ์แทรกต์ (Malt Extract Difco)
9. ยีสต์เอกซ์แทรกต์ (Bacto Yeast Extract)
10. เพปโทน (Bacto Peptone)
11. กลูโคส (Glucose)
12. บีฟเอกซ์แทรกต์ (Beef extract)
13. ผงวุ้นตรานางเงือก
14. แอมโมเนียมซัลเฟต
15. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
16. โพแทสเซียมคลอไรด์
17. น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอนที่ 2 การตรวจวิเคราะห์

1. เครื่องแก้ว
2. เครื่อง pH meter
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง 6405 UV/ Vis Spectrophotometer , JENWAY
4. เครื่องควบแน่นที่มี jacket ขนาด 300 มล. ปลายอ่างเป็นแบบ ground glass jointขนาด 24/40
5. เตาชนิด hot plate
6. ชุดย่อยสลาย (Digestion apparatus) ประกอบด้วยขวดเคลดาห์ล ขนาด 500 มล. และเตาให้ความร้อน (heating mantal)
7. ชุดกลั่น (Distillation apparatus)
8. น้ำยาสำหรับย่อยสลาย
9. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์-โซเดียมไทโอซัลเฟต
10. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์
11. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 0.250 นอร์มัล
12. สารละลายกรดซัลฟูริกที่เติมซิลเวอร์ซัลเฟต
13. สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.05 นอร์มัล
14. เมอร์คิวรี่ (II) ซัลเฟต
15. สารละสายเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์
16. สารละลายกรดซัลฟูริก 5 นอร์มัล
17. สารละลายแอนติโมนีโพแทสเซียมทาเทรต
18. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท
19. สารละลายแอสคอบิก 0.1 โมลาร์
20. สารละลายสต็อคฟอสเฟต
21. สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต

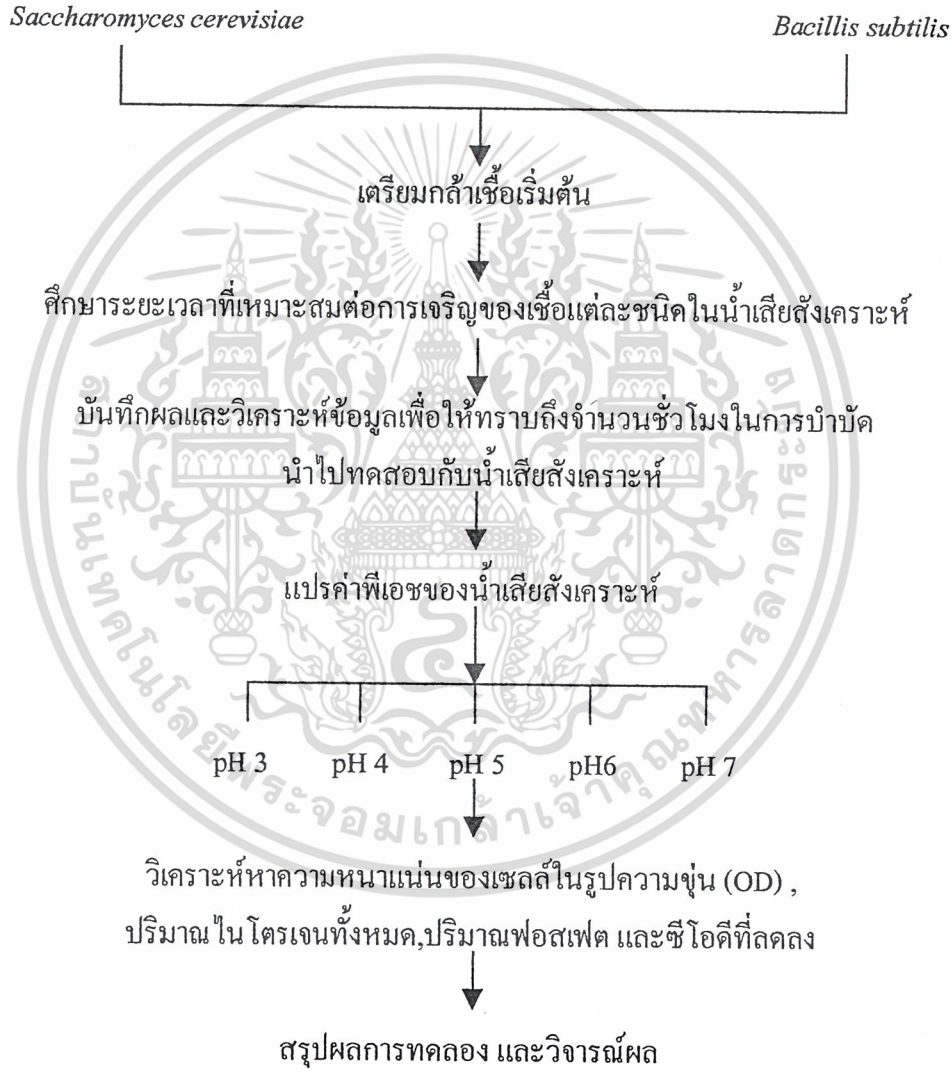
3.2 แหล่งที่มาของตัวอย่างน้ำเสีย

สังเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสีย (ภาคผนวก ก) โดยแปรค่าพีเอชเป็น 3, 4, 5, 6 และ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การวางแผนการทดลอง

เลือกใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยทำการเลือกสภาวะที่เหมาะสมในบำบัด โดยแสดงแผนผังการทดลองได้ดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4. การเตรียมเชื้อยีสต์/ แบคทีเรียสำหรับใช้ในการทดลอง

ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อ *S. cerevisiae* และ *B. subtilis* ลงในอาหารเหลว Yeast Malt Extract broth ,YMB (ภาคผนวก ก) และ Nutrient broth , NB (ภาคผนวก ก) 100 มล. ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. (สำหรับอาหาร YMB ปรับพีเอชเป็น 3.5) นำไปให้อากาศบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สำหรับยีสต์ และ 595 นาโนเมตร สำหรับแบคทีเรีย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความขุ่น 0.5 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อไป

3.5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำน้ำเสียสังเคราะห์ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตร 100 มล. (ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 3.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มัล สำหรับเลี้ยงยีสต์)นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4 มาปริมาตร 10 มล. เติมลงในฟลาสก์แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ณ. อุณหภูมิห้อง
3. ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า OD ที่ 660 นาโนเมตรสำหรับยีสต์ และ 595 นาโนเมตรสำหรับแบคทีเรีย (ถ้า OD ที่วัดได้เกิน 1 ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น)นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่า OD ที่วัดได้กับระยะเวลาที่ทำการเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

3.6 การศึกษาค่าพีเอชในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *S.cerevisiae* และ *B. subtilis* รวมทั้งค่า COD และปริมาณไนโตรเจนและฟอสเฟตที่ลดลง

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียมน้ำตัวอย่าง(ภาคผนวก ก) 100 มล. ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล.
2. ปรับค่า pH ของน้ำเสียสังเคราะห์เป็น 3, 4, 5, 6 และ 7
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น
4. วิเคราะห์หาค่า COD, ไนโตรเจน, ฟอสเฟต ของน้ำเสียสังเคราะห์ก่อนใส่เชื้อเริ่มต้นแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4 มาปริมาตร 10 มล. เติมลงในฟลาสก์แล้วนำไปวัดค่า OD ณ. เวลาที่ 0 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ณ. เวลาที่เชื้อแต่ละตัวมีอัตราการเจริญสูงสุดจากข้อ 3.5
6. ภายหลังการเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดนำน้ำเสียสังเคราะห์มาวิเคราะห์หา COD, ไนโตรเจน, ฟอสเฟตรวมทั้ง OD

3.7 การตรวจวิเคราะห์

3.7.1 การศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดค่า COD

การวิเคราะห์หาซีโอดีด้วยวิธีรีฟลักซ์แบบเปิด(Open Reflux, Titrimetric Method)

1) เติมน้ำตัวอย่างลงในขวดรีฟลักซ์ 10 มล. แล้วเติมเมอร์คิวรี่ (II) ซัลเฟตประมาณ 0.2 กรัม ใส่ลูกแก้ว 5 – 6 ชิ้น
2) เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.250 นอร์มัล จำนวน 5.0 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน
3) นำไปต่อกับเครื่องควบแน่น
4) ค่อยๆเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ซึ่งมีซิลเวอร์ซัลเฟตเจือปนอยู่ จำนวน 15.0 มล. ลงไป
5) เปิดไฟและเปิดน้ำให้น้ำไหลเข้าคอนเดนเซอร์อย่างสม่ำเสมอ รีฟลักซ์หรือต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง
6) ทิ้งให้เย็นแล้วล้างเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่น 40 มล. แล้วถอดออกมาไทเทรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 นอร์มัล โดยใช้เฟอร์โรอีนเป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติจะมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองไปเป็น ฟ้าอมเขียวและน้ำตาลแดง
7) บันทึกปริมาณของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้
8) ทำแบลงค์พร้อมกับตัวอย่างน้ำโดยใช้น้ำกลั่น 10 มล . สารเคมีต่างๆใช้เท่ากันกับตัวอย่างน้ำ ทำการรีฟลักซ์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทุกประการ

วิธีการคำนวณ

$$\text{ซีโอดี (มก. } O_2/\text{ล.)} = \frac{(a-b) \times N \times 8000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (มล.)}}$$

โดยที่ a = ปริมาณ FAS ที่ใช้ไทเทรตกับแบลงค์ (มล.)

b = ปริมาณ FAS ที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่างน้ำ (มล.)

N = ความเข้มข้นของ FAS (นอร์มัล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.2 การศึกษาปริมาณทีเคเอ็นไนโตรเจน (TKN)

- การย่อยสลาย (Digestion)

1.) นำน้ำตัวอย่าง 250 มล. ถ่ายใส่ขวดเคลดาห์ล แล้วเติมน้ำยาสำหรับย่อยสลาย 50 มล. ลงไป

2.) นำไปต้มในตู้ดวันจนสารละลายใสหรือมีสีเหลืองฟาง

3.) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงเจือจางด้วยน้ำกลั่น 300 มล. เติมฟีนอล์ฟทาลีน 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน

4.) เติมน้ำยาโซเดียมโฮดรอกไซด์ไทโอซัลเฟต 50 มล. ผสมให้เข้ากัน

- **การกลั่น (Distillation)**

1.) นำตัวอย่างที่ย่อยแล้วมาต่อเข้าเครื่องกลั่น โดยให้ส่วนที่กลั่นออกมาได้ จุ่มอยู่ใต้สารละลายกรดบอริกที่เติมอินดิเคเตอร์ 50 มล.

2.) กลั่นจนได้สารละลายออกมามีปริมาตรรวมประมาณ 200-250 มล.

3.) ทำแบลงค์โดยทำทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับการหาในตัวอย่าง แต่ไม่ต้องนำไปย่อยสลาย

- **การไทเทรต (titration)**

1.) นำตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกลั่นไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มัล

2.) ที่จุดยุติสีจะเปลี่ยนจากเขียวเป็นม่วงอ่อน

วิธีการคำนวณ

$$\text{ทีเคเอ็น (มก.N/ล.)} = \frac{(A-B) \times 280}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (มล.)}}$$

โดยที่ A = ปริมาตรกรดซัลฟูริกที่ใช้กับตัวอย่างน้ำ (มล.)

B = ปริมาตรกรดซวัลฟูริกที่ใช้กับแบลงค์ (มล.)

หรือ สารอินทรีย์ไนโตรเจน = ทีเคเอ็น – แอมโมเนียไนโตรเจน

3.7.3 การหาปริมาณออโธฟอสเฟต

การหาปริมาณออโธฟอสเฟตด้วยวิธีแอสคอบิกแอซิด

1.) ปิเปตน้ำตัวอย่าง 50 มล. เติมฟีนอล์ฟทาลีน 1 หยด

2.) ถ้าได้สีแดงให้เติมกรดซัลฟูริก 5 นอร์มัล ทีละหยดจนสีแดงหายไป

3.) เติมน้ำยารวม 8.0 มล. เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

4.) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร

เตรียมกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.15 – 1.30 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.) ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตมา 0 , 2 , 6 , 10 ,16 และ 24 มิลลิลิตรใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.) เติมน้ำกลั่นให้ถึงขีด แล้วจึงเติมน้ำยารวม 8.0 มล. เขย่าให้เข้ากัน

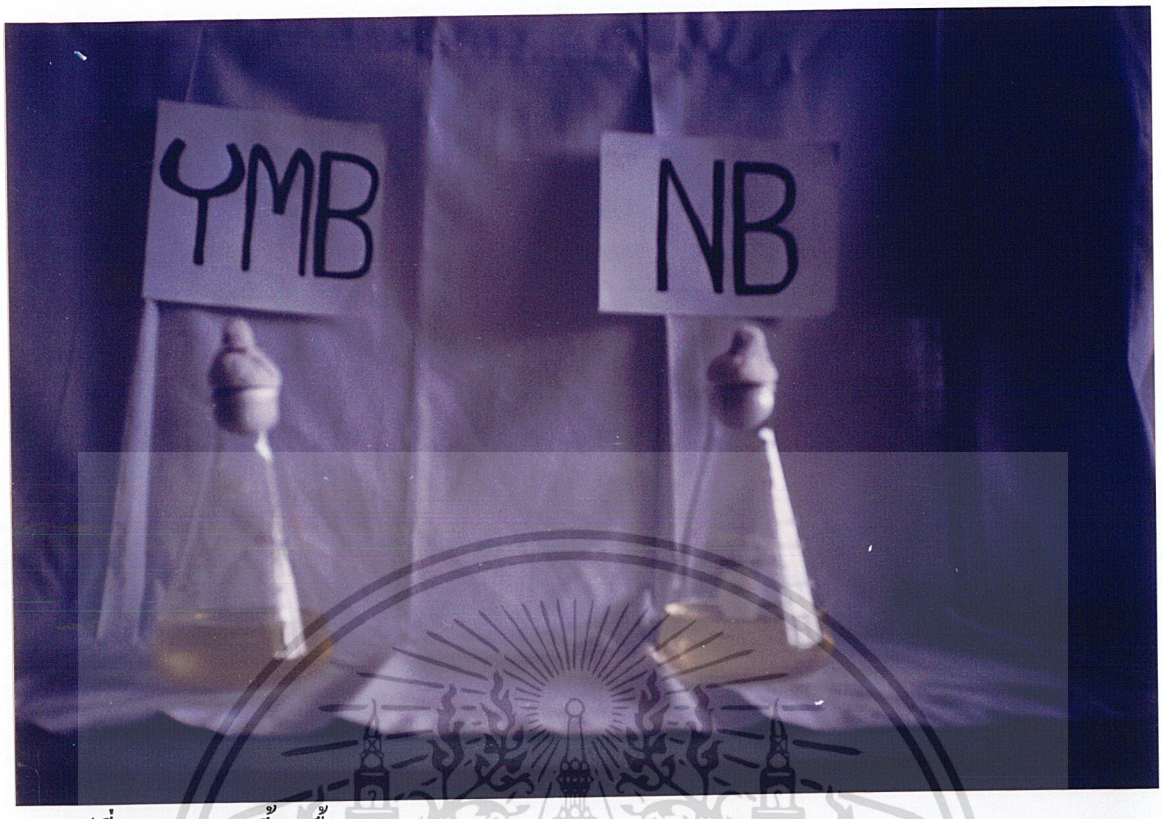
3.) ได้สารละลายฟอสเฟตที่มีความเข้มข้น 0 , 5 , 15 , 25 , 40 และ 60 ไมโครกรัมฟอสฟอรัส

4.) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 880 นาโนเมตร

วิธีการคำนวณ

$$\text{ฟอสเฟต (มก.P /ล.)} = \frac{\text{ไมโครกรัมที่อ่านได้จากกราฟ}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (มล.)}}$$

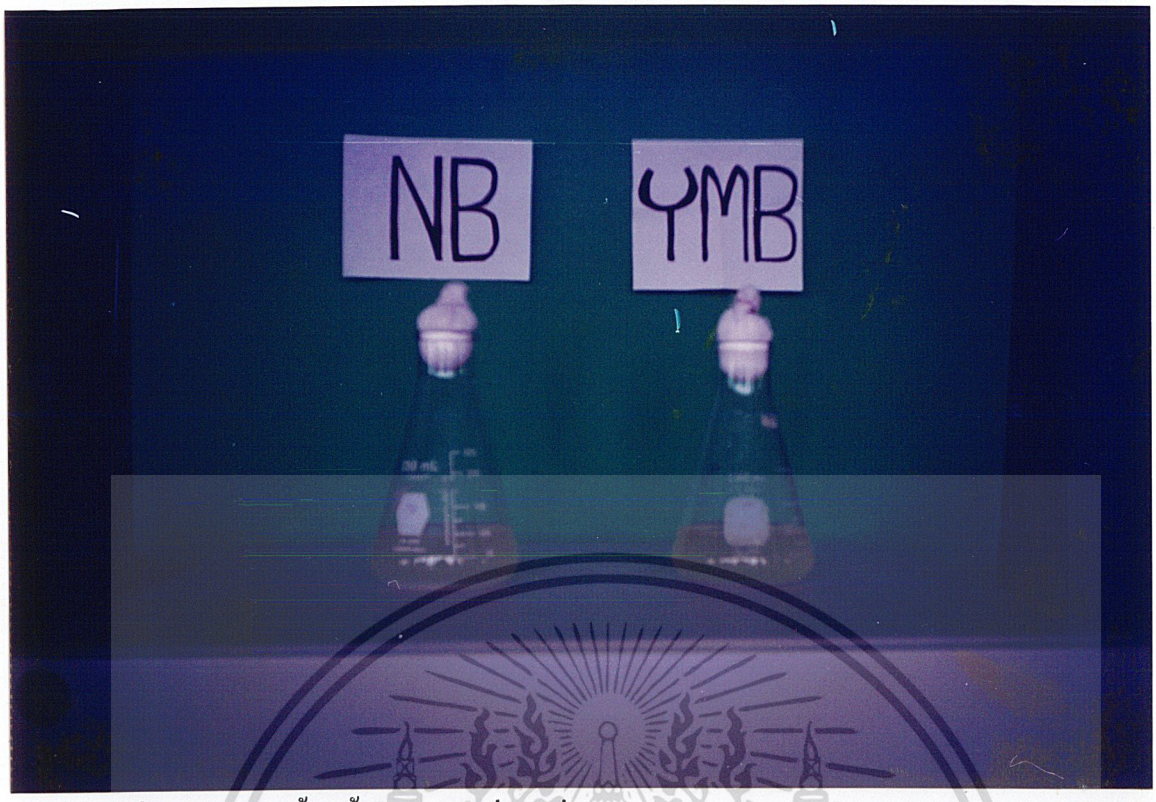
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



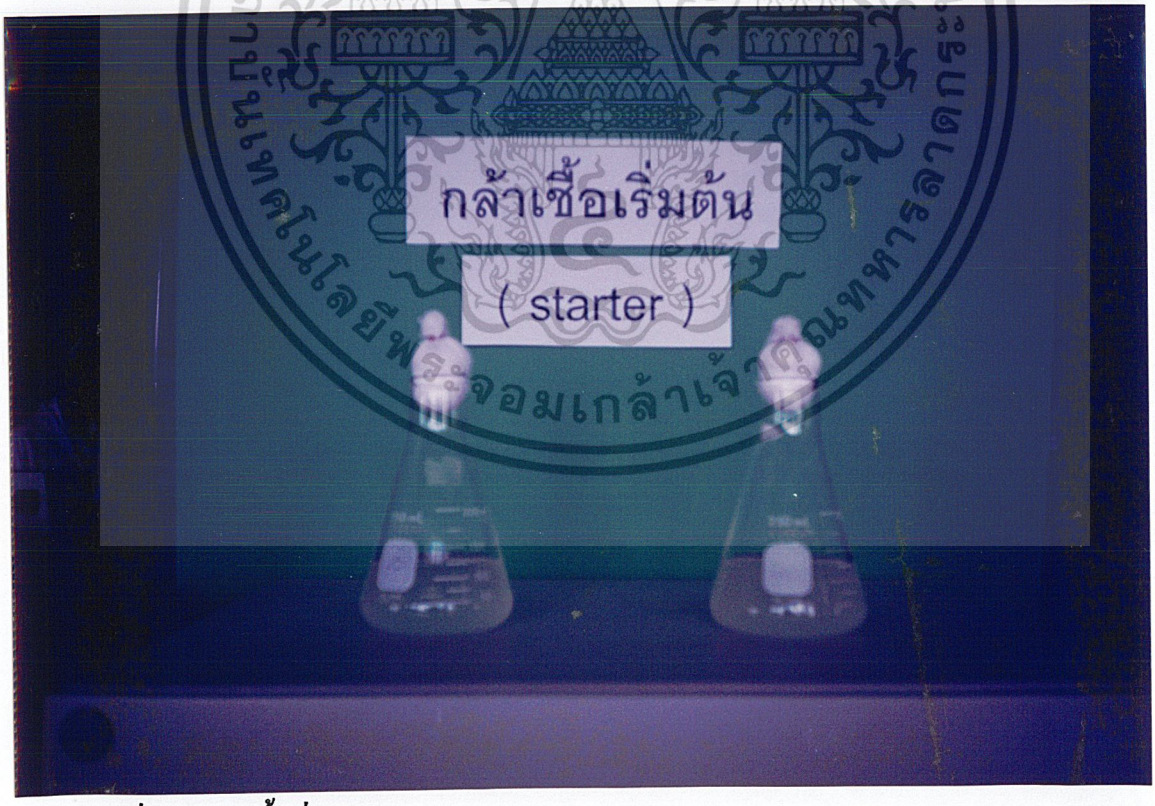
รูปที่ 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

รูปที่ 3.2 การเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

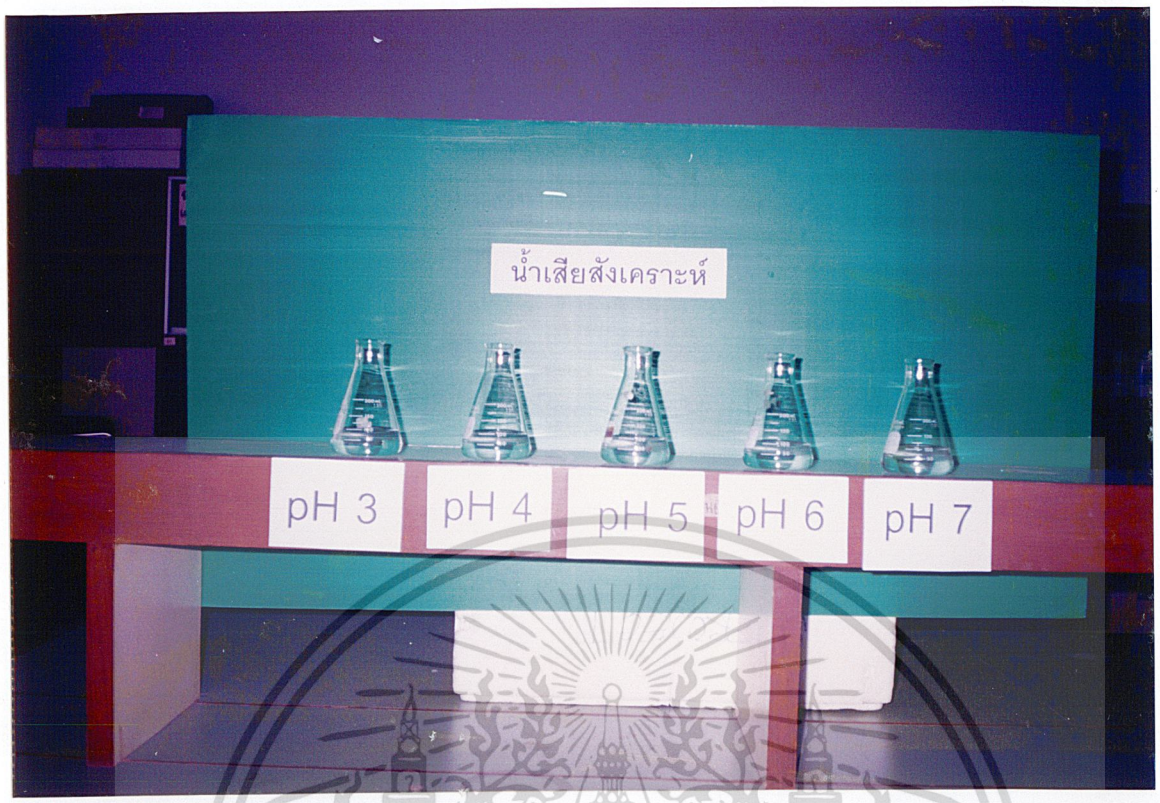


รูปที่ 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อหลังนำไปปั่นเหวี่ยง

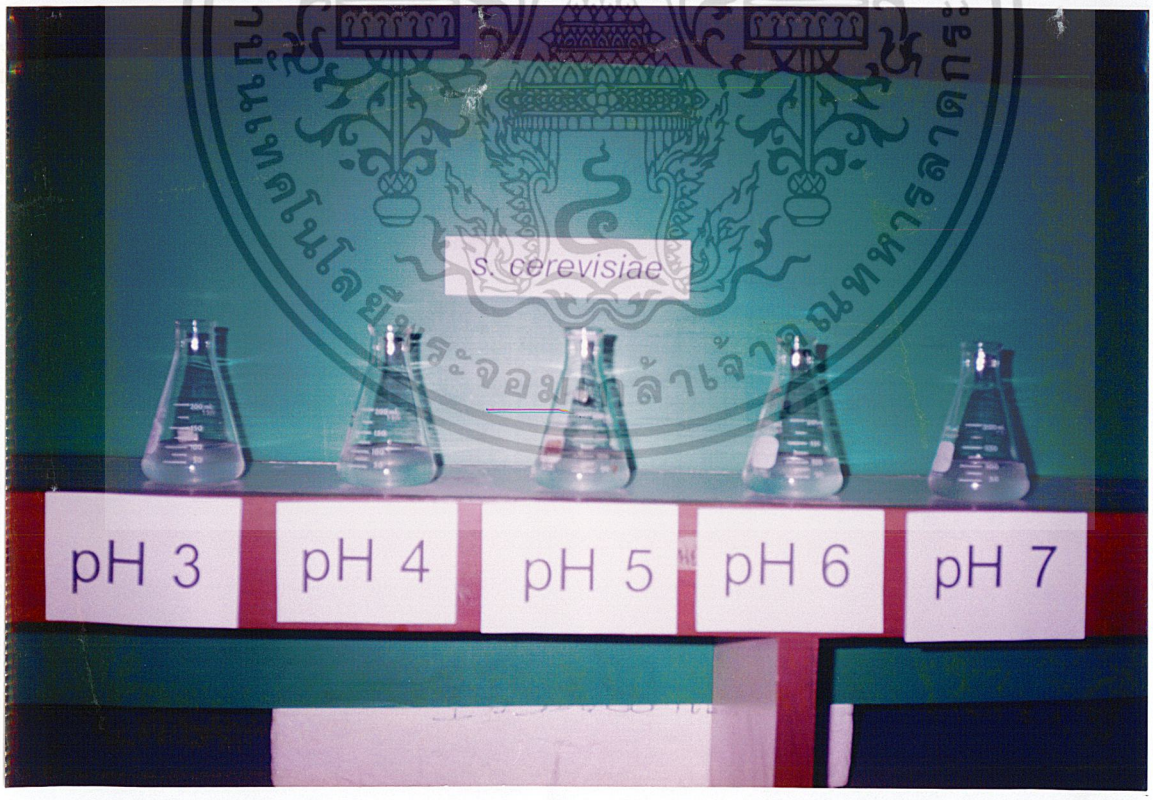


รูปที่ 3.4 กล้าเชื้อเริ่มต้น (starter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

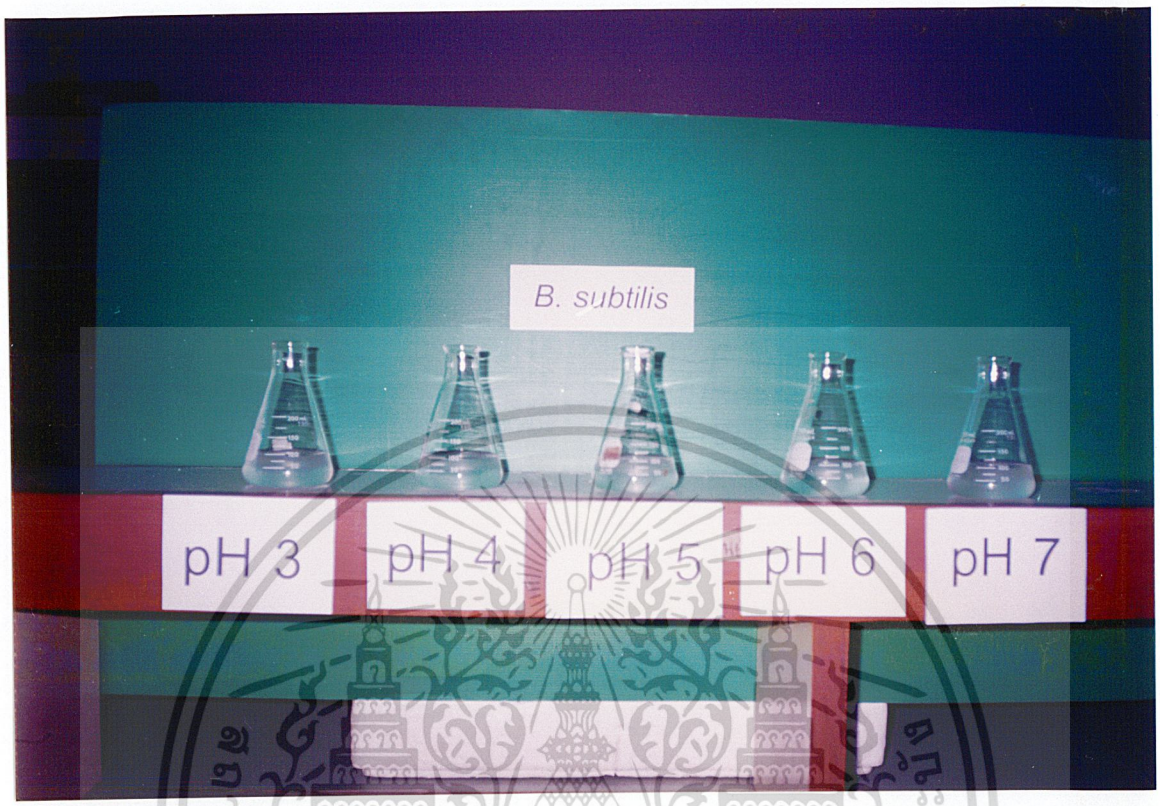


รูปที่ 3.5 น้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชต่างๆ



รูปที่ 3.6 น้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัดด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.7 น้ำเสียสังเคราะห์หลังผ่านการบำบัดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อ *Bacillus subtilis*

ในการทดลองนี้ได้ทำการถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นลงในน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตกับเวลา โดยนำไปให้อากาศบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ / นาที ณ. อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สำหรับยีสต์และที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับแบคทีเรีย บันทึกผลได้ดังตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เวลาต่างๆ

ชั่วโมงที่	ค่า OD ที่ ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย
0	0.067	0.062	0.056	0.055	0.060
2	0.065	0.063	0.057	0.053	0.060
4	0.067	0.065	0.059	0.057	0.062
6	0.072	0.070	0.063	0.056	0.065
8	0.070	0.068	0.069	0.063	0.067
10	0.066	0.068	0.073	0.067	0.069
12	0.062	0.075	0.078	0.069	0.071
14	0.065	0.072	0.077	0.070	0.071
16	0.065	0.087	0.070	0.070	0.073
18	0.083	0.079	0.083	0.082	0.082
20	0.082	0.078	0.078	0.068	0.077
22	0.077	0.073	0.076	0.074	0.075
24	0.078	0.069	0.070	0.073	0.073

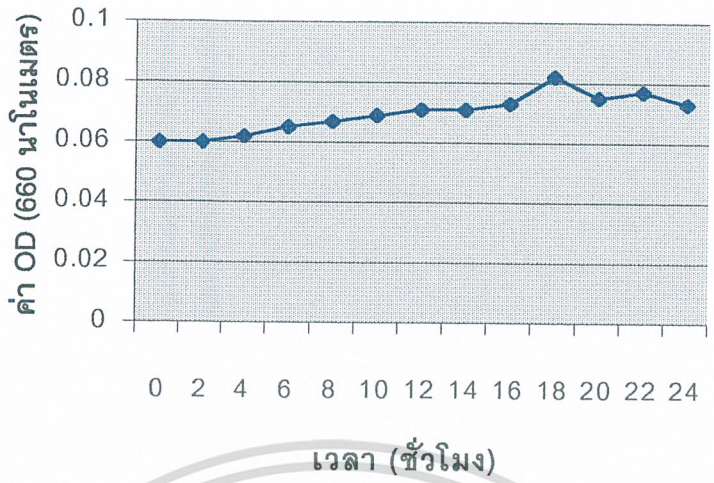
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่เวลาต่างๆ

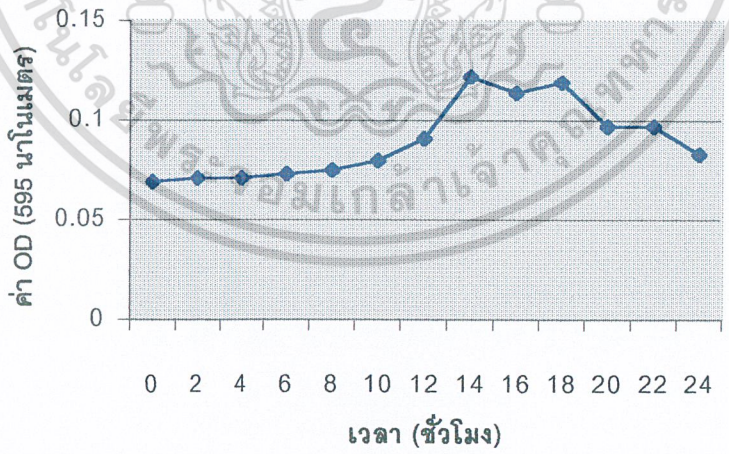
ชั่วโมงที่	ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย
0	0.086	0.054	0.105	0.049	0.069
2	0.071	0.056	0.109	0.051	0.071
4	0.068	0.058	0.109	0.049	0.071
6	0.075	0.059	0.110	0.050	0.073
8	0.073	0.062	0.115	0.053	0.075
10	0.138	0.090	0.128	0.065	0.080
12	0.131	0.058	0.125	0.052	0.091
14	0.163	0.087	0.177	0.063	0.122
16	0.134	0.083	0.170	0.069	0.114
18	0.166	0.080	0.159	0.073	0.119
20	0.093	0.073	0.153	0.067	0.097
22	0.140	0.072	0.115	0.062	0.097
24	0.119	0.068	0.128	0.059	0.093

จากตารางที่ 4.1 และ 4.2 จะเห็นได้ว่า *Saccharomyces cerevisiae* และ *Bacillus subtilis* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในน้ำเสียสังเคราะห์ ณ. ชั่วโมงที่ 18 และ 14 ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2) ดังนั้นจึงได้เลือกเอาชั่วโมงดังกล่าวมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ของค่า OD ที่เวลาต่าง ๆของ *S.cerevisiae*



รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ของค่า OD ที่เวลาต่าง ๆของ *B.subtilis*

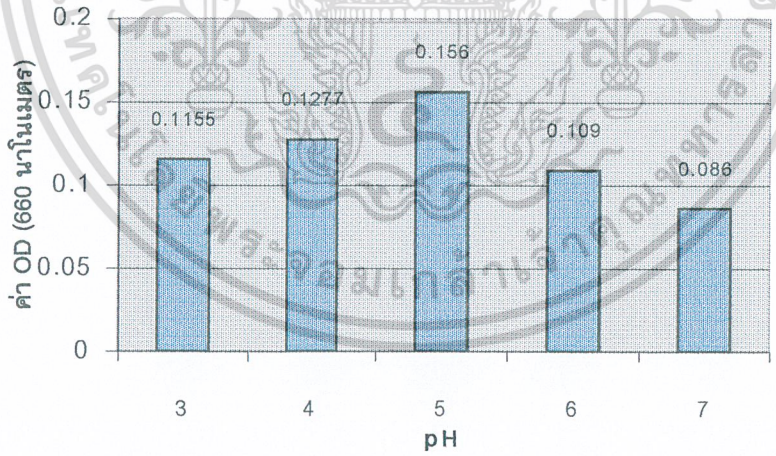
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาค่า pH ในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* และ *B.subtilis* รวมทั้งค่าซีโอดี และปริมาณไนโตรเจนและฟอสเฟตที่ลดลง

การทดลองเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มล. ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. แล้วนำมาปรับค่าพีเอช เป็น 3,4,5,6 และ7 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มัล จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นของเชื้อแต่ละชนิดลงในฟลาสก์ 10 มล. นำไปเขย่า 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 และ 14 ชั่วโมง สำหรับ *S.cerevisiae* และ *B.subtilis* เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ค่าซีโอดี ปริมาณไนโตรเจนและปริมาณฟอสเฟตที่ลดลง

4.2.1. ผลของค่าพีเอชในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *S.cerevisiae* และ *B.subtilis*

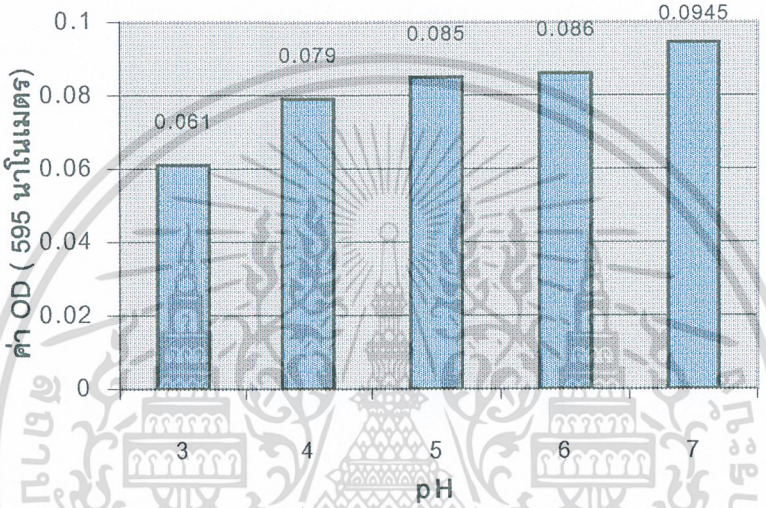
จากการทดลองพบว่า จากการเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีพีเอชต่างๆ กันที่เวลา 18 ชั่วโมง พบว่าน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าพีเอช 5.0 จะมีการเจริญเติบโตของเชื้อสูงสุด วัดค่า OD ที่ 660 นาโนเมตรได้ 0.1560 ขณะที่พีเอช 3 , 4 , 6 และ 7 จะมีการเจริญของเชื้อ 0.1155 , 0.1277 , 0.1090 และ0.0860 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* ใน น้ำเสียสังเคราะห์ ที่pH ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการเลี้ยง *B.subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีพีเอชต่างๆกัน ที่เวลา 14 ชั่วโมงพบว่า *B.subtilis* จะเจริญได้ดีที่สุดในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าพีเอช 7.0 โดยสามารถวัดค่า OD ที่ 595 นาโนเมตรได้ 0.0945 ขณะที่น้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอช 3 , 4 , 5 และ 6 สามารถวัด OD ได้ 0.061 , 0.079 , 0.085 และ 0.086 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.4



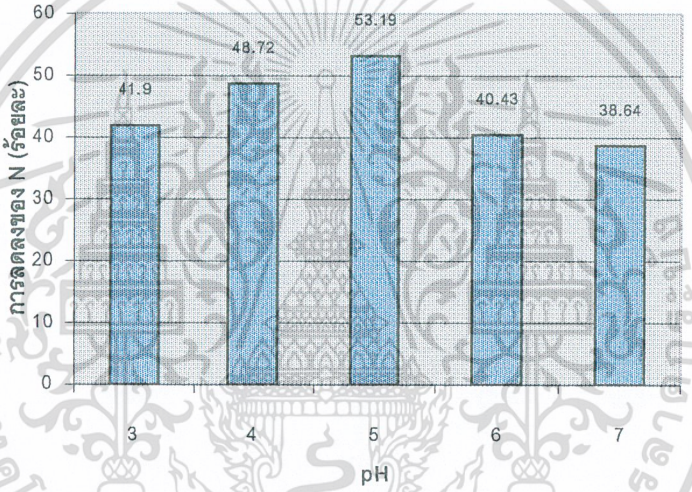
รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่ pH ต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S.cerevisiae* กับ *B.subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชให้มีค่าต่างๆ พบว่า *S.cerevisiae* สามารถเจริญได้ดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 5.0 ขณะที่การใช้ *B.subtilis* สามารถเจริญได้ดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 7.0 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Vu Anh-Tuan (1976) พบว่าเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด พีเอชอยู่ในช่วง 3.5 – 5.5 และสำหรับแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางคือมีพีเอชอยู่ในช่วง 6 – 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.ผลของค่าพีเอชในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีต่อปริมาณไนโตรเจน เมื่อทำการเลี้ยง *S.cerevisiae* และ *B.subtilis*

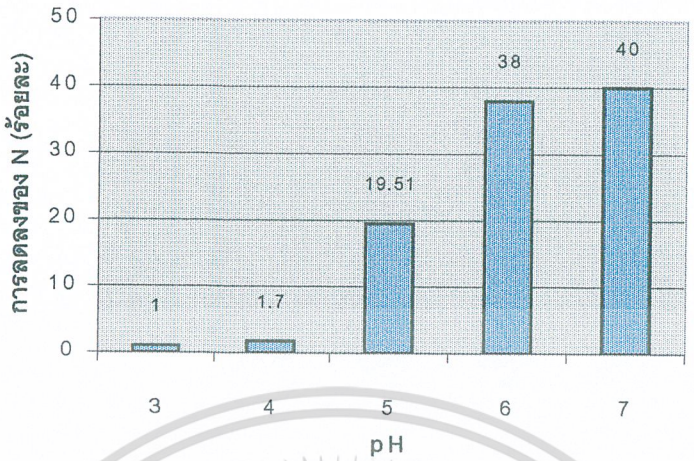
จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *S.cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีพีเอชต่างๆกันเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปริมาณไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์ลดลง โดยพบว่าน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 5.0 จะมีปริมาณไนโตรเจนลดลงมากที่สุดคือร้อยละ53.19 ขณะที่น้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 3 , 4 , 6 และ 7 มีปริมาณไนโตรเจนลดลงร้อยละ 41.90 , 48.72 , 40.43 และ 38.64 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *S. cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ pH ต่าง ๆ

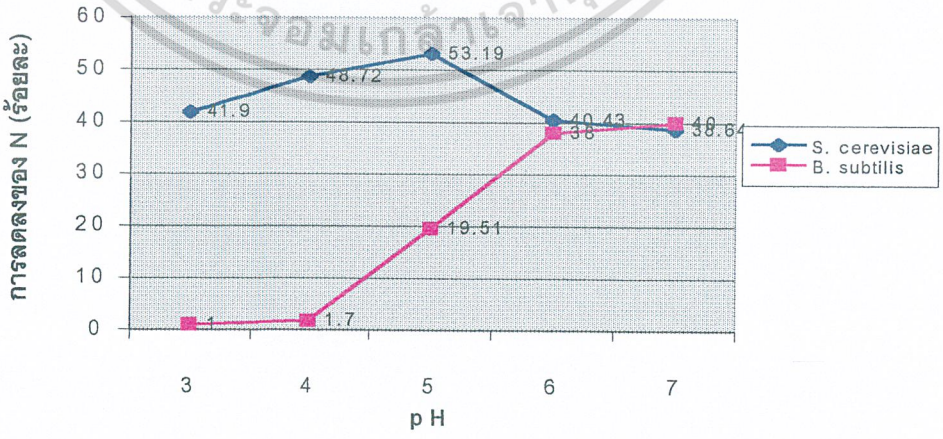
สำหรับการเลี้ยง *B.subtilis*ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีพีเอชต่างๆกัน เป็นเวลา 14 ชั่วโมง พบว่าน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 7.0 จะมีปริมาณไนโตรเจนลดลงมากที่สุดคือร้อยละ 40.0 รองลงมาเป็นน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 6 , 5 , 4 และ 3 ตามลำดับโดยพบว่ามีปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงร้อยละ 38.0 , 19.51 , 1.70 และ 1.00 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *B. subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ pH ต่างๆ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อนำน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 5.0 มาเลี้ยงเชื้อ *S.cerevisiae* เชื้อสามารถเจริญได้ดีและปริมาณไนโตรเจนก็ลดลงมากที่สุดที่พีเอชนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชอื่น เนื่องมาจาก *S.cerevisiae* จะนำไนโตรเจนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างส่วนประกอบของเซลล์ สำหรับ *B.subtilis* ก็เช่นเดียวกัน โดยพบว่าสามารถเจริญได้ดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 7.0 และที่พีเอชนี้ปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงก็มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชอื่น ดังแสดงในรูปที่ 4.7

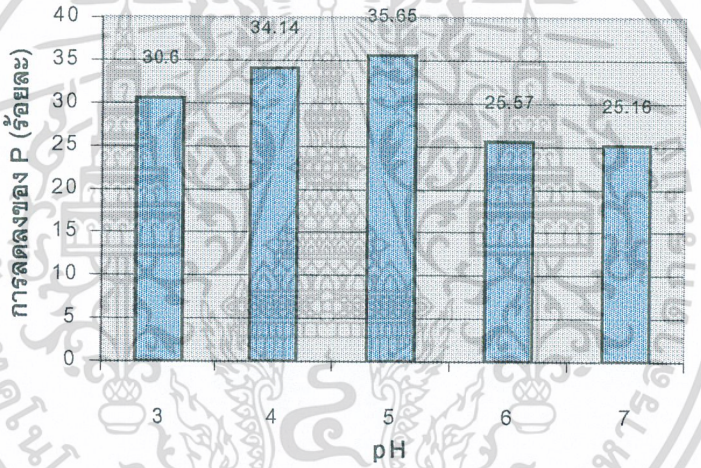


รูปที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบ ปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงของ *S. cerevisiae* และ *B. subtilis* ที่ pH ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3.ผลของค่าพีเอชในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีต่อปริมาณฟอสเฟต เมื่อทำการเลี้ยง *S.cerevisiae* และ *B.subtilis*

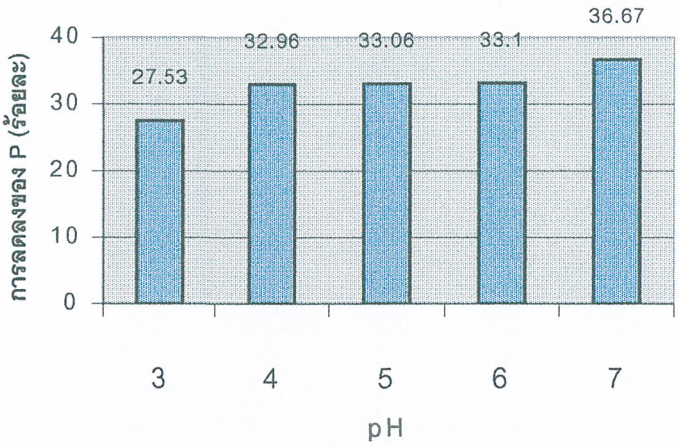
จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *S.cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีพีเอชต่างๆกันเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปริมาณฟอสเฟตในน้ำเสียสังเคราะห์ลดลง โดยพบว่าน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 5.0 จะมีปริมาณฟอสเฟตลดลงสูงที่สุดคือร้อยละ 35.65 ขณะที่น้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 3 , 4 , 6 และ 7 มีปริมาณฟอสเฟตลดลงร้อยละ 30.60 , 34.14 , 25.57 และ 25.16 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณฟอสเฟตที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *S. cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ pH ต่างๆ

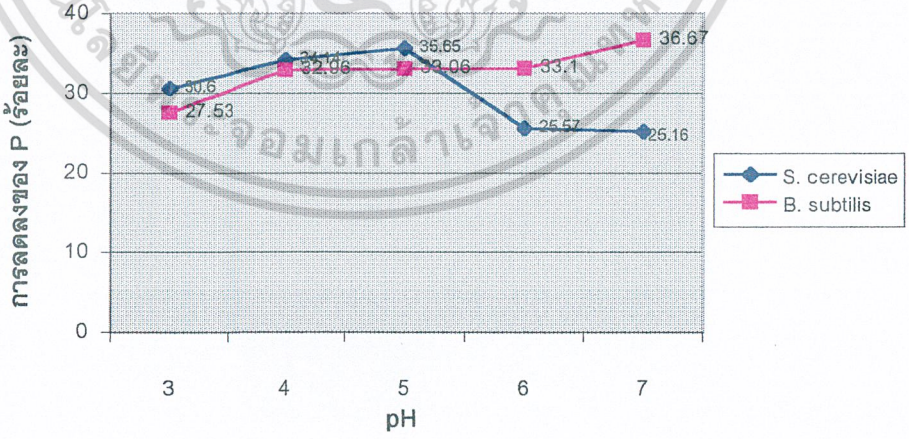
สำหรับการเลี้ยง *B.subtilis*ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีพีเอชต่างๆกัน เป็นเวลา 14 ชั่วโมง พบว่าน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 7.0 จะมีปริมาณฟอสเฟตลดลงมากที่สุดคือร้อยละ 36.67 ขณะที่น้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 3 , 4 , 5 และ 6 มีปริมาณฟอสเฟตลดลงร้อยละ 27.53 , 32.96 , 33.06 และ 33.10 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณฟอสเฟตที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *B. subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ pH ต่างๆ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อนำน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 5.0 มาเลี้ยงเชื้อ *S.cerevisiae* เชื้อสามารถเจริญได้ดีและปริมาณฟอสเฟตก็ลดลงมากที่สุดที่พีเอชนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชอื่น สำหรับ *B.subtilis* ก็เช่นเดียวกัน โดยพบว่าสามารถเจริญได้ดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 7.0 และที่พีเอชนี้ปริมาณฟอสเฟตที่ลดลงก็มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชอื่น เนื่องจากฟอสเฟตเป็นแร่ธาตุที่ทั้งยีสต์และแบคทีเรียนำไปใช้ในการเจริญเติบโตจึงทำให้ปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.10

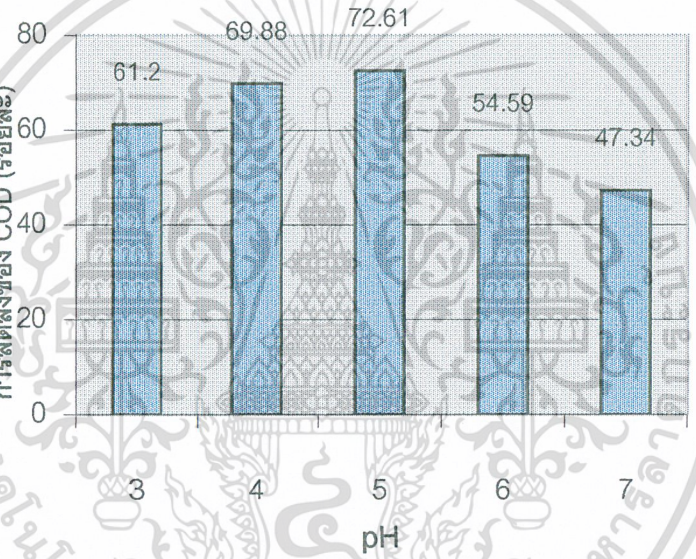


รูปที่ 4.10 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟตที่ลดลงของ *S. cerevisiae* และ *B. subtilis* ที่ pH ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4.ผลของค่าพีเอชในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีต่อค่าซีโอดีที่ลดลง เมื่อทำการเลี้ยง *S.cerevisiae* และ *B.subtilis*

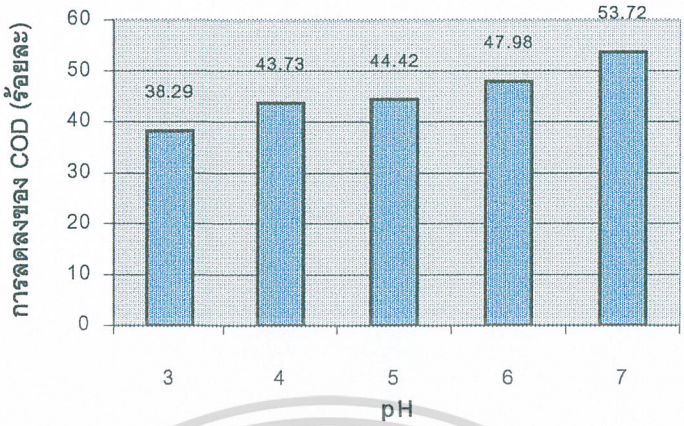
จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *S.cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีพีเอชต่างๆกันเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปริมาณซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์ลดลง โดยพบว่าน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 5.0 จะมีปริมาณซีโอดีลดลงมากที่สุดคือร้อยละ 72.61 ขณะที่น้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับ พีเอชเป็น 3 , 4 , 6 และ 7 มีปริมาณซีโอดีลดลงร้อยละ 61.21 , 69.88 , 54.59 และ 47.34 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณซีโอดีที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง *S. cerevisiae* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ pH ต่างๆ

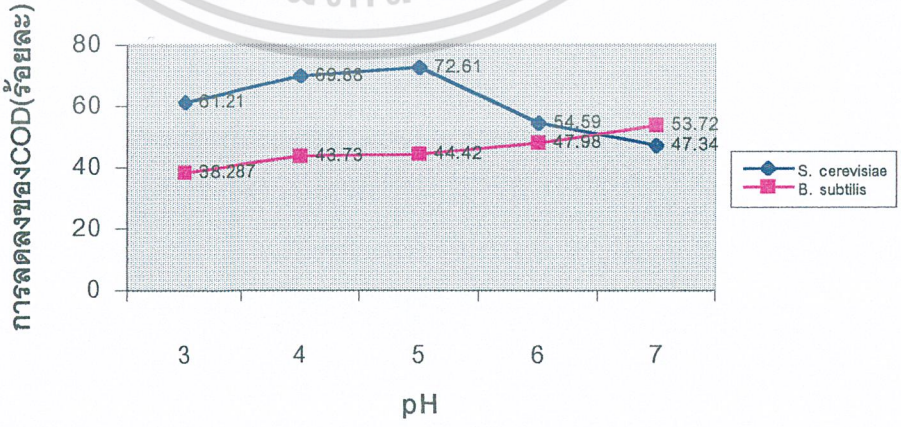
สำหรับการเลี้ยง *B.subtilis*ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีพีเอชต่างๆกัน เป็นเวลา 14 ชั่วโมง พบว่าน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 7.0 จะมีปริมาณซีโอดีลดลงมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 53.72 ขณะที่น้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 3 , 4 , 5 และ 6 มีปริมาณซีโอดีลดลงร้อยละ 38.29 , 43.73 , 44.42 และ 47.98 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณซีโอดีที่ลดลงเมื่อทำการเลี้ยง B. subtilis ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ pH ต่าง ๆ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อนำน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 5.0 มาเลี้ยงเชื้อ *S.cerevisiae* เชื้อสามารถเจริญได้ดีและปริมาณซีโอดีลดลงมากที่สุดที่พีเอชนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชอื่น เนื่องมาจาก *S.cerevisiae* จะนำสารอินทรีย์ที่มีในน้ำเสียสังเคราะห์ไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างส่วนประกอบของเซลล์ สำหรับ *B.subtilis* ก็เช่นเดียวกัน โดยพบว่าสามารถเจริญได้ดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปรับพีเอชเป็น 7.0 และที่พีเอชนี้ปริมาณซีโอดีที่ลดลงก็มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียสังเคราะห์ที่พีเอชอื่น ดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณซีโอดีที่ลดลง ของ *S. cerevisiae* และ *B. subtilis* ที่pH ต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองที่ได้ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* และ *B. subtilis* ในน้ำเสียสังเคราะห์จะเห็นได้ว่า *S.cerevisiae* และ *B. subtilis* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 และ 14 ตามลำดับ และเมื่อนำเวลาดังกล่าวมาทำการทดลองกับน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าซีโอดีอยู่ในช่วง 1,000 – 1,300 มก. / ล. พร้อมกับแปรค่าพีเอชของน้ำเสียสังเคราะห์เป็น 3 , 4 , 5 , 6 และ 7 ผลปรากฏว่า *S.cerevisiae* มีความสามารถในการลดค่าซีโอดีลงได้สูงสุดที่พีเอช 5.0 คิดเป็นร้อยละ 72.61 ในขณะที่ *B.subtilis* ลดได้เพียงร้อยละ 44.42 และเมื่อพีเอชเพิ่มสูงขึ้น *B. subtilis* จะสามารถลดค่าซีโอดีลงได้มากขึ้นโดยให้ค่าสูงสุดที่พีเอช 7.0 เท่ากับร้อยละ 53.72 ซึ่งมากกว่า *S.cerevisiae* ที่มีค่าเพียงร้อยละ 47.34 และเมื่อทำการวิเคราะห์หาค่าความหนาแน่นของเซลล์ในรูปความขุ่น (OD) , ไนโตรเจนและฟอสเฟตในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าผลการทดลองที่ได้มีค่าสอดคล้องกับความสามารถในการลดค่าซีโอดี กล่าวคือเมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการนำสารอาหารคือ ไนโตรเจนและฟอสเฟตไปใช้ได้มากทำให้ค่าซีโอดีลดลง

<u>ตารางสรุป</u> แสดงค่า OD หลังบำบัด , เปอร์เซ็นต์การลดลงของไนโตรเจน ,เปอร์เซ็นต์การลดลงของฟอสเฟต และเปอร์เซ็นต์การกำจัดซีโอดี

เชื้อ	พีเอช (pH)	ค่า OD หลังบำบัด	การลดลงของไนโตรเจน (ร้อยละ)	การลดลงของฟอสเฟต (ร้อยละ)	การลดลงของซีโอดี (ร้อยละ)
S.cerevisiae	3	0.1155	41.90	30.60	61.21
	4	0.1277	48.72	34.14	69.88
	5	0.1560	53.19	35.65	72.61
	6	0.1090	40.43	25.57	54.59
	7	0.0860	38.64	25.16	47.34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ	พีเอช (pH)	ค่า OD หลังบำบัด	การลดลงของไนโตรเจน (ร้อยละ)	การลดลงของฟอสเฟต (ร้อยละ)	การลดลงของซีโอดี (ร้อยละ)
B. subtilis	3	0.061	1.00	27.53	38.29
	4	0.079	1.70	32.96	43.73
	5	0.085	19.51	33.06	44.42
	6	0.086	38.00	33.10	47.98
	7	0.0945	40.00	36.67	53.72

จากผลการทดลองได้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียไปใช้ในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียพบว่า กรณีที่น้ำเสียมีสภาวะเป็นกรดควรที่จะเลือกใช้ยีสต์มากกว่าแบคทีเรียแต่ถ้าในกรณีที่น้ำเสียมีสภาวะเป็นกลางควรที่จะเลือกใช้แบคทีเรีย นอกจากนี้สมควรที่จะมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องในเรื่องของปัจจัยต่างๆ ที่จะมีผลต่อความสามารถในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสีย โดยอาจทำการแปรค่าปริมาณสารอินทรีย์เริ่มต้นที่มีในน้ำเสีย ปริมาณของเซลล์ยีสต์และแบคทีเรีย , สภาวะในระบบบำบัดที่เหมาะสม , ปริมาณสารอาหารที่เติมลงในระบบโดยมีการศึกษาถึงแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสเฟตอื่นๆที่เชื้อสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ รวมถึงแนวทางในการนำยีสต์ไปใช้กับระบบบำบัดน้ำเสียแทนแบคทีเรียเพื่อให้เกิดการพัฒนาต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast malt extract agar (YMA)

สูตรอาหาร	กรัม / ลิตร
Peptone	5
Yeast extract	3
Malt extract	3
Glucose	10
Agar	15
ปรับพีเอช 3.5	

2. Yeast malt extract broth (YMB)

สูตรอาหาร	กรัม / ลิตร
Peptone	5
Yeast extract	3
Malt extract	3
Glucose	10
ปรับพีเอช 3.5	

3. Nutrient Agar (NA)

สูตรอาหาร	กรัม/ลิตร
Beef extract	3
Peptone	5
Agar	15
ปรับพีเอช 6 – 7	

หมายเหตุ .... Nutrient Broth (NB) ไม่ต้องเติม Agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

1.) ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ตามสูตรอาหาร YM

2.) ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น ถ้าเป็น YMA ให้เติมวุ้นลงไป ส่วน YMB ไม่ต้องเติมวุ้น ปั่นกวนให้ส่วนประกอบของอาหารละลายหมด โดยให้ความร้อนจากนั้นปรับปริมาตรให้ครบตามสูตร

3.) วัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอช เมื่ออาหารเป็นกรดหรือด่างมากเกินไปให้ทำการปรับด้วย 0.1 นอร์มัล NaOH หรือ 0.1 นอร์มัล HCl จนได้พีเอชประมาณ 3.5

5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.) ชั่งส่วนประกอบต่างๆตามสูตรอาหาร NB

2.) ละลายส่วนประกอบต่างๆในน้ำกลั่น ถ้าเป็น NA ให้เติมวุ้นลงไป ส่วน NB ไม่ต้องเติมวุ้น ปั่นกวนให้ส่วนประกอบของอาหารละลายหมด โดยให้ความร้อน จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบตามสูตร

3.) วัดค่าความเป็นกรด- ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอช เมื่ออาหารเป็นกรดหรือด่างมากเกินไปให้ทำการปรับด้วย 0.1 นอร์มัล NaOH หรือ 0.1 นอร์มัล HCl จนได้พีเอชประมาณ 7.0

6. การบรรจุอาหาร

1.) บรรจุอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วลงในหลอดอาหารเอียง

2.) อุดหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยจุกสำลี (เพื่อป้องกันฝุ่นละอองและจุลินทรีย์ที่อยู่ในอากาศเข้าสู่หลอดอาหาร)

3.) รวบรวมหลอดอาหารที่บรรจุเรียบร้อยแล้วใส่ที่วาง ปิดหุ้มด้วยกระดาษฟลอยเพื่อป้องกันไอน้ำหยดลงมาเปียกสำลี แล้วนำไปกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่ให้อุณหภูมิสูงถึง 121 ^{o}C เป็นเวลา 15 – 30 นาที

4.) นำหลอดอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเอียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์

สูตรอาหาร	ปริมาณ(กรัม)
Glucose	100
$(NH_4)_2SO_4$	5
KH_2PO_4	2
KCl	1.1
น้ำกลั่น	1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

แสดงผลการทดลอง

แสดงค่า OD ของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ 660 นาโนเมตร

pH	ครั้งที่	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด
3	1	0.055	0.062
	2	0.053	0.129
	3	0.058	0.113
	4	0.055	0.158
	เฉลี่ย	0.0553	0.1155
4	1	0.054	0.116
	2	0.055	0.120
	3	0.060	0.165
	4	0.055	0.110
	เฉลี่ย	0.056	0.1277
5	1	0.055	0.166
	2	0.055	0.158
	3	0.060	0.153
	4	0.056	0.147
	เฉลี่ย	0.0565	0.156
6	1	0.055	0.063
	2	0.055	0.062
	3	0.058	0.210
	4	0.055	0.101
	เฉลี่ย	0.0558	0.109
7	1	0.058	0.061
	2	0.055	0.110
	3	0.065	0.110
	4	0.055	0.063
	เฉลี่ย	0.058	0.086

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงค่า OD ของ *Bacillus subtilis* ที่ 595 นาโนเมตร

pH	ครั้งที่	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด
3	1	0.057	0.044
	2	0.056	0.053
	3	0.056	0.097
	4	0.056	0.050
	เฉลี่ย	0.0563	0.061
4	1	0.056	0.100
	2	0.057	0.068
	3	0.056	0.067
	4	0.056	0.081
	เฉลี่ย	0.0563	0.079
5	1	0.054	0.081
	2	0.057	0.073
	3	0.054	0.099
	4	0.056	0.093
	เฉลี่ย	0.0553	0.085
6	1	0.051	0.074
	2	0.055	0.056
	3	0.050	0.113
	4	0.053	0.101
	เฉลี่ย	0.0523	0.086
7	1	0.054	0.093
	2	0.054	0.093
	3	0.054	0.097
	4	0.054	0.095
	เฉลี่ย	0.054	0.0945

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงปริมาณ N ของ *Saccharomyces cerevisiae*

pH	ครั้งที่	ก่อนบำบัด(มก./ล.)	หลังบำบัด(มก./ล.)	% Nที่ลดลง
3	1	14.56	12.32	
	2	11.20	6.70	
	3	11.20	4.48	41.90
	4	11.20	4.48	
	เฉลี่ย	12.04	6.99	
4	1	12.32	6.72	
	2	7.84	3.36	
	3	12.32	6.72	48.72
	4	11.20	5.60	
	เฉลี่ย	10.92	5.60	
5	1	13.44	6.72	
	2	11.20	4.48	
	3	14.56	7.84	53.19
	4	13.44	5.60	
	เฉลี่ย	13.16	6.16	
6	1	14.56	5.60	
	2	13.44	5.60	
	3	11.20	7.84	40.43
	4	13.44	12.32	
	เฉลี่ย	13.16	7.84	
7	1	11.20	5.60	
	2	7.84	5.60	
	3	11.20	7.80	38.64
	4	13.44	7.80	
	เฉลี่ย	10.92	6.70	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ N ของ *Bacillus subtilis*

pH	ครั้งที่	ก่อนบำบัด(มก./ล.)	หลังบำบัด(มก./ล.)	% N ที่ลดลง
3	1	12.32	12.32	
	2	12.32	11.20	
	3	10.08	9.24	1.00
	4	10.08	11.20	
	เฉลี่ย	11.11	10.99	
4	1	14.56	13.44	
	2	11.20	11.20	
	3	11.20	10.08	1.70
	4	10.08	10.08	
	เฉลี่ย	11.76	11.56	
5	1	13.44	6.72	
	2	11.20	11.20	
	3	10.08	8.96	19.51
	4	11.20	10.08	
	เฉลี่ย	11.48	9.24	
6	1	14.56	6.72	
	2	14.56	8.96	
	3	14.56	10.08	38.00
	4	12.32	8.96	
	เฉลี่ย	14.00	8.68	
7	1	11.20	6.72	
	2	7.84	3.36	
	3	13.44	8.96	40.00
	4	12.32	7.84	
	เฉลี่ย	11.20	6.72	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ P ของ *Saccharomyces cerevisiae*

pH	ครั้งที่	ก่อนบำบัด(มก./ล.)	หลังบำบัด(มก./ล.)	% P ที่ลดลง
3	1	5.40	3.68	
	2	5.30	3.94	
	3	5.60	3.70	30.60
	4	5.40	3.74	
	เฉลี่ย	5.425	3.765	
4	1	4.90	3.60	
	2	5.42	3.42	
	3	5.90	3.52	34.14
	4	5.40	3.70	
	เฉลี่ย	5.405	3.56	
5	1	5.62	3.66	
	2	5.56	3.60	
	3	5.44	3.50	35.65
	4	5.90	3.73	
	เฉลี่ย	5.63	3.623	
6	1	5.30	3.90	
	2	5.60	3.60	
	3	5.56	4.40	25.57
	4	5.44	4.40	
	เฉลี่ย	5.475	4.075	
7	1	5.42	3.74	
	2	5.30	3.50	
	3	4.94	3.74	25.16
	4	5.56	4.90	
	เฉลี่ย	5.305	3.97	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ P ของ *Bacillus subtilis*

pH	ครั้งที่	ก่อนบำบัด(มก./ล.)	หลังบำบัด(มก./ล.)	% P ที่ลดลง
3	1	5.90	3.90	
	2	5.80	3.94	
	3	5.54	4.40	27.53
	4	5.03	3.90	
	เฉลี่ย	5.568	4.035	
4	1	5.50	3.70	
	2	5.50	3.52	
	3	5.06	3.74	32.96
	4	5.54	3.52	
	เฉลี่ย	32.96	3.62	
5	1	5.60	3.50	
	2	5.40	3.90	
	3	5.40	3.52	33.06
	4	5.80	3.94	
	เฉลี่ย	5.55	3.715	
6	1	6.10	3.70	
	2	5.50	3.92	
	3	5.80	3.50	33.10
	4	5.80	4.40	
	เฉลี่ย	33.10	3.88	
7	1	7.10	3.60	
	2	5.90	3.88	
	3	6.00	3.70	36.67
	4	5.60	4.40	
	เฉลี่ย	6.15	3.895	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ COD ของ *Saccharomyces cerevisiae*

pH	ครั้งที่	ก่อนบำบัด (มก./ล.)	หลังบำบัด (มก./ล.)	%COD removal
3	1	1063.82	432.08	
	2	1078.53	392.80	
	3	1102.36	432.08	61.2
	4	1210.76	471.36	
	เฉลี่ย	1113.87	432.08	
4	1	1193.46	432.08	
	2	1224.28	392.80	
	3	1235.96	392.80	69.88
	4	1302.17	274.96	
	เฉลี่ย	1239.10	69.88	
5	1	1139.12	274.96	
	2	1105.34	314.24	
	3	1253.09	353.52	72.61
	4	1378.90	392.80	
	เฉลี่ย	1219.11	333.88	
6	1	1005.37	549.92	
	2	1260.51	510.64	
	3	1297.03	589.20	54.59
	4	1194.57	510.64	
	เฉลี่ย	1189.37	540.10	
7	1	1298.87	667.76	
	2	1209.43	628.48	
	3	1178.56	589.20	47.34
	4	1236.21	707.04	
	เฉลี่ย	1230.76	648.12	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ COD ของ Bacillus subtilis

pH	ครั้งที่	ก่อนบำบัด (มก./ล.)	หลังบำบัด (มก./ล.)	%COD removal
3	1	1063.82	667.76	
	2	1078.53	549.92	
	3	1102.36	746.32	38.29
	4	1210.76	785.60	
	เฉลี่ย	1113.67	687.40	
4	1	1193.46	746.32	
	2	1224.28	667.76	
	3	1235.96	707.04	43.73
	4	1302.71	667.76	
	เฉลี่ย	1239.10	697.22	
5	1	1139.12	549.92	
	2	1105.34	707.04	
	3	1253.09	667.76	44.42
	4	1378.90	785.60	
	เฉลี่ย	1219.11	677.58	
6	1	1005.37	589.20	
	2	1260.51	549.92	
	3	1297.03	628.48	47.98
	4	1194.57	707.04	
	เฉลี่ย	1189.37	618.66	
7	1	1298.87	589.20	
	2	1209.43	628.48	
	3	1178.56	549.92	53.72
	4	1236.21	510.64	
	เฉลี่ย	1230.76	569.56	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. การะเกด อมรรัตนเกียรติ และเกรียงศักดิ์ เลิศประภามงคล. การดูดซับโครเมียม(+6)ในน้ำเสียโดยใช้ยีสต์. โครงงานพิเศษภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 1-38; 2538.
2. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. กรุงเทพ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ที่บริษัท เอส.เค. 07 จำกัด.
3. ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์.การดูดซับโครเมียม (+6) ในน้ำเสียโดยใช้ยีสต์. โครงงานพิเศษภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 4,2539.
4. เชาวนีย์ ยงไสว. การดูดซับโครเมียม(+6)ในน้ำเสียโดยใช้ยีสต์ขนมปัง.โครงงานพิเศษภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2540.
5. ดุษณี ธนะบริพัฒน์. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง,2537.
6. ดวงใจ โอชัยกุลและมาริสา จาตุพรพิพัฒน์. " การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง," วิทยาศาสตร์ มข. 26(3): 181-185; กรกฎาคม-กันยายน 2541.
7. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539.
8. นวลพรรณ ณ. ระนอง และมงคล เพ็ญสายใจ "น้ำและการบำบัดน้ำเสีย".ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง,2542.
9. ภาควิชาวิศวกรรมสภาวะแวดล้อม "การควบคุมน้ำเสียจากชุมชนและอุตสาหกรรม". คณะวิศวกรรมศาตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ,2534.
10. ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต .จุลชีววิทยาทางอาหาร .พิมพ์ที่ มหาวิทยาลัยบูรพา ,2536.
11. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. " โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิต CM-Glucan สู่อุตสาหกรรม". โรงพิมพ์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย,2543.
12. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. กรุงเทพ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. อรพิน ภูมิภมร. จุลินทรีย์ที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการเกษตรสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพ : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

14. Aaron E. Wasserman, James W. Hampson, & N. F. Alvare. WPCF., 1961, 33(10), 1090-1094.

15. Harris,E.E.,Seaman,J.F.,Marquarot,Hannan,M.L. and Rogers,S.C. (1948a), Fodder Yeast from wood Hydrolyzates and Still Risidues,*Ind. and Engng.Chem.*, v.40,no. 7,pp. 1220.

16. Harris,E.E.,Hannan,M.L.,Marquarot,R.R.(1948),Production of Food Yeast from Wood Hydrolyzates- Nutrient Requirement, *Ind. Engng. Chem.* V.40,pp. 2068.

17. Hospodka,J.(1966),Industrial Application of Continuous Fermentation,in *Theorotical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganism*,Ed.MALEK and FENCL,Acad. Press,New York.

18. Inskeep,G.C.Wiley,A.J.,Holderby,J.M. and Hughes,L.P.(1951),Food Yeast From spent Liquor, *Ind. and Engng Chem.*,v.43,no.8,pp.1702.

19. Kayer,R.(1969),*Adv. Water Pollution Research*,7,477.

20. Kreger-Van,Rij. The yeast-ataxnonic study;3rd. edition,Groningen, The Natherland, 1994,pp. 383-384,692-693,819-820,822-823.

21. Kurth,E.F. and Cheldelin,V.H.(1946a),Feeding Yeast from Wood Sugar Stillage, *Ind. and Engng Chemistry*,v. 38,no. 6,pp. 617.

22. Kurth,E.F.(1946b),Yeast from Wood Sugar Stillage, *Ind. and Engng Chem.*,v.38, No. 6,pp. 204.

23. Milbury,W.F.,Riedel,T.W.,Jones,P.H.(1968),Yeast Production Using Convention-Al Activated Sludge Method for Treatment of Corn Processing Industrial Waste, *3 rd Canadian Symposium on Water Pollution Research*,Univ. of Toronto,1968.

24. Munro,A.L.S.(1970),Measurment and control of pH values,*Methods in Microbiology*,v.2,chapt.2.

25. Muller,L.L.(1969),Yeast Products from Whey, *Process Biochemistry*,v.4,no.1,pp.21.

26. Nguyen C. Thanh & Ronald E. Simard. Biological treatment of wastewater by yeast. WPCP., 1973,45(4), 674-680.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27. Nichihara Environmental sanitation Research Crop.,Ltd.Tokyo,Japan.2000

28. Nolte,A.J.,Von Loesecke,H.W. and Pulley,G.N. (1942),Feed Yeast and Ind. Alcohol from Citrus Waste Press Juice, *Ind. Engng Chem.*,v.34,no. 6,pp.670.

29. Peterson,W.H.,Snell,J.F.,Frazier,W.C.(1945),Food Yeast from Wood Sugar, *Ind. and Engng Chem.*,v.37,no.1,pp.30.

30. Snyder,H.E.(1970),Microbial Source of Protein,*Adv.Food Resarch*,v. 18,pp. 35.

31. Tan Tong Choon. " Complete treatment of carbohydrate waste with yeast product" Master's Thesis, Science, Asian Instituted of Technology, 1976.

32. Thanh,N.C.and Wu.J.S. (1973),Treatment of Tapioca Starch Wastewater by Torula Yeast , *Can. Inst. Food Sci. Tech.J.*,v.8,pp.4.

33. Vu Anh-Tuan. "Brewery waste treatment by Torula yeast and recovery of single cell protein" Master's Thesis, Engineering, Asian Instituted of Technology, 1976.

34. Wanpen,K.(1975),Whey as a Culture Medium for Abatement of Water Pollution, M. Eng. Thesis No. 839, Asian Institute of Technology,Bangkok,Thailand.

35. Wasserman,A.E. ,Hopkins,W.J. and Porges,N. (1958), Whey Utilization Growth Conditions for Saccharomyces Fragilis, *Sewage and Ind. Wastes*, v.30,no.7, pp.913.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้