การพัฒนาวิธีตรวจหาแบคทีเรียประจำถิ่นแบบรวดเร็วด้วยเทคนิคเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุล เพื่อการควบคุมที่มีประสิทธิภาพในระบบบำบัดน้ำเสีย

วัลย์สห คุ้มครองวงจี[1], นภัสสร บุญสร้าง[1], ณัฐกาญจน์ ศิริพรพันธ์[1], สุนทรี คำก้อนแก้ว[1], เบญญาภา ถาบัวรี[1], เวโรจน์ ต๊ะตุ้ย[2], และ ธีราวุฒิ ภู่สันติสัมพันธ์[1*]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ประเทศไทย
[2]บริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด โรงงานอยุธยา ประเทศไทย
**Corresponding author: phusantisampan.t@gmail.com*

บทคัดย่อ

ปัญหาตะกอนบวม ซึ่งเกิดจากการเจริญอย่างเกินสมดุลของแบคทีเรียกลุ่มเส้นใย ส่งผลให้การแยกตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง มีประสิทธิภาพลดลง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ระบุชนิดแบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใยในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมจริงด้วยเทคนิคเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุล และ 2) ทดสอบศักยภาพของแบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใยที่คัดแยกได้ ในการควบคุมปัญหาดังกล่าว ศึกษาโดยเก็บตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดที่กำลังประสบปัญหาตะกอนบวม นำมาเพาะเลี้ยงและคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำมาวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาและระบุชนิดแบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใยโดยการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA ขั้นตอนต่อไปนำแบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใยจากตะกอนที่มีเสถียรภาพดี เพื่อเสริมเข้าสู่ระบบปฏิกรณ์ชีวภาพจำลองที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดตะกอนบวม ผลการศึกษาพบว่า เชื้อที่คัดแยกได้มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผลการย้อมแกรมพบเป็นแท่งสั้นสีม่วงเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ การวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA ระบุว่าเป็น คือ *Bacillus cereus* strain 1 และการเสริมแบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใยที่คัดแยกได้สามารถช่วยลดสัดส่วนของแบคทีเรียเส้นใย ทำให้ค่าดัชนีปริมาตรตะกอนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนของตะกอนจุลินทรี ย์ได้ สรุปได้ว่าแนวทางบูรณาการที่ผสมผสานการวินิจฉัยเชิงโมเลกุลกับการควบคุมโดยชีววิธีนี้ เป็นกลยุทธ์ที่มีศักยภาพสูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ในการป้องกันและแก้ไขปัญหาตะกอนบวมได้อย่างจำเพาะเจาะจง อีกทั้งยังช่วยเพิ่มเสถียรภาพในการดำเนินงานและยกระดับคุณภาพน้ำทิ้งของระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ตะกอนบวม / แบคทีเรียเส้นใย / เทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุล / การควบคุมโดยชีววิธี / ระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม

Development of a rapid molecular biotechnology-based detection method for indigenous bacteria to enhance control efficiency in wastewater treatment systems

Vansaha Kumkrongvajee[1], Napussorn Bunsang[1], Nattakan Siripornpan[1], Soontari Komkonekaew[1], Benyapa Thabuaree[1], Waroch Tatuy[2], Theerawut Phusantisampan[1*]

[1]Department of Biotechnology Faculty of Applied Science King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand
[2]Ajinomoto co. (Thailand) ltd. Ayutthaya Factory, Thailand
**Corresponding author: phusantisampan.t@gmail.com*

Abstract

Sludge bulking, caused by the excessive proliferation of filamentous bacteria, significantly reduces the separation efficiency of microbial sludge in activated sludge wastewater treatment systems. This study aimed to: 1) identify the non-filamentous bacteria in an actual industrial wastewater treatment system using molecular biotechnology techniques, and 2) evaluate the potential of isolated non-filamentous bacteria to control and inhibit this problem. Sludge samples were collected from a treatment plant experiencing bulking phenomena. Bacteria were cultivated and isolated from these samples. The morphological characteristics of the non-filamentous bacteria were analyzed, and their species were identified through 16S rRNA gene sequencing. Subsequently, non-filamentous bacteria, isolated from a well-settling sludge, were introduced into a laboratory-scale bioreactor where sludge bulking had been artificially induced. The results demonstrated that the isolated bacterium exhibited opaque white colonies with a smooth, entire margin. Gram staining revealed short, purple (Gram-positive) rods arranged in short chains. 16S rRNA gene sequence analysis identified it as *Bacillus cereus* strain 1. Furthermore, the augmentation with the selected non-filamentous bacteria effectively reduced the proportion of filamentous bacteria, leading to a significant decrease in the Sludge Volume Index (SVI) and a notable improvement in sludge settleability. In conclusion, this integrated approach, combining molecular diagnostics with biological control, represents a highly promising and environmentally friendly strategy for the specific prevention and remediation of sludge bulking. This method not only enhances operational stability but also effectively improves the effluent quality of industrial wastewater treatment system.

Keywords: Sludge bulking / Filamentous bacteria / Molecular biotechnology / Biological control / Industrial wastewater treatment system

1. บทนำ

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (activated sludge process) เป็นระบบที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการบำบัดน้ำเสียจากชุมชนและอุตสาหกรรม เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดสารอินทรีย์และสารอาหาร ระบบอาศัยการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่รวมตัวกันเป็นฟล็อค (floc) ซึ่งสามารถตกตะกอนแยกออกจากน้ำใสได้ง่าย [1] อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของระบบคือ ปัญหาตะกอนบวม (sludge bulking) ซึ่งเกิดจากการเจริญเติบโตมากเกินไปของแบคทีเรียกลุ่มเส้นใย (filamentous bacteria) จนทำให้โครงสร้างฟล็อคหลวม น้ำหนักเบา และตกตะกอนได้ช้าหรือไม่ตกตะกอน [2]

ผลกระทบของตะกอนบวมทำให้ค่าดัชนีปริมาตรตะกอน (Sludge Volume Index: SVI) สูงขึ้น (>150 มิลลิลิตรต่อกรัม) ส่งผลให้ตะกอนจุลินทรีย์หลุดลอยปนออกไปกับน้ำทิ้ง (effluent) ทำให้คุณภาพน้ำทิ้งไม่ได้มาตรฐานและเพิ่มภาระในการจัดการ [3] แบคทีเรียเส้นใยที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของปัญหาในระบบอุตสาหกรรม ได้แก่ *Microthrix parvicella*, *Nocardia* spp., Type 0041 และ Type 0675 เป็นต้น [4]

แนวทางการควบคุมตะกอนบวมในปัจจุบันมีหลากหลายวิธี ทั้งการใช้สารเคมี เช่น คลอรีน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือโพลิเมอร์ ซึ่งให้ผลรวดเร็วแต่อาจเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และมีค่าใช้จ่ายสูง [5] การควบคุมทางกายภาพ เช่น การปรับอัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์ (F/M ratio) การควบคุมอายุตะกอน หรือการเติมออกซิเจน เป็นวิธีที่ปลอดภัยแต่ต้องใช้เวลาและความเข้าใจในระบบอย่างลึกซึ้ง [6]

วิธีการเสริมชีวภาพ (bioaugmentation) หรือการเติมจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพลงในระบบ เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีความจำเพาะเจาะจง [7] โดยเฉพาะการใช้แบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใย (non-filamentous bacteria) ที่มีความสามารถในการแข่งขันกับแบคทีเรียเส้นใยด้านอาหารและพื้นที่อยู่อาศัย ส่งผลให้สัดส่วนของแบคทีเรียเส้นใยลดลงและตะกอนกลับมามีคุณภาพการตกตะกอนที่ดี [8] แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นกลุ่มที่มีศักยภาพสูง เนื่องจากสามารถสร้างเอนโดสปอร์ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง และสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นได้ [9]

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ผ่านมามักใช้จุลินทรีย์ทางการค้าหรือจุลินทรีย์จากต่างถิ่น ซึ่งอาจไม่สามารถปรับตัวเข้ากับระบบบำบัดจริงได้ดีเท่าที่ควร [10] ดังนั้น การคัดแยกจุลินทรีย์ประจำถิ่น (indigenous microorganisms) ที่มีอยู่แล้วในระบบและมีศักยภาพสูงในการควบคุมตะกอนบวม น่าจะเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืนกว่า

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและระบุชนิดแบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใยจากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมจริงที่กำลังประสบปัญหาตะกอนบวม และทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมตะกอนบวมในระบบจำลองแบบ SBR โดยหวังว่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการพัฒนาเทคโนโลยีควบคุมตะกอนบวมที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถประยุกต์ใช้ได้จริงในภาคอุตสาหกรรมต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใย (non-filamentous bacteria) จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรม ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการลดค่าดัชนีปริมาตรตะกอน (SVI) ในระบบ Sequencing Batch Reactor (SBR) จำลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะตะกอนบวม
3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ (TOC) และไนโตรเจนทั้งหมด (TN) ระหว่างการเสริมแบคทีเรียบาซิลัสเพียงชนิดเดียว การเสริมแบคทีเรียคอคคัสเพียงชนิดเดียว และการเสริมร่วมกันทั้งสองชนิด

3. ขอบเขตของการศึกษา

1. ศึกษาและคัดแยกแบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใยจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งจากโรงงาน อายิโนะโมะโต๊ะ อยุธยา
2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพจะจำกัดอยู่ภายใต้สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการ เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียในระบบและแบคทีเรียที่คัดแยกมา

4. วิธีการศึกษา

4.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ (mixed liquor) จากบ่อเติมอากาศของระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานอายิโนะโมะโต๊ะ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งกำลังประสบปัญหาตะกอนบวม (มีค่า SVI สูงกว่า 200 มิลลิลิตรต่อกรัม) โดยใช้ขวดเก็บตัวอย่างพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 1 ลิตร จำนวน 3 ขวด จากนั้นรักษาสภาพตัวอย่างด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2 การคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์

นำตัวอย่างน้ำเสียมาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-5} จากนั้นทำการ spread plate บนอาหาร nutrient agar (NA) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน (สี ขนาด รูปร่าง ขอบ) มาทำการ streak plate บนอาหาร NA ซ้ำเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำไปย้อมสีแกรมและส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูรูปร่างและการจัดเรียงตัว

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16s rRNA ด้วยเทคนิค colony PCR และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Colony PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์สากล 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') [11] ส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย โคโลนีแบคทีเรีย 1 โคโลนี, 0.5X MyTaq reaction buffer, PCR master mix (ประกอบด้วย dNTP, $MgCl_2$ และ DNA polymerase) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ forward และ reverse ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 1.25 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร สภาวะการทำ PCR มีดังนี้: เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (1 รอบ) ตามด้วยการ Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที รวม 40 รอบ และสิ้นสุดด้วย Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (1 รอบ) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1.5% เปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 100 bp จากนั้นส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี direct DNA sequencing นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) [12]

4.4 การจำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ SBR

4.4.1 การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ตามสูตรดัดแปลงจาก [13] ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบในน้ำเสียสังเคราะห์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มก./ล.)
กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	500
เปปโทน	250
แอมโมเนียคลอไรด์ (NH_4Cl)	50
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	10
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	5
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	2

4.4.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดตะกอนบวม

เหนี่ยวนำให้เกิดตะกอนบวมในระบบจำลอง โดยควบคุมให้มีอัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์เริ่มต้น (F/M ratio) สูง (>0.5 กก.ซีโอดี/กก.เอ็มแอลเอสเอส/วัน) และควบคุมความเข้มข้นออกซิเจนละลาย (DO) ให้ต่ำ (<1 มก./ล.) ในช่วง 7 วันแรกของการทดลอง [14]

4.4.3 ชุดการทดลอง

ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรทำงาน 150 มิลลิลิตร แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 3 ซ้ำ ได้แก่

กลุ่ม C (Control): น้ำเสียสังเคราะห์ + เชื้อจากระบบบำบัดจริง 15 มล., กลุ่ม G1: น้ำเสียสังเคราะห์ + เชื้อจากระบบ 10 มล. + เชื้อ *Bacillus* (G1) 5 มล., กลุ่ม G2: น้ำเสียสังเคราะห์ + เชื้อจากระบบ 10 มล. + เชื้อ Coccus (G2) 5 มล., กลุ่ม G3: น้ำเสียสังเคราะห์ + เชื้อจากระบบ 10 มล. + เชื้อ *Bacillus* 2.5 มล. + เชื้อ Coccus 2.5 มล.

4.4.4 สภาวะการเดินระบบ

เดินระบบแบบกะ (Batch) โดยวางบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 28 วัน เก็บตัวอย่างทุก 7 วัน เพื่อวิเคราะห์ค่าต่างๆ

4.5 การวิเคราะห์ค่าต่างๆ

- **ค่าดัชนีปริมาตรตะกอน (SVI):** วัดตามวิธีการมาตรฐาน [13] โดยคำนวณจากปริมาตรตะกอนที่ตกตะกอนใน 30 นาที (SV30) หารด้วยความเข้มข้นของตะกอนแขวนลอย (MLSS)
- **ปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมด (TOC):** วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Total Organic Carbon Analyzer (รุ่น TOC-L, Shimadzu, ญี่ปุ่น)
- **ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TN):** วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Total Nitrogen Measuring Unit (รุ่น TNM-L, Shimadzu, ญี่ปุ่น) ต่อกับเครื่อง TOC Analyzer
- **การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของฟล็อคและแบคทีเรียเส้นใย:** ย้อมสีแกรมและส่องกล้องจุลทรรศน์ (1000X) เพื่อประเมินสัดส่วนของแบคทีเรียเส้นใยด้วยสายตา [4]

4.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบวัดซ้ำ (Repeated Measures ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 26 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) และเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ด้วยวิธี Bonferroni

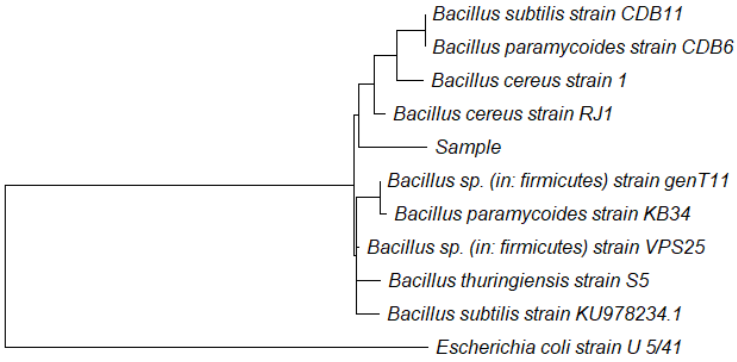
5. ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

5.1 การคัดแยกและระบุชนิดแบคทีเรีย

ผลการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำเสีย พบโคโลนีลักษณะแตกต่างกัน 3 ชนิด เมื่อนำมาย้อมสีแกรม พบลักษณะโคโลนีดังนี้

1. เชื้อชนิดที่ 1: ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผลการย้อมแกรมพบเป็นแท่งสั้น สีม่วง (แกรมบวก) เรียงตัวเป็นสายสั้นๆ
2. เชื้อชนิดที่ 2: ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวมัน ขอบเรียบ ผลการย้อมแกรมพบเป็นทรงกลม สีม่วง (แกรมบวก) เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น
3. เชื้อชนิดที่ 3: ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบหยักไม่สม่ำเสมอ พื้นผิวแห้งและขรุขระ ผลการย้อมแกรมพบเป็นแท่งยาว สีม่วง (แกรมบวก) เรียงตัวเป็นกลุ่มแท่งยาว

จากนั้นทำคัดกรองเบื้องต้นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยพิจารณาเลือกเฉพาะเชื้อชนิดที่ 1 นำไปวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA เนื่องจากเป็นสายพันธุ์เด่น ที่มีลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์สอดคล้องกับกลุ่มแบคทีเรียเป้าหมาย เมื่อนำเชื้อชนิดที่ 1 ไปวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA (รูปที่ 1) ผลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือน (identity) กับ *Bacillus cereus* strain 1 มากที่สุดที่ 98.41% (Accession No. MT539991.1) จึงระบุชื่อแบคทีเรียชนิดนี้ว่า *Bacillus cereus* BTS1



รูปที่ 1 phylogenetic tree ของยีน 16s rRNA ด้วยวิธีการของ UPGMA method

5.2 ประสิทธิภาพของระบบจำลองบำบัดน้ำเสีย

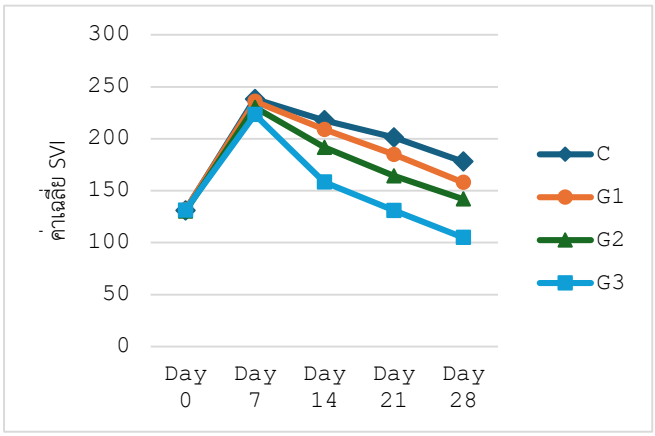
5.2.1 การเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีปริมาตรตะกอน (SVI)

ผลการวิเคราะห์ค่า SVI ตลอด 28 วันแสดงในรูปที่ 2 พบว่าในช่วง 7 วันแรกของการเหนี่ยวนำ ทุกกลุ่มทดลองมีค่า SVI เพิ่มขึ้นสูง (>200 มล./ก.) บ่งชี้ว่าเกิดภาวะตะกอนบวม หลังจากวันที่ 7 เป็นต้นไป กลุ่ม G3 (เสริมเชื้อร่วม) มีค่า SVI ลดลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง จนในวันที่ 28 มีค่า SVI ต่ำที่สุด (105 ± 12 มล./ก.) รองลงมาคือกลุ่ม G2 (142 ± 10 มล./ก.) กลุ่ม G1 (158 ± 14 มล./ก.) และกลุ่มควบคุม (178 ± 15 มล./ก.) ตามลำดับ

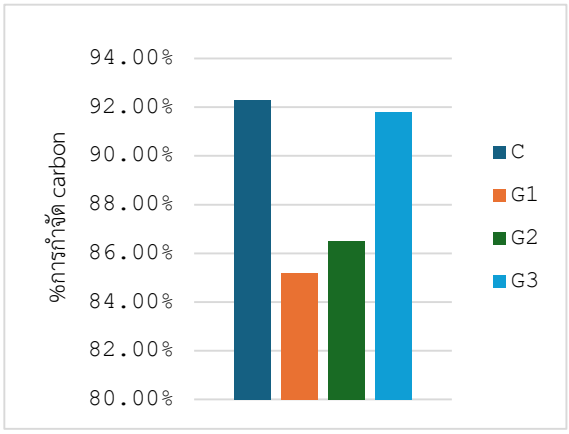
5.2.2 ประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ (TOC)

ผลการวิเคราะห์ TOC พบว่าทุกกลุ่มมีแนวโน้มการลดลงของ TOC ตามระยะเวลา ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 3 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 28) กลุ่มควบคุม (C) และกลุ่ม G3 มีประสิทธิภาพการกำจัด TOC สูงสุดที่ 92.3% และ 91.8%

ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในขณะที่กลุ่ม G1 และ G2 มีประสิทธิภาพการกำจัด TOC ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (85.2% และ 86.5% ตามลำดับ, $p < 0.05$)



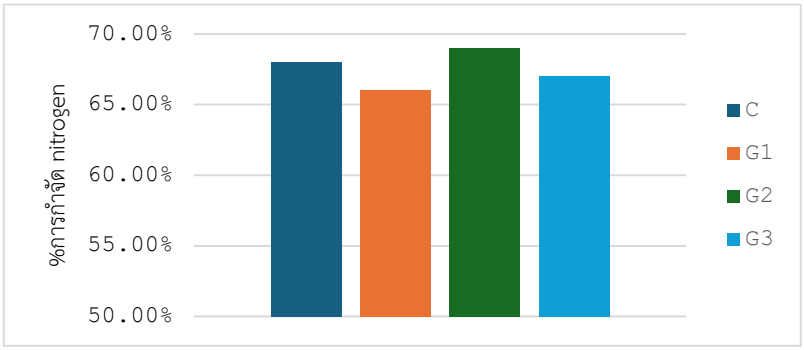
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงค่า SVI ตลอดระยะเวลา 28 วัน



รูปที่ 3 ประสิทธิภาพการกำจัด TOC ของกลุ่มทดลองต่างๆ

5.2.3 ประสิทธิภาพการกำจัดไนโตรเจนทั้งหมด (TN)

ผลการวิเคราะห์ TN (รูปที่ 4) พบว่าทุกกลุ่มทดลองมีประสิทธิภาพการกำจัด TN เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา โดยในวันที่ 28 ทุกกลุ่มมีประสิทธิภาพการกำจัด TN อยู่ในช่วง 65-70% ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าการเสริมเชื้อ *B. cereus* BTS1 และแบคทีเรียคอคคัสไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อกระบวนการกำจัดไนโตรเจนในระบบ



รูปที่ 4 ประสิทธิภาพการกำจัด TN ของกลุ่มทดลองต่างๆ

5.2.4 การสังเกตสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การย้อมสีแกรมและส่องกล้องจุลทรรศน์ในวันที่ 28 พบว่ากลุ่มควบคุม (C) ยังคงมีแบคทีเรียเส้นใยปรากฏให้เห็นในสัดส่วนสูง ขณะที่กลุ่ม G3 พบแบคทีเรียเส้นใยน้อยมาก และพบฟล็อคที่มีขนาดกะทัดรัดและขอบเขตชัดเจน สอดคล้องกับค่า SVI ที่ต่ำ

อภิปรายผล

การคัดแยกแบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใยจากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่กำลังประสบปัญหาตะกอนบวม พบว่าแบคทีเรียเด่นชนิดหนึ่งคือ *B. cereus* BTS1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบในระบบตะกอนเร่งและมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ [9, 18] ความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ทำให้ *Bacillus* ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงและสามารถคงอยู่ในระบบได้นาน [17]

ผลการทดลองในระบบ SBR พบว่าการเสริม *B. cereus* ร่วมกับแบคทีเรียคอคคัส (G3) สามารถลดค่า SVI ได้ดีที่สุดและมีประสิทธิภาพการกำจัด TOC เทียบเท่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่าความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ที่สูงขึ้นช่วยให้ระบบมีเสถียรภาพและฟื้นตัวจากสภาวะวิกฤติได้ดีกว่า [18] การทำงานร่วมกัน (synergistic effect) ระหว่าง *Bacillus* ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ [19] และแบคทีเรียคอคคัสซึ่งอาจมีบทบาทในการสร้างโครงสร้างฟล็อค [18] อาจเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้กลุ่ม G3 มีประสิทธิภาพดีที่สุด ทั้งนี้ เนื่องจากการศึกษานี้มุ่งเน้นไปที่การระบุชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์เด่นเป็นหลัก ยังไม่ได้ทำการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่มคอคคัสในระดับโมเลกุล ซึ่งควรดำเนินการในอนาคต

อย่างไรก็ตาม กลุ่มที่เสริม *Bacillus* เพียงชนิดเดียว (G1) และกลุ่มที่เสริมคอคคัสเพียงชนิดเดียว (G2) มีประสิทธิภาพการกำจัด TOC ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นเพราะในช่วงแรกของการเติมเชื้อ เกิดการแข่งขันกันเองระหว่างจุลินทรีย์ในระบบ (competition) ทำให้ต้องใช้เวลาในการปรับตัว (lag phase) นานขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพโดยรวมลดลง [21] ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการเลือกใช้จุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกันมีความสำคัญมากกว่าการใช้จุลินทรีย์เดี่ยว

ประสิทธิภาพการกำจัด TN ที่ไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่มทดลอง แสดงให้เห็นว่าไนโตรเจนส่วนใหญ่ในระบบนี้น่าจะถูกกำจัดผ่านกระบวนการนำไปใช้สร้างเซลล์ (assimilation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่แบคทีเรียทั่วไปสามารถทำได้ [22] มากกว่ากระบวนการไนตริฟิเคชัน-ดีไนตริฟิเคชันที่ต้องการจุลินทรีย์เฉพาะทาง ข้อจำกัดของงานวิจัยนี้คือเป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ (lab-scale) ในระบบ Batch ซึ่งอาจไม่สามารถสะท้อนพฤติกรรมของระบบจริง (full-scale) ที่มีการไหลต่อเนื่องได้ทั้งหมด นอกจากนี้ ยังไม่ได้ทำการศึกษากลไกการแข่งขันระหว่าง *B. cereus* BTS1 กับแบคทีเรียเส้นใยในระดับโมเลกุล ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

ทั้งนี้ข้อจำกัดสำคัญในการนำ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ BTS1 ไปประยุกต์ใช้จริง คือประเด็นด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ (Biosafety) เนื่องจากเชื้อชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อโรคระดับที่ 2 ที่อาจก่อโรคในคนและสัตว์ได้ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561) ดังนั้น การนำไปใช้งานในระบบบำบัดน้ำเสียจริงจึงต้องอยู่ภายใต้การควบคุมที่เข้มงวดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมและผู้ปฏิบัติงาน โดยในอนาคตควรมีการต่อยอดเพื่อตรวจหาสายพันธุ์ย่อยที่ไม่ก่อสารพิษ (Non-toxigenic strain) หรือพิจารณาเลือกใช้สารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่ผลิตจากเชื้อแทนการเติมเชื้อชีวิตลงในระบบโดยตรง

6. สรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการคัดแยก *B. cereus* สายพันธุ์ BTS1 จากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม และทดสอบศักยภาพในการควบคุมปัญหาตะกอนบวมด้วยวิธีการเสริมชีวภาพ ผลการทดลองในระบบ SBR จำลองพบว่า:

1. สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ไม่เป็นเส้นใยจากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ประสบปัญหาตะกอนบวม และระบุชนิดด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA พบว่าคือ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ BTS1

2. การนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปเสริมในระบบ SBR จำลอง สามารถควบคุมปัญหาตะกอนบวมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยกลุ่มที่ G3 สามารถลดค่าดัชนีปริมาตรตะกอน (SVI) ได้ดีที่สุด เหลือเพียง 105 ± 12 มล./ก. ส่งผลให้ตกตะกอนได้ดีขึ้น

3. จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ พบว่ากลุ่ม G3 ให้ประสิทธิภาพการกำจัดคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมด (TOC) สูงสุดที่ 91.8% ซึ่งดีกว่าการเสริมแบบเชื้อเดี่ยว (G1และG2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ การเสริมจุลินทรีย์ทุกกลุ่มการทดลองไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อการกำจัดไนโตรเจนทั้งหมด (TN) ของระบบ

งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้จุลินทรีย์ประจำถิ่นแบบผสม (Mixed culture) มีศักยภาพสูงในการนำมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อชีวภาพเพื่อควบคุมตะกอนบวม ทั้งนี้ เนื่องจากการจัดระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของเชื้อ B. cereus (Biosafety Level 2) การนำผลวิจัยไปประยุกต์ใช้จริงในระดับอุตสาหกรรม จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้านการประเมินความเสี่ยงและสายพันธุ์ย่อยที่ไม่ก่อโรค เพื่อให้เกิดความปลอดภัยสูงสุดต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม

7. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษา Talent Ajinomoto Scholarship เพื่อใช้ในการดำเนินงานวิจัยชิ้นนี้ การสนับสนุนดังกล่าวมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งที่ช่วยให้งานวิจัยบรรลุวัตถุประสงค์และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ที่สนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

[1] Tchobanoglous, G., Stensel, H. D., Tsuchihashi, R., & Burton, F. (2014). *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery* (5th ed.). McGraw-Hill Education.

[2] Jenkins, D., Richard, M. G., & Daigger, G. T. (2004). *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and Other Solids Separation Problems* (3rd ed.). CRC Press.

[3] Martins, A. M. P., Pagilla, K., Heijnen, J. J., & van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Filamentous bulking sludge—a critical review. *Water Research*, 38(4), 793-817.

[4] Eikelboom, D. H. (2000). *Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation*. IWA Publishing.

[5] Guo, J., Peng, Y., Wang, S., Zheng, Y., Huang, H., & Ge, S. (2018). Bioaugmentation for filamentous sludge bulking control: A review. *Bioresource Technology*, 265, 554-564.

[6] Metcalf & Eddy, Inc. (2013). *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery* (5th ed.). McGraw-Hill.

[7] Herrero, M., & Stuckey, D. C. (2015). Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 140, 119-128.

[8] Guo, J., Wang, S., Lian, J., Ngo, H. H., Guo, W., Liu, Y., & Peng, Y. (2017). Rapid control of activated sludge bulking by a novel bioaugmentation strategy: Starvation and reactivation of *Sphaerotilus natans*. *Bioresource Technology*, 241, 722-729.

[9] Shchegolkova, N. M., Krasnov, G. S., Belova, A. A., Dmitriev, A. A., Kharitonov, S. L., Klimina, K. M., ... & Semenov, M. V. (2016). *Bacillus* species in activated sludge: diversity and potential role in wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(20), 8923-8936.

[10] van Limbergen, H., Top, E. M., & Verstraete, W. (1998). Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(1), 16-23.

[11] Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). *Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461-2470.

[12] Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). *MEGA12: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12 for adaptive and green computing. Molecular Biology and Evolution*, 41(12), msae263.

[13] Nopens, I., Capalozza, C., & Vanrolleghem, P. A. (2001). Stability analysis of a synthetic municipal wastewater. *Department of Applied Mathematics, Biometrics and Process Control*, University of Gent, Belgium.

[14] Wilén, B. M., & Balmér, P. (1999). The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research*, 33(2), 391-400.

[15] APHA, AWWA, & WEF. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd ed.). American Public Health Association.

[16] Zhang, T., Shao, M. F., & Ye, L. (2012). 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME Journal*, 6(6), 1137-1147.

[17] Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548-572.

[18] Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Duffy, J. E., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., & Jouseau, C. (2006). Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature*, 443(7114), 989-992.

[19] Priest, F. G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, 41(3), 711-753.

[20] Bossier, P., & Verstraete, W. (1996). Triggers for microbial aggregation in activated sludge? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1-2), 1-6.

[21] Thompson, I. P., van der Gast, C. J., Ciric, L., & Singer, A. C. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*, 7(7), 909-915.

[22] Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D. (2008). *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. IWA Publishing.