บทที่ 2

ทฤษฎีและแนวความคิด

2.1 กระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ

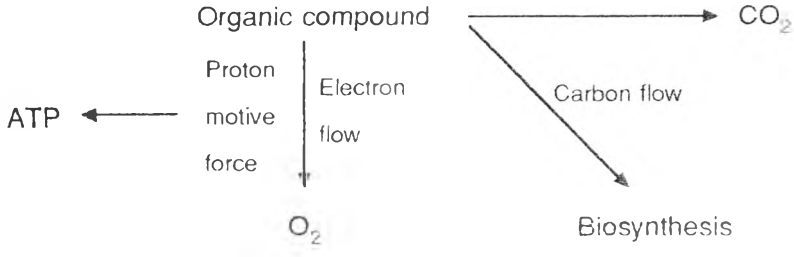
2.1.1 ลักษณะทั่วไป

ปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ที่เกิดขึ้นในการบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลชีพ เป็นปฏิกิริยาเคมีแบบออกซิเดชัน-รีดักชัน หรือปฏิกิริยารีดอกซ์ นั่นคือ ปฏิกิริยาที่มีการถ่ายเทอิเลกตรอนเกิดขึ้นระหว่างสารให้อิเลกตรอน (electron donor) และสารรับอิเลกตรอน (electron acceptor) ในระบบชีวเคมี ปฏิกิริยารีดอกซ์ส่วนใหญ่ไม่เพียงแต่จะเกี่ยวข้องกับการถ่ายเท อิเลกตรอนเท่านั้นแต่รวมไปถึงไฮโดรเจนอะตอมด้วย เมื่อมีการให้อิเลกตรอนเกิดขึ้น จะเป็นการให้อิเลกตรอนผ่านอะตอมของไฮโดรเจน และไฮโดรเจนอะตอมจะกลายเป็นโปรตอนหรือไฮโดรเจนอิออน (H^+) สารให้อิเลกตรอนในน้ำเสียจะเป็นพวกสารอินทรีย์หรือสารมลพิษในน้ำเสีย ถือเป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการหายใจ (respiration) ของจุลชีพ โดยกระบวนหายใจแบบใช้อากาศ (aerobic respiration) จุลชีพจะใช้ออกซิเจนอิสระ (O_2) เป็นสารรับอิเลกตรอนสุดท้าย (terminal electron acceptor) ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนกระบวนการหายใจแบบไร้อากาศ (anaerobic respiration) จะแตกต่างจากกระบวนการหายใจแบบใช้อากาศตรงที่จุลชีพจะใช้สารอื่นๆ ที่ไม่ใช่ออกซิเจนอิสระเป็นสารรับอิเลกตรอนแทน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไนเทรต ซัลเฟต และสารอินทรีย์บางชนิดได้ ความแตกต่างในการออกซิเดชันสารอินทรีย์ระหว่างกระบวนการหายใจแบบใช้อากาศและไร้อากาศแสดงในรูปที่ 2.1

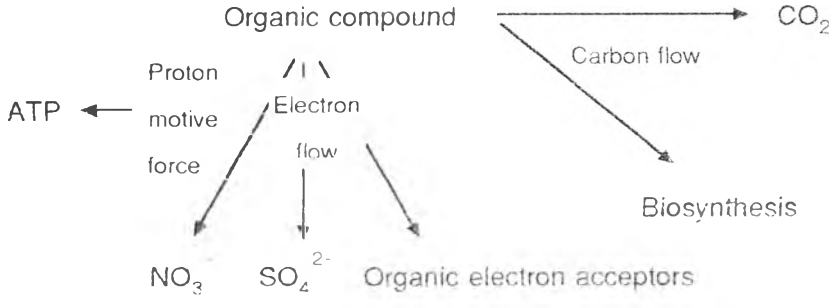
นอกจากกระบวนการหายใจทั้ง 2 แบบที่ได้กล่าวไปข้างต้นแล้วนั้น ยังมีปฏิกิริยาที่มีการออกซิเดชันสารอินทรีย์และให้พลังงานกับเซลอีกประเภทหนึ่งที่ควรจะกล่าวถึง คือ การหมัก (fermentation) เป็นปฏิกิริยารีดอกซ์ที่ค่อนข้างแตกต่างจากกระบวนการหายใจทั้ง 2 แบบ คือเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีสารรับอิเลกตรอนสุดท้าย จุลชีพจะออกซิไดซ์สารอินทรีย์เริ่มต้นเพียงบางส่วนในขั้นตอนการออกซิเดชัน จากนั้นสารอินทรีย์ที่ถูกออกซิไดซ์แล้วนี้จะกลายเป็นสารรับอิเลกตรอนในขั้นตอนการรีดักชันที่เกิดตามมา และกลายเป็นสารอินทรีย์ชนิดใหม่ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ความสามารถของจุลชีพนี้เรียกว่า *internal balanced* กระบวนการหมักนี้ทำให้มีการปลดปล่อยพลังงานจากสารอินทรีย์ได้เพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เพราะการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ที่ไม่สมบูรณ์นั่นเอง การหมักมีความสำคัญมากในขั้นตอนการสร้างกรดของแบคทีเรียในกระบวนการไร้อากาศ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก) Aerobic respiration

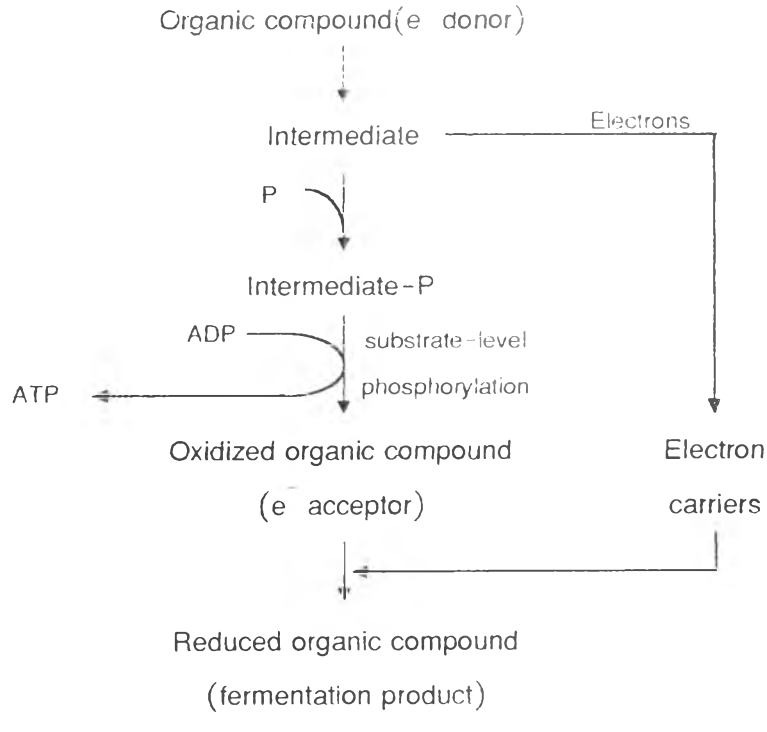


(ข) Anaerobic respiration



รูปที่ 2.1 วิถีของอิเลกตรอนและคาร์บอนในกระบวนการหายใจ

(Madigan et al., 1997)



รูปที่ 2.2 วิถีของอิเลกตรอนและคาร์บอนในกระบวนการหมัก **(Madigan et al., 1997)**

2.1.2 กลไกการย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบไร้อากาศ

กระบวนการไร้อากาศเกี่ยวข้องกับจุลชีพหลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กัน โดยเฉพาะแบคทีเรีย ซึ่งมีหน้าที่เปลี่ยนรูปสารโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ เพราะความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกันของแบคทีเรียหลายกลุ่มทำให้สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีหลายชนิด ดังสมการข้างล่าง

$$\text{Organic matter} \longrightarrow CH_4 + CO_2 + H_2 + NH_3 + H_2S$$

ถึงแม้จะมีจุลชีพชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับระบบไร้อากาศ แต่เป็นที่แน่ชัดว่าจุลชีพหลักคือแบคทีเรียหลายหลากชนิดที่เกี่ยวข้องทั้งกระบวนการไฮโดรไลซิส การหมัก และการหายใจ

การเปลี่ยนแปลงสารอาหารโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นสารผลิตภัณฑ์ เช่น ก๊าซมีเทน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้สภาวะไร้อากาศนั้น มีกลไกอยู่ 4 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 *HYDROLYSIS*

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส คือ ปฏิกิริยาที่แตกสาร 1 โมเลกุลใหญ่เป็นสารโมเลกุลเล็ก 2 โมเลกุลขึ้นไป โดยรวมกับโมเลกุลของน้ำ นั่นคือ แบคทีเรียจะย่อยสารประกอบอินทรีย์ซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ให้กลายเป็นสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลเล็กสามารถละลายน้ำและดูดซึมเข้าสู่เซลของแบคทีเรียได้ เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล กรดไขมัน โดยแบคทีเรียพวก Acidogens จะปล่อยสารเอนไซม์ออกมาภายนอกเซล (extracellular enzyme) เรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า hydrolytic enzymes หรือ hydrolases น้ำย่อยนอกเซลที่เหมาะกับสารอินทรีย์เฉพาะ เช่น แป้งและไกลโคเจน ต้องใช้เอนไซม์ amylase ส่วนไขมันและไลปิด (lipids) ใช้เอนไซม์ lipase และ esterases โปรตีนต้องใช้เอนไซม์ protease ส่วน amino acid และ lysine ต้องใช้ trypsin เป็นต้น ขั้นตอนนี้ดำเนินไปค่อนข้างช้า ถ้าสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่เป็นสารที่มีความซับซ้อน ขั้นตอนนี้ก็จะใช้เวลามากขึ้นไปอีก ดังนั้น ขั้นตอนนี้จึงเป็นขั้นตอนที่กำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาในระบบไร้อากาศ อัตราเร็วและความสมบูรณ์ของขั้นตอนนี้ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างเช่น อุณหภูมิ เวลากักน้ำ และค่าพีเอช

ขั้นที่ 2 *ACIDOGENESIS*

ผลผลิตจากขั้นตอนที่ 1 จะได้เป็น กรดอะมิโน น้ำตาล และกรดไขมัน แล้วแต่ชนิดสารอินทรีย์ จะถูกแบคทีเรียกลุ่มเดียวกับในขั้นตอนที่ 1 คือ พวก Acidogenic organisms ดูดซึมเข้าไปภายในเซล เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของเซล โดยผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) ภายในเซล และเปลี่ยนเป็นกรดไขมันระเหย (volatile fatty acid) เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิออนิก กรดบิวทิริก หรือพวกแอลกอฮอล และคีโตน เป็นต้น ผลผลิตที่ได้จะเป็นสารอะไรบ้างนั้นขึ้นอยู่กับชนิดสารอินทรีย์ ชนิดแบคทีเรีย และความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนในขณะนั้น ตัวอย่างเช่น การย่อยสลายน้ำตาลเป็นกรดอะซิติกโดยผ่านวิถีชีวเคมีที่เรียกว่า Emden-Meyerhof Pathway ดังสมการข้างล่างนี้

ความดันพาร์เชียลไฮโดรเจนต่ำ :

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH$ (butyric acid) $+ 2CO_2 + 2H_2$

ความดันพาร์เชียลไฮโดรเจนสูง :

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2COOH$ (propionic acid) $+ CH_3COOH + CO_2 + H_2$

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH$ (butyric acid) $+ 2CO_2 + 2H_2$

ส่วนกรดไขมันชนิดยาว (long chain fatty acid) จะเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกและไฮโดรเจน ภายใต้สภาวะความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนมีค่าต่ำ และเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนมีค่าสูงจะย่อยสลายกลายเป็นกรดโพรพิออนิกและกรดบิวทิริก การเปลี่ยนแปลงกรด ไขมันชนิดยาวจะผ่านวิถีชีวเคมีของกระบวนการ β-oxidation

ขั้นที่ 3 *ACETOGENESIS*

กรดไขมันระเหยที่ผลิตขึ้นในขั้นตอนที่ 2 นั้น จะเป็นอาหารให้กลุ่มแบคทีเรียที่ทำหน้าที่สร้างมีเทนต่อไป แต่เนื่องจากแบคทีเรียที่สร้างมีเทนไม่สามารถใช้กรดไขมันระเหยที่มีคาร์บอนมากกว่า 2 อะตอม เช่น กรดบิวทิริก กรดโพรพิออนิก เป็นสารอาหารได้ จึงต้องอาศัยแบคทีเรียอะซิโตเจน (สร้างไฮโดรเจนได้) ทำการย่อยสลายกรดไขมันที่มีคาร์บอนมากกว่า 2 อะตอมให้กลายเป็นกรดอะซิติกเพื่อให้แบคทีเรียสร้างมีเทนนำไปใช้ต่อไป แบคทีเรียกลุ่มนี้เช่น พวก *Syntrobacter wolinii* และ *Syntrophomonas wolfei* จะเปลี่ยนกรดไขมันระเหยให้กลายเป็นกรดอะซิติก กาซไฮโดรเจน และ คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการ

สภาพแวดล้อมที่มีความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนมีค่าต่ำเท่านั้น ถ้าความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนมีค่าสูงจะทำให้กรดอะซิติกสามารถรวมกับก๊าซไฮโดรเจนกลับไปเป็นกรดโพรพิออนิก กรดบิวทิริก หรือ เอทานอลได้

เอทานอล กรดโพรพิออนิก และกรดบิวทิริก ถูกย่อยสลายกลายเป็นกรดอะซิติกด้วยแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ดังสมการข้างล่างดังต่อไปนี้

$$CH_3CH_2OH + CO_2 \longrightarrow CH_3COOH + 2H_2$$

$$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$$

$$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$$

ขั้นที่ 4 *METHANOGENESIS*

แบคทีเรียชนิดที่สร้างมีเทนเป็นชนิดไร้ออกซิเจนอย่างเด็ดขาด ใช้สารอาหารจำเพาะเจาะจง Fenchel และคณะ (1995) ได้แบ่งสารอาหารของแบคทีเรียสร้างมีเทนออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในที่นี้รวมถึง กรดฟอร์มิก (HCOOH) และคาร์บอนมอนนอกไซด์ (CO) โดยมีก๊าซไฮโดรเจน (H_2) เป็นสารให้อิเลกตรอน

2) สารประกอบที่มีกลุ่มเมทิล ($-CH_3$) เป็นองค์ประกอบ และเป็นเพียงคาร์บอนอะตอมเดียวในโมเลกุล เช่น เมทานอล (CH_3OH) เมทิลลามีน ($CH_3NH_3^+$) ฯลฯ

3) กรดอะซิติก (CH_3COOH)

Gottschalk (1988) ได้แบ่งแบคทีเรียที่สร้างมีเทนตามการใช้สารอาหารดังนี้

1) **Obligate chemolithotrophic methanogens** คือ พวกที่ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน ในการสร้างมีเทนดังสมการ

$$CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$$

นอกจากนี้ ยังสามารถใช้สารอาหารอื่นได้อีกเช่น กรดฟอร์มิกและคาร์บอนมอนนอกไซด์ ทั้งนี้เพราะสารทั้ง 2 ตัวนี้จะถูกแบคทีเรียชนิดนี้ใช้โดยผ่านการเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนก่อน ดังสมการ

$$4HCOOH \longrightarrow 4CO_2 + 4H_2$$
$$CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$$
$$4HCOOH \longrightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$$

และ $$4CO + 2H_2O \longrightarrow CH_4 + 3CO_2$$

เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นสารให้อิเลกตรอนในการสร้างมีเทน จึงช่วยลดความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนให้ลดต่ำลงได้ แบคทีเรียชนิดนี้จึงอาจเรียกเป็น Hydrogenotrophic methanogens ได้

2) **Methylotrophic methanogens** คือ แบคทีเรียสร้างมีเทนที่ใช้สารอาหารที่มีกลุ่มเมทิลเป็นองค์ประกอบอยู่ เช่น เมทานอล เมทิลลามีน กรดอะซิติก สำหรับการใช้กรดอะซิติกเป็นสารอาหาร เป็นดังสมการข้างล่างนี้

$$CH_3COOH \longrightarrow CH_4 + CO_2$$

ในขณะที่แบคทีเรียเช่นพวก *Methanosarcrina barkeri* ใช้สารอาหารพวกเมทานอล หรือ เมทิลลามีน จะเปลี่ยนสารอาหาร 1 ใน 4 ส่วน ให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อีก 3 ส่วน จะเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทน ดังสมการข้างล่างนี้

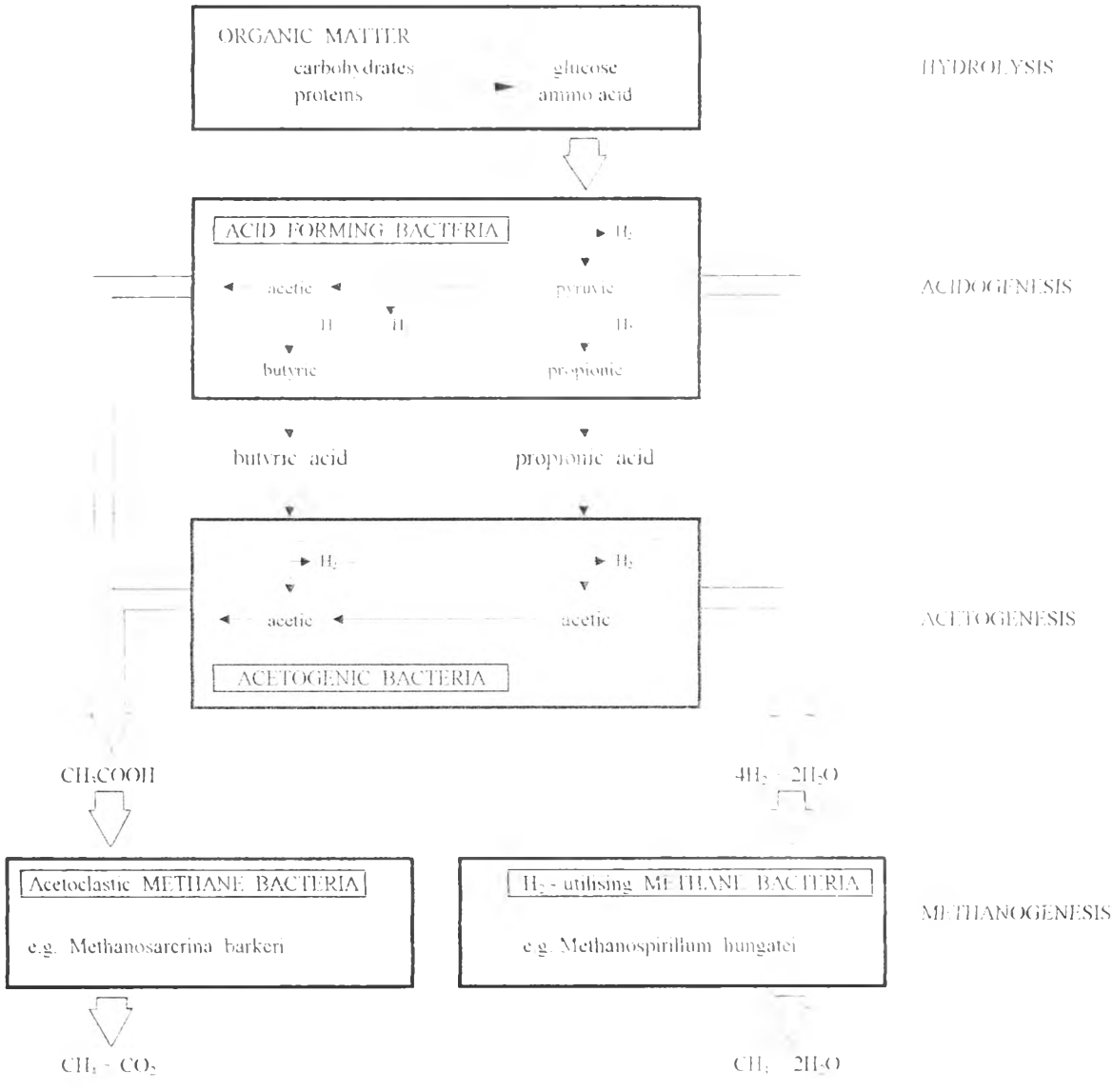
$$CH_3OH + H_2O \longrightarrow CO_2 + 6H$$
$$3CH_3OH + 6H \longrightarrow 3CH_4 + 3H_2O$$
$$4CH_3OH \longrightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$$

หรือ $$4(CH_3)_3\text{-}N + 6H_2O \longrightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_3$$

ก๊าซมีเทนที่ได้จากสารอาหารประเภทนี้จะสร้างจากกลุ่มเมทิลในสารอาหาร จากการทดสอบโดยใช้อะตอมของดิวทีเรียม (Deuterium, D) แทนอะตอมของไฮโดรเจนในกลุ่มเมทิล ดังสมการ

$$CD_3OH \xrightarrow{\text{fermentation}} CD_3H$$

อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนการสร้างมีเทนในกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศนั้น สารอาหารส่วนใหญ่ยังคงเป็น ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ กรดอะซิติก ดังนั้น ขั้นตอนของปฏิกิริยาไร้อากาศทั้ง ๆ นั้น จึงแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาไร้อากาศ (Mosey, 1982)

2.1.3 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ

2.1.3.1 แบคทีเรียสร้างกรด (Acidogenic Bacteria)

ในขั้นตอนการสร้างกรดของกระบวนการไร้อากาศ กรดจะผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียพวก obligate anaerobes มากกว่า พวก facultative ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียพวกแรกมีจำนวนมากกว่า แบคทีเรีย obligate anaerobes ที่มีบทบาทในการสร้างกรดไขมันระเหย ก็คือกลุ่ม *Clostridium* แบคทีเรียกลุ่มนี้มีเมตาบอลิซึมหลายแบบ จึงสามารถใช้สารอาหารทั้งที่เป็นพวก polysaccharides หรือ โปรตีนได้ ผลปฏิกิริยาที่ได้จึงมีหลายชนิดต่างๆ ไป เช่น กรดบิวทิริก กรดอะซิติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจน เอทานอล บิวทานอล อะซีโตน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียในกลุ่ม *Propionibacterium* ที่ผลิตกรดโพรพิออนิก และกรดอะซิติก จากกรดแลกติก (Fenchel, 1995 และ Madigan, 1997)

2.1.3.2 แบคทีเรียสร้างกรดอะซิติก (Acetogenic Bacteria)

เมื่อผลผลิตจากแบคทีเรียสร้างกรดมีหลายชนิดดังที่กล่าว และบางชนิดยังเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่แบคทีเรียสร้างมีเทนไม่สามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารได้ ดังนั้น จึงต้องมีการเปลี่ยนสารเหล่านั้นให้กลายเป็นสารอาหารอย่างง่ายสำหรับแบคทีเรียที่สร้างมีเทน ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนกรดไขมันระเหยโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นกรดอะซิติก ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้นั้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

1) Homoacetogenic Bacteria

เป็นแบคทีเรียที่ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารรับอิเลกตรอน และผลิตกรดอะซิติกขึ้นมา (เป็นกระบวนการหายใจแบบไร้อากาศ) ผ่านวิถีที่เรียกว่า Acetyl-CoA pathway แบคทีเรียชนิดนี้ เช่น *Acetobacterium woodii* และ *Clostridium aceticum* สามารถเจริญเติบโตทั้งในแบบออโทโทรฟิก (autotrophic) คือใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารรับอิเลกตรอนและแหล่งคาร์บอนและใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นสารให้อิเลกตรอน เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก อีกทั้งเจริญเติบโตในแบบเฮเทอโรโทรฟิก (Heterotrophic) ก็ได้ โดยการหมักน้ำตาลดังสมการข้างล่าง

$$2CO_2 + 4H_2 \xrightarrow{\text{autotrophic bacteria}} CH_3COOH + 2H_2O$$

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{heterotrophic bacteria}} 3CH_3COOH$$

จะเห็นว่าแบคทีเรียพวก *Clostridium* มีอยู่ทั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดทั่วไป (Acidogenic Bacteria) และกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก (Acetogeneic Bacteria) ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียกลุ่มนี้มีเมตาบอลิซึมหลายแบบดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียบางกลุ่มในจีนัส *Clostridium* (Medigan et al., 1997)

Key chracteristics	Other characteristics	Species
I. Ferment carbohydrates		
Ferment cellulose	Fermentation products: acetate,lactate, succinate, ethatnol, CO_2, H_2	*C. cellobioparum* *C. thermocellum*
Ferment sugars, starch, and pectin	Fermentation products: acetone, butanol, ethanol, isopropanol, butyrate, acetate, propionate, succinate, CO_2, H_2; some fix N.	*C. butyricum* *C. acetobutylicum* *C. pasteurianum* *C. perfringens* *C. thermosulfurogenes*
Ferment sugars primarily to acetic acid	Total synthesis of acetate from CO_2; cytochromes present in some species	*C. aceticum* *C. thermoaceticum* *C. formicoaceticum*
Ferments only pentoses or methylpentoses	Ring-shaped cells form left-handed, helical chains; fermentation products: acetate, propionate, *n*-propanol, CO_2, H_2	*C. methylpentosum*
II. Ferment proteins or amino acids	Fermentation products: acetate, other fatty acids, NH_3, CO_2, sometimes H_2; some also ferment sugars to butyrate and acetate; may produce exotoxins Ferments three-carbon compounds to propionate, acetate and CO_2	*C. sporogenes* *C. tetani* *C. botulinum* *C. tetanomorphum* *C. propionicum*
III. Ferments carbohydrates or amino acids	Fermentation products from glucose: acetate, formate, small amounts of isobutyrate and isovalerate	*C. bifermentans*
IV. Purine fermenters	Ferments uric acid and other purines, forming acetate, CO_2, NH_3	*C. acidurici*
V. Ethanol fermentation to fatty acids	Produces butyrate, caproate, and H_2; requires acetate as electron acceptor; does not use sugars, amino acids, or purines	*C. kluyveri*

2) H_2-producing Acetogenic Bacteria

แบคทีเรียชนิดนี้จะใช้กรดไขมันระเหย (ที่ไม่ใช่กรดอะซิติก) หรือแอลกอฮอลล์เป็นสารอาหาร แล้วสร้างกรดอะซิติกและก๊าซไฮโดรเจนขึ้นมา ซึ่งเป็นสารอาหารของแบคทีเรียสร้างมีเทน ดังนั้นแบคทีเรียชนิดนี้จึงมีบทบาทสำคัญ เพราะเป็นตัวเชื่อมระหว่างแบคทีเรียสร้างกรดกับแบคทีเรียสร้างมีเทน อย่างไรก็ดี แบคทีเรียชนิดนี้จะเจริญเติบโตได้ไม่ดีเมื่ออยู่ตามลำพัง ทั้งนี้เพราะก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นมา ถ้าสะสมจะทำให้มีความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนสูง ทำให้ปฏิกิริยาสร้างกรดอะซิติกไม่สามารถเกิดขึ้นได้ การเจริญเติบโตของแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติกนี้จะลดลง ดังนั้น จะเห็นได้ว่า การอยู่รวมกันระหว่างแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติก และสร้างมีเทน ให้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน และต่างก็ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีถ้าอยู่เพียงลำพัง นั่นคือ แบคทีเรียสร้างกรดอะซิติกจะสร้างอาหารให้แก่แบคทีเรียที่สร้างมีเทน ส่วนแบคทีเรียที่สร้างมีเทนก็ช่วยทำลายก๊าซไฮโดรเจนให้กับแบคทีเรียที่สร้างกรด

แบคทีเรียชนิดนี้จะอยู่ในกลุ่ม *Synthrophomonas* และกลุ่ม *Synthrophobacter* โดยแบคทีเรีย*Synthrophomonas wolfei* จะย่อยกรดไขมันระเหยที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 4 ถึง 8 อะตอม ให้กลายเป็นกรดอะซิติก ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนแบคทีเรีย *Syntrophobacter wolinii* จะย่อยกรดโพรพิออนิกให้กลายเป็นกรดอะซิติก ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เช่นกัน

2.1.3.3 แบคทีเรียที่สร้างมีเทน (Methanogenesis Bacteria)

ในขั้นตอนการสร้างมีเทน แบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทนจะเป็นแบคทีเรียประเภทที่ไม่อาจทนต่อออกซิเจนได้แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย แบคทีเรียพวกนี้จะเจริญเติบโตช้า และเลือกชนิดของอาหารมาก สารอาหารสำหรับแบคทีเรียสร้างมีเทนมีอยู่ประมาณ 10 ชนิด โดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารอาหารที่มีเกือบทั่วไปในธรรมชาติ และเมื่อแหล่งให้อิเลกตรอนเป็นก๊าซไฮโดรเจน แบคทีเรียสร้างมีเทนพวกนี้จะจัดเป็นพวกจุลินทรีย์ออโทโทรฟิก ที่คาร์บอนไดออกไซด์ทำหน้าที่เป็นทั้งสารรับอิเลกตรอนและแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ ยังมีสารอาหารอีกหลายตัวที่เป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับคาร์บอนไดออกไซด์ได้อีก ดังแสดงในตารางที่ 2.2

กล่าวได้ว่า การสร้างมีเทนจากก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถจัดเป็นการหายใจแบบไร้อากาศได้ โดยมีคาร์บอนไดออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารรับอิเลกตรอน อย่างไรก็ตาม การศึกษาทางชีวเคมีของกระบวนการสร้างมีเทน พบว่า แบคทีเรียสร้างมีเทนที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารอาหาร ไม่มีสารจำพวก cytochromes

และ quinones ซึ่งเป็นสารจำเป็นในระบบขนส่งอิเลกตรอนทั่วไป ถึงกระนั้น การขนส่งอิเลกตรอนในกระบวนการสร้างมีเทนจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นี้ ก็ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันอย่างชัดเจนนักจนถึงปัจจุบัน ทั้งนี้เพราะกระบวนการนี้ต้องการสารโคเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับ methanogens เท่านั้น เพื่อทำหน้าที่ช่วยสารเอนไซม์ในการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์เป็นก๊าซมีเทน

ตารางที่ 2.2 สารอาหารสำหรับแบคทีเรียสร้างมีเทน (Medigan et.al.,1997 ; Fenchel and Finlay,1995)

กลุ่มคาร์บอนไดออกไซด์
Carbon dioxide, CO_2 (with electrons derived from H_2)
Formate, $HCOO^-$
Carbon monoxide, CO
กลุ่มสารประกอบเมทิล
Methanol, CH_3OH
Methylamine, $CH_3NH_3^+$
Dimethylamine, $(CH_3)_2NH_2^+$
Trimethylamine, $(CH_3)_3NH^+$
Methylmercaptan, CH_3SH
Dimethylsulfide, $(CH_3)_2S$
กลุ่มกรดอะซิติก
Acetate, CH_3COO^-

แบคทีเรียสร้างมีเทนหลายชนิดได้ถูกค้นพบและสามารถเพาะแยกเชื้อได้ การศึกษาทั้งทางกายภาพและในระดับโมเลกุล ทำให้สามารถแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้เป็น 7 กลุ่ม รวมทั้งสิ้น 17 จีนัส (Genus) รูปร่างของแบคทีเรียชนิดนี้มีทั้งที่เป็นแท่ง (ทั้ง short rods และ long rods) ทรงกลม (cocci) ที่มีการจัดรูปแบบเซลต่างๆ หรือเป็น plate-shaped รวมทั้งที่เป็นเส้นใย (filamentous) การติดสีมีทั้งแกรมลบและแกรมบวก ดังแสดงในตารางที่ 2.3

พวกแบคทีเรียสร้างมีเทนนี้ จะมีลักษณะเด่นชัดแตกต่างจากพวกโปรคาริโอตทั่วไป ตรงที่มีสารโคเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับแบคทีเรียกลุ่มนี้เท่านั้นอยู่หลายตัว สารโคเอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการชีวเคมีของการสร้างมีเทนมากกว่า NAD^+ หรือ FMN ซึ่งเป็นสารโคเอนไซม์ทั่วไปของพวกโปรคาริโอต สารโคเอนไซม์เหล่านี้มีดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างแบคทีเรียที่สร้างมีเทนและสารอาหารที่ใช้ (Medigan et al., 1997)

Genus	Morphology	Gram reaction	Number of species	Substrates for methanogenesis
Group I				
Methanobacterium	Long rods	+or-	8	H_2+CO_2, formate
Methanobrevibacter	Short rods	+	3	H_2+CO_2, formate
Methanosphaera	Cocci	+	1	Methanol + H_2 (both needed
Group II				
Methanothermus	Rods	+	2	H_2+CO_2; can also reduce S^0
Group III				
Methanococcus	Irregular cocci	-	5	H_2+CO_2, pyruvate + CO_2, formate
Group IV				
Methanomicrobium	Short rods	-	2	H_2+CO_2, formate
Methanogenium	Irregular cocci	-	3	H_2+CO_2, formate
Methanospirillum	Spirilla	-	1	H_2+CO_2, formate
Methanoplanus	Plate-shaped cells occurring as thin plates with sharp edges	-	2	H_2+CO_2, formate
Group V				
Methanosarcina	Large irregular cocci in packets	+	6	H_2+CO_2, methanol, *methylamines, acetate*
Methanolobus	Irregular cocci in aggregates	-	5	Methanol, Methylamines
Methanoculleus	Irregular cocci	-	4	H_2+CO_2, alcohols, formate
Methanohalobium	Irregular cocci	-	1	Methanol, methylamines; halophilic
Methanococcoides	Irregular cocci	-	2	Methanol, methylamines
Methanohalophilus	Irregular cocci	-	3	Methanol, methylamines, methyl sulfides; halophile
Methanothrix (Methanosaeta)	Long rods to filaments	-	3	Acetate
Group VI				
Methanopyrus	Rods in chains	+	1	H_2+CO_2; hyperthermophile, growth at 110°C
Group VII				
Methanopusculum	Irregular cocci	-	3	H_2+CO_2, formate, alcohols

- โคเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งคาร์บอน 1 อะตอม จากสารอาหารจนเป็นมีเทน ได้แก่ สาร methanofuran methanopterin coenzyme M รวมทั้ง coenzyme F_{430}

- โคเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดอกซ์ ได้แก่ coenzyme F_{420} และ HS-HTP (7-mercaptoheptanoyl threonine phosphate)

2.1.3.4 แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต (Sulfate Reducing Bacteria, SRB)

แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตเป็นแบคทีเรียไร้ออกซิเจนชนิดเด็ดขาด ต้องการสภาพไร้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียขนิดเคโมเฮเทอโรโทรป ดำรงชีพและเจริญเติบโตโดยได้รับพลังงานจากปฏิกิริยาทางเคมีในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและสารให้อิเลกตรอน เช่น พวกกรดไขมัน หรือ แอลกอฮอลล์ ลักษณะเด่นของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ การใช้สารประกอบอนินทรีย์ของซัลเฟอร์บางชนิด เช่น ซัลเฟต ซัลไฟต์ หรือไธโอซัลเฟต (ตารางที่ 2.4) เป็นสารรับอิเลกตรอนในการย่อยสลายสารอาหาร แล้วเปลี่ยนสารประกอบซัลเฟอร์นั้นให้อยู่ในรูปซัลไฟด์แทน ซึ่งผลผลิตที่สำคัญคือก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการย่อยสลายแบบไร้อากาศเช่นเดียวกับขั้นตอนการสร้างมีเทน ดังนั้นจึงมักพบแบคทีเรียชนิดนี้รวมกับแบคทีเรียสร้างกรดและแบคทีเรียสร้างมีเทนในระบบไร้อากาศที่ใช้บำบัดน้ำเสียที่มีซัลเฟต ซึ่งความสัมพันธ์ของแบคทีเรียหลายกลุ่มดังที่กล่าวมามีทั้งการพึ่งพาอาศัย และการแข่งขันระหว่างกัน

แบคทีเรียชนิดนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (ตารางที่ 2.5) ตามความสามารถในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์เพื่อการดำรงชีพและการเจริญเติบโตดังนี้

1) แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตชนิดย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ไม่สมบูรณ์ (Incompletely Oxidizing Sulfate Reducing Bacteria, I-SRB) แบคทีเรียชนิดนี้จะใช้สารอาหาร เช่น กรดแลกติก กรดไพรูวิก เอทานอล หรือกรดไขมันบางขนิด โดยสารอินทรีย์ที่เหลือจากการย่อยสลายจะเป็นอะซิเตด เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Desulfovibrio Desulfomonas Desulfotomaculum* และ *Desulfobulbus* เป็นต้น

2) แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตชนิดย่อยสลายสารอินทรีย์ได้สมบูรณ์ (Completely Oxidizing Sulfate Reducing Bacteria, C-SRB) สารอาหารที่ใช้จะเป็นกรดไขมัน โดยเฉพาะกรดอะซิติก และถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จนกลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียในกลุ่มนี้เช่นพวก *Desulfococcus Desulfosarcrina* และ *Desulfonema*

ตารางที่ 2.4 สารประกอบซัลเฟอร์และสารให้อิเลกตรอนสำหรับแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต

Compound	Oxidation state
สารประกอบที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ	
Organic S (R-SH)	-2
Sulfide (H_2S)	-2
Elemental sulfur (S^0)	0
Thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$)	+2 (average per S)
Tetrathionate ($S_4O_6^{2-}$)	+2.5 (average per S)
Sulfur dioxide (SO_2)	+4
Sulfite (SO_3^{2-})	+4
Sulfur trioxide (SO_3)	+6
Sulfate (SO_4^{2-})	+6
สารให้อิเลกตรอนบางชนิดสำหรับแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต	
H_2	Acetate
Lactate	Propionate
Pyruvate	Butyrate
Ethanol and other alcohols	Long-chain fatty acids
Fumarate	Benzoate
Malate	Indole
Choline	Hexadecane

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตและสารอาหารที่ใช้ (Gottschalk, 1988)

Species	Substrates utilized[1]	growth with H_2+CO_2	cytochromes
Group I			
Desulfovibrio desulfuricans	lactate, ethanol, malate	+[2]	*c*
Desulfovibrio vulgaris	lactate, ethanol, malate	+[2]	*c*
Desulfomonas pigra	lactate	-	*c*
Desulfotomaculum nigrificans	lactate, ethanol	+[2]	*b*
Desulfobulbus propionicus	propionate	-	*b*, *c*
Group II			
Desulfotomaculum acetoxidans	acetate	+	*b*
Desulfobacter postgatei	acetate	-	*b*, *c*
Desulfococcus multivorans	acetate, propionate, benzoate,	-	*b*, *c*
Desulfonema limicola	fatty acids (C_1-C_{14})	+	*b*, *c*
	formate, acetate, propionate,		
Desulfosarcrina variabilis	fatty acids (C_1-C_{12})	+	ND
	acetate, propionate,		
	benzoate,		
	fatty acids (C_1-C_{14})		

ND, not determined.

(1) Substrates utilized in the presence of sulfate;

(2) Group I organisms require acetate for growth with H_2+CO_2.

ปฏิกิริยาในการย่อยสลายสารอาหารของแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตทั้ง 2 กลุ่ม มีอยู่หลายปฏิกิริยา เนื่องจากสารอาหารของแบคทีเรียชนิดนี้มีอยู่หลายชนิด แสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างของปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอาหารของแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต (Widdle, 1988)

ลำดับที่	สารให้อิเลกตรอน	แบคทีเรีย	ปฏิกิริยา
1	ไฮโดรเจนหรือฟอร์เมต	I-SRB, C-SRB	$4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \longrightarrow 4H_2O + HS^-$
2	อะซิเตต	C-SRB	$CH_3COO^- + SO_4^{2-} \longrightarrow 2HCO_3^- + HS^-$
3	โพรพิออเนต	C-SRB	$4CH_3CH_2COO^- + 7SO_4^{2-} \longrightarrow 12HCO_3^- + 7HS^- + H^+$
		I-SRB	$4CH_3CH_2COO^- + 3SO_4^{2-} \longrightarrow 4CH_3COO^- + 4HCO_3^- + 3HS^- + H^+$
4	บิวทิเรต	C-SRB	$2CH_3(CH_2)_2COO^- + 5SO_4^{2-} \longrightarrow 8HCO_3^- + 5HS^- + H^+$
		I-SRB	$2CH_3(CH_2)_2COO^- + SO_4^{2-} \longrightarrow 4CH_3COO^- + HS^- + H^+$
5	แลกเตต	C-SRB	$2CH_3CHOHCOO^- + 3SO_4^{2-} \longrightarrow 6HCO_3^- + 3HS^- + H^+$
		I-SRB	$2CH_3CHOHCOO^- + SO_4^{2-} \longrightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + HS^- + H^+$
6	เบนโซเอต	C-SRB	$4C_6H_5COO^- + 15SO_4^{2-} + 16H_2O \longrightarrow 28HCO_3^- + 15HS^- + 9H^+$
		I-SRB	$4C_6H_5COO^- + 3SO_4^{2-} + 16H_2O \longrightarrow 12CH_3COO^- + 4HCO_3^- + 3HS^- + 9H^+$

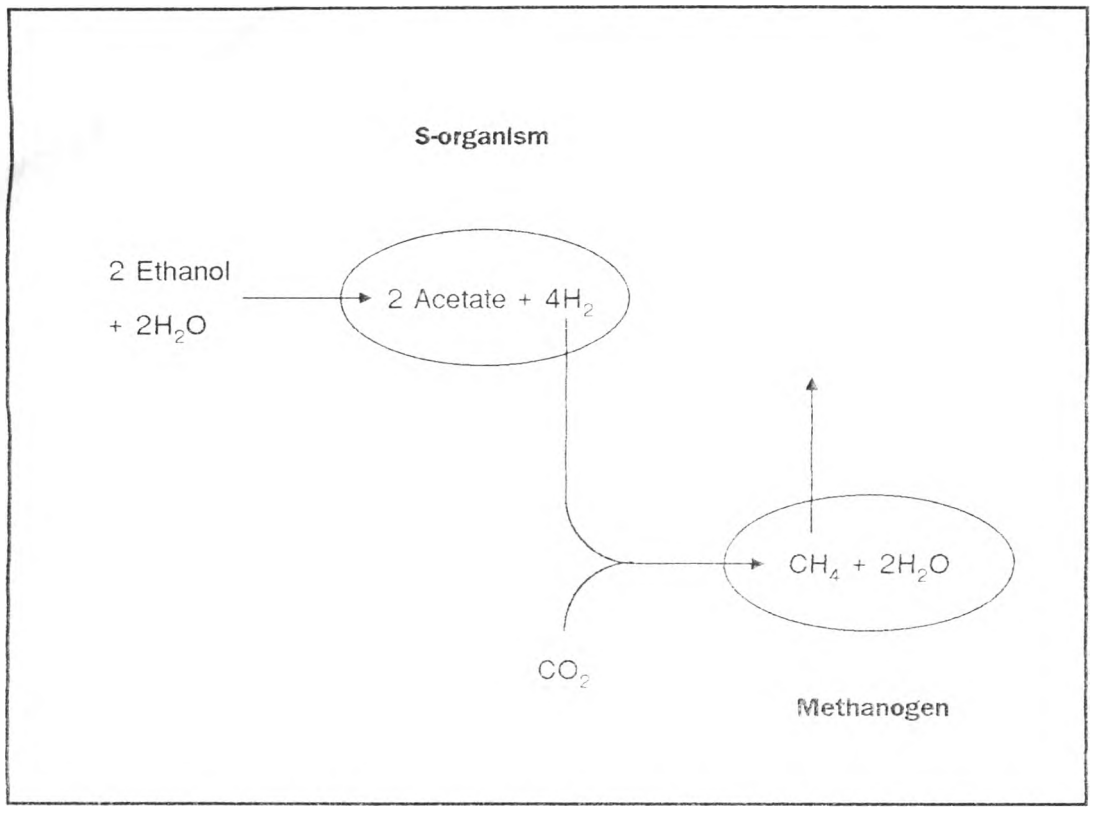
2.1.4 ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ในระบบไร้อากาศ

2.1.4.1 แบคทีเรียสร้างมีเทนกับแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติก

ถึงแม้ว่าก๊าซมีเทนจะเป็นสารประกอบคาร์บอน ที่เป็นส่วนน้อยของวัฏจักรคาร์บอนในธรรมชาติ แต่เนื่องจากก๊าซมีเทนเป็นผลผลิตสุดท้ายจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลชีพในระบบไร้อากาศ ทำให้การผลิตก๊าซมีเทนด้วยแบคทีเรียที่สร้างมีเทนเป็นขั้นตอนสำคัญของระบบไร้อากาศ จากที่ได้กล่าวมาแล้วว่าในการผลิตก๊าซมีเทนนั้น แบคทีเรียสร้างมีเทนจะใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นสารรับอิเลกตรอนในกระบวนการหายใจและเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทน ซึ่งสารให้อิเลกตรอนหรือสารอาหารของแบคทีเรียพวกนี้ เช่น ก๊าซไฮโดรเจน หรือกรดอะซิติก ฯลฯ ล้วนเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนอะตอมน้อย สารประกอบเหล่านี้ส่วนใหญ่มักจะเป็นผลิตผลของการหมักโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ดังนั้น การผลิตก๊าซมีเทนด้วยแบคทีเรียสร้างมีเทนในระบบไร้อากาศ จึงขึ้นอยู่กับการย่อยสารอาหารที่ซับซ้อนให้กลายเป็นสารประกอบคาร์บอนอะตอมน้อยๆ โดยแบคทีเรียชนิดอื่น

จากที่ได้กล่าวไว้แล้วว่า การย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ เช่น สารโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และไขมัน จนกลายเป็นก๊าซมีเทน ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียหลายชนิด โดยสารประกอบสำคัญที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการย่อยสารอินทรีย์จนกลายเป็นก๊าซมีเทนคือ ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นสามารถถูกใช้ไปโดยแบคทีเรียพวกสร้างมีเทน แบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก และแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นสารอาหาร (H_2-consuming bacteria) แบคทีเรียที่เป็นกุญแจสำคัญของการย่อยสลายสารอินทรีย์ซับซ้อน คือ แบคทีเรียพวก fermentative กลุ่มที่ 2 ที่สามารถใช้สารอาหารพวกกรดไขมันหรือแอลกอฮอล์เป็นแหล่งพลังงานและผลิตก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก (H_2-producing bacteria) ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารอาหารสำหรับแบคทีเรียสร้างมีเทน แบคทีเรียชนิดนี้จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อทำการเพาะเป็นเชื้อบริสุทธิ์ แต่เมื่ออยู่รวมกับแบคทีเรียที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นสารอาหารแล้ว แบคทีเรียชนิดนี้จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การอยู่รวมกันแบบ Syntrophy ซึ่งมีความหมายว่า "กินด้วยกัน" ซึ่งเป็นที่มาของชื่อแบคทีเรียชนิดนี้เช่น พวก *Syntrophomonas* และ *Syntrophobacter* ที่ย่อยกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์บางชนิดให้เป็นกรดอะซิติก ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย 2 กลุ่มนี้แสดงในรูปที่ 2.4

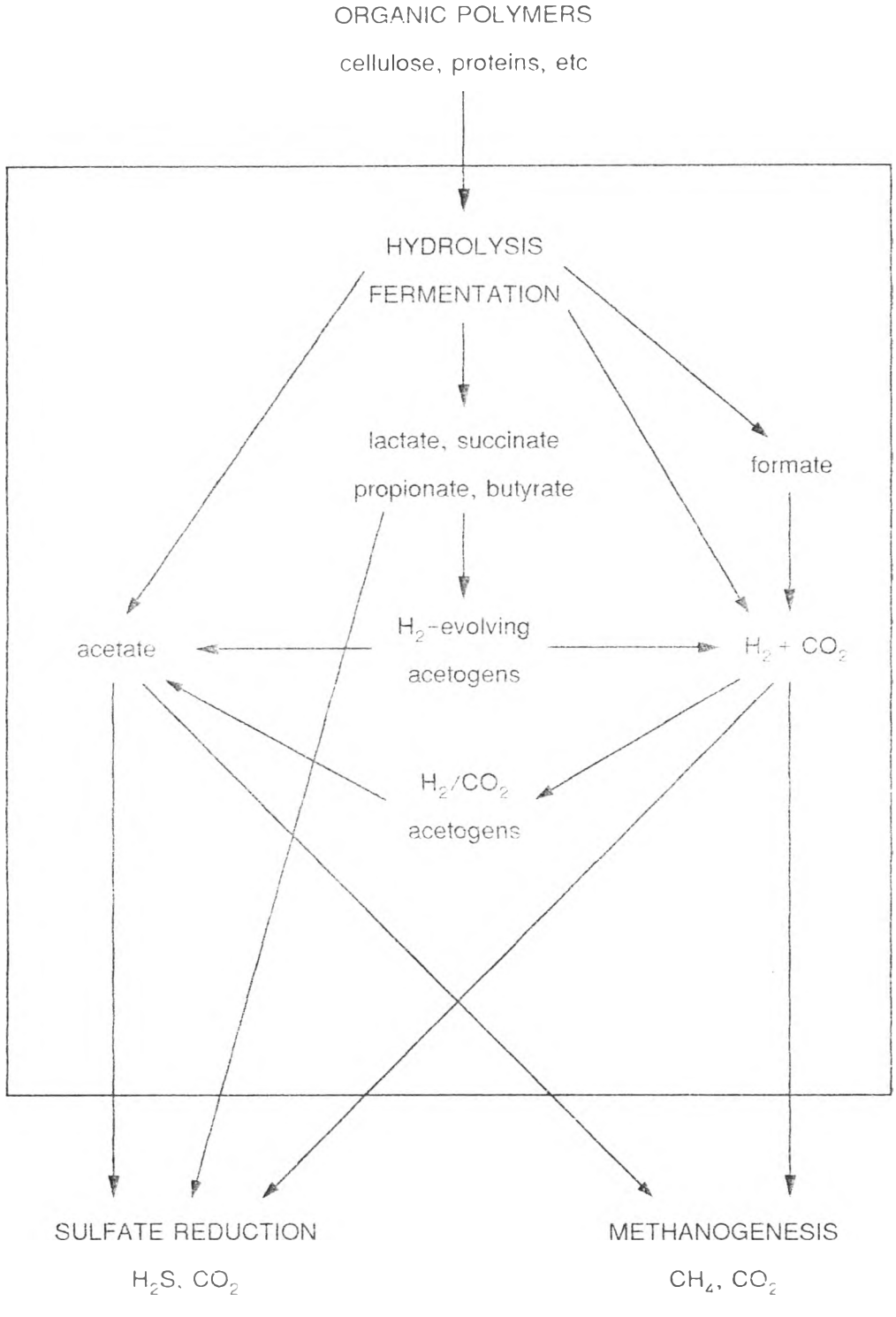
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 ตัวอย่างความสัมพันธ์แบบ Syntrophy (Fenchel and Finlay, 1995)

2.1.4.2 ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในระบบไร้อากาศเมื่อมีซัลเฟตในน้ำเสีย

ในสภาวะไร้อากาศ แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตและแบคทีเรียสร้างมีเทนจัดเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อขั้นตอนสุดท้ายในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำที่มีซัลเฟต โดยแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดต่างก็สามารถย่อยสารอินทรีย์ให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารอนินทรีย์ (mineralization) นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดยังมีความคล้ายคลึงเชิงสรีระวิทยาหลายประการ คือมีลักษณะเป็นแบคทีเรียไร้ออกซิเจนชนิดเด็ดขาด มีช่วงอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคล้ายกัน และมีลักษณะเป็นแบคทีเรียชนิดเคโมเฮเทอโรโทรปรวมกัน ดังนั้นจึงสามารถพบแบคทีเรีย 2 กลุ่มนี้รวมกันในกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศที่มีซัลเฟตนอกเหนือไปจากแบคทีเรียสร้างกรด รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนการย่อยสลายอินทรีย์ในกระบวนการไร้อากาศเมื่อมีซัลเฟตอยู่ในน้ำเสีย



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการย่อยสารอินทรีย์ในระบบไร้อากาศเมื่อน้ำเสียมีซัลเฟต
(Fenchel et al., 1995)

ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต แบคทีเรียสร้างมีเทน และแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติกที่มีความสำคัญ จำแนกได้ดังนี้ (Visser, 1994)

-การแข่งขันระหว่างแบคทีเรียสร้างมีเทน (MPB) และแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต (SRB) ในการแย่งใช้ไฮโดรเจนและกรดอะซิติกเป็นสารอาหาร และผลของการแข่งขันเป็นการกำหนดผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ ว่าจะเป็นก๊าซมีเทนหรือซัลไฟด์

-การแข่งขันระหว่างแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตและแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติก (AB) ในการแย่งใช้กรดโพรพิออนิกและกรดบิวทิริกเป็นสารอาหาร

-การแข่งขันระหว่างแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตชนิดต่างๆ ในการแย่งใช้ซัลเฟต ซึ่งกรณีนี้จะมีบทบาทสำคัญเมื่อมีความเข้มข้นซัลเฟตในระดับต่ำ

1) การแข่งขันระหว่างแบคทีเรียสร้างมีเทนและแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต

การแข่งขันระหว่างแบคทีเรีย 2 กลุ่มนี้จะเป็นการแย่งใช้สารอาหารคือ ไฮโดรเจนและกรดอะซิติก ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญของแบคทีเรียสร้างมีเทน โดยประมาณได้ว่า 30% ของซีโอดีที่ถูกย่อยสลายในกระบวนการไร้อากาศ เป็นการย่อยโดยแบคทีเรียที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นสารอาหาร (Hydrogenotrophic MPB ; H-MPB และ Hydrogenotrophic SRB ; H-SRB) และอีก 70% เป็นการย่อยโดยแบคทีเรียที่ใช้กรดอะซิติกเป็นสารอาหาร (Acetotrophic MPB ; A-MPB และ Acetotrophic SRB ; A-SRB) ความสามารถในการแข่งขันระหว่างแบคทีเรีย 2 กลุ่มนี้ อาจพิจารณาได้จากคุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิก (ตารางที่ 2.7)

ตารางที่ 2.7 ค่าพลังงานทางเทอร์โมไดนามิกของแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต (SRB) และแบคทีเรียสร้างมีเทน (MPB)

Reaction	ΔG^{o} (kJ/react.)
Hydrogen-consuming	
By H-SRB : $4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \longrightarrow HS^- + 4H_2O$	-152.2
By H-MPB : $4H_2 + HCO_3^- + H^+ \longrightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135.6
Acetate-consuming	
By A-SRB : $CH_3COO^- + SO_4^{2-} \longrightarrow HS^- + 2HCO_3^-$	-47.6
By A-MPB : $CH_3COO^- + H_2O \longrightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31.0

จากตารางข้างต้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตมีความได้เปรียบมากกว่าแบคทีเรียสร้างมีเทนทั้งที่ใช้ไฮโดรเจนและอะซิเตตเป็นสารอาหาร เนื่องจากได้ค่า ΔG^0 เป็นลบมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกหลายประการที่ทำให้แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตไม่สามารถเอาชนะแบคทีเรียสร้างมีเทนได้โดยเด็ดขาด

2) การแข่งขันระหว่างแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตและแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติก

ในน้ำเสียที่มีซัลเฟต แบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม สามารถแย่งใช้กรดไขมันระเหยได้ดังนี้

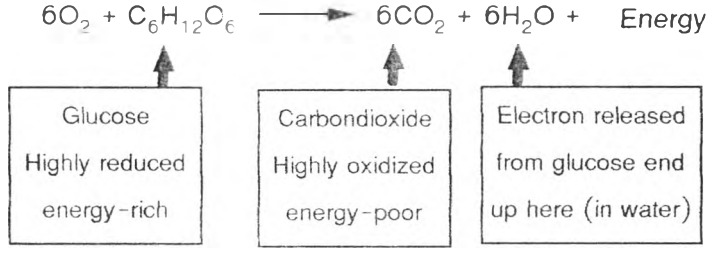
ก) ในลักษณะเดียวกับแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติก ที่อยู่รวมกับแบคทีเรียสร้างมีเทน (syntrophy) คือในน้ำเสียที่มีความเข้มข้นซัลเฟตต่ำๆ แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตบางชนิดจะทำการย่อยสารอินทรีย์ เช่น เอทานอล กรดแลกติก กรดโพรพิออนิก และ กรดบิวทิริก แล้วสร้างเป็นกรดอะซิติกเช่นเดียวกัน

ข) แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตบางชนิดจะใช้กรดไขมันระเหยเป็นสารอาหารโดยตรง แล้วย่อยกรดอินทรีย์เหล่านี้ให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Completely Oxidizing-SRB) หรือกรดอะซิติก (Incompletely Oxidizing-SRB)

ในน้ำเสียที่มีซัลเฟตความเข้มข้นสูง แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตจะสามารถแย่งใช้กรดไขมันระเหยได้ดีกว่าแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกเนื่องจากคุณสมบัติในการเจริญเติบโตที่ดีกว่า ในแหล่งน้ำที่เป็นทะเลมักจะปรากฏว่ากรดโพรพิออนิกและกรดบิวทิริกถูกใช้โดยตรงโดยแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต (Banat และ Nedwell, 1984 อ้างถึงใน Visser, 1994)

2.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (Oxidation-Reduction Reaction)

ในปฏิกิริยาหลายๆ ปฏิกิริยาของกระบวนการเมตาบอลิซึม ล้วนแต่มีการถ่ายเทอิเลกตรอน (electron transfer) รวมอยู่ด้วย การถ่ายเทอิเลกตรอนหมายถึง การมีปฏิกิริยาที่ให้อิเลกตรอนที่เรียกว่าปฏิกิริยาออกซิเดชัน และปฏิกิริยารับอิเลกตรอนที่เรียกว่าปฏิกิริยารีดักชัน เมื่อโมเลกุลหนึ่งมีการสูญเสียอิเลกตรอน จะต้องมีอีกโมเลกุลหนึ่งเข้ามารับอิเลกตรอนนั้นๆ ดังนั้น ทุกปฏิกิริยาออกซิเดชันจะต้องมีปฏิกิริยารีดักชันเกิดขึ้นพร้อมกันเสมอ สารที่มีสภาวะรีดิวซ์สูงจะเป็นสารที่มีพลังงานสูงกว่าสารที่มีสภาวะออกซิไดซ์สูง เช่น คาร์บอน 6 อะตอมของกลูโคสโมเลกุลจะมีสภาวะรีดิวซ์สูง จึงกล่าวได้ว่ามีพลังงานสะสมอยู่ในโมเลกุลมาก เมื่อสิ่งมีชีวิตย่อยกลูโคสจนได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำอย่างละ 6 โมเลกุลแล้ว เท่ากับว่าคาร์บอนอะตอมเหล่านี้ได้ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในสภาวะออกซิไดซ์ที่สูงขึ้น ดังแสดงข้างล่างนี้



ในระหว่างปฏิกิริยานี้ มี 12 อิเลกตรอน (ที่ถูกปล่อยออกมาพร้อมกับไฮโดรเจน 12 อะตอม) จะถูกถ่ายเทจากกลูโคสไปสู่ออกซิเจนโมเลกุล สร้างเป็นน้ำ 6 โมเลกุล เนื่องจากอิเลกตรอนจะถูกพาไปโดยไฮโดรเจน ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่าอิเลกตรอนจะไปอยู่ในโมเลกุลของสารที่มีไฮโดรเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคสแล้ว คาร์บอนไดออกไซด์มีพลังงานน้อยมาก เพราะว่ามีการปล่อยพลังงานเคมีออกมามากในระหว่างที่มีปฏิกิริยาออกซิเดชัน

2.2.1 พาหะขนส่งอิเลกตรอน (Electron Carriers)

การถ่ายเทพลังงานในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน จำเป็นต้องมีการแลกเปลี่ยนอิเลกตรอน โดยส่วนใหญ่แล้วอิเลกตรอนจะถูกถ่ายเทชั่วคราวให้กับพาหะขนส่งอิเลกตรอน พลังงานทั้งหมดที่จะได้จากปฏิกิริยา สามารถพิจารณาได้จากความแตกต่างของศักย์รีดักชันระหว่างสารให้อิเลกตรอนตั้งต้นกับสารรับอิเลกตรอนสุดท้าย พาหะขนส่งอิเลกตรอนสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่อยู่เป็นอิสระในสารละลาย และกลุ่มที่ยึดติดอยู่ในเซลเมมเบรน ในกลุ่มหลังจะได้กล่าวถึงในหัวข้อต่อไป พาหะขนส่งอิเลกตรอนที่อยู่เป็นอิสระมีอยู่ 3 ชนิด คือ สาร nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) สาร nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) และสาร flavin adenine dinucleotide (FAD) สารประกอบเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์โดยการรับ อิเลกตรอน 1 คู่ ที่ถูกปล่อยออกมาจากสารให้อิเลกตรอนในรูปของไฮโดรเจนอะตอม (ไฮโดรเจนอะตอมนี้หมายถึงทั้งโปรตอนและอิเลกตรอน) สาร NAD และ NADP ที่ยังไม่ได้รับอิเลกตรอนมักจะมีประจุเป็นบวกอยู่ก่อนแล้ว (NAD^+ และ $NADP^+$) สารพาหะแต่ละตัวจะเข้ารับอิเลกตรอน 1 คู่จากไฮโดรเจน 2 อะตอม และรับโปรตอนไว้ 1 ตัวด้วย กลายเป็นสารที่มีไฮโดรเจนเป็นส่วนประกอบและเป็นกลางทางไฟฟ้า (ไม่มีประจุ) ส่วนโปรตอนอีก 1 ตัวที่เหลือจะยังคงอยู่ในน้ำในรูปไฮโดรเจนอิออน (H^+) พาหะขนส่งอิเลกตรอนที่ถูกรีดิวซ์แล้วจะอยู่ในรูป NADH และ NADPH ในระหว่างปฏิกิริยาย้อนกลับสารพาหะดังกล่าวจะปล่อยอิเลกตรอน 2 ตัวและโปรตอน 1 ตัว โดยอิเลกตรอนที่เกิน 1 ตัวจะเข้าจับกับไฮโดรเจนอิออนที่อยู่ในน้ำ ดังสมการ

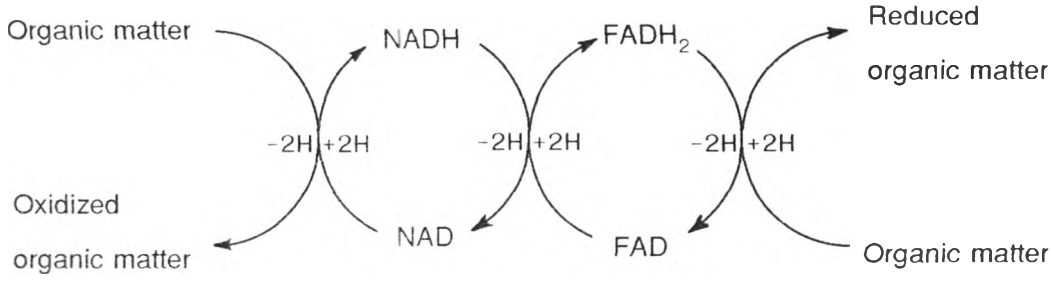
$$NAD^+ + 2H^+ + 2e \longleftrightarrow NADH\ (+\ H^+\ \text{in solution})$$

$$NADP^+ + 2H^+ + 2e \longleftrightarrow NADPH\ (+\ H^+\ \text{in solution})$$

ในขณะที่พาหะขนส่งอิเลกตรอน FAD จะรับอิเลกตรอนพร้อมกับโปรตอน 2 ตัว กลายเป็นสารที่ถูกรีดิวซ์แล้วในรูปของ $FADH_2$

ดังนั้นพาหะขนส่งอิเลกตรอนเหล่านี้เมื่อรับอิเลกตรอนแล้ว ก็เท่ากับกลายเป็นแหล่งของอิเลกตรอนไปเองด้วย โดยปรกติแล้วสารพาหะทั้ง 2 ตัว คือ NAD และ NADP จะไม่ปรากฏพร้อมกันในปฏิกิริยาประเภทเดียวกัน ซึ่งในที่นี้หมายถึงปฏิกิริยา 2 ประเภท คือ ปฏิกิริยาในกระบวนการย่อยสลายสารอาหารเพื่อสร้างพลังงานจะพบแต่สาร NAD และปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์เซลหรือสารอินทรีย์จะพบแต่สาร NADP นั่นคือ

1) ในกระบวนการย่อยสารอาหาร อิเลกตรอนที่ถูกปล่อยมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบอินทรีย์ จะถูกขนส่งโดยสาร NAD^+ ซึ่งเมื่อรับอิเลกตรอนแล้วจะกลายเป็น NADH จากนั้น จะให้อิเลกตรอนกับสารรับอิเลกตรอนตัวที่ 2 ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ที่มีสีเหลือง คือ FAD ซึ่งจะกลายเป็น $FADH_2$ ต่อไป และจะต้องมีสารรับอิเลกตรอนสุดท้าย (*teminal electron acceptor*) เข้ามารับอิเลก ตรอนเหล่านี้ นั่นคือ การฟื้นอำนาจของ NADH ให้เป็น NAD^+ นั้นอาจทำได้โดยการให้อิเลกตรอนกับสารรับอิเลกตรอนตัวสุดท้ายเลยหรือผ่าน FAD ก่อนเท่านั้น (รูปที่ 2.6) ซึ่งสารรับอิเลกตรอนสุดท้ายจะเป็นสารใดก็ขึ้นอยู่กับระดับพลังงานที่จะถูกปล่อยออกมาและถูกใช้ไปเพื่อสร้าง ATP ได้มากน้อยเพียงใด



รูปที่ 2.6 การขนส่งอิเลกตรอนผ่านโคเอนไซม์ NAD

2) ในการสังเคราะห์เซลหรือสารอินทรีย์ (Biosynthesis) อิเลกตรอนที่ถูกปล่อยมาจากการออกซิเดชันโมเลกุลของสารอินทรีย์อย่างง่าย จะถูกขนส่งจาก NADH ไปให้ $NADP^+$ กลายเป็น NADPH จากนั้น NADPH ก็จะขนส่งอิเลกตรอนนี้เข้าร่วมกับการสังเคราะห์สารประกอบหรือเซลขึ้นมา

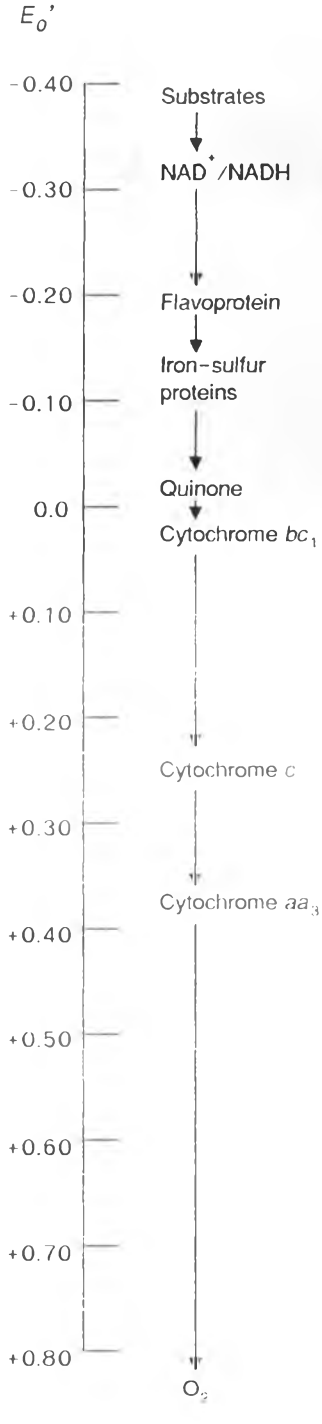
2.2.2 ระบบขนส่งอิเลกตรอน (Electron Transport System)

ระบบขนส่งอิเลกตรอนนี้ ประกอบไปด้วยกลุ่มพาหะขนส่งอิเลกตรอนประเภทที่ยึดติดอยู่กับเซลเมมเบรน ซึ่งระบบทำหน้าที่หลัก 2 ประการ คือ ประการแรกจะรับอิเลกตรอนจากสารให้อิเลก ตรอนแล้วส่งต่อไปยังสารรับอิเลกตรอน และประการที่ 2 คือ เก็บรักษาพลังงานที่เกิดขึ้นจากการขนส่งอิเลกตรอนนี้ให้อยู่ในรูป ATP ระบบนี้จะเริ่มจากสาร NADH ที่รับอิเลกตรอน 2 ตัวไว้อยู่ในโมเลกุล (และมีพลังงานสะสมอยู่ในโมเลกุล) ในกระบวนการหายใจของสิ่งมีชีวิตจะมีการถ่ายเทอิเลกตรอนไปสู่ระดับของพลังงานที่ต่ำกว่า และระหว่างกระบวนการนี้ก็ทำให้มีการปล่อยพลังงานออกมาในรูปของการผลิตสาร ATP อาจเปรียบได้กับพลังงานที่ได้จากการไหลของน้ำที่ตกจากที่สูงลงมาสู่ที่ต่ำ ในระหว่างการหายใจ พลังงานที่อยู่ในรูปอิเลกตรอนจะถูกดึงออกมาโดยการผ่านอิเลกตรอนไปตามระบบขนส่งอิเลกตรอนนี้ การจัดเรียงสารพาหะขนส่งอิเลกตรอนเหล่านี้ (ซึ่งยึดติดกับเซลเมมเบรน) จะเรียงตามลำดับความสามารถในการดึงดูดอิเลกตรอน (electron affinity) ทำให้อิเลกตรอนสามารถเคลื่อนที่ผ่านพาหะขนส่งอิเลกตรอนจากตัวหนึ่งไปยังตัวต่อไปได้ตามความสามารถในการดึงดูดอิเลกตรอน ความสามารถในการดึงดูดอิเลกตรอน สามารถพิจารณาได้จากค่าศักย์รีดักชันของสารแต่ละตัวนี้ได้ (รูปที่ 2.7) ด้วยวิธีนี้อิเลกตรอนจะส่งผ่านระบบขนส่งดังกล่าวได้ในกระบวนการหายใจ และแต่ละขั้นที่มีการส่งผ่านอิเลกตรอนอย่างสมบูรณ์ ก็จะให้พลังงานออกมา พลังงานดังกล่าวจะถูกนาไปใช้สร้าง ATP จำนวน 3 โมเลกุลต่อการขนส่งอิเลกตรอนแต่ละคู่จากสาร NADH การผลิต ATP ที่ร่วมกับการขนส่งอิเลกตรอนผ่านระบบขนส่งอิเลกตรอนนี้ เรียกว่า Oxidative phosphorylation

สารพาหะในระบบขนส่งอิเลกตรอนนี้แบ่งได้เป็น 4 ประเภทดังนี้คือ 1) สาร NADH ถือเป็นสารตั้งต้นของระบบนี้ 2) สารที่มี riboflavin เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ สาร FMN หรือ FAD 3) สารพวก iron-sulfur proteins และ 4) สารไซโตโครม (cytochrome) ซึ่งเป็นสารพวกโปรตีนที่มีสาร heme เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ก็ยังมีสารพาหะอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ใช่สารประกอบของโปรตีนคือ สาร quinones หรือเรียกว่า Coenzyme Q

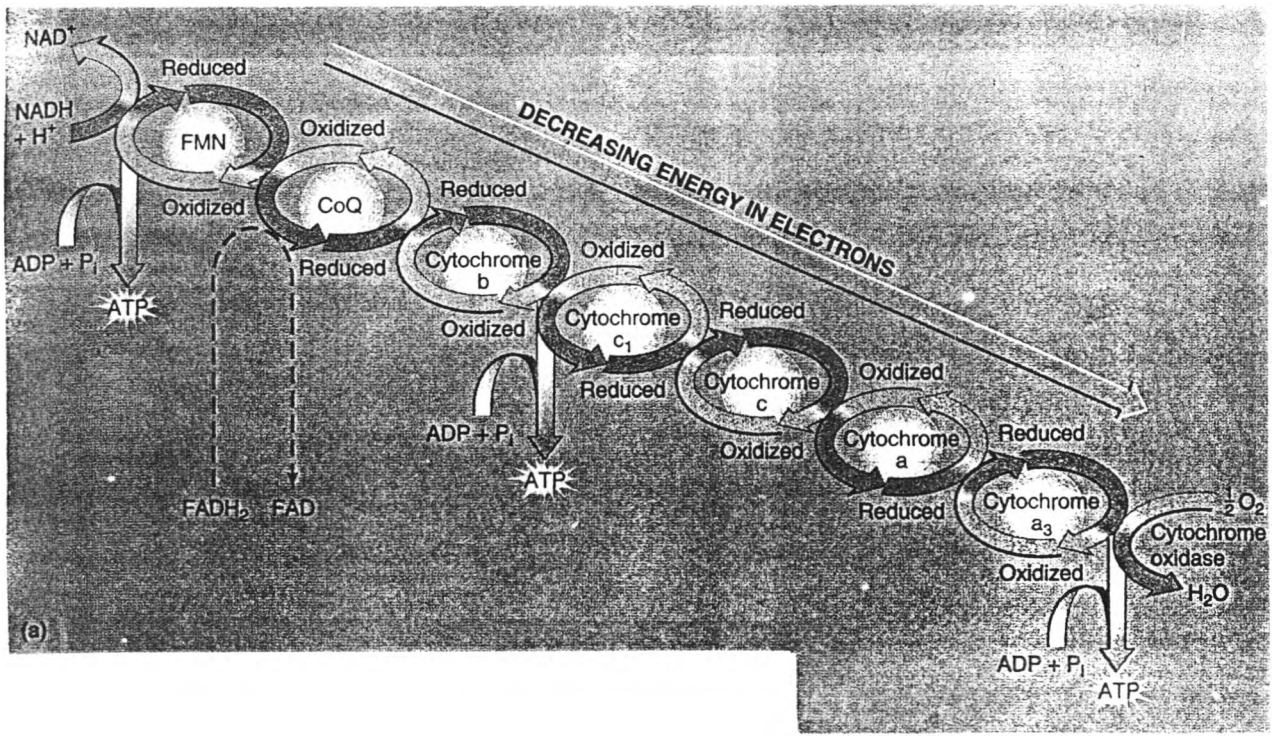
การขนส่งอิเลกตรอนมักจะเริ่มขึ้นจากสาร NADH ปล่อยอิเลกตรอน 2 ตัว และโปรตอน 1 ตัว ให้กับสารพาหะขนส่งอิเลกตรอนจำพวก flavoprotein จากนั้นสาร flavoprotein ก็จะส่งอิเลกตรอนคู่นี้ต่อไปให้สารพาหะตัวถัดไป พร้อมกับโปรตอน 1 ตัวลงในน้ำ อิเลกตรอนจะเคลื่อนที่ไปจนถึงสารพาหะตัวสุดท้าย ซึ่งจะต้องมีสารรับอิเลกตรอนจากภายนอกระบบ เข้ามารับอิเลกตรอนจากสารพาหะตัวสุดท้ายนี้ การขนส่งจึงจะดำเนินต่อไปได้ (รูปที่ 2.8) ถ้าไม่มีสารรับอิเลกตรอนสุดท้ายเข้ามารับอิเลกตรอนแล้ว การขนส่งอิเลกตรอนดังกล่าวจะไม่อาจเกิด

ขึ้นได้ สาร ATP ก็ไม่สามารถสร้างขึ้นมาได้ ทำให้กระบวนการหายใจหยุดชะงัก สิ่งมีชีวิตไม่มีพลังงานสำหรับการดำรงชีวิตก็จะหยุดการเจริญเติบโตหรือตายไป



รูปที่ 2.7 ตัวอย่างค่าศักย์รีดักชันของสารพาหะในระบบขนส่งอิเลกตรอน

(Medigan et al., 1997)



รูปที่ 2.8 ตัวอย่างระบบขนส่งอิเลกตรอนในกระบวนการหายใจ
(Mckane and Kandel, 1996)

2.2.3 แนวโน้มของปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน

2.2.3.1 สารให้อิเลกตรอนและสารรับอิเลกตรอน

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน จะต้องมีการให้อิเลกตรอนจากสารให้อิเลกตรอน (electron donor) และมีการรับอิเลกตรอนโดยสารรับอิเลกตรอน (electron acceptor) ตัวอย่าง เช่น ก๊าซไฮโดรเจนสามารถให้อิเลกตรอนและไฮโดรเจนอิออนดังนี้

$$H_2 \longrightarrow 2e^- + 2H^+$$

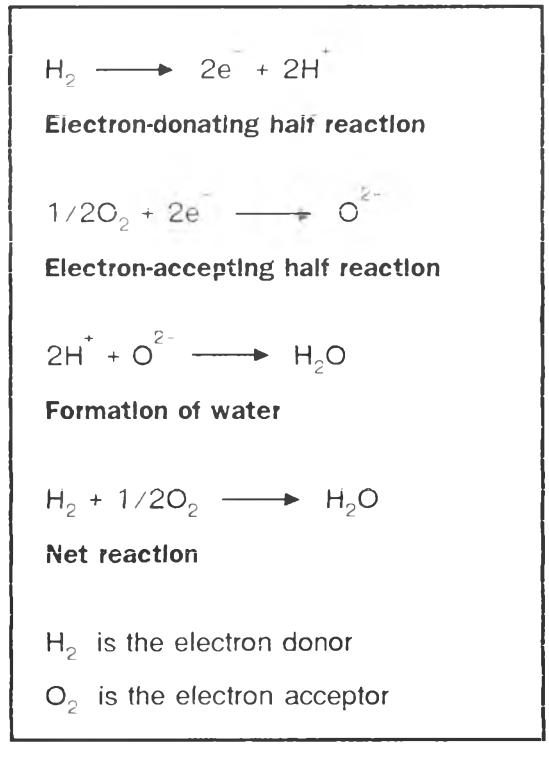
อย่างไรก็ตาม อิเลกตรอนไม่สามารถอยู่อย่างอิสระได้ในน้ำ ดังนั้นสมการข้างบนจึงไม่สามารถเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจริงได้เพียงลำพัง เรียกว่าเป็น "ครึ่งปฏิกิริยา" (half reaction) และเป็นปฏิกิริยาให้อิเลกตรอน (oxidation) ซึ่งต้องการอีกครึ่งปฏิกิริยาที่เป็นปฏิกิริยารับอิเลกตรอน (reduction) ที่จะทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันเกิดขึ้นได้จริง ตัวอย่างเช่น ก๊าซไฮโดรเจนให้อิเลกตรอนกับก๊าซออกซิเจน ซึ่งมีครึ่งปฏิกิริยาดังนี้

$$1/2O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O$$

เมื่อรวมครึ่งปฏิกิริยาทั้ง 2 นี้ จะได้สมการปฏิกิริยารวมเป็น

$$H_2 + 1/2O_2 \longrightarrow H_2O$$

ในปฏิกิริยารวมนี้ H_2 คือสารให้อิเลกตรอน และ O_2 คือสารรับอิเลกตรอน (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 ตัวอย่างปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน

2.2.3.2 ศักย์รีดักชัน (Reduction potential)

สารต่างๆ มีความสามารถต่างๆ กันที่จะให้อิเลกตรอนหรือรับอิเลกตรอน ความสามารถดังกล่าวพิจารณาได้จากค่าศักย์รีดักชัน (E_0) ของสารนั้นๆ ค่าศักย์นี้วัดได้ด้วยเครื่องมือทางไฟฟ้าโดยเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิงไฮโดรเจน โดยส่วนใหญ่ศักย์รีดักชันจะเป็นค่าสำหรับครึ่งปฏิกิริยารีดักชัน นอกจากนี้ค่านี้ยังขึ้นอยู่กับโปรตอนหรือไฮโดรเจนอิออนในน้ำด้วย นั่นคือ ค่าพีเอชมีผลต่อค่าศักย์รีดักชันนี้ ดังนั้นในทางชีววิทยาค่าศักย์รีดักชันที่กล่าวถึงจะเป็นค่า ณ พีเอชที่เป็นกลาง เนื่องจากของเหลวในเซลคือไซโตพลาสซึมมักจะมีค่าพีเอชเป็นกลางหรือใกล้เคียง ตัวอย่างเช่น ค่าศักย์รีดักชันของปฏิกิริยา

$1/2O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O$ เท่ากับ 0.816 โวลท์ และปฏิกิริยา

$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ มีค่าศักย์รีดักชันเท่ากับ -0.421 โวลท์

ในการเขียนปฏิกิริยารวมนั้น ครึ่งปฏิกิริยาของสารที่ให้อิเลกตรอนมักจะมีค่าศักย์รีดักชันต่ำกว่าครึ่งปฏิกิริยาของสารรับอิเลกตรอน ยกตัวอย่างเช่น ครึ่งปฏิกิริยา $2H^+/H_2$ มีค่าศักย์รีดักชันเท่ากับ -0.42 โวลท์ จึงมีแนวโน้มจะเป็นสารให้อิเลกตรอน ในขณะที่ครึ่งปฏิกิริยาของ $1/2O_2/H_2O$ มีค่าศักย์เท่ากับ +0.82 โวลท์ นั่นคือ ออกซิเจนมีแนวโน้มที่จะรับอิเลกตรอน ดังนั้น สารส่วนใหญ่สามารถเป็นได้ทั้งสารให้อิเลกตรอนและสารรับอิเลกตรอนได้ในสภาวะต่างๆ กัน ขึ้นอยู่กับสารอื่นๆ ที่จะเข้าทำปฏิกิริยาด้วย

แนวโน้มการถ่ายเทอิเลกตรอนสามารถพิจารณาได้จากรูปที่ 2.10 ซึ่งจะแสดงค่าศักย์รีดักชันของครึ่งปฏิกิริยาของสารต่างๆ โดยสารที่มีค่าศักย์เป็นลบมากจะอยู่ด้านบน สารที่มีค่าศักย์เป็นบวกจะอยู่ด้านล่าง นั่นคือสารที่มีแนวโน้มในการให้อิเลกตรอนมากจะอยู่ด้านบนสุดของรูปนี้ และสารที่มีแนวโน้มในการรับอิเลกตรอนมากจะอยู่กลุ่มล่างของรูปนี้ อิเลกตรอนจากสารให้อิเลกตรอนจะถูกจับโดยสารรับอิเลกตรอนที่ระดับต่างๆ ไป ความแตกต่างระหว่างค่าศักย์รีดักชันของสารทั้ง 2 ตัว เรียกว่า $\Delta E'_0$ ซึ่งถ้าความแตกต่างของค่าศักย์รีดักชันนี้ ($\Delta E'_0$) ยิ่งมีมาก ก็หมายถึงในระหว่างการถ่ายเทอิเลกตรอนระหว่างสารทั้ง 2 จะมีพลังงานถูกปล่อยออกมามากเท่านั้น นั่นคือ ออกซิเจนที่อยู่ล่างสุดของรูปจะเป็นสารรับอิเลกตรอนที่สิ่งมีชีวิตใช้มากที่สุด เพราะทำให้ได้พลังงานออกมามากที่สุด

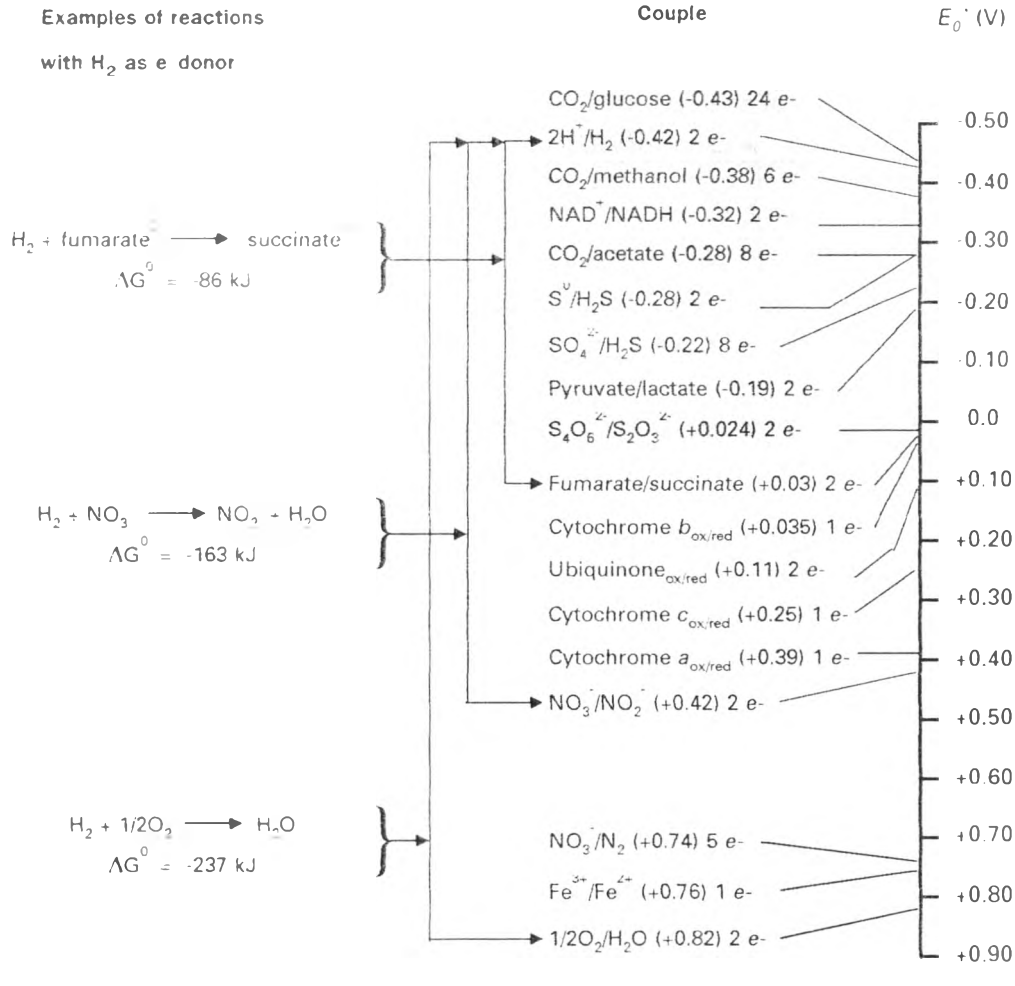
เมื่อพิจารณาครึ่งปฏิกิริยาของสารคู่อื่นๆ เช่น ครึ่งปฏิกิริยาของ $2H^+/H_2$ ซึ่งมีค่าศักย์รีดักชันเท่ากับ -0.42 โวลท์ และครึ่งปฏิกิริยาของสาร fumarate/succinate มีค่าศักย์เท่ากับ -0.03 โวลท์ ดังนั้นปฏิกิริยารวมจึงเป็น $H_2 + \text{fumarate}^{2-} \longrightarrow \text{succinate}^{2-}$ นั่นคือ ครึ่งปฏิกิริยาของ fumarate/succinate จึงเป็นปฏิกิริยารับอิเลกตรอน ในอีกกรณีหนึ่ง

เมื่อพิจารณาครึ่งปฏิกิริยาของ fumarate/succinate คู่กับครึ่งปฏิกิริยาของ NO_3^-/NO_2^- (+0.42 โวลท์) หรือของ $1/2O_2/H_2O$ (+0.82 โวลท์) แล้ว ปฏิกิริยารวมจะกลายเป็นดังนี้

$$succinate^{2-} + NO_3^- \longrightarrow fumarate^{2-} + NO_2^- + H_2O$$

$$succinate^{2-} + 1/2O_2 \longrightarrow fumarate^{2-} + H_2O$$

ดังนั้น ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแต่มีก๊าซไฮโดรเจน สาร fumarate จะทำหน้าที่เป็นสารรับอิเลกตรอน (แล้วกลายเป็น succinate) ในอีกสภาวะหนึ่งที่มีไนเตรตหรือมีออกซิเจน succinate จะทำหน้าที่เป็นสารให้อิเลกตรอน (แล้วกลายเป็น fumarate) ซึ่งสอดคล้องกับความเป็นจริง คือ การเปลี่ยนรูประหว่าง fumarate และ succinate เกิดได้โดยจุลชีพหลายชนิดในสภาวะต่างๆ กัน (เชนมี ออกซิเจน ไนเตรต หรือไม่มีเลย) และพลังงานที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันที่สมบูรณ์จะมากหรือน้อยก็ขึ้นอยู่กับค่าศักย์รีดักชันของสารให้อิเลกตรอนและสารรับอิเลกตรอนทั้ง 2 ตัวประกอบกัน



รูปที่ 2.10 ค่าศักย์รีดักชันของครึ่งปฏิกิริยาต่างๆ **(Medlgan et al., 1997)**

2.2.4 ค่าโออาร์พี (Oxidation-Reduction Potential ; ORP)

ค่าโออาร์พีมีหน่วยเป็นมิลลิโวลท์ เป็นการวัดสภาวะของปฏิกิริยาโดยการวัดแรงเคลื่อนไฟฟ้าระหว่างอิเลกโทรดอ้างอิง (reference electrode) กับอิเลกโทรดโลหะเฉื่อย (inert metal electrode) ในปฏิกิริยาชีวเคมีต่างๆ สามารถอธิบายได้เป็นครึ่งปฏิกิริยาของการให้อิเลกตรอนและการรับอิเลกตรอนดังที่กล่าวมาแล้วคือ

ครึ่งปฏิกิริยาของการรับอิเลกตรอน $Ox + ne \longrightarrow Red$.....(1)

ส่วนอีกครึ่งปฏิกิริยาการให้อิเลกตรอน $Red_2 \longrightarrow ne + Ox_2$

ปฏิกิริยารวมจะเป็น $Ox + Red_2 \longrightarrow Red + Ox_2$

เนื่องจากอิเลกตรอนไม่สามารถปรากฏเป็นอิเลกตรอนอิสระในสารละลายหรือในน้ำได้ ดังนั้น จึงกำหนดรูปแบบการนับอิเลกตรอนให้เป็นแอกติวิตี้ของอิเลกตรอน (electron activity) ซึ่งอาจให้ความหมายได้ว่า เป็นอิเลกตรอนที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันเท่านั้น จากสมการ (1) ค่าคงที่สมดุล (equilibrium constant, K) สามารถแสดงได้ดังสมการต่อไปนี้

$$K = \frac{\{Red\}}{\{Ox\}\{e\}}$$

$$e = \left[\frac{1}{K}\frac{\{Red\}}{\{Ox\}}\right]$$

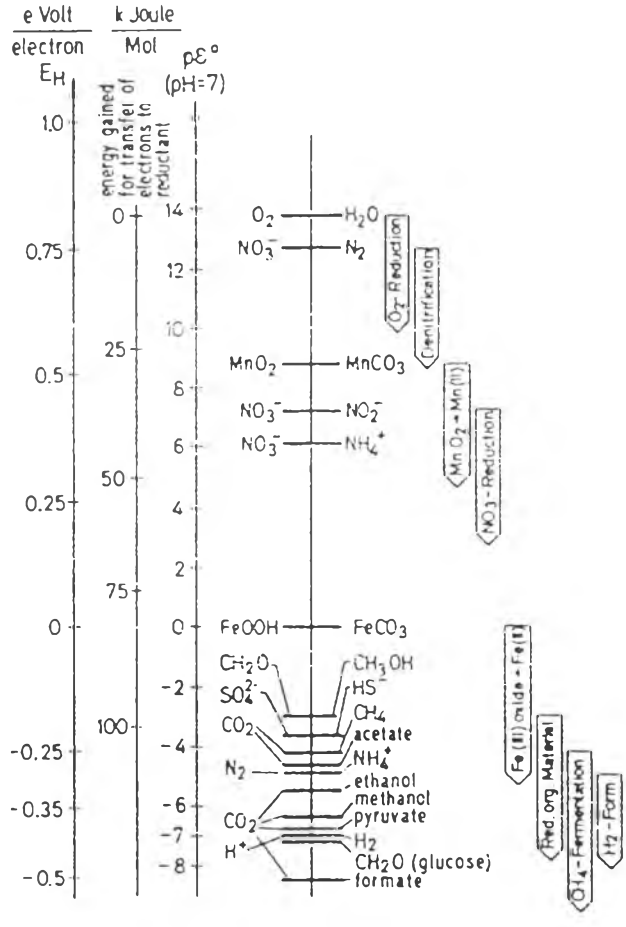
เมื่อพิจารณาค่าลบลอกการริทึมของอิเลกตรอน (pε) ในลักษณะเดียวกับค่าพีเอช (pH) จะได้

$$p\varepsilon = -\log\{e\}$$

$$= p\varepsilon^0 + \frac{1}{n}\log\left[\frac{\{Red\}}{\{Ox\}}\right]$$

เมื่อ $p\varepsilon^0 = \frac{1}{n}\log K$ (ค่า $p\varepsilon^0$ ของบางปฏิกริยาแสดงในรูปที่ 2.12)

ค่า pε จะบอกถึงแนวโน้มของสารละลายที่จะรับหรือถ่ายเทอิเลกตรอน ในสารละลายที่มีแนวโน้มจะให้อิเลกตรอนคือมีความดันอิเลกตรอน (electron pressure) ค่อนข้างสูง จะมีค่า pε ค่อนข้างต่ำหรือติดลบ ในทางกลับกัน ค่า pε ที่สูง ก็แสดงถึงแนวโน้มในการรับอิเลกตรอน จะเห็นว่ามีลักษณะที่คล้ายคลึงกับค่าพีเอช (pH) คือเมื่อความเข้มข้นไฮโดรเจนอิออนสูง แสดงสภาวะที่เป็นกรด ค่าพีเอชจะต่ำ แต่เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออนน้อยลง ค่าพีเอชกลับสูงขึ้น



รูปที่ 2.11 ไดอะแกรมของค่า $p\varepsilon^0$ ของบางปฏิกิริยา (**Alexander et al., 1988**)

I 17906064

อย่างไรก็ตาม การพิจารณาด้วยวิธีการที่มีความสะดวกมากกว่า คือ การใช้ค่าศักย์รีดักชันและสมการเนินชท์ (Nernst equation) เพราะมีความสัมพันธ์กับการวัดแรงดันทางไฟฟ้าในหน่วยโวลท์ ดังนี้

ค่า ΔG ของปฏิกิริยา (1) มีความเกี่ยวพันกับค่าศักย์รีดักชันที่ใช้อิเลกโทรดอ้างอิงแบบไฮโดรเจน E_H ดังสมการ

$$E_H = \frac{-\Delta G}{nF} = \frac{RT}{nF} \ln K = \frac{2.3RT}{nF} \log K = \frac{2.3RT}{F} p\varepsilon$$

นั่นคือ

$$E_H = \frac{2.3RT}{F} p\varepsilon$$

$$= \frac{2.3RT}{F} \frac{1}{n} \left| \log K + \log \left(\frac{\{Ox\}}{\{Red\}} \right) \right|$$

$$= E_H^0 + \left(\frac{2.3RT}{nF} \right) \log \left(\frac{\{Ox\}}{\{Red\}} \right)$$

สมการข้างต้นเรียกว่าสมการของเนินชท์ (Nernst Equation) ซึ่งที่อุณหภูมิ 25°C อาจเขียนเป็นสมการใหม่ได้ดังนี้

$$E_H = E_H^0 + \left(\frac{0.0591}{n} \right) \log \left(\frac{\{Ox\}}{\{Red\}} \right)$$

สมการดังกล่าวข้างต้น ก็คือสมการที่ใช้หาค่าของโออาร์พีหรือค่าศักย์รีดอกซ์ นั่นเอง เพียงแต่ค่าศักย์รีดอกซ์ (E_H) ในสมการดังกล่าวข้างต้นเป็นค่าที่ใช้ไฮโดรเจนเป็นอิเลกโทรดอ้างอิง แต่ในปัจจุบัน อิเลกโทรดอ้างอิงส่วนใหญ่จะเป็น Ag/AgCl ในสารละลาย KCl ซึ่งมีค่า E^0 = 0.199 โวลท์ ดังนั้น ค่า E_H^0 ที่จะนำมาใช้กับเครื่องวัดโออาร์พีแบบ Ag/AgCl จะต้องทำการปรับเทียบให้เป็นค่า E^0 ที่ใช้ Ag/AgCl เป็นอิเลกโทรดอ้างอิงก่อนที่ใช้สูตรคำนวนข้างต้น

2.3 ระบบยูเอเอสบี (Upflow Anaerobic Sludge Blanket, UASB Process)

2.3.1 ความเป็นมาของระบบยูเอเอสบี

เนื่องจากปัญหาการขาดแคลนพลังงานที่มีความรุนแรงมากขึ้น ทำให้มีความพยายามในการคิดค้นระบบบำบัดน้ำเสียแบบใหม่ๆ มาทดแทนหรือลดค่าใช้จ่ายของระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ ซึ่งต้องใช้พลังงานสูงในการเติมอากาศและภาระในการทิ้งสลัดจ์ส่วนเกิน ทำให้นักวิทยาศาสตร์และวิศวกรหันกลับมาให้ความสนใจกับระบบไร้อากาศอีกครั้ง หลังจากระบบนี้ได้ถูกละเลยไม่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ เนื่องจากระบบมีปัญหาอยู่หลายประการ

-ต้องใช้เวลากักน้ำมากทำให้ระบบมักมีขนาดใหญ่ เช่น บ่อไร้ออกซิเจน (Anaerobic pond)

-ระบบไม่มีเสถียรภาพในการทำงาน เนื่องจากขาดความรู้ที่ถูกต้องในการควบคุมระบบ

-ตะกอนจุลินทรีย์มักจะหลุดออกไปกับน้ำทิ้งจากระบบ ทำให้น้ำทิ้งมีคุณภาพต่ำ ขณะเดียวกัน เมื่อไม่สามารถเก็บกักตะกอนจุลินทรีย์ได้ดี ทำให้ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์ในระบบมีน้อยลง ทำให้ระบบมีประสิทธิภาพในการทำงานน้อยลง

จากปัญหาเหล่านี้ ทำให้มีความพยายามที่จะพัฒนาแก้ไขปัญหาดังกล่าวของกระบวนการไร้อากาศกันอย่างกว้างขวาง ก่อให้เกิดระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศในรูปแบบต่างๆ หลายชนิด แต่ก็ยังไม่มีระบบที่ประสิทธิภาพสูง จนสามารถเปลี่ยนแปลงความเชื่อในด้านลบของระบบไร้อากาศเหล่านี้ได้ จนกระทั่งในช่วงปี 1972 Dr. Lettinga (Mosey, 1982) ได้ทำการทดลองศึกษาการย่อยแบบไร้อากาศของน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำตาล beet sugar แห่งหนึ่งในประเทศฮอลแลนด์ โดยเริ่มแรกเป็นการศึกษาโดยใช้ถังกรองไร้อากาศ (anaerobic filter) แต่ต่อมาได้มีการพัฒนาปรับปรุงอุปกรณ์ให้สามารถแยกน้ำเสียตะกอนจุลินทรีย์ และก๊าซชีวภาพ ออกจากกันได้ทั้ง 3 สถานะ (1980 อ้างถึงใน พีรพงษ์ ทิพยากร, 2530) จึงได้ตั้งชื่อกระบวนการนี้ว่า กระบวนการชั้นตะกอนจุลินทรีย์ไร้อากาศแบบไหลขึ้น (upflow anaerobic sludge blanket) และยังสามารถเลี้ยงให้เชื้อตะกอนจุลินทรีย์ภายในระบบมีลักษณะเป็นเม็ดหรือเกล็ด (granular or pellet)

ปัจจุบันระบบยูเอเอสบีได้รับความสนใจและยอมรับอย่างกว้างขวาง มีการติดตั้งระบบยูเอเอสบีเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่องทั่วโลก โดยนำมาใช้สำหรับการบำบัดทางชีวภาพขั้นต้นเพื่อลดภาระบรรทุกสารอินทรีย์ให้กับระบบใช้อากาศที่อยู่ตามมา

2.3.2 ลักษณะและการทำงานของระบบยูเอเอสบี

ลักษณะโดยทั่วไปเป็นถังปิดรูปทรงสี่เหลี่ยม หรือ ทรงกระบอกก็ได้ โดยถังยูเอเอสบีจะประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นถังปฏิกรณ์พร้อมด้วยระบบกระจายน้ำเสียและส่วนตกตะกอนและแยกก๊าซบริเวณด้านบน (รูปที่ 2.12) โดยมีลักษณะการทำงานดังนี้

1) สำหรับส่วนที่เป็นถังปฏิกรณ์ การป้อนน้ำเสียจะเข้าทางด้านล่างผ่านระบบการกระจายน้ำเสียเพื่อให้น้ำเสียเข้าถังทั่วทั้งหน้าตัด การไหลของน้ำเสียในถังเป็นการไหลจากด้านล่างขึ้นด้านบน

2) มีการเลี้ยงเชื้อแบบไร้อากาศให้เกิดเป็นชั้นสลัดจ์ที่มีความหนาแน่น โดยเชื้อในชั้นสลัดจ์จะรวมกันเป็นเม็ดหรือเกล็ด

3) เชื้อที่มีความหนาแน่นสูงจะจมตัวอยู่ด้านล่าง (sludge bed) โดยมีการเรียงตัวจากขนาดใหญ่ขึ้นไปหาเล็กเหมือนชั้นทรายกรองเป็นชั้นตะกอนล่าง ทำหน้าที่ย่อยสารอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่อยู่ในน้ำ ส่วนกลุ่มที่มีความหนาแน่นต่ำและมีความเร็วในการจมตัวต่ำกว่า จะถูกฟองก๊าซที่เกิดขึ้นมาและการไหลของน้ำที่เข้าถังปฏิกรณ์ทางด้านล่างของถัง กวนขึ้นมาเป็นชั้นตะกอนแขวนลอย และสัมผัสกับน้ำเสียอีก เป็นการเพิ่มการสัมผัส

4) ส่วนบนของถังจะเป็นชุดแยกสามสถานะ เรียกว่า GSS (Gas-Solids Separator) ทำหน้าที่แยกก๊าซ กลุ่มตะกอนจุลินทรีย์ และน้ำเสียออกจากัน การออกแบบอุปกรณ์แยกสามสถานะนี้มีหลายลักษณะตามขนาดและรูปร่างของถังปฏิกรณ์ แต่ใช้หลักการเดียวกัน คือ

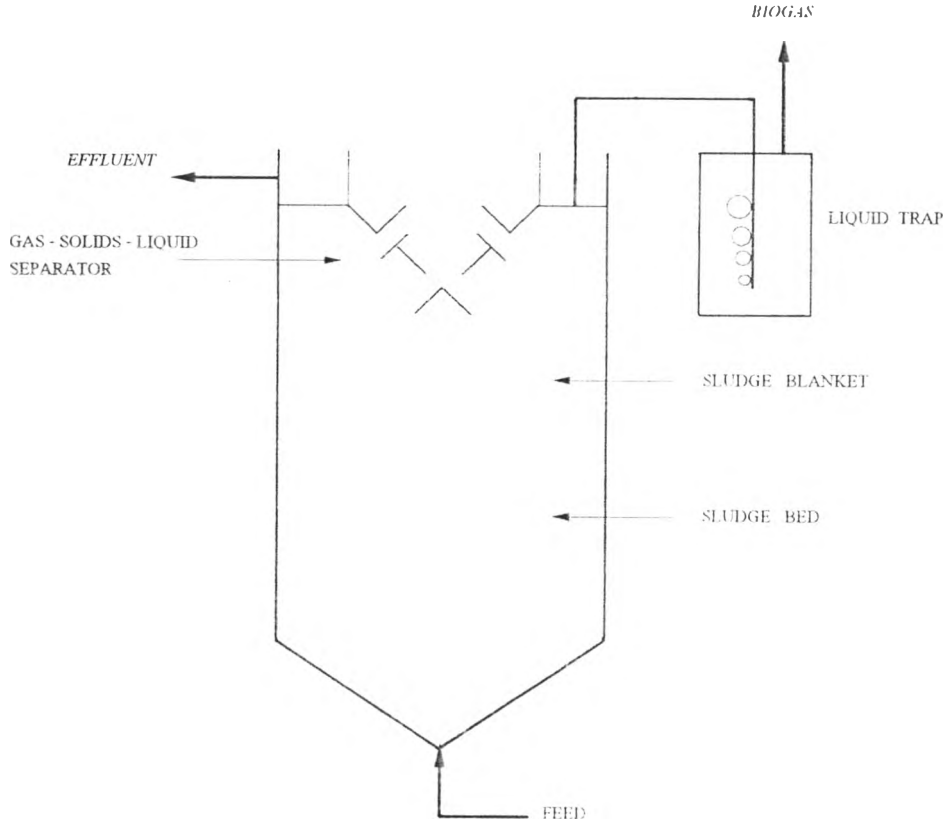
-เก็บกักน้ำไว้โดยการแทนที่น้ำ

-แยกน้ำกับก๊าซไม่ให้ไหลออกทางเดียวกัน โดยอาศัยหลักการที่ว่าน้ำสามารถไหลเลี้ยวไปมาได้ แต่ก๊าซมีการลอยตัวจากด้านล่างขึ้นสู่ด้านบนเป็นเส้นตรงเท่านั้น ยกเว้นถ้ามีสิ่งกีดขวางหรือแผ่นปะทะใดๆ มาเปลี่ยนทิศทางการลอยตัวขึ้น แต่หลังจากผ่านพ้นสิ่งกีดขวางนั้นแล้วก็จะลอยตัวเป็นเส้นตรงดังเดิม

-แยกตะกอนออกจากน้ำโดยการตกตะกอน ดังนั้นในส่วนของอุปกรณ์แยกสามสถานะ จึงต้องมีเนื้อที่ส่วนที่เป็นน้ำนิ่งเพียงพอที่ตะกอนจะตกกลับลงมาในถังปฏิกรณ์ได้ ทำให้คงรักษาปริมาณตะกอนจุลินทรีย์ในถังปฏิกิริยาให้มีค่าสูงไว้ได้

ลักษณะที่สำคัญของระบบยูเอเอสบีคือ การเก็บกักตะกอนไว้ภายในถังปฏิกรณ์ได้มาก โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ให้รวมตัวเป็นเม็ดหรือเกล็ดตะกอนจนกระทั่งมีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมาก มีความเร็วในการจมตัวสูง (high settling velocity) สามารถตกตะกอนได้ดี การรวมตัวเป็นเม็ดของตะกอนจุลินทรีย์จะขึ้นกับลักษณะน้ำเสียและเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในตอนเริ่มเดินระบบ และอุปกรณ์แยกสามสถานะต้องสามารถทำงานได้ดี โดยตะกอนจุลินทรีย์ที่ตกตะกอน

แยกตัวลงมาแล้ว ต้องสามารถตกกลับเข้าถังปฏิกรณ์ได้ง่าย ไม่มีการสะสมตัวอยู่ในส่วนตกตะกอนและมีตะกอนหลุดออกไปกับน้ำทิ้งน้อยที่สุด



รูปที่ 2.12 ตัวอย่างระบบยูเอเอสบี (Christensen, Gerick และ Eblen, 1984)

2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของระบบยูเอเอสบี

ระบบยูเอเอสบี ซึ่งเป็นกระบวนการไร้อากาศแบบหนึ่ง การทำงานของระบบจะขึ้นกับการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบ ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสภาวะแวดล้อมของจุลินทรีย์ และปัจจัยที่ใช้ควบคุมการทำงานของจุลินทรีย์

2.3.3.1 ปัจจัยที่เกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมของจุลินทรีย์

1) *อุณหภูมิ (Temperature)*

ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับแบคทีเรียในกระบวนการไร้อากาศมี 2 ช่วงคือ

- mesophilic ช่วงอุณภูมิ 30 - 40° C
- Thermophilic ช่วงอุณภูมิ 45 -55° C

2) *พีเอช (pH)*

ค่าพีเอชที่เหมาะกับกระบวนการไร้อากาศควรอยู่ระหว่าง 6.6-7.6 (McCarty, 1964 อ้างถึงใน พีรพงษ์, 2530) ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคทีเรียที่สร้างมีเทน ส่วนแบคทีเรียที่สร้างกรดจะสามารถปรับตัวได้ในช่วงพีเอชที่กว้างกว่า ดังนั้นการควบคุมพีเอชของระบบจึงมุ่งเน้นไปที่ค่าที่เหมาะสมกับกลุ่มสร้างมีเทนมากกว่า

3) *กรดไขมันระเหย (volatile fatty acid, VFA) สภาพความเป็นด่าง (alkalinity)*

กรดไขมันระเหยที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่สร้างกรด ปกติควรมีค่าประมาณ 200-400 มก./ล. ของกรดอะซิติก กรดไขมันระเหยที่เพิ่มขึ้นรวดเร็วจะเป็นพิษต่อแบคทีเรียได้ ทำให้พีเอชลดลงจนไม่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมของแบคทีเรีย ดังนั้นสภาพความเป็นด่างจึงแสดงถึงกำลังบัฟเฟอร์ของระบบ ซึ่งจะรักษาระบบให้มีพีเอชคอนข้างคงที่ ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันระเหยได้ โดยทั่วไป กระบวนการไร้อากาศควรมีสภาพความเป็นด่างประมาณ 1500-2000 มก./ล. และอัตราส่วนของ VFA ต่อสภาพความเป็นด่าง ถ้าน้อยกว่า 0.4 แสดงว่ามีกำลังบัฟเฟอร์สูง ระบบทำงานได้ดี ถ้ามากกว่า 0.8 แสดงว่ามีกำลังบัฟเฟอร์ต่ำ อาจจะทำให้ระบบมีประสิทธิภาพลดลงหรือล้มเหลวได้ สารเคมีที่ใช้เพิ่มความเป็นด่างให้แก่ระบบเพื่อควบคุมพีเอช มีอยู่หลายชนิดเช่น สารไบคาร์บอเนต หรือ คาร์บอเนต โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) เป็นสารเคมีที่ดีที่สุดในการควบคุมพีเอช เพราะละลายน้ำได้ดีและให้คาร์บอเนตโดยตรงต่อระบบ แต่ข้อเสียคือมีราคาแพงกว่าสารเคมีตัวอื่นๆ

4) *อาหารเสริม (nutrient)*

จากอัตราส่วน C:N:P:S ในเซลมีค่าประมาณ 100:10:1:1 จึงจำเป็นต้องรักษาสัดส่วนนี้ไว้ไม่ให้น้อยกว่านี้ จุลินทรีย์จึงต้องการอาหารเสริมนอกจากคาร์บอนแล้ว เช่น

ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส โดย McCarty, 1964 กล่าวว่า ค่า BOD:N:P ควรมีอัตราส่วนต่ำกว่า 100:1.1:0.2 สำหรับกระบวนการไร้อากาศ นอกจากนี้ยังมีธาตุบางอย่างที่แบคทีเรียสร้างมีเทนต้องการเป็นปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ ได้แก่ เหล็ก โคบอลท์ นิเกิล ซัลเฟอร์

5) *สารพิษ (toxic)*

สารที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียในระบบไร้อากาศได้แก่ กรดโวลาไทล์ แอมโมเนีย แคทไอออนของโลหะเบา ซัลไฟด์ โลหะหนัก สารที่เป็นพิษเหล่านี้บางตัวเป็นสารอาหารที่จำเป็นแต่ต้องมีปริมาณที่พอเหมาะ ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะกลายเป็นสารพิษได้

พิษของอิออนบวกและโลหะหนัก

ได้แก่ Na^+, K^+, Mg^+ และ Ca^{2+} ซึ่งถ้ามีความเข้มข้นต่ำพอเหมาะจะมีประโยชน์ต่อแบคทีเรีย ถ้ามากเกิดความจำเป็นจะเป็นพิษต่อแบคทีเรีย โดยอิออนบวกที่มีวาเลนซีสูงจะมีความเป็นพิษมากกว่าที่มีวาเลนซีต่ำ ซึ่งพิษของ Mg^+ และ Ca^{2+} มากกว่า Na^+ และ K^+ ถึง 10 เท่า ดังนั้นพิษของอิอนบวกจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อวาเลนซีสูงขึ้น และน้ำหนักอะตอมเพิ่มมากขึ้น สามารถลดความเป็นพิษได้โดยการทำแอนทาโกนิสซึม (Antagonism) คือเมื่ออิออนบวกอยู่ร่วมกันในความเข้มข้นที่พอเหมาะ พิษของอิออน บวกชนิดหนึ่งสามารถลดความเป็นพิษไอออนอีกชนิดหนึ่งได้

สวนโลหะหนักได้แก่ แมงกานีส สังกะสี แคดเมียม นิเกิล โคบอลท์ ทองแดง และโครเมียม โลหะหนักเหล่านี้จะอยู่ในรูปของอิออน พบว่า Cu^{2+} มีผลต่อระบบมากที่สุด โดยความเป็นพิษของ $Cu^{2+} > Cu^+ > Fe^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+}$ ความเป็นพิษของโลหะหนักลดลงได้ถ้าน้ำเสียมีปริมาณซัลไฟด์พอเหมาะ เพราะสามารถรวมกับโลหะหนักเกิดเป็นโลหะซัลไฟด์ซึ่งสามารถตกตะกอนได้

พิษของกรดไขมันระเหย

กรดไขมันระเหยถ้าถูกสร้างมากเกินไป เนื่องจากมีสารอินทรีย์เข้ามาในระบบมาก และถ้ามีกำลังบัฟเฟอร์ไม่พอ จะทำให้ค่าพีเอชลดลง มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียที่ผลิตมีเทนได้

พิษของแอมโมเนีย

แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ มาจากการย่อยสลายสารพวกโปรตีน ซึ่งมีไนโตรเจนรวมอยู่ในโมเลกุล โดยไนโตรเจนที่ปล่อยออกมาจะอยู่ในรูป NH_4^+ และ

NH_3 ดังสมการ $NH_4^+ \longleftrightarrow NH_3 + H_2$ ถ้าพีเอชต่ำกว่า 7.2 ปฏิกิริยาจะดำเนินไปทางซ้าย ถ้าพีเอชมากกว่า 7.2 ปฏิกิริยาจะดำเนินไปทางขวา ซึ่ง NH_3 จะยับยั้งการทำงานและเป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจนมากกว่า NH_4^+ ปริมาณของแอมโมเนียไนโตรเจน ซึ่งวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการจะรวมทั้ง NH_4^+ และ NH_3 ดังแสดงในตารางข้างล่างนี้

ตารางที่ 2.8 ผลของแอมโมเนียไนโตรเจนต่อระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ

แอมโมเนียไนโตรเจน (มก./ล.)	ผลต่อระบบ
50-200	ปริมาณพอเหมาะ
200-1000	ยังไม่เกิดผลเสีย
1500-3000	เริ่มยับยั้งเมื่อพีเอชสูง
>3000	เป็นพิษโดยตรง

พิษของซัลไฟด์

ซัลไฟด์จะเป็นพิษต่อแบคทีเรียสร้างมีเทนในกระบวนการไร้ออกซิเจนเมื่อน้ำเสียที่เข้าสู่ระบบ มีปริมาณของซัลไฟด์มาก หรือเกิดการย่อยสลายของซัลเฟต (SO_4^{2-}) อยู่ในรูปที่ละลายน้ำหรือไม่ละลายน้ำ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอิออนบวกที่รวมอยู่ ถ้ารวมกับโลหะหนักก็จะตกตะกอนลงมา ส่วนที่เหลือจะละลายน้ำในรูปแบบของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสามารถเปลี่ยนเป็นกรดซัลฟุริคได้ แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนอิสระสามารถทนต่อซัลไฟด์ที่ละลายน้ำอันมีความเข้มข้นถึง 50 - 100 มก./ล. แต่ความเข้มข้นที่มากกว่า 200 มก./ล. จะเป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดนี้ การลดพิษของซัลไฟด์ทำได้โดยการทำให้ตกตะกอนของซัลไฟด์ การทำให้น้ำเจือจาง หรือโดยการแยกซัลไฟด์ออกจากน้ำเสียก่อนเข้าระบบ

พิษของสารอินทรีย์

สารอินทรีย์บางชนิดจะยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนอิสระ สารพวกนี้ได้แก่ แอลกอฮอล เช่น เมทานอล รวมทั้งกรดไขมันที่มีโมเลกุลยาว ซึ่งความเป็นพิษของสารอินทรีย์เหล่านี้ สามารถทำลายได้โดยการนำน้ำทิ้งที่มีสารอินทรีย์เข้าสู่ระบบบำบัดอย่างสม่ำเสมอ เพื่อทำให้แบคทีเรียคุ้นเคยและปรับตัวได้ แม้ว่าจะมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ที่เป็นพิษถึง 10,000 มก./ล. ก็ตาม หรืออาจแก้ไขได้โดยการเติมสารเคมีลงไป เพื่อทำให้เกิดการตกตะกอนของสารอินทรีย์ที่เป็นพิษ

2.3.3.2 ปัจจัยที่ใช้ควบคุมการทำงานของจุลินทรีย์

นอกจากสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมดังในหัวข้อที่กล่าวมาแล้ว การควบคุมจุลินทรีย์ให้คงทนทำงานได้ดี จำเป็นต้องรักษาสภาพทางกายภาพต่อตัวจุลินทรีย์ให้เหมาะสม ดังต่อไปนี้

1) *การรักษาปริมาณจุลินทรีย์ไว้ให้สูงสุด*

เนื่องจากการรักษาปริมาณจุลินทรีย์ในระบบให้มีอยู่เป็นจำนวนมาก เป็นจุดเด่นของระบบยูเอเอสบีนี้ ซึ่งทำให้สามารถรับภาระบรรทุกสารอินทรีย์ได้มากขึ้น ผลิตน้ำทิ้งที่มีคุณภาพดี ทั้งนี้เป็นเพราะระบบนี้จะเลี้ยงแบคทีเรียให้จับตัวกันเป็นเม็ดตะกอนและมีขนาดใหญ่ มีน้ำหนักมากจนตกตะกอนได้ดี และยังมีอุปกรณ์ในการแยกก๊าซออกจากกลุ่มตะกอนจุลินทรีย์และดักตะกอนจุลินทรีย์ไม่ให้หลุดออกไปกับน้ำทิ้งด้วย ทำให้ตะกอนจุลินทรีย์อยู่ในระบบได้นาน เรียกอุปกรณ์นี้ว่า อุปกรณ์แยกสามสถานะ การออกแบบอุปกรณ์แยกสามสถานะจึงควรออกแบบให้ถูกต้องเหมาะสม จะต้องพิจารณาถึงสมบัติของน้ำเสีย ซึ่งมีส่วนในการกำหนดชนิดของตะกอน จุลินทรีย์ที่จะปรากฏในระบบ อัตราบรรทุกสารอินทรีย์ที่เข้าสู่ระบบ ปริมาณก๊าซชีวภาพที่คาดว่าจะเกิดขึ้น ขนาดและรูปร่างของถังยูเอเอสบี ตัวอย่างเช่น การบำบัดน้ำเสียความเข้มต่ำ จำเป็นต้องควบคุมเวลากักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ให้ได้ตามเงื่อนไขของระบบ จึงต้องออกแบบอุปกรณ์แยกสามสถานะให้มีประสิทธิภาพสูง ในการป้องกันการหลุดออกจากระบบของตะกอนจุลินทรีย์ ขณะที่การบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มสูงและมีโปรตีนหรือไขมันมาก จะต้องติดตั้งอุปกรณ์กำจัดฟองหรือฝ้าไขที่เกิดขึ้นในส่วนบนของอุปกรณ์เก็บก๊าซ

2) *การกระจายน้ำเสียเข้าถังอย่างทั่วถึง*

เนื่องจากระบบยูเอเอสบี เป็นระบบไร้อากาศจึงไม่มีการเติมอากาศ และไม่มีการ mixing กันในถังปฏิกรณ์ ดังนั้นจึงควรออกแบบระบบป้อนน้ำเข้าให้สามารถกระจายน้ำเสียเข้าถังปฏิกรณ์ได้อย่างทั่วถึง เพื่อป้องกันการไหลลัดวงจรของน้ำเสียผ่านชั้นตะกอนหนาแน่น (bed)

3) *อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์*

อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ การตกตะกอนของจุลินทรีย์ และก๊าซที่เกิดในระบบ น้ำเสียควรมีอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ต่ำกว่าอัตราสูงสุดในการกำจัดสารอินทรีย์ของระบบ เพื่อป้องกันการเกิด shock load ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพลดลง

2.3.4 ระบบยูเอเอสบีแบบมีถังสร้างกรด

ในระบบไร้อากาศ เป็นระบบที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรีย 2 กลุ่มใหญ่ คือ แบคทีเรียที่สร้างกรดและสร้างมีเทน ซึ่งมีความแตกต่างกันมากทั้งในเรื่องของสภาพทางกายภาพ ความต้องการอาหาร อัตราการเจริญเติบโตและความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียที่สร้างกรดจะเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ต่างๆ แบคทีเรียชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว ทำให้เจริญเติบโตอยู่ในลักษณะฟล็อกได้ง่าย ทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดีกว่าแบคทีเรียสร้างมีเทน ในขณะที่แบคทีเรียสร้างมีเทนซึ่งเปลี่ยนสารพวกกรดอินทรีย์เหล่านี้ให้กลายเป็นก๊าซมีเทน เป็นแบคทีเรียชนิดที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า ทำให้สามารถเจริญเติบโตอยู่ในลักษณะที่แน่นได้ ค่าจลศาสตร์ต่างๆ ของแบคทีเรียแสดงในตาราง 2.9 ดังนั้น การเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิดเหล่านี้ในถังปฏิกรณ์ใบเดียว ย่อมจะต้องเกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมกับแบคทีเรียกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งในที่สุด ส่งผลให้ไม่สามารถใช้แบคทีเรียเหล่านี้เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในทางทฤษฎี การแยกขั้นตอนการบำบัดแบบไร้อากาศให้เป็น 2 ขั้นตอน จะทำให้แบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม ต่างก็สามารถมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมกับแบคทีเรียนั้นๆ

ตารางที่ 2.9 ค่าจลศาสตร์ต่างๆ ของแบคทีเรีย Mesophilic (Thaveesri, 1994)

แบคทีเรีย	สารอาหาร	q (gCOD/gVSS.d)	K_s (mg COD/l)	μ_{max} (d^{-1})	b (d^{-1})	Y (gVSS/gCOD)
Acidogenic	คาร์โบไฮเดรต	1.33-70.6	22.5-630	7.2-30	6.1	0.14-0.17
Acetogenic	C_5,C_4,C_3 กรดไขมัน	6.2-17.1	12-500	0.13-1.2	0.01-0.027	0.025-0.047
Methanogenic	กรดอะซิติก	2.6-11.6	11-421	0.08-0.7	0.004-0.037	0.01-0.054
	H_2/CO_2	1.92-90	4.8×10^{-5}-0.6	0.05-4.07	0.088	0.017-0.054
Methanosaeta sohngenii	กรดอะซิติก	3.7-8.0	30-45	0.11-0.16	-	0.02-0.03
Methanosarcina barkeri	กรดอะซิติก	8.8-15	320	0.44-0.6	-	0.04-0.05

Pohland และ Ghost (1971 อ้างถึงใน Fang H.H.P., 1995) ได้แนะนำให้แยกระบบไร้ออกซิเจนเป็น 2 ถังปฏิกิริยา ถังใบแรกสำหรับขั้นตอนไฮโดรไลซีส และขั้นตอนการสร้างกรด ขั้นตอนทั้งสองนี้ไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยเด็ดขาด เนื่องจากแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องเป็นชนิดเดียวกัน ส่วนถังใบที่ 2 สำหรับขั้นตอนการสร้างอะซิติกและขั้นตอนการสร้างมีเทน เพราะแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติกต้องอาศัยแบคทีเรียที่สร้างมีเทนโดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นสารอาหาร ช่วยรักษาความดันพาร์เชียลไฮโดรเจนให้ต่ำเพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปได้ และการแยกถังออกจากกันโดยสมบูรณ์ไม่มีความจำเป็น การควบคุมระบบทำได้ยาก (Lettinga et.al., 1991)

2.3.4.1 ข้อดีของการมีถังสร้างกรด

การแยกแบคทีเรีย 2 กลุ่มดังกล่าวข้างต้นมีข้อดีหลายประการ ทั้งในเรื่องของกำลังบัฟเฟอร์ที่ต้องเติมให้ สารอาหารที่เพียงพอสำหรับแบคทีเรียที่สร้างมีเทน และยังสามารถรับภาระบรรทุกอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นได้ดีอีกด้วย และเป็นที่ยอมรับว่าระบบบำบัดไร้อากาศแบบ 2 ขั้นตอนนี้เหมาะอย่างยิ่งกับการบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มสูง โดยเฉพาะจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ และน้ำเสียที่มีความซับซ้อนมาก (complex wastewater) ดังนั้นในระบบบำบัดแบบไร้อากาศ การมีถังสร้างกรดมีข้อได้เปรียบเหนือกว่าระบบที่ไม่มีถังสร้างกรดหลายประการ

ถังสร้างกรดป้องกันถังสร้างมีเทน จากสภาวะที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อแบคทีเรียสร้างมีเทน เช่น การเพิ่มภาระของระบบอย่างกระทันหัน การมีสารพิษเข้าสู่ระบบ หรือจากสภาวะที่แปรปรวนต่างๆ (Ghosh et.al., 1975 ; Bull et.al., 1984) ทั้งนี้เป็นเพราะแบคทีเรียสร้างกรดสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ดีกว่า Malasopina และคณะ (1996) พบว่า ถังสร้างกรดช่วยให้ค่าพีเอชของระบบคงที่ เพิ่มเสถียรภาพให้ระบบในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเนยแข็ง ขณะที่ Shin และคณะ (1992) พบว่าถังสร้างกรดช่วยให้การบำบัดน้ำเสียที่ปริมาณซัลเฟตสูงมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยถังสร้างกรดสามารถลดปริมาณซัลเฟตในน้ำเสียจากโรงกลั่นเหล้าได้ถึง 35-65% การลดลงของปริมาณซัลเฟตในถังสร้างกรด คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากการที่ซัลเฟตสามารถหลุดออกจากถังสร้างกรดได้ในรูปก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ค่าพีเอชในถังสร้างกรดประมาณ 6.5 Lettinga และคณะ (1991) กล่าวว่าถังสร้างกรดในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานแป้งมันฝรั่ง ใช้เพื่อกำจัดซัลไฟด์และโปรตีนในน้ำเสีย ซึ่งซัลไฟด์เป็นพิษต่อแบคทีเรียในระบบ ส่วนโปรตีนทำให้เกิดการลอยตัวของตะกอนจุลินทรีย์ พีรพงษ์ ทิพยาทร (2530) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตนมถั่วเหลืองและน้ำอัดลมด้วยระบบยูเอเอสบี พบว่าการใช้ถังสร้างกรดช่วยลดปัญหาจากน้ำเสียที่ค่อนข้างเป็นพิษเนื่องจากยาฆ่าเชื้อและน้ำยาทำความสะอาด

การมีถังสร้างกรดทำให้ระบบสามารถรับภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่สูงขึ้นได้ ซึ่งเป็นผลมาจาก โอกาสที่จะเกิดเหตุการณ์ที่เป็นอันตรายต่อแบคทีเรียในถังสร้างมีเทนน้อยลง อีกทั้งน้ำเสียยังถูกย่อยให้เป็นสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ง่าย เช่น พวกกรดไขมันระเหยโมเลกุลเล็ก ซึ่งสามารถย่อยสลายต่อได้อย่างรวดเร็วในถังสร้างมีเทน (Cohen et.al., 1982 ; Sutton et.al., 1983 ; Bull et.al., 1984 ; Aoki et.al., 1991 ; Stadlbauer et.al., 1994)

ถังสร้างกรดช่วยป้องกันการเจริญเติบโตที่มากเกินไปของแบคทีเรียสร้างกรด เป็นสาเหตุให้เกิดปัญหาตะกอนไม่จมตัวของระบบไร้ออกซิเจน (anaerobic bulking) ในถังสร้างมีเทน เนื่องจากแบคทีเรียสร้างกรดสามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่าแบคทีเรียสร้างมีเทน และผลิตสารโพลีเมอร์ (extracellular polymer) ออกมาจำนวนมาก (Yoda et.al., 1989) จากการศึกษาพบว่าถังสร้างกรดจำเป็นสำหรับระบบที่ภาระสูงๆ เพื่อป้องกันการเกิดการหลุดออกของเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ เนื่องจากมีแบคทีเรียสร้างกรดแบบเส้นใยจำนวนมากเกิดขึ้นในระบบ (Ohtsuki et.al., 1992 ; Alphenaar, 1994)

นอกจากนี้ ถังสร้างกรดยังช่วยป้องกันผลเสีย อันเนื่องมาจากอนุภาคแขวนลอยเข้าไปในระบบ ซึ่ง Lettinga และคณะ (1991) ได้กล่าวไว้ว่า ในระบบยูเอเอสบีการมีอนุภาคแขวนลอยปริมาณสูงในน้ำเสียมีผลต่อการทำงานของระบบ อนุภาคแขวนลอยจะติดผิวแบคทีเรียที่เป็นฟล็อก ขัดขวางการรวมตัวของเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ ทำให้การเจริญเติบโตของเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ช้า และการรวมตัวของเม็ดตะกอนไม่แข็งแรง อนุภาคแขวนลอยย่อยสลายยากและสะสมในชั้นตะกอนจุลินทรีย์ จะทำให้การทำงานของแบคทีเรียสร้างมีเทนต่อปริมาตรลดลง เพราะปริมาณตะกอนในชั้นตะกอนจุลินทรีย์เพิ่มเนื่องจากอนุภาคแขวนลอยที่สะสมแทนที่จะเป็นจุลินทรีย์ และถ้าอนุภาคแขวนลอยติดอยู่ในชั้นตะกอนจุลินทรีย์เป็นเวลานาน อาจเกิดการหลุดออกของตะกอนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ ทั้งนี้เพราะสภาพเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ไม่แข็งแรงจนมีความหนาแน่นของเม็ดตะกอนลดลง กรณีที่อนุภาคแขวนลอยเป็นพวกไขมัน ก็จะทำให้เกิดการลอยตัวและหลุดออกของตะกอนจุลินทรีย์ได้เช่นกัน ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีถังสร้างกรด การย่อยสลายอนุภาคแขวนลอยจะเกิดขึ้นในถังสร้างกรดก่อน เป็นการป้องกันอนุภาคแขวนลอยสะสมในถังสร้างมีเทน (Ghosh et.al.,1975 ; Lettinga et.al., 1986 ; Sayed et.al., 1993) กล่าวคือ ถังสร้างกรดช่วยเปลี่ยนสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำให้กลายเป็นสารอินทรีย์ละลายน้ำและย่อยสลายง่าย Endo G. และ Tohya Y. (1985) พบว่า ถังสร้างกรดช่วยแก้ปัญหาการเกิดชั้นสกัมลอยในการบำบัดน้ำเสียโสโครก ป้องกันการหลุดออกของเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ในระบบ

ถังสร้างกรดยังสามารถนำไปใช้รวมกับระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพอื่นๆ ทำให้ประหยัด ทั้งนี้เพราะถังสร้างกรดจะเปลี่ยนน้ำเสียที่ซับซ้อนจากโรงงานอุตสาหกรรม ให้เป็นกรดไขมันระเหยอย่างง่ายสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในระบบ เช่น ระบบ Biological Nutrient Removal และระบบบำบัดแบบใช้ออกซิเจน (Alexiou et.al., 1994)

2.3.4.2 เกณฑ์การออกแบบถังสร้างกรด

Lettinga และ Hulshoff (1991) แนะนำให้ใช้ถังกวนผสมอย่างสมบูรณ์เป็นถังสร้างกรด และถังพักน้ำเสีย (balancing tank) ที่มีอยู่ในโรงงานอุตสาหกรรมสามารถดัดแปลงนำมาใช้เป็นถังสร้างกรดได้ Alexiou และคณะ (1994) แนะนำให้ใช้ถังสร้างกรดเป็นแบบง่ายที่สุด ทั้งในด้านการออกแบบและดำเนินการ และไม่ควรจะมีค่าลงทุนและค่าดำเนินการที่สูงจนเกินไป

1) อุณหภูมิและพีเอช

อุณหภูมิที่เหมาะสมของถังสร้างกรดขึ้นกับค่าพีเอชที่จะเลือกใช้ Zoetemeyer และคณะ (1982a, 1982b) กล่าวว่า อุณหภูมิของถังสร้างกรดควรอยู่ในช่วง mesophilic หรือ thermophilic โดยช่วง mesophilic จะมีส่วนประกอบของกรดที่คงที่กว่า โดยส่วนประกอบของกรดจะขึ้นกับอุณหภูมิและอัตราส่วนการเจือจาง ค่าพีเอชที่เหมาะสมของถังสร้างกรดอยู่ระหว่าง 5.8-6.2 และอัตราการสร้างกรดจะลดลงอย่างรวดเร็วที่พีเอชต่ำกว่า 5 (Lettinga et.al., 1991)

2) ระยะเวลากักน้ำ

Lettinga และ Hulshoff (1991) แนะนำว่าระยะเวลากักน้ำในถังสร้างกรดควรอยู่ระหว่าง 6 ถึง 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำเสีย โดยเลือกระยะเวลากักน้ำที่ทำให้เกิดการหมักกรด 20-40% การทำให้เกิดกรดโดยสมบูรณ์ไม่ใช้สิ่งจำเป็น ทำให้ต้องเสียเงินลงทุนและเสียค่าดำเนินการที่สูงขึ้นและยังเป็นผลเสียต่อระบบ เพราะอาจมีแบคทีเรียสร้างกรดจำนวนมากปนเข้าไปในถังสร้างมีเทน ทำให้เกิดผลเสียต่อเม็ดตะกอนจุลินทรีย์และการทำงานของระบบได้

การเลือกเวลากักน้ำของถังสร้างกรด ขึ้นกับระยะเวลาที่ทำให้เกิดปริมาณกรดที่เหมาะสม คือไม่ก่อให้เกิดผลเสียกับระบบสร้างมีเทนในขั้นต่อไป โดยต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นมากแต่ปริมาณกรดที่ได้ไม่แตกต่างกันนักด้วย เช่น Alexiou และคณะ (1994) พบว่าเวลากัก

น้ำเสียในถังสร้างกรดจากการผลิตกาแฟ 24 ชั่วโมงจะเกิดกรด 50% ในขณะที่เวลากักน้ำ 6 ชั่วโมง จะเกิดกรด 40% การลดเวลากักน้ำส่งผลให้ขนาดถังสร้างกรดลดลง เป็นการประหยัดการลงทุนทางหนึ่ง ดังนั้นการศึกษาระยะเวลากักน้ำที่เหมาะสมสำหรับน้ำเสียแต่ละชนิด เป็นสิ่งจำเป็นในการออกแบบถังสร้างกรดสำหรับการใช้งานจริงต่อไป

เกณฑ์การออกแบบถังสร้างกรดไม่มีข้อกำหนดตายตัว ค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการออกแบบอาศัยจากการศึกษาที่ผ่านมา โดยขึ้นกับลักษณะและชนิดของน้ำเสียแต่ละประเภท ค่าพารามิเตอร์ของถังสร้างกรดที่ใช้ในการศึกษาต่าง ๆ ที่ผ่านมาแสดงในตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 ตัวอย่างค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ออกแบบถังสร้างกรดสำหรับน้ำเสียประเภทต่าง ๆ ในระบบบำบัดไร้ออกซิเจน (รวบรวมโดยเนตรนภา, 2540)

ประเภทน้ำเสีย	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	เวลากักน้ำ (ชม.)	การเกิดกรด	อ้างถึง
กลูโคส	6.0	37	-	-	Zoetemeyer (1982a, 1982b)
	5.8	30	24	-	Alphenaar (1994)
น้ำตาล	4.8	30	3	-	Lettinga (1980)
แป้งมันสำปะหลัง	4.5-4.7	30-32	12	1,200 mg/l	Lwin (1996)
	7.0	37	24	-	ธาดา ฉัตรธานี (1987)
กาแฟ	6.0	37	6	40-50%	Alexiou (1994)
	4.5	45	3	-	Kozuchowska (1995)
กากน้ำตาล	4.0-5.0	35-37	4.7	60%	Yoda (1997)
	6	35	3.4	50%	Romli (1994)
น้ำเสียชุมชน	-	18	4	-	Sayed (1993)
เนยแข็ง	6.5	-	-	23-28%	Malaspina F. (1996)
	4.5	35	9.6	70%	Garcia P.A. (1991)
โรงเบียร์	5.9+0.3	32	7+2	20%	Stadlbauer (1994)
มูลหมู	-	36	4 วัน	-	Cseh T. (1984)
นมผง	5.0-5.5	35	12	85%	Anderson (1994)
แป้ง	6.2	35+2	12	67%	Zhang (1994)

2.4 สีย้อม (dyes)

สีย้อม เป็นสารเคมีที่สำคัญสำหรับการฟอกย้อม สกัดมาจากน้ำมันปิโตรเลียมและถ่านหิน เมื่อผ่านการสกัดจะได้สารไฮโดรคาร์บอน เช่น ไซลีน แอนทราซีน โทลูอีน โดยสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ จะถูกนำไปทำปฏิกิริยาด้วยกระบวนการไนเตรชั่น แอมมิเนชั่น ฯลฯ เพื่อเปลี่ยนสภาพจากสารไฮโดรคาร์บอนไปเป็นสารตัวกลาง (intermediates) และสารตัวกลางนี้จะถูกนำไปเปลี่ยนเป็นสีย้อมด้วยเทคนิคต่างๆ ซึ่งเป็นเทคโนโลยีของแต่ละบริษัทที่ผลิตสีเพื่อที่จะได้สีย้อมชนิดต่างๆ สำหรับเส้นใยที่จะนำมาย้อม ตลอดจนกระบวนการย้อมที่มีลักษณะแตกต่างกันไป เพื่อให้ได้ชิ้นงานที่มีสีติดคงทนต่อแสงแดดและการซักล้าง

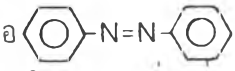
2.4.1 การมองเห็นสี

Witt (อ้างถึงใน สมคิด,2525) ได้สรุปว่าสีซึ่งปรากฏออกมาทำให้ตามนุษย์ปกติมองเห็นได้ เกิดจากการเรียงตัวของกลุ่มอะตอมประเภทหนึ่งภายในโมเลกุลของสีย้อม กลุ่มอะตอมที่กล่าวนี้ เรียกว่า โครโมฟอร์ (chromophores) ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายกลุ่มคือ

1) กลุ่มไนโตรโซ (nitroso group) -NO (หรือ =N-OH)
2) กลุ่มไนโตร (nitro group) $-NO_2$ (หรือ =NO.OH)
3) กลุ่มอะโซ (azo group) -N=N-
4) กลุ่มเอทธิลีน (ethylene group) $\rangle C=C\langle$
5) กลุ่มคาร์บอนีล (carbonyl group) $\rangle C=O$
6) กลุ่มคาร์บอนีล-ไนโตรเจน (carbonyl-nitrogen group) $\rangle C=NH$ และ -CH=N-
7) กลุ่มซัลเฟอร์ (sulfur group) $\rangle C=S$ และ $-C-S-S-C-$

กลุ่มอะตอมต่างๆ เหล่านี้ จะเป็นตัวไปเพิ่มสีให้แก่สารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) โดยการดูดคลื่นแถบแสงสีขาวบางแถบแสง และปล่อยออกมาบางแถบแสง ทำให้มองเห็นสีย้อมมีโทนสีแตกต่างกันไป

สีย้อมโดยทั่วไปนอกจากจะต้องมีกลุ่มอะตอมโครโมฟอร์แล้ว ยังจำเป็นต้องมีกลุ่มอะตอมอีกชนิดหนึ่งได้แก่ กลุ่มอะตอมออกโซโครม (Auxochromes) อันได้แก่ OH, NH_2, NHR, NR_2, SO_3 และ COOH เพื่อให้สีย้อมสามารถทำปฏิกิริยายึดติดกับเส้นใยได้ โมเลกุลใดที่ปราศจากกลุ่มอะตอมออกโซโครม โมเลกุลนั้นจะแสดงสมบัติของสีออกมาได้ แต่จะขาดสมบัติในการยึดติดกับเส้นใย โมเลกุลดังกล่าวนี้เรียกว่า โครมาเจน (chromagen) ยกตัวอย่าง เช่น สีย้อมอะมิโนเอโซเบนซีน (aminoazobenzene dyestuff) มีสูตรโมเลกุลคือ

กลุ่มอะตอมโครโมฟอร์คือ -N=N- กลุ่มอะตอมออกโซโครมคือ $-NH_2$ และโมเลกุลที่เรียกว่าโครมาเจนคือ  ทั้งกลุ่มโครโมฟอร์ ออกโซโครมและโครมาเจนนี้ จะเป็นส่วนสำคัญในการพิจารณาแบ่งกลุ่มของสีย้อมตามสูตรโครงสร้างทางเคมีซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

2.4.2 การจำแนกสีย้อม (อัจฉราพร ไศละสูต, 2527)

จำแนกตามลักษณะทางกายภาพ สามารถแบ่งสีย้อมได้เป็น 2 ชนิด ชนิดหนึ่งละลายน้ำได้เรียกว่า สีย้อม (dyes) อีกชนิดหนึ่งไม่ละลายน้ำเรียกว่า ปิกเมนต์ (pigments) เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่ราคาถูกที่สุด ทำให้ผู้ผลิตจะพยายามค้นคว้าหาวิธีทำให้สีทุกชนิดละลายน้ำได้เพื่อความสะดวกในการย้อม ดังนั้นการจำแนกสีย้อมโดยวิธีนี้จึงเกิดความสับสนขึ้น

จำแนกตามส่วนประกอบทางเคมี ซึ่งจะมีความยุ่งยากสำหรับผู้ที่ไม่ได้ผ่านการศึกษาด้านเคมีมาโดยตรง นอกจากนี้ สีในกลุ่มเคมีเดียวกันอาจมีวิธีการย้อมแตกต่างกัน ใช้กับเส้นใยแตกต่างกัน อีกประการหนึ่งคือ สูตรโครงสร้างที่แท้จริงของสีย้อมหลายชนิดที่นิยมใช้ในปัจจุบันยังไม่ทราบกันเป็นที่แน่ชัด ทำให้มีข้อจำกัดในการจำแนกสีย้อมด้วยวิธีนี้ อย่างไรก็ตามสามารถจำแนกสีตามโครงสร้างเคมีของสี ได้ดังนี้

1) Azo Colorants
   - 1.1) Aromatic Diazo Compound
     - Diazotization and Diazo Compounds
     - The Coupling Reaction
   - 1.2) Azo Compound
     - Basic Dyes
     - Acid Dyes
     - Mordant and Premetallized Dyes
     - Direct Dyes
     - Azoic Dyes
2) Phenylmethane Dyes
3) Xantene Dyes
4) Indigoid Dyes
5) Polycyclicquinone (Anthraquinone, etc.) Dyes

5.1) Anthraquinone Group-Vat Dyes

- Acylamino Anthraquinones
- Condensation Products of Amino Anthraquinone and Cyanuric Chloride
- Anthraquinone Acridones
- Benzanthrones
- Anthanthrones
- Pyranthone and Flavanthrone
- Anthrimides
- Carbazoles
- Sulfur-Containing Anthraquinone compounds

5.2) Naphthalenic Acid Group-Vat Dyes

5.3) Esters of Anthraquinone-Vat Dyes

5.4) Anthraquinonoid-Acid Dyes

6) Sulfur Fusion Dyes

7) Amine Oxidation Colorants

8) Phthalocyanine Colorants

9) Onium Dyes

10) Reactive Dyes

11) Pigments

จำแนกตามลักษณะการนำไปใช้งาน การจำแนกสีย้อมด้วยวิธีนี้ เป็นที่ยอมรับกันทั้งผู้ใช้และผู้ผลิตสีย้อม รวมทั้งสมาคมผู้ผลิตสีย้อม (The Society of Dyers and Colourist) การจำแนกสีย้อมตามลักษณะการนำไปใช้งาน ได้แก่

1) สีเบสิค (Basic dyes)
2) สีแอสิค (Acid dyes)
3) สีมอแดนท์ และพรีเมตัลไลซ์ (Mordant and premetallized dyes)
4) สีไดเรกท์ (Direct dyes)
5) สีดีสเพอร์ส (Disperse dyes)
6) สีอะโซอิค (Azoic dyes)
7) สีวัต (Vat dyes)
8) สีกำมะถัน (Sulfur or sulphide dyes)

9) สีออกซิไดซ์ (Oxidation colorants)
10) สีโอเนียม (Onium dyes)
11) สีรีแอกทีฟ (Reactive dyes)
12) สีปิกเมนต์ที่ใช้กับเรซิน (Pigment-resin binder system)
13) สีโลหะ (Metallic dyes)

2.4.3 ปัจจัยในการทำให้สีย้อมติดกับเส้นใย

2.4.3.1 อิทธิพลเชิงเคมี

สีย้อมที่มีการผลิตขึ้นใช้ในกระบวนการย้อมมีหลายชนิด การที่จะนำสีย้อมชนิดใดมาใช้ย้อมให้ได้ผลที่ดีนั้น ขึ้นอยู่กับการรวมตัวของสีกับเส้นใยซึ่งต้องมีมากกว่าการที่สีจะรวมตัวกับน้ำ ภาวะเช่นนี้เกิดขึ้นได้เมื่อโมเลกุลของสีย้อม มีหมู่อะตอมที่เรียงตัวกันในลักษณะที่ทำให้เกิดภาวะดูดติดกับเส้นใย (substantivity) โดยแรงในการดูดติดยองสีย้อมกับเส้นใยจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับอิทธิพลเชิงเคมี 4 ชนิด ดังต่อไปนี้

1) พันธะเคมีไฮโดรเจน (hydrogen bond)
2) แรงแวนเดอวัลล์ (van de waals forces)
3) แรงไอออนิค (ionic forces)
4) พันธะเคมีโควาเลนท์ (covalent bond)

กำลังเหล่านี้จะไม่ทำหน้าที่เพียงลำพัง จะต้องมีอย่างน้อย 2 ชนิดขึ้นไป บางครั้งก็พร้อมกันทั้ง 4 ชนิด จึงจะทำให้สีกับเส้นใยรวมตัวกันได้ โดยแรงดึงดูดที่จะทำให้เกิดการยึดติดได้ดีที่สุด คือ พันธะเคมีโควาเลนท์

2.4.3.2 ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลของสีย้อม

รูปร่างและขนาดของโมเลกุลของสีย้อม จะมีผลต่อการเคลื่อนตัวของสีย้อมเพื่อเข้าไปในเส้นใยที่ทำการย้อม คือ ถ้าโมเลกุลสีย้อมมีขนาดเล็กและรูปร่างยาว ก็จะสามารถผ่านช่องว่างเข้าไปในเส้นใยได้มากกว่าโมเลกุลสีย้อมที่มีขนาดใหญ่ ทำให้การติดสีได้ดีขึ้น

2.4.4 สีรีแอกทีฟ (reactive dyes)

2.4.4.1 ประวัติของสีรีแอกทีฟ

ในปี 1884 ได้มีการค้นพบสีย้อมที่สามารถย้อมเส้นใยเซลลูโลสได้โดยตรง ได้แก่ สีแวด และ สีซัลเฟอร์ ความพยายามในช่วงต่อมา คือ การทำให้สีที่ไม่ละลายน้ำเหล่านี้สามารถละลายน้ำและติดกับเส้นใยได้ นอกจากนี้ยังมีการค้นคว้าเพื่อหาวิธีย้อมให้สีเกิดปฏิกิริยาโดยตรงกับเส้นใยเซลลูโลส นักค้นคว้าได้พยายามทุกวิถีทาง ตั้งแต่การใช้สารเคมีราคาแพง กระบวนการย้อมสีที่สลับซับซ้อน ใช้สารทำละลายที่อันตราย แต่ความพยายามต่างๆ เหล่านี้ กลับไม่เกิดผลทางด้านเทคนิคเลย จวบจนในช่วงต้นของทศวรรษที่ 50 คือในปีค.ศ. 1952 ได้มีการวางจำหน่ายสีไวนิลซัลโฟน (vinylsulphone) ที่ทำปฏิกิริยาติดกับเส้นใยจำพวกขนสัตว์ (wool) ต่อมาบริษัทอิมพีเรียลเคมีคัลอินดอร์เปอเรชั่น (ICI) ประสบความสำเร็จในการคิดค้นกระบวนการย้อมเส้นใยฝ้ายด้วยสีรีแอกทีฟ และได้วางจำหน่ายสีรีแอกทีฟชนิดแรกในปีค.ศ. 1956 คือ สี Procion

2.4.4.2 คุณสมบัติทั่วไปของสีรีแอกทีฟ

สีรีแอกทีฟ เป็นสีย้อมที่ละลายน้ำได้ดี สามารถย้อมเส้นใยเซลลูโลสได้ดีที่สุด โดยมีคุณสมบัติเป็นแอนไอออนเมื่ออยู่ในน้ำย้อมที่เป็นด่าง โมเลกุลของสีจะทำปฏิกิริยากับหมู่ OH ในเซลลูโลส และเชื่อมโยงติดกันโดยพันธะเคมีโควาเลนท์ เพื่อสร้างเป็น Cross Link Compound กลายเป็นสารประกอบเคมีชนิดใหม่กับเซลลูโลส ทำให้เป็นสีที่มีความคงทนต่องการซักฟอกและการขัดถู

2.4.4.3 โครงสร้างเคมีของสีรีแอกทีฟ

กลุ่มเคมีที่ประกอบขึ้นเป็นสีรีแอกทีฟประกอบด้วยกลุ่มพื้นฐาน 4 กลุ่ม ซึ่งสามารถแสดงเป็นโครงสร้างทั่วไปได้ดังนี้

S - D - T - X

โดย **S** คือ กลุ่มที่มีความสามารถในการละลายน้ำสูง โดยทั่วไปจะเป็นพวกซัลโฟนิก ($-SO_2Na$) ซึ่งจะอยู่ติดกับกลุ่มโครโมฟอร์

D คือ กลุ่มของเคมีที่ทำให้เกิดสี เรียกว่ากลุ่มโครโมฟอร์ (Chromophore)

T คือ กลุ่มอะตอมที่ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างกลุ่มรีแอกทีฟกับกลุ่มโครโมฟอร์ (Bridging group) เช่น กลุ่ม -NH-, -NHCO-, $-SO_2-$, $-NHSO_2-$ และ $-NCH_3-$ เป็นต้น

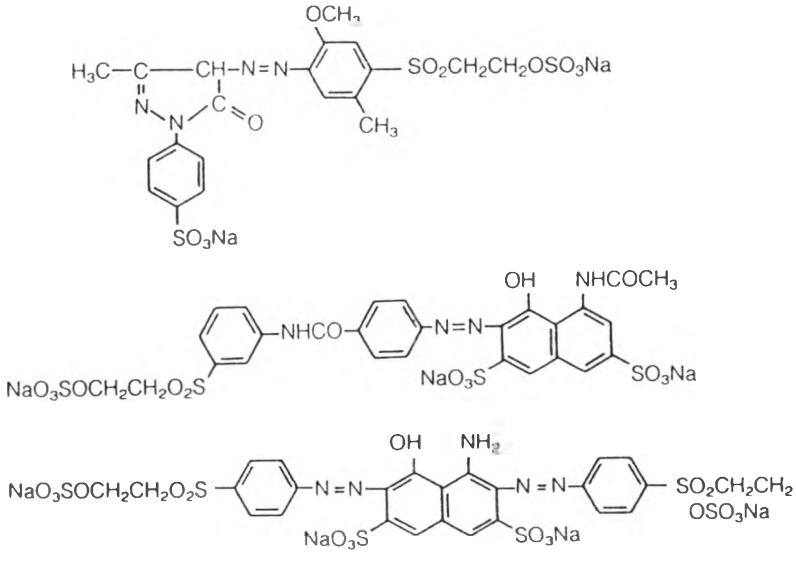
X คือ กลุ่มรีแอกทีฟ (Reactive group) ซึ่งจะเป็นกลุ่มที่ทำให้สีทำปฏิกิริยากับกลุ่มไฮดรอกซิลในเส้นใย

ในบางกรณี กลุ่มรีแอกทีฟก็จะติดกับกลุ่มโครโมฟอร์โดยตรง ไม่ต้องมีตัวเชื่อมก็ได้ และกลุ่มรีแอกทีฟส่วนใหญ่จะเป็นสาร heterocyclic ring ลักษณะของกลุ่มตัวเชื่อมและส่วนประกอบของ heterocyclic ring มีอิทธิพลอย่างมากต่อความสามารถการทำปฏิกิริยา และคุณสมบัติอื่นๆ ของสี จากส่วนประกอบดังที่กล่าวมานี้ พบว่า มีสองส่วนที่สำคัญ คือ สารที่ทำให้เกิดสีและกลุ่ม รีแอกทีฟ โดยส่วนประกอบทั้งสองส่วนนี้ จะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้สีแต่ละชนิดแตกต่างกันไป

2.4.4.4 กลุ่มอะตอมที่ทำให้เกิดสี (Chromophore)

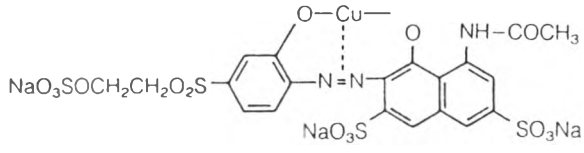
กลุ่มอะตอมที่ทำให้เกิดสีส่วนใหญ่พัฒนามาจากสีแอซิด โดยแบ่งตามโครงสร้างได้เป็นหลายกลุ่มดังนี้ (Sumitomo Chemical Co.,Ltd)

1) กลุ่มโครโมฟอร์ที่มีโครงสร้าง Unmetallised Azo เป็นหลัก แสดงในรูปที่ 2.13 ซึ่งสี รีแอกทีฟส่วนใหญ่ จะมีสารที่ทำให้เกิดสีชนิดนี้เป็นส่วนมาก



รูปที่ 2.13 ตัวอย่างสีที่มีกลุ่มโครโมฟอร์แบบ Unmetallised Azo

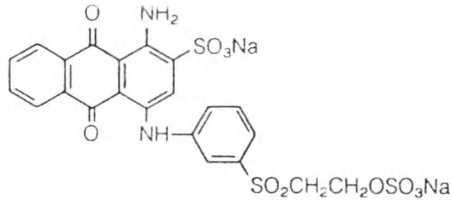
2) กลุ่มโครโมฟอร์ที่มีโครงสร้าง Metal-Complex Azo เป็นหลัก (รูปที่ 2.14)



H-Acid type
(Red. Violet-Blue)

รูปที่ 2.14 ตัวอย่างสีที่มีกลุ่มโครโมฟอร์แบบ Metal-Complex Azo

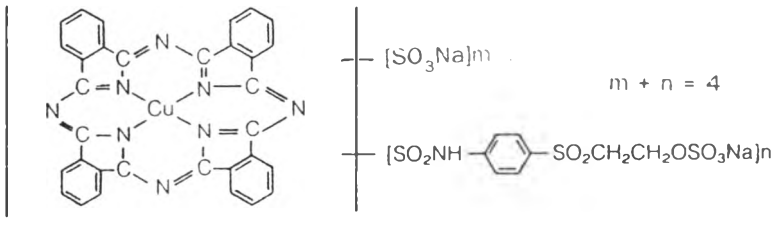
3) กลุ่มโครโมฟอร์ที่มีโครงสร้าง Anthraquinone เป็นหลัก ดังแสดงในรูปที่ 2.15



(Blue)

รูปที่ 2.15 ตัวอย่างสีที่มีกลุ่มโครโมฟอร์แบบ Anthraquinone

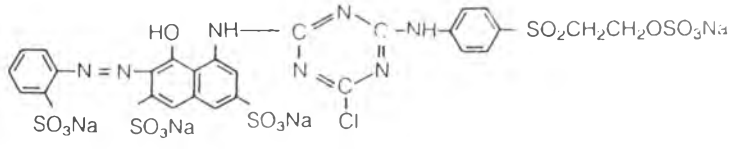
4) กลุ่มโครโมฟอร์ที่มีโครงสร้าง Phthalocyanine เป็นหลัก แสดงในรูปที่ 2.16



(Turquoise Blue)

รูปที่ 2.16 ตัวอย่างสีที่มีกลุ่มโครโมฟอร์แบบ Phthalocyanine

5) กลุ่มโครโมฟอร์ที่มีโครงสร้าง Azo เป็นหลัก ในสีที่มีกลุ่มรีแอกทีฟแบบ Bifunctional แสดงในรูปที่ 2.17



(Red)

รูปที่ 2.17 ตัวอย่างสีรีแอกทีฟแบบ Bifunctional ที่มีกลุ่มโครโมฟอร์เป็นแบบ Azo

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า กลุ่มสารที่ทำให้เกิดสีในสีย้อมรีแอกทีฟนั้น ต่างก็มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปใช้งานที่แตกต่างกันไป โดยองค์ประกอบของกลุ่มโครโมฟอร์ในสีรีแอกทีฟนั้น แสดงในตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 เปอร์เซนต์การกระจายของลักษณะโครงสร้างของกลุ่มโครโมฟอร์ในสีรีแอกทีฟแบ่งตามโทนสีต่าง ๆ (Shore, 1990)

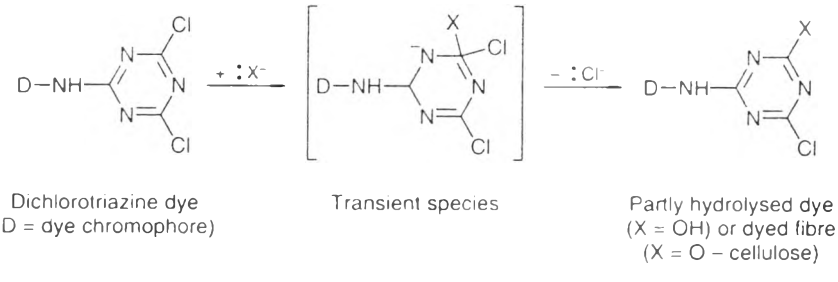
Chemical Class	%การกระจายของโทนสี								%ของสีรีแอกทีฟทั้งหมด
	เหลือง	ส้ม	แดง	ม่วง	ฟ้า	เขียว	น้ำตาล	ดำ	
Unmetallised azo	97	90	90	63	20	16	57	42	66
Metal-complex azo	2	10	9	32	17	5	43	55	15
Anthraquinone				5	34	37		3	10
Phthalocyanine					27	42			8
Miscellaneous	1		1		2				1
รวม	100	100	100	100	100	100	100	100	100

จากตารางข้างต้น จะเห็นได้ว่าสีรีแอกทีฟส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกลุ่มโครโมฟอร์ชนิด Azo (Unmetallised azo และ Metal-complex azo) เป็นส่วนมาก โดยสูงถึงร้อยละ 81 และถ้าไม่รวมสีรีแอกทีฟที่มีโทนสีฟ้าและเขียว ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มโครโมฟอร์ประเภท Anthraquinone และ Phthalocyanine เป็นส่วนใหญ่แล้ว พบว่า สีรีแอกทีฟจะมีกลุ่มอะโซ เป็นองค์ประกอบอยู่สูงถึงร้อยละ 95 ดังนั้นในการบำบัดน้ำเสียมีสีย้อม ถ้าสามารถทำลายพันธะอะโซในกลุ่มโครโมฟอร์ของสีรีแอกทีฟได้ ก็จะสามารถลดสีในน้ำเสียลงได้ การบำบัดน้ำเสียสีรีแอกทีฟในกลุ่มอะโซจึงเป็นงานที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

2.4.4.5 กลุ่มรีแอกทีฟ (*Reactive group*)

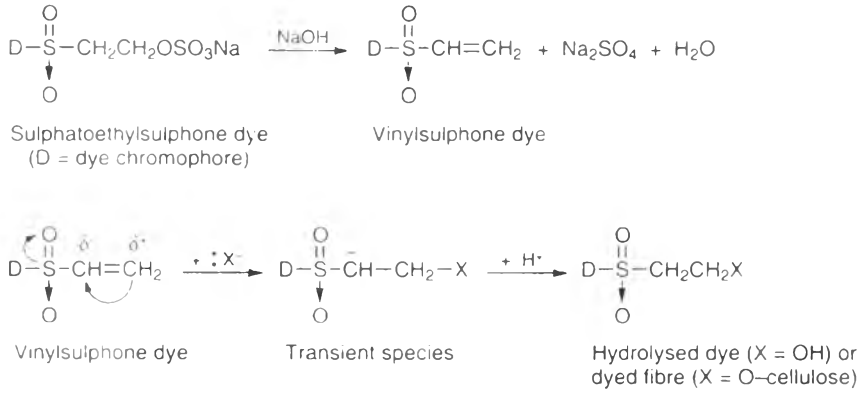
กลุ่มรีแอกทีฟเหล่านี้เป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่สร้างพันธะกับเส้นใย ทำให้สีย้อมสามารถดูดติดกับเส้นใยได้ การสร้างพันธะระหว่างกลุ่มรีแอกทีฟของสีกับเส้นใยแบ่งได้ 2 ลักษณะ คือ

1) เส้นใยหรือไฮดรอกไซด์อิออน เข้าแทนที่อะตอมพวกฮาโลเจน (halogen) ในโมกุลสี (Nucleophilic Substitution) เกิดเป็นพันธะระหว่างสีกับเส้นใยขึ้น ลักษณะของปฏิกิริยาแสดงในรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 ตัวอย่างปฏิกิริยาแบบ Nucleophilic Substitution (Shore, 1995)

2) เส้นใยหรือไฮดรอกไซด์อิออน สร้างพันธะกับโมเลกุลของสีโดยการสลายพันธะคู่ของคาร์บอนอะตอม 2 อะตอม ในกลุ่มไวนิลซัลโฟน (vinylsulphone) แล้วเชื่อมตัวมันเข้าไปกับคาร์บอนตัวท้ายของกลุ่มไวนิลซัลโฟนดังกล่าว (Nucleophilic Addition) ลักษณะของปฏิกิริยาแสดงในรูปที่ 2.19



รูปที่ 2.19 ตัวอย่างปฏิกิริยาแบบ **Nucleophilic Addition (Shore, 1995)**

การสร้างพันธะกับโมเลกุลของสี สามารถเกิดได้ทั้งกับเส้นใยหรือไฮดรอกไซด์อิออน แต่ความสามารถในการสร้างพันธะกับเส้นใยจะมีมากกว่าการสร้างพันธะกับไฮดรอกไซด์อิออน สีที่สร้างพันธะกับไฮดรอกไซด์อิออนเรียกว่าสีที่ไฮโดรไลซ์แล้ว ไม่สามารถสร้างพันธะติดกับเส้นใยได้อีก จึงหลงเหลือไปกับน้ำย้อมและน้ำล้างได้เป็นบางส่วน

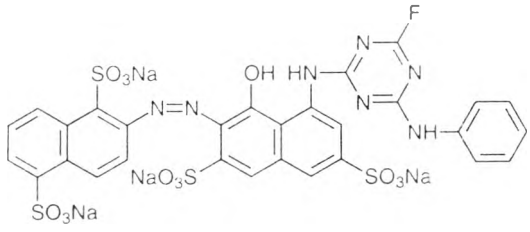
นอกจากนี้ กลุ่มรีแอกทีฟที่มีการพัฒนาคิดค้นขึ้นมาและใช้กันค่อนข้างมาก การพิจารณาจัดกลุ่มขึ้นอยู่กับกลไกในการสร้างพันธะระหว่างสีและเส้นใย และความคงทนของพันธะนี้ในขั้นตอนต่างๆ หลังการย้อม โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้ 1) พวก Monofunctional และ 2) พวก Bifunctional (ตารางที่ 2.12)

ตารางที่ 2.12 กลุ่มรีแอกทีฟที่สำคัญ (Shore, 1995)

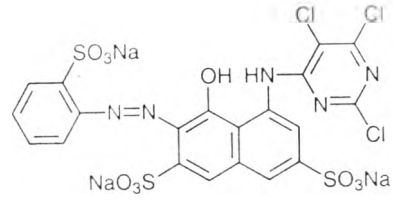
กลุ่มรีแอกทีฟ	ชื่อทางการค้า
Monofunctional	
Dichlorotriazine	Procion MX (Zeneca)
Aminochlorotriazine	Procion H (Zeneca)
Aminofluorotriazine	Cibacron F (CGY)
Trichloropyrimidine	Drimarene X (S)
Chlorodifluoropyrimidine	Drimarene K (S)
Dichloroquinoxaline	Levafix E (BAY)
Sulphatoethylsulphone	Remazol (HOE)
Sulphatoethylsulphonamide	Remazol D (HOE)
Bifunctional	
Bis(aminochlorotriazine)	Procion H-E (Zeneca)
Bis(aminonicotinotriazine)	Kayacelon React (KYK)
Aminochlorotriazine-sulphatoethylsulphone	Sumifix Supra (NSK)
Aminofluorotriazine-sulphatoethylsulphone	Cibacron C (CGY)

กลุ่มรีแอกทีฟ Monofunctional

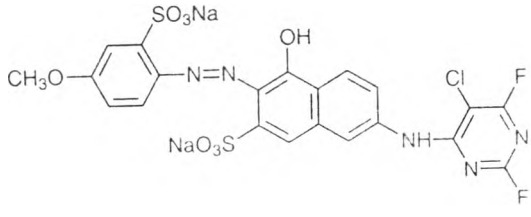
สีในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีกลุ่มรีแอกทีฟเพียงกลุ่มเดียวในโมเลกุล เช่น กลุ่มรีแอกทีที่มีอะตอมฮาโลเจนของสีพวก aminohalotriazine (คลอรีน หรือฟลูออรีน) หรือกลุ่มรีแอกทีฟที่มีกลุ่มไวนิลซัลโฟน นอกจากนี้ ยังมีอีกลักษณะหนึ่งคือ มีกลุ่มรีแอกทีฟเพียงกลุ่มเดียวแต่มีอะตอมฮาโลเจนมากกว่า 1 อะตอม เช่น กลุ่มรีแอกทีฟพวก dichlorotriazine difluoropyrimidine หรือ dicholroquinoxaline จะมีอะตอมฮาโลเจน 2 ตัวในกลุ่มรีแอกทีฟ แต่เมื่อตัวใดตัวหนึ่งถูกแทนที่ด้วยเส้นใยหรือไฮดรอกไซด์อิออนแล้ว อะตอมฮาโลเจนที่เหลืออยู่จะมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาลดลง เนื่องจากการแทนที่ดังกล่าวไปแล้ว ตัวอย่างสีที่มีกลุ่มรีแอกทีฟแบบ monofunctional แสดงในรูปที่ 2.20



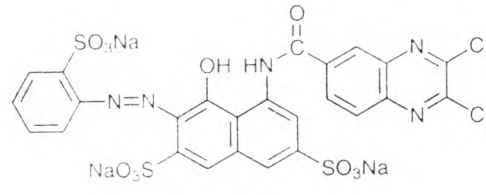
(ก) **Aminofluorotriazine (Cibacron F)**



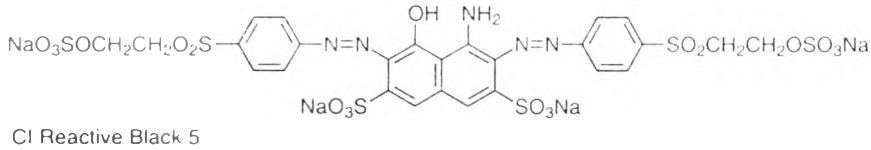
(ข) **Trichloropyrimidine (Procion MX)**



(ค) **Chlorodifluoropyrimidine (Drimarine K)**

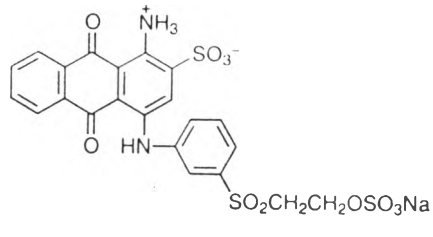


(ง) **Dichloroquinoxaline (Levafix E)**



CI Reactive Black 5

(จ) **Sulphatoethylsulphone (Remazol)**



CI Reactive Blue 19

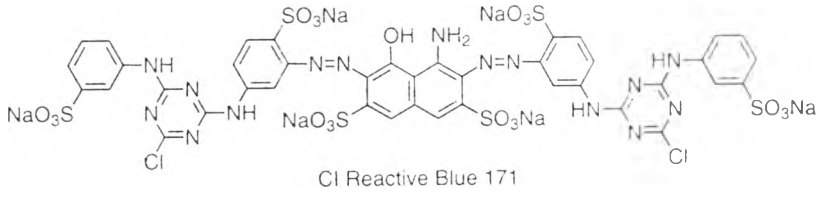
(ฉ) **Sulphatoethylsulphonamide (Remazol D)**

รูปที่ 2.20 ตัวอย่างสีที่มีกลุ่มรีแอกทีฟแบบ **Monofunctional (Shore, 1995)**

กลุ่มรีแอกทีฟ Bifunctional

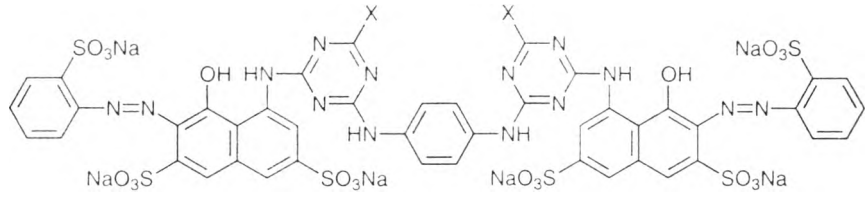
สีรีแอกทีฟในกลุ่มนี้จะมีกลุ่มรีแอกทีฟอยู่ 2 กลุ่มใน 1 โมเลกุลสี ซึ่งทำให้ความสามารถในการดูดติดกับเส้นใยสูงขึ้น ทั้งนี้เพราะเท่ากับมีกลุ่มรีแอกทีฟให้เส้นใยเข้าสร้างพันธะได้เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า และเมื่อกลุ่มหนึ่งเข้าทำปฏิกิริยากับเส้นใยแล้ว อีกกลุ่มหนึ่งก็ยังมีความสามารถในการสร้างพันธะได้ดีอยู่ ทำให้พบว่ามีการสร้างพันธะระหว่างเส้นใยที่อยู่ใกล้เคียงกันด้วย บริษัท ICI ได้ผลิตสี กลุ่มProcion H-E ซึ่งมีโครงสร้างของกลุ่ม aminochlorotriazine 2 กลุ่ม ต่อ 1 โมเลกุลสี ซึ่งทำให้การดูดติดกับเส้นใยดีขึ้น เมื่อเทียบกับพวก monofunctional การผลิตสีย้อมที่เป็น bifunctional เหล่านี้ มักจะเป็นการสร้างขึ้นโดยการดัดแปลงกลุ่มรีแอกทีฟของพวก monofuncitonal มาเป็นองค์ประกอบ มีอยู่ 2 ลักษณะดังนี้ คือ

1) กลุ่มรีแอกทีฟทั้ง 2 กลุ่มในโมเลกุลสี เป็นชนิดเดียวกัน ซึ่งการสร้างสีย้อมรีแอกทีฟเหล่านี้ จะมีตำแหน่งของกลุ่มรีแอกทีฟทั้ง 2 ในโมเลกุลสมมาตรกัน (รูปที่ 2.21)



CI Reactive Blue 171

(ก) Bis(aminochlorotriazine) (Procion H-E)



CI Reactive	*Substituent X*	
Red 120	chloro	Procion Red H-E3B (Zeneca)
Red 221	nicotino	Kayacelon React Red CN-3B (KYK)

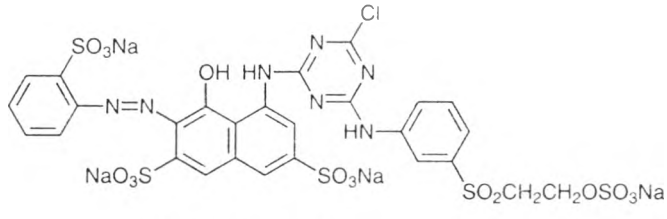
(ข) Bis(aminonicotinotriazine) (Kayacelon React)

รูปที่ 2.21 ตัวอย่างสีที่มีกลุ่มรีแอกทีฟแบบ **Bifunctional** ในลักษณะสมมาตร

(Shore, 1995)

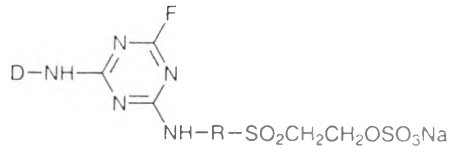
2) กลุ่มรีแอกทีฟทั้ง 2 กลุ่มในโมเลกุลสี เป็นคนละชนิดกัน เช่น สีในกลุ่ม Sumifix Supra ซึ่งมีกลุ่มรีแอกทีฟพวก aminochlorotriazine และ พวก sulphatoethylsulphone กลุ่มรีแอกทีฟทั้ง 2 กลุ่มสามารถทำปฏิกิริยากับเส้นใยได้ แต่โดยส่วนใหญ่จะทำปฏิกิริยากับพวก sulphatoethylsulphone มากกว่า นอกจากนี้ กลุ่ม aminochlorotriazine ยังทำหน้าที่เป็นกลุ่มตัวเชื่อมระหว่าง กลุ่ม sulphatoethylsulphone กับกลุ่มโครโมฟอร์ได้อีกด้วย ซึ่งทำให้สามารถผลิตสีประเภทนี้โดยมีโครงสร้างของกลุ่มโครโมฟอร์แตกต่างกันไปอย่างหลากหลายได้ และการที่มีกลุ่มรีแอกทีฟแตกต่างกันทำให้สามารถใช้สีเหล่านี้ได้ในช่วงกว้างของอุณหภูมิ

ในปี 1988 บริษัท Ciba-Geigy ก็ได้ผลิตสีในกลุ่ม Cibacron C ซึ่งมีกลุ่มรีแอกทีฟพวก aminofluorotriazine และพวก aliphatic sulphatoethylsulphone (รูปที่ 2.22) และเช่นเดียวกันที่กลุ่ม aminofluorotriazine ทำหน้าที่เป็นกลุ่มตัวเชื่อมในโมเลกุลสีด้วย ทำให้สีนี้มีความสามารถในการติดกับเส้นใยสูง และไฮโดรไลส์น้ำน้อย และข้อได้เปรียบของสี Cibacron C คือ ในสภาวะการทำงานหนึ่งๆ กลุ่มรีแอกทีฟทั้ง 2 กลุ่ม จะทำงานได้ดีเท่ากัน



CI Reactive Red 194

(ก) Aminochlorotriazine-sulphatoethylsulphone (Sumifix Supra)



D = dye chromophore R = aliphatic group

(ข) Aminofluorotrazine-sulphatoethylsulphone (Cibacron C)

รูปที่ 2.22 ตัวอย่างสีที่มีกลุ่มรีแอกทีฟแบบ **Bifunctional** แต่กลุ่มรีแอกทีฟแตกต่างกัน **(Shore, 1995)**

2.4.4.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาของสีรีแอกทีฟ

ในกระบวนการฟอกย้อมสีรีแอกทีฟ มีจุดประสงค์สำคัญคือ การทำให้สีสามารถแทรกซึมเข้าไปทำปฏิกิริยากับเส้นใยให้มากที่สุด และเกิดการไฮโดรไลส์ในน้ำน้อยที่สุด ทั้งนี้ไม่เพียงเพื่อเป็นการประหยัดเท่านั้น ยังทำให้เส้นใยไม่ดูดสีที่ไฮโดรไลส์แล้วเข้าไปในเส้นใย ซึ่งจะทำให้ไม่คงทนเมื่อผ่านกระบวนการใช้น้ำ เพราะถ้าให้สีไฮโดรไลส์มาก การซักในขั้นสุดท้ายก็ทำให้สะอาดหมดจดได้ยาก จึงจำเป็นต้องซักเอาสีพวกนี้ออกให้หมด เพื่อจะทำให้สีไม่ตกเวลาใช้

การไฮโดรไลส์ของสี คือ การทำปฏิกิริยาของสีกับไฮดรอกไซด์อิออนในน้ำ มักจะเป็นปฏิกิริยาที่แข่งขันกับการทำปฏิกิริยาระหว่างสีกับเส้นใย ปฏิกิริยาระหว่างสีกับเส้นใยสามารถเกิดได้ก็ต่อเมื่อ สีสามารถดูดซึมเข้าไปในเส้นใย ดังนั้น ความเร็วของปฏิกิริยาระหว่างสีกับเส้นใยจึงขึ้นอยู่กับความเร็วในการดูดซึมเข้าไปในเส้นใยของสี อัตราส่วนของความเร็วในการทำปฏิกิริยาระหว่างสีกับเส้นใย และระหว่างสีกับน้ำ จะมีค่าคงที่สำหรับสีหนึ่งๆ แม้ในช่วงค่อนข้างกว้างของพีเอชที่เป็นด่าง

ประสิทธิภาพของการทำปฏิกิริยาระหว่างสีกับเส้นใยขึ้นกับ

1) อัตราส่วนของความเร็วปฏิกิริยา ระหว่างสีกับเส้นใยต่อความเร็วปฏิกิริยาระหว่างสีกับน้ำ

2) ความเข้มข้นสัมพัทธ์ระหว่างสีที่ถูกดูดซึมเข้าไปในเส้นใยและสีที่หลงเหลืออยู่ในน้ำ

3) สัมประสิทธิ์การแพร่ของสีเข้าไปในเส้นใย

4) ปริมาณน้ำ พบว่ายิ่งปริมาณน้ำน้อยจะเพิ่มความเร็วและประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาระหว่างสีกับเส้นใย

5) พื้นที่ผิวของเส้นใยสำหรับให้สีได้ถูกดูดซึม

จะเห็นว่าคุณสมบัติพื้นฐานของสีมีผลต่อการทำปฏิกิริยาของสีกับเส้นใย ดังนั้นวิธีการย้อมสำหรับสีแต่ละชนิดจึงแตกต่างกันไป และตัวแปรที่ใช้ควบคุมก็จะแตกต่างกันไป ซึ่งสามารถแบ่งสีรีแอกทีฟได้เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะของตัวแปรที่ใช้ควบคุมการย้อมได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สีรีแอกทีฟที่ใช้ด่างเป็นตัวควบคุม (Alkali-controllable reactive dyes)

สีย้อมในกลุ่มนี้ต้องการอุณหภูมิในการย้อมประมาณ 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส สีย้อมกลุ่มนี้มีลักษณะที่สำคัญคือ จะมีสีย้อมหลงเหลือน้อยในน้ำหลังการย้อมซึ่งมีสารละลายเกลือที่เป็นกลางอยู่ และยังไม่ได้เติมด่าง สีย้อมเหล่านี้จะมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาสูงขึ้น

เมื่อมีการเติมด่าง ดังนั้นระดับการทำปฏิกิริยาจะสามารถควบคุมได้ด้วยปริมาณด่างที่เติมให้ ตัวอย่างของสีกลุ่มนี้จะมีกลุ่มรีแอกทีฟพวก dichlorotriazine chlorodifluoropyrimidine dichloroquinoxaline และ vinylsulphone

กลุ่มที่ 2 สีรีแอกทีฟที่ใช้เกลือเป็นตัวควบคุม (Salt-controllable reactive dyes)

สีย้อมในกลุ่มนี้ต้องใช้อุณหภูมิในการย้อมประมาณ 80 องศาเซลเซียส จนถึงน้ำเดือด สีย้อมกลุ่มนี้ จะมีหลงเหลือมากในน้ำหลังการย้อมที่พีเอชเป็นกลาง ดังนั้น ระดับเกลือที่เติมให้จึงมีความสำคัญมากต่อระดับการทำปฏิกิริยาของสีในการย้อม สามารถใช้เป็นตัวควบคุมการย้อมสีได้ สีย้อมประเภทนี้มักจะมีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาต่ำ เช่น สีย้อมที่มีกลุ่มรีแอกทีฟ trichloropyrimidine aminochlorotriazine หรือ bis(aminochlorotriazine) ส่วนสีย้อม aminofluorotriazine (Cibacron F) มีลักษณะที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้เช่นกัน แต่การย้อมสีย้อมกลุ่มนี้กลับมีประสิทธิภาพดีเมื่อย้อมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า โดยใช้กระบวนการย้อมแบบเท (batchwise)

กลุ่มที่ 3 สีรีแอกทีฟที่ใช้อุณหภูมิเป็นตัวควบคุม (Temperature-controllable reactive dyes)

สีย้อมกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือด ในสภาวะที่ไม่มีด่าง แม้ว่าในการใช้งานจริงสามารถใช้สภาวะการย้อมเดียวกับในกลุ่มที่ 2 ร่วมกับการใช้ด่าง ที่อุณหภูมิ 80 ถึง 100 องศาเซลเซียส สีย้อมประเภทนี้มีระดับการทำปฏิกิริยาของแต่ละสีเอง สารช่วยย้อมอื่นๆ ไม่มีความจำเป็นเท่าใดนัก การย้อมให้ได้ผลดีเพียงแต่ควบคุมการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเท่านั้นก็พอ ในปัจจุบันสีย้อมในกลุ่มนี้มีเพียงสีในกลุ่ม Kayacelon React ซึ่งมีโครงสร้างกลุ่มรีแอกทีฟเป็น bis(aminonicotinotriazine) เป็นองค์ประกอบ

2.4.5 กระบวนการย้อมสี

กระบวนการย้อมสีมีได้หลายแบบ ขึ้นอยู่กับชนิดของเส้นใยและสีย้อมที่ใช้ ในที่นี้จะเน้นถึงกระบวนการย้อมเส้นใยฝ้ายโดยใช้สีรีแอกทีฟ เนื่องจากเป็นแหล่งน้ำเสียที่ใช้ในการวิจัยนี้ และเพื่อให้สามารถเข้าใจถึงส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำเสียที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นประโยชน์ในการทดลองต่อไป กระบวนการย้อมฝ้ายประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

2.4.5.1 การเตรียมเส้นใยสำหรับการย้อม

เนื่องจากเส้นด้ายที่ผลิตมาจากโรงปั่นนั้นยังมีความสกปรกต่างๆ อยู่มาก เช่น แป้ง ขี้ผึ้ง กาว สีธรรมชาติ ฯลฯ ซึ่งล้วนเป็นอุปสรรคต่อการย้อม ทำให้น้ำย้อมไม่สามารถเข้าถึงภายในเส้นใยได้อย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ซึ่งอาจทำให้เส้นด้ายที่ได้จากการย้อมมีสีไม่สม่ำเสมอหรือเป็นรอยด่าง ดังนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการกำจัดสิ่งสกปรกต่างๆ ที่อยู่ในเส้นด้ายออกให้หมด ตลอดจนเตรียมเส้นใยให้พร้อมสำหรับการย้อมต่อไป เพื่อให้การย้อมสีมีประสิทธิภาพสูง ขั้นตอนที่สำคัญมีดังต่อไปนี้

1) การลอกแป้ง (Desizing)

เป็นกระบวนการที่ทำให้แป้งสลายตัวกลายเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ โดยสารเคมีในการออกซิไดซ์ (oxidising agent) หรือ การต้มด้วยสารช่วยย่อย (enzyme agent)

2) การขจัดสิ่งสกปรก (Scouring)

เป็นกระบวนการที่ใช้สำหรับขจัดสิ่งสกปรกต่างๆ เช่น คราบน้ำมัน ขี้ดิน ขี้ผึ้ง กาว ฯลฯ ให้หมดไปจากเส้นใย โดยการใส่ด่างซึ่งนิยมใช้โซดาไฟ (NaOH) กับสารลดแรงตึงผิว เช่น สบู่ หรือ ผงซักฟอก ลงในหม้อต้ม โดยสารเคมีที่ใส่นี้จะทำปฏิกิริยากับสิ่งสกปรกที่ติดอยู่กับเส้นใยให้หลุดออกมากับน้ำ

3) การฟอกขาว (Bleaching)

เป็นการกำจัดสีธรรมชาติของใยฝ้าย ซึ่งจะมีผลต่อการย้อมในภายหลังได้หากไม่ทำการกำจัดให้หมดก่อนนำไปย้อม

สารเคมีที่ใช้ในการฟอกขาว คือ สารเคมีที่มีอำนาจในการออกซิไดซ์ที่สูง เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และสารประกอบเปอร์ออกไซด์อื่นๆ ทั้งนี้การจะเลือกสารเคมีตัวใดขึ้นอยู่กับชนิดของเส้นใย เครื่องมือที่ใช้ในการฟอก และความเข้มสีที่จะทำการย้อม เช่น ถ้าย้อมสีเข้มก็อาจไม่ต้องฟอกเส้นใยจนขาวมากนัก เพราะผลกระทบของสีธรรมชาติเดิมจะมีผลน้อย

4) การซุบมัน (Mercerizing)

กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่เพิ่มความมันของเส้นใย เพื่อให้เส้นใยสามารถดูดสีย้อมได้มากขึ้น และเส้นใยอ่อนนุ่มขึ้น โดยสารเคมีที่นิยมใช้คือ โซดาไฟ

ขั้นตอนต่าง ๆ ที่กล่าวมาแสดงในรูปที่ 2.23

2.4.5.2 การย้อมสี

กระบวนการย้อมใยฝ้ายด้วยสีรีแอกทีฟมีได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะของสีชนิด สมบัติของเส้นใยที่นำมาย้อม และอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้อม แต่ทุกวิธีมีจุดประสงค์เพื่อให้สีย้อมเกิดปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ก่อนที่กระบวนการย้อมจะสิ้นสุดลง และต้องพยายามให้สีดูดซึมเข้าไปในเส้นใยให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้

สีรีแอกทีฟที่ใช้ในการย้อม ไม่ว่าสีตัวนั้นจะเหมาะสำหรับย้อมเย็นหรือย้อมร้อน สามารถจำแนกวิธีการย้อมได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

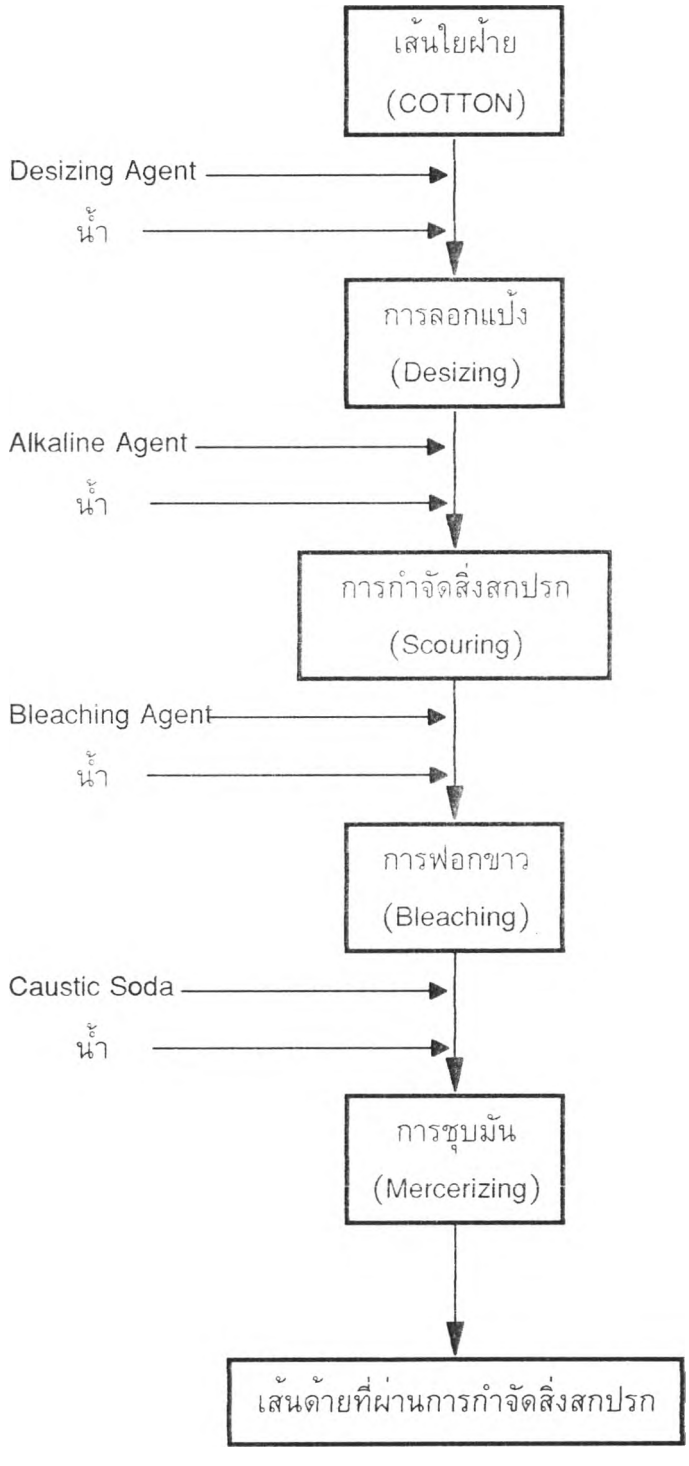
1) การย้อมแบบต่อเนื่อง (Continuous dying process)

ในกระบวนการนี้ จะทำให้สีย้อมเข้าในเส้นใยได้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ส่วนมากจะมีสีเข้มและง่ายต่อการควบคุม

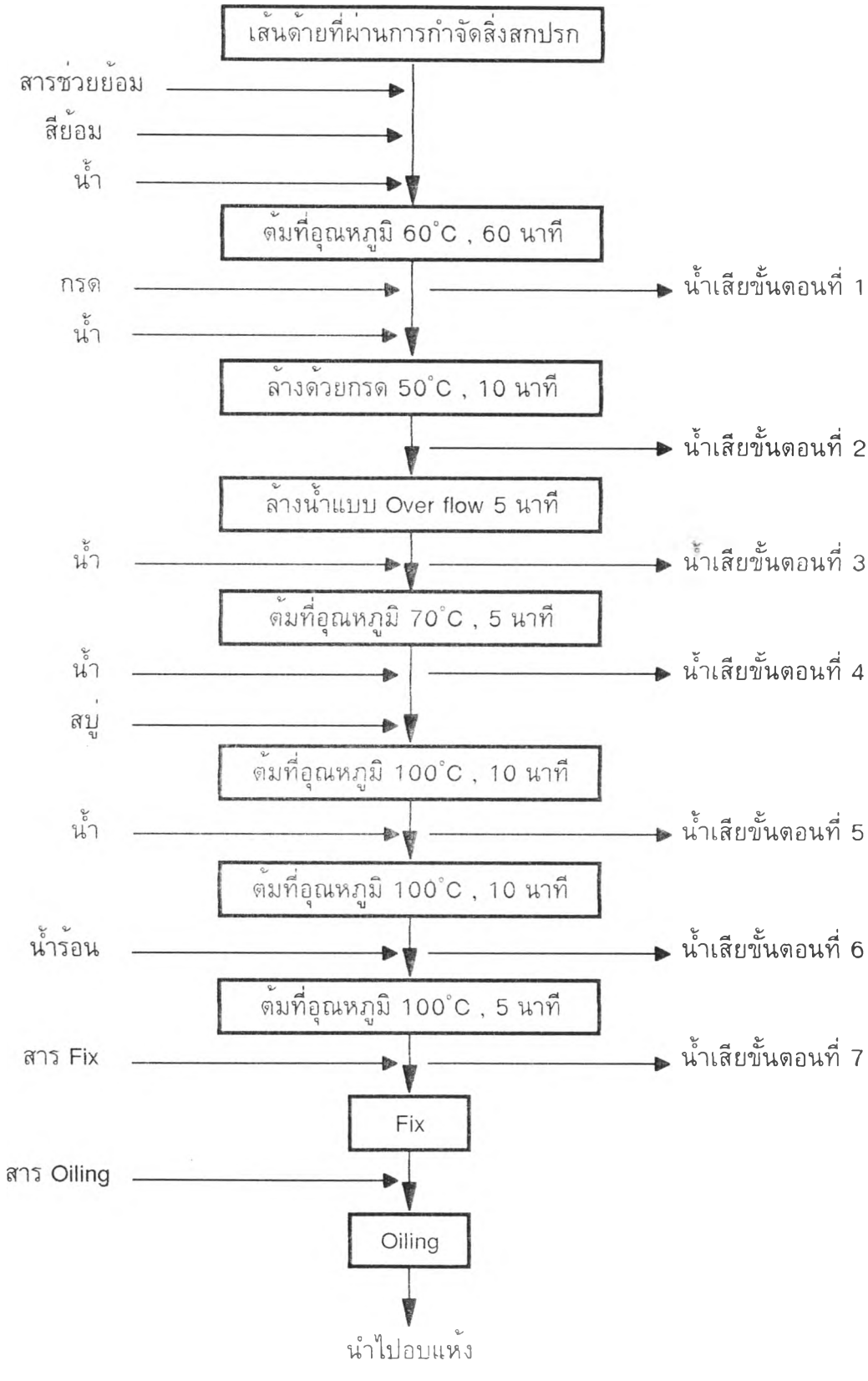
2) การย้อมแบบสีซึมในหม้อย้อม หรือ แบบเท (Batchwise dying)

เป็นกรรมวิธีที่เหมาะสำหรับโรงงานขนาดเล็ก ใช้เครื่องย้อมแบบธรรมดาแต่สามารถให้คุณภาพดีเท่ากับโรงงานขนาดใหญ่

ขั้นตอนที่ใช้ในการย้อมแบบเทนี้จะให้น้ำเสียออกมาในแต่ละขั้นตอนแตกต่างกันไป ดังแสดงในรูปที่ 2.24 สำหรับในงานวิจัยนี้ได้นำน้ำเสียมาจากขั้นตอนที่ 1 ซึ่งเป็นน้ำเสียที่เข้มที่สุดมาใช้ในการทดลอง



รูปที่ 2.23 การเตรียมเส้นใยสำหรับการย้อม



รูปที่ 2.24 กระบวนการย้อมสีและตกแต่งผ้า (โรงงานอุตสาหกรรมรามาเทคไทล์ จำกัด)

2.5 การบำบัดน้ำเสียมีสีย้อมด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

ในปัจจุบัน อุตสาหกรรมสิ่งทอได้เพิ่มจำนวนมากขึ้นตามการเพิ่มของประชากร อีกทั้งยังมีการพัฒนาเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการฟอกย้อม ไม่ว่าจะเป็นเครื่องจักรที่ทันสมัย การเติมสารเคมีช่วยเพิ่มคุณภาพของผ้า แม้กระทั่งการพัฒนาสีที่ใช้ในการย้อมเพื่อให้สีติดผ้าได้ดีขึ้น ทำให้อุตสาหกรรมสิ่งทอมีการใช้สารเคมีต่างๆ เป็นจำนวนมาก คือมีสารเคมีมากกว่า 8,000 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย้อมที่มีการระบุไว้ในดัชนีสี (Colour Index) ในขณะที่มีการผลิตสี มากกว่า $7x10^5$ เมตริกตันต่อปี (Meyer, 1981 อ้างถึงใน Banat et al., 1996) น้ำเสียจากอุตสาหกรรมเหล่านี้จึงประกอบไปด้วยสารเคมีและสีย้อมมากมายหลายชนิด แต่ลักษณะสำคัญของน้ำเสียชนิดนี้ก็คือ เป็นน้ำเสียที่มีสี ซึ่งเป็นผลมาจากสีย้อมที่ใช้ในกระบวนการของอุตสาหกรรมนี้ สีย้อมเหล่านี้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย เช่น สีบางชนิดที่ความเข้มข้นเพียง 1 มก./ล. ก็ทำให้น้ำเสียมีสีจนเป็นที่น่ารังเกียจได้ มลภาวะจากน้ำเสียมีสี นอกจากจะทำให้เป็นที่น่ารังเกียจต่อแหล่งน้ำต่างๆ แล้ว ยังอาจมีผลทำให้การส่องผ่านของแสงลงไปในน้ำได้น้อยลง และทำให้พืชน้ำไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ นอกจากนี้สีย้อมเหล่านี้ยังมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์สังเคราะห์ ซึ่งส่วนใหญ่ใช้สารประกอบอะโรมาติกอามีนเป็นส่วนประกอบในการผลิตสี สีย้อมเหล่านี้จึงสามารถทนต่อการถูกออกซิเดชันด้วยกระบวนการทางเคมีและแสง (Dubrow et al., 1996) ทำให้คงตัวอยู่ได้นานและย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก

การบำบัดน้ำเสียมีสีในช่วงแรกๆ จึงเป็นการใช้วิธีการทางกายภาพและเคมีเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้มีอยู่หลายวิธี เช่น กระบวนการฟล็อกคูเลชัน-โคแอกกูเลชัน โดยใช้สารเคมี (สมคิด วงศ์ไชยสุวรรณ, 2525) กระบวนการดูดติดผิวด้วยผงถ่านกัมมันต์ (Reife และ Freeman, 1996) การแยกสีออกจากน้ำด้วยเมมเบรน (Elliott, 1996) การออกซิเดชันสีย้อมด้วยคลอรีน โอโซน หรือ แสงอุลตราไวโอเล็ต (UV) การใช้ไฟฟ้าแยกสีออกจากน้ำ การใช้เรซิน รวมทั้งการใช้สารเคมีเฟนตัน (วุฒิ วิพันธ์พงษ์, 2540) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้สามารถลดสีในน้ำเสียลงได้เป็นอย่างดี แต่กลับไม่เป็นที่แพร่หลาย ทั้งนี้ก็เพราะค่าใช้จ่ายในการลงทุนและการดำเนินการด้วยวิธีดังกล่าวค่อนข้างสูงมาก นอกจากนี้กระบวนการลดสีดังกล่าวบางวิธียังไม่สามารถใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีสีย้อมบางชนิดได้ เช่น กระบวนการโคแอกกูเลชันโดยใช้สารส้ม ปูนขาว และ แมกนีเซียมคาร์บอเนตไฮเดรตเบสิก ก็แทบจะไม่สามารถกำจัดสีย้อมประเภทรีแอกทีฟลงได้ (สมคิด วงศ์ไชยสุวรรณ, 2525) ทำให้เป็นปัญหากับโรงงานบางแห่งที่มีการใช้สีย้อมหลายชนิดต่างๆ กัน

2.5.1 การบำบัดน้ำเสียมีสีย้อมด้วยระบบบำบัดแบบเติมอากาศ

การบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีการทางชีวภาพ ยังคงเป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการทางกายภาพและเคมี โดยเฉพาะระบบชีวภาพแบบเติมอากาศ เช่น ระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ที่มีใช้กันมากที่สุดในงานบำบัดน้ำเสีย อย่างไรก็ตาม การกำจัดสีย้อมในน้ำเสียด้วยวิธีทางชีวภาพแบบเติมอากาศไม่ประสบความสำเร็จเท่าไรนัก ก็เนื่องจากความทนทานต่อการถูกออกซิไดซ์ของสีย้อมดังที่กล่าวไปแล้วนั่นเอง นอกจากนี้ยังมีปัญหาของความเป็นพิษจากสีย้อมที่มีต่อจุลชีพ การทำให้จุลชีพแบบใช้อากาศมีความชินกับน้ำเสียมีสีย้อมจึงเป็นเรื่องยาก อีกทั้งน้ำเสียจากโรงฟอกย้อมมักจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา สาเหตุก็เพราะกระบวนการย้อมมีหลายขั้นตอนทั้งการเตรียมด้ายหรือผ้าก่อนการย้อม การย้อม และการล้างและตกแต่งภายหลังการย้อม ซึ่งล้วนแต่มีการใช้สารเคมีหลายชนิด และในแต่ละขั้นตอนก็อาจมีการใช้สารเคมีแตกต่างกันไปอีก เมื่อเส้นด้ายหรือผ้ามีความแตกต่างกันไป โดยเฉพาะกระบวนการย้อม เพราะสีย้อมมีหลายชนิดแล้วแต่ชนิดของเส้นใยที่ต้องการย้อม และสารช่วยย้อมต่างๆ ก็แตกต่างไปอีกแล้วแต่ชนิดสีย้อม เส้นใย และการติดสี

Porter และ Snider (1976 อ้างถึงใน Dubrow et al., 1996) ได้ระบุว่าน้ำเสียจากโรงฟอกย้อมมีความยากในการย่อยสลายทางชีวภาพ เนื่องจากพบว่าค่า BOD_{30} มีค่ามากกว่า BOD_5 มาก และยังมีงานวิจัยของ Shriver และ Dague (1978 อ้างถึงใน Dubrow et al., 1996) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการทดลองค่าบีโอดี และสรุปว่าน้ำเสียที่มีสีจากโรงฟอกย้อมมีอัตราการย่อยสลายช้ากว่าน้ำเสียชุมชน โดยพบว่า หลังจากเวลาผ่านไป 10 วัน อัตราการย่อยสลายน้ำเสียคิดเป็น 31% ในขณะที่น้ำเสียชุมชนมีอัตราการย่อยสลาย 92% ดังนั้นจึงได้มีความพยายามปรับปรุงให้ระบบบำบัดแบบเติมอากาศมีความสามารถในการบำบัดน้ำเสียจากโรงฟอกย้อมได้ดีขึ้น

Shaul และคณะ (1986) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียมีสีย้อมแอซิด 7 ชนิด และสีทั้ง 7 ชนิดมีโครงสร้างเป็นอะโซ โดยศึกษาการดูดติดผิว (adsorption) ของสีย้อมกับฟล็อกของจุลชีพ และพบว่าสีย้อม 5 ใน 7 ชนิด สามารถลดลงได้มากกว่า 70% โดยส่วนใหญ่มีกลไกของการดูดติดผิวร่วมกับการย่อยสลายทางชีวภาพ

Goronszy และคณะ (1992) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียมีสีย้อมด้วยระบบ Cyclic Activated Sludge System (CASS) พบว่าสีย้อมที่หลงเหลือจากการบำบัดด้วยระบบ CASS นี้แล้ว สามารถถูกกำจัดได้ง่าย เมื่อเติมคลอรีนความเข้มข้น 25-100 มก./ล. เวลาสัมผัส 5-20 นาที

Marquez และ Costa (1996) ศึกษาการใช้ระบบ PACT (Powder Activated Carbon Treatment) ในการบำบัดน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ที่ย่อยยาก โดยการเติมผงถ่านกัมมันต์ในระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์จำลองในห้องปฏิบัติการ แล้วศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างมวลชีวภาพ (biomass) กับการกำจัดสี พบว่า ที่ความเข้มข้นมวลชีวภาพประมาณ 1,000 มก./ล. มีการกำจัดสีได้ดีที่สุด เนื่องจากมีพื้นที่ผิวเพียงพอในการดูดติดสีและให้จุลชีพยึดเกาะและเจริญเติบโต แต่เมื่อความเข้มข้นมวลชีวภาพมากกว่า 2,500 มก./ล. พื้นที่ผิวของผงถ่านมีน้อยลงเนื่องจากมีมวลชีวภาพยึดเกาะมากเกินไป จนขาดพื้นที่ผิวเหลือสำหรับการดูดติดผิวกับสีย้อม

กมลรัตน์ ดีประเสริฐวงศ์ (2540) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีในระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ด้วยการเติมผงถ่านกัมมันต์ พบว่า ระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ที่เติมผงถ่านมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีเพิ่มขึ้นจากช่วง 13.5-27% เป็น 26-68% และเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีจากช่วง 67-75% เป็น 74-84% และผงถ่านกัมมันต์ยังเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนของสลัดจ์จากระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ด้วย

2.5.2 การบำบัดน้ำเสียมีสีย้อมด้วยระบบบำบัดแบบไร้อากาศ

การศึกษาการบำบัดน้ำเสียมีสีย้อมด้วยระบบบำบัดแบบไร้อากาศ มีจุดเริ่มต้นมาจากการศึกษาการย่อยสลายสีผสมอาหารชนิดอะโซภายในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Carliell, 1995) ด้วยเหตุนี้ งานวิจัยในระยะหลังจึงมักจะมุ่งไปที่กลไกการสลายพันธะอะโซด้วยจุลชีพประเภทเดียวกับที่อยู่ในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม กลไกการกำจัดสีอะโซภายใต้สภาวะไร้อากาศที่แท้จริงเป็นอย่างไรยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่เป็นที่เข้าใจว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า azoreductase

Chung และคณะ (1992 อ้างถึงใน Munruk Tuntoolavest, 1997) ได้รวบรวมผลการศึกษากับแบคทีเรียหลายชนิด (ตารางที่ 2.13) ซึ่งเป็นแบคทีเรียในลำไส้ที่ต่างก็สามารถลดสีชนิดอะโซได้ และมักจะพบเอนไซม์ azoreductase ในแบคทีเรียเหล่านี้ และ Chung ยังได้ระบุว่า เอนไซม์ azoreductase นี้ไม่สามารถทนออกซิเจนได้ และต้องการสารประกอบฟลาวิน (flavin) เช่น โคเอนไซม์ FAD เพื่อช่วยในการทำงานของเอนไซม์ นั่นคือ สาร FAD จะถูกรีดิวซ์ด้วย สาร NADH กลายเป็น $FADH_2$ (reduced flavin nucleotides) และ $FADH_2$ ก็ถ่ายอิเลกตรอนให้กับพันธะอะโซของสีย้อม แล้วพันธะอะโซก็แตกออกนั่นเอง ดังนั้น การลดสีในน้ำเสียจึงไม่ใช่การย่อยสลายโดยตัวสีเป็นสารให้อิเลกตรอนเช่นสารอินทรีย์ในน้ำเสียทั่วๆ ไป แต่ทำหน้าที่เป็นสารออกซิไดซิ่งเอเจนต์สำหรับ $FADH_2$ ในการเปลี่ยนรูปกลับเป็นโคเอนไซม์ FAD ในระบบขนส่งอิเลกตรอนต่อไป (Gingell และ Walker, 1971 อ้างถึงใน Carliell, 1995)

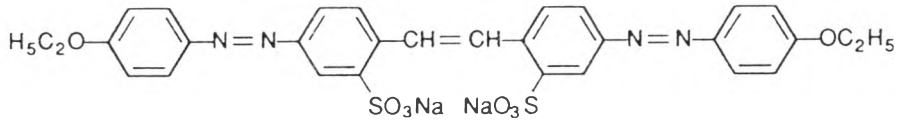
ตารางที่ 2.13 แบคทีเรียในลำไส้ที่พบเอนไซม์ azoreductase (รวบรวมโดย **Chung et al., 1992** อ้างถึงใน **Munruk Tuntoolavest, 1997**)

Acidaminococcus fermentans
Aerobacter aerogenes (Enterobacter aerogenes)
Bacillus sp.
Bacteroides sp.
Bacteroides fragilis
G. thetaiotaomicron
Bifidobacterium adolescentis
B. infantis
Butyrivibrio sp.
Citrobacter sp.
Clostridium nexile
C. clostridiiforme
C. parrputrificum
C. ramosum
C. sporogenes
Coprococcus catus
Enterococcus faecalis
Escherichia coli
Eubacterium aerofaciens
E. biforme
E. hadrum
Fusobacterium sp.
Fusobacterium prausnitzii
Klebsiella aerogenes
Lactobacillus sp.
Lactobacillus catenaforme
Peptococcus prevotii
Peptostreptococcus productus
Pneumococcus sp.
Proteus sp.
Proteus vulgaris
Pseudomonas sp.
Pseudomonas aeruginosa
P. pyrocyanea
Ruminococcus bromii
Salmonella paratyphi
S. typhimurium
Shigella dysenteriae (Type 1)
Staphylococcus aureus
Streptococcus faecalis
S. faecalis var liquefaciens (Enterococcus faecalis)
S. faecium (Enterococcus faecium)
S. haemolyticus
Veillonella parvula

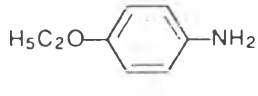
การศึกษาการลดสีด้วยแบคทีเรียในลำไส้ที่กล่าวมาข้างต้น จึงเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาการลดสีย้อมจากโรงฟอกย้อมภายใต้สภาวะไร้อากาศ เนื่องจากสีย้อมส่วนใหญ่มักจะมีกลุ่มโครโมฟอร์ที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นพันธะอะโซ ดังนั้น ถ้ามีการทำลายพันธะอะโซได้กลุ่มโครโมฟอร์ของสีย้อมเหล่านี้ก็จะไม่สามารถแสดงสีได้ต่อไป ทำให้เป็นประโยชน์ต่อการบำบัดน้ำเสียจากโรงฟอกย้อมเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะในระยะหลังที่มีการผลิตสีรีแอกทีฟขึ้นมาใช้ ซึ่งถึงแม้จะเป็นสีที่ยึดติดกับเส้นใยได้เป็นอย่างดี แต่ก็เป็นสีที่มีความสามารถในการละลายน้ำสูง ทำให้น้ำเสียที่มีสีย้อมรีแอกทีฟหลงเหลืออยู่ยิ่งบำบัดได้ยากด้วยวิธีการต่างๆ ที่กล่าวมา

งานวิจัยที่มีคุณประโยชน์อย่างยิ่ง และเป็นเอกสารอ้างอิงของงานวิจัยต่อๆ มาที่เกี่ยวกับการลดสีในน้ำเสียจากโรงฟอกย้อมด้วยระบบบำบัดแบบไร้อากาศ ก็คือ งานวิจัยของ Brown และ Hamburger (1987) ที่ทำการศึกษากับสีย้อมอะโซ 14 ชนิด พบว่าสีเกือบทุกชนิดที่ได้นำมาศึกษา ซึ่งมีทั้งสีแอซิด สีไดเร็ก และสีมอแดนต์ ถูกย่อยสลายได้มากกว่า 90% และยังพบว่า สารประกอบที่เกิดจากการย่อยสลายโมเลกุลของสีชนิดอะโซ ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอะโรมาติกอามีน ตัวอย่างเช่นปฏิกิริยาการสลายพันธะอะโซของสี C.I. Direct Yellow 12 (รูปที่ 2.25) และ C.I. Acid Yellow 36 (รูปที่ 2.26) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

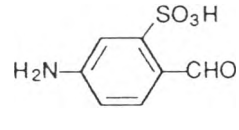
นอกจากนี้ Carliell และคณะ (1996) ได้เสนอกลไกการรับอิเลกตรอนของสีอะโซภายใต้สภาวะไร้อากาศดังรูปที่ 2.27 และยังมีการศึกษาการลดสีด้วยแบคทีเรียชนิดต่างๆ มากมาย (ตารางที่ 2.14) และส่วนใหญ่แบคทีเรียที่สามารถลดสีได้ ก็มักจะมีเอนไซม์ azoreductase ที่เป็นตัวการทำให้พันธะอะโซแตกออก เช่นเดียวกับแบคทีเรียในลำไส้ Haug และคณะ (1991) ได้เสนอว่าการย่อยสลายสีย้อมจนสมบูรณ์ได้ ควรมีทั้งขั้นตอนไร้อากาศและขั้นตอนเติมอากาศ ทำให้การย่อยสลายสีย้อมจนสมบูรณ์จำเป็นต้องใช้จุลชีพหลายชนิด แต่อย่างไรก็ตาม การทำลายพันธะอะโซจำเป็นต้องมีเอนไซม์ azoreductase ซึ่งต้องทำงานภายใต้สภาวะไร้อากาศเท่านั้น



Direct Yellow 12



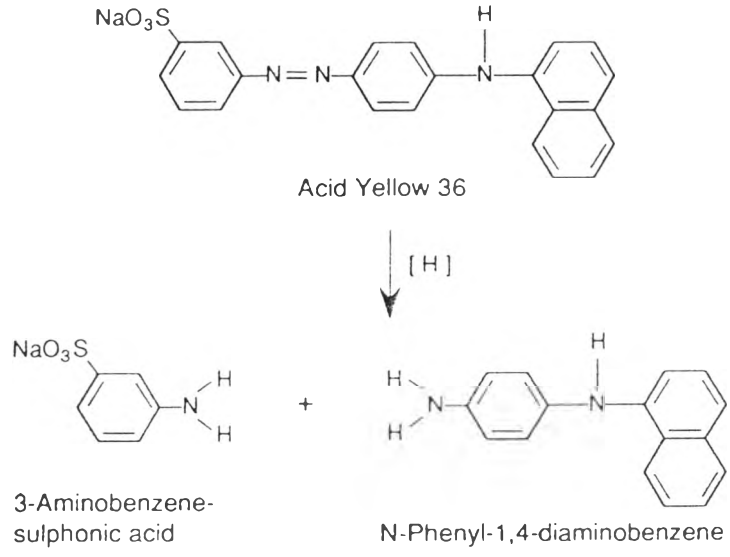
1-Amino-4-ethoxybenzene



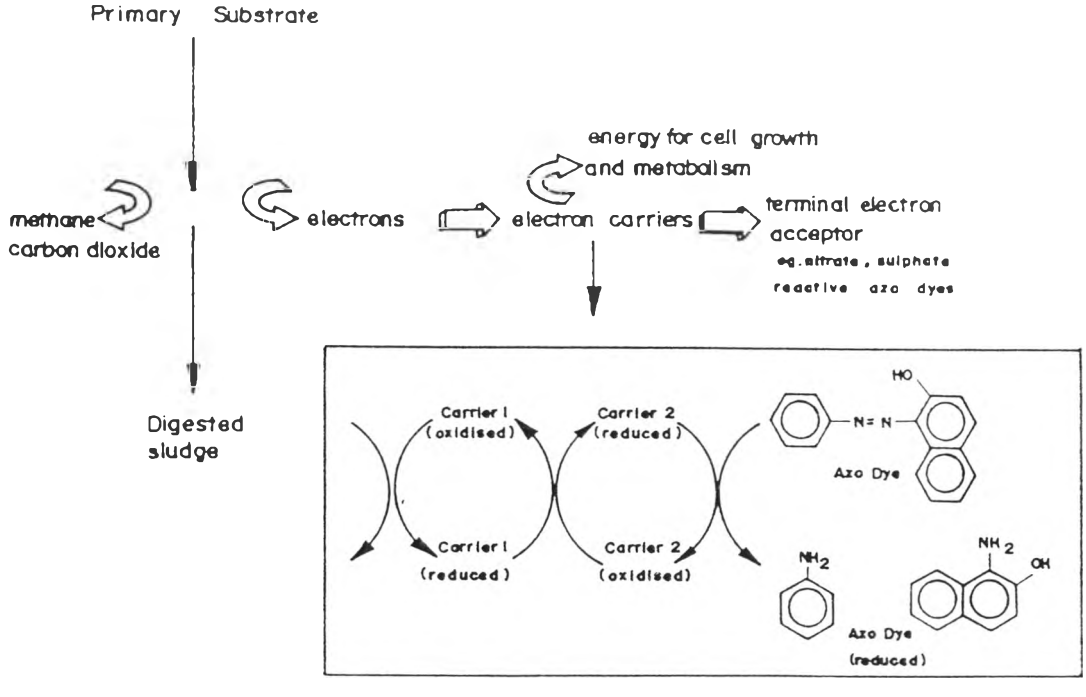
4-Amino-2-sulphobenzaldehyde

รูปที่ 2.25 ปฏิกิริยาการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศของสี **C.I. Direct Yellow 12**

(Dubrow et al., 1996)



รูปที่ 2.26 ปฏิกิริยาการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศของสี C.I. Acid Yellow 36 (Dubrow et al., 1996)



รูปที่ 2.27 กลไกการรับอิเลกตรอนของสีย้อมอะโซภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Carliell et al., 1996)

ตารางที่ 2.14 รายชื่อแบคทีเรียในงานวิจัยที่สามารถลดสีได้ (รวบรวมโดย Banat et al., 1996)

Culture	Dye and concentration	Percent removal/ time	Mechanism	Reference
Aeromonas hydrophila var 24B	various azo dyes (0.2 mmol/l)	40-100% (24 h)	azoreductase (cell free extract)	Yatome et al. (1987)
Aeromonas hydrophila var 24B	various azo dyes (10-100 mg/l)	50-90% (24 h)	azoreductase (cell free extract)	Idaka & Ogawa (1978)
Bacillus subtilis IFO 13719	2-carboxy-4' dimethyleamino benzene (0.045 mmole)	100% (20 min)	azoreductase (in growing cells)	Yatome et al. (1991)
Bacillus subtilis IFO 3002	p-aminoazobenzene (30 mg/l)	80-90% (30 h)	azoreductase	Horitsu et al. (1977)
Klebsiella pneumoniae RS-13	Methyl Red (MR) (100 mg/l)	100% (24 h)	azoreductase	Wong & Yuen (1996)
Pseudomonas cepacia 13NA	C.I. Acid Orange 12 (10 mg/l)	65% (8 h)	azoreductase	Ogawa et al. (1986)
	C.I. Acid Orange 20 (10 mg/l)	87% (8 h)	azoreductase	
	C.I. Acid Red 88 (37 mg/l)	94% (8 h)	azoreductase	
Pseudomonas cepacia 13NA	Orange I (0.045 mmole)	= 90% (10 h)	azoreductase (cell free extract and growing cells)	Yatome et al. (1991)
Pseudomonas cepacia 13NA (immobilized system)	p-aminoazobenzene (10 mg/l)	60-80% (10 h RT)	azoreductase	Ogawa & Yatome (1990)
Pseudomonas luteola	Red G (100 mg/l)	37.4% (2 days)	azoreductase	Hu (1994)
	RBB (100 mg/l)	93.2% (2 days)	azoreductase	
	RP2B (100 mg/l)	92.4% (2 days)	azoreductase	
	V2RP (100 mg/l)	88.0% (2 days)	azoreductase	
Pseudomonas stutzeri	various azo dye (0.1 mmol/l)	90% (8-20 min)	azoreductase (cellular extract)	Yatome et al. (1990)
Pseudomonas stutzeri IAM 12097	Orange I (0.045 mmole)	= 80% (20 h)	azoreductase (cell free extract)	Yatome et al. (1991)
	Orange II (0.045 mmole)	= 80% (20 h)	azoreductase (cell free extract)	
Streptomycetes BW 130	Azo-reactive Red 147 (150 mg/l)	29.0% (14 days)	adsorption	Zhou & Zimmermann (1993)
	Azo-copper Red 171 (180 mg/l)	73.0% (14 days)	adsorption	
	Anthraquinone Blue 114 (280 mg/l)	27.0% (14 days)	adsorption	
	Formazan Blue 209 (80 mg/l)	70.0% (14 days)	adsorption	
	Phthalocyanine Blue 110 (200 mg/l)	39.0% (14 days)+CA	adsorption	
Mixed bacterial culture	Mordant Yellow (unknown)	50% (5 days)	azoreductase	Haug et al. (1991)

2.5.3 การศึกษาที่ผ่านมา

Carliell และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการกำจัดสีด้วยการย่อยแบบไร้อากาศโดยใช้สี C.I. Reactive Red 141 และมีการเติมแหล่งคาร์บอนด้วย จากนั้นทำการจำแนกเพื่อระบุชนิดสารที่เกิดจากการย่อยสีนี้ นอกจากนี้ Carliell ยังได้ขยายขอบเขตการศึกษานี้โดยการทดลองกับสีรีแอกทีฟอีกหลายๆ ตัว ที่มีใช้กันทั่วไปในอุตสาหกรรมสิ่งทอ และยังนำไปศึกษาในงานสนามโดยใช้สี C.I. Reactive Red 141 กับระบบบำบัดน้ำเสีย 5 ขั้นของ Bardenpho ที่เป็นระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ซึ่งมีขั้นตอนการกำจัดสารอาหารด้วย (nutrient removal) รวมทั้งมีการเก็บมวลจุลชีพสำหรับการศึกษาในห้องทดลองด้วย โดยในห้องทดลอง Carliell ได้จัดชุดทดลองสภาวะไร้อากาศและทดสอบกับสีรีแอกทีฟหลายชนิดดังกล่าว ผลการทดลองพบว่า 80% ของจำนวนสีที่ทำการทดลองสามารถกำจัดสีลงได้ โดยประสิทธิภาพการกำจัดสีได้ถึง 70-97% (ตารางที่ 2.15) ยกเว้นสี C.I. Reactive Yellow 95 ซึ่งไม่สามารถกำจัดได้เลย จึงอาจถือได้ว่าเป็นสารยับยั้งหรือเป็นพิษต่อระบบ

การวิเคราะห์ด้วย column chromatography เพื่อระบุชนิดสารที่เกิดจากการย่อยสี C.I. Reactive Red 141 พบว่าเกิดสารดังกล่าวขึ้น 4 ชนิด โดย 3 ชนิดสามารถวิเคราะห์พบโดยอุปกรณ์ NMR ดังนี้ สารตัวที่ 1 คือ 2-aminonapthalene-1,5-disulphonic acid สารตัวที่ 2 คือ 1,7-diamino-8-naptho-3,6-disulphonic acid และ สารตัวที่ 3 คือ p-diamino-benzene ส่วนสารตัวที่ 4 นั้น ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยอุปกรณ์ NMR เพราะไม่มีไฮโดรเจนอะตอมในโมเลกุล แต่คาดได้ว่าเป็น cyanuric acid จากผลการวิเคราะห์เหล่านี้ทำให้ Carliell เสนอว่า ในสภาวะไร้อากาศ พันธะอะโซในโมเลกุลของสีย่อมถูกทำลาย แล้วตามด้วยการแตกสลายสาร amine ระหว่างกลุ่มโครโมฟอร์กับกลุ่มรีแอกทีฟ และระหว่างกลุ่มรีแอกทีฟด้วยกันเองออกมา

ระบบบำบัดที่มีขั้นตอนกำจัดสารอาหารของ Bardenpho ที่เลือกใช้สำหรับการศึกษาภาคสนามนี้ มีขั้นตอนไร้อากาศ 1 โซน และขั้นตอนแอ็อกซิก 2 โซน หลังจากการเติมสี C.I. Reactive Red 141 ลงไปในน้ำทิ้งที่กำลังจะเข้าสู่ขั้นตอนไร้อากาศ ปรากฏว่าสีหายไปในเวลา 30 นาที ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นผลมาจากการสลายพันธะอะโซ หรือเกิดจากการเจือจาง จึงได้ทำการศึกษาในห้องทดลองเพิ่มเติม และยืนยันได้ว่าการกำจัดสีเป็นผลมาจากกระบวนการทางชีวภาพ

Carliell จึงสรุปว่ากระบวนการบำบัดน้ำเสียที่มีขั้นตอนการกำจัดสารอาหาร สามารถใช้กำจัดสีย้อมอะโซได้ โดยการป้อนน้ำเสียจากการฟอกย้อมเข้าสู่ระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ ให้ป้อนน้ำเสียเข้าสู่ถังย่อยไร้อากาศ หรือถังแอนอ็อกซิกก่อน

ตารางที่ 2.15 ผลการกำจัดสีรีแอกทีฟด้วยระบบไร้อากาศ (Carliell และคณะ, 1994)

	Chemical classification	Percentage decolorisation	Reaction time (h) required to attain maximun decolorisation
Reactive dye powders			
C.I. Reactive Yellow 16	azo	80 to 90	6.5
C.I. Reactive Red 198a	azo	85 to 90	2
C.I. Reactive Red 141	azo	85 to 90	4.5
C.I. Reactive Blue 38	phthalocyanine	40	4.5
C.I. Reactive Blue 21	phthalocyanine	85 to 90	4.5
C.I. Reactive Blue 220	azo	90 to 95	1
C.I. Reactive Black 5	azo	80 to 85	4.5
Reactive dye solutions			
C.I. Reactive Yellow 95	azo	0	-
C.I. Reactive Orange 12	azo	90 to 95	23
C.I. Reactive Red 218	azo	90 to 95	32
C.I. Reactive Red 24	azo	90 to 97	32
C.I. Reactive Orange 13	azo	85 to 90	50
C.I. Reactive Brown 11	azo	90	23
* Blue PB	metal complex	98	2
C.I. Reactive Blue 49	anthraquinone	7 to 10	2
C.I. Reactive Black 39	azo	70 to 75	5.5
* Black SG	metal complex	75 to 80	7.5
C.I. Reactive Blue 72	phthalocyanine	25 to 30	50
* No C.I. number available			

Carliell และคณะ (1995) ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากงานวิจัยในปี 1994 โดยมุ่งเน้นไปที่ลำดับ kinetic ของการสลายสารอะโซ และจากจุดนี้ก็จะทำการระบุปัจจัยที่เป็นข้อจำกัดต่ออัตราการสลายตัว นอกจากนี้ยังศึกษาเพื่อระบุสารที่เกิดจากการสลายตัวของสารอะโซ และทำการพิจารณาว่า ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสีย้อม หรือสารที่เกิดจากการสลายตัวจะส่งผลกระทบในทางลบต่อประชากรจุลชีพหรือไม่ โดย Carliell ได้ตั้งเป้าหมายในการศึกษาไว้ 6 ประการคือ

1) ทดลองเพื่อหาลำดับ kinetic ของการกำจัดสี C.I. Reactive Red 141 ในแต่ละความเข้มข้นของสีที่ 100 150 และ 200 มก./ล.

2) ทดลองเพื่อหาอัตราการกำจัดสี C.I. Reactive Red 141 เมื่อมีแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวคือสี แล้วเปรียบเทียบอัตราการกำจัดสีดังกล่าวกับอัตราการกำจัดสีเมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนคือกลูโคสให้กับระบบ

3) ทดลองเพื่อศึกษาการกำจัดสี C.I. Reactive Red 141 เมื่อมีการเติมสารรับอิเลกตรอนตัวอื่นๆ โดยทำการศึกษากับสารออกซิไดซ์ 2 ตัว คือ ไนเตรต และซัลเฟต เพื่อประเมินผลกระทบของสารรับอิเลกตรอนดังกล่าวที่มีต่อการสลายตัวของสี C.I. Reactive Red 141

4) ทดลองเพื่อศึกษาแนวโน้มของค่าศักย์รีดอกซ์ ระหว่างการกำจัดสี C.I. Reactive Red 141 โดยวัดค่าศักย์รีดอกซ์ของ 3 การทดลองคือ (1) การทดลองที่มีแต่สี C.I. Reactive Red 141 (2) การทดลองที่มีสีและมีการเติมไนเตรต (3) การทดลองที่มีสีและมีการเติมซัลเฟต

5) ทดลองเพื่อระบุสารที่เกิดจากการสลายตัวของสี C.I. Reactive Red 141 โดยการใช้ Column chromatography รวมกับอุปกรณ์ NMR ทำการวิเคราะห์สารที่เกิดขึ้น

6) ทดลองเพื่อศึกษาการยับยั้งของสี C.I. Reactive Red 141 ที่มีต่อจุลชีพแบบไร้อากาศ โดยทำการทดสอบความเป็นพิษกับความเข้มข้นของสี C.I. Reactive Red 141 ที่ 20 50 100 200 และ 500 มก./ล. และใช้จุลชีพ 2 ชนิด คือ จุลชีพที่มีการปรับชินสภาพก่อนกับสีย้อมนี้เปรียบเทียบกับจุลชีพที่ไม่มีการปรับชินสภาพ

ผลการทดลองก็สามารถสรุปได้ดังนี้คือ การกำจัดสี C.I. Reactive Red 141 ในระบบไร้อากาศ เกิดขึ้นได้โดยเป็นผลมาจากการแตกพันธะอะโซ ซึ่งนำไปสู่การปล่อยสาร 4 ชนิด ที่เป็นผลจากการสลายตัวของสี เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปแล้วในงานของ Carliell ในปี 1994 ข้างต้น กระบวนการกำจัดสี C.I. Reactive Red 141 ในระบบไร้อากาศเป็นความสัมพันธ์ในลำดับที่ 1 และมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้น คือ ที่ความเข้มข้นของสีเพิ่มขึ้นอัตราการกำจัดสีลดลงซึ่งนำไปสู่สมมติฐานที่ว่า สีที่ความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อระบบ และเมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนคือกลูโคสให้ ก็พบว่าอัตราการกำจัดสีมากกว่าการทดลองที่ความเข้มข้นสีเดียวกันแต่ไม่มีการเติมกลูโคสให้อย่างเห็นได้ชัด ดังนั้น จึงควรมีการเติมแหล่งคาร์บอนให้กับระบบเพื่อรักษาอัตราการกำจัดสีให้สูงตามต้องการไว้

การเติมสารรับอิเลกตรอน ไนเตรต ให้พร้อมกับสี C.I. Reactive Red 141 พบว่า มีการยับยั้งการกำจัดสีเป็นระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งจะนานเท่าไรนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไนเตรตที่เติมให้ และเมื่อพ้นจากช่วงเวลานี้แล้ว การกำจัดสีก็จะเริ่มต้นต่อไป ส่วนการเติมซัลเฟตนั้น

ไม่ได้ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญ นั่นคือ การแย่งกันรับอิเลกตรอนของสารรับอิเลกตรอนที่มีอยู่ในระบบไร้อากาศก็เป็นปัจจัยที่ควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยาเช่นกัน โดยการ denitrification จะเกิดได้ดีกว่าการรีดักชันของสี C.I. Reactive Red 141 ส่วนค่าศักย์รีดอกซ์ในระบบไร้อากาศมีบทบาทสำคัญต่อการกำจัดสี คือ เป็นไปได้ว่ากระบวนการกำจัดสีจะเกิดขึ้นในช่วงค่าศักย์หนึ่งๆ เท่านั้น และเมื่อค่าศักย์รีดอกซ์อยู่นอกช่วงนี้ก็อาจบอกได้ว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยากำลังจะถูกรบกวน

ในการตรวจสอบความเป็นพิษพบว่า จุลชีพที่มีการปรับชินสภาพกับสีย้อมก่อนจะมีความทนทานต่อสีที่ความเข้มข้นสูงกว่าจุลชีพที่ไม่ได้มีการปรับชินสภาพอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งการปรับชินสภาพให้กับแบคทีเรียเพื่อการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีสารยับยั้ง จะสามารถลดผลกระทบจากความเป็นพิษ และยังสามารถทำให้การทำงานทางสรีระบางส่วนกลับคืนดังเดิมด้วย

Brown และ Laboureur (1983) ได้มีแนวคิดจากพฤติกรรมของสีย้อมที่มักจะถูกดูดซึม (absorb) ไปในสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสีย หรือตะกอนตามก้นแม่น้ำหรือทะเลสาบ ซึ่งสภาพแวดล้อมมักจะเป็นสภาวะไร้อากาศ ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่ว่า การดูดซึมหายไปของสีอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพแบบไร้อากาศ โดยได้ทำการทดลองกับสีย้อม 22 ชนิด ซึ่งเป็นตัวแทนของสีย้อมที่ใช้งานจริงทั่วไป ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ก็ได้มาจากโรงบำบัดน้ำเสียที่บำบัดน้ำเสียชุมชนเป็นหลัก หรือจากถังย่อยของห้องทดลองที่เป็นแบบจำลองของระบบแอกทิเวเด็ดสลัดจ์ แล้วทำการทดลองในขวดแก้วที่ปิดสนิท และมีวาล์วสำหรับระบายก๊าซที่เกิดขึ้น ประกอบเข้ากับเครื่องกวนด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และควบคุมอุณหภูมิที่ 35 + 1°C แล้ววิเคราะห์ตัวอย่าง ณ วันที่ 14 28 และ 42 เปรียบเทียบกับวันแรก ผลการทดลองพบว่า สีประเภท momoazo 4 ชนิด และ diazo 6 ชนิด สามารถลดสีลงอย่างเห็นได้ชัด ส่วนสี poly-azo anthraquinone และอื่นๆ ที่เลือกมาทำการทดลองก็สามารถกำจัดสีลงได้พอสมควร ยกเว้นสี Acid Blue 80 ที่สีลดลงได้น้อยมาก จึงสรุปได้ว่าการสลายสีย้อมในสภาวะไร้อากาศมีความเป็นไปได้สูง

Brown และ Hamburger (1987) ได้ทำการศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยของ Brown และ Laboureur ในปี 1983 รวมทั้งจากการศึกษาของหน่วยงาน ETAD (The Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry) ซึ่งสรุปได้ว่า สีย้อมไม่สามารถย่อยสลายภายใต้สภาวะมีอากาศได้อย่างมีนัยสำคัญ ด้วยความร่วมมือของสมาชิก ETAD Ecological Subcommittee และ Analytical Subcommittee ได้ทำการศึกษากับสีกลุ่มอะโซ 14 ชนิด สี anthraquinone 1 ชนิด และ phenoxazine 1 ชนิด โดยทำการศึกษากับกระบวนการ 2 ขั้นตอน คือกระบวนการไร้อากาศแล้วตามด้วยกระบวนการมีอากาศ กับสี 9

ชนิด การย่อยสลายสีย้อมในขั้นตอนไร้อากาศ ใช้สีย้อมความเข้มข้น 100 มก./ล. และทำการทดลองในขวดแก้วเช่นเดียวกับในปี 1983 แต่เพิ่มระยะเวลาสิ้นสุดการทดลองจาก 42 วัน เป็น 56 วัน แล้วเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาชนิดที่แน่นอนของสารอะโรมาติกอามีน (aromatic amine) ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของสีย้อม โดยใช้วิธีการประเภทโครมาโตกราฟิคที่เหมาะสม และบางชนิดก็ได้มีการระบุ yeild ของการเกิดสารอามีน (amine) เหล่านี้ด้วย ส่วนการศึกษาการย่อยของสารอามีนที่เกิดขึ้นด้วยกระบวนการมีอากาศ ได้ใช้สลัดจ์ไวงาน (activated sludge) เป็นเชื้อเพาะเลี้ยง แล้วทำการตรวจสอบด้วยการวิเคราะห์ค่า DOC (dissolve organic carbon) โดยการศึกษากระบวนการ 2 ขั้นตอนนี้ จะทำกับสีย้อมอะโซโดยเฉพาะ

จากผลการทดลองวิเคราะห์สารอามีนที่เกิดจากการสลายตัวของสีย้อมอะโซ เป็นการยืนยันว่าสีย้อมอะโซ ถูกย่อยสลายได้ภายใต้สภาวะไร้อากาศ และยังชี้ให้เห็นว่าการย่อยสลายของสีย้อมอะโซนี้ ทำให้เกิดสารอะโรมาติกอามีนเพิ่มขึ้น ซึ่งคาดว่าเป็นสารอามีนที่เป็นโครงสร้างพื้นฐานของสีนั้นๆ แต่อย่างไรก็ตาม สารอามีนที่เกิดขึ้นและตรวจวัดได้ก็มีปริมาณน้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้ทางทฤษฎี ซึ่ง Brown และ Hamburger ก็ได้เสนอปัจจัยที่เป็นไปได้ดังนี้ 1) ความไม่บริสุทธิ์ของสีย้อมที่ใช้ในการวิจัยซึ่งอาจทำให้ปริมาณสีที่แท้จริงมีน้อยกว่าที่เข้าใจ 2) การตรวจสอบสารอามีนได้ทำเฉพาะกับของเหลวเท่านั้น ซึ่งอาจมีบางส่วนที่ติดไปกับสลัดจ์ได้ 3) ข้อสมมติฐานที่ว่าการย่อยสลายสีย้อมอะโซภายใต้สภาวะไร้อากาศเกิดจากการสลายพันธะอะโซนั้นอาจไม่ใช่สมมติฐานที่ถูกต้อง อย่างไรก็ตาม จากชนิดสารอามีนที่เกิดขึ้นก็ไม่มีข้อสรุปใดที่ดีไปกว่าข้อสรุปที่ว่าการสลายตัวของสีย้อมนั้นเกิดจากการสลายพันธะอะโซของสีย้อมเป็นหลัก

สรุปได้ว่าการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการยืนยันผลการวิจัยในปี 1983 ของ Brown ที่ว่า สีย้อมส่วนใหญ่และโดยเฉพาะสีอะโซสามารถย่อยสลายอย่างเห็นได้ชัดในสภาวะไร้อากาศ และมีสารอะโรมาติกอามีนที่คาดว่าเป็นสารจากการสลายพันธะอะโซเกิดขึ้นจริงๆ และปริมาณของสารอะโรมาติกอามีนที่เกิดขึ้นมีอยู่มากพอสมควร จึงคาดเดาว่าสารเหล่านี้สลายตัวได้ช้าในสภาวะไร้อากาศ เมื่อตรวจสอบด้วยกระบวนการมีอากาศกับสารอะโรมาติกอามีนดังกล่าว ก็ยืนยันได้ว่าสารอะโรมาติกอามีนชนิด lipophilic สามารถย่อยสลายได้ดีภายใต้สภาวะมีอากาศ ยกเว้นสารอะโรมาติกอามีนชนิด sulphonated

Bhattacharya (1989) ศึกษาการกำจัดสีย้อม Acid Orange 10 ในระบบไร้อากาศด้วยชุดขวดเซรุ่ม และป่อนสีย้อม Acid Orange 10 ในช่วงความเข้มข้น 10-3,000 มก./ล. โดยจัดการทดลองเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรกทดสอบความเป็นพิษกับแบคทีเรียชนิดไร้อากาศ

ช่วงที่ 2 ทำการทดลองกับระบบบำบัดน้ำเสียชุดทดลองขนาดเล็ก ซึ่งมีทั้งขั้นตอนย่อยแบบไร้อากาศแล้วตามด้วยการเติมอากาศ ผลการทดลองในช่วงที่ 1 แสดงให้เห็นว่าสีย้อมที่ความเข้มข้น 2,000 และ 3,000 มก./ล. มีผลรบกวนการทำงานของแบคทีเรียสร้างมีเทน คือ ทำให้ปริมาณก๊าซลดลง 20-40% และประสิทธิภาพการลดสีเหลือ 48-50% ในขณะที่ความเข้มข้นสีย้อม 10-1,000 มก./ล. ไม่มีผลต่อการผลิตก๊าซ และมีประสิทธิภาพการลดสี 90-95% ส่วนผลการทดลองในช่วงที่ 2 ปรากฏว่ามีการลดสี 30-50% ในขั้นตอนการบำบัดแบบไร้อากาศและลดไปได้อีก 1-18% ในขั้นตอนเติมอากาศ สรุปได้ว่า การกำจัดสีย้อม Acid Orange 10 ในชุดขวดเซรุ่มมากกว่าในถังย่อยไร้อากาศอย่างเห็นได้ชัด และความเข้มข้นสีในระดับ 25 มก./ล. ยังไม่ส่งผลรบกวนการทำงานของระบบบำบัดที่มีทั้งขั้นตอนไร้อากาศและเติมอากาศ นอกจากนี้ ระบบเติมอากาศสามารถลดสี Acid Orange 10 ลงได้พอสมควร และปริมาณตะกอนในขวดเซรุ่มยิ่งมากก็ยิ่งลดสีลงได้มากด้วย

Rahman (1991) ได้ทำการศึกษาเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและทำการปรับชินสภาพเชื้อให้สามารถย่อยสลายสีย้อมที่ปนเปื้อนในน้ำเสียได้ โดยเน้นไปที่ปัจจัยต่างๆ ที่จะมีอิทธิพลต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพนี้ ซึ่ง Rahman ได้สนใจความเกี่ยวข้องและผลกระทบซึ่งกันและกันระหว่างปัจจัยหลายๆ ตัว ทั้งนี้เพราะการศึกษาที่ผ่านๆ มา มักจะศึกษาแต่ปัจจัยที่มีอิทธิพลทีละตัว อีกทั้งในกระบวนการชีวภาพโดยแท้จริงนั้น การส่งผลกระทบระหว่างกันและกันของปัจจัยหลายๆ ตัวจะมีความสำคัญมากกว่า ดังนั้นวิธีการ *factor analysis* จึงมีการใช้กันมากขึ้นเพื่อระบุอิทธิพลระหว่างปัจจัยหลายๆ ตัว โดย Rahman ได้ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสี Red B 600 มก./ล. สารเคมีต่างๆ รวมทั้งน้ำตาล เนื่องจากกลูโคลเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในน้ำเสียจากโรงฟอกย้อมที่มีการใช้แป้งเป็นสาร desizing แล้วทำการทดลองโดยแปรเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ รวมเป็น 62 ชุดการทดลอง ปัจจัยที่ทำการศึกษามี 6 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของสี ความเข้มข้นของกลูโคส อัตราการเติมอากาศ ความเข้มข้นของมวลชีวภาพเริ่มต้น ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ความเข้มข้นของกลูโคส สี และอุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลมากที่สุด โดยกลูโคสมีอิทธิพลในด้านสนับสนุนการเจริญเติบโตเพราะเป็นสารให้อิเลกตรอนสำหรับการรีดักชันสีย้อม ส่วนสีย้อมซึ่งความเข้มข้นที่เลือกใช้จะใกล้เคียงกับที่พบทั่วไปในน้ำเสียจากการฟอกย้อม ก็ดูจะมีอิทธิพลทางด้านสนับสนุนมากกว่าการยับยั้งการเจริญเติบโต ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะการปรับชินสภาพให้กับแบคทีเรียก่อน และบทบาทของมันที่เป็นสารรับอิเลกตรอน ส่วนอุณหภูมิที่มากกว่า 40°C จะหน่วงการเจริญเติบโตให้ช้าลง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงปัจจัยทั้ง 3 ตัว จะส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่ออัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

Harmer และ Bishop (1992) ศึกษากับสีย้อมอะโซ AO-7 (Acid Orange 7) เพราะเป็นสีย้อมอะโซที่สามารถย่อยสลายให้เห็นได้อย่างชัดเจนโดยระบบทางชีวภาพ แต่สารที่เกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพของสีอะโซนี้มักจะเป็นสารที่เป็นพิษ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกิดจากการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้อากาศ การสลายสีย้อมอะโซประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ ขั้นที่ 1 การทำลายพันธะอะโซ และขั้นที่ 2 คือการเปลี่ยนเป็นสารขั้นกลาง (intermediates) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารอะโรมาติกอามีน และโดยส่วนใหญ่เป็นสารก่อมะเร็ง นั่นคือ ความเป็นพิษไม่ได้เกิดจากตัวสีโดยตรง แต่เกิดจากสารขั้นกลางเหล่านี้มากกว่า ทั้งนี้เป็นผลมาจากลักษณะของกระบวนการไร้อากาศเองที่ไม่สามารถย่อยสลายสารจนสมบูรณ์ได้ ดังนั้น Harmer และ Bishop จึงเลือกศึกษากับระบบฟิล์มชีวะภาพที่สามารถให้ทั้งส่วนไร้อากาศและส่วนมีอากาศ ซึ่งจะทำให้การย่อยสลายสารโดยสมบูรณ์สามารถเกิดขึ้นได้ในระบบเดียว ผลจากการทดลองสรุปได้ว่า สามารถกำจัดสี AO-7 ได้ถึงร้อยละ 18-97 โดยการกำจัดสี AO-7 เกิดขึ้นได้สูงสุด 2 กรณี เมื่อ 1) มีค่าออกซิเจนละลาย ใน bulk-phase สูง และ ค่าฟลักซ์ซีโอดีต่ำๆ 2) มีค่าออกซิเจนละลายต่ำ แต่ค่าฟลักซ์ซีโอดีสูง นอกจากนี้ยังตรวจพบสาร 1-amino 2-napthol ด้วย ส่วนสาร sulfanilic acid พบเมื่อสภาวะมีออกซิเจนละลายต่ำๆ การเปลี่ยนแปลงสีย้อม AO-7 และกระบวนการ denitrification มีปฏิกิริยาต่อกัน แต่ผลกระทบมีน้อยมาก

Zaoyan และคณะ (1992) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่มีสีย้อมโดยใช้ระบบจานหมุนชีวภาพ (RBC) รวมกับระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ โดยระบบจานหมุนที่ใช้ประกอบด้วยจานหมุน 3 ชุดต่ออนุกรมกันและเป็นระบบไร้อากาศ โดยจานหมุนจะจมอยู่ใต้ระดับน้ำทั้งหมด และมีชุดจานหมุนแบบจุลชีพใช้อากาศอีก 3 ชุดต่ออนุกรมกันเช่นเดียวกัน และตามด้วยระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การบำบัดน้ำเสียมีสีด้วยขั้นตอนไร้อากาศเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถลดสีได้ดีเท่ากับการใช้กระบวนการไร้อากาศรวมกับขั้นตอนเติมอากาศ Zaoyan กล่าวว่า ขั้นตอนไร้อากาศสามารถลดสีในน้ำเสียลงได้ และยังสามารถย่อยสารที่ย่อยสลายได้ยากให้กลายเป็นสารที่ง่ายขึ้น และสามารถถูกออกซิไดซ์ได้สมบูรณ์ด้วยขั้นตอนเติมอากาศต่อไป

Ghorpade และ Spencer (1993) ทำการศึกษาการกำจัดสีที่มีกลุ่มซัลโฟเนตในโมเลกุลสี 3 ชนิดคือ Acid Red 114 Acid Orange 51 และ Acid Orange 63 ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas Putida* โดยใช้ 3-chlorobenzoic acid เป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียชนิดนี้จะมีเอนไซม์ azoreductase ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยาที่พันธะอะโซจนสลายออกแล้วกลายเป็นสารอามีนขึ้นมา ($-NH_2$) และ Ghorpade ยังกล่าวว่า สารอามีนที่เกิดจากการแตกพันธะอะโซของสีทั้ง 3 ชนิด เป็นสารไม่มีสี และสามารถใช้การลดสีเป็นตัวตรวจวัดการสลายพันธะอะโซของสี

ย้อมได้ ระยะเวลาในการสลายพันธะคาดว่าจะขึ้นกับความสามารถในการละลายน้ำของสี และความสามารถในการย่อยสีย้อมก็ขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีของสี

Randall และ คณะ (1993) ทำการศึกษากับระบบบำบัดน้ำเสียที่มีขั้นตอนไร้อากาศแล้วตามด้วยขั้นตอนเติมอากาศ โดยเปลี่ยนแปลงเวลากักน้ำในขั้นตอนไร้อากาศเป็น 2 ค่า โดยในช่วงแรกของการทดลองที่เวลากักน้ำ 12 ชม. และในช่วงหลังเป็น 6 ชม. ส่วนระบบเติมอากาศเป็นระบบที่มีเวลากักน้ำ (HRT) เท่ากับเวลากักเซล (SRT) ประมาณ 30 วัน ผลการทดลอง ปรากฏว่า การลดสีในขั้นตอนไร้อากาศที่การทดลองกับเวลากักน้ำ 12 ชม. มีมากกว่า 6 ชม. และการลดสีส่วนใหญ่ของระบบก็เกิดในขั้นตอนไร้อากาศ คือ ประมาณ 55 ถึง 60% ในขณะที่ขั้นตอนเติมอากาศลดสีได้ประมาณ 10% ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการดูดติดผิวในสลัดจ์ ส่วนการกำจัดคาร์บอนอินทรีย์ (TOC) ในขั้นตอนไร้อากาศมีค่อนข้างน้อย แต่จะถูกกำจัดมากในขั้นตอนเติมอากาศ ดังนั้น Randall จึงเสนอว่า ควรใช้การบำบัดแบบไร้อากาศร่วมกับการบำบัดแบบเติมอากาศ ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงฟอกย้อมให้ได้ผลดีที่สุด

Hu (1994) ศึกษาการกำจัดสีย้อมอะโซ เช่น Red G RBB RP_2B และ V_2RP ด้วยแบคทีเรีย *Psuedomonas Luteola* ซึ่งเป็นแบคทีเรียจากระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ หลังจากทำการกวนและอุ่นที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้ว พบว่าแบคทีเรีย P. Luteola สามารถกำจัดสีได้ภายใน 2 วัน และประสิทธิภาพในการกำจัดสีของ Red G เป็นร้อยละ 37.4 สี RBB เป็นร้อยละ 93.2 สี RP_2B เป็นร้อยละ 92.4 และสี V_2RP เป็นร้อยละ 88 การเพาะเชื้อ P. Luteola ในสารตัวกลางที่มีไนโตรเจนต่ำๆ ไม่สามารถเพิ่มการกำจัดสีขึ้นได้ นอกจากนี้การกำจัดสีก็จะไม่ประสบความสำเร็จหากมีการเขย่าตลอดเวลาหรือตั้งทิ้งไว้เฉยๆ อย่างเดียวโดยไม่มีการกวนใดๆ เลย นั่นคือ ในการทดลองที่มีการเขย่าตลอดเวลา พบว่าแบคทีเรีย P. Luteola เจริญเติบโตได้ดีแต่ก็สีของ Red G และ V_2RP ไม่ลดลง ส่วนเชื้อที่ตั้งทิ้งไว้เฉยๆ ตลอดเวลามีการเจริญเติบโตไม่ดีนัก แต่ยังสามารถกำจัดสีลงได้ร้อยละ 23-76 ซึ่ง Hu ได้กล่าวว่า การเขย่าสารตลอดเวลาทำให้มีออกซิเจนละลายน้ำสำหรับจุลชีพใช้ในการเจริญเติบโต แต่ทำให้แบคทีเรียขาดความสามารถในการกำจัดสีไป และในระหว่างการตั้งทิ้งไว้เฉยๆ ไม่เขย่าสารอย่างใดเลย Hu ได้กล่าวว่าอาจมีการเปลี่ยนแปลงแบบไร้อากาศเกิดขึ้นในส่วนที่เป็นสภาวะไร้อากาศของระบบ และการกำจัดสีอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมฟอร์กลุ่มอะโซ ผลจากการศึกษาด้วยอุปกรณ์ TLC (thin layer chromatography) พบว่าการสลายพันธะอะโซเป็นสาเหตุสำคัญในการกำจัดสี โดยสีทั้ง 3 ชนิดไม่รวม Red G สามารถย่อยสลายได้โดยแบคทีเรีย P. Luteola

Baughman และ Weber (1994) ได้ทำการศึกษาถึงปฏิกิริยาของสีย้อมดีสเพอร์สในตะกอนจมตัวก้นแหล่งน้ำ โดยศึกษากับสีดีสเพอร์สประเภท azo anthraquinone และ quinoline หลายชนิด โดยตะกอนนี้มาจากทะเลสาบ 4 แห่งใกล้กับเมือง Athens ทำการร่อนด้วยซีฟขนาด 0.5 มม. แล้วเก็บตะกอนที่ร่อนแล้วใส่ถังขนาด 2 แกลลอน แล้วเก็บในที่มืดเช่นเดียวกับสภาพใต้ทะเลสาบจนกว่าจะนำมาใช้ ค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงในช่วง 6.4-7.2 และไม่มีบัฟเฟอร์ ผลการทดลองได้ว่าในสภาพแอน็อกซิกของตะกอน สีย้อม azo anthraquinone แบบธรรมดาจะสลายไป ส่วน quinoline จะคงตัวมากกว่า เช่น สี Solvent Yellow 33 ซึ่งคงตัวน้อยที่สุดยังมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 6 เดือน ส่วนสี Disperse Red 9 และ 1-aminoanthraquinone จะเปลี่ยนเป็น hydrogen-bonded anthrones บางส่วนซึ่งคงตัวมากกว่า สี Disperse Red 11 ก็ให้สาร 1,4-diamino-2-hydroxyanthraquinone ออกมา ซึ่งคงตัวมากกว่าตัวสีดั้นแบบเอง และมีครึ่งชีวิต 2-3 เดือนในตะกอนแอน็อกซิก สี anthraquinone ที่มีกลุ่ม amino หรือ alkylamino ในตำแหน่งที่ 1 และ 4 ของโมเลกุล สามารถหายไปจากตะกอนแอน็อกซิกด้วยครึ่งชีวิตน้อยกว่า 2-3 สัปดาห์ แต่วิถีการเปลี่ยนแปลงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ส่วนสี azo (Solvent Red 1) มีครึ่งชีวิตเพียงไม่กี่วัน โดยปฏิกิริยาเกิดจากการสลายพันธะอะโซ

Ganesh, Boardman และ Michelsen (1994) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับพฤติกรรมของสีย้อมอะโซในสลัดจ์ โดยใช้สีย้อม Reactive Black 5 และน้ำล้างสีย้อม Navy 106 (ซึ่งเกิดจากสีรีแอกทีฟซนิดอะโซ 3 ตัว) ทั้งนี้มีที่มาจากความต้องการจะศึกษาการย่อยสลายสีในสลัดจ์ซึ่งมีมวลชีวภาพเข้มข้นกว่าในน้ำเสีย จึงใช้การย่อยสลัดจ์แบบแบตช์ (batch) ทั้งแบบมีอากาศและไม่มีอากาศ โดย 1) ทำการศึกษาถึงบทบาทของหมู่ vinylsulfone และ hydroxyl ในการกำจัดสี Reactive Black 5 และ 2) ศึกษาผลกระทบจากความเข้มข้นของมวลชีวภาพที่มีต่อการกำจัดสี Navy 106 จากนั้นทำการเปรียบเทียบการกำจัดสีและสารอินทรีย์ ภายใต้สภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ นอกจากนั้นยังทำการตรวจสอบสีย้อมที่ถูกชะออกมาจากสลัดจ์ที่นำไปฝังกลบด้วยวิธีการ TCLP (toxicity characteristic leaching procedure) ผลการทดลองพบว่า หมู่ vinylsulfone ของสีย้อม Reactive Black 5 ทำให้สีย้อมถูกกำจัดได้ดีกว่ากลุ่ม hydrolyzed ในสภาวะมีอากาศ ส่วนการดูดซับและการกำจัดสีแบบมีอากาศของน้ำล้างสี Navy 106 นั้นเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของมวลชีวภาพมากขึ้น การยับยั้งการกำจัดสีจากน้ำล้างสีย้อมภายใต้สภาวะมีอากาศเกิดขึ้นเมื่ออัตราส่วนสีต่อมวลชีวภาพสูง และในขณะเกิดการยับยั้งก็มีการปล่อยปริมาณไนเตรต และซัลเฟตออกมาน้อยลง ปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ (TOC) และค่าซีโอดีของสีย้อม hydrolyzed Reactive Black 5 และน้ำล้างสี Navy 106 ลดลงภายใต้สภาวะมีอากาศ ส่วนในสภาวะไร้อากาศนั้น การกำจัดสีเกิดขึ้นภายใน 1 วัน โดยสีของ hydrolyzed Reactive Black 5 และน้ำล้างสี Navy 106 ซึ่งมีสีโทนม่วงได้เปลี่ยนเป็นสีเขียวอม

เหลือง แสดงถึงการสลายตัวของสารประกอบอะโซ แต่ปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ และค่าซีโอดีของสีทั้ง 2 ชนิดไม่ลดลง ส่วนการทดสอบ TCLP ก็พบว่ามีสีปนออกมาน้อยมากจนแทบไม่พบเลย

Jian และ คณะ (1994) ศึกษาการกำจัดสีโดยใช้ถังปฏิกรณ์ที่มีตัวกลางให้แบคทีเรีย 8 ชนิด ได้ยึดเกาะ จำนวน 3 ถัง โดยใช้แบคทีเรีย *Aeromonas* sp. H-1 *Alcaligenes* sp. H-2 *Aeromonas* sp. L-1 และ *Pseudomonas* sp. L-2 บรรจุในถังที่ 1 ส่วนแบคทีเรียอีก 4 ชนิด คือ *Pseudomonas* sp. GM-1G GM-2G S-1 และ M-1 บรรจุในถังที่ 3 ส่วนถังที่ 2 บรรจุ เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มรวมกัน แล้วตามด้วยถังปฏิกรณ์แอกทิเวเต็ดสลัดจ์ พบว่าการลดสีในถังปฏิกรณ์ที่มีตัวกลางและแบคทีเรียสามารถลดสีได้ดี และยังลดค่าซีโอดีลงได้ดีด้วยเช่นกัน แบคทีเรียที่ยึดเกาะกับตัวกลางสามารถย่อยสารอินทรีย์ที่ย่อยยากโดยเฉพาะสี ให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายขึ้น คือทำให้ค่า BOD/COD สูงขึ้น และยังได้แนะนำว่าระบบที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นระบบที่มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำและยังมีประสิทธิภาพดี

Knapp และ Newby (1995) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ กัน ประมาณ 20 ชนิด และพบว่าทุกชนิดสามารถลดสีลงได้ภายใน 15 วันของการบ่มเชื้อ (incubation) และยังสามารถลดสีย้อม A_{390} ได้ไม่ต่ำกว่า 77% โดยกล่าวว่า การลดสีย้อมอะโซเป็นการทำปฏิกิริยาโดยตรงกับโคเอนไซม์ FAD และพบว่าในชุดแบคทีเรียไร้อากาศที่เติมกลูโคสให้มากๆ (ถึง 2%) ไม่ได้ช่วยให้การลดสีเพิ่มมากขึ้น และยังอาจยับยั้งแบคทีเรียด้วยซ้ำ นอกจากนี้การลดสีที่มากเกิดในช่วงที่แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตเร็ว และเมื่อทำการวิเคราะห์แยกสารด้วย TLC พบว่าจุดแสดงตำแหน่งของโครโมฟอร์ของสีหายไป เมื่อตัวอย่างน้ำนั้นผ่านการบ่มเชื้อในสภาวะไร้อากาศมา และยังมีตำแหน่งของสารใหม่เกิดขึ้นในโครมาโตแกรมด้วย แบคทีเรียที่พบในเชื้อที่เพาะเลี้ยงมีทั้งจีนัส *Bacillus* และ *Clostridium* และยังพบการกลับคืนของสีในน้ำที่ผ่านการบ่มเชื้อด้วยสภาวะไร้อากาศ แล้วถูกตั้งทิ้งไว้และอาจมีโอกาสสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ โครโมฟอร์ของสีที่กลับคืนมามีความแตกต่างจากเดิม การกลับคืนของสีแบบนี้เป็นข้อเสียของการบำบัดสีในน้ำเสียด้วยกระบวนการไร้อากาศ

Nigam และ คณะ (1996) ศึกษาการใช้กลุ่มจุลชีพในการลดสีในน้ำเสียจากโรงฟอกย้อม โดยเชื้อที่นำมาเพาะเลี้ยง จะเพาะจากตัวอย่างดินที่อยู่บริเวณโรงงานและในมหาวิทยาลัย แล้วนำมาเพาะเชื้อให้มีปริมาณมากด้วยสารอาหาร (คาร์บอน 5 ก./ล.) พร้อมกับเติมสีย้อม 0.5 ก./ล. ภายหลังจากการเพาะเชื้อเป็นระยะเวลาหนึ่ง ก็ทำการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งปรากฏว่าประกอบด้วยเชื้อ 2 ชนิดเป็นส่วนใหญ่ คือ *Alcaligenes faecalis* และ *Commamonas acidovorans* แต่เชื้อทั้ง 2 ชนิดเมื่อนำมาแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้ว ต่างก็ไม่สามารถลดสีได้เท่า

กับการใช้กลุ่มจุลชีพทั้งหมด และถึงแม้ว่าจะใช้เชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดมาเลี้ยงร่วมกัน ก็ไม่สามารถลดสีได้เท่ากับใช้จุลชีพทั้งหมดอยู่ดี และกลุ่มจุลชีพนี้สามารถลดสีย้อม 8 ใน 9 ชนิด ได้มากกว่า 67% ภายใน 24 ชม. และมีการเติมอาหาร yeast extract ให้ 5 ก./ล. แต่เมื่อไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ให้นอกจากสีย้อม ก็ไม่สามารถลดสีลงได้ ส่วนสีอีก 1 ชนิดที่ไม่สามารถลดสีลงได้คือ สี Remazol Turquoise Blue G133 ซึ่งเป็นสีที่มีโลหะทองแดงเป็นองค์ประกอบในสี จึงทำให้การกำจัดสีย้อมชนิดนี้ทำได้ยากกว่าสีอื่นๆ

Oxspring และ คณะ (1996) ได้ทำการศึกษาต่อจากงานวิจัยของ Nigam (1996) โดยใช้ระบบถังกรองไร้อากาศแบบไหลขึ้น (upflow anaerobic filter) และใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีพวก *Alcaligenes faecalis* และ *Commamonas acidovorans* เป็นจุลชีพหลัก แล้วเลี้ยงเชื้อให้ยึดติดกับตัวกลางที่เป็นกรวด (gravel) ถังกรองไร้อากาศนี้มีปริมาตร 0.125 ลิตร และมีอัตราการไหล 0.1 ลิตร/ชั่วโมง ทดลองกับสี Remazol Black B ถังกรองไร้อากาศในงานวิจัยนี้สามารถลดสีได้เกือบทั้งหมดภายในระยะเวลา 48 ชม. ซึ่งการลดสีในระบบนี้สามารถลดสีได้เร็วกว่าการลดสีในกลุ่มจุลชีพที่เลี้ยงในตัวกลางของเหลว (Nigam, 1996) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ระบบถังกรองไร้อากาศสามารถเพิ่มความสามารถของกลุ่มจุลชีพในการลดสีลงได้

Carliell และ คณะ (1996) ทำการศึกษาการบำบัดน้ำเสียสีย้อมรีแอกทีฟ โดยใช้น้ำเสียสีเข้มที่ยังไม่ได้รวมกับน้ำเสียจากขั้นตอนการล้างต่างๆ มาป้อนให้กับถังย่อยไร้อากาศขั้นแรก (primary digesters) ของระบบบำบัดน้ำเสีย USPW ใน เมือง Pinetown จำนวน 1 ถัง ที่มีปริมาตร 1,340 $ม^3$ ด้วยอัตราการป้อนน้ำเสียสีเข้ม 3 $ม^3$/วัน เฉพาะวันจันทร์-ศุกร์ เป็นระยะเวลา 151 วัน โดยอัตราการป้อนสลัดจ์เข้าถังเท่ากับ 48 $ม^3$/วัน ทั้งถังที่ใช้ทดลองและถังที่ใช้เป็นถังควบคุม (ไม่เติมน้ำเสียมีสี) น้ำที่ผ่านถังย่อยแล้วทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ สี โซเดียม และซัลไฟด์ นอกจากนี้ ยังมีชุดทดลองระดับห้องปฏิบัติการที่มีการติดตั้งและดำเนินการทดลองแบบเดียวกับในระบบจริง แต่น้ำเสียสีย้อมที่เติมให้ต่อปริมาณสลัดจ์มากกว่าในระบบจริง 2 เท่า ปรากฏว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุม แต่ระดับโซเดียมและซัลไฟด์สูงขึ้น เนื่องจากมีการใช้โซเดียมซัลเฟตในกระบวนการย้อมมาก การทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าระบบไม่คงตัว เนื่องจากซัลไฟด์มีความเข้มข้นสูงถึง 400 มก./ล. แต่ในถังย่อยของระบบจริงที่ทำการทดลอง ปริมาณซัลไฟด์กลับไม่เพิ่มสูงขึ้นเท่าไรนัก

จินตนา แป้นสุวรรณ (2540) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงฟอกย้อมโดยใช้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพชนิดเอสบีอาร์แบบธรรมดา กับแบบแอนนอกซิก+แอนแอโรบิก/ออกซิก (เอทูโอ-เอสบีอาร์) ผลการทดลองพบว่า การลดสีและการกำจัดสารอินทรีย์โดยใช้ระบบเอทูโอ-เอสบีอาร์ มีประสิทธิภาพสูงกว่าระบบเอสบีอาร์แบบธรรมดา นอกจากนี้ยังพบอีก

ด้วยว่า การลดสีรีแอกทีฟที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเสริม โดยใช้ระบบเอทูโอ-เอสบีอาร์ที่มีการทำงานในช่วงแอนนอกซิก+แอนแอโรบิก 20 ชั่วโมง และช่วงออกซิก 2 ชั่วโมง (แบบ 20+2) มีประสิทธิภาพการลดสี 42.8% ซึ่งสูงกว่าแบบ 8+2 ชั่วโมง ที่มีประสิทธิภาพการลดสี 29.2% ในหน่วย space unit แสดงให้เห็นว่าระบบเอสบีอาร์ที่มีขั้นตอนที่ไม่ใช้ออกซิเจนนานกว่า สามารถลดสีได้ดีกว่าระบบเอสบีอาร์ที่มีขั้นตอนไม่ใช้ออกซิเจนสั้นกว่า

Razo-Flores และ คณะ (1997) ทำการศึกษากับสีอะโซ 2 ชนิด คือ Mordant Orange 1 (MO1) และ Azodisalicylate (ADS) ด้วยระบบยูเอเอสบีที่มีปริมาตร 160 มล. โดยเชื้อที่มีลักษณะเป็นเม็ดจากระบบยูเอเอสบีที่ใช้บำบัดน้ำเสียจากอุตสหกรรมปิโตรเคมี ในการทดลองกับสี MO1 มีสาร 5-aminosalicylic acid (5-ASA) และ 1,4-phenylenediamine เกิดขึ้น และ Razo-Flores ได้ระบุว่าเป็นสารที่เกิดจากการสลายพันธะอะโซ และหลังจากที่ดำเนินการทดลองเป็นระยะเวลานาน ปรากฏว่าสาร 5-ASA ซึ่งเป็นสารอะโรมาติกอามีนที่เกิดจากการย่อยสลายสี กลับตรวจพบในปริมาณน้อยมาก แสดงว่ามีการย่อยสลายจนสมบูรณ์ได้ต่อไป ส่วนสี ADS ซึ่งเป็นสีที่ใช้ในการผลิตยามีส่วนประกอบของสาร 5-ASA อยู่ 2 หน่วยต่อโมเลกุลสี สามารถสลายตัวอย่างสมบูรณ์ แม้ว่าจะไม่มีการเติมอาหารให้ Razo-Flores จึงกล่าวว่า การย่อยสลายสาร 5-ASA สามารถเป็นสารให้อิเลกตรอนกับการสลายพันธะอะโซ การทดลองแบบเท (batch) สนับสนุนว่า สี ADS สามารถย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สีอะโซบางชนิดสามารถเป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งพลังงานและแหล่งไนโตรเจนให้กับแบคทีเรียไร้อากาศได้ แต่การเติมกลูโคสเป็นการเพิ่มการรีดิวซ์สาร FAD ทำให้การรีดิวซ์พันธะอะโซเกิดขึ้นได้มากกว่าการไม่เติม และการเติมให้มากเกินไปก็เพียงแต่เป็นการเพิ่มการทำงานของแบคทีเรียสร้างมีเทนเท่านั้น ไม่ได้เพิ่มการลดสีให้มากขึ้นเท่าไร