Thesis Title	Control of Membrane - Attached Biofilms in Membrane Bioreactors
Author	Miss Ampin Kuntiya
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee		
	Assoc. Prof. Dr. Naiyatat Poosaran	Chairperson
	Prof. Dr. David Leo Pyle	Member
	Lect. Dr. Cristiano Nicolella	Member
	Lect. Dr. K. Niranjan	Member
	Asst. Prof. Dr. Tapana Choenban	Member

Abstract

This research presents an experimental study aimed at assessing the relationship between formation and growth of membrane-attached biofilms and cell properties such as cell surface hydrophocity and celluar age. The objective is to understand the factors controlling the formation and growth of membrane attached biofilms in a membrane bioreactor used for the extraction and degradation of organic pollutants. In particular, the investigation focuses on the effect of growth conditions such as mineral medium composition and cellular age on the surface hydrophobicity of bacterial cells grown in suspension. Identical growth conditions are then used in a lab-scale extractive membrane bioreactor to assess their effects on biofilm formation and growth, and also on system performance.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Soil *Pseudomonas* sp. and phenol were used in this research as a model microorganism and a model toxic organic pollutant, respectively. In shake flask experiments, cell surface hydrophobicity of this bacterium decreased with increasing cellular age in the exponential growth phase and in the presence of sodium chloride in the growth medium. Bacterial growth on phenol was faster in the presence of sodium chloride or a phosphate buffer; in a buffered medium complete degradation of phenol was achieved. However, in the presence of both sodium chloride and the buffer growth appeared to be slightly slower and lower yield coefficient was also obtained.

Similar results regarding cell surface hydrophobicity were obtained when medium of the same composition was employed in a lab-scale extractive membrane bioreactor operated in batch and semi-batch modes; cell surface hydrophobicity of the suspended cells decreased in the presence of sodium chloride in the growth medium. In semi-batch experiments, the biofilm formed under the condition of low cell surface hydrophobicity proved to be thinner and more fragile than that formed under higher cell surface hydrophobicity. Scanning electron microscopy of the biofilms revealed the difference in biofilm morphology and structure as response to the difference in medium composition. Therefore, it was concluded that cell surface hydrophobicity plays a key role in biofilm formation and stability in membrane system and that its control can be an important element in biofilm system performance. Shortage of nutrient/s in the bioreactor resulted in phenol accumulation and development of dark colour, which could be recovered by restoring minerals to their original concentrations. Stepwise increase of feed concentration up to 2.2 g/l to allow faster degradation was achieved following the increase in suspended biomass concentration in the bioreactor and in the presence of the biofilm.

In a prolonged continuous experiment, the following parameters influencing biofilm morphology were individually investigated: dilution rate, ammonium concentration, iron concentration, and phenol feed concentration. The continuous feed of the growth medium and the change in dilution rate produced thinner but stronger

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and more controllable biofilm than those observed in semi-batch experiments. Washout of the suspended cells was achieved by increasing the dilution rate to a value of 0.03 h^{-1} and from this moment on visible cell growth occurred only within the biofilm. Complete absence of iron from the growth medium affected biofilm morphology whereas a decrease in ammonium concentration did not. However, in both cases phenol degradation efficiency was not affected. A feed concentration of 5 g/l resulted in large scale detachment of biofilm but detached cells were well adapted to high phenol concentration environment and kept their ability to degrade transferred phenol. Theoretical analysis suggested the existence of an anaerobic region of the biofilm close to the membrane and biofilm formation under anaerobic condition was shown to occur.

The silicone rubber membrane used in this research offers significant resistance to mass transfer of phenol and essentially determines the mass transfer coefficient. The change in Reynolds number on the tube side or the presence of a biofilm had therefore little effect on the overall mass transfer coefficient.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การควบคุมแผ่นฟิล์มชีวภาพยึดเกาะเมมเบรนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดใช้เมมเบรน	
ผู้เขียน	นางสาวอำพิน กันธิยะ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. นัยทัศน์ ภู่ศรัณย์	ประธานกรรมการ
	Prof. Dr. David Leo Pyle	กรรมการ
	Lect. Dr. Cristiano Nicolella	กรรมการ
	Lect. Dr. K. Niranjan	กรรมการ
	ผศ. ดร. ฐปน ชื่นบาล	กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดและการโตของฟิล์มชีวภาพกับสมบัติของเซลล์ซึ่งได้แก่ ไฮโดรโฟบิซิตี้และอายุของเซลล์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เข้าใจปัจจัยที่ควบคุมการเกิดและการโตของฟิล์มชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชนิดใช้เมมเบรนที่ใช้แยกและย่อยสลายสารมลพิษอินทรีย์ การวิจัยมุ่งเน้นไปที่ผลของสภาวะการเจริญคือองค์ประกอบของอาหารและอายุของเซลล์ที่มีต่อไฮโดรโฟบิซิตี้ของผิวเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในสภาพแขวนลอย จากนั้นใช้สภาวะการเจริญอย่างเดียวกันในถังปฏิกรณ์ชนิดใช้เมมเบรนในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาผลต่อการเกิดและการโตของฟิล์มชีวภาพตลอดจนต่อการทำงานของระบบ

ในงานวิจัยได้ใช้ *Pseudomonas* sp. ซึ่งแยกได้จากดินและฟีนอลเป็นแบบของจุลินทรีย์และสารมลพิษอินทรีย์ตามลำดับ จากการทดลองในฟลาสก์พบว่า ไฮโดรโฟบิซิตี้ของผิวเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ลดลงตามอายุของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในระยะการเจริญแบบเอกซโปเนนเชียล และในสภาวะที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ในอาหารที่ใช้เลี้ยง การเจริญของแบคทีเรียโดยใช้ฟีนอลเกิดได้เร็วถ้ามีโซเดียมคลอไรด์หรือบัฟเฟอร์ในอาหาร โดยเฉพาะการมีบัฟเฟอร์จะทำให้การย่อยฟีนอลเกิดได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามการมีทั้งบัฟเฟอร์และโซเดียมคลอไรด์ในอาหารทำให้การเจริญช้าลงเล็กน้อย และค่าสัมประสิทธิ์ของผลรวมก็น้อยกว่า

เมื่อใช้อาหารชนิดเดียวกับที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในฟลาสก์มาทำการเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชนิดใช้เมมเบรนในระดับห้องปฏิบัติการจะทำให้ได้ผลการทดลองคล้ายกันในเรื่องไฮโดรโฟบิซิตี้ของผิวเซลล์ กล่าวคือ ไฮโดรโฟบิซิตี้ของผิวเซลล์ที่อยู่ในสภาพแขวนลอยจะลดลงเมื่ออาหารมีโซเดียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ ในการทดลองแบบกึ่งกะพบว่า ฟิล์มชีวภาพที่เกิดขึ้นในสภาวะที่ผิวเซลล์มีไฮโดรโฟบิซิตี้ต่ำจะบางและฉีกขาดง่ายกว่าฟิล์มชีวภาพที่เกิดภายใต้สภาวะที่ผิวเซลล์มีไฮโดรโฟบิซิตี้ที่สูงกว่า ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงให้เห็นความแตกต่างของฟิล์มชีวภาพซึ่งเป็นผลของอาหารที่มีองค์ประกอบต่างกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ไฮโดรโฟบิซิตี้ของผิวเซลล์มีความสำคัญต่อการเกิดและต่อเสถียรภาพของฟิล์มชีวภาพ การควบคุมไฮโดรโฟบิซิตี้จึงมีความสำคัญต่อการทำงานในระบบฟิล์มชีวภาพ การขาดแคลนสารอาหารในถังปฏิกรณ์ทำให้เกิดการสะสมของฟีนอลและทำให้อาหารมีสีเข้มมากขึ้น ซึ่งสามารถทำการแก้ไขโดยการเติมสารละลายแร่ธาตุลงไปให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้น การเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายฟีนอลให้เร็วขึ้นทำได้โดยการค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของฟีนอลตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์และในสภาวะที่มีฟิล์มชีวภาพอยู่ในระบบด้วย การเพิ่มความเข้มข้นนี้สามารถเพิ่มได้ถึง 2.2 กรัมต่อลิตร

ในการทดลองแบบต่อเนื่องที่ยาวนานได้ทำการทดสอบผลของอัตราการเจือจาง ความเข้มข้นของแอมโมเนียม ความเข้มข้นของเหล็ก และความเข้มข้นของฟีนอลในถัง feed ที่มีต่อสัณฐานวิทยาของฟิล์มชีวภาพ ผลการทดลองพบว่า การให้อาหารแบบต่อเนื่องและการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจือจางทำให้เกิดฟิล์มชีวภาพที่มีลักษณะบางแต่แข็งแรงและมีลักษณะที่ควบคุมได้ง่ายกว่าฟิล์มชีวภาพที่เกิดขึ้นในการทดลองแบบกึ่งกะ เมื่อทำการเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.03 ต่อชั่วโมงจะทำให้เกิดการชะหมดไป และหลังจากเวลานี้เป็นต้นไปการเจริญของเซลล์เกิดเฉพาะในฟิล์มชีวภาพเท่านั้น เมื่ออาหารไม่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบจะมีผลต่อสัณฐานวิทยาของฟิล์มชีวภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในขณะที่การลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมไม่มีผลแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามในทั้งสองกรณีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลไม่ได้รับผลกระทบ การเพิ่มความเข้มข้นของฟีนอลในถัง feed เป็น 5 กรัม/ ลิตร ทำให้ฟิล์มชีวภาพเกิดการหลุดลอกอย่างมาก แต่เซลล์ที่หลุดออกมาสามารถปรับตัวในสภาวะที่มีความเข้มข้นของฟีนอลสูงและยังสามารถทำการย่อยสลายฟีนอลที่ส่งผ่านมาได้ การวิเคราะห์ทางทฤษฎีทำให้พบว่าฟิล์มชีวภาพส่วนที่อยู่ติดกับเมมเบรนอยู่ในสภาวะไร้อากาศและฟิล์มชีวภาพก็สามารถเกิดได้จริงในสภาวะไร้อากาศ

เมมเบรนซึ่งเป็นซิลิโคนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทำให้เกิดความต้านทานอย่างมากต่อการส่งผ่านฟีนอลและเป็นตัวกำหนดค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่าน การเปลี่ยนแปลงค่าเรย์โนลด์นัมเบอร์ในท่อเมมเบรนหรือการเกิดฟิล์มชีวภาพจึงมีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านเพียงเล็กน้อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved