การคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจากระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

นางสาวกัลย์สุดา ดวงศรีแก้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NITRIFYING BACTERIA FROM RECIRCULATING AQUACULTURE SYSTEM

Miss Kansuda Duangsrikaew

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจากระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
โดย	นางสาวกัลย์สุดา ดวงศรีแก้ว
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.สมเกียรติ เตชกาญจนารักษ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กัลย์สุดา ดวงศรีแก้ว : การคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจากระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. (ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NITRIFYING BACTERIA FROM RECIRCULATING AQUACULTURE SYSTEM) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข, 102 หน้า.

ระบบบำบัดน้ำเสียของระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (RAS) เป็นระบบที่สามารถนำน้ำกลับมาใช้ใหม่ ภายหลังจากการกรองชีวภาพ (biofiltration) โดยแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจะเกาะอยู่บนวัสดุที่ใช้เป็นตัวกรองชีวภาพแบบไบโอฟิล์ม (biofilm) แล้วทำหน้าที่ลดปริมาณแอมโมเนียและไนไตรต์ที่พบในน้ำเสียอย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงส่วนใหญ่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (uncultured bacteria) ดังนั้นจุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้ คือการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงและคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจากตัวกรองชีวภาพของระบบ RAS ที่มาจากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในขั้นแรกเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงเบื้องต้นเป็นเวลา 3 เดือน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ประกอบด้วยแอมโมเนีย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารกุ้ง 90 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมทั้งใส่ตัวกลาง BCN-009 เพื่อเพิ่มพื้นที่ให้แบคทีเรียยึดเกาะ ผลการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่ามีเซลล์เกาะบนตัวกลางหลายกลุ่ม ต่อมาถ่ายตัวกลางที่มีแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม แต่เติมแอมโมเนียความเข้มข้น 2, 5 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรทุกวัน พบว่าปริมาณแอมโมเนียทั้ง 3 ความเข้มข้นลดลงจนหมดทุกวัน จากการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรของแบคทีเรีย โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ด้วยไพรเมอร์ CTO189f-gc และ CTO 654r พบว่าแถบโครงสร้างประชากรจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตรงกันกับแบคทีเรียจากใยกรองของระบบ RAS และผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียเด่นบนตัวกลางและในใยกรอง คือ Uncultured *Nitrosomonas* sp. นอกจากนี้แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้สามารถลดแอมโมเนียที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริง ภายในเวลา 20 ชั่วโมง อัตราการย่อยสลายแอมโมเนียสูงสุดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้นี้ คือ 67.9 mg-N/m^2/h แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ยังมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแอมโมเนีย หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้สามารถเพาะเลี้ยงและรักษาสภาพของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า วิธีการเลี้ยงเชื้อนี้เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการบำบัดน้ำเสียของระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

ภาควิชา............จุลชีววิทยา...ลายมือชื่อนิสิต............Kamsuda..................................

สาขาวิชา...........จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม...........ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..

ปีการศึกษา.......2551..ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..

4972216023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: recirculating aquaculture system, nitrifying bacteria, biofilter, DGGE

KANSUDA DUANGSRIKAEW: ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NITRIFYING BACTERIA FROM RECIRCULATING AQUACULTURE SYSTEM. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., THESIS COADVISOR: SORAWIT POWTONGSOOK, Ph.D., 102 pp.

Recirculating Aquaculture System (RAS) allows the reuse of water after biofiltration. In this system, nitrifying bacteria attached on the biofilter material as biofilm could effectively eliminate ammonia and nitrite in the wastewater. Previous studies found that most nitrifying bacteria are unculturable. Thus, the purposes of this study were to develop a process for cultivation and isolation of the nitrifying bacteria from RAS biofilter obtained from the Center of Excellence for Marine Biotechnology, Chulalongkorn University. At first, nitrifying bacteria were pre-cultured for 3 months in a medium containing 90 mg/l shrimp food and 100 mg/l $(NH_4)_2SO_4$. Plastic matrices (BCN-009) were also added to increase the surface area for attachment by these bacteria. The result from scanning electron microscope (SEM) showed many groups of bacteria in these matrices. Then, the matrices with nitrifying bacteria were transferred daily into a similar medium but vary the amount of NH_4-N to 2, 5, and 10 ppm. The nitrifying activity could completely reduce NH_4-N concentrations within a day. Community of nitrifying bacteria was studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) with CTO189f-gc and CTO654r primers. DGGE profiles of the cultivated ammonia oxidizing bacteria were similar to the profile from the RAS biofilter sample. Nucleotide analysis identified the dominant populations in both samples as Uncultured *Nitrosomonas* sp. Moreover, these cultured bacteria could reduce ammonia at the initial concentration of 5 mg/l in both synthetic wastewater and real wastewater within 20 hours. The maximum rate of ammonia degradation from these cultured bacteria was 67.9 mg-N/m^2/h. In addition, these cultured bacteria were still effective for ammonia reduction after storage for 1 week at 4° C. The bacteria could be re-cultivated and maintained in the same medium. From the results, we can conclude that this process was suitable for the culture of nitrifying bacteria, which can be used as inoculum for wastewater treatment in the recirculating aquaculture system.

Department: ....Microbiology................Student's signature.......Kansuda.......

Field of study: ....Industrial Microbiology....Advisor's signature..........................

Academic year: ....2008..........................Co-advisor's signature..........................

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร.สรวิศ เผ่าทองศุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงกำลังใจและความอดทนที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และดร. สมเกียรติ เตชกาญจนารักษ์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ รวมทั้งอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์อาร์เอ็นเอในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ห้องวิจัย 448, 406 และ 453 ที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้อง เพื่อน ๆ ทุกคนและรุ่นพี่ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย..	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..	จ
กิตติกรรมประกาศ..	ฉ
สารบัญ..	ช
สารบัญตาราง..	ฎ
สารบัญภาพ..	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..	ฑ
บทที่	
1 บทนำ..	1
2 ปริทัศน์วรรณกรรม..	4
2.1 ลักษณะและผลกระทบของน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ………..	4
2.2 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการบำบัดน้ำแบบหมุนเวียนน้ำ……………	6
2.3 วัฏจักรไนโตรเจนและแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง.....................................	12
2.4 การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายอิง…………………………………	18
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย..	27
อุปกรณ์..	27
เคมีภัณฑ์……………………………………………………………………	28
วิธีการดำเนินงานวิจัย..	31
3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายอิงแบคทีเรียเบื้องต้น	31
3.1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำและใยกรองและการเตรียมตัวอย่าง……………	31
3.1.2 อาหารแข็งชนิดต่าง ๆ………………………………………………	31
3.1.3 อาหารเหลวชนิดต่าง ๆ………………………………………………	31
3.2 การเพาะเลี้ยงและตรวจสอบไนตริฟายอิงแบคทีเรียจากอาหารเหลวที่คัดเลือกได้	32
3.2.1 การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายอิง……………………..	32
3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้……….	33
3.2.3 การวิเคราะห์ตัวกลางที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)……..	33

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

3.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้และแบคทีเรียจากใยกรองด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล………………………………………………………………... 33
3.3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ………………………………………………….. 33
3.3.2 การตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธี Gel Electrophoresis……………………………………………………………… 34
3.3.3 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์……………………………………………….. 35
3.3.4 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)………………………………… 35
3.3.4.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ…… 35
3.3.4.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั่วไป……………………………………………………………….. 36
3.3.4.3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย……………………………………….. 37
3.3.5 การสกัดอาร์เอนเอ……………………………………………………….. 37
3.3.6 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)………………………………… 38
3.3.6.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของอาร์เอนเอ 38
3.3.6.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย…………………………… 39
3.3.7 การวิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 39
3.3.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอเด่นจากโปรไฟล์ของ DGGE 40
3.3.8.1 เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน 40
3.3.8.2 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR…………………………….. 41
3.3.8.3 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลามิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ 41
3.3.8.4 สกัดรีคอมบีแนนท์พลาสมิด…………………………….. 42
3.3.8.5 ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ……………………………………………………….. 42
3.3.8.6 วิเคราะห์สำดับนิวคลีโอไทด์…………………………….. 42
3.4 วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ……………………………………………………………. 43

หน้า

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH_4-N)…………….. 43
3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์-ไนโตรเจน (NO_2-N)………………… 43
3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรต-ไนโตรเจน (NO_3-N)………………… 44
3.5 การทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริง………………………………………………………………………………… 44
3.5.1 กิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ 44
3.5.2 กิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียจริง……………….. 44
3.5.3 การทดสอบอัตราการย่อยสลายแอมโมเนียไนโตรเจนในน้ำเสียจริง 45
3.6 การเก็บรักษาสภาพหัวเชื้อแบคทีเรีย………………………………………. 45
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง…………………………………………………. 46
4.1 การคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเบื้องต้นจากบ่อบำบัดน้ำเสียของบ่อเลี้ยงกุ้งแบบหมุนเวียนน้ำ……………………………………………………………….. 46
4.1.1 การเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่าง……………………………… 46
4.1.2 การเลี้ยงเชื้อเบื้องต้นบนอาหารแข็งชนิดต่าง ๆ…………………… 47
4.1.3 การเลี้ยงเชื้อเบื้องต้นในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ…………………… 48
4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยใช้อาหารเหลวที่เลือก……………………….... 52
4.3 การเปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้กับแบคทีเรียในบ่อบำบัด…. 60
4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตะกอนใยกรองและจากตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อ…………………………………………………………… 60
4.3.2 การเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)……………………………………….. 60
4.3.2.1 16S universal primers…………………………………. 61
4.3.2.2 16S AOB primers………………………………………. 61
4.3.3 การแยกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธี DGGE……………………….. 62
4.3.4 การสกัดอาร์เอนเอของตะกอนแบคทีเรียจากตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อ 67
4.3.5 Reverse transcription และการเพิ่มจำนวน 16S rRNA โดยวิธี PCR 67
4.4 กิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียสังเคราะห์…………………… 68
4.5 กิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียจริง…………………………… 69
4.5.1 ประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ในน้ำเสียจริง…… 69

หน้า

4.5.2 อัตราการย่อยสลายแอมโมเนียไนโตรเจน.................................... 70

4.6 การรักษาสภาพหัวเชื้อ.. 72

5. สรุปผลการทดลอง.. 74

รายการอ้างอิง…………………………………………………………………….. 77

ภาคผนวก………………………………………………………………………… 84

ภาคผนวก ก……………………………………………………………………... 85

ภาคผนวก ข……………………………………………………………………... 88

ภาคผนวก ค…………………………………………………………………….. 93

ภาคผนวก ง……………………………………………………………………... 95

ภาคผนวก จ…………………………………………………………………….. 98

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.. 102

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	ลักษณะของน้ำเสียโดยทั่วไปจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ..................................	5
2.2	ตัวอย่างชนิดสัตว์น้ำและความเค็มกับการทนไนไตรต์..............................	6
2.3	อัตราการบำบัด TAN จากระบบบำบัดน้ำเสียของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยใช้ตัวกรองชีวภาพชนิดต่าง ๆ..	15
2.4	ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษากลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในในระบบบำบัดน้ำเสีย..	24
3.1	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบื้องต้น..	32
4.1	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอเด่นจากรูปที่ 4.3..............	51
4.2	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของดีเอ็นเอจากแม่แบบ 16s AOB..	64
จ.1	ปริมาณการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร...........	94
จ.2	ปริมาณการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร...........	95
จ.3	ปริมาณการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร...........	95
จ.4	ปริมาณการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร.........	96
จ.5	ปริมาณการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร.........	96

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างส่วนประกอบสำคัญของระบบหมุนเวียนน้ำสำหรับการเลี้ยงกุ้งในโรงเรือน..	10
2.2	วัฏจักรไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ…………………………………………	13
2.3	กิจกรรมของแบคทีเรียในไบโอฟิล์มจากตัวกลางในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไนตริฟิเคชันโดยทั่วไป………………………………………………………….	14
2.4	ตัวกรองชีวภาพชนิด bead filters ชื่อทางการค้าคือ Nor-Pac………………..	15
2.5	ตัวกรองชีวภาพชนิด Bead Filter ชื่อทางการค้าคือ BCN-009……………….	17
4.1	ใยกรองในระบบบำบัดน้ำเสียของบ่อเลี้ยงกุ้ง (ก) ใยกรอง (ข) บ่อบำบัดน้ำเสียแบบไนตริฟิเคชันจากการเลี้ยงกุ้ง...	47
4.2	การเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง (ก) อาหารเลี้ยงเชื้อ NOB (ข) อาหารเลี้ยงเชื้อ AOB จากตัวอย่างน้ำและตะกอนจากใยกรองที่เจือจางความเข้มข้น 100 เท่า……………………………………………………………………....	48
4.3	การวิเคราะห์ DGGE ด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ 16s universal…………………….	49
4.4	การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต ในระยะเวลา 1 เดือน….	52
4.5	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากการเลี้ยงเชื้อในการบำบัด…………………….	54
4.6	ลักษณะพื้นผิวตัวกลาง BCN 009 ภายหลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน……….	55
4.7	ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน………………………………….	56
4.8	Genomic DNA ของแบคทีเรียจากตัวอย่าง………………………………….	58
4.9	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสจาก Genomic DNA ของดีเอ็นเอแม่แบบ 16s universal………………………………………………………………..	59
4.10	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสจาก Genomic DNA ของดีเอ็นเอแม่แบบ 16s AOB……………………………………………………………………….	60
4.11	การวิเคราะห์ DGGE ของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสที่ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ 16s universal………………………………………………………………….	61
4.12	การวิเคราะห์ DGGE ของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสที่ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ คือ CTO189f-gc และ CTO654r……………………………………………….	62
4.13	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยวิธี Reverse transcription………..	65
4.14	ประสิทธิภาพการบำบัดแอมโมเนีย และไนไตรต์ ในน้ำเสียสังเคราะห์………..	67

ภาพที่		หน้า
4.15	ประสิทธิภาพการบำบัดแอมโมเนีย และไนไตรต์ ในน้ำเสียจริง..................	68
4.16	อัตราการย่อยสลายของแอมโมเนียไนโตรเจนในน้ำเสียจริง......................	69
4.17	การบำบัดแอมโมเนียของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้เมื่อผ่านการเก็บรักษาหัวเชื้อเป็นเวลา 7 วัน..	70
ค.1	กราฟมาตรฐานแอมโมเนียไนโตรเจน...	89
ค.2	กราฟมาตรฐานไนไตรต์ไนโตรเจน..	89
ค.3	กราฟมาตรฐานไนเตรตไนโตรเจน..	90
ฉ.1	ปริมาณแอมโมเนียความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ลดลงต่อเวลา..........................	94
ฉ.2	กราฟเส้นแสดงแนวโน้มปริมาณแอมโมเนียความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ลดลง.........	97

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A_{260}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 260 นาโนเมตร
A_{280}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 280 นาโนเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำ (Recirculating aquaculture system) เป็นระบบที่มีการหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่ โดยน้ำเสียจะมีการบำบัดโดยผ่านกระบวนการบำบัดโดยวิธีทางกายภาพและชีวภาพก่อนนำมาใช้ใหม่ (Losordo และคณะ, 1998) กระบวนการบำบัดทางชีวภาพประกอบด้วยตัวกลางที่มีแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงยึดเกาะอยู่ และทำหน้าที่ในการบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์จากระบบเพาะเลี้ยง สรวิศ เผ่าทองศุข และ เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต (2550) รายงานว่าระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดที่มีระบบบำบัดน้ำแบบ Nitrification Biofilter ซึ่งใช้ใยกรองไบโอโพลีมา และระบบ Tubular Denitrification Reactor จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล สามารถใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบปกติ (กุ้ง 7 ตัวต่อตารางเมตร) และแบบหนาแน่น (กุ้ง 150 ตัวต่อตารางเมตร) เป็นเวลามากกว่า 11 เดือน โดยไม่มีการถ่ายน้ำออกทิ้ง ตลอดระยะเวลาการทดลองสามารถควบคุมความเข้มข้นของแอมโมเนียไม่ให้เกิน 0.2 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไม่พบการสะสมไนไตรต์ในน้ำทะเล แสดงว่ามีความเป็นไปได้ที่จะพบแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจากใยกรองไบโอโพลีมาซึ่งมีหน้าที่บำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ในระบบบำบัดนี้ อย่างไรก็ดียังไม่มีการจำแนกหรือการคัดแยกแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสียนี้

การศึกษาแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียในอดีต ทำได้โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและศึกษาทางด้านสรีรวิทยา แต่เนื่องจากข้อจำกัดในการเลี้ยงเชื้อทำให้ในปัจจุบันมีการศึกษาแบคทีเรียใช้วิธีการทางชีววิทยาโมเลกุลมากขึ้น ได้แก่ การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S ribosomal DNA (rDNA) และการศึกษากลุ่มประชากรของแบคทีเรียในแหล่งต่างๆ ด้วยวิธี DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) เช่นการศึกษาของ Kowalchuk และคณะ (1997) โดยใช้วิธี DGGE แล้วพบแบคทีเรียในกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย ที่ประกอบด้วย *Nitrosomonas sp.* และ *Nitrosospira sp.* จากดินบริเวณชายฝั่ง นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่ยังไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ (unidentified) ได้อีกหลายชนิดในกลุ่มเดียวกัน อีกตัวอย่างได้แก่ Tanaka และคณะ (2003) ศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง ใน activated-sludge reactor พบแบคทีเรียเด่น ๆ ได้แก่ *Nitrosomonas sp.* และ *Nitrospira* sp. และพบแบคทีเรียกลุ่มเด่นหลายชนิดที่เป็น uncultured bacteria เทคนิคทางโมเลกุลเหล่านี้ทำให้ค้นพบแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นหลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้หลากหลายกลุ่ม

การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงในระบบบำบัดน้ำเสียหรือในสิ่งแวดล้อม ทำได้โดย ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่แตกต่างกัน แบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง

ประกอบด้วย ammonia oxidizing bacteria (AOB) และ nitrite oxidizing bacteria (NOB) ซึ่งใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน แบคทีเรียกลุ่ม AOB สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรต์ ตัวอย่างเช่น *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus*, *Nitrolobus* และ *Nitrospira* (Antony และ Philip, 2006) ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม NOB สามารถออกซิไดซ์ไนไตรต์ให้เป็นไนเตรต ตัวอย่างเช่น *Nitrobacter*, *Nitrococcus* และ *Nitrospira* (Drahos, 2006) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงทำได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ และ $NaNO_2$ เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดส์แอมโมเนียและแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดส์ไนไตรต์ตามลำดับ (Carlucci และ Strickland, 1968; Watson และ Mandel,1971; Du และคณะ, 2003) ทั้งนี้ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ และ $NaNO_2$ ที่ใช้ในงานวิจัยต่างๆ มีค่าแตกต่างกัน

อย่างไรก็ดีปัญหาในการศึกษาและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง คือส่วนมากไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ด้วยวิธีการดั้งเดิม เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญช้าหรือไม่สามารถเลี้ยงได้ในสภาวะแวดล้อมที่ต่างไปจากเดิม (Tal, *et al.* 2003) รวมทั้งเชื้อมีความไวต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมาก เช่น ความเค็ม (salinity) ปริมาณแสง (light intensity) และ pH เมื่อเกิดปฏิกิริยาไนทริฟิเคชันจะเกิด $2H^+$ ด้วย ทำให้เกิดกรดในระบบบำบัด เมื่อ pH มีค่าน้อยกว่า 6 จะเป็นพิษต่อแบคทีเรียกลุ่มนี้ จึงต้องรักษาสภาวะเป็นกลางโดยการใช้สารไบคาร์บอเนต (Guisasola, *et al.* 2007) ปัญหาอีกอย่างหนึ่งของการเลี้ยงเชื้อ คือการที่ต้องใช้ระยะเวลาในการบ่มนาน ในอดีตการศึกษาจำนวนของแบคทีเรียด้วยวิธี MPN ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบด้วยน้ำทะเล ต้องใช้ระยะเวลาสูงสุดประมาณ 60-90 วัน (Matulewich, *et al.* 1975) ถึงแม้ว่าการศึกษาการเลี้ยงเชื้อในเวลาต่อมา พบว่าสามารถลดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเหลือประมาณ 25 วัน ก็ยังเป็นระยะเวลาที่นาน เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ

การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง ในระบบบำบัดน้ำเสียจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบหมุนเวียนน้ำในประเทศไทย ได้มีการศึกษาโดยสุธาสินี อ่วมจันทร์ (2546) พบแบคทีเรียจำนวน 5 ชนิดในน้ำเสียเทียมจากถังปฏิกรณ์ไนทริฟิเคชัน โดยใช้ไบโอบอล (bioball) เป็นตัวกลางให้แบคทีเรียยึดจับ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (uncultured) และไม่สามารถจำแนกได้ (unidentified) ในน้ำทะเลเริ่มต้นก่อนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชั่น และบางชนิดยังคงพบได้ตลอดการทดลอง จึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ และไม่สามารถจำแนกได้ เพื่อสามารถนำความรู้เกี่ยวกับชนิดของแบคทีเรียและวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้ มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้หัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้ จึงศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกและการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง จากระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีบ่อบำบัดน้ำเสียแบบตัว

กรองชีวภาพ (biofilter) ที่มีใยกรองทำหน้าที่เป็นตัวกลางให้แบคทีเรียยึดจับเป็นไบโอฟิล์ม ทำให้คาดว่าจะมีแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงที่มีประสิทธิภาพสูง การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจะทำโดยปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เคยมีการรายงานมาก่อนให้เหมาะสมกับแบคทีเรียกลุ่ม AOB และ NOB ยิ่งขึ้น เช่น การดัดแปลงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้เป็นบัฟเฟอร์และแหล่งคาร์บอน คือ $NaHCO_3$ การเติมตัวกลางพลาสติกให้แบคทีเรียมีพื้นที่เพิ่มขึ้นในการยึดเกาะ หรือการผสมอาหารกุ้งเข้าไปในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มวิตามินและแร่ธาตุลงไป เนื่องจากการศึกษาของสุธาสินี อ่วมจันทร์ (2546) พบว่าเมื่อเติมอาหารเลี้ยงกุ้งในระบบบำบัดจำลองพบแบคทีเรียหลากหลายชนิด มากกว่าการที่ไม่เติมอาหารกุ้งในระบบ และจากงานวิจัยของ Shan และ Obbard (2001) ก็ได้มีการเติมอาหารกุ้ง 440 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงที่ตรึงอยู่กับ clay pellet เพื่อเลียนแบบสภาวะในบ่อเลี้ยงกุ้ง งานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ กับแบคทีเรียที่ตรวจพบบนใยกรองจากการเลี้ยงกุ้งแบบหมุนเวียนน้ำ เพื่อพิสูจน์ว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้เป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในระบบบำบัดหรือไม่ หลังจากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ต่อการบำบัดแอมโมเนีย และไนไตรต์ ทั้งในตัวอย่างน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง
2. เปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้กับแบคทีเรียกลุ่มเด่นในบ่อบำบัดน้ำเสียของระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำ
3. วิเคราะห์ประสิทธิภาพการบำบัดไนโตรเจนของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม สำหรับการเลี้ยงประชากรแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง และคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มเด่นในบ่อบำบัดน้ำเสียแบบไนทริฟิเคชั่น โดยความรู้เกี่ยวกับชนิดของแบคทีเรียและวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้ สามารถนำไปพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการบำบัดน้ำเสียประเภทแอมโมเนียและไนไตรต์ สำหรับประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีบำบัดน้ำเสียจากระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำ ให้มีประสิทธิภาพดีและสะดวกต่อการใช้งานต่อไป

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ลักษณะและผลกระทบของน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการทำเกษตรกรรมมาช้านาน ผลผลิตทางการเกษตรมีมากมายหลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งใช้ในการบริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำถือเป็นสินค้าทางการเกษตรที่สำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากสามารถทำรายได้เข้าประเทศได้ดีโดยเฉพาะกุ้ง ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้ราคาดี ในบริเวณพื้นที่ชายทะเล เช่น ภาคตะวันออกของประเทศ ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกกุ้งทะเลจากการเพาะเลี้ยงที่สำคัญของโลกประเทศหนึ่ง ในปี 2542 คาดคะเนว่ามีผลผลิตสูงถึง 200,000 ตัน สูงที่สุดในโลกจากพื้นที่เลี้ยง 500,000 ไร่ และมีผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างสูง คือ 400 กิโลกรัม (กิจจา ใจเย็น, 2548) การเลี้ยงกุ้งเป็นจำนวนมาก ทำให้มีน้ำเสียถูกปล่อยออกมาเป็นจำนวนมากตามมา จึงมีการกำหนดมาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งก่อนปล่อยหรือระบายทิ้ง โดยกรมควบคุมมลพิษในปีพ.ศ. 2545 ดังนี้ pH อยู่ระหว่าง 6.5 – 9 มิลลิกรัมต่อลิตร BOD ไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตะกอนแขวนลอย ไม่เกิน 70 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนียรวมไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟอรัสรวม ไม่เกิน 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนโตรเจนรวมไม่เกิน 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (มะลิ บุณยรัตผลิน และคณะ, 2546)

โดยทั่วไปความสกปรกของน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกุ้งมีความสกปรกไม่มาก เมื่อเทียบกับน้ำเสียจากบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรม ในน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกุ้งประกอบไปด้วยสารกลุ่มแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต เป็นองค์ประกอบหลัก ทั้งนี้เนื่องจากสัตว์น้ำจะปล่อยของเสียออกมาในรูปของแอมโมเนีย ดังนั้นในน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกุ้งจึงประกอบไปด้วยสารประกอบไนโตรเจน (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548) จากตารางที่ 2.1 พบว่าปริมาณแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงกุ้งมีอยู่ในระดับที่ไม่สูง (0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตาม ไนไตรต์ ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยสลายแอมโมเนียมีปริมาณค่อนข้างสูง (2.16 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งอาจส่งผลต่อกุ้งที่เลี้ยง รวมทั้งการถ่ายน้ำทิ้งในอดีตมักใช้วิธีการถ่ายน้ำสะอาดจากแหล่งน้ำภายนอกเข้าสู่ภายในบ่อเลี้ยงกุ้ง (สถาบันวิจัยสัตว์น้ำชายฝั่ง, 2549) และมีการถ่ายน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา (Intensive system) ในปัจจุบันซึ่งมีจำนวนกุ้งต่อบ่อมากขึ้น ของเสียที่เกิดจากการเลี้ยงกุ้ง ประกอบด้วยเศษอาหาร และของเสียที่กุ้งขับถ่าย ซึ่งจะถูกปล่อยออกมาพร้อมการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ทั้งในช่วงระหว่างการเลี้ยงและระหว่างการจับกุ้ง น้ำทิ้งมักจะมีระดับของแอมโมเนีย ไนไตรต์สูงกว่าสภาพธรรมชาติ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่เหมาะสมกับการ

เจริญเติบโตของสัตว์น้ำ มีระดับของค่าออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำต่ำ มีปริมาณของแพลงก์ตอนในน้ำสูงมาก และอาจมียาปฏิชีวนะและสารเคมีปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้ง เมื่อระบายสู่แหล่งน้ำจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและสัตว์น้ำในธรรมชาติ ส่งผลทำให้สัตว์น้ำตาย เนื่องจากขาดออกซิเจนและยังส่งผลให้คุณภาพน้ำที่จะนำมาเลี้ยงกุ้งมีคุณภาพต่ำลง ซึ่งอาจจะโน้มนำให้เกิดโรคระบาดกุ้งได้ ส่วนสารออกซิเตตราชัยคลิน มีผลทำให้ไนโตรเจนและอินทรีย์คาร์บอนของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งสลายตัวช้าลง ซึ่งข้อมูลที่ผ่านมาพบว่าน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งโดยเฉพาะในช่วงจับกุ้งมีปริมาณของเสียมากที่สุด (สุรพล เรืองสิริ, 2544) ซึ่งถ้าไม่มีการบำบัดน้ำก่อนการปล่อยลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติจะส่งผลต่อมนุษย์และสัตว์น้ำอื่น ๆ ในแหล่งน้ำธรรมชาติโดยเฉพาะในแหล่งน้ำปิดที่มีสารประกอบไนโตรเจนมากเกินไป จะทำให้เกิดกระบวนการ Eutrophication หรือกระบวนการที่มีพืชน้ำเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลงและเกิดการตายของพืชและสัตว์น้ำในบริเวณนั้นตามมา (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2545) ทำให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสีย โดยเฉพาะในบริเวณใกล้กับแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ตารางที่ 2.1 ลักษณะของน้ำเสียโดยทั่วไปจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548)

ลักษณะของน้ำเสีย	ค่าเฉลี่ย
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	7.54
อุณหภูมิ (องสาเซลเซียส)	31.19
ความเค็ม (พีพีที)	0.80
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	7.35
แอมโมเนีย (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.09
ไนไตรต์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	2.16
ไนเตรต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.01
ฟอสเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.04

ไนไตรต์เป็นสารที่มีพิษต่อกุ้ง มีคุณสมบัติในการจับกับเม็ดเลือดได้เร็วกว่า ออกซิเจน จึงทำให้สัตว์น้ำ ใช้ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้น้อยลง (Grommen และคณะ, 2002) ซึ่งกุ้งต้องใช้ออกซิเจน ในขบวนการเผาผลาญอาหาร เพื่อการดำรงชีวิต และการเจริญเติบโต แต่เนื่องจาก ไนไตรต์ ทำให้คุณภาพน้ำไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ในน้ำที่มีไนไตรท์สูงกว่า 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้กุ้งป่วย และติดเชื้อโรคต่างๆ ได้ง่าย ดังนั้นน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีระดับของไนไตรท์ สูงกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ควรนำมาเลี้ยงกุ้ง พิษของไนไตรท์ยังเป็นอันตรายต่อเหงือก ทำให้กุ้งเกิดความระคายเคืองบริเวณซี่เหงือก เป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อได้ง่าย และ

ทำให้ระบบการหายใจของกุ้งผิดปกติ กุ้งต้องหายใจถี่ขึ้น ทำให้กุ้งสูญเสียระบบการขับถ่ายน้ำ และเกลือแร่จากร่างกาย ทำให้ร่างกายอ่อนแอ การเจริญเติบโตของกุ้งลดลง เนื่องจากขบวนการเผาผลาญอาหาร ภายในร่างกายมีประสิทธิภาพลดลง ไนไตรต์ยังทำให้กุ้งลอกคราบไม่ออก, กุ้งเปลือกนิ่ม, กินกันเองขณะลอกคราบ, การเจริญเติบโตช้าลง, กุ้งอ่อนแอ และตายในที่สุด กุ้งที่ได้รับพิษจาก ไนไตรท์ ในระยะแรกๆ จะมีความเสียงต่อการเกิดโรค หัวเหลือง ตัวแดง ดวงขาว สูงมากกว่ากุ้งที่อยู่ในสภาพน้ำปกติ (สถาบันวิจัยสัตว์น้ำชายฝั่ง, 2549)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างชนิดสัตว์น้ำและความเค็มกับการทนไนไตรต์ (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และไพพรรณ พรประภา, 2544)

ชนิดของสัตว์น้ำ	ชนิดของน้ำที่ใช้เลี้ยง	ปริมาณไนไตรต์ (mg-N/l)	ปริมาณสัตว์น้ำที่ตายต่อระยะเวลา (ชั่วโมง)
ปลาเรนโบว์เทราท์ อายุ 1 ปี	น้ำจืด	0.55	55% ใน 24 ชั่วโมง
ปลาชินุกค์ แซลมอน (ปลานิ้ว)	น้ำจืด	19.00	50% ใน 48 ชั่วโมง
ปลาชินุกค์ แซลมอน (ปลานิ้ว)	น้ำเค็ม	1070.00	10% ใน 48 ชั่วโมง
Americah oyster (โตเต็มวัย)	น้ำเค็ม	658.00	50% ใน 96 ชั่วโมง
Malaysian Prawn	น้ำเค็ม	8.60	50% ใน 96 ชั่วโมง

จากข้อมูลเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยปราศจากการบำบัดน้ำทิ้ง มีผลกระทบอย่างมากทั้งต่อมนุษย์และตัวสัตว์น้ำเอง การเลี้ยงสัตว์น้ำยิ่งมีจำนวนมากย่อมต้องมีของเสียปล่อยออกมามาก ดังนั้นปัญหาของการเพาะเลี้ยงให้มีผลผลิตมากในขณะที่คุณภาพของน้ำที่ใช้จะต้องได้รับการบำบัดให้ได้มาตรฐาน จึงมีความน่าสนใจต่อการศึกษาถึงวิธีการในการทำให้การเพาะเลี้ยงและการบำบัดควบคู่กันไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.2 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการบำบัดน้ำแบบหมุนเวียนน้ำ

2.2.1 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย

ประเทศไทยมีการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา (intensive) ตั้งแต่ พ.ศ. 2529 โดยพัฒนามาจากการเลี้ยงกุ้งกึ่งธรรมชาติ (semi intensive) และการเลี้ยงแบบธรรมชาติ (extensive) ในบริเวณพื้นที่นาข้าวชายฝั่งที่มีน้ำท่วมถึง การเลี้ยงกุ้งแบบธรรมชาติ (extensive) หมายถึงการเลี้ยงกุ้งเพื่อให้ได้ผลผลิตมาก โดยการขยายพื้นที่ตามบริเวณชายฝั่งของประเทศไทย ที่มีน้ำขึ้น-ลงถึง เริ่มทำการเลี้ยงกุ้งในบริเวณนาข้าวเมื่อถึงฤดูน้ำหลาก น้ำทะเลท่วมถึงพร้อมทั้งนำเอาลูกพันธุ์กุ้ง-ปลาเข้ามาด้วย เมื่อน้ำลด กุ้งปลาที่ตกค้างอยู่ในนาก็เจริญเติบโตดี เจ้าของสามารถนำมาบริโภคและจับขายได้

มากขึ้น ต่อมามีการปรับปรุงพื้นที่นาเดิมให้ลึกและเหมาะสำหรับเลี้ยง และจับลูกพันธุ์จากธรรมชาติมาเพิ่มมากขึ้น เรียกว่า การเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งธรรมชาติ (sem intensive) ชนิดของกุ้งที่เลี้ยงในขณะนั้น คือกุ้งขาว (*Penaeus merguiensis* และ *Penaeus indicus*) และกุ้งตะกาด (*Metapenaeus monoceros*) เป็นหลัก ต่อมาปี พ.ศ. 2525 กรมประมงเริ่มมีการเพาะฟักกุ้งกุลาดำ (*Penacus monodon*) ได้สำเร็จ ได้แนะนำส่งเสริมให้เกษตรกรทั่วไปสามารถทำได้ จึงเกิดการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา (intensive) ขึ้นมาประมาณปี พ.ศ. 2527 การเลี้ยงแบบพัฒนาเพื่อเพิ่มผลผลิตโดยไม่มีการขยายพื้นที่แต่เพียงอย่างเดียว ด้วยการนำลูกพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงได้ไปปล่อยในบ่อดิน จำนวนตัวต่อตารางเมตรหนาแน่นมากขึ้น (ประจวบ หลำอุบล, 2546)

การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาของไทยเริ่มขึ้นในปี 2528-2529 ในภาคกลางบริเวณ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และสมุทรปราการ การปรับเปลี่ยนพื้นที่เป็นนากุ้งแบบพัฒนาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว กุ้งราคาดี จึงเป็นสาเหตุจูงใจให้มีการขยายพื้นที่การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาอย่างรวดเร็ว โดยไม่มีการวางแผนและจัดระบบการใช้น้ำล่วงหน้า และปล่อยน้ำจากนาทิ้งลงแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยไม่มีการบำบัดน้ำก่อนทิ้ง นอกจากนั้นยังมีการใช้สารเคมีทุกประเภทเพียงเพื่อบำบัดน้ำ ให้มีคุณภาพดี ผลที่เกิดขึ้นในปี 2532 ภายหลังการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาได้เพียง 3 ปี เกิดการล่มสลายของนากุ้งบริเวณสมุทรสาคร สมุทรสงคราม และสมุทรปราการ การเลี้ยงก็เคลื่อนย้ายไปทางภาคตะวันออก จังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด และมากขึ้น มีการใช้วิชาการและขบวนการเลี้ยงพัฒนากว่าเดิม ทำให้การเลี้ยงมีผลผลิตสูงและต่อเนื่องยาวนาน พร้อม ๆ กับการเลี้ยงในเขตตะวันออก ได้มีการขยายพื้นที่การเลี้ยงลงมาทางภาคใต้ ที่มีพื้นที่ติดต่อกับชายทะเลเป็นระยะทางยาว ทั้งทางฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามัน (กิจจา ใจเย็น, 2548)

ปัจจัยที่มีผลต่อกุ้งและสภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยตรง คืออาหารกุ้ง อาหารกุ้งมีโปรตีนประมาณ 30-40% นอกจากนี้อาหารสำหรับแม่กุ้งต้องมีโปรตีนสูงกว่าปกติ คือที่ 50-55% กรดอะมิโนที่มีในอาหารคือ อาร์จินีน อีสทีดีน ไอโซลูซีน ลูซีน เมทไทโอนีน เมทิลอลานีน ทรีโอนีน ทริบโตเพน และวาลีน ประมาณ 5.5, 1.7, 3.1, 5.3, 5.2, 2.0, 2.9, 2.7, 0.8 และ 3.6% ของโปรตีนในอาหารตามลำดับ ไขมันในอาหารกุ้งอยู่ระหว่าง 5-10% และในจำนวนดังกล่าวประกอบไปด้วยกรดไขมัน โอเมก้า-3 ฮูฟ่า 0.5-1.0% ฟอสโฟลิปิด 1.2-1.5% หรือลีซีติน 2% และคอเรสเตอรอล 0.2-0.5% กุ้งกุลาดำสามารถใช้พลังงานจากคาร์โบไฮเดรตพวกแป้ง ดังนั้นในอาหารกุ้งจึงมีระดับคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมประมาณ 30% ปริมาณแร่ธาตุในอาหารขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ในสูตรอาหาร ถ้าสูตรอาหารมีแหล่งโปรตีนมาจากสัตว์น้ำ มีแร่ธาตุอยู่มาก และในน้ำที่เลี้ยงมีความกระด้างสูง แร่ธาตุที่เติมจะมีเพียงฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แมกนีเซียม ปริมาณ 10, 9, 3 กรัมต่ออาหารหนึ่งกิโลกรัม ตามลำดับ ทองแดง และสังกะสี 53, 52 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม วิตามินที่เติมในอาหารกุ้งมีไทอามีน ไรโบฟราวิน วิตามินบี 12 ไนอาซีน โพลิคเอซิด วิตามินซี

วิตามินดี วิตามินเค ในปริมาณ 14, 22, 5, 0.2, 7.2, 8, 40, 0.1, 40 มิลลิกรัมต่ออาหารหนึ่งกิโลกรัม (ประจวบ หล้าอุบล, 2546) จะเห็นได้ว่าอาหารกุ้งนั้นประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ มากมาย ซึ่งสารเหล่านี้เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของแบคทีเรียในแหล่งน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งด้วย

2.2.2 การควบคุมคุณภาพน้ำจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

2.2.2.1 การควบคุมคุณภาพน้ำจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทางกายภาพ

การควบคุมคุณภาพน้ำทางกายภาพในบ่อบำบัดน้ำ โดยทั่วไปใช้วิธีการเติมอากาศให้กับน้ำในบ่อบำบัด โดยการติดตั้งเครื่องเติมอากาศเพื่อช่วยเพิ่มอากาศในน้ำ เปิดเครื่องช่วยเพิ่มอากาศในบ่อบำบัดทางชีวภาพอย่างน้อยก็ในระหว่างเติมน้ำและระหว่างฝนตก เพื่อป้องกันมิให้ความเค็ม อุณหภูมิและองค์ประกอบทางคุณภาพน้ำอื่น ๆ แบ่งชั้น และเพื่อป้องกันมิให้เกิดการสะสมความร้อนหรือเกิดปฏิกิริยาเรือนกระจกในน้ำ ที่บริเวณพื้นบ่อที่จะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ภายในบ่อบำบัดตลอดจนเพื่อย่นระยะเวลาในการบำบัด นอกจากการเติมอากาศแล้ว อีกวิธีในการควบคุมคุณภาพน้ำจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทางกายภาพ คือการตกตะกอนหรือการกรอง เพื่อลดปริมาณของแข็งแขวนลอยในน้ำก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์,2548)

2.2.2.2 การควบคุมคุณภาพน้ำจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทางเคมี

การควบคุมคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อบำบัดน้ำ สารที่จะใช้ในการควบคุมและรักษาคุณภาพน้ำนั้นจะต้องใช้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำมาก (ต่ำกว่าระดับต่ำสุดที่จะเป็นอันตรายต่อกุ้งระหว่าง 10-50 เท่า) จนกระทั่งไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่มีอยู่ภายในบ่อ ตัวอย่างการใช้สารเคมีในการบำบัดสารพิษได้แก่ การใช้ปูนขาว (1-5 กิโลกรัมต่อไร่) ในการป้องกันมิให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไข่เน่าสะสมในบ่อเลี้ยงกุ้ง การใช้สารประกอบที่มีฤทธิ์เป็นกรด ในการป้องกันมิให้แก๊สแอมโมเนียมีสะสมในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยจัดการให้เปลี่ยนสภาพไปอยู่ในรูปของเกลือแร่ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ เช่น ฟอร์มาลิน 0.5 - 5 ลิตรต่อไร่ คลอรีนผง (เกรด 60%) 25-100 กรัมต่อไร่ คลอรีนน้ำ (เกรด 10%) 150 - 600 มิลลิลิตรต่อไร่ (อนันต์ ตันสุตะพานิช, 2538)

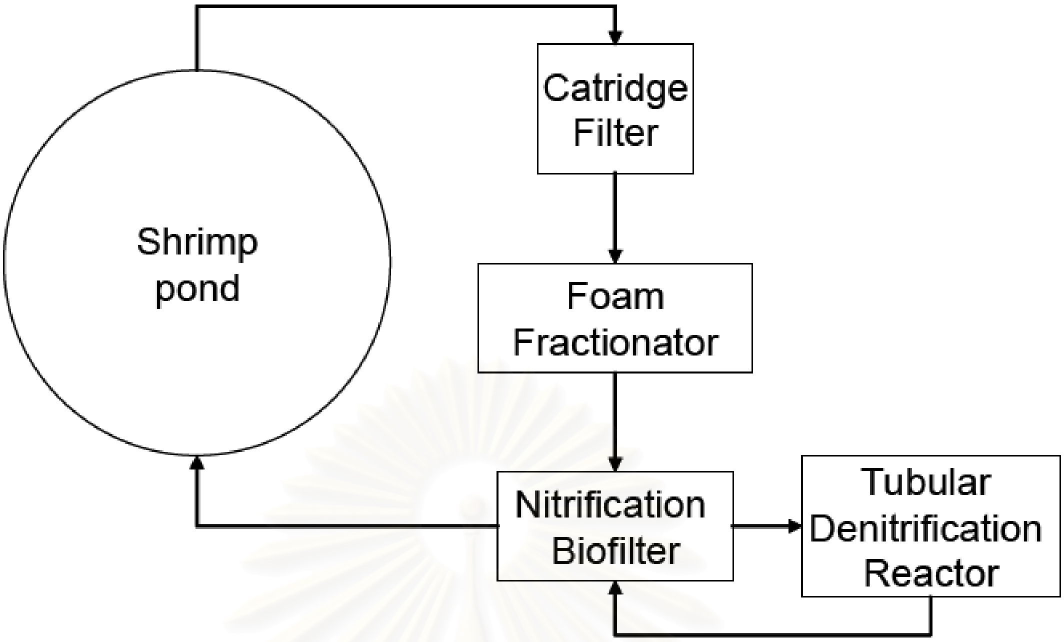
2.2.2.3 การควบคุมคุณภาพน้ำจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทางชีวภาพ

การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีหลายแบบ เช่น การเลี้ยงสัตว์น้ำประเภทหอยและปลาขนาดเล็ก เช่น ปลาหางนกยูง ปลาบู่แคระ บู่ใส โดยสัตว์น้ำที่มีขนาดเล็กเหล่านั้น จะเจริญเติบโตขยายพันธุ์ภายในบ่อเลี้ยงกุ้ง แล้วทำหน้าที่เสมือนพนักงานรักษาความสะอาด เก็บกินแพลงก์ตอน เศษอาหารสิ่งขับถ่ายและซากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เมื่อกุ้งเจริญเติบโต

จนกระทั่งมีขนาดน้อยกว่า 80 ตัว/กิโลกรัม ก็จะเริ่มจับสัตว์น้ำเหล่านั้นกินเป็นอาหารอีกทอดหนึ่ง วิธีการนี้ควรทำควบคู่ไปกับการควบคุมคุณภาพของน้ำเสียทางกายภาพและเคมี เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้อยู่ในสภาวะสมดุลตลอดการเลี้ยง (อนันต์ ตันสุตะพานิช, 2538) การใช้พืชน้ำหรือที่เรียกว่าระบบบึงประดิษฐ์ ก็เป็นอีกวิธีในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพอย่างหนึ่ง วิธีการนี้จะใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาช่วยในการบำบัด โดยพืชน้ำจะดูดออกซิเจนจากอากาศและแพร่ออกไปในน้ำเสียผ่านบริเวณรากพืช จุลินทรีย์บริเวณรากจะสามารถช่วยย่อยสลายสารพิษได้ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ , 2548) อย่างไรก็ตามวิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมานั้นเป็นวิธีการที่ต้องพึ่งพาธรรมชาติค่อนข้างมาก ในปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ปลาและกุ้ง ได้มีการพัฒนาให้มีการเลี้ยงได้ปริมาณมาก เมื่อเทียบกับขนาดของพื้นที่ที่ใช้เลี้ยง เช่น การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำ ซึ่งน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงจะเป็นน้ำเก่าที่ผ่านการเลี้ยงมาแล้ว ดังนั้นในการบำบัดน้ำเสียที่ปล่อยออกมาจึงต้องมีการจัดการที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และรวดเร็วกว่าการบำบัดน้ำแบบเก่า

2.2.3 การบำบัดน้ำจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำ

โดยทั่วไปบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วไปสามารถแบ่งออกได้เป็นสามรูปแบบ ได้แก่ บ่อดินที่อยู่กลางแจ้ง ซึ่งเป็นบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำที่พบได้ทั่วไป บ่อไร้ดินกลางแจ้ง เช่น บ่อดินปูทับด้วยผ้ายาง หรือบ่อซีเมนต์ที่ตั้งอยู่กลางแจ้ง และบ่อในโรงเรือนที่มีลักษณะเป็นบ่อหรือถังที่ไม่มีดิน แต่มีหลังคาปกคลุมทำให้ได้รับแสงน้อย การพัฒนาระบบหมุนเวียนน้ำสำหรับบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อนำมาใช้งานกับระบบบ่อทั้งสามรูปแบบนี้จึงมีรูปแบบ เทคโนโลยี และการจัดการระบบบำบัดที่แตกต่างกัน (สรวิศ เผ่าทองศุข และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2550) การเลี้ยงสัตว์น้ำโดยใช้ระบบบำบัดน้ำแบบหมุนเวียนน้ำ (Recirculating Aquaculture Systems: RAS) เป็นระบบที่มีการบำบัดน้ำที่ผ่านการใช้งานแล้วเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่โดยวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้แบคทีเรียที่เกาะอยู่กับตัวกลางในการบำบัดน้ำเสีย ข้อดีคือระบบแบบนี้ต้องการพื้นที่และใช้น้ำน้อยกว่าการเลี้ยงแบบดั้งเดิม สามารถที่จะคาดเดาและควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงได้ ทำให้ระบบนี้เหมาะสำหรับการเลี้ยงที่มีพื้นที่และปริมาณน้ำจำกัดหรือคุณภาพของน้ำไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เลี้ยงสัตว์น้ำที่ไม่ใช่สัตว์น้ำประจำถิ่นได้อีกด้วย (Itoi และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตาม ระบบนี้ยังมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าการเลี้ยงแบบดั้งเดิม เนื่องจากระบบนี้ต้องมีการปั้มน้ำหมุนเวียนอยู่ตลอดเวลารวมทั้งจะต้องมีการเป่าอากาศเข้าไปในบ่อบำบัดน้ำเสีย ทำให้สิ้นเปลืองค่าไฟฟ้าค่อนข้างสูง รวมทั้งจำเป็นต้องมีคนที่มีความรู้ในการจัดการระบบให้ทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ และสามารถแก้ปัญหาได้เมื่อมีเหตุขัดข้องเกิดขึ้น



รูปที่ 2.1 ตัวอย่างส่วนประกอบสำคัญของระบบหมุนเวียนน้ำสำหรับการเลี้ยงกุ้งในโรงเรือน (สรวิศ เผ่าทองศุข และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2550)

Losordo และคณะ (1999) กล่าวถึงหลักการของระบบบำบัดน้ำแบบหมุนเวียนน้ำ คือ ระบบบำบัดน้ำแบบหมุนเวียนน้ำเป็นระบบปิด ประกอบด้วยบ่อหรือถังเลี้ยงสัตว์น้ำ การกรองและการบำบัดน้ำ สัตว์น้ำจะเจริญในถังเลี้ยงและมีการหมุนเวียนน้ำอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญ น้ำจะถูกสูบออกจากถังเลี้ยงผ่านระบบการบำบัดโดยการกรองผ่านการกรองทางกายภาพเพื่อแยกตะกอน และการกรองทางชีวภาพด้วยตัวกรองชีวภาพเพื่อกำจัดสารประกอบไนโตรเจนในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยง และกลับเข้าสู่ถังเลี้ยงอีกครั้ง การกำจัดสารประกอบไนโตรเจนในน้ำเสียด้วยตัวกรองชีวภาพเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียในกลุ่มไนทริฟายอิงและดีไนทริฟายอิง แบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ไนโตรเจนไปเป็นไนเตรตภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน และแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริฟายอิงบำบัดไนเตรตไปเป็นก๊าซไนโตรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้ตัวกรองชีวภาพที่มีแบคทีเรียเหล่านี้เกาะอยู่สามารถทำได้โดยการสร้างระบบบำบัดที่เหมาะสมกับแบคทีเรียในกลุ่มนั้น ๆ เช่นระบบสำหรับแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจะต้องมีการเติมอากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้กับระบบและใส่ตัวกลางที่เป็นวัสดุของแข็งลงไปแล้วทำการเดินระบบ ในระยะแรกอาจยังไม่สามารถบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ได้ ต่อมาแบคทีเรียจะเริ่มเกาะกันเป็นไบโอฟิล์มและเมื่อประสิทธิภาพการบำบัดดีแล้ว สามารถนำมาใช้ได้ในระบบจริง

ธัญญา พันธ์ฤทธิ์ดำ (2541) ศึกษาระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และพบว่าจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เป็นเวลา 305 วัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิด สามารถควบคุม คุณภาพของน้ำ คือ แอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต และปริมาณออกซิเจนละลาย ให้อยู่ในเกณฑ์ปรกติได้ โดยเฉพาะไนเตรทซึ่งมีการสะสมเพิ่มขึ้นในช่วงแรก แสดงให้เห็นถึงการมีกิจกรรมของแบคทีเรียในการบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ ในขณะที่ระบบตัวกรองทางชีวภาพในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน สามารถควบคุมปริมาณไนเตรตของระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดให้ลดลงได้ โดยพบว่าในระบบหมุนเวียนน้ำนี้มีปริมาณไนเตรทอยู่ในระดับต่ำกว่า 50มก./ล. ซึ่งเป็นระดับที่ไม่เป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำ และทำให้การเติบโตและการรอดของกุ้งกุลาดำเป็นปรกติ

Lin และคณะ (2003) ศึกษาการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในบ่อภายนอกโรงเรือนเป็นเวลา 80 วัน โดยใช้ระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดในการบำบัดน้ำเสียที่มาจากการเพาะเลี้ยง จากการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของการบำบัดแอมโมเนียทั้งหมด (Total ammonia nitrogen) และ ไนไตรต์ไนโตรเจน มีค่าประมาณ 57% และ 90% ตามลำดับ (อัตราการย่อยสลายของแอมโมเนียทั้งหมดมีค่า 0.036 $g/m^2/day$ และอัตราการย่อยสลายของไนไตรต์ไนโตรเจนมีค่า 0.014 $g/m^2/day$) ทั้งนี้เนื่องจากอัตราการโหลดน้ำเสียเข้าสู่ระบบต่ำ ทำให้มีอัตราการย่อยสลายของแอมโมเนียทั้งหมดต่ำ อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดในระบบหมุนเวียนน้ำนี้อยู่ที่ 0.28 ± 0.18 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งสามารถเจริญเติบโตได้ดีในขณะที่น้ำเสียเมื่อผ่านการบำบัดสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกโดยไม่เป็นอันตรายต่อกุ้ง

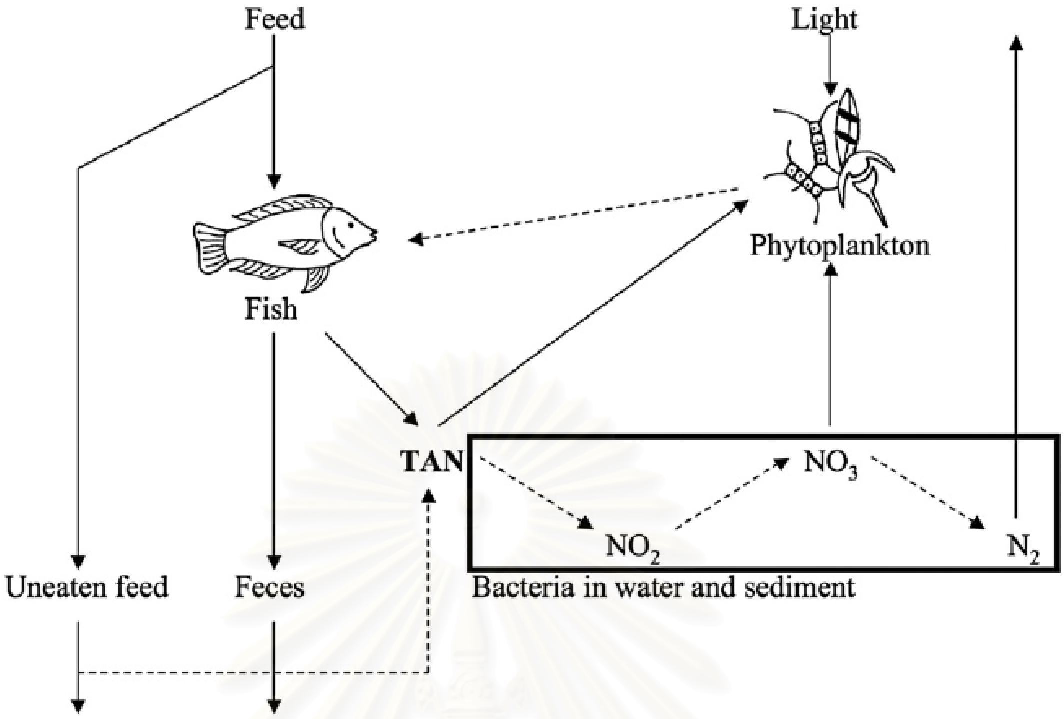
สรวิศ เผ่าทองศุข และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต (2550) ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนโดยใช้ระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด มีระบบการจัดการน้ำโดยการกรองทั้งทางด้านกายภาพและชีวภาพ ดังรูปที่ 2.1 ไนทริฟายอิงแบคทีเรียที่ใช้ในการบำบัดนี้ได้จากที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ เช่นในน้ำทะเล แล้วใช้วิธีการเพิ่มจำนวนบนตัวกลางในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ การเตรียมตัวกลางสำหรับการบำบัดทำได้โดย นำตัวกลาง (งานวิจัยนี้ใช้วัสดุใยกรองไบโอโพลีมา) มาใส่ในถังน้ำที่มีน้ำทะเล และเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและอาหารกุ้งประมาณ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อากาศภายในถังเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน จึงสามารถนำใยกรองที่มีไนทริฟายอิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ มาใช้ในระบบบำบัดแบบไนตริฟิเคชันของระบบหมุนเวียนน้ำได้ และจากการทดลองพบว่า แม้ว่าจะผ่านการนำน้ำมาหมุนเวียนในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลามากกว่า 1 ปี โดยเป็นการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นสูง (350 ตัวต่อตารางเมตร) ก็ตาม ก็ยังสามารถควบคุมปริมาณแอมโมเนียและไนไตรต์ ให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งได้เป็นอย่างดี

2.3 วัฏจักรไนโตรเจนและแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง

2.3.1 วัฏจักรไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ

จุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้ง มีความสัมพันธ์และสำคัญในทุกรูปแบบและขั้นตอนของการเลี้ยง โดยเฉพาะในเรื่องของการควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง หากการเลี้ยงแบบธรรมชาติเดิม จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำและพื้นบ่อ ก็จะมีหน้าที่ในการย่อยสลายขี้ของกุ้งและอินทรีย์สารอื่น ๆ แต่ถ้าหากมีการเลี้ยงแบบพัฒนา กล่าวคือ เลี้ยงแบบหนาแน่น และให้อาหารกุ้งกินเต็มที่ ดังนั้นในบางสภาวะที่อากาศแปรปรวน หรือกุ้งอยู่ในสภาวะเครียดจากสาเหตุใดก็ตาม อาหารที่กุ้งกินไม่หมดก็จะเกิดการเน่าเสียจากจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด มีการแย่งใช้ออกซิเจนทำให้ออกซิเจนลดลง ปัญหาที่ตามมา คือ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จุลินทรีย์ปล่อยออกมาเป็นพวกก๊าซพิษ ได้แก่ ก๊าซแอมโมเนีย ก๊าซไข่เน่า (ไฮโดรเจนซัลไฟด์), ก๊าซมีเธน และก๊าซอื่น ๆ อีก จากการย่อยสลายสิ่งปฏิกูลมูลสัตว์ (เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2546) หากเกิดสภาวะนี้กับน้ำในบ่อเลี้ยงจะส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อกุ้ง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในระยะที่มีการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา ผลิตภัณฑ์ที่ตามมาและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ จุลินทรีย์ที่ใช้ควบคุมคุณภาพน้ำ

วัฏจักรไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (รูป 2.2) เกิดขึ้น โดยไนโตรเจนที่เข้าสู่ระบบจะอยู่ในรูปของอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำ ส่วนที่สัตว์น้ำกินไม่หมดจะยังคงตกค้างอยู่ในระบบ ส่วนที่ถูกกินจะเปลี่ยนไปเป็นมวลของสัตว์น้ำ และบางส่วนจะถูกขับออกมาในรูปของแอมโมเนีย อาหารส่วนที่เหลือนี้กลายเป็นสารอินทรีย์ที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ และทำให้ระดับของแอมโมเนีย-ไนโตรเจนทั้งหมด (Total Ammonia Nitrogen: TAN) และไนไตรต์เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เป็นพิษต่อสัตว์น้ำแม้ว่าจะมีปริมาณต่ำก็ตาม ในระบบ TAN อาจเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ ไนเตรต และก๊าซไนโตรเจนได้ โดยแบคทีเรียในน้ำและตะกอนผ่านกระบวนการไนตริฟิเคชั่นและดีไนตริฟิเคชั่น อีกห่วงโซ่หนึ่งในระบบคือ สาหร่ายในน้ำสามารถใช้ทั้ง TAN และไนไตรต์ เพื่อการเจริญและสัตว์น้ำก็จะกินสาหร่ายอีกทอดหนึ่ง อย่างไรก็ตามห่วงโซ่นี้เกิดขึ้นได้น้อยกว่ากระบวนการไนตริฟิเคชั่นและดีไนตริฟิเคชั่น ดังนั้นการเกิดการสะสมของ TAN ในระบบ สืบเนื่องมาจากกระบวนการไนตริฟิเคชั่นเกิดขึ้นได้ไม่ดี (Crab และคณะ, 2007)

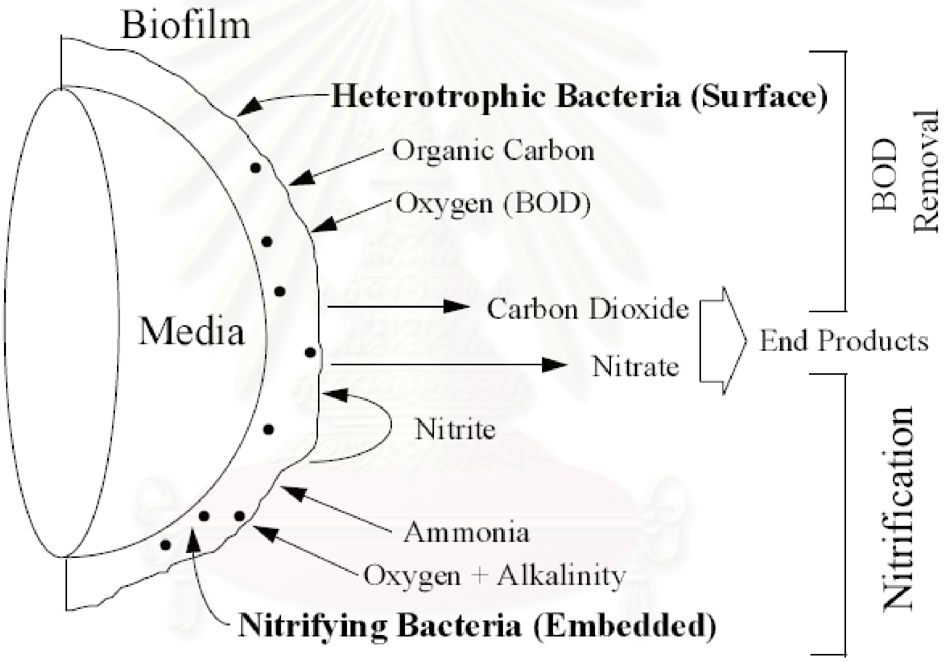


รูปที่ 2.2 วัฏจักรไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (Crab และคณะ, 2007)

2.3.2 การกำจัดสารประกอบไนโตรเจนโดยใช้ตัวกรองชีวภาพ (biofilter)

การบำบัดไนโตรเจนในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยใช้ตัวกรองชีวภาพที่มีแบคทีเรียเกาะในระบบไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน เป็นวิธีที่ดีที่สุดที่สามารถกำจัดไนโตรเจนออกจากระบบได้ทั้งหมด วิธีนี้มีข้อดีกว่าการใช้พืชและสาหร่ายที่จะต้องคอยกำจัดเศษสาหร่ายและซากพืชทิ้ง ทั้งยังมีประสิทธิภาพสูง ใช้พลังงานน้อย และปลอดภัยต่อสัตว์น้ำ มากกว่าระบบบำบัดแบบเคมีและกายภาพ (เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2543) หลักการของระบบตัวกรองชีวภาพคือมีแบคทีเรียยึดเกาะอยู่บนตัวกลางวัสดุที่เป็นของแข็ง การยึดเกาะของกลุ่มประชากรแบคทีเรียนี้เรียกว่าการตรึง (Immobilization) แบคทีเรียเหล่านี้จะทำการย่อยสลายสารที่อยู่ในน้ำ เช่น nitrifying biofilter เป็นตัวกรองชีวภาพที่มีแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงตรึงอยู่บนตัวกลาง ในการบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ในน้ำเสีย แบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงสามารถสร้างสารที่มีลักษณะเป็นเมือกออกมาเพื่อยึดเกาะกับพื้นผิวของตัวกลาง เกิดเป็นชั้นของแบคทีเรีย เรียกว่า ไบโอฟิล์ม (biofilm) (Hagopain และ Riley, 1998) โดยทั่วไปในธรรมชาติสามารถเกิดไบโอฟิล์มได้โดยเป็นการรวมกลุ่มกันของแบคทีเรียหลากหลายชนิด เริ่มจากแบคทีเรียเซลล์แรกยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุ จากนั้นเพิ่มจำนวนเป็นโคโลนี โคโลนีแต่ละโคโลนีที่อยู่ใกล้ ๆ กันนั้น อาจเป็นแบคทีเรียต่างชนิดกัน การอยู่รวมกันของแบคทีเรียนี้จะเพิ่มเป็นชั้นหนาขึ้นเรื่อย ๆ และมีการสร้างสารที่เป็นสารประกอบโพลีเมอร์ขึ้นเพื่อปกป้องเซลล์ที่อยู่ภายในจากสิ่งแวดล้อมภายนอก และยังพบว่ามีการ

ติดต่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียทั้งในไบโอฟิล์มและภายนอกโดยใช้ signaling molecules แบคทีเรียแต่ละชนิดในไบโอฟิล์มจะอยู่แบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยแบคทีเรียชนิดหนึ่งจะสร้างสารออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งสารที่ปล่อยออกมาแบคทีเรียชนิดอื่นสามารถนำไปใช้ได้ เช่น การอยู่รวมกันของแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงกับแบคทีเรียกลุ่ม heterotrophic ดังรูปที่ 2.3 โดยแอมโมเนียและไนไตรต์ จะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงซึ่งโตช้ากว่าอยู่ด้านในของไบโอฟิล์ม ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม heterotrophic ที่อยู่ด้านนอกจะย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย (Golz, 1999) อย่างไรก็ตามการที่มีแบคทีเรียกลุ่ม heterotrophic มากเกินไปจะทำให้การบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์เกิดได้ไม่ดี ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงส่งผลต่อแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟิเคชัน



รูปที่ 2.3 กิจกรรมของแบคทีเรียในไบโอฟิล์มจากตัวกลางในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไนตริฟิเคชันโดยทั่วไป (Golz, 1999)

ชนิดของตัวกรองชีวภาพโดยทั่วไปคือ gravel, แผ่นจานหมุนชีวภาพ (rotating biological contactor), bead filters, ระบบโปรยกรอง (trickle filters) และ fluidized bed filters โดยที่ตัวกรองชีวภาพแต่ละชนิด มีอัตราการย่อยสลายแอมโมเนียไนโตรเจนแตกต่างกันออกไป ดังตารางที่ 2.3 ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและความจำเป็นในการใช้งาน จากตารางนี้จะพบว่าตัวกรองชีวภาพชนิด bead filters มีชื่อทางการค้าว่า Nor-Pac ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว ทำจากพลาสติก Polypropylene ลักษณะดังรูปที่ 2.4 มีอัตราการบำบัดสูงสุดใกล้เคียงกับอัตราการบำบัดสูงสุดของตัวกรองชีวภาพชนิด trickling filters เนื่องจาก bead filters มีขนาดเล็กแต่มีพื้นที่ผิวมาก

(ขึ้นกับชนิดและเส้นผ่านศูนย์กลาง) แต่ bead filters มีราคาถูกกว่าถึงครึ่งหนึ่ง ดังนั้นตัวกรองชีวภาพชนิดนี้จึงมีความน่าสนใจในการศึกษา และนำไปใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำซึ่งมีพื้นที่ในการใช้งานน้อย

รูปที่ 2.4 ตัวกรองชีวภาพชนิด bead filters ชื่อทางการค้าคือ Nor-Pac

(ที่มา: http://www.jaegerenvironmental.com/nor-pac.htm)

ตารางที่ 2.3 อัตราการบำบัด TAN จากระบบบำบัดน้ำเสียของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยใช้ตัวกรองชีวภาพชนิดต่าง ๆ (Crab และคณะ, 2007)

ชนิดของตัวกรองชีวภาพ	อัตราการบำบัด TAN โดยเฉลี่ย (กรัม TAN/ m^2 day)	ราคา (Euro/kg yr)
Rotating biological contactor	0.19-0.79	1.143
Trickling filter	0.24-0.64	1.036
Bead filter	0.30-0.60	0.503
Fluidized sand biofilter	0.24	0.198

ระบบตัวกรองชีวภาพมีหลายประเภท ซึ่งแบ่งออกได้ดังนี้

1. ระบบจานหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactor, RBC) โดยทั่วไปจานจะทำจากแผ่นพีวีซีหรือพลาสติกที่จมอยู่ใต้น้ำประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ระบบจานหมุนชีวภาพจะทำการบำบัดน้ำเสียที่สูบออกจากบ่อเลี้ยงโดยการหมุนรอบตัวเองด้วยความเร็วต่ำประมาณ 2–5 rpm ซึ่งทำให้ไนทริฟายอิงแบคทีเรียได้สัมผัสกับน้ำเสีย ที่มีแอมโมเนียและอากาศสลับกันไปอย่างต่อเนื่อง ทำให้กระบวนการไนตริฟิเคชั่นเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ระบบจานหมุนชีวภาพยังสามารถ

ลดปัญหาการอุดตันได้เป็นอย่างดีอีกด้วย การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าอัตราการย่อยสลายไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียอยู่ระหว่าง 0.19–0.79 g TAN/m^2/day (Crab และคณะ, 2007)

2. ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบโปรยกรอง (Trickling Filter) ถังระบบนี้สามารถบำบัดและหมุนเวียนน้ำโดยกระบวนการไนตริฟิเคชั่นได้เช่นกัน ในระบบนี้ไนทริฟายอิงแบคทีเรียจะเจริญเติบโตอยู่บนตัวกลางที่ไม่เคลื่อนที่ซึ่งโดยมากทำมาจากหินหรือพลาสติกที่มีน้ำหนักเบา และมีพื้นที่ผิวสำหรับให้แบคทีเรียยึดเกาะภายในอยู่ประมาณ 100–1,000 m^2/m^3 น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงที่มีแอมโมเนียจะถูกปล่อยให้ไหลลงมาจากด้านบนของระบบ ผ่านวัสดุตัวกลางที่มีไนทริฟายอิงแบคทีเรียเกาะยึดอยู่บนพื้นผิวเพื่อให้สัมผัสกับอากาศ ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนเตรท ข้อด้อยของระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบโปรยกรองคือการอุดตันภายในช่องว่างระหว่างตัวกลางจากของแข็งในน้ำเสียและจากฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) ซึ่งแบคทีเรียขับออกมาระหว่างการเจริญเติบโต จากการค้นคว้าพบว่าอัตราการย่อยสลายแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภทนี้อยู่ที่ 0.24–0.64 g TAN/m^2/day (Crab และคณะ, 2007)

3. ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิดไดซ์เบด (Fluidized Bed Bioreactor) หลักการทำงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบนี้ มีความคล้ายคลึงกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบโปรยกรอง กล่าวคือไนทริฟายอิงแบคทีเรียจะเกาะยึดอยู่บนพื้นผิวของตัวกลางที่มีขนาดเล็ก เช่น เม็ดทราย หรือ Polystyrene bead ขนาดประมาณ 1–3 mm ซึ่งทำให้มีพื้นที่ผิวสำหรับให้แบคทีเรียเจริญเติบโตสูงมากถึง 4,000–20,000 m^2/m^3 ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิดไดซ์เบดจะต้องมีการสูบน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงเข้าสู่ด้านใต้ของถังปฏิกรณ์ เพื่อทำให้เกิดการยกตัวและเคลื่อนที่ของตัวกลางแบบไหลวน ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภทนี้มีจุดเด่นคือสามารถบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงในปริมาณมากได้ดี และสามารถบรรเทาปัญหาเกี่ยวกับการอุดตัน ซึ่งพบมากในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการใช้ตัวกลางแบบไม่เคลื่อนที่ เช่น Trickling Filter อย่างไรก็ตามในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิดไดซ์เบด จะต้องทำการติดตั้งระบบเติมอากาศที่มีประสิทธิภาพเพื่อรองรับกระบวนการไนตริฟิเคชั่น การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าอัตราการย่อยสลายไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียอยู่ที่ 0.24–0.55 g TAN/m^2/day (กษิดิศ หนูทอง, 2551)

4. ระบบตัวกรองชีวภาพแบบ Microbead Filter ตัวกรองแบบนี้ได้ถูกนำเสนอ เพื่อใช้บำบัดและหมุนเวียนน้ำในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบปิด Microbead Filter มีลักษณะการทำงานเหมือนกับ Bead Filter ทั่วไปคือเพิ่มพื้นที่ให้แบคทีเรียยึดเกาะ แต่ต่างกันที่ขนาดของตัวกรอง ระบบนี้มีความคล้ายคลึงกับระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบโปรยกรอง แต่ขนาดของตัวกลางสำหรับให้ไนทริฟายอิงแบคทีเรียยึดเกาะจะมีขนาดเล็กกว่า คืออยู่ที่ประมาณ 1–3 mm ซึ่งทำให้มี

พื้นที่ผิวประมาณ 1,260–3,780 m^2/m^3 ระบบ Microbead Filter มีข้อดี คือสามารถบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงในปริมาณมากได้ดี และสามารถแยกตะกอนของแข็งเพื่อป้องกันการอุดตันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าอัตราการย่อยสลายไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียอยู่ที่ 0.3–0.6 g TAN/m^2/day (กษิดิศ หนูทอง, 2551)

ในงานวิจัยนี้ใช้ตัวกลางที่มีชื่อทางการค้า คือ BCN-009 ทำจากพลาสติก Polyethylene ดังรูปที่ 2.5 มีพื้นที่ผิวประมาณ 864 m^2/m^3 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งกับระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบโปรยกรอง ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิดไดซ์เบด รวมถึงระบบตัวกรองชีวภาพแบบ Bead Filter ได้เช่นกัน ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการใช้งานในแต่ละพื้นที่

รูปที่ 2.5 ตัวกรองชีวภาพชนิด Bead Filter ชื่อทางการค้าคือ BCN-009
(ที่มา: http://www.piscesengineering.co.uk/filter_media.htm)

ตัวอย่างการนำระบบตัวกรองชีวภาพมาใช้บำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ Tookwinas และ Sangrungruang (1998) ทำการบำบัดน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาที่จังหวัดจันทบุรี โดยใช้ระบบตัวกรองชีวภาพที่มีแบคทีเรียยึดเกาะอยู่ พบว่าสามารถลดแอมโมเนียลงได้ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตภายในระยะเวลา 7 ชั่วโมง ในปีเดียวกันนี้ นภาพร กิตติมศักดิ์ (2541) ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างตัวกรองชีวภาพแบบไบโอดรัม และ แบบใต้น้ำ ซึ่งใช้ในระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และ ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เป็นเวลา 3 เดือน ในการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่าระบบตัวกรองชีวภาพทั้งสองแบบ สามารถควบคุมคุณภาพน้ำคือ แอมโมเนียรวม, ไนไตรต์ และไนเตรต ให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ แต่เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้มวลชีวภาพของกุ้งกุลาดำมีปริมาณน้อยมาก จึงไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดที่มีตัวกรองชีวภาพต่างกันได้ ส่วนการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาว พบว่าระบบตัวกรองชีวภาพทั้งสองแบบสามารถควบคุมคุณภาพน้ำ คือ แอมโมเนียรวม, ไนไตรท์ และไนเตรท ให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ อย่างไรก็ตามพบว่าในการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาว

ปริมาณแอมโมเนียรวม และไนไตรท์ในชุดการทดลองที่มีตัวกรองชีวภาพแบบใต้น้ำ จะมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่มีตัวกรองชีวภาพแบบไบโอดรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.3.2 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพ

ในการพัฒนาให้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ความชัดเจนของประชาคมจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียมีความสำคัญมาก และจำเป็นต้องอาศัยความรู้ทางด้านจุลชีววิทยามาช่วยสนับสนุนให้เข้าใจระบบลึกซึ้ง แต่ในปัจจุบันยังขาดแคลนข้อมูลและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจำนวนหรือชนิดของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดหรือในตัวกรองชีวภาพ ซึ่งทำให้การคำนวณระบบบำบัดโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์จำเป็นต้องใช้แบบจำลองที่เรียกว่า กล่องดำ (black-box model) ซึ่งก็คือระบบจำลองที่มีเฉพาะ input และ output เนื่องจากยังไม่เข้าใจถึงปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการบำบัดได้อย่างสมบูรณ์ (Yoshie และคณะ, 2001) ความรู้ทางด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์ในธรรมชาติยังมีอยู่น้อยมาก เนื่องจากการใช้วิธีตรวจสอบแบบดั้งเดิม เช่น การใช้กล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก โดยทั่วไปการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย นิยมใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์แล้ว วิเคราะห์ชนิดโดยการส่องตรวจรูปร่างลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย และวิธีการทดสอบทางชีวเคมี เช่น Leonard และคณะ (2000) ใช้วิธีการทดสอบทางชีวเคมี ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดสำหรับเลี้ยงปลาทะเล จำแนกได้แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas, Oceanospirillum, Marinobacter, Paracoccus, Erythrobacter, Aeromonas* และ *Vibrio* แต่จะไม่พบ *Vibrio* ในตัวกรองชีวภาพ และไม่พบแบคทีเรียในกลุ่มไนทริฟายอิง ซึ่งอาจเกิดจากวิธีการวิเคราะห์ที่ไม่เหมาะสม เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ไม่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในกลุ่มไนทริฟายอิง ทำให้ไม่สามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้

2.4 การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง

แบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงสามารถพบได้ทั้งในดิน น้ำจืด และน้ำเค็ม แบคทีเรียเหล่านี้ใช้ออกซิเจนในการหายใจ ใช้สารอนินทรีย์คาร์บอน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ หรือไบคาร์บอเนต เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารประกอบไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงาน เจริญช้า และไวต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเค็มและค่าอัลคาลินิตีของน้ำ (Crab และคณะ, 2007) การศึกษาการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนของตัวกรองชีวภาพในระบบบำบัดน้ำเสียมักศึกษากลุ่มประชากรของไนทริฟายอิงแบคทีเรีย ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ α และ β-subdivisions ของ Proteobacteria เช่น *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp.,

และ *Nitrospira* sp. ไนทริฟายอิงแบคทีเรียแบ่งการทำงานเป็น 2 กลุ่มคือ แบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย และแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์

1. แบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย (Ammonium oxidizing bacteria (AOB)) มีหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรต์ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus* และ *Nitrosolobus* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ได้ด้วยเอนไซม์ ammonia monooxygenase (AMO) ซึ่งจะเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็น NH_2OH และเอนไซม์ hydroxylamine oxidoreductase (HAO) ใช้เปลี่ยน NH_2OH ไปเป็นไนไตรต์ ปริมาณและสกุลของแบคทีเรียที่พบเป็นชนิดเด่นในแต่ละแหล่ง ขึ้นกับลักษณะของน้ำเสียในระบบบำบัด (Antony และ Philip, 2006)

2. แบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ (Nitrite oxidizing bacteria (NOB)) ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรต แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Nitrobacter* และ *Nitrospira* ซึ่งสามารถออกซิไดซ์ไนไตรต์ไปเป็นไนเตรตโดยใช้เอนไซม์ nitrite oxidoreductase (Drahos, 2006)

2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อไนทริฟายอิงแบคทีเรีย

2.4.1.1 ออกซิเจน

แบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย เมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำ สามารถใช้ไนไตรต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เกิดเป็น N_2O หรือ NO เช่น *Nitrosomonas eutropha* และ *Nitrosomonas europaea* สามารถทำให้เกิดได้ทั้งปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด ส่วนการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ โดยอาศัยเอนไซม์ nitrite oxidoreductase เปลี่ยนไนไตรต์ให้เป็นไนเตรต หากอยู่ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนจะทำให้เกิดกระบวนการย้อนกลับโดยรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ได้ (Schmidt และคณะ, 2003)

2.4.1.2 ความเค็มของน้ำ

ความเค็มของน้ำมีผลอย่างมากต่อการทำงานของไนทริฟายอิงแบคทีเรีย Sakairi และคณะ (1996) พบว่าในการบำบัดไนโตรเจนจากน้ำทะเลโดยไนทริฟายอิงแบคทีเรีย ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันในน้ำทะเลจะเกิดขึ้นได้น้อยกว่าในน้ำจืดถึง 6 เท่า

2.4.1.3 การถูกยับยั้งการทำงาน

ไนทริฟายอิงแบคทีเรียจะถูกยับยั้งการทำงานได้โดยแสงสว่าง (Hagopain และ Riley, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่า Hydroxylamine แอมโมเนีย และ NO จะยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ (Schmidt และคณะ, 2003)

2.4.1.4 ความสัมพันธ์กับแบคทีเรียอื่น ๆ

Bianchi และคณะ (1992) กล่าวว่า แบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงสามารถปล่อยสารประกอบอินทรีย์ได้ในระหว่างการเจริญ และสารประกอบอินทรีย์ที่ปล่อยมานี้แบคทีเรียกลุ่ม heterotroph สามารถใช้ในการเจริญได้ ในขณะเดียวกันการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถเพิ่มกิจกรรมของแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง เช่น *Nitrosomonas* หรือลดระยะ lag phase ของแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงนั่นเอง

Nogueira และคณะ (2002) กล่าวว่ามีการแข่งขันกันระหว่างแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายอิงกับแบคทีเรียกลุ่ม heterotroph ในไบโอฟิล์ม ซึ่งในกรณีที่ในน้ำมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญช้าและเจริญอยู่บริเวณด้านล่างของไบโอฟิล์ม ทำให้แบคทีเรียกลุ่ม heterotroph ที่อยู่ด้านบนของไบโอฟิล์มใช้ออกซิเจนได้มากกว่า

2.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง

Carlucci และ Strickland (1968) ศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจากน้ำทะเลโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง สำหรับแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนียและแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้ง 2 กลุ่ม โดยพบแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย 8 ชนิด และแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ 2 ชนิด

ต่อมาในปี 1998 Mizoguchi และคณะ สามารถคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย *Nitrosomonas* sp. TN0632 จากตัวอย่างน้ำทะเล 80 ตัวอย่างได้ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SW medium ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 3.O กรัมต่อลิตร และ MOPS 10.0 กรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบ และในปีเดียวกันนี้ Sorokin และคณะ ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์จากดินตะกอนบริเวณทะเลสาบ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี $NaNO_2$ เป็นแหล่งพลังงาน และได้มีการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล มาใช้ในการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วย ซึ่งจากการทดลองสามารถคัดแยก *Nitrobacter alkalicus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ได้สำเร็จ

อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันมีความพยายามในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มใหม่ ๆ และกลุ่มที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ และเนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มไนทริฟายอิงแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่โตช้า เมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ทั่วไป รวมทั้งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Tal และคณะ2003) เช่น จากการศึกษาของ Spieck และคณะ ในปี 2003 ได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในกลุ่มไนทริฟายอิงแบคทีเรีย uncultured *Nitrospira*-like bacterium ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ มีบทบาทในการย่อยสลายไนไตรต์ไปเป็นไนเตรต แยกได้จากตะกอนเร่งในระบบบำบัดน้ำเสียจากบ้านเรือน โดยใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mineral medium ที่เติม 3 mM $NaNO_2$ เป็นแหล่งพลังงาน เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6-8 สัปดาห์ จากนั้นถ่ายเชื้อใส่อาหารเหลวที่เติมแอมพิซิลิน เพื่อกำจัดแบคทีเรียกลุ่ม heterotroph เลี้ยงเชื้อต่อเป็นระยะเวลาอีกประมาณ 6-9 เดือน จากนั้นจึงนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ไม่เติมแอมพิซิลินอีกประมาณ 2-3 เดือน เพื่อคัดแยก *Nitrospira*-like bacterium ออกจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นโดยวิธี Percoll density gradient centrifugation จากการทดลองพบว่าต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่น้อยกว่า 1 ปี จึงคัดแยกได้ *Nitrospira*-like bacterium ชนิดใหม่คือ *Candidatus* Nitrospira defluvii จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้หลายชนิด มีบทบาทในการบำบัดน้ำเสียที่มีสารประกอบไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ จากงานวิจัยที่ผ่านมาสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้ได้ เช่น การดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Carlucci และ Strickland (1968) มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อจากใยกรองของระบบบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลียงสัตว์น้ำ หรือการนำดีเอนเอแม่แบบชนิด CTO189f และ CTO654r มาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาการมีอยู่และกิจกรรมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ตลอดจนการเพาะเลี้ยงและการลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มนี้ต่อไป

2.4.3 การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

การพัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ทำให้สามารถศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้ถึงระดับยีน (gene) ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นผลมาจากวิวัฒนาการ หลักการของการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในธรรมชาติคือการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสในอาร์เอนเอ หรือดีเอนเอ และจัดแบ่งความหลากหลายของประชากรออกมาเป็นกลุ่มตามความแตกต่าง หรืออาจเรียกว่าเทคนิคการทำลายพิมพ์ดีเอนเอ (DNA fingerprint) สามารถใช้เปรียบเทียบองค์ประกอบประชาคมแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ รวมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนของแบคทีเรียได้อีกด้วย ซึ่งเทคนิคทางโมเลกุลนี้ทำให้งานวิจัยใหม่ ๆ ค้นพบแบคทีเรียได้เพิ่มขึ้นหลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้หลากหลายกลุ่ม ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาในการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ ตัวอย่างการทดลองเช่น Itoi และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาประชาคมแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำ ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำ โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการสกัดดีเอนเอ และเพิ่มจำนวนดีเอนเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แล้ววิเคราะห์ลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างดีเอนเอ ผลการทดลองพบว่าพบแบคทีเรียในกลุ่มของ *Nitrosomonas* ซึ่งเป็นกลุ่มของไนทริฟายอิงแบคทีเรียหลายชนิดจากไบโอฟิล์มของตัวกรองชีวภาพ และยังพบแบคทีเรียในกลุ่มอื่น ๆ รวมทั้งแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้อีกด้วย

ไพรเมอร์ (primer) คือ ดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวเส้นสั้น ๆ จำนวนตั้งแต่ 10-20 เบสต่อกัน ใช้เป็นตัวเริ่มต้นในการสร้างสายดีเอ็นในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในการศึกษาแบคทีเรียโดยทั่วไปนิยมการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ของแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบและระบุความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียด้วยวิธี DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ซึ่งเทคนิค DGGE นี้เป็นเทคนิคที่ใช้แยกดีเอ็นเอสายคู่ซึ่งมีความยาวเท่ากันแต่มีลำดับเบสต่างกันโดยใช้เกรเดียนท์ (gradient) ของความเข้มข้นของสารเคมี เช่น ยูเรียและฟอร์มาไมด์ เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ ความแตกต่างของลำดับเบสส่งผลให้การสลายพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน ในขณะที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่อยู่ภายในเจล ทำให้แยกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่ลำดับเบสต่างกันออกจากกันได้ โดยเมื่อดีเอ็นเอสายคู่ถูกทำลายพันธะไปบางส่วนจะหยุดการเคลื่อนที่เนื่องจาก GC clamp ซึ่งเป็นส่วนที่มีเบส GC อยู่มาก เมื่อสายดีเอ็นเอหยุดเคลื่อนที่จึงเห็นเป็นแถบดีเอ็นเออยู่ภายในเจล โดยความหลากหลายของจุลินทรีย์สามารถสังเกตได้จากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (Myer และคณะ, 1985) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคนี้ร่วมกับการใช้ดีเอนเอแม่แบบที่เหมาะสม มาตรวจสอบแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้นี้เป็นแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจริง ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในตัวอย่างใยกรองจากระบบจริง และจากไบโอฟิล์มจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4.4 แบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (Uncultured bacteria) ในระบบบำบัดน้ำเสีย

ในการศึกษาถึงแบคทีเรียในธรรมชาติที่ผ่านมาประมาณได้ว่า ยังมีแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีการศึกษาและไม่สามารถเลี้ยงเชื้อโดยวิธีปกติได้มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ (Hugenholtz และคณะ, 1998) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้อาจมีความสำคัญต่อการย่อยสลายสารพิษในน้ำได้ จากงานวิจัยของ สุธาสินี อ่วมจันทร์ (2546) ใช้วิธีการศึกษากลุ่มประชากรแบคทีเรียโดยวิธี DGGE พบแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (uncultured) และไม่สามารถจำแนกได้ (unidentified) ในน้ำทะเลเริ่มต้นก่อนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชั่น และยังสามารถพบได้จากไบโอบอล (bioball) ซึ่งเป็นตัวกลางให้แบคทีเรียยึดจับในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชั่น แสดงว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ที่พบตลอดการทดลองนี้ น่าจะมีบทบาทในปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่น คืออาจมีความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนียและไนไตรต์ในน้ำเสียได้

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้นำเทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ในการศึกษา เพิ่มเติมจากวิธีการเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไป จากตารางที่ 2.4 การศึกษาแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่ามีการค้นพบแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่อง จากตารางที่ 2.4 การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงนิยมใช้ดีเอนเอแม่แบบที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่มนี้ เนื่องจาก

ในอดีตการใช้ดีเอนเอแม่แบบชนิด 16s rDNA จะทำให้ได้แถบโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียชนิดอื่นบนมาด้วย และแถบโครงสร้างของแบคทีเรียบางชนิดมีขนาดใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงกับแบคทีเรียอื่น ๆ ด้วยวิธี PCR-DGGE ได้ (Nicolaisen และ Ramsing, 2002) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาดีเอนเอแม่แบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรียกลุ่มนี้มากขึ้น เพื่อความสะดวกในการศึกษา และจากการพัฒนาดีเอนเอแม่แบบนี้ ทำให้สามารถค้นพบแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงได้มีการนำดีเอนเอแม่แบบที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง มาใช้ในการศึกษานอกจากจะเป็นการยืนยันถึงแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงแล้ว และยังสามารถบอกได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่พบนั้น มีบทบาทในการย่อยสลายแอมโมเนียในน้ำเสียได้จริง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษากลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในในระบบบำบัดน้ำเสีย

แบคทีเรียที่พบ	**แหล่งที่มา**	**วิธีการที่ใช้ในการศึกษา**	**ไพรเมอร์**/probe	**เป้าหมาย**	**สารที่ย่อยสลาย**	**อ้างอิง**
Uncultured Nitrospira-like bacterium	Activated sludge จากระบบบำบัดน้ำเสียจากบ้านเรือน	พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ และ FISH	S-G-Ntspa-0662-a-A-18 S-*-Ntspa-0712-a-A-21 targeting the S-G-Nbac-1035-a-A-18 EUB probe mix	genus *Nitrospira* phylum *Nitrospira* genus *Nitrobacter* most known *Bacteria*	ไนไตรต์	Spieck และคณะ (2006)
Nitrospira-like bacterium	Gravel จากระบบบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	DGGE pattern Hybridization probe	358f และ 519r S-G-Ntspa-0685-a-A-22 S-*-Ntspa-0454-a-A-19	Eubacteria *N. moscoviensis*, *N. marina*, และ 710-9 clone *N. moscoviensis* 710-9 clone	ไนไตรต์	Hovanec และคณะ (1998)

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษากลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในในระบบบำบัดน้ำเสีย (ต่อ)

แบคทีเรียที่พบ	**แหล่งที่มา**	**วิธีการที่ใช้ในการศึกษา**	**ดีเอนเอแม่แบบ**/probe	**เป้าหมาย**	**สารที่ย่อยสลาย**	**อ้างอิง**
Uncultured b-proteobacteria Uncultured bacterial clone P2D7 Uncultured bacterial clone SL24 Uncultured sludge bacterium A4b	Activated sludge จากระบบบำบัดน้ำเสียจากบ้านเรือน	DGGE pattern	P2 และ P3	V3 region ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย	แอมโมเนีย	Tanaka และคณะ (2003)
Uncultured *Nitrosomonas* sp. clone 61-1 Uncultured *Nitrosomonas* sp. clone 88-1 Uncultured *Nitrosomonas* sp. clone 88-2	Membrane-aerated biofilm reactor	DGGE pattern	CTO189fAB, CTO189fC และ CTO654r	β-subdivision ของ AOB	แอมโมเนีย	Gong และคณะ (2007)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษากลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในในระบบบำบัดน้ำเสีย (ต่อ)

แบคทีเรียที่พบ	**แหล่งที่มา**	**วิธีการที่ใช้ในการศึกษา**	**ดีเอนเอแม่แบบ/probe**	**เป้าหมาย**	**สารที่ย่อยสลาย**	**อ้างอิง**
Uncultured bacterium	polyethylene beads จาก moving bed bioreactors	DGGE pattern	1055f และ 1392r-GC	Universal bacterial 16S rRNA	แอมโมเนีย	Tal และคณะ (2003)
Nitrospira-like bacteria	Activated sludge จากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม	FISH	NIT3 S-*-Ntspa-1026-a-A-18	*Nitrobacter* species *N. moscoviensis*	ไนไตรต์	Juretschko และคณะ (1998)
Uncultured *Nitrosomonas* sp. Clone 26Ft	Wastewater treatment reactor	DGGE pattern	CTO189fAB, CTO189fC และ CTO654r	β-subdivision ของ AOB	แอมโมเนีย	Hallin และคณะ (2005)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 บริษัท Decan Ultrasonics, England
2. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
3. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น MIKRO20 บริษัท Hettich, Germany
6. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA และ รุ่น MJ Mini™ Personal Thermal Cycler บริษัท Biorad,USA
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
8. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA
10. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific supply, Japan
11. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70°ซ รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20°ซ รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
13. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
14. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
15. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan

17. ชุดเครื่องเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส mini Gel migration trough รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japan
18. หัวกรองสำเร็จรูป ขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร บริษัท Corning Incorporated, Germany

เคมีภัณฑ์

1. โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) บริษัท Merck, Germany
2. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) บริษัท Merck, Germany
3. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) บริษัท Fluka, Germany
4. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) บริษัท Merck, Germany
5. โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4.2H_2O$) บริษัท Sigma, USA
6. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
7. โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) บริษัท Fluka, Germany
8. โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) บริษัท Merck, Germany
9. โซเดียมซิเตรต ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
10. ซัลฟานิลาไมด์ (Sulphanilamide) บริษัท Sigma, USA
11. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, France
12. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck, Germany
13. โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
14. แคลเซียมไนเตรต ($Ca(NO_3)_2$) บริษัท Merck, Germany
15. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
16. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) บริษัท Merck, Germany
17. แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) บริษัท Merck, Germany
18. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
19. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
20. แบคโตอะการ์ (bacto agar) บริษัท Merck, USA.
21. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research organics, Inc., USA
22. โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ ($Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$) บริษัท Sigma, USA

23. N-(1-napthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NNED: $C_{12}H_{14}N_2.2HCl$) บริษัท Fluka, Germany
24. เมทธานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
25. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) บริษัท Merck, Germany
26. ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)) บริษัท USB, USA
27. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
28. อะซิโตน (acetone) บริษัท Merck, Germany
29. Triton X-100 บริษัท Sigma, USA
30. อะกาโรสเจล (Agarose gel) บริษัท IUAI, Japan
31. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
32. ฟีนอล (Phenol) บริษัท Merck, Germany
33. สีบรอมฟีนอลบลู (Bromphenolblue) บริษัท Fluka, Germany
34. 100 base pair DNA ladder บริษัท New England Biolabs, USA
35. 1 kb DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK และ บริษัท Fermentas, USA
36. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) บริษัท Nacalal tesque, Japan
37. เรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI บริษัท Promega, USA
38. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) บริษัท Sigma, USA
39. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_22H_2O$) บริษัท Sigma, USA
40. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalal tesque, Japan
41. Ribonuclease A (RNase A) บริษัท Promega, USA
42. Proteinase K บริษัท US. Biological, USA
43. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC., Canada
44. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC., Canada
45. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalai tesque, Japan
46. *Taq* PCR mastermix บริษัท Qiagen, Germany
47. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit บริษัท Qiagen, Germany
48. ชุด PCR purification kit QIAquick PCR Purification Kit บริษัท Qiagen, Germany

49. ชุด PCR Cloning Kit pGEM-T Easy Vector System II บริษัท Promega, USA

50. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ RNeasy Mini Kit บริษัท Qiagen, Germany

51. ชุด RNAprotect Bacteria Reagent บริษัท Qiagen, Germany

52. ชุด One step RT-PCR Kit บริษัท Qiagen, Germany

53. ตัวกลางพลาสติกรุ่น BCN-009 บริษัท 2h-kunststoff, Germany

54. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE บริษัท Bio-RAD Laboratories Inc., USA

ฟอร์มาไมด์ (Formamide (Deionized))

สารละลาย 40% อะคริลาไมด์/บิส (40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1)

ยูเรีย (Urea)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate)

เทมเมด (TEMED (N,N,N′,N′-Tetra-methyl-ethylenediamine))

50xTAE

Dye solution

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide solution) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงแบคทีเรีย

3.1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำและใยกรองและการเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำและใยกรองจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบไนตริฟิเคชัน ของบ่อเลี้ยงกุ้งแบบหมุนเวียนน้ำ จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่ง สรวิศ เผ่าทองศุข และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต (2550) ได้ทำการทดลองเลี้ยงกุ้งในระบบหมุนเวียนน้ำแห่งนี้ และพบว่าสามารถบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ให้อยู่ในระดับต่ำและไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งได้ตลอดการเพาะเลี้ยง โดยตัวกรองที่เก็บได้นำไปตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อให้ตะกอนที่เกาะอยู่สามารถหลุดออกจากใยกรองได้ดีขึ้น ใส่ชิ้นของใยกรอง 20 กรัม ในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำทะเลปราศจากเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร น้ำทะเลที่ใช้มาจากน้ำทะเลที่เตรียมสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งจากจากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที และเขย่าด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 10 นาที

3.1.2 อาหารแข็งชนิดต่าง ๆ

อาหารแข็งสำหรับใช้เลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย และสำหรับแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ (ภาคผนวก ก) จาก Carlucci และ Strickland (1968) นำตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 3.1.1 มาเจือจางในหลอดทดลอง โดยปิเปตน้ำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองที่มีน้ำทะเลปราศจากเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เป็นระดับความเจือจางที่ 10 เท่า (10^{-1}) จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ความมีความเข้มข้นที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีน้ำทะเลปราศจากเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เป็นระดับความเจือจางที่ 100 เท่า (10^{-2}) ทำเช่นนี้จนได้ระดับความเจือจาง 100,000 เท่า (10^{-5}) ปิเปตตัวอย่างทุกความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้งสองชนิด เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.1.3 อาหารเหลวชนิดต่าง ๆ

อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง ดัดแปลงส่วนประกอบของอาหารเหลวดังตารางที่ 3.1 จากการทดลองของ Shan และ Obbard (2001) ได้เติมอาหารเลี้ยงกุ้งเพื่อเลียนแบบสภาวะจริงในบ่อบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง ที่จะมีเศษอาหารกุ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงละลายปนอยู่ในน้ำเสียด้วย นอกจากนี้อาหารกุ้งยังเป็นแหล่งเพิ่มแร่ธาตุและวิตามิน

ให้แก่แบคทีเรียได้ด้วย เตรียมอาหารแต่ละชนิดปริมาตร 90 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และใส่ตัวกลาง BCN 009 ขวดละ 20 ชิ้น เพื่อเพิ่มพื้นที่ยึดเกาะของแบคทีเรีย ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 3.1.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นนำตัวกลางมาเขย่าด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บตะกอนมาสกัดดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบื้องต้น

ชนิดของอาหาร	ส่วนประกอบที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว					
	อาหารกุ้ง (mg)	$NaHCO_3$ (mg)	$(NH_4)_2SO_4$ (mg)	K_2HPO_4 (mg)	Chelated[1] (ml)	น้ำทะเล[2] (ml)
1. ไม่ใส่อาหารกุ้ง	-	300	200	50	1	1,000
2. อาหารกุ้ง 200 ppm	200	300	200	50	1	1,000
3. $NaHCO_3$ 100 ppm	80	100	200	50	1	1,000
4. $NaHCO_3$ 500 ppm	80	500	200	50	1	1,000
5. $(NH_4)_2SO_4$ 50 ppm	80	300	50	50	1	1,000
6. $(NH_4)_2SO_4$ 100 ppm	80	300	100	50	1	1,000
7. $(NH_4)_2SO_4$ 200 ppm	80	300	200	50	1	1,000

หมายเหตุ: [1] ส่วนประกอบของ Chelated metals solution แสดงดังภาคผนวก ก

[2] น้ำทะเลที่ใช้มาจากน้ำทะเลสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้ง ความเค็มประมาณ 30 psu จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การเพาะเลี้ยงและตรวจสอบไนทริฟายอิงแบคทีเรียจากอาหารเหลวที่คัดเลือกได้

3.2.1 การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง

หลังจากทดสอบอาหารเหลวเบื้องต้นชนิดต่าง ๆ คัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการคัดแยกและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง โดยนำตัวอย่างจากข้อ 3.1.1 ปิเปตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากผลการทดลองข้อ 4.1.3 (ภาคผนวก ก) วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3 เติมแอมโมเนียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน เก็บตัวอย่างอาหารเหลวขวดละ 5 มิลลิลิตร เพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงของ

ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต ทุก 7 วัน เมื่อครบ 1 เดือน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกเดือน โดยถ่ายตัวกลาง BCN 009 ที่มีหัวเชื้อเกาะ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดใหม่ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรและความเข้มข้นของแอมโมเนียสุดท้ายเท่าเดิม ขั้นตอนนี้ใช้เวลาเพาะเลี้ยงหัวเชื้อทั้งหมด 3 เดือน

3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้

เมื่อเพาะเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงผ่านไปเป็นเวลา 3 เดือน ถ่ายตัวกลาง BCN 009 ที่มีหัวเชื้อแบคทีเรียเกาะอยู่ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวนขวดละ 20 ชิ้น เติมแอมโมเนียให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จาก stock แอมโมเนียความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน โดยเมื่อครบ 24 ชั่วโมง ถ่ายตัวกลาง BCN 009 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดใหม่ ที่มีปริมาณของอาหารและความเข้มข้นของแอมโมเนียสุดท้ายเท่าเดิม แล้วนำไปเขย่า เก็บส่วนที่เป็นของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต ทุกวัน หลังจาก 10 วัน แยกตัวกลางทั้งหมดมาเลี้ยงรวมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดใหม่ ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 วัน เพื่อปรับสภาวะของสิ่งแวดล้อมให้เหมือนกัน ก่อนนำหัวเชื้อบางส่วนไปจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล และนำหัวเชื้อบนตัวกลางอีกส่วนไปทดสอบประสิทธิภาพในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริง ส่วนตัวกลางที่เหลือเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต่อไป

3.2.3 การวิเคราะห์ตัวกลางที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

นำตัวกลาง BCN 009 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.2.1 และตัวกลางที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อ (ชุดควบคุม) มาตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียบนตัวกลางด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้และแบคทีเรียจากใยกรองด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

3.3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในไบโอฟิล์มที่เกาะอยู่กับตัวกลาง BCN 009 และไบโอฟิล์มจากใยกรองในระบบบำบัดน้ำเสียจากระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Tsai และ Olson (1991) โดยนำตะกอนจากใยกรองข้อ 3.1.1 และตะกอนจากตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากข้อ 3.1.3 และ 3.2.2 ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งจนเกือบหมด เทสารละลายตะกอนแบคทีเรียที่เหลือใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งจนหมด เติมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction buffer) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมเอนไซม์ Proteinase K 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม 20% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ ทุก 20 นาที เพื่อไม่ให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอน เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมาละลายที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทำการแช่เยือกเข็งและละลายซ้ำอีก 2 ครั้ง หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเก็บส่วนน้ำใสใส่หลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติม Phenol-chloroform-isoamyl alcohol เพื่อตกตะกอนโปรตีน ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ นาน 1-2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใส ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ ทำซ้ำอีกครั้ง หรือจนกว่าจะไม่มีตะกอนโปรตีน เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.8 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกกลับหลอดขึ้นลงอย่างช้าๆ และทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ระเหยเอธานอลออกจากดีเอ็นเอให้แห้ง โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ที่ผสมกับเอนไซม์ RNase A ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.2 การตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธี Gel Electrophoresis

เตรียมวุ้นความเข้มข้น 1% โดยชั่งผงวุ้นหนัก 1 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า นำไปหลอมด้วยไมโครเวฟประมาณ 2-3 นาที ทิ้งให้สารละลายเย็นลง จนเหลืออุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในถาดที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 60 นาที วางแผ่นวุ้นลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมแผ่นวุ้น ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร กับสีติดตาม (6X loading dye) 1 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) บนแผ่นพาราฟิล์ม หยอดลงในหลุมบนแผ่นวุ้น โดยหลุมแรกให้หยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb DNA marker) จากนั้นเปิดสวิตซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านแผ่นวุ้นและบัฟเฟอร์ TAE โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวเอต (UV) ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล (Gel Documentation system, Bio-RAD)

3.3.3 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.9% โดยชั่งอะกาโรสผงหนัก 0.9 กรัมละลายในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมด้วยไมโครเวฟประมาณ 2-3 นาที เทลงในถาดที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 60 นาที วางแผ่นอะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมแผ่นอะกาโรสเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมดกับสีติดตาม หยอดลงในหลุมบนแผ่นวุ้น และหยอด 1 kb DNA marker จากนั้นเปิดสวิตซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านแผ่นอะกาโรสเจล ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวเอต ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล จากนั้นตัดชิ้นอะกาโรสเจลเฉพาะส่วนที่มีดีเอ็นเอ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ

3.3.4 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.3.4.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 3.1.3 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} โดยหากอัตราส่วนที่ได้มีค่า

น้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง แต่ถ้าค่าสูงว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.3.4.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั่วไป

ใช้ไพรเมอร์ (primer) 338F+GC (5’-CGCCCGCCGCGCGCGGCG GGCGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3’) ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณปลาย 5’ และไพรเมอร์ (primer) 518R (5’-ATTACCGCGGCTGG-3’) (Muyzer และคณะ, 1993) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความยาวประมาณ 200 คู่เบส โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา เป็นดังนี้

สารละลาย *Tag* PCR Master Mix kit (Qiagen, Germany) 15 ไมโครลิตร น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 10 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ (primer) 338F+GC 2 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ (primer) 518R 2 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไพรเมอร์ของแต่ละชนิดเป็น 20 ไมโครโมล สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม 1 ไมโครลิตร รวมส่วนผสมทั้งหมดในหลอด PCR จะมีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

1. Initial denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ
    - 2.1 Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
    - 2.2 Annealing step อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (ลดอุณหภูมิลดลงทีละ 0.5 องศาเซลเซียส ในแต่ละรอบ)
    - 2.3 Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
3. Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
4. Annealing step อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
5. Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ
7. Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.4.3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย

ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้คือ CTO189f+GC (5'- CGCCGCGCGGCGGG CGGGGCGGGGGCGGAGAA AAGCAGGGGATCG-3') และ CTO654r (5'-CTAGCCTTGT AGTTTCAAACGC-3') (Kowalchuk และคณะ, 1997) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA Proteobacteria β-subgroup ของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีความยาวประมาณ 465 คู่เบส ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา แสดงดังข้อ 3.3.4.2 โปรแกรมสำหรับสร้างปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้

1. Initial denaturation step	อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที
2. Denaturation step	อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
3. Annealing step	อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที
4. Extension step	อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที (เพิ่มเวลา 1 วินาที ต่อรอบ)
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ	
6. Final extension	อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลีเมอร์เรสที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel Electrophoresis ใช้เจลความเข้มข้น 2% โดยชั่งผงวุ้นหนัก 2 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ทำตามวิธีในข้อ 3.3.2 แต่เปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (100 bp DNA ladder)

3.3.5 การสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอ RNeasy Mini kit (บริษัท Qiagen, Germany) โดยในขั้นแรกทำการปกป้องเซลล์จากวิธีการเก็บเชื้อ เช่น การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง เนื่องจากอาร์เอ็นเอเป็นสารที่ถูกย่อยสลายได้ง่าย มีครึ่งชีวิตสั้น และมีการเปลี่ยนสภาพเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสภาวะภายนอกที่เปลี่ยนแปลง จึงต้องมีการปกป้องเซลล์ให้คงสภาพเดิมเหมือนในสิ่งแวดล้อมด้วยชุด RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen, Germany) โดยเติม RNAprotect Bacteria Reagent 1,000 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วยตะกอนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้บนตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเขย่าด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 10 นาที ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าทันทีนาน 5

วินาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตะกอนเซลล์ที่ได้สามารถเก็บได้นาน 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำตะกอนเซลล์ที่ได้เติมบัฟเฟอร์ TE ที่ผสมกับ Lysozyme 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมด้วยเครื่อง vortex mixer 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ระหว่างที่บ่มเขย่าหลอดนาน 10 วินาที ทุก 2 นาที เมื่อครบ 10 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน 5-10 วินาที จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอดไมโครฟิวจ์ฝาเกลียวขนาด 2 มิลลิลิตร ที่เติม glass bead ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150-600 ไมโครเมตร ปริมาณ 50 มิลลิกรัม นำหลอดไมโครฟิวจ์ฝาเกลียวที่เตรียมเสร็จเขย่าด้วยเครื่อง Bead beater ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที ดูดส่วนใสทั้งหมดใส่หลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม absolute ethanol ปริมาตร 470 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ดูดของเหลว (lysate) ใส่ RNeasy Mini spin column ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาและปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที เทส่วนน้ำทิ้ง ปั่นเหวี่ยงจนของเหลว (lysate) หมด เติมบัฟเฟอร์ RW1 ลงใน RNeasy Mini spin column ปิดฝาและปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที ถ่าย column ลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ RPE ลงใน column ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาและปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที เติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาและปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ถ่าย RNeasy Mini spin column ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม น้ำปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ปิดฝาและปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.6 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.3.6.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} โดยหากอัตราส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 2.0 แสดงว่ามีดีเอ็นเอปนเปื้อนสูง และคำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอจากสมการ

ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm x 40 x dilution factor

3.3.6.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอใช้ชุด OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Germany) ในชุดนี้มีสารละลาย RT-PCR Enzyme Mix ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ Reverse Transcriptases ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนอาร์เอ็นเอไปเป็นซีดีเอ็นเอ (cDNA) และเอนไซม์ DNA Polymerase สำหรับสร้างสายดีเอ็นเอ ทำให้สามารถสร้างสายซีดีเอ็นเอและเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสไปพร้อมกันในขั้นตอนเดียวได้ ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้คือ CTO189f+GC และ CTO654r (Kowalchuk และคณะ, 1997) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA β-subgroup *Proteobacteria* ของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีความยาวประมาณ 465 คู่เบส ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาแสดงในคู่มือ OneStep RT-PCR Kit ดังนี้

5x Qiagen OneStep RT- PCR buffer 10 ไมโครลิตร dNTP Mix 2 ไมโครลิตร Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix 2 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ (primer) CTO189f+GC 2 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ CTO654r 2 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไพรเมอร์ (primer) ของแต่ละชนิดเป็น 20 ไมโครโมล สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม 1 ไมโครลิตร เติมน้ำปราศจากเอนไซม์ RNase ให้มีปริมาตรสุดท้ายคือ 50 ไมโครลิตร โปรแกรมสำหรับสร้างปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้

1. Reverse transcription อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
2. Initial PCR activation step อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
3. Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที
4. Annealing step อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที
5. Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที
6. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ
6. Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel Electrophoresis ตามข้อ 3.3.4.2

3.3.7 การวิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Biorad, USA) ในการวิเคราะห์ DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 30-70% จากสารละลาย denaturant 0% และ 100% (ภาคผนวก ข) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงใน

ชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหวีลงไประหว่างกระจกทั้งสองแผ่น ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งข้ามคืนให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว นำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตรประมาณ 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนได้อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งหมดกับสีติดตาม หยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นเปิดสวิตซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านชุดเจลแซนวิชและบัฟเฟอร์ TAE จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ นาน 5 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วย สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวเอต ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล

3.3.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอเด่นจากโปรไฟล์ของ DGGE

3.3.8.1 เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

ตัดชิ้นพอลิอะคริลาไมด์เจลบริเวณแถบดีเอ็นเอเด่นใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ เติม TE buffer 20 ไมโครลิตร แช่ชิ้นเจลไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 วัน เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมาจากเจลให้มากที่สุด เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา ตามข้อ 3.3.4.2 แต่ไพรเมอร์ (primer) 338F ไม่ต้องมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5’ ในขณะที่ไพรเมอร์ (primer) ของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนียใช้ชนิดเดิม และใช้ปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอตั้งต้น 5 ไมโครลิตร จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

1. Initial denaturation step	อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 52 นาที
2. Denaturation step	อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
3. Annealing step	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
4. Extension step	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ	
6. Final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที

โปรแกรมสำหรับไพรเมอร์ CTO189f+GC และ CTO654r ใช้โปรแกรม และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel Electrophoresis ตามข้อ 3.3.4.3

3.3.8.2 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

นำสารละลายผลิตภัณฑ์ PCR จากข้อ 3.3.8.1 มาไลเกทเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy Vector System II (Promega, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือในไมโครฟิวจ์ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

2X ไลเกชันบัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pGEM-T Easy Vector System II (50 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
สารละลายผลิตภัณฑ์ PCR จากข้อ 3.3.7.1	3	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ทำการไลเกชันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บสารละลายไลเกชันที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.8.3 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลามิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 และคัดเลือกทรานสฟอร์มเมนท์ (tranformant) ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลามิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาแช่ในน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ไม่เกิน 10 นาที เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้แล้วจากข้อ 3.1.9.2 ปริมาตร 2-4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที ทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที แล้วเติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ (tranformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายเซลล์ *E. coli* JM109 ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลามิดแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) เข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) เข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ หลังจาก

เกลี่ยเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง เก็บเชื้อ *E. coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลามิด ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่านำมาใช้

3.3.8.4 สกัดรีคอมบีแนนท์พลาสมิด

สกัดรีคอมบีแนนท์พลาสมิด ด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ

ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยวิธี Gel Electrophoresis ใช้วุ้นความเข้มข้น 1% โดยชั่งผงวุ้นหนัก 1 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ทำตามวิธีในข้อ 3.3.2

3.3.8.5 ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy	1	ไมโครลิตร
10X บัฟเฟอร์	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Eco*RI	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	7	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมด (10 ไมโครลิตร) มาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรก ด้วยวิธี Gel Electrophoresis ใช้วุ้นความเข้มข้น 1% โดยชั่งผงวุ้นหนัก 1 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ทำตามวิธีในข้อ 3.1.5 เปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส

3.3.8.6 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part โดยบริษัทนี้ใช้ระบบ LI-COR® NEN 4200 Global IR2 DNA Sequencing และเครื่อง ABI® PRISM DNA Sequencing ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ M13R (5’ GGATAACAATTTCACACAGG 3’)

ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pGEM-T Easy เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแล้ว นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank ใช้โปรแกรม BLASTn (http://www.ncbi.nim.nih.gov/)

3.4 วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH_4-N) โดยวิธีการเกิดปฏิกิริยาของ Phenol hypochlorite (Strickland and Parsons, 1972)

เก็บน้ำตัวอย่างจากขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุ De-ionized water (D.I.) ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิเปตน้ำตัวอย่างที่ถูกเจือจางลงในหลอดไมโครฟิวจ์ 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม Phenol solution (Phenol 20 กรัม ละลายใน 95% ethyl alcohol 200 มิลลิลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เขย่าแล้วเติม Sodium nitroplusside solution ($Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$ 1 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 200 มิลลิลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เขย่าแล้วเติม Oxidizing solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งต้องเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งโดยผสม alkaline reagent (Sodium citrate 100 กรัม และ NaOH 5 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 500 มิลลิลิตร) และ Sodium hypochlorite solution (ใช้สารละลาย ทางการค้าซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 1.5 N) ในอัตราส่วน 100 มิลลิลิตร ต่อ 25 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดไมโครฟิวจ์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 nm โดยเครื่อง Spectrophotometer เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน เทียบกับกราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (ภาคผนวก ค) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.0125, 0.05, และ 0.1 มิลลิกรัมแอมโมเนียไนโตรเจนต่อลิตร ที่เตรียมจาก stock ammonia solution ความเข้มข้น 100 mgNH_4-N/L และ blank ที่เตรียมจากน้ำปลอดประจุ

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์-ไนโตรเจน (NO_2-N) โดยวิธีการเกิดปฏิกิริยาของ Sulfanilamine (Strickland and Parsons, 1972)

เก็บน้ำตัวอย่างจากขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาเจือจางด้วยละลายในน้ำปลอดประจุ (D.I.) แล้วปิเปตน้ำตัวอย่างที่ถูกเจือจางลงในหลอดไมโครฟิวจ์ 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นเป็น blank เติม sulphanilamide solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (sulphanilamide 5 กรัม HCl conc 50 ml ละลายในน้ำปลอดประจุ 500 มิลลิลิตร) เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 2-8 นาที เติม NNED solution (N-(1-Naphthyl)-Ethylenediamine Dihydrochloride 0.50 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 500 มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 nm โดยเครื่อง Spectrophotometer เปรียบเทียบกับกราฟ

มาตรฐานของไนไตรต์-ไนโตรเจน (ภาคผนวก ค) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.0125, 0.05, และ 0.1 มิลลิกรัมไนไตรต์ไนโตรเจนต่อลิตร ที่เตรียมจาก stock nitrite solution ความเข้มข้น 100 mg NO_2-N /L และ blank ที่เตรียมจากน้ำปลอดประจุ

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรต-ไนโตรเจน (NO_3-N) โดยวิธีการวัดการดูดกลืนแสง Ultraviolet (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA), 1992)

เก็บน้ำตัวอย่างจากขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุ (D.I.) ปิเปตน้ำตัวอย่างที่ถูกเจือจางลงในหลอดไมโครฟิวจ์ 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นเป็น blank วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 nm โดยเครื่อง UV Spectrophotometer การคำนวณหาปริมาณไนเตรต-ไนโตรเจน ทำได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 nm หักลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 nm เทียบกับกราฟมาตรฐานของ ไนเตรต-ไนโตรเจน (ภาคผนวก ค) ที่เตรียมจาก stock nitrate solution ความเข้มข้น 100 mg NO_3-N /L และ blank ที่เตรียมจากน้ำปลอดประจุ

3.5 การทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริง

3.5.1 กิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียสังเคราะห์

นำตัวกลางที่มีแบคทีเรียยึดเกาะจากข้อ 3.2.2 มาทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 มาใช้เป็นน้ำเสียสังเคราะห์ เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่ตัวกลางที่มีแบคทีเรียยึดเกาะจากข้อ 3.2.2 ขวดละ 20 ชิ้น และเติมแอมโมเนียให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างน้ำทุกชั่วโมง ชั่วโมงละ 2 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต ตามวิธีการในข้อ 3.4

3.5.2 กิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียจริง

นำตัวกลางจากข้อ 3.5.1 ทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียในน้ำเสียจริง โดยใช้น้ำเสียจริงจากสถานที่เก็บตัวอย่างในข้อ 3.1.1 นำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.4 เพื่อกำจัดตะกอนที่อยู่ในน้ำเสีย ทดสอบปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรตในน้ำเสีย เติมน้ำเสียจริงปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่ตัวกลางจากข้อ 3.5.1 ขวดละ 20 ชิ้น และเติมแอมโมเนียให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์ เนื่องจากน้ำเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งที่ต่อกับระบบบำบัดน้ำเสียจากสถานที่

เก็บตัวอย่างนั้น มีปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียในระบบต่ำเนื่องจากมีการเดินระบบตลอดเวลา ดังนั้นจึงต้องเติมแอมโมเนียให้กับน้ำเสียจริงที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5.1 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต ตามวิธีการในข้อ 3.4

3.5.3 การทดสอบอัตราการย่อยสลายแอมโมเนียไนโตรเจนในน้ำเสียจริง

เตรียมน้ำเสียจริงตามข้อ 3.5.2 และเติมแอมโมเนียให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทดสอบอัตราเร็วของการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่ตัวกลางที่ผ่านการบำบัดจากข้อ 3.5.2 ขวดละ 20 ชิ้น เขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงจนกว่าแอมโมเนียจะหมดไป จากนั้นถ่ายตัวกลางใส่ขวดใหม่ เติมน้ำเสียจริง และทำการทดลองซ้ำโดยเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียเป็น 3, 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยเก็บตัวอย่างน้ำทุก 2 ชั่วโมง สำหรับที่ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียเป็น 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ลดลงต่อเวลาที่ได้นำไปคำนวณหาย่อยสลายแอมโมเนียไนโตรเจน โดยแทนค่าในสมการดังต่อไปนี้ (Pano และ Middlebrooks, 1983)

$$\text{อัตราย่อยสลายแอมโมเนียไนโตรเจน (V)} = \frac{V_{max} \times \text{ความเข้มข้นของแอมโมเนีย (S)}}{K_m + \text{ความเข้มข้นของแอมโมเนีย (S)}}$$

3.6 การเก็บรักษาสภาพหัวเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบการเก็บเซลล์ตรึงบนตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกตามภาคผนวก ก ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร เติมกลีเซอรอล 15% และใส่ตัวกลางจากข้อ 3.5.3 ที่มีแบคทีเรียเกาะ 5 ชิ้น ลงไปในแต่ละหลอด เก็บเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ 3 อุณหภูมิได้แก่ อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบตามกำหนด ถ่ายหัวเชื้อที่เกาะกับตัวกลางทั้ง 5 ชิ้น ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่คัดเลือกตามภาคผนวก ก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีตัวกลางใหม่จำนวน 15 ชิ้นต่อขวด เขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อทดสอบกิจกรรมการบำบัดแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต ตามวิธีการในข้อ 3.4

บทที่ 4

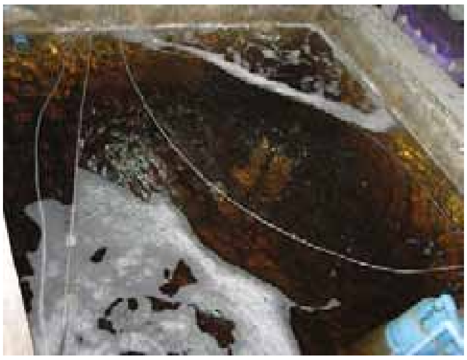
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเบื้องต้นจากบ่อบำบัดน้ำเสียของบ่อเลี้ยงกุ้งแบบหมุนเวียนน้ำ

4.1.1 การเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำและใยกรองจากบ่อบำบัดน้ำเสียของบ่อเลี้ยงกุ้งแบบหมุนเวียนน้ำ จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใยกรองที่ใช้ในระบบบำบัดมีชื่อทางการค้าคือ ไบโอคอร์ด (Biocord) มีลักษณะเป็นเส้นใยพลาสติกพันอยู่กับแกนกลาง เพื่อเพิ่มพื้นที่ยึดเกาะของแบคทีเรียในการบำบัดแอมโมเนียไนโตรเจนที่ซึ่งเป็นของเสียที่มาจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ใยกรองจะทำหน้าที่เป็นตัวกรองชีวภาพ เนื่องจากแบคทีเรียที่เกาะอยู่สามารถใช้แอมโมเนียในน้ำเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ใยกรองก่อนนำมาใช้จะมีสีขาวขุ่น แต่เมื่อนำมาใส่ในบ่อบำบัดที่มีการเลี้ยงกุ้งตลอดเวลา เป็นระยะเวลามากกว่า 4 เดือน ใยกรองได้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีตะกอนสีน้ำตาลเข้มเกาะอยู่ดังภาพที่ 4.1

สรวิศ เผ่าทองศุข และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต (2550) รายงานว่า ระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดที่มีระบบบำบัดน้ำแบบ Nitrification Biofilter ซึ่งใช้ใยกรองไบโอโพลีมา และระบบ Tubular Denitrification Reactor จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลแห่งนี้ สามารถใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (กุ้ง 7 ตัวต่อตารางเมตร) เป็นเวลา 7 เดือน โดยไม่มีการถ่ายน้ำออกทิ้ง ตลอดระยะเวลาการทดลอง สามารถควบคุมความเข้มข้นของแอมโมเนียไม่ให้เกิน 0.2 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร นอกจากนี้ยังสามารถใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบหนาแน่นสูง (กุ้ง 150 ตัวต่อตารางเมตร) เป็นเวลา 4 เดือน พบความเข้มข้นของแอมโมเนียไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และเมื่อทดลองใช้เลี้ยงกุ้งขาวแบบหนาแน่นสูง (กุ้ง 350 ตัวต่อตารางเมตร) เป็นเวลา 4 เดือน พบความเข้มข้นของแอมโมเนียไม่เกิน 0.06 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร การเลี้ยงกุ้งทั้ง 3 แบบไม่พบการสะสมไนไตรต์ในน้ำทะเล และการเลี้ยงกุ้งทั้ง 3 แบบนี้ เป็นการเลี้ยงต่อเนื่องกัน ใช้น้ำทะเลเดิมเลี้ยงโดยไม่มีการเติมน้ำทะเลใหม่เข้าสู่ระบบแต่อย่างใด จะเห็นได้ว่าระบบสามารถควบคุมปริมาณแอมโมเนียให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้ง แสดงว่าปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นสามารถเกิดได้อย่างสมบูรณ์ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบแบคทีเรียในกลุ่มของไนทริฟายอิงแบคทีเรียที่เกาะเป็นไบโอฟิล์ม จากใยกรองที่ผ่านการเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลายาวนานนี้

(ก) (ข) 

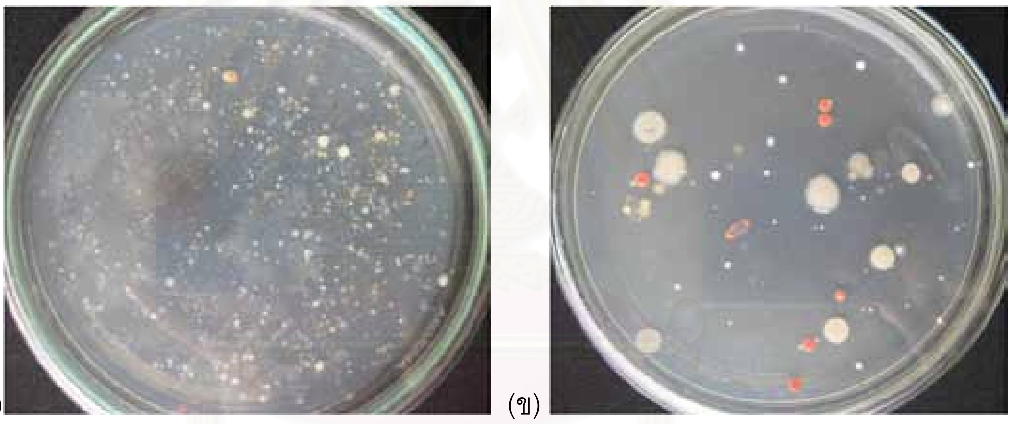
ภาพที่ 4.1 ใยกรองในระบบบำบัดน้ำเสียของบ่อเลี้ยงกุ้ง (ก) ใยกรอง (ข) บ่อบำบัดน้ำเสียแบบไนตริฟิเคชันจากการเลี้ยงกุ้ง

4.1.2 การเลี้ยงเชื้อเบื้องต้นบนอาหารแข็งชนิดต่าง ๆ

นำตัวอย่างน้ำและตะกอนจากใยกรองของบ่อบำบัดน้ำเสีย มาเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้งสองชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ AOB สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย และอาหารเลี้ยงเชื้อ NOB สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ แตกต่างกันที่อาหารเลี้ยงเชื้อ AOB เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อ NOB ใช้โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) เป็นแหล่งไนโตรเจน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ใช้ในการทดลองนี้ดัดแปลงจาก Carlucci และ Strickland (1968) เนื่องจากอาหารแข็งทั้ง 2 ชนิด สามารถใช้คัดแยกแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงทั้ง 2 กลุ่ม ดังที่กล่าวมาแล้ว ในขณะที่งานวิจัยอื่น ๆ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคัดแยกไนทริฟายอิงแบคทีเรียเพียงกลุ่มเดียว ซึ่งมักจะเป็นกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อของ Carlucci และ Strickland (1968) ยังใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อน้อยกว่า (Du และคณะ, 2003; Shan และ Obbard, 2001) เนื่องจากไนทริฟายอิงแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่โตช้า (Tal และคณะ, 2003) ดังนั้นในการทดลองจึงต้องหาสูตรอาหารที่กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้เร็วและไม่มีสารอินทรีย์คาร์บอน เพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม heterotrophs อื่น ๆ ซึ่งสามารถเจริญได้เร็วกว่าไนทริฟายอิงแบคทีเรีย

ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามีโคโลนีขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด โดยจำนวนโคโลนีของอาหารเลี้ยงเชื้อ AOB มีมากกว่าโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NOB แสดงถึงประชากรของแบคทีเรียกลุ่ม AOB มีจำนวนมากกว่าประชากรของแบคทีเรียกลุ่ม NOB ในตัวอย่างใยกรองของบ่อบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีของเสียในรูปของแอมโมเนียไนโตรเจนเข้ามาในระบบตลอดเวลา ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะพบแบคทีเรียกลุ่ม AOB ได้มากกว่าแบคทีเรียกลุ่ม NOB

นอกจากนี้โคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็งทั้งสองชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน และบนอาหารชนิดเดียวกันก็มีลักษณะโคโลนีหลากหลายแบบ โดยมีทั้งโคโลนีสีขาว และโคโลนีที่มีสีอื่น ๆ ขนาดของโคโลนีก็มีความแตกต่างกัน ดังภาพที่ 4.2 โดยทั่วไปแล้วโคโลนี 1 โคโลนีหมายถึงแบคทีเรีย 1 ชนิด ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันทั้งขนาด ลักษณะรูปร่าง และสีของโคโลนี จากภาพที่ 4.2 แสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่าประชากรของแบคทีเรียกลุ่ม AOB และ NOB มีความหลากหลาย อย่างไรก็ตาม เมื่อนำโคโลนีที่ได้จากการเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง มาเขี่ยเชื้อในอาหารชนิดเดิม พบว่าไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ได้ อาจเนื่องมาจากในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไนตริฟิเคชันโดยทั่วไป แบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายเออร์จะอยู่รวมกันเป็นไบโอฟิล์ม ซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มประชากรแบคทีเรียหลากหลายชนิด (Sugita และคณะ, 2005) เพื่อพึ่งพาอาศัยกันในการใช้สารต่าง ๆ ที่แบคทีเรียอีกชนิดผลิตขึ้น ดังนั้นเมื่อเขี่ยโคโลนีเดี่ยวแต่ละโคโลนีลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ แบคทีเรียเหล่านั้นจึงไม่สามารถเจริญอย่างต่อเนื่องบนอาหารแข็งได้



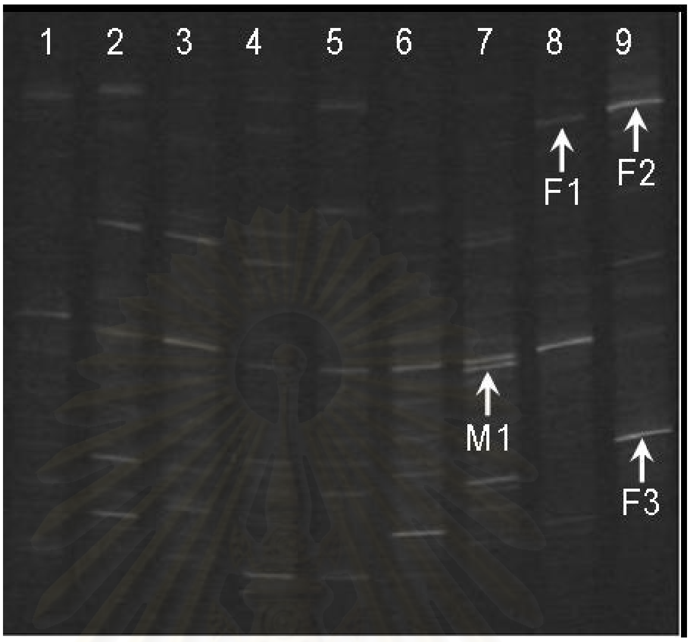
(ก) (ข)

ภาพที่ 4.2 การเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง (ก) อาหารเลี้ยงเชื้อ AOB (ข) อาหารเลี้ยงเชื้อ NOB จากตัวอย่างน้ำและตะกอนจากใยกรองที่เจือจางความเข้มข้น 100 เท่า เช่นเดียวกัน

4.1.3 การเลี้ยงเชื้อเบื้องต้นในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ

นำตัวอย่างน้ำและตะกอนจากใยกรองของบ่อบำบัดน้ำเสีย มาเลี้ยงในอาหารเหลว AOB แบบต่างๆ ที่ใส่ตัวกลาง BCN 009 โดยดัดแปลงส่วนประกอบของอาหารเหลว AOB ตามตารางที่ 3.1 เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำมาปั่นเก็บตะกอนเพื่อสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี freeze-thaw ดัดแปลงจาก Tsai และ Olson (1991) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วยไพรเมอร์ (primer) คือ 338f-gc และ 518r ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 200 คู่เบส และศึกษาโครงสร้างประชาคม

แบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 การวิเคราะห์ DGGE ด้วยไพรเมอร์ 16S universal จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่าง ๆ ช่องวิ่งที่ 1 ไม่ใส่อาหารกุ้ง ช่องวิ่งที่ 2-7 ใส่อาหารกุ้ง 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่องวิ่งที่ 8-9 ตะกอนจากใยกรองที่เก็บจากตำแหน่งที่ต่างกัน ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอเด่นที่เลือกมาวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ DGGE นี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้น เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบนตัวกลางที่เพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่าง ๆ เกรเดียนท์ของความเข้มข้น denaturant คือ 30 – 70% พบว่าโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต่างๆ มีลักษณะคล้ายคลึงกับประชาคมแบคทีเรียจากใยกรอง (ภาพที่ 4.3) โดยแถบดีเอ็นเอเด่นจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว อยู่ตรงกับแถบดีเอ็นเอโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากใยกรองหลายตำแหน่ง ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจึงน่าจะใช้เป็นอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากใยกรองได้ จากผลการทดลองพบว่ามีความแตกต่างระหว่างอาหารเหลวที่ใส่และไม่ใส่อาหารกุ้ง คือ แถบดีเอ็นเอเด่นของอาหารเหลวเติมอาหารกุ้ง (ช่องวิ่งที่ 2-7) มีความคมชัดกว่าแถบโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียของอาหารเหลวไม่เติมอาหารกุ้ง (ช่องวิ่งที่ 1) (ภาพที่ 4.3) ซึ่งในระบบบำบัดจริงนั้นน้ำเสียที่มาจากการเลี้ยงกุ้ง ย่อมจะต้องมีอาหารกุ้งละลายบนมากับน้ำเสียและเข้าสู่ระบบบำบัดอยู่แล้ว และในอาหารกุ้งก็จะมีสารอาหารและวิตามินเป็นส่วนประกอบ แบคทีเรียจึง

สามารถเจริญได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมอาหารกุ้ง ในช่วงแรกของการศึกษานี้ ได้เติมอาหารกุ้ง 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นปริมาณเดียวกันกับในงานวิจัยของ Delwiche และ Finstein (1965) ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 80 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกระตุ้นการเจริญของไนทริฟายอิงแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการเติมสารสกัดจากยีสต์อาจทำให้แบคทีเรียกลุ่ม heterotroph เจริญได้มากกว่ากลุ่ม nitrifying autotroph ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารกุ้งแทน อย่างไรก็ตามอาหารกุ้งมีส่วนประกอบบางชนิดที่ไม่ละลายน้ำ ในการทดลองต่อมา จึงเพิ่มอาหารกุ้งเป็น 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้งานวิจัยของ Shan และ Obbard (2001) ใช้แบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงที่ตรึงอยู่กับ clay pellet ในการบำบัดแอมโมเนียจากการเลี้ยงกุ้ง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ก็มีการเติมอาหารกุ้ง 440 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเลียนแบบสภาวะในบ่อเลี้ยงกุ้งเช่นเดียวกัน ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช่องวิ่งที่ 2, 5-7) มีแถบดีเอ็นเอเด่นหลายแถบ ซึ่งแสดงว่าโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียมีความหลากหลาย และแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ยังชัดเจนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคาร์บอเนต 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช่องวิ่งที่ 3-4) (ภาพที่ 4.3) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมอาหารกุ้ง 90 มิลลิกรัมต่อลิตรและโซเดียมคาร์บอเนต 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

แม้ว่าแถบดีเอ็นเอของตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อบางแถบ มีความคล้ายคลึงกับแถบที่ปรากฏในช่องวิ่งของตะกอนใยกรองทั้ง 2 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4.3) อย่างไรก็ตามเป็นการยากที่จะบอกได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏนั้นเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือไม่ เนื่องจากแถบดีเอ็นเอมีความเอียงและสังเกตได้ไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างจากใยกรองที่เก็บจากตำแหน่งที่ต่างกันในถังบำบัดน้ำเสียแบบไนตริฟิเคชั่นจากระบบหมุนเวียนน้ำ (ช่องวิ่งที่ 8 และ 9) แถบโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียของตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอเด่นไม่เหมือนกัน (ภาพที่ 4.3) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมในระบบบริเวณจุดเก็บตัวอย่างเช่น ปริมาณออกซิเจนในน้ำ หรือชนิดของแบคทีเรียในไบโอฟิล์ม

<u>การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์</u>

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ DGGE โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของไพรเมอร์ 338f-gc และ 518r เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn ซึ่งอนุมานได้ว่าแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ มาจากแบคทีเรีย 1 ชนิด เนื่องจากในการทดลองนี้เป็นการวิเคราะห์เบื้องต้น เพื่อดูภาพรวมของประชากรแบคทีเรียในใยกรองและในอาหารเลี้ยงเชื้อ และตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ตรงกันสามารถอนุมานได้ว่าแถบดีเอนเอที่ตรงกันเป็นดีเอนเอชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการโคลนดีเอ็นเอจากแถบดีเอ็นเอเด่นที่ปรากฏในแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ (ภาพที่ 4.3) นั้น พบว่าแถบดีเอ็นเอเด่น

ส่วนมากไม่สามารถโคลนดีเอ็นเอเข้าพลาสมิดได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาทางเทคนิคในขั้นตอนการโคลน แถบดีเอนเอเด่นที่สามารถโคลนได้จากใยกรองทั้งสองตัวอย่าง คือ F1, F2 และ F3 และแถบดีเอนเอเด่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ M พบว่าแถบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสทั้ง 4 แถบเป็นแบคทีเรียคนละชนิดกัน (ตารางที่ 4.1) แบคทีเรียที่จำแนกได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเล แบคทีเรียเหล่านี้จัดเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (Uncultured bacterium) ซึ่งบางชนิดอาจเป็นแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงที่มีบทบาทในการบำบัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้ในการศึกษา เช่น AM295517 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่แยกได้จากไบโอฟิล์มในระบบบำบัดแบบโปรยกรอง (trickling filter) ของระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำ (Foesel และคณะ, 2007) จากผลการทดลองนี้แสดงว่า แบคทีเรียกลุ่มเด่นของใยกรองเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้อ 4.1.2 ที่พบโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ กลับไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย

เนื่องจากในขั้นตอนนี้เป็นการเลี้ยงเชื้อเบื้องต้น เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง จากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบไนทริฟิเคชั่นของระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้นในขั้นแรกจึงเลือกใช้ไพรเมอร์ 338f-gc และ 518r เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเด่นในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไนทริฟิเคชั่น ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราห์แถบดีเอ็นเอเด่นที่โคลนได้พบว่า แถบดีเอ็นเอเด่นที่โคลนได้ส่วนมากเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (Uncultured bacteria) ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มไนทริฟายอิงหรือไม่ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ไพรเมอร์ CTO189f-gc และ CTO654r ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ เพื่อให้สามารถบอกได้ว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้เป็นแบคทีเรียในกลุ่มไนทริฟายอิง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอเด่นจากภาพที่ 4.3 (M หมายถึง แบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ F หมายถึง แบคทีเรียจากใยกรอง)

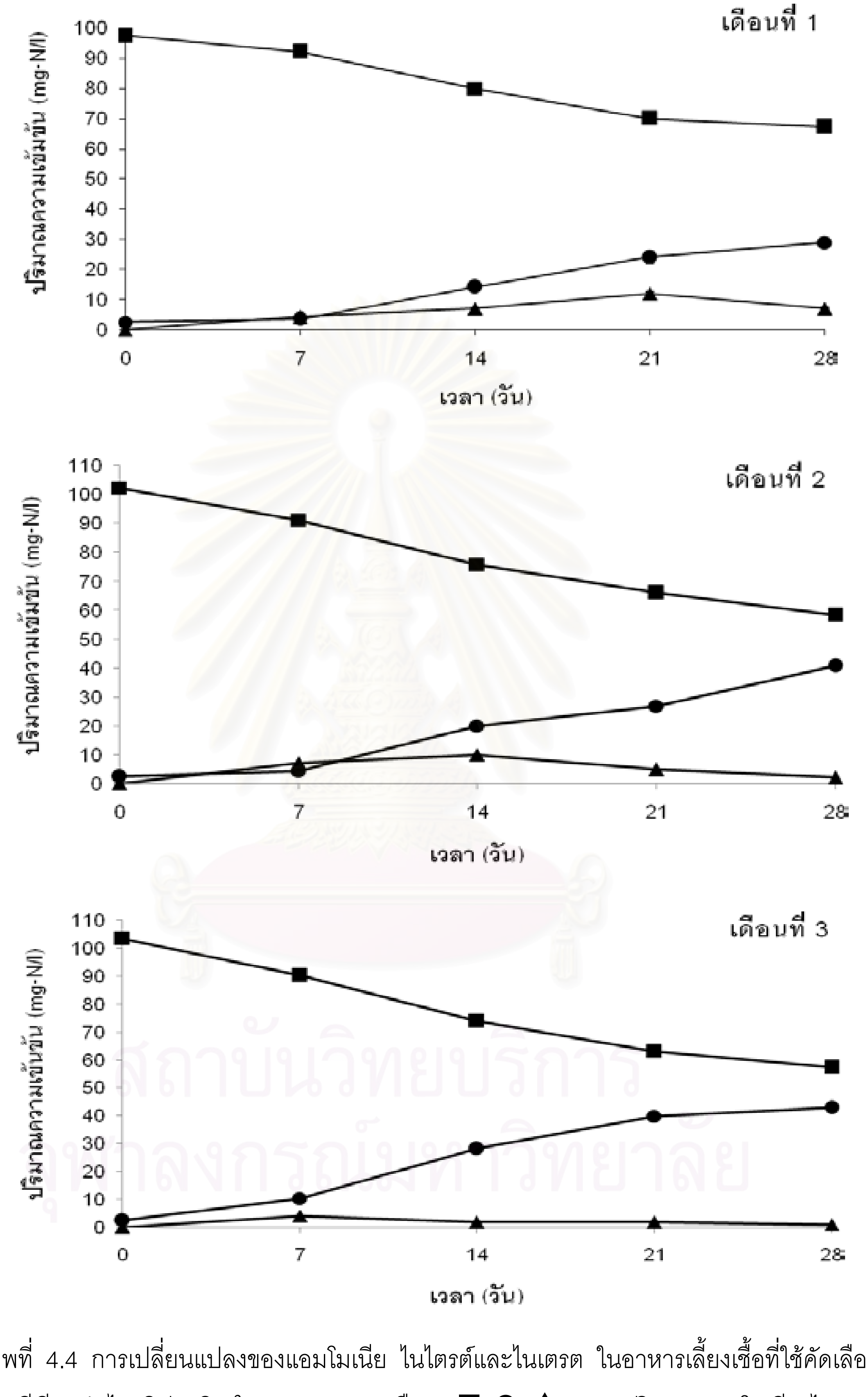
แถบดีเอ็นเอเด่น	Accession No.	Sequence identity (%)	สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	อ้างอิง
M	AM157559	99	Uncultured gamma proteobacterium	hypersaline wastewater	Lefebvre และคณะ (2006)
F1	AM295517	100	Uncultured bacterium	marine aquaculture biofilm	Foesel และคณะ (2007)
F2	EU919797	99	Uncultured bacterium	Ocean water	Zeng,Y. (2008) ไม่ตีพิมพ์
F3	EU734671	100	*Microbacterium* sp. สายพันธุ์ FS-YC6714	Sludge	Yasir และ Chung,Y.R. (2008) ไม่ตีพิมพ์

4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยใช้อาหารเหลวที่เลือก

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำและใยกรอง โดยใช้อาหารเหลวที่คัดเลือกจากข้อ 4.1.3 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการคัดแยกและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง การทดสอบเริ่มต้นจากนำตัวอย่างตะกอนจากน้ำและใยกรอง จากระบบบำบัดน้ำแบบหมุนเวียนน้ำ จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล มาใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวที่เติมแอมโมเนียความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เพื่อกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย และใส่ตัวกลาง BCN-009 เพื่อใช้เป็นพื้นที่ยึดเกาะของแบคทีเรีย เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 เดือน เมื่อครบ 1 เดือน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ โดยถ่ายเฉพาะตัวกลางทั้งหมดในขวดอาหารเก่าลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดใหม่ เพื่อกำจัดปริมาณไนเตรตที่สะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเพื่อลดการเกิดกรดซึ่งเกิดจากกระบวนการย่อยสลายแอมโมเนีย เมื่อการเลี้ยงเชื้อเบื้องต้นผ่านไป 1 เดือน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ โดยถ่ายตัวกลางทั้งหมดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดใหม่ เพื่อให้ได้จำนวนแบคทีเรียจำนวนมากเป็นหัวเชื้อในการทดลอง รวมใช้เวลาเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 3 เดือน โดยเมื่อผ่านการเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนนี้สามารถสังเกตเห็นตะกอนสี

น้ำตาลเกาะอยู่บนตัวกลางได้อย่างชัดเจน และสามารถนำตะกอนที่เกาะอยู่นั้นไปสกัดดีเอ็นเอใน ขั้นตอนต่อไปได้ ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต ในแต่ละเดือนแสดง ดังภาพที่ 4.4 โดยทดสอบการเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต ทุก 7 วัน พบว่า ปริมาณแอมโมเนียลดลง ในขณะที่ปริมาณของไนไตรต์และไนเตรตเพิ่มขึ้น โดยในเดือนที่ 1 ปริมาณแอมโมเนียสามารถลดลงได้ประมาณ 30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และในเดือนที่ 2 และ 3 ปริมาณแอมโมเนียสามารถลดลงได้ประมาณ 40 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ปริมาณไนไตรต์ใน เดือนที่ 1 และ 2 ยังคงพบได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ในเดือนที่ 3 พบว่าปริมาณไนไตรต์ลดลงและ หมดไปในที่สุด ในขณะที่ปริมาณไนเตรตเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการเลี้ยงเชื้อในวันที่ 7 ของทุกเดือน แสดง ว่ากระบวนการย่อยสลายไนไตรต์ เกิดขึ้นภายหลังกระบวนการย่อยสลายแอมโมเนียไปเป็นไน ไตรต์ประมาณ 7 วัน จากการทดลองขั้นตอนนี้พบว่าในเดือนที่ 1 ปริมาณไนไตรต์ยังไม่สามารถ ลดลงจนหมดได้ แสดงว่าหัวเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อยังไม่สามารถ นำไปใช้ได้ จึงต้องเลี้ยงเชื้อต่อไป ในเดือนที่ 2 ปริมาณไนไตรต์ลดลงแต่ยังหมดจนกระทั่งในช่วง เดือนที่ 3 จึงพบว่าปริมาณไนไตรต์ลดลงจนหมด แสดงว่าการเพิ่มจำนวนหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ นี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 2-3 เดือน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

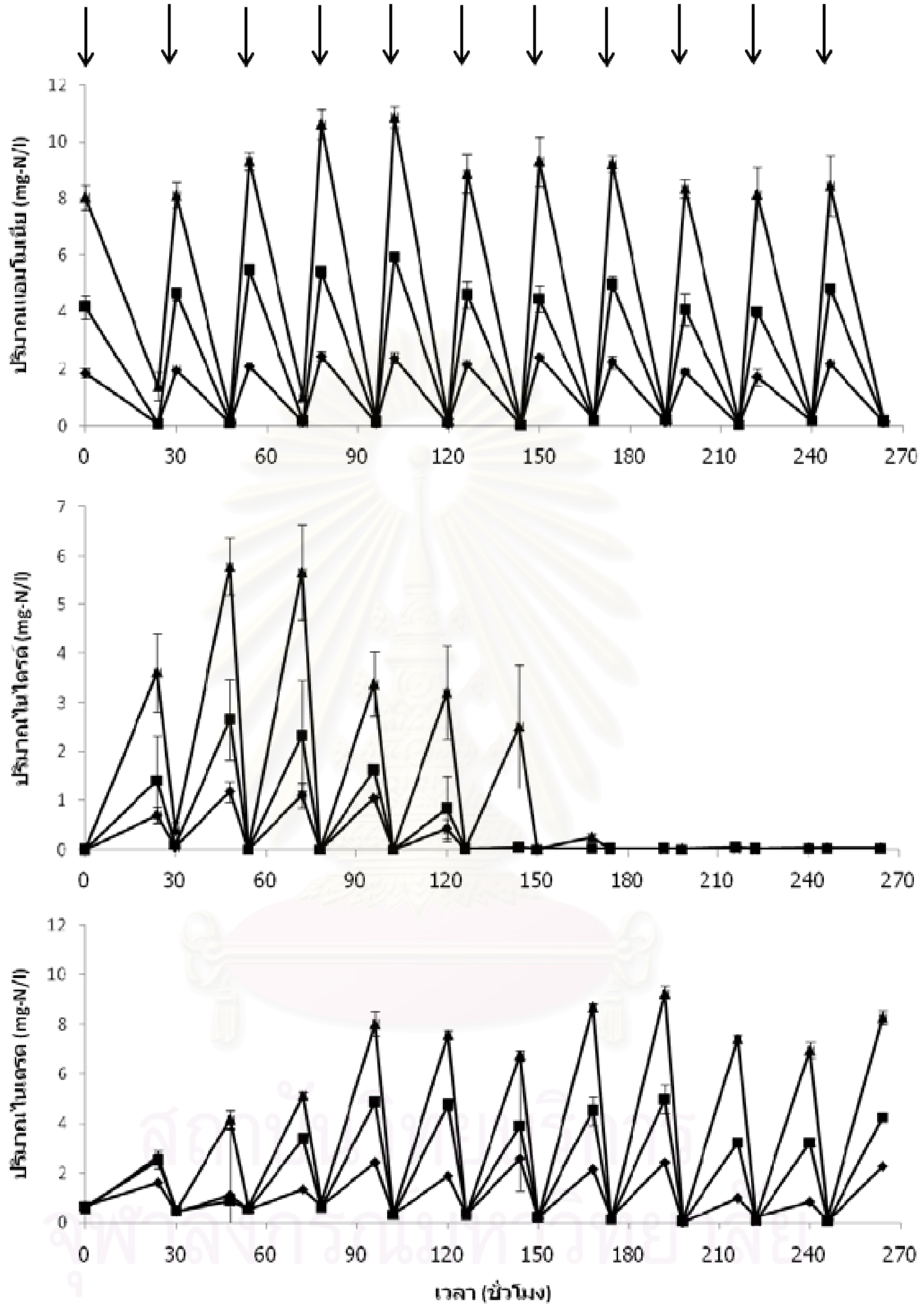


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง ในระยะเวลา 3 เดือน (■ ● ▲ แสดงปริมาณแอมโมเนีย ไนเตรต และไนไตรต์ ตามลำดับ)

เมื่อเลี้ยงเชื้อผ่านไปทั้งหมดเป็นเวลา 3 เดือน นำตัวกลางทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนีย โดยใส่ตัวกลาง 20 ชิ้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 2, 5 และ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าแอมโมเนียทุกความเข้มข้นสามารถลดลงไปถึงน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ได้ใน 1 วัน แต่ปริมาณไนไตรต์ยังไม่ลดลง ดังนั้นจึงเปลี่ยนขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอมโมเนียทุกวัน เพื่อให้สภาวะในขวดทดลองมีแอมโมเนียสม่ำเสมอคล้ายกับสภาวะในการบำบัดจริง และเพื่อกระตุ้นการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย และกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ ให้มีประสิทธิภาพ ผลการทดลองพบว่าปริมาณความเข้มข้นของไนไตรต์เพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการทดสอบ แต่เมื่อผ่านวันที่ 7 ปริมาณความเข้มข้นของไนไตรต์ลดลงจนเกือบถึง 0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร แม้ว่าจะใช้เติมแอมโมเนียที่ความเข้มข้นต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ ที่มีบทบาทในการสลายไนไตรต์ สามารถปรับตัวและมีกิจกรรมในการสลายไนไตรต์ได้อย่างรวดเร็ว ผลของไนเตรตพบว่าปริมาณไนเตรตค่อนข้างคงที่ ขึ้นอยู่กับปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นในแต่ละครั้งของการเติมแอมโมเนีย จากผลการทดลองแสดงว่าหัวเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน สามารถนำไปใช้ในการบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ได้จริง ดังรูป 4.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากการเลี้ยงเชื้อในการบำบัด (■◆▲ แสดงแอมโมเนียความเข้มข้นประมาณ 2, 5 และ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ) ↓ หมายถึงการเปลี่ยนขวดอาหารเลี้ยงเชื้อและเติมแอมโมเนียให้ได้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับความเข้มข้นเริ่มต้นของแต่ละชุดทดลอง

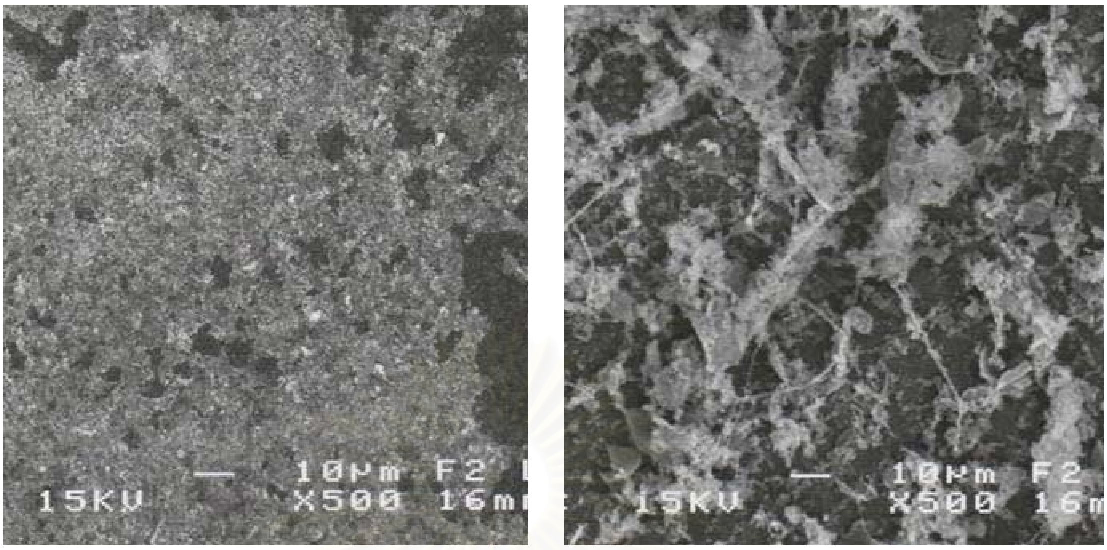
<u>การเจริญของแบคทีเรียบนตัวกลาง</u>

เมื่อผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าตัวกลางมีตะกอนสีน้ำตาลเกาะอยู่ภายใน ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และเมื่อนำไปผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) สามารถเห็นความแตกต่างของตัวกลางที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 เดือนกับตัวกลางที่ไม่มีตะกอนเกาะอย่างชัดเจน ดังภาพที่ 4.6 สอดคล้องกับการรายงานของ Tal และคณะ (2003) ที่ศึกษาประชากรแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสีย จากระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยใช้เม็ดโพลีเอทีลีน ที่มีลักษณะคล้ายกับตัวกลางที่ใช้ในงานวิจัยนี้ในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ พบว่าเมื่อผ่านการบำบัดมากกว่า 1 เดือน สังเกตเห็นไบโอฟิล์มสีน้ำตาลเกาะอยู่บนเม็ดโพลีเอทีลีน เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงเช่นเดียวกัน

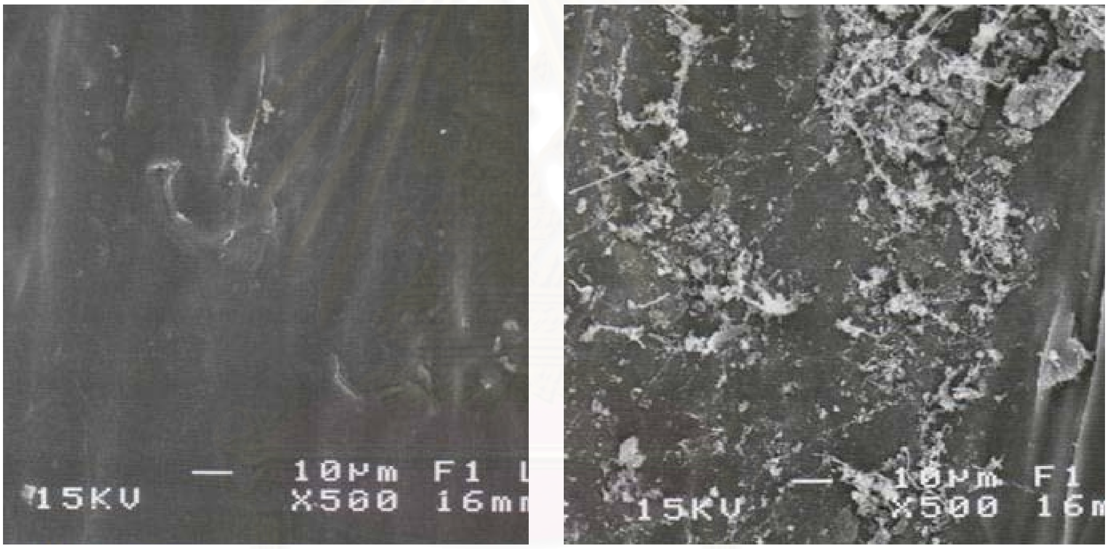
ภาพที่ 4.6 ลักษณะพื้นผิวตัวกลาง BCN 009 ภายหลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน (ก) ตัวกลางที่ไม่มีตะกอนเกาะ (ข) ตัวกลางภายหลังการเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองส่องตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (ภาพที่ 4.7) พบว่าพื้นผิวภายนอกของตัวกลางมีความเรียบกว่าพื้นผิวภายในตัวกลางซึ่งค่อนข้างขรุขระ ทำให้แบคทีเรียสามารถเกาะอยู่กับด้านในของตัวกลางได้มากกว่า รวมทั้งพื้นผิวด้านนอกมีแรงชะจากการเขย่าขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงอาจทำให้แบคทีเรียเกาะอยู่ได้น้อยกว่า จากภาพที่ 4.7 สิ่งที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของตัวกลาง มีลักษณะเป็นเซลล์ที่มีการสร้างเส้นใยยึดกับตัวเซลล์และพื้นผิวตัวกลาง จากการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าวิธีการและอาหารเลี้ยงเชื้อนี้สามารถเลี้ยงแบคทีเรียตรึงอยู่กับตัวกลางได้ โดยแบคทีเรียยังคงมีกิจกรรมในการย่อยสลายแอมโมเนียและไนไตรต์ได้ดี

ด้านใน



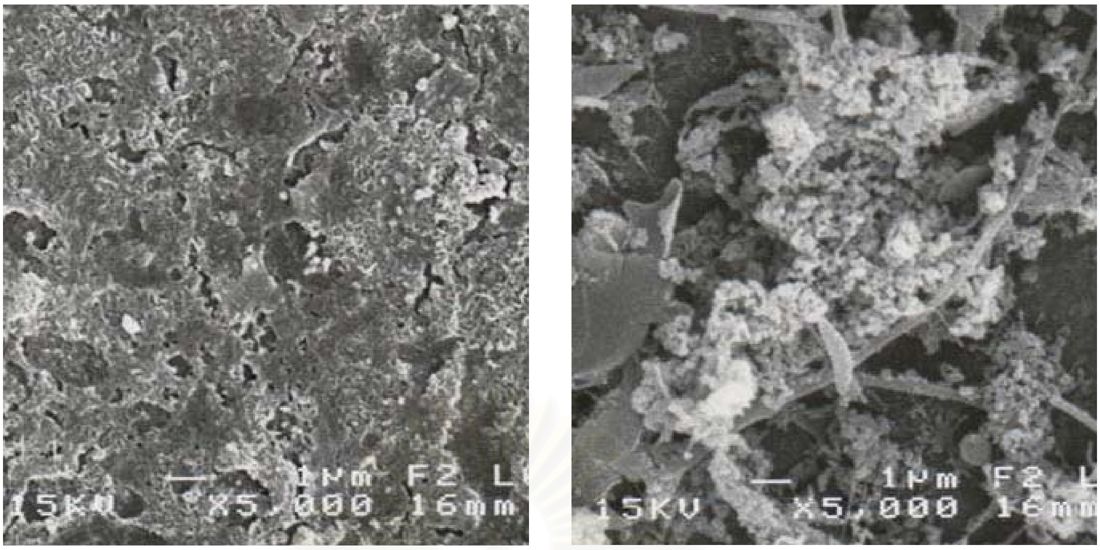
ด้านนอก



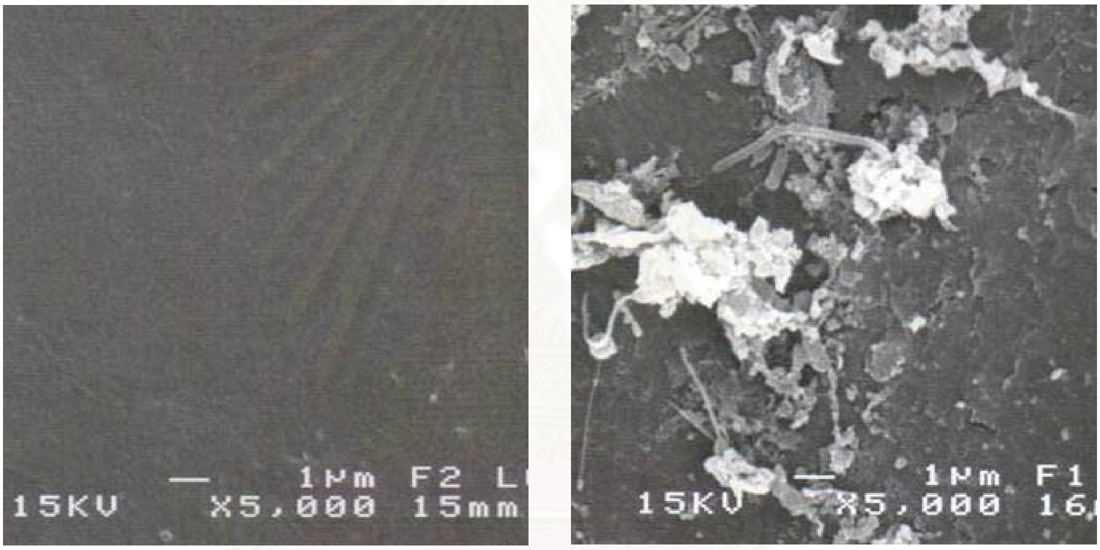
ภาพที่ 4.7 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ก) และ (ข) แสดงภาพด้านในตัวกลาง (ค) และ (ง) แสดงภาพด้านนอกของตัวกลาง รูปด้านซ้ายแสดงภาพตัวกลางที่ไม่มีแบคทีเรียเกาะ รูปด้านขวาแสดงภาพแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้บนตัวกลาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ด้านใน



ด้านนอก



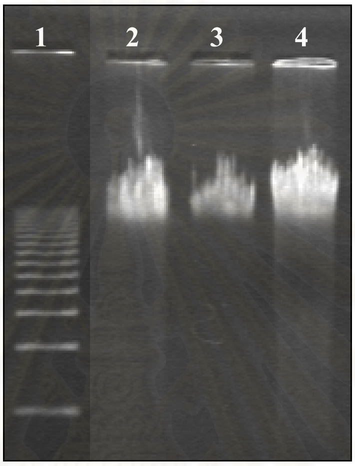
ภาพที่ 4.7 (ต่อ) ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (จ) และ (ฉ) แสดงภาพด้านในตัวกลาง (ช) และ (ซ) แสดงภาพด้านนอกของตัวกลาง รูปด้านซ้ายแสดงภาพตัวกลางที่ไม่มีแบคทีเรียเกาะ รูปด้านขวาแสดงภาพแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้บนตัวกลาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การเปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้กับแบคทีเรียในบ่อบำบัด

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตะกอนใยกรองและจากตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตะกอนใยกรอง ที่เก็บมาพร้อมกับการทดลองข้อ 4.2 และจากตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลังจากผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน จากข้อ 4.2 ด้วยวิธี freeze-thaw ดัดแปลงจาก Tsai และ Olson (1991) เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 4.1 สามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้ จากภาพที่ 4.8 สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน



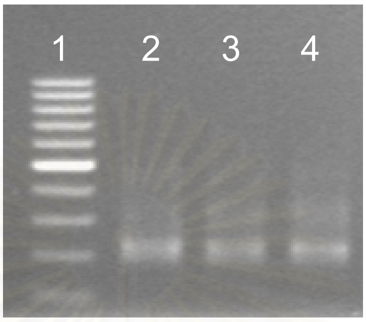
ภาพที่ 4.8 Genomic DNA ของแบคทีเรียจากตัวอย่าง จากซ้ายไปขวา marker 1 kb DNA ladder (ช่องวิ่งที่ 1) *E. coli* (ช่องวิ่งที่ 2) แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (ช่องวิ่งที่ 3) แบคทีเรียจากใยกรอง (ช่องวิ่งที่ 4)

4.3.2 การเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 4.2.1 นำมาเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ใช้ไพรเมอร์ (DNA primers) 2 แบบ คือ 16S universal primers ได้แก่ 338f-gc และ 518r ตามวิธีของ Ye และคณะ (2007) และ 16S AOB primers ได้แก่ CTO189f-gc และ CTO654r ตามวิธีของ Kowalchuk และคณะ (1997)

4.3.2.1 16S universal primers

ผลการเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วยไพรเมอร์ (DNA primers) คือ 338f-gc และ 518r ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 200 คู่เบส ไพรเมอร์ชนิดนี้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ที่ตำแหน่ง 16S rDNA ของแบคทีเรียทั่วไป ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องอิเลคโทรโฟเรซิสพบแถบผลิตภัณฑ์ขนาด 200 คู่เบส จากตัวอย่างทั้งหมดได้ชัดเจน ดังภาพที่ 4.9

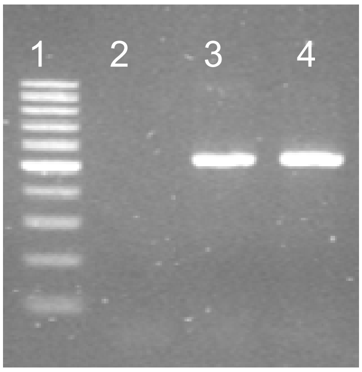


ภาพที่ 4.9 ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสจาก Genomic DNA ของไพรเมอร์ 16S universal จากซ้ายไปขวา marker 100 bp DNA ladder (ช่องวิ่งที่ 1) *E. coli* (ช่องวิ่งที่ 2) แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (ช่องวิ่งที่ 3) แบคทีเรียจากใยกรอง (ช่องวิ่งที่ 4)

4.3.2.2 16S AOB primers

ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสจากไพรเมอร์ (DNA primers) ชนิดนี้มีขนาด 465 คู่เบส จากภาพที่ 4.10 พบแถบผลิตภัณฑ์ที่ตำแหน่งประมาณ 500 คู่เบส จากตัวอย่างดีเอ็นเอของตะกอนจากตัวกลาง และตะกอนจากใยกรอง แต่ไม่พบแถบผลิตภัณฑ์จากดีเอ็นเอของ *E. coli* ทั้งนี้เนื่องจากไพรเมอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียกลุ่ม AOB ที่ตำแหน่ง 16S ดังนั้นจึงไม่พบแถบผลิตภัณฑ์จากดีเอ็นเอของ *E. coli*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



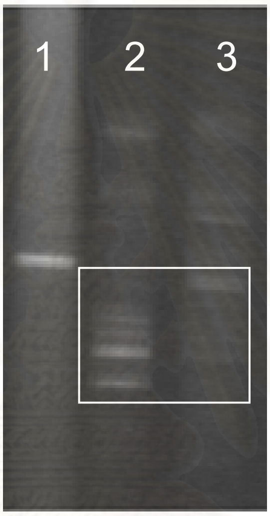
ภาพที่ 4.10 ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสจาก Genomic DNA ของไพรเมอร์ 16S AOB จากซ้ายไปขวา marker 100 bp DNA ladder (ช่องวิ่งที่ 1) *E. coli* (ช่องวิ่งที่ 2) แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (ช่องวิ่งที่ 3) แบคทีเรียจากใยกรอง (ช่องวิ่งที่ 4)

4.3.3 การแยกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธี DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

DGGE โดยใช้ 16S universal primers

โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสที่ใช้ไพรเมอร์ (DNA primers) คือ 338f-gc และ 518r แสดงดังภาพที่ 4.11 พบว่าแถบที่ชัดเจนของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (ช่องวิ่งที่ 2) ไม่ตรงกับแถบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของแบคทีเรียจากใยกรอง (ช่องวิ่งที่ 3) แสดงว่าแบคทีเรียกลุ่มเด่นในใยกรองน่าจะเป็นคนละชนิดกับแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากในระบบบำบัดจริงนั้นน้ำเสียอาจมีสารอาหารและสภาวะที่เหมาะกับแบคทีเรียหลากหลายชนิดมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการทดลองของ Itoi และคณะ (2006) ศึกษาประชากรของแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพในระบบบำบัดน้ำแบบหมุนเวียนน้ำจากการเพาะเลี้ยงปลาปักเป้า โดยใช้ universal primers พบว่าบนตัวกรองชีวภาพพบแบคทีเรียหลากหลายกลุ่ม เช่น Actinobacteria, α-Proteobacteria, Bacilli, β-Proteobacteria, Clostridia, Flavobacteria, γ-Proteobacteria, Mollicutes, Planctomycetacia, Sphingobacteria, Verrucomicrobia และ Unclassified bacteria ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่พบมากที่สุดตามลำดับได้แก่ γ-Proteobacteria, Flavobacteria และ Sphingobacteria นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง ได้แก่กลุ่ม *Nitrosomonas* sp. เช่นเดียวกับการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ 338f-gc และ 518r ซึ่งเป็น universal primers เช่นกัน จึงสามารถจับกับดีเอ็นเอตำแหน่ง V3 ของ 16S rDNA genes ของแบคทีเรียได้ทุกชนิด อย่างไรก็ตามในการทดลองช่วงแรกนั้น เป็นการศึกษาภาพรวมของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรียบนใยกรอง เพื่อสังเกตความหลากหลายและกลุ่มประชากรเด่นของแบคทีเรียบนใยกรองและใน

อาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสจากตารางที่ 4.1 พบแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (Uncultured bacterium) ซึ่งไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มไนทริฟายอิงตามที่ต้องการจริงหรือไม่ อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ (ภาพที่ 4.5) ก็พบว่าประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการบำบัดแอมโมเนียที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่าง ๆ กัน สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ทุกวัน ดังนั้นแม้ว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จะไม่ใช่แบคทีเรียกลุ่มเด่นในใยกรอง แต่เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการบำบัดแอมโมเนีย โดยทั่วไปการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายเออร์ จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่มนี้ (Nicolaisen และ Ramsing, 2002)



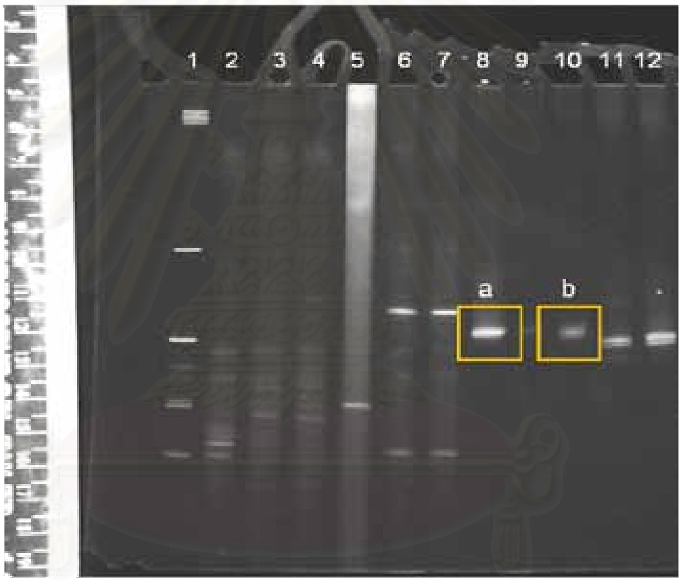
ภาพที่ 4.11 การวิเคราะห์ DGGE ของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสที่ใช้ไพรเมอร์ 16S universal เกรเดียนท์ของความเข้มข้น denaturant คือ 30 – 70% จากซ้ายไปขวา *E. coli* (ช่องวิ่งที่ 1) แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (ช่องวิ่งที่ 2) แบคทีเรียจากใยกรอง (ช่องวิ่งที่ 3)

จากภาพที่ 4.11 เมื่อนำตำแหน่งของแถบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสมาเปรียบเทียบกับตำแหน่งของภาพที่ 4.3 พบว่าแถบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของแบคทีเรียบนใยกรองมีความคล้ายคลึงกันในบางตำแหน่ง เนื่องจากตะกอนจากใยกรองที่ใช้ในการสกัดดีเอนเอเป็นตะกอนที่เก็บที่เวลาแตกต่างกัน ดังนั้นจึงอาจมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ (Itoi และคณะ, 2006) ทำให้แถบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสมีความแตกต่างกันบ้าง ในขณะที่แถบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อในภาพที่ 4.11 และ ภาพที่ 4.3 มีความแตกต่างกันมากกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่างกัน (1 เดือนกับ 3 เดือน) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานาน ก็อาจทำให้แบคทีเรียบนใยกรองมีความจำเพาะมากขึ้น

แบคทีเรียที่ไม่สามารถทนต่อแอมโมเนียได้ก็จะไม่สามารถอยู่รอดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้แถบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสที่พบในภาพที่ 4.11 มีจำนวนไม่มากเท่ากับแถบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสที่พบในภาพที่ 4.3

DGGE โดยใช้ 16S AOB primers

โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสที่ใช้ไพรเมอร์ คือ CTO189f-gc และ CTO654r แสดงดังภาพที่ 4.12 พบแถบผลิตภัณฑ์เพียงตัวอย่างละ 1 แถบเท่านั้น โดยแถบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของตะกอนจากตัวกลางมีความคมชัดกว่าแถบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของตะกอนใยกรอง เมื่อใช้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้น ก่อนทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเท่ากัน ดังนั้นสามารถบอกได้ว่าประชากรแบคทีเรียในกลุ่มของ AOB จากตัวอย่างตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีมากกว่าในตัวอย่างจากใยกรอง



ภาพที่ 4.12 การวิเคราะห์ DGGE ของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรส จากซ้ายไปขวา marker 100 bp DNA ladder (ช่องวิ่งที่ 1) แถบโครงสร้างประชากรของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของไพรเมอร์ 16S universal (ช่องวิ่งที่ 2-7) แถบโครงสร้างประชากรของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของไพรเมอร์ CTO189f-gc และ CTO654r (ช่องวิ่งที่ 8-12) เกรเดียนท์ของความเข้มข้น denaturant คือ 30 – 70% (a) แสดงแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (b) แสดงแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากใยกรอง

จากนั้นจึงใช้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสทั้งหมดโคลนเข้าสู่พลาสมิด และสุ่มเลือกตัวอย่างโคลนที่ให้โคโลนีสีขาวส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของไพรเมอร์ CTO189f-gc และ CTO654r แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Nitrosomonas* ทั้งที่เป็น uncultured *Nitrosomonas* sp. *Nitrosomonas* sp. Nm51 และ *Nitrosomonas marina* ซึ่งสามารถแยกได้จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมที่มีแอมโมเนียปนเปื้อนทั้งจากการเลี้ยงสัตว์น้ำและระบบบำบัดน้ำเสียแบบไนทริฟายอิง ตัวอย่างที่พบมากที่สุดคือแบคทีเรียกลุ่ม uncultured *Nitrosomonas* sp. (รหัส EU155078.1) ซึ่งแยกได้จากตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้ง (Ma และ Wang, ไม่ตีพิมพ์) โดยพบทั้งหมด 5 ตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากใยกรอง พบแบคทีเรียในกลุ่ม Uncultured *Nitrosomonas* sp. (รหัส EU155078.1) 4 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.3) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (uncultured bacterium) รหัส AM29552.1 8 ตัวอย่าง และรหัส EF175894.1 1 ตัวอย่าง ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมที่มีแอมโมเนียปนเปื้อนจากการเลี้ยงสัตว์น้ำ และ activated sewage sludge ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับใยกรอง พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่มที่เหมือนกันคือ Uncultured *Nitrosomonas* sp. (EU155078.1) ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้ ถือว่าเป็นแบคทีเรียเด่นที่พบได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและใยกรอง แสดงว่าวิธีการและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้ สามารถใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในกลุ่ม AOB ที่เด่นในระบบบำบัดน้ำเสียนี้ได้

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของดีเอ็นเอจากแม่แบบ 16S AOB (M หมายถึง แบคทีเรียจากตัวกลาง และ F หมายถึง แบคทีเรียจากใยกรอง)

พลาสมิด	Accession	Max ident	ชนิดของแบคทีเรีย	แยกได้จาก	อ้างอิง
M1	AY683482.1	99%	uncultured *Nitrosomonas* sp.	aquarium biofilter	Grommen และคณะ, 2005.
M3, M8	AF272418.1	97%	*Nitrosomonas marina*	Nitrifying wastewater treatment plants	Purkhold และคณะ, 2000.
M6, M9, M10, M11, M12	EU155078.1	98%	uncultured *Nitrosomonas* sp.	prawn farm sediment	Ma และ Wang, ไม่ตีพิมพ์
M14	AF272424.1	99%	*Nitrosomonas* sp. Nm51	Nitrifying wastewater treatment plants	Purkhold และคณะ, 2000.
F6, F14, F16, F17	EU155078.1	98%	uncultured *Nitrosomonas* sp.	prawn farm sediment	Ma และ Wang, ไม่ตีพิมพ์
F7, F8, F9, F10, F12, F13, F15, F18	AM295532.1	98%	uncultured bacterium	Marine aquaculture biofilm	Foesel และคณะ, 2008.
F11	EF175894.1	99%	uncultured bacterium	activated sewage sludge	Hornek และคณะ ไม่ตีพิมพ์

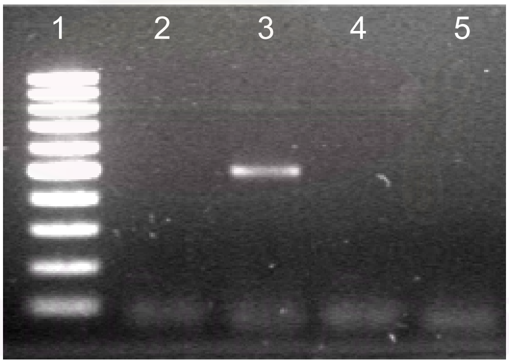
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.4 การสกัดอาร์เอนเอของตะกอนแบคทีเรียจากตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สกัดอาร์เอนเอจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปวัดปริมาณอาร์เอนเอ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คือ 0.0202 และ 0.0104 ตามลำดับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เมื่อนำไปคำนวณปริมาณอาร์เอนเอ จากสูตรการคำนวณความเข้มข้นของอาร์เอนเอ ได้ปริมาณอาร์เอนเอ 80.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3.5 Reverse transcription และการเพิ่มจำนวน 16S rRNA โดยวิธี PCR

นำตัวอย่างอาร์เอนเอที่สกัดได้จากข้อ 4.3.4 เพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยชุด one step RT-PCR kit ที่มีเอนไซม์ reverse transcriptase อยู่ในชุดผลิตภัณฑ์แล้ว เพื่อเปลี่ยนอาร์เอนเอที่สกัดได้ไปเป็นซีดีเอ็นเอก่อนเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสต่อไป ไพรเมอร์ที่ใช้คือ CTO189f-gc และ CTO654r ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.13 โดยพบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 500 คู่เบส ของอาร์เอนเอที่สกัดจากแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อในช่องวิ่งที่ 3 แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากชุดควบคุม (ไม่เติมอาร์เอนเอ) ในขณะที่การเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบไม่มี Reverse transcription (ช่องวิ่งที่ 4 และ 5) ไม่พบแถบผลิตภัณฑ์ แสดงได้ว่าตัวอย่างอาร์เอนเอที่สกัดได้เป็นอาร์เอนเอจากแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อจริง และไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน

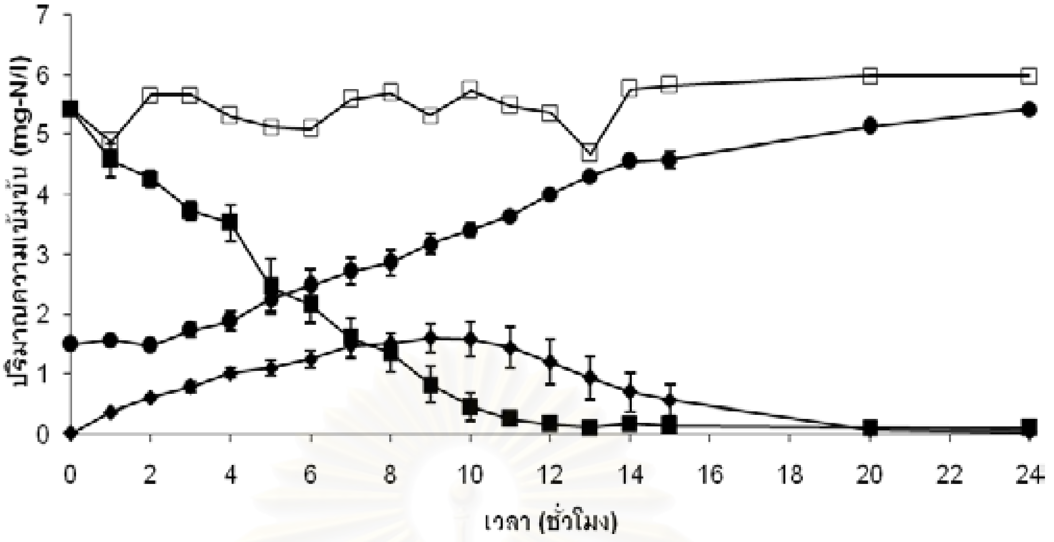


ภาพที่ 4.13 ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยวิธี Reverse transcription ช่องวิ่งที่ 1 100 คู่เบส DNA ladder ช่องวิ่งที่ 2 และ 3 เป็นชุดควบคุมและอาร์เอนเอจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ตามลำดับ ช่องวิ่งที่ 4 และ 5 เป็นผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่ไม่มี Reverse transcription โดยเป็นชุดควบคุมและอาร์เอนเอจากแบคทีเรียของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ตามลำดับ

จากผลการทดลองในข้อ 4.3.4 สามารถบอกได้ว่าผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอเรสของอาร์เอนเอที่พบนั้น เป็นอาร์เอนเอจากตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มของไนทริฟายอิงแบคทีเรีย โดยใช้ไพรเมอร์ CTO189f-gc และ CTO654r เช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของดีเอ็นเอดังการทดลองข้อ 4.3.2.2 แสดงว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 4.2 นั้น มีแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงและแบคทีเรียดังกล่าวมีชีวิตและมีกิจกรรมในการย่อยสลายแอมโมเนียได้จริง

4.4 กิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียสังเคราะห์

การทดลองนี้เป็นการทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาช่วงเวลาในการลดลงของปริมาณแอมโมเนีย สำหรับใช้เป็นแนวทางในการศึกษาอัตราเร็วของการบำบัดน้ำเสียที่มีแอมโมเนียด้วยแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในการทดลองถัดไป โดยนำแบคทีเรียที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวจากข้อ 4.2 มาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแทนน้ำเสียสังเคราะห์ ใส่แบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนตัวกลาง 20 ลูก ต่อขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 1 ขวด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียประมาณ 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยทั่วไปพบว่า ปริมาณแอมโมเนียที่พบในน้ำมีค่าไม่เกิน 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร อย่างไรก็ตามในการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นและใช้ระบบหมุนเวียนน้ำ ถ้าไม่มีการบำบัดแอมโมเนียจะสามารถเกิดการสะสมของแอมโมเนียได้สูงขึ้น ดังนั้นจึงทดสอบแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้กับการบำบัดแอมโมเนียที่ความเข้มข้นสูงกว่า ปริมาณความเข้มข้นที่พบในน้ำจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วไป ผลที่ได้พบว่าแอมโมเนียที่เติมลงไปประมาณ 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร สามารถเปลี่ยนเป็นไนไตรต์และไนเตรตได้หมดภายในเวลาประมาณ 13 ชั่วโมง และปริมาณความเข้มข้นของไนไตรต์หายไปภายในเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง ผลการทดสอบประสิทธิภาพแสดงดังภาพที่ 4.14 แสดงว่าแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มคือ AOB และ NOB สามารถมีกิจกรรมในน้ำเสียสังเคราะห์ได้และช่วงเวลาที่สามารถบำบัดแอมโมเนียได้หมด คือ 13 ชั่วโมง



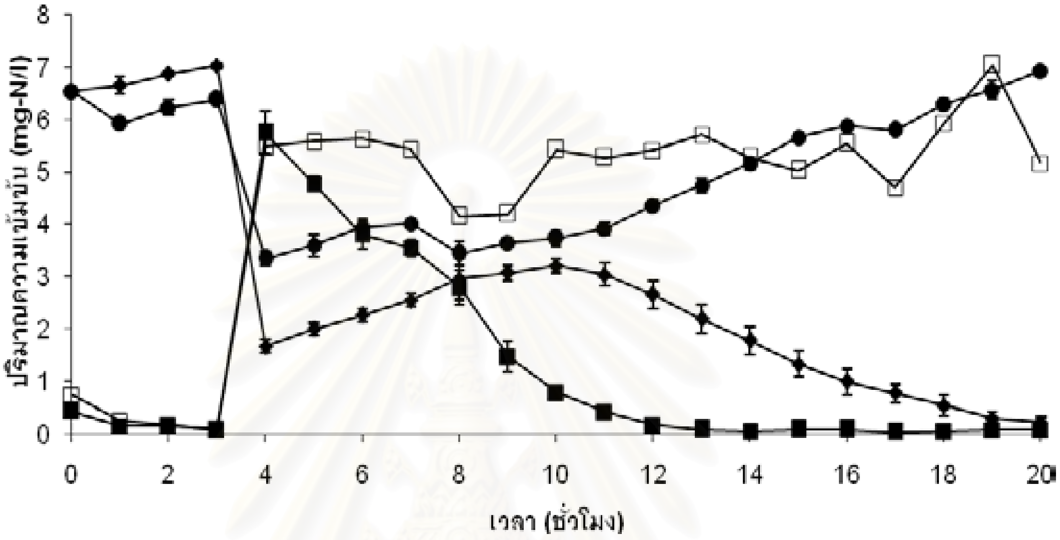
ภาพที่ 4.14 ประสิทธิภาพการบำบัดแอมโมเนีย และไนไตรต์ ในน้ำเสียสังเคราะห์ ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ (●,◆,■,□ แสดงไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนีย และ แอมโมเนียในชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย ตามลำดับ)

4.5 กิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียจริง

4.5.1 ประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ในน้ำเสียจริง

การทดลองนี้เป็นการทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำเสียจริง โดยเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 4.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ของแบคทีเรียในน้ำเสียจริง จากระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำ ของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยี ชีวภาพทางทะเล พบว่ามีปริมาณแอมโมเนียน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ดังนั้นจึงทำการเติมแอมโมเนียไนโตรเจนลงในน้ำเสียจริงดังการทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์ในชั่วโมงที่ 4 เพื่อศึกษาช่วงเวลาในการลดลงของแอมโมเนีย ผลการทดลองพบว่าน้ำเสียจริงมีปริมาณแอมโมเนียต่ำ (น้อยกว่า 0.5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) แต่มีปริมาณไนไตรต์สะสมอยู่ค่อนข้างสูง (ประมาณ 6.5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) และเมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 3 พบว่าปริมาณแอมโมเนียลดลงจนใกล้หมด และปริมาณไนไตรต์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จากการทดสอบประสิทธิภาพในน้ำเสียสังเคราะห์พบว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้สามารถย่อยสลายแอมโมเนียและไนไตรต์ได้ ดังนั้นเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้บนตัวกลางในการบำบัดแอมโมเนียในน้ำเสียจริง จึงทำการเติมแอมโมเนียลงในน้ำเสียจริงในชั่วโมงที่ 4 ในชั่วโมงที่ 4 พบว่าปริมาณไนไตรต์จากชั่วโมงที่ 3 ลดลงอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ที่มีบทบาทมากขึ้นภายหลัง

จากการปรับตัวในน้ำเสียจริง ปริมาณแอมโมเนียที่เติมลงไปลดลงหมดภายในเวลาประมาณ 10 ชั่วโมง นับจากการเติมแอมโมเนียประมาณ 5.5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 4 และปริมาณไนไตรต์สามารถลดลงหมดภายในเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.15 แสดงว่าไนทริฟายอิงแบคทีเรียสามารถมีกิจกรรมในน้ำเสียจริงได้ และช่วงเวลาในการบำบัดแอมโมเนียคือ 10 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.15 ประสิทธิภาพการบำบัดแอมโมเนีย และไนไตรต์ ในน้ำเสียจริง ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ (●,◆,■,□ แสดงไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนีย และแอมโมเนียในชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย ตามลำดับ)

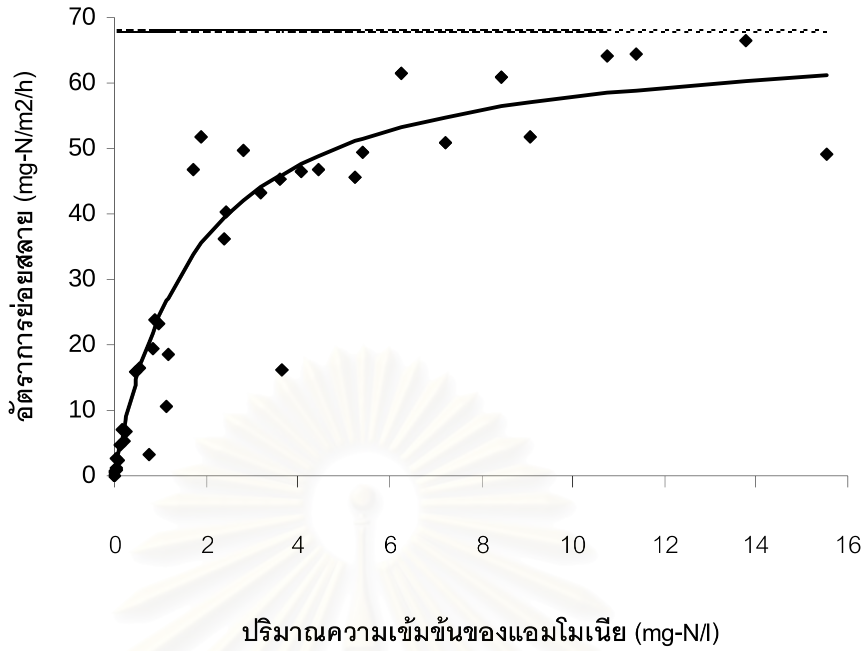
จากประสิทธิภาพของการบำบัดแอมโมเนีย และไนไตรต์ ในน้ำเสียทั้งสองชนิดพบว่า การบำบัดแอมโมเนียในน้ำเสียจริงใช้เวลาน้อยกว่าการบำบัดแอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะของสารอาหารในน้ำเสียจริงมีองค์ประกอบ เช่น สารอาหาร หรือสารเคมีอื่นๆ ที่เหมาะสมกับการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงมากกว่าในน้ำเสียสังเคราะห์ ทำให้แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ มีกิจกรรมการบำบัดแอมโมเนียในน้ำเสียจริงได้ดีกว่าน้ำเสียสังเคราะห์ ดังนั้นจากผลการทดลองนี้สามารถบอกได้ว่าในน้ำเสียจริง แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ก็ยังคงมีประสิทธิภาพในการบำบัดได้ดี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้งานจริงในอนาคต

4.5.2 อัตราการย่อยสลายแอมโมเนียไนโตรเจน

การศึกษาอัตราการย่อยสลายของแอมโมเนียไนโตรเจน ของแบคทีเรียบนตัวกลางจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนตัวกลางจากอาหารเลี้ยงเชื้อกับงานวิจัยอื่น ๆ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียเป็น 1, 3, 5, 10

และ 15 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร แล้วนำผลการบำบัดแอมโมเนียต่อเวลา (ภาคผนวก) ที่ได้มาคำนวณหาอัตราเร็วของการย่อยสลายเปรียบเทียบกับพื้นที่และเวลา ซึ่งพื้นที่ของตัวกลาง 1 ลูก คือ 0.000894 ตารางเมตร (มนวิกานต์, 2551) และในปริมาตร 1 ลิตร มีตัวกลางประมาณ 926 ลูก ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.16 จากรูปพบว่าอัตราเร็วสูงสุดในการย่อยสลายแอมโมเนียของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้คือ 67.9 mg-N/m^2/h เมื่อผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาประมาณ 4 เดือน จากงานวิจัยของ Tal และคณะ (2003) ที่ศึกษาอัตราการย่อยสลายแอมโมเนีย ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดของไบโอฟิล์มบนตัวกลาง polyethylene beads โดยใส่ตัวกลางในระบบบำบัดน้ำ ซึ่งเป็นถังขนาด 2 ลูกบาศก์เมตร ที่ต่อกับบ่อเลี้ยงปลาทะเล มีน้ำเข้าตลอดเวลา เรียกระบบนี้ว่า high organic load เดินระบบเป็นเวลา 4 เดือน แล้วย้ายตัวกลางทั้งหมดมาใส่ในถังขนาด 5 ลิตร ที่ไม่ต่อกับบ่อเลี้ยงปลาทะเล เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ทุกวัน เรียกระบบนี้ว่า low organic load พบว่าระบบบำบัดที่เป็น low organic load มีอัตราการย่อยสลาย 31.5 mg NH–N/m^2/h ในขณะที่ระบบบำบัดที่เป็น high organic load มีอัตราการย่อยสลาย 25 mg NH–N/m^2/h แสดงว่าแบคทีเรียบนตัวกลางที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของการศึกษานี้ มีประสิทธิภาพดีกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวกลาง BCN 009 ที่ใช้มีพื้นที่ผิว 828 ตารางเมตรต่อลูกบาศก์เมตร ซึ่งมากกว่าพื้นที่ผิวของ polyethylene beads ของ Tal และคณะ (2003) เมื่อมีพื้นที่ผิวให้แบคทีเรียสามารถเกาะได้มากกว่า ประสิทธิภาพของการบำบัดจึงดีกว่า (Mizuno และคณะ, 2005) รวมทั้งในตอนเริ่มเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการทดลองข้อ 4.2 ได้เติมแอมโมเนีย 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย ในขณะที่ Tal และคณะ (2003) ใช้น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลาซึ่งมีแอมโมเนียน้อยกว่า อาจทำให้แบคทีเรียมีกิจกรรมในการบำบัดแอมโมเนียดีกว่า จากผลการทดลองนี้บ่งบอกได้ว่าแบคทีเรียบนตัวกลางที่เพาะเลี้ยงได้นี้น่าจะสามารถนำไปใช้ในการบำบัดแอมโมเนียในน้ำเสียจริงได้จริง

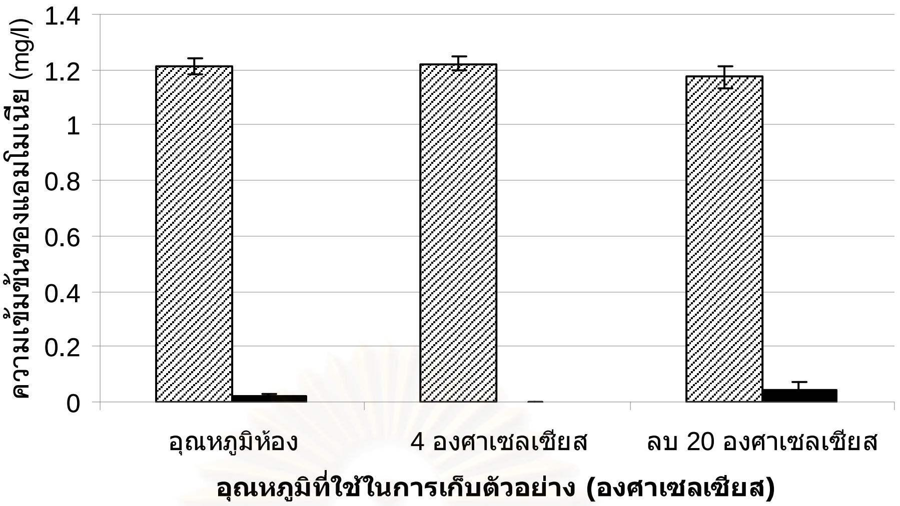
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.16 อัตราการย่อยสลายของแอมโมเนียไนโตรเจนในน้ำเสียจริงของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้

4.6 การรักษาสภาพหัวเชื้อ

ทดสอบการเก็บเซลล์ตรึงบนตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติม 15% กลีเซอรอล เช่นเดียวกับการทดลองของ Vogelsang และคณะ (1999) เพื่อรักษาสภาพของเซลล์แบคทีเรียให้ถูกทำลายจากสภาวะแวดล้อมภายนอกเซลล์น้อยที่สุด เก็บเชื้อในสภาวะต่างกัน 3 สภาวะ คือ เก็บที่อุณหภูมิห้อง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายแอมโมเนีย ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.17 จากรูปพบว่าเมื่อนำตัวกลางที่มีเซลล์ตรึงอยู่ 5 ลูก มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมกับตัวกลางใหม่อีก 15 ลูก เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถย่อยสลายแอมโมเนียความเข้มข้นประมาณ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรได้หมด และหัวเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ โดยพบว่าปริมาณแอมโมเนียที่เหลืออยู่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คือ 0.0017 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในขณะที่หัวเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีปริมาณแอมโมเนียเหลืออยู่ 0.0193 และ 0.04 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4.17 การบำบัดแอมโมเนียของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้เมื่อผ่านการเก็บรักษาหัวเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (RT), 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส กราฟลายเส้น แสดงปริมาณแอมโมเนียที่เติมไปครั้งแรก กราฟสีดำล้วน แสดงปริมาณแอมโมเนียเมื่อบำบัดผ่านไป 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลองแสดงว่าวิธีการนี้สามารถใช้เก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียได้ เนื่องจากเมื่อผ่านการเก็บเชื้อในอาหารเหลวที่เติม 15% กลีเซอรอล เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำหัวเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงใหม่แบคทีเรียยังคงมีประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนียอยู่ ดังผลการทดลองข้างต้น และเมื่อเลี้ยงต่อไปในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมแอมโมเนีย 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์สามารถเห็นตะกอนสีน้ำตาลเกาะอยู่บนตัวกลางได้อย่างชัดเจน ซึ่งตะกอนสีน้ำตาลนี้มีลักษณะเดียวกันกับตะกอนที่พบจากการทดลองข้อ 4.2 อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาหัวเชื้อในการทดลองนี้ใช้เวลาในการเก็บไม่นาน จึงอาจไม่เห็นความแตกต่างของประสิทธิภาพภายหลังการเก็บรักษามากนัก ดังนั้นการรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียให้มีประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนียอยู่เสมอ สามารถทำได้โดยใส่ตัวกลางที่มีแบคทีเรียเกาะอยู่ 5 ลูก ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร 1 ขวด ที่มีตัวกลางใหม่ 15 ลูก เขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมแอมโมเนียทุกวัน เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ก็สามารถเพิ่มจำนวนหัวเชื้อได้ เนื่องจากงานวิจัยของ สรวิศ เผ่าทองศุข และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต (2550) พบว่าในการเตรียมตัวกรองชีวภาพที่มีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยึดเกาะอยู่นั้น ต้องใช้ระยะเวลาในการเตรียมตัวกรองชีวภาพนานประมาณ 1 เดือน ถึงจะสามารถนำมาใช้ในระบบบำบัดน้ำแบบหมุนเวียนน้ำได้ ซึ่งถ้ามีหัวเชื้อแบคทีเรียแล้วสามารถช่วยลดระยะเวลาในการเตรียมตัวกรองชีวภาพลงได้ ซึ่งจะเป็น

ประโยชน์ต่อการใช้แบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง ในบ่อบำบัดน้ำเสียของระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในอนาคตต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง จากระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงในอดีต พบว่ายังมีข้อจำกัดอยู่มาก ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่โตช้า เมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ทั่วไป รวมทั้งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Tal และคณะ, 2003) อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกลุ่มนี้จัดว่าเป็นกลุ่มที่มีบทบาทในการย่อยสลายแอมโมเนียและไนไตรต์ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกลุ่ม heterotroph (Antony และ Philip, 2006) ดังนั้นในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไนตริฟิเคชัน เช่น ระบบบำบัดน้ำเสียแบบหมุนเวียนน้ำ (RAS) จึงต้องการใช้แบคทีเรียกลุ่มนี้ในการบำบัด การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงในระบบบำบัดน้ำเสีย จากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบหมุนเวียนน้ำในประเทศไทย โดยสุธาสินี อ่วมจันทร์ (2546) โดยใช้ไบโอบอล (bioball) เป็นตัวกลางให้แบคทีเรียยึดเกาะ พบแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงและแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ในน้ำทะเลเริ่มต้นก่อนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ไนทริฟิเคชั่น และบางชนิดยังคงพบได้ตลอดการทดลอง และในการทดลองของสรวิศ เผ่าทองศุข และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต (2550) ได้ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นเวลากว่า 1 ปี ในระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดที่มีระบบบำบัดน้ำแบบ Nitrification Biofilter ซึ่งใช้ใยกรองไบโอโพลีมาเป็นตัวกลางให้แบคทีเรียยึดเกาะ พบว่าสามารถบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ได้เป็นอย่างดี การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงเพื่อให้รู้ถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเลี้ยงเชื้อ จึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการพัฒนาเทคนิคในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะน้ำเสียจากระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิด ที่มีปริมาณแอมโมเนียในระบบตลอดเวลา ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง โดยดัดแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อและเติมตัวกลางพลาสติกเพื่อเพิ่มพื้นที่ให้แบคทีเรียยึดเกาะ และมีการเติมอาหารเลี้ยงกุ้งเพื่อเลียนแบบสภาวะจริงในบ่อบำบัดน้ำเสีย ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า

1. จากการทดลองพบว่าเมื่อผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน สังเกตเห็นไบโอฟิล์มสีน้ำตาลบนตัวกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อนำตัวกลางที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์การเจริญบนตัวกลางภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่ามีเซลล์เกาะบนตัวกลางเป็นกลุ่ม ๆ เมื่อนำตัวกลางที่ได้ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เติมแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 2, 5 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกวัน ปริมาณแอมโมเนียก็สามารถลดลงจนหมดภายใน 1 วัน ได้ทุกความเข้มข้น ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ ปริมาณแอมโมเนียไม่ลดลง แสดงให้

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เห็นว่ามีแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงเจริญเป็นไบโอฟิล์มบนตัวกลาง แสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารที่คัดเลือกได้ซึ่งประกอบด้วยอาหารกุ้ง 90 มิลลิกรัมต่อลิตรและโซเดียมคาร์บอเนต 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) และวิธีการในการเพาะเลี้ยงนี้สามารถใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงแบคทีเรีย และแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้บนตัวกลางจากอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ สามารถย่อยสลายแอมโมเนียในน้ำเสียจริงได้

2. ในการเปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียบนตัวกลางจากอาหารเลี้ยงเชื้อกับแบคทีเรียจากใยกรองในบ่อบำบัดน้ำเสียของระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่มที่เหมือนกันคือ Uncultured *Nitrosomonas* sp. (EU155078.1) แสดงว่าวิธีการและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้ สามารถใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในกลุ่ม AOB ที่เด่นในระบบบำบัดน้ำเสียนี้ได้

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนตัวกลางที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 เดือนในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริง ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียประมาณ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าน้ำเสียทั้งสองชนิดมีความเข้มข้นของแอมโมเนียและไนไตรต์ลดลงจนหมดภายใน 20 ชั่วโมง ในการคิดอัตราการย่อยสลายแอมโมเนียของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้นี้ พบว่ามีอัตราการย่อยสลาย 67.9 mg-N/m^2/h ซึ่งสูงกว่างานวิจัยอื่น ๆ เช่น Tal และคณะ (2003)

4. การเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าแบคทีเรียที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมการย่อยสลายแอมโมเนียดีที่สุด ทั้งนี้การรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียให้มีประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนียอยู่เสมอ สามารถทำได้โดยใส่ตัวกลางที่มีแบคทีเรียเกาะอยู่ 5 ลูก ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร 1 ขวด ที่มีตัวกลางใหม่ 15 ลูก เขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมแอมโมเนียทุกวัน เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ก็สามารถเพิ่มจำนวนหัวเชื้อได้ ดังนั้นวิธีการเลี้ยงเชื้อนี้จึงสามารถใช้เลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงได้จริง และแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังคงมีบทบาทในการย่อยสลายแอมโมเนียได้เมื่อผ่านการเก็บรักษาหัวเชื้อ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำในอนาคตต่อไป

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป

1. งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลศึกษาแบคทีเรียไนทริฟายอิง กลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย (AOB) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนียมีความสำคัญเป็นอันดับแรก ในการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนจากการเลี้ยงกุ้ง ในขณะที่ไนทริฟายอิงแบคทีเรียอีกกลุ่มคือ แบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ (NOB) ไม่ได้มีการศึกษาอย่างจริงจัง เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทภายหลังจากแบคทีเรียกลุ่ม

ออกซิไดซ์แอมโมเนีย อย่างไรก็ดีผลการวิจัยนี้พบว่าปริมาณไนไตรต์ที่เพิ่มขึ้นหลังการออกซิไดซ์แอมโมเนีย จะมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ทั้งในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริง แสดงว่ามีแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์อยู่ร่วมกับแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนียบนตัวกลางที่เพาะเลี้ยงได้ ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงควรมีการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้แบบเจาะจงมากขึ้น เช่น การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ของ Spieck และคณะ (2006) ที่ศึกษาวิธีการในการเพาะเลี้ยง *Nitrospira*-like bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้มาก่อนได้สำเร็จ แต่ก็ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงยาวนาน หรือการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาช่วยในการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่นงานวิจัยของ Wertz และคณะ (2008) ที่ได้พัฒนาเทคนิค PCR-DGGE สำหรับใช้ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในกลุ่ม *Nitrobacter*-like bacteria โดยใช้ดีเอนเอแม่แบบจับที่ตำแหน่ง partial *nrxA* gene sequences (*Nb-nxrA*)

2. ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของไนทริฟายอิงแบคทีเรีย บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้ เนื่องจากในขั้นตอนการถ่ายโคโลนีเดี่ยวลงอาหารจานใหม่ ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งนี้ Juretschko และคณะ (1998) ได้ศึกษา nitrifying activated sludge จากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยวิธี FISH พบว่าแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนียและแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์ อยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มประชากร แสดงถึงความสัมพันธ์ที่เกื้อหนุนกัน การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มจะช่วยให้เข้าใจถึงกิจกรรมของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม แล้วนำมาเป็นข้อมูลในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม และการคัดเลือกสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม สำหรับใช้คัดแยกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย เพื่อนำไปศึกษาถึงลักษณะและกิจกรรมของแบคทีเรียแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน
3. การเก็บรักษาสภาพหัวเชื้อของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ ใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษาสั้น ทำให้ไม่สามารถเห็นข้อแตกต่างของระยะเวลาและประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพหัวเชื้อมากนัก ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงควรเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาสภาพหัวเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ เพื่อแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของวิธีการเก็บรักษาหัวเชื้อสำหรับนำไปใช้งานในอนาคต

รายการอ้างอิง

กษิดิศ หนูทอง. 2551. การบำบัดไนโตรเจนในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบปิด: Nitrogen Treatment in Closed – System Aquaculture วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง 16(1) (เมษายน 2551) : 11-22.

กิจจา ใจเย็น. 2548. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของไทย [online] แหล่งที่มา : http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=154 [31 มีนาคม 2552].

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2546. จุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้ง (Microorganisms and Shrimp Production) [online] แหล่งที่มา : http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=131[31 มีนาคม 52].

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2545. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.

ธัญญา พันธ์ฤทธิ์ดำ. 2541. ระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดที่มีระบบดีไนตริฟิเคชันสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภาพร กิตติมศักดิ์. 2541. การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำระหว่างระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดที่มีตัวกรองชีวภาพแบบไบโอดรัมและแบบใต้น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประจวบ หล่ำอุบล. 2546. การเลี้ยงกุ้งทะเล [online] แหล่งที่มา : http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=134 [31 มีนาคม 52].

มนวิกานต์ ขจรบุญ. 2551. การคัดเลือกหัวเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียเพื่อการประยุกต์ใช้กับตัวกรองชีวภาพสำหรับระบบน้ำหมุนเวียนของบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งระบบปิด วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มะลิ บุณยรัตผลิน นิพนธ์ ศิริพันธ์ และ ศิริ ทุกขวินาศ. 2546. แนวทางและข้อกำหนดสำหรับการเลี้ยงกุ้งทะเลระบบอินทรีย์: Guideline and Regulation for Oraganic Marine Shrimp Farming in Thailand [online] แหล่งที่มา : http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=146 [31 มีนาคม 52].

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และไพพรรณ พรประภา. 2544. การจัดการคุณภาพน้ำและการบำบัดน้ำเสียใน

บ่อเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ เล่ม 1 การจัดการคุณภาพน้ำ พิมพ์ครั้งที่ 4 กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สรวิศ เผ่าทองศุข และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. 2550. การเลี้ยงกุ้งในระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดในโรงเรือน เอกสารประกอบการสัมมนา เรื่อง นวัตกรรมและทิศทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบหมุนเวียนแบบปิดในประเทศไทย สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ.

สุธาสินี อ่วมจันทร์. 2546. การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพแบบไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันสำหรับการเพาะเลี้ยงทางน้ำ วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2548. จุลชีววิทยาของน้ำเสีย (WASTEWATER MICROBIOLOGY) กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรพล เรืองสิริ. 2544. กรมควบคุมมลพิษ จัดแถวเลี้ยงกุ้งให้ยั่งยืน มาควบคุมน้ำทิ้งกันเถอะ [online] แหล่งที่มา : http://www.geocities.com/takaidow/pm22/ks22b.htm [31 มีนาคม 52].

อนันต์ ตันสุตะพานิช. 2538. เลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระบบปิดหรือระบบรีไซเคิล [online] แหล่งที่มา : http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=111[31 มีนาคม 52].

Antony, S.P. and R. Philip. 2006. Bioremediation in shrimp culture systems. NAGA, *World Fish Center Quarterly* **29**: 62-66.

APHA, 1998. Standard methods for the analysis of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Alexandria, VA.

Bianchi M., Pcrfettini, J. and Bianchi, A. 1992. Marine heterotrophic bacteria associated with enrichment culture of nitrifying bacteria planned for closed aquaculture system. *Aquartic Living Resources* **5**: 137-144.

Carlucci A. F. and J. D. H. Strickland. 1968. The isolation, purification and some kinetic studies of marine nitrifying bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2**:156-166.

Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., and Verstraete, W. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* **270**: 1–14.

Delwiche, C. C. and Finstein, S. 1965. Carbon and Energy Sources for the Nitrifying Autotroph Nitrobacter. *Journal of bacteriology* **90**: 102-107.

Drahos, D. J. 2006. Consortium of nitrifying bacteria. [online] Available from: http://www.freepatentsonline.com/20060081532.html. [5 November 2007].

Du, G., Geng, J., Chen, J. and Lun, S., 2003. Mixed culture of nitrifying bacteria and denitrifying bacteria for simultaneous nitrification and denitrification, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **19**: 433–437.

Foesel, B.U., Gieseke, A., Schwermer, C., Stief, P., Koch,L., Cytryn, E., Torre, J.T., Rijn, J., Minz, D., Drake, H.L. and Schramm, A. 2008. *Nitrosomonas* Nm143-like ammonia oxidizers and Nitrospira marina-like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm. *FEMS Microbiology Ecology* **63** (2): 192-204.

Golz, W. J. 1995. Biological Treatment in Recirculating Aquaculture Systems. [online] Available from: http://mysite.verizon.net/res6m3ph/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/wjg_tchr.pdf [5 พฤศจิกายน 2007].

Gong, Z., Liu, S., Yang, F., and Furukawa K., 2007. Characterization of functional microbial community in a membrane-aerated biofilm reactor operated for completely autotrophic nitrogen removal *Bioresource Technology* **99**: 1-7.

Grommen,R., Dauw,L. and Verstraete,W. Elevated 2005 Salinity selects for a less diverse ammonia-oxidizing population in aquarium biofilters. *FEMS Microbiology Ecology* **52** (1): 1-11.

Grommen, R., I. Van Hauteghem, M. Van Wambeke, W. Verstraete, 2002. An improved nitrifying enrichment to remove ammonium and nitrite from freshwater aquaria systems. *Aquaculture* **211**: 115– 124.

Guisasola, A., S. Petzet, J.A. Baeza, J. Carrera, and J. Lafuente 2007. Inorganic carbon limitations on nitrification: Experimental assessment and modeling. *Water research*. **41**: 277 – 286.

Hagopian, D.S. and J.G. Riley. 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering* **18**: 224-230.

Hallin, S., Lydmark, P., Kokalj, S., Hermansson, M., Sorensson, F. and Lindgren, P.E. 2005. Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time. *Journal of Applied Microbiology* **99**: 629–640.

Hovanec, T. A., Lance, T., T, Blakis, A., and Delong, E. F. 1998. *Nitrospira*-like bacteria

associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Applied and environmental microbiology* **64**: 258–264.

Hugenholtz, P. Goebel, B.M., and Pace, N.R. 1998. Impact of culture-Independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of bacteriology* **180**: 4765–4774.

Itoi, S., Niki, A., and Sugita, H. 2006. Changes in microbial communities associated with the conditioning of filter material in recirculating aquaculture systems of the puffer fish *Takifugu rubripes. Aquaculture* **256**: 287–295.

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Pommereningro, A. Koops, H.P., and Wagner M. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:3042–3051.

Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., Boer, W. D., Prosser, J. I., Embley, T. M., and Woldendorp, J. W. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β-subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments, *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1489–1497.

Lefebvre, O. Vasudevan, N., Thanasekaran, K., Moletta, R., and Godon, J.J., 2006. Microbial diversity in hypersaline wastewater: the example of tanneries. *Extremophiles* **10**: 505–513.

Leonard,N., Blancheton, J.P., Guiraud, J.P. 2000. Populationof heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering* **22**: 109-120.

Lin, Y.F., Jing, S.R., and Lee D.Y. 2003. The potential use of constructed wetlands in a recirculating aquaculture system for shrimp culture. *Environmental Pollution* **123**: 107–113.

Losordo, T. M., Masser, M. P., and Rakocy, J.E. 1999. Recirculating aquaculture tank production systems: A review of component options. *Southern regional aquaculture center* **453**: 13-18.

Matulewich, V.A., Strom, P.F., and Finstein, M.S. 1975. Length of incubation for enumerating

nitrifying bacteria present in various environments. *Apply microbiology* **29**: 265-268.

Mizuno, K., Kido, H., Narita, T., Dohmoto, M., Ogawa, T., and Osawa S. 2005. Control of degradation rate of porous biodegradable polymers. *Proceeding of the 8th Polymers for Advanced Technologies International Symposium* Budapest, Hungary, 13-16 September 2005.

Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* **59**: 695-700.

Mizoguchi, M., Omotani, J., Mizuno, Y., Takahashi, R., and Kanehiro, T. 1998. Newly isolated marine Ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas* sp. TN0632. *Journal of fermentation and bioengineering* **86**: 406-409.

Nicolaisen, M. H., and Ramsing, N.B. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches tostudy the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of microbiological methods* **50**: 189– 203.

Nogueira R., Meloa, L.F., Purkholdb, U., Wuertzc, S., and Wagner M. 2002. Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Water research* **36**: 469–481.

Pano, A. and Middlebrooks, E.J. 1983. Kinetics of carbon and ammonia nitrogen removal in RBC's. *Journal of water pollution control federation* **55**: 956-965.

Purkhold,U., Pommerening-Roser, A., Juretschko,S., Schmid,M.C., Koops,H.P. and Wagner,M. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys *Applied and environmental microbiology* **66** (12): 5368-5382.

Sakairi, M.A.C., Yasuda, K., Matsumura, M. 1996. Nitrogen removal in seawater using nitrifying and denitrifying bacteria immobilized in porous cellulose carrier. *Water science and technology* **34**(7-8): 267-274.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Satoh, H., Nakamura, Y., and Okabe, S. 2007. Influences of infaunal burrows on the

community structure and activity of ammonia-oxidizing bacteria in intertidal sediments . *Applied and environmental microbiology* **70**: 1341–1348.

Schmidt, I., Sliekers, O., Schmidt, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.P., Jetten, M.S.M., Strous, M. 2003. New concepts of microbial treatment process for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS microbiology reviews* **27**: 481-492.

Shan, H. and Obbard, J.P., 2001, Ammonia removal from prawn aquaculture water using immobilized nitrifying bacteria, *Applied Microbiological Biotechnology* **57**: 791–798.

Spieck, E. Hartwig, C., McCormack, I., Maixner, F., Wagner, M., Lipski A., and Daims, H. 2006. Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira*-like bacterium from activated sludge. *Environmental Microbiology* **8**(3), 405–415.

Strickland, J.D. and T.R. Parson. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2nd. Ottowa : Fisheries Research board of Canada.

Sugita, H., Nakamura H., และ Shimada, T. 2005. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of fresh water fish. *Aquaculture* **243**: 403–409.

Tal, Y., Watts, J.E.M., Schreier, S.B., Sowers, K.R., and Schreier, H.J. 2003. Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. *Aquaculture* **215**: 187–202.

Tanaka, J. Syutsubo, A., Watanabe, A., Izumida I., and Harayama, S. 2003. Activity and population structure of nitrifying bacteria in an activated-sludge reactor containing polymer beads. *Environmental Microbiology* **5**(4), 278–286.

Tookwinas, S and Sangrungruang, C. 1998. Study on bio-filtering treatment for improving the water quality in an intensive marine shrimp pond. *Thai fisheries gazette* **51**(6): 535-540.

Tsai, Y., and Olson, B.H. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1070-1074.

Vogelsang,C., Gollembiewski, K., และ Stgaard, K. 1999. Effect of preservation techniques on the regeneration of gel entrapped nitrifying sludge. *Water Research* **33**: 164-168.

Watson, S. W. and Mandel, M. 1971. Comparison of the morphology and deoxyribonucleic

acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria. *Journal of bacteriology* **107**: 563-569.

Wertz, S., Poly, F., Roux Le X., and Degrange, V. 2008. Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of Nitrobacter –like *nxrA* sequences in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **63**: 261–271.

Yasir and Chung,Y.R. 2008. Molecular analysis of microbial community and chitinase gene diversity from vermicompost with antifungal activity [unpubliced].

Ye, N.F., Lu, F., Shao, L.M., Godon, J.J., and He, P.J. 2007. Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 1055–1065.

Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Inamori, Y. 2001. Microbial community analysis in the nitrification process of saline-wastewater by Denaturing Gredient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rDNA and the cultivation method. *Journal of bioscience and bioengineering* **92**(4): 346-353.

Zeng,Y. Diversity of bacterioplankton in the Kongsfjorden, western Spitsbergen, Svalbard 2008 [unpubliced].

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายอิง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์แอมโมเนีย

แอมโมเนียมเปอซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	100	มิลลิกรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	50	มิลลิกรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	300	มิลลิกรัม
chelated metals solution	1	มิลลิลิตร
แบคโตอะการ์ (bacto agar)	15	กรัม
sea water	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Chelated metals solution:

โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	0.004	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.004	กรัม
เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)	1.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.3	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$)	0.6	กรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.15	กรัม
Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)	6.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับแบคทีเรียกลุ่มออกซิไดซ์ไนไตรต์

โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$)	100	มิลลิกรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	25	มิลลิกรัม
โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	300	มิลลิกรัม
แบคโตอะการ์ (bacto agar)	15	กรัม
chelated metals solution	1	มิลลิลิตร
sea water	1	ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายส่วนผสมทั้งหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายอิง

อาหารกุ้ง	90	มิลลิกรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	50	มิลลิกรัม
โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	50	มิลลิกรัม
chelated metals solution	1	มิลลิลิตร
sea water	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง whatman No.4 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

stock แอมโมเนียไนโตรเจน (NH_4-N) 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

แอมโมเนียมเปอซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	471.4	มิลลิกรัม

ละลายแอมโมเนียในโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กรองแล้วปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB) pH 7.0

ทริปโตน (Tryptone)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB) pH 7.0

เติมผงวุ้น 15 กรัม ในอาหารเหลว LB pH 7.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC

สารละลาย A

ทริปโตน (Tryptone)	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5	กรัม

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.58	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4{\bullet}7H_2O$)	2.46	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl)	2	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.18	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 980 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย B

กลูโคส (Glucose)	3.6	กรัม
น้ำปลอดประจุ	20	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมกับน้ำปลอดประจุ จนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง ผ่านหัวกรอง ขนาด 0.20 ไมโครเมตร ผสมสารละลาย A และ B ทั้งหมดด้วยกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย

1. สารละลายฟีนอล

เกล็ดฟีนอล	20	กรัม
95% เอทานอล	200	มิลลิลิตร

ละลายเกล็ดฟีนอลใน 95% เอทานอล จนได้สารละลายใส เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลายโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ ($Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$)

โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ ($Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$)	1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	200	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ในน้ำปลอดประจุ เก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายนี้มีอายุการใช้งานอย่างน้อย 1 เดือน

3. อัลคาไลน์รีเอเจนต์ (alkaline reagent)

สารละลาย A

โซเดียมซิเตรต ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	100	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	5	กรัม
น้ำปลอดประจุ	500	มิลลิลิตร

สารละลาย B

Sodium hypochlorite solution (ใช้สารละลายทางการค้า ความเข้มข้นประมาณ 1.5 N)

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เตรียมสารอัลคาไลน์รีเอเจนต์ใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน สารละลาย A เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์

1. **สารละลายซัลฟานิลาไมด์** (Sulphanilamide solution)

Sulphanilamide	5	กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl conc.)	50	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ		

ผสมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 50 มิลลิลิตรและน้ำปลอดประจุ เติมผงซัลฟานิลาไมด์ 5 กรัม คนจนได้สารละลายใส ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุ ให้ได้ 500 มิลลิลิตร

2. **สารละลาย** N-(1-napthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NNED: $C_{12}H_{14}N_2.2HCl$)

NNED	0.5	กรัม
น้ำปลอดประจุ	500	มิลลิลิตร

ละลาย NNED ในน้ำปลอดประจุ เก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายนี้มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

โปรตีนเนสเค (proteinase K) 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	20	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	มิลลิลิตร

ละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K) จนได้สารละลายใส เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

20% **โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต** (Sodium dodecyl sulfate, SDS)

Sodium dodecyl sulfate	20	กรัม

ค่อยๆละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จนได้สารละลายใส หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

70% เอธานอล

99.9% เอธานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	300	มิลลิลิตร

สารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)	1.2	กรัม

ละลาย Tris base ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.0 หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

EDTA ($C_{10}H_{14}O_8Na_2 \bullet 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) คนให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็น แล้วปรับ pH 8.0 หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

TE buffer

Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	10	มิลลิลิตร
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์	0.2	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

TE buffer **ที่ผสมกับ** RNase A

TE buffer	1	มิลลิลิตร
RNase A	2	ไมโครลิตร

เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า

Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)	242	กรัม
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์	100	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตรปริมาตร 800 มิลลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) **ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

เอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	20	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	200	มิลลิลิตร

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) จนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกันเนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นสารก่อมะเร็ง)

สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin, Ap)

แอมพิซิลิน	100	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal)

X-gal	20	มิลลิกรัม
ไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (DMF)	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) **เข้มข้น 1 โมลาร์**

IPTG	238	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สีติดตาม (6X loading dye)

Sucrose	20	กรัม
Bromphenol blue (ละลาย 4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)	12.5	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย TE buffer จนได้ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5 M โซเดียมคลอไรด์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	292	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

DNA extraction buffer

Tris base 1 โมลาร์, pH 8	15	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมฟอสเฟต 1 โมลาร์	15	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์, pH 8.0	30	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์	45	มิลลิลิตร
CTAB 5% (w/v)	30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	15	มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ DGGE

0% Denaturing solution **ใน** 8% **อะคริลาไมด์เจล**

40% อะคริลาไมด์เจล/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	78	มิลลิลิตร

100% Denaturing solution **ใน** 8% **อะคริลาไมด์เจล**

40% อะคริลาไมด์เจล/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
ฟอร์มาไมด์	40	มิลลิลิตร
ยูเรีย	42	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุ จนได้ปริมาตร100 มิลลิลิตร

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

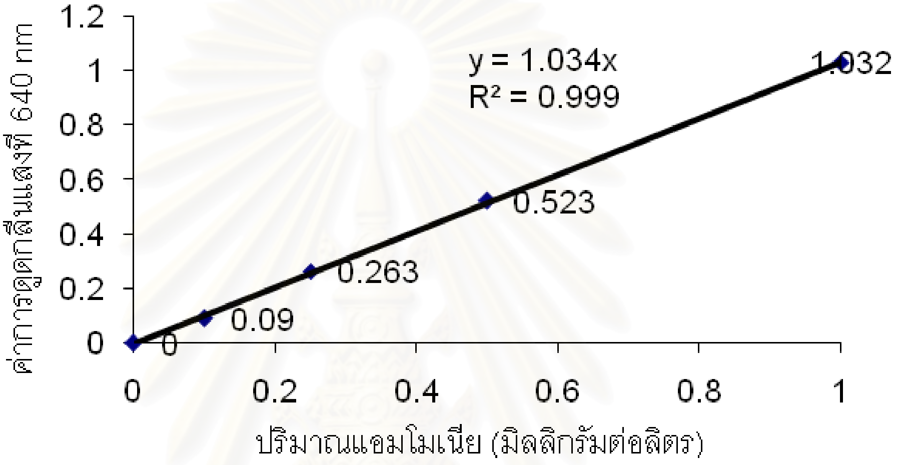
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

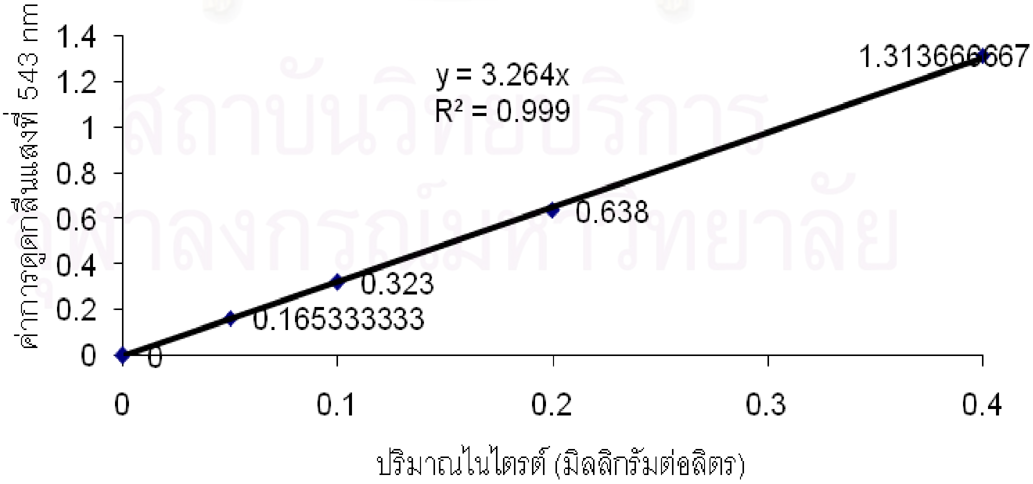
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

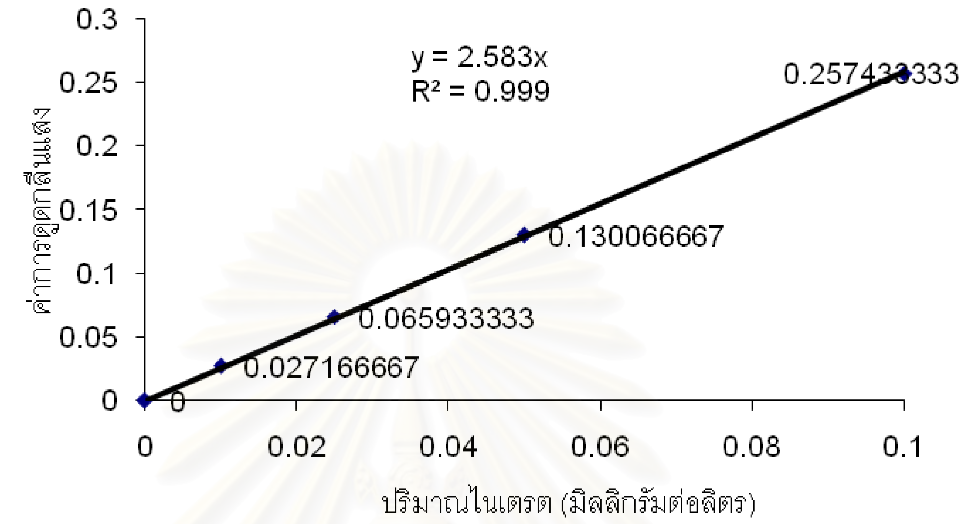
ภาพที่ ค.1 กราฟมาตรฐานแอมโมเนียไนโตรเจน



ภาพที่ ค.2 กราฟมาตรฐานไนไตรต์ไนโตรเจน



ภาพที่ ค.3 กราฟมาตรฐานไนเตรตไนโตรเจน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ uncultured *Nitrosomonas* sp. (AY683482.1)

51 GTCGCATGCT CCCGGCCGCC ATGGCGGCCG CGGGAATTCG ATTCGCCGCG
101 CGGCGGGCGG GGCGGGGGCG GAGGAAAGTA GGGGATCGAA AGACCTTGCG
151 CTTTTGGAGC GGCCGATGTC TGATTAGCTA GTTGGTGGGG TAAGGGCCTA
201 CCAAGGCGAC GATCAGTAGT TGGTCTGAGA GGACGACCAG CCACACTGGG
251 ACTGAGACAC GGCCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATTTTGG
301 ACAATGGGCG CAAGCCTGAT CCAGCAATGC CGCGTGAGTG AAGAAGGCCT
351 TCGGGTTGTA AAGCTCTTTC AGTCGAGAAG AAAAGGCTGC AGTGAATAAC
401 TGTAGTTTAT GACGGTATCG ACAGAAGAAG CACCGGCTAA CTACGTGCCA
451 GCAGCCGCGG TAATACGTAG GGTGCGAGCG TTAATCGGAA TTACTGGGCG
501 TAAAGGGTGC GCAGGCGGTT TTGTAAGTCA GATGTGAAAT CCCCGGGCTT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Nitrosomonas marina* (AF272418.1)

51 GTCGCATGCT CCCGGCCGCC ATGGCGGCCG CGGGAATTCG ATTCTAGCTT
101 TGTAGTTTCA AACGCAATTC CCAGGTTAAG CCCGGGGATT TCACATCTGA
151 CTTACAAAGC CGCCTGCGCA CCCTTTACGC CCAGTAATTC CGATTAACGC
201 TTGCACCCTA CGTATTACCG CGGCTGCTGG CACGTAGTTA GCCGGTGCTT
251 CTTCTGTCGA TACCGTCATG AACTGTGATT ATTCATCACA ATCTTTTCTT
301 CTCGACTGAA AGAGCTTTAC AACCCGAAGG CCTTCTTCAC TCACGCGGCA
351 TTGCTGGATC AGGCTTTCGC CCATTGTCCA AAATTCCCCA CTGCTGCCTC
401 CCGTAGGAGT CTGGGCCGTG TCTCAGTCCC AGTGTGGCTG GTCGTCCTCT
451 CAGACCAACT ACTGATCGTC GCCTTGGTAG GCCTTTACCC CACCAACTAG
501 CTAATCAGGC ATCGGCCACT CCAAAAGCGC AAGGTCTTAC GATCCCCTAC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ uncultured *Nitrosomonas* sp. (EU155078.1)

51 GTCGCATGCT CCCGGCCGCC ATGGCGGCCG CGGGAATTCG ATTCTAGCTT

101 TGTAGTTTCA AACGCAATTC CCAGGTTAAG CCCGGGGATT TCACATCTGA

151 CTTACAAAGC CGCCTGCGCA CCCTTTACGC CCAGTAATTC CGATTAACGC

201 TTGCACCCTA CGTATTACCG CGGCTGCTGG CACGTAGTTA GCCGGTGCTT

251 CTTCTGTCGA TACCGTCATG AACTGTGATT ATTCATCACA ATCTTTTCTT

301 CTCGACTGAA AGAGCTTTAC AACCCGAAGG CCTTCTTCAC TCACGCGGCA

351 TTGCTGGATC AGGCTTTCGC CCATTGTCCA AAATTCCCCA CTGCTGCCTC

401 CCGTAGGAGT CTGGGCCGTG TCTCAGTCCC AGTGTGGCTG GTCGTCCTCT

451 CAGACCAACT ACTGATCGTC GCCTTGGTAG GCCTTTACCC CACCAACTAG

501 CTAATCAGGC ATCGGCCACT CCAAAAGCGC AAGGTCTTAC GATCCCCTGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Nitrosomonas* sp. Nm51 (AF272424.1)

51 GTCGCATGCT CCCGGCCGCC ATGGCGGCCG CGGGAATTCG ATTCTAGCTT

101 TGTAGTTTCA AACGCAATTC CCAGGTTAAG CCCGGGGATT TCACATCTGA

151 CTTACAAAGC CGCCTGCGCA CCCTTTACGC CCAGTAATTC CGATTAACGC

201 TTGCACCCTA CGTATTACCG CGGCTGCTGG CACGTAGTTA GCCGGTGCTT

251 CTTCTGTCGA TACCGTCATG AACTGTGATT ATTCATCACA ATCTTTTCTT

301 CTCGACTGAA AGAGCTTTAC AACCCGAAGG CCTTCTTCAC TCACGCGGCA

351 TTGCTGGATC AGGCTTGCGC CCATTGTCCA AAATTCCCCA CTGCTGCCTC

401 CCGTAGGAGT CTGGGCCGTG TCTCAGTCCC AGTGTGGCTG GTCGTCCTCT

451 CAGACCAACT ACTGATCGTA GCCTTGGTAG GCGTTTACCC CACCAACTAG

501 CTAATCAGGC ATCGGCCGCT CCAGAAGCGC AAGGTCTTAC GATCCCCTGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ uncultured bacterium (AM295532.1)

51 GTCGCATGCT CCCGGCCGCC ATGGCGGCCG CGGGAATTCG ATTCTAGCCT

101 TGTAGTTTCA AACGCAATTC CCAGGTTAAG CCCGGGGATT TCACATCTGA

151 CTTACAAAAC CGCCTGCGCA CCCTTTACGC CCAGTAATTC CGATTAACGC

201 TCGCACCCTA CGTATTACCG CGGCTGCTGG CACGTAGTTA GCCGGTGCTT

251 CTTCTGTCGA TACCGTCATA AACTACAGTT ATTCACTGCA GCCTTTTCTT

301 CTCGACTGAA AGAGCTTTAC AACCCGAAGG CCTTCTTCAC TCACGCGGCA

351 TTGCTGGATC AGGCTTGCGC CCATTGTCCA AAATTCCCCA CTGCTGCCTC

401 CCGTAGGAGT CTGGGCCGTG TCTCAGTCCC AGTGTGGCTG GTCGTCCTCT

451 CAGACCAACT ACTGATCGTC GCCTTGGTAG GCCCTTACCC CACCAACTAG

501 CTAATCAGAC ATCGGCCGCT CCAAAAGCGC AAGGTCTTTC GATCCCCTGC

551 TTTCCTCCGC CCCCGCCCCG CCCGCCGCGC GGCGAATCAC TAGTGAATTC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ uncultured bacterium (EF175894.1)

51 TCGCATGCTC CCGGCCGCCA TGGCGGCCGC GGGAATTCGA TTCGCCGCGC

101 GGCGGGCGGG GCGGGGGCGG AGGAAAGCAG GGGTTCGAAA GACCTTGCGC

151 TTTTGGAGCG GCCGATGTCT GATTAGCTAG TTGGTGGGGT AAGGGCCTAC

201 CAAGGCGACG ATCAGTAGTT GGTCTGAGAG GACGACCAGC CACACTGGGA

251 CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATTTTGGA

301 CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA AGAAGGCCTT

351 CGGGTTGTAA AGCTCTTTCA GTCGAGAAGA AAAGGCTGCA GTGAATAACT

401 GTAGTTTATG ACGGTATCGA CAGAAGAAGC ACCGGCTAAC TACGTGCCAG

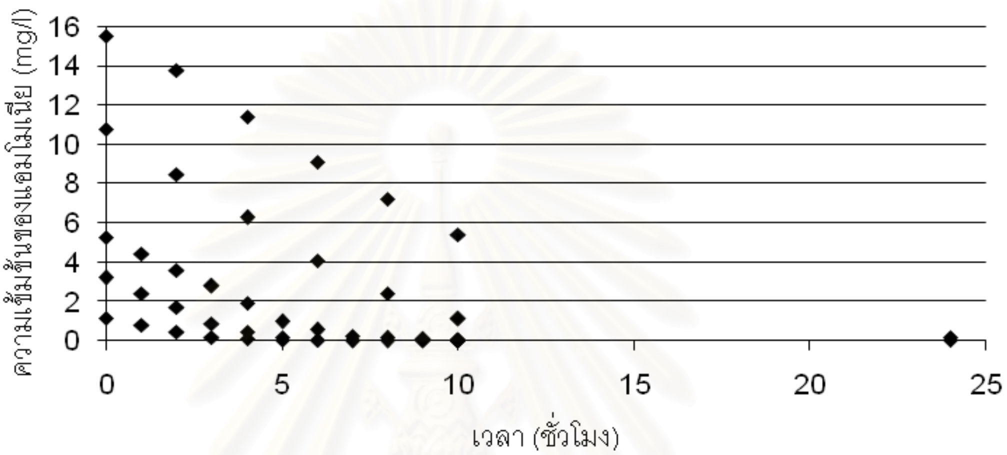
451 CAGCCGCGGT AATACGTAGG GTGCGAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT

501 AAAGGGTGCG CAGGCGGTTT TGTAAGTCAG ATGTGAAATC CCCGGGCTTA

ภาคผนวก จ

อัตราการย่อยสลายแอมโมเนีย

ภาพที่ ฉ.1 ปริมาณแอมโมเนียความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ลดลงต่อเวลา



ตารางที่ 1 ปริมาณการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	1.140129	1.161856	1.16496	1.155648	0.013529
1	0.830784	0.81423	0.822507	0.822507	0.008277
2	0.466605	0.481089	0.473847	0.473847	0.007242
3	0.190366	0.185193	0.192436	0.189332	0.00373
4	0.095183	0.091045	0.099322	0.095183	0.004138
5	0.053282	0.053799	0.053178	0.05342	0.000333
6	0.035694	0.036004	0.036314	0.036004	0.00031
7	0.020382	0.020899	0.020278	0.02052	0.000333
8	0.011691	0.011898	0.011794	0.011794	0.000103
9	0.01076	0.011174	0.010863	0.010932	0.000215
10	0.010449	0.010346	0.009311	0.010036	0.000629

ตารางที่ 2 ปริมาณการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	3.186568	3.248644	3.15553	3.196914	0.047411
1	2.420964	2.493386	2.358888	2.424413	0.067315
2	1.70709	1.727782	1.676052	1.703641	0.026037
3	0.900102	0.920794	0.786296	0.869064	0.072422
4	0.455224	0.475916	0.393148	0.441429	0.043074
5	0.15519	0.186228	0.134498	0.158639	0.026037
6	0.031038	0.041384	0.031038	0.034487	0.005973
7	0.010346	0.010346	0.020692	0.013795	0.005973
8	0.010346	0.010346	0.020692	0.013795	0.005973
9	0.010346	0.020692	0.010346	0.013795	0.005973
10	0.020692	0.010346	0.010346	0.013795	0.005973

ตารางที่ 3 ปริมาณการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	5.255768	5.193692	5.32819	5.259217	0.067315
1	4.428088	4.438434	4.459126	4.441883	0.015804
2	3.600408	3.590062	3.631446	3.607305	0.021537
3	2.762382	2.803766	2.824458	2.796869	0.031608
4	1.955394	1.903664	1.86228	1.907113	0.046653
5	1.003562	0.941486	0.993216	0.979421	0.033258
6	0.610414	0.548338	0.527646	0.562133	0.043074
7	0.25865	0.289688	0.248304	0.265547	0.021537
8	0.144844	0.165536	0.124152	0.144844	0.020692
9	0.082768	0.062076	0.041384	0.062076	0.020692
10	0.020692	0.010346	0.010346	0.013795	0.005973

ตารางที่ 4 ปริมาณการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

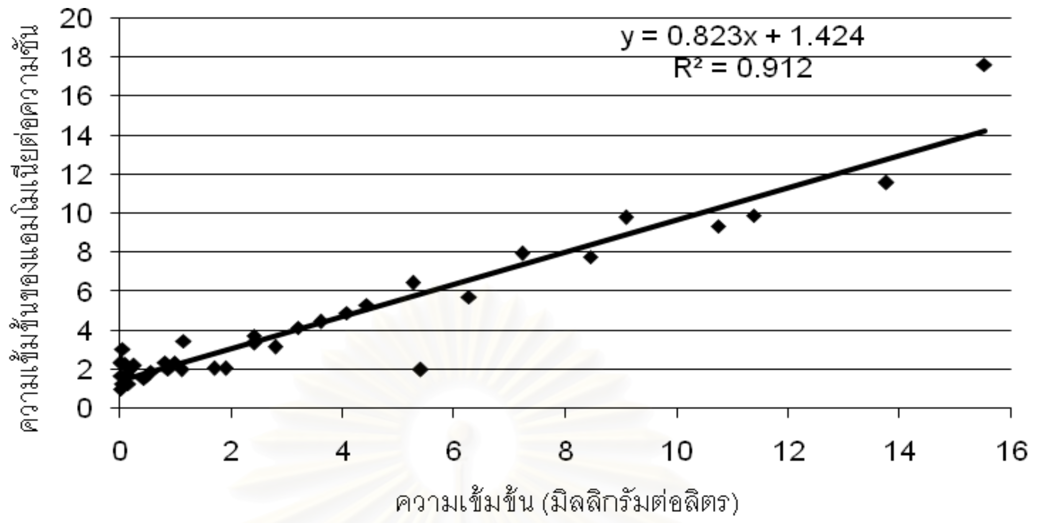
เวลา (ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	10.57361	10.71846	10.94607	10.74605	0.187754
2	8.463028	8.369914	8.514758	8.449233	0.073401
4	6.25933	6.166216	6.393828	6.273125	0.114431
6	4.521202	4.39705	3.31072	4.076324	0.665932
8	2.462348	2.348542	2.420964	2.410618	0.057604
10	1.127714	1.055292	1.169098	1.117368	0.057604
12	0.77595	0.682836	0.765604	0.741463	0.051036
24	0.020692	0.010346	0.031038	0.020692	0.010346

ตารางที่ 5 ปริมาณการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	15.52935	15.46727	15.56038	15.519	0.047411
2	13.91537	13.64637	13.7188	13.76018	0.139191
4	11.42198	11.35991	11.37025	11.38405	0.033258
6	9.114826	9.05275	9.073442	9.080339	0.031608
8	7.283584	7.19047	7.200816	7.224957	0.051036
10	5.441996	5.359228	5.410958	5.404061	0.041813
12	3.683176	3.600408	3.631446	3.638343	0.041813
24	0.227612	0.134498	0.175882	0.179331	0.046653

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ ฉ.2 กราฟเส้นแสดงแนวโน้มปริมาณแอมโมเนียความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ลดลง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกัลย์สุดา ดวงศรีแก้ว เกิดเมื่อวันพฤหัสบดีที่ 15 กันยายน 2526 ที่จังหวัดลพบุรี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2548 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 87/9 หมู่ที่ 1 ถนนพหลโยธิน ตำบลเขาสามยอด อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี 15000

ผลงานวิจัยนี้ได้นำเสนอที่งานประชุมวิชาการ Commemorative International Conference : Sustainable Development to Save the Earth, Bangkok, Thailand 7-9 เมษายน 2552 จัดโดย King Mongkut's University of Technology Thonburi.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย