รายงานฉบับสมบูรณ์

การวิจัยและพัฒนาเซนเซอร์วัดค่าบีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์

Research and Development of Microbial-Based BOD Sensors

โดย

นายวีระศักดิ์ สุระเรืองชัย

นางพรพิมล ศรีทองคำ

นางสาวทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล

นางสาวศันสนลักษณ์ รัชฎาวงศ์

นายศมากร แพทยานนท์

นายวชิรา ชัยวรณ์

เสนอต่อ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รหัสโครงการ RDG45-3-0009

129052550

รายงานฉบับสมบูรณ์

การวิจัยและพัฒนาเซนเซอร์วัดค่าบีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์

Research and Development of Microbial-Based BOD Sensors

โดย

นายวีระศักดิ์ สุระเรืองชัย
นางพรพิมล ศรีทองคำ
นางสาวทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล
นางสาวศันสนลักษณ์ รัชฎาวงศ์
นายศมากร แพทยานนท์
นายวชิรา ชัยวรณ์

เสนอต่อ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รหัสโครงการ RDG45-3-0009

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RDG45-3-0009

โครงการ : การวิจัยและพัฒนาเซนเซอร์วัดค่าบีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์

นักวิจัย :

1. นายวีระศักดิ์ สุระเรืองชัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
2. นางพรพิมล ศรีทองคำ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
3. นางสาวทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
4. นางสาวศันสนลักษณ์ รัชดาวงศ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
5. นายศมากร แพทยานนท์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
6. นายวชิรา ชัยวรณ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

Email address : werasak.sur@kmutt.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 30 เดือน (1 มค.45 – 30 มิย. 47) ขยายเวลาถึง 28 กพ.48

วัตถุประสงค์ของโครงการ "การวิจัยและพัฒนาเซนเซอร์วัดค่าบีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์" คือเพื่อสร้างหัววัดจุลินทรีย์จากจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถใช้สารอินทรีย์ประเภทต่าง ๆได้กว้างขวาง หัววัดดังกล่าวถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณบีโอดีของตัวอย่างน้ำจากกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ในการทดลองส่วนแรกจุลินทรีย์ถูกแยกและคัดเลือกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากระบบบำบัดและดินจากแหล่งต่าง ๆ การทดสอบเบื้องต้นสามารถคัดแยกจุลินทรีย์เป้าหมาย 64 สายพันธุ์ จากนั้นทดสอบความสามารถในการใช้สารอินทรีย์ 4 กลุ่ม ได้แก่ น้ำตาล กรดอะมิโน แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ ซึ่งคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้สารอินทรีย์ได้ดีที่สุด 6 สายพันธุ์ และนำจุลินทรีย์ดังกล่าวไปใช้ในการสร้างหัววัดจุลินทรีย์

การศึกษาความสามารถในการใช้สารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ในเชิงเซนเซอร์ใช้สารละลายมาตรฐานบีโอดีเป็นโมเดลในการทดสอบ หัววัดจุลินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์สายพันธ์ *Bacillus sp.* 2 ชนิดมีสมบัติเชิงเซนเซอร์ที่เหมาะสมที่สุด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสหัววัดดังกล่าวตอบสนองต่อสารละลายบีโอดีอย่างเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 0.5 - 80 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี เวลาที่ใช้ในการตอบสนองประมาณ 7-16 นาทีต่อตัวอย่าง และใช้ตรวจวัดสารละลายบีโอดีได้อย่างต่อเนื่อง 60 ครั้ง นอกจากนี้ได้ทดสอบการใช้งานของหัววัดจุลินทรีย์กับตัวอย่างน้ำจากโรงงานผลไม้และน้ำผลไม้ เครื่องดื่ม และโรงงานผลิตสุราและเบียร์ ผลคือค่าบีโอดีที่ตรวจวัดได้จากหัววัดจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับการวัดโดยวิธี BOD_5

คำหลัก หัววัดจุลินทรีย์ ไบโอเซนเซอร์ บีโอดี

Abstract

Contract number: RDG4530009
Project: Research and Development of Microbial-Based BOD Sensors
Investigators:
1. Mr Werasak Surareungchai KMUTT
2. Mrs Pornpimol Sritongkham KMUTT
3. Ms Taweerat Vichitsoontornkul KMUTT
4. Ms Sansanaluk Rachchadawong KMUTT
5. Mr Smakon Baedyananda KMUTT
6. Mr Wachira Chaiyaworn KMUTT

Email address: werasak.sur@kmutt.ac.th
Duration of project: 30 months (Jan 1st, 2002- Jun 30th, 2004), extended to Feb 28th, 2005.

This research and development project relates to water quality analysis, and a particularly to a method and to sensing probe for determining biochemical oxygen demand (BOD) in aqueous liquids containing organic substances. The classical determination method for BOD requires 3-5 days, thereby, making it unsuitable for process control. The need for fast, portable and cost-effective methods for environmental monitoring has stimulated the production of a variety of field analytical tools such as biosensors. Biosensors are device that have several unique features such as compact size, simple to use, one step reagentless analysis, low cost and quick-real time results. A number of microbial BOD sensors have been developed internationally. The drawback is that they sometimes cannot be used for the local application. This may be due to the different in sample domains, or lack of storage stability caused by shipping and delivery from abroad.

In this project, local strains of microorganisms were screened and isolated from sewage treatment plant and soil. Six strains of microorganisms were selected as they performed the highest ability to utilize various organic substrates. To test the assimilation capability in sensor aspect, each selected microorganism was immobilized onto cellulose acetate membrane and the current response obtained from substrate assimilation was recorded. Sensors with the different strains were characterized in terms of linear range, sensitivity, detection time and operational stability. Microbial sensors based on two strains of Bacillus sp. showed good sensor characteristics. At 30°C, the sensors dynamic range was from 0.5 to 80 mg/l BOD when a glucose/glutamic acid BOD standard solution was used. Typical response times of the BOD sensors were in the range of 7-16 min. The sensors operational lifetime of 60 continuously assays was obtained. The microbial-based sensors were applied to untreated and treated wastewaters from canned fruits, brewery and beverages factory effluents. BOD values determined using these sensors correlated with those determined by the conventional 5-day BOD determination method.

Keywords: microbial sensors, biosensors, BOD

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
รายการตาราง	จ
รายการรูปประกอบ	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความเป็นมา	1
1.2 หลักการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์	2
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.4 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	5
1.5 ประโยชน์ที่จะได้รับ	6
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	7
2.1 วัสดุ	7
2.1.1 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	7
2.1.2 วัสดุตรึงเซลจุลินทรีย์	7
2.2 วิธีดำเนินการวิจัย	8
2.2.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์	8
2.2.2 การคัดแยกจุลินทรีย์	9
2.2.3 การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่คัดแยก	10
2.2.4 การตรึงเซลจุลินทรีย์และการประกอบหัววัดจุลินทรีย์	12
2.2.5 การวัดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า	13
2.2.6 การวัดตัวอย่างสารละลายบีโอดีมาตรฐานและตัวอย่างน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรม	14
3. ผลการวิจัย	15
3.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน น้ำ และน้ำเสีย	15
3.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารที่มีสารอาหารต่ำ	19
3.3 การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้สารอาหารต่าง ๆ	20
3.4 การตอบสนองต่อสารอาหารของจุลินทรีย์ในเชิงเซนเซอร์	22
3.4.1 การศึกษาปริมาณเซลจุลินทรีย์ที่เหมาะสม	22

3.4.2 การศึกษาความสามารถในการใช้สารอาหาร
ของจุลินทรีย์ 6 ไอโซเลทในเชิงเซนเซอร์ 23
3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตอบสนองของจุลินทรีย์ 28
3.5.1 ผลของพีเอช 28
3.5.2 ผลของอุณหภูมิ 31
3.6 การศึกษาสมบัติของเซนเซอร์ที่ใช้จุลินทรีย์ไอโซเลทต่าง ๆ
เป็นไบโอคะตะลิสต์ 34
3.7 การวัดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานอุตสาหกรรมด้วยหัววัดจุลินทรีย์ 44

4. บทสรุป 48
4.1 สรุปผลการศึกษา 48
4.2 โปรโตคอลการตรวจวัดบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์ 50

เอกสารอ้างอิง 52
ภาคผนวก 55
1. ผนวก 1 ผลการศึกษาปริมาณเซลที่เหมาะสม 55
2. ผนวก 2 ผลการวิเคราะห์ค่าบีโอดีของสารละลายบีโอดีมาตรฐาน
ด้วยวิธีมาตรฐาน APHA-BOD_5 เปรียบเทียบกับหัววัดจุลินทรีย์ 67
3. ผนวก 3 การทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบการวัดตัวอย่างระหว่าง
หัววัดจุลินทรีย์กับวิธีมาตรฐาน 68

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 3.1	จำนวนจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มที่คัดแยกได้	15
ตารางที่ 3.2	แสดงลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	16
ตารางที่ 3.3	สรุปจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้บนอาหารแข็งที่มีสารอาหารต่ำ	19
ตารางที่ 3.4	ปริมาณเซลที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์	23
ตารางที่ 3.5	สมบัติของหัววัดค่าบีโอดีที่ตรึงด้วยจุลินทรีย์ไอโซเลทต่าง ๆ	41
ตารางที่ 3.6	เปรียบเทียบหัววัดค่าบีโอดีที่ได้จากวิจัยได้กับรายงานอื่น ที่ใช้ระบบการวัดแบบกะ (batch measurement) และใช้สารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิคเป็นสารทดสอบ	43
ตารางที่ 3.7	ผลการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานอุตสาหกรรม โดยหัววัดจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับวิธี BOD_5	45
ตารางที่ ผ.1	ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อใช้สารอาหารต่าง ๆ เป็นแหล่งอาหาร	61
ตารางที่ ผ.2	ผลการวิเคราะห์ค่าบีโอดีของสารละลายบีโอดีมาตรฐาน (glucose-glutamic acid standard solution GGA solution) ด้วยวิธีมาตรฐาน APHA-BOD_5เปรียบเทียบกับ หัววัดจุลินทรีย์	67

รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1.1	กลไกการใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงบนผิวหน้าออกซิเจนอิเล็กโทรด	3
รูปที่ 2.1	การตรึงจุลินทรีย์บนออกซิเจนอิเล็กโทรด	13
รูปที่ 2.2	อุปกรณ์และระบบวัดทางเคมีไฟฟ้า	14
รูปที่ 3.1	กระแสและระยะเวลาการตอบสนองของจุลินทรีย์ ที่คัดเลือกต่อสารอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรท	25
รูปที่ 3.2	กระแสและระยะเวลาการตอบสนองของจุลินทรีย์ ที่คัดเลือกต่อสารอาหารในกลุ่มกรดอะมิโน	26
รูปที่ 3.3	กระแสและระยะเวลาการตอบสนองของจุลินทรีย์ ที่คัดเลือกต่อสารอาหารในกลุ่มแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์	27
รูปที่ 3.4	การตอบสนองของ *Pseudomonas* spp.P_8 และEnteric bacteria E_9 ที่พีเอชต่างๆ	29
รูปที่ 3.5	การตอบสนองของ *Bacillus* sp.B_6 และUnidentified bacteria UN_{10}ที่พีเอชต่างๆ	30
รูปที่ 3.6	การตอบสนองของ *Pseudomonas* spp.P_8 และEnteric bacteria E_9 ที่อุณหภูมิต่างๆ	32
รูปที่ 3.7	การตอบสนองของ *Bacillus* sp.B_6 และUnidentified bacteria UN_{10}ที่อุณหภูมิต่างๆ	33
รูปที่ 3.8	กราฟมาตรฐานของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย *Bacillus* sp.B_6 เมื่อทดสอบด้วยสารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิค	35
รูปที่ 3.9	กราฟมาตรฐานของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย Enteric bacteria E_9 เมื่อทดสอบด้วยสารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิค	36
รูปที่ 3.10	กราฟมาตรฐานของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย *Pseudomonas* spp.P_8 เมื่อทดสอบด้วยสารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิค	37
รูปที่ 3.11	กราฟมาตรฐานของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย Unidentified bacteria UN_{10} เมื่อทดสอบด้วยสารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิค	38
รูปที่ 3.12	กระแสของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย *Bacillus* sp.B_6 และ Enteric bacteria E_9ที่ระยะเวลาการใช้งานต่างๆ	39
รูปที่ 3.13	กระแสของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย *Pseudomonas* spp.P_8 ที่ระยะเวลาการใช้งานต่างๆ	40
รูปที่ ผ.1	ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซล *Pseudomonas* sp. รหัส P_8 ที่ปริมาณ 1×10^5 ถึง 1×10^9 เซลต่อตารางเซนติเมตร	55

รูปที่ ผ.2	ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซล *Bacillus* sp. รหัส B_6 ที่ปริมาณ 1×10^5 ถึง 5×10^8 เซลต่อตารางเซนติเมตร	56
รูปที่ ผ.3	ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซล Unidentified bacteria รหัส UN_{10} ที่ปริมาณ 1×10^5 ถึง 5×10^8 เซลต่อตารางเซนติเมตร	57
รูปที่ ผ.4	ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซล Unidentified bacteria รหัส UN_{11} ที่ปริมาณ 1×10^5 ถึง 5×10^9 เซลต่อตารางเซนติเมตร	58
รูปที่ ผ.5	ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซล Enteric bacteria รหัส E_9 ที่ปริมาณ 1×10^5 ถึง 1×10^9 เซลต่อตารางเซนติเมตร	59
รูปที่ ผ.6	ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้ปริมาณเซลของ Yeast รหัส Y_1 ที่ปริมาณ 1×10^5 ถึง 1×10^9 เซลต่อตารางเซนติเมตร	60

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา

บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) คือปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ และใช้เป็นพารามิเตอร์บ่งบอกคุณภาพน้ำที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย วิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีที่กำหนดโดย American Public Health Association (APHA) [1] คือการตรวจวัดค่า BOD_5 หรือการวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้โดยจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำในระยะเวลา 5 วัน การวิเคราะห์ทำโดยวัดปริมาณออกซิเจนเริ่มต้น (DO_0) แล้วบ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จึงนำตัวอย่างน้ำมาตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่เหลือ (DO_5) ปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในระยะเวลาดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำ แม้ BOD_5 จะเป็นวิธีตรวจวัดคุณภาพน้ำที่ยอมรับกันโดยทั่วไป แต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัด ได้แก่ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดค่อนข้างนาน ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลเสียในกรณีของโรงงานอุตสาหกรรมขนาดใหญ่หรือชุมชนที่มีประชากรหนาแน่นที่ต้องมีระบบบำบัดน้ำก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำสาธารณะ หากระบบเกิดปัญหาใดๆขึ้น จะทำให้ไม่สามารถแก้ไขได้ทันเวลา นอกจากนี้วิธี BOD_5 ต้องการผู้ชำนาญการในการวิเคราะห์จึงจะให้ผลซ้ำที่ถูกต้องแม่นยำ ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาเครื่องมือและวิธีการที่จะทำให้การตรวจวัดปริมาณบีโอดีเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว และยังคงมีความถูกต้องแม่นยำ

บีโอดีเซนเซอร์หรือหัววัดจุลินทรีย์สำหรับตรวจวัดปริมาณบีโอดี มีการพัฒนาขึ้นเพื่อทดแทนวิธีการวิเคราะห์บีโอดีแบบดั้งเดิม โดยอาศัยหลักการไบโอเซนเซอร์ กล่าวคือเป็นการนำสารทางชีวภาพเช่น เอนไซม์ จุลินทรีย์ รีเซบเตอร์ หรือแอนติบอดี้ ควบคู่กับอุปกรณ์ทางไฟฟ้าอิเล็กทรอนิกส์ที่เรียกว่า "ทรานส์ดิวเซอร์ (transducer)" ซึ่งอุปกรณ์เหล่านี้สามารถตรวจจับสัญญาณหรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมี / ชีวเคมีระหว่างสารทางชีวภาพกับสารที่ต้องการตรวจวัด สัญญาณหรือการเปลี่ยนแปลงจะอยู่ในรูปแบบที่วัดขนาดได้เช่น กระแสไฟฟ้า แรงเคลื่อนไฟฟ้า ความถี่ ความเข้มแสง เป็นต้น ขนาดสัญญาณที่ตรวจจับได้มีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารที่ต้องการตรวจวัด

ในกรณีของการตรวจวัดปริมาณบีโอดี สารทางชีวภาพจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดี ซึ่งอาจเป็นจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือกลุ่มของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีการใช้แอคติเวตเตดสลัดจ์ที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสีย และนำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาตรึงที่ผิวหน้าออกซิเจนอิเล็กโทรดที่ทำหน้าที่เป็นทรานส์ดิวเซอร์ เมื่อจุลินทรีย์ใช้สารอินทรีย์ที่มีในน้ำ จะมีการใช้ออกซิเจนปริมาณหนึ่งไปพร้อมกัน ปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงหรือแตกต่างก่อนและหลังการใช้สารอินทรีย์ จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำ ปริมาณออกซิเจนตั้งต้นและที่เหลือหลังจากถูกใช้ถูกตรวจจับได้โดยออกซิเจนอิเล็กโทรด (หลักการตรวจวัดจะได้กล่าวถึงในหัวข้อ 1.2) บีโอดีเซนเซอร์ที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาจากกลุ่มนักวิจัยต่างๆสามารถลดเวลาในการวิเคราะห์จาก 5 วันโดยวิธี BOD_5 เหลือเพียงประมาณ 10-60 นาที เซนเซอร์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารอินทรีย์ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ที่เลือกใช้ รวมทั้งวิธีการสร้างไบโอเซนเซอร์ และการตรึงเซลจุลินทรีย์มีผลต่อการตอบสนองและความไวต่อสารอินทรีย์ของบีโอดีเซนเซอร์เช่นกัน

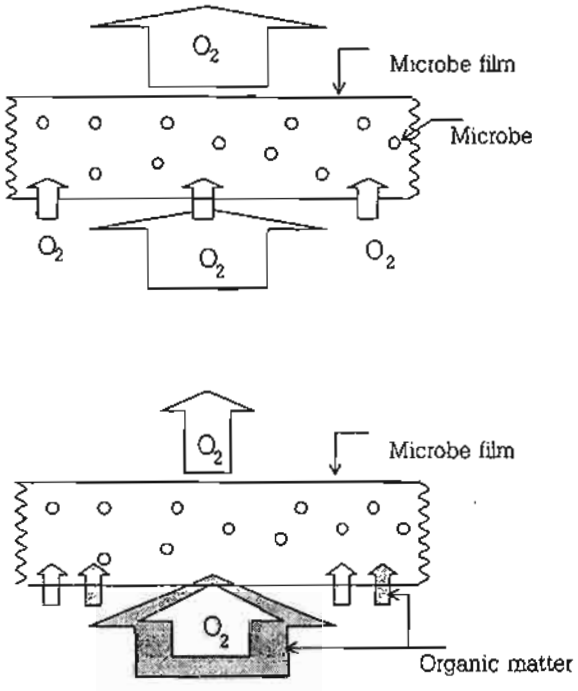
ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์ออกจำหน่ายในเชิงพาณิชย์หลายรูปแบบ เครื่องวัดปริมาณบีโอดีทางการค้าชนิดแรกผลิตขึ้นในปี ค.ศ.1983 โดยบริษัท Nissin Denki ประเทศญี่ปุ่น หัววัดจุลินทรีย์สร้างขึ้นโดยใช้เซล *Trichosporon cutaneum* นอกจากนี้ได้แก่เครื่องมือจาก Pruefgeraete-Werk Medingen GmbH ที่ใช้จุลินทรีย์ *T. cutaneum* เช่นเดียวกัน และเครื่อง ARAS โดยบริษัท DR.Lange GmbH ประเทศเยอรมันนี ใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Issatchenkia orientalis* และ *Rhodococcus* เครื่องมือเหล่านี้สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีโดยให้ผลที่ใกล้เคียงกับการวัดโดยวิธี BOD_5 เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ประมาณ 1-30 นาที

แม้จะมีรายงานว่าเครื่องมือวิเคราะห์บีโอดีข้างต้นให้ผลการตรวจวัดเป็นที่น่าพอใจ แต่ด้วยราคาที่ค่อนข้างสูง โรงงานอุตสาหกรรมหรือหน่วยงานใดที่มีทุนดำเนินการต่ำไม่สามารถจัดซื้อมาใช้งานได้ จึงทำให้การใช้งานจำกัดอยู่ในวงแคบ นอกจากนี้ผู้ใช้อาจประสบปัญหาเกี่ยวกับอายุการใช้งานของหัววัดจุลินทรีย์ซึ่งสร้างจากการตรึงเซลในเมมเบรน โดยทั่วไปอายุของหัววัดจะอยู่ในระหว่าง 3-5 เดือน แต่เนื่องจากหัววัดจุลินทรีย์ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ระยะเวลาของการขนส่งอาจทำให้อายุการใช้งานสั้นลง ปัญหาอีกประการหนึ่งได้แก่สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาสร้างหัววัดอาจไม่เหมาะกับชนิดของน้ำทิ้งและสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย การตรวจวัดปริมาณบีโอดีจึงอาจผิดพลาดไปได้

ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์ขึ้นภายในประเทศ จะเป็นแนวทางสำคัญที่สามารถลดข้อจำกัดต่างๆข้างต้นลงได้ การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งน้ำหรือดินในประเทศไทยนับเป็นปัจจัยหลักที่ส่งเสริมให้หัววัดจุลินทรีย์มีความสามารถในการตอบสนองต่อสารอาหารชนิดต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมเกษตร เช่น อาหารและเครื่องดื่มได้อย่างว่องไวและถูกต้อง ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีจึงสูงขึ้น ในขณะที่ต้นทุนของการวิเคราะห์ต่ำลง

1.2 หลักการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์

จุดประสงค์ของการพัฒนาบีโอดีเซนเซอร์คือเพิ่มความสะดวกและลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ โดยที่ยังคงความถูกต้องแม่นยำ บีโอดีเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1977 จนถึงปัจจุบันส่วนใหญ่อาศัยหลักการวัดแบบแอมเพอโรเมตรี (amperometry) ซึ่งเป็นการวัดการไหลของอิเล็กตรอนหรือกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพกับสับสเตรทหรือสารตัวอย่างเป็นสัญญาณชี้นำ กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนระหว่างปฏิกิริยาที่ผิวหน้าเซนเซอร์กับอิเล็กโทรด ทรานส์ดิวเซอร์หรืออิเล็กโทรดที่ใช้ในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์วัดปริมาณบีโอดีส่วนใหญ่คือออกซิเจนอิเล็กโทรด ส่วนสารชีวภาพคือเซลจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ จุลินทรีย์จะถูกควบคู่กับออกซิเจนอิเล็กโทรดด้วยการตรึงเซลบนวัสดุพาหะซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่เยื่อแผ่นสังเคราะห์ หรือเมมเบรน (membrane) ตัวอย่างของเมมเบรนได้แก่ โพลีคาร์บอเนต เซลลูโลสอะซิเตท และไดอะไลซิสเมมเบรน เป็นต้น การตรึงเซลจุลินทรีย์บนเมมเบรนดังกล่าวมีหลายวิธี วิธีที่ง่ายที่สุดได้แก่การกรองเซลที่แขวนลอยในสารละลายผ่านชั้นเมมเบรน โดยที่เซลจุลินทรีย์จะถูกกักไว้ภายในรูพรุนของเมมเบรนนั้นๆ นอกจากนี้อาจใช้วิธีกักเซลไว้ในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ แล้วสร้างชั้นของพอลิเมอร์ดังกล่าวบนเมมเบรน ขั้นตอนสุดท้ายคือประกอบเมมเบรนที่มีเซลจุลินทรีย์กับออกซิเจนอิเล็กโทรด



รูปที่ 1.1 กลไกการใช้ออกซิเจนโดยจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงบนผิวหน้าออกซิเจนอิเล็กโทรด

การวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีโดยไบโอเซนเซอร์จะใช้หลักการตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้โดยจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงบนผิวหน้าออกซิเจนอิเล็กโทรด กลไกดังกล่าวแสดงดังรูปที่ 1.1 โดยเริ่มต้นปริมาณออกซิเจนในสารละลายมีค่าคงที่ จากนั้นเมื่อมีการเติมสารอินทรีย์สู่ระบบ ปริมาณออกซิเจนจะลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสารตัวอย่าง ดังนั้นความแตกต่างของปริมาณออกซิเจนก่อนและหลังการย่อยสลายสารอินทรีย์จึงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารอินทรีย์ในตัวอย่าง ด้วยหลักการนี้จึงมีการพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณบีโอดีโดยใช้จุลินทรีย์หลากหลายชนิด รายละเอียดของงานวิจัยต่าง ๆที่เกี่ยวข้องจะได้กล่าวถึงในหัวข้อ 1.3

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจวัดปริมาณบีโอดีอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพได้ถูกพัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Karube และคณะ [2] จากนั้นเป็นต้นมาได้มีกลุ่มวิจัยอื่น ๆเป็นจำนวนมากทำการวิจัยและพัฒนาหัววัดจุลินทรีย์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีโดยใช้จุลินทรีย์หลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น *Trichosporon cutaneum* [2-8], *Bacillus subtilis* [9-10], *Clostidium butyricum* [11], *Hansenula anomala* [12], *Torulopsis candida* [13], *Arxula adeninivorans* [14], *Klebsiella oxytoca* [15], *Serratia mercescens* [16] และ *Pseudomonas putida* [17-18] เป็นต้น โดยทั่วไปการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้สร้างหัววัดจุลินทรีย์หรือไบโอเซนเซอร์จะใช้เฉพาะเชื้อที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทชนิดต่าง ๆต่ำ และมีกิจกรรมในการออกซิไดส์ (oxidative activity) หรือความสามารถในการใช้สารอินทรีย์ประเภทต่าง ๆได้มากชนิด ลักษณะสมบัติเช่นนี้มีผลดีต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งมีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์หลากหลายทั้งชนิดและปริมาณ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติจากรายงานของกลุ่มวิจัยข้างต้น พบว่าหัววัดจุลินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวไม่สามารถตอบสนองต่อสารอินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง

เพื่อลดปัญหาดังกล่าวและเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของหัววัดจุลินทรีย์ จึงมีการนำเอาจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิด มาใช้ร่วมกันเพื่อสร้างหัววัด ตัวอย่างเช่น การใช้จุลินทรีย์ผสมในกลุ่มแบคทีเรีย *Bacilli* [19-22] หรือจุลินทรีย์กลุ่ม *Citrobacter* sp. กับ *Enterobacter* sp. [23] หรือการใช้ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* ร่วมกับแบคทีเรีย *Rhodococcus erythropolis* [24] ผลคือมีการตอบสนองต่อสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆได้กว้างขึ้น และช่วยให้ความไวในการตอบสนองสูงขึ้นกว่าการใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้มีรายงานการพัฒนาหัววัดจุลินทรีย์สำหรับวัดปริมาณบีโอดีโดยใช้ activated sludge [25] ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด หัววัดดังกล่าวให้ผลทำนองเดียวกับการใช้จุลินทรีย์ pure culture มากกว่า 1 ชนิด อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการใช้จุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิดทำให้สมบัติของไบโอเซนเซอร์เปลี่ยนแปลงไปภายหลังการใช้งานในระยะหนึ่ง มีผลให้ข้อมูลที่ได้ไม่คงที่ (non-reproducible) และขาดความถูกต้อง ต่อมา Tan และคณะ ได้ทดลองใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis 7B* ในอัตราส่วนเท่ากัน และใช้เซลแบคทีเรียทั้งสองชนิดในปริมาณสูงสุดที่สามารถตรึงลงบนเมมเบรนได้ [19-22] ผลคือหัววัดจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความว่องไวและมีอายุการใช้งานสูง นอกจากนี้ยังตอบสนองต่อสารอินทรีย์ประเภทต่าง ๆได้หลากหลายชนิด ส่วนงานวิจัยของกลุ่มวิจัยไบโอเซนเซอร์ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ *Trichosporon cutaneum* และ *Bacillus licheniformis* สำหรับสร้างบีโอดีเซนเซอร์ เซนเซอร์ที่พัฒนามีความไวสูง ตอบสนองต่อสารละลายบีโอดีมาตรฐานอย่างเชิงเส้นที่ปริมาณบีโอดีสูง อย่างไรก็ตามเซนเซอร์ดังกล่าวมีปัญหาเกี่ยวกับความคงตัวที่ไม่สูงนัก [26]

ปัจจุบันมีการผลิตบีโอดีเซนเซอร์เชิงพาณิชย์โดย Cole-Palmer ส่วนของไบโอฟิล์ม "BIOSEED" ใช้เซลจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนจนเซลไม่มีชีวิต แต่ยังคงมีกิจกรรมจากเอนไซม์เหลืออยู่ ด้วยวิธีการนี้บีโอดีเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นจะมีความไวในระดับเดียวกับไบโอเซนเซอร์ที่สร้างจากเซลจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แต่เป็นเซลที่มีชีวิต และใช้ปริมาณเซลล์เท่ากัน ไบโอเซนเซอร์นี้ให้สัญญาณการตอบสนองสูงกว่า และมีอายุการเก็บยาวนานกว่า แต่การตอบสนองจะใช้เวลาสูงกว่า และเวลาที่ใช้ในการกลับสู่กระแสพื้นหลัง (background current) หรือกระแสตั้งต้นจะสูงกว่าเช่นกัน

นอกเหนือจากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถตอบสนองต่อสารอินทรีย์ได้อย่างรวดเร็วและหลากหลายชนิดแล้ว ยังมีรายงานการวิจัยอีกส่วนหนึ่งที่กล่าวถึงการปรับปรุงประสิทธิภาพของบีโอดีไบโอเซนเซอร์ให้สูงขึ้นโดยเฉพาะในส่วนของระบบวัด ในการวัดแบบกะ (batch measurement) ค่ากระแสที่อ่านได้และบันทึกผล ได้จาก steady-state current สารตัวอย่างจะถูกเติมลงไปในระบบวัดที่มีสารละลายบัฟเฟอร์หลังจากกระแสพื้นหลัง มีค่าคงที่ สารตัวอย่างที่เติมลงไปในระบบวัดจะถูกใช้โดยจุลินทรีย์ที่ถูกตรึง พร้อมกันนั้นออกซิเจนในสารละลายจะถูกใช้ไปในขณะเดียวกัน ปริมาณออกซิเจนซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้การวัดค่าบีโอดีมีค่าลดลง กระแสรีดักชันที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนจึงลดลง ความแตกต่างของกระแสพื้นหลังกับกระแสภายหลังการเติมสารตัวอย่างจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณบีโอดีในสารตัวอย่าง เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยทั่วไปประมาณ 20 นาที ซึ่งค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงมีการวัดอีกประเภทหนึ่งคือ "dynamic transient method" วิธีนี้วัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของกระแสต่อเวลาแทนการตรวจวัดกระแสที่ลดลง อัตราการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณบีโอดีเช่นเดียวกับการลดลงของกระแส [9,20] วิธี dynamic transient ใช้เวลาในการตรวจวัดค่อนข้างสั้น คือประมาณ 15-30 วินาที แต่ในทางปฏิบัติอาจทำได้ไม่ง่ายนัก

นอกจากระบบวัดแบบกะ สามารถใช้ระบบวัดแบบ "flow injection" เพื่อประยุกต์ใช้กับไบโอเซนเซอร์วิเคราะห์ปริมาณบีโอดี วิธีการนี้จัดเป็นการวัดจลศาสตร์ของเซนเซอร์ (kinetic measurement mode)

ประเภทหนึ่ง มีข้อดีที่ใช้ได้สะดวกและรวดเร็ว วัดตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างต่อเนื่อง โดยใช้ระบบพาสารละลายที่ประกอบด้วยท่อขนาดเล็กและปั๊มพ์ที่มีประสิทธิภาพ

เนื่องจากหัววัดจุลินทรีย์อาศัยหลักการการตรวจวัดอัตราการหายใจของจุลินทรีย์ที่ถูกตรึง ซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ ดังนั้นสัญญาณที่เกิดขึ้นจากเซนเซอร์จึงมีหลายพารามิเตอร์เข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช และปริมาณของสารอินทรีย์ นอกจากนี้ยังอาจมีพารามิเตอร์อื่นๆ เช่น ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่างน้ำ เช่น ไอออนของโลหะหนักชนิดต่างๆ ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ มีรายงานว่าการใช้ฟิล์มบาง poly(4-vinyl pyridine) คลุมผิวหน้าหัววัดจุลินทรีย์จะช่วยป้องกันไม่ให้ไอออนโลหะหนักผ่านเข้าไปยังชั้นจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงได้ [20] นอกจากนี้จุลินทรีย์บางประเภทเช่น *Serratia marcescens LSY4* สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีความทนทานต่อความเป็นพิษของไอออนโลหะหนัก โดยเฉพาะสังกะสีได้

เป็นที่ทราบว่าเวลาในการตอบสนอง ระยะเวลาในการกลับสู่จุดหรือกระแสตั้งต้น และความคงตัวของบีโอดีเซนเซอร์ขึ้นกับชนิดของวัสดุและวิธีการตรึงเซลจุลินทรีย์ การตรึงเซลทำได้หลายวิธี เช่น การกักเซลในเนทเวอร์คของพอลิเมอร์ การกักเซลบนเมมเบรนหรือในรูพรุนของเมมเบรน วิธีการนี้ทำได้ค่อนข้างง่ายและเหมาะสมกับไบโอเซนเซอร์ที่ใช้เซลจุลินทรีย์เป็นไบโอคะตะลิสต์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้สารเคมีใดๆที่อาจเป็นพิษต่อเซล ดังนั้นวิธีการดังกล่าวจึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย บางกลุ่มวิจัยจะมุ่งเน้นการศึกษาวิธีการตรึงเซลอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เซนเซอร์มีอัตราการตอบสนองต่อสารอินทรีย์ประเภทต่างๆได้อย่างรวดเร็ว [4,6,9] นอกจากนี้ยังอาจใช้วิธีการบางอย่างในการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมต่อการวัดมากขึ้น เช่น การใช้ก๊าซโอโซนกับตัวอย่างเพื่อย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์บางส่วนที่อยู่ในน้ำให้มีขนาดเล็กลง เพื่อที่จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงบนหัววัดจะได้ย่อยสลายได้ดีขึ้น ด้วยวิธีการนี้ทำให้ระยะเวลาในการตรวจวัดบีโอดีสั้นลง [18]

1.4 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมต่อการสร้างหัววัดจุลินทรีย์สำหรับตรวจวัดปริมาณบีโอดี
2) เพื่อสร้างหัววัดจุลินทรีย์จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือก และศึกษาสมบัติของไบโอเซนเซอร์ดังกล่าว
3) เพื่อทดสอบการใช้งานหัววัดจุลินทรีย์กับน้ำทิ้งจากกระบวนการของโรงงานผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่มทั่วไป และเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์
4) เพื่อจัดทำโปรโตคอลสำหรับการวัดปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์

1.5 ประโยชน์ที่จะได้รับ

ได้วิธีการและหัววัดจุลินทรีย์ต้นแบบสำหรับวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้และน้ำผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่ม และเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ โดยหัววัดต้นแบบดังกล่าวสามารถนำไปใช้ร่วมกับเครื่องมือและระบบวัดแบบกึ่งอัตโนมัติ ซึ่งจะพัฒนาต่อไปในงานวิจัยระยะที่ 2 องค์ความรู้และเทคโนโลยีที่พัฒนาจะถ่ายทอดไปยังผู้ผลิต นำไปสู่การผลิตเชิงการค้าที่สามารถนำผลิตภัณฑ์เข้าสู่ตลาด และเกิดการใช้งานทั้งจากภาคเอกชนที่เป็นผู้ประกอบการอุตสาหกรรม ตลอดจนภาครัฐซึ่งทำหน้าที่เป็นผู้ตรวจสอบและวางนโยบายสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุ

2.1.1 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium dihydrogen phosphate), ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate), โซเดียมไนเตรต (sodium nitrate), แมกเนเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate), โปแตสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride), แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride), เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulphate) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) จากบริษัท Merck, เยอรมันนี

กรดไนโตรฮิวมิก (nitrohumic acid), กัมอะราบิก (gum arabic), โซเดียมลิกนินซัลโฟเนต (sodium ligninsulfonate), กรดแทนนิก (tannic acid), โซเดียมโดเดคิลเบนซีนซัลโฟเนต (sodium dodecylbenzene sulfonate, LAS), ยีสต์สกัด (yeast extract), คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate), ซิงก์ซัลเฟต (zinc sulfate), แมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate), กรดบอริก (boric acid), โมลิบดินัมออกไซด์ (molibdinum oxide) ทริสไฮดรอกซีเมทธิลอะมิโนมีเธน (Tris(hydroxymethyl) aminomethane), โซเดียมอะซีเตต (sodium acetate)จากบริษัท Sigma Chemicals สหรัฐอเมริกา

น้ำตาลกลูโคส (glucose), ฟรัคโตส (fructose), มอลโตส (maltose), แลคโตส (lactose), แมนโนส (mannose), ไซโลส (xylose), ซูโครส (sucrose), แป้ง (starch) จากบริษัท Merck, เยอรมันนี

กรดกลูตามิก (glutamic acid), ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine), เซรีน (serine), ซีสเทอีน (cysteine), อาร์จีนีน (arginine), กรดแอสพาติก (aspartic acid), ไกลซีน (glycine), ฮิสติดีน (histidine), เมทไธโอนีน (methionine), ไลซีน (lysine) จากบริษัท Merck, เยอรมันนี

กรดซัคซินิก (succinic acid), กรดซิตริก (citric acid), กรดอะซิติก (acetic acid), กรดแลกติก (lactic acid), กรดมาลิก (malic acid) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) จากบริษัท Merck, เยอรมันนี

เมทธานอล (methanol), เอทธานอล (ethanol), 2-โพรพานอล (2-propanol), บิวทานอล (butanol), กลีเซอรอล (glycerol), แมนนิทอล (mannitol), ซอร์บิทอล (sorbitol) จากบริษัท Merck, เยอรมันนี

2.1.2 วัสดุครึ่งเซลจุลินทรีย์

- เยื่อแผ่นเซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate membrane) ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.19 มิลลิเมตร บริษัท Sartorius, Germany
- เยื่อแผ่นโพลีเตตตระฟลูออโรเอทธิลลีน (tetrafluoroethylene, PTFE) ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3 เซ็นติเมตร บริษัท Sartorius, Germany
- ท่อเทฟล่อนกลวง เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.02 มิลลิเมตร

2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.2.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์

ดำเนินการเก็บตัวอย่างสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ดินและน้ำเสียดังต่อไปนี้

แหล่งน้ำธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำเจ้าพระยา 1 ตัวอย่าง สารอาหารส่วนใหญ่ที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติจะเป็นพวกคาร์บอนอินทรีย์ (organic carbons) ได้แก่โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) เช่นเซลลูโลส ลิกนิน ซึ่งได้จากพืช นอกจากนี้อาจพบสารอินทรีย์อื่นๆเช่น กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และกรดอินทรีย์ อย่างไรก็ตามสารอาหารเหล่านี้มีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่มีในดิน ซึ่งอาจต่ำมากถึง 1 มิลลิกรัมคาร์บอนต่อลิตร [27] ดังนั้นจุลินทรีย์ที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติจึงสามารถใช้คาร์บอนอินทรีย์ในปริมาณต่ำมากได้ นอกจากนี้ยังใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์เช่น ไนเตรตและแอมโมเนียมได้เช่นกัน

ดิน

เก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 16 ตัวอย่าง จากแหล่งต่อไปนี้

1. ดินจากไร่อ้อย	S_1
2. ดินจากนาข้าว จังหวัดราชบุรี	S_2
3. ดินจากป่า จังหวัดแม่ฮ่องสอน	S_3
4. ดินจากสวนยางพารา จังหวัดระยอง	S_4
5. ดินจากนาสวนมะพร้าว จังหวัดราชบุรี	S_5
6. ดินจากไร่สับปะรด	S_6
7. ดินจากสวนมังคุด	S_7
8. ดินจากบางปู	S_8
9. ดินริมคลอง	S_9
10. ดินเชิงเขา	S_{10}
11. ดินจากป่าสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ บริเวณกาดผี จังหวัดเชียงใหม่ (บริเวณไม่มีต้นไม้)	S_{11}
12. ดินจากป่าสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ บริเวณกาดผี จังหวัดเชียงใหม่ (บริเวณไม่มีต้นไม้)	S_{12}
13. ดินจากป่าอุทยานแห่งชาตินาแห้ว อำเภอนาแห้ว จังหวัดเลย	S_{13}
14. ดินจากป่าอุทยานแห่งชาตินาแห้ว อำเภอนาแห้ว จังหวัดเลย (บริเวณที่ถูกไฟไหม้)	S_{14}
15. ดินจากป่าสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ บริเวณสันพันสี่ จังหวัดเชียงใหม่	S_{15}
16. ดินจากป่าสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ บริเวณสันพันสี่ จังหวัดเชียงใหม่ (บริเวณที่ถูกไฟไหม้)	S_{16}

ดินเป็นที่อาศัยของจุลินทรีย์หลายชนิด ที่มีค่อนข้างมากชนิดได้แก่แบคทีเรียและรา ในดินมี สารอาหารหลายชนิดทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ ปริมาณของสารแต่ละชนิดขึ้นกับชนิดของดิน เช่นดินที่มีลักษณะ

oligotrophic environment เหมาะกับจุลินทรีย์ประเภท oligotroph และ facultative oligotroph หรือ obligate oligotroph แต่ไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลอิสระ (free cell) ดังนั้นการคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินชนิดนี้จะมีโอกาสได้จุลินทรีย์ที่เจริญได้บนอาหารที่มีสารอาหารต่ำ [28] เป็นต้น แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในดินได้แก่กลุ่ม *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., Actinomycete และ *Agrobacterium* sp. เป็นต้น

<u>*น้ำเสีย*</u>

เก็บตัวอย่างน้ำเสียทั้งหมด 8 ตัวอย่างดังนี้

1. โรงงานอายิโนะโมะโต๊ะ จังหวัดสมุทรปราการ (จาก activated sludge)	W_1
2. โรงงานอายิโนะโมะโต๊ะ จังหวัดสมุทรปราการ (จากบ่อตกตะกอน)	W_2
3. โรงงานไทยน้ำทิพย์ จังหวัดปทุมธานี	W_3
4. โรงงานเสริมสุข จังหวัดปทุมธานี (จาก activated sludge)	W_4
5. โรงงานเสริมสุข จังหวัดปทุมธานี (จากบ่อตกตะกอน)	W_5
6. โรงงานเสริมสุข จังหวัดปทุมธานี (จากน้ำที่ปล่อยออก)	W_6
7. โรงงานมาลีสามพราน (จาก activated sludge)	W_7
8. โรงงานมาลีสามพราน (จากบ่อพักตะกอน)	W_8

น้ำเสียประกอบด้วยสารอาหารทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ ปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับปัจจัยหลายประการเช่น ชนิดของวัตถุดิบ หรือกระบวนการผลิต เป็นต้น ในน้ำเสียแต่ละชนิดมีชนิดและจำนวนจุลินทรีย์แตกต่าง ที่พบส่วนใหญ่ได้แก่จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, Enteric bacteria และ *Clostridium* เป็นต้น จากตัวอย่างข้างต้นจะเห็นได้ว่าตัวอย่างเกือบทั้งหมดได้จากระบบบำบัดน้ำที่มีการให้อากาศอย่างสม่ำเสมอจากโรงงานเครื่องดื่มและผลไม้กระป๋อง ดังนั้นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ควรเป็นกลุ่ม aerobic bacteria ที่เจริญและย่อยสลายสารอาหารต่าง ๆในน้ำเสียดังกล่าวได้ดี

2.2.2 การคัดแยกจุลินทรีย์

2.2.2.1 ประเภทของจุลินทรีย์ที่คัดแยก

กลุ่มจุลินทรีย์ที่จะคัดแยกเพื่อใช้สร้างหัววัดจุลินทรีย์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีมี 4 กลุ่มได้แก่

1) *Pseudomonas* sp.
2) *Bacillus* sp.
3) Enteric bacteria
4) yeast และ acid tolerant bacteria

จุลินทรีย์ 4 กลุ่มข้างต้นพบได้ในธรรมชาติและน้ำเสียทั่วไป และมีรายงานว่าสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นบีโอดีเซนเซอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การคัดแยกใช้วิธีของ Holt และ Krieg ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1) <u>กลุ่ม *Peudomonas* sp.</u>

เนื่องจาก *Peudomonas* sp. สามารถใช้อาหารที่มีไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้เกลือของกรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ขั้นตอนการคัดแยกจึงเริ่มด้วยการเพิ่มจำนวนด้วยการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีส่วนประกอบของไนเตรตกับกรดอินทรีย์ โดยใช้ succinate salt medium ซึ่งประกอบด้วย

sodium succinate, KNO_3, K_2HPO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$ และ $FeSO_4$ ในสภาวะที่มีอากาศจำกัด แล้วยืนยันผลอีกครั้งด้วยการเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มี cetrimide เป็นองค์ประกอบทำการคัดเลือกโคโลนีของแบคที่เรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะต่างกัน

2) <u>กลุ่ม *Bacillus* sp.</u>

แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้าง endospore และใช้สารอาหารได้อย่างกว้างขวาง การคัดแยกจึงทำโดยใช้สมบัติการทนความร้อนของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อแยกแบคทีเรียกลุ่ม mesophilic spore forming ออกจาก vegetative cell แบคทีเรียที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วเจริญได้บนอาหารแข็งจะเป็นแบคทีเรียทนความร้อนเนื่องจากมีการสร้างสปอร์

ขั้นตอนของการคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. ใช้หลักการข้างต้นคือ นำตัวอย่างดินหรือน้ำเสียมาให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง nutrient agar ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างออกจากกัน

3) <u>กลุ่ม Enteric bacteria</u>

แบคทีเรียประเภทนี้มีการดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph สามารถสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส คาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ และแอลกอฮอล์ได้ การคัดเลือกใช้ selective medium ได้แก่ violet red bile agar ซึ่งมีองค์ประกอบของ bile salt และ crystal violet ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ และมี methyl red เป็นอินดิเคเตอร์ ทำให้สามารถแบ่งจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารชนิดนี้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เจริญบนอาหารแล้วให้โคโลนีสีเข้ม ได้แก่กลุ่ม lactose fermentation ส่วนโคโลนีใสคือ non lactose fermentation

4) <u>กลุ่มยีสต์</u>

ยีสต์สามารถใช้สารอาหารได้หลายชนิดจึงเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เหมาะต่อการประยุกต์ใช้ในงานบีโอดีเซนเซอร์ ในการศึกษานี้คัดแยกกลุ่มยีสต์และราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud dextrose agar

2.2.2.2 ลักษณะเซลล์และการย้อมติดสี

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาย้อมสีแกรมและสังเกตรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2.3 การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อที่คัดแยก

2.2.3.1 การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารต่ำ

ขั้นตอนนี้เป็นการทดสอบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จาก 2.2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารต่ำ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ประเภทได้แก่

1) <u>Artificial wastewater agar</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้มีองค์ประกอบหลากหลาย เลียนแบบน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว องค์ประกอบของ artificial wastewater ได้แก่ nitrohumic acid (2000 mg/L), gum arabic (2000 mg/L), sodium lignisulfonate (2000 mg/L), tannic acid (2000 mg/L), sodium dodecylbenzene sulfonate (2000 mg/L),

sodium nitrate (2200 mg/L), sodium dihydrogenphosphate (200 mg/L), disodium hydrogenphosphate (300 mg/L), magnesium sulfate (200 mg/L), potassium chloride (40 mg/L), ferrous sulfate (1 mg/L), calcium chloride (20 mg/L), yeast extract (20 mg/L), molibdinum oxide (10 µg/L), copper sulfate (5 µg/L), boric acid (10 µg/L), manganese sulfate ((10 µg/L), zinc sulfate (7 µg/L), agar (1500 mg/L)

2) <u>อาหารแข็งจากน้ำธรรมชาติ (river-water agar)</u>
เตรียมโดยใช้น้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาที่มีค่าบีโอดีประมาณ 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเติมวุ้นปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

3) <u>อาหารสังเคราะห์ nutrient medium</u> โดยเจือจางอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วน 10 และ 100เท่า

2.2.3.2 การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในการใช้สารอาหารประเภทต่างๆ (secondary screening)

การทดลองขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถในการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ โดยนำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาทดลองเลี้ยงในสารละลายน้ำตาล กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ และแอลกอฮอล์ โดยใช้ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สารอาหารที่ทดสอบแบ่งตามกลุ่มได้ดังต่อไปนี้

1) คาร์โบไฮเดรท 8 ชนิด ได้แก่
น้ำตาลกลูโคส
น้ำตาลฟรัคโตส
น้ำตาลมอลโตส
น้ำตาลแลคโตส
น้ำตาลแมนโนส
น้ำตาลไซโลส
น้ำตาลซูโครส
แป้ง
2) กรดอะมิโน 10 ชนิด ได้แก่
กรดกลูตามิก
ฟีนิลอะลานีน
แอล-เซรีน
แอล-ซิสเทอีน
กรดแอสพาติก
ไกลซีน
แอล-ฮีสติดีน
เมทไธโอนีน
แอล-ไลซีน
3) กรดอินทรีย์ 5 ชนิด ได้แก่
กรดซักซินิก
กรดซิตริก

กรดอะซิติก

กรดแลกติก

กรดมาลิก

4) แอลกอฮอล์ 7 ชนิด ได้แก่

เมทธานอล

เอทธานอล

2-โพรพานอล

บิวทานอล

กลีเซอรอล

แมนนิทอล

ซอร์บิทอล

2.2.4 การตรึงเซลจุลินทรีย์และการประกอบหัววัดจุลินทรีย์

เพื่อทดสอบสมบัติเชิงเซนเซอร์ จุลินทรีย์ที่คัดแยกและคัดเลือกจากวิธีการในข้อ 2.2.2 และ 2.2.3 จะถูกนำมาตรึงบนเมมเบรน ก่อนนำไปประกอบกับออกซิเจนอิเล็กโทรด ขั้นตอนการตรึงเซลมีดังนี้

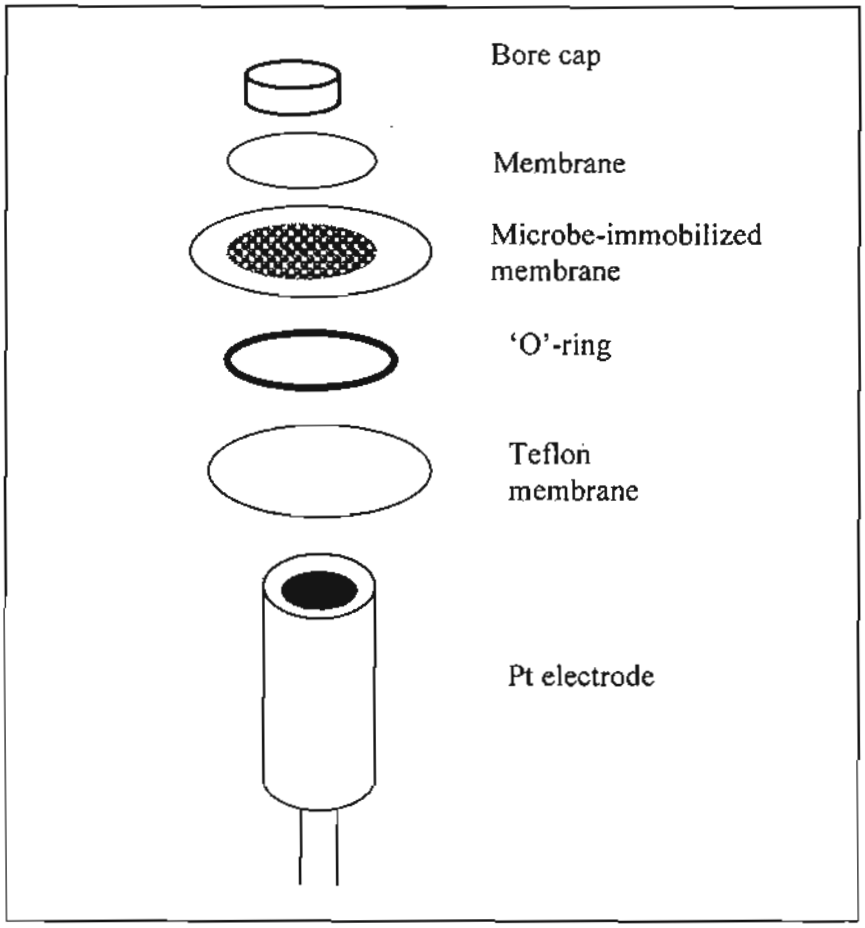
1) เลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอุณหภูมิและความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสม ทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กับระยะเวลา เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเกี่ยวเซล และนับจำนวนเซลจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลาโดยวิธี plate count

2) เก็บเซลจุลินทรีย์ในช่วงปลายระยะการเจริญแบบทวีคูณ (late of log phase) แยกเซลจุลินทรีย์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (centrifuge)

3) เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ลงในหลอดบรรจุเซลด้วยปริมาตรต่างๆ เพื่อให้มีจำนวนเซลจุลินทรีย์ตามต้องการ

4) กรองเซลที่แขวนลอยในฟอสเฟตบัฟเฟอร์บนเมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดรู 0.45 ไมครอน ด้วยไซริงจ์และอุปกรณ์การกรอง เซลจุลินทรีย์จะติดอยู่บนเมมเบรนด้วยจำนวนเซลตามต้องการ

5) ปิดทับชั้นเมมเบรนที่มีเซลจุลินทรีย์ด้วยเซลลูโลสอะซิเตทเมมเบรนเปล่า วางบนผิวหน้าท่อเทฟลอนกลวง แล้วยึดให้ติดกับวัสดุดังกล่าวด้วยโอริง ได้เป็นเมมเบรนโมดูล หรือเมมเบรนคาร์ทริดจ์ (membrane cartridge) จากนั้นนำไปสวมทับบนออกซิเจนอิเล็กโทรด ให้ส่วนเมมเบรนแนบสนิทกับผิวหน้าของออกซิเจนอิเล็กโทรดโดยการยึดด้วยพาราฟิล์ม ลักษณะของหัววัดจุลินทรีย์แสดงในรูปที่ 2.1

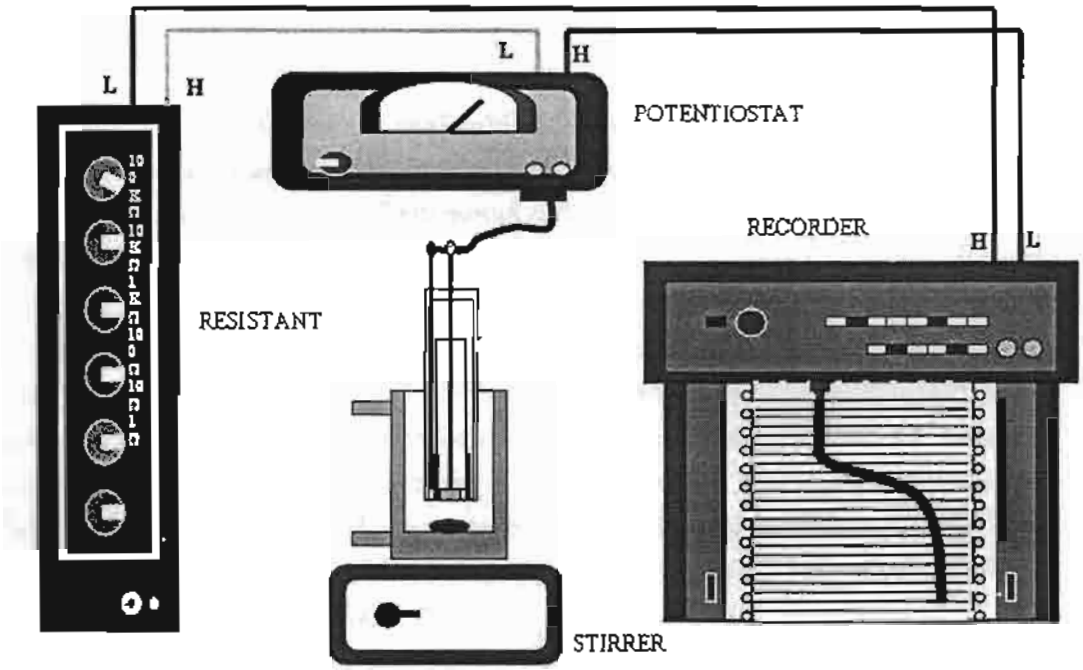


รูปที่ 2.1 การตรึงจุลินทรีย์บนออกซิเจนอิเล็กโทรด

หัววัดจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้น สามารถนำไปใช้ได้ทันที หรือนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ก่อนใช้ต้องทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และให้อากาศหรือกระตุ้นด้วยสารอาหารด้วยระยะเวลาประมาณ 30-60 นาที จึงจะนำไปใช้งานได้ตามปกติ

2.2.5 การวัดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

ระบบวัดทางเคมีไฟฟ้าประกอบด้วยโพเทนชิโอสแตท (potentiostat) ซึ่งเป็นอุปกรณ์จ่ายศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ -800 มิลลิโวลต์ให้แก่ออกซิเจนอิเล็กโทรด ศักย์ไฟฟ้าดังกล่าวเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนในสารละลายบัฟเฟอร์ ความแตกต่างของปริมาณออกซิเจนที่ถูกรีดิวซ์ก่อนและหลังการเติมสับสเตรทมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสับสเตรท หรือในที่นี้คือปริมาณบีโอดีในสารตัวอย่าง สัญญาณหรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นสามารถมอนิเตอร์ผ่านทางเครื่องบันทึกสัญญาณ (chart recorder) อุปกรณ์และระบบวัดทางเคมีไฟฟ้าแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 อุปกรณ์และระบบวัดทางเคมีไฟฟ้า

2.2.6 การวัดตัวอย่างสารละลายบีโอดีมาตรฐานและตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอาหารและเครื่องดื่ม ปริมาณบีโอดีในสารละลายที่ทราบค่า และในตัวอย่างน้ำจะถูกตรวจวัดดังวิธีการที่กล่าวในหัวข้อ 2.2.5 สารละลายมาตรฐานบีโอดีเตรียมจากกรดกลูตามิก 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคส 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าบีโอดีเท่ากับ 220 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในกรณีที่น้ำตัวอย่างมีปริมาณบีโอดีสูงเกินขีดจำกัดของหัววัดจุลินทรีย์ จะต้องเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาณเหมาะสม และอาจเตรียมตัวอย่างมากกว่า 1 ความเข้มข้น

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน น้ำ และน้ำเสีย

เมื่อนำตัวอย่างดิน น้ำและน้ำเสียมาคัดแยกจุลินทรีย์โดยวิธีเฉพาะสำหรับจุลินทรีย์กลุ่ม enteric bacteria, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ yeast พบว่าสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมดจำนวน 64 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่สามารถทนความร้อนที่ 80องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีจำนวน 24 ไอโซเลท แบคทีเรียในกลุ่ม enteric bacteria ที่สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลแลกโตสในอาหาร violet red bile agar จำนวน 11 ไอโซเลท และเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ที่สามารถใช้ cetrimide เป็นแหล่งคาร์บอนจำนวน 9 ไอโซเลท และเป็นยีสต์และแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารแข็งที่มีน้ำตาลสูงและเป็นกรดอย่างละ 4 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร nutrient agar ซึ่งไม่ได้จำแนกชนิดในขณะดำเนินการอีก 12 ไอโซเลท ผลการคัดแยกแสดงในตารางที่ 3.1 ส่วนในตารางที่ 3.2 แสดงรูปร่างโคโลนี รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการย้อมติดสีของจุลินทรีย์ที่แยกได้ อย่างไรก็ตามการแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์แบ่งโดยใช้เพียงการใช้สารอาหารหรือสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมซึ่งช่วยให้จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มเจริญได้ดีเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องมีการจำแนกด้วยวิธีที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทหลังจากการคัดเลือกขั้นที่ 2 จึงจะสามารถบอกชนิดของจุลินทรีย์นั้นได้

ตารางที่ 3.1 จำนวนจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มที่คัดแยกได้

กลุ่ม	จำนวนจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
Unidentified bacteria	12
Enteric bacteria	11
Bacillus sp.	24
Pseudomonas sp.	9
Yeast	4
Acid tolerant bacteria	4

ตารางที่ 3.2 แสดงลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

Isolate	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar				ลักษณะเซลล์และการย้อมติดสี		Source
	Margin	Elevation	Opacity	Pigment	Gram stain	Morphology	
Unidentifiedbacteria							
UN_1	rough	umbonate	opaque	white	negative	cocci	S1
UN_2	rough	dome	translucent	white	negative	rod	W3
UN_3	smooth	raised	opaque	yellow	positive	cocci	S2
UN_4	smooth	dome	opaque	white	negative	cocci	W4
UN_5	smooth	dome	opaque	pale red	positive	rod	W8
UN_6	filamentous	flat	opaque	yellow	positive	rod	W7
UN_7	smooth	dome	translucent	white	negative	rod	W5
UN_8	smooth	umbillicate	opaque	dark yellow	positive	long rod	S3
UN_9	smooth	dome	translucent	yellow	positive	short rod	R1
UN_{10}	erose	raised	opaque	white	positive	cocci	S16
UN_{11}	smooth	convex	translucent	white	positive	short rod	S13
UN_{12}	erose	raised	opaque	white	positive	cocci	S13
Enteric bacteria							
E_1	smooth	dome	translucent	white	negative	rod	W3
E_2	smooth	dome	translucent	white	negative	rod	W3
E_3	smooth	dome	opaque	white	negative	short rod	W3
E_4	smooth	convex	opaque	white	negative	short rod	S14
E_5	smooth	convex	opaque	white	negative	long rod	S14
E_6	smooth	convex	opaque	white	negative	short rod	S14
E_7	smooth	convex	opaque	white	negative	short rod	S14
E_8	smooth	umbronate	opaque	pale red	negative	short rod	S16
E_9	smooth	pulvinate	translucent	white	negative	short rod	S15
E_{10}	smooth	pulvinate	translucent	white	negative	short rod	S12
E_{11}	smooth	pulvinate	translucent	white	negative	short rod	S13

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

Isolate	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar				ลักษณะเซลล์และการย้อมติดสี		Source
	Margin	Elevation	Opacity	Pigment	Gram stain	Morphology	
***Bacillus* sp.**							
B_1	smooth	dome	opaque	white	positive	large rod	W3
B_2	rough	umbillicate	translucent	white	positive	rod	W7
B_3	smooth	flat	opaque	dark yellow	positive	small rod	W7
B_4	rough	dome	opaque	white	positive	rod	W4
B_5	filamentous	dome	opaque	yellow	positive	long rod	S4
B_6	smooth	umbillicate	opaque	yellow	positive	rod	S4
B_7	smooth	dome	opaque	white	positive	long rod	S1
B_8	rough	flat	opaque	yellow	positive	rod	W8
B_9	smooth	dome	opaque	white	positive	long rod	S9
B_{10}	erose	umbronate	opaque	white	positive	long rod	S11
B_{11}	smooth	umbronate	opaque	white	positive	long rod	S11
B_{12}	erose	raised	opaque	white	positive	long rod	S11
B_{13}	smooth	convex	opaque	white	positive	long rod	S14
B_{14}	smooth	pulvinate	translucent	white	positive	medium rod	S14
B_{15}	smooth	umbronate	opaque	white	positive	short rod	S16
B_{16}	smooth	convex	opaque	white	positive	rod	S16
B_{17}	erose	raised	opaque	white	positive	long rod	S16
B_{18}	smooth	convex	opaque	white	negative	long rod	S16
B_{19}	erose	raised	opaque	white	positive	short rod	S15
B_{20}	smooth	convex	opaque	white	positive	long rod	S12
B_{21}	smooth	convex	translucent	white	positive	short rod	S12
B_{22}	smooth	convex	opaque	white	positive	medium rod	S12
B_{23}	smooth	convex	translucent	white	positive	short rod	S13
B_{24}	erose	raised	opaque	white	positive	long rod	S13

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

Isolate	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar				ลักษณะเซลล์และการย้อมติดสี		Source
	Margin	Elevation	Opacity	Pigment	Gram stain	Morphology	
***Pseudomonas* sp.**							
P_1	smooth	dome	translucent	white	negative	short rod	W3
P_2	smooth	dome	translucent	white	negative	rod (oval)	W8
P_3	smooth	dome	translucent	white	negative	rod	S2
P_4	smooth	pulvinate	translucent	white	negative	medium rod	S14
P_5	undulate	raised	translucent	white	negative	short rod	S14
P_6	smooth	pulvinate	translucent	white	negative	rod	S16
P_7	smooth	convex	opaque	white	negative	short rod	S15
P_8	smooth	convex	translucent	white	negative	short rod	S12
P_9	smooth	pulvinate	translucent	white	negative	rod (oval)	S13
Yeast							
Y_1	irregular	dull surface	opaque	white	ND	oval	W7
Y_2	rough	dull surface	opaque	white	ND	oval	W8
Y_3	smooth	convex	translucent	white	ND	oval	S15
Y_4	smooth	pulvinate	opaque	white	ND	oval	S13
Acid tolerant bacteria							
AB_1	smooth	umbillicate	opaque	white	positive	rod	W7
AB_2	rough	dull surface	opaque	white	positive	rod	W7
AB_3	smooth	convex	opaque	white	negative	rod	S15
AB_4	smooth	pulvinate	opaque	white	negative	cocci	S12

ND = Not Determined

3.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ที่แยกได้บนอาหารที่มีสารอาหารต่ำ

อาหารแข็งที่มีปริมาณสารอาหารต่ำที่ใช้ในการศึกษานี้มี 3 ชนิด ได้แก่ nutrient agar (NA) เจือจาง 10 และ 100 เท่า, อาหารแข็งจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (river-water agar) และน้ำเสียสังเคราะห์

จากผลการศึกษาที่แสดงในตารางที่ 3.3 จะเห็นได้ว่า nutrient agar เจือจาง 10 เท่าเป็นแหล่งอาหารที่จุลินทรีย์ทั้ง 64 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ โดยมีจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในระดับดีมากหลังการบ่ม 24-48 ชั่วโมงถึง 39 ไอโซเลท ในขณะที่แหล่งอาหารอื่นๆที่เหลืออีก 3 ชนิด จุลินทรีย์ที่คัดแยกเจริญได้เล็กน้อยถึงปานกลาง แม้จะบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน เมื่อใช้ nutrient agar เจือจาง 100 เท่า โคโลนีมีลักษณะค่อนข้างบาง และเจริญอย่างสม่ำเสมอบริเวณผิวหน้าอาหารแข็ง ส่วนการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งจากน้ำธรรมชาติและน้ำเสียสังเคราะห์มีลักษณะคล้ายกันคือ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้เพียงเล็กน้อย มีโคโลนีบางๆกระจายบนผิวหน้าของอาหารแข็ง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสำหรับจุลินทรีย์ 64 ไอโซเลทที่แยกได้ nutrient agar มีปริมาณสารอาหารมากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ จุลินทรีย์จึงเจริญได้ดี ส่วนอาหารประเภทอื่นมีสารอาหารจำเป็นไม่เพียงพอ ทำให้มีจำนวนไอโซเลทที่ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวถึง 42 ไอโซเลท

ตารางที่ 3.3 สรุปจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้บนอาหารแข็งที่มีสารอาหารต่ำ

	จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ			
	1/10 NA	*1/100 NA*	*River water agar*	Artificial wastewater
เจริญได้ดีมาก	39	0	0	0
เจริญได้ปานกลาง	20	35	6	1
เจริญได้เล็กน้อย	5	27	40	41
ไม่สามารถเจริญได้	0	2	18	22

หมายเหตุ สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้สามารถเจริญบนอาหารแข็ง nutrient agar เจือจาง 10 และ 100 เท่า ดังสรุปในตารางที่ 3.3 และมีเพียง 6 ไอโซเลทที่เจริญได้ปานกลางบนอาหารแข็งจากน้ำธรรมชาติ แบ่งกลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลทได้ดังนี้

- จุลินทรีย์ที่ยังไม่ได้จำแนกกลุ่มจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ UN_1 และ UN_{11}
- จุลินทรีย์กลุ่ม enteric bacteria จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ E_3 และ E_6
- จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ B_{19}
- จุลินทรีย์กลุ่ม *Pseudomonas* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ P_5

นอกจากนี้มีจุลินทรีย์ที่เจริญได้ปานกลางในน้ำเสียสังเคราะห์ เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ยีสต์ รหัส Y_2

อย่างไรก็ตามการศึกษาในขั้นนี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการสร้างหัววัดจุลินทรีย์เพื่อตรวจวัดปริมาณบีโอดีจะต้องใช้สารอาหารได้หลากหลาย ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาคุณสมบัติดังกล่าวในขั้นตอนต่อไป ก่อนสรุปผลเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับใช้ในการสร้างหัววัดจุลินทรีย์

3.3การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในการใช้สารอาหารต่าง ๆ(secondary screening)
จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้ง 64 ไอโซเลท จะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการใช้อาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้อาหารได้อย่างหลากหลาย เพื่อนำไปสร้างและศึกษาสมบัติเซิงเซนเซอร์ในขั้นตอนต่อไป การทดลองทำโดยนำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาทดลองและศึกษาการเจริญในสารละลาย 4 กลุ่ม ได้แก่น้ำตาล กรดอะมิโน แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ รวมทั้งสิ้น 30 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นเดียวกันคือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง

ผลการทดลองในตาราง ผ.1 (ในภาคผนวก) เห็นได้ว่า ยีสต์ Y_1 เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้สารอาหารได้อย่างหลากหลายที่สุด คือสามารถเจริญได้มาก ปานกลาง และเล็กน้อยในสารอาหาร 4, 18 และ 8 ชนิดตามลำดับ เมื่อบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มเวลาบ่มเป็น 48 ชั่วโมง Y_1 มีการเจริญเพิ่มขึ้นเป็นเจริญมากและปานกลางในสารอาหาร 16 และ 13 ชนิดตามลำดับ โดยเจริญได้เล็กน้อยในน้ำตาลแลกโตสเพียงชนิดเดียว

จุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมอีกไอโซเลทหนึ่งได้แก่ *Pseudomonas* sp. P_8 ที่เจริญได้มากและปานกลางในสารอาหาร 9 และ 12 ชนิดตามลำดับ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง และเจริญได้เล็กน้อยในสารอาหารที่เหลืออีก 9 ชนิด (ส่วนใหญ่ได้แก่กรดอินทรีย์) เมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มเป็น 48 ชั่วโมง แบคทีเรียดังกล่าวยังคงเจริญได้เพียงเล็กน้อยในสารละลายกรดอินทรีย์

นอกจากจุลินทรีย์ Y_1 และ P_8 ยังคงมีจุลินทรีย์อื่นๆที่สามารถใช้สารอาหารได้ค่อนข้างกว้างเช่นกัน ได้แก่ แบคทีเรียที่ไม่ได้จำแนกชนิดรหัส UN_{10} และ UN_{11} แบคทีเรียกลุ่ม enteric bacteria รหัส E_9 และแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. รหัส B_6 แม้ว่าจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลทไม่สามารถเจริญเติบโตหรือใช้สารอาหารทั้ง 30 ชนิดในการศึกษานี้ได้อย่างดีเยี่ยม ตัวอย่างเช่น Y_1 ใช้แอลกอฮอล์ได้ไม่ดีนัก หรือ P_8 เจริญได้ค่อนข้างน้อยในกรดอินทรีย์ แต่โดยรวมจุลินทรีย์ Y_1, P_8, UN_{10}, UN_{11}, E_9 และ B_6 ยังสามารถใช้สารอาหารกลุ่มต่างๆได้ดีกว่าจุลินทรีย์อีก 58 ไอโซเลท ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงได้คัดเลือกจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลทสำหรับการศึกษาการตอบสนองต่อสารอาหารกลุ่มต่างๆในเชิงเซนเซอร์ต่อไป

3.4 การตอบสนองต่อสารอาหารของจุลินทรีย์ในเชิงเซนเซอร์

3.4.1 การศึกษาปริมาณเซลจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการตอบสนองต่อสารอาหารในเชิงเซนเซอร์

ปริมาณเซลจุลินทรีย์ที่ตรึงบนเมมเบรนมีผลอย่างมากต่อการแพร่ผ่านของออกซิเจนและสารอาหารที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งจะมีผลไปถึงอัตราการใช้สารอาหารและระยะเวลาในการตอบสนอง (หรือระยะเวลาในการตรวจวัด) ดังนั้นก่อนการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท จะต้องมีการศึกษาถึงปริมาณเซลที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่จะตรึงบนเมมเบรน โดยใช้ความสามารถในการตอบสนองต่อสารละลายบีโอดีมาตรฐาน และระยะเวลาในการตอบสนองต่อสารอาหารดังกล่าวเป็นพารามิเตอร์เพื่อเปรียบเทียบและคัดเลือกปริมาณเซลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแต่ละไอโซเลท

เซลจุลินทรีย์จะถูกเก็บเกี่ยวในช่วงปลายระยะเจริญแบบทวีคูณ (late of log phase) และตรึงบนเมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตท (วิธีการตรึงเซลและประกอบหัววัดจุลินทรีย์ดังหัวข้อ 2.2.4) หลังจากประกอบหัววัดจุลินทรีย์ จะทดสอบการตอบสนองของหัววัดที่มีปริมาณเซลจุลินทรีย์ในช่วง 5×10^6 ถึง 5×10^9 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตรของเมมเบรน โดยจุ่มหัววัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่ให้อากาศจนอิ่มตัว ควบคุมอุณหภูมิของระบบวัดที่ 30 องศาเซลเซียส

จากการทดลองจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเซลจุลินทรีย์ ค่ากระแสพื้นหลัง (background current) จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเซลที่เพิ่มขึ้นจะขัดขวางการแพร่ผ่านของออกซิเจนจากสารละลายสู่ผิวหน้าของหัววัด กระแสรีดักชัน (reductive current) ที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนที่ผิวหน้าของหัววัดจึงมีค่าต่ำ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับทฤษฎีโดยทั่วไป นอกจากปริมาณเซลที่จะมีผลต่อกระแสไฟฟ้าและระยะเวลาที่วัดแล้ว ขนาดของเซลจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะให้ผลในทำนองเดียวกันเช่นกัน (ผลการทดลองแสดงในรูปผ.1-ผ.6 ภาคผนวก)

กระแสที่เกิดขึ้น (I) และระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง มีผลสืบเนื่องมาจากประสิทธิภาพในการใช้สารอาหารและปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆเป็นหลัก กล่าวคือถ้าจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการใช้สารอาหารได้ต่ำ กระแสที่วัดได้จะมีค่าต่ำ ในอีกกรณีหนึ่งถ้าจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการใช้สารอาหารสูง แต่มีปริมาณเซลน้อยเกินไป กระแสที่วัดได้จะมีค่าต่ำเช่นเดียวกัน (การตอบสนองน้อย) และใช้เวลาในการวัดแบบ steady state ค่อนข้างนาน ส่วนการใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการใช้สารอาหารได้ดี แต่มีปริมาณเซลที่ตรึงบนเมมเบรนสูง จะวัดกระแสได้น้อยเช่นกัน เนื่องจากอัตราการแพร่ผ่านของออกซิเจนต่ำ เป็นผลจากเกิดการขัดขวางการแพร่จากปริมาณเซล จากการศึกษาสามารถสรุปปริมาณเซลที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้ดังตารางที่ 3.4 ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณเซลที่คัดเลือกอาจมิใช่ปริมาณจุลินทรีย์ที่ให้ผลการตอบสนองได้สูงสุด เพราะในบางการทดลองมีการตอบสนองสูงมาก แต่ในขณะเดียวกันเวลาที่ใช้ในการวัดจะสูงมากเช่นกัน ซึ่งจะไม่เหมาะสมหากใช้สภาวะดังกล่าวในการวัดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างจริงที่ต้องการความสะดวกและรวดเร็ว

ตารางที่ 3.4 ปริมาณเซลที่เหมาะสมในการตรึงเซลจุลินทรีย์

	Cell loading Cfu/cm^2	Background (nA)	I (nA)	Time (minutes)
Unidentified bacteria UN_{10}	1×10^6	40.625	29.75	33.05
Unidentified bacteria UN_{11}	1×10^7	34	32	21.25
Bacillus sp.B_6	1×10^7	27.83	26.83	12.42
Pseudomonas sp.P_8	1×10^7	40.3	15.5	15.83
Enteric bacteria E_9	5×10^7	23.25	22.25	10.62
Yeast Y_1	5×10^8	17.25	15.5	6.56

จากตารางที่ 3.4 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่า unidentified bacteria UN_{11}, unidentified UN_{10} และ *Bacillus* sp. B_6 เป็นจุลินทรีย์ที่ให้กระแสสูงสุด คือ 32, 29.75 และ 26.83 นาโนแอมแปร์ ตามลำดับ ขณะที่ยีสต์ Y_1 และ enteric bacteria E_9 ใช้เวลาในการตอบสนองต่ำคือ 6.56 และ 10.62 นาที ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามการศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นเพียงการคัดเลือกเบื้องต้น ซึ่งทำการทดสอบกับสารละลายมาตรฐานบีโอดีที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและกรดกลูตามิกที่ทราบความเข้มข้นเท่านั้น จึงยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่เหมาะสม การศึกษาขั้นต่อไปจะได้นำจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลทที่มีปริมาณเซลดังแสดงในตารางที่ 3.4 ตรึงบนเมมเบรน ทดสอบการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ต่อสารอาหาร 4 กลุ่มที่ระบุในหัวข้อ 2.2.3 จุลินทรีย์ที่ให้การตอบสนองเซิงเซนเซอร์ต่อสารอาหารได้หลากหลายด้วยอัตราที่สูง และใช้เวลาในการตอบสนองต่ำจะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับวัดปริมาณบีโอดีต่อไป

3.4.2 การศึกษาความสามารถในการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ 6 ไอโซเลทที่คัดเลือกในเซิงเซนเซอร์

การศึกษาส่วนนี้เริ่มจากการนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยวิธีทางจุลชีววิทยาทั้ง 6 ไอโซเลทมาทดสอบหาปริมาณเซลที่เหมาะสมต่อการตรึงบนเมมเบรน และให้การตอบสนองต่อสารละลายบีโอดีมาตรฐานทั้งขนาดสัญญาณและระยะเวลาการตอบสนองที่ดี โดยที่ unidentified bacteria UN_{11}, *Bacillus* sp. B_6 และ *Pseudomonas* sp. P_8 มีปริมาณเซลที่เหมาะสมต่อการตรึงที่ 1×10^7 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ขณะที่ unidentified bacteria UN_{10}, enteric bacteria E_9 และยีสต์ Y_1 มีปริมาณเซลที่เหมาะสมต่อการตรึงที่ 1×10^6 , 5×10^7 และ 5×10^8 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ จากนั้นนำเมมเบรนที่ตรึงด้วยเซลจุลินทรีย์ในปริมาณที่เหมาะสมดังกล่าวมาทดสอบการตอบสนองต่อสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่ม และเบียร์ โดยใช้สารทดสอบความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.0 สารอาหารที่ใช้ในการทดสอบได้แก่

คาร์โบไฮเดรท

น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส
น้ำตาลซูโครส

กรดอะมิโน

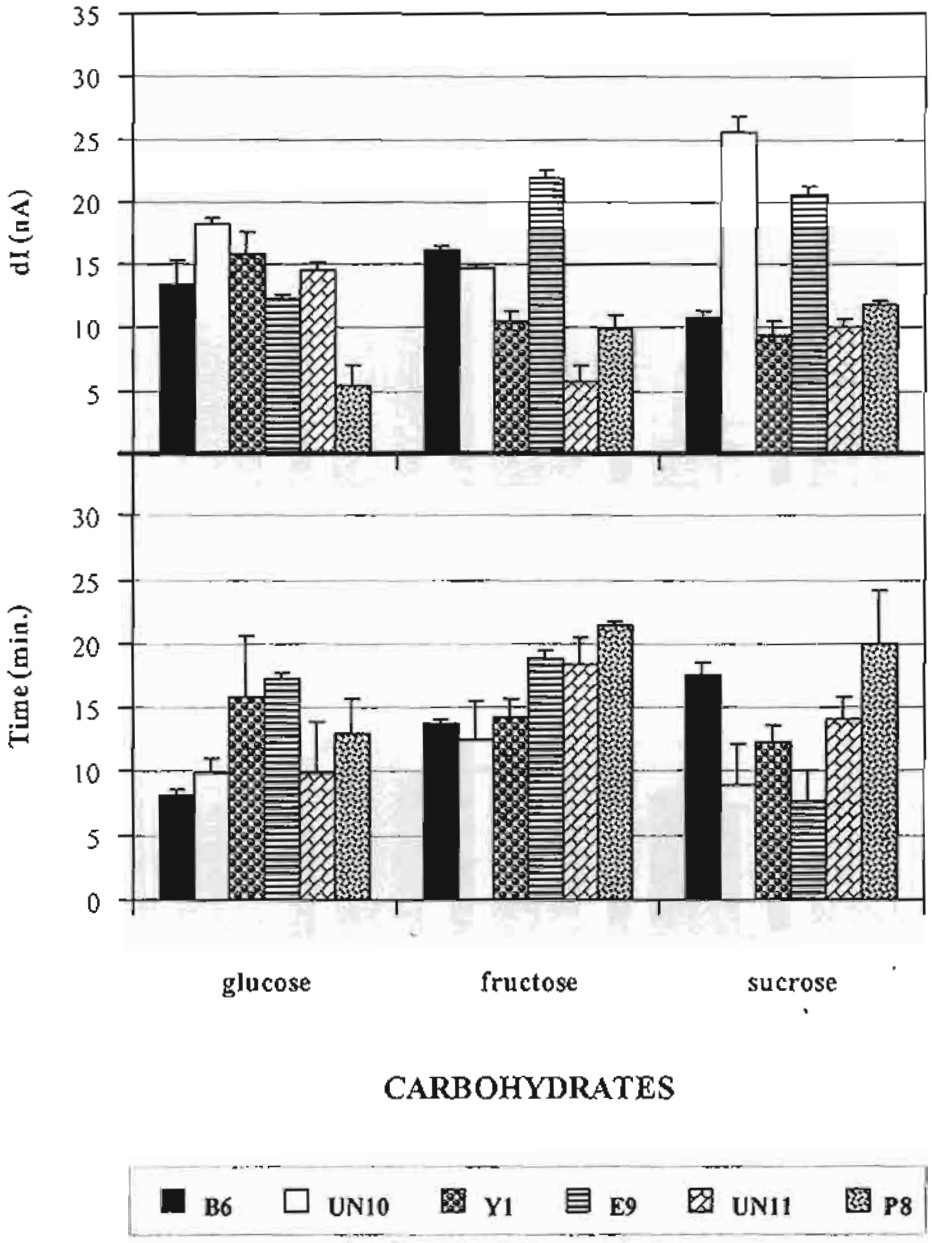
กรดกลูตามิก ฟีนิลอะลานีน
แอล-ซีสเทอีน ไกลซีน
แอล-ไลซีน

แอลกอฮอล์

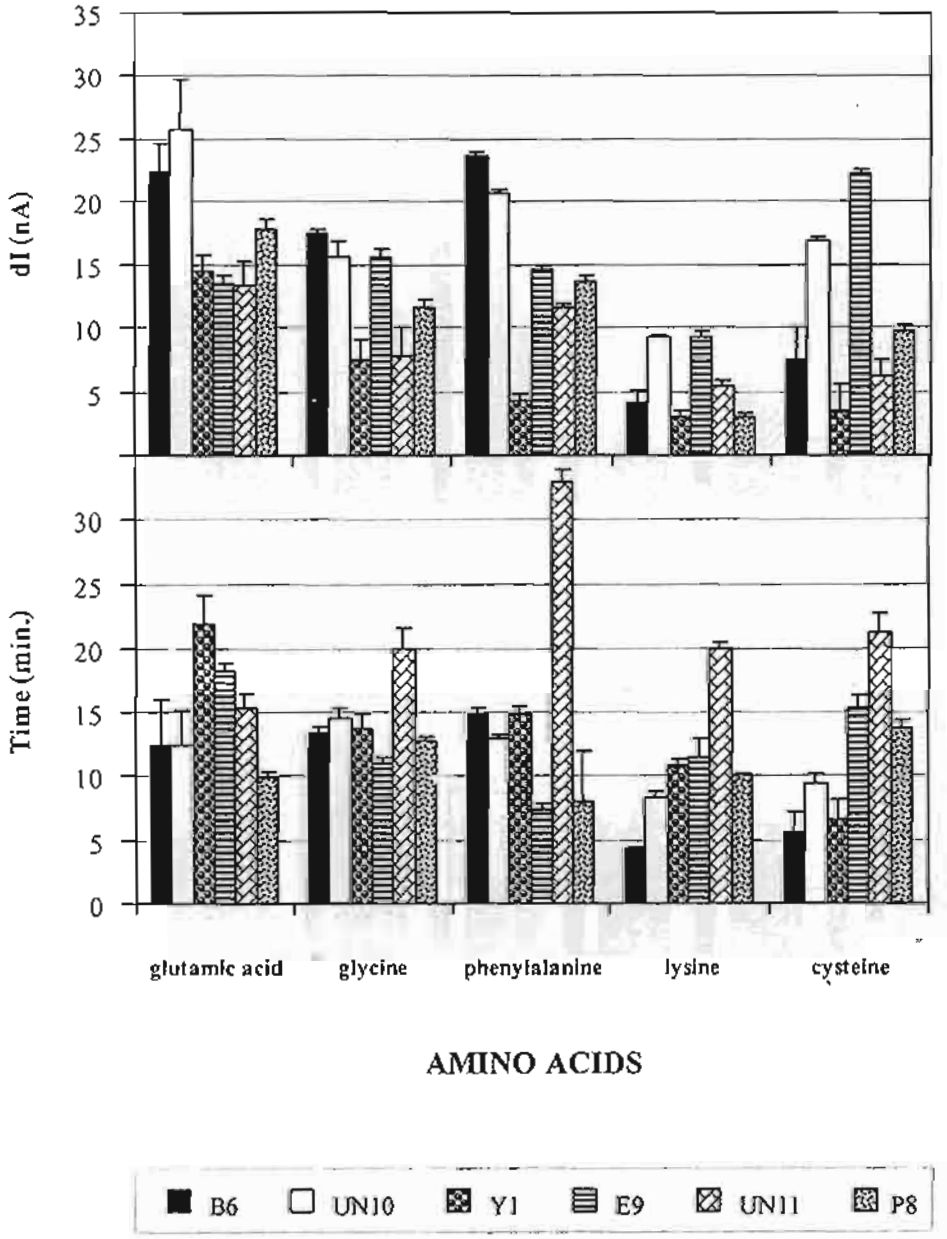
เอทธานอล ซอร์บิทอล

กรดอินทรีย์

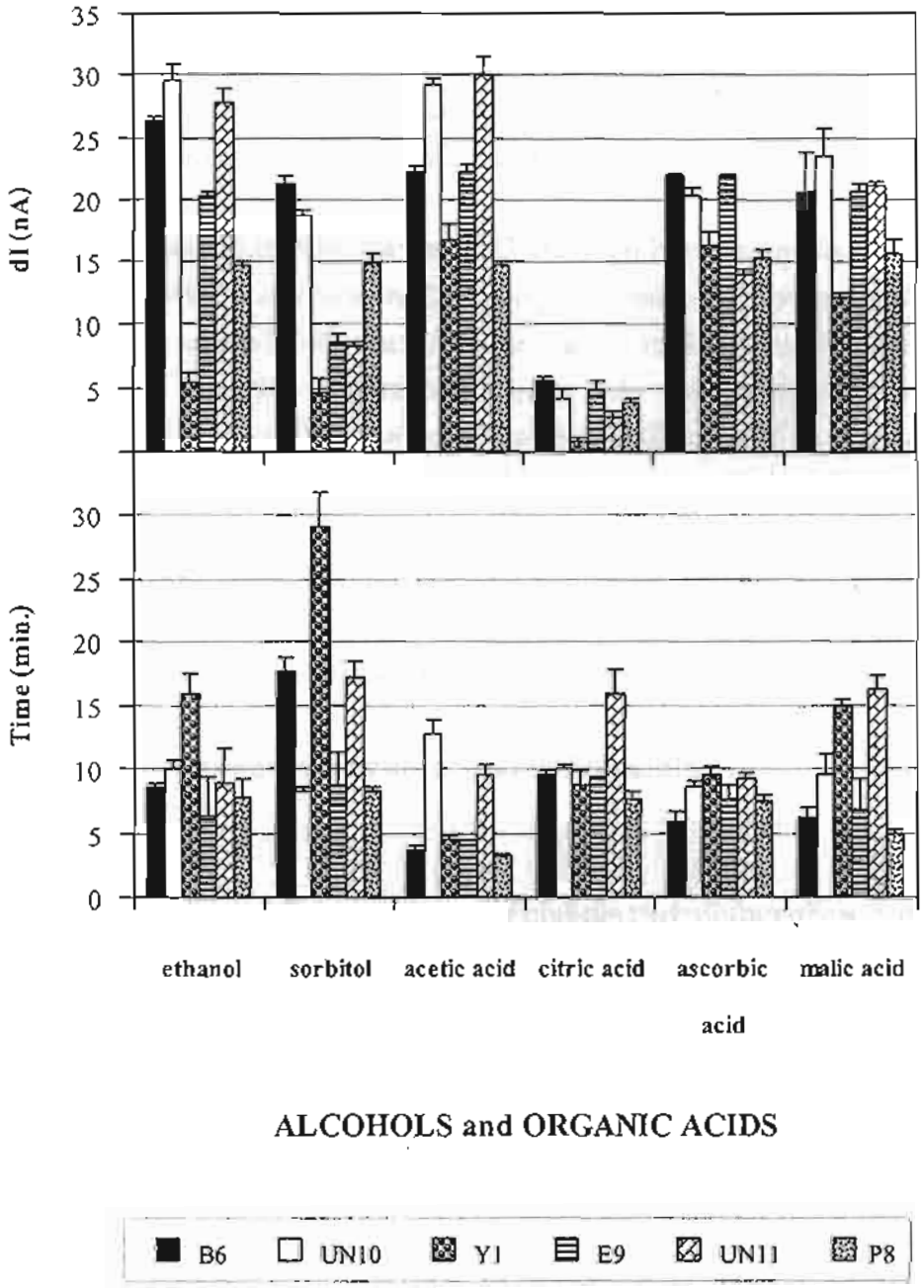
กรดซิตริก กรดอะซิติก
กรดมาลิก กรดแอสคอบิก



รูปที่ 3.1 กระแสและระยะเวลาการตอบสนองของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกต่อสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรท



รูปที่ 3.2 กระแสและระยะเวลาการตอบสนองของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกต่อสารอาหารกลุ่มกรดอะมิโน



รูปที่ 3.3 กระแสและระยะเวลาการตอบสนองของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกต่อสารอาหารกลุ่มแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.1,3.2 และ 3.3 ซึ่งแสดงการตอบสนองของจุลินทรีย์ต่อสารอินทรีย์ในกลุ่มต่างๆพบว่า จุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทสามารถตอบสนองต่อสารอาหารได้แตกต่างกัน โดยที่ UN_{10} ให้กระแสหรือการตอบสนองสูงที่สุดเมื่อทดสอบด้วยสารละลายกลูโคส ซูโครส กรดกลูตามิก ไลซีน เอทธานอล และกรดมาลิก โดยเฉพาะเมื่อทดสอบด้วยเอทธานอลจะให้กระแสสูงสุดถึง 29.50 นาโนแอมแปร์ โดยใช้เวลานาน 10 นาที ดังนั้นจึงได้คัดเลือกจุลินทรีย์ดังกล่าวสำหรับศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากมีความสามารถในการตอบสนองต่อแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานผลิตเบียร์และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

Bacillus sp. B_6 มีการตอบสนองต่อสารอาหารหลายชนิดได้ดีเช่นกัน โดยให้กระแสสูงสุดเมื่อทดสอบด้วยไกลซีน ฟีนิลอะลานีน ซอร์บิทอล กรดซิตริก และกรดแอสคอบิก ส่วน enteric bacteria E_9 มีการตอบสนองต่อน้ำตาลฟรุกโตส ไลซีน ซีสเทอีน และกรดแอสคอบิกได้ดี ขณะที่ *Pseudomonas* sp. P_8 มีความสามารถในการตอบสนองต่อกรดอินทรีย์ได้แก่กรดซิตริก กรดอะซิติก และกรดมาลิก ได้อย่างรวดเร็ว กรดอินทรีย์ดังกล่าวเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผลไม้กระป๋องและเครื่องดื่ม ดังนั้นจึงได้คัดเลือกจุลินทรีย์ 3 ชนิดดังกล่าวสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

ยีสต์ Y_1 เป็นจุลินทรีย์ที่ตอบสนองต่อสารอินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ต่ำที่สุด กระแสที่ได้จากการตอบสนองมีค่าน้อยเมื่อทดสอบด้วยสารอาหาร 9 ชนิดจากทั้งหมด 14 ชนิด ขณะเดียวกัน UN_{11} ใช้เวลาในการตอบสนองต่อสารอินทรีย์ค่อนข้างสูง ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวจึงไม่นำจุลินทรีย์ 2 ไอโซเลทไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

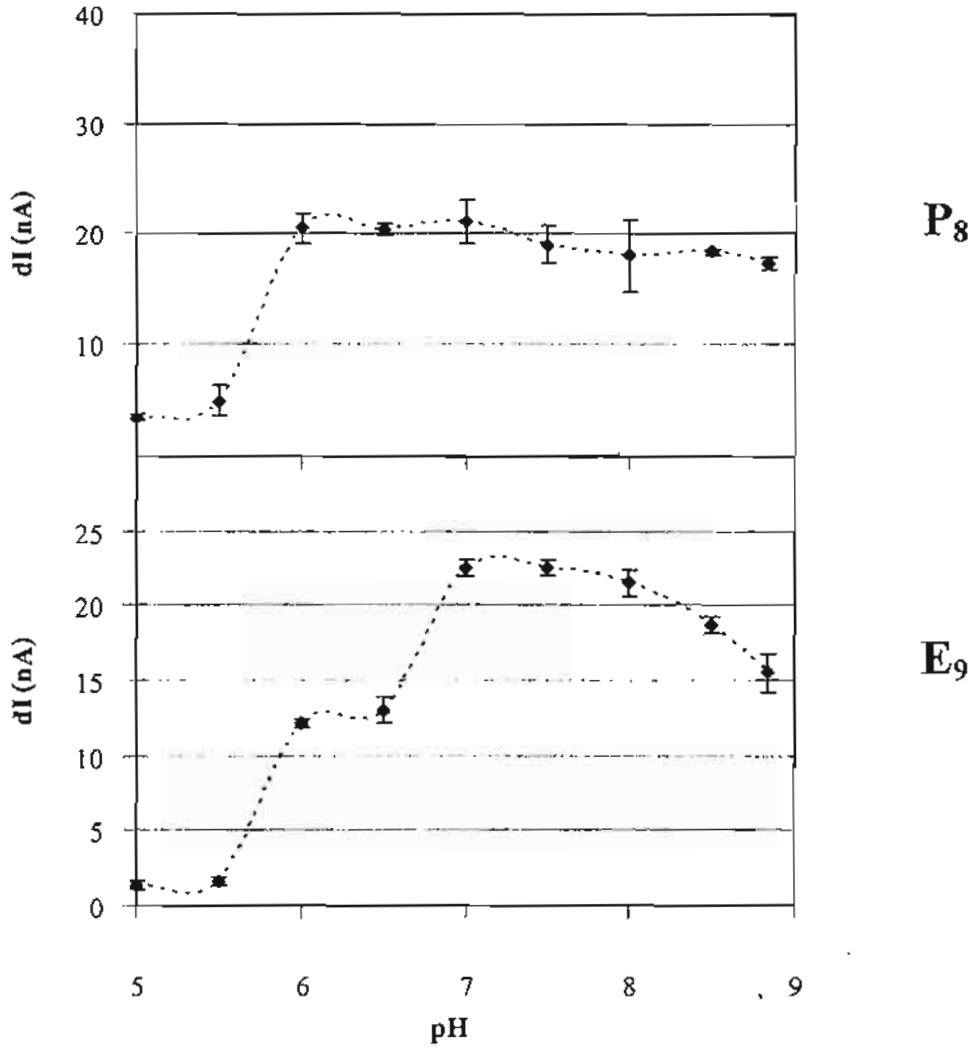
3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตอบสนองของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท

3.5.1 ผลของพีเอช

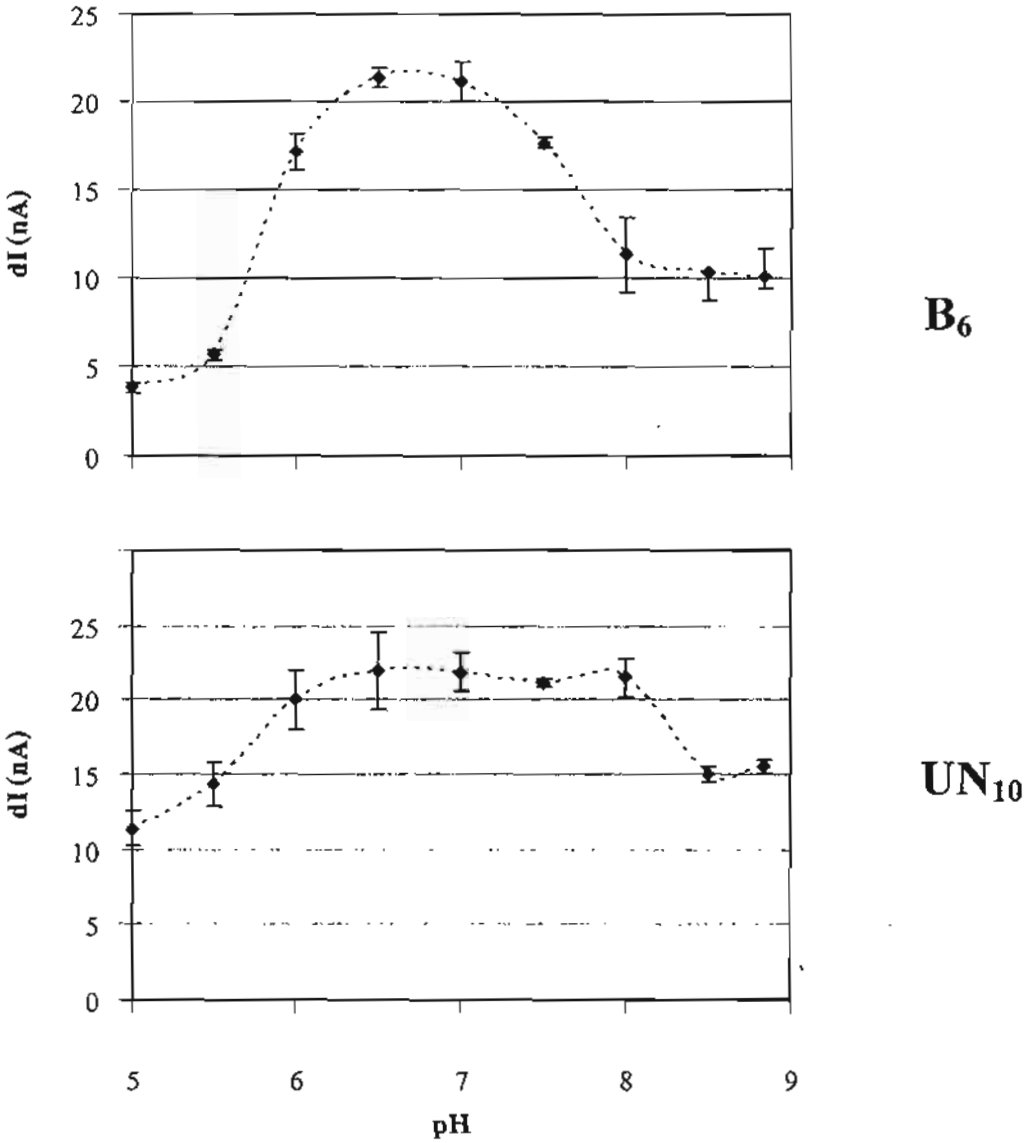
พีเอชมีผลโดยตรงต่อกิจกรรมของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาถึงสภาวะพีเอชที่เหมาะสมต่อการตอบสนองของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทเพื่อให้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาสามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษาใช้เซลจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทในปริมาณเหมาะสมดังศึกษาในหัวข้อ 3.4.1 ทดสอบการตอบสนองต่อสารละลายกลูโคสและกรดกลูตามิก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส สารละลายทำงานมีพีเอชในช่วง 5.0 – 8.8 โดยใช้สารละลายดังต่อไปนี้

พีเอช	*ชนิดของบัฟเฟอร์*
5.0 และ 5.5	0.1 M sodium acetate-acetic acid buffer
6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0	0.1 M Na_2HPO_4 – NaH_2PO_4 buffer
8.5 และ 8.8	0.1 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane – HCl buffer



รูปที่ 3.4 การตอบสนองของ Pseudomonas sp.P_8และ Enteric bacteria E_9 ที่พีเอชต่างๆ



รูปที่ 3.5 การตอบสนองของ *Bacillus* sp.B_6 และ Unidentified bacteria UN_{10}ที่พีเอชต่าง ๆ

จากผลการทดลองดังแสดงในรูป 3.4 และ 3.5 สามารถสรุปช่วงพีเอชที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทได้ดังนี้

• *Pseudomonas* sp. P_8 มีพีเอชเหมาะสมในช่วง 6.0 – 8.8 ในช่วงพีเอชดังกล่าวกระแสที่วัดได้ไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจน กล่าวคืออยู่ในช่วง 17.33 – 21.13 นาโนแอมแปร์ อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าที่พีเอช 7.0 การตอบสนองในรูปของกระแสไฟฟ้ามีค่าสูงสุด และใช้เวลาในการตอบสนองประมาณ 6 – 7 นาที ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ไม่สูงนักเมื่อเปรียบเทียบกับที่พีเอชค่าอื่นๆ ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกใช้พีเอช 7.0 สำหรับศึกษาไบโอเซนเซอร์ที่สร้างจาก *Pseudomonas* sp. P_8

• Enteric bacteria E_9 สามารถตอบสนองต่อสารละลายมาตรฐานกลูโคส – กรดกลูตามิกได้ในช่วงพีเอช 7.0 – 8.5 พีเอชที่มีการตอบสนองต่อสารละลายดังกล่าวได้สูงสุดคือ 7.0 โดยให้กระแส 22.5 นาโนแอมแปร์

• *Bacillus* sp. B_6 ตอบสนองต่อสารละลายมาตรฐานบีโอดีได้ดีในช่วงพีเอช 6.0 – 7.5 การตอบสนองสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 6.5 โดยให้กระแส 21.33 นาโนแอมแปร์ เวลาที่ใช้ในการตอบสนอง

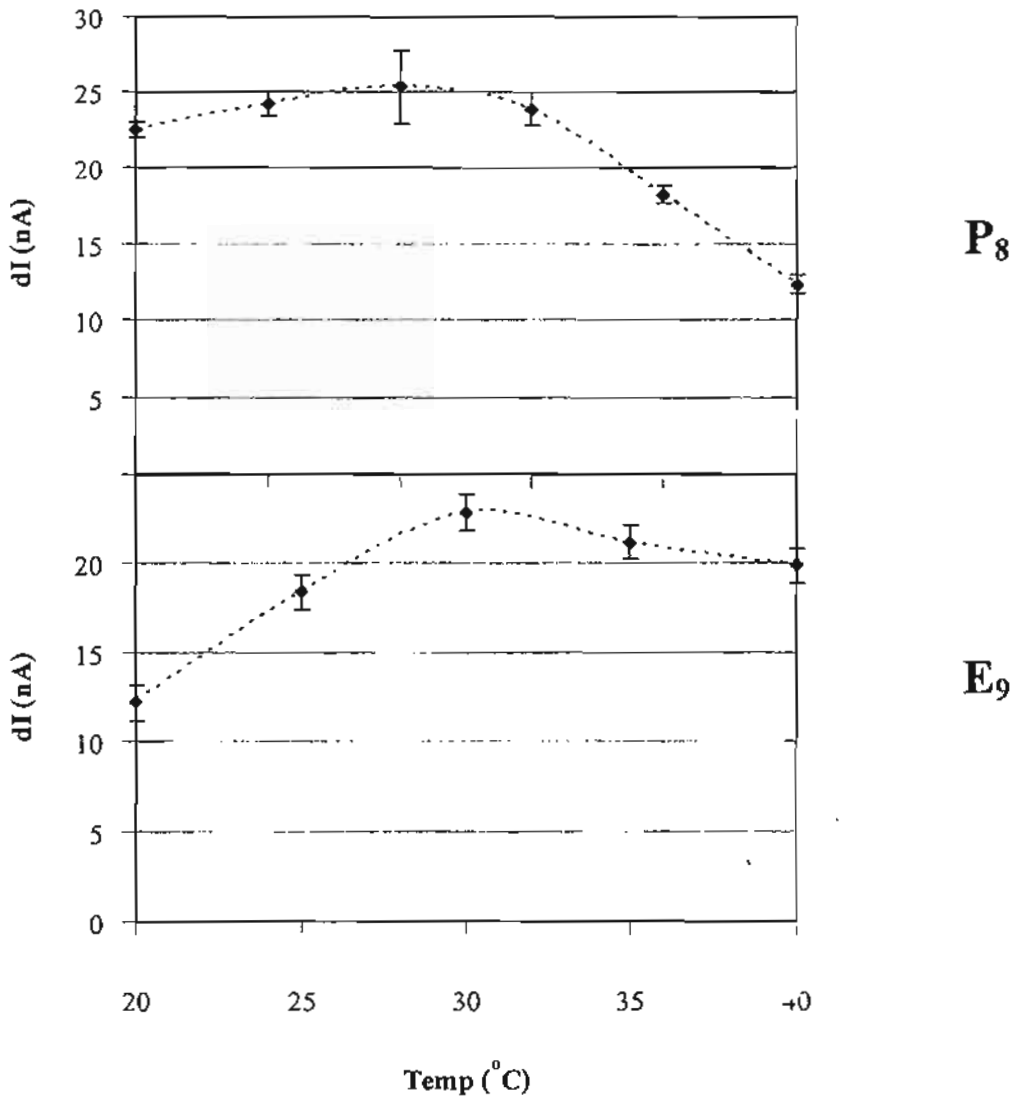
• Unidentified bacteria UN_{10} ตอบสนองต่อสารละลายบีโอดีมาตรฐานได้ในช่วงพีเอช 6.0 – 8.0 และที่พีเอช 6.5 มีการตอบสนองสูงสุด โดยให้กระแส 22 นาโนแอมแปร์

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถคัดเลือกค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทได้ดังนี้คือ *Pseudomonas* sp. P_8 และ enteric bacteria ใช้พีเอช 7.0 ในขณะที่ *Bacillus* sp. B_6 และ unidentified bacteria UN_{10} มีพีเอชเหมาะสมที่ 6.5

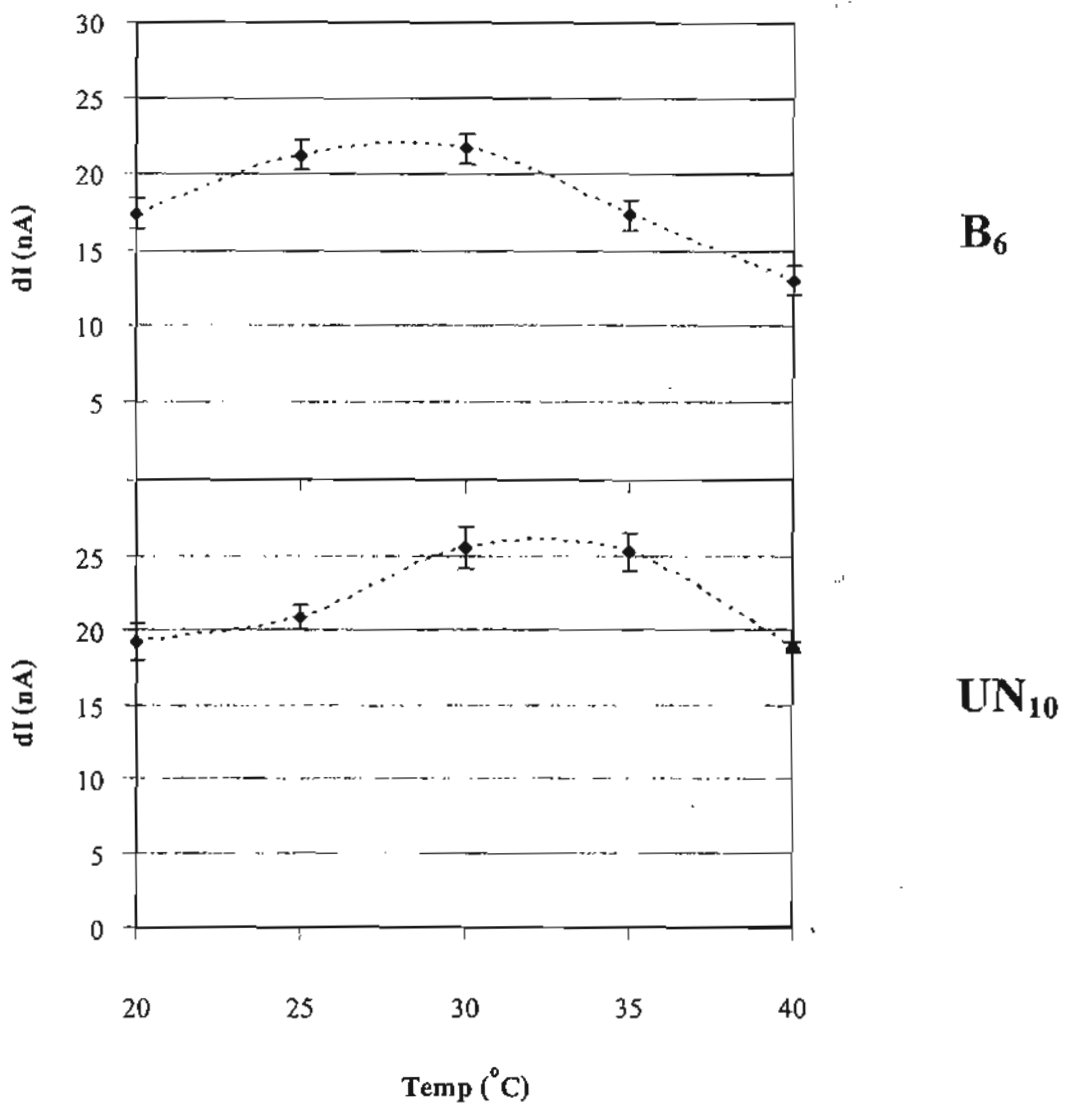
3.5.2 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิของระบบมีผลโดยตรงต่อกิจกรรมของเอนไซม์ รวมถึงประสิทธิภาพการละลายของออกซิเจน ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงจึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาเซนเซอร์วัดค่าบีโอดีเช่นกัน

การศึกษาเริ่มจากนำเซลจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทในปริมาณที่เหมาะสมตรึงบนเมมเบรน จากนั้นทดสอบการตอบสนองต่อสารละลายน้ำตาลกลูโคส – กรดกลูตามิก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมค่าพีเอชโดยใช้พีเอช 7.0 กับ *Pseudomonas* sp. P_8 และ enteric bacteria ส่วน *Bacillus* sp. B_6 และ unidentified bacteria UN_{10} ใช้พีเอช 6.5 ทดสอบการทำงานของเซนเซอร์ในช่วงอุณหภูมิ 20 – 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.6 การตอบสนองของ *Pseudomonas* sp. P_8และ Enteric bacteria E_9 ที่อุณหภูมิต่างๆ



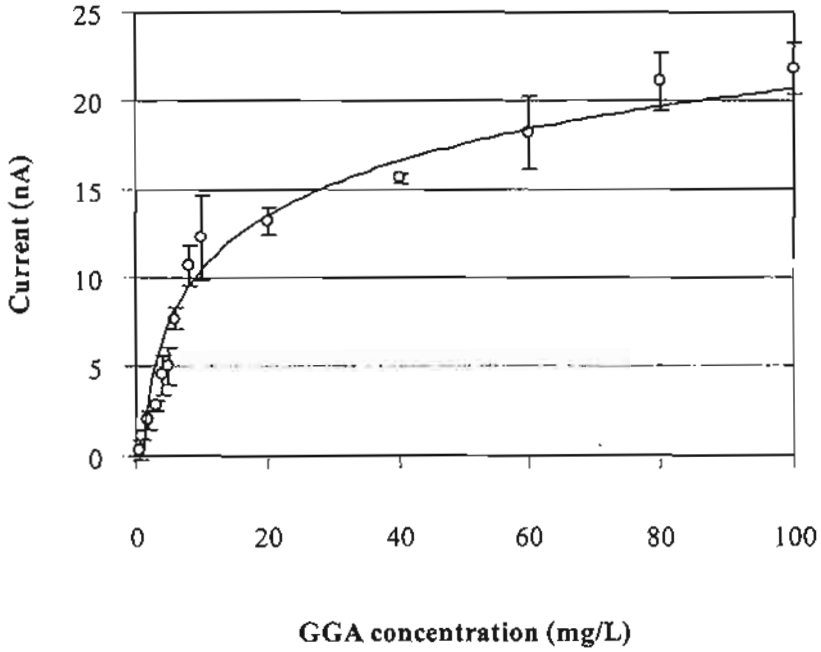
รูปที่ 3.7 การตอบสนองของ *Bacillus* sp.B_6 และ Unidentified bacteria UN_{10}ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

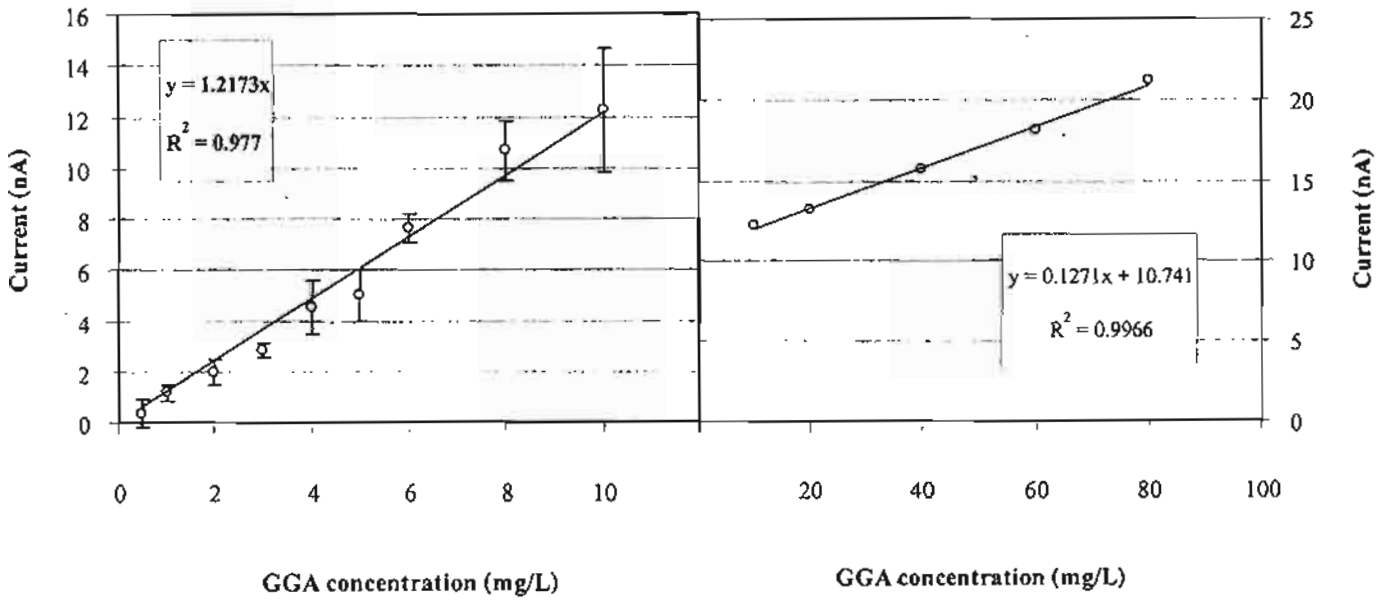
จากผลการศึกษาที่แสดงในรูปที่ 3.6 และ 3.7 จะเห็นว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถตอบสนองต่อสารละลายกลูโคส – กรดกลูตามิกได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 – 35 องศาเซลเซียส และพบว่า enteric bacteria E_9 ยังคงตอบสนองต่อสารอาหารได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากการศึกษานี้ได้เลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิดังกล่าวใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องของประเทศไทย รวมทั้งเป็นอุณหภูมิที่จุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถตอบสนองต่อสารอาหารได้ดีเช่นกัน

3.6 การศึกษาสมบัติของเซนเซอร์ที่ใช้จุลินทรีย์ไอโซเลทต่าง ๆเป็นไบโอคะตะลิสต์

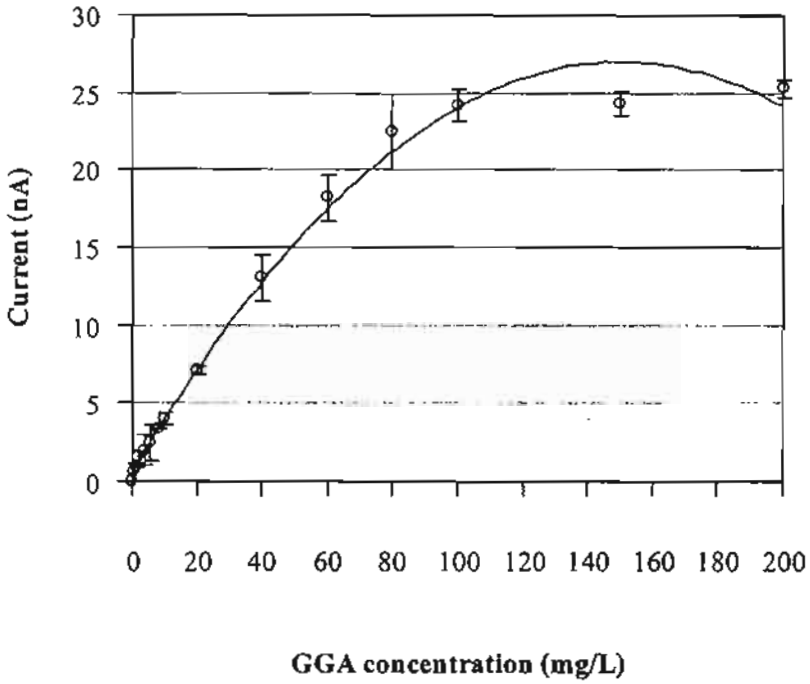
การศึกษาส่วนนี้เริ่มจากการนำเซลของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทที่คัดเลือก มาตรึงลงบนเมมเบรนในปริมาณที่เหมาะสมได้แก่ enteric bacteria E_9, *Bacillus* sp. B_6 และ *Pseudomonas* sp. P_8 ใช้ปริมาณเซลที่ 1×10^7 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ขณะที่ unidentified bacteria UN_{10} ใช้ปริมาณเซลที่ 1×10^6 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร จากนั้นจึงนำแผ่นเมมเบรนดังกล่าวมาทดสอบสมบัติของเซนเซอร์ โดยใช้สารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิกซึ่งมีค่าบีโอดีเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสารทดสอบ ระหว่างการศึกษาควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทคือ enteric bacteria E_9 และ *Pseudomonas* sp. P_8 ควบคุมที่ 7.0 ขณะที่ unidentified bacteria UN_{10} และ *Bacillus* sp. B_6 ควบคุมที่ 6.5 โดยสมบัติของเซนเซอร์ที่ทำการศึกษาประกอบด้วย

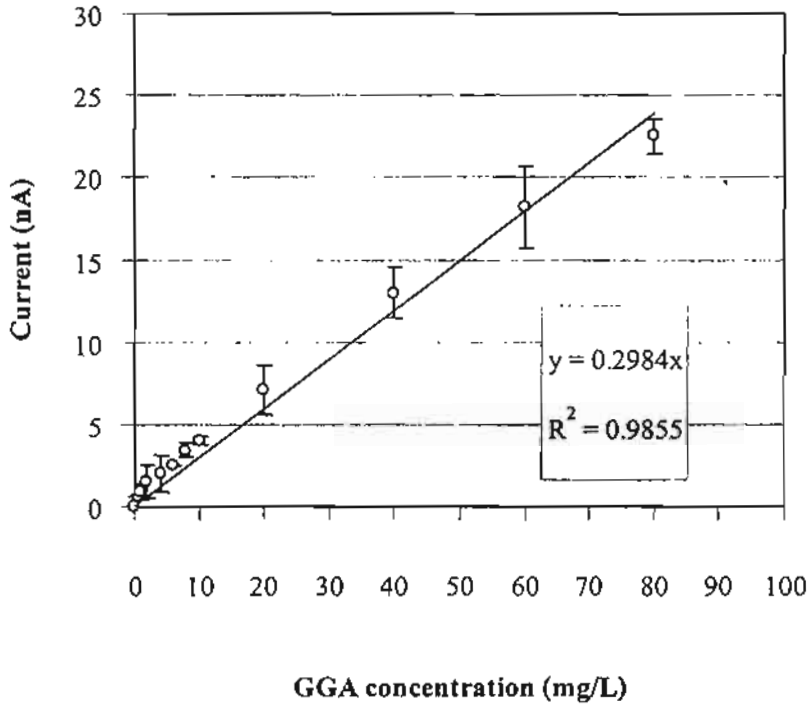
1) ค่าพิสัยเชิงเส้น
2) ความไวต่อการตอบสนอง
3) ความเข้มข้นสารต่ำสุดที่วัดได้
4) เวลาในการตอบสนอง
5) ความคงตัวต่อการใช้งาน



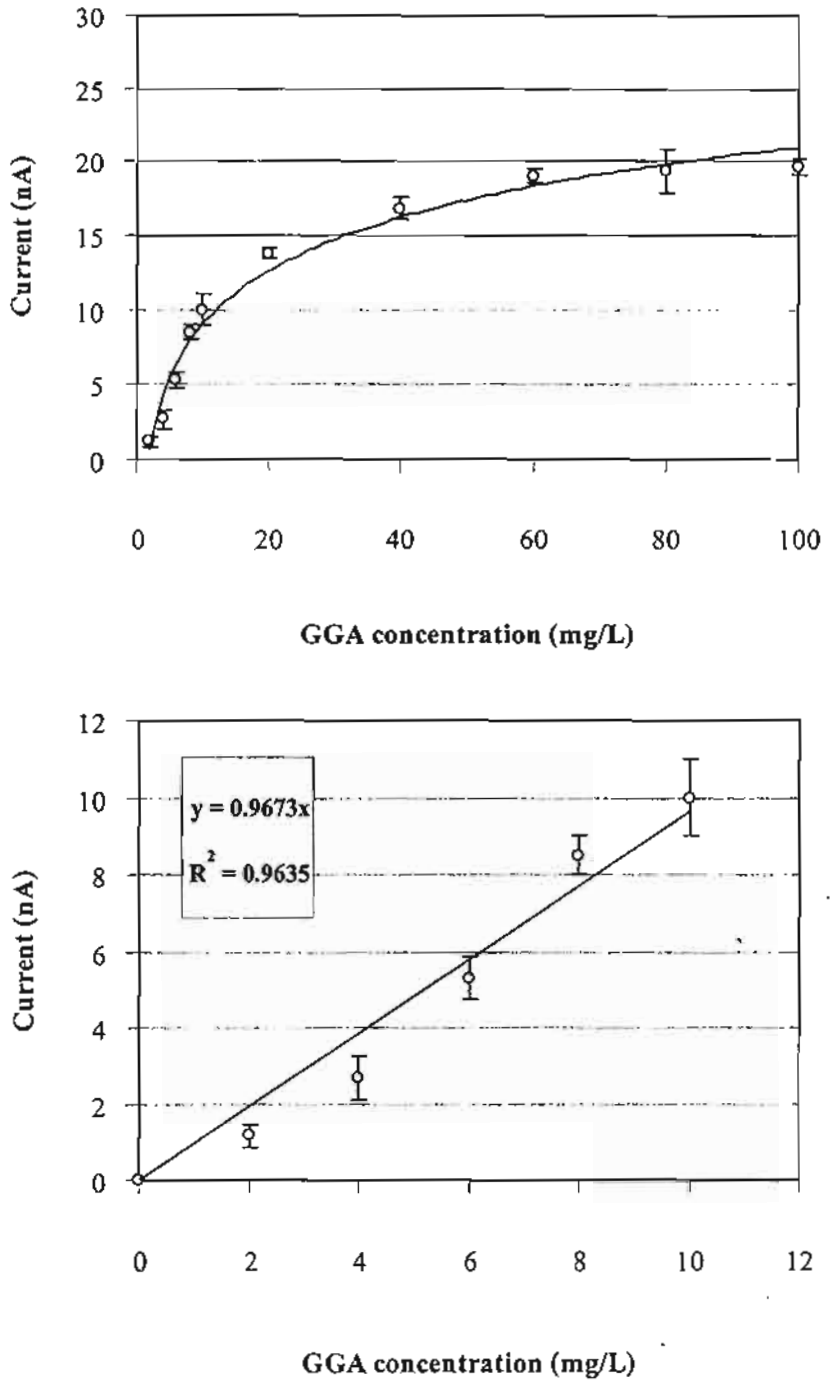


รูปที่ 3.8 กราฟมาตรฐานหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วยจุลินทรีย์ B_6 เมื่อทดสอบด้วยสารละลายกลูโคส และกรดกลูตามิค

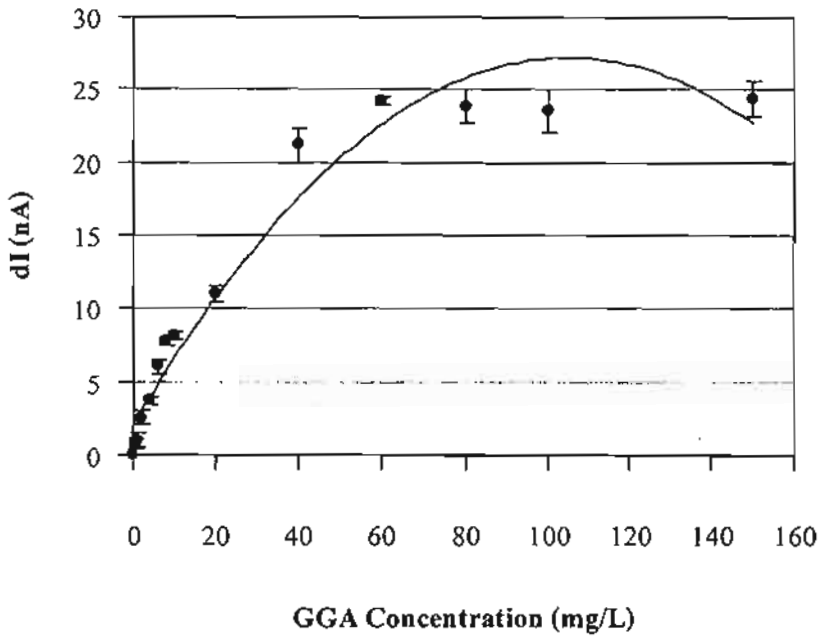


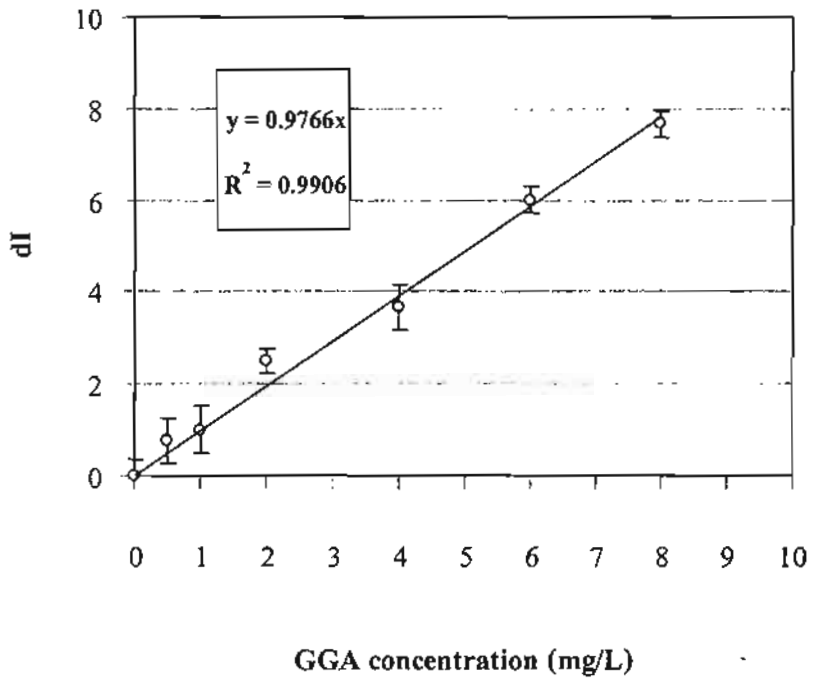


รูปที่ 3.9 กราฟมาตรฐานของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วยจุลินทรีย์ E_9 เมื่อทดสอบด้วยสารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิค

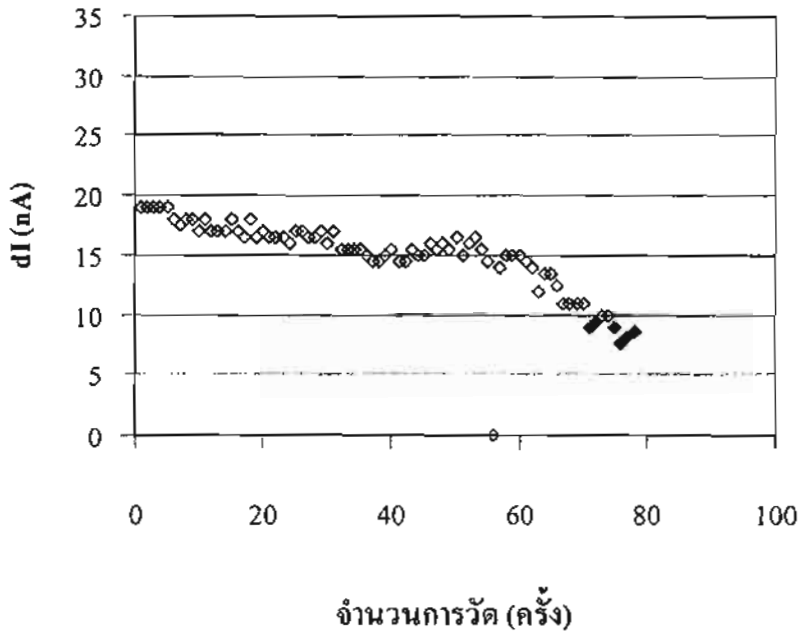


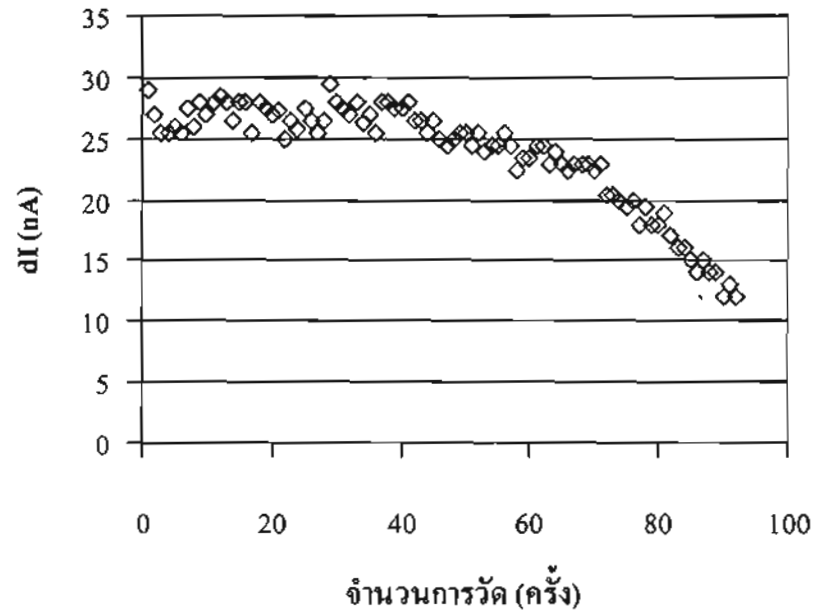
รูปที่ 3.10 กราฟมาตรฐานของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย *Pseudomonas* sp. P_8เมื่อทดสอบด้วยสารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิค



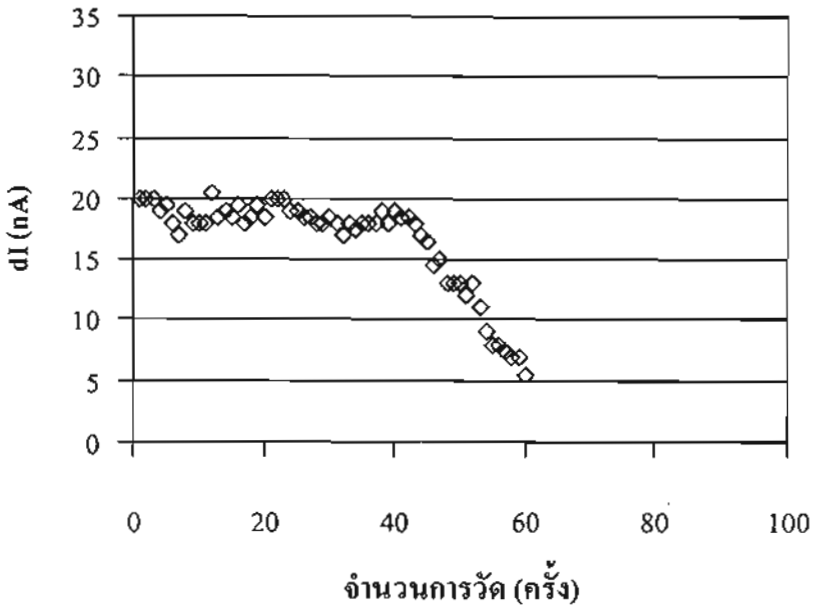


รูปที่ 3.11 กราฟมาตรฐานของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย Unidentified bacteria UN_{10} เมื่อทดสอบด้วยสารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิค





รูปที่ 3.12 กระแสของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วยจุลินทรีย์ B_6และจุลินทรีย์ E_9 ที่ระยะเวลาการใช้งานต่าง ๆ



รูปที่ 3.13 กระแสของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย *Pseudomonas* sp. P_8 ที่ระยะเวลาการใช้งานต่างๆ

การตอบสนองต่อสารละลายมาตรฐานกลูโคส-กรดกลูตามิกของหัววัดบีโอดีที่ตรึงด้วยเชื้อไอโซเลทต่างๆ แสดงในรูปที่ 3.8 ถึง 3.13 และตารางที่ 3.5 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่า จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นหัววัดค่าบีโอดี ได้แก่ *Bacillus* sp. B_6 ซึ่งมีค่าพิสัยเชิงเส้น 2 ช่วง และ enteric bacteria E_9 ซึ่งมีค่าพิสัยเชิงเส้นยาวที่สุดถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี จุลินทรีย์ทั้งสองไอโซเลทมีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 3.5 สมบัติของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วยจุลินทรีย์ไอโซเลทต่าง ๆ

	Bacillus sp. B_6	Enteric bacteria E_9	*Pseudomonas* sp. P_8	Unidentified bacteria UN_{10}
Cell loading	1×10^7 cfu/cm^2	5×10^7 cfu/cm^2	1×10^7 cfu/cm^2	5×10^7 cfu/cm^2
Optimal temperature	30°C	30°C	30°C	30°C
Optimal pH	6.5	7.0	7.0	6.5
Sensitivity	1.2173 nA/ppm (r^2 = 0.977)	0.2984 nA/ppm (r^2 = 0.9855)	0.9673 nA/ppm (r^2 = 0.9635)	0.9766 nA/ppm (r^2 = 0.9953)
Linear range	0 -10 ppm	0 - 80 ppm	0 -10 ppm	0 - 8 ppm
Limit of detection	0.5 ppm	0.5 ppm	2 ppm	0.5 ppm
Response time	3.5 - 17.25 minutes	7.16 - 16.23 minutes	6.5 - 10.085 minutes	10.78 - 15.22 minutes
Sensitivity	10.8748 nA/ppm (r^2 = 0.9968)			
Linear range	10 - 80 ppm			
Response time	4.11 - 14.56 minutes			

***Bacillus* sp. B_6** คัดแยกจากดินสวนยาง จังหวัดระยอง มีความสามารถในตอบสนองต่อสารอาหารหลากหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวยังมีช่วงการตอบสนอง 2 ช่วง คือในช่วงของความเข้มข้นของสารต่ำๆ (0-10 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี) มีความไวต่อการตอบสนองเท่ากับ 1.2173 นาโนแอมแปร์ต่อมิลลิกรัมต่อลิตร บีโอดี ค่าความเข้มข้นบีโอดีต่ำสุดที่วัดได้คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี ใช้เวลาในการตอบสนองในช่วง 3.50-17.25 นาที ในช่วงความเข้มข้นสูง (10-80 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี) มีความไวต่อการตอบสนอง 11.036 นาโนแอมแปร์ต่อมิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี เวลาในการตอบสนองในช่วง 5.09-14.56 นาที สภาวะการทำงานที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 โดยใช้ปริมาณเซล 1×10^7 เซลต่อตารางเซนติเมตร สามารถใช้งานได้ประมาณ 60 ครั้ง (RSD = 2.1001%)

Enteric bacteria E_9 คัดแยกได้จากดินในสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิต์ จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าหัววัดค่าบีโอดีที่ตรึงด้วยเชื้อดังกล่าว สามารถตอบสนองต่อสารอาหารได้หลากหลายชนิด โดยเฉพาะน้ำตาลฟรุกโทสและกรดอินทรีย์ซึ่งมีอยู่มากในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผลไม้บรรจุกระป๋อง และเมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน สารละลายกลูโคสและกรดกลูตามิก พบว่าเชื้อดังกล่าวมีความไวต่อการตอบสนอง 0.2984 นาโนแอมแปร์ต่อมิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี ค่าพิสัยเชิงเส้น 0-80 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี ค่าความเข้มข้นบีโอดีต่ำสุดที่วัดได้ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี ใช้เวลาในการตอบสนองในช่วง 7.11- 16.23 นาที มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 โดยใช้ปริมาณเซลล์ 5×10^7 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และมีอายุการใช้งานประมาณ 56 ครั้ง (RSD = 2.3111%)

ส่วนจุลินทรีย์อีก 2 ไอโซเลทได้แก่ *Pseudomonas* sp. P_8 และ unidentified bacteria UN_{10} มีสมบัติทางเซนเซอร์ไม่เหมาะสม เนื่องจากมีค่าพิสัยเชิงเส้นที่ค่อนข้างต่ำคือ 2-10 และ 0.5-8 ตามลำดับ จึงไม่เหมาะที่จะนำไปพัฒนาเป็นหัววัดค่าบีโอดีสำหรับน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่มและเบียร์ ตามจุดประสงค์ของโครงการนี้ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ 2 ไอโซเลทนี้อาจเหมาะกับการนำไปพัฒนาเป็นหัววัดค่าบีโอดีสำหรับน้ำทิ้ง หรือแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีค่าบีโอดีต่ำ ต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบหัววัดค่าบีโอดีที่ตรึงด้วย *Bacillus* sp. B_6 หรือ enteric bacteria E_9 กับหัววัดจุลินทรีย์จากรายงานอื่นที่ใช้ระบบการวัดแบบกะ (batch measurement) และใช้สารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิกเป็นสารทดสอบ (ตารางที่ 3.6) พบว่าหัววัดทั้งสองมีสมบัติทางเซนเซอร์ไม่ด้อยไปกว่าจุลินทรีย์ที่มีการรายงานมา ทั้งทางด้านพิสัยเชิงเส้น ความเข้มข้นสารต่ำสุดที่วัดได้ เวลาในการตอบสนอง และความคงตัวต่อการใช้งาน อย่างไรก็ตาม ต้องนำหัววัดทั้งสองไปทดสอบการวัดโดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงาน รวมถึงการเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (BOD_5) เพื่อตรวจสอบความแม่นยำและความน่าเชื่อถือต่อไป

ตารางที่ 3.6 เปรียบเทียบหัววัดจุลินทรีย์วัดค่าบีโอดีที่ได้จากวิจัยได้กับรายงานอื่นที่ใช้ระบบการวัดแบบกะ (Batch measurement) และใช้สารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิค เป็นสารทดสอบ

Immobilized microbes	Measuring range (mg/L BOD)	Response time (min)	Operational stability (times)	References
Trichosporon cutaneum	< 60	< 18	17	1
	4 – 100	5	48	2
	0 – 110	3 - 10	7 - 30	3
	0.2 – 18	7 - 20.	disposable sensor	4
Klebsiella oxytoca AS1	< 44	2.5	-	5
Hansenula anomala	1 ~ 45	13 - 20	-	6
Serratia marcescens LSY4	44	15	-	7
B. Subtilis + *B. licheniformis*	< 70	4 - 15	22	8
Citrobacter sp. + *Enterobacter* sp.	6 – 18	8	-	9
Bacteria isolate from soil	< 22	10 - 15	10	10
Bacteria isolate from activated sludge	3.3 - 32.8	6	48	11
	2 – 22	< 10	20	12
BODSEED	0 – 45	45 - 60	20	13
***Bacillus* sp. B_6**	**0.5 – 10**	**4 – 17**	**60**	**Our research**
	10 – 80	**5 – 15**	**60**	**Our research**
Enteric bacteria E_9	**0.5 – 80**	**7 - 16**	**56**	**Our research**

กล่าวโดยสรุป จุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทมีสมบัติในเชิงเซนเซอร์ต่างกัน จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นหัววัดค่าบีโอดีจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ *Bacillus* sp. B_6 ซึ่งมีค่าพิสัยเชิงเส้น 2 ช่วง และ enteric bacteria E_9 ซึ่งมีค่าพิสัยเชิงเส้นยาวที่สุดถึง 80 มิลลิกรัม ทั้งนี้จึงจะได้นำจุลินทรีย์ทั้งสองไอโซเลทไปทดสอบกับน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่มและเบียร์ และเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (BOD_5) ต่อไป

3.7 การวัดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานอุตสาหกรรมด้วยหัววัดจุลินทรีย์

จากการศึกษาในหัวข้อ 3.6 สรุปได้ว่า enteric bacteria E_9 ให้การตอบสนองในเชิงเซนเซอร์ต่อสารอินทรีย์ได้อย่างหลากหลายด้วยระยะเวลาค่อนข้างต่ำ ดังนั้นในการทดสอบการวัดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมจึงเลือกใช้ไบโอเซนเซอร์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิดดังกล่าว ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน คือ BOD_5 โดยใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมดังที่ได้ทำการศึกษาในขั้นต้น

ตัวอย่างน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งได้แก่ โรงงานผลิต เบียร์ ผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่มปราศจากแอลกอฮอล์ และน้ำอัดลม รวมทั้งสิ้น 7 โรงงาน 20 ตัวอย่าง ถูกเก็บจากจุดต่างๆได้แก่ น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิต น้ำเสียจากบ่อรวม บ่อเติมอากาศ และบ่อพักน้ำเพื่อปล่อยทิ้ง การวัดปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์รวมทั้งการวิเคราะห์ค่า BOD_5 (ใช้วิธีมาตรฐาน APHA) จะทำทันทีในห้องปฏิบัติการหลังการเก็บตัวอย่างน้ำ ค่าบีโอดีจากหัววัดจุลินทรีย์ได้จากการสอบเทียบหัววัด (calibration) ด้วยสารละลายมาตรฐานบีโอดีซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและกรดกลูตามิก

ตารางที่ 3.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานอุตสาหกรรมโดยหัววัดจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับวิธี BOD_5

ตัวอย่าง	BOD sensor			BOD5 (mg/L)	% ความแตกต่าง
	% sample	BOD (mg/L)	±SD		
โรงงานผลิตเบียร์ 1					
บ่อรวมน้ำเสีย	10.0	517.2	14.0	809.0	56.5
	4.0	527.9	23.0		53.2
	2.0	520.3	53.0		55.6
บ่อเติมอากาศ A	10.0	560.0	71.7	916.0	63.6
	4.0	543.2	13.3		68.7
	2.0	596.8	45.9		53.4
บ่อเติมอากาศ B	10.0	563.1	10.6	923.0	63.9
	4.0	512.6	13.3		79.9
	2.0	596.8	45.9		54.6
บ่อเติมอากาศ B (ครั้งที่ 2)	2.0	1316.0	53.0	2337.0	77.6
โรงงานผลิตเบียร์ 2					
บ่อรวมน้ำเสีย	100.0	140.8	10.6	290.0	105.7
โรงงานผลิตสุรา					
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 1)	0.5	10160.4	212.0	19750.0	94.4
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 2)	1.0	4100.9	106.0	9840.0	139.9
โรงงานผลไม้กระป๋อง 1					
น้ำจากการผลิต	10.0	584.7	14.0	2125.0	263.2
น้ำบ่อเติมอากาศ	10.0	162.2	10.6	580.0	258.0
น้ำจากบ่อรอปล่อยทิ้ง	100.0	23.0	23.0	87.0	278.3
โรงงานผลไม้กระป๋อง 2					
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 1)	4.0	1998.4	679.5	3463.0	73.3
	2.0	1089.5	74.3		217.9
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 2)	4.0	1245.7	185.5	2950.0	136.8
	2.0	1622.0	53.0		81.9
น้ำบ่อเติมอากาศ (ครั้งที่ 1)	10.0	82.6	9.2	122.0	47.0
	4.0	91.8			32.6
น้ำบ่อเติมอากาศ (ครั้งที่ 2)	10.0	193.4	9.2	340.0	75.8
	4.0	208.1	23.1		63.4

ตารางที่ 3.7(ต่อ) ผลการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานอุตสาหกรรมโดยหัววัดจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับวิธี BOD_5

ตัวอย่าง	BOD sensor			BOD5(mg/L)	% ความแตกต่าง
	% sample	BOD (mg/L)	±SD		
<u>โรงงานเครื่องดื่ม(ชาเขียว)</u>					
น้ำจากการผลิต	10.0	416.2	10.6	2280.0	448.1
	4.0	474.3	26.5		381.0
น้ำจากบ่อเติมอากาศ	100.0	10.4	1.1	51.0	410
<u>โรงงานน้ำอัดลม</u>					
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 1)	10.0	202.0	9.2	610.0	202.0
	4.0	206.5	23.0		194.7
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 2)	10.0	153.0	10.6	316.0	106.5
	4.0	191.2	35.1		64.6
น้ำจากบ่อเติมอากาศ(ครั้งที่ 1)	100.0	10.4	1.1	40.0	300.0
น้ำจากบ่อเติมอากาศ(ครั้งที่ 2)	100.0	14.1	1.1	54.0	285.7

ผลการตรวจวัดปริมาณบีโอดีจากน้ำตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3.7 จะเห็นความแตกต่างระหว่างปริมาณบีโอดีที่วิเคราะห์ด้วยหัววัดจุลินทรีย์และด้วยวิธี APHA โดยค่าที่ได้จากหัววัดจุลินทรีย์ต่ำกว่าที่ได้จากวิธี APHA เสมอ เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์จากโรงงานผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทั้ง 3 โรงงาน พบว่าค่าบีโอดีจากหัววัดจุลินทรีย์จะแปรตามค่าบีโอดีจากวิธี APHA อย่างค่อนข้างคงที่ กล่าวคืออัตราส่วนระหว่างหัววัดจุลินทรีย์และวิธี APHA มีค่าประมาณ 0.5-0.6 แม้ว่าจะมีการเจือจางตัวอย่างน้ำในปริมาณร้อยละ 2-10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผลการทดลองในทำนองเดียวกันได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำโรงงานผลิตผลไม้กระป๋องและน้ำชาเขียว แต่อัตราส่วนของค่าบีโอดีระหว่างหัววัดจุลินทรีย์และวิธี APHA แตกต่างไปจาก 3 โรงงานข้างต้น คือมีค่าเท่ากับ 0.3 และ 0.2 ตามลำดับ ส่วนผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ให้ค่าที่แตกต่างไปจากโรงงานประเภทแรก โดยที่อัตราส่วนค่าบีโอดีระหว่างหัววัดจุลินทรีย์และวิธี APHA มีค่า 0.2 – 0.8 และจะเห็นได้ว่าในกรณีนี้การเจือจางตัวอย่างน้ำมีผลต่อการวิเคราะห์ค่าบีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์ค่อนข้างมาก ส่วนโรงงานผลิตน้ำอัดลมให้ผลที่แตกต่างออกไป กล่าวคือการเจือจางตัวอย่างไม่มีผลต่อค่าบีโอดีที่วิเคราะห์ด้วยหัววัดจุลินทรีย์ แต่ผลการตรวจวัดบีโอดีของน้ำแต่ละตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง มีอัตราส่วนระหว่างหัววัดจุลินทรีย์กับวิธี APHA ที่แตกต่าง จะเห็นได้ว่าการตรวจวัดปริมาณบีโอดีจากโรงงานทั้ง 7 แห่งมิได้ให้ผลในทำนองเดียวกันทั้งหมด เนื่องจากมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดหลายประการ ได้แก่ ตัวอย่างน้ำจากแต่ละแหล่งมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่แตกต่างซึ่งจะสัมพันธ์กับความสามารถในการใช้หรือการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ ระยะเวลาสำหรับย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์บนหัววัด และการเทียบค่าบีโอดีจากกราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารละลายกลูโคสและกรดกลูตามิก ผลของปัจจัยดังกล่าวสามารถอธิบายได้ดังนี้

1) น้ำจากโรงงานอุตสาหกรรมแต่ละประเภทมีความหลากหลายของสารอินทรีย์ เป็นที่ทราบว่าจุลินทรีย์ย่อยสลายหรือใช้สารอาหาร (assimilation) แต่ละชนิดด้วยวิถีเมตาโบลิก (metabolic pathway) ที่แตกต่างตามชนิดของสารอินทรีย์ อัตราการหายใจ (respiration rate) รวมถึงอัตราการใช้ออกซิเจน (ซึ่งในที่นี้ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ค่าบีโอดี) แปรไปตามวิถีเมตาโบลิกดังกล่าว ดังนั้นตัวอย่างน้ำที่มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ต่างชนิดจะมีอัตราการใช้ออกซิเจนในระดับที่ต่างกัน เมื่อตรวจวิเคราะห์ค่าบีโอดีของตัวอย่างน้ำต่างชนิดด้วยหัววัดจุลินทรีย์ จะพบว่าค่าที่วัดได้มีความแตกต่าง แม้ว่าปริมาณรวมของสารอินทรีย์ในน้ำ (loading) มีค่าเท่ากัน

นอกจากนี้การเจือจางตัวอย่างน้ำด้วยอัตราส่วนต่างๆ ทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลง วิถีเมตาโบลิกและอัตราการหายใจของจุลินทรีย์จึงมีค่าแตกต่างไป แม้ว่าจะเป็นตัวอย่างน้ำชนิดเดียวกันก็ตาม ตัวอย่างจากการศึกษานี้ได้แก่การวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้โรงที่ 2 (เก็บตัวอย่างน้ำขณะผลิตน้ำผลไม้ผสมสับปะรดและแครอท) จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่ำลง ค่าบีโอดีจะสูงขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าสารอินทรีย์ปริมาณสูง สามารถลดหรือยับยั้งวิถีเมตาโบลิก การใช้สารอาหารจึงเกิดได้ต่ำลง เช่นเดียวกับปรากฏการณ์ "substrate inhibition" การศึกษา 3 ใน 4 ตัวอย่างให้ผลในทางเดียวกัน ยกเว้นตัวอย่างน้ำจากการผลิตครั้งที่ 1 ให้ผลในทางตรงข้าม ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าอาจเกิดจากความผิดพลาดของการวัดโดยหัววัดจุลินทรีย์ขึ้น

2) จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงบนหัววัดไม่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ได้ทันทีในระยะเวลา 10-15 นาทีดังที่ใช้ในการทดลอง ในขณะที่วิธี APHA ใช้เวลาในการบ่มตัวอย่างน้ำถึง 5 วัน ซึ่งเพียงพอต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ทั้งขนาดเล็กและใหญ่ ค่าบีโอดีที่วิเคราะห์ได้จากวิธีทั้งสองจึงมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด

3) ความแตกต่างของการวัดระหว่างวิธีทั้งสอง เกิดจากการใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคส - กรดกลูตามิกสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานเทียบค่าบีโอดี เนื่องจากสารละลายดังกล่าวประกอบด้วยสารเพียง 2 ชนิด และทั้งกลูโคสและกลูตามิกเป็นสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ใช้ได้ง่ายและรวดเร็ว เมื่อตรวจวัดตัวอย่างน้ำที่มีสารอินทรีย์หลายชนิดด้วยหัววัดที่เทียบค่าจากสารละลายดังกล่าว ค่าบีโอดีจึงมีความคลาดเคลื่อนจากค่าจริง วิธีแก้ไขอาจทำได้โดยใช้สารละลายสำหรับเทียบมาตรฐานที่มีสมบัติใกล้เคียงกับตัวอย่างน้ำ ซึ่งจะต้องทราบว่าน้ำทิ้งที่จะทำการวิเคราะห์มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์เป็นอย่างไร และมีในปริมาณเท่าใด ด้วยวิธีการนี้ปริมาณบีโอดีที่วิเคราะห์ด้วยหัววัดจุลินทรีย์จะมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริง อย่างไรก็ตามกระบวนการวิเคราะห์จะยุ่งยากมากขึ้น เนื่องจากต้องใช้สารละลายมาตรฐานที่มีความจำเพาะสำหรับตัวอย่างน้ำจากโรงงานแต่ละประเภท

ด้วยปัจจัยดังกล่าว การวัดปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งจึงมีข้อจำกัด คือไม่สามารถใช้ตรวจวัดตัวอย่างน้ำทุกประเภทได้ ชนิดของจุลินทรีย์จะเป็นตัวกำหนดชนิดตัวอย่าง การใช้จุลินทรีย์ผสมอาจช่วยขยายขอบเขตของการวิเคราะห์ตัวอย่างให้มีความหลากหลายมากขึ้น อย่างไรก็ตามหัววัดจุลินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิดอาจทำให้ควบคุมลักษณะสมบัติของหัววัดได้ยากขึ้น และมีความซับซ้อนในการสร้างมากขึ้น [26]

บทที่ 4
บทสรุป

4.1 สรุปผลการศึกษา

หัววัดจุลินทรีย์ที่พัฒนาขึ้นภายใต้โครงการ "การวิจัยและพัฒนาเซนเซอร์วัดค่าบีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์" สร้างจากการตรึงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้สารอินทรีย์ประเภทต่าง ๆได้อย่างกว้างขวางบนออกซิเจนอิเล็กโทรด การวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีทำได้โดยตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงภายหลังจุลินทรีย์ได้ใช้หรือย่อยสลายสารอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำ ปริมาณออกซิเจนที่ตรวจวัดได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าบีโอดี

การวิจัยและพัฒนาเริ่มต้นจากการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน น้ำ และน้ำเสียจากแหล่งต่าง ๆภายในประเทศ การคัดแยกใช้วิธีเฉพาะสำหรับ enteric bacteria, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และยีสต์ จากขั้นตอนนี้สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ได้รวมทั้งสิ้น 64 ไอโซเลท เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่สามารถมีชีวิตและเจริญเติบโตได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีสารอาหารต่ำ เช่นในน้ำทิ้งบางชนิด จึงได้ทดสอบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังกล่าวบนอาหารแข็งที่มีสารอาหารต่ำ จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีมากบน nutrient agar ทั้งที่เจือจาง 10 และ 100 เท่า มีจุลินทรีย์เพียง 6 ไอโซเลทที่เจริญได้ปานกลางบนอาหารแข็งจากน้ำธรรมชาติ เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้ง 64 ไอโซเลททดสอบความสามารถในการใช้สารอาหาร 4 กลุ่มหลัก ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ รวม 30 ชนิดโดยบ่มจุลินทรีย์ในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการใช้สารอาหารได้แตกต่างกัน บางไอโซเลทสามารถใช้สารอาหารได้หลายชนิดและมีการเจริญค่อนข้างสูง บางไอโซเลทอาจตอบสนองต่อสารอาหารได้กว้างเช่นกัน แต่มีการเจริญในระดับต่ำ สรุปคือมีจุลินทรีย์เพียง 6 ไอโซเลทที่สามารถใช้อาหารได้อย่างหลากหลาย และมีการเจริญในระดับปานกลางถึงมาก จุลินทรีย์ดังกล่าวประกอบด้วย enteric bacteria E_9, *Bacillus* sp. B_6., *Peudomonas* sp. P_8 และยีสต์ Y_1 อย่างละ 1 ไอโซเลท ส่วนอีก 2 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียที่ยังไม่จำแนกชนิดคือ UN_{10}และ UN_{11} จุลินทรีย์ 6 ไอโซเลทที่คัดเลือกสามารถใช้และเจริญได้ดีในคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโน แต่เจริญได้ไม่สูงนักในแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ มีเพียง P_8 ที่เติบโตได้ดีในแอลกอฮอล์ และ Y_1 ที่สามารถใช้กรดอินทรีย์ได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ

การตรึงจุลินทรีย์บนเมมเบรนเพื่อสร้างเป็นหัววัดจุลินทรีย์ต้องคำนึงถึงปริมาณเซลที่เหมาะสมซึ่งมีความสัมพันธ์กับขนาดของสัญญาณ รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการตอบสนอง ปริมาณเซลที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนเซลลูโลสอะซิเตทคือ 1×10^7 เซลต่อตารางเซนติเมตร สำหรับ UN_{11}, *Bacillus* sp. B_6 และ *Pseudomonas* sp. P_8 ส่วน UN_{10}, enteric bacteria E_9 และยีสต์ Y_1 มีปริมาณเซลเหมาะสมที่ 1×10^6, 5×10^7 และ 5×10^8 เซลต่อตารางเซนติเมตรตามลำดับ เวลาที่ใช้ในการวัดมีช่วงค่อนข้างกว้างระหว่าง 6-33 นาทีขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ซึ่งในที่นี้ได้แก่สารละลายบีโอดีมาตรฐานกลูโคสและกลูตามิก เมื่อนำหัววัดจุลินทรีย์ที่ใช้ปริมาณเซลขนาดดังกล่าวมาทดสอบการตอบสนองต่อสารอาหารประเภทต่าง ๆที่เป็นองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานอาหารกระป๋องและเครื่องดื่มจะพบว่าหัววัดจุลินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ UN_{10}, *Bacillus* sp. B_6, enteric bacteria E_9 และ *Pseudomonas* sp. P_8 ตอบสนองต่อสารอาหารเหล่านั้นได้ดี ในขณะที่ยีสต์ Y_1 ตอบสนองได้ค่อนข้างต่ำ และ UN_{11} ใช้เวลาในการตอบสนองนานกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ดังนั้นในการศึกษาเกี่ยวกับสมบัติในเชิงเซนเซอร์ซึ่งเป็นขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้เฉพาะจุลินทรีย์ 4 ไอโซเลทข้างต้นเท่านั้น

หัววัดจุลินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ 4 ไอโซเลทสามารถคงกิจกรรมในการใช้หรือย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีเมื่อสารละลายมีพีเอชเป็นกลางคือ 6.5 – 7.0 อุณหภูมิ 25 – 35 องศาเซลเซียส แต่เพื่อความสะดวกในการใช้งานจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเนื่องจากมีความใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิเฉลี่ยของประเทศไทย การเลือกใช้อุณหภูมิดังกล่าวจะทำให้การสร้างเครื่องมือวัดแบบอัตโนมัติหรือกึ่งอัตโนมัติซึ่งจะดำเนินงานในขั้นต่อไปมีความซับซ้อนน้อยลง และลดค่าใช้จ่ายลงได้เนื่องจากไม่ต้องมีอุปกรณ์สำหรับควบคุมอุณหภูมิเพิ่มขึ้น จากการศึกษาสมบัติเชิงเซนเซอร์ของหัววัดจุลินทรีย์สรุปได้ว่า หัววัดที่สร้างจากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. B_6 และ enteric bacteria E_9 มีสมบัติเชิงเซนเซอร์เหมาะสมกว่าโดยเฉพาะพิสัยเชิงเส้นที่สูงกว่า *Pseudomonas* P_8และ UN_{10} อย่างชัดเจน หัววัดจากจุลินทรีย์ทั้งสองมีพิสัยเชิงเส้นในช่วง 0 – 80 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี และมีความไวรวมทั้งระยะเวลาตอบสนองที่ดีกว่าคือประมาณ 4 – 17 นาที ในขณะที่ P_8 และ UN_{10} มีพิสัยเชิงเส้นในช่วงที่แคบมากคือ 10 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบสมบัติเชิงเซนเซอร์อื่นเช่น ความเข้มข้นสารต่ำสุดที่วัดได้ (detection limit) ระหว่าง B_6 และ E_9 จะเห็นได้ว่า E_9 สามารถตอบสนองต่อสารอินทรีย์ในปริมาณต่ำกว่า B_6 ดังนั้นหากนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งอาจมีปริมาณบีโอดีในช่วงกว้างตั้งแต่ค่าบีโอดีต่ำจากน้ำที่ผ่านการบำบัดและรอปล่อยสู่ลำรางสาธารณะ จนถึงตัวอย่างน้ำที่มีปริมาณบีโอดีสูงเช่นน้ำจากกระบวนการผลิต การเลือกใช้ E_9 จึงมีความเหมาะสมมากกว่า ส่วนจุลินทรีย์ P_8 และ UN_{10} ไม่มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจวัดบีโอดีจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มที่มีปริมาณบีโอดีสูง แต่อาจเหมาะต่อการพัฒนาเป็นหัววัดจุลินทรีย์วิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณบีโอดีต่ำเช่น แหล่งน้ำธรรมชาติ หรือน้ำเสียที่ผ่านกระบวนการบำบัดและรอปล่อยทิ้ง เป็นต้น

การทดสอบประสิทธิภาพของหัววัดจุลินทรีย์ที่พัฒนา ทำได้โดยการตรวจวัดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานสุรา เบียร์ ผลไม้กระป๋อง และน้ำอัดลม รวมทั้งสิ้น 7 แห่ง 20 ตัวอย่าง เปรียบเทียบการวิเคราะห์ดังกล่าวกับวิธีมาตรฐาน (BOD_5,APHA) จากการศึกษาสรุปได้ว่าการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์ขึ้นกับปัจจัย 2 ประการได้แก่ i) ชนิดของตัวอย่างน้ำที่มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ จุลินทรีย์มีความสามารถในการใช้สารแต่ละชนิดได้แตกต่างเช่นกัน ขึ้นกับวิถีเมตาโบลิกของจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะสำหรับสารแต่ละประเภท กระบวนการดังกล่าวสัมพันธ์กับอัตราการใช้ออกซิเจนในการคะตะไลต์สารและอัตราการหายใจของจุลินทรีย์ และ ii) การใช้สารละลายสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานที่มีความแตกต่างจากองค์ประกอบของตัวอย่างน้ำโรงงานประเภทต่างๆ ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ปริมาณ อย่างไรก็ตามอัตราส่วนหรือความแตกต่างระหว่างการวิเคราะห์บีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์และวิธี APHA มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจากโรงงานผลิตเบียร์และสุรา รวมถึงโรงงานผลิตเครื่องดื่มชาเขียวและโรงงานผลิตผลไม้กระป๋อง แม้ว่าจะเจือจางตัวอย่างน้ำด้วยอัตราส่วนต่างๆ

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าหัววัดจุลินทรีย์ที่พัฒนาขึ้นมีการตอบสนองต่อสารอินทรีย์ประเภทต่างๆ ได้ดี ประโยชน์ที่เห็นได้ชัดเจนคือการตรวจวัดทำได้อย่างรวดเร็วประมาณ 10-15 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเดิมที่ใช้เวลาถึง 5 วัน แม้ว่าปริมาณที่ตรวจวัดได้จากหัววัดจุลินทรีย์จะมีความแตกต่างไปจากวิธีมาตรฐาน APHA แต่ความแตกต่างดังกล่าวมีอัตราส่วนคงที่แปรตามชนิดหรือองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำแต่ละประเภท ซึ่งกรณีนี้สามารถใช้วิธีชดเชยความแตกต่าง (compensation) โดยใช้ correction factor ที่จำเพาะสำหรับน้ำทิ้งจากโรงงานแต่ละกลุ่มเพื่อปรับค่าการวิเคราะหให้มีความใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด

การปรับปรุงกระบวนการวิเคราะห์บีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์อาจใช้วิธีสร้างกราฟมาตรฐานที่มีความจำเพาะสำหรับน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรมแต่ละกลุ่ม โดยใช้สารละลายมาตรฐานสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบและสมบัติใกล้เคียงกับน้ำทิ้งจากโรงงานประเภทนั้นๆ ด้วยวิธีการดังกล่าวการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์จะมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยการปรับค่ากราฟมาตรฐานโดย correction factor

4.2 โปรโตคอล *"การวัดปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์"*

1. การสร้างหัววัดจุลินทรีย์

<u>การเลี้ยงเซลจุลินทรีย์</u> ใช้วิธีการเช่นเดียวกับจุลินทรีย์ทั่วไป ขั้นตอนมีดังนี้

1) ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารแข็ง (nutrient agar) จำนวน 3 ลูป ลงในอาหารเหลว (nutrient broth) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เก็บเซลจุลินทรีย์ในช่วงปลายระยะการเจริญแบบทวีคูณ (late log phase) ประมาณชั่วโมงที่ 10 หลังการถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว

3) นับจำนวนเซลมีชีวิตโดยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง

4) ปั่นแยกเซลจุลินทรีย์จากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5) ดูดส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 เขย่าเพื่อล้างเซล จากนั้นนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงเพื่อแยกเซลอีกครั้ง

6) ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5

7) เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดที่มีเซลจุลินทรีย์ เขย่าเพื่อให้เซลแขวนลอยก่อนนำไปเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ เพื่อให้ได้เซลจุลินทรีย์สำหรับตรึงบนเมมเบรนในจำนวนที่ต้องการ

<u>การตรึงเซลจุลินทรีย์</u>

1) คำนวณปริมาณเซลทั้งหมดจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง

2) เจือจางเซลจุลินทรีย์แขวนลอยด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เพื่อให้ได้ปริมาณเซลต่อปริมาตรสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการตรึงบนเมมเบรน

3) กรองเซลจุลินทรีย์บนเมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3 เซ็นติเมตร ผ่านไซริงจ์สำหรับกรอง จากนั้นตั้งทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปประกอบเป็นหัววัดจุลินทรีย์

<u>การประกอบหัววัดจุลินทรีย์</u>

1) นำเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตตวางประกบบนเมมเบรนที่มีเซลจุลินทรีย์ แล้วใช้ผ้าไนลอนหรือผ้าก๊อซประกบเมมเบรนอีกชั้น จากนั้นนำไปประกอบเป็นเมมเบรนโมดูล โดยใช้ท่อเทฟลอนกลวง 2 ชิ้นเป็นวัสดุยึดเมมเบรนให้อยู่ในตำแหน่งคงที่

2) นำเมมเบรนโมดูลสวมทับออกซิเจนอิเล็กโทรดชนิดคลาก (Clark-type oxygen electrode) ให้ผิวหน้าของอิเล็กโทรดสัมผัสปลายเมมเบรนโมดูล

2. วิธีวัด

1) ระบบวัดประกอบด้วยอ่างน้ำชนิดหมุนเวียนควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส น้ำที่ควบคุมอุณหภูมิจะไหลเวียนผ่านชั้นนอก (water jacket) ของเซลเคมีไฟฟ้าภายในบรรจุฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0) ที่อิ่มตัวด้วยอากาศจากปั๊มพ์ลม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และกวนด้วยแท่งแม่เหล็กขนาดเล็กตลอดระยะเวลาทำการทดลอง จุ่มหัววัดจุลินทรีย์ในเซลเคมีไฟฟ้า และให้ศักย์ไฟฟ้าขนาด -800 มิลลิโวลต์กับขั้วไฟฟ้าทำงาน (เทียบกับขั้วอ้างอิง)

2) วัดกระแสที่เกิดขึ้น สัญญาณที่เกิดขึ้นแสดงโดยเครื่องบันทึก (chart recorder) เมื่อกระแสพื้นหลัง (background current) มีค่าคงที่ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 นาที จึงเติมตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตรในเซลเคมีไฟฟ้า จุลินทรีย์ที่ตรึงบนเมมเบรนจะเริ่มใช้สารอินทรีย์ในตัวอย่างควบคู่กับการใช้ออกซิเจนในสารละลาย ผลคือปริมาณออกซิเจนลดลง ค่ากระแสที่เกิดจากรีดักชันของออกซิเจนจึงลดลง และคงที่เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปได้ระยะหนึ่ง ใช้เวลาประมาณ 7-15 นาที ความแตกต่างของกระแสก่อนและหลังการเติมตัวอย่างสัมพันธ์กับปริมาณตัวอย่างโดยตรง

3) ทำความสะอาดหัววัดจุลินทรีย์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์และดำเนินการตามข้อ 2) เพื่อตรวจวัดบีโอดีจากตัวอย่างใหม่ ระยะเวลาที่ใช้ในการกลับเข้าสู่กระแสพื้นหลังประมาณ 5 นาที

3. Correlation Factor

ประเภทโรงงาน	***Correlation Factor***
โรงงานเบียร์	1.63
โรงงานสุรา	2.17
โรงงานผลไม้กระป๋อง	3.67
โรงงานเครื่องดื่ม (ชาเขียว)	5.13
โรงงานน้ำอัดลม	2.92

4. การเก็บรักษา

หัววัดจุลินทรีย์มีอายุการเก็บและการใช้งานได้ค่อนข้างนาน หากมีการเก็บรักษาดังต่อไปนี้

1) หลังการใช้งานต้องทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นหลายครั้ง ถอดโมดูลหัววัดจุลินทรีย์จากออกซิเจนอิเล็กโทรด แช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) เมมเบรนที่ยังไม่ได้ประกอบเป็นเมมเบรนโมดูลสามารถเก็บแห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้งานให้ประกอบกับโมดูล และแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พร้อมให้อากาศประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อกระตุ้นกิจกรรมของจุลินทรีย์ ในกรณีที่ประกอบเป็นโมดูลและผ่านการใช้งานแล้ว หลังเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก็จะต้องมีการให้อากาศเพื่อกระตุ้นกิจกรรมเช่นเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

1. APHA (1992). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, Section 5210, 18th ed., American Public Health Association Water Works Association, American Water Environment Federation, Washington DC, pp 5.1-5.6

2. Karube I, Matsunaga T, Mitsuda S and Suzuki S (1977) Microbial electrode BOD sensors. Biotechnology and Bioengineering 19:1535-1547.

3. Hikuma M, Suzuki H, Yasuda T, Karube I and Suzuki S (1979) Amperometric estimation of BOD by using living immobilized yeasts. European Journal Applied Microbiology 8:289-297.

4. Riedel K, Lange KP, Stein HJ, Kuhn M, Ott P and Scheller F (1990) A microbial sensor for BOD. Water Research 24:883-887.

5. Praet E, Reuter V, Gillard T and Vasel JL (1995) Bioreactors and biomembranes for biochemical oxygen demand estimation. Trends in Analytical Chemistry 14:371-378.

6. Yang Z, Suzuki H, Sasaki S and Karube I (1996) Disposable sensor for biochemical oxygen demand. Applied Microbiology Biotechnology 46:10-14.

7. Yang Z, Suzuki H, Sasaki S, McNiven S and Karube I (1997) Comparison of the dynamic transient- and steady state measuring methods in a batch type BOD sensing system. Sensors and Actuators B45:217-222.

8. Reiss M, Heibges A, Metzger S and Hartmeier W (1998) Determination of BOD values of starch-containing wastewater by a BOD biosensor. Biosensors and Bioelectronics 13:1083-1090.

9. Riedel K, Renneberg R, Kuhn M and Scheller F (1988) A fast estimation of biochemical oxygen demand using microbial sensors. Applied Microbiology Biotechnology 28:316-318.

10. Tan TC and Qian Z (1997) Dead *Bacillus subtilis* cells for sensing biochemical oxygen demand of water and wastewater. Sensors and Actuators B40:65-70.

11. Karube I, Matsunage T and Suzuki S (1997) A new microbial electrode for BOD estimation. Journal of Solid-Phase Biochemical 2:97-104.

12. Kulys J and Kadziauskiene K (1980) Yeast BOD sensor. Biotechnology and Bioengineering 22:221-226.

13. Sangeetha S, Sugandhi G, Murugesan M, Murali MV, Berchmans S, Rajasekar R, Rajasekar S, Jeyakumar D and Prabhakara RG (1996) *Torulopsis candida* based sensor

for the estimation of biochemical oxygen demand and its evaluation. Electroanalysis 8:698-701.

14. Chan C, Lehmann M, Tag K, Lung M, Kunze G, Riedel K, Gruendig B and Renneberg R (1999) Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adeninivorans* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl) sulfonate (PCS) Part I: Construction and characterization of the microbial sensor. Biosensors and Bioelectronics 14:131-138.

15. Ohki A, Shinohara K, Ito O, Naka K, Maeda S, Sato T, Akano H, Kato N and Kawamura Y (1994) A BOD sensor using *Klebsiella oxytoca AS1*. International Journal of Environment Analytical Chemistry 56:261-269.

16. Kim NM and Kwon HS (1999) Biochemical oxygen demand sensor using *Serratia mercescen LSY4*. Biosensors and Bioelectronics 14:1-7.

17. Chee GJ, Nomura Y and Karube I (1999) Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand. Analytica Chimica Acta 379:185-191.

18. Chee GJ, Nomura Y, Ikebukuro K and Karube I (1999) Development of highly sensitive BOD sensor and its evaluation using preozonation. Analytica Chimica Acta 394:65-71.

19. Tan TC, Li F and Neoh KG (1992) Microbial membrane modified dissolved oxygen probe for rapid biochemical oxygen demand measurement. Sensors and Actuators B8:167-172.

20. Tan TC, Li F and Neoh KG (1993) Measurement of BOD by initial rate of response of a microbial sensor. Sensors and Actuators B10:137-142.

21. Li F and Tan TC (1994) Monitoring BOD in the presence of heavy metal ions using a poly(4-vinylpyridine)-coated microbial sensor. Biosensors and Bioelectronics 9:445-455.

22. Li F, Tan TC and Lee YK (1994) Effect of precondition and microbial composition on the sensing efficacy of a BOD biosensor. Biosensors and Bioelectronics 9:197-205.

23. Galido E, Garcis JI, Torres LG and Quintero R (1992) Characterization of microbial membranes used for the estimation of biochemical oxygen demand with a biosensor. Biotechnology Techniques 6:399-404

24. Heim S, Schnieder I, Binz D, Vogel A and Bilitewski U (1999) Development of an automated microbial sensor system. Biosensors and Bioelectronics 14:187-193

25. Lui J, Bjornsson L and Mattiasson B (2000) Immobilised activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurement. Biosensors and Bioelectronics 14:883-893

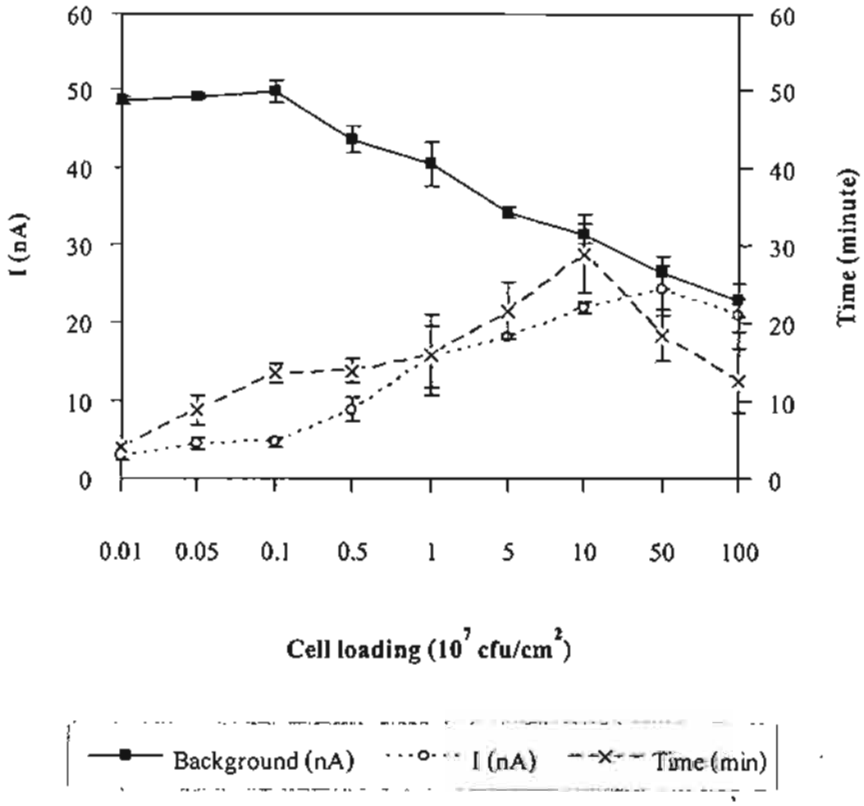
26. Suriyawattanakul L, Surareungchai W, Sritongkam P, Tanticharoen M and Kirtikara K (2002) The use of co-immobilization of *Trichosporon cutaneum* and *Bacillus licheniformis* for a BOD sensor. Applied Microbiology Biotechnology 59:40-44.

27. Atlas, R.M. and Batha, R. (1993). Microbial Ecology. 3rd Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. USA. pp.563.

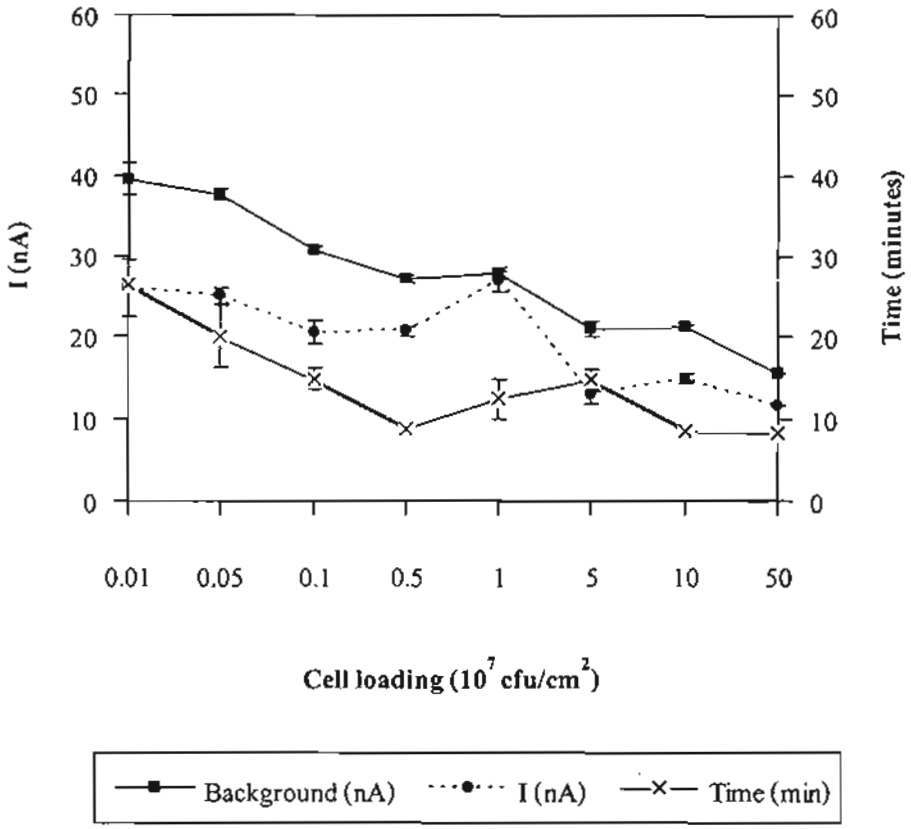
28. Morita R.Y. (1997). Bacteria in oligotrophic environments. Chapman and Hall, New York. pp.529.

ภาคผนวก

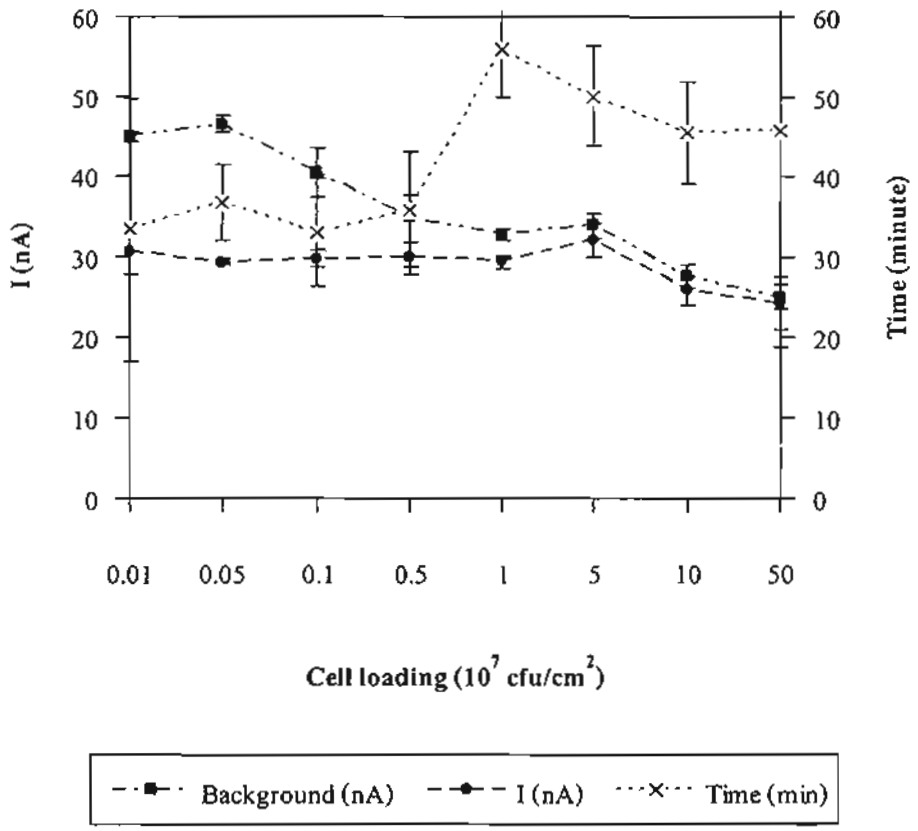
ผนวก 1 ผลการศึกษาปริมาณเซลที่เหมาะสม



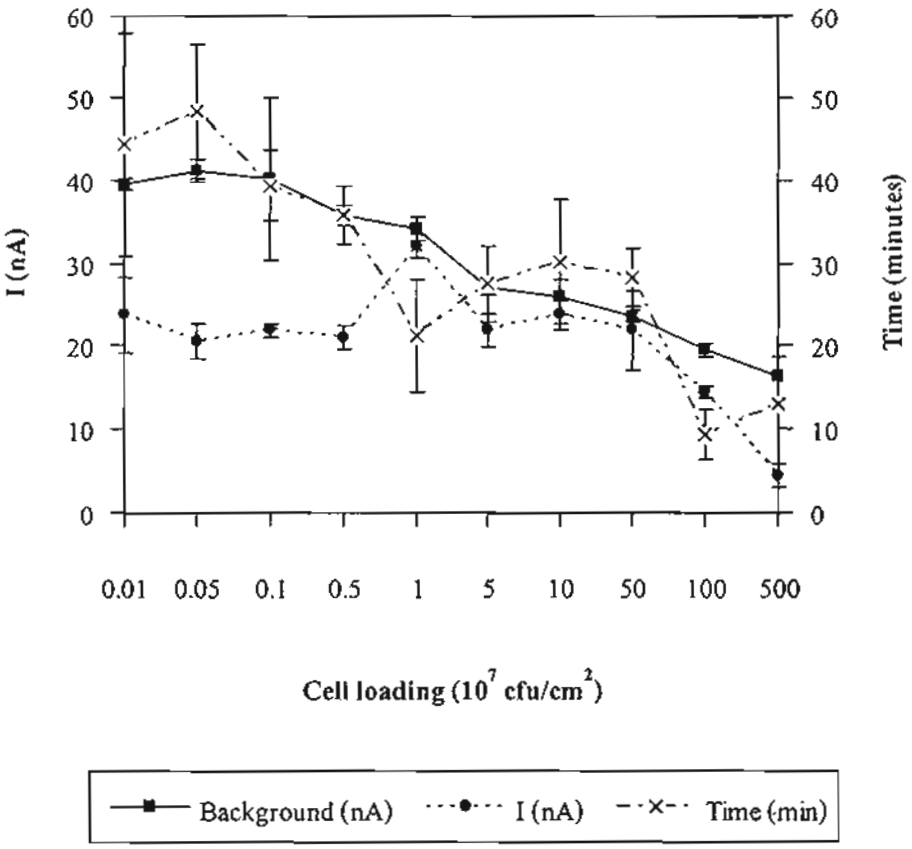
รูปที่ ผ.1 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซล *Pseudomonas* sp.P_8ปริมาณ 1 x 10^5 ถึง 1 x 10^9 เซลต่อตารางเซนติเมตร



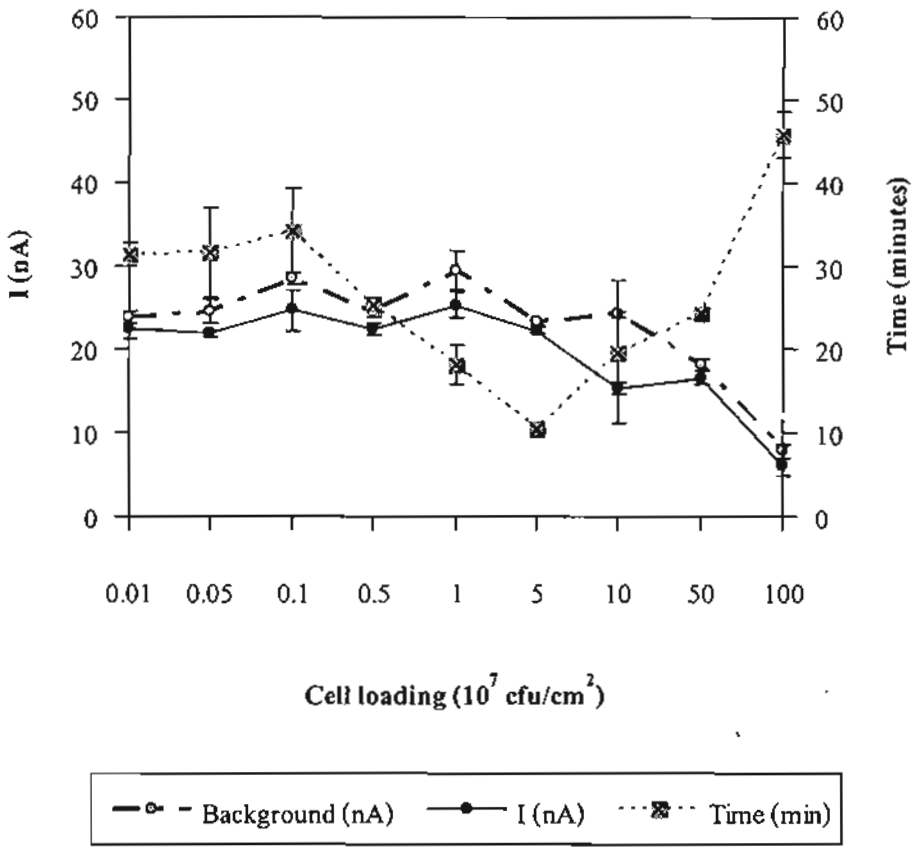
รูปที่ ผ.2 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซล *Bacillus* sp.B_6 ปริมาณ 1 x 10^5 ถึง 5 x 10^8 เซลต่อตารางเซนติเมตร



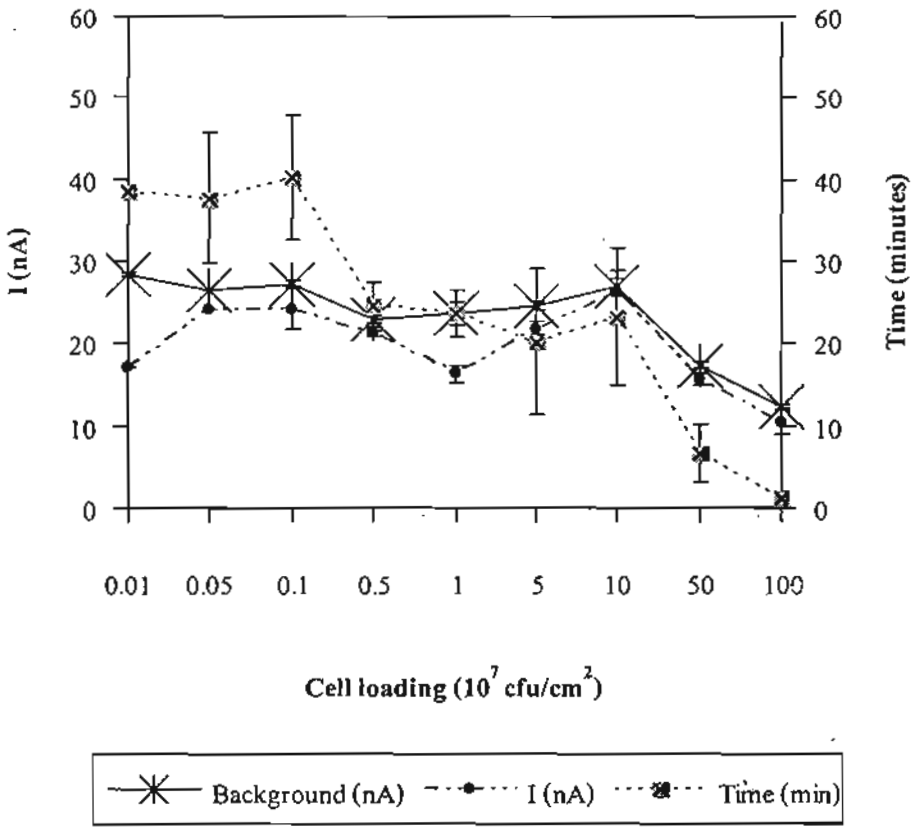
รูปที่ ผ.3 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซล Unidentified bacteria UN_{10}ปริมาณ 1 x 10^5 ถึง 5 x 10^8 เซลต่อตารางเซนติเมตร



รูปที่ ผ.4 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซล Unidentified bacteria UN_{11}ปริมาณ 1 x 10^5 ถึง 5 x 10^9 เซลต่อตารางเซนติเมตร



รูปที่ ผ.5 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซล Enteric bacteria E_9ปริมาณ 1 x 10^5 ถึง 1 x 10^9 เซลต่อตารางเซนติเมตร



รูปที่ ผ.6 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซลยีสต์ Y_1 ปริมาณ 1×10^5 ถึง 1×10^9 เซลต่อตารางเซนติเมตร

ตารางที่ ผ.1 ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เมื่อใช้สารอาหารต่าง ๆ เป็นแหล่งอาหาร

	CARBOHYDRATES								AMINO ACIDS										ALCOHOLS							ORGANIC ACIDS				
	Glucose	Fructose	Maltose	Mannose	Xylose	Lactose	Sucrose	Starch	Glutamic	Phenylalanin	Serine	Cysteine	Arginine	Aspartic	Glycine	Histidine	Methionine	Lysine	Methanol	Ethanol	Propanol	Butanol	Glycerol	Mannitol	Sorbitol	Citric acid	Malic acid	Succinic	Acetic acid	Lactic acid
	INCUBATION TIME (days)																													
Isolate	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2
Unidentified																														
bacteria																														
UN_1	1 1	1 2	1 2	2 2	1 1	1 2	1 2	2 2	1 2	1 2	1 1	2 2	2 3	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	2 2	2 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
UN_2	1 1	1 1	1 1	2 2	1 2	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
UN_3	1 1	1 1	1 2	1 2	1 1	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	1 2	1 2	1 1	2 2	1 1	1 2	1 1	1 1	1 2	1 1	1 2	2 2	2 3	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	2 2
UN_4	1 1	2 2	1 2	2 2	1 1	1 1	1 2	2 2	2 2	2 2	2 2	3 2	3 3	3 2	3 2	2 2	2 1	1 2	2 1	1 1	2 2	3 1	1 1	1 2	3 2	3 1	2 1	1 1	1 1	1 1
UN_5	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	2 2	2 2	2 3	2 3	1 2	1 2	2 2	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
UN_6	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	2 2	1 2	1 2	1 1	1 2	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
UN_7	1 1	1 2	1 2	2 2	1 1	1 1	2 2	2 2	1 1	1 1	1 1	1 2	2 2	1 2	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2
UN_8	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
UN_9	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 2	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
UN_{10}	3 3	3 3	2 3	2 2	2 2	1 2	1 2	2 2	2 2	2 2	2 3	1 2	3 3	2 3	1 1	2 2	2 2	2 3	1 1	2 2	2 2	1 1	1 1	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	2 2	1 2
UN_{11}	2 2	3 3	2 2	2 3	2 3	1 2	2 3	2 2	1 2	1 2	2 3	2 3	2 2	2 2	1 1	1 2	1 2	2 3	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
UN_{12}	1 1	2 2	1 1	1 2	1 2	1 1	1 2	1 2	1 1	1 2	1 1	1 1	2 2	1 2	1 1	2 2	1 1	1 1	1 1	2 2	2 1	2 2	1 1	1 2	1 2	1 1	1 2	1 1	1 2	1 1

ตารางที่ ผ.1 (ต่อ)

	CARBOHYDRATES																AMINO ACIDS																				ALCOHOLS												ORGANIC ACIDS									
	Glucose		Fructose		Maltose		Mannose		Xylose		Lactose		Sucrose		Starch		Glutamic		Phenylalanin		Serine		Cysteine		Arginine		Aspartic		Glycine		Histidine		Methionine		Lysine		Methanol		Ethanol		Propanol		Butanol		Glycerol		Mannitol		Sorbitol		Citric acid		Malic acid		Succinic		Acetic acid		Lactic acid	
	INCUBATION TIME (days)																																																												
Isolate	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Enteric																																																													
bacteria																																																													
E_1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	3	2	3	1	2	1	2	1	1	1	1	2	3	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	3	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2
E_2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
E_3	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E_4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E_5	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E_6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
E_7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1
E_8	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E_9	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	3	2	3
E_{10}	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2
E_{11}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางที่ ผ.1 (ต่อ)

	CARBOHYDRATES								AMINO ACIDS										ALCOHOLS							ORGANIC ACIDS				
	Glucose	Fructose	Maltose	Mannose	Xylose	Lactose	Sucrose	Starch	Glutamic	Phenylalanin	Serine	Cysteine	Arginine	Aspartic	Glycine	Histidine	Methionine	Lysine	Methanol	Ethanol	Propanol	Butanol	Glycerol	Mannitol	Sorbitol	Citric acid	Malic acid	Succinic	Acetic acid	Lactic acid
	INCUBATION TIME (days)																													
Isotate	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2
Bacillus sp.																														
B_1	2 2	1 1	2 2	1 1	1 1	1 1	2 3	2 2	1 1	1 1	1 2	1 1	2 2	1 2	1 2	1 2	1 1	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2
B_2	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	2 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
B_3	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
B_4	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
B_5	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 2	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	2 3	2 3	2 3	2 3	2 3
B_6	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	3 3	2 2	2 2	2 3	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
B_7	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 2	1 2	1 1	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
B_8	1 1	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	2 2	2 2	2 2	2 2	1 2	1 2	2 2	2 2	2 2	1 2	1 2	2 2	1 1	1 2	1 1	2 2	1 1	2 2	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
B_9	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	2 2	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
B_{10}	2 2	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	2 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
B_{11}	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
B_{12}	2 2	2 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	2 2	1 2	1 1	2 2	1 1	2 2	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	2 2	1 2	1 2	1 1	2 2

ตารางที่ ผ.1 (ต่อ)

	CARBOHYDRATES																AMINO ACIDS																				ALCOHOLS														ORGANIC ACIDS									
	Glucose		Fructose		Maltose		Mannose		Xylose		Lactose		Sucrose		Starch		Glutamic		Phenylalanin		Serine		Cysteine		Arginine		Aspartic		Glycine		Histidine		Methionine		Lysine		Methanol		Ethanol		Propanol		Butanol		Glycerol		Mannitol		Sorbitol		Citric acid		Malic acid		Succinic		Acetic acid		Lactic acid	
	INCUBATION TIME (days)																																																													
Isolate	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Bacillus sp.																																																														
B_{13}	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{14}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{15}	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{16}	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{17}	2	2	2	2	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{18}	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{19}	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{20}	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{21}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{22}	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{23}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B_{24}	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2

ตารางที่ ผ.1 (ต่อ)

	CARBOHYDRATES																AMINO ACIDS																				ALCOHOLS												ORGANIC ACIDS									
	Glucose		Fructose		Maltose		Mannose		Xylose		Lactose		Sucrose		Starch		Glutamic		Phenylalanin		Serine		Cysteine		Arginine		Aspartic		Glycine		Histidine		Methionine		Lysine		Methanol		Ethanol		Propanol		Butanol		Glycerol		Mannitol		Sorbitol		Citric acid		Malic acid		Succinic		Acetic acid		Lactic acid	
	INCUBATION TIME (days)																																																												
Isolate	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Pseudomonas sp.																																																													
P_1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
P_2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P_3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
P_4	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1
P_5	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
P_6	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2
P_7	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	3	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	1	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
P_8	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	1	2	1	1	3	3	3	3	2	3	2	3	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
P_9	2	3	2	3	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	1	2	3	2	3	2	3	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	3	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางที่ ผ.1 (ต่อ)

	CARBOHYDRATES																AMINO ACIDS																				ALCOHOLS														ORGANIC ACIDS									
	Glucose		Fructose		Maltose		Mannose		Xylose		Lactose		Sucrose		Starch		Glutamic		Phenylalanin		Serine		Cysteine		Arginine		Aspartic		Glycine		Histidine		Methionine		Lysine		Methanol		Ethanol		Propanol		Butanol		Glycerol		Mannitol		Sorbitol		Citric acid		Malic acid		Succinic		Acetic acid		Lactic acid	
	INCUBATION TIME (days)																																																													
Isotate	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Yeast																																																														
Y_1	3	3	3	3	2	2	2	2	1	2	1	1	3	3	1	2	2	3	2	3	2	3	2	3	2	2	3	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	3	1	2	2	3
Y_2	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	3	1	1	2	2	2	2	2	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Y_3	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Y_4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acid tolerant																																																														
bacteria																																																														
AB_1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB_2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB_3	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	3	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB_4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

เมื่อ 1 หมายถึงเชื้อจุลินทรีย์เจริญได้เล็กน้อย มีความขุ่นน้อยกว่า 0.4 McFarland standard

2 หมายถึงเชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ปานกลาง มีความขุ่นในช่วง 0.4 – 0.75 McFarland standard

3 หมายถึงเชื้อจุลินทรีย์เจริญได้มาก มีความขุ่นมากกว่า 0.75 McFarland standard

ผนวก 2 ผลการวิเคราะห์ค่าบีโอดีของสารละลายบีโอดีมาตรฐาน

ตารางที่ ผ.2 ผลการวิเคราะห์ค่าบีโอดีของสารละลายบีโอดีมาตรฐาน (glucose-glutamic acid standard solution GGA solution) ด้วยวิธีมาตรฐาน APHA-BOD_5เปรียบเทียบกับหัววัดจุลินทรีย์

ตัวอย่าง	BOD_5 (mg/L)	BOD_{sensor} (mg/L)
GGA ความเข้มข้น 20 mg/L	19.2	25.1
GGA ความเข้มข้น 40 mg/L	38.4	44.4
GGA ความเข้มข้น 60 mg/L	54.4	59.3
GGA ความเข้มข้น 80 mg/L	76	76.8

ผนวก 3 การทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบการวัดตัวอย่างระหว่างหัววัดจุลินทรีย์กับวิธีมาตรฐาน

การทดสอบค่าเฉลี่ย 2 กลุ่มที่สัมพันธ์กัน

ใช้กับรูปแบบการวิจัยลักษณะ Matching design หรือต้องการเปรียบเทียบผลจากการวัดด้วยเครื่องมือคนละชนิดกัน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องมือ การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องคำนวณค่า

d คือ ความแตกต่างของข้อมูลระหว่างการวัดทั้ง 2 ครั้ง

S_d คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง

μ_d คือ ค่าเฉลี่ยของประกรมาตรฐาน

สถิติที่ใช้ทดสอบคือ Paired test โดยโปรแกรม SPSS โดยมีสมมติฐานดังนี้

$H_0 : \mu_d = 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัดไม่แตกต่างกัน

$H_1 : \mu_d \neq 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัดแตกต่างกัน

สูตรที่ใช้ทดสอบคือ $t = \dfrac{\bar{d} - \mu_d}{S_d / \sqrt{n}}$

การทดสอบทางสถิติจะแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มตัวอย่างจากโรงงานสุราและเบียร์
2. กลุ่มตัวอย่างจากโรงงานน้ำอัดลมและชาเขียว
3. กลุ่มตัวอย่างจากโรงงานผลไม้กระป๋อง

ผลการทดสอบมีดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่างจากโรงงานสุราและเบียร์

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	BOD5	4980.7143	7	7315.8120	2765.1170
	BODS	2480.5814	7	3643.1213	1376.9704

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	BOD5 & BODS	7	.995	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference Lower	Upper			
Pair 1	BOD5 - BODS	2500.1329	3709.1296	1401.9192	-930.2399	5930.5056	1.783	6	.125

สถิติที่ใช้ทดสอบคือ Paired-Sample t-test

H_0 : $\mu_d = 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 วิธีไม่แตกต่างกัน

H_1 : $\mu_d \neq 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 วิธีแตกต่างกัน

ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 หรือ $\alpha = 0.05$

จากการคำนวณด้วยโปรแกรม SPSS แล้วพิจารณาค่า P สรุปได้ว่า $P = 0.125 > \alpha = 0.05$

รับ H_1 แสดงว่าค่าที่ได้จากการวัดไม่แตกต่างกัน

2. กลุ่มตัวอย่างจากโรงงานเครื่องดื่มน้ำอัดลมและชาเขียว

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	BOD5	558.5000	6	872.4608	356.1806
	BODS	142.7833	6	171.9163	70.1845

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	BOD5 & BODS	6	.957	.003

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference Lower	Upper			
Pair 1	BOD5 - BODS	415.7167	709.7309	289.7464	-329.1002	1160.5335	1.435	5	.211

สถิติที่ใช้ทดสอบคือ Paired-Sample t-test

H_0 : $\mu_d = 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 วิธีไม่แตกต่างกัน

H_1 : $\mu_d \neq 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 วิธีแตกต่างกัน

ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 หรือ $\alpha = 0.05$

จากการคำนวณด้วยโปรแกรม SPSS แล้วพิจารณาค่า P สรุปได้ว่า $P = 0.211 > \alpha = 0.05$

รับ H_0 แสดงว่าค่าที่ได้จากการวัดไม่แตกต่างกัน