# การบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตท่อและข้อต่อเหล็กด้วย *Bacillus* spp.

# Treatment of Wastewater of Steel Pipe Fitting Factory by using *Bacillus* spp.

**บุษยา อภิชัยเสถียรโชติ**
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของแบคทีเรียจากน้ำเสียโรงงานผลิตท่อและข้อต่อเหล็กที่มีการปนเปื้อนด้วยโลหะหนักสังกะสีและแมงกานีส รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานฯ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ 2 ไอโซเลทคือ T-1 และ P-3 นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการทนต่อโลหะหนักสังกะสีบนอาหาร NA ที่ผสม $ZnSO_4$ และ $KMnO_4$ ผลการทดลองพบว่าไอโซเลท T-1 สามารถทนต่อโลหะสังกะสีและแมงกานีสได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 450 mg/l และ 500 mg/l ตามลำดับ เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นพบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacilus* spp. ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแบคทีเรียพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.546 ต่อวัน ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว NB ได้แก่ความเข้มข้นของโลหะสังกะสีและแมงกานีส ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย และค่า pH พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงที่ความเข้มข้นของโลหะสังกะสีและแมงกานีสในช่วง 100 ถึง 200 mg/l ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมเท่ากับ 10 % (V/V) และค่า pH เท่ากับ 7.0 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการบำบัดน้ำเสียที่มีโลหะสังกะสีและแมงกานีสจากโรงงานผลิตท่อและข้อต่อเหล็กพบว่าร้อยละการกำจัดค่าซีโอดีและแมงกานีสเท่ากับ 30.71 และ 52.79 ตามลำดับ ส่วนการกำจัดโลหะสังกะสีลดจากช่วง 100 mg/l เป็น 50 mg/l ดังนั้น *Bacillus* spp. น่าจะมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียโรงงานฯได้อย่างมีประสิทธิภาพ

**คำสำคัญ: น้ำเสีย/ โลหะหนัก / *Bacillus***

**Abstract**

The objectives of this research were to Isolate and preliminary identification bacteria from wastewater of steel pipe fitting factory that are contaminated with heavy metals, zinc and manganese. In addition, to test the efficiency of the isolated bacteria for use in wastewater treatment plants. It was found that two isolates of bacteria T-1 and P-3 were isolated and were evaluated for their tolerance to zinc and manganese on NA with $ZnSO_4$ and NA with $KMnO_4$. It was found that the bacterial isolate T-1 showed the maximum metal tolerance toward zinc at 450 mg / l and manganese at 450 mg /l. For preliminary identification, the isolate T-1 was genus *Bacillus* spp. The result of the specific growth rate of bacteria was 0.546 per day. Study of factors affecting the growth of bacteria in NB were the concentration of zinc and manganese, seedling and pH. The results showed that the bacteria had high growth at the concentration of zinc and manganese in the range of 100 to 200 mg

/l . The appropriate amount of seeding was 10% and the pH was 7. *Bacillus* isolate T-1 was tested for the efficiency of wastewater treatment contaminated with zinc and manganese from steel pipe fitting factory. It was found that the percentage of COD and manganese removal were 30.71 and 52.79 respectively. For the removal of zinc, it was decreased from 100 mg /l to 50 mg /l. Therefore, it might be that *Bacillus* isolate T-1 could have a potential for wastewater treatment plants efficiency.

**Keyword*:* wastewater / heavy metal / *Bacillus***

**บทนำ**

ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมผลิตท่อและข้อต่อเหล็กมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โรงงานเหล่านี้มีการใช้น้ำและสาร เคมีเป็นจำนวนมากในกระบวนการผลิตเช่น การกำจัดคราบไขมันโดยการล้างด้วยโซดาไฟ การกำจัดคราบสนิมและการกระตุ้นผิวชิ้นงานโดยการจุ่มในบ่อกรดไฮโดคลอริก การจุ่มฟลักซ์เพื่อกระตุ้นผิวให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเหล็กและสังกะสีโดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์กับซิงค์คลอไรด์ผสมกัน การชุบสังกะสีในบ่อสังกะสีหลอมเหลว การจุ่มน้ำเพื่อระบายความร้อน เป็นต้น ทำให้มีการปนเปื้อนของสารมลพิษในน้ำเสียปริมาณสูง เช่น ค่าซีโอดี และโลหะหนักต่างๆเช่น แมงกานีส และสังกะสี ประวรดา (2555) ทำการศึกษาคุณลักษณะทางเคมีบางประการของน้ำเสียรวมจากบ่อล้างน้ำในขั้นตอนการขจัดไขมัน การขจัดสนิมเหล็กและการชุบโลหะของบริษัทบีสไพพ์ ฟิตติ้ง อินดัสตรี พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณสังกะสีเท่ากับ 7,641 mg/l และค่าเฉลี่ยปริมาณแมงกานีสเท่ากับ 38.27 mg/l ซึ่งเกินค่ามาตรฐานตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 ซึ่งกำหนดให้มีปริมาณสังกะสีและแมงกานีสไม่เกิน 5.0 mg/l ดังนั้นน้ำเสียดังกล่าวจึงจำเป็นต้องผ่านการบำบัดก่อนที่จะปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งระบบบำบัดของโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้กระบวนการบำบัดทางกายภาพและเคมี ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยและต้นทุนต่ำ มีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถกำจัดโลหะหนักออกจากน้ำเสียได้เช่นเชื้อรา สาหร่าย แบคทีเรีย( Gavrilesca, 2004; Gupta et al. 2000; Volesky and Holan,1995) มีงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. สามารถบำบัดน้ำเสียที่มีโลหะหนักในระดับความเข้มข้นสูงได้ เช่น Kim et al. (2007) ศึกษาการทนต่อโลหะหนักของ *Bacillus* spp. และความสามารถในการดูดซับทางชีวภาพพบว่าแบคทีเรียสามารถทนต่อโลหะต่างๆได้ดังนี้ Pb > Cd > Cu > Ni > Co > Mn >Cr > Zn

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

1.เพื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียโรงงานผลิตท่อและข้อต่อเหล็กที่มีความสามารถในการทนต่อโลหะหนักสังกะสีและแมงกานีส

2. เพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของแบคทีเรียที่มีสามารถในการทนต่อโลหะหนักสังกะสีและแมงกานีส

3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ในการนำไปใช้บำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตท่อและข้อต่อเหล็ก

**ขอบเขตของการวิจัย**

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียของโรงงานผลิตท่อและข้อต่อเหล็กที่มีความสามารถในการทนต่อโลหะหนักสังกะสีและแมงกานีส และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อโลหะดังกล่าว จากนั้นจึงศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานฯ

**วิธีดำเนินการวิจัย**

1.การเก็บตัวอย่างน้ำเสียและการวิเคราะห์คุณภาพตัวอย่างน้ำเสีย

นำขวดพลาสติก Polyethylene ทำความสะอาดทิ้งไว้ให้แห้ง เก็บตัวอย่างน้ำเสียได้แก่น้ำเสียจากบ่อกำจัดคราบไขมัน (Tapping) น้ำเสียจากบ่อระบายความร้อน (Pressure) และน้ำเสียจากบ่อกำจัดคราบสนิม และการกระตุ้นผิวชิ้นงาน(Zinc) จากโรงงานผลิตท่อและข้อต่อเหล็ก จังหวัดสมุทรสาคร เก็บน้ำเสียไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ทำการวิเคราะห์คุณภาพตัวอย่างได้แก่ค่า COD ด้วยวิธี Open Reflux (AOAC, 2000) ปริมาณแมงกานีสด้วยวิธี Spectrophotometer (AOAC, 2000) ปริมาณสังกะสีด้วยชุดทดสอบสังกะสี Quantofix® Zink

2. การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะสังกะสีและแมงกานีส

2.1 นำตัวอย่างน้ำเสีย Tapping, Pressure และ Zinc มาทำ serial dilution จากนั้นดูดสารละลายมา spread plate บนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันเขี่ยเชื้อลงในอาหารเอียง เพื่อนำไปทดสอบความทนทานต่อโลหะแมงกานีสและสังกะสีต่อไป

2.2 เตรียมอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ที่มีสารละลาย $ZnSO_4$ และอาหาร NA ที่มีสารละลาย $KMnO_4$ ที่ความเข้มข้น 50, 100,150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 mg/l นำเชื้อที่คัดแยกได้มาเขี่ยลงบนอาหารแข็ง NA ที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งที่มีความเข้มข้นต่างๆของโลหะสังกะสีและแมงกานีส

3.การพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อโลหะสังกะสีและแมงกานีส

3.1การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยเขี่ยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนี สีโคโลนี รูปร่างและขนาดของเซลล์ การผลิตสปอร์

3.2 ศึกษาผลการย้อม Gram stain และการย้อมแบบ Simple stain

3.3 การทดสอบทางชีวเคมีได้แก่ การทดสอบ Oxidase Test, การทดสอบ Catalase Test, Lactose ferment broth, Triple sugar iron agar (TSI agar), Indole test , Motility test, Citrate test , MR-VP Test และ Oxidation / Fermentation test

4. การศึกษาอัตราการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก

เตรียมอาหารเหลว NB ปริมาตร 400 ml นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ปริมาณ 10% (V/V) ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปวัดค่า O.D $_{600\ nm}$ และค่า pH

5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก

5.1การศึกษาความเข้มข้นของโลหะหนักที่ผลมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเหลว NB ที่มีสารละลาย $ZnSO_4$ ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 450 mg/l (ความเข้มข้นสูงสุดของโลหะสังกะสีที่แบคทีเรียสามารถทนได้) ปริมาณ 100 ml และอาหารเหลว NB ที่มีสารละลาย $KMnO_4$ ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 mg/l (ความเข้มข้นสูงสุดของโลหะแมงกานีสที่แบคทีเรียสามารถทนได้) ปริมาณ 100 ml ใส่เชื้อที่คัดเลือกได้ปริมาณ 10 % (V/V) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 48 นำไปวัดค่า O.D $_{600\ nm}$ และค่า pH

5.2 การศึกษาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเหลว NB ที่มีสารละลาย $ZnSO_4$ ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาณ 100 ml และอาหารเหลว NB ที่มีสารละลาย $KMnO_4$ ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาณ 100 ml ใส่หัวเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ปริมาณ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 % (V/V) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ C เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 48 นำไปวัดค่า O.D $_{600\ nm}$ และค่า pH

5.3 การศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเหลว NB ที่มีสารละลาย $ZnSO_4$ ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาณ 100 ml และสารละลาย $KMnO_4$ ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาณ 100 ml ใส่หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาณที่เหมาะสม แล้วจึงปรับ pH อาหารเหลวเท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30$^{\circ}$ C เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 48 นำไปวัดค่า O.D$_{600\ nm}$ และค่า pH

6. การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียด้วย *Bacillus* spp.

เตรียมตัวอย่างน้ำเสียรวมอัตราส่วน Tapping : Pressure : Zinc อัตราส่วน 1 : 1 :1 ปริมาณ 100 ml ปรับค่า pH และใส่หัวเชื้อเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ C เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 48 นำไปวัดค่า COD ค่า pH ปริมาณแมงกานีสและช่วงปริมาณสังกะสีที่เปลี่ยนแปลง

**ผลการวิจัย**

การวิเคราะห์คุณภาพตัวอย่างน้ำเสีย

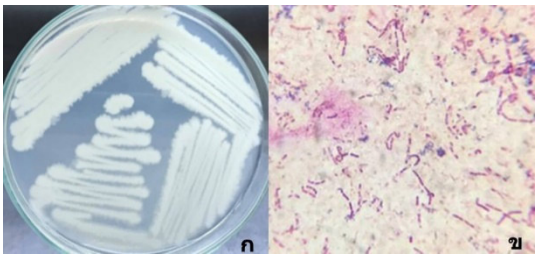
จากการวิเคราะห์ค่า COD ในตัวอย่างรวมของน้ำเสียบ่อกำจัดคราบไขมัน (Tapping) บ่อระบายความร้อน ( Pressure) และบ่อกำจัดคราบสนิมและการกระตุ้นผิวชิ้นงาน (Zinc) อัตราส่วน Tapping : Pressure : Zinc เท่ากับ 1 :1 : 1 พบว่าน้ำเสียรวมมีค่า COD เท่ากับ 1,670 ค่า pH เท่ากับ 3.65 ส่วนปริมาณโลหะหนักพบว่าปริมาณสังกะสีอยู่ในช่วงมากกว่า 100 mg/l ปริมาณแมงกานีสเท่ากับ 5.10 mg/l ซึ่งพบว่ามีค่าเฉลี่ยสูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม โดยตามมาตรฐานน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงานต้องมีค่า COD ไม่มากกว่า 400 mg/l ค่า pH ไม่เกิน 5.5 - 9.0 ปริมาณโลหะหนักสังกะสีและแมงกานีสไม่มากกว่า 5 mg/l

ผลการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะสังกะสีและแมงกานีส

ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสีย Tapping, Pressure และ Zinc พบว่าแยกแบคทีเรียได้ 2 ไอโซเลทได้แก่ T-1 และ P-3 จากนั้นทดสอบความทนทานของแบคทีเรียต่อโลหะสังกะสีและแมงกานีสบนอาหาร NA ที่มีสารละลาย $ZnSO_4$ และอาหาร NA ที่มีสารละลาย $KMnO_4$ ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400,450 และ500 mg/l ผลการทดลองพบว่าไอโซเลท T-1 สามารถเจริญบนอาหาร NA ที่ความเข้มข้นของสังกะสีสูงสุดที่ 450 mg/l และความเข้มข้นของแมงกานีสที่ 500 mg/l ส่วนไอโซเลท P-3 สามารถทนความเข้มข้นของสังกะสีสูงสุดเพียง 350 mg/l และความเข้มข้นของแมงกานีส 450 mg/l ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลท T-1 เพื่อทำการศึกษาต่อไป

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของแบคทีเรียไอโซเลท T-1

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลทT-1 พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อมีสีครีม เมื่อเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 1 ก) ผลการย้อมแกรมพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก อาจเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสาย (ภาพที่ 1 ข)

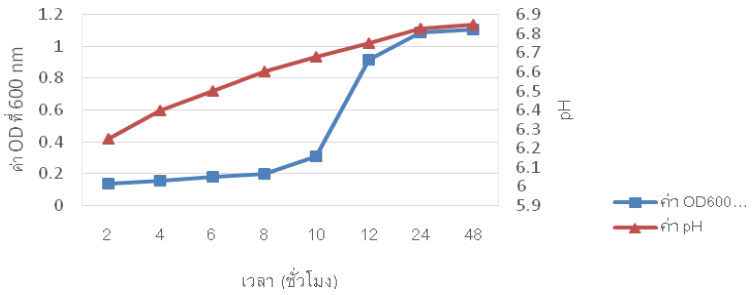



ภาพที่ 1 แสดงโคโลนี (ก) และการติดสีแกรมบวก (ข) (1000 X) ของแบคทีเรียไอโซเลท T-1

ส่วนผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าไอโซเลท T-1 ให้ผลบวกกับการทดสอบดังนี้ Oxidase Test, Catalase Test, TSI agar Test, Motility Test, Citrate Test, VP Test และ Oxidation / Fermentation Test และให้ผลลบกับการทดสอบ Lactose ferment broth Test, Indole test และ MR Test ซึ่งตรงกับคุณสมบัติของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. เปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิงของ Sneath et al. (1986) และTurnbull et al. (1990)

ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ *Bacillus* spp.

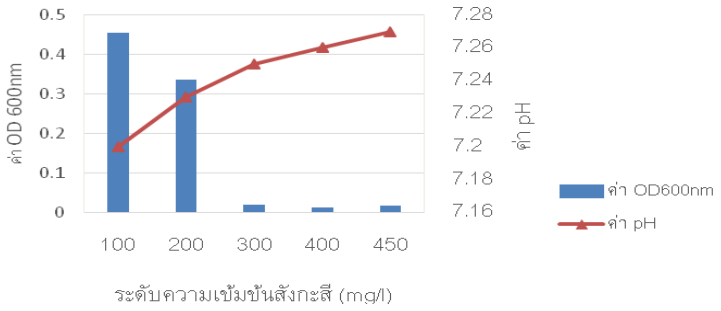
จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ *Bacillus* ในอาหารเหลว NB บ่มที่อุณหภูมิ 30 ° C เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญสูงสุดชั่วโมงที่ 12 โดยวัดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) มีค่าเท่ากับ 0.546 ต่อวัน ที่ pH 6.75 (ภาพที่ 2)



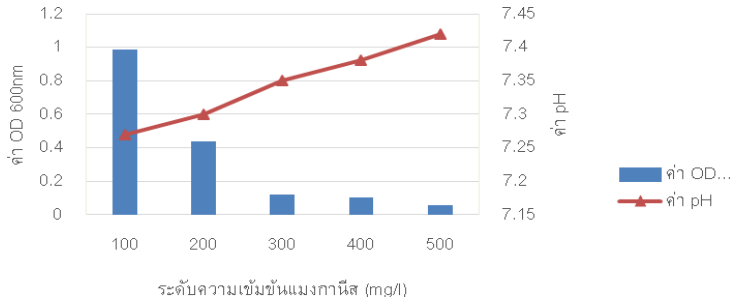

ภาพที่ 2 แสดงอัตราการเจริญของ *Bacillus* spp. ในอาหารเหลว NB ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการศึกษาปัจจัยที่ผลมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ผลการศึกษาความเข้มข้นของโลหะสังกะสีและแมงกานีสที่มีต่อการเจริญของ *Bacillus* ในอาหารเหลว NB ที่ความเข้มข้นของโลหะสังกะสี 100 – 450 mg/l และโลหะแมงกานีส ที่ความเข้มข้น 100 -500 mg/l พบว่าเมื่อความเข้มข้นโลหะในอาหารเหลวเพิ่มขึ้น การเจริญเติบของแบคทีเรียจะน้อยลง โดยแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในอาหาร NB ทีมีการเติมสังกะสีที่ความเข้มข้น 100 mg/l pH 7 รองลงมาคือ 200 mg/l ที่ pH 7.22 และเจริญเติบโตได้น้อยที่ความเข้มข้นสังกะสีมากกว่า 200 mg/l (ภาพที่ 3) ในทำนองเดียวกันพบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตดีที่ความเข้มข้นแมงกานีส 100 mg/l pH 7.28 รองลงมาคือ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH 7.3 แต่ที่ความเข้มข้นของแมงกานีสมากกว่า 200 mg/l แบคทีเรียเจริญเติบโตได้น้อยลงตามลำดับ (ภาพที่ 4)



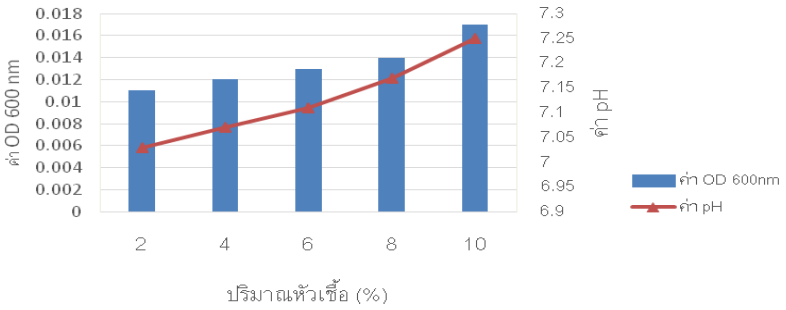

ภาพที่ 3 ผลของความเข้มข้นของโลหะสังกะสีในอาหารเหลว NB ที่มีผลต่อการเจริญของ *Bacillus* spp.



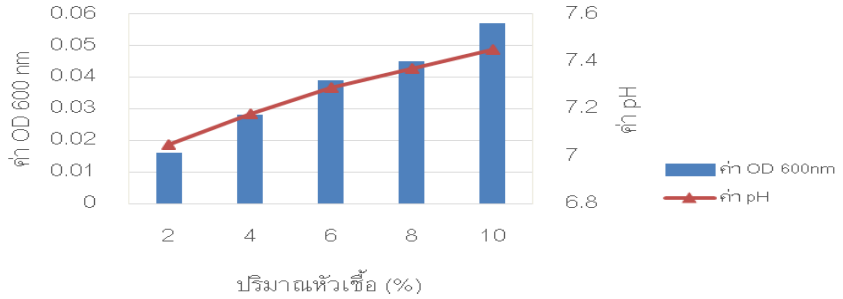

ภาพที่ 4 ผลของความเข้มข้นของโลหะแมงกานีสในอาหารเหลว NB ที่มีผลต่อการเจริญของ *Bacillus* spp.

ผลการศึกษาปริมาณหัวเชื้อ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10% (V/V) ที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร NB ที่มีการเติมโลหะสังกะสีความเข้มข้น 450 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหาร NB ที่มีการเติมแมงกานีสความ

เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตดีเมื่อเติมหัวเชื้อในปริมาณ 10% (V/V) ทั้งในอาหารเหลวที่มีการเติมสังกะสี (ค่า OD 600 $_{nm}$ = 0.017) และในอาหารเหลวที่มีการเติมแมงกานีส (ค่า OD 600 $_{nm}$ = 0.055) (ภาพที่ 5, 6)



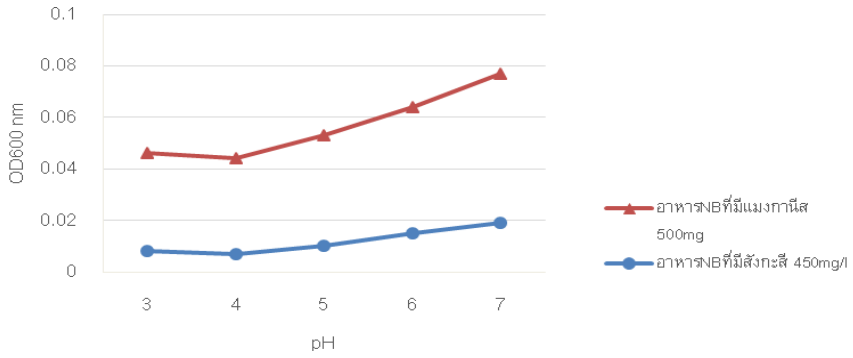

ภาพที่ 5 ผลของปริมาณหัวเชื้อ *Bacillus* spp.ที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว NB ที่มีโลหะสังกะสีและการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ




ภาพที่ 6 ผลของปริมาณหัวเชื้อ *Bacillus* spp.ที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว NB ที่มีโลหะแมงกานีสและการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการศึกษาค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* spp.

พบว่า *Bacillus* มีการเจริญได้ดีเมื่อค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น โดยเจริญได้ดีที่สุดที่ค่า pH เท่ากับ 7 ทั้งในอาหารเหลวที่มีโลหะสังกะสี (ค่า OD 600 $_{nm}$ = 0.02) และในอาหารเหลวที่มีโลหะแมงกานีส (OD 600 $_{nm}$ = 0.08) (ภาพที่ 7)




ภาพที่ 7 ผลของ pH ในอาหารเหลว NB ผสมแมงกานีส 500 mg/l และอาหารเหลว NB ผสมสังกะสี 450 mg/l ที่มีต่อการเจริญของ *Bacillus* spp.

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการบำบัดน้ำเสียรวมจากโรงงานข้อต่อเหล็ก

เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อ *Bacillus* 10 % (v/v) มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียรวมที่มีการปรับ pH เท่ากับ 7 0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ C อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่า COD เริ่มต้นก่อนการบำบัดเท่ากับ 1,312 mg$O_2$ / l มีค่าลดลงเหลือ 909 mg $O_2$ /l คิดเป็น เปอร์เซ็นต์การกำจัดเท่ากับ 30.71 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแมงกานีสเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 8.14 mg/l มีค่าลดลงเหลือ 3.89 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกำจัดเท่ากับ 52.79 ส่วนผลของปริมาณสังกะสีก่อนการบำบัดอยู่ในช่วง 100 mg/l หลังการบำบัดมีค่าลดลงเหลืออยู่ในช่วง 50 mg/l ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละการกำจัดค่า COD ปริมาณโลหะแมงกานีส และช่วงปริมาณสังกะสีหลังการบำบัดด้วย *Bacillus* spp.

| าที่วิเคราะห์ | ก่อนการบำบัด | หลังการบำบัด | % การกำจัด |
|---|---|---|---|
| COD (mg$O_2$/l) | 1312 | 909 | 30.71 |
| ปริมาณแมงกานีส (mg/l) | 8.14 | 3.89 | 52.79 |
| ปริมาณสังกะสี (mg/l) | อยู่ในช่วง 100 | อยู่ในช่วง 50 | - |

หมายเหตุ แถบสีแสดงช่วงของปริมาณสังกะสี (mg/l)

อยู่ในช่วง 5 mg/l
อยู่ในช่วง 10 mg/l
อยู่ในช่วง 25 mg/l
อยู่ในช่วง 50 mg/l
อยู่ในช่วง 100 mg/l

**อภิปรายผลการวิจัย**

ผลจากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียโรงงานฯพบว่าไอโซเลท T-1 สามารถทนต่อความเข้มข้นของสังกะสีบนอาหาร NA ได้ถึง 450 mg/l และทนต่อแมงกานีสได้ถึง 500 mg/l Gadd (1988) ศึกษากลไกการสะสมโลหะหนักของแบคทีเรียพบว่ามีหลายแบบ เช่นการใช้ระบบการขนส่งธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ การจับกับโลหะหนักด้วยโปรตีน การตกตะกอน การดูดซับไอออนโลหะหนักและการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโลหะหนักซึ่งเกิดขึ้นจากการขับสารเมตาบอไลต์ออกมาจับกับไอออน โลหะหนัก

ผลการศึกษาความเข้มข้นของโลหะสังกะสีและแมงกานีสที่มีต่อการเจริญของ*Bacillus* พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีในโลหะทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่ำคือช่วง 100-200 mg/l และมีการเจริญลดลงเมื่อความเข้มข้นของโลหะสูงขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียมีการเจริญได้ดีในอาหารเหลวที่มีแมงกานีสได้ดีกว่าในอาหารเหลวที่มีสังกะสีในทุกความเข้มข้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอด คล้องกับการทดลองของ Yilmaz (2003) พบว่าความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ *Bacillus circulans* strain EB1 เรียงตามลำดับได้ดังนี้ Cd = Co > Cu > Ni > Zn > Mn

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตข้อต่อเหล็ก พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการกำจัด COD และปริมาณแมงกานีสคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 30.71 และ 52.79 ตามลำดับ และสามารถลดปริมาณของสังกะสีเหลืออยู่ในช่วง 50 mg/l อย่างไรก็ตามคุณภาพน้ำเสียยังไม่ผ่านมาตรฐานตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาการวิจัยต่อไป

**ข้อเสนอแนะ**

1. ควรมีการพัฒนาการวิจัยโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติหลายชนิดร่วมกันกับแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ในการบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

2. ควรมีการจำแนก species ของ *Bacillus* spp. โดยใช้เทคนิค PCR

**กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยแก่บุคลากรสังกัดภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จากกองทุนสนับสนุนการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

**เอกสารอ้างอิง**

ประวรดา โภชนจันทร์. (2555). การศึกษาคุณลักษณะ การใช้ประโยชน์ และการบำบัดน้ำทิ้งอย่างยั่งยืนในโรงงานอุตสาหกรรมต้นแบบ: กรณีศึกษาโรงงานบีสไพพ์ฟิตติ้ง อินดัสตรี จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต. 4 (1), 4-14

กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม. ฉบับที่ 3 ตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม (2539) สืบค้นเมื่อ มกราคม 10, 2562, จาก http://www.ieat.go.th/handbook/Program_IEAT/pages/th/ Department/MOST.html

Gadd G. M. (1988). Accumulation of metals by microorganism and algae. Biotechnology. 66, 401-433.

Gavrilesca, M. (2004). Removal of heavy metals from the environmental by biosorption. Engineering in Life Science. 4 (3), 219-232

Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R., and Mohapatra, X. (2000). Microbial biosorbents.: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. Current Science, 78 (8), 967-973

Kim, S., Yong-Hwa C., Seo H., Jae-Seoun H., and Ju–Sik, C. (2007). Characterization of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (*Bacillus* spp.). Water Science and Technology. 55 (1-2), 105-111

Sneath, PHA., Mair N, Sharpe, M.E., and Holt J. G. (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology (Vol 2). Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

The Association of official analytical chemists. (2000). Official Method of Analysis of AOAC International. 17th ed. Virginia.

Turnbull, PCB., Kramer, JM., Melling, JC. (1990). *Bacillus*. In Parker, MT, Duerden, BI. (Eds) : Systematic bacteriology. Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. (Vol.2). Edward Arnold, Sevenoaks, England.

Volesky, B., and Holan, Z. (1995). Biosorption of heavy metals. Biotechnology Progress, 11, 235-250

Yilmaz, E. (2003). Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. Research in Microbiology. 154 (6), 409-415