



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวัดความเสถียรของ
ระบบบำบัดน้ำเสียด้วยระบบเติมอากาศ

**Development of Biotechnological Method for Assessing
the Stability of Wastewater Management using Activated
Sludge System**

โดย ศาสตราจารย์ (นาง) วันเพ็ญ ชัยคำภาและคณะ

พฤษภาคม พ.ศ. 2553

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวัดความเสถียรของ
ระบบบำบัดน้ำเสียด้วยระบบเติมอากาศ

Development of Biotechnological Method for Assessing the
Stability of Wastewater Management using Activated Sludge
System

คณะผู้วิจัย	สังกัด
ศาสตราจารย์ (นาง) วันเพ็ญ ชัยคำภา	ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
รองศาสตราจารย์ (นาง) อัญชลี ตั้งตรงจิตร	ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
อาจารย์ (นาย) นิตศน์ สุขรุ่ง	สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
อาจารย์ (นางสาว) นิตยา อินทรวัดนา	ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
นายบัณฑิต อุดล	บริษัทยูทิลิตี้ บิสิเนส อัลลายแอนซ์ จำกัด

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
และบริษัทยูทิลิตี้ บิสิเนส อัลลายแอนซ์ จำกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เป็นเงิน 3,000,000 บาท (สามล้านบาทถ้วน) และบริษัท ยูทิลิตี้ บิซิเนส อัลลายแอนซ์ จำกัด เป็นเงิน 360,000 บาท (สามแสนหกหมื่นบาทถ้วน) และส่วนสนับสนุนอื่นในวงเงิน 3,023,520 บาท (สามล้านสองหมื่นสามพันห้าร้อยยี่สิบบาทถ้วน)

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญเรื่อง	ii
สารบัญตาราง	iv
สารบัญภาพ	vi
สารบัญคำย่อ	xii
บทคัดย่อ	xv
บทสรุปผู้บริหาร	xxii
รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์	1
ระยะเวลาของโครงการ 2 ปี วันที่ 28 กันยายน พ.ศ. 2550	
ถึงวันที่ 27 กันยายน พ.ศ. 2552 (เริ่มโครงการเมื่อ	
มีนาคม 2551)	
โครงการ: การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวัดความเสถียรของระบบบำบัดน้ำ	
เสียด้วยระบบเติมอากาศ	
Development of Biotechnological Method for Assessing the Stability of	
Wastewater Management using Activated Sludge System	
ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	10
ระเบียบวิธีวิจัย	10
ก. รูปแบบของการวิจัย	10
ข. ขั้นตอนการศึกษา	10
ค. การเก็บข้อมูล	13
ง. วิเคราะห์ข้อมูล	13
จ. สถานที่ทำการทดลอง	13
ฉ. ขอบเขตของโครงการวิจัย	14
ช. แผนการวิจัยที่เสนอไว้ในโครงร่างงานวิจัย	14
รายละเอียดของการดำเนินการวิจัยและผลงานวิจัย	15
กิจกรรมข้อที่ 1: วางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้นในการเก็บตัวอย่างและข้อมูล และการ	15
จัดเตรียมน้ำยา สารเคมีสิ้นเปลืองสำหรับห้องปฏิบัติการ	
กิจกรรมข้อที่ 2: ศึกษาและจำแนกชนิดจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย	15
ส่วนที่หนึ่ง การศึกษาความหลากหลายของเชื้อโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์ที่พบ	15
ในบ่อบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional method)	

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้าที่
ส่วนที่สอง	
การศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่พบในโรงงานบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional method) และวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular biology method) ด้วยเทคนิค Metagenomics	50
กิจกรรมข้อที่ 3: ศึกษาบทบาทหน้าที่ของจุลชีพประเภทต่างๆ ที่เกี่ยวข้องต่อการบำบัดน้ำเสียกับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในน้ำเสีย	71
กิจกรรมข้อที่ 4: ระบุถึงปริมาณ/อัตราส่วนของจุลชีพประเภทต่างๆ ในระบบที่เหมาะสม	76
กิจกรรมข้อที่ 5: พัฒนาเทคนิคหรือวิธีการที่ใช้ตรวจวัดประเภทและปริมาณของจุลชีพ	94
กิจกรรมข้อที่ 6: การใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดประเภทและปริมาณของจุลชีพในระบบบำบัดน้ำเสียจริง	106
กิจกรรมข้อที่ 7 เป็นกิจกรรมเพิ่มเติมตามข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	126
บทสรุปการวิจัย (Conclusions)	159
References	162
แผนภูมิแสดงขั้นตอนและระยะเวลาการทำวิจัย	163

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 การคำนวณจำนวนตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ตรวจวิเคราะห์โดยใช้ตัวกำหนดตามระเบียบวิธีทางสถิติ	26
ตารางที่ 1.2 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของตัวอย่างน้ำเสียที่จะทำการตรวจ	28
ตารางที่ 1.3 แสดงตารางการจดบันทึกข้อมูลในการตรวจวิเคราะห์น้ำเสียด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อหาจุลชีพต่างๆ ตามเกณฑ์ที่กำหนด (ปรับปรุงจาก worksheet 35.4 Total Organism Count, Gerardi MH, 2008)	36
ตารางที่ 1.4 อัตราชุกของ ของ Rotifers แต่ละสายพันธุ์ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากระบบ Activated Sludge (โรงบำบัดน้ำเสียจากชุมชนที่หนองแขม)	38
ตารางที่ 2.1 แสดงประเภทและจำนวนของแบคทีเรียที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 1-3 ของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากชุมชน (โรงงานบำบัดน้ำเสียที่หนองแขม)	53
ตารางที่ 2.2 แสดงประเภทและจำนวนของ bacterial isolates ได้จากจุดเก็บที่ 1-3 ของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (โรงงานกระดาษ) จังหวัดนครสวรรค์	54
ตารางที่ 2.3 แสดงกลุ่ม ชนิด และจำนวนของ bacterial isolates ได้จากจุดเก็บที่ 1-3 ของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากชุมชนที่หนองแขม	56
ตารางที่ 2.4 แสดงผลการเปรียบเทียบ DNA sequence ในแต่ละรูปแบบที่พบในการวิจัยนี้เปรียบเทียบกับชนิด DNA sequence ใน GenBank database	68
ตารางที่ 3.1 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ และเหตุผลในการพิสูจน์ความสัมพันธ์กับจำนวนโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) ที่ตรวจพบ	73
ตารางที่ 3.2 การศึกษาหาความสัมพันธ์ของโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 กับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3	75
ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างทั้ง 3 จุด จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553	84
ตารางที่ 4.2 แสดง ranges, means, standard deviations (SD) จำนวนน้อยที่สุด (เดือนที่พบ) และ จำนวนมากที่สุด (เดือนที่พบ) ของแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่ม	88
ตารางที่ 5.1 แสดงระดับแอนติบอดี (Indirect ELISA titers) ในซีรัมของหนูไมซ์ทั้งสามตัวที่ได้รับการ immunized ด้วย waste water extract (ww) เมื่อใช้ ww เป็นแอนติเจนในการทดสอบ	96

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้าที่
ตารางที่ 5.2 แสดง Antigenic specificities ของ MAb จาก hybridoma clones ทั้ง 66 clones ต่อ ww และ pool N1, pool N2, pool P และ pool S เมื่อตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA	100
ตารางที่ 5.3 แสดงความเฉพาะของ Mab จาก clones ต่างๆ กับ homologous antigen และ heterologous antigens	103
ตารางที่ 6.1 แสดงผลของ W66 monoclonal antibody based-ELISA เพื่อหาปริมาณที่น้อยที่สุดของ แอนติเจนของโรติเฟอร์ที่ยังให้ผลบวกในการทดสอบ (detection limit ของ indirect ELISA)	106
ตารางที่ 6.2 แสดงผลของ W6 monoclonal antibody based-ELISA เพื่อหาปริมาณที่น้อยที่สุดของ แอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N1 ที่ยังให้ผลบวกในการทดสอบ (detection limit ของ sandwich ELISA)	107
ตารางที่ 6.3 แสดงผลของ W11 monoclonal antibody based-ELISA เพื่อหาปริมาณที่น้อยที่สุดของ แอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N2 ที่ยังให้ผลบวกในการทดสอบ (detection limit ของ sandwich ELISA)	112
ตารางที่ 6.4 แสดงผลของ W34 monoclonal antibody based-ELISA เพื่อหาปริมาณที่น้อยที่สุดของ แอนติเจนของแบคทีเรียชนิด S ที่ยังให้ผลบวกในการทดสอบ (detection limit ของ sandwich ELISA)	116
ตารางที่ 6.5 แสดงผลของ W5 monoclonal antibody based-ELISA เพื่อหาปริมาณที่น้อยที่สุดของ แอนติเจนของแบคทีเรียชนิด P ที่ยังให้ผลบวกในการทดสอบ (detection limit ของ sandwich ELISA)	120
ตารางที่ 7.1 การศึกษาหาความสัมพันธ์ของ Rotifers ชนิดที่ 2 กับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จากน้ำเสียในระบบบำบัดแบบ Activated Sludge ที่มีภาวะไม่เสถียร ณ จุดเก็บที่ 1+2 และ 3	141
ตารางที่ 7.2 แสดงปริมาณแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่ม ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 1+2 และ 3 ของ unstable pilot plant ในช่วงเวลาต่างๆ	144

สารบัญภาพ

	หน้าที่
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของโรติเฟอร์ (Miller and Harley, 2002)	17
รูปที่ 1.2 ตัวอย่างโรติเฟอร์ใน Classes ต่างๆ	20
รูปที่ 1.3 แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Activated Sludge	21
รูปที่ 1.4 จุดที่เก็บตัวอย่างน้ำเสีย (Area of Sampling) ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์	22
รูปที่ 1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย	29
รูปที่ 1.6 ภาพแสดงการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากจุดที่เก็บ	29
รูปที่ 1.7 การเก็บตัวอย่างน้ำเสียเพื่อการตรวจวิเคราะห์	30
รูปที่ 1.8 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์น้ำเสียในการตรวจวินิจฉัยจุลชีพ (Protozoa & Rotifers)	31
รูปที่ 1.9 Sedgewick chamber ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยและนับจำนวนโปรโตซัวและโรติเฟอร์	32
รูปที่ 1.10 การตรวจวินิจฉัยและนับจำนวนโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์	33
รูปที่ 1.11 แผนผังแสดงการสุ่มตรวจตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บมาตรวจ	34
รูปที่ 1.12 Rotifers ชนิดที่ 1 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	40
รูปที่ 1.13 Rotifers ชนิดที่ 2 (ขณะหดตัว) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	41
รูปที่ 1.14 Rotifers ชนิดที่ 2 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	42
รูปที่ 1.15 Rotifers ชนิดที่ 2 (ขณะยืดตัว) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	43
รูปที่ 1.16 Rotifers ชนิดที่ 3 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	44
รูปที่ 1.17 Rotifers ชนิดที่ 3 (ขณะไม่เคลื่อนที่) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	45
รูปที่ 1.18 Rotifers ชนิดที่ 4 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	46
รูปที่ 1.19 Stalked ciliate ชนิดที่ 1 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	47
รูปที่ 1.20 Stalked ciliate ชนิดที่ 2 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	48
รูปที่ 1.21 Stalked ciliate ชนิดที่ 3 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	48
รูปที่ 1.22 Stalked ciliate ชนิดที่ 4 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย	49
รูปที่ 2.1 แสดง PCR amplified product ของ 16S RNA genes	60
รูปที่ 2.2 แสดง RFLP patterns ของ recombinant plasmids ที่มี 16S RNA gene inserts ที่แยกจากจุดเก็บที่ 1	65
รูปที่ 2.3 แสดง RFLP patterns ของ recombinant plasmids ที่มี 16S RNA gene inserts ที่แยกจากจุดเก็บที่ 2	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้าที่
รูปที่ 2.4 แสดง RFLP patterns ของ insert recombinant plasmids ที่มี 16S RNA gene inserts ที่แยกจากจุดเก็บที่ 3	67
รูปที่ 3.1 ประชากรจุลชีพในกลุ่มโปรโตซัวและโรติเฟอร์ในระบบนิเวศน์ของระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชน แบบ activated sludge ที่สัมพันธ์กับความเสถียรของระบบ	72
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงจำนวนค่าเฉลี่ย (Means) ของโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) ที่พบในน้ำเสียทั้ง 3 จุดที่เก็บน้ำเสีย ณ ช่วงเวลาต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาหนึ่งปี	78
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวน (ตัวเลข) ของโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) ที่พบในน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 1 ณ ช่วงเวลาต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาหนึ่งปี	79
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวน (Means) ของโรติเฟอร์ ชนิดที่ 2 (R2) ที่พบในน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 2 ณ ช่วงเวลาต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาหนึ่งปี	80
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวน (Means) ของ Rotifer ชนิดที่ 2 (R2) ที่พบในน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 3 ณ ช่วงเวลาต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาหนึ่งปี	81
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย กลุ่ม N1 ที่พบในน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 1 (N1/1), 2 (N1/2) และ 3 (N1/3) ณ ช่วงเวลาต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาหนึ่งปี	89
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย กลุ่ม N2 ที่พบในน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 1 (N2/1), 2 (N2/2) และ 3 (N2/3) ณ ช่วงเวลาต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาหนึ่งปี	90
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย กลุ่ม S ที่พบในน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 1 (S/1), 2 (S/2) และ 3 (S/3) ณ ช่วงเวลาต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาหนึ่งปี	91
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย กลุ่ม P ที่พบในน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 1 (P/1), 2 (P/2) และ 3 (P/3) ณ ช่วงเวลาต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาหนึ่งปี	92
รูปที่ 4.9 กราฟแสดงจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมด [Total bacteria (T)] คือกลุ่ม N1, N2, S และ P รวมกัน ที่พบในน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 1 (T1), 2 (T2) และ 3 (T3) ณ ช่วงเวลาต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาหนึ่งปี	93

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 6.3.1 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด N1 ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุด ที่ 1 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N1 ด้วยวิธี monoclonal antibody (W6) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด N1 กับ OD ของ monoclonal antibody (W6) based-sandwich ELISA ในการ detect N1 antigen	109
รูปที่ 6.3.2 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด N1 ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุด ที่ 2 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N1 ด้วยวิธี monoclonal antibody (W6) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด N1 กับ OD ของ monoclonal antibody (W6) based-sandwich ELISA ในการ detect N1 antigen	110
รูปที่ 6.3.3 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด N1 ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุด ที่ 3 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N1 ด้วยวิธี monoclonal antibody (W6) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด N1 กับ OD ของ monoclonal antibody (W6) based-sandwich ELISA ในการ detect N1 antigen	111
รูปที่ 6.4.1 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด N2 ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุด ที่ 1 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N2 ด้วยวิธี monoclonal antibody (W11) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด N2 กับ OD ของ monoclonal antibody (W11) based-sandwich ELISA ในการ detect N2 antigen	113
รูปที่ 6.4.2 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด N2 ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุด ที่ 2 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N2 ด้วยวิธี monoclonal antibody (W11) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด N2 กับ OD ของ monoclonal antibody (W11) based-sandwich ELISA ในการ detect N2 antigen	114

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 6.4.3 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด N2 ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 3 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N2 ด้วยวิธี monoclonal antibody (W11) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด N2 กับ OD ของ monoclonal antibody (W11) based-sandwich ELISA ในการ detect N2 antigen	115
รูปที่ 6.5.1 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด S ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 1 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด S ด้วยวิธี W34 monoclonal antibody based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด S กับ OD ของ W34 monoclonal antibody based-sandwich ELISA ในการ detect S antigen	117
รูปที่ 6.5.2 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด S ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 2 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด S ด้วยวิธี monoclonal antibody (W34) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด S กับ OD ของ monoclonal antibody (W34) based-sandwich ELISA ในการ detect S antigen	118
รูปที่ 6.5.3 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด S ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 3 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด S ด้วยวิธี monoclonal antibody (W34) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด S กับ OD ของ monoclonal antibody (W34) based-sandwich ELISA ในการ detect S antigen	119
รูปที่ 6.6.1 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด P ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 1 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด P ด้วยวิธี monoclonal antibody (W5) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด P กับ OD ของ monoclonal antibody (W5) based-sandwich ELISA ในการ detect P antigen	121

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 6.6.2 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด P ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 2 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด P ด้วยวิธี monoclonal antibody (W5) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด P กับ OD ของ monoclonal antibody (W5) based-sandwich ELISA ในการ detect P antigen	122
รูปที่ 6.6.3 (A) ปริมาณของแบคทีเรียชนิด P ที่สามารถพบได้ ณ จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 3 จากโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และค่า optical densities (OD at A_{405nm}) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด P ด้วยวิธี monoclonal antibody (W5) based-sandwich ELISA (B) ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิด P กับ OD ของ monoclonal antibody (W5) based-sandwich ELISA ในการ detect P antigen	123
รูปที่ 6.7 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาจำนวนปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด S ในน้ำเสียจากโรงงานบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม (โรงงานกระดาษ) จังหวัดนครสวรรค์ กับการตรวจวัดปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด S ด้วย W34 monoclonal antibody based-sandwich ELISA	125
รูปที่ 7.1 บริเวณจุดเก็บตัวอย่างน้ำของระบบบำบัดน้ำหนองแขมที่ส่งให้ผู้วิจัย	127
รูปที่ 7.2 ระบบบำบัดน้ำเสียที่จำลองขึ้น (ระบบบำบัดน้ำเสียแบบที่ไม่เสถียร Unstable Pilot Plant)	128
รูปที่ 7.3 (ก) ลักษณะของถังตกตะกอนเมื่อมองด้าน Top View (ข) ลักษณะของถังตกตะกอนเมื่อมองด้าน Side View	130
รูปที่ 7.4 ลักษณะถังตกตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียจำลอง (unstable pilot plant) เป็นถังสี่เหลี่ยมผืนผ้าและไม่มีใบกวาดตะกอนอยู่บนผิวหน้าตัดของถังตกตะกอน	130
รูปที่ 7.5 กราฟแสดงจำนวน (Means) ของ Rotifer ชนิดที่ 1 (R1) ที่พบในน้ำเสียทั้ง 2 จุดที่เก็บน้ำเสียจากระบบที่มีภาวะที่ไม่เสถียร (unstable pilot plant) ณ ช่วงเวลาต่างๆ	133
รูปที่ 7.6 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวน (ตัวเลข) ของ Rotifer ชนิดที่ 1 (R1) ที่พบในน้ำเสียที่จุดที่ 1+2 ซึ่งเก็บน้ำเสียจากระบบที่มีภาวะที่ไม่เสถียร (unstable pilot plant) ณ ช่วงเวลาต่างๆ	134

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้าที่
รูปที่ 7.7 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวน (ตัวเลข) ของ Rotifer ชนิดที่ 1 (R1) ที่พบในน้ำเสียที่จุดที่ 3 ซึ่งเก็บน้ำเสียจากระบบที่มีภาวะที่ไม่เสถียร (unstable pilot plant) ณ ช่วงเวลาต่างๆ	135
รูปที่ 7.8 กราฟแสดงจำนวน (Means) ของ Rotifer ชนิดที่ 2 (R2) ที่พบในน้ำเสียทั้ง 2 จุดที่เก็บน้ำเสียจากระบบที่มีภาวะที่ไม่เสถียร (unstable pilot plant) ณ ช่วงเวลาต่างๆ	137
รูปที่ 7.9 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวน (ตัวเลข) ของ Rotifer ชนิดที่ 2 (R2) ที่พบในน้ำเสียที่จุดที่ 1+2 ซึ่งเก็บน้ำเสียจากระบบที่มีภาวะที่ไม่เสถียร (unstable pilot plant) ณ ช่วงเวลาต่างๆ	138
รูปที่ 7.10 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวน (ตัวเลข) ของ Rotifer ชนิดที่ 2 (R2) ที่พบในน้ำเสียที่จุดที่ 3 ซึ่งเก็บน้ำเสียจากระบบที่มีภาวะที่ไม่เสถียร (unstable pilot plant) ณ ช่วงเวลาต่างๆ	139

สารบัญคำย่อ

Abbreviations or symbol	Term
$\times g$	Specific gravity
$^{\circ}\text{C}$	Degrees Celsius
A	Absorbance
AF	Anaerobic filter
AL	Aerated lagoon
AS	Activated sludge
BOD	Biochemical oxygen demand
BS	Bovine serum
BSA	Bovine serum albumin
cfu/ml	Colony forming units per milliliter
COD	Chemical oxygen demand
DO	Dissolved oxygen
Effluent BOD	Biochemical oxygen demand ของน้ำเสียขาออก
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
F:M	Food to microorganism ratio คือ อัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์
HRP	Horseradish peroxidase
HRT	Hydraulic retention time ระยะเวลาที่กักน้ำ
Influent BOD	Biochemical oxygen demand ของน้ำเสียขาเข้า
IS	Immune serum
LB-A	LB-ampicilin
MAb	Monoclonal antibody (-ies)
MCRT	Mean cell resident time คือ อายุของสลัดจ์ เป็นระยะเวลาโดยเฉลี่ยของจุลินทรีย์ที่อาศัยในระบบบำบัดน้ำเสีย
MEM	Minimum Essential Medium
MLSS	Mixed liquor suspended solids
MLSS@RAS	Mixed liquor suspended solid ในสลัดจ์ที่สูบกลับเพื่อนำไปใช้ใหม่
MLSSavg	ค่าของ Mixed liquor suspended solid ในสลัดจ์ที่สูบกลับเพื่อนำไปใช้ใหม่
MPN	Most probable number
N	Nitrogen

สารบัญคำย่อ (ต่อ)

Abbreviations or symbol	Term
N1	กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอมโมเนีย
N2	กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไนไตรท์
NO_3^-	ค่าไนโตรเจนในรูปของ organic nitrogen ที่เป็น Nitrates
NSS	Normal saline solution
OD	Optical Density (-ies)
P	Phosphorus/Phosphate/กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย ฟอสเฟต
PAb	Polyclonal antibodies
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline with Tween-20
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-DGGE	Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
PS	Positive control serum
Q	อัตราการไหลของน้ำเสีย เช่นเดียวกับคำว่า flow
Qwas	อัตราการไหลในการสูบล้างกลับ
R1	<i>Lacane</i> spp. (<i>inermis</i>)
R2	<i>Rotaria</i> spp. (<i>rotatoria</i>)
R3	<i>Diplois daviesiae</i>
R4	<i>Collothea</i> spp.
RAS	Returned activated sludge
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
S	Sulfur/กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายซัลเฟอร์
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Sse	ความเข้มข้นของของแข็งแขวนลอยในน้ำปล่อยทิ้ง
SV_{30}	ปริมาตรของสลัดจ์ซึ่งตกตะกอนจากตัวอย่าง 1,000 มิลลิลิตร ใน เวลา 30 นาที
SVI	Sludge volume index (ดัชนีปริมาตรสลัดจ์)
TAE	Tris-acetate-EDTA
TBE	Tris-borate-EDTA

สารบัญคำย่อ (ต่อ)

Abbreviations or symbol	Term
TDS	Total dissolved solid
TN	Total nitrogen
TSS	Total suspended solid
VolAR1-4	ปริมาตรรวมของ aeration tank อยู่ที่ 1 ถึง 4
WW/ww/Ww	Waste water extract

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวัดความเสถียรของระบบบำบัดน้ำเสีย ด้วยระบบเดิมอากาศ

การบำบัดน้ำเสียถือเป็นสิ่งจำเป็นที่ทั้งภาครัฐและภาคอุตสาหกรรมต้องให้ความสำคัญด้วย เหตุผลที่อาจจะแตกต่างกัน สำหรับภาครัฐ การกำจัดของเสียจากชุมชนก็เพื่อรักษาสภาพของสิ่งแวดล้อมและเพื่อสุขอนามัยที่ดีและความผาสุกของประชาชนเป็นสำคัญ สำหรับภาคอุตสาหกรรม มักทำเพื่อเป็นการปฏิบัติตามกฎหมายและ/หรือการสร้างภาพลักษณ์ที่ดีของภาคอุตสาหกรรมนั้นๆ ในปัจจุบันการควบคุมการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียใช้วิธีตรวจสอบคุณภาพของน้ำที่จะทิ้งออกไปสู่สิ่งแวดล้อมหลังการบำบัดและตรวจการทำงานของเครื่องจักรในระบบ การตรวจวัดการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียที่ผลลัพธ์สุดท้าย คือวัดคุณภาพของน้ำที่จะทิ้ง ถูกพบบ่อยครั้งว่าของเสียในน้ำที่จะทิ้งไม่ได้ถูกบำบัดตามที่กำหนดเพราะระบบบำบัดเกิดความผิดปกติคือเกิดภาวะไม่เสถียรขึ้น แต่ก็มักสายเกินไป เพราะได้ปล่อยน้ำที่บำบัดไม่สมบูรณ์ออกไปสู่ชุมชนและสิ่งแวดล้อมไปแล้ว ซึ่งนอกจากปัญหาที่เกิดขึ้นในระบบได้รับการแก้ไขล่าช้าหรือบางครั้งไม่สามารถแก้ไขได้ แล้ว ยังเป็นผลเสียเป็นอันมากในอีกหลายๆ ด้าน เช่น เป็นกรณีพิพาทระหว่างภาคอุตสาหกรรมและชุมชนที่ปรากฏอยู่เนืองๆ และส่งผลด้านลบถึงภาครัฐ

ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้เปลี่ยนวิธีการควบคุมดูแลระบบบำบัดน้ำเสีย เสียใหม่ โดยมุ่งเน้นที่การตรวจวัดปริมาณของจุลชีพที่เป็นตัวหลักในการกำจัดของเสียในระบบขณะที่ระบบกำลังทำงานอย่างมีประสิทธิภาพหรือขณะที่ระบบมีความเสถียร ซึ่งจุลชีพเหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดในระบบบำบัดน้ำเสีย รวมทั้งได้พัฒนาวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันที่สามารถตรวจหาและวัดปริมาณแอนติเจนของจุลชีพเป้าหมายที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียด้วย โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อใช้วิธีนี้แทนการตรวจคุณภาพน้ำที่กำลังจะปล่อยทิ้งสู่สิ่งแวดล้อมแบบเดิม ทั้งนี้โดยเชื่อว่าคุณภาพน้ำทั้งจะได้มาตรฐานตลอดเวลาที่ตรวจพบว่าประชากรจุลชีพหลักหรือปริมาณแอนติเจนของจุลชีพหลักในระบบมีปริมาณเหมาะสม

ในการวิจัยคณะผู้วิจัยใช้รูปแบบการศึกษาแบบ Cross-sectional Controlled Trial Design โดยการวิจัยแบ่งเป็นการศึกษาชนิดและปริมาณของจุลชีพสำคัญในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (Activated Sludge System) ได้แก่โรติเฟอร์และแบคทีเรียต่างๆ โดยใช้ตัวอย่างน้ำเสียจากโรงบำบัดน้ำเสียที่มาจากชุมชน ที่หนองแขม กรุงเทพฯ และโรงบำบัดน้ำเสียที่มาจากโรงงานอุตสาหกรรม คือโรงบำบัดน้ำเสียจากโรงงานกระดาษ ที่จังหวัดนครสวรรค์ ในขณะที่ระบบบำบัดน้ำเสียทั้งสองแห่งมีความเสถียร เป็นต้นแบบในการศึกษา และคณะผู้วิจัยได้ผลิตแอนติบอดีของหนูเมาส์ชนิดโมโนโคลนาลที่มีความจำเพาะต่อจุลชีพหลักในระบบ และใช้แอนติบอดีเหล่านี้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาและวัดปริมาณแอนติเจนของจุลชีพเป้าหมายที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีความเสถียรในช่วงเวลาต่างๆ ในรอบปี ด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันคือ MAb based-antigen detection assays

การวิจัยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งบำบัดทั้งสองแห่ง โดยเก็บจากจุดต่างๆในระบบ สามจุดคือ จุดเก็บที่ 1 ได้แก่จุดที่ Returned Activated Sludge (RAS) เพิ่งสัมผัสกับน้ำเสียที่เพิ่งเข้ามาในระบบ จุดเก็บที่ 2 คือจุดที่ Mixed liquor (RAS ผสมกับน้ำเสีย) เพิ่งออกจากถังเติมอากาศ และจุดเก็บที่ 3 คือตัวอย่าง RAS (ตะกอนจุลชีพที่บำบัดของเสียในน้ำ) ที่ถูกสูบกลับไปเพื่อจะเติมให้แก่ น้ำเสียที่เข้ามาใหม่ (ซึ่งขณะนั้นน้ำเสียเดิมได้ถูกบำบัดแล้วและพร้อมปล่อยออกเป็น surface water) แล้วนำตัวอย่างน้ำเสียไปศึกษาชนิดและปริมาณจุลชีพหลักที่พบ ณ จุดเก็บตัวอย่างทั้งสามจุด

ผลของการศึกษาชนิดและปริมาณของจุลชีพสำคัญในระบบบำบัดน้ำเสียพบว่า

โรติเฟอร์ที่พบในบ่อบำบัดน้ำเสียจากชุมชน (โรงบำบัดน้ำเสียหนองแขม) จำแนกได้เป็น 4 สายพันธุ์หลักคือ โรติเฟอร์ชนิดที่ 1 (R1): *Lacane inermis* โรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2): *Rotaria rotatoria* โรติเฟอร์ชนิดที่ 3 (R3): *Diplois daviesiae* และโรติเฟอร์ชนิดที่ 4 (R4): *Collotheca* spp. โดยพบว่าโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) หรือ *Rotaria rotatoria* มีอัตราสูงสุดโดยพบอัตราที่จุดเก็บที่ 1 คิดเป็น 100% จุดเก็บที่ 2 คิดเป็น 95.2% และจุดเก็บที่ 3 คิดเป็น 100% ทำให้สรุปได้ว่าโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) นี้เป็นสายพันธุ์หลัก (common species) ที่ตรวจพบได้ตลอดในระบบนิเวศของระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชนแบบ activated sludge ในสภาวะที่ระบบมีความเสถียร โดย ณ จุดเก็บที่ 1 โรติเฟอร์ชนิดที่ 2 มีความสัมพันธ์ผกผันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) กับค่า dissolved oxygen (DO) และ Mixed liquor suspended solids (MLSS) ซึ่งจุดเก็บที่ 1 นี้เป็นจุดที่น้ำเสียเพิ่งเข้าสู่ระบบจึงมีปริมาณอาหาร (ของเสีย) เข้ามามาก จุลชีพมีการเพิ่มจำนวนมากในช่วงแรกรวมทั้งโรติเฟอร์ด้วย การเพิ่มปริมาณของจุลชีพต้องมีการใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำเพิ่มมากขึ้น จึงพบว่าค่าออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen) ลดลง ส่วนค่า MLSS ซึ่งคือของแข็งแขวนลอยทั้งหมดสามารถใช้เป็นตัวแทนของปริมาณตะกอนจุลชีพได้ เนื่องจากโรติเฟอร์จะดำรงชีวิตโดยการกินสิ่งมีชีวิตเล็กๆ เช่นพวกแบคทีเรียต่างๆ และเศษอินทรีย์วัตถุที่มีอยู่ในน้ำ ดังนั้นถ้ามีโรติเฟอร์อยู่มากปริมาณตะกอนจุลชีพก็จะลดลงจากการกินโดยโรติเฟอร์ในระบบห่วงโซ่อาหาร (food chain)

คณะผู้วิจัยใช้ตัวอย่างน้ำเสียจากโรงบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม EPCCO ที่จังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งเป็นโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษเป็นต้นแบบของการศึกษาเพื่อหาปริมาณและจำแนกชนิดของโรติเฟอร์ และเนื่องจากน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมแห่งนี้ไม่มีความผันแปรตามฤดูกาล จึงไม่ได้เก็บตัวอย่างตลอดทั้งปี ผลการวิจัยพบว่าปริมาณโรติเฟอร์ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษแห่งนี้มีน้อยมากและไม่สามารถจัดกลุ่มได้

คณะผู้วิจัยศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่พบในโรงบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ ด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional method) และวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular biology method) ด้วยเทคนิค Metagenomics ได้ผลดังนี้คือ สามารถเพาะ แยก และจำแนกแบคทีเรียที่ทำหน้าที่กำจัดของเสียในน้ำเสียจากชุมชนจากตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บทั้งสามจุด ได้เป็น 4 กลุ่มหลัก คือกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอมโมเนีย (Nitrogen group 1; N1) กลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายไนโตรเจน (Nitrogen group 2; N2) กลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายซัลเฟอร์ (Sulfur group; S)

และกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟอสเฟต (Phosphate group; P) ส่วนน้ำเสียจากโรงบำบัดน้ำเสียที่มาจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษนั้นพบเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม S ทุกจุดที่เก็บตัวอย่างทั้งสามจุด

คณะผู้วิจัยได้ศึกษา Metagenomics ของเชื้อแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชนด้วยการสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากตัวอย่างน้ำเสีย แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction; PCR) แล้วทำการโคลนยีนเหล่านี้เข้าสู่พลาสมิด จากนั้นนำพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านชนิดอีโคไล หลังจากเพิ่มปริมาณยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA จากอีโคไลทรานซฟอร์แมนท์แต่ละโคลน แล้วได้นาดีเอ็นเอไปย่อยด้วยเอนไซม์ที่ตัดดีเอ็นเอจำเพาะ (restriction endonucleases) สามชนิด คือ *MspI*, *HaeIII* และ *HhaI* ก่อนนำไปศึกษาความหลากหลายของท่อนยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) พบว่าความหลากหลายของท่อนยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมีความแตกต่างกัน 11, 9 และ 8 แบบ ตามลำดับ ซึ่งดีเอ็นเอเหล่านี้ถูกเก็บไว้เป็นคลังสำหรับการศึกษายีนที่สนใจต่อไป

คณะผู้วิจัยได้ผลิตแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลจากหนูเมาส์สายพันธุ์บาลบซี (Mouse monoclonal antibodies; MAb) ที่จับจำเพาะกับแอนติเจนของโรติเฟอร์ชนิด R2 และแบคทีเรียกลุ่ม N1, N2, S และ P คือ MAb จาก clones W66, W6, W11, W34 และ W5 ตามลำดับ ทั้งนี้โดยใช้เทคนิคไฮบริโดมามาตรฐาน

คณะผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากชุมชน (หนองแขม) ที่จุดเก็บตัวอย่างสามจุด คือจุดเก็บที่ 1 ได้แก่จุดที่ Returned Activated Sludge (RAS) เพิ่งสัมผัสกับน้ำเสียที่เพิ่งเข้ามาในระบบ จุดเก็บที่ 2 คือจุดที่ Mixed liquor (RAS ผสมรวมกับน้ำเสียแล้ว) เพิ่งออกจากถังเติมอากาศ และจุดเก็บที่ 3 คือตัวอย่าง RAS (ตะกอนจุลชีพที่บำบัดของเสียในน้ำ) ที่ถูกสูบกลับไปเพื่อจะเติมให้น้ำเสียที่เข้ามาใหม่ โดยเก็บจุดละสามตัวอย่าง ทุกสัปดาห์ตลอดปี คือระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 เป็นระยะเวลา 49 สัปดาห์ (ยกเว้นเก็บตัวอย่างไม่ได้ในสัปดาห์ที่ 23 ของเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2552 และในสัปดาห์ที่ 39 และ 40 ของเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 จึงมีตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละจุดจำนวน 46 x 3 หรือ 138 ตัวอย่าง และผลจากการทดสอบใดๆที่รายงานในรายงานฉบับนี้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่ทำซ้ำสามครั้ง)

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิค W66 monoclonal antibody (MAb) based-indirect ELISA เพื่อตรวจหาและวัดปริมาณแอนติเจนของโรติเฟอร์ชนิด R2 ในตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บทั้งสามจุดตลอดปีเปรียบเทียบกับจำนวนโรติเฟอร์ชนิด R2 ในตัวอย่างเดียวกันที่ตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าจำนวนของโรติเฟอร์ชนิด R2 และปริมาณแอนติเจนของโรติเฟอร์ชนิด R2 ที่ตรวจด้วยวิธี MAb-based-indirect ELISA มีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีเยี่ยมในทุกตัวอย่างที่เก็บจากทุกจุดเก็บ อย่างไรก็ตามก็ตีจำนวนน้อยที่สุดของโรติเฟอร์ชนิด R2 ที่ W66 MAb based-indirect ELISA จะให้ผลบวกคือ จำนวนแปดตัว แต่ในตัวอย่างน้ำเสียหลายตัวอย่างมีจำนวนโรติเฟอร์ชนิด

R2 ในปริมาณน้ำเสีย 100 ไมโครลิตรที่ใช้ใน indirect ELISA น้อยกว่าแปดตัว จึงเป็นผลให้การตรวจหาปริมาณแอนติเจนของโรติเฟอร์ชนิด R2 เป็นลบในตัวอย่างเหล่านี้

คณะผู้วิจัยได้ผลิต Rabbit polyclonal antibody (PAb) ต่อแอนติเจนที่มีอยู่ในน้ำเสียจากชุมชน และพัฒนา sandwich ELISA (PAb-ตัวอย่างน้ำเสีย-MAb) เพื่อตรวจหาและวัดปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียกลุ่ม N1, N2, S และ P ในตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บทั้งสามจุดตลอดปีเปรียบเทียบกับจำนวนของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มในตัวอย่างเดียวกันที่ตรวจนับด้วยวิธีนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงชนิดครึ่งแข็งครึ่งเหลว

พบว่าจำนวนของแบคทีเรียชนิด N1 ที่ตรวจนับด้วยการนับจำนวนโคโลนีและปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N1 ที่ตรวจด้วยวิธี W6 MAb-based-sandwich ELISA มีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีเยี่ยมในทุกตัวอย่างที่เก็บจากทุกจุดเก็บตลอดทั้งปี (ค่า correlation coefficient ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.995, 0.828 และ 0.981 ตามลำดับ) โดยจำนวนโคโลนีของ N1 ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 ในขณะที่ระบบมีความเสถียร อยู่ที่ $6.2-94.8 \times 10^6$, $2.6-52.6 \times 10^6$ และ $4.1-70.6 \times 10^6$ cfu per ml ตามลำดับ และ ค่า optical densities ที่ 405 nm ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 อยู่ที่ range: 0.001-0.530, 0.001-0.470 และ 0.001-0.521; median: 0.135, 0.063 และ 0.083 และ SD: 0.180, 0.120 และ 0.170 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามก็ยังมีตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 จำนวน 9 (19.6%), 19 (41.3%) และ 11 (23.9%) ตัวอย่าง ที่ผลการตรวจด้วย W6 based-sandwich ELISA ให้ผลลบ

พบว่าจำนวนของแบคทีเรียชนิด N2 ที่ตรวจนับด้วยการนับจำนวนโคโลนีและปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N2 ที่ตรวจด้วยวิธี W11 MAb-based-sandwich ELISA มีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีเยี่ยมในทุกตัวอย่างที่เก็บจากทุกจุดเก็บตลอดทั้งปี (ค่า correlation coefficient ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.950, 0.979 และ 0.983 ตามลำดับ) โดยจำนวนโคโลนีของ N2 ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 ในขณะที่ระบบมีความเสถียร อยู่ที่ $8.4-64.5 \times 10^6$, $4.0-44.36 \times 10^6$ และ $6.1-68.0 \times 10^6$ cfu per ml ตามลำดับ และ ค่า optical densities ที่ 405 nm ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 ในขณะที่ระบบมีความเสถียร อยู่ที่ range: 0.016-0.408, 0.001-0.357 และ 0.034-0.431; median: 0.107, 0.058 และ 0.092 และ SD: 0.101, 0.070 และ 0.105 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามก็ยังมีตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 จำนวน 6 (13.0%), 15 (32.6%) และ 8 (17.4%) ตัวอย่าง ที่ผลการตรวจด้วย W11 based-sandwich ELISA ให้ผลลบ

พบว่าจำนวนของแบคทีเรียชนิด S ที่ตรวจนับด้วยการนับจำนวนโคโลนีและปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด S ที่ตรวจด้วยวิธี W34 MAb-based-sandwich ELISA มีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีเยี่ยมในทุกตัวอย่างที่เก็บจากทุกจุดเก็บตลอดทั้งปี (ค่า correlation coefficient ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.854, 0.925 และ 0.892 ตามลำดับ) โดยจำนวนโคโลนีของ S ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 ในขณะที่ระบบมีความเสถียร อยู่ที่ $10.1-38.9 \times 10^6$, $5.3-20.0 \times 10^6$ และ $8.9-45.2 \times 10^6$ cfu per ml ตามลำดับ และ ค่า optical

densities ที่ 405 nm ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 ในขณะที่ยังมีความเสถียร อยู่ที่ range: 0.020-0.325, 0.010-0.235 และ 0.020-0.339; median: 0.092, 0.056 และ 0.108 และ SD: 0.070, 0.040 และ 0.079 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ดี มีตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 จำนวน 9 (19.6%), 18 (39.1%) และ 7 (15.2%) ตัวอย่าง ที่ผลการตรวจด้วย W34 based-sandwich ELISA ให้ผลลบ

พบว่าจำนวนของแบคทีเรียชนิด P ที่ตรวจนับด้วยการนับจำนวนโคโลนีและปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด P ที่ตรวจด้วยวิธี W5 MAb-based-sandwich ELISA มีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีเยี่ยมในทุกตัวอย่างที่เก็บจากทุกจุดเก็บตลอดทั้งปี (ค่า correlation coefficient ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.828, 0.986 และ 0.994 ตามลำดับ) โดยจำนวนโคโลนีของ P ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 ในขณะที่ยังมีความเสถียร อยู่ที่ $14.7-65.0 \times 10^6$, $24.5-38.8 \times 10^6$ และ $16.3-96.4 \times 10^6$ cfu per ml ตามลำดับ และ ค่า optical densities ที่ 405 nm ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 ในขณะที่ยังมีความเสถียร อยู่ที่ range: 0.050-0.496, 0.016-0.334 และ 0.058-0.544; median: 0.185, 0.095, 0.205 และ SD: 0.121, 0.079 และ 0.123 ตามลำดับ โดยตัวอย่างจากจุดเก็บที่ 2 มี 14 ตัวอย่าง (30.4%) ที่ให้ผล W5 based-sandwich ELISA เป็นลบ แต่ไม่มีตัวอย่างใดจากจุดเก็บที่ 1 และ 3 ที่ให้ผล W5 based-sandwich ELISA เป็นผลลบเลย

สำหรับระบบบำบัดน้ำเสียที่ได้จำลองให้เกิดความไม่เสถียรด้วยการเปิด-ปิดปั๊มสำหรับเติมอากาศเพื่อให้ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอสำหรับจุลชีพ พบว่าจำนวนโรติเฟอร์ทั้งชนิดที่ 1 (R1) และชนิดที่ 2 (R2) ที่ตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ มีความสัมพันธ์ดีเยี่ยมกับสภาวะของระบบคือ เมื่อระบบไม่เสถียรจำนวนของโรติเฟอร์ทั้งสองชนิดก็จะลดลงทันที แต่การใช้ W66 based-indirect ELISA เพื่อตรวจวัดปริมาณของแอนติเจนของโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) ไม่สามารถบอกความเสถียรหรือไม่เสถียรของระบบได้

จำนวนของแบคทีเรียชนิด N1 ที่ตรวจนับด้วยการนับจำนวนโคโลนีและปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N1 ที่ตรวจด้วยวิธี W6 MAb-based-sandwich ELISA มีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีเยี่ยมในทุกตัวอย่างที่เก็บจากทุกจุดเก็บ (ค่า correlation coefficient ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 (RAS ผสมกับน้ำเสียที่เข้ามาใหม่เรียบร้อยแล้ว) และ 3 (RAS) เท่ากับ 0.996 และ 0.997 ตามลำดับ) โดยจำนวนโคโลนีของ N1 ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 ในขณะที่ยังมีความไม่เสถียร (unstable) อยู่ที่ $0.01-30.0 \times 10^6$ และ $0.015-30.0 \times 10^6$ cfu per ml ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียชนิด N1 ในระบบที่เสถียรอย่างมีนัยสำคัญ และค่า optical densities ที่ 405 nm ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 ในขณะที่ยังไม่เสถียร อยู่ระหว่าง (range) 0-0.175 และ 0-0.173 ตามลำดับ โดยมีตัวอย่างจากจุดเก็บที่ 1+2 และ 3 จำนวน 13 และ 9 ตัวอย่าง (54.2% และ 37.5%) ตามลำดับ ที่ให้ผล W6 MAb-based-sandwich ELISA เป็นลบ ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลบวกเพราะมีการเติมอากาศเข้าไปในระบบเป็นบางระยะนั้นก็ให้ OD ก่อนข้างต่ำคือไม่เกิน 0.175

พบว่าจำนวนของแบคทีเรียชนิด N2 ที่ตรวจนับด้วยการนับจำนวนโคโลนีและปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด N2 ที่ตรวจด้วยวิธี W6 MAb-based-sandwich ELISA มีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีเยี่ยมในทุกตัวอย่างที่เก็บจากทุกจุดเก็บ (ค่า correlation coefficient ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 เท่ากับ 0.993 และ 0.996 ตามลำดับ) โดยจำนวนโคโลนีของ N2 ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 ในขณะที่ระบบมีความไม่เสถียร อยู่ที่ $0.80-30.0 \times 10^6$ และ $0.35-30.0 \times 10^6$ cfu per ml ตามลำดับ ส่วนค่า optical densities ที่ 405 nm ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 ในขณะที่ระบบไม่เสถียร อยู่ระหว่าง (range) 0.005-0.177 และ 0.005-0.174 ตามลำดับ โดยมีตัวอย่างจากจุดเก็บที่ 1+2 และ 3 จำนวน 5 จาก 24 ตัวอย่าง (20.8%) ทั้งสองจุดที่ให้ผล W11 MAb-based-sandwich ELISA เป็นลบ ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลบวกเพราะมีการเติมอากาศเข้าไปในระบบเป็นบางระยะนั้นก็ให้ OD ก่อนข้างต่ำคือไม่เกิน 0.177

พบว่าจำนวนของแบคทีเรียชนิด S ที่ตรวจนับด้วยการนับจำนวนโคโลนีและปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด S ที่ตรวจด้วยวิธี W6 MAb-based-sandwich ELISA มีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีเยี่ยมในทุกตัวอย่างที่เก็บจากทุกจุดเก็บ (ค่า correlation coefficient ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 เท่ากับ 0.994 และ 0.998 ตามลำดับ) โดยจำนวนโคโลนีของ S ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 ในขณะที่ระบบมีความไม่เสถียร อยู่ที่ $0.85-30.0 \times 10^6$ และ $0.5-30.0 \times 10^6$ cfu per ml ตามลำดับ ส่วนค่า optical densities ที่ 405 nm ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 ในขณะที่ระบบไม่เสถียร อยู่ระหว่าง (range) 0.002-0.221 และ 0.001-0.195 ตามลำดับ โดยมีตัวอย่างจากจุดเก็บที่ 1+2 และ 3 จำนวน 11 และ 9 จาก 24 ตัวอย่าง (45.8% และ 37.5%) ตามลำดับ ที่ให้ผล W34 MAb-based-sandwich ELISA เป็นลบ ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลบวกเพราะมีการเติมอากาศเข้าไปในระบบเป็นบางระยะนั้นก็ให้ OD ก่อนข้างต่ำคือไม่เกิน 0.221

พบว่าจำนวนของแบคทีเรียชนิด P ที่ตรวจนับด้วยการนับจำนวนโคโลนีและปริมาณแอนติเจนของแบคทีเรียชนิด P ที่ตรวจด้วยวิธี W6 MAb-based-sandwich ELISA มีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีเยี่ยมในทุกตัวอย่างที่เก็บจากทุกจุดเก็บ (ค่า correlation coefficient ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 เท่ากับ 0.998 และ 0.997 ตามลำดับ) โดยจำนวนโคโลนีของ P ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 ในขณะที่ระบบมีความไม่เสถียร อยู่ที่ $0.06-30.0 \times 10^6$ และ $0.045-30.0 \times 10^6$ cfu per ml ตามลำดับ ส่วนค่า optical densities ที่ 405 nm ของตัวอย่างที่จุดเก็บที่ 1+2 และ 3 ในขณะที่ระบบไม่เสถียร อยู่ระหว่าง (range) 0-0.170 และ 0-0.173 ตามลำดับ โดยมีตัวอย่างจากจุดเก็บที่ 1+2 และ 3 จำนวน 8 จาก 24 ตัวอย่าง (33.3%) จากทั้งสองจุดที่ให้ผล W5 MAb-based-sandwich ELISA เป็นลบ ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลบวกเพราะมีการเติมอากาศเข้าไปในระบบเป็นบางระยะนั้นก็ให้ OD ก่อนข้างต่ำคือไม่เกิน 0.173

ดังนั้นจากการวิจัย สามารถสรุปได้ว่า W5 based-sandwich ELISA ที่ตรวจหาแอนติเจนของแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายฟอสเฟต (P) โดยใช้ตัวอย่างจากจุดเก็บที่ 1 (น้ำเสียเพิ่งเข้าสู่ระบบ) และ 3 (ตัวอย่าง returned activated sludge; RAS) เป็นวิธีที่จะบอกความเสถียรของ

ระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากชุมชนได้ดีที่สุด ส่วน W34 MAb based-sandwich ELISA ที่ตรวจหาแอนติเจนของแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายซัลเฟอร์ (S) สามารถใช้ประเมินความเสถียรของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมกระดาษได้ ยิ่งไปกว่านั้นการตรวจหาโรติเฟอร์ชนิด *Rotaria rotatoria* (R2) ด้วยวิธีทางจุลทรรศน์ศาสตร์ซึ่งสะดวกไม่ยุ่งยาก และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่างธรรมดา (light microscope) ก็สามารถใช้ประเมินความเสถียรของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากชุมชนได้ดี ซึ่งเมื่อพบ *Rotaria rotatoria* จากตัวอย่างน้ำเสียจากจุดเก็บตัวอย่างทั้งสามจุดก็แสดงว่าระบบมีความเสถียร

บทสรุปผู้บริหาร

การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวัดความเสถียรของระบบบำบัดน้ำเสีย ด้วยระบบเดิมอากาศ

การบำบัดน้ำเสียถือเป็นสิ่งจำเป็นที่ทั้งภาครัฐและภาคอุตสาหกรรมต้องให้ความสำคัญด้วย เหตุผลที่อาจจะแตกต่างกัน สำหรับภาครัฐ การกำจัดของเสียจากชุมชนก็เพื่อรักษาสภาพของสิ่งแวดล้อมและเพื่อสุขอนามัยที่ดีและความผาสุกของประชาชนเป็นสำคัญ สำหรับภาคอุตสาหกรรม มักทำเพื่อเป็นการปฏิบัติตามกฎหมายและ/หรือการสร้างภาพลักษณ์ที่ดีของภาคอุตสาหกรรมนั้นๆ ในปัจจุบันการควบคุมการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียใช้วิธีตรวจสอบคุณภาพของน้ำที่จะทิ้งออกไปสู่สิ่งแวดล้อมหลังการบำบัดและตรวจการทำงานของเครื่องจักรในระบบ การตรวจวัดการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียที่ผลลัพธ์สุดท้าย คือวัดคุณภาพของน้ำที่จะทิ้ง ถูกพบบ่อยครั้งว่าของเสียในน้ำที่จะทิ้งไม่ได้ถูกบำบัดตามที่กำหนดเพราะระบบบำบัดเกิดความผิดปกติคือเกิดภาวะไม่เสถียร แต่ก็มักสายเกินไป เพราะได้ปล่อยน้ำที่บำบัดไม่สมบูรณ์ออกไปสู่ชุมชนและสิ่งแวดล้อมไปแล้ว ซึ่งนอกจากจะทำให้ปัญหาที่เกิดขึ้นในระบบได้รับการแก้ไขล่าช้าหรือบางครั้งไม่สามารถแก้ไขได้ แล้ว ยังเป็นผลเสียเป็นอันมากในอีกหลายๆ ด้าน เช่น เป็นกรณีพิพาทระหว่างภาคอุตสาหกรรมและชุมชนที่ปรากฏอยู่เนืองๆ และส่งผลด้านลบถึงภาครัฐ

ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้เปลี่ยนวิธีการควบคุมดูแลระบบบำบัดน้ำเสีย เสียใหม่ โดยมุ่งเน้นที่การตรวจวัดปริมาณของจุลชีพที่เป็นตัวหลักในการกำจัดของเสียในระบบขณะระบบกำลังทำงานอย่างมีประสิทธิภาพหรือขณะที่ระบบมีความเสถียร ซึ่งจุลชีพเหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดในระบบบำบัดน้ำเสีย รวมทั้งได้การพัฒนาวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันที่สามารถตรวจวัดปริมาณแอนติเจนของจุลชีพเป้าหมายที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสีย เพื่อใช้แทนการตรวจคุณภาพน้ำที่กำลังจะปล่อยทิ้งสู่สิ่งแวดล้อมแบบเดิม ทั้งนี้โดยเชื่อว่าคุณภาพน้ำทิ้งจะได้มาตรฐานตลอดเวลาที่ตรวจพบว่าประชากรจุลชีพหลักหรือปริมาณแอนติเจนของจุลชีพหลักในระบบมีปริมาณเหมาะสม

ในการวิจัยคณะผู้วิจัยใช้รูปแบบการศึกษาแบบ Cross-sectional Controlled Trial Design โดยการวิจัยแบ่งเป็นการศึกษาชนิดและปริมาณของจุลชีพสำคัญในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (Activated Sludge System) คือโรติเฟอร์และแบคทีเรีย โดยใช้โรงงานบำบัดน้ำเสียที่มาจากชุมชน ที่หนองแขม กรุงเทพฯ และโรงบำบัดน้ำเสียที่มาจากโรงงานอุตสาหกรรม คือโรงบำบัดน้ำเสียจากโรงงานกระดาษ ที่จังหวัดนครสวรรค์ ในขณะที่ระบบบำบัดน้ำเสียทั้งสองแห่งมีความเสถียร เป็นต้นแบบในการศึกษา และคณะผู้วิจัยได้ผลิตแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลที่มีความจำเพาะต่อจุลชีพหลักในระบบ และใช้แอนติบอดีเหล่านี้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาและวัดปริมาณแอนติเจนของจุลชีพเป้าหมายที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีความเสถียรในช่วงเวลาต่างๆ ในรอบปี ด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันคือ MAb based-antigen detection assays

การวิจัยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งบำบัดทั้งสองแห่ง โดยเก็บจากจุดต่างๆในระบบ สามจุดคือ จุดเก็บที่ 1 ได้แก่จุดที่ Returned Activated Sludge (RAS) เพิ่งสัมผัสกับน้ำเสียที่เพิ่งเข้ามาในระบบ จุดเก็บที่ 2 คือจุดที่ Mixed liquor (RAS ผสมกับน้ำเสีย) เพิ่งออกจากถังเติมอากาศ และจุดเก็บที่ 3 คือตัวอย่าง RAS (ตะกอนจุลชีพที่บำบัดของเสียในน้ำ) ที่ถูกสูบกลับไปเพื่อจะเติมให้แก่ น้ำเสียที่เข้ามาใหม่ (ซึ่งขณะนั้นน้ำเสียเดิมได้ถูกบำบัดแล้วและพร้อมปล่อยออกเป็น surface water) แล้วนำตัวอย่างน้ำเสียไปศึกษาชนิดและปริมาณจุลชีพหลักที่พบ ณ จุดเก็บตัวอย่างทั้งสามจุด

ผลของการศึกษาชนิดและปริมาณของจุลชีพสำคัญในระบบบำบัดน้ำเสียพบว่า

โรติเฟอร์ที่พบในบ่อบำบัดน้ำเสียจากชุมชน (โรงบำบัดน้ำเสียหนองแขม) จำแนกได้เป็น 4 สายพันธุ์หลักคือ โรติเฟอร์ชนิดที่ 1 (R1): *Lacane inermis* โรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2): *Rotaria rotatoria* โรติเฟอร์ชนิดที่ 3 (R3): *Diplois daviesiae* และโรติเฟอร์ชนิดที่ 4 (R4): *Collotheca* spp. โดยพบว่าโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) หรือ *Rotaria rotatoria* มีอัตราชุกสูงสุดโดยพบอัตราชุกที่จุดเก็บที่ 1 คิดเป็น 100% จุดเก็บที่ 2 คิดเป็น 95.2% และจุดเก็บที่ 3 คิดเป็น 100% ทำให้สรุปได้ว่าโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) นี้เป็นสายพันธุ์หลัก (common species) ที่ตรวจพบได้ตลอดในระบบนิเวศน์ของระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชนแบบ activated sludge ในสภาวะที่ระบบมีความเสถียร

คณะผู้วิจัยใช้ตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม EPCCO ที่จังหวัดนครสวรรค์ซึ่งเป็นโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษเป็นต้นแบบของการศึกษาเพื่อหาปริมาณและจำแนกชนิดของโรติเฟอร์ และเนื่องจากน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมแห่งนี้ไม่มีความผันแปรตามฤดูกาล จึงไม่ได้เก็บตัวอย่างตลอดทั้งปี พบว่ามีปริมาณโรติเฟอร์ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษมีน้อยมาก และไม่สามารถจัดกลุ่มได้

คณะผู้วิจัยศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่พบในโรงบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ ด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional method) และวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular biology method) ด้วยเทคนิค Metagenomics ได้ผลดังนี้คือ สามารถเพาะ แยก และจำแนกแบคทีเรียที่ทำหน้าที่กำจัดของเสียในน้ำเสียจากชุมชนจากตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากจุดเก็บทั้งสามจุด ได้เป็น 4 กลุ่มหลัก คือกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอมโมเนีย (Nitrogen group 1; N1) กลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายไนไตรท์ (Nitrogen group 2; N2) กลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายซัลเฟอร์ (Sulfur group; S) และกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟอสเฟต (Phosphate group; P) ส่วนน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษนั้นพบเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม S ทุกจุดที่เก็บตัวอย่างทั้งสามจุด

คณะผู้วิจัยได้ศึกษา Metagenomics ของเชื้อแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชน ด้วยการสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากตัวอย่างน้ำเสียแล้วนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ไปเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR) แล้วทำการโคลนยีนเหล่านี้เข้าสู่พลาสมิด จากนั้นนำพลาสมิดเข้าสู่ แบคทีเรียเจ้าบ้านชนิดอีโคไล แล้วย่อยดีเอ็นเอที่เป็นรหัสของ 16S RNA ที่เพิ่มปริมาณจากอีโคไลทรานสฟอร์มเม้นท์แต่ละโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonucleases) สามชนิด คือ *MspI*, *HaeIII* และ *HhaI* ก่อนนำไปศึกษาความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length

Polymorphism (RFLP) พบว่าความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 1, 2 และ 3 แตกต่างกัน 11, 9 และ 8 แบบ ตามลำดับ ซึ่งดีเอ็นเอเหล่านี้ถูกเก็บไว้เป็นคลังสำหรับการศึกษายีนที่สนใจต่อไป

คณะผู้วิจัยได้ผลิตแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลจากหนูเมาส์สายพันธุ์บาลบซี (Mouse monoclonal antibodies; MAb) ที่จับจำเพาะกับแอนติเจนของโรติเฟอร์ชนิด R2 และแบคทีเรียกลุ่ม N1, N2, S และ P คือ MAb จาก clones W66, W6, W11, W34 และ W5 ตามลำดับ ทั้งนี้โดยใช้เทคนิคไฮบริโดมามาตรฐาน และใช้แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลเหล่านี้ในกรรมวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจหาและวัดปริมาณแอนติเจนของจุลชีพหลักในระบบบำบัดน้ำเสีย ผลการวิจัยสรุปได้ว่า W5 based-sandwich ELISA ที่ตรวจหาแอนติเจนของแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายฟอสเฟต (P) โดยใช้ตัวอย่างจากจุดเก็บที่ 1 และ 3 เป็นวิธีที่จะบอกความเสถียรของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากชุมชนได้ดีที่สุด ส่วน W34 MAb based-sandwich ELISA ที่ตรวจหาแอนติเจนของแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายซัลเฟอร์ (S) สามารถใช้ประเมินความเสถียรของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมกระดาษได้ ยิ่งไปกว่านั้นการตรวจหาโรติเฟอร์ชนิด *Rotaria rotatoria* (R2) ด้วยวิธีทางจุลทรรศน์ศาสตร์ซึ่งสะดวกไม่ยุ่งยากและใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่างธรรมดา (light microscope) ก็สามารถใช้ประเมินความเสถียรของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากชุมชนได้ดีซึ่งเมื่อพบ *Rotaria rotatoria* จากตัวอย่างน้ำเสียจากจุดเก็บตัวอย่างทั้งสามจุดก็แสดงว่าระบบมีความเสถียร จากการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าน่าจะนำ W5 based-sandwich ELISA และ W34 MAb based-sandwich ELISA ไปพัฒนาเพื่อใช้งานจริงในการประเมินประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชนและอุตสาหกรรมต่อไป

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ระยะเวลาของโครงการฯ วันที่ 28 กันยายน พ.ศ. 2550 ถึงวันที่ 27 กันยายน พ.ศ. 2553
(ได้รับทุนและเริ่มทำการวิจัยจริงเมื่อ มีนาคม พ.ศ. 2551)

โครงการ: การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวัดความเสถียรของระบบบำบัดน้ำเสียด้วยระบบเติมอากาศ

Development of Biotechnological Method for Assessing the Stability of Wastewater Management using Activated Sludge System

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

น้ำเสีย หมายถึงน้ำที่มีสิ่งต่าง ๆ เจือปนมากมายจนกระทั่งกลายเป็นน้ำที่ไม่เป็นที่ต้องการ และน่ารังเกียจของคนทั่วไป ไม่เหมาะสมสำหรับใช้ประโยชน์อีกต่อไป หรือถ้าปล่อยลงสู่ลำน้ำธรรมชาติก็จะทำให้คุณภาพน้ำในธรรมชาติเสียหายได้ (กรมควบคุมมลพิษ พ.ศ. ๒๕๕๓)

น้ำเสียชุมชน หมายถึงน้ำเสียที่เกิดจากกิจกรรมประจำวันของประชาชนที่อาศัยอยู่ในชุมชนและกิจกรรมที่เป็นอาชีพของครัวเรือน ได้แก่ น้ำเสียที่เกิดจากการประกอบอาหารและชำระล้างสิ่งสกปรกทั้งหลายภายในครัวเรือนและอาคารประเภทต่าง ๆ เป็นต้น (กรมควบคุมมลพิษ พ.ศ. ๒๕๕๓)

ส่วนประกอบและลักษณะของน้ำเสีย (กรมควบคุมมลพิษ พ.ศ. ๒๕๕๓)

น้ำเสียชุมชนมีส่วนประกอบและลักษณะดังนี้

1. สารอินทรีย์ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เช่น เศษข้าว ก๋วยเตี๋ยว น้ำแกง เศษใบตอง เศษพืชผัก ชันเนื้อ กระดูก เป็นต้น ซึ่งสามารถย่อยสลายได้เองโดยจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน ทำให้ระดับออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) ลดลง เกิดสภาพเน่าเหม็นได้ ปริมาณของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย นิยมวัดเป็นค่า บีโอดี (BOD ซึ่งย่อมาจาก biochemical oxygen demand) เมื่อค่าบีโอดีในน้ำสูง แสดงว่ามีสารอินทรีย์ปนอยู่มากและสภาพเน่าเหม็นจะเกิดขึ้นได้ง่าย

2. สารอนินทรีย์ ได้แก่ แร่ธาตุต่าง ๆ ที่อาจไม่ทำให้น้ำเกิดเน่าเหม็น แต่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและชีวิต เช่น คลอไรด์ ซัลเฟต เป็นต้น

3. โลหะหนักและสารพิษ อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ และสามารถสะสมอยู่ในห่วงโซ่อาหาร เกิดเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างเช่น ปปรอท โครเมียม ทองแดง ซึ่งปกติจะอยู่ในของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และสารเคมีที่ใช้กำจัดแมลง สัตว์รบกวน และศัตรูพืช ที่มักปนมากับน้ำทิ้งจากการเกษตร สำหรับในชุมชนอาจมาจากอุตสาหกรรมในครัวเรือนบางประเภท เช่นร้านชุบโลหะ อู่ซ่อมรถ เป็นต้น รวมทั้งน้ำเสียจากโรงพยาบาล

4. ไขมันและสารลอยน้ำต่าง ๆ เป็นอุปสรรคต่อการสังเคราะห์แสง กีดขวางการกระจายของออกซิเจนจากอากาศลงสู่ น้ำ และทำให้เกิดสภาพไม่สะอาด

5. ของแข็ง เมื่อจมสู่ก้นลำน้ำทำให้เกิดสภาพไร้ออกซิเจนที่ท้องน้ำ ทำให้แหล่งน้ำตื้นเขิน น้ำมีความขุ่นสูง และทำให้เกิดสภาพไม่น่าดู

6. สารก่อให้เกิดฟองและสารชักฟอง ได้แก่ ผงซักฟอก สบู่ ฟองจะกีดกันการกระจายของออกซิเจนในอากาศสู่ น้ำ และอาจเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต

7. จุลินทรีย์ น้ำเสียจากโรงพยาบาล หรือจากโรงงานบางประเภท เช่น โรงฟอกหนัง โรงฆ่าสัตว์ โรงงานอาหารกระป๋อง มักจะมีจุลินทรีย์จำนวนมาก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต จึงทำให้ออกซิเจนลดลงเมื่อมีจุลินทรีย์จำนวนมาก ลดระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และทำให้เกิดสภาพเน่าเหม็น จุลินทรีย์บางชนิดเป็นเชื้อก่อโรคในคนและ/หรือสัตว์ด้วย โดยเฉพาะจุลินทรีย์ในน้ำเสียจากโรงพยาบาล

8. ธาตุอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เมื่อมีปริมาณสูง จะช่วยให้สาหร่ายเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณรวดเร็ว (algae bloom) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการทำให้ออกซิเจนในน้ำลดต่ำลงมากโดยเฉพาะในช่วงกลางคืน นอกจากนี้ธาตุอาหารยังทำให้เกิดวัชพืชน้ำ เป็นปัญหาของการสัญจรไปมาทางน้ำอีกด้วย

9. กลิ่น มักเกิดจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือก๊าซไข่เน่า ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของสารอินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน หรือกลิ่นเหม็นอื่นๆ จากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น โรงงานปลาปน โรงฆ่าสัตว์ เป็นต้น

พารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้วัดปริมาณของเสียจากชุมชน (กรมควบคุมมลพิษ พ.ศ. ๒๕๕๓) ได้แสดงไว้ในตารางในหน้าถัดไป ส่วนพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลักษณะของน้ำเสีย ได้แก่

1. pH เป็นค่าที่บอกถึงความเป็นกรด-ด่างของน้ำเสีย โดยทั่วไปสิ่งที่มีชีวิตในน้ำหรือจุลินทรีย์ในถังบำบัดจะดำรงชีพได้ดีในสภาวะเป็นกลาง คือ pH ประมาณ 7-8

2. Biochemical oxygen demand (BOD) เป็นค่าที่บอกถึงปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ถ้าค่า BOD สูงแสดงว่ามีความต้องการออกซิเจนสูง หมายถึงมีความสกปรกหรือสารอินทรีย์อยู่ในน้ำมาก

3. Chemical oxygen demand (COD) หมายถึงปริมาณสารต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำเสีย ทั้งในลักษณะที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble solids) และละลายน้ำ (dissolved solids) ของแข็งบางชนิดมีน้ำหนักเบาและแขวนลอยอยู่ในน้ำ (suspended solids) บางชนิดหนักและจมลงเบื้องล่าง (settleable solids) ของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ สร้างปัญหาในการอุดตันเครื่องเติมอากาศในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศ (activated sludge system) และหากปล่อยทิ้งในปริมาณมากจะทำให้สกปรก ไม่น่าดู และลำน้ำธรรมชาติตื้นเขิน ตลอดจนบดบังแสงแดดที่จะส่องลงสู่ท้องน้ำด้วย

4. ไขมันและน้ำมัน (Fat, oil and grease) ส่วนใหญ่ได้แก่อน้ำมันและไขมันจากพืชและสัตว์ที่ใช้ในการทำอาหาร สบู่จากการอาบน้ำ และฟองสารซักฟอกจากการชะล้าง สารเหล่านี้มีน้ำหนักเบาและลอยน้ำ ทำให้เกิดสภาพไม่น่าดูและขวางกั้นการซึมของออกซิเจนจากอากาศลงสู่แหล่งน้ำ นอกจากนี้ยังมีค่า BOD สูงเพราะเป็นสารอินทรีย์

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม ต่อ ลิตร)		
	น้อย	ปานกลาง	มาก
1. ของแข็งทั้งหมด (Total solids)	350	720	1,200
- ของแข็งละลายน้ำ	250	500	580
- ของแข็งแขวนลอย	100	220	350
2. ปริมาณตะกอนหนัก (Settleable solids)	5	10	20
3. ค่าบีโอดี (Biochemical oxygen demand; BOD)	110	220	400
4. ค่าซีโอดี (Chemical oxygen demand; COD)	250	500	1,000
5. ไนโตรเจนทั้งหมด (Total as N)	20	40	85
- อินทรีย์ไนโตรเจน (Organic N)	8	15	35
- แอมโมเนีย (Free ammonia)	12	25	50
- ไนไตรท์ (Nitrites)	0	0	0
- ไนเตรท (Nitrate)	0	0	0
6. ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total as P)	4	8	15
- สารอินทรีย์ (Organic)	1	3	5
- สารอนินทรีย์ (Inorganic)	3	5	10
7. คลอไรด์ (Chlorides) ⁽¹⁾	30	50	100
8. ซัลเฟต (Sulfate) ⁽¹⁾	20	30	50
9. สภาพด่าง (Alkalinity as CaCO ₃)	50	100	200
10. ไขมัน (Grease)	50	100	150
11. โคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด (Total coliforms)	10^6 - 10^7	10^7 - 10^8	10^8 - 10^9
MPN/100 ml			

⁽¹⁾ เป็นค่าที่เพิ่มจากค่าที่ตรวจพบในน้ำใช้ปกติ

ที่มา: Wastewater Engineering (Metcalf and Eddy, 1991)

กลไกการบำบัดน้ำเสีย

การบำบัดน้ำเสียสามารถแบ่งตามกลไกในการกำจัดสิ่งเจือปนในน้ำเสียได้ดังนี้

1. การบำบัดทางกายภาพ (Physical treatment) เป็นวิธีการแยกเอาสิ่งเจือปน เช่น ของแข็งขนาดใหญ่ กระดาษ พลาสติก เศษอาหาร กรวด-ทราย ไขมันและน้ำมัน ออกจากน้ำเสียโดยใช้อุปกรณ์ในการบำบัดทางกายภาพ คือตะแกรงดักขยะ ถังดักกรวด-ทราย ถังดักไขมันและน้ำมัน และถังตกตะกอน ซึ่งเป็นการลดปริมาณของแข็งในน้ำเป็นหลัก

2. การบำบัดทางเคมี (Chemical treatment) เป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยใช้กระบวนการทางเคมีเพื่อทำปฏิกิริยากับสิ่งเจือปนในน้ำเสีย วิธีการนี้จะใช้กับน้ำเสียที่มีส่วนประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้ คือ มีค่า pH สูงหรือต่ำเกินไป มีสารพิษ มีโลหะหนัก มีของแข็งแขวนลอยที่ตกตะกอนยาก มีไขมันและไขมันที่ปะปนกับน้ำ มีไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสสูงเกินไป และมีเชื้อโรค ทั้งนี้ อุปกรณ์ที่ใช้บำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางเคมี ได้แก่ ถังกวนเร็ว ถังกวนช้า ถังตกตะกอน ถังกรอง และ ถังฆ่าเชื้อโรค

3. การบำบัดทางชีวภาพ (Biological treatment) เป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพหรือใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดสิ่งเจือปนในน้ำเสีย โดยเฉพาะสารคาร์บอนอินทรีย์ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส โดยสิ่งสกปรกเหล่านี้จะถูกใช้เป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ในถังเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโตและในขณะเดียวกันก็ทำให้น้ำเสียมีความสกปรกลดลง โดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจเป็นพวกที่ใช้ออกซิเจน (aerobic organisms) หรือไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic organisms) ก็ได้ ระบบบำบัดน้ำเสียที่อาศัยหลักการทางชีวภาพ ได้แก่ ระบบแอกติเวตเต็ดสลัดจ์ (activate sludge; AS) ระบบแผ่นจานหมุนชีวภาพ (rotated biological contactor; RBC) ระบบคลองวนเวียน (oxidation ditch; OD) ระบบบ่อเติมอากาศ (aerated lagoon; AL) ระบบโปรยกรอง (tricking filter) ระบบบ่อฝืด (stabilization pond) ระบบยูเอเอสบี (upflow anaerobic sludge blanket) และระบบกรองไร้อากาศ (anaerobic filter; AF) เป็นต้น

โดยทั่วไปการบำบัดน้ำเสีย สามารถแบ่งตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การบำบัดขั้นต้น (Preliminary treatment) และการบำบัดเบื้องต้น (primary treatment)

เป็นการบำบัดเพื่อแยกกรวด-ทราย และของแข็งขนาดใหญ่ ออกจากของเหลวหรือน้ำเสีย โดยใช้เครื่องจักร อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย ตะแกรงหยาบ (coarse screen) ตะแกรงละเอียด (fine screen) ถังดักกรวด-ทราย (grit chamber) ถังตกตะกอนเบื้องต้น (primary sedimentation tank) และเครื่องกำจัดไขมัน (skimming device) การกำจัดของเสียขั้นนี้สามารถกำจัดของแข็งแขวนลอยได้ร้อยละ 50-70 และกำจัดสารอินทรีย์ซึ่งวัดในรูปของค่า BOD ได้ร้อยละ 25-40

2. การบำบัดขั้นที่สอง (secondary treatment)

เป็นการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น และการบำบัดเบื้องต้นมาแล้ว แต่ยังคงมีของแข็งแขวนลอยขนาดเล็กและสารอินทรีย์ที่ละลายและไม่ละลายในน้ำเสียคงเหลืออยู่ โดยทั่วไปการบำบัดขั้นที่สองนี้ หรือที่เรียกอีกอย่างว่า การบำบัดทางชีวภาพ (biological treatment) จะอาศัยหลักการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบภายใต้สภาวะที่ควบคุมได้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกินและใช้สารอินทรีย์ให้ได้รวดเร็วกว่าที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติและมีการแยก

ตะกอนจุลินทรีย์ออกจากน้ำทิ้งโดยใช้ถังตกตะกอน (sedimentation tank) ทำให้น้ำทิ้งมีคุณภาพดีขึ้น จากนั้นจึงผ่านน้ำเข้าระบบฆ่าเชื้อโรค (disinfection) เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีจุลินทรีย์ที่สามารถก่อโรคปนเปื้อน ก่อนจะระบายน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเป็น surface water หรือนำกลับไปใช้ประโยชน์ (reuse) ต่อไป การบำบัดน้ำเสียในขั้นนี้สามารถกำจัดของแข็งแขวนลอยและสารอินทรีย์ซึ่งวัดในรูปของค่า BOD ได้ร้อยละประมาณ 80

3. การบำบัดน้ำเสียในขั้นสูง (advanced treatment หรือ tertiary treatment)

เป็นกระบวนการกำจัดสารอาหาร (ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส) สี สารแขวนลอยที่ตกตะกอนยากและอื่นๆ ซึ่งยังไม่ได้ถูกกำจัดในขั้นที่สอง ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดียิ่งขึ้น และเหมาะสมเพียงพอที่จะนำกลับไปใช้ใหม่ (recycle) ได้ นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการเติบโตมากเกินไปของสาหร่ายที่เป็นสาเหตุของการเกิดน้ำเน่า แก้ไขปัญหาความน่ารังเกียจของแหล่งน้ำอันเนื่องจาก สี และแก้ไขปัญหาคืออื่นๆ ที่ระบบบำบัดขั้นที่สองไม่สามารถกำจัดได้ กระบวนการบำบัดขั้นสูงได้แก่

- การกำจัดฟอสฟอรัส ซึ่งมีทั้งแบบใช้กระบวนการทางเคมีและแบบใช้กระบวนการทางชีวภาพ
- การกำจัดไนโตรเจน ซึ่งมีทั้งแบบใช้กระบวนการทางเคมีและแบบใช้กระบวนการทางชีวภาพ โดยวิธีการทางชีวภาพมีสองขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเปลี่ยนแอมโมเนียในโตรเจนให้เป็นไนเตรทที่เกิดขึ้นในสภาวะใช้ออกซิเจน หรือที่เรียกว่า กระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) และขั้นตอนการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นก๊าซไนโตรเจนซึ่งเกิดขึ้นในสภาวะไร้ออกซิเจน หรือที่เรียกว่า กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (denitrification)
- การกำจัดฟอสฟอรัสและไนโตรเจนร่วมกัน ใช้กระบวนการทางชีวภาพซึ่งเป็นการใช้ทั้งกระบวนการแบบใช้อากาศและกระบวนการแบบไม่ใช้อากาศ ร่วมกับกระบวนการจับใช้ฟอสฟอรัสอย่างฟุ่มเฟือย (phosphorus luxury uptake) ซึ่งต้องการใช้กระบวนการแบบใช้อากาศต่อด้วยกระบวนการแบบไม่ใช้อากาศด้วยเช่นกัน
- การกรอง (filtration) เป็นกระบวนการกำจัดสารที่ไม่ต้องการด้วยวิธีทางกายภาพ อันได้แก่ สารแขวนลอยที่ตกตะกอนได้ยาก เป็นต้น
- การดูดซับ (adsorption) เป็นกระบวนการกำจัดสารอินทรีย์ที่มีในน้ำเสียด้วยกระบวนการดูดซับบนพื้นผิวของของแข็ง รวมทั้งการกำจัดกลิ่น หรือก๊าซ ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการเดียวกัน

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอกทิเวเตดสลัดจ์ (Activated Sludge; AS)

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอกทิเวเตดสลัดจ์ เป็นวิธีบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีการทางชีววิทยาโดยใช้แบคทีเรียพวกที่ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) เป็นตัวหลักในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย สามารถบำบัดได้ทั้งน้ำเสียชุมชนและน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม แต่การเดินระบบประเภทนี้จะมี

ความยุ่งยากซับซ้อนเนื่องจากจำเป็นต้องมีการควบคุมสภาวะแวดล้อมและลักษณะทางกายภาพต่าง ๆ ให้เหมาะสมแก่การทำงานและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ เพื่อให้ระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดสูงสุด

ในปัจจุบันระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์มีการพัฒนาใช้งานหลายรูปแบบ เช่น ระบบแบบกวนสมบูรณ์ (completely mixed) กระบวนการปรับเสถียรสัมผัส (contact stabilization process) ระบบคลองวนเวียน (oxidation ditch) หรือระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ (sequencing batch reactor) เป็นต้น

หลักการทำงานของระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอกทิเวเตดสลัดจ์โดยทั่วไปจะประกอบด้วยส่วนสำคัญสองส่วน คือ ถังเติมอากาศ (aeration tank) และถังตกตะกอน (sedimentation tank) โดยน้ำเสียจะถูกส่งเข้าถังเติมอากาศ ซึ่งมีสลัดจ์อยู่เป็นจำนวนหนึ่งตามที่ต้องการ (ส่วนใหญ่ถูกสูบกลับมาจากถังตกตะกอน จึงมักเรียกว่า returned activated sludge; RAS) สภาวะภายในถังเติมอากาศจะมีสภาพที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แบบแอโรบิก จุลินทรีย์เหล่านี้ซึ่งมีทั้งสัตว์ตัวเล็กเช่นโรติเฟอร์ (Rotifers) โปรโตซัว และแบคทีเรีย จะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียให้อยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในที่สุด น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วจะไหลต่อไปยังถังตกตะกอนเพื่อแยกสลัดจ์ (ตะกอนที่เกิดจากจุลินทรีย์จำนวนมากเกาะกัน) ออกจากน้ำใส สลัดจ์ที่แยกตัวอยู่ในถังตกตะกอนส่วนหนึ่งจะถูกสูบกลับเข้าไปในถังเติมอากาศใหม่ (returned activated sludge; RAS) เพื่อรักษาความเข้มข้นของสลัดจ์ในถังเติมอากาศให้ได้ตามที่กำหนด และอีกส่วนหนึ่งจะเป็นสลัดจ์ส่วนเกิน (excess sludge) ที่ต้องนำไปกำจัดต่อไป สำหรับน้ำใสส่วนบนจะเป็นน้ำทิ้งที่สามารถระบายออกสู่สิ่งแวดล้อมได้

รูปแบบต่างๆ ของระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์

1. ระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์แบบกวนสมบูรณ์ (completely mixed activated sludge; CMAS) ลักษณะสำคัญของระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์แบบนี้ คือ จะต้องถังเติมอากาศที่สามารถกวนให้น้ำเสียและสลัดจ์ที่อยู่ในถังผสมเป็นเนื้อเดียวกันตลอดทั่วทั้งถัง ระบบแบบนี้สามารถรับภาระการบรรทุกสารอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (shock load) ได้ดี เนื่องจากน้ำเสียกระจายไปทั่วถึง และสภาพแวดล้อมต่างๆ ในถังเติมอากาศก็มีค่าสม่ำเสมอทำให้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ มีลักษณะเดียวกันตลอดทั้งถัง (uniform population)

2. ระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์แบบปรับเสถียรสัมผัส (contact stabilization activated sludge; CSAS) ลักษณะสำคัญของระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์แบบนี้ คือ จะแบ่งถังเติมอากาศออกเป็นสองถังโดยอิสระจากกัน ได้แก่ ถังสัมผัส (contact tank) และถังย่อยสลาย (stabilization tank) โดยตะกอนที่สูบมาจากถังตกตะกอนขึ้นสองจะถูกส่งมาเติมอากาศใหม่ในถังย่อยสลาย จากนั้นตะกอนจะถูกส่งมาสัมผัสกับน้ำเสียในถังสัมผัส (contact tank) เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียในถังสัมผัสนี้ ความเข้มข้นของสลัดจ์จะลดลงตามปริมาณน้ำเสียที่ผสมเข้ามาใหม่ น้ำเสียที่ถูกบำบัดแล้วจะไหลไปยังถังตกตะกอนขึ้นที่สองเพื่อแยกตะกอนกับส่วนน้ำใส โดยน้ำใส

ส่วนบนจะถูกระบายออกจากระบบ และตะกอนที่ก้นถังส่วนหนึ่งจะถูกสูบกลับไปเข้าถังย่อยสลาย และอีกส่วนหนึ่งจะนำไปทิ้ง ทำให้บ่อเติมอากาศมีขนาดเล็กกว่าบ่อเติมอากาศของระบบแอกติเวเต็ดสลัดจ์ทั่วไป

3. ระบบคลองวนเวียน (oxidation ditch; OD) ลักษณะสำคัญของระบบแอกติเวเต็ดสลัดจ์แบบนี้ คือ รูปแบบของถังเติมอากาศจะมีลักษณะเป็นวงรีหรือวงกลม ทำให้น้ำไหลวนเวียนตามแนวยาว (plug flow) ของถังเติมอากาศ และรูปแบบการกวนที่ใช้เครื่องกลเติมอากาศตีน้ำในแนวนอน (horizontal surface aerator) รูปแบบของถังเติมอากาศลักษณะนี้จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า แอน็อกซิก (anoxic zone) ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนละลายในน้ำทำให้ไนเตรทไนโตรเจน (NO_3^{2-}) ถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจน (N_2) โดยแบคทีเรียจำพวกไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (*Nitrosomonas* spp. และ *Nitrobacter* spp.) ทำให้ระบบสามารถบำบัดไนโตรเจนได้

4. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ (sequencing batch reactor) ลักษณะสำคัญของระบบแอกติเวเต็ดสลัดจ์แบบนี้ คือ เป็นระบบแอกติเวเต็ดสลัดจ์ ประเภทเติมเข้า-ถ่ายออก (fill and draw activated sludge) โดยมีขั้นตอนในการบำบัดน้ำเสียแตกต่างจากระบบตะกอนเร่งแบบอื่นๆ คือ การเติมอากาศ (aeration) และการตกตะกอน (sedimentation) จะดำเนินการเป็นไปตามลำดับภายในถังปฏิกริยาเดียวกัน โดยการเดินระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์หนึ่งรอบการทำงาน (1 cycle) จะมี 5 ช่วงตามลำดับ ดังนี้ 1) ช่วงเติมน้ำเสีย (fill) เพื่อนำน้ำเสียเข้าระบบ 2) ช่วงทำปฏิกิริยา (react) เป็นการลดสารอินทรีย์ในน้ำเสีย (ลด BOD) 3) ช่วงตกตะกอน (settle) ทำให้ตะกอนจุลินทรีย์ตกลงก้นถังปฏิกริยา 4) ช่วงระบายน้ำทิ้ง (draw) ระบายน้ำที่ผ่านการบำบัด และ 5) ช่วงพักระบบ (idle) เพื่อซ่อมแซมหรือรอรับน้ำเสียใหม่ โดยการเดินระบบสามารถเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในแต่ละช่วงได้ง่าย ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการบำบัด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความยืดหยุ่นของระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์

ตัวอย่างระบบแอกติเวเต็ดสลัดจ์ที่ใช้ในประเทศไทย

แหล่งชุมชนระดับเทศบาลหลายแห่งใช้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอกติเวเต็ดสลัดจ์ อาทิเช่น

- ระบบแอกติเวเต็ดสลัดจ์แบบปรับเสถียรสัมผัส ได้แก่ โครงการระบบบำบัดน้ำเสียสี่พระยาของกรุงเทพมหานคร ขนาดของระบบสามารถรองรับน้ำเสียได้ 30,000 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน
- ระบบคลองวนเวียน ได้แก่ เทศบาลตำบลแสนสุข จังหวัดชลบุรี มี 2 แบบ ได้แก่ ระบบบำบัดน้ำเสียแสนสุขเหนือ ขนาดของระบบสามารถรองรับน้ำเสียได้ 14,000 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน ใช้พื้นที่ในการก่อสร้าง 12 ไร่ และระบบบำบัดน้ำเสียแสนสุขใต้ ขนาดของระบบสามารถรองรับน้ำเสียได้ 9,000 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน ใช้พื้นที่ในการก่อสร้าง 12 ไร่
- ระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ ได้แก่ โครงการระบบบำบัดน้ำเสียยานนาวา ของกรุงเทพมหานคร หรือเรียกว่า cyclic activated sludge system ขนาดของระบบสามารถรองรับน้ำเสียได้ 200,000 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน

ปัญหาตะกอนไม่จมตัว (bulking sludge) และการเกิดตะกอนลอย (rising sludge) ของระบบ แอกทิเวเต็ดสลัดจ์

ตะกอนไม่จมตัว (bulking sludge) เกิดจากสภาวะที่มีจุลินทรีย์จำพวกเส้นใย (filamentous organisms) มากเกินไป โดยจุลินทรีย์จำพวกเส้นใยเหล่านี้เป็นสาเหตุทำให้ตะกอนจุลินทรีย์ในถังเติมอากาศไม่จับตัวกันเป็นฟล็อก (Floc) เมื่อไหลไปยังถังตกตะกอนจะพบว่าตะกอนจุลินทรีย์เหล่านี้จะลอยขึ้นมาคล้ายลูกคลื่นเป็นชั้นตลอดทั่วทั้งถังตกตะกอน

การป้องกันการเกิดจุลินทรีย์จำพวกเส้นใยในระบบนั้นต้องควบคุมให้ระบบมีสภาวะการทำงานที่เหมาะสม ได้แก่ การควบคุมค่าออกซิเจนละลายน้ำในถังเติมอากาศไม่ให้ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร การเติมสารอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในปริมาณที่พอเหมาะ การควบคุม pH ไม่ให้ต่ำกว่า 6.5 เป็นต้น

ตะกอนลอย (rising sludge) เกิดจากสภาวะดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนไนโตรเจนและไนเตรตเป็นก๊าซไนโตรเจน โดยก๊าซไนโตรเจนจะสะสมตัวอยู่ใต้ชั้นของตะกอนจุลินทรีย์ในถังตกตะกอนจนมากพอที่จะดันให้ตะกอนจุลินทรีย์เหล่านั้นลอยขึ้นมาเป็นก้อนใหญ่ๆ เมื่อลอยขึ้นมาจนถึงผิวน้ำแล้วจะแตกกระจายออกเป็นแผ่นมองเห็นฟองก๊าซเล็กๆ ลอยขึ้นมากับตะกอน

การแก้ปัญหาตะกอนลอย ได้แก่ การเพิ่มอัตราการสูบตะกอนกลับจากถังตกตะกอนเพื่อลดระยะเวลาเก็บกักตะกอนในถังตกตะกอนหรือลดอายุสลัดจ์ (reduction of sludge age) โดยการเพิ่มอัตราการระบายตะกอนส่วนเกิน (excess sludge) ที่

การบำบัดน้ำเสียถือเป็นสิ่งจำเป็นที่ทั้งภาครัฐและภาคอุตสาหกรรมต้องให้ความสำคัญด้วยเหตุผลที่อาจจะแตกต่างกันอยู่บ้าง สำหรับภาครัฐการบำบัดน้ำเสียก็เพื่อการรักษาสุขภาพของสิ่งแวดล้อมและเพื่อสุขอนามัยที่ดีและความผาสุกของประชาชนเป็นสำคัญ ทั้งนี้เพราะน้ำเสียมีสารพิษต่างๆ และเชื้อโรคปนเปื้อนอยู่มาก ดังที่ได้ยกตัวอย่างไว้แล้ว แต่สำหรับภาคอุตสาหกรรมมักทำการบำบัดน้ำเสียเพื่อเป็นการปฏิบัติตามกฎหมายและ/หรือการสร้างภาพลักษณ์ที่ดีของภาคอุตสาหกรรมนั้นๆ ซึ่งเท่าที่ผ่านมา การควบคุมการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสีย (ซึ่งมีทั้งระบบเติมอากาศและระบบที่ไม่ใช้ออกซิเจน) ใช้วิธีตรวจสอบคุณภาพของน้ำที่จะทิ้งหลังการบำบัดและตรวจการทำงานของเครื่องจักรในระบบเท่านั้น แต่การตรวจสอบจำนวนประชากรของจุลชีพซึ่งเป็นตัวทำหน้าที่หลักในกระบวนการบำบัดของเสีย (ใช้ของเสียในน้ำเสียเพื่อการเจริญเติบโตของจุลชีพ) และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดในระบบบำบัดน้ำเสียนั้นถูกมองข้ามไป บางแห่งอาจจะมีการตรวจวัดจุลชีพในกระบวนการทำงานอยู่บ้าง แต่ก็เป็นการตรวจคร่าวๆ คือมีเพียงการวัดมวลของของแข็งรวม (total solid mass) ที่เป็นตะกอนของจุลชีพเมื่อจะปล่อยน้ำทิ้งออกไป หรือมีการตรวจวัดทางกายภาพของระบบ ซึ่งเป็นการตรวจทางอ้อมเท่านั้น ไม่ได้ตรวจหาและวัดปริมาณของจุลชีพที่ทำหน้าที่กำจัดของเสียในน้ำเสียซึ่งเป็นกระบวนการทำงานที่เกิดขึ้นจริงในระบบ โดยตรง การตรวจวัดการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียที่ผลลัพธ์สุดท้ายของระบบเท่าที่เป็นอยู่ คือวัดที่คุณภาพน้ำทิ้งดังกล่าวข้างต้นนั้น มักสายเกินไปกว่าที่จะทราบว่ามีปัญหาเกิดขึ้นแล้วในระบบ บ่อยครั้งที่ส่งผลให้ปัญหาที่เกิดขึ้นได้รับการแก้ไขล่าช้าหรือ

บางครั้งไม่สามารถแก้ไขได้ เพราะได้ปล่อยน้ำที่บำบัดไม่สมบูรณ์ออกเป็น surface water สู่มุมชนและสิ่งแวดล้อมไปแล้ว อันเป็นผลเสียเป็นอันมากในหลายๆ ด้าน รวมทั้งเกิดเป็นกรณีพิพาทระหว่างภาคอุตสาหกรรมและชุมชนและส่งผลถึงภาครัฐ อยู่เนืองๆ

คณะผู้วิจัยจึงได้เสนอเปลี่ยนมุมมองและวิธีการควบคุมดูแลระบบบำบัดน้ำเสียเสียใหม่ด้วยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ โดยมุ่งเน้นที่การดูแลและตรวจวัดปริมาณของจุลชีพในระบบขณะระบบกำลังทำงานอย่างมีประสิทธิภาพคือขณะที่ระบบมีความเสถียร แทนการตรวจคุณภาพน้ำทิ้งที่ปลายเหตุแบบเดิม เนื่องจากเชื่อว่าหากสามารถตรวจสอบและดูแลกระบวนการทำงานที่แท้จริงของระบบให้คงที่ (คือมีปริมาณของจุลชีพหลักที่ทำหน้าที่กำจัดของเสียอยู่ในเกณฑ์ปกติในระบบ) ได้แล้ว ผลลัพธ์ที่ได้ (การกำจัดของเสียในน้ำเสีย) ย่อมเป็นไปตามสภาวะของกระบวนการที่เกิดขึ้น อันเป็นสภาวะที่พึงประสงค์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของจุลชีพประเภทต่าง ๆ ที่มีอยู่ภายในระบบบำบัดน้ำเสียที่อยู่ในสภาวะเสถียรในลำดับแรกและพัฒนาเทคนิคและวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันสำหรับตรวจวัดปริมาณของจุลชีพเหล่านั้นในระบบที่มีความเสถียรเป็นลำดับถัดไป ทั้งนี้เพื่อให้ทราบถึงสถานะของระบบที่เป็นปัจจุบัน ซึ่งจะทำให้สามารถป้องกันก่อนที่จะเกิดปัญหาขึ้น หรือแก้ปัญหาได้รวดเร็ว หากพบจำนวนที่ผิดปกติในกลุ่มประชากรของจุลชีพที่สำคัญหรือปริมาณที่ผิดปกติของแอนติเจนของจุลชีพที่สำคัญของระบบ รวมทั้งทำให้มั่นใจได้ว่าคุณภาพน้ำทิ้งจะได้มาตรฐานตลอดเวลาที่ตรวจพบว่าประเภทและปริมาณของประชากรจุลชีพที่สำคัญในระบบมีอยู่อย่างเหมาะสม

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาชนิดของจุลชีพสำคัญที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศระบบแอกทิเวเตดสลัดจ์ (Activated Sludge System) ในโรงงานกำจัดน้ำเสียจากชุมชน คือโรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม และโรงงานกำจัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมคือโรงงานกระดาษ ที่จังหวัดนครสวรรค์ ในขณะที่ระบบมีความเสถียรในช่วงเวลาต่างๆ ในรอบหนึ่งปี ด้วยวิธีทางจุลทรรศน์ศาสตร์และจุลชีววิทยา และหาความสัมพันธ์ของอัตราส่วนของจุลชีพชนิดต่างๆ ในระบบกับคุณภาพของน้ำที่ออกจากระบบ จากนั้นได้พัฒนาวิธีการตรวจประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียโดยการตรวจวัดปริมาณแอนติเจนของจุลชีพหลักที่มีอยู่ในระบบขณะที่ระบบมีความเสถียรโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่วิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันในรูปแบบของ antigen-based-assay ที่ใช้ monoclonal antibody ที่จับจำเพาะกับแอนติเจนของจุลชีพหลักเป็นตัวตรวจจับแอนติเจน ซึ่งเมื่อพบว่าปริมาณแอนติเจนของจุลชีพหลัก ณ จุดต่างๆ ในระบบในช่วงเวลาต่างๆ ในรอบปี ยังมีอยู่ในปริมาณที่เป็นปกติ ก็ย่อมแสดงว่าระบบบำบัดน้ำเสียยังทำงานได้ตามปกติ คณะผู้วิจัยได้ออกแบบให้ชุดตรวจดังกล่าวสามารถทำการตรวจหาแอนติเจนได้ง่าย สะดวก รวดเร็วและประหยัดกว่าวิธีทางกายภาพที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน คือใช้หลักการของ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ผลการวิจัยที่ได้รับคือมี monoclonal antibodies ที่จับจำเพาะกับแอนติเจนของจุลชีพสำคัญของระบบบำบัดน้ำเสียแบบเดิมอากาศ มีวิธีการตรวจหาและวัดปริมาณของแอนติเจนของจุลชีพหลักในระบบบำบัดน้ำเสียที่น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตอบสนองความต้องการของภาคอุตสาหกรรมในส่วนของการบำบัดน้ำเสียได้ โดยใช้เทคนิคที่

ทางคณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดปริมาณของประชากรจุลชีพที่บำบัดน้ำเสียโดยตรง ซึ่งในขณะนี้ยังไม่มีผู้ใช้วิธีนี้ คณะผู้วิจัยเชื่อว่าการที่ได้คิดและเริ่มต้นก่อนจะมีเทคโนโลยีและเครื่องมือที่เหมาะสมกว่าและก่อนผู้อื่นถือเป็นข้อได้เปรียบในสภาวะการแข่งขันที่ยิ่งจะทวีความรุนแรงมากขึ้นเรื่อยๆ ของโลกปัจจุบันและอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. วัตถุประสงค์หลัก (Principal objective)

เพื่อพัฒนาวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันในการตรวจวัดปริมาณแอนติเจนของประชากรจุลชีพ สำหรับประเมินความเสถียรของระบบการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (Activated Sludge System) ให้สามารถใช้งานจริงได้ในภาคอุตสาหกรรม

2. วัตถุประสงค์เฉพาะ (Specific objectives)

2.1 ศึกษากลุ่มประชากรจุลชีพและบทบาทที่สำคัญของกลุ่มจุลชีพต่างๆ ที่มีความสำคัญในการกำจัดมลภาวะในถังบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ

2.2 พัฒนาการตรวจวัดปริมาณประชากรจุลชีพที่มีบทบาทสำคัญในการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ โดยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

2.3 ศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของสถานะของถังบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศและประสิทธิภาพในการบำบัด กับผลการวัดปริมาณของประชากรจุลชีพที่วัดได้จากเทคนิคการวัดปริมาณแอนติเจนที่พัฒนาขึ้น

ระเบียบวิธีวิจัย

ก. รูปแบบของการวิจัย ใช้รูปแบบการศึกษาแบบ Cross-sectional Controlled Trial Design

ข. ขั้นตอนการศึกษา

ส่วนที่หนึ่ง การศึกษาความหลากหลายของเชื้อโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์ที่พบในบ่อบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional method)

1. การเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งกำเนิด โดยใช้ตัวอย่างจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขมซึ่งบำบัดน้ำเสียจากชุมชน และโรงควบคุมคุณภาพน้ำของโรงงานเยื่อกระดาษที่จังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และทั้งสองแห่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Activated Sludge เป็นต้นแบบในการศึกษา

2. ศึกษาและจำแนกประเภทของโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์ในระบบนิเวศของการบำบัดน้ำเสียจากแหล่งกำเนิด โดยการตรวจวิเคราะห์รูปร่างลักษณะและโครงสร้าง (Taxonomy) ของจุลชีพดังกล่าว เพื่อหาจุลชีพกลุ่มหลักของระบบที่พบในน้ำเสียทั้งสองแหล่งที่เป็นต้นแบบในการศึกษา รวมทั้งกลุ่มที่แตกต่างกันตามลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย

3. ตรวจประเมินชนิด ปริมาณ หรือจำนวนของโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์กลุ่มหลักในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีความเสถียร ในช่วงเวลาต่างๆ ในรอบปีที่มีน้ำเสียเข้าสู่ระบบในปริมาณที่แตกต่างกัน และหาความสัมพันธ์ของปริมาณ หรือจำนวนของโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์กลุ่มหลักกับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสถียรของระบบบำบัดน้ำเสีย

ส่วนที่สอง: การศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่พบในโรงบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional method) และวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular biology method) ด้วยเทคนิค Metagenomics

2.1 ศึกษาด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional method)

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากถัง Activated Sludge จากตะกอนที่ตกกันถึง (ซึ่งจะ represent Returned Activated Sludge; RAS) (ในการปฏิบัติจริงผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างเพิ่มอีกสองจุดเก็บ) โดยตัวอย่างจะถูกบรรจุในกล่องควบคุมความเย็น และนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการเพาะเชื้อโดยมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

2.1.1 การปั่นแยก (Differential Centrifugation) เพื่อแยกสิ่งมีชีวิตกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ เช่น โรติเฟอร์ และ ciliates อื่นๆ ออกจากแบคทีเรีย โดยใช้ความเร็วรอบต่ำ ประมาณ $2,000 \times g$ ซึ่งสิ่งมีชีวิตดังกล่าวและวัตถุขนาดใหญ่จะตกตะกอน ส่วนแบคทีเรียจะอยู่ใน supernatant จากนั้นปั่น supernatant ซ้ำด้วยความเร็วสูงประมาณ $12,000 \times g$ แบคทีเรียทั้งหมดจะตกตะกอน แล้วนำตะกอนไป resuspend ในปริมาตรน้อยๆ

2.1.2 นำตะกอนจากการปั่นครั้งแรกไปตรวจจำแนกชนิดและจำนวนของสิ่งมีชีวิตกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ เช่น โรติเฟอร์ และ ciliates ส่วน resuspended pellet จากการปั่นครั้งที่สองนำไปทำการเจือจางตามวิธี standard dilution method แล้วทำตามข้อ 2.1.3

2.1.3 ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม หลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม

2.1.4 คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเพื่อนำไปทดสอบเอกลักษณ์ทางชีวเคมีเพื่อบอกชนิดของเชื้อ และศึกษาความหลากหลายของเชื้อ

2.1.5 คัดเลือกเชื้อกลุ่มที่จะใช้สำหรับพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันต่อไป

2.2 ศึกษาด้วยทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค Metagenomics

2.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเสีย

ดำเนินการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป แล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย Gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1× TBE ย้อมแผ่นเจลดังกล่าวด้วยสาร Ethidium bromide แล้วสังเกตแถบดีเอ็นเอโดย UV illuminator จากนั้นทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย spectrophotometry

2.2.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีนนี้ ตรวจสอบ PCR product ที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

2.2.3 สร้าง Ribosomal gene library

นำ PCR product ที่เตรียมได้จากข้างต้นมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป แล้วทำการโคลนชิ้นส่วนยีนดังกล่าวเข้า cloning vector แล้ว transform เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA เพื่อนำไปสกัดพลาสมิด

นำ Plasmid ที่ได้ไปศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา แล้วจัดหมวดหมู่ของเชื้อแบคทีเรียที่พบเพื่อศึกษาลำดับเบสต่อไป

ส่วนที่สาม การพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแอนติเจนของจุลชีพในบ่อบำบัดน้ำเสีย

ทำการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อจุลชีพที่สำคัญที่พบในบ่อบำบัดน้ำเสีย

3.1 การผลิตโพลีโคลนาลแอนติบอดี (Polyclonal antibodies; PAb)

3.1.1 เตรียมเชื้อจุลชีพจากแต่ละกลุ่มที่ถูกจัดหมวดหมู่ในการทดลองข้างต้น

3.1.2 นำมา immunize ในสัตว์ทดลอง (กระต่าย หรือ หนู)

3.1.3 ทำการเก็บซีรัมของสัตว์ทดลองที่ถูก immunize ในข้างต้นมาตรวจสอบหา antibody titer ต่อเชื้อจุลชีพดังกล่าว

3.1.4 ทำการ purify immunoglobulin (polyclonal antibodies; PAb) จากซีรัมของสัตว์ทดลองที่มีค่า antibody titer ที่เหมาะสม

3.1.5 เก็บแอนติบอดี (PAb) ที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.2 การผลิตโมโนโคลนาลแอนติบอดี

3.2.1 เตรียมเชื้อจุลชีพจากแต่ละกลุ่มที่ถูกจัดหมวดหมู่ในการทดลองของส่วนที่หนึ่งและส่วนที่สอง ข้างต้น

3.2.2 นำไป Immunize สัตว์ทดลอง (BALB/c mice)

3.2.3 ทำการผลิต hybrid cells (hybridomas) โดยเทคนิค Hybridoma

นำเซลล์ม้ามของหนูที่ถูก Immunized ข้างต้นไป fuse กับ myeloma cells โดยใช้สารเคมีเป็น fusogen หลังจากนั้นทำการเลี้ยง hybrid cells ใน selective medium ใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C

3.2.4 ทำการคัดเลือก specific hybridomas ซึ่งสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อจุลชีพเป้าหมาย ซึ่งพบในบ่อน้ำบาดน้ำเสียด้วย immunological method

3.2.5 ดำเนินการ purify และ concentrate monoclonal antibodies ที่ผลิตได้แล้ววัดปริมาณความเข้มข้นของแอนติบอดีดังกล่าว เพื่อใช้ประกอบเป็นชุดตรวจสอบ

3.2.6 พัฒนาวิธีการตรวจจุลชีพจากบ่อน้ำบาดน้ำเสียด้วยวิธีทาง Immunological assay เช่น sandwich/indirect ELISA

3.2.7 นำชุดตรวจต้นแบบที่ได้จากห้องปฏิบัติการไปทดลองใช้ในการติดตามภาวะเสถียรของระบบนิเวศน์ในระบบบำบัดน้ำเสียจากแหล่งน้ำเสียชุมชน และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

ค. การเก็บข้อมูล

ข้อมูลแต่ละตัวอย่างที่ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตัวแปร ทำการสุ่มตัวอย่างซ้ำสามครั้ง และบันทึกในตารางบันทึกผล เก็บลงในเครื่องคอมพิวเตอร์และแผ่นบันทึกข้อมูล

ง. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาตรวจสอบความถูกต้องและบันทึกในรูปแบบของแฟ้มข้อมูลในส่วนของความจำของคอมพิวเตอร์ นำเสนอข้อมูลเป็น descriptive ในการทดสอบเชิงเปรียบเทียบ นำข้อมูลมาทดสอบการกระจายของข้อมูล normality ทั้ง skewness และ kurtosis ในกรณีที่ข้อมูลเป็น normal distribution การเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มใช้วิธีการทางสถิติแบบ parametric method ได้แก่ Anova และ independent student *t* test ในกรณีที่ข้อมูลที่ทดสอบไม่เป็น normal distribution ได้นำเสนอเป็น median, 95% confidence interval (% CI) และ range และใช้วิธีการทางสถิติแบบ non-parametric method การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มใช้ Kruskal-Wallis analysis of variance และ Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใช้ Spearman's rank correlation

จ. สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ภาควิชาปรีสติวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2. ห้องปฏิบัติการหน่วยเครื่องมือพิเศษเพื่อการวิจัย สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

3. ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
4. โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม กรุงเทพฯ (เป็นตัวแทนของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากชุมชน)
5. โรงควบคุมคุณภาพน้ำ โรงงานกระดาษ จังหวัดนครสวรรค์ (เป็นตัวแทนของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรม)

จ. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการศึกษาวิจัยนี้เป็นโครงการต้นแบบที่ทำการศึกษาวิจัยการบำบัดน้ำเสียด้วยระบบ Activated sludge ซึ่งเป็นระบบที่นิยมใช้แพร่หลายทั่วไปทั้งในและต่างประเทศ โดยเลือกศึกษาการบำบัดน้ำเสียของชุมชนในเขตกรุงเทพมหานครเปรียบเทียบกับ การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม มุ่งเน้นการจำแนกประเภทของจุลชีพ รวมทั้งบทบาทและหน้าที่ของจุลชีพเหล่านั้นในระบบบำบัดน้ำเสีย เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของประเภทและปริมาณของจุลชีพและประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์ความเสถียรของระบบก่อนที่จะเข้าสู่ภาวะไม่เสถียรถาวร

ข. แผนการวิจัยที่เสนอไว้ในโครงร่างงานวิจัย

1. ทบทวนผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อให้ทราบถึงจุลชีพประเภทต่าง ๆ ที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียชีวภาพแบบใช้อากาศ (aerobic treatment system) โดยทั่วไปที่ได้เคยมีการพบทั้งประเภทที่มีความจำเป็นต่อระบบและประเภทที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบ ประชุมคณะผู้วิจัยเพื่อวางแผนปฏิบัติการวิจัยในการเก็บ การถนอม และการส่งตัวอย่างจากภาคสนามไปยังห้องปฏิบัติการ การเก็บข้อมูล และการจัดเตรียมน้ำยา สารเคมีสิ้นเปลืองสำหรับห้องปฏิบัติการ
2. ศึกษาและจำแนกประเภทของจุลชีพในระบบบำบัดน้ำเสียจริง โดยใช้โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขมและโรงควบคุมคุณภาพน้ำของโรงงานกระดาษซึ่งทั้งสองแห่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Activated sludge เป็นต้นแบบในการศึกษา
3. ศึกษาบทบาทหน้าที่ของจุลชีพประเภทต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องต่อการบำบัด และค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในน้ำเสีย
4. ศึกษาปริมาณของจุลชีพประเภทต่าง ๆ ในระบบที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำเสียอย่างมีประสิทธิภาพ
5. พัฒนาเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันที่ใช้ตรวจวัดปริมาณแอนติเจนของจุลชีพ
6. ใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวัดปริมาณแอนติเจนของจุลชีพในระบบบำบัดน้ำเสียจริง
7. รวบรวมผลที่ได้จากการใช้งานในระบบบำบัดน้ำเสียจริง วิเคราะห์ข้อมูล และจัดทำรายงาน

รายละเอียดของการดำเนินการวิจัยและผลงานวิจัย

กิจกรรมข้อที่ 1: วางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้นในการเก็บตัวอย่างและข้อมูล และการจัดเตรียมน้ำยา สารเคมีสิ้นเปลืองสำหรับห้องปฏิบัติการ

ได้ดำเนินการทบทวนผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อให้ทราบถึงจุลชีพประเภทต่าง ๆ ที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียชีวภาพแบบใช้อากาศ (Aerobic treatment system) โดยทั่วไปที่ได้เคยมีการพบ ทั้งประเภทที่มีความจำเป็นต่อระบบ และประเภทที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบ

ได้ประชุมนักวิจัยและผู้เกี่ยวข้องเพื่อวางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้นในการเก็บการถนอมและการส่งตัวอย่าง และการเก็บข้อมูล ได้จัดเตรียมและซื้อ น้ำยา สารเคมีสิ้นเปลืองวัสดุ อุปกรณ์สำหรับการวิจัยทั้งหมด

กิจกรรมข้อที่ 2: ศึกษาและจำแนกชนิดจุลชีพในระบบบำบัดน้ำเสีย

ส่วนที่หนึ่ง การศึกษาความหลากหลายของเชื้อโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์ที่พบในบ่อบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional method)

1. การเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งกำเนิด โดยใช้โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม (น้ำเสียจากชุมชน) และโรงควบคุมคุณภาพน้ำของโรงงานเยื่อกระดาษ (น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม) ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Activated Sludge (AS) เป็นต้นแบบในการศึกษา

2. ศึกษาและจำแนกประเภทของโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์ในระบบนิเวศของการบำบัดน้ำเสียจากแหล่งกำเนิดทั้งสองแหล่ง โดยการตรวจวิเคราะห์รูปร่างลักษณะและโครงสร้าง (Taxonomy) ของโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์เพื่อหาโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์กลุ่มหลักของระบบที่พบในน้ำเสียทั้งสองแหล่งที่เป็นต้นแบบในการศึกษา รวมทั้งกลุ่มที่แตกต่างกันตามลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย

3. ตรวจประเมินชนิด ปริมาณ และ จำนวนของโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์กลุ่มหลักในระบบนิเวศที่เสถียรเปรียบเทียบกับระบบที่มีภาวะไม่เสถียรที่มีความเปลี่ยนแปลงไปตามแต่ละช่วงเวลาในรอบปีของปริมาณน้ำเสีย และหาความสัมพันธ์เหล่านี้เพื่อประเมินหรือใช้พยากรณ์ความเปลี่ยนแปลงกับค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ความไม่เสถียรของระบบบำบัดน้ำเสีย

เนื่องจากมีรายงานเบื้องต้นและจากการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากชุมชนในระยะแรกบ่งชี้ว่าจุลชีพที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชนมักเป็นสัตว์หลายเซลล์ (metazoa) ที่เรียกกันว่าโรติเฟอร์ (rotifers) เป็นส่วนใหญ่ คณะผู้วิจัยจึงขอนำเรียนข้อมูลเกี่ยวกับโรติเฟอร์โดยสังเขป ดังนี้

โรติเฟอร์ (Rotifers)

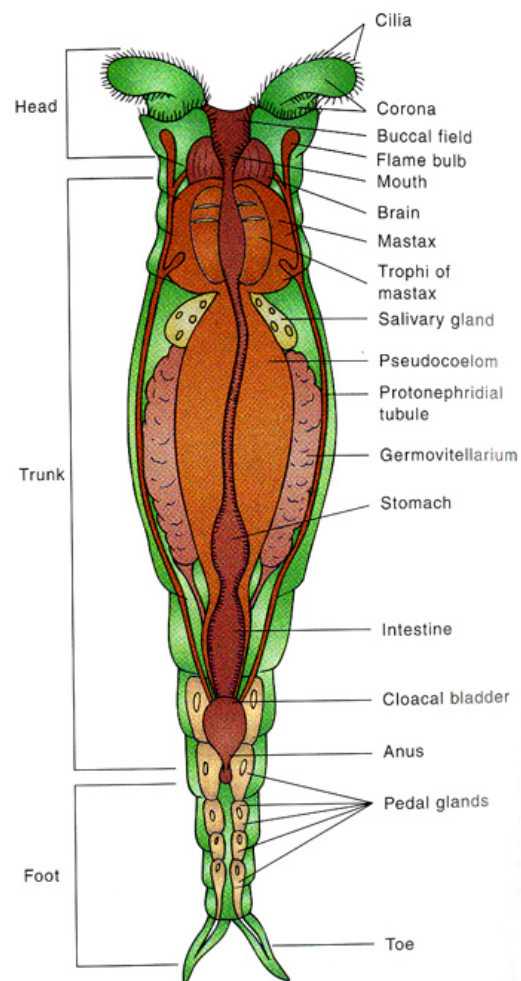
โรติเฟอร์ (Rotifers) เป็นสัตว์หลายเซลล์ (metazoa) ที่มีขนาดเล็ก คือมีขนาดตั้งแต่ 100-800 ไมโครเมตร จัดอยู่ใน Phylum Rotifera สามารถพบได้ทั่วไปตามสระน้ำ หนอง-บึง คู-คลอง และมีบางพวกที่อาจพบได้ในน้ำเค็ม รวมทั้งในดินและน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียต่าง ๆ อีกด้วย โรติเฟอร์ถูกแบ่งออกเป็น 3 classes คือ *Digononta*, *Monogonanta* และ *Seisonidea* โรติเฟอร์ที่พบบ่อยในระบบบำบัดน้ำเสียคือ family *Bdelloidea* (เช่น *Philodina* spp. และ *Habrotrocha*

spp.) และ *Monogonanta* (เช่น *Lecane* spp. และ *Notommata* spp.) โรติเฟอร์จะดำรงชีวิตโดยการกินสิ่งมีชีวิตเล็กๆ เช่นแบคทีเรียต่างๆและเศษอินทรีย์วัตถุที่มีอยู่ในน้ำ ดังนั้นถ้ามีโรติเฟอร์อยู่มากในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแสดงว่ากระบวนการบำบัดของเสียด้วยกระบวนการทางชีววิทยามีประสิทธิภาพดี จึงสามารถใช้ปริมาณของโรติเฟอร์เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) และพยากรณ์ (predict) ความเสถียรของระบบได้

ลักษณะทั่วไปของโรติเฟอร์

โรติเฟอร์เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพวกชูโดซีลอม (Pseudocoelomate invertebrate) ที่มีลักษณะเฉพาะคือ ส่วนหัวจะมีอวัยวะที่เรียกว่า โครนา (corona) มีขน (cilia) เรียงเป็นแถบโดยรอบช่องปาก และมีแมสแทกซ์ (Mastax) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นประจำฟิลัม แมสแทกซ์เป็นอวัยวะที่มีรูปร่างคล้ายฟันในลำตัวจะมีแขนงซึ่งเป็นสารประกอบหมู่โคโพลีแซคคาไรด์ 7 ชั้น เรียงเชื่อมต่อกันเรียกว่า โทรโฟ (trophi)

ลำตัวของโรติเฟอร์สามารถแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ คือ ลำตัวคล้ายถุง (sac-shaped) ทรงกลม (spherical-shaped) และทรงกระบอกยาวคล้ายหนอนพยาธิ (worm-shaped) ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ตอนคือ ตอนหน้า ได้แก่ ส่วนหัว (head region) ส่วนลำตัว (trunk) และ ตอนท้าย ได้แก่ เท้า (foot) (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของโรติเฟอร์ (Miller and Harley, 2002)

ส่วนหัวของโรติเฟอร์ที่เรียกว่า โคโรนา (Corona) มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหารและว่ายน้ำ ลักษณะโครงสร้างของโคโรนาจะประกอบด้วยบริเวณต่างๆ คือ

1. Buccal field (บริเวณรอบปาก) เป็นบริเวณที่มีซีเลียและล้อมรอบช่องปากอยู่ทางด้านท้อง (ventral)

2. Circumapical band เป็นแถบซีเลียรอบแนวขอบของหัวซึ่งจะมีลักษณะเป็นแถบวงแหวนบรรจบกันบริเวณรอบปาก

3. Apical field (ส่วนปลายสุดของหัว) เป็นส่วนปลายยอดของหัวที่อยู่เหนือซีเลีย หรืออาจกล่าวว่าย้อมรอบด้วยแถบซีเลียเซอร์คัมเอพิคัล

ลักษณะโคโรนาที่แตกต่างกันไปในโรติเฟอร์กลุ่มต่างๆ นั้นเป็นวิวัฒนาการตามลำดับขั้น โดยทั่วไปแล้วบริเวณรอบปากและแถบเซอร์คัมเอพิคัลมักแยกตัวออกจากกัน มากหรือน้อยนั้นขึ้นกับความจำเพาะในหน้าที่ การพัฒนาปรับเปลี่ยนที่พบมาก คือ มีการรวมตัวกันเป็นกระจุกของซีเลียในแถบเซอร์คัมเอพิคัลด้านข้างหัวที่เรียกว่า ออริเคิล (Auricle) หรือโรติเฟอร์บางชนิดมีการลดขนาดของวงโทรคัสหรือวงโทรคัสหายไป การปรับเปลี่ยนอื่นๆ ได้แก่ การมีการรวมตัวของซีเลียเป็นแท่งใหญ่คล้ายขนแข็ง เรียกว่า เซอร์ไร (Cirri)

ส่วนหัวของโรติเฟอร์พวกเดลลอยด์ (Delloid) ใน Class *Digononta* และ พวกโนโทมมาทิด (Notommatic) ใน Order *Ploima*, Class *Monogononta* จะมีแขนงยื่นออกมาจากกึ่งกลางด้านหลังเรียกว่า โรสตรัม (Rostrum) ที่ปลายซีเลียมีขนแข็งในการรับความรู้สึกและทำหน้าที่เกาะยึด มีตาอยู่ทางด้านหน้าและมีระยะสั้น 1-2 เส้น ที่เรียกว่า แอนเทนนา (Antenna) และมีอวัยวะรีโทรซีรีบรัล (Retrocerebral organ) ในการสร้างเมือก

ส่วนลำตัวของโรติเฟอร์ที่เป็นส่วนใหญ่ของร่างกาย ถูกปกคลุมด้วยอิพิดอร์มิสที่แข็งเป็นเปลือกเรียกว่า ลอริกา (Lorica) ลอริกาอาจเป็นแผ่นเรียงต่อกันหรือมีการแบ่งตามเส้นรอบวงเป็นวงแหวน มักจะมีสันหนามหรือระยะที่เคลื่อนไหวได้อยู่บนลอริกา

ส่วนท้ายหรือส่วนเท้าเป็นส่วนที่แคบกว่าลำตัว อิพิดอร์มิสมีลักษณะเป็นข้อวงแหวน ปลายเท้าของโรติเฟอร์มักจะมีแขนงยื่นออกไป 1-4 แขนง เรียกว่า นิ้วเท้า (Toe) โรติเฟอร์ที่คืบคลานและเกาะอยู่กับที่จะมีต่อมพิตอล (Pedal gland) ที่บริเวณเท้า ต่อมนี้นำหน้าที่ในการสร้างสารสำหรับเกาะออกมาตามท่อซึ่งเปิดออกที่ปลายนิ้วเท้าหรือบริเวณอื่นๆ ของเท้า โดยการเกาะจะเป็นแบบชั่วคราว ส่วนเท้าของโรติเฟอร์ที่เป็นแพลงก์ตอน (Planktons) มักจะมีขนาดเล็กลงหรือหายไป

โดยทั่วไปแล้วโรติเฟอร์จะไม่มีคิวิเคิล อิพิดอร์มิสส่วนนอกจะมีเส้นใยโปรตีนเรียงตัวหนาแน่นเป็นข่ายใยค้ำจุนอยู่ในเซลล์ (Intracellular web) โครงสร้างต่างๆ ที่ผิวหนังเป็นแขนงจากข่ายใยนี้แต่ยังคงมีข่ายใยภายในเซลล์อยู่ คิวิเคิลที่แท้จริงจะเป็นสิ่งห่อหุ้มที่พบในโรติเฟอร์บางชนิด เช่น *Stephanoceros* และ *Collotheca* เป็นต้น

ผิวหนังของโรติเฟอร์จะมีช่องเปิดสำหรับกระจายสารอยู่ทั่วไป ชั้นอิพิดอร์มิสจะมีเยื่อบางและไม่มีเยื่อชั้นระหว่างเซลล์ ใต้อิพิดอร์มิสเป็นกล้ามเนื้อลายที่มีการจัดตัวไม่เป็นชั้นโดยสมบูรณ์ เส้น

ใยกล้ามเนื้อบางส่วนเรียงตัวตามเส้นรอบวงเป็นกล้ามเนื้อรอบวง บางส่วนเรียงตัวตามความยาวของลำตัวเป็นกล้ามเนื้อหดตัว ใต้ผนังตัวเป็นซีลอมเทียมที่มีของเหลวล้อมรอบท่อทางเดินอาหารและอวัยวะภายในอื่นๆ

การจำแนกหมวดหมู่ (Classification)

ในปัจจุบัน โรติเฟอร์ถูกแบ่งเป็น 3 Classes ได้แก่:

1. Class *Seisonidea* เป็นปรสิตเกาะอยู่กับเหงือกของครัสเตเชีย ไม่จัดว่าเป็นแพลนคตอน
2. Class *Monogononta* ประกอบด้วย 3 อันดับ (Orders) ได้แก่

2.1 Order *Ploima*; Family *Brachionidae*; *Keratella* sp., *Brachionus* sp.

(รูปที่ 1.2A)

2.2 Order *Flosculariacea*; *Conochilus* sp. (รูปที่ 1.2 B)

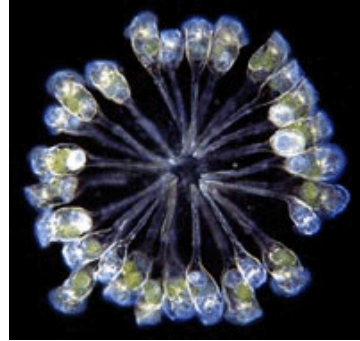
2.3 Order *Collothecacea*; *Collotheca* sp. (รูปที่ 1.2 C)

3. Class *Digononta*; Family *Bdelloidea*; *Philodina* sp. (รูปที่ 1.2 D)

การจำแนกชนิดของโรติเฟอร์จะอาศัยขนาด รูปร่างลักษณะ และลักษณะเฉพาะของโครงสร้างต่างๆ ของตัวโรติเฟอร์ เช่น *lorica*, *corona* และ *mastax* เป็นต้น โดยนำลักษณะต่างๆ มาเปรียบเทียบกับ Taxonomic key ของ Wallace and Snell (2001), Edmondson (1959), Ruttner-Kolisko (1974) และ Koste (1978) รวมทั้งภาพประกอบจาก Atlas และ Websites ต่างๆ



(A) *Brachionus* sp.



(B) *Conochilus* sp.



(C) *Collotheca* sp.

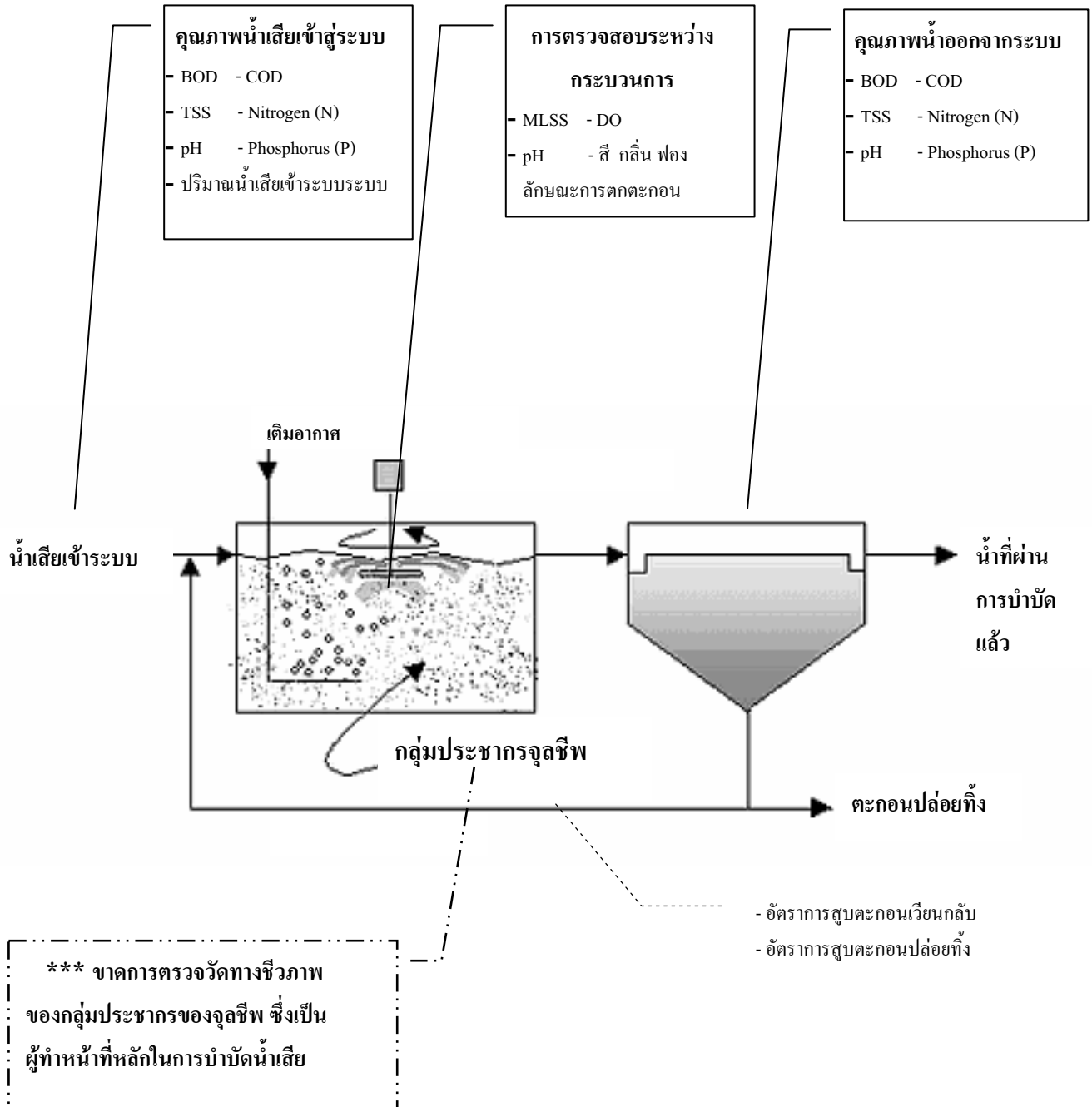


(D) *Philodina* sp.

รูปที่ 1.2 ตัวอย่างโรติเฟอริใน Classes ต่างๆ

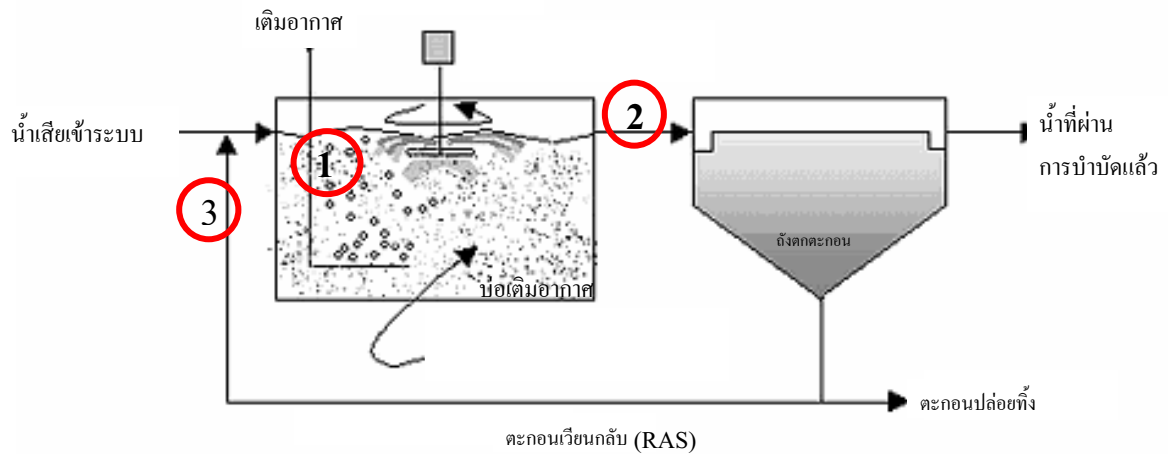
กิจกรรมการวิจัยของส่วนที่ 1

1. การเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งกำเนิด โดยใช้โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม (น้ำเสียจากชุมชน) และโรงควบคุมคุณภาพน้ำของโรงงานเยื่อกระดาษที่จังหวัดนครสวรรค์ (น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม) ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบ **Activated Sludge** เป็นต้นแบบในการศึกษา



รูปที่ 1.3 แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Activated Sludge

BOD, Biochemical Oxygen Demand; COD, Chemical Oxygen Demand; TSS, Total suspended solid; TDS, Total dissolved solid; MLSS, Mixed liquor suspended solids; TN, Total nitrogen; DO, Dissolved oxygen; AS, Activated sludge



รูปที่ 1.4 จุดที่เก็บตัวอย่างน้ำเสีย (Area of Sampling) ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

- จุดเก็บที่ 1: จุดที่ Returned Activated Sludge (RAS) เพิ่งสัมผัสกับน้ำเสีย
- จุดเก็บที่ 2: จุดที่ Mixed liquor เพิ่งออกจากถังเติมอากาศ
- จุดเก็บที่ 3: ตัวอย่าง RAS ขณะนั้นน้ำเสียถูกบำบัดแล้วและพร้อมปล่อย
ออกเป็น surface water

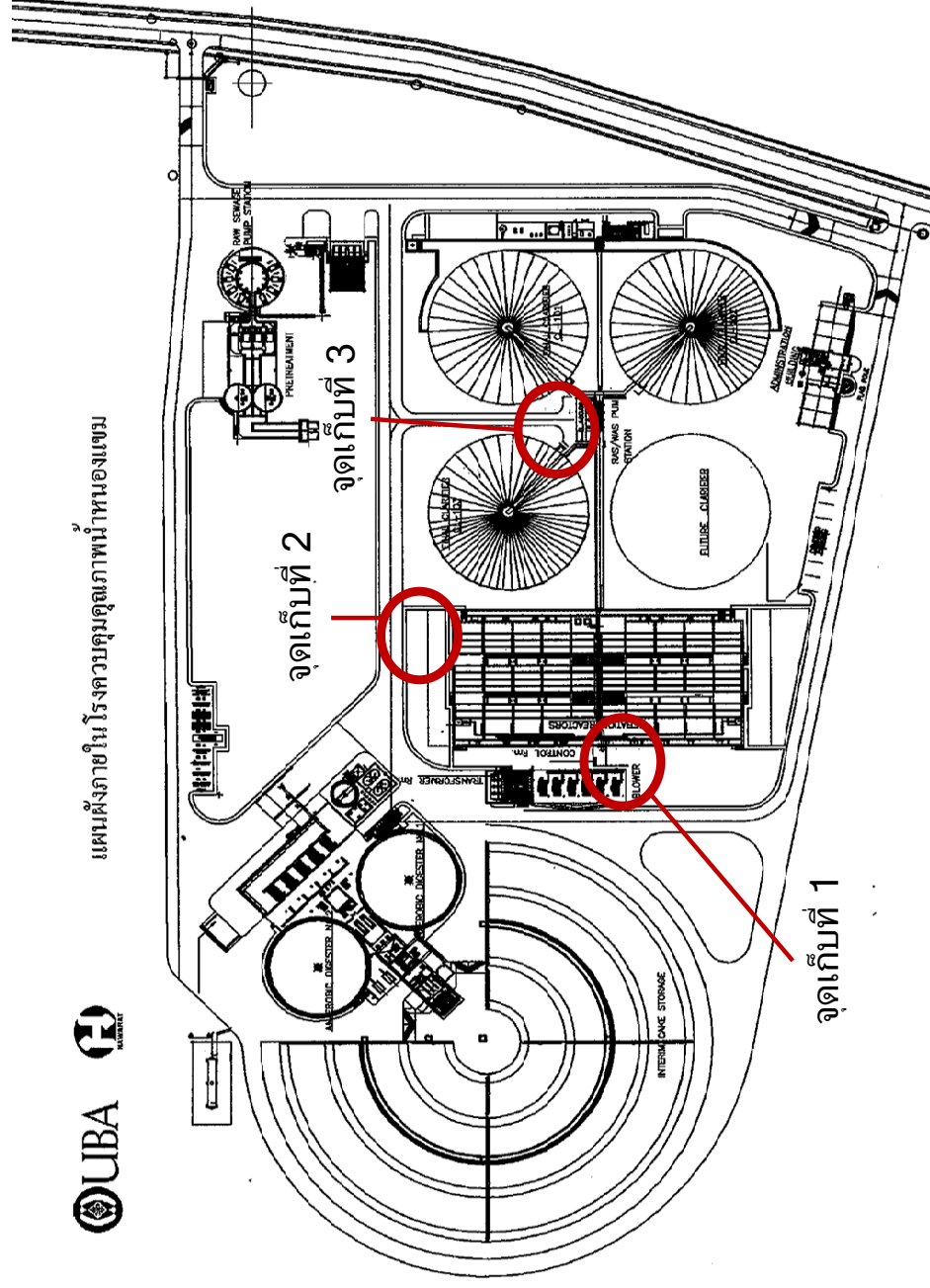
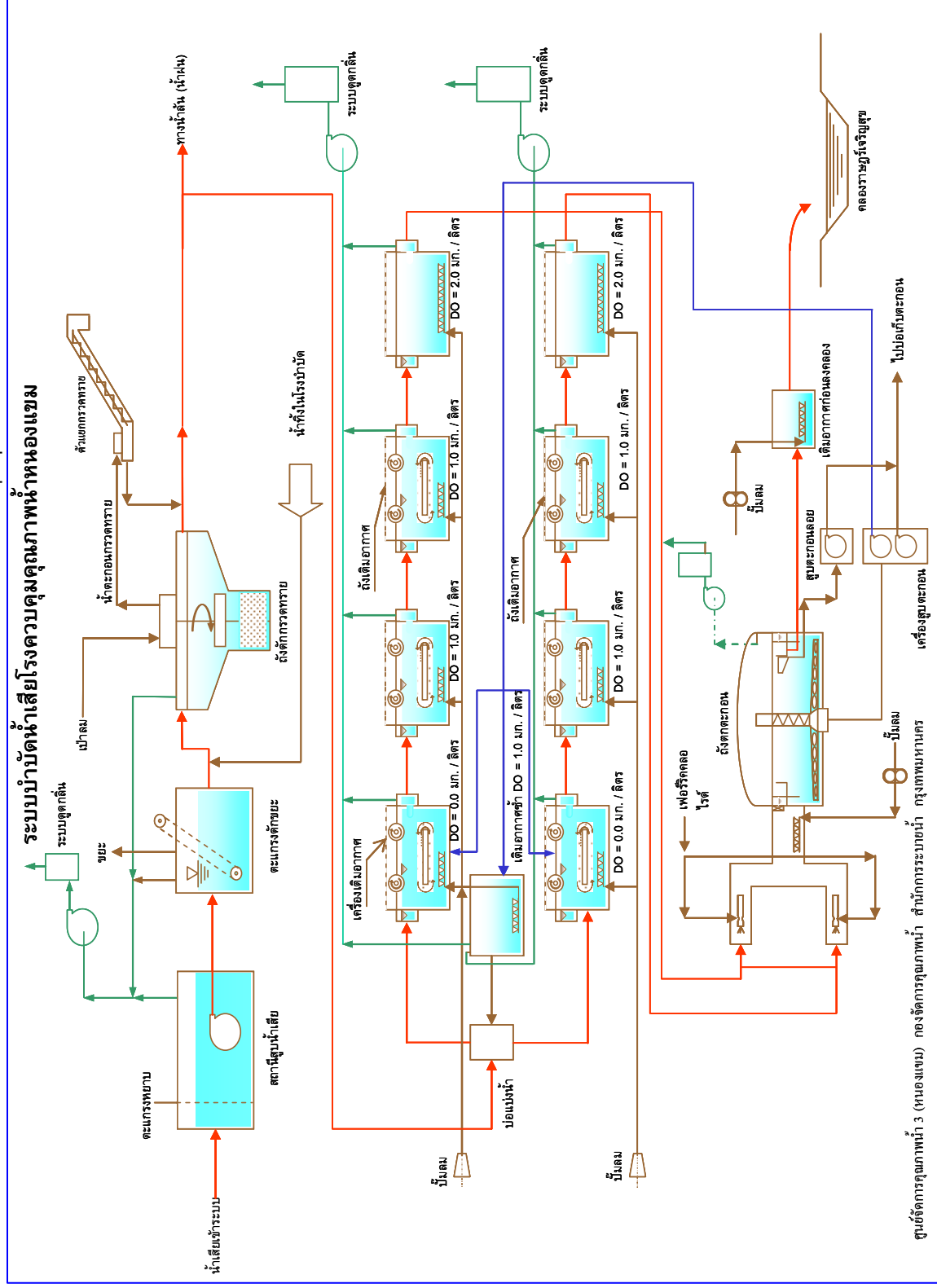


Diagram 1: ระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Activated Sludge ที่โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม



ศูนย์จัดการคุณภาพน้ำ 3 (หนองแขม) กองจัดการคุณภาพน้ำ สำนักการระบายน้ำ กรุงเทพมหานคร

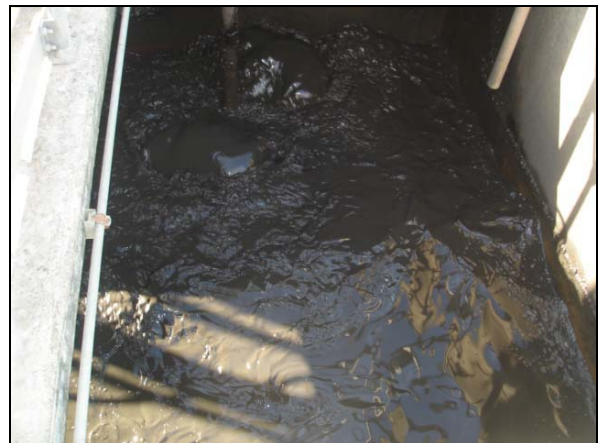
ภาพแสดงจุดเก็บตัวอย่าง



จุดเก็บที่ 1



จุดเก็บที่ 2



จุดเก็บที่ 3

การสำรวจสายพันธุ์ของโรติเฟอร์ที่มีในแหล่งน้ำเสีย

การสำรวจหาโรติเฟอร์โดยการเก็บตัวอย่างน้ำเสียเฉพาะระบบ Activated sludge (AS) ในจุดเก็บต่างๆ ในโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน (โรงบำบัดน้ำเสียหนองแขม) และโรงบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (โรงงานเยื่อกระดาษ จังหวัดนครสวรรค์) มีรายละเอียดดังนี้

การกำหนดจำนวนตัวอย่างน้ำเสียในการตรวจวิเคราะห์

ผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่า จำนวนของโรติเฟอร์ในตัวอย่างน้ำเสียจากจุดต่างๆ ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสถียรของระบบบำบัดน้ำเสีย การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร ใช้ Pearson's correlation โดยคำนวณจำนวนตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ดังนี้

Correlation test that $\rho = \rho_0$ for x and y bivariate normal

ตารางที่ 1.1 การคำนวณจำนวนตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ตรวจวิเคราะห์โดยใช้ตัวกำหนดตามระเบียบวิธีทางสถิติ

Column	1	2	3
Test significant level α	0.05	0.05	0.05
1 or 2 sided test	2	2	2
● Non hypothesis correlation (ρ_0)	0.00	0.00	0.00
● Alternative correlation (ρ_1)	0.500	0.450	0.400
Power (%)	80	80	80
N (จำนวนตัวอย่างน้ำเสีย)	30	<u>37</u>	47

ดังนั้น จำนวนตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ อย่างน้อย **37** ตัวอย่าง

หมายเหตุ: โครงการนี้ได้มีการปรึกษาด้านความเหมาะสมและการคำนวณตามระเบียบวิธีทางสถิติกับหน่วยระบาดวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ข้อกำหนดในการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย

เวลาที่เก็บตัวอย่าง: 7.00-9.00 a.m.

ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง: 3 จุดตามที่กำหนด (รูปที่ 1.4) จุดละ 3 ตัวอย่าง

- จุดเก็บที่ 1: จุดที่ Returned Activated Sludge (RAS) เพิ่งสัมผัสกับน้ำเสีย
- จุดเก็บที่ 2: จุดที่ Mixed liquor เพิ่งออกจากถังเติมอากาศ
- จุดเก็บที่ 3: ตัวอย่าง RAS ขณะนั้นน้ำเสียถูกบำบัดแล้วและพร้อมปล่อยออกเป็น surface water

ภาชนะที่บรรจุ: ขวดพลาสติกขนาด 100 cc และ 1,000 cc ที่มีฝาปิดแน่น และการติดฉลากกำกับตามตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง

การนำส่ง: ใส่ขวดตัวอย่างน้ำเสียในกล่องโฟมที่มี ice pack เพื่อให้เกิดความเย็น รักษาสภาพจุลชีพในตัวอย่าง

ระยะเวลาที่ดำเนินการเก็บ: ทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง อย่างน้อย 37 ครั้ง ในการวิจัยได้เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 49 สัปดาห์ คือระหว่าง มีนาคม พ.ศ. 2552 ถึง กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 และมีจำนวนตัวอย่างของทุกสัปดาห์รวม 46 สัปดาห์ โดยไม่สามารถเก็บตัวอย่างของสัปดาห์ที่ 23 ในเดือน สิงหาคม พ.ศ. 2552 และสัปดาห์ 39 และ 40 ของเดือนธันวาคม พ.ศ.2552 ได้ แต่ละสัปดาห์มีตัวอย่างจากจุดเก็บ 3 จุด และจุดละ 3 ตัวอย่าง

ค่าพารามิเตอร์: เป็นตัวบ่งชี้ความเสถียรของระบบบำบัดน้ำเสียที่เก็บค่าพร้อมกับตัวอย่างน้ำเสียเพื่อใช้ในการประเมิน หรือพยากรณ์ความเปลี่ยนแปลงความเสถียรของระบบ ได้แก่ สี กลิ่น ฟอง ลักษณะการตกตะกอน BOD, COD, TSS / Nitrogen & Phosphorus / pH เป็นต้น ดังในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของตัวอย่างน้ำเสียที่จะทำการตรวจ

ลักษณะทางกายภาพ	Influent	Effluent	Aeration	RAS
สี	pH	pH	pH	pH
กลิ่น	BOD	BOD effluent	MLSS	MLSS
	influent			
ฟอง	COD	COD	MLVSS	MLVSS
การตกตะกอน	TSS	TSS	DO (AZIDE)	DO (AZIDE)
	TN	TN	SV ₃₀	SV ₃₀
	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	Temperature	Temperature
	NO ₂ ⁻	NO ₂ ⁻		
	NH ₃	NH ₃		

1. RAS, Return Activated Sludge
2. BOD influent, biochemical oxygen demand ของน้ำเสียขาเข้า ซึ่งวัดปริมาณความต้องการออกซิเจนของจุลชีพ เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียในช่วงเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
3. BOD effluent, biochemical oxygen demand ของน้ำเสียขาออก ซึ่งวัดปริมาณความต้องการออกซิเจนของจุลชีพ เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียในช่วงเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
4. COD, Chemical Oxygen Demand (คือปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ต้องการใช้เพื่อการออกซิเดชันสารอินทรีย์ในน้ำให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ)
5. MLSS, Mix liquor suspended solid (ค่าปริมาณตะกอนจุลชีพในถังเติมอากาศ หมายถึงปริมาณโดยรวมของจุลินทรีย์)
6. TSS, Total suspended solid (ค่าของแข็งแขวนลอย)
7. DO, Dissolved oxygen (ค่าออกซิเจนละลายน้ำ เพื่อให้ทราบว่าได้ให้ออกซิเจนแก่จุลชีพพอเพียงสำหรับการใช้งานหรือไม่)
8. Sv₃₀, ปริมาตรของสลัดจ์ซึ่งตกตะกอนจากตัวอย่าง 1,000 มิลลิลิตร ในเวลา 30 นาที
9. TN, Total Nitrogen ค่าไนโตรเจนที่จัดเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลชีพ
10. NO₃⁻, ค่าไนโตรเจนในรูปของ organic nitrogen ที่เป็น Nitrates
11. NO₂⁻ ค่าไนโตรเจนในรูปของ organic nitrogen ที่เป็น Nitrites
12. NH₃ ค่าไนโตรเจนในรูปของ Ammonia



รูปที่ 1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย



รูปที่ 1.6 ภาพแสดงการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากจุดที่เก็บ

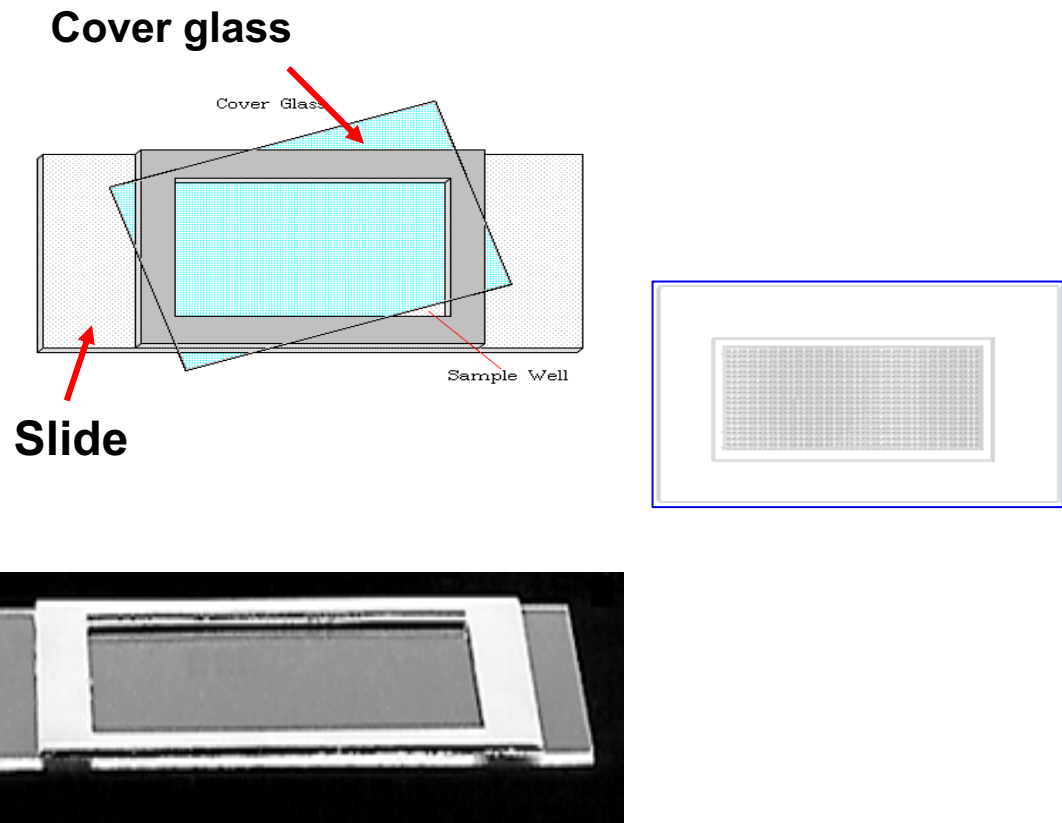


รูปที่ 1.7 การเก็บตัวอย่างน้ำเสียเพื่อการตรวจวิเคราะห์

2. ศึกษาและจำแนกประเภทของโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์ในระบบนิเวศน์ของการบำบัดน้ำเสียจากแหล่งกำเนิด โดยการตรวจวิเคราะห์รูปร่างลักษณะและโครงสร้าง (Taxonomy) ของโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์ เพื่อหาโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์กลุ่มหลักของระบบที่พบในน้ำเสียทั้งสองแหล่งที่เป็นต้นแบบในการศึกษา รวมทั้งกลุ่มที่แตกต่างกันตามลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย



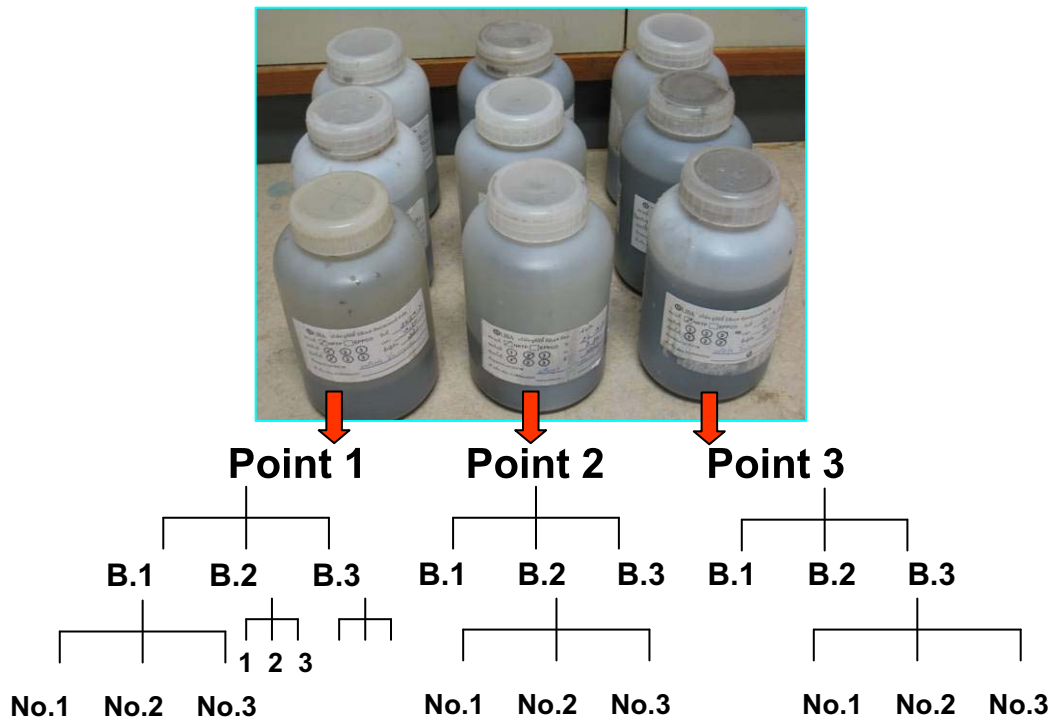
รูปที่ 1.8 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์น้ำเสียในการตรวจวินิจฉัยจุลชีพ (Protozoa & Rotifers)



รูปที่ 1.9 Sedgewick chamber ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยและนับจำนวนโปรตีนตัวชี้และโรติเฟอร์



รูปที่ 1.10 การตรวจวินิจฉัยและนับจำนวนโปรโตซัวและ/หรือโรติเฟอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 1.11 แผนผังแสดงการสุ่มตรวจตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บมาตรวจ

วิธีการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสีย

1. ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสียภายใน 3 ชม. หลังได้รับตัวอย่างน้ำเสีย (โรงบำบัดน้ำเสียหนองแขม)
2. เขย่าขวดพลาสติกที่เก็บตัวอย่างน้ำเสียเพื่อให้ตัวอย่างน้ำเสียเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วดูดน้ำเสีย 0.1 มิลลิลิตร (100 μ l) ด้วย pipette นำไป dilute ด้วยน้ำเกลือปกติ (normal saline solution; NSS) ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:10) นำส่วนผสมนี้ไป fill ใน Sedgewick chamber (รูปที่ 1.9) แล้วปิดด้วย cover slip
3. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในการตรวจเบื้องต้นใช้เลนส์วัตถุ 4 $\times$ (4 เท่า) และ 10 $\times$ (40 เท่า) เมื่อพบจุลชีพได้เพิ่มกำลังขยาย โดยตรวจดูด้วยเลนส์วัตถุ (Objective lens) 40 $\times$ (400 เท่า) เพื่อดูรูปร่างลักษณะในการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของจุลชีพสายพันธุ์ต่างๆ ที่ตรวจพบ
4. จัดบันทึกข้อมูลโดยการนับจำนวนแยกตามสายพันธุ์ที่พบ ตามวันที่ทำการตรวจวิเคราะห์ เพื่อใช้ในการคำนวณต่อไป
5. บันทึกภาพจุลชีพสายพันธุ์ต่างๆ ที่ตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่บันทึกภาพด้วยรุ่น Nikon eclipse 600 และตัวกล้องที่บันทึกภาพ Nikon Digital camera grnjDXM 1200 ด้วยเลนส์วัตถุ 4 $\times$, 10 $\times$, 20 $\times$ และ 40 $\times$

ใช้โปรแกรม Nikon ACT-1 เนื่องจากโรติเฟออร์มีการเคลื่อนที่เร็ว จึงต้องตั้ง Mode-Photo-quick มีผลให้ Shutter speed เร็วขึ้น และตั้ง File-Format-Jpeg (fine), Auto save, Sensitivity Max เพื่อให้การประมวลผลในการบันทึกภาพเร็วขึ้น

ตารางที่ 1.3 แสดงตารางการจดบันทึกข้อมูลในการตรวจวิเคราะห์น้ำเสียด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อหา
จุลชีพต่างๆ ตามเกณฑ์ที่กำหนด (ปรับปรุงจาก worksheet 35.4 Total Organism
Count, Gerardi MH, 2008)

สถานที่เก็บ วันที่เก็บ/...../.....	Rotifer					Stalk ciliate			
		R1	R2	R3	Other	ชนิดที่ 1	ชนิดที่ 2	ชนิดที่ 3	ชนิดที่ 4
จุดเก็บที่ 1 สุ่มครั้งที่ 1 ลักษณะ	เป็น								
	ตาย								
จุดเก็บที่ 1 สุ่มครั้งที่ 2 ลักษณะ	เป็น								
	ตาย								
จุดเก็บที่ 1 สุ่มครั้งที่ 3 ลักษณะ.....	เป็น								
	ตาย								
จุดเก็บที่ 2 สุ่มครั้งที่ 1 ลักษณะ	เป็น								
	ตาย								
จุดเก็บที่ 2 สุ่มครั้งที่ 2 ลักษณะ	เป็น								
	ตาย								
จุดเก็บที่ 2 สุ่มครั้งที่ 3 ลักษณะ.....	เป็น								
	ตาย								
จุดเก็บที่ 3 สุ่มครั้งที่ 1 ลักษณะ.....	เป็น								
	ตาย								
จุดเก็บที่ 3 สุ่มครั้งที่ 2 ลักษณะ.....	เป็น								
	ตาย								
จุดเก็บที่ 3 สุ่มครั้งที่ 3 ลักษณะ.....	เป็น								
	ตาย								

ผู้ตรวจนับ.....

วันที่

การตรวจหาและจำแนกชนิดของโรติเฟอร์ (Rotifers)

สำหรับโรติเฟอร์สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในบ่อบำบัดน้ำเสียจากชุมชน (โรงบำบัดน้ำเสียหนองแขม) พบว่า มีโรติเฟอร์อยู่ 4 สายพันธุ์หลัก จึงได้ทำการศึกษารูปร่างลักษณะและให้การวินิจฉัย ดังนี้คือ

โรติเฟอร์ชนิดที่ 1 (R1): *Lacane* spp. (*inermis*)

โรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2): *Rotaria* spp. (*rotatoria*)

โรติเฟอร์ชนิดที่ 3 (R3): *Diplois daviesiae*

โรติเฟอร์ชนิดที่ 4 (R4): *Collotheca* spp.

อัตราส่วนของโรติเฟอร์แต่ละสายพันธุ์ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสียได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 1.4 พบว่าโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) หรือ *Rotaria rotatoria* มีอัตราสูงสุดโดยพบอัตราที่จุดเก็บที่ 1 คิดเป็น 100% จุดเก็บที่ 2 คิดเป็น 95.2% และจุดเก็บที่ 3 คิดเป็น 100% ทำให้สรุปได้ว่าโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) นี้เป็นสายพันธุ์หลัก (common species) ที่ตรวจพบได้ตลอดในระบบนิเวศของระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชนแบบ activated sludge ที่มีภาวะเสถียร คณะผู้วิจัยจึงคัดเลือกโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) เพื่อใช้เป็นแอนติเจนเป้าหมาย (target antigen) ในการศึกษาและพัฒนาเทคนิคหรือวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันที่จะใช้ตรวจหาและวัดปริมาณของจุลชีพ โดยทำการสร้างแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลที่จับจำเพาะต่อโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 นี้ (โปรดดูส่วนที่สาม)

การตรวจหาและจำแนกชนิดโปรโตซัว (Protozoa)

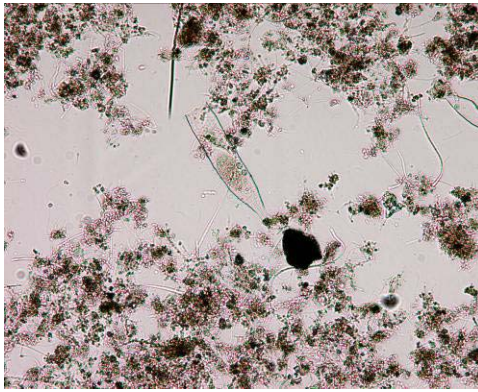
จากตัวอย่างน้ำเสียทั้งหมด 42 ตัวอย่างจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบ activated sludge ที่ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาความหลากหลายของโปรโตซัวที่พบในบ่อบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีมาตรฐาน พบว่าโปรโตซัวที่พบมีความแตกต่างกันตามฤดูกาล โปรโตซัวที่ตรวจพบมีทั้งกลุ่มที่เป็น amoeba, flagellates และ ciliates และไม่พบสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเป็นสายพันธุ์หลักที่จะสามารถใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มโปรโตซัวได้ ยิ่งไปกว่านั้น กลุ่มโปรโตซัวจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศคือการแบ่งตัวแบบ binary fission และการแตกหน่อ (budding) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวก stalked ciliates มีการแตกกิ่งมาก และมีจำนวนกิ่งหลากหลายมากตั้งแต่ 1 กิ่งจนถึงมากกว่า 10 กิ่งทำให้ไม่สามารถนับจำนวนได้อย่างถูกต้องแม่นยำพอที่จะใช้เป็นจุลชีพต้นแบบในการศึกษาและพัฒนาเทคนิคหรือวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันที่ใช้ตรวจหาและวัดปริมาณของจุลชีพในระบบบำบัดน้ำเสียได้ ดังนั้นในชุดตรวจวัดปริมาณจุลชีพในระบบบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันจะไม่ใช้โปรโตซัวเป็นแอนติเจนเป้าหมาย

ตารางที่ 1.4 อัตราส่วนของ ของ Rotifers แต่ละสายพันธุ์ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากระบบ Activated Sludge (โรงบำบัดน้ำเสียจากชุมชนที่หนองแขม)

Types of rotifers	Total samples	Positive samples or prevalence (%) at Point 1	Positive samples or prevalence (%) at Point 2	Positive samples or prevalence (%) at Point 3
R1: <i>Lacane</i> spp. (<i>inermis</i>)	42	16/42 (38.1%)	16/42 (38.1%)	18/42 (42.9%)
R2: <i>Rotaria</i> spp. (<i>rotatoria</i>)	42	42/42 (100%)	40/42 (95.2%)	42/42 (100%)
R3: <i>Diplois daviesiae</i>	42	2/42 (4.8%)	1/42 (2.4%)	4/42 (9.5%)
R4: <i>Collotheca</i> spp.	42	3/42 (7.1%)	3/42 (7.1%)	2/42 (4.8%)

การตรวจหาและจำแนกชนิดโปรโตซัวและโรติเฟอร์ในตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงาน อุตสาหกรรม

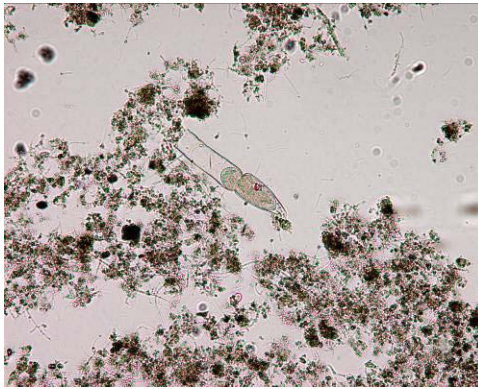
คณะผู้วิจัยใช้ตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม EPCCO ที่จังหวัดนครสวรรค์ซึ่งเป็นโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษเป็นต้นแบบของการศึกษาเพื่อหาปริมาณและจำแนกชนิดโปรโตซัวและโรติเฟอร์ เนื่องจากน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมไม่มีความผันแปรตามฤดูกาล จึงได้ทำการตรวจน้ำเสียจากตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด 4 ครั้งเพื่อนำไปตรวจหาโปรโตซัวและโรติเฟอร์ และพบปัญหาคือการเก็บและขนส่งน้ำเสียมายังห้องปฏิบัติการใช้เวลานานในการขนส่งแม้จะเก็บและแช่เย็นในขณะขนส่งแต่ก็ไม่สามารถถนอมให้โปรโตซัวและโรติเฟอร์ในตัวอย่างน้ำเสียคงความมีชีวิตและคงรูปร่างอยู่ได้ ทำให้ไม่สามารถ identify และจัดกลุ่มได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากคณะผู้วิจัยสามารถตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มเด่นในตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม EPCCO ได้ในกิจกรรมส่วนที่สองคือกลุ่ม S จึงจะใช้แบคทีเรียกลุ่มเด่นในตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นแอนติเจนเป้าหมาย (target antigen) ในการศึกษาและพัฒนาเทคนิคหรือวิธีการทางวิทยามิคุ่มกันที่จะใช้ตรวจหาและวัดปริมาณของจุลชีพ แทนการใช้โปรโตซัวหรือโรติเฟอร์เพื่อประเมินความเสถียรของระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป



Objective lens; 4×



Objective lens; 4×



Objective lens; 10×



Objective lens; 20×



Objective lens; 40×

รูปที่ 1.12 Rotifers ชนิดที่ 1 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย



Objective lens; 10×



Objective lens; 40×



Objective lens; 10×



Objective lens; 40×

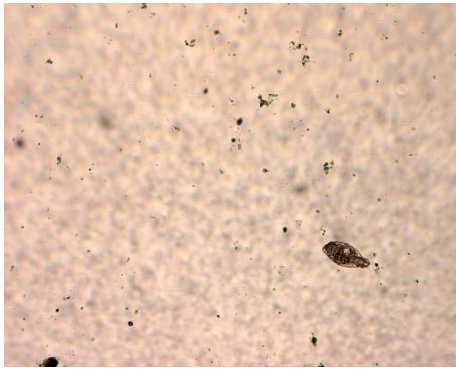


Objective lens; 10×



Objective lens; 40×

รูปที่ 1.13 Rotifers ชนิดที่ 2 (ขณะหดตัว) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย



Objective lens; 4× ขณะหดตัว



Objective lens; 20× ขณะหดตัว



Objective lens; 40× ขณะหดตัว



Objective lens; 4× ขณะยืดตัว



Objective lens; 10× ขณะยืดตัว



Objective lens; 20× ขณะยืดตัว

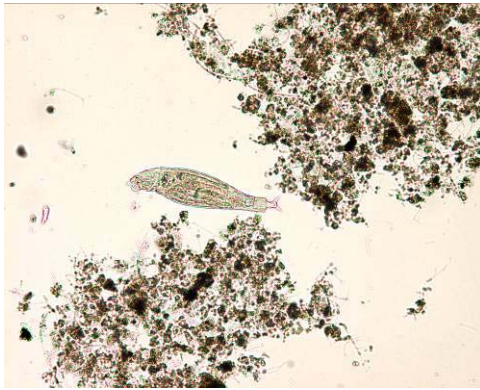


Objective lens; 40× ขณะยืดตัว



Objective lens; 40× ขณะยืดตัว

รูปที่ 1.14 Rotifers ชนิดที่ 2 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย



Objective lens; 10×

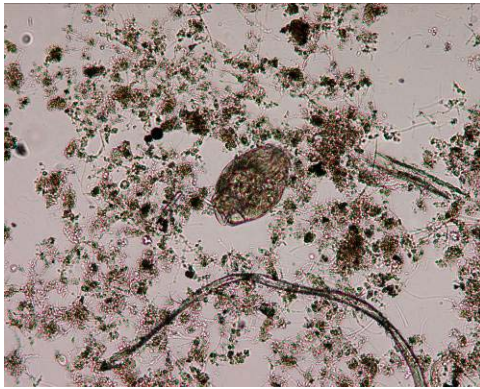


Objective lens; 20×



Objective lens; 40×

รูปที่ 1.15 Rotifers ชนิดที่ 2 (ขณะยึดตัว) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย



Objective lens; 10× ขณะหดตัว



Objective lens; 20× ขณะหดตัว



Objective lens; 40× ขณะยืดตัว



Objective lens; 20× ขณะยืดตัว



รูปที่ 1.16 Rotifers ชนิดที่ 3 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย



Objective lens; 10×



Objective lens; 40×



Objective lens; 20×

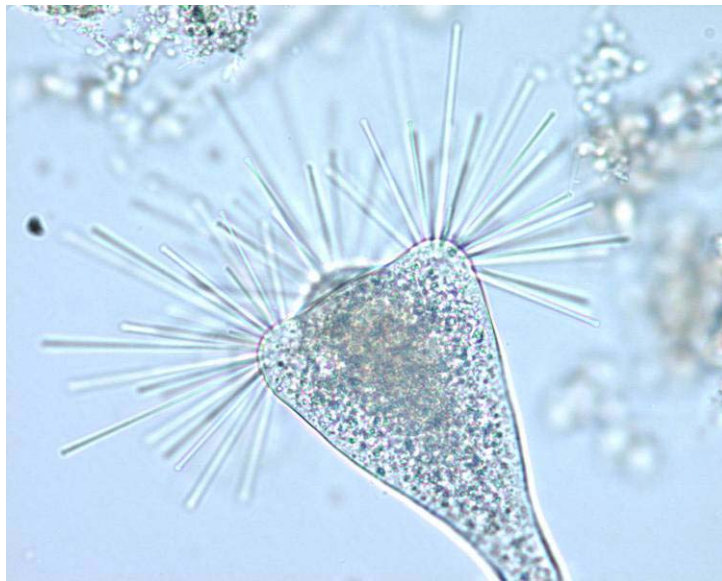


Objective lens; 40×

รูปที่ 1.17 Rotifers ชนิดที่ 3 (ขณะไม่เคลื่อนไหว) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย



Objective lens; 10×



Objective lens; 20×

รูปที่ 1.18 Rotifers ชนิดที่ 4 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย



Objective lens; 10×



Objective lens; 20×



Objective lens; 40×

รูปที่ 1.19 Stalked ciliate ชนิดที่ 1 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย



Objective lens; 20×

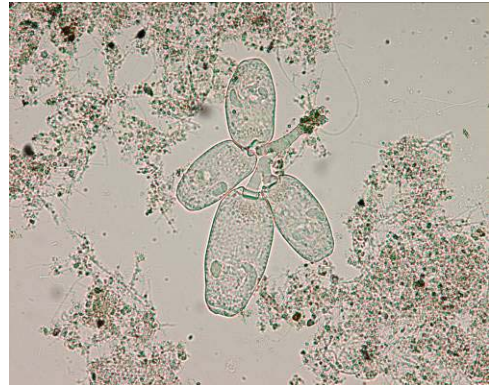


Objective lens; 20×

รูปที่ 1.20 Stalked ciliate ชนิดที่ 2 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย

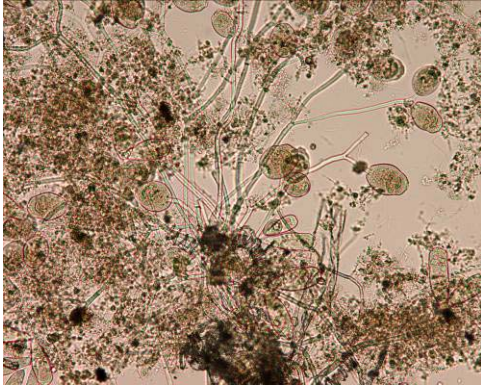


Objective lens; 10×



Objective lens; 20×

รูปที่ 1.21 Stalked ciliate ชนิดที่ 3 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย



Objective lens; 10×



Objective lens; 20×

รูปที่ 1.22 Stalked ciliate ชนิดที่ 4 ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำเสีย

ส่วนที่สอง การศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่พบในโรงงานบำบัดน้ำเสีย ด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional method) และศึกษา metagenomics ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular biology method)

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียในน้ำเสียโดยวิธี Conventional method

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสีย

นำตัวอย่างน้ำเสีย 500 ml ไปปั่นตกตะกอนครั้งแรกที่ความเร็วรอบ $800 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปทำการปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็วรอบ $6,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งน้ำใสส่วนบน จากนั้นละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลายน้ำเกลือปกติ (normal saline solution; NSS) และเจือจางเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ที่ dilutions: 10^{-3} , 10^{-5} และ 10^{-7} ด้วย NSS

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อจำแนกกลุ่มของแบคทีเรีย

เนื่องจากวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือการศึกษาระเภทของเชื้อแบคทีเรียที่ทำหน้าที่กำจัดของเสียในน้ำเสีย ซึ่งสามารถจำแนกแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ดังกล่าวได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

- กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอมโมเนีย (Nitrogen group 1; N1)
- กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไนไตรท์ (Nitrogen group 2; N2)
- กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายซัลเฟอร์ (Sulfur group; S)
- กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟต (Phosphate group; P)

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ในข้อที่ 1 ออกเป็นกลุ่มๆ โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารน้อยชนิด เรียกอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ว่า "Minimum Essential Medium (MEM)" แต่เตรียม MEM ให้มีสารอาหารพื้นฐานต่างกัน 4 ชนิด คือ แอมโมเนียม ไนไตรท์ ซัลเฟอร์ และฟอสเฟต ซึ่งแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารอาหารเหล่านี้ได้เหมือนสารอาหารที่พบในน้ำเสีย ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียได้ตามส่วนประกอบที่สำคัญใน MEM โดยในการวิจัยนี้สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียได้เป็น 4 ชนิดเช่นกัน

การเตรียมส่วนประกอบจำเป็นสำหรับ MEM แต่ละชนิด มีดังนี้ (10x stock essential solution)

Medium for individual bacterial groups	Composition	Sterilization
Agar in water	- Agar (16 g) - NaCl (0.5 g) ละลายในน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 ml	Autoclave
For Nitrogen group 1 (N1)	- NH_4Cl (5 g) ละลายในน้ำให้ได้ปริมาตร 500 ml	Autoclave
For Nitrogen group 2 (N2)	- NaNO_2 (5 g) ละลายในน้ำให้ได้ปริมาตร 500 ml	Autoclave
For Sulfur group (S)	- MgSO_4 (123.23 g) ละลายในน้ำให้ได้ปริมาตร 100 ml - ละลาย glucose 180 g ในน้ำ ให้ได้ปริมาตร 100 ml (36% glucose)-	Autoclave Filtration through sterile filter
For Phosphate group (P)	- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (37.6 g) - KH_2PO_4 (15.0 g) ละลายในน้ำให้ได้ปริมาตร 500 ml	Autoclave

การเตรียม MEM

MEM group	Composition
Nitrogen group 1	- 90 ml of Agar in water 10 ml of 10× NH ₄ Cl
Nitrogen group 2	- 90 ml of Agar in water 10 ml of 10× NaNO ₂
Sulfer group	- 90 ml of Agar in water 0.5% MgSO ₄ (final concentration) 1.0% Glucose (final concentration)
Phosphate group	- 90 ml of Agar in water 10 ml of 10× Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O and KH ₂ PO ₄

หลังจากผสมส่วนประกอบของ MEM แล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อเทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri-dishes) แล้วรอจนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (solidified) จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อนำมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจะต้องนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำให้ agar surfaceแห้งที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนใช้

3. การเพาะเชื้อแบคทีเรียเพื่อจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ในข้างต้น (undiluted, diluted) อย่างละ 50 µl หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด แล้วเกลี่ย (spread) ให้ทั่วผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-36 ชั่วโมง ซึ่งพบแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ณ จุดเก็บทั้ง 3 จุดจากน้ำเสียจากโรงงานหนองแขม คือจุดเก็บที่ 1 (จุดที่ Returned Activated Sludge เพิ่งสัมผัสกับน้ำเสีย) จุดเก็บที่ 2 (จุดที่ Mixed liquor เพิ่งออกจากถังเติมอากาศ) และจุดเก็บที่ 3 (ตัวอย่าง RAS) และสามารถแยกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียได้ ดัง ตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.2 แสดงกลุ่มและจำนวนของ bacterial isolates ที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 1-3 ของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (โรงงานกระดาษ จังหวัดนครสวรรค์) จะเห็นว่ามีเพียงแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ sulfur (กลุ่ม S) เท่านั้นที่พบได้ทุกจุดเก็บตัวอย่าง ส่วนแบคทีเรียอีก 3 ชนิด คือ N1, N2 และ P พบเฉพาะจุดเก็บที่ 3 คือ Returned activated sludge (RAS) เท่านั้น ดังนั้นสำหรับการพัฒนาวิธีการทางภูมิคุ้มกันเพื่อใช้ประเมินความเสถียรของระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมจะใช้แบคทีเรียกลุ่ม S (Sulfer group) เป็นแอนติเจนเป้าหมาย

ตารางที่ 2.1 แสดงประเภทและจำนวนของแบคทีเรียที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 1-3 ของโรงงาน
บำบัดน้ำเสียจากชุมชน (โรงงานบำบัดน้ำเสียที่หนองแขม)

ชนิดของแบคทีเรีย	จุดที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน bacterial isolates
Nitrogen group 1 (N1)	จุดที่ 1	48
	จุดที่ 2	27
	จุดที่ 3	86
Nitrogen group 2 (N2)	จุดที่ 1	48
	จุดที่ 2	29
	จุดที่ 3	45
Sulfer group (S)	จุดที่ 1	50
	จุดที่ 2	38
	จุดที่ 3	41
Phosphate group (P)	จุดที่ 1	64
	จุดที่ 2	29
	จุดที่ 3	54

โคโลนีของแบคทีเรียแต่ละประเภทที่แยกได้นี้จะนำไปทำการย้อมสีแกรมและทดสอบทางชีวเคมีต่อไป (โปรดดูข้อ 4 ข้างล่าง)

ตารางที่ 2.2 แสดงประเภทและจำนวนของ bacterial isolates ที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 1-3 ของ
โรงงานบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (โรงงานกระดาษ) จังหวัด
นครสวรรค์

ชนิดของแบคทีเรีย	จุดที่เก็บ	จำนวน isolates
Nitrogen group 1 (N1)	จุดที่ 1	-
	จุดที่ 2	-
	จุดที่ 3	24
Nitrogen group 2 (N2)	จุดที่ 1	-
	จุดที่ 2	-
	จุดที่ 3	60
Sulfer group (S)	จุดที่ 1	47
	จุดที่ 2	8
	จุดที่ 3	52
Phosphate group (P)	จุดที่ 1	-
	จุดที่ 2	-
	จุดที่ 3	110
-, ไม่พบแบคทีเรียกลุ่มนั้นๆ		

4. การย้อมสีแกรมและการทดสอบเอกลักษณ์ทางชีวเคมีของแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละโคโลนีที่แยกได้จากการเพาะเลี้ยงข้างต้นมาจัดเป็นหมวดหมู่โดยดูการติดสีย้อมชนิดแกรมซึ่งอาศัยความแตกต่างของส่วนประกอบพื้นฐานของผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป็นส่วนที่ทำให้ย้อมติดสีแกรมแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียแกรมบวกย้อมติดสีม่วง และแบคทีเรียแกรมลบย้อมติดสีส้ม-แดง อีกทั้งสามารถแยกชนิดแบคทีเรียโดยดูรูปร่างของเชื้อ เช่น รูปร่างกลม (cocci) รูปร่างเป็นแท่ง (bacilli) ซึ่งสารเคมีสำหรับการย้อมสีแกรมประกอบด้วย Crystal violet (primary stain), Gram iodine (mordant stain), Acetone-alcohol (decolorizer stain) และ Safranin O (counter stain)

การย้อมสีแกรมทำโดยนำโคโลนีของแบคทีเรียมาป้าย (smear) บนแผ่นกระจก (microscopic slides หรือเรียกว่า สไลด์) ที่สะอาด แล้วทำการ fix แบคทีเรียบนสไลด์ โดยนำสไลด์ที่ป้ายเชื้อแล้วไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ทำการย้อมสีขั้นต้นโดยหยด crystal violet ทิ้งไว้ 10 วินาที หยด Gram iodine ให้ทั่วสไลด์ ทิ้งไว้ 10 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา หยด Acetone-alcohol 5 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา หยด Safranin O ให้ทั่วสไลด์ ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา เมื่อสไลด์ที่ย้อมแห้งแล้วนำไปสังเกตผลการย้อมและตรวจรูปร่างของแบคทีเรียโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x แล้วจัดกลุ่มแบคทีเรียเพื่อเลือกวิธีการทดสอบเอกลักษณ์ทางชีวเคมี เช่น Oxidase test, Sugar fermentation, Amino acid decarboxylase and deamination, Indole production, Urease production การย่อยสลาย citrate, Bile esculin และ Motility โดยผลการทดสอบสามารถระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียในแต่ละจุดเก็บตามประเภทของอาหารคัดเลือกดัง ตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงกลุ่ม ชนิด และจำนวนของ bacterial isolates ที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 1-3
ของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากชุมชนที่หนองแขม

กลุ่มของแบคทีเรีย	จุดที่เก็บ	ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวน isolates
Nitrogen group 1 (N1)	จุดที่ 1	<i>Bacillus</i> spp.	29
		<i>Enterobacter sakazakii</i>	33
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
		Non-fermenting bacteria	5
	จุดที่ 2	<i>Bacillus</i> spp.	4
		<i>Enterobacter sakazakii</i>	11
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
		Non-fermenting bacteria	11
	จุดที่ 3	<i>Bacillus</i> spp.	26
		<i>Enterobacter cloace</i>	5
		<i>Enterobacter sakazakii</i>	13
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
Nitrogen group 2 (N2)	จุดที่ 1	<i>Bacillus</i> spp.	2
		Diptheroids	3
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	52
		Non-fermenting bacteria	17
	จุดที่ 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
		Non-fermenting bacteria	4
	จุดที่ 3	Diptheroids	6
		<i>Enterobacter cloacae</i>	6
		<i>Klebsiella ozanae</i>	20
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) แสดงกลุ่ม ชนิด และจำนวนของแบคทีเรียที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 1-3 ของ
โรงงานบำบัดน้ำเสียจากชุมชนที่หนองแขม

กลุ่มของแบคทีเรีย	จุดที่เก็บ	ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวน isolates
Sulfer group (S)	จุดที่ 1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2
		<i>Enterobacter agglomerans</i>	4
		<i>Enterobacter gergoviae</i>	10
		<i>Enterobacter sakazakii</i>	12
		<i>Enterobacter</i> spp.	3
		<i>Klebsiella ozanae</i>	1
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
		<i>Klebsiella</i> spp.	6
	จุดที่ 2	<i>Aeromonas</i> spp.	6
		<i>Bacillus</i> spp.	1
		<i>Enterobacter agglomerans</i>	7
		<i>Enterobacter</i> spp.	8
		<i>Escherichia coli</i>	16
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
	จุดที่ 3	<i>Bacillus</i> spp.	1
		<i>Enterobacter agglomerans</i>	10
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	51
		<i>Vibrio</i> spp.	8
Phosphate group (P)	จุดที่ 1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
		<i>Enterobacter agglomerans</i>	8
		<i>Enterobacter cloacae</i>	18
		<i>Enterobacter sakazakii</i>	7
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
	จุดที่ 2	<i>Bacillus</i> spp.	30
		<i>Enterobacter agglomerans</i>	5
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
		Non-fermenting bacteria	5
	จุดที่ 3	<i>Aeromonas</i> spp.	19
		<i>Bacillus</i> spp.	15
		<i>Enterobacter cloacae</i>	10
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
		Non-fermenting bacteria	7
		<i>Plesiomonas</i> spp.	1

การศึกษา Metagenomics ของเชื้อแบคทีเรีย

1. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสีย

นำตัวอย่างน้ำเสีย 500 มิลลิลิตร ไปปั่นตกตะกอนครั้งแรกที่ความเร็วรอบ $800 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปทำการปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็วรอบ $3,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที นำน้ำส่วนใสมาสกัด DNA ด้วยชุดสำเร็จรูปโดยนำน้ำส่วนใส 1 มิลลิลิตรใส่ใน microtube แล้วเติม lysis buffer (20 mg/ml lysozyme, 20 mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 8.0) ปริมาตร 200 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม GB buffer ปริมาตร 200 μ l ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน incubate ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลาประมาณ 10 นาที เติม absolute ethanol ปริมาตร 200 μ l จากนั้นนำสารผสมใส่ลงใน GD column ที่บรรจุใน collection tube แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใน collection tube ทิ้ง แล้วเติม W1 buffer ปริมาตร 400 μ l ลงใน GD column นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใน collection tube ทิ้ง เติม Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ลงใน GD column นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใน collection tube ทิ้ง นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเปลี่ยน collection tube เติม elution buffer ปริมาตร 30 μ l ลงใน GD column ตั้งทิ้งไว้ที่ 25°C เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ $6,000 \times g$ เป็นเวลา 30 วินาที เก็บส่วนน้ำใสหรือ DNA ของแบคทีเรียใน collection tube ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2. การเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้างต้นไปเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสจำเพาะต่อยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA คือ Forward primer Bact27 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ Reverse primer 1492 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3' แล้วทำการเพิ่มจำนวนยีนที่ปฏิกิริยาและสภาวะดังนี้

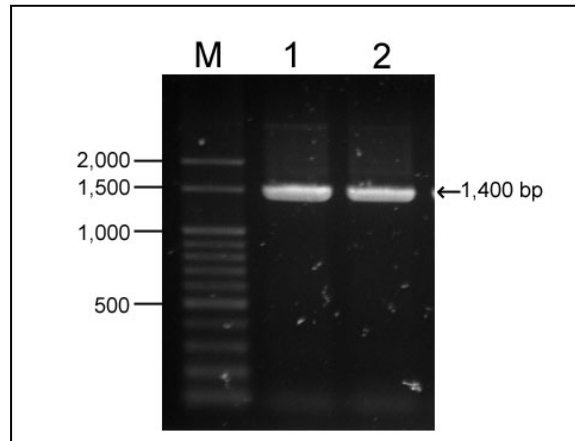
PCR reaction mixture: for one reaction/25 μ l

<i>Taq</i> buffer without MgCl_2 (10 $\times$)	2.5 μ l
MgCl_2 (50 mM)	2.0 μ l
dNTP (10 mM)	0.5 μ l
Bact27 forward primer (50 μ M)	0.5 μ l
1492 reverse primer (50 μ M)	0.5 μ l
<i>Taq</i> polymerase (5 units/ μ l)	0.2 μ l
DNA template	3.0 μ l
Distilled water	14.8 μ l

PCR condition:

First denaturation	94 $^{\circ}$ C	3 minutes	30 cycles
Denature	94 $^{\circ}$ C	1 minute	
Annealing	55 $^{\circ}$ C	90 seconds	
Extension	72 $^{\circ}$ C	150 seconds	
Final extension	72 $^{\circ}$ C	10 minutes	
	4 $^{\circ}$ C	Hold	

ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis แล้วทำการย้อมเจลด้วย Ethidium bromide และสังเกตแถบดีเอ็นเอด้วย UV illuminator



รูปที่ 2.1 แสดง PCR amplified product ของ 16S RNA genes

Lanes 1 and 2, amplicons of 16S RNA genes

Lane M, Standard DNA ladder

Numbers at the left and right are DNA sizes in base pairs (bp)

3. การโคลนยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA

3.1 DNA ligation

นำ 16S RNA gene PCR product ไป ligate เข้า TA Cloning Vector โดยใช้ชุด T & A Cloning Vector Kit ของ RBC Biosciences โดย reaction mixture ประกอบด้วย

Ligation buffer A	1 μ l
Ligation buffer B	1 μ l
T&A cloning vector	2 μ l
PCR product	5 μ l
T4 DNA ligase	1 μ l

จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.2 การนำ recombinant plasmids ที่มียีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA (16S genes) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α ด้วยเทคนิค Electroporation

ทำการเตรียม competent cells (เซลล์เจ้าบ้าน) โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5 α ใน LB broth 3 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 คืน นำเชื้อดังกล่าวปริมาตร 2 มิลลิลิตร เลี้ยงในฟลasks ที่บรรจุ LB medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 600 nm (A_{600nm}) เท่ากับ 0.7-0.5 ประมาณ 2 – 2.5 ชั่วโมง แล้วแช่ฟลask ในน้ำแข็ง 30-15 นาที นำ culture ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 4,000 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งและเติม ice-cold 1 mM Hepes (pH 7.0) ลงไป 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 4000 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งและเติม ice-cold 1 mM Hepes (pH 7.0) ลงไป 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 4000 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ด้วย 10% glycerol ใน 1 mM Hepes (pH 7.0) 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 4000 $\times g$ อีกครั้งที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที ตูดส่วนใสทิ้งและเติมด้วย 10% glycerol ใน 1 mM Hepes (pH 7.0) 300 μ l แล้วแบ่งเก็บใส่ใน 1.5 ml microtube หลอดละ 100 μ l แล้วเติม recombinant plasmids ที่มี 16S genes ที่ได้เตรียมไว้ปริมาตร 5 μ l แช่น้ำแข็ง 1 นาที จากนั้นย้ายเซลล์มาใส่ใน cuvette ตั้งโปรแกรมของเครื่อง Electroporator ให้เป็นโปรคารีโอต ใช้กระแสไฟ 1700 V 5 msec เติม LB medium ลงไปใน cuvette 1 มิลลิลิตร และดูดออกใส่ในหลอด นำไปบ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นนำ cell suspension ไปเกลี่ย (spread) บนผิว LB-ampicilin (LB-A) plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน เชื้อเชื้อทุกโคโลนีลงใน LB-A broth 2 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน แล้วนำเชื้อไปสกัดพลาสมิด (plasmid) ต่อไป

4. การสกัด plasmid

เลี้ยง *E. coli* transformant แต่ละ isolates ใน LB-A broth 10 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน จากนั้นปั่นตกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 11,000× *g* เป็นเวลา 30 วินาทีและเทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ Buffer A1 ลงไป 250 µl ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำ Buffer A2 ลงไป 250 µl ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ 25°C เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำ Buffer A3 ลงไป 600 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปั่นตกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 11,000× *g* เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดส่วนใส 700 µl ใส่ลงใน column ใน collection tube ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 11,000× *g* เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ Buffer A4 ลงไป 600 µl ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 11,000× *g* เป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 11,000× *g* เป็นเวลา 2 นาที ย้าย column มาใส่ลงใน microtube ใหม่ วางไว้ 5 นาที เติมน้ำกลั่นลงไป 30 µl เก็บไว้ที่ 25°C เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 11,000× *g* เป็นเวลา 1 นาที นำ plasmid ที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อทำการศึกษาความหลากหลายของยีนในขั้นตอนต่อไป

5. การศึกษาความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ด้วยเทคนิค Restriction

Fragment Length Polymorphism (RFLP)

คณะผู้วิจัยได้เปลี่ยนวิธีการศึกษาความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) ที่เสนอไว้ในโครงร่างงานวิจัยมาเป็นเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) เนื่องจากสามารถใช้ทดแทนได้ และมีวิธีการทำที่ไม่ยุ่งยากเท่า PCR-DGGE ดังมีรายละเอียดดังนี้

นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) ดังข้างต้น จากนั้น นำ PCR product ของยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ fast digest restriction endonucleases สามชนิด คือ *MspI*, *HaeIII* และ *HhaI* ดังปฏิกิริยาของของผสม (reaction mixture) ข้างล่าง

Fast digest reaction mixture: for one reaction/ (30 µl)

Fast digest buffer (10×)	2.0 µl
FastDigest® <i>HhaI</i>	1.0 µl
FastDigest® <i>MspI</i>	1.0 µl
FastDigest® <i>HaeIII</i>	1.0 µl
PCR product	10.0 µl
Distilled water	17.0 µl

นำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาประมาณ 10 นาที แล้ววิเคราะห์ความหลากหลายของ digested PCR product ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การเตรียม SDS-polyacrylamide gel: เจลที่ใช้ในการทดลองนี้มีส่วนประกอบดังนี้

Component	Separating gel
Acrylamide stock (30%)	16 ml
Tris- HCl/SDS pH 8.45	10 ml
Sterile DW	0.64 ml
Glycerol	3.2 ml
Ammonium persulfate (10%)	150 µl
TEMED	10 µl

* DW, distilled water

สำหรับเตรียม Polyacrylamide gel slabs ได้ 4 แผ่น (ขนาด 7 cm x 10 cm)

การเตรียมตัวอย่าง: นำ digested PCR product ที่เตรียมได้จำนวน 15 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วเติมลงใน well ของเจลที่เตรียมข้างต้นแล้วทำการแยกนิวคลีโอไทด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE (Tris acetate-EDTA), pH 8.0 (running buffer) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 50 milliAmpares เป็นเวลา 60 นาที แล้วทำการย้อมเจลที่ได้ด้วย Ethidium bromide และสังเกตแถบดีเอ็นเอด้วย UV illuminator ดังแสดงใน **รูปที่ 2.2 -2.4**

หลังจากนำ Digested PCR products ไปศึกษาความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) พบว่าสามารถพบความหลากหลาย 11 แบบในกลุ่มของแบคทีเรียที่แยกจากจุดเก็บที่ 1 และความหลากหลาย 9 และ 8 แบบในกลุ่มของแบคทีเรียที่แยกจากจุดเก็บที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ **ความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 1 ซึ่งแตกต่างกัน 11 แบบ (รูปที่ 2.2)**

แบบที่ 1.1 พบจำนวน 24 clones คือ clones no. 1, 4, 5, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39 และ 40

แบบที่ 1.2 พบจำนวน 2 clones คือ clones no. 2, และ 3

แบบที่ 1.3 พบจำนวน 3 clones คือ clones no. 6, 7 และ 10

แบบที่ 1.4 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 8

แบบที่ 1.5 พบจำนวน 5 clones คือ clones no. 9, 11, 12, 13 และ 15

แบบที่ 1.6 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 14

แบบที่ 1.7 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 17

แบบที่ 1.8 พบจำนวน 1 clone คือ clones no. 24

แบบที่ 1.9 พบจำนวน 2 clones คือ clones no. 29 และ 36

แบบที่ 1.10 พบจำนวน 1 clone คือ clones no. 41

แบบที่ 1.11 พบจำนวน 1 clone คือ clones no. 42

ความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 2 ซึ่งแตกต่างกัน 9 แบบ (รูปที่ 2.3)

แบบที่ 2.1 พบจำนวน 1 clone คือ clones no. 1

แบบที่ 2.2 พบจำนวน 7 clones คือ clones no. 2, 4, 16, 18, 19, 22 และ 23

แบบที่ 2.3 พบจำนวน 5 clones คือ clone no. 3, 5, 17, 20 และ 21

แบบที่ 2.4 พบจำนวน 7 clones คือ clones no. 6, 9, 10, 11, 12, 24 และ 25

แบบที่ 2.5 พบจำนวน 1 clone คือ clones no. 7

แบบที่ 2.6 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 8

แบบที่ 2.7 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 13

แบบที่ 2.8 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 14

แบบที่ 2.9 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 15

ความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากจุดเก็บที่ 3 ซึ่งแตกต่างกัน 8 แบบ (รูปที่ 2.4)

แบบที่ 3.1 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 1

แบบที่ 3.2 พบจำนวน 1 clone คือ clones no. 2

แบบที่ 3.3 พบจำนวน 5 clones คือ clones no. 3, 4, 5, 7 และ 19

แบบที่ 3.4 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 6

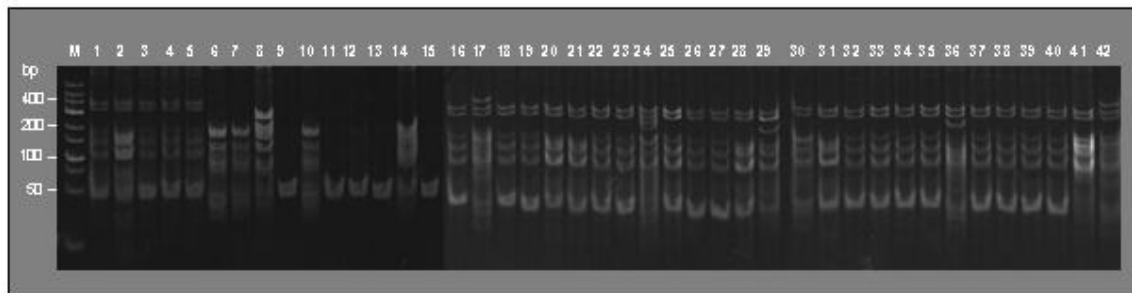
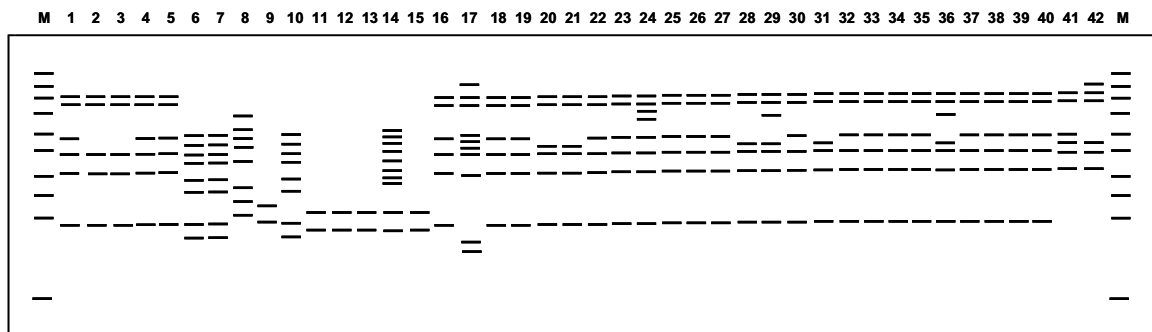
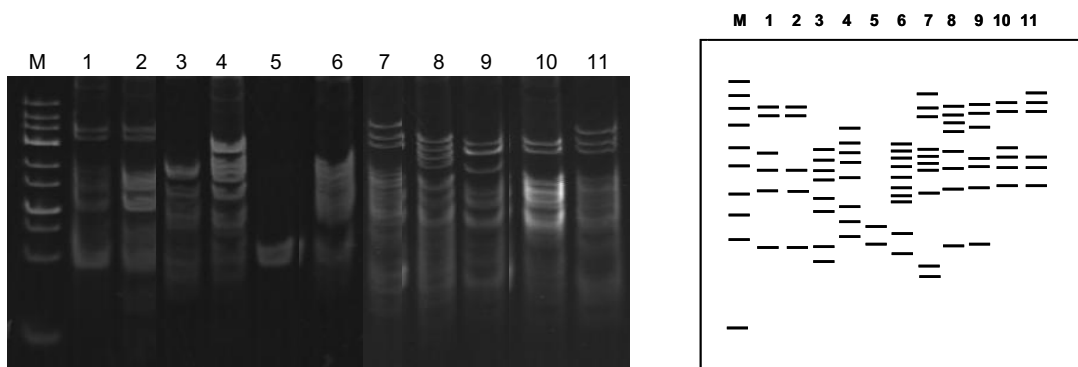
แบบที่ 3.5 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 8 และ 11

แบบที่ 3.6 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 9

แบบที่ 3.7 พบจำนวน 7 clones คือ clones no. 10, 12, 13, 14, 15, 16 และ 17

แบบที่ 3.8 พบจำนวน 1 clone คือ clone no. 18

ตัวอย่าง DNA แต่ละรูปแบบที่ได้จากการจัดกลุ่มความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสีย ณ จุดเก็บต่างๆ ถูกนำส่งวิเคราะห์ DNA sequence แล้วทำการเปรียบเทียบกับชนิด DNA sequence ใน GenBank database ดังแสดงใน ตารางที่ 2.4

A**B****C**

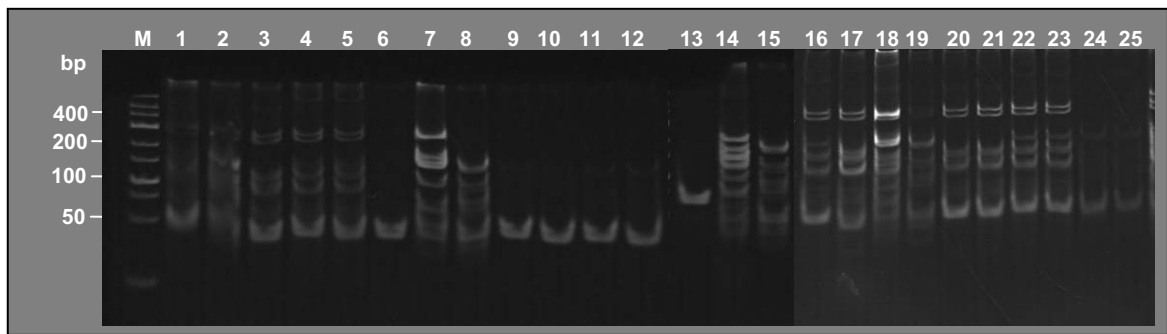
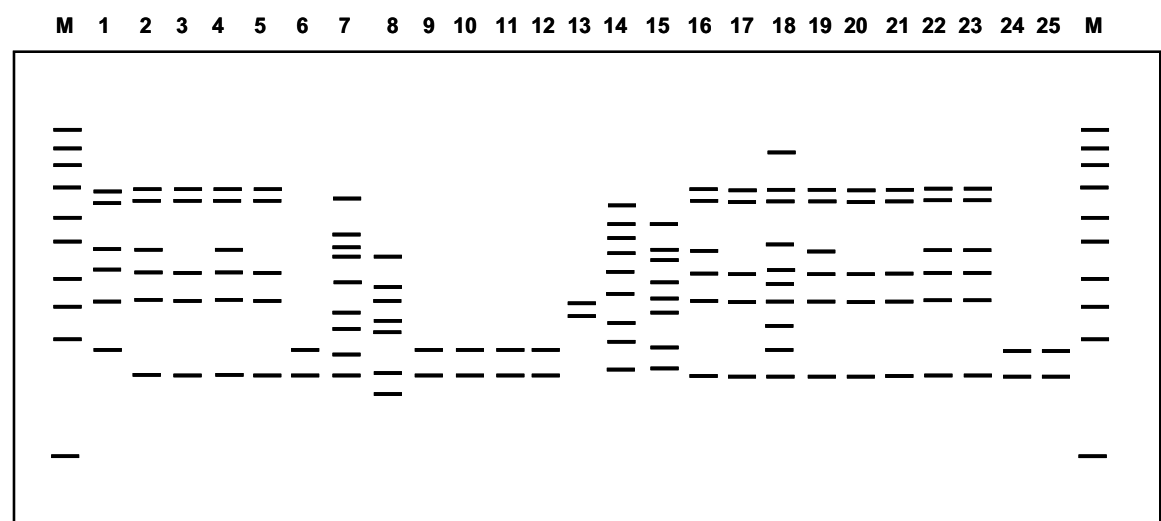
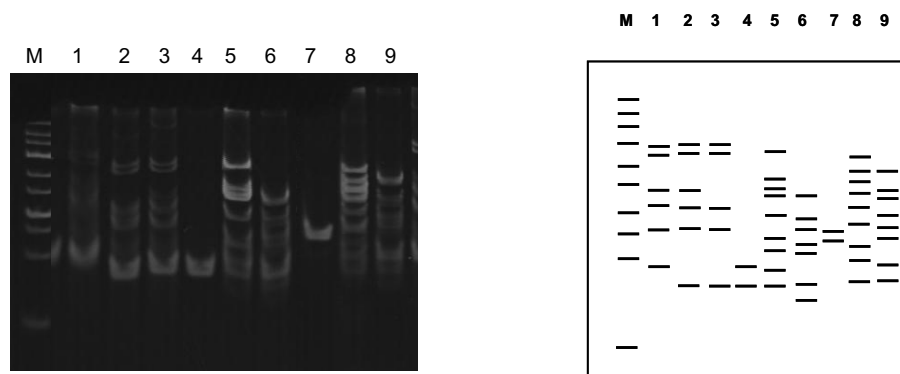
รูปที่ 2.2 แสดง RFLP patterns ของ recombinant plasmids ที่มี 16S RNA gene inserts ที่แยกจากจุดเก็บที่ 1

A, RFLP ของ 16S ของ 42 ตัวอย่าง

B, Schematic patterns ของ RFLP ของทั้ง 42 ตัวอย่าง

C, RFLP ของทั้ง 11 patterns ที่พบ (left block, lanes 1-11) และ Schematic patterns (right block, numbers 1-11)

M, 100 bp DNA ladder

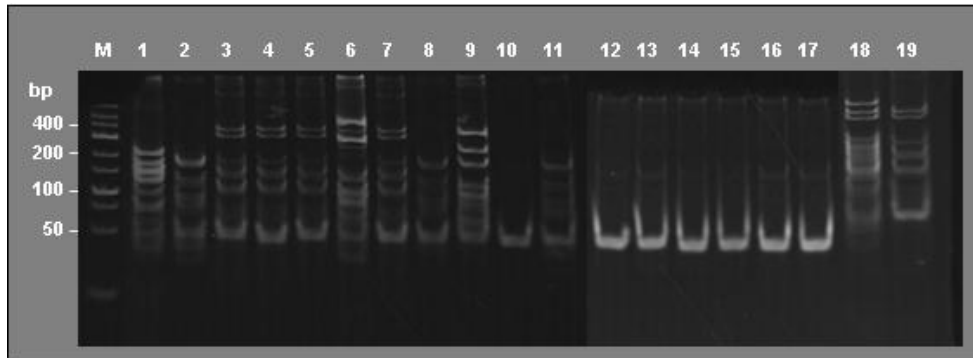
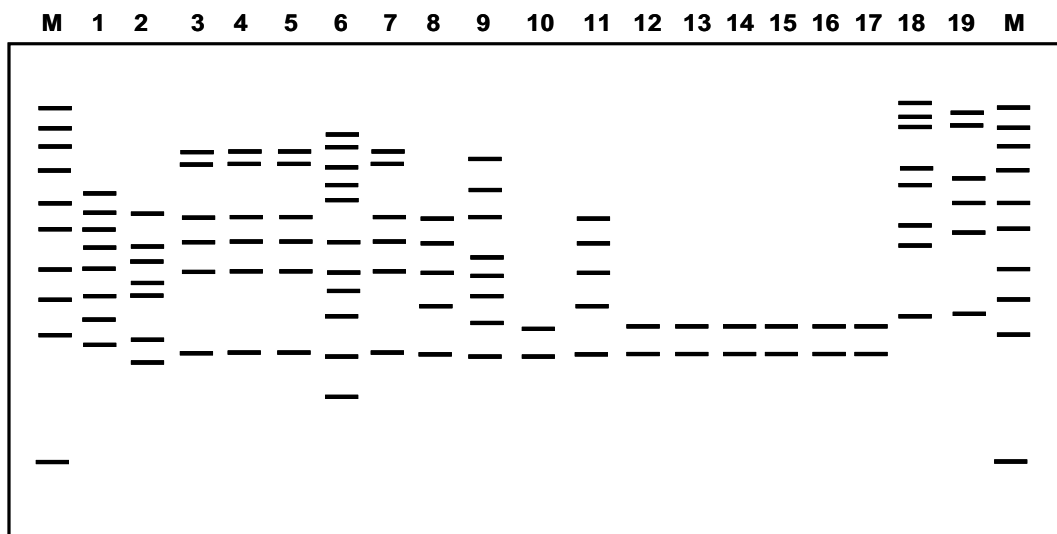
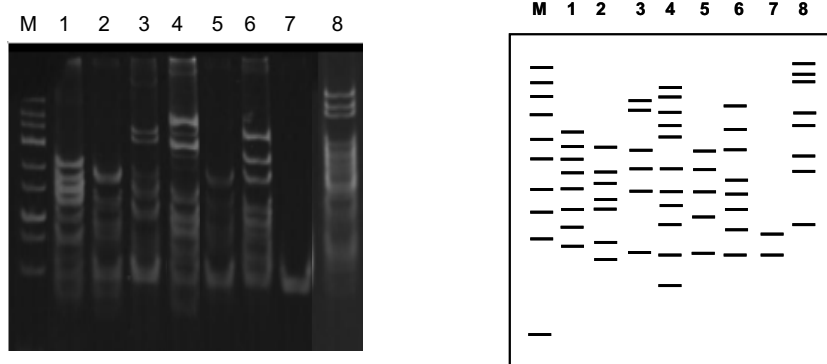
A**B****C**

รูปที่ 2.3 แสดง RFLP patterns ของ recombinant plasmids ที่มี 16S RNA gene inserts ที่แยกจากจุดเก็บที่ 2

A, RFLP ของ 16S ของ 25 ตัวอย่าง **B**, Schematic patterns ของ RFLP ของ 25 ตัวอย่าง

C, RFLP ของ 9 patterns ที่พบ (left block; lanes 1-9) และ Schematic patterns (right block; numbers 1-9)

M, 100 bp DNA ladder

A**B****C**

รูปที่ 2.4 แสดง RFLP patterns ของ insert recombinant plasmids ที่มี 16S RNA gene inserts ที่แยกจากจุดเก็บที่ 3

A, RFLP ของ 16S ของ 19 ตัวอย่าง **B**, Schematic patterns ของ RFLP ของ 19 ตัวอย่าง

C, RFLP ของ 8 patterns ที่พบ (left block; lanes 1-8) และ Schematic patterns (right block; numbers 1-8)

M, 100 bp DNA ladder

ตารางที่ 2.4 แสดงผลการเปรียบเทียบ DNA sequence ในแต่ละรูปแบบที่พบในการวิจัยนี้เปรียบเทียบกับชนิด DNA sequence ใน GenBank

รูปแบบของ DNA patterns ของ ยีนที่เป็นรหัสของ 16S RNA	database	BLAST results
1.1		No significant similarity found in GenBank database
1.2		No significant similarity found in GenBank database
1.3		No significant similarity found in GenBank database
1.4		-EU132456 Uncultured bacterium clone FFCH18555 16S ribosomal RNA gene, -EF459825 Uncultured bacterium clone 183b1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence -DQ083100 Uncultured bacterium clone X14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence -FM956995 Uncultured bacterium partial 16s rRNA gene, clone D14R30C44
1.5		No significant similarity found in GenBank database
1.6		-EF203172 Uncultured bacterium clone Kas2B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence -EF471640 Uncultured delta proteobacterium clone CB01E11 16S ribosomal RNA -FJ710720 Uncultured bacterium clone Dok01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence -FJ154966 Uncultured bacterium clone BO 16S ribosomal RNA gene, partial sequence -EU925834 Uncultured bacterium clone 001E3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
1.7		No significant similarity found in GenBank database
1.8		-EF075104 Uncultured Bacteroidetes bacterium clone GASP-WC2S3_E04 16S -FJ623276 Uncultured bacterium clone 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence -FJ660549 Uncultured bacterium clone A24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

(cont. next page)

1.9	-EU234268Uncultured bacterium clone C44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	-AY693809 Uncultured euryarchaeote clone ARC8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	-FJ230892 Uncultured bacterium clone F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	-AM180043Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone A1-71
	-EU795883Uncultured bacterium clone 1M13R 16S ribosomal RNA gene, partial
	-EU809779Uncultured bacterium clone KS-246 16S ribosomal RNA gene, partial
	-EU592668 Uncultured bacterium clone MFBC5F01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	-FJ350202Uncultured bacterium clone 051024_S1_W_T_SDP3_159 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	RNA gene, partial sequence
	No significant similarity found in GenBank database
1.11	No significant similarity found in GenBank database
2.1	No significant similarity found in GenBank database
2.2	-AM162486 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone B39
	-AM991275 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone M6A-722
	-AY661909 Bacterium DM-P3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	-EU101223 Uncultured bacterium clone RS06101_B19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	-AF507586 Uncultured soil bacterium clone C131 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
2.3	No significant similarity found in GenBank database
2.4	No significant similarity found in GenBank database
2.5	-AM162486 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone B39

(cont. next page)

	-AY661909 Bacterium DM-P3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	-AM991275 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone M6A-722
2.6	No significant similarity found in GenBank database
2.7	No significant similarity found in GenBank database
2.8	-FM242339 Uncultured Verrucomicrobium sp. partial 16S ribosomal RNA, clone 6 T9d-oil
	-EU050744 Uncultured alpha proteobacterium clone ss1_B_05_03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	-AY676481 Uncultured bacterium clone B-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	-AB255059 Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: IC-31
2.9	No significant similarity found in GenBank database
3.1	No significant similarity found in GenBank database
3.2	No significant similarity found in GenBank database
3.3	-AJ717355 Microbacterium phyllosphaerae 16S rRNA gene, isolate AC13
	-DQ337503 Escherichia sp. BBDP20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	-EU088014 Endophytic bacterium WR4b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	-EF551816 Uncultured bacterium clone L1B_003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
3.4	No significant similarity found in GenBank database
3.5	No significant similarity found in GenBank database
3.6	No significant similarity found in GenBank database
3.7	AM502240 Leishmania infantum chromosome 22 99%
3.8	No significant similarity found in GenBank database

(cont. next page)

กิจกรรมข้อที่ 3: ศึกษาบทบาทหน้าที่ของจุลชีพประเภทต่างๆ ที่เกี่ยวข้องต่อการบำบัดน้ำเสียกับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในน้ำเสีย

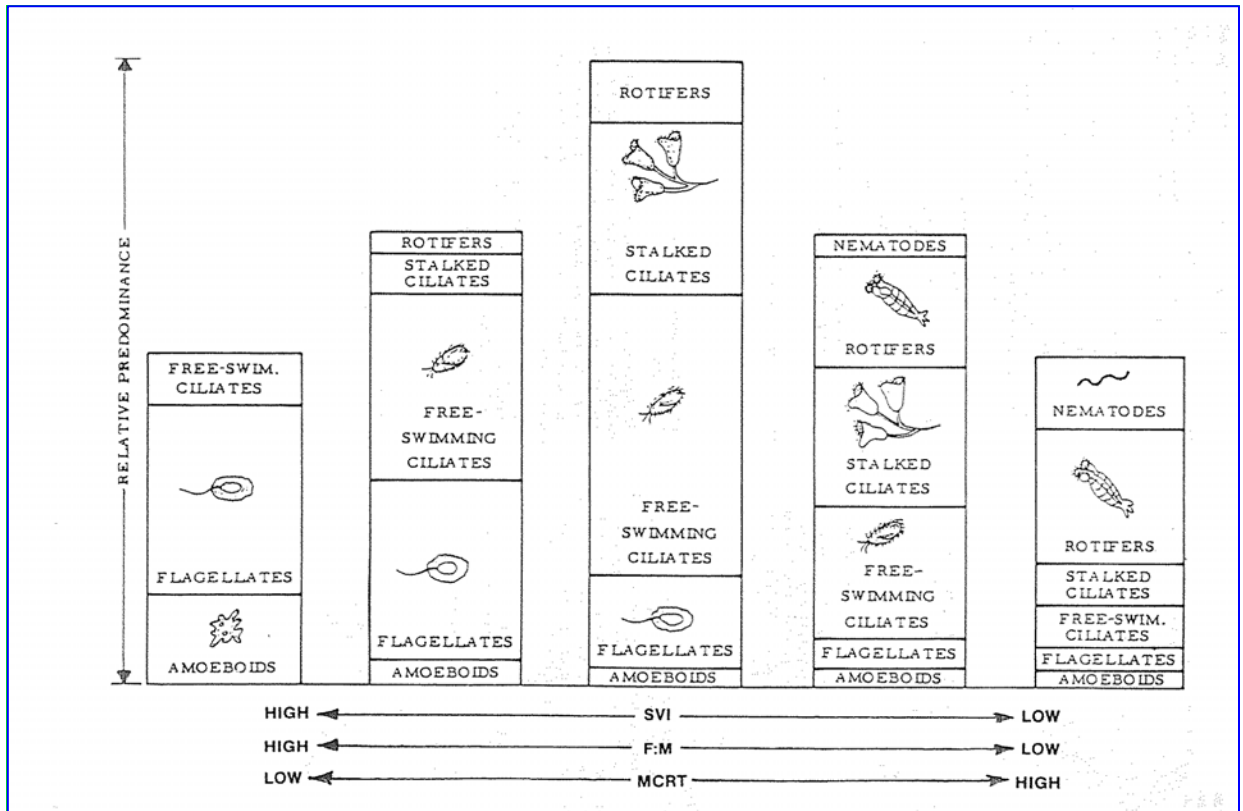
ส่วนที่หนึ่ง: เป้าหมายของกิจกรรมนี้คือ การศึกษาหาความสัมพันธ์ของโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (the most prevalent species ในโรงบำบัดน้ำเสียจากชุมชน) กับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ความ (ไม่) เสถียรของระบบบำบัดน้ำเสียเพื่อประเมิน/ใช้พยากรณ์ความเปลี่ยนแปลงของระบบบำบัดน้ำเสีย จากความรู้พื้นฐานและแนวคิดที่ว่าจำนวนโรติเฟอร์ที่เพิ่มสูงขึ้นย่อมบ่งบอกถึงความสมดุลของระบบบำบัดน้ำเสีย จึงนำข้อมูลจำนวนโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 ที่ได้จากการสำรวจสายพันธุ์ของโรติเฟอร์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชน (โรงงานบำบัดน้ำเสียที่หนองแขม) จากแต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างน้ำเสีย (จุดเก็บที่ 1 จุดเก็บที่ 2 และจุดเก็บที่ 3) ไปหาความสัมพันธ์กับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ โดยข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปตรวจสอบความถูกต้องและบันทึกในรูปแบบของแฟ้มข้อมูลในคอมพิวเตอร์ เพื่อนำไปทดสอบการกระจายของข้อมูล normality ทั้ง skewness และ kurtosis ถ้ามีการกระจายเป็น normal distribution การเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มจะใช้วิธีการทางสถิติแบบ parametric method ได้แก่ Anova และ independent student *t* test (ค่าสถิติที่ใช้ทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัว จะใช้ Pearson correlation) แต่ถ้าข้อมูลทดสอบไม่เป็น normal distribution การนำเสนอจะเสนอเป็น median และ range และใช้วิธีการทางสถิติแบบ non-parametric method การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มใช้ Kruskal-Wallis analysis of variance และ Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใช้ Spearman correlation

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าจำกัดความของค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ความไม่เสถียรของระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชน (โรงงานบำบัดน้ำเสียหนองแขม) เพื่อนำไปทดสอบหาความสัมพันธ์กับจำนวนโรติเฟอร์ที่ตรวจพบ และเหตุผลในการพิสูจน์ความสัมพันธ์นี้ เพื่อแปลผลเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย

ตารางที่ 3.2 แสดงผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 กับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ แต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างน้ำเสีย (จุดเก็บที่ 1 จุดเก็บที่ 2 และจุดเก็บที่ 3) พบว่า ณ จุดเก็บที่ 1 โรติเฟอร์ชนิดที่ 2 มีความสัมพันธ์ผกผันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ กับค่า dissolved oxygen (DO) และ mixed liquor suspended solids (MLSS) ซึ่งจุดเก็บที่ 1 นี้เป็นจุดที่น้ำเสียเพิ่งเข้าสู่ระบบจึงมีปริมาณอาหาร (ของเสีย) เข้ามามาก จุลชีพมีการเพิ่มจำนวนมากในช่วงแรกทำให้โรติเฟอร์เมื่อมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น จึงมีการใช้ออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น จึงพบค่าออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) ลดลง ส่วนค่า MLSS ซึ่งวัดในรูปของของแข็งแขวนลอยทั้งหมดเป็นตัวแทนของปริมาณตะกอนจุลชีพ เนื่องจากโรติเฟอร์จะดำรงชีวิตโดยการกินสิ่งมีชีวิตเล็กๆ เช่นพวกแบคทีเรียต่างๆ และเศษอินทรีย์วัตถุที่มีอยู่ในน้ำ ดังนั้นถ้ามีโรติเฟอร์อยู่มากปริมาณตะกอนจุลชีพก็จะลดลงจากการกินโดยโรติเฟอร์ในระบบห่วงโซ่อาหาร (food chain) (รูปที่ 3.1)

สำหรับจุดเก็บที่ 2 ซึ่งเป็นจุดที่ Mixed liquor เพิ่งออกจากถังเติมอากาศมักใช้เป็นจุดที่ทำการตรวจสอบระหว่างกระบวนการ พบว่าจำนวนโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 มีความสัมพันธ์ผกผันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า DO เพียงค่าเดียว ที่ $p < 0.01$ เช่นเดียวกับจุดที่ 1 แต่จำนวนโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 มีความสัมพันธ์แปรผกผันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า Sludge volume index (SVI หรือดัชนีปริมาตรสลัดจ์) ที่ $p < 0.05$ ซึ่งค่า SVI นี้มีความสัมพันธ์ทางทฤษฎีที่ใช้ในการดูการตกตะกอน แสดงว่าจำนวนโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 เพิ่มมากขึ้นจะมีการตกตะกอนมากขึ้น

สำหรับจุดเก็บที่ 3 คือ RAS ซึ่งขณะนั้นน้ำเสียที่บำบัดแล้วจะออกจากระบบ จำนวนโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 มีความสัมพันธ์ผกผันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า Hydraulic retention time (HRT; ระยะเวลาที่กักน้ำ) ที่ $p < 0.05$ และค่า DO ที่ $p < 0.01$ แปลผลได้ว่า จำนวนโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ระยะเวลาที่กักน้ำสั้นลงตามที่ตั้งสมมุติฐานไว้ เพราะมีการบำบัดหรือย่อยสลายของเสียได้เร็วขึ้น ส่วนความสัมพันธ์ผกผันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า DO นั้นก็สัมพันธ์กับผลการทดสอบทั้งจุดเก็บที่ 1 และจุดเก็บที่ 2 ซึ่งเป็นไปตามที่กล่าวมาแล้ว



รูปที่ 3.1 ประชากรจุลชีพในกลุ่มโปรโตซัวและโรติเฟอร์ในระบบนิเวศของระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชน แบบ activated sludge ที่สัมพันธ์กับความเสถียรของระบบ
Source: Operation of Wastewater Treatment Plants. Vol. 2, 4th edition, p. 95
ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ผลสอดคล้องกับข้อมูลที่มีมาก่อนในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศจากต่างประเทศและเป็นข้อมูลแรกของประเทศไทย

ตารางที่ 3. 1 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ และเหตุผลในการพิสูจน์ความสัมพันธ์กับจำนวนโรติเฟอร์ชนิดที่ 2 (R2) ที่ตรวจพบ

Item	Matching parameter	Unit	ความสัมพันธ์กับจำนวนโรติเฟอร์ที่ตรวจพบบ่งชี้ถึง	หมายเหตุ
1	Influent BOD loading	kg/day	ปริมาณอาหารที่เข้าระบบกับปริมาณโรติเฟอร์ที่วัดได้	[BODi] x Flow
2	Reduction in BOD loading	kg/day	ปริมาณอาหารที่หายไป กับปริมาณโรติเฟอร์ที่วัดได้ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการบำบัด	[(BODi - BODe)] x Flow
3	Mean Cell Resident Time (MCRT)		โรติเฟอร์มีผลต่ออายุของสลัดจ์	(MLSSavg x VofAR1-4):[(MLSS@RAS x Qwas)+(Sse x Q)]
4	F:M (Food to Microorganism ratio)		อัตราการเจริญเติบโตของจุลชีพ	(Bodi) x Q : (MLSSavg x VofAR1-4)
5	SVI	ml/mg	ความสัมพันธ์ทางทฤษฎีนี้ใช้ในการคาดการณ์	SV30@AR4 : MLSSavg
6	HRT	hours	ระยะเวลาที่น้ำจะสั่นลง	VofAR1-4 : Q x 24
7	Temperature		สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง	
8	DO in sampling points 1, 2 and 3	mg/liter	สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง	If high levels of organic matter are present in the water, microbes may use all available oxygen
9	pH in sampling points 1, 2 and 3		สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง	In the wastewater field pH analyses are important for neutralization, corrosion control, precipitation, coagulation, and biological treatment
10	MLSS in sampling points 1, 2 and 3	mg/liter	ปริมาณรวมจุลชีพ	

Abbreviations

1. BODi (Influent BOD loading) คือ biochemical oxygen demand ของน้ำเสียขาเข้า (BOD influent)
2. BODe (Effluent BOD loading) คือ biochemical oxygen demand ของน้ำเสียขาออก (BOD effluent)
3. Flow คือ อัตราการไหลของน้ำ
4. MCRT คือ mean cell resident time ซึ่งคือ อายุของสลัดจ์ เป็นระยะเวลาโดยเฉลี่ยของจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสีย

5. F:M, Food to Microorganism ratio คือ อัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์
6. MLSS คือ Mix liquor suspended solid หมายถึง ปริมาณโดยรวมของจุลินทรีย์
7. MLSSav คือ ค่าของ Mix liquor suspended solid โดยเฉลี่ย ซึ่งหมายถึงปริมาณโดยรวมของจุลินทรีย์
8. VofAR1-4 คือ ปริมาตรรวมของ aeration tank ตั้งแต่ 1 ถึง 4
9. RAS คือ return activated sludge
10. MLSS@RAS คือ Mix liquor suspended solid ในสัตจที่สูบกลับเพื่อนำไปใช้ใหม่
11. Qwas คือ อัตราการไหลในการสูบสัตจกลับ
12. Sse คือ ความเข้มข้นของแข็งแขวนลอยในน้ำปล่อยทิ้ง
13. Q คือ อัตราการไหลของน้ำเสีย เช่นเดียวกับค่า Q_{flow}
14. SVI คือ sludge volume index หมายถึง ดัชนีปริมาตรสัตจ
15. SV_{30} คือ ปริมาตรของสัตจซึ่งตกตะกอนจากตัวอย่าง 1,000 มิลลิลิตร ในเวลา 30 นาที
16. DO คือค่าออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen; DO) เพื่อให้ทราบว่าได้ออกซิเจนแก่จุลชีพเพียงพอสำหรับการใช้งานหรือไม่ เนื่องจากจุลชีพต้องใช้ ออกซิเจนในการดำรงชีพ
17. HRT คือ Hydraulic retention time หมายถึงระยะเวลาที่น้ำ