

การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มเบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพแบบไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน  
สำหรับการเพาะเลี้ยงทางน้ำ



นางสาวสุชาตินี อ่วมจันทร์

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5044-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**CHANGING OF BACTERIAL GROUPS IN NITRIFICATION AND DENITRIFICATION  
BIOFILTER FOR AQUACULTURE**



**Miss Sutasinee Ournchan**

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Environmental Science (Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5044-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มแบคทีเรียในตัวของชีวภาพแบบไนตริฟิเคชัน  
และดีไนตริฟิเคชันสำหรับการเพาะเลี้ยงทางน้ำ

โดย

นางสาวสุธาสิณี อ่วมจันทร์

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

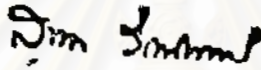
อาจารย์ที่ปรึกษา

ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

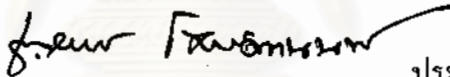
ดร. สรวิศ เผ่าทองสุข

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กิระนันท์)

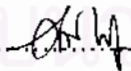
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฉมิตานนท์)



..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ดร. สรวิศ เผ่าทองสุข)



..... กรรมการ  
(ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

สุชาณี ร่วมจันทร์ : การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพดั่งปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันและ  
ดีไนครีฟิเคชันสำหรับการเพาะเลี้ยงทางน้ำ. (CHANGING OF BACTERIAL GROUPS IN  
NITRIFICATION AND DENITRIFICATION BIOFILTER FOR AQUACULTURE)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมณะเสวด, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ดร.สรวิศ เน่าทองสุข  
147 หน้า. ISBN 974-5044-7

การศึกษาองค์ประกอบชนิดของแบคทีเรียในดั่งปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันและดั่งปฏิกรณ์ดีไนครีฟิเคชัน (NR และ DNR) สำหรับใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทำในดั่งปฏิกรณ์รูปทรงกระบอกขนาดความจุ 14 ลิตร บรรจุด้วยลูกบอลพลาสติกเพื่อเป็นที่ยึดเกาะของแบคทีเรีย แบ่งการทดลองออกเป็นสองรอบ โดยในแต่ละรอบจะ ประกอบด้วยดั่งปฏิกรณ์สองดั่งที่เหมือนกัน จัดให้อ่าง NR มีการพ่นอากาศอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้เหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยาในครีฟิเคชัน ส่วนดั่ง DNR จะมีการพ่นก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนออกจากระบบ ทำให้ภายใน ดั่งเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนซึ่งจะเหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยาดีไนครีฟิเคชัน หลังจากการจัดสภาวะที่เหมาะสม พบว่าดั่ง NR สามารถเกิดปฏิกิริยาในครีฟิเคชันและดั่ง DNR เกิดปฏิกิริยาดีไนครีฟิเคชันขึ้นได้ โดยในการทดลอง รอบที่ 1 แม้ว่าจะทำการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แต่การจัดสภาวะที่เหมาะสมสามารถทำได้เฉพาะในช่วง 10 วัน สุดท้ายเท่านั้น ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและจากเทคนิค PCR-DGGE ของ 16S rDNA พบว่าองค์ประกอบชนิดของแบคทีเรียในดั่งปฏิกรณ์ทั้งสองเหมือนกัน โดยจำนวนแถบของ ดีเอ็นเอ 9 แถบซึ่งมีแบคทีเรียอย่างน้อย 9 ชนิดเติบโตอยู่ในดั่งปฏิกรณ์ และแบคทีเรียที่สามารถจำแนกชนิดได้ คือ *Methylophaga marina* และ *Marinobacter* sp.

ในการทดลองรอบที่สอง สามารถจัดสภาวะของระบบที่เหมาะสมได้ตลอดการทดลอง 8 สัปดาห์ ผลการ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียใน DNR มีการ เติบโตเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในขณะที่แบคทีเรียใน NR มีการเติบโตช้ามาก และพบแบคทีเรียอย่างน้อย 29 ชนิด ในน้ำเริ่มต้นที่เป็นน้ำทะเลจากบ่อเลี้ยงกุ้ง แต่หลังจากนั้นพบแบคทีเรียเพียง 8 ชนิดในดั่งปฏิกรณ์ NR และ DNR เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ โดยมีแบคทีเรียจำนวน 5 ชนิดที่พบเฉพาะใน NR และแบคทีเรียจำนวน 5 ชนิดที่พบ เฉพาะใน DNR ในขณะที่มีแบคทีเรียจำนวน 3 ชนิดที่พบทั้งใน NR และ DNR การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดย เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับฐานข้อมูล BLASTN พบว่าจำแนกแบคทีเรียชนิดเด่นในทั้งสองดั่ง ปฏิกรณ์ได้แก่ *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group bacterium ในดั่งปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันพบ แบคทีเรียชนิดเด่นได้แก่ Alpha-proteobacterium, CFB group bacterium และ *Methylobacterium* sp. ส่วน แบคทีเรียชนิดเด่นในดั่งปฏิกรณ์ดีไนครีฟิเคชันได้แก่ Bacteroidetes bacterium, CFB group bacterium, *Pseudomonas* sp. หรือ *Uncultured Colwellia* sp. และ *Desulfobulbus* sp.

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม.....  
ปีการศึกษา.....2546.....

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

#4389108320 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEY WORD: NITRIFYING BACTERIA / DENITRIFYING BACTERIA / BIOFILM / BIOFILTER /  
NITRIFICATION / DENITRIFICATION / BACTERIAL COMMUNITY / AQUACULTURE /  
PCR-DGGE

SUTASINEE OUMCHAN : CHANGING OF BACTERIAL GROUPS IN NITRIFICATION  
AND DENITRIFICATION BIOFILTER FOR AQUACULTURE. THESIS ADVISOR :  
PROF.PIAMSAK MENASVETA, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : SORAWIT  
POWTONGSOOK, Ph.D. 147 pp. ISBN 974-17-5044-7

Bacterial community in nitrification and denitrification reactors (NR and DNR) for aquaculture was studied with two similar cylinder-shape bioreactors (14 L) packed with plastic bioballs. The experiment was conducted in two trials, each trial consisted of two similar reactors assigned as NR and DNR. For NR, the reactor was continuously aerated to create an aerobic condition for nitrifying bacteria while in DNR was set to anoxic condition by a short bubbling of nitrogen gas. After proper condition was settled up, the results showed that NR and DNR can perform nitrogen treatment by either nitrification or denitrification processes. In the first trial, although the experimental period was 60 days, the duration that nitrification (in NR) or denitrification (in DNR) occurred was only the last 10 days. The results from bacterial analysis in the last day using SEM and PCR-DGGE of 16S rDNA showed that bacterial composition in both reactor was similar. Number of bands in DGGE gel illustrated that there was at least 9 species of bacteria growing in the reactor. Two of those bacteria could be identified as that *Methylophaga marina* and *Marinobacter* sp.

In the second trial, proper conditions for NR and DNR reactors were successfully set up since the starting day and prolong throughout 8 weeks of the experiment. Protein analysis and SEM pictures showed that bacteria in DNR increased rapidly during the experiment while bacteria in NR seemed to have very slow growth rate. From at least 29 species of bacteria found in the starting water obtained from shrimp culture tank, as indicated by 29 DGGE bands, there was only 8 species of bacteria found in NR and DNR after 8 weeks of the experiment. Among those bacteria, 5 species were found only in NR, 5 species were found only in DNR and 3 species were found in both NR and DNR reactors. Identification of bacterial species found in the reactor by comparing 16S rDNA sequence with the BLASTN database found that *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group bacterium was commonly found in both reactors. With NR, the dominant bacteria were possibly Alpha-proteobacterium, CFB group bacterium, *Methylobacterium* sp. while the dominant bacteria in DNR were Bacteroidetes bacterium, CFB group bacterium, *Pseudomonas* sp. or Uncultured *Colwellia* sp. and *Desulfobulbus* sp.

Field of study Environmental Science .....

Academic year 2003 .....

Student's signature .....

Advisor's signature .....

Co-advisor's signature .....



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้เนื่องจากความกรุณาเป็นอย่างสูงของ ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต ที่ให้โอกาสในการทำวิทยานิพนธ์และกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อีกท่านหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้คืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ดร. สรวิศ เฒ่าทองสุข ที่ให้ความกรุณาแนะนำแนวทางในขั้นตอนการทดลอง เทคนิคการศึกษาวิจัย และช่วยเหลือในการเตรียมวัสดุที่ใช้ในการทดลอง ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงสิ้นสุดการทำวิทยานิพนธ์รวมถึงแนะนำวิธีการเขียนวิทยานิพนธ์ ตรวจสอบแก้ไข วิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ส่วนการวิจัยทางด้านชีวโมเลกุลสำเร็จได้ เนื่องจากความกรุณาของ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ในการให้คำแนะนำเทคนิคการทดลอง อำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ อีกส่วนหนึ่งต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ ไชยมิตรานนท์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ พัฒนผลไพบุลย์ ที่กรุณาตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ เป็นประธานการสอบวิทยานิพนธ์และ โครงร่างวิทยานิพนธ์

ขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยบางส่วนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และทุนสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบคุณความมีน้ำใจของเพื่อนๆ ที่ห้องทดลอง ณ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและแลกเปลี่ยนความคิดเห็นขณะทำการทดลอง กำลั้งใจในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์นั้นมาจากคุณพ่อคุณแม่และคุณชำนานู บุญมาลี สุดท้ายนี้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่สามารถเกิดขึ้นได้หากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากทุกท่านดังรายนามข้างต้น

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
<b>บทที่</b>	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ผลกระทบของสารประกอบไนโตรเจนในแหล่งน้ำต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม.....	3
2.2 การกำจัดไนโตรเจนทางชีวภาพ โดยแบคทีเรีย.....	4
2.2.1 ตัวกรองชีวภาพ (Biofilters) สำหรับการบำบัดน้ำเสีย.....	4
2.2.2 ไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Nitrifying bacteria).....	6
2.2.3 ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria).....	8
2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อไนตริฟายอิงแบคทีเรียและ ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย.....	9
2.3 การบำบัดสารประกอบไนโตรเจนในน้ำเสียจากการ เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยระบบกรองทางชีวภาพ.....	10
2.4 การศึกษาความหลากหลายแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพ ระบบบำบัดสารประกอบไนโตรเจน.....	12
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	19
3.1 การเตรียมถังปฏิกรณ์.....	19
3.2 ขั้นตอนการทดลอง.....	24

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 การสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำและแบคทีเรีย.....	27
3.4 วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.....	30
3.5 วิธีวิเคราะห์แบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพไบโอบอล.....	31
4. ผลการทดลอง.....	44
4.1 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอินทรีย์ใน ไตรเจนและแบคทีเรีย ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน (การทดลองรอบที่ 1).....	44
4.1.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบอินทรีย์ใน ไตรเจน ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน.....	44
4.1.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบอินทรีย์ใน ไตรเจน ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	46
4.1.3 ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพไบโอบอล ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	50
4.2 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอินทรีย์ใน ไตรเจนและแบคทีเรีย ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (การทดลองรอบที่ 2).....	57
4.2.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบอินทรีย์ใน ไตรเจน ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน.....	57
4.2.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบอินทรีย์ใน ไตรเจน ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	61
4.2.3 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพ ไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	68
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	91
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	103
รายการอ้างอิง.....	106
ภาคผนวก.....	112
ภาคผนวก ก.....	113
ภาคผนวก ข.....	116



## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ค.....	127
ภาคผนวก ง.....	129
ภาคผนวก จ.....	141
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	147



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 2-1	ตัวอย่างของ DNA primer ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์แบคทีเรีย โดยวิธี PCR-DGGE..... 13
ตารางที่ 2-2	ตัวอย่างของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลาย ของไนตริฟายอิงแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE..... 16
ตารางที่ 2-3	ความหลากหลายของดีเอ็นเอไนตริฟายอิงแบคทีเรียในระบบบำบัด ดีเอ็นเอไนตริฟิเคชัน โดยการวิเคราะห์ PCR-DGGE..... 18
ตารางที่ 3-1	ขั้นตอนการทดลองในการทดลองรอบที่ 1 ระยะเวลา 58 วัน..... 25
ตารางที่ 3-2	ขั้นตอนการทดลองในการทดลองรอบที่ 2 ระยะเวลา 56 วัน..... 25
ตารางที่ 4-1	ปริมาณ โปรตีนของแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพไบโอบอล..... 54
ตารางที่ 4-2	ชนิดของแบคทีเรียที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในการทดลองรอบที่ 1 และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blastn..... 56
ตารางที่ 4-3	ชนิดของแบคทีเรียที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในการทดลองรอบที่ 2 และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blastn..... 87
ตารางที่ 4-4	การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่เกาะอยู่บนไบโอบอล ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน..... 88
ตารางที่ 4-5	การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่เกาะอยู่บนไบโอบอล ในถังปฏิกรณ์ดีเอ็นเอไนตริฟิเคชัน..... 89
ตารางที่ 5-1	การเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน..... 92
ตารางที่ 5-2	ตัวอย่างภาพถ่ายของแบคทีเรียที่เป็นฟิล์มชีวภาพ ในระบบบำบัดน้ำเสีย..... 96

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2-1	การเพิ่มความหนาของชั้นฟิล์มจุลินทรีย์ที่เกาะบนตัวกรองชีวภาพ..... 5
ภาพที่ 2-2	แบบจำลองแสดงการออกซิไดซ์แอมโมเนีย (NH <sub>3</sub> ) ให้เป็นไนไตรต์ (NO <sub>2</sub> ) ..... 9
ภาพที่ 2-3	แบบจำลองแสดงการรีดิวซ์ไนเตรดให้เป็นไนไตรต์ ไนตริกออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์และก๊าซไนโตรเจน ..... 11
ภาพที่ 2-4	โคอะแกรมแสดงการเคลื่อนที่ของ DNA เชื้อแบคทีเรีย แต่ละชนิดบนเจล DGGE ..... 15
ภาพที่ 3-1	ภาพส่วนประกอบดังปฏิกรณ์ทำจากท่อพลาสติกอะคลิลิกใส..... 20
ภาพที่ 3-2	โคอะแกรมของดังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR)..... 21
ภาพที่ 3-3	ตัวกรองชีวภาพ Super Bioball™ หรือ ไบโอบอล..... 22
ภาพที่ 3-4	โคอะแกรมของดังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR)..... 23
ภาพที่ 3-5	ภาพ ก ดังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันและดังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (ข) ชิ้นส่วน ไบโอบอล (ค) หัววัด ORP (ง) จุดเก็บตัวอย่างน้ำดังปฏิกรณ์ ไนตริฟิเคชัน (จ) จุดเก็บตัวอย่างน้ำดังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน ..... 29
ภาพที่ 3-6	Anaerobic Jar สำหรับบ่มเชื้อแบคทีเรียลดซัลเฟต และเชื้อดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย..... 35
ภาพที่ 3-7	Anaerotest จะเปลี่ยนสีจากสีฟ้า (ตัวอย่างรูปซ้าย) เป็นสีขาว (ตัวอย่างรูปขวา) เมื่อภายใน Anaerobic Jar อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน..... 35
ภาพที่ 3-8	ขั้นตอนการสกัด DNA จากไบโอบอลด้วย FastDNA SPIN Kit for soil..... 38
ภาพที่ 3-9	(ก) เครื่อง PCR (ข) เครื่อง Mini Submarine Electrophoresis (ค) เครื่อง UV Transilluminator..... 40
ภาพที่ 3-10	อุปกรณ์ชุด The Dcode™ Universal Mutation Detection System..... 42
ภาพที่ 3-11	การวิเคราะห์ DGGE โดยใช้ 8% polyacrylamide..... 43
ภาพที่ 4-1	แสดงผลปริมาณไนโตรเจนของ แอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรด ในน้ำเสียทดลองดังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน การทดลองครั้งที่ 1 ..... 45

## สารบัญญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 4-2	แสดงผลปริมาณไนโตรเจนของ แอมโมเนีย ในไตรด์ ในเตรด ในน้ำเสียทดลองถึงปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน การทดลองครั้งที่ 1.....	47
ภาพที่ 4-3	ความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าไออาร์พีกับการบำบัดไนเตรด.....	48
ภาพที่ 4-4	ค่าพีเอชในน้ำเสียทดลองในถังปฏิกรณ์ ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	49
ภาพที่ 4-5	ค่าอุณหภูมิของน้ำเสียทดลองในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	49
ภาพที่ 4-6	ผลการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจากตัวกรองชีวภาพ ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน.....	50
ภาพที่ 4-7	ผลการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจากตัวกรองชีวภาพ ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	51
ภาพที่ 4-8	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในน้ำทะเล (TB) ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (DNB) ไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (NB) และไวรัสโอ (VB).....	52
ภาพที่ 4-9	แบคทีเรียที่พบบนพื้นผิวของไบโอบอลในวันสุดท้ายของการทดลอง.....	54
ภาพที่ 4-10	แสดง DGGE profile ของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอล.....	55
ภาพที่ 4-11	แสดงผลปริมาณไนโตรเจนของ แอมโมเนีย ในไตรด์ ในเตรด ในน้ำเสียทดลองถึงปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน การทดลองรอบที่ 2.....	58
ภาพที่ 4-12	ปริมาณสารอนินทรีย์ไนโตรเจนทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน.....	59
ภาพที่ 4-13	อัตราการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันถึงปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน.....	60
ภาพที่ 4-14	การลดลงของอัลคาไลน์ตี (alkalinity) ของน้ำในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน.....	61
ภาพที่ 4-15	แสดงผลปริมาณไนโตรเจนของ แอมโมเนีย ในไตรด์ ในเตรด ในน้ำเสียทดลองถึงปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน การทดลองครั้งที่ 2.....	63
ภาพที่ 4-16	การเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	64
ภาพที่ 4-17	ลักษณะฟองก๊าซไนโตรเจนที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	64
ภาพที่ 4-18	อัตราการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	65
ภาพที่ 4-19	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า ORP กับการบำบัดไนเตรดในน้ำเสียทดลอง ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันระหว่างการทดลอง.....	66

## สารบัญญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 4-20	ค่าพีเอชของน้ำในถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ ดีไนตริฟิเคชันในระหว่างการทดลองระยะเวลา 56 วัน..... 67
ภาพที่ 4-21	ค่าอุณหภูมิของน้ำเสียทดลองในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน..... 67
ภาพที่ 4-22	ปริมาณแบคทีเรียในน้ำทะเลจากบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนที่ใช้สำหรับ การทดลองในถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน..... 68
ภาพที่ 4-23	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่แยกมาจากไบโอบอล ในถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชัน..... 70
ภาพที่ 4-24	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่แยกมาจากไบโอบอล ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน..... 70
ภาพที่ 4-25	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในน้ำทะเล (TB) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA..... 72
ภาพที่ 4-26	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชัน และดีไนตริฟิเคชันที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ..... 72
ภาพที่ 4-27	แบคทีเรียที่แยกได้จากไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชัน ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุกำลังขยาย 60 เท่า..... 74
ภาพที่ 4-28	แบคทีเรียและจุลินทรีย์จากไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า..... 74
ภาพที่ 4-29	ภาพถ่ายของแบคทีเรียในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนที่นำมาใช้ เป็นน้ำเริ่มต้นในการทดลอง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน กำลังขยาย 10,000 เท่า..... 76
ภาพที่ 4-30	จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชัน (NR)ในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง..... 77
ภาพที่ 4-31	จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชัน (NR)ในสัปดาห์ที่4..... 77
ภาพที่ 4-32	จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชัน (NR)ในสัปดาห์ที่ 6..... 77
ภาพที่ 4-33	จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชัน (NR)ในสัปดาห์ที่ 8..... 78



## สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 4-34	จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของ ไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) สัปดาห์ที่ 2.....	79
ภาพที่ 4-35	จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของ ไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง.....	79
ภาพที่ 4-36	จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของ ไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง.....	80
ภาพที่ 4-37	จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของ ไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ในสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง พบจุลินทรีย์รูปร่างกลม ขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย ที่ผิวมีลักษณะเหมือนเส้นใย.....	81
ภาพที่ 4-38	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ โปรตีนของ ไบโอฟิล์มจากไบโอบอล ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน.....	82
ภาพที่ 4-39	DGGE profile (ครั้งที่ 1) ของ 16S rDNA.....	83
ภาพที่ 4-40	DGGE profile (ครั้งที่ 2) ของ 16S rDNA.....	84
ภาพที่ 4-41	DGGE profile ของ 16S rDNA ประมวลจากผล DGGE ในภาพที่ 4-38 และ 4-39 โดยแถบดีเอ็นเอที่แสดงด้วยตัวอักษร A-K คือแถบดีเอ็นเอ ที่เลือกเพื่อนำไปหาลำดับเบส.....	86
ภาพที่ 5-1	ลักษณะการกระจายของโคโลนีแบคทีเรียที่มี flagella บนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	99
ภาพที่ 5-2	การทดสอบ Nitrate test.....	99
ภาพที่ 5-3	ภาพถ่าย TEM ของแบคทีเรีย <i>Marinobacter</i> sp. ....	100

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดโดยใช้ตัวกรองชีวภาพ (Biofilter) ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อช่วยบำบัดน้ำเสีย โดยเฉพาะในโตรเจนที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน ถึงแม้ระบบนี้จะมีความยุ่งยากและมีต้นทุนค่าใช้จ่ายสำหรับการใช้งานแต่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ให้ค่าตอบแทนสูงเช่นการเพาะเลี้ยงพ่อพันธุ์แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ เป็นต้น

ในการพัฒนาให้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ความชัดเจนของกลุ่มและชนิดของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียนั้นเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ และจำเป็นต้องอาศัยความรู้ทางด้านจุลชีววิทยามาช่วยสนับสนุนให้เข้าใจระบบลึกซึ้ง แต่ในปัจจุบันยังขาดแคลนข้อมูลและการวิจัยจำนวนหรือ ชนิดของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดหรือในตัวกรองชีวภาพ (Rowan *et al.*, 2003) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันในการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนในระบบบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (Nitrification) ในการบำบัดแอมโมเนีย และปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) ในการบำบัดไนเตรด ในถึงปฏิกรณ์สภาวะห้องปฏิบัติการ เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำทะเลสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ในการบำบัดแอมโมเนียในน้ำเสียเทียมความเค็ม 30 psu จากบ่อเลี้ยงกุ้งภายในโรงเรือน
- 2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน ในการบำบัดไนเตรดในน้ำเสียเทียมความเค็ม 30 psu จากบ่อเลี้ยงกุ้งภายในโรงเรือน
- 3) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะฟิล์มชีวภาพที่เกิดขึ้นในตัวกรองในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน และดีไนตริฟิเคชันสภาวะห้องปฏิบัติการ โดยการวิเคราะห์โปรตีนและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน
- 4) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรและชนิดของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพ ขณะเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในถังปฏิกรณ์ โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน โดยการทำงานของไนตริฟายอิงแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์สภาวะห้องปฏิบัติการ
- 2) สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน โดยการทำงานของดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์สภาวะห้องปฏิบัติการ
- 3) เข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในตัวกรองชีวภาพในการทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันในถังปฏิกรณ์
- 4) สามารถนำความรู้ทางด้านแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน มาใช้พัฒนาระบบบำบัดสารประกอบไนโตรเจนสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ผลกระทบของสารประกอบไนโตรเจนในแหล่งน้ำค่อมมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

ในแหล่งน้ำที่มีสารประกอบไนโตรเจนมากเกินไปโดยเฉพาะในแหล่งน้ำปิด ทำให้เกิดปัญหา Eutrophication เกิดการเจริญเติบโตของสาหร่ายและพืชน้ำต่างๆ ทำให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสีย ชุมเขี้ยว จากการตายและการสะสมของสาหร่ายและพืชน้ำ (พรศรี ประรัถกะโม, 2541) ทำให้เกิดความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำในบริเวณใกล้เคียงกับแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

แอมโมเนียอิสระเพียง 0.2 mg/L สามารถเป็นพิษรุนแรงต่อสัตว์น้ำหลายชนิดได้ (มันสิน ตัฒจุลเวศม์ และไพพรรณ พรประภา, 2536) โดยแอมโมเนียจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งโดยลดความสามารถในการขนส่งออกซิเจน ทำให้มีโอกาสติดโรคได้ง่ายขึ้น ความเป็นพิษของแอมโมเนียต่อสัตว์น้ำอยู่ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.4–2 mg/L ของแอมโมเนีย ทั้งนี้ความเป็นพิษของแอมโมเนียขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการเช่น ในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำ ในน้ำเสียที่มีเกลือแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+$ ) และมีสภาพพีเอชมากกว่าหรือเท่ากับ 8 เกลือแอมโมเนียมจะถูกแปรสภาพเป็นแอมโมเนียอิสระ ( $\text{NH}_3$ ) ความเป็นพิษของแอมโมเนียจะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชสูงขึ้นทำให้พิษของแอมโมเนียต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำเพิ่มขึ้นด้วย ส่วนพิษของไนไตรต์ที่มีต่อปลาจะทำให้เลือดไม่สามารถขนถ่ายออกซิเจนได้ เนื่องจากไนไตรต์ทำปฏิกิริยากับฮีโมโกลบินในเลือด ทำให้ปลาตาย

สำหรับผลของไนเตรตต่อสุขภาพของมนุษย์ พบว่าไนเตรตอาจทำให้เกิดโรค โดยเฉพาะเด็กทารกอายุน้อยกว่า 3 เดือน โดยไนเตรตจะถูกกรดิวซ์เป็นไนไตรต์ในกระเพาะอาหารของเด็ก ส่งผลให้เกิดการสร้าง methemoglobin ในเลือด เมื่อร่างกายได้รับน้ำที่มีไนเตรตสูงมากเกินไป จะทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับเม็ดเลือดขาดออกซิเจน (methemoglobinemia) เนื่องจากฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงไม่สามารถรับส่งออกซิเจนได้ ผลที่เกิดขึ้นคือเด็กขาดออกซิเจนหายใจไม่ออก ตัวเขียวคล้ำ (blue babies) และอาจเสียชีวิตได้ ในผู้ใหญ่หากได้รับไนเตรตในปริมาณมากอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ โดยไนเตรตอาจรวมตัวกับเอมีน (amines) เป็นไนโตรซามีน (nitrosamines) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Woodbury *et al.*, 1998; Knowles, 2000)

องค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกาจึงได้ตั้งค่ากำหนดเพื่อพิทักษ์สิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำจืด สำหรับแอมโมเนียอิสระ ( $\text{NH}_3$ ) ในรูปไนโตรเจนเท่ากับ 0.016 mgN/L หรือ 0.02 mg/L ในรูปแอมโมเนีย แต่ความเป็นพิษขึ้นกับค่าพีเอชของน้ำ จึงตั้งค่ากำหนดให้ขึ้นกับพีเอชและค่าอุณหภูมิของน้ำด้วย และสภารัฐมนตรีทรัพยากรสิ่งแวดล้อมของแคนาดากำหนดให้ความเข้มข้นของ



ไนโตรเจนในแหล่งน้ำไว้ไม่เกิน 0.06 mg mgN/L สำหรับในน้ำดื่ม การประปานครหลวง กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข กระทรวงอุตสาหกรรม และสำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรมของประเทศไทย ต่างกำหนดค่ามาตรฐานของไนเตรตในน้ำดื่มไว้ไม่เกิน 10 mg mgN/L หรือ 45 mg mgN/L (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544)

## 2.2 การกำจัดไนโตรเจนทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย

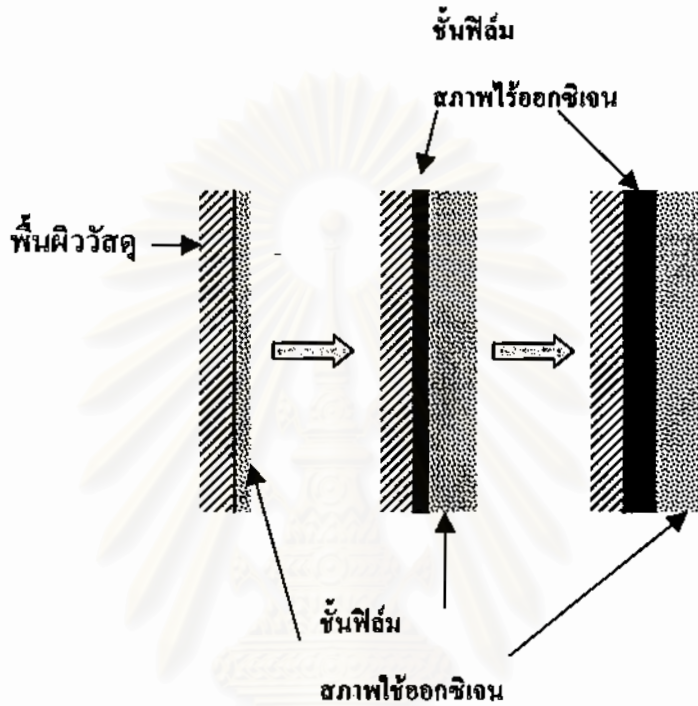
การกำจัดไนโตรเจนโดยวิธีชีวภาพส่วนใหญ่อาศัยแบคทีเรีย โดยปกติในสภาวะแอโรบิก แบคทีเรียสามารถใช้ออกซิเจนมาออกซิไดซ์อินทรีย์คาร์บอน ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ โดยมีออกซิเจนเป็นสารรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย แต่สารอินทรีย์ไนโตรเจนนั้นจะต้องผ่านกระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification) เพื่อเปลี่ยนรูปให้เป็นเกลือแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) ในรูปต่างๆ เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต หรือแอมโมเนียอิสระ ( $\text{NH}_3$ ) เสียก่อน จึงจะถูกออกซิไดซ์โดยไนตริฟายอิงแบคทีเรีย เป็นไนไตรต์และไนเตรตได้ในสภาวะแอโรบิก แต่กระบวนการนี้เป็นเพียงแค่การเปลี่ยนรูปของไนโตรเจนในสภาพรีดิวซ์เป็นไนโตรเจนในสภาพออกซิไดซ์ ทำให้พบการสะสมของไนเตรต (Tookwinas and Sangrungruang, 1998; Kim *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษเช่นเดียวกัน และการกำจัดหรือลดไนโตรเจนยังไม่เกิดขึ้นยกเว้นเฉพาะไนโตรเจนส่วนที่นำไปสร้างเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเป็นปริมาณน้อยมาก ทั้งนี้ไนเตรตจะต้องถูกรีดิวซ์อีกครั้งโดยดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียในสภาวะ Anoxic คือสภาวะไม่มีออกซิเจนอิสระแต่มีออกซิเจนในรูปของไนเตรตเป็นสารรับอิเล็กตรอนและคาร์บอนเป็นสารให้อิเล็กตรอน จึงจะเกิดการกำจัดไนโตรเจนขึ้นได้ โดยไนเตรตจะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจนทำให้เกิดการกำจัดไนโตรเจนออกจากระบบได้โดยสมบูรณ์

### 2.2.1 ตัวกรองชีวภาพ (Biofilter) สำหรับการบำบัดน้ำเสีย

หลักการของระบบกรองทางชีวภาพคือมีวัสดุที่เรียกว่าตัวกรองชีวภาพ Biofilter ซึ่งก็คือวัสดุที่มีแบคทีเรียยึดเกาะอยู่ เช่นไนตริฟายอิงแบคทีเรียจะสร้าง Lipopolysaccharide ออกมาเป็นเมือกจับกับพื้นผิวของตัวกรอง (Hagopain and Riley, 1998) การยึดเกาะดังกล่าวอาจเรียกว่าการตรึง (Immobilization) เกิดเป็นชั้นเรียกว่าฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) ที่สามารถนำมาใช้บำบัดน้ำเสียที่ไหลผ่านตัวกรองชีวภาพได้ แบคทีเรียในระบบบำบัดส่วนใหญ่จะเติบโตเพิ่มจำนวนในตัวกรองชีวภาพ (Leonard *et al.*, 2000) โดยเฉพาะไนตริฟายอิงแบคทีเรียซึ่งมีอัตราการเจริญช้า จึงต้องใช้การตรึงเซลล์แบคทีเรียกับวัสดุเพื่อนำมาใช้เป็นตัวกรองชีวภาพ (Seo *et al.*, 2001) การเกาะของแบคทีเรียบนผิวตัวกรองจะกลายเป็นชั้นหนาขึ้นเรื่อยๆ โดยในระยะเริ่มแรกจะเป็นชั้นเซลล์บางที่อยู่ในสภาพที่ใช้ออกซิเจนได้ (Aerobic layer) แต่เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นชั้นหนาขึ้นจะเกิดสภาพไร้ออกซิเจนขึ้นภายใน (Anaerobic layer) ส่วนผิวด้านนอกยังคงมีสภาพใช้ออกซิเจนอยู่ ดังภาพที่ 2-1



โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในชั้นฟิล์มสภาพใช้ออกซิเจนจะเป็นตัวที่บำบัดน้ำเสียโดยสารอินทรีย์ละลายในน้ำเสียหรือสารอินทรีย์แขวนลอยจะถูกไฮโดรไลซ์จนได้โมเลกุลเล็กๆบริเวณผิวฟิล์มจุลินทรีย์ จากนั้นน้ำเสียจะไหลผ่านชั้นฟิล์มจุลินทรีย์ด้วยวิธี Molecular Diffusion แล้วถูกจุลินทรีย์เปลี่ยนรูปหรือย่อยสลายต่อไป (เกรียงศักดิ์ อุคมสิน โรจน์, 2543)



ภาพที่ 2-1 การเพิ่มความหนาของชั้นฟิล์มจุลินทรีย์ที่เกาะบนตัวกรองชีวภาพที่ระยะเวลาต่างๆ (ดัดแปลงจากเกรียงศักดิ์ อุคมสิน โรจน์, 2543)

วัสดุที่ใช้เป็นตัวกรองชีวภาพ ถ้าพิจารณาถึงด้านกายภาพของผิวตัวกรองซึ่งมีความสำคัญต่อการยึดเกาะของแบคทีเรีย ยังใช้วัสดุที่มีพื้นที่ผิวมาก มีความพรุนหรือขรุขระ ปริมาณแบคทีเรียที่ยึดเกาะจะมากตามไปด้วย งานวิจัยของ Menasveta *et al.* (2001) ได้เลือกใช้เปลือกหอยนางรมหุบซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้จากธรรมชาติ นำมาเป็นวัสดุยึดเกาะแบคทีเรียโดยบรรจุเปลือกหอยในคอลัมน์ดีไนตริฟิเคชัน ซึ่งในงานวิจัยต่อมา อัมไพเทพิน สิงห์พันธุ์ (2543) ได้ทำการพัฒนาระบบบำบัดไนเตรตต่อจาก Menasveta *et al.* (2001) โดยเปลี่ยนมาใช้วัสดุยึดเกาะรูปทรงกลมทำด้วยพลาสติกชื่อว่าไบโอบอลบรรจุในระบบบำบัดไนเตรตแบบท่อยาว พบว่าระบบสามารถลดความเข้มข้นไนเตรตได้ และสุวิมล ตันนาศุกิจวงนิช (2545) ก็ได้ใช้ไบโอบอลเป็นตัวกรองชีวภาพในการศึกษาปฏิบัติการดีไนตริฟิเคชันทั้งถังปฏิกรณ์ขนาดเล็กและในระบบบำบัดแบบท่อยาวพบว่าสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากไบโอบอลมีความคงทนและล้างทำความสะอาดง่าย

ในปัจจุบันวัสดุที่ถูกนำมาใช้เป็นที่ยึดเกาะของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพนอกเหนือไปจากวัสดุจำพวกแก้ว เซรามิก และพลาสติกทรงต่างๆ แล้ว ก็ยังมีการใช้วัสดุจำพวกโพลีเมอร์อีกหลายชนิด ตัวอย่างเช่น AQUACEL เป็นเซลลูโลสที่มีรูพรุนซึ่ง Sakairi *et al.* (1996) ได้ใช้เป็นวัสดุยึดเกาะแบคทีเรียของไนโตรฟายอิงแบคทีเรียและดีไนโตรฟายอิงแบคทีเรียในการบำบัดไนโตรเจนในน้ำทะเล พบว่า AQUACEL มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันได้สูงถึง 99 – 100% ในขณะที่ Cao *et al.* (2002) ได้ใช้ PVA ในถังปฏิกรณ์แบบ Single-Stage Biotenitrification ส่วน Kim *et al.* (2000) ใช้ Polyurethane เป็นตัวยึดเกาะแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้นสูงในระบบตัวกรองชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน พบว่าปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่เกิดขึ้นมีประสิทธิภาพในการบำบัด 95% .

### 2.2.2 ไนโตรฟายอิงแบคทีเรีย (Nitrifying bacteria)

ไนโตรฟายอิงแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Strictly aerobic chemolithotrophic bacteria พบได้ทั้งในดิน น้ำจืด น้ำทะเลหรือน้ำในน้ำเสีย (Austin, 1988) ใช้ออกซิเจนในการหายใจแหล่งคาร์บอนได้จากสาร อนินทรีย์คาร์บอนไดออกไซด์หรือไบคาร์บอเนต (ชงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544) และใช้การออกซิไดซ์สารประกอบไนโตรเจนให้เป็นพลังงาน เจริญเติบโตช้า (Prosser, 1986; Rittmann and McCarty, 2001; Rowan *et al.*, 2003) โดยเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5-8.0 (Prosser, 1986; Allison and Prosser, 1992; Hagopian and Riley, 1998) จะหยุดการเจริญเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า 42 องศาเซลเซียส (Hagopian and Riley, 1998) ไนโตรฟายอิงแบคทีเรียแบ่งการทำงานออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. แบคทีเรียออกซิไดซ์แอมโมเนีย (Ammonia Oxidizing Bacteria: AOB) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรีย 2 กลุ่มคือ beta-proteobacteria และ gamma-proteobacteria ที่รู้จักกันดีคือสกุล *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus* และ *Nitrosolobus* (Watson, 1974; Allison and Prosser, 1992) ปริมาณและสกุลที่พบเป็นชนิดเด่นขึ้นอยู่กับลักษณะของน้ำเสียในระบบบำบัด

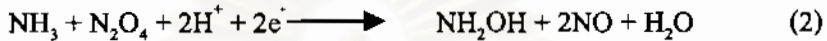
AOB เป็นแบคทีเรียชนิด obligate chemolithoautotroph แต่บางครั้ง AOB สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ได้ ปัจจุบันพบว่า autotrophic AOB บางชนิดเมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำสามารถใช้ไนไตรต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนเกิดเป็น  $N_2O$  หรือ  $NO$  (Hagopian and Riley, 1998) ตัวอย่างเช่น *Nitrosomonas eutropha* และ *Nitrosomonas europaea* สามารถทำให้เกิดได้ทั้งปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันเมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (Bothe *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2003) โดยสามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรต์ได้ภายใต้สภาวะ Anoxic

แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียผลิตเอ็นไซม์ 2 ชนิดที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย ดังแสดงในภาพที่ 2-2 (Bothe *et al.*, 2000) โดยมีขั้นตอนอธิบายได้ดังนี้

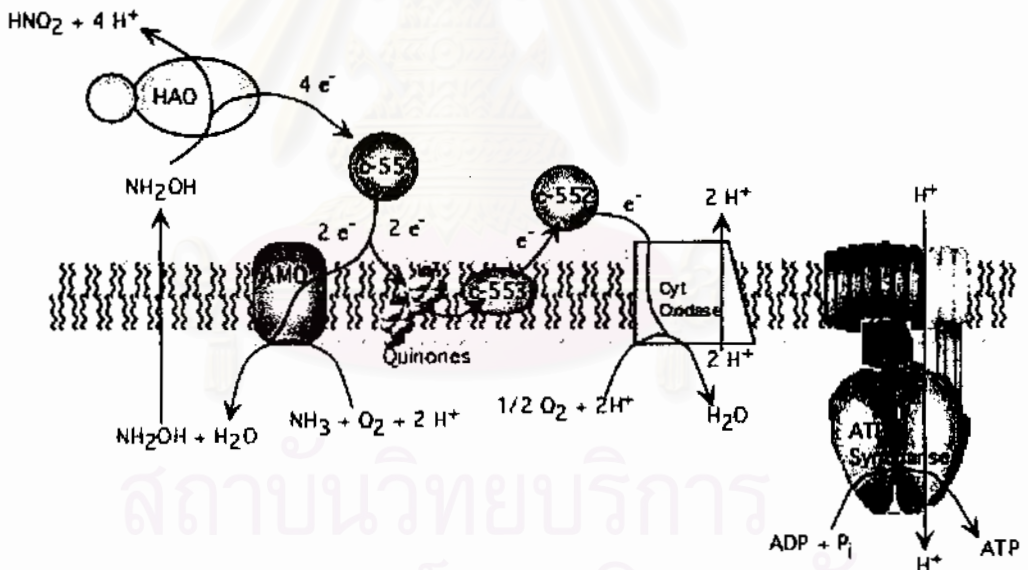
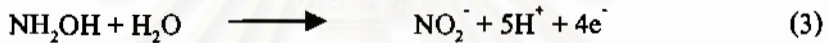
1 เอ็นไซม์ ammonia monooxygenase (AMO) ใช้เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็น hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH) ในสภาวะมีออกซิเจนดังสมการที่ 1



แต่หากอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน แบคทีเรียออกซิไดซ์แอมโมเนียบางชนิดจะเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็น hydroxylamine โดยใช้เอ็นไซม์ ammonia monooxygenase (AMO) และ dinitrogen tetroxide (dimer ของ NO<sub>2</sub>) ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ดังสมการที่ 2



2 เอ็นไซม์ hydroxylamine oxidoreductase (HAO) ใช้เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน hydroxylamine เป็นไนไตรต์ ดังสมการที่ 3

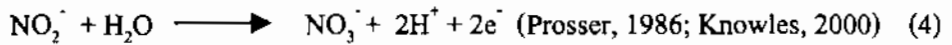


ภาพที่ 2-2 แบบจำลองแสดงการออกซิไดซ์แอมโมเนีย (NH<sub>3</sub>) ให้เป็นไนไตรต์ (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) โดยการทำงานของเอ็นไซม์ ammonia monooxygenase (AMO) ซึ่งอยู่ใน periplasmic membrane และเอ็นไซม์ hydroxylamine oxidoreductase (HAO) ซึ่งเป็น soluble enzyme ใน periplasmic ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Paustian, 2004)

2. แบคทีเรียออกซิไดซ์ไนไตรต์ (Nitrite Oxidizing Bacteria: NOB) ได้แก่แบคทีเรียสกุล *Nitrococcus* และ *Nitrobacter* ซึ่งเป็น alpha-proteobacteria และ *Nitrospira* (Watson, 1974) โดยสกุลที่รู้จักกันดีคือ *Nitrobacter* แต่ในปัจจุบันพบว่าสกุลที่มีบทบาทมากในน้ำทะเลคือ *Nitrospira*

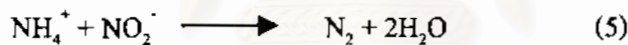


(Rittmann and McCarty, 2001) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถออกซิไดซ์ไนโตรดให้เป็นไนเตรดโดยใช้เอ็นไซม์ nitrite oxidoreductase ที่ membrane-bound (Schmidt *et al.*, 2003) ได้ ATP และ NADH ดังสมการที่ 4



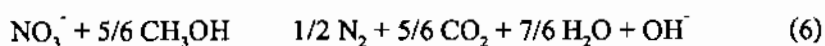
NOB บางชนิดเป็น facultative autotrophs และ anaerobes โดยสามารถใช้สารอินทรีย์เช่น pyruvate ได้และ *Nitrobacter* มีความสามารถในการรีดิวซ์ ไนโตรดเป็นไนเตรดในปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้ (Schmidt *et al.*, 2003)

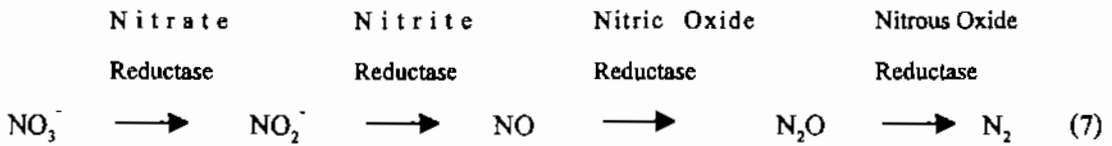
ปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่า autotrophic bacteria ที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนเตรดได้โดยตรง (Bothe *et al.*, 2000) แต่พบแบคทีเรียอีกพวกที่สามารถบำบัดแอมโมเนียได้ในสภาวะ anoxic คือ Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria (AnAOB) สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา Anaerobic ammonia-oxidation (Anammox) ได้แก่แบคทีเรียกลุ่ม Planctomycetales เช่น *Candidatus Brocadia anammoxidans* และ *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (Pynaert *et al.*, 2003) ซึ่งเป็น chemolithoautotrophic ที่มีการเจริญช้า กระบวนการทางชีวเคมีที่อธิบายการทำงานของแบคทีเรีย anammox นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าสามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียในสภาวะไร้ออกซิเจนทำให้เกิด hidrazine ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ), สารระเหยและสารมีพิษบางอย่าง และเอ็นไซม์ HAO สามารถออกซิไดซ์ hidrazine ไปเป็นก๊าซไนโตรเจน ( $\text{N}_2$ ) ได้ ดังสมการที่ 5



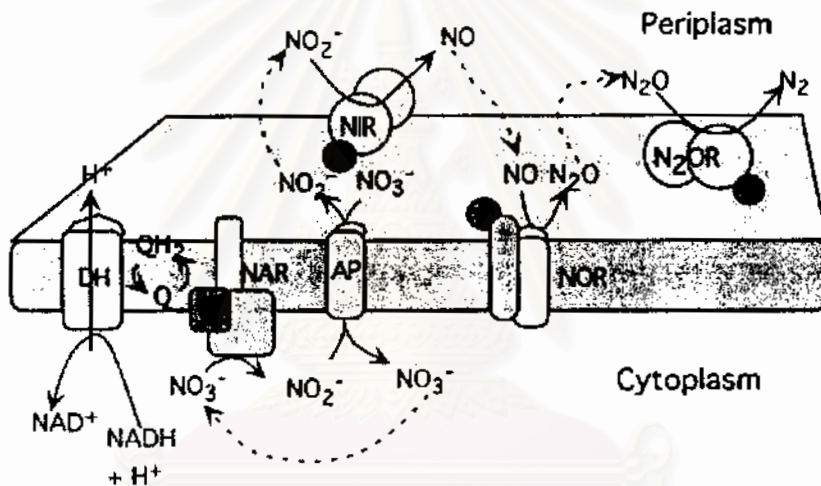
### 2.2.3 ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria)

ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Facultative anaerobic bacteria พบในดิน แหล่งน้ำจืด น้ำกร่อย และในทะเล (Austin, 1988) ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียมีหลายสกุลเช่น *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Halobacterium* และ *Pseudomonas* (Delwiche, 1981) สามารถหายใจได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้จึงต้องใช้อินทรีย์ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิเตท กลูโคส ฯลฯ เป็นแหล่งคาร์บอน (Rittmann and McCarty, 2001) ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนไนเตรดให้เป็นก๊าซไนโตรเจนได้โดยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน ซึ่งแบคทีเรียจะใช้ไนเตรด ไนโตรด ไนตริกออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและใช้เมทานอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ (Mccaig and Haug, 1971) ดังสมการที่ 6 โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ Reductase ดังภาพที่ 2-3 และสมการดังที่ 7





อย่างไรก็ตามเอ็นไซม์เหล่านี้อาจถูกยับยั้งการทำงานหากอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนและจะเกิดการสะสมของไนไตรต์ ไนตริกออกไซด์ และไนตรัสออกไซด์ เรียกว่าเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันแบบไม่สมบูรณ์ (Rittmann and McCarty, 2001) ซึ่งในทางปฏิบัติหากสามารถควบคุมระบบให้เกิดดีไนตริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ เท่ากับว่าระบบสามารถบำบัดสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนออกไปได้อย่างสมบูรณ์ โดยที่สามารถนำน้ำทะเลกลับมาหมุนเวียนใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้อีก



ภาพที่ 2-3 แบบจำลองแสดงการรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ ไนตริกออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์ และก๊าซไนโตรเจน โดยเอ็นไซม์ Nitrate Reductase (NAR), Nitrite Reductase (NIR), Nitric Oxide Reductase (NOR) และ Nitrous Oxide Reductase ( $\text{N}_2\text{OR}$ ) ในปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (Paustian, 2004)

## 2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อไนตริฟายอิงแบคทีเรียและดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย

### 1. ออกซิเจน

แบคทีเรียออกซิไดซ์แอมโมเนียบางชนิดเมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำสามารถใช้ไนไตรต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนเกิด  $\text{N}_2\text{O}$  หรือ  $\text{NO}$  (Hagopian and Riley, 1998) เช่น *Nitrosomonas eutropha* และ *Nitrosomonas europaea* สามารถทำให้เกิดได้ทั้งปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันได้ เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (Bothe *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2003) โดย autotrophic AOB สามารถมีชีวิตอยู่ในสภาวะ Anoxic เช่นในดินตะกอน หรือน้ำเสียได้นานเป็นเดือน ส่วนการทำงานของแบคทีเรียออกซิไดซ์ไนไตรต์โดยอาศัยเอ็นไซม์



nitrite oxidoreductase เปลี่ยนไนไตรต์ให้เป็นไนเตรต หากอยู่ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนเอ็นไซม์ nitrite oxidoreductase จะสามารถทำให้เกิดกระบวนการย้อนกลับโดยรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ได้ (Schmidt *et al.*, 2003)

## 2. แหล่งคาร์บอน

โดยทั่วไปหากปริมาณเมทานอลที่ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนในระบบบำบัดไม่สมดุลกับปริมาณไนเตรตจะทำให้ประสิทธิภาพของการบำบัดไนเตรตลดลง โดยการทดลองของ Menasveta *et al.* (2001) ได้เปรียบเทียบการใช้เอทานอลกับเมทานอลสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนของดีไนริฟายอิงแบคทีเรียในระบบ พบว่าเกิดกรดอินทรีย์จากการย่อยสลายเอทานอลอย่างไม่สมบูรณ์ของแบคทีเรียทำให้พีเอชในระบบเพิ่มขึ้น เมื่อเปลี่ยนมาใช้เมทานอลพบว่าระบบสามารถเกิดปฏิกิริยาคีโนรีฟิเคชันได้อย่างต่อเนื่อง

## 3. ความเค็มของน้ำ

ความเค็มมีผลอย่างมากต่อการทำงานของไนริฟายอิงแบคทีเรีย Sakairi *et al.* (1996) พบว่าในการบำบัดไนโตรเจนในน้ำทะเลโดยไนริฟายอิงแบคทีเรียและดีไนริฟายอิงปฏิกิริยาในคิโนรีฟิเคชันในน้ำทะเลจะเกิดขึ้นได้น้อยกว่าในน้ำจืดถึง 6 เท่า

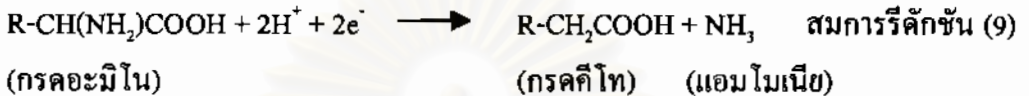
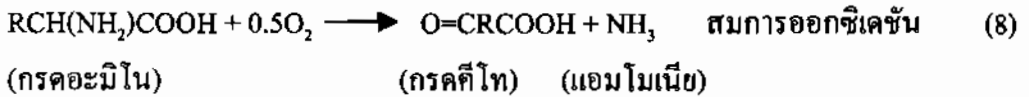
## 4. การถูกยับยั้งการทำงาน

ไนริฟายอิงแบคทีเรียจะถูกยับยั้งโดยแสงสว่าง (Hagopain and Riley, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่า Hydroxylamine แอมโมเนียและ NO จะยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียออกซิไดซ์ไนไตรต์ (Schmidt *et al.*, 2003) ซึ่งในการบำบัดน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้นสูงในระบบตัวกรองชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน Kim *et al.* (2000) พบการสะสมของไนไตรต์สูง สาเหตุเกิดจากการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียออกซิไดซ์ไนไตรต์เนื่องจากความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง

### 2.3 การบำบัดสารประกอบไนโตรเจนในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยระบบกรองทางชีวภาพ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบพัฒนาซึ่งจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำอยู่เสมอเพื่อคงคุณภาพน้ำที่ดีในบ่อ น้ำทิ้งที่ปล่อยออกจะมีปริมาณสารอินทรีย์สูงและมีของเสียไนโตรเจน (nitrogenous waste) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดมาจากการขับถ่ายของสัตว์น้ำ ซึ่ง 50 % ของไนโตรเจนจะอยู่ในรูปแอมโมเนีย (มันติน ดันจูลเวตส์ และ ไพพรธน พรประภา, 2536) เนื่องจากสัตว์น้ำจะขับถ่ายไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียเป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีของเสียไนโตรเจนในรูปสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น ซากพืช ซากสัตว์ เซลล์จุลินทรีย์ที่ตายแล้ว หรือเศษอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำตกค้างอยู่ในบ่อซึ่งจะถูกเปลี่ยนรูป ให้ไปอยู่ในรูปอนินทรีย์ไนโตรเจนซึ่งก็คือแอมโมเนีย โดยกระบวนการ

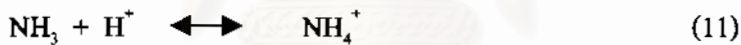
การ แอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification) โดยจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น แบคทีเรีย แอคทีโนมัยซีทีส ฟังไจ ในกระบวนการนี้โปรตีนจะถูกย่อยสลายเป็นกรดอะมิโน และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน กรดอะมิโนให้เป็นแอมโมเนียคั่งสมการที่ 8 และ 9 (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544)



ส่วนยูเรียจากการขับถ่ายของสัตว์น้ำจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอ็นไซม์ยูรีเอสดังสมการที่ 10



ในน้ำเสียที่มีแอมโมเนียอิสระซึ่งมีพีเอชเป็นกลางหรือเป็นกรดแอมโมเนียจะถูกแปรสภาพเป็นเกลือแอมโมเนียมดังสมการ



การบำบัดน้ำเสียในโตรเจนจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยใช้ตัวกรองชีวภาพที่มีแบคทีเรียเกาะในระบบไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่สามารถกำจัดไนโตรเจนออกจากระบบได้ทั้งหมด วิธีนี้มีข้อดีกว่าการใช้สารร้ายที่จะต้องคอยกำจัดเซลล์สาหร่ายทิ้ง ทั้งยังมีประสิทธิภาพสูง ใช้พลังงานน้อย และปลอดภัยต่อสัตว์น้ำกว่าระบบบำบัดแบบเคมีและกายภาพ (เกรียงศักดิ์ อุคสมสิน ไรจน์, 2543) จากการศึกษาของ Tookwinas และ Sangrungruang (1998) ที่ได้ทำการบำบัดน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาที่จังหวัดจันทบุรีด้วยระบบ Biofilter โดยใช้แบคทีเรียระบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนปรากฏว่าสามารถลดแอมโมเนียลงได้ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตภายในระยะเวลา 7 ชั่วโมง แต่พบการสะสมของไนเตรตจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยระบบการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนต่อไป การจะเปลี่ยนไนเตรตเป็นก๊าซไนโตรเจนซึ่งเป็นการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนได้อย่างสมบูรณ์นั้นจะต้องอาศัยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน แต่ถ้าหากมีการควบคุมที่ไม่ดี โดยเฉพาะการที่ปริมาณเมทานอลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้แบคทีเรียในระบบไม่สมดุลกับปริมาณไนเตรตจะทำให้ประสิทธิภาพของระบบลดลงและจะเกิดซัลไฟด์ขึ้นในช่วงท้ายของการบำบัด (Balderston and Sieburth, 1976)

การศึกษาระบบบำบัดคิโนรีฟิเคชันสำหรับใช้ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย มีรายงานโดย Menasveta *et al.* (2001) ซึ่งเป็นการทดลองใช้คอลัมน์บรรจุเปลือกหอยนางรมทูปเป็น วัสดุกรองชีวภาพพบว่าระบบสามารถลดปริมาณไนเตรตลงได้จาก 165 mg/L เหลือ 25 mg/L ในระยะเวลา 9 สัปดาห์และได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการใช้เอทานอลกับเมทานอลสำหรับเป็น แหล่งคาร์บอนของเชื้อคิโนรีฟิเคชันแบคทีเรียในระบบพบว่าการใช้เอทานอล ระบบจะเกิด ปฏิริยาดีในคิโนรีฟิเคชันขึ้นได้เฉพาะในทุกๆครั้งที่มีการเติมแบคทีเรีย *Bacillus sp.* ที่เตรียมจากห้อง ปฏิบัติการ สาเหตุเป็นเพราะการเกิดกรดอินทรีย์จากการย่อยสลายเอทานอลอย่างไม่สมบูรณ์ของ แบคทีเรียทำให้พีเอชในระบบเพิ่มขึ้น เมื่อเปลี่ยนมาใช้เมทานอลระบบสามารถเกิดปฏิริยาดีในคิโนรี ฟิเคชันได้อย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับชุดควบคุมโดยไม่จำเป็นต้องเติมแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการ ต่อมาได้มีการปรับปรุงระบบบำบัดไนเตรตโดยอำไพเทพิน (2543) ซึ่งได้ใช้เปลือกหอยนางรมทูป เป็นวัสดุยึดเกาะแบคทีเรียในคอลัมน์คิโนรีฟิเคชัน พบว่าเมื่อทำการทดลองเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เกิดการอุดตันของระบบ จึงได้เปลี่ยนมาใช้วัสดุยึดเกาะรูปทรงกลมทำด้วยพลาสติก (ไบโอบอล) บรรจุในท่อยาว ระบบดังกล่าวสามารถลดความเข้มข้นไนเตรตจาก 145.4 mg-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L เหลือ 2.9 mg-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L

#### 2.4 การศึกษาความหลากหลายแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพ

ในการพัฒนาให้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ความชัดเจนของ ประชาคมจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียนั้นสำคัญ และจำเป็นต้องอาศัยความรู้ทางด้านจุลชีววิทยา มาช่วยสนับสนุนให้เข้าใจระบบลึกซึ้ง แต่ในปัจจุบันยังขาดแคลนข้อมูลและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ จำนวนหรือ ชนิดของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดหรือในตัวกรองชีวภาพ (Rowan *et al.*, 2003) ซึ่งทำ ให้การคำนวณระบบบำบัดโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์จำเป็นต้องใช้แบบจำลองที่เรียกว่า "กล่องดำ" (black-box model) ซึ่งก็คือแบบจำลองที่มีเฉพาะ input และ output เนื่องจากยังไม่เข้าใจ ถึงปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการบำบัดได้อย่างสมบูรณ์ (Yoshie *et al.*, 2001)

ความรู้ทางด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์ในธรรมชาติยังมีน้อยมาก เนื่องจากการ ใช้วิธีส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีข้อจำกัดอยู่มาก โดยทั่วไปการจำแนกชนิดของแบคทีเรียมักใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้โคโลนี เดียวที่บริสุทธิ์แล้ว วิเคราะห์ชนิดโดยการส่องตรวจรูปร่างลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย และวิธีการทดสอบทางชีวเคมี เช่น งานวิจัยของ Leonand และคณะ (2000) ใช้วิธีจำแนกชนิด ของแบคทีเรียในระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดสำหรับเลี้ยงปลาทะเล (sea bass) ตามคู่มือของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology จำแนกได้แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas*, *Oceanospirillum*, *Marinobacter*, *Paracoccus*, *Erythrobacter*, *Aeromonas* และ *Vibrio* แต่จะไม่พบ *Vibrio* ในตัวกรองชีวภาพ



การพัฒนาเทคนิคทางโมเลกุลทำให้สามารถศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ถึงระดับยีน (gene) ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นผลมาจากวิวัฒนาการ หลักการของการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในธรรมชาติก็คือการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสใน RNA หรือ DNA และจัดแบ่งความหลากหลายประชากรออกมาเป็นกลุ่มตามความแตกต่าง (pattern หรือ profile) หรืออาจเรียกว่าเทคนิค DNA fingerprint สามารถใช้เปรียบเทียบองค์ประกอบประชากรแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ รวมทั้งการติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนของแบคทีเรียได้อีกด้วย

ในปัจจุบันวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลที่นิยมใช้ในการศึกษาประชากรแบคทีเรียก็คือเทคนิค PCR-DGGE ประกอบด้วยขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของ DNA ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และการแยกชั้นของ 16S rDNA ด้วยวิธีการแยกสารด้วยไฟฟ้า (electrophoresis)

ขั้นตอนทั่วไปของการวิเคราะห์ประชากรจุลินทรีย์ (Muyzer and Smalla, 1998) โดยวิธี PCR-DGGE ประกอบด้วย

1. การสกัดกรดนิวคลีอิก (DNA หรือ RNA)
2. การเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วย PCR โดยใช้ primer ที่เหมาะสมดังตารางที่
3. วิเคราะห์ยีนจาก PCR โดยเทคนิค genetic fingerprint เช่น DGGE หรือ TGGE

ตารางที่ 2-1 ตัวอย่างของ DNA primer ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์แบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE

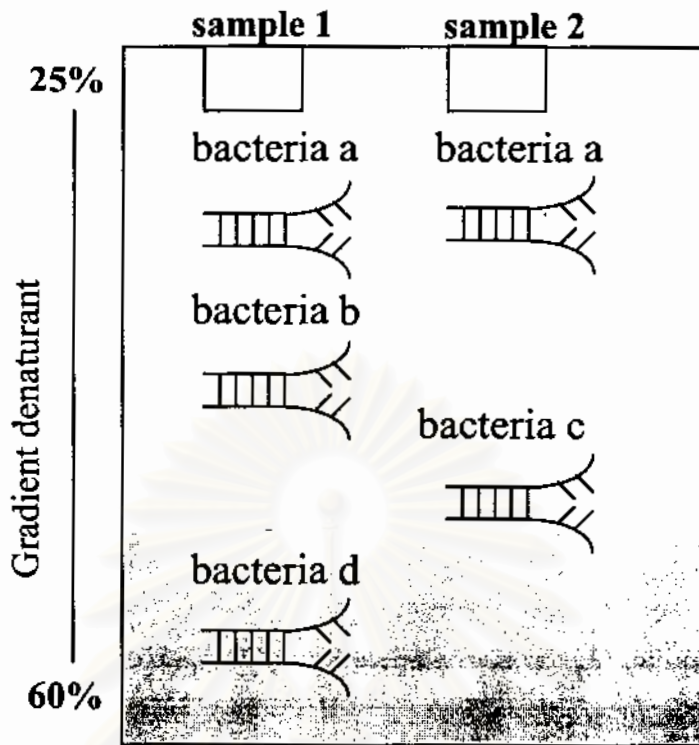
Primer	ใช้สำหรับ	ที่มา
Primer PARCH340f (5'-CCCTACGGGG(C/T)GCA (G/C)CAG-3')	Archaea, V3 region	Øvreås <i>et al.</i> , 1997
Primer PARCH519r (5'-TTACCGCGGC(G/T)GC TG-3')		
primer PRBA338f + GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGG GGGCACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAG CAG-3')	Bacteria, V3 region	Lane, 1991 อ้าง โดย Øvreås <i>et al.</i> , 1997
primer PRUN518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')	Universal, V3 region	Muyzer <i>et al.</i> , 1993 โดย Øvreås <i>et al.</i> , 1997



ตารางที่ 2-1 (ต่อ) ตัวอย่างของ DNA primer ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์แบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE

Primer	ใช้สำหรับ	ที่มา
Primer 2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') Primer 3 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCG GGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGG CAGCAG-3')	Bacteria	Rowan <i>et al.</i> , 2003
Primer 341f + GC clamp (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') primer 534r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (250 bp)	Bacteria	Labbe <i>et al.</i> , 2003
Primer 1055f (5'-TGGCTGTCGTCAGCT-3') GC clamp primer 1392r (5'-CGCCCGCCGCGC CCCGCGCCCGCCCCGCGCCCCCGCCCA CGGGCGGTGTGTAC-3')	Universal bacteria	Tal <i>et al.</i> , 2003

เทคนิค DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ได้ถูกนำมาใช้ในการบ่งบอกถึงความหลากหลายของยีนในประชาคมแบคทีเรีย ด้วยเทคนิคการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้หลักการการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอสายคู่ (double-strand DNA) ในตัวกลางสำหรับการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่เป็น polyacrylamide gel ที่ถูกให้ความร้อนและมีการผสมด้วยสารเคมีที่สามารถทำลายพันธะในคู่สายดีเอ็นเอ (denaturant) ซึ่งเป็นสารผสมของ urea และ formamide ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันจากน้อยไปมาก (denaturant gradient) เมื่อ โมเลกุล DNA ซึ่งมีลำดับเบสต่างกันวิ่งผ่านในเจล พันธะในโมเลกุลของ DNA จะถูกทำลายด้วย denaturant ด้วยรูปแบบที่แตกต่างกัน โดย DNA ที่มีความแข็งแรงของพันธะมากจะเสียดสภาพได้เมื่อสัมผัสกับ urea ความเข้มข้นสูง ทำให้ DNA แต่ละชิ้นมีการเคลื่อนที่บนเจลด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ urea ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามระยะทางบน gradient gel ดังภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 โดอะแกรมแสดงการเคลื่อนที่ของ DNA เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดบนเจล DGGE

จากเหตุผลที่เทคนิค DGGE สามารถนำมาใช้วิเคราะห์องค์ประกอบชนิดหรือประชาคม (community) ของแบคทีเรียในธรรมชาติได้เป็นอย่างดี จึงมีการนำเทคนิค DGGE มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น Yoshie และคณะ (2001) ทำการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในกระบวนการดีไนตริฟิเคชันบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็ม โดยใช้วิธี PCR-DGGE เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการใช้วิธี PCR-DGGE สามารถจำแนกจุลินทรีย์ในระบบได้ดีกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากวิธีเพาะเลี้ยงจะสามารถตรวจสอบจุลินทรีย์จากระบบบำบัดได้เฉพาะบางชนิดที่สามารถเติบโตบนอาหารเพาะเชื้อได้ ในขณะที่ในตัวอย่างชีวภาพมีจุลินทรีย์จำนวนมากที่ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Yoshie et al, 2001; Tal et al., 2003) เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA จึงช่วยทำให้การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมมีความถูกต้องมากขึ้น

Sakairi et al. (1996) ศึกษาลักษณะทางกายภาพของไนตริฟายอิงในระบบบำบัดในโตรเจนในน้ำทะเลโดยใช้ AQUACEL เป็นวัสดุยึดเกาะแบคทีเรียพบลักษณะไนตริฟายอิงแบคทีเรียเป็นสกุล *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio* และ *Nitrobacter* ส่วนดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียมีลักษณะคล้าย *Hyphomicrobium* sp. ส่วน Balderston และ Sieburth (1976) ได้ศึกษาการบำบัดไนเตรดจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบปิดโดยใช้คอลัมน์ดีไนตริฟิเคชัน เมื่อใช้กล่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนส่องตรวจจุลินทรีย์ พบว่าเริ่มมีจุลินทรีย์เจริญบนวัสดุกรองชีวภาพในวันที่ 8 โดยพบจุลินทรีย์

กลุ่ม Flagellates, Loricated ciliates, Testacea และ Peritricha เมื่อทำการแยกดีเอ็นเอในไตรฟายอิงแบคทีเรีย ระบุได้ว่าเป็น *Pseudomonas* sp. และ *Alcaligenes* sp.

การศึกษาของ Tal และคณะ (2003) ใช้เทคนิค DGGE ที่มีความเข้มข้นของ denaturants ระหว่าง 40-60 % มาจำแนกชนิดแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพ polyethylene beads ในถังปฏิกรณ์ moving bed bioreactor เพื่อบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลระบบหมุนเวียนแบบปิด พบแบคทีเรียทั้ง ในไตรฟายอิงแบคทีเรีย ชนิด *Nitrosomonas cryotolerans* และ *Nitrospira marina* ดีเอ็นเอในไตรฟายอิงแบคทีเรีย ชนิด *Pseudomonas* sp. และ *Sphingomonas* sp. และแบคทีเรีย *Planctomyces* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา anaerobic ammonia oxidation (anammox) ผลของการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Nitrospira* นั้นเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญยิ่งต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันในขั้นตอนการเปลี่ยนไนโตรเจนไปเป็นไนเตรต ซึ่งแตกต่างไปจากความเข้าใจดั้งเดิมที่มักจะระบุว่าเกิดจากแบคทีเรียในสกุล *Nitrobacter* นอกจากนี้ความรู้ใหม่ทางด้านจุลินทรีย์เช่น การค้นพบ anaerobic ammonia oxidizing planctomyces และ proteobacteria ที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนีย ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยพัฒนาการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียไนโตรเจนทางชีวภาพแบบใหม่ๆ ให้มีประสิทธิภาพการบำบัดไนโตรเจนได้อย่างสมบูรณ์ ตัวอย่างของการใช้เทคนิค PCR-DGGE ช่วยในการจำแนกชนิดและติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมรวมถึงในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีตัวกรองชีวภาพแสดงในตารางที่ 2-2 และ 2-3

ตารางที่ 2-2 ตัวอย่างของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายของไนตริฟายอิงแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE

สภาวะการศึกษา	แบคทีเรียชนิดเด่นที่พบ	ที่มา
Biological aerated filter และ filter bed reactor บำบัดน้ำเสีย	<i>Nitrosomonas</i> sp. <i>Nitrosococcus mobilis</i>	Rowan <i>et al.</i> , 2003
ตะกอนจากหาดทรายชายฝั่งทะเล ประเทศเนเธอร์แลนด์	<i>Nitrospira</i> sp. <i>Nitrosomonas</i> sp.	Kowalchuk <i>et al.</i> , 1997 ใช้ primer สำหรับ AOB
ตะกอนดินในฟาร์มเลี้ยงปลาทะเล	<i>Nitrosomonas</i> group	Mccaig <i>et al.</i> , 1999
Nitrifying granules ใน aerobic upflow fluidized bed (AUFB) reactor	<i>Nitrosomonas</i> -like bacteria	Tsuneda <i>et al.</i> , 2003

ตารางที่ 2-2 (ต่อ) ตัวอย่างของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายของไนคริฟายอิงแบคทีเรีย โดยวิธี PCR-DGGE

สภาวะการศึกษา	แบคทีเรียชนิดเด่นที่พบ	ที่มา
Membrane aerated บำบัดน้ำเสียชุมชน ใช้ตัวกรอง microporous polypropylene	$\beta$ - subdivision of <i>Proteobacteria</i>	Cole <i>et al.</i> , 2002
ถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน บำบัดน้ำเสียโรงงาน สภาวะออกซิก ประเทศสวีเดน แลนค์ ใช้เทคนิค FISH ในการวิเคราะห์แบคทีเรีย	<i>Nitrospira</i> sp. <i>Nitrosomonas communis</i> <i>Nitrosomonas oligotropha</i> <i>Nitrosomonas europaea</i> <i>Nitrosomonas eutropha</i>	Egli <i>et al.</i> , 2003b
Activated sludge ของโรงบำบัดน้ำเสีย อุตสาหกรรมที่มีแอมโมเนียสูง ใช้เทคนิค FISH ในการวิเคราะห์แบคทีเรีย	<i>Nitrosococcus mobilis</i> <i>Nitrosomonas europaea</i> <i>Nitrobacter</i> sp. <i>Nitrospira</i> sp.	Juretschko <i>et al.</i> , 1998
Rotating biological contactor biofilm บำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแอมโมเนียสูง ใช้เทคนิค FISH ในการวิเคราะห์แบคทีเรีย	<i>Nitrosomonas europaea</i> <i>Nitrosomonas eutropha</i> <i>Nitrospira</i> sp. <i>Cytophaga-Flavobacterium</i> <i>-Bacteroides</i> (CFB) <i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	Egli <i>et al.</i> , 2003a
Rotating biological contactor (RBC) บำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแอมโมเนียสูง	<i>Nitrosomonas</i> sp. <i>Sulfobacillus</i> sp. <i>Kuenenia stuttgartiensis</i> <i>Brocadia anammoxidans</i>	Pynaert <i>et al.</i> , 2003

หมายเหตุ FISH = Fluorescence in Situ Hybridization



ตารางที่ 2-3 ความหลากหลายของดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียในระบบบำบัดดีไนตริฟิเคชัน โดยการวิเคราะห์ PCR-DGGE

สภาวะการศึกษา	แบคทีเรียชนิดเด่นที่พบ	ที่มา
methanol-fed denitrification reactor บำบัดน้ำทะเล ใช้ตัวกรอง cellulose	<i>Methylophaga</i> sp. <i>Candidate</i> OPI1 <i>Thiomicrospira denitrificans</i>	Labbe <i>et al.</i> , (2003)
Anaerobic bed reactor บำบัด metallurgic salt wastewater	<i>Colwellia</i> sp. <i>Halomonas</i> group <i>Cytophaga-Flavobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	Yoshie <i>et al.</i> , 2001
Moving bed bioreactor (MBB) บำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล ความเค็ม 20 พีพีที ตัวกรอง polyethylene beads	<i>Nitrosomonas cryotolerans</i> <i>Nitrospira marina</i> <i>Sphingomonas</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Planctomycetes</i> sp. <i>Aquaspirillum metamorphum</i> <i>Sulfitobacter</i> sp.	Tal <i>et al.</i> , 2003
Sludge granule anaerobic ใน UASB reactor ใช้การวิเคราะห์ทางชีวเคมี	<i>Methanosaeta concilii</i> <i>Methanobacterium</i> strain AZ	Pol <i>et al.</i> , 2004
ตะกอนชายฝั่งทะเล สภาวะ aerobic และ Denitrifying	<i>Marinobacter</i> sp stain CAB	Rontani <i>et al.</i> , 1997
ตะกอนจาก hypersaline ponds ทะเลเมดิเตอร์เรเนียน สภาวะ anoxic	<i>Cytophaga-Flavobacterium</i> <i>-Bacteroides</i> (CFB) (phylum Bacteroidetes) <i>Halobacteria</i> sp. <i>Methanobacter</i> sp. <i>Desulfotomaculum</i> sp. <i>Dehalococcoides</i> sp. <i>Aerococcus</i> sp. <i>Salinibacter</i> sp. <i>Rhodothermus</i> sp.	Mouné <i>et al.</i> , 2003

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดและกลุ่มของแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพ เพื่อนำมาวัดไนโตรเจนจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ทำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจำนวนสองถังที่มีโครงสร้างคล้ายกัน แต่จัดสถานะของระบบแตกต่างกัน โดยถังปฏิกรณ์ถังที่ 1 ถูกจัดให้เป็นสถานะที่มีออกซิเจนเพื่อให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน และถังปฏิกรณ์ถังที่ 2 ถูกจัดให้เป็นสถานะไร้ออกซิเจนเพื่อให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน

#### 3.1 การเตรียมถังปฏิกรณ์

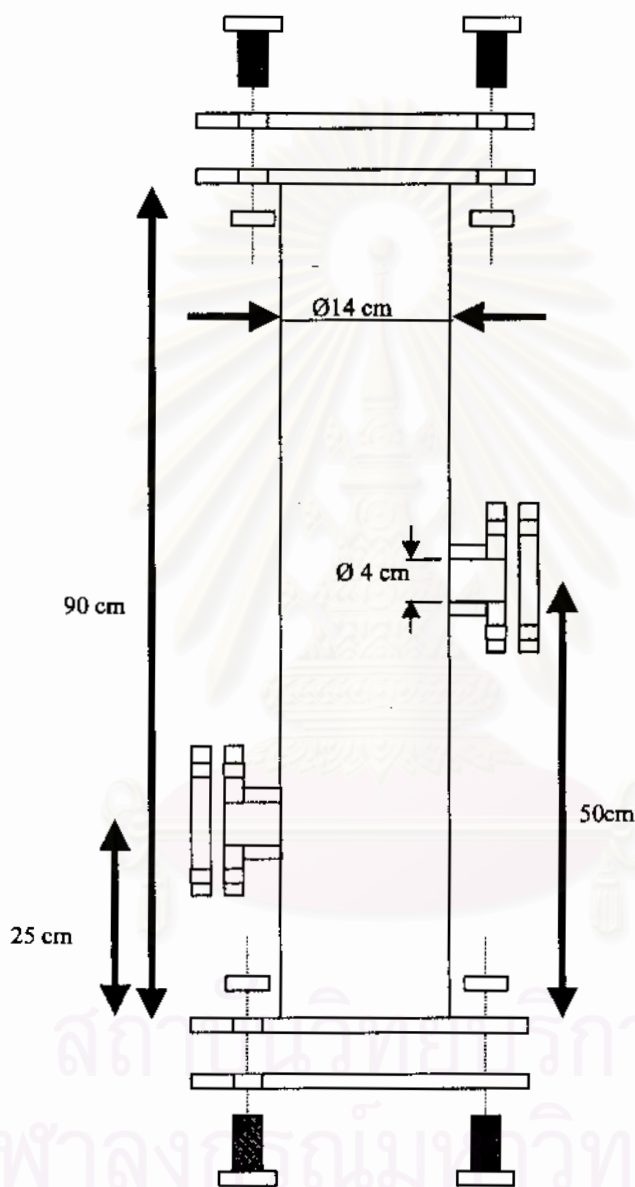
##### 3.1.1 การเตรียมถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน

ถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (Nitrification reactor: NR) (ภาพที่ 3-2) สร้างขึ้นจากท่อพลาสติกอะคลิลิกใสหนา 8 mm มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 14 cm ความสูง 90 cm ความจุ 13.86 L ถังปฏิกรณ์เป็นแบบ Aerobic batch submerged fixed-bed biofilm reactor โดยด้านข้างถังมีจุดเก็บตัวอย่างน้ำเป็นท่อน้ำออกทำจากสายยางซิลิโคน ด้านล่างของถังปฏิกรณ์มีท่อจ่ายอากาศโดยต่อสายจากปั๊มจ่ายอากาศที่อยู่ด้านบนนอก ปลายท่อจ่ายอากาศมี หัวทรายทรงกลมพ่นอากาศให้กับน้ำภายในถังปฏิกรณ์ ติดตั้งปั๊มสูบน้ำ (LEGEON AQUARIUM 10-15 W 400-700 L/H) เพื่อสูบน้ำออกจากถังปฏิกรณ์เมื่อต้องการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ด้านบนของถังปฏิกรณ์ปิดด้วยฟิล์มพลาสติกใสเพื่อกันฝุ่นละออง และภายนอกของถังปฏิกรณ์ถูกหุ้มด้วยพลาสติกสีดำเพื่อป้องกันแสงสว่างจากภายนอก

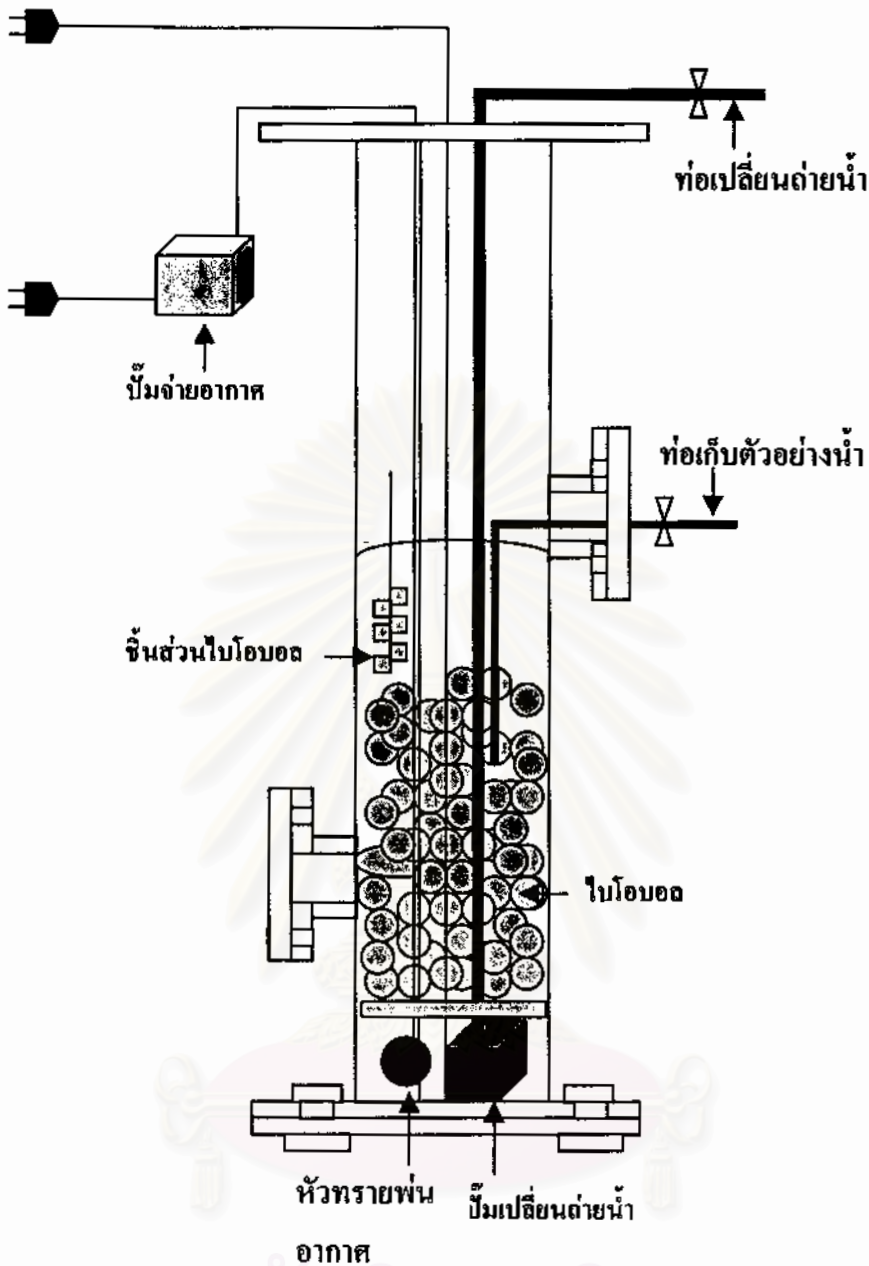
ภายในถังปฏิกรณ์ NR บรรจุตัวกรองชีวภาพที่ใช้เป็นวัสดุยึดเกาะของแบคทีเรียชื่อ “Super Bioball™” หรือไบโอบอล (ภาพ 3-3) จำนวน 700 ลูก บนฐานสูงขึ้นไปจากก้นถัง ไบโอบอลทำจากพลาสติก POM (Polyoxymethylene) ทรงกลม สีฟ้า เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm ผิวเรียบ ไม่มีรูพรุน แข็ง น้ำซึมผ่านไม่ได้ มีน้ำหนักมากกว่าน้ำ นอกจากนี้ยังได้นำชิ้นส่วนของไบโอบอลซึ่งได้จากการบิบบิโอบอลให้แตก เเจาะรูผูกเชือกห้อยไว้ในถังปฏิกรณ์ ชิ้นส่วนดังกล่าวมีไว้สำหรับการสูบล้างไบโอบอลเพื่อส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

น้ำเสียเทียมที่ใช้สำหรับการทดลองในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันเตรียมจากน้ำทะเลที่ปรับความเค็มให้อยู่ระดับ 30 psu ผสมกับน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งภายในโรงเรือนปริมาตรร้อยละ 2 เพื่อเป็นแหล่งอาหารและเป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น ในขั้นตอนการทดลองได้เตรียมน้ำปริมาตรรวม 20 L

เพื่อใช้กับถังปฏิกรณ์ทั้ง NR และ DNR เพื่อให้มีสภาพของน้ำเริ่มต้นเหมือนกันทุกประการ โดยในถัง NR ได้เติมน้ำปริมาตร 5 L และเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ให้มีความเข้มข้น  $2 \text{ mgNH}_4\text{-N/L}$  ทำเครื่องหมายบอกระดับปริมาตรน้ำด้านข้างถัง น้ำเสียเทียมส่วนที่เหลือเตรียมไว้สำหรับเติมลงในถังปฏิกรณ์ทดแทนน้ำตัวอย่างที่ถูกเก็บไปวิเคราะห์ระหว่างการทำงานทดลอง

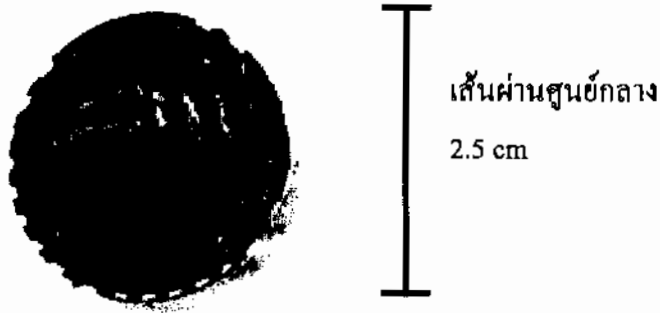


ภาพที่ 3-1 ภาพส่วนประกอบถังปฏิกรณ์ทำจากท่อพลาสติกอะคลิลิกใสเพื่อใช้สำหรับทดลอง โดยถังปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชัน (NR) และดีไนโตรฟิเคชัน (DNR) จะมีโครงสร้างพื้นฐานของถังเหมือนกัน



ภาพที่ 3-2 โคอะแกรมของถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR) เพื่อใช้ศึกษาการบำบัดแอมโมเนียภายในบรรจุตัวกรองชีวภาพไบโอบอด 700 ลูกและน้ำเสียเทียม ความเค็ม 30 psu ปริมาตร 5 L มีหัวทรายพ่นอากาศ เพื่อให้ถึงอยู่ในสภาวะมีออกซิเจนตลอดเวลา ด้านบนปิดด้วยฟิล์มพลาสติกใสเพื่อกันฝุ่น และมีการแขวนชั้นส่วนไบโอบอดสำหรับการสูมตัวอย่างเพื่อส่องตรวจด้วย SEM



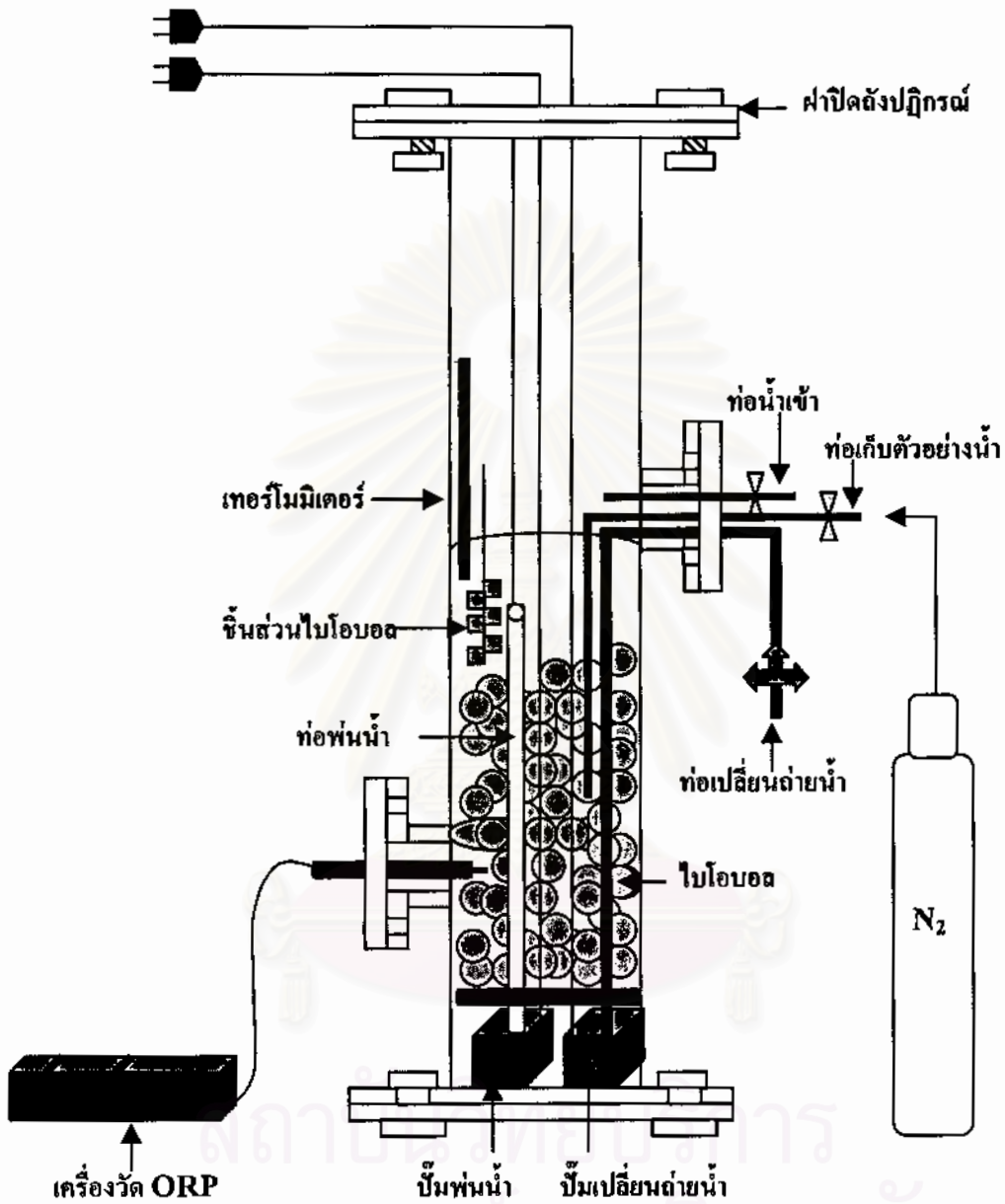


ภาพที่ 3-3 ตัวกรองชีวภาพ Super Bioball™ หรือไบโอบอล สำหรับเป็นวัสดุยึดเกาะของแบคทีเรีย  
 บรรจุภายในถังปฏิกรณ์

### 3.1.2 เตรียมถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน

ถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification reactor: DNR) มีรูปแบบคล้ายถังปฏิกรณ์  
 ไนตริฟิเคชัน (ภาพที่ 3-4) แต่จะทำการปรับให้ภายในถังอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยด้านบนมีฝา  
 ปิดสนิทเพื่อไม่ให้อากาศสามารถผ่านเข้าออกได้ ถังปฏิกรณ์เป็นแบบ Anaerobic batch submerged  
 fixed-bed biofilm reactor ด้านข้างถังมีจุดเก็บตัวอย่างน้ำเป็นท่อน้ำเข้าและท่อน้ำออกโดยใช้สาย  
 ยางซิลิโคน ด้านล่างของถังปฏิกรณ์ ติดตั้งปั๊มคูลน้ำขนาดเล็กจำนวน 2 เครื่อง ปั๊มเครื่องที่หนึ่งจะต่อ  
 กับท่อที่ใช้สำหรับการเปลี่ยนถ่ายน้ำออกจากถังปฏิกรณ์ และปั๊มอีกเครื่องหนึ่งจะใช้สำหรับหมุน  
 เวียนน้ำที่ตกลงภายในถังให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ด้านข้างของถังปฏิกรณ์ติดตั้งหัววัดโออาร์พีเชื่อม  
 ต่อกับเครื่องมือวัดโออาร์พี ที่สามารถบันทึกข้อมูลได้โดยอัตโนมัติ (HANNA Instruments:  
 Microprocessor Logging ORP meter HI 98240 ) โดยต่อหัววัดไว้ทางด้านข้างถังให้ปลายหัววัดอยู่  
 กลางถังปฏิกรณ์ ภายในถังปฏิกรณ์บรรจุไบโอบอล จำนวน 700 ลูก มีเทอร์มอมิเตอร์สำหรับ  
 วัดอุณหภูมิของน้ำ และมีชิ้นส่วนของไบโอบอลสำหรับสุ่มไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์  
 อิเล็กตรอนผูกเชือกห้อยไว้ในถังปฏิกรณ์เช่นเดียวกับถัง NR

สำหรับน้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำเสียบเทียบปริมาตร 5 L ซึ่งเป็นน้ำที่เตรียมขึ้นใช้ร่วมกับ  
 การทดลองในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (หัวข้อ 3.1) เพียงแค่เปลี่ยนจากการเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  เป็นการเติม  
 $\text{NaNO}_3$  ความเข้มข้น  $50 \text{ mgNO}_3\text{-N/L}$  ลงในถังปฏิกรณ์ DNR เพื่อเป็นแหล่งของไนเตรด น้ำที่ตกลง  
 ส่วนที่เหลือเตรียมไว้สำหรับเติมลงในถังปฏิกรณ์ทดแทนน้ำตัวอย่างที่ถูกเก็บไปวิเคราะห์ระหว่าง  
 การทดลอง



ภาพที่ 3-4 โคอะแกรมของถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) เพื่อใช้ศึกษาการบำบัดไนเตรต ภายในบรรจุตัวกรองชีวภาพไบโอบอล 700 ลูก เพื่อเป็นวัสดุยึดเกาะแบคทีเรียและและน้ำเสียเทียม ความเค็ม 30 psu ปริมาตร 5 L มีการเป่าก๊าซ  $N_2$  เพื่อให้ถังปฏิกรณ์อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anoxic) ติดตั้งหัวตรวจวัดค่าโออาร์พี ด้านล่างถังมีปั๊มน้ำเพื่อช่วยให้น้ำในถังไหลเวียนทั่วถึงกัน

ก่อนเริ่มต้นการทดลอง ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพการหมุนเวียนน้ำภายในถังปฏิกรณ์ ทั้ง NR และ DNR โดยการเติมน้ำประปาลงในถังปฏิกรณ์และฉีดหมักสีน้ำเงินปริมาณ 25 ml เข้าไปในถังปฏิกรณ์ทั้งสอง แล้วเริ่มเปิดปั๊มจ่ายอากาศใน NR และเปิดปั๊มน้ำภายใน DNR ซึ่งถังปฏิกรณ์ทั้งสองจะต้องสามารถหมุนเวียนน้ำภายในถัง ให้มีการผสมกันเป็นเนื้อเดียวได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 2-3 วินาที สังเกตได้จากสีของหมักที่กระจายทั่วถังปฏิกรณ์

### 3.2. ขั้นตอนการทดลอง

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์ในระดับห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยการศึกษาแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชัน (NR) และในถังปฏิกรณ์ดีไนโตรฟิเคชัน (DNR) โดยเริ่มทำการทดลองพร้อมกันทั้งสองถังและใช้น้ำเสียเทียมที่เตรียมมาจากน้ำทะเลผสมน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งเหมือนกัน แตกต่างกันเฉพาะการเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ความเข้มข้น 2 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$  และจัดสภาวะมือออกซิเจนใน NR และการเติม  $\text{NaNO}_3$  ความเข้มข้น 50 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  และจัดสภาวะไร้ออกซิเจนใน DNR ในการศึกษาได้ทำการทดลองแบ่งออกเป็นสองรอบ การทดลองรอบที่ 1 เริ่มทำการทดลองในวันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2546 สิ้นสุดการทดลองวันที่ 25 เมษายน 2546 รวมระยะเวลาในการทดลอง 58 วัน ส่วนการทดลองรอบที่ 2 เริ่มทำการทดลองในวันที่ 6 สิงหาคม 2546 สิ้นสุดการทดลองวันที่ 1 ตุลาคม 2546 รวมระยะเวลาในการทดลอง 56 วัน สำหรับรายละเอียดของขั้นตอนการทดลองแสดงในตารางที่ 3-1 และ 3-2

รูปแบบขั้นตอนการทดลองของ NR และ DNR จะทำไปพร้อมกัน แต่มีการจัดสภาวะภายในถังปฏิกรณ์ที่แตกต่างกัน โดย NR จะเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนตลอดเวลา ขณะดำเนินการทดลองได้มีการเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  เริ่มต้นความเข้มข้น 2 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$  และมีการเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  เพิ่มลงใน NR เมื่อแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ถูกบำบัดหมด และเติม  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  เมื่อค่าความเป็นด่าง Alkalinity ในถังปฏิกรณ์มีค่าต่ำกว่า 60 ppm ในระหว่างการทดลองมีการสูบน้ำเข้าและไบโอบอลเพื่อนำไปวิเคราะห์ โดยสูบน้ำเข้าทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลองในการทดลองทั้งสองรอบ เพื่อทำการวิเคราะห์ ปริมาณแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์ รวมถึงฟิเอช และสูบน้ำเข้าไบโอบอลเพื่อทำการศึกษาแบคทีเรียในช่วงท้ายของการทดลองครั้งแรกและในทุก 2 สัปดาห์ตลอดระยะเวลาการทดลองของการทดลองครั้งที่สอง

การศึกษแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพใน DNR จะมีความแตกต่างจาก NR กล่าวคือได้จัดถังปฏิกรณ์ให้เป็นสภาวะไร้ออกซิเจนโดยเป่าก๊าซไนโตรเจนลงไปใต้น้ำทดลองทางท่อน้ำเข้าเพื่อเป็นการไล่ก๊าซออกซิเจน และในระหว่างการทดลองมีการตรวจวัดค่าไออาร์พีของน้ำทดลองในถังปฏิกรณ์ทุก 15 นาทีโดยระบบบันทึกข้อมูลอัตโนมัติตลอดระยะเวลาการทดลอง มีการเติม  $\text{NaNO}_3$  ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  และมีการเติมไนเตรตเพิ่มเมื่อไนเตรตในถังปฏิกรณ์ถูกบำบัดหมด นอกจากนี้ได้มีการเติมสารละลายอาหารกุ้งปราศจากเชื้อ (sf) ที่เตรียมโดย นำอาหารกุ้ง

มาบคให้ละเอียดละลายในน้ำใส่ขวดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที และเติมเมทานอล ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) เพื่อเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ในระหว่างการทดลอง ในระหว่างการทดลองมีการสูบล้างด้วยน้ำและไบโอบอลเพื่อนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทำการทดลองใน NR

ตารางที่ 3-1 ขั้นตอนการทดลองในการทดลองรอบที่ 1 ระยะเวลา 58 วัน

วันที่	ตั้งปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR)	ตั้งปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR)
เริ่มต้น	เติม $\text{NH}_4\text{Cl}$ 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$	เติม $\text{NaNO}_3$ 50 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$
9	เปลี่ยนถ่ายน้ำ เติม $\text{NH}_4\text{Cl}$ 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$	เติมเมทานอล 1 ml
37	เปลี่ยนถ่ายน้ำ เติม $\text{NH}_4\text{Cl}$ 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$	
18-26		เติมเมทานอล 1 ml
27-41		เติมเมทานอล 10 ml
42		เติมเมทานอล 50 ml
44		เติมสารละลายอาหารกึ่ง 15 ml เป่าก๊าซ $\text{N}_2$
46	เติม $\text{NH}_4\text{Cl}$ 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$	
51		เปลี่ยนถ่ายน้ำ เติม $\text{NaNO}_3$ 50 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ เติมสารละลายอาหารกึ่ง 15 ml
56	เก็บตัวอย่างไบโอบอลไปวิเคราะห์	เก็บตัวอย่างไบโอบอลไปวิเคราะห์

ตารางที่ 3-2 ขั้นตอนการทดลองในการทดลองรอบที่ 2 ระยะเวลา 56 วัน

วันที่	ตั้งปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR)	ตั้งปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR)
เริ่มต้น	เติม $\text{NH}_4\text{Cl}$ 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$	เติม $\text{NaNO}_3$ 50 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ เติมสารละลายอาหารกึ่ง 15 ml เป่าก๊าซ $\text{N}_2$
1		เติมสารละลายอาหารกึ่ง 15 ml เป่าก๊าซ $\text{N}_2$
5		เปลี่ยนถ่ายน้ำ เติม $\text{NaNO}_3$ 50 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ เติมสารละลายอาหารกึ่ง 15 ml เป่าก๊าซ $\text{N}_2$



ตารางที่ 3-2 (ต่อ) ขั้นตอนในการทดลองรอบที่ 2

วันที่	ตั้งปฏิกรณ์ในครีฟิเคชัน (NR)	ตั้งปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR)
8	เติม $\text{NH}_4\text{Cl}$ 2 mg-N/L	เปลี่ยนถ่ายน้ำ เติม $\text{NaNO}_3$ 50 mg $\text{NO}_3$ -N/L เป่าก๊าซ $\text{N}_2$
11		เติม $\text{NaNO}_3$ 50 mg $\text{NO}_3$ -N/L เป่าก๊าซ $\text{N}_2$ .
13		เป่าก๊าซ $\text{N}_2$
14	เก็บตัวอย่างไบโอบอลไปวิเคราะห์	เก็บไบโอบอลไปวิเคราะห์ เป่าก๊าซ $\text{N}_2$
15		เป่าก๊าซ $\text{N}_2$
20		เติม $\text{NaNO}_3$ 100 mg $\text{NO}_3$ -N/L เติมเมทานอล 10 ml
23		เติม $\text{NaNO}_3$ 100 mg $\text{NO}_3$ -N/L
24		เติม $\text{NaNO}_3$ 100 mg $\text{NO}_3$ -N/L
25		เติม $\text{NaNO}_3$ 100 mg $\text{NO}_3$ -N/L
26	เติม $\text{NH}_4\text{Cl}$ 2 mg $\text{NH}_4$ -N/L	เติม $\text{NaNO}_3$ 100 mg $\text{NO}_3$ -N/L
27		เติม $\text{NaNO}_3$ 200 mg $\text{NO}_3$ -N/L
28	เก็บตัวอย่างไบโอบอลไปวิเคราะห์	เก็บตัวอย่างไบโอบอลไปวิเคราะห์ เป่าก๊าซ $\text{N}_2$
33		เติมสารละลายอาหารกึ่ง 5 ml เติมเมทานอล 2 ml
34	เติม $\text{NH}_4\text{Cl}$ 2 mg $\text{NH}_4$ -N/L เติม $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 150 ppm	
35		เติม $\text{NaNO}_3$ 200 mg $\text{NO}_3$ -N/L
40		เติม $\text{NaNO}_3$ 300 mg $\text{NO}_3$ -N/L เติมสารละลายอาหารกึ่ง 5 ml เติมเมทานอล 2 ml
41	เติม $\text{NH}_4\text{Cl}$ 2 mg $\text{NH}_4$ -N/L	
42	เก็บตัวอย่างไบโอบอลไปวิเคราะห์	เก็บตัวอย่างไบโอบอลไปวิเคราะห์ เป่าก๊าซ $\text{N}_2$
43		เติมเมทานอล 2 ml เป่าก๊าซ $\text{N}_2$

ตารางที่ 3-2 (ต่อ) ขั้นตอนในการทดลองรอบที่ 2

วันที่	ถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR)	ถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR)
44		เติมสารละลายอาหารกึ่ง 5 ml เติมเมทานอล 2 ml เป่าก๊าซ N <sub>2</sub>
45	เติม NH <sub>4</sub> Cl 2 mg NH <sub>4</sub> -N/L	
46		เติม NaNO <sub>3</sub> 200 mg NO <sub>3</sub> -N/L
50	เติม NH <sub>4</sub> Cl 2 mg NH <sub>4</sub> -N/L	
51		เติม NaNO <sub>3</sub> 200 mg NO <sub>3</sub> -N/Lเติมเมทานอล 4 ml
54	เติม NH <sub>4</sub> Cl 2 mg NH <sub>4</sub> -N/L เติม Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 150 ppm	เติม NaNO <sub>3</sub> 200 mg NO <sub>3</sub> -N/Lเติมเมทานอล 4 ml
56	เก็บตัวอย่างไบโอบอลไปวิเคราะห์	เก็บไบโอบอลไปวิเคราะห์ เป่าก๊าซ N <sub>2</sub>

### 3.3 การสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำและแมคทีเรีย

#### 3.3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำในถังปฏิกรณ์

การสุ่มตัวอย่างน้ำในถังปฏิกรณ์ทั้งไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยใช้หลอดฉีดยาพลาสติกใสดูดน้ำจากท่อซีลิโคนสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 10 ml แล้วใส่กลับเข้าไปในถังปฏิกรณ์เพื่อกำจัดน้ำตัวอย่างเท่าที่ค้างอยู่ในท่อ แล้วดูดน้ำตัวอย่างปริมาตร 50 ml ใส่ลงในขวดพลาสติกขนาด 60 ml วัดพีเอชโดยเครื่อง pH meter (Hanna HI 8418) จากนั้นทำการกรองน้ำตัวอย่างโดยฉีดผ่าน Sterile Acrodisc Syriing Filter (Pall Gelman Laboratory, USA) ซึ่งมีขนาดรูกรอง 0.2 µm ใส่ลงในขวดพลาสติก ปิดฝาให้สนิท แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนเตรต และไนไตรต์

### 3.3.2 การสุ่มตัวอย่างตัวกรองชีวภาพไบโอบอล

สุ่มตัวอย่างตัวกรองชีวภาพไบโอบอล เพื่อศึกษาจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน โดยใช้ที่เก็บขนาดใหญ่รูปแอลกอฮอล์ ถนไฟ แล้วเก็บไบโอบอล จากด้านบนของถังปฏิกรณ์จำนวน 1 ลูก ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำทะเลกรองความเค็ม 30 psu ปราศจากเชื้อ เพื่อใช้เป็นน้ำ สำหรับการเจือจางในการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ 5 กลุ่ม (หัวข้อ 3.4) จากนั้นเก็บไบโอบอลจำนวน 3 ลูก ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 1 ลูกเพื่อทำการวิเคราะห์โปรตีน (หัวข้อ 3.5.3) เก็บไบโอบอลจำนวน 20 ลูกใส่ในถุงพลาสติกเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเพื่อการวิเคราะห์ 16S rDNA โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE (หัวข้อ 3.5.4) เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนไบโอบอลเพื่อนำไปต้องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน โดยชิ้นส่วนดังกล่าวเตรียมจากไบโอบอลที่ถูกคัดเป็นชิ้นขนาดเล็กและผูกห้อยไว้ด้วยเชือกภายในถังปฏิกรณ์ตั้งแต่เริ่มการทดลอง เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนดังกล่าวบรรจุในถุงพลาสติกที่มีน้ำจากถังปฏิกรณ์เพื่อป้องกันการกระทบกระเทือน แล้วส่งตัวอย่างไปที่ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการตรึงและคงสภาพจุลินทรีย์ที่อยู่บนพื้นผิวพลาสติกไบโอบอล สำหรับถังดีไนตริฟิเคชันเมื่อทำการเก็บตัวอย่างไบโอบอลเรียบร้อยแล้ว จะต้องปิดฝาให้สนิทแล้วเป่าก๊าซไนโตรเจนลงไปใต้น้ำทดลองทางท่อเข้า เพื่อเป็นการไล่ก๊าซออกซิเจนที่เข้ามาในขณะที่เปิดฝาดังในขณะเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 3-5(ก) ถึงปฏิกรณ์ดีไนโตรฟิเคชัน (ซ้าย) และถึงปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชันหุ้มด้วยพลาสติก  
 ลีด้า (ขวา) (ข) ชิ้นส่วนไบโอบอล (ค) หัววัดไออาร์พี (ง) จุดเก็บตัวอย่างน้ำ  
 ถึงปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชัน (จ) จุดเก็บตัวอย่างน้ำถึงปฏิกรณ์ดีไนโตรฟิเคชัน



### 3.4 วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

#### 3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) โดยวิธีการเกิดปฏิกิริยาของ Phenol hypochlorite (Strickland and Parsons, 1972)

นำน้ำตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์ซึ่งถูกเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายก่อนทำการวิเคราะห์ โดยปิเปตน้ำตัวอย่างที่ถูกเจือจางด้วยน้ำ De-ionized water (D.I.) ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 5 ml ลงในหลอดทดลอง เติม Phenol solution (Phenol 20 g ใน 95% V/V ethyl alcohol 200 ml) ปริมาตร 0.2 ml เขย่าแล้วเติม sodium nitropusside solution ( $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.0 g ในน้ำ D.I. 200 ml) ปริมาตร 0.2 ml เขย่าแล้วเติม oxidizing solution ปริมาตร 0.5 ml ซึ่งต้องเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งโดยผสม alkaline reagent (sodium citrate 100 g และ NaOH 5 g ในน้ำ D.I. 500 ml) และ sodium hypochlorite solution (ใช้สารละลาย hypochlorite ทางการค้าซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 1.5 N) ในอัตราส่วน 100 ml ต่อ 25 ml ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง อย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 nm โดยเครื่อง Spectrophotometer เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน เทียบกับกราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (ภาคผนวก ก) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 0.5  $\text{mgNH}_4\text{-N/L}$  ที่เตรียมจาก stock ammonia solution ความเข้มข้น 200  $\text{mgNH}_4\text{-N/L}$  และ Blank ที่เตรียมจากน้ำ D.I. โดยทำกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์

#### 3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์-ไนโตรเจน ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) โดยวิธีการเกิดปฏิกิริยาของ sulfanilamide (Strickland and Parsons, 1972)

นำน้ำตัวอย่างที่ถูกสุ่มเก็บมาจากถังปฏิกรณ์ซึ่งถูกแช่แข็งอยู่มาละลายก่อนทำการวิเคราะห์ โดยปิเปตน้ำตัวอย่างปริมาตร 5 ml ที่ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว ลงในหลอดทดลอง ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank เติม sulphanilamide solution ปริมาตร 0.1 ml (sulphanilamide 5 g กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 ml ในน้ำกลั่น 500 ml) เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 2-8 นาที เติม NNED solution (N-(1-Naphthyl)-Ethylenediamine Dihydrochloride 0.50 g ผสมน้ำกลั่น 500 ml) ปริมาตร 0.1 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาทีถึง 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 nm โดยเครื่อง Spectrophotometer เทียบกับกราฟมาตรฐานของไนไตรต์ (ภาคผนวก ก) ที่ความเข้มข้น 0.007, 0.056 และ 0.224  $\text{mg NO}_2\text{-N/L}$  ที่เตรียมจาก stock nitrite solution ความเข้มข้น 140  $\text{mgNO}_2\text{-N/L}$  โดยทำกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์

### 3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรต-ไนโตรเจน ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) โดยวิธีวัดการดูดกลืนแสง Ultraviolet (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA), 1992)

นำน้ำตัวอย่างที่ถูกสุ่มเก็บมาจากถังปฏิกรณ์ซึ่งถูกแช่แข็งอยู่มาละลายก่อนทำการวิเคราะห์ โดยเปิดน้ำตัวอย่างที่ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว 5 ml ลงในหลอดทดลองโดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 nm โดยเครื่อง Spectrophotometer การคำนวณหาปริมาณไนเตรต-ไนโตรเจนทำโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 nm หักลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 nm เทียบกับกราฟมาตรฐานของไนเตรต-ไนโตรเจน (ภาคผนวก ก) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 3.0  $\text{mgNH}_4\text{-N/L}$  จาก stock nitrate solution ความเข้มข้น 100  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$  โดยทำกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์

### 3.4.4 การวิเคราะห์ Alkalinity โดยใช้ชุดทดสอบความเป็นด่าง (Total Alkalinity Test Kit) สำหรับน้ำทะเลและน้ำจืด

ชุดทดสอบค่าความเป็นด่างที่ใช้ผลิต AQUA-VBC การวิเคราะห์ทำโดยเติมน้ำตัวอย่างลงในหลอดทดสอบจนถึงขีด 5 ml หยดสารละลาย A ปริมาตร 2 ml เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีน้ำเงิน หยดสารละลาย B ทีละหยดโดยใช้ขวดหยดตั้งในแนวตั้ง เขย่าเบาๆ ให้สารละลายผสมกัน หยุดหยดเมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มอมชมพู ค่าความเป็นด่าง คิดเป็น ppm ของ  $\text{CaCO}_3$  คำนวณจากจำนวนหยดของสารละลาย B ที่ใช้คูณด้วย 10

## 3.5 วิธีวิเคราะห์แบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอล

### 3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโดยวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่เติบโตเพิ่มจำนวนยึดติดกับพื้นผิวของไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน ทำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ 5 ชนิด โดยมีวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในหัวข้อ 3.5.1.1 และทำการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เติบโตขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ 5 ชนิด ซึ่งกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดได้แก่

- 1) แบคทีเรียทั้งหมดในน้ำทะเล (Total Marine Bacteria: TB) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar
- 2) ไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Nitrifying Bacteria: NB) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Ammonia Oxidizing Bacteria Agar

- 3) ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Denitrifying Bacteria: DNB) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate Agar
- 4) แบคทีเรียลดซัลเฟต (Sulfate Reducing Bacteria: SB) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron Agar (TSI)
- 5) แบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* spp.: VB) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sugar Agar (TCBs)

### 3.5.1.1 วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- 1) การเพาะเชื้อแบคทีเรียรวมในน้ำทะเลใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Agar (Scharlau Chemic, SPAIN) ที่ประกอบด้วย Bacto Beef extract 3 g ค่อน้ำ 1 L และ Bacto peptone 5 g ค่อน้ำ 1 L วิธีเตรียมทำโดยการชั่ง Nutrient Agar 28 g ผสมน้ำทะเลกรองความเค็ม 30 psu ปริมาตร 1 L นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที เทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ
- 2) การเพาะเชื้อไนตริฟายอิงแบคทีเรียใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงเชื้อ Ammonia Oxidizing Bacteria (Skinner and Walker, 1968) ที่มีส่วนประกอบดังนี้

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 g
CaCl	0.02 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04 g
FeNaEDTA ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 77 mg NaEDTA 103 mg ผสมน้ำกลั่น 50 ml)	0.1 ml
Phenol red (0.002%) (ชั่ง Phenol red 0.1 g ผสมเอทานอล (20%) 100 ml)	20 ml

ชั่งส่วนประกอบผสมน้ำทะเลกรองความเค็ม 30 psu ปริมาตร 1 L ปรับพีเอช ให้เท่ากับ 8.5 ด้วยสารละลาย 5% NaOH เติม Agar 15 g นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที เทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อไนตริฟายอิงแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีแดง (พีเอชเป็นเบส) เป็นสีเหลือง (พีเอชเป็นกรด) เนื่องจากไนตริฟายอิงแบคทีเรียใช้แอมโมเนียในการเจริญทำให้พีเอชลดลง

- 3) การเพาะเชื้อคิงโนคริฟายอิงแบคทีเรียใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nitrate Medium ที่เตรียมจาก Nutrient Agar 28 g (Scharlau Chemie, SPAIN) ผสมกับ  $\text{KNO}_3$  5 g (CarLo erba reagent) ผสมน้ำทะเลกรองความเค็ม 30 psu ปริมาตร 1 L นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที เทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ
- 4) การเพาะเชื้อแบคทีเรียลดซัลเฟต ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Triple Sugar Iron Agar: TSI (Oxoid, England) เตรียมโดยการชั่ง TSI 65 g ผสมน้ำทะเลกรองความเค็ม 30 psu ปริมาตร 1 L นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที เทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ
- 5) การเพาะเชื้อแบคทีเรียสกุลวibriโอ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TCBS (Oxoid, England) เตรียมโดยการชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TCBS 88 g ผสมน้ำทะเลกรองความเค็ม 30 psu ปริมาตร 1 L ให้ความร้อนโดยใช้ไมโครเวฟจนอุ่นละลาย เทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ

### 3.5.1.2 วิธีการแยกเลี้ยงแบคทีเรียจากฟิล์มชีวภาพ (biofilm) ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

นำตัวอย่างไบโอบอลที่เก็บจาก NR และ DNR มาใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำทะเลความเค็ม 30 psu ที่ผ่านการกรองให้ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5 ml ทำการแยกเชื้อออกจากพื้นผิวไบโอบอลโดยวิธีสั่นสะเทือนด้วยความถี่สูง (Sonication) ด้วยเครื่อง Ultrasonics cleaner (Branson ultrasonics cleaner 2200, 47 kHz, 60 W, USA) เป็นเวลา 3 นาที (Flemming *et al.*, 2000) จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างแบคทีเรียโดยปิเปตตัวอย่างเชื้อปริมาตร 0.5 ml ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำทะเลกรองความเค็ม 30 psu ปราศจากเชื้อปริมาตร 4.5 ml ให้มีความเจือจาง 1 เท่า, 10 เท่า ( $10^{-1}$ ), 100 เท่า ( $10^{-2}$ ), 1000 เท่า ( $10^{-3}$ ), 10000 เท่า ( $10^{-4}$ ), 100000 เท่า ( $10^{-5}$ ) และ 1000000 เท่า ( $10^{-6}$ ) จากนั้นปิเปตตัวอย่างเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 ml ลงบนจานเลี้ยงเชื้อจำนวน 3 จาน (=3 ซ้ำ) แล้วใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับไนคริฟายอิงแบคทีเรีย หลังจากที่ได้เจือจางตัวอย่างแล้วจะต้องทำ Sonication อีกครั้งใช้เวลา 3 นาที แล้วจึงปิเปตตัวอย่างเชื้อปริมาตร 0.1 ml จากหลอดที่เจือจางแล้วจำนวน 3 หลอด (การเลือกค่าความเจือจางขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของปริมาณเชื้อแต่ละชนิด) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Ammonia Oxidizing Bacteria Medium จำนวน 3 จาน ใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ



### 3.5.1.3 การนับจำนวนแบคทีเรีย

หลังจากการเจือจางและเลี้ยงเชื้อในอาหารจำเพาะ จะทำการบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อน นำมานับจำนวนโคโลนีโดยมีระยะเวลาที่แตกต่างกันดังนี้

- 1) แบคทีเรียในน้ำทะเล นำงานเลี้ยงเชื้อใส่ถุงพลาสติกแล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมานับจำนวนโคโลนี
- 2) ไมคริฟายอิงแบคทีเรีย นำงานเลี้ยงเชื้อใส่ถุงพลาสติกแล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 3-5 วัน เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว สังเกตอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง นับจำนวนโคโลนี
- 3) คีโนคริฟายอิงแบคทีเรีย จะต้องเลี้ยงเชื้อบนอาหารจำเพาะ Nitrate Medium ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยนำงานเลี้ยงเชื้อใส่ใน Anaerobic Jar (ภาพที่ 3-6) ที่ดัดแปลงขึ้นจากโหลพลาสติกขนาดใหญ่ การจัดสภาวะไร้ออกซิเจนทำโดยใช้ Gas Pak (AnaeroGen, OXOID) ที่เติมน้ำกลั่น 10 ml ลงในช่องของ Gas Pak แล้ววางช่องไว้ใน Anaerobic Jar และจัดให้มีตัวชี้วัดการเกิดสภาวะไร้ออกซิเจน Anaerotest (Merck) ไร่ด้านข้าง (ภาพที่ 3-7) Anaerotest จะเปลี่ยนสีจากสีฟ้าเป็นสีขาวเมื่อภายใน Anaerobic Jar อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1-2 วัน แล้วจึงทำการนับจำนวนโคโลนี
- 4) แบคทีเรียลดซัลเฟต ใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อบนอาหารจำเพาะ TSI ในสภาวะไร้ออกซิเจนใน Anaerobic Jar เช่นเดียวกับคีโนคริฟายอิงแบคทีเรีย โดยบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน จะสังเกตเห็นโคโลนีของแบคทีเรียลดซัลเฟตจะมีสีดำบนอาหารเลี้ยงเชื้อสีแดง
- 5) วิบริโอ หลังจากการเตรียมเชื้อบนอาหารจำเพาะ TCBs ทำการบ่มเชื้อโดยนำงานเลี้ยงเชื้อใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 16 ชั่วโมง ก่อนนำมานับจำนวนโคโลนี



ภาพที่ 3-6 Anaerobic Jar สำหรับบ่มเชื้อแบคทีเรียลคซัลเฟต (ด้านซ้าย) และเชื้อดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (ด้านขวา) คัดแปลงโดยใช้โพลีพลาสติกขนาดใหญ่ บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้ Gas Pak



ภาพที่ 3-7 Anaerotest จะเปลี่ยนสีจากสีฟ้า (ตัวอย่างรูปซ้าย) เป็นสีขาว (ตัวอย่างรูปขวา) เมื่อภายใน Anaerobic Jar อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน

### 3.5.2 วิธีการย้อมสี Gram stain (Csuros and Csuros, 1999)

นำตัวอย่างเชื้อจากไบโอบอลที่ผ่าน Sonication แล้ว มาหยดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศและลบกระจกด้วยเปลวไฟ หลังจากนั้นจึงย้อมสีคริสตัลไวโอเล็ต 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน 1 นาที ล้างน้ำ และล้างสีออกโดยใช้ 95% เอทานอล ชับให้แห้ง ย้อมสีซาฟรานินโอ 20 –30 วินาที ล้างน้ำซับให้แห้ง ส่องตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน กำลังขยายเลนส์วัตถุ 100 เท่า

### 3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

นำตัวอย่างไบโอบอลที่เก็บจากถังปฏิกรณ์ไนคริติเคชันและดีไนคริติเคชันใส่ในหลอดทดลอง เติม 0.5N NaOH (NaOH 2 mg ในน้ำ D.I. 100 ml) ปริมาตร 5 ml นำไป Sonication 5 นาที และเขย่าด้วยเครื่อง vortex นาน 1 นาที นำไปคัมในน้ำเดือด 20 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที ปิ่ลดส่วนน้ำใส 1 ml ลงในหลอดทดลองโดยใช้น้ำ De-ionized water (D.I.) เป็น Blank เติมสารละลาย C ปริมาตร 5 ml ที่เตรียมขึ้นใหม่จากการผสมสารละลาย A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 g และ NaOH 4 g ในน้ำ D.I. 1,000 ml) ปริมาตร 50 ml ผสมกับสารละลาย B ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5 g และ Sodiumpotassium tartate 1 g ในน้ำ D.I. 100 ml) ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย D (2N Folin-Ciocalteu phenol reagent 50 ml ผสมน้ำ D.I. 50 ml) เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm โดยเครื่อง Spectrophotometer เทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณของโปรตีน (ภาคผนวก ก) ความเข้มข้น 50, 100 และ 200  $\mu\text{g/ml}$  ที่เตรียมจาก stock BSA (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g/ml}$  โดยทำกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบกับทุกครั้งที่ทำกรวิเคราะห์

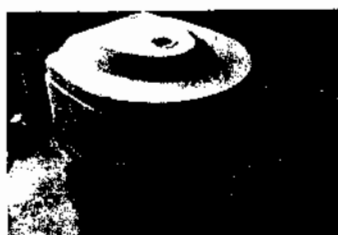
### 3.5.4 การวิเคราะห์ 16S rDNA โดยวิธี PCR-DGGE

การวิเคราะห์ 16S rDNA โดยวิธี PCR-DGGE (Denatured Gradient Gel Electrophoresis) มี 4 ขั้นตอนดังนี้

#### 3.5.4.1 การสกัด DNA ของแบคทีเรียที่เติบโตบนผิวของไบโอบอล

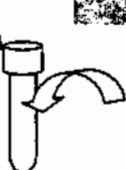
นำตัวอย่างไบโอบอลที่เก็บจากถังปฏิกรณ์ไนคริติเคชัน (NR) และดีไนคริติเคชัน (DNR) ใส่ในหลอดทดลองเติมน้ำทะเลกรองปราศจากเชื้อให้ท่วมไบโอบอล นำไป Sonication 5 นาที เพื่อให้เชื้อหลุดออกจากไบโอบอล แล้วปั่นตกตะกอนโดยเครื่อง Centrifuge (SORVALL® Biofuge stratos, Kendo, Germany) ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตะกอนมาสกัด DNA โดยใช้ FastDNA® SPIN Kit for soil (BIO101, USA) ตามขั้นตอนที่แสดงในภาพที่ 3-8

ใส่ตะกอนตัวอย่าง  
ลงใน Lysing Matrix E  
Tube



ปั่นโดยเครื่อง Centrifuge  
(Mikro 20 Hettich zentrifugen)  
ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที  
เป็นเวลา 5 นาที

ดูดน้ำใสด้านบนทิ้ง



เติม Sodium Phosphate Buffer 978  
โมโคโรลิตร และ MT Buffer 122  
โมโคโรลิตร



นำหลอดใส่ในเครื่อง FastPrep® Instrument  
(FP120, BIO101, USA)  
ใช้ความเร็วระดับ 5.5 นาน 30 วินาที



ปั่นตกตะกอนความเร็ว 13,000  
รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที



เทเฉพาะส่วนน้ำใสลงในหลอด Eppendorf



เติม PPS Reagent (เขย่าด้วยมือ 10 ครั้ง)



ปั่นตกตะกอนความเร็ว 13,000  
รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที



เทส่วนน้ำใสใส่หลอดทดลอง  
เติม Binding Matrix Suspension

สงวนลิขสิทธิ์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ได้สารละลาย DNA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ภาพที่ 3-8 ขั้นตอนการสกัด DNA จากใบ โอบอลด้วย FastDNA SPIN Kit for soil

นำตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis (ภาพที่ 3-9) โดยใช้ 1% Agarose gel (Agarose (USB) 0.50 g ผสม 1x TBE Buffer 50 ml) ละลายเจลด้วยเครื่องให้ความร้อน (Thermolyne, Cimarec 2) ทิ้งให้อุ่นเติม Ethidium Bromide (Biorad) ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 10  $\mu$ L เติลงในภาชนะหิวเพื่อให้เกิดช่องใส่ตัวอย่าง รอให้เจลแข็งตัวประมาณครึ่งชั่วโมง จากนั้นนำเจลออกมา ไว้ในเครื่อง Mini Submarine Electrophoresis (Hoefer HE 33, Amersham Biosciences) เติ 1x TBE Buffer ให้ท่วมเจลแล้วเปิด 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA) ที่ผสม 2x Gel Loading Dye แล้วปริมาตร 5  $\mu$ L ลงในเจลช่องที่ 1 ผสมตัวอย่างสารละลาย DNA ปริมาตร 5  $\mu$ L กับสีย้อม 2x Gel Loading Dye (70% glycerol, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) ปริมาตร 5  $\mu$ L แล้วเปิดลงในเจลช่องถัดไปจนครบทำการเดินระบบ Electrophoresis โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 135 V เป็นเวลาประมาณ 45 นาทีหรือจนเห็นสีย้อมลงมาถึงประมาณ 2/3 ของเจล จากนั้นตรวจดู DNA ที่สกัดได้ด้วย UV Transilluminator (UVP, BioDoc-It™ System) (ภาพที่ 3-9)

### 3.5.4.2 การเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)

#### 3.5.4.2.1 การเพิ่มจำนวน 16S rDNA ของตัวอย่างแบคทีเรียที่สกัดมาจากตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์ในทวีพีเคชันและคีนทวีพีเคชันในการทดลองรอบที่ 1

ทำการเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยใช้ puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads (Amersham Biosciences, USA) ซึ่งมีส่วนผสมของ 2.5 units puReTaq™ DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM each dNTP, sterbilitzers และใช้ primer PRBA338f ซึ่งเป็น Bacteria primer V3 region มีตำแหน่งเบสที่ 338-357 เชื่อมต่อกับ GC clamp และ primer PRUN518r ซึ่งเป็น Bacteria primer V3 region มีตำแหน่งเบสที่ 518-534 (Øvreås *et al.*, 1997) โดยมีลำดับเบสของ primer ดังนี้

primer PRBA338f + GC clamp

5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAG3'

primer PRUN518r

5'ATTACCGCGGCTGCTGG3'

เตรียมสารละลาย primer ทั้งสองชนิด ชนิดละ 1.5 µL (จากสารละลาย primer เข้มข้น 10 pM) ผสมกับตัวอย่าง DNA จากขั้นตอนการสกัด 50 ng และน้ำปราศจากเชื้อเพื่อปรับปริมาตรเป็น 25 µL ลงในหลอด PCR tube (0.2 ml) นำเข้าเครื่อง PCR (GeneAmp®PCR System 2700, Applied Biosystems) (ภาพที่ 3-9) โดยใช้โปรแกรมอุณหภูมิดังนี้

	Initial denaturation	92 °C	2 นาที
35 รอบ	{	Denaturation	92 °C 1 นาที
		Annealing	55 °C 30 วินาที
		Extension	72 °C 1 นาที
		Final Extension	72 °C 6 นาที

ตรวจสอบ DNA โดยวิธี Agarose gel electrophoresis ด้วย 1% agarose gel และใช้เครื่อง Mini Submarine Electrophoresis ด้วยแรงดันไฟฟ้า 135 V เป็นเวลาประมาณ 45 นาที และนำมาตรวจสอบ DNA บนเจลด้วยเครื่อง UV Transilluminator

3.5.4.2.2 การเพิ่มจำนวน 16S rDNA ของตัวอย่างแบคทีเรียที่สกัดมาจากตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันและน้ำเสียที่ใช้ทดลองเริ่มต้นในการทดลองครั้งที่ 2

การเพิ่มจำนวน 16S rDNA ในการทดลองรอบที่สองใช้ Taq PCR Master Mix (QIAGEN) โดยมีส่วนผสมของ 2.5 units Taq DNA polymerase, 1x QIAGEN PCR Buffer (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) 200 μM each dNTP ใช้ DNA จากขั้นตอนการสกัด DNA 50 ng ใช้ PCR Master Mix 12.5 μL และ primer PRBA338f ที่เชื่อมต่อกับ GC clamp และ primer PRUN518r รวมทั้งโปรแกรมของเครื่อง PCR เช่นเดียวกับการทดลองรอบที่ 1



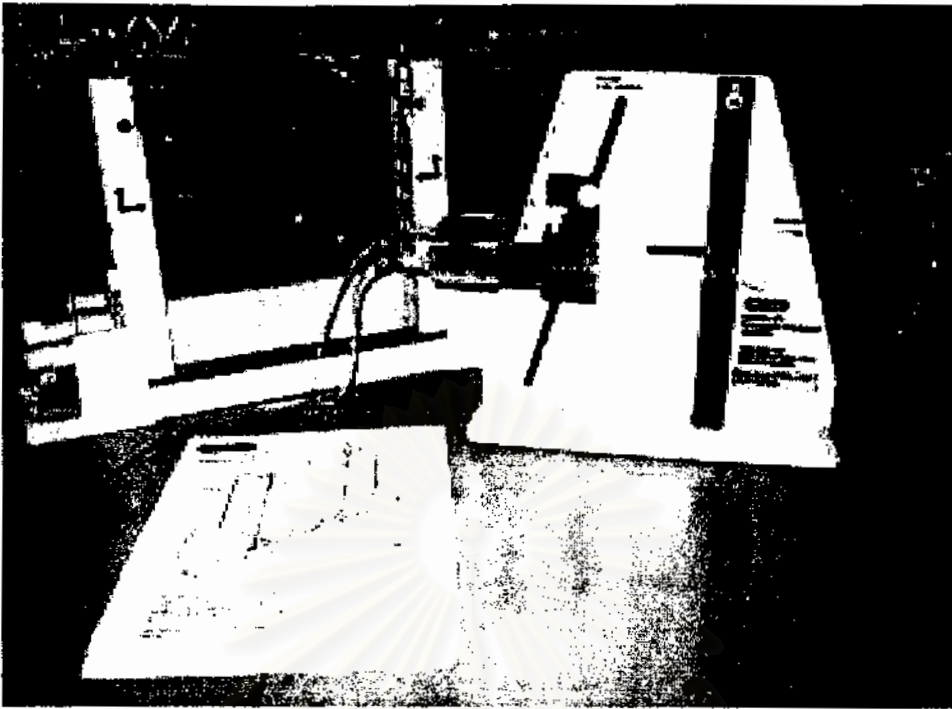
ภาพที่ 3-9 (ก) เครื่อง PCR ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน 16S rDNA (ข) เครื่อง Mini Submarine Electrophoresis ใช้ในการตรวจสอบ DNA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis (ค) เครื่อง UV Transilluminator ใช้ถ่ายภาพ DNA บนเจล

### 3.5.4.3 การแยกชนิดเบสที่เรียโดยวิธี DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (The Dcode™ Universal Mutation Detection System, BIO-RAD)

จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าความเข้มข้นของ urea ที่เหมาะสมสำหรับ denatured gel คือ 25% ถึง 60% การเตรียมเจล 8% polyacrylamide ที่มี 25% - 60% urea denaturant เตรียมโดยการผสม stock 0% denaturing solution (40% acrylamide 10 ml, 50x TAE buffer 1 ml เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 50 ml) เข้ากับ stock 100% denaturing solution (40% acrylamide 10 ml, 50x TAE buffer 1 ml, formamide 20 ml และ urea 21 g เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 50 ml) เพื่อนำมาใช้เตรียม 25% denaturing solution (0% denaturing solution 12.75 ml ผสมกับ 100% denaturing solution 4.25 ml) และใช้เตรียม 60 % denaturing solution (0% denaturing solution 6.8 ml ผสมกับ 100% denaturing solution 10.2 ml และเติม Dcode dye solution 50  $\mu$ L)

ประกอบชุด parallel gradient gel (ภาพที่ 3-10) สำหรับทำ DGGE โดยนำ 25% denaturing polyacrylamide solution และ 60 % denaturing polyacrylamide solution มาเติม 10% ammonium persulfate (ammonium persulfate 0.10 g ในน้ำกลั่น 1 ml) ปริมาตร 150  $\mu$ L และเติม TEMED 15  $\mu$ L ซึ่งเป็นสาร hardener ที่ทำให้เกิดเจล ใช้หลอดฉีดยาดูด denaturing acrylamide solution ทั้งสองชนิดมาบรรจุเข้ากับอุปกรณ์เตรียม gradient จากนั้นหมุนวงล้อเพื่อให้เครื่องมือทำการผสม denaturing acrylamide solution ทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันในสัดส่วนตั้งแต่ 0-100% ซึ่งจะทำให้เกิด acrylamide gel ที่มีความเข้มข้นของ urea denaturant ตั้งแต่ 25-60% เสียบหัวสำหรับเตรียมร่องบรรจุ DNA แล้วทิ้งไว้ค้างคืนเพื่อให้เจลแข็งตัวดี





ภาพที่ 3-10 อุปกรณ์ชุด The Dcode™ Universal Mutation Detection System, BIO-RAD  
สำหรับทำการวิเคราะห์ DGGE

จากนั้นนำชุดกระจกเจลประกอบเข้ากับเครื่อง Electrophoresis (ภาพที่ 3-11) คึงหิวอก เติม 1x TAE buffer ปริมาตร 7,000 ml ลงในถังของระบบ Electrophoresis เดินเครื่องปั๊มหมุนเวียนบัฟเฟอร์และตัวทำความร้อน จนกระทั่งอุณหภูมิของบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นถึง 60 °C จึงทำการเติม 16S rDNA ลงในเจล ใช้ทีปปลายแหลมเปิด 1 Kb Plus DNA Ladder ที่ผสม 2x Gel Loading Dye ปริมาตร 20  $\mu$ L ลงในเจลช่องแรก ผสมตัวอย่าง DNA ปริมาตร 20  $\mu$ L กับสีย้อม 2x Gel Loading Dye 20  $\mu$ L แล้วเปิดลงในเจลช่องถัดไปจนครบ เดินเครื่อง Electrophoresis โดยใช้อุณหภูมิ 60 °C ใช้แรงดันไฟฟ้า 130 V ใช้เวลาประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลออกจากกระจกนำมาข้อมด้วย ethidium bromide (ethidium bromide 40  $\mu$ L ผสมกับ 1x TAE buffer 400  $\mu$ L) เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างออกด้วย 1x TAE buffer 400  $\mu$ L เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบ Profile DGGE ของเจลด้วยเครื่อง UV Transilluminator (UVP, BioDoc-It™ System) และถ่ายภาพด้วยเครื่อง Viewing Cabinets (UVP, Mitsubishi P91)



ภาพที่ 3-11 การวิเคราะห์ DGGE โดยใช้ 8% polyacrylamide 25% - 60% urea denaturant ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แรงดันไฟฟ้า 130 V ใช้เวลาประมาณ 5 ชั่วโมง

#### 3.5.4.4 การจำแนกชนิดแบคทีเรียของแถบ DNA บนเจล DGGE โดยวิธีลำดับเบส

ใช้ใบมีดโกนที่ล้างให้สะอาดด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ตัดแถบ 16S rDNA แต่ละแถบจากเจลใส่ในหลอด eppendorf เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 30  $\mu$ L ให้ท่วมเจลแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเพื่อให้ DNA แพร่่ออกมาจากเจล จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน 16S rDNA อีกครั้ง ตามขั้นตอนการ PCR ในหัวข้อ 3.5.4.2. โดยการทดลองรอบที่ 1 ใช้ primer PRUN518r (5'ATTACCGCGGCTGCTGG3') ในการเพิ่มจำนวน DNA และในการทดลองรอบที่ 2 ได้เปลี่ยน primer จาก PRBA338f ที่เชื่อมต่อกับ GC clamp เป็น primer PRBA338f ที่ไม่มี GC clamp (5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAG3') หลังจากเพิ่มจำนวน DNA แล้วจึงนำมาตรวจสอบปริมาณ DNA ที่ได้โดยใช้ 1% Agarose gel Electrophoresis

หลังการเพิ่มจำนวน 16S rDNA แล้วจึงนำตัวอย่าง DNA ไปส่งวิเคราะห์ลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ แล้วนำผลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับเบสของฐานข้อมูล 16S rDNA ของ GenBank, EMBL, DDBJ, PDB จาก National Center for Biotechnology Information ด้วยโปรแกรม BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

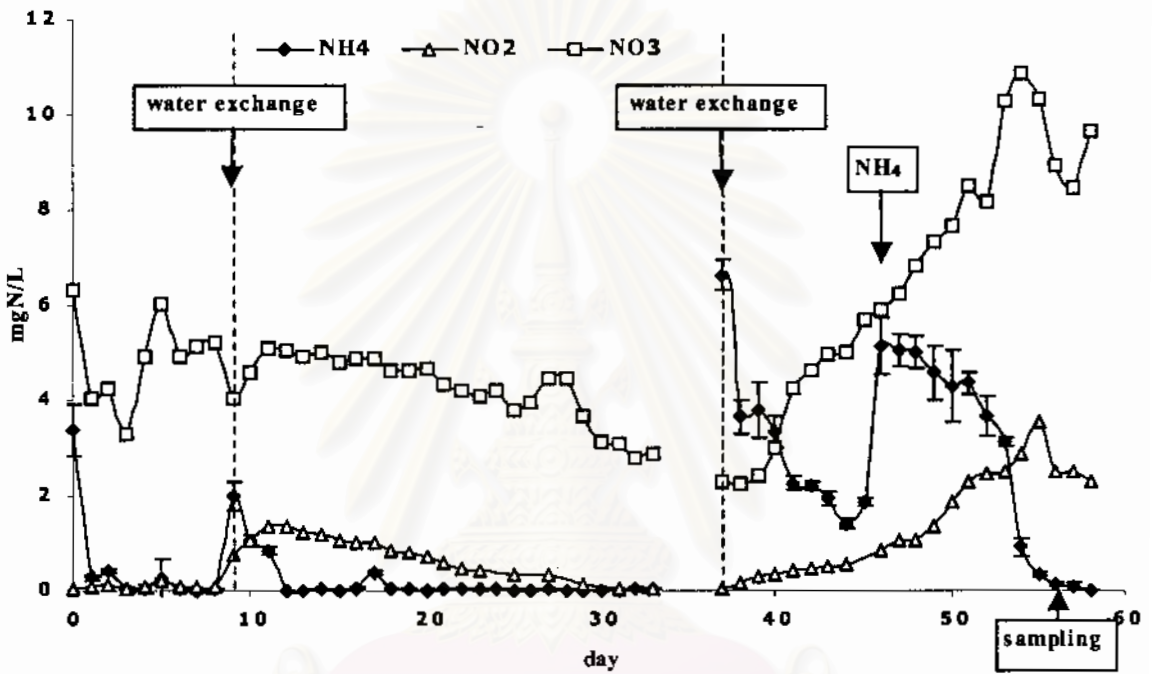
#### 4.1 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนและแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ไนตริไฟเคชันและดีไนตริไฟเคชัน (การทดลองรอบที่ 1)

ในการทดลองรอบที่ 1 ได้ทำการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไนตริไฟเคชันในถังปฏิกรณ์แบบมีออกซิเจน (NR) และปฏิกิริยาดีไนตริไฟเคชันในถังปฏิกรณ์แบบไร้ออกซิเจน (DNR) โดยใช้น้ำเริ่มต้นเป็นน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนนำมาแบ่งใส่ในถังปฏิกรณ์ทั้งสองถัง จากนั้นจึงตรวจวัดการลดลงของแอมโมเนียในถัง NR และการลดลงของไนเตรดในถัง DNR รวมทั้งศึกษาแบคทีเรียที่เติบโตบนผิวของตัวกรองชีวภาพ

##### 4.1.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนในถังปฏิกรณ์ไนตริไฟเคชัน

ผลการวิเคราะห์สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนในถังปฏิกรณ์ไนตริไฟเคชันแสดงในภาพที่ 4-1 โดยในขณะที่เริ่มต้นการทดลองได้ทำการเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ลงในน้ำทำให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้น  $3.37 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  ส่วนไนไตรต์และไนเตรดในน้ำเสียนมีความเข้มข้นเริ่มต้น  $0.061 \text{ mg NO}_2\text{-N/L}$  และ  $6.3 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ตามลำดับ หลังจากเริ่มการทดลองเป็นเวลา 1 วัน พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียลดลงเหลือ  $0.279 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  โดยไม่มีการเพิ่มของไนเตรด จากนั้นในวันที่ 9 ของการทดลองได้ทำการเปลี่ยนน้ำในถังปฏิกรณ์ และเติมแอมโมเนียให้มีความเข้มข้น  $1.987 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  พบว่าแอมโมเนียลดลงจนหมดภายใน 3 วัน และเกิดไนไตรต์เพิ่มขึ้นในระบบ แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาไนตริไฟเคชันเนื่องจากแอมโมเนียถูกแบคทีเรียเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ แต่ปฏิกิริยายังไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่พบการเพิ่มของไนเตรด ในขณะที่การเปลี่ยนน้ำในถังปฏิกรณ์ในวันที่ 37 ของการทดลองและมีการเติมแอมโมเนียความเข้มข้น  $6.623 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  พบการลดลงของแอมโมเนียโดยความเข้มข้นลดลงเหลือ  $1.402 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  ภายใน 7 วัน สอดคล้องกับการพบการเพิ่มขึ้นของไนไตรต์และไนเตรด โดยไนไตรต์เพิ่มจาก  $0.06 \text{ mg NO}_2\text{-N/L}$  เป็น  $0.54 \text{ mg NO}_2\text{-N/L}$  ในวันที่ 44 ส่วนความเข้มข้นของไนเตรดเพิ่มขึ้นจาก  $2.283 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  เป็น  $5.013 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ในวันที่ 44 และจากการเติมแอมโมเนียเพิ่มลงในถังปฏิกรณ์ในวันที่ 46 ของการทดลอง ก็พบว่าแบคทีเรียในระบบสามารถลดความเข้มข้นของแอมโมเนียจาก  $5.154 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  จนหมดในเวลา

2 วัน ในขณะที่ความเข้มข้นของไนไตรต์และไนเตรตเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2.271 mg NO<sub>2</sub>-N/L และ 9.663 mg NO<sub>3</sub>-N/L ตามลำดับ แสดงว่าแบคทีเรียในตู้กรองชีวภาพกลุ่ม ammonia oxidizing bacteria เปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนไตรต์ และแบคทีเรียกลุ่ม nitrite oxidizing bacteria เปลี่ยนไนไตรต์ให้เป็นไนเตรต จึงพบการสะสมของไนไตรต์และไนเตรตขึ้นในถังปฏิกรณ์



ภาพที่ 4-1 แสดงผลปริมาณไนโตรเจนของ แอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต ในน้ำเสียทดลองถัง

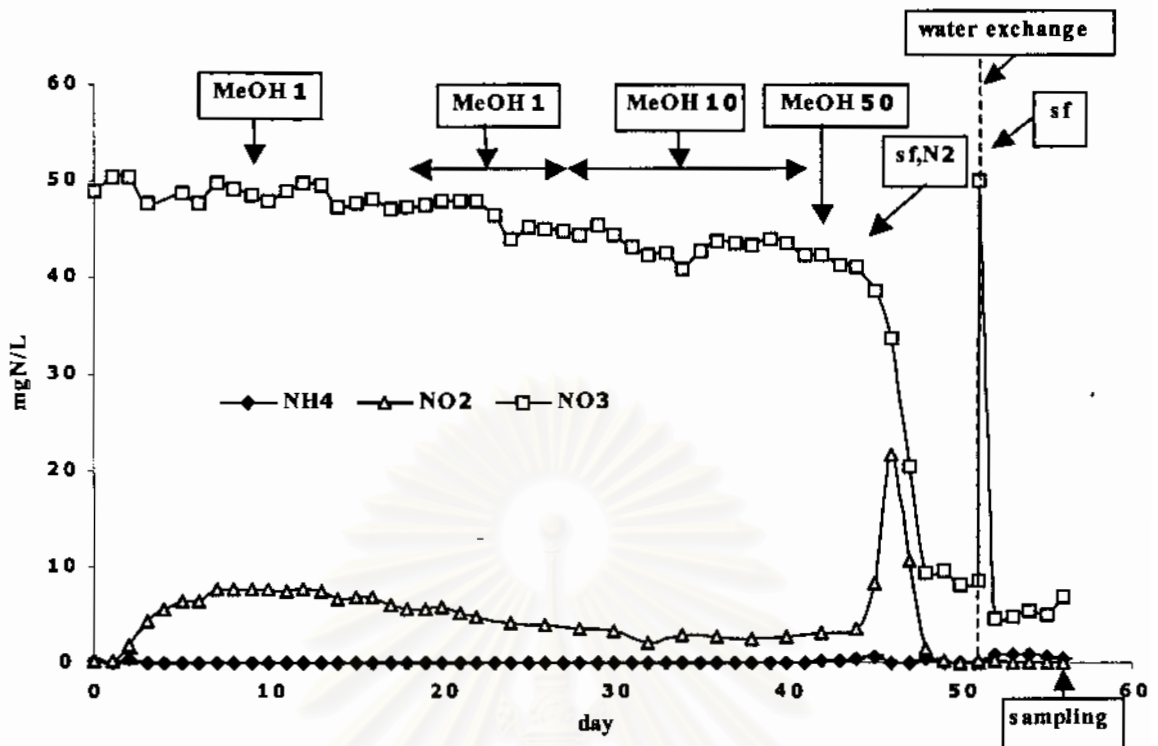
ปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน การทดลองครั้งที่ 1 ระยะเวลาการทดลอง 58 วัน มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังปฏิกรณ์ (water exchange) วันที่ 9 และ 37 ของการทดลอง วันที่ 46 เดิมสารประกอบแอมโมเนีย (NH<sub>4</sub>) ในถังปฏิกรณ์และช่วงท้ายการทดลองทำการเก็บตัวอย่างไบโอบอล (sampling) เพื่อไปวิเคราะห์แบคทีเรีย



#### 4.1.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในโตรเจนในถังปฏิกรณ์คิงในตรีฟิเคชัน

ผลการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจนในโตรเจนในถังปฏิกรณ์คิงในตรีฟิเคชันตลอดระยะเวลาการทดลอง 56 วัน แสดงในภาพที่ 4-2 พบว่า พบว่าน้ำในถังปฏิกรณ์เริ่มต้นมีความเข้มข้นเริ่มต้นของไนเตรต  $50.467 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ในขณะที่ไนไตรต์และแอมโมเนียมีค่าต่ำกว่าคือ  $0.104 \text{ mg NO}_2\text{-N/L}$  และ  $0.299 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  ตามลำดับ ในวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าไนไตรต์มีปริมาณเพิ่มขึ้นแต่ไม่พบการลดลงของไนเตรตที่ชัดเจน จึงทำการเติมเมทานอลปริมาตร  $1 \text{ ml}$  เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้แบคทีเรียในวันที่ 9 ของการทดลอง ซึ่งเป็นการเติมคาร์บอนในอัตราส่วน C:N เท่ากับ 1:1 พบว่าจนถึงวันที่ 18 ก็ยังไม่พบการเกิดปฏิกิริยาคิงในตรีฟิเคชันเนื่องจากไม่พบการลดลงของไนเตรต ดังนั้นจึงได้เติมเมทานอลลงในถังปฏิกรณ์ปริมาณวันละ  $1 \text{ ml}$  ทุกวัน ตั้งแต่วันที่ 18 จนถึงวันที่ 26 ของการทดลอง หลังจากนั้นจึงเพิ่มปริมาณเมทานอลเป็นวันละ  $10 \text{ ml}$  ในระหว่างวันที่ 27 ถึงวันที่ 41 ของการทดลอง พบว่าความเข้มข้นของไนเตรตมีการลดลงอย่างช้าๆ เหลือ  $42.405 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ในวันที่ 42 ของการทดลอง ในขณะที่ปริมาณไนไตรต์ยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในวันที่ 42 ของการทดลองจึงทำการเติมเมทานอลปริมาตร  $50 \text{ ml}$  ซึ่งก็ยังไม่พบการลดลงของไนเตรต

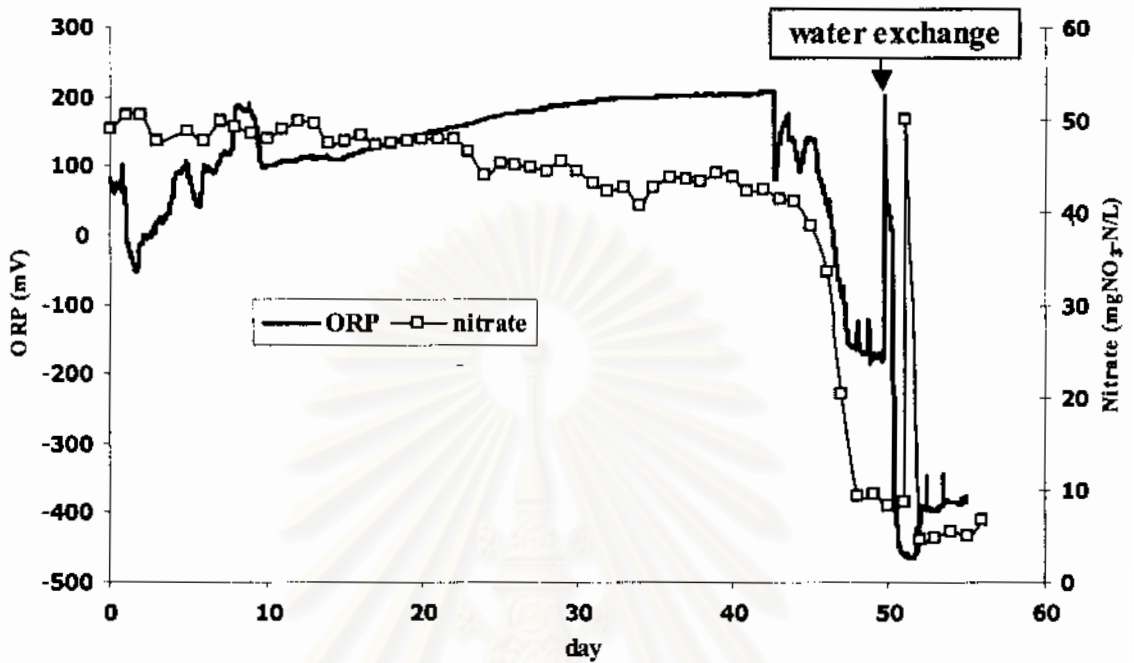
เนื่องจากการเติมเฉพาะเมทานอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวไม่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาคิงในตรีฟิเคชันในถังปฏิกรณ์ได้ ในวันที่ 44 ของการทดลองจึงได้ทำการเติมสารละลายอาหารกึ่งปราศจากเชื้อ  $15 \text{ g}$  ซึ่งเตรียมโดยการนำอาหารกึ่งมาบดและผสมกับน้ำทะเลก่อนนำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อ และทำการพ่นแก๊สไนโตรเจนเพื่อช่วยลดออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ ผลการทดลองในวันที่ 46 ได้ตรวจพบการลดลงของไนเตรตอย่างรวดเร็วหลังจากการเติมสารละลายอาหาร โดยระบบสามารถบำบัดไนเตรตจากความเข้มข้น  $41.176 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ลดลงเหลือ  $9.406 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ภายใน 4 วัน และยังพบว่าความเข้มข้นไนไตรต์เพิ่มขึ้นระหว่างการบำบัดไนเตรตและหมดไปเมื่อการบำบัดไนเตรตสิ้นสุด จากนั้นในวันที่ 51 จึงทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังปฏิกรณ์ใหม่ทั้งหมดโดยใช้น้ำชนิดเดียวกับที่ใช้เมื่อเริ่มต้นการทดลองและมีการเติมสารละลายอาหารกึ่ง ผลการทดลองพบการลดลงของไนเตรตจาก  $50.061 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  เหลือเพียง  $4.602 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ภายในเวลาเพียง 1 วัน โดยที่ไม่พบการสะสมของไนไตรต์แสดงว่าระบบเกิดปฏิกิริยาคิงในตรีฟิเคชัน ได้อย่างสมบูรณ์



ภาพที่ 4-2 แสดงผลปริมาณไนโตรเจนของ แอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต ในน้ำเสียทดลอง ถึงปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน การทดลองครั้งที่ 1 ระยะเวลาการทดลอง 56 วัน มีการเติม เมทานอล (MeOH) 1 ml, 10 ml และ 50 ml ในระหว่างการทดลอง ในวันที่ 44 เติมนสาร ละลายอาหารกุ้ง (sf) และก๊าซไนโตรเจน (N<sub>2</sub>) พบว่าไนเตรตลดลง จึงทำการเปลี่ยนถ่าย น้ำในถังปฏิกรณ์และเติมนสารละลายอาหารกุ้งในวันที่ 51 พบว่าไนเตรตลดลงอย่าง รวดเร็วช่วงท้ายสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างไบโอบอล (sampling) เพื่อไปวิเคราะห์ แบคทีเรีย

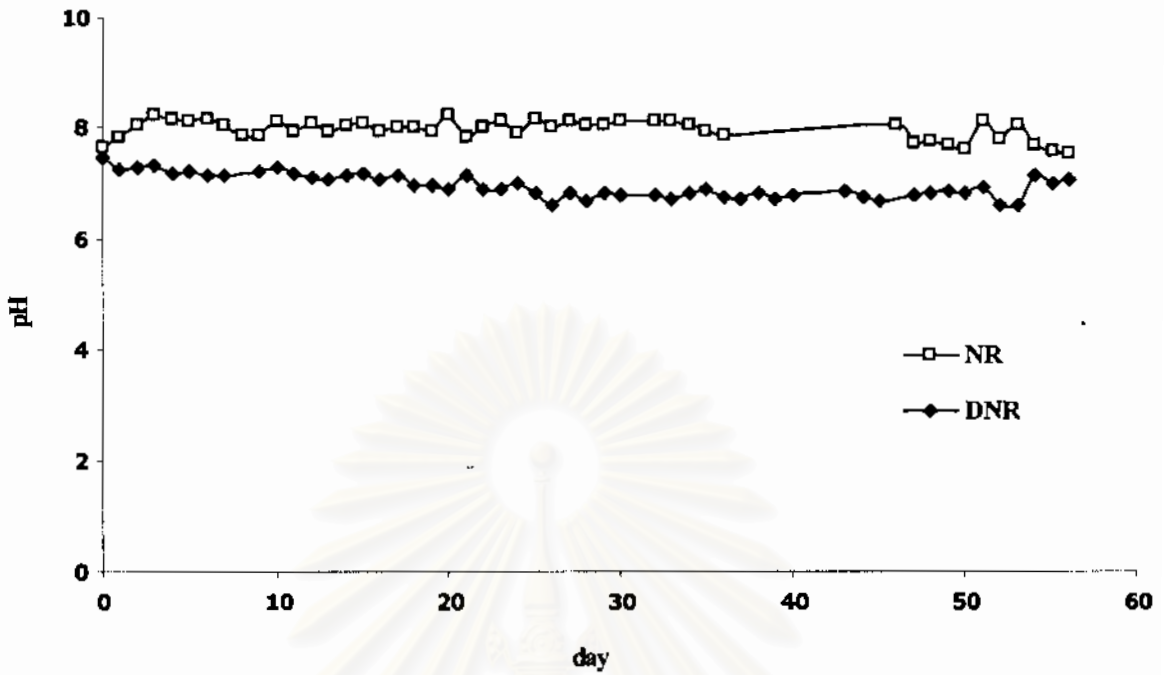
ผลการตรวจวัดค่าโออาร์พี (Oxidation-Reduction Potential: ORP) ในระหว่างการทดลอง ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันแสดงในภาพที่ 4-3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในการทดลองตั้งแต่วันเริ่มต้น จนถึงวันที่ 44 นั้นยังไม่เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันขึ้นในถังปฏิกรณ์ เนื่องจากค่าโออาร์พีมีค่าสูงกว่า 0 mV หลังจากนั้นค่าโออาร์พีจะลดลงอย่างรวดเร็วในเวลาเดียวกันกับที่พบการลดลงของไนเตรต และในช่วงท้ายของการทดลองพบว่าค่าโออาร์พีมีค่าระหว่าง -100 ถึง -400 mV ซึ่งเป็นค่าโออาร์พี ของน้ำที่เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน โดยมีไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ในวันที่ 50 มีการเปิดถัง ปฏิกรณ์เพื่อเตรียมทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังปฏิกรณ์ (แสดงด้วยสัญลักษณ์ water exchange ในภาพที่ 4-3) ทำให้ค่าโออาร์พีเพิ่มขึ้นมาอยู่ที่ประมาณ 200 mV เนื่องจากมีออกซิเจนอยู่ในระบบ แต่หลังจาก

การเป่าก๊าซไนโตรเจนเพื่อทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนในถังปฏิกรณ์แล้วทำให้ค่าโออาร์พีในถังปฏิกรณ์ลดลงได้

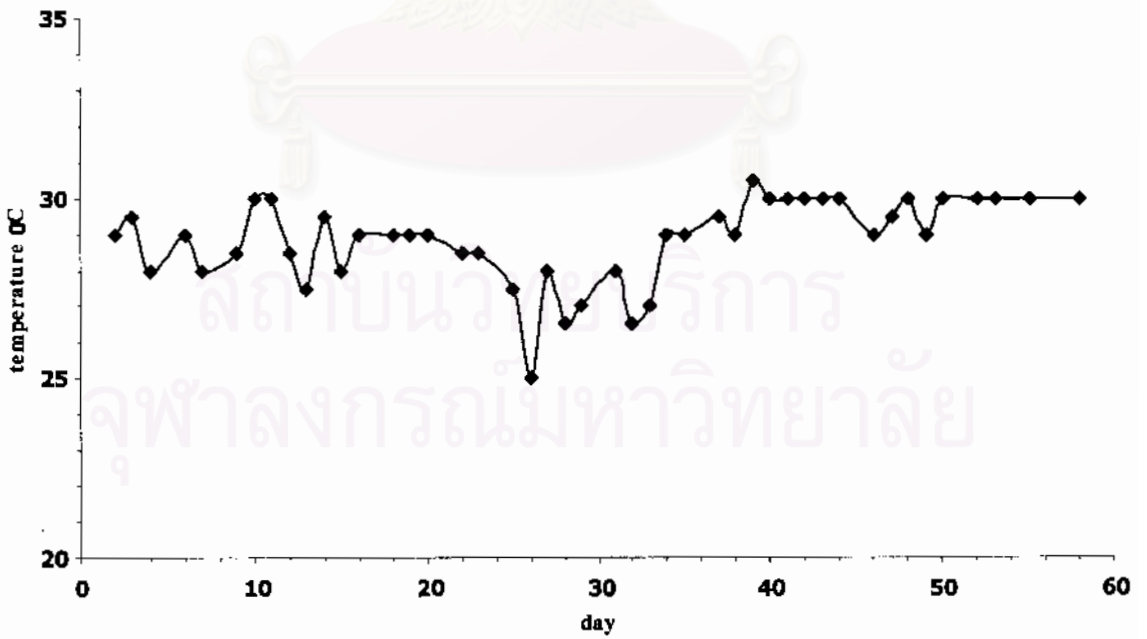


ภาพที่ 4-3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าโออาร์พีกับการบำบัดไนเตรตในน้ำเสียทดลองในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันระหว่างการทดลอง 56 วัน พบว่าเมื่อไนเตรตลดลง ค่าโออาร์พีลดลงตามลงมาจนมีค่าติดลบ ในวันที่ 50 ของการทดลองมีการเปิดถังปฏิกรณ์เพื่อทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ (water exchange) ทำให้มีอากาศเข้ามาในถังปฏิกรณ์ส่งผลให้ค่าโออาร์พีเพิ่มขึ้น

ผลการตรวจวัดค่าพีเอชในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน ซึ่งใช้น้ำทะเลเริ่มต้นชุดเดียวกันและทำการทดลองไปพร้อมกัน พบว่าจากค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 7.5 เท่ากันทั้งสองถัง น้ำในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันจะมีค่าพีเอชตลอดการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ  $8.0 \pm 0.18$  ซึ่งจะสูงกว่าพีเอชของน้ำในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $7.0 \pm 0.21$  (ภาพที่ 4-4) ส่วนการตรวจวัดอุณหภูมิซึ่งทำเฉพาะในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน พบว่าน้ำในถังปฏิกรณ์มีอุณหภูมิเฉลี่ยระหว่างการทดลองอยู่ที่  $29 \pm 1.19$  °C (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-4 ค่าพีเอชในน้ำเสียทดลองในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันระหว่างการทดลอง 56 วัน



ภาพที่ 4-5 ค่าอุณหภูมิของน้ำเสียทดลองในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันระหว่างการทดลอง

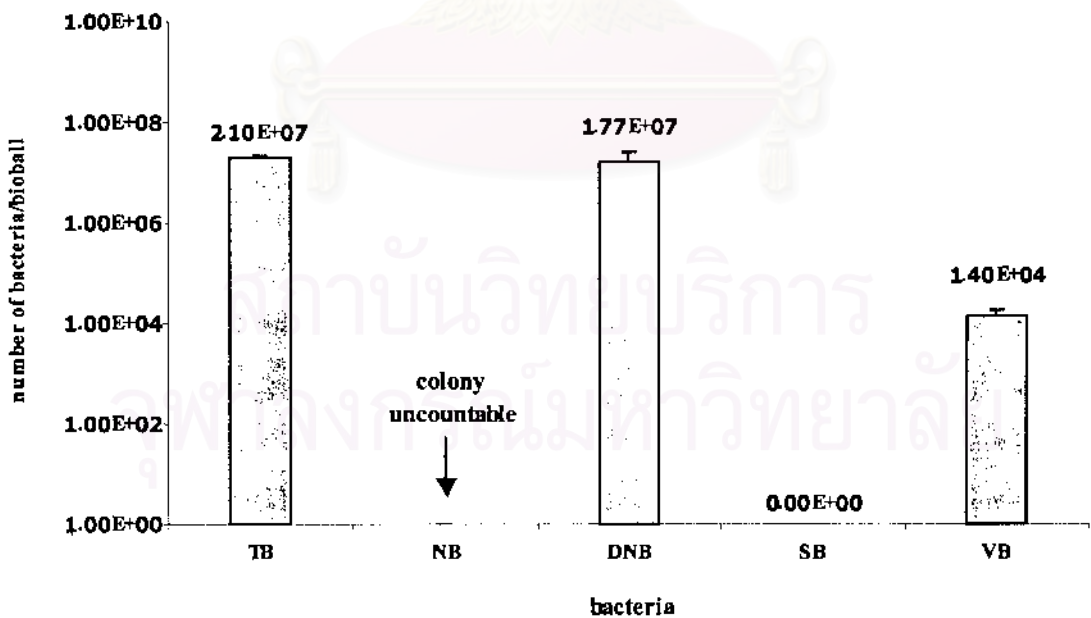


#### 4.1.3 ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ในตรีฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน

การศึกษาลักษณะ รูปร่าง ชนิด และปริมาณแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอล ทำโดยการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ การส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และการใช้เทคนิค PCR-DGGE

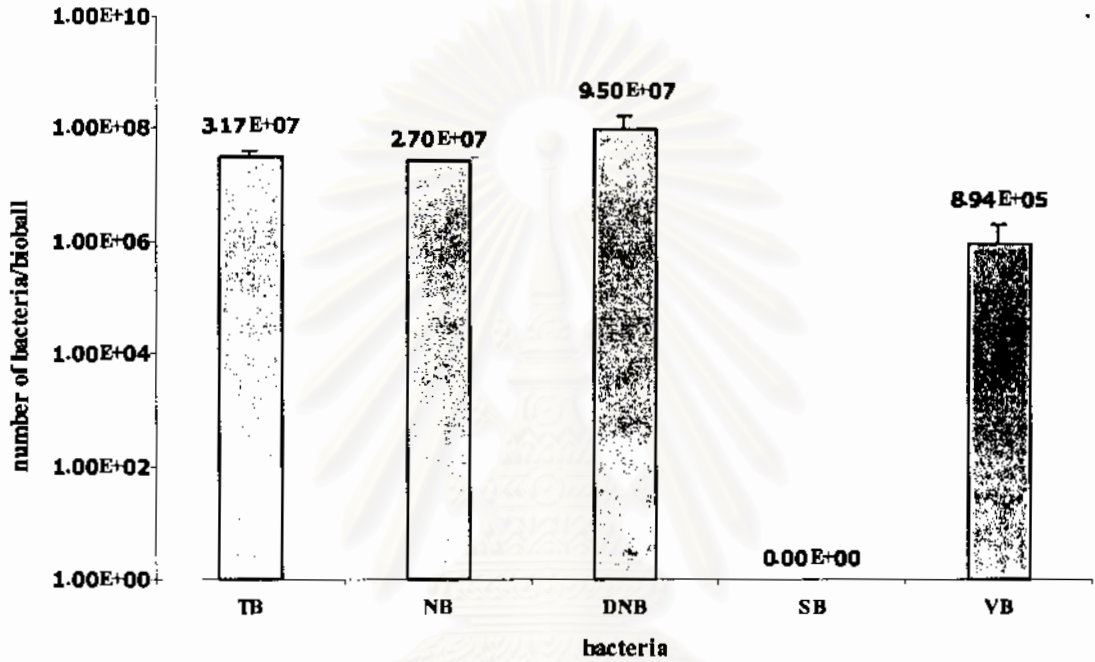
##### 4.1.3.1 ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ในตรีฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันโดยวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

ผลการนำตัวอย่างแบคทีเรียจากตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ในตรีฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ดังรายละเอียดในวิธีการทดลอง (หัวข้อ 3.5.1) ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4-6 และ 4-7 และภาคผนวก ข พบว่าในถังปฏิกรณ์ในตรีฟิเคชันมีแบคทีเรียรวม (Total bacteria) ในปริมาณใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่เลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสำหรับดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะไร้ออกซิเจน ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มไนตริฟายอิงแบคทีเรียไม่สามารถตรวจนับได้เนื่องจากมีโคโลนีที่มีขนาดเล็กบาง เกะกันเป็นกลุ่มทำให้สังเกตเห็นได้ยาก ส่วนปริมาณของแบคทีเรียในสกุลวิบริโอมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับแบคทีเรียทั้งหมด และตรวจไม่พบแบคทีเรียลคซัลเฟต (ภาพที่ 4-8)



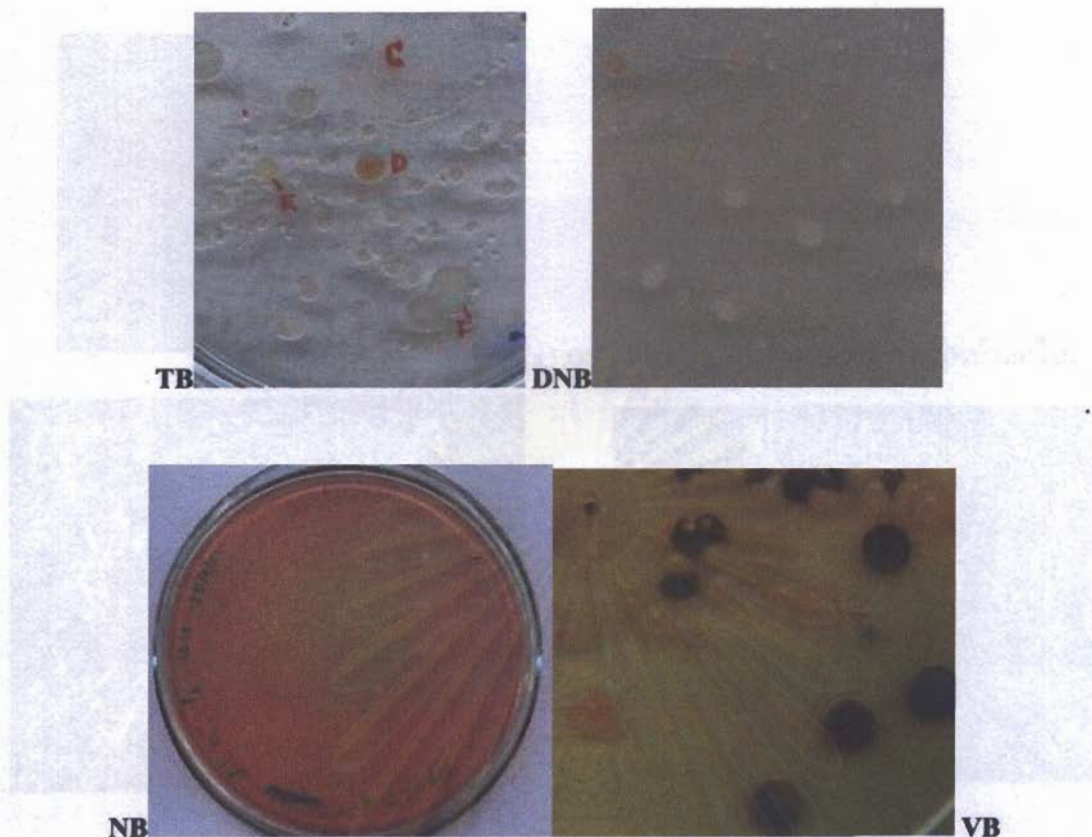
ภาพที่ 4-6 ผลการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจากตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์ในตรีฟิเคชัน (NR) โดยวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

ผลการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจากตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันในภาพที่ 4-7 พบว่าแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียมีจำนวนใกล้เคียงกัน และมีค่าสูงกว่าจำนวนแบคทีเรียที่พบในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในกลุ่มไนตริฟายอิงแบคทีเรีย แต่ไม่พบแบคทีเรียลดซัลเฟต สำหรับปริมาณแบคทีเรียสกุล *Vibrio* พบว่ามีปริมาณมากกว่าที่พบในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน



ภาพที่ 4-7 ผลการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจากตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) โดยวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

โคโลนีของแบคทีเรียที่พบในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารชนิด NA จากตัวอย่างตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันและในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันมีลักษณะที่เหมือนกัน โดยพบโคโลนีหลายรูปแบบ เช่น โคโลนีสีขาวขุ่น โคโลนีสีส้ม และโคโลนีสีเหลือง (ภาพที่ 4-8) ในขณะที่แบคทีเรียสกุล *Vibrio* บนอาหารเพาะเชื้อ TCBS มีทั้งโคโลนีเป็นสีเขียวและสีเหลืองส้ม ส่วนไนตริฟายอิงแบคทีเรียมีโคโลนีที่บางสีขาวใส บางครั้งแผ่ออกเชื่อมกันเป็นกลุ่ม ทำให้สังเกตเห็นได้ยาก และมีอัตราการเติบโตของแบคทีเรียที่ช้ากว่า โดยจะต้องใช้เวลาประมาณ 5-7 วันในการเพาะเลี้ยง

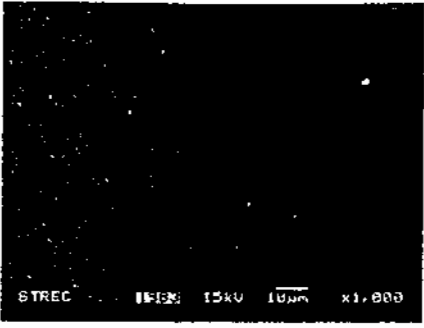


ภาพที่ 4-8 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียรวมในน้ำทะเล (TB) ดีไนโตรฟายอิงแบคทีเรีย (DNB) ไนโตรฟายอิงแบคทีเรีย (NB) และไวรัสโอ (VB) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะของแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพดังปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชันและดังปฏิกรณ์ดีไนโตรฟิเคชัน

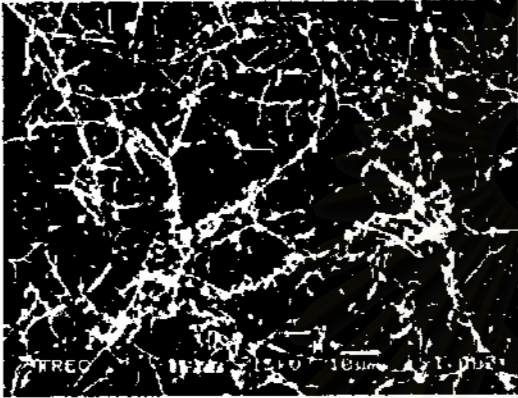
#### 4.1.3.2 ผลการศึกษาแบคทีเรียที่เกาะบนพื้นผิวตัวอย่างชีวภาพไบโอบอดโดยการส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน

ผลการส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า จุลินทรีย์ที่เติบโตยึดเกาะกับผิวของพลาสติกในถังปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนโตรฟิเคชันในวันสุดท้ายของการทดลองมีลักษณะที่เหมือนกัน โดยพบจุลินทรีย์ที่เป็นเส้นใย (filamentous) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ  $0.5 \mu\text{m}$  และเมื่อส่องตรวจด้วยกำลังขยายสูงก็จะพบแบคทีเรียรูปแท่ง (rod) เกาะยึดติดอยู่กับแบคทีเรียที่เป็นเส้นใย และมีแบคทีเรียรูปแท่งบางส่วนเกาะยึดติดกับพื้นผิวพลาสติกโดยตรง (ภาพที่ 4-9)

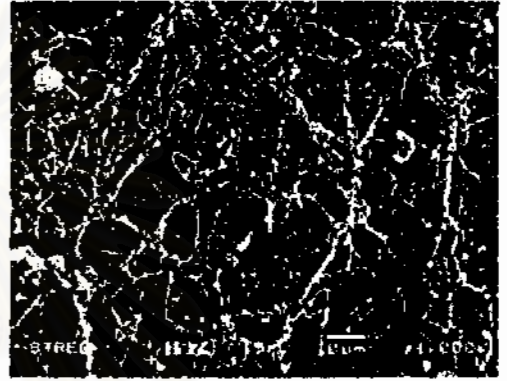




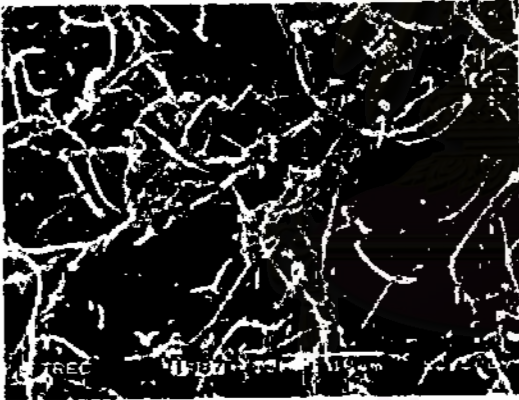
B (x1,000) ภาพที่ 4-9 (คำอธิบายภาพอยู่หน้าถัดไป)



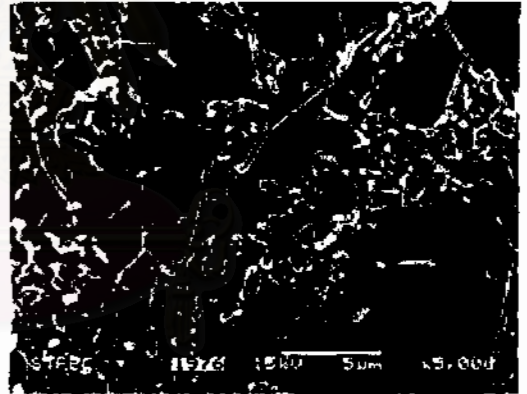
N1 (x1,000)



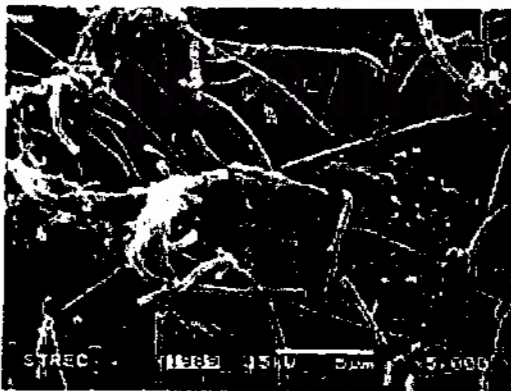
D1 (x1,000)



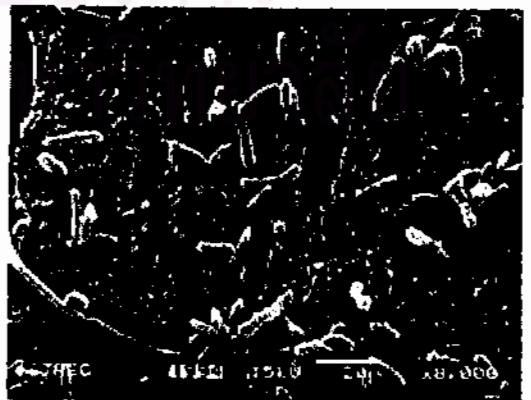
N2 (x2,500)



D2 (x5,000)



N3 (x5,000)



D3 (x8,000)



ภาพที่ 4-9 แบคทีเรียที่พบบนพื้นผิวของไบโอบอลในวันสุดท้ายของการทดลอง โดยภาพบนสุด (B) แสดงลักษณะพื้นผิวไบโอบอลในตอนเริ่มต้นการทดลอง ภาพด้านซ้าย N1, N2, N3 เป็นลักษณะจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR) ในกำลังขยาย 1,000 เท่า 2,500 เท่า และ 5,000 เท่า ตามลำดับ ภาพด้านขวา D1, D2, D3 เป็นลักษณะจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ในกำลังขยาย 1,000 เท่า 5,000 เท่า และ 8,000 เท่า ตามลำดับ

#### 4.1.3.3 ผลการศึกษาปริมาณโปรตีนของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน

การศึกษาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry ของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน ในวันที่ 11 และ 19 ของการทดลอง ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4-1 ซึ่งพบว่าปริมาณโปรตีนในวันที่ 19 มีค่าสูงกว่าในวันที่ 11 และในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันมีปริมาณโปรตีนของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพสูงกว่าปริมาณโปรตีนของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA  $P=0.015$  และ  $P=0.00006$  ตามลำดับ) (รายละเอียดในภาคผนวก ข)

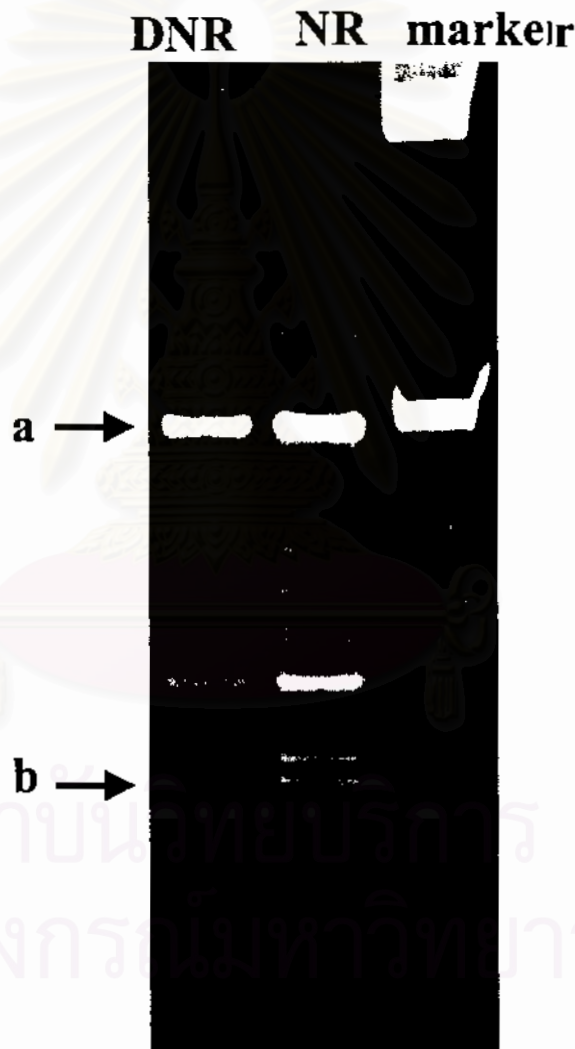
ตารางที่ 4-1 ปริมาณโปรตีนของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR) และดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ตัวอักษรตัวทแยงแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ )

วันที่ทำการทดลอง	ปริมาณโปรตีนในไบโอบอลในถัง NR		ปริมาณโปรตีนในไบโอบอลในถัง DNR	
	ค่าเฉลี่ย (mg/bioball)	SD (n=9)	ค่าเฉลี่ย (mg/bioball)	SD (n=9)
11	0.049 <sup>a</sup>	0.000045	0.0624 <sup>b</sup>	0.000144
19	0.095 <sup>a</sup>	0.000277	0.1243 <sup>b</sup>	0.000426

#### 4.1.3.4 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชาคมและชนิดของแบคทีเรียที่เกาะอยู่บนไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE

หลังจากทำการสกัด DNA ของจุลินทรีย์จากตัวอย่างตัวกรองชีวภาพไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยใช้ FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit และทำการเพิ่มจำนวน 16S rDNA ของ DNA ที่สกัดได้ด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ด้วย primer PRBA338f และ primer PRUN518r รายละเอียดแสดงในวิธีการทดลอง (หัวข้อ 3.5.4.2) และ-

วิเคราะห์ด้วยวิธี DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) เพื่อแยก 16S rDNA ของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยใช้ความเข้มข้น urea denaturant 25% - 60% ใน 8% polyacrylamide gel ได้ผลการวิเคราะห์ DGGE ดังภาพที่ 4-10 ซึ่งจะเห็นได้ว่า DGGE แยกแถบ (band) ของ 16S rDNA ออกเป็นอย่างน้อย 9 แถบ โดยมีความหนาของแถบไม่เท่ากัน และในดั่งปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR) และดั่งปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ให้ลักษณะแถบของ DNA ที่เหมือนกัน แสดงว่าในดั่งปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดั่งปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันมีองค์ประกอบของชนิดแบคทีเรียเหมือนกัน โดยมีแบคทีเรียอย่างน้อย 9 ชนิด



ภาพที่ 4-10 DGGE profile ของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในดั่งปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR) และดั่งปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ตัวอักษร a และ b เป็นแถบ DNA ที่นำไปทำการหาลำดับเบส

ผลการหาลำดับเบสของ DNA แถบ a และ b ในภาพที่ 4-10 โดยการเพิ่มจำนวนชิ้น 16S rDNA ด้วย primer PRUN518r แล้วนำไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสที่หน่วยปฏิบัติการดีเอ็นเอ เทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสแสดงในภาคผนวก ก) และนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Blastn (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) พบว่าแบคทีเรียในแถบ a คือ *Methylophaga marina* และแบคทีเรียในแถบ b คือ *Marinobacter* sp. โดยมีรายละเอียดของผลการเปรียบเทียบดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ชนิดของแบคทีเรียที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในการทดลองรอบที่ 1 และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blastn

แถบ	ชนิดของแบคทีเรีย	หมายเหตุ
a	<i>Methylophaga marina</i>	Score = 313 bits (158), Expect = 6e-83 Identities = 165/166 (99%), Gaps = 1/166 (0%) Strand = Plus / Minus
b	<i>Marinobacter</i> sp.	Score = 216 bits (109), Expect = 1e-53 Identities = 122/127 (96%) Strand = Plus / Minus

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

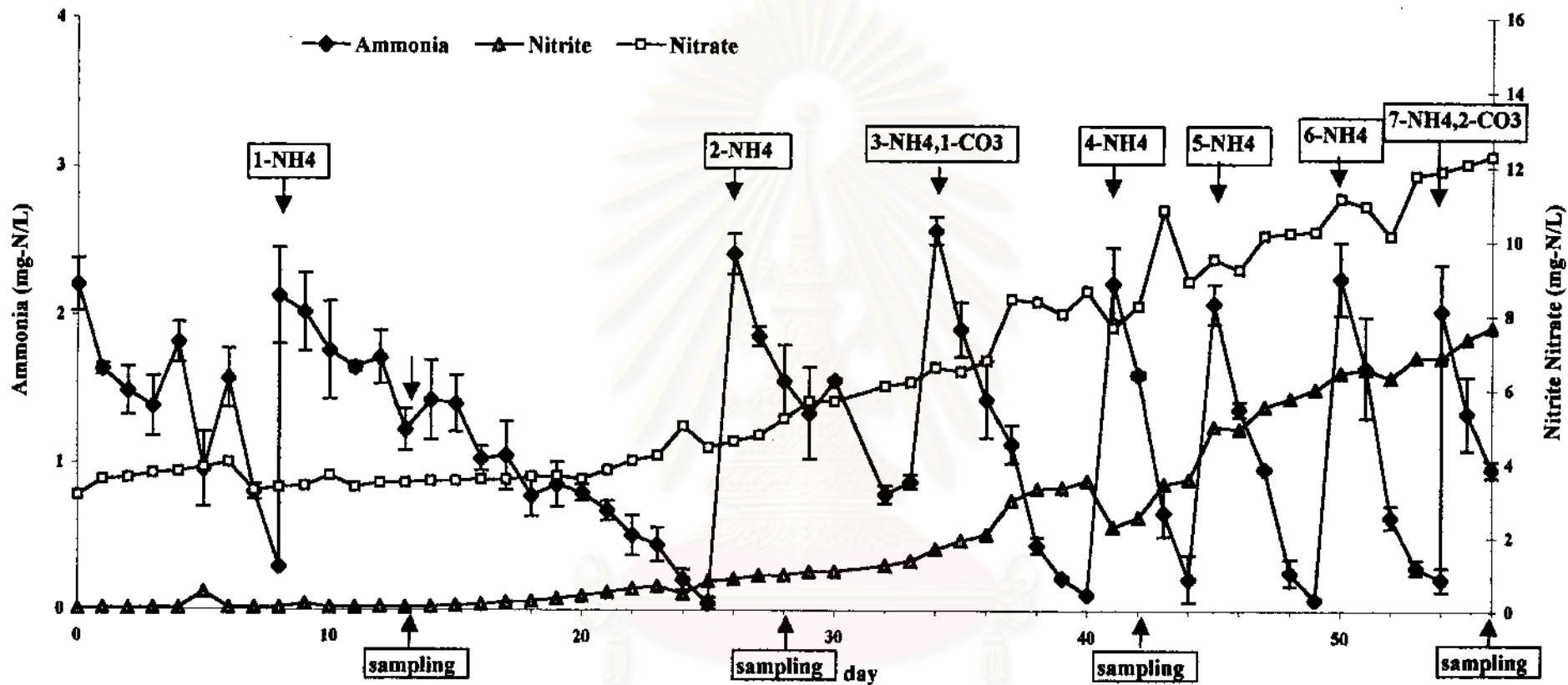
#### 4.2 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนและแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน และถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (การทดลองรอบที่ 2)

จากผลการทดลองในรอบที่ 1 ทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในถังปฏิกรณ์ แต่เวลาส่วนใหญ่ที่ใช้ในการทดลองเป็นการทดลองปรับสภาวะของระบบ โดยพบปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในระยะสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองซึ่งยังเป็นระยะเวลาที่สั้นมาก ส่งผลให้องค์ประกอบชนิดของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ทั้งสองไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการทดลองในรอบที่ 2 จึงได้ทำการทดลองในสภาวะของถังปฏิกรณ์ให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (สภาวะมีออกซิเจน) หรือดีไนตริฟิเคชัน (สภาวะไร้ออกซิเจนมีแหล่งคาร์บอนและสารอาหารที่เพียงพอ) ตั้งแต่เริ่มต้นและควบคุมสภาวะให้เหมาะสมกับปฏิกิริยาตลอดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ และทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำและองค์ประกอบของแบคทีเรียในลักษณะเดียวกันกับการทดลองรอบที่ 1

##### 4.2.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน

ผลการตรวจวัดปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจนในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ของการทดลอง แสดงในภาพที่ 4-11 ในวันเริ่มต้นการทดลองได้เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ลงในน้ำที่นำมาจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาค่าในโรงเรือนให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น  $2.206 \text{ mgNH}_4\text{-N/L}$  และเมื่อมีการบำบัดแอมโมเนียจนหมดก็จะทำการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมในถังปฏิกรณ์อีก 7 ครั้ง พบว่าแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันสามารถบำบัดแอมโมเนียมโดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไนไตรต์และไนเตรตตามลำดับ ส่งผลให้เกิดการสะสมของไนเตรตขึ้นในถังปฏิกรณ์ และปริมาณไนโตรเจนรวมของระบบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (ภาพที่ 4-12) เนื่องมาจากการเติมแอมโมเนียมลงในถังปฏิกรณ์ ในระยะ 8 วันแรกของการทดลอง ระบบสามารถบำบัดแอมโมเนียให้ลดลงเหลือ  $0.294 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  ภายใน 8 วัน คิดเป็นอัตราการบำบัดแอมโมเนียม  $0.2176 \text{ mg NH}_4\text{-N/L/day}$  หรือ  $0.0016 \text{ mg NH}_4\text{-N/Bioball/day}$  และหลังจากการเติมแอมโมเนียม (ครั้งที่ 1) เพิ่มลงไปในถังปฏิกรณ์ในวันที่ 8 ทำให้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น  $2.128 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  ก็พบว่าระบบสามารถบำบัดแอมโมเนียมลงเหลือ  $0.050 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  ภายใน 18 วัน โดยมีอัตราการบำบัดลดลงเป็น  $0.0008 \text{ mg NH}_4\text{-N/Bioball/day}$  และปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ไม่เปลี่ยนแปลง ในการเติมแอมโมเนียมลงในถังปฏิกรณ์ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 จึงได้เติม  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ลงในถังปฏิกรณ์เพื่อเพิ่มปริมาณอัลคาลินิตีขึ้นเป็น  $150 \text{ ppm}$  เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนแก่แบคทีเรีย พบว่าระบบสามารถบำบัดแอมโมเนียได้เร็วขึ้น (ภาพที่ 4-13) และพบการสะสมไนไตรต์และไนเตรตเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

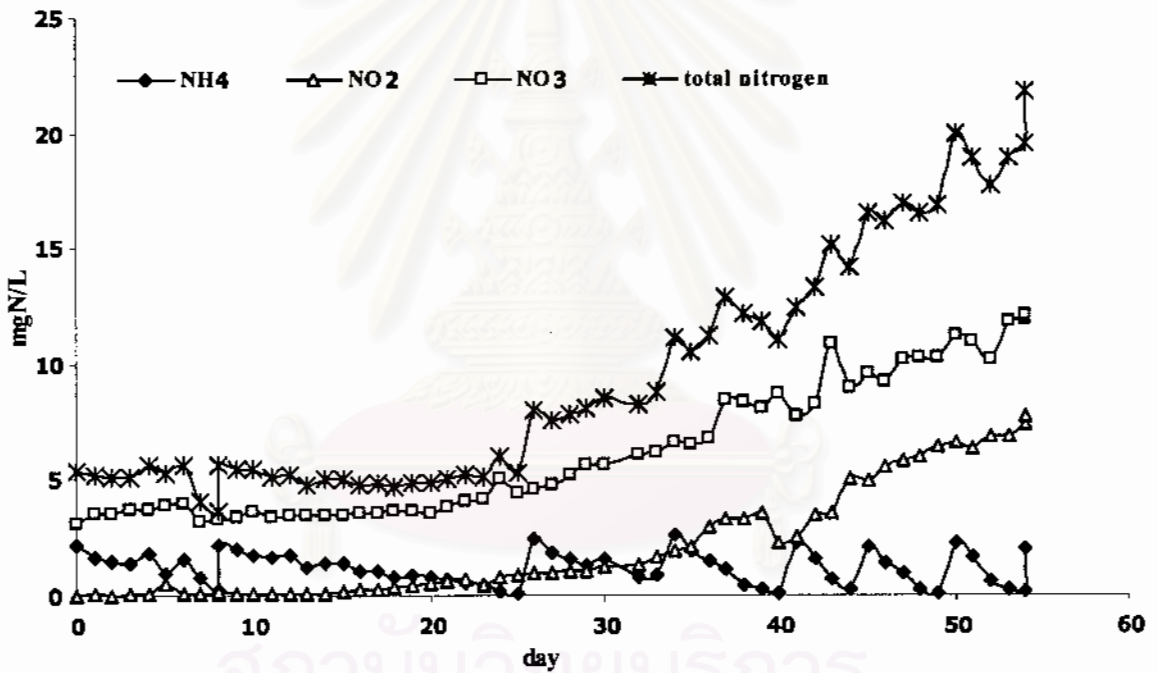




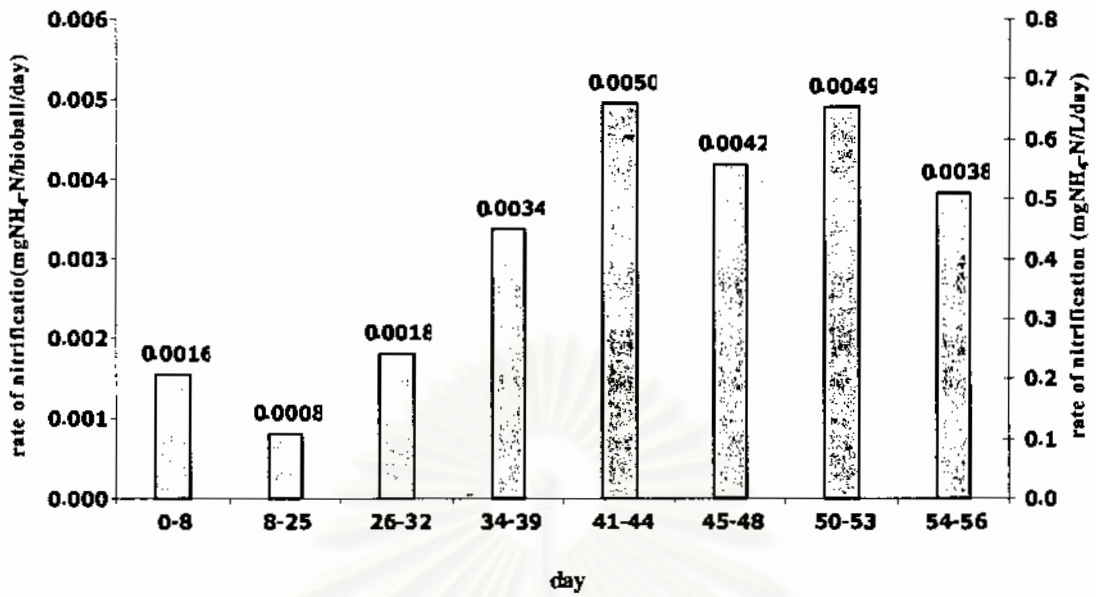
ภาพที่ 4-11 แสดงผลปริมาณไนโตรเจนของ แอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรด ในน้ำเสียทดลองดังปฏิกรณ์ไนตริไฟเคชัน การทดลองรอบที่ 2 ระยะเวลาการทดลอง 56 วัน โดยมีการเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ลงในถังปฏิกรณ์จำนวน 7 ครั้งในวันที่ 8,26,34,41,45,50 และ 54 และมีการเติม  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  เพื่อเพิ่มอัลคาไลน์ตีในถังปฏิกรณ์ให้อยู่ที่ระดับ 150 ppm ตั้งแต่วันที่ 34 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

การเติมแอมโมเนียมไนโตรเจนครั้งที่ 4, 5 และ 6 (วันที่ 41, 45 และ 50 ตามลำดับ) ความเข้มข้นประมาณ  $2 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  พบว่าแอมโมเนียลดลงจนหมดภายใน 3 วัน โดยมีอัตราการบำบัดแอมโมเนียอยู่ระหว่าง  $0.004\text{-}0.005 \text{ mg NH}_4\text{-N/Bioball/day}$  (ภาพที่ 4-13) ผลการทดลองในวันที่ 56 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองตรวจพบปริมาณแอมโมเนียมในน้ำ  $0.964 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  แต่มีการสะสมของไนไตรต์และไนเตรตความเข้มข้น  $7.698 \text{ mg NO}_2\text{-N/L}$  และ  $12.301 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ตามลำดับ

โดยปริมาณผลรวมของไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำเสียทดลองจากภาพที่ 4-12 พบว่าไนโตรเจนทั้งหมดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากการเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ลงในถังปฏิกรณ์ระหว่างทดลอง โดยระบบสามารถบำบัดแอมโมเนียมเป็นไนไตรต์ได้ แต่ไม่สามารถบำบัดไนไตรต์เป็นไนเตรตได้หมด จึงทำให้เกิดการสะสมของไนไตรต์ขึ้นในระบบ



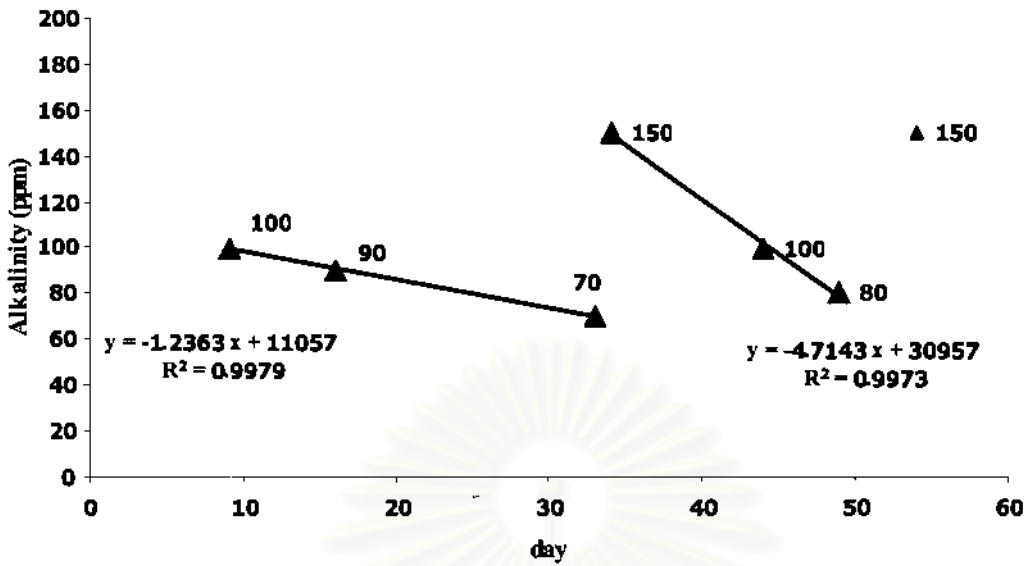
ภาพที่ 4-12 ปริมาณสารอนินทรีย์ไนโตรเจนทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน พบว่าไนโตรเจนทั้งหมดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเนื่องจากการเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ลงไประหว่างการทดลองโดยแอมโมเนียมถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์และไนเตรต



ภาพที่ 4-13 อัตราการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันถึงปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน เมื่อคิดเทียบต่อไบโอบอล (แกนซ้าย: หน่วย  $\text{mgNH}_4\text{-N/bioball/day}$  แสดงเป็นตัวเลขอยู่เหนือแท่งกราฟ) และคิดเทียบต่อปริมาตรน้ำ (แกนขวา: หน่วย  $\text{mgNH}_4\text{-N/L/day}$ )

ผลการตรวจวัดปริมาณอัลคาไลน์ (alkalinity) ของน้ำในถังปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน แสดงในภาพที่ 4-14 ซึ่งการลดลงของอัลคาไลน์ในน้ำจาก 100 ppm ในวันที่ 9 ของการทดลองลดลงเหลือ 90 ppm และ 70 ppm ในวันที่ 16 และ 33 ของการทดลองตามลำดับ คิดเป็นอัตราการใช้  $\text{CO}_2$  เท่ากับ  $1.2 \text{ mg CO}_2\text{/L/day}$  ( $0.009 \text{ mg CO}_2\text{/bioball/day}$ ) และจากการที่ค่าอัลคาไลน์ในถังปฏิกิริยามีค่าลดลงมาก จึงทำการเติม  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ลงในถังปฏิกิริยาในวันที่ 34 ทำให้อัลคาไลน์ในน้ำเพิ่มขึ้นเป็น 150 ppm หลังจากนั้นจึงตรวจพบการลดลงของอัลคาไลน์เหลือ 100 ppm และ 80 ppm ในวันที่ 44 และ 49 ของการทดลองตามลำดับ สามารถคำนวณเป็นอัตราการใช้  $\text{CO}_2$  เท่ากับ  $4.7 \text{ mg CO}_2\text{/L/day}$  ( $0.034 \text{ mg CO}_2\text{/bioball/day}$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4-14 การลดลงของอัลคาไลน์ (alkalinity) ของน้ำในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน สมการเส้นตรงคำนวณโดยวิธีวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis)

#### 4.2.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน

จากผลการทดลองในการทดลองรอบที่ 1 ทำให้สามารถสร้างสภาวะในถังปฏิกรณ์ในการทดลองรอบที่ 2 ให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้ตั้งแต่วันเริ่มต้นจนถึงวันสิ้นสุดการทดลองระยะเวลา 56 วัน ดังแสดงในภาพที่ 4-15 จากในวันเริ่มการทดลองมีความเข้มข้นของไนเตรต 53.83 mg NO<sub>3</sub>-N/L ส่วนไนไตรต์และแอมโมเนียมมีความเข้มข้นต่ำมาก (0.028 mg NO<sub>2</sub>-N/L และ 0.061 mg NH<sub>4</sub>-N/L ตามลำดับ) และได้ทำการเติมสารละลายอาหารกุ้งปราศจากเชื้อ 5 ml เพื่อเป็นแหล่งอาหารแก่จุลินทรีย์ รวมทั้งเป่าก๊าซไนโตรเจนลงในถังเพื่อกำจัดออกซิเจนในน้ำ พบว่าความเข้มข้นของไนเตรตลดลงเหลือ 10.844 mg NO<sub>3</sub>-N/L ในเวลาเพียง 3 วัน และพบไนไตรต์เกิดขึ้น 44.416 mg NO<sub>2</sub>-N/L หลังจากนั้นไนไตรต์จึงลดลงจนหมดไป ในระหว่างวันที่ 5-6 พบว่าน้ำเสียในถังปฏิกรณ์มีสีเหลืองขุ่นและเกิดกลิ่นเหม็นคล้ายก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จึงต้องทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังปฏิกรณ์ทั้งหมดออก แล้วเติมน้ำทะเลจากบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนที่เตรียมไว้เช่นเดียวกับเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และทำการเติมสารละลายอาหารกุ้งปราศจากเชื้อ พบว่าระบบสามารถลดปริมาณไนเตรตลงจนหมดในเวลา 3 วัน และน้ำเริ่มมีกลิ่นของไฮโดรเจนซัลไฟด์ จึงทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำครั้งที่ 2 ในวันที่ 8 และเป่าก๊าซไนโตรเจนลงในถังปฏิกรณ์แต่ไม่ได้เติมสารละลายอาหารกุ้ง พบว่าระบบยังสามารถบำบัดไนเตรตได้ภายใน 3 วัน โดยมีอัตราการบำบัด 0.131 mgNO<sub>3</sub>-N/Bioball/day (ภาพที่ 4-18)

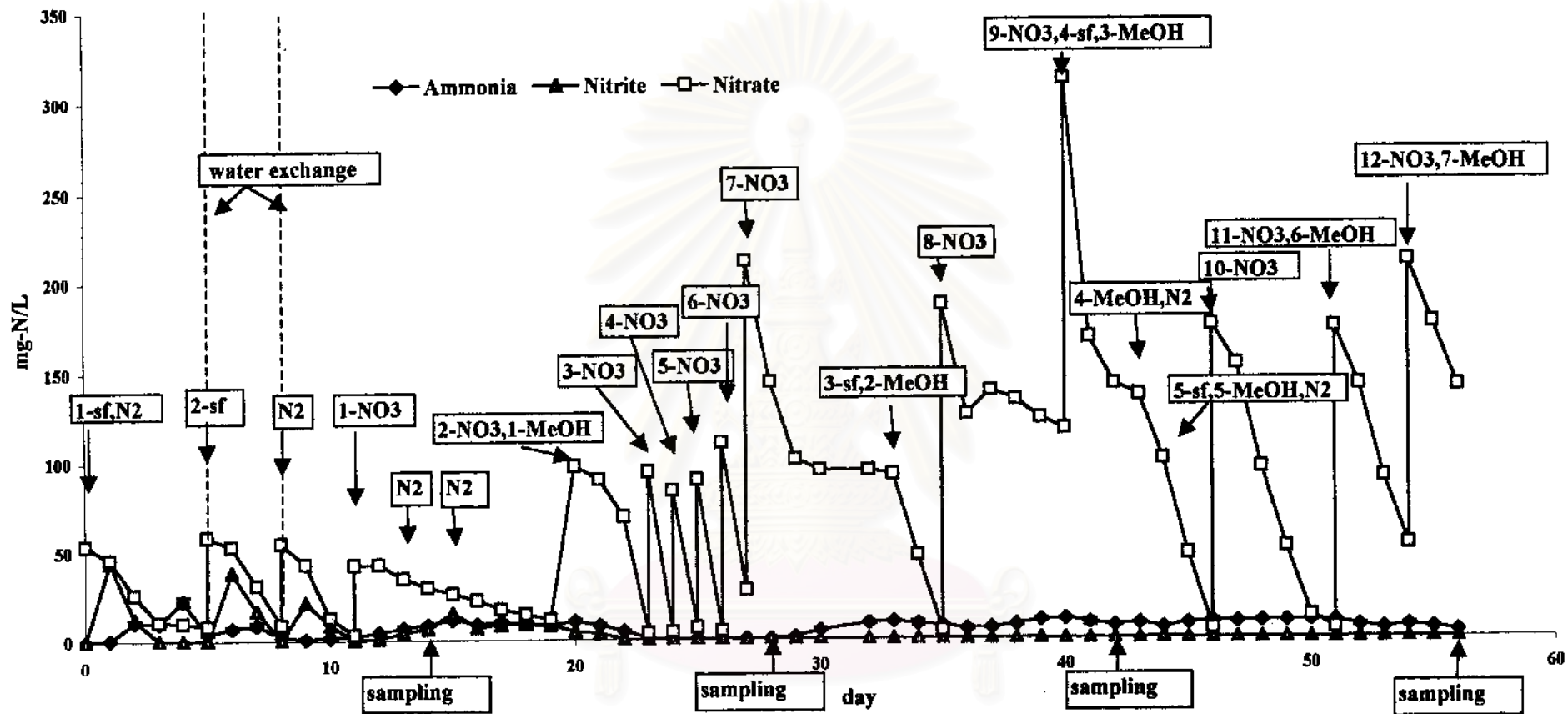


เมื่อไนเตรดในระบบถูกบำบัดจนหมดในวันที่ 11 จึงทำการเติม  $\text{NaNO}_3$  ลงในน้ำถังปฏิกรณ์ทำให้ความเข้มข้นของไนเตรดเพิ่มขึ้นเป็น  $42.4 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  พบว่าอัตราการบำบัดไนเตรดลดลงเหลือเพียง  $0.030 \text{ mg NO}_3\text{-N/Bioball/day}$  การเติมไนเตรดลงในถังปฏิกรณ์ในวันที่ 20 ของการทดลองได้เพิ่มความเข้มข้นของไนเตรดขึ้นเป็น  $97.7 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  และมีการเติมเมทานอล  $10 \text{ ml}$  เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรีย พบว่าระบบสามารถบำบัดไนเตรดได้ในอัตราที่สูงขึ้นเป็น  $0.217 \text{ mg NO}_3\text{-N/Bioball/day}$  และไนเตรดลดลงเหลือ  $3.5 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ในเวลา 3 วันโดยไม่พบการสะสมของไนไตรต์ ในเวลาต่อมาพบว่าการเติมไนเตรดลงในถังปฏิกรณ์ในวันที่ 23, 24, 25 และ 26 ให้มีความเข้มข้นประมาณ  $100 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ระบบสามารถบำบัดไนเตรดได้หมดภายในเวลาหนึ่งวัน โดยมีอัตราการบำบัดที่สูงสุดเท่ากับ  $0.643 \text{ mg NO}_3\text{-N/Bioball/day}$  ในวันที่ 23-24 ของการทดลอง ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวจะพบฟองก๊าซไนโตรเจนที่บริเวณไบโอบอลและน้ำในถังปฏิกรณ์จะมีความขุ่นเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 4-17)

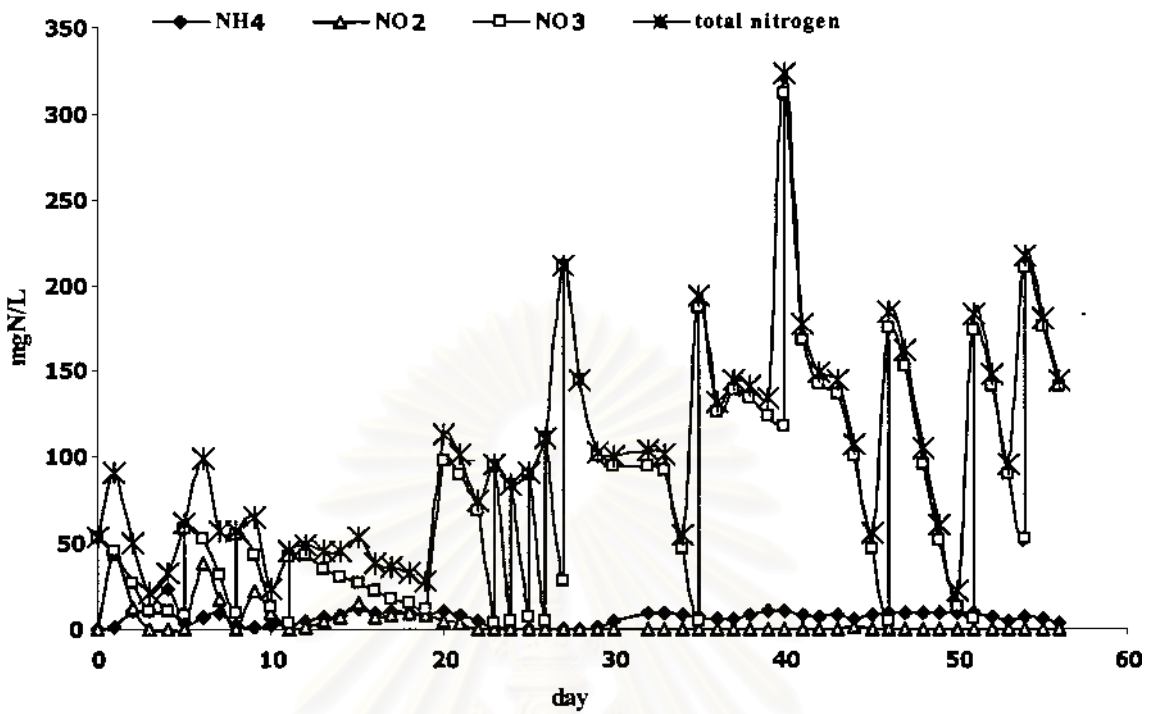
ในวันที่ 27 ได้เพิ่มความเข้มข้นของไนเตรดในถังปฏิกรณ์ขึ้นเป็น  $211 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  พบว่าระบบยังสามารถบำบัดไนเตรดได้ โดยไนเตรดลดลงอย่างรวดเร็วใน 2 วันแรก (วันที่ 27-29) แต่อีก 3 วันต่อมา (วันที่ 30-33) พบว่าปริมาณไนเตรดมีค่าคงที่ จึงทำการตรวจสอบถังปฏิกรณ์พบว่าเกิดรอยรั่วขึ้นบริเวณใกล้ช่องทางออกของสายไฟด้านบนฝาถังปฏิกรณ์ เมื่อทำการซ่อมแซมอุดรอยรั่วแล้วทำการเป่าก๊าซไนโตรเจน เติมนเมทานอล  $2 \text{ ml}$  และเติมสารละลายอาหารกุ้ง  $5 \text{ ml}$  พบว่าระบบสามารถเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันทำให้ความเข้มข้นของไนเตรดลดลงได้

ในวันที่ 40 ของการทดลองได้ทำการเพิ่มความเข้มข้นของไนเตรดในถังปฏิกรณ์เป็น  $311 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  และมีการเติมเมทานอล  $2 \text{ ml}$  และสารละลายอาหารกุ้ง  $5 \text{ ml}$  ก็พบว่าระบบสามารถบำบัดไนเตรดได้จนหมดในเวลา 6 วัน และการเติมไนเตรดความเข้มข้นประมาณ  $180 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  ในวันที่ 46, 51 และ 54 ของการทดลองโดยไม่มีการเติมสารละลายอาหารกุ้งเพิ่มอีก ระบบก็ยังสามารถบำบัดไนเตรดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีอัตราการบำบัดอยู่ระหว่าง  $0.25\text{-}0.3 \text{ mgNO}_3\text{-N/Bioball/day}$

ผลการทดลองในภาพรวม (ภาพที่ 4-16) แสดงให้เห็นว่า การบำบัดไนเตรดที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ โดยปริมาณสารอนินทรีย์ไนโตรเจนรวมในถังปฏิกรณ์มีค่าเปลี่ยนแปลงตามปริมาณการเติมไนเตรดลงในถัง เมื่อไนเตรดลดลงปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจนรวมก็จะลดลงด้วย ซึ่งแสดงว่าไนเตรดถูกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซไนโตรเจนซึ่งจะถูกกำจัดออกจากน้ำขึ้นไปอยู่ที่ส่วนบนของถัง และจะถูกถ่ายออกนอกถังปฏิกรณ์ในระหว่างที่มีการเปิดฝาถังเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำหรือตัวอย่างไบโอบอลไปทำการวิเคราะห์



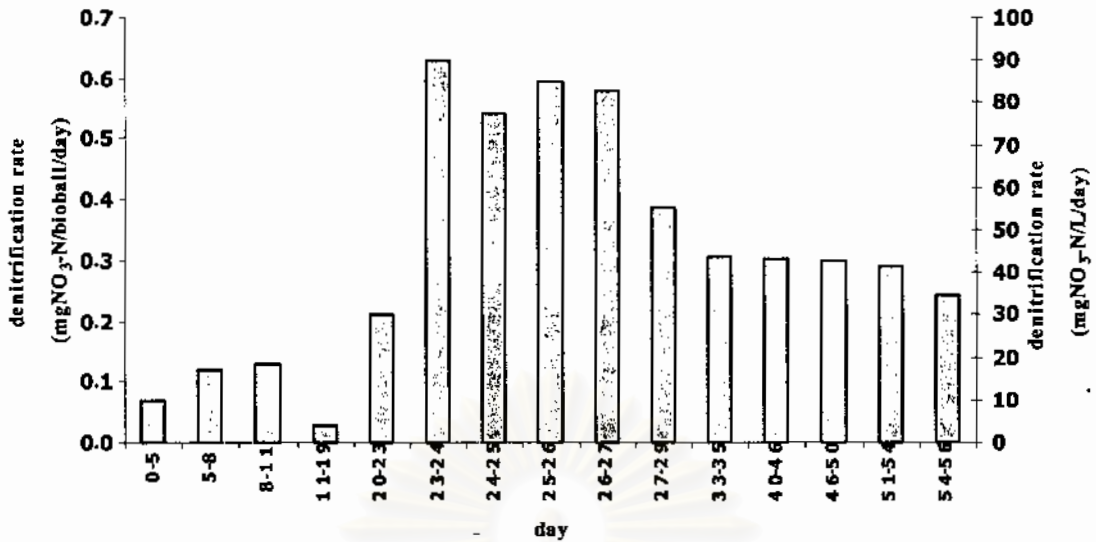
ภาพที่ 4-15 การเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน การทดลองรอบที่ 2 ระยะเวลาการทดลอง 56 วัน ในระหว่างการทดลองได้มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทั้งหมด (water exchange) ในวันที่ 5 และ 8 และมีการเติม  $\text{NaNO}_3$  เข้าในถังปฏิกรณ์ในวันที่ 11, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 35, 40, 46 และ 51 และเติมเมทานอล (MeOH), สารละลายอาหารกุ้ง (sf) และก๊าซไนโตรเจน ( $\text{N}_2$ ) ในระหว่างการทดลอง และมีการเก็บตัวอย่างไบโอบอด (sampling) เพื่อไปวิเคราะห์แบคทีเรียทุก 2 สัปดาห์



ภาพที่ 4-16 การเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน พบว่าการบำบัดไนเตรตที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่สมบูรณ์



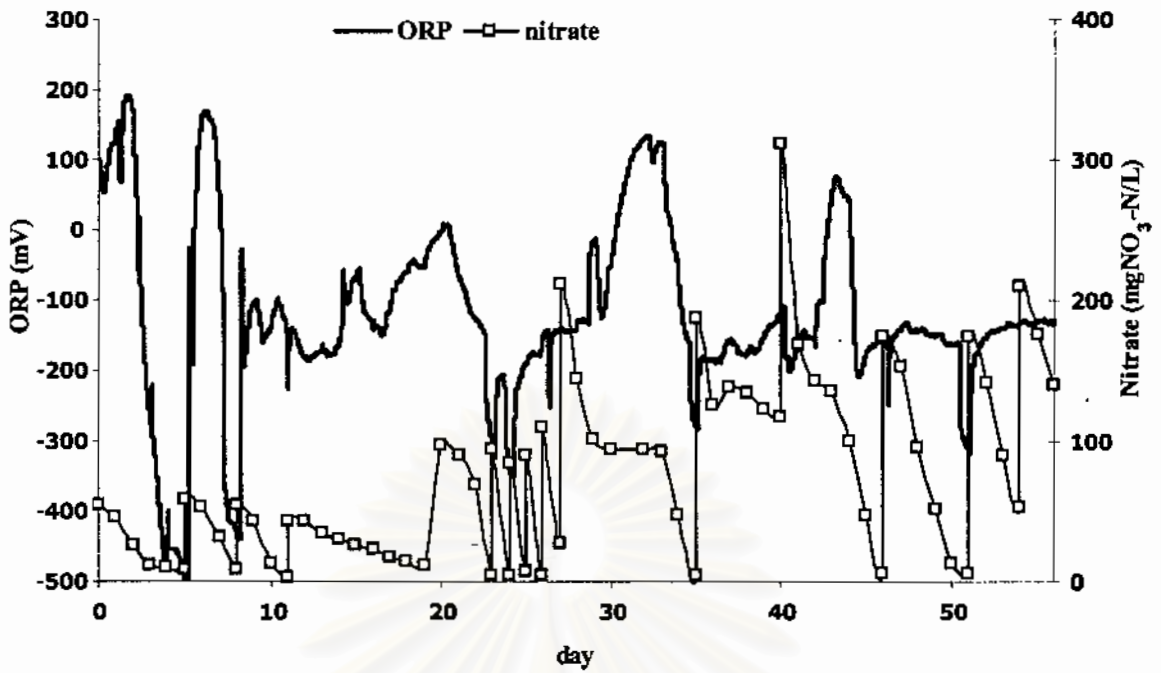
ภาพที่ 4-17 ลักษณะฟองก๊าซไนโตรเจนที่เกิดขึ้นบริเวณผิวของไบโอบอลระหว่างการทดลองในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน



ภาพที่ 4-18 อัตราการเกิดปฏิกิริยาคีโนตริฟิเคชันในถังปฏิกรณ์คีโอโนตริฟิเคชันตลอดระยะเวลาการทดลอง 56 วัน เมื่อคิดเทียบต่อจำนวนไบโอบอล (แกนซ้าย) และเมื่อคิดเทียบกับปริมาตรน้ำในถัง (แกนขวา)

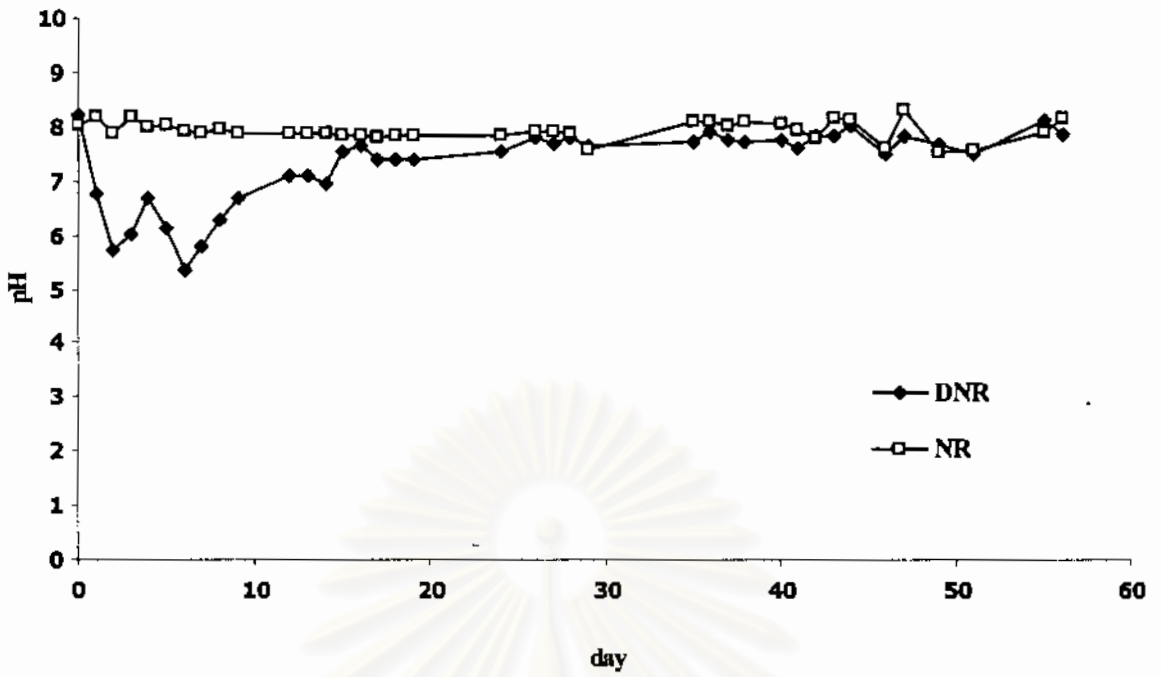
ผลการตรวจวัดค่าโออาร์พี (ORP) ในถังปฏิกรณ์คีโอโนตริฟิเคชันตลอดระยะเวลาการทดลอง 56 วันแสดงในภาพที่ 4-19 จะเห็นได้ว่าช่วงของค่าโออาร์พีที่เกิดปฏิกิริยาคีโนตริฟิเคชันซึ่งจะพบการลดลงของไนเตรต จะอยู่ระหว่าง -100 และ -200 mV โดยในขณะที่เริ่มดำเนินการทดลองในวันที่ 3-5 และวันที่ 7-8 พบว่าค่าโออาร์พีลดลงต่ำกว่า -400 mV เนื่องจากระบบได้กำจัดไนเตรตในน้ำจนหมด ทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ขึ้นจนต้องมีการเปลี่ยนถ่านน้ำในถังปฏิกรณ์ใหม่ทั้งหมด ในขณะที่การเพิ่มของโออาร์พีที่ตรวจพบระหว่างวันที่ 30-33 เป็นเพราะเกิดรูรั่วของถังปฏิกรณ์ทำให้มีออกซิเจนจากภายนอกรั่วไหลเข้าสู่ภายในถัง หลังจากที่ถูกอุดรูรั่วและไล่ออกซิเจนออกด้วยการพ่นก๊าซไนโตรเจนก็พบว่าค่าโออาร์พีกลับลดต่ำลงอยู่ที่ระดับประมาณ -150 mV และเกิดปฏิกิริยาคีโนตริฟิเคชันทำให้ปริมาณไนเตรตลดลง สำหรับการเพิ่มขึ้นของโออาร์พีเป็นช่วงสั้นๆ ในวันอื่นเกิดจากการเปิดฝาถังเพื่อเก็บตัวอย่างไบโอบอล



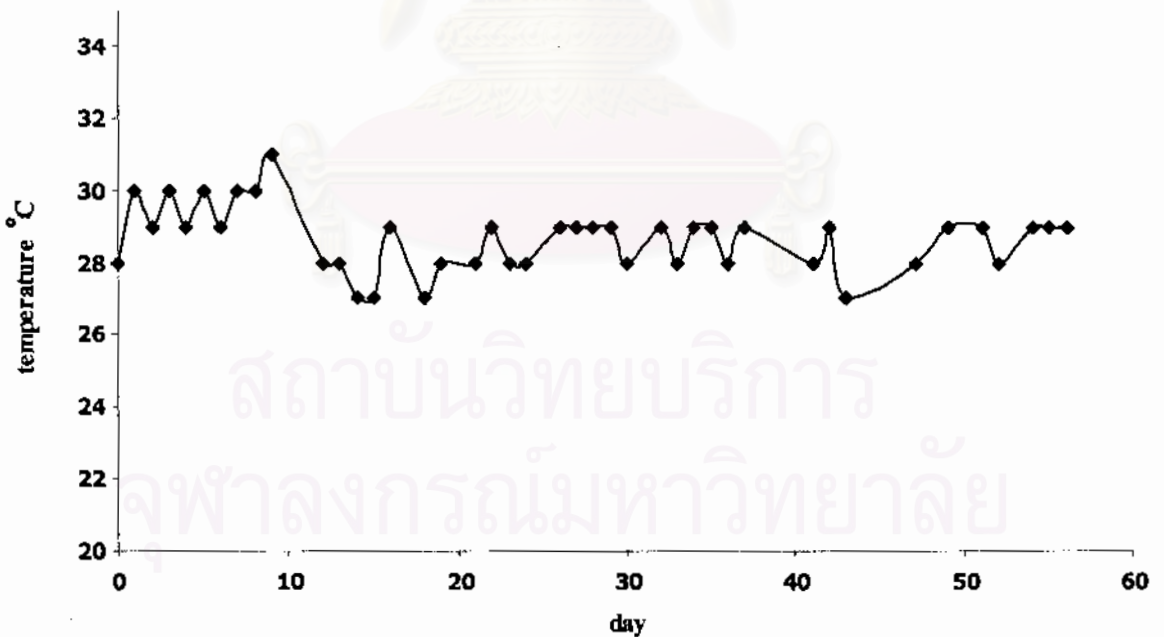


ภาพที่ 4-19 ความสัมพันธ์ระหว่างไออาร์พี (Oxidation-Reduction Potential) กับการบำบัดไนเตรดใน  
 ถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันระหว่างการทดลอง พบว่าช่วงที่ระบบมีการบำบัดไนเตรดค่า  
 ไออาร์พี จะอยู่ระหว่าง -100 mV ถึง -200 mV

ผลการตรวจวัดค่าพีเอชของน้ำในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน  
 แสดงในภาพที่ 4-20 จะเห็นได้ว่าน้ำในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันมีพีเอชลดลงมาอยู่ระหว่าง 5-6  
 ในช่วง 10 วันแรกของการทดลอง ซึ่ง ณ เวลาดังกล่าวระบบได้บำบัดไนเตรดจนหมดและเกิดก๊าซ  
 ไฮโดรเจนซัลไฟด์ขึ้นในถังปฏิกรณ์ แต่ภายหลังจากที่ได้เปลี่ยนถ่ายน้ำในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน  
 ใหม่ และควบคุมปริมาณไนเตรดไม่ให้ลดลงจนหมด ค่าพีเอชของน้ำภายในถังก็กลับมาคงที่อยู่ที่  
 พีเอช 7.5-8 ในขณะที่น้ำในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันมีระดับพีเอชค่อนข้างคงที่อยู่ระหว่าง 7.5-8 ตลอด  
 ระยะเวลาของการทดลอง ส่วนผลการตรวจวัดอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันในภาพที่ 4-21  
 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิในระหว่างการทดลองอยู่ระหว่าง 27-30 °C โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย  $29 \pm 0.9$  °C



ภาพที่ 4-20 ค่าพีเอชของน้ำในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันในระหว่างการทดลองระยะเวลา 56 วัน



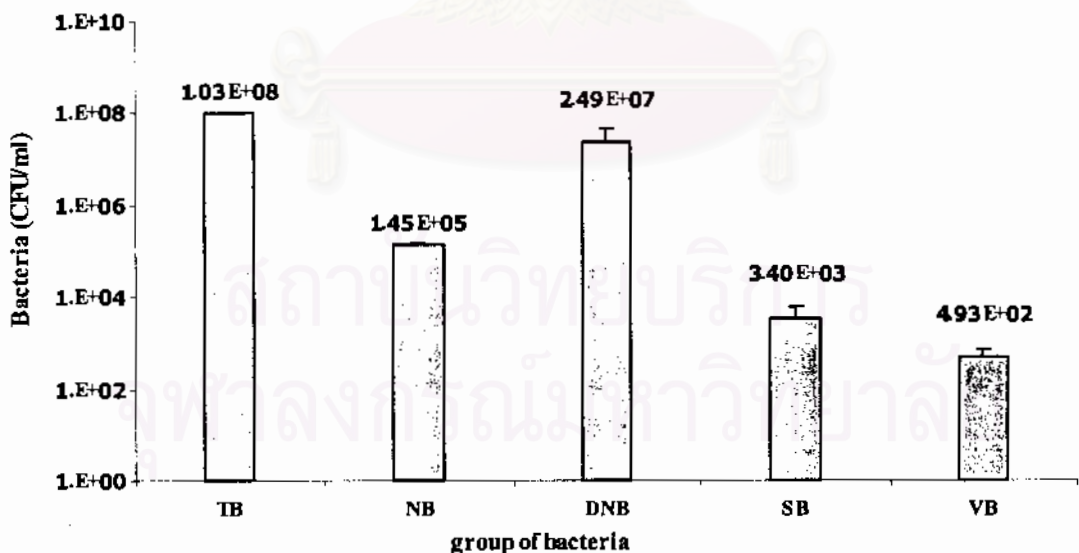
ภาพที่ 4-21 อุณหภูมิของน้ำในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันระหว่างการทดลองระยะเวลา 56 วัน

#### 4.2.3 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพไบโอบอลในถัง ปฏิกรณ์ในตรีฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตรีฟิเคชัน

การศึกษาลักษณะ รูปร่าง ชนิด และปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพไบโอบอลทำได้โดย  
การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ การย้อมสีแกรม  
การส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และการใช้เทคนิค  
PCR-DGGE

##### 4.2.3.1 ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ในตรีฟิเคชันและดีไนตรีฟิเคชันโดย วิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

ผลการนับปริมาณแบคทีเรียในน้ำเสียเริ่มต้นที่ใช้ทดลองในถังปฏิกรณ์ โดยการนับ  
โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ 5 ชนิด แสดงดังภาพที่ 4-22 พบว่าในน้ำทะเลจากบ่อเลี้ยงกุ้ง  
ในโรงเรือนที่นำมาใช้ในการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ทั้งหมด (TB)  
 $1.03 \times 10^8$  CFU/ml โดยเมื่อแยกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะแต่ละชนิดสามารถนับจำนวนแบคทีเรีย  
ได้ดังนี้คือ แบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (NB)  $1.45 \times 10^5$  CFU/ml ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย  
(DNB)  $2.49 \times 10^7$  CFU/ml แบคทีเรียลดซัลเฟต (SB)  $3.40 \times 10^3$  CFU/ml และไวรัสโอ (VB)  $4.93 \times 10^2$   
CFU/ml



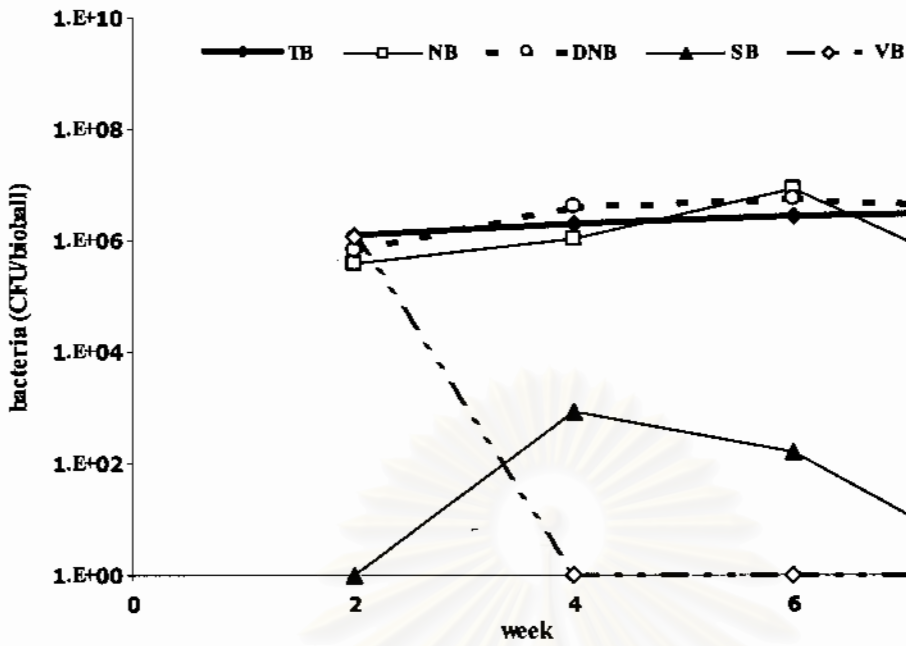
ภาพที่ 4-22 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำทะเลจากบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนที่ใช้สำหรับการทดลองในถัง  
ปฏิกรณ์ โดยการนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะสำหรับแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ  
ทะเล (TB) ไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (NB) ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (DNB) แบคทีเรียลดซัลเฟต  
(SB) และไวรัสโอ (VB)

หลังจากนำน้ำทะเลมาบรรจุในถังปฏิกรณ์ทั้งสองถัง และตุ้มตัวอย่างไบโอบอลเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพทุก 2 สัปดาห์ โดยการนับโคโลนีแบคทีเรียที่แยกมาจากไบโอบอลและเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ 5 ชนิด ให้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-23, 4-24 และ 4-24 โดยในถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันที่มีการพ่นอากาศตลอดเวลาพบว่าแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำทะเล (TB) ไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (NB) และดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (DNB) มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก โดยมีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง  $10^6$ - $10^7$  CFU/bioball ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มไวรัส (VB) ที่ตรวจพบในสัปดาห์ที่สอง มีจำนวนลดลงจนตรวจไม่พบเลยในสัปดาห์ที่สี่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง. และแบคทีเรียลคซัลเฟต (SB) ซึ่งตรวจไม่พบในสัปดาห์ที่สอง มีจำนวนเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 แต่ตรวจไม่พบในสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง อย่างไรก็ตามแบคทีเรียลคซัลเฟตที่ตรวจพบมีความหนาแน่นสูงสุดเพียง  $10^3$  CFU/bioball ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ

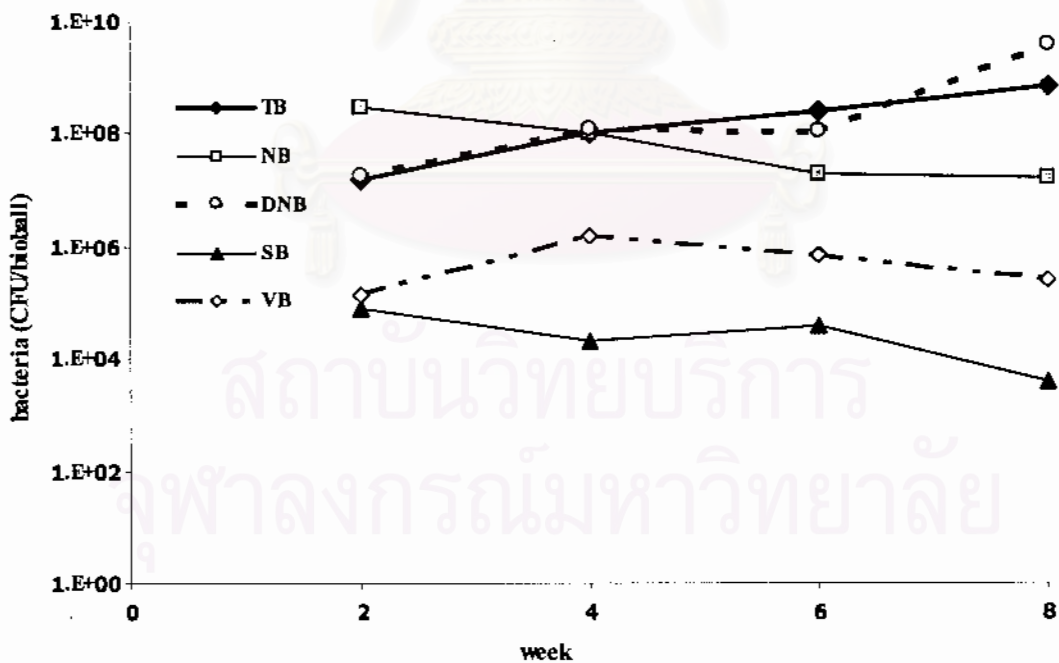
ส่วนผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันที่อยู่ในสถานะไร้ออกซิเจนตลอดการทดลอง 8 สัปดาห์ในภาพที่ 4-24 แสดงให้เห็นว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำทะเล (TB) และดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (DNB) มีการเพิ่มจำนวนขึ้นจากประมาณ  $10^7$  CFU/bioball ในสัปดาห์ที่ 2 เป็น  $10^8$ - $10^9$  CFU/bioball ในสัปดาห์ที่ 8 ในขณะที่ไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (NB) มีการลดลงจาก  $10^8$  โคโลนีต่อไบโอบอล ลดเหลือ  $10^7$  CFU/bioball ในสัปดาห์ที่ 8 ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มไวรัสและแบคทีเรียลคซัลเฟตไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง  $10^5$ - $10^6$  CFU/bioball ตลอดระยะเวลาการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาพที่ 4-23 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่แยกมาจากไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ในตรีฟิเคชัน (มีการฟ่นอากาศตลอดเวลา) โดยทำการตรวจวัดทุก 2 สัปดาห์ ด้วยวิธีการนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะสำหรับแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำทะเล (TB) ในตรีฟายอิงแบคทีเรีย (NB) คีโนตรีฟายอิงแบคทีเรีย (DNB) แบคทีเรียลคซัลเฟต (SB) และไวรัสไอ (VB)



ภาพที่ 4-24 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่แยกมาจากไบโอบอลในถังปฏิกรณ์คีโนตรีฟิเคชัน (สถานะไร้ออกซิเจน) โดยทำการตรวจวัดทุก 2 สัปดาห์ ด้วยวิธีการนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะสำหรับแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำทะเล (TB) ในตรีฟายอิงแบคทีเรีย (NB) คีโนตรีฟายอิงแบคทีเรีย (DNB) แบคทีเรียลคซัลเฟต (SB) และไวรัสไอ (VB)

ลักษณะรูปร่างโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกมาจากไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ในครีทีเคชันและคีโนครีทีเคชันบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะแต่ละชนิดแสดงในภาพที่ 4-25 – 4-26 พบว่าลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียจากไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ในครีทีเคชันและคีโนครีทีเคชันที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) มีลักษณะคล้ายกัน (ภาพที่ 4-25) โดยมีโคโลนีหลายรูปแบบเช่น โคโลนีมันวาวสีชมพูอมส้มลักษณะโค้งนูน (Convex) โคโลนีสีขาวขุ่นแบน (Raised) ขนาดใหญ่ โคโลนีสีเหลือง โคโลนีสีน้ำตาล โคโลนีสีขาวลักษณะนูนตรงกลาง (Umbonate) และ โคโลนีมันวาวสีส้มลักษณะโค้งนูน (Convex)

ลักษณะโคโลนีของคีโนครีฟายอิงแบคทีเรีย (DNB) จากไบโอบอลที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมไนเตรต (Nitrate medium) ในสภาวะไร้ออกซิเจนคั่งแสดงในภาพที่ 4-26 มีลักษณะโคโลนีคล้ายกับที่พบเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ส่วนไนครีฟายอิงแบคทีเรีย (NB) ที่เติบโตบนอาหารเพาะเชื้อ Ammonia oxidizing medium โคโลนีที่พบมีลักษณะบางสีขาว และมีอัตราการเติบโตช้าโดยจะต้องใช้เวลาประมาณ 5 วัน โคโลนีของแบคทีเรียจึงจะเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีแดงเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดการใช้แอมโมเนียในอาหาร ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียลดซัลเฟต (SB) บน TSI มีสีดำเนื่องจากการสร้าง  $H_2S$  ของโคโลนี ส่วน vibrio (VB) มีโคโลนี สีเขียวเป็นมัน สีเหลืองเป็นมันวาว และสีน้ำตาลอ่อน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

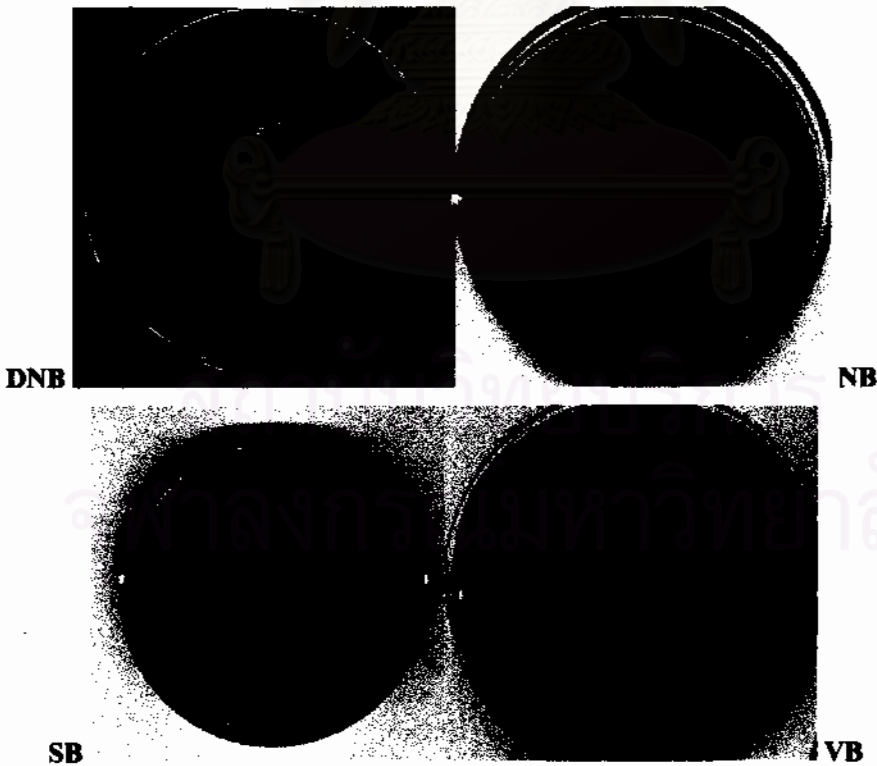


NR

DNR



ภาพที่ 4-25 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในน้ำทะเล (TB) ที่เค็มโคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ภาพซ้าย (NR) เป็นแบคทีเรียจากไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ในครีทีเคชั่น ภาพขวา (DNR) เป็นแบคทีเรียจากไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ดีในครีทีเคชั่น ภาพล่างเป็นภาพขยายของโคโลนีแบคทีเรียชนิดต่างๆ



DNB

NB

SB

VB

ภาพที่ 4-26 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพถังปฏิกรณ์ในครีทีเคชั่นและดีในครีทีเคชั่นที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ได้แก่ ดีไนโตรฟายอิงแบคทีเรีย (DNB) ไนโตรฟายอิงแบคทีเรีย (NB) แบคทีเรียลดซัลเฟต (SB) และไวรัส (VB)

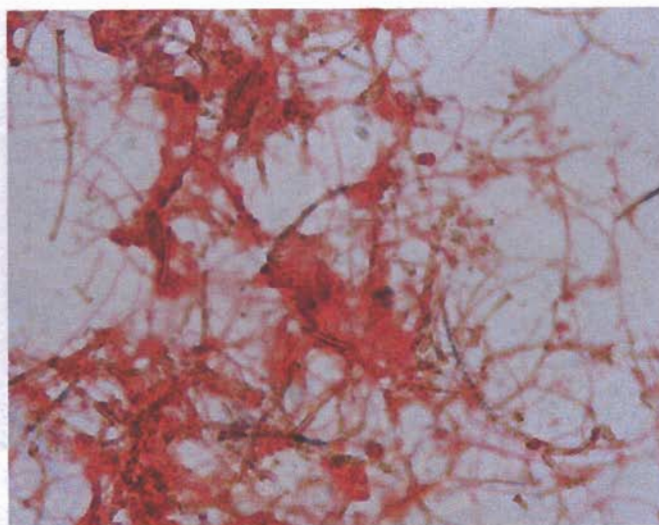
#### 4.2.3.2 การศึกษาพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ ในครีฟิเคชันและถังปฏิกรณ์คิโนครีฟิเคชันโดยการย้อมสีแกรม

ผลการย้อมสีแกรม (Gram stain) ของแบคทีเรียที่แยกออกจากไบโอบอล โดยวิธี Sonication พบว่าแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันมีลักษณะต่างจากแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์คิโนครีฟิเคชัน โดยแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชัน (ภาพที่ 4-27) ที่เก็บตัวอย่างในตอนเริ่มต้นการทดลอง สัปดาห์ที่ 6 และสัปดาห์ที่ 8 มีลักษณะคล้ายกันคือส่วนใหญ่เป็นเส้นใย เกาะกันเป็นกลุ่มคิสติแดง ส่วนแบคทีเรียจากไบโอบอลในถังคิโนครีฟิเคชัน (ภาพที่ 4-28) ในเริ่มต้นการทดลองพบแบคทีเรียรูปแท่งและแบบเส้นสายคิสติแดง ในสัปดาห์ที่ 6 นอกจากพบเซลล์แบคทีเรียแล้วก็ยังพบจุลินทรีย์รูปกระสวยไม่คิสติ และในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งเป็นสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง พบแบคทีเรียและจุลินทรีย์รูปกระสวยเหมือนกับที่พบในสัปดาห์ที่ 6 และยังพบจุลินทรีย์ที่มีลักษณะรวมเป็นกลุ่มก้อนรูปทรงกลม

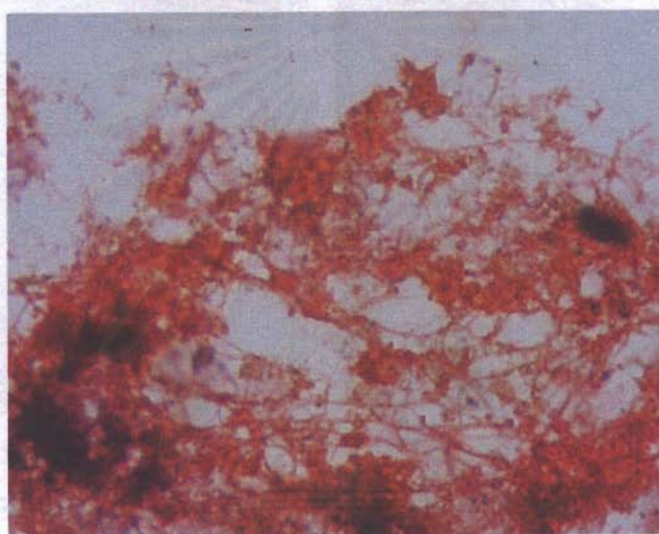


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

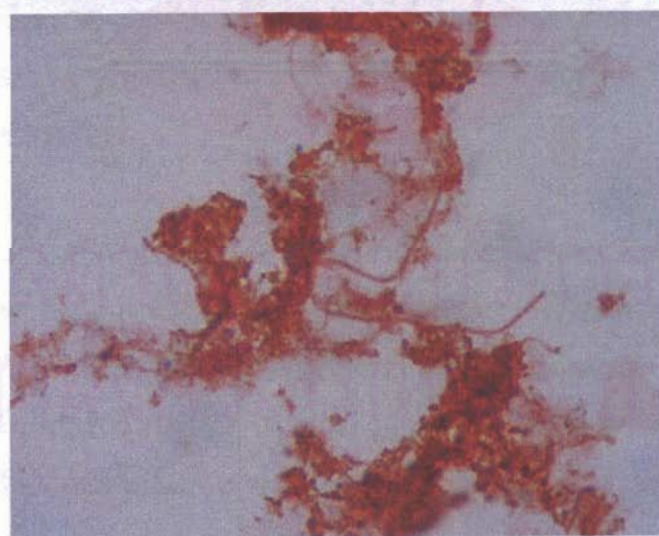




(N0)

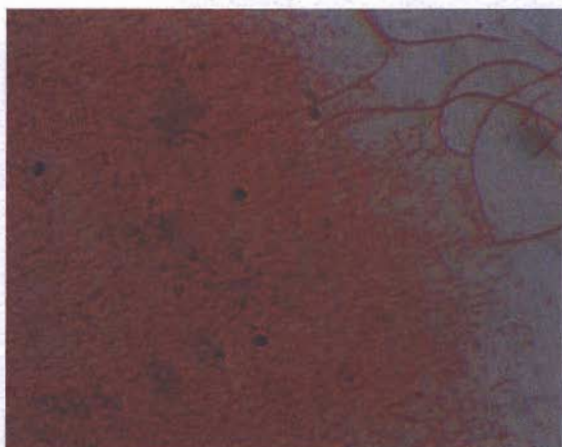


(N6)

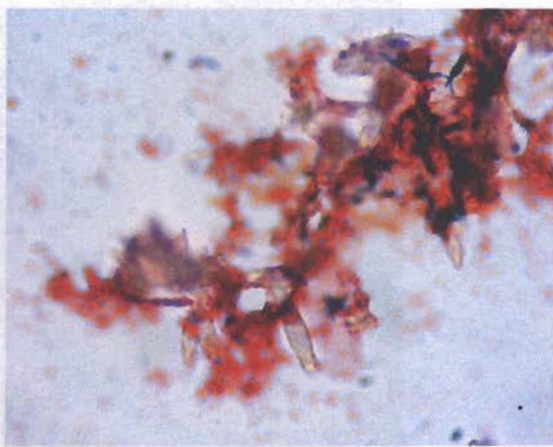


(N8)

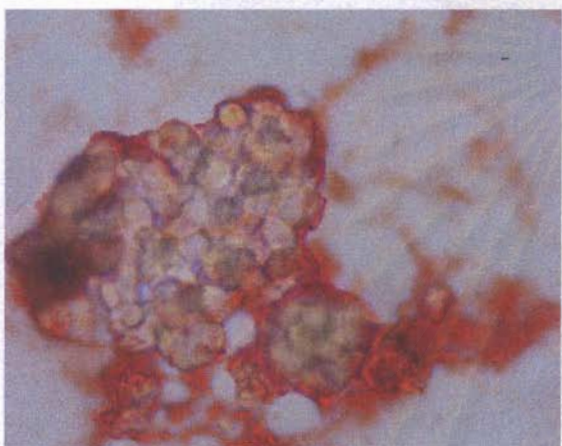
ภาพที่ 4-27 แบคทีเรียที่แยกได้จากไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ในตรีฟิเคชัน เริ่มต้นการทดลอง (N0), สัปดาห์ที่ 6 (N6) และสัปดาห์ที่ 8 (N8) ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุกำลังขยาย 60 เท่า



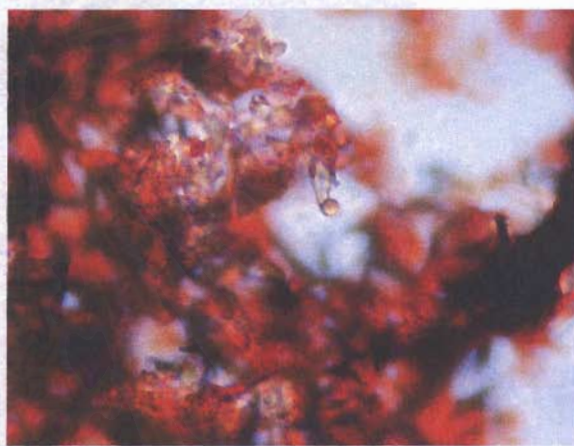
(D0)



(D6)



(D8)



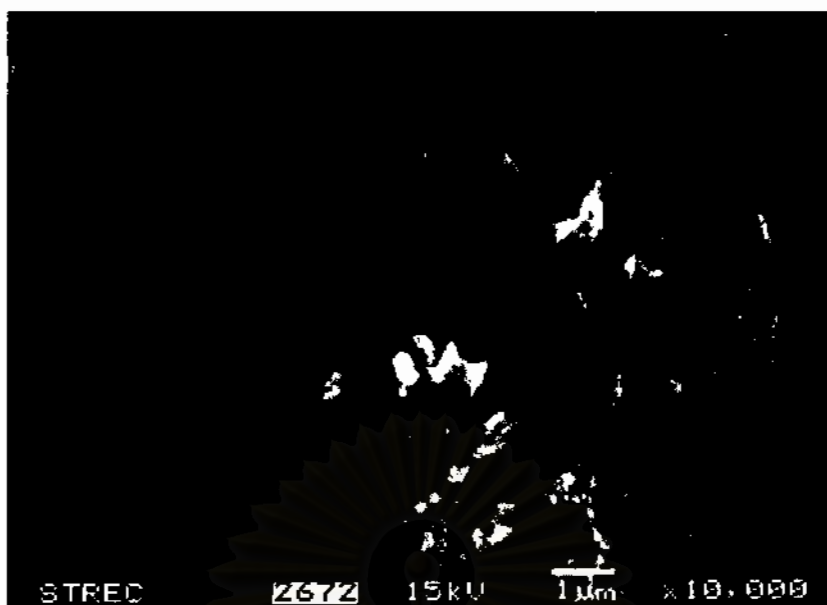
(D8)

ภาพที่ 4-28 แบคทีเรียและจุลินทรีย์จากไบโอบอลในถังปฏิกรณ์คิงในตรีฟิเคชันในเริ่มต้นการทดลอง (N0), สัปดาห์ที่ 6 (D6) และสัปดาห์ที่ 8 (D8) ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า ในสัปดาห์ที่ 6 จะพบจุลินทรีย์รูปกระสวยและในสัปดาห์ที่ 8 พบจุลินทรีย์เกาะเป็นกลุ่ม ลักษณะเป็นรูปทรงกลม

#### 4.2.3.3 การศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่เกาะบนพื้นผิวไบโอบอลในถังปฏิกรณ์คิงและถังปฏิกรณ์คิงในตรีฟิเคชันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน

ภาพถ่ายของแบคทีเรียในน้ำทะเลจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในโรงเรือนที่ใช้เป็นน้ำตั้งต้นก่อนนำมาใช้ทดลองปริมาตร 1 L นำมากรองด้วยแผ่นกรองขนาด  $0.45 \mu\text{m}$  พบแบคทีเรียหลายชนิด ทั้งที่เป็นรูปแท่ง และที่เป็นเส้นสาย ดังแสดงในภาพที่ 4-29





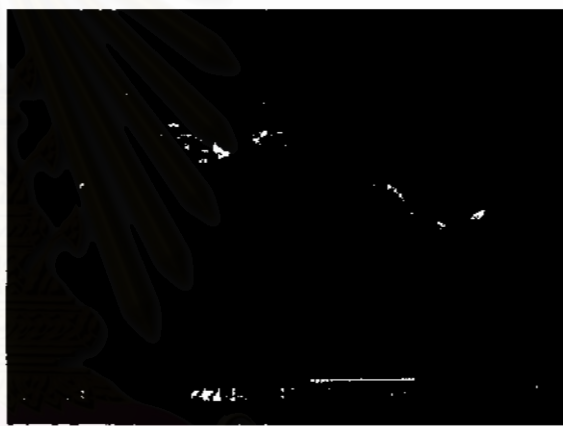
ภาพที่ 4-29 ภาพถ่ายของแบคทีเรียในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนที่นำมาใช้เป็นน้ำเริ่มต้นในการทดลอง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 10,000 เท่า

ภาพของแบคทีเรียบนพื้นผิวของไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ในตรีพีเคชัน (NR) ในสัปดาห์ที่ 2, 4, 6 และ 8 แสดงในภาพที่ 4-30, 4-31, 4-32 และ 4-33 ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 2 โดยพบแบคทีเรียที่มีรูปร่างที่แตกต่างกันหลายชนิด และในสัปดาห์ที่ 8 จะพบการเกาะกันเป็นกลุ่มของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น โดยมีแบคทีเรียขนาดเล็กยึดติดอยู่กับแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4-30 จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของใบโอบอลจากถังปฏิบัติการไนตริฟิเคชัน (NR) ในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง

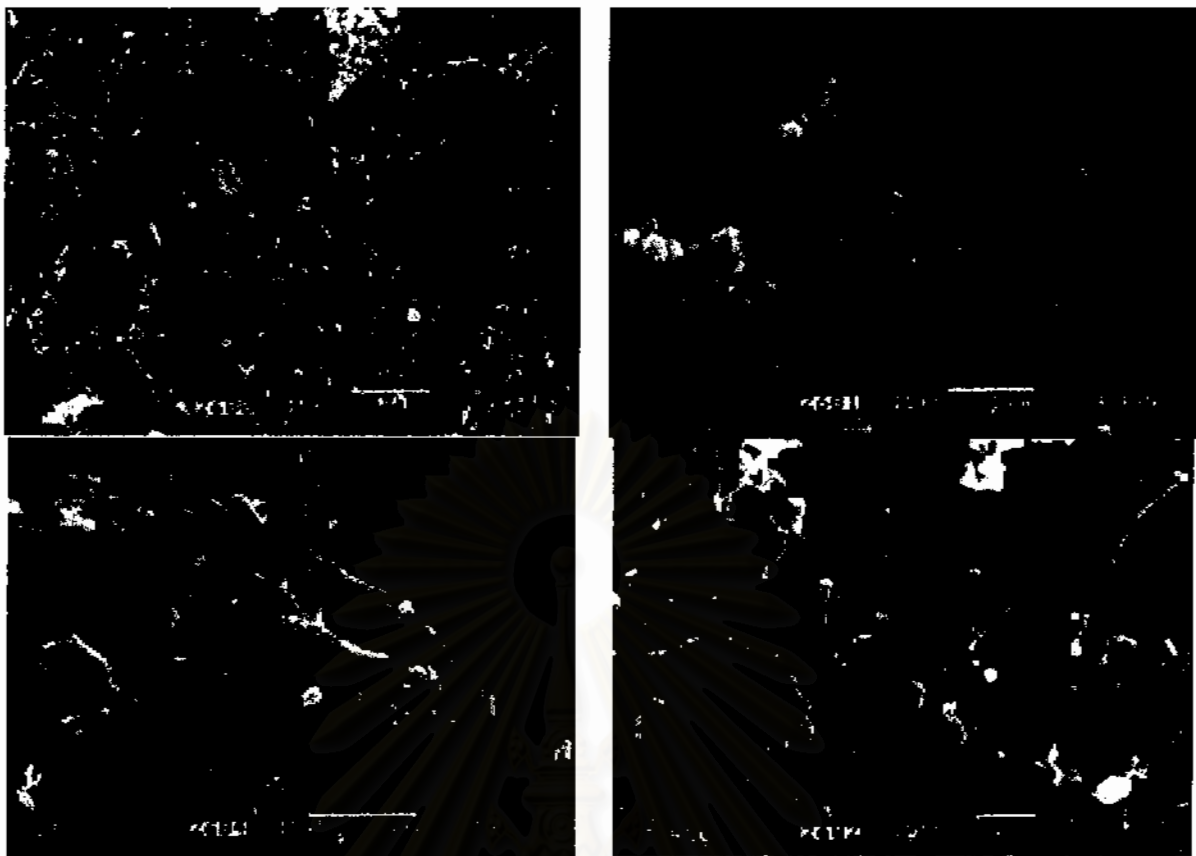


ภาพที่ 4-31 จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของใบโอบอลจากถังปฏิบัติการไนตริฟิเคชัน (NR) ในสัปดาห์ที่ 4



ภาพที่ 4-32 จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของใบโอบอลจากถังปฏิบัติการไนตริฟิเคชัน (NR) ในสัปดาห์ที่ 6





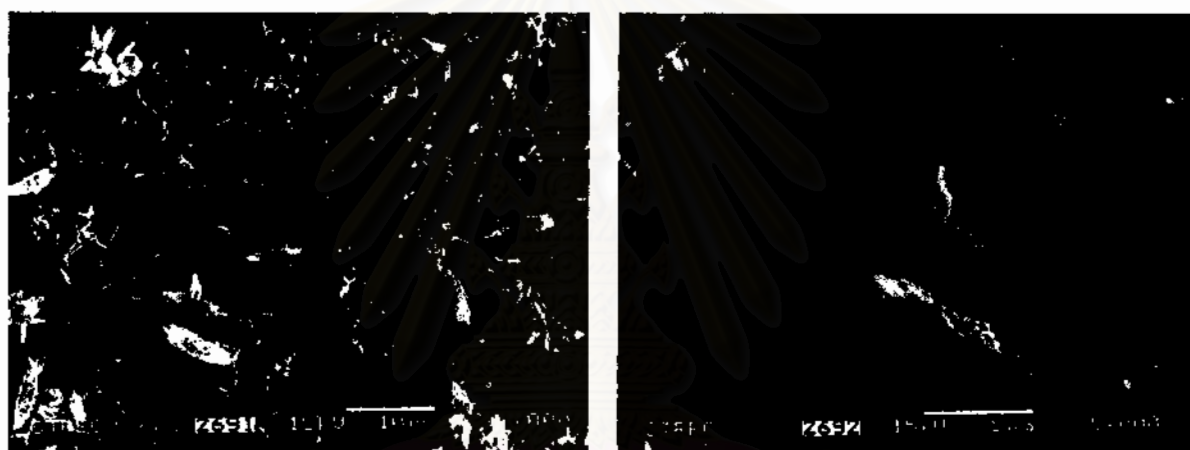
ภาพที่ 4-33 จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR) ในสัปดาห์ที่ 8

จากภาพการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนพื้นผิวไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน ทุก 2 สัปดาห์ของการทดลองพบลักษณะจุลินทรีย์ในน้ำกับจุลินทรีย์ที่เกาะบนไบโอบอลมีลักษณะคล้ายกันซึ่งมีรูปร่างหลายชนิด และในระหว่างการทดลองมีจุลินทรีย์เกาะกับพื้นผิวไบโอบอลเพิ่มมากขึ้น โดยเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดิมแต่มีการเกาะกันเป็นกลุ่มมากขึ้น

ภาพถ่ายของแบคทีเรียบนพื้นผิวของไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ในสัปดาห์ที่ 2, 4, 6, และ 8 แสดงในภาพที่ 4-34, 4-35, 4-36 และ 4-37 ตามลำดับ พบว่าลักษณะของแบคทีเรียมีความแตกต่างจากแบคทีเรียที่พบในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน ในสัปดาห์ที่ 2 พบลักษณะจุลินทรีย์หลายแบบเช่น ท่อนยาว แบบท่อนกลม แบบเส้นใยขนาดเล็ก โดยเกาะกันเป็นกลุ่มกระจายบนพื้นผิวไบโอบอล และพบแบคทีเรียที่มีการรวมกลุ่มกันเป็นรูปกระสวยในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 และยังพบจุลินทรีย์ไม่ทราบชนิดที่มีลักษณะเป็นรูปกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ  $10\ \mu\text{m}$  ซึ่งเป็นขนาดใหญ่กว่าเซลล์แบคทีเรียมาก

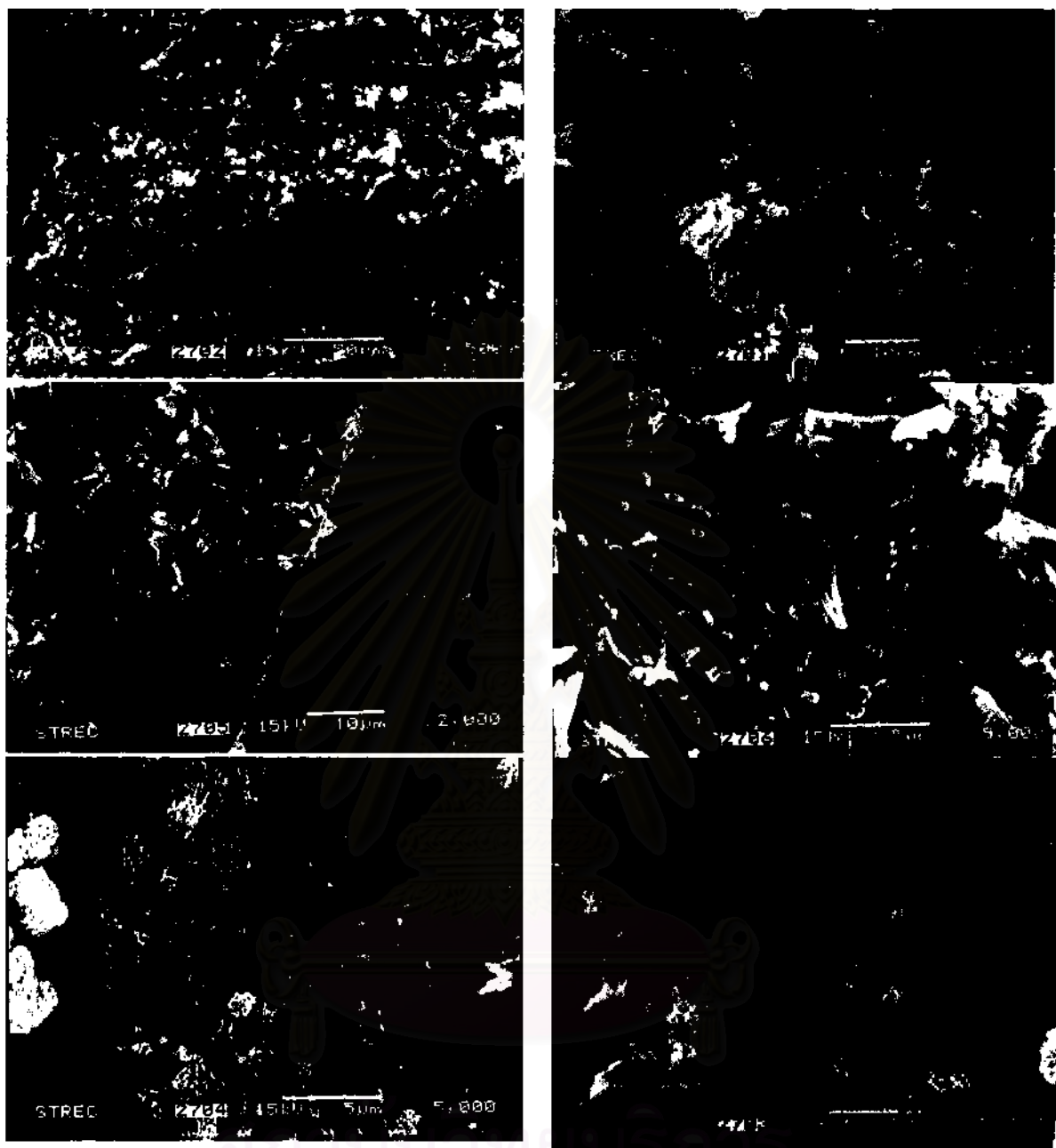


ภาพที่ 4-34 จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) สัปดาห์ที่ 2

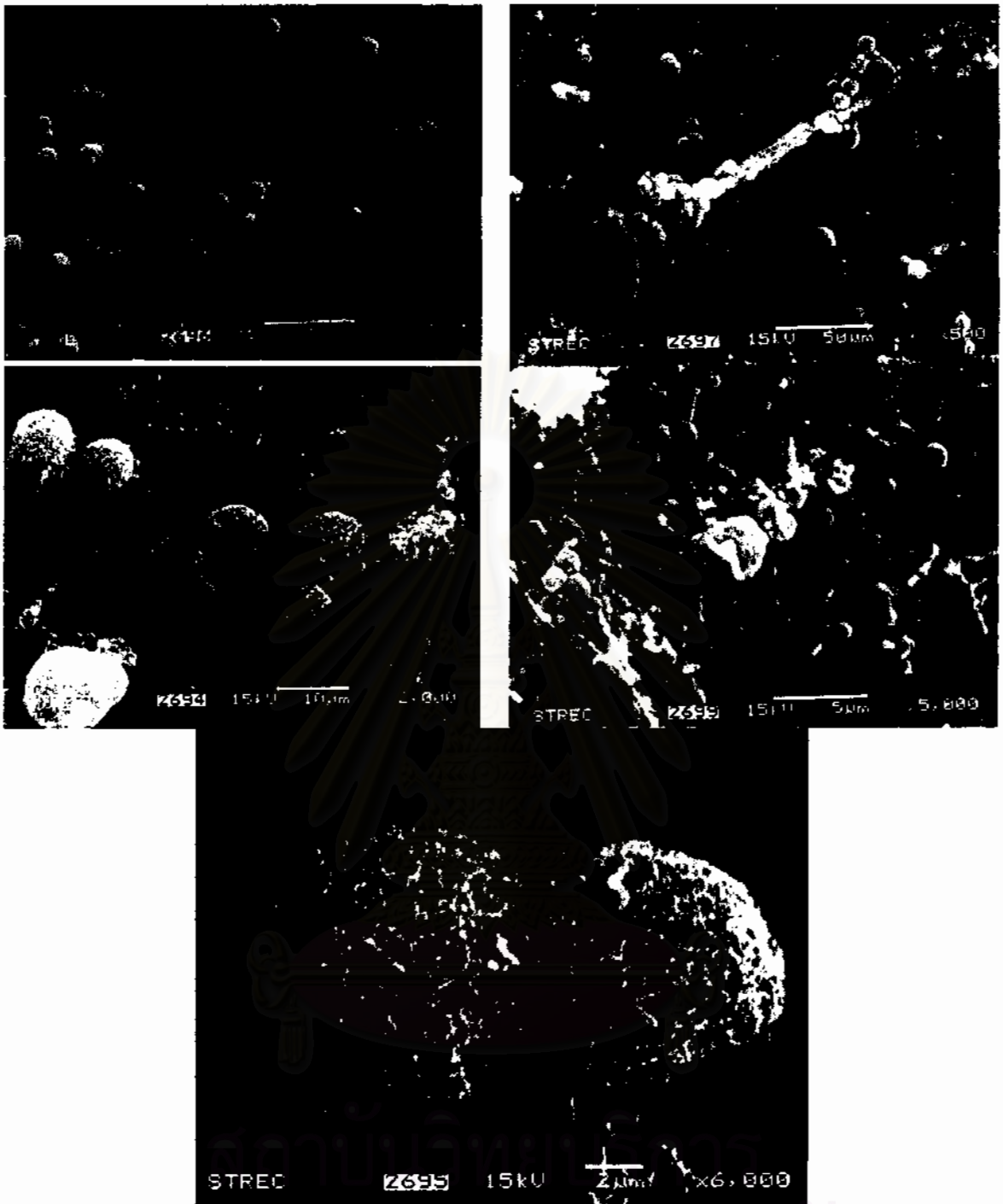


ภาพที่ 4-35 จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4-36 จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ใน  
สัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง

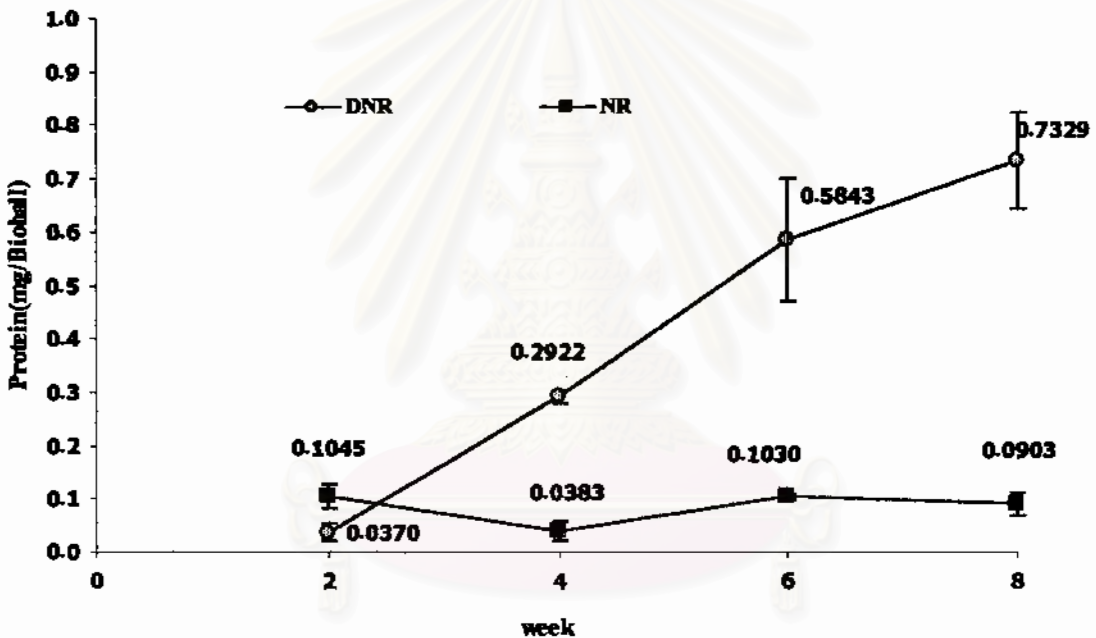


ภาพที่ 4-37 จุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวของ ไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) ใน สัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง พบจุลินทรีย์รูปร่างกลมขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย ที่ผิวมี ลักษณะเหมือนเส้นใย



#### 4.2.3.4 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนของแบคทีเรียในไบโอบอดจาก ถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน

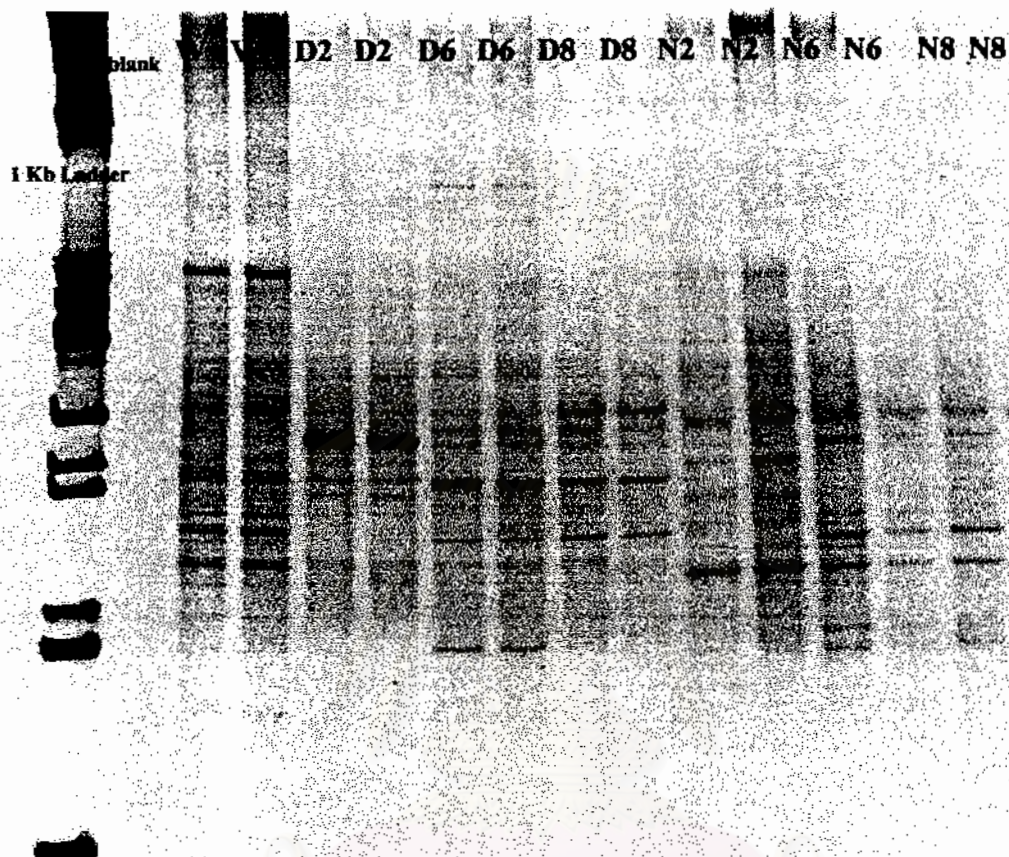
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของไบโอฟิล์มด้วยวิธี Lowry ทุก 2 สัปดาห์ ตลอดการทดลอง ให้ผลดังภาพที่ 4-38 พบว่าปริมาณโปรตีนในตัวอย่างชีวภาพจากถังปฏิกรณ์ ไนตริฟิเคชันไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างชีวภาพจากถังปฏิกรณ์ ดีไนตริฟิเคชันมีการเพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองไบโอฟิล์มจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริ ฟิเคชันมีปริมาณ โปรตีนเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เท่าตัว



ภาพที่ 4-38 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ โปรตีนของ ไบ โอฟิล์มจากไบ โอบอดในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเค  
ชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน

#### 4.2.3.5 การเปลี่ยนแปลงประชาคมและชนิดของแบคทีเรียในไบโอบอดจากถัง ปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE

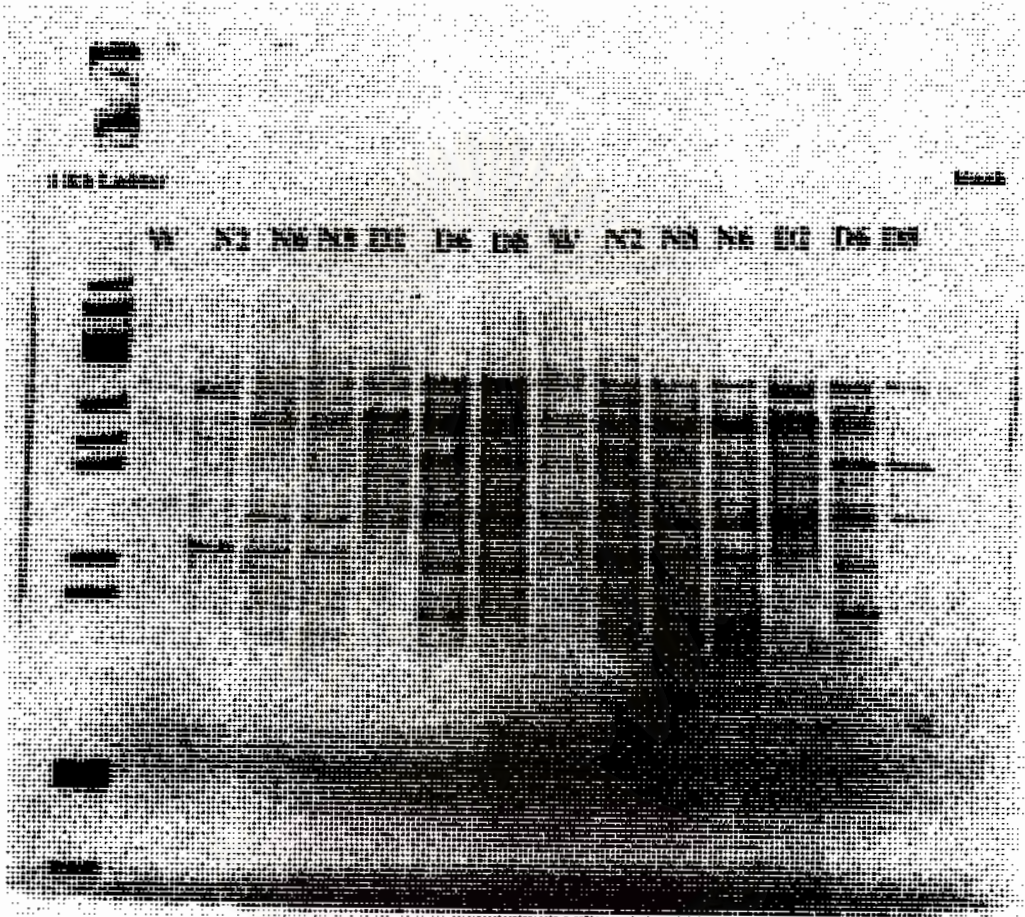
จากการสกัด 16S rDNA ของแบคทีเรียจากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งที่นำมาใช้เป็น  
น้ำเริ่มต้นในการทดลอง และจากตัวอย่างไบโอบอดจำนวน 20 ลูกจากถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถัง  
ปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันทุก 2 สัปดาห์นำมาเพิ่มปริมาณและแยกด้วยเทคนิค DGGE (วิธีการทดลองใน  
หัวข้อ 3.5.4) จำนวน 2 ครั้ง (2 ซ้ำ) ได้ผลดังภาพที่ 4-39 และ 4-40



ภาพที่ 4-39 DGGE profile (ครั้งที่ 1) ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียในน้ำเริ่มต้นที่ใช้ทดลอง (W) ของแบคทีเรียบนใบโอบอลจากดงปฏิกรณ์ดีโนตริไฟเคชันในสัปดาห์ที่ 2, 6 และ 8 (D2) (D6) (D8) และของแบคทีเรียบนใบโอบอลจากดงปฏิกรณ์โนตริไฟเคชันในสัปดาห์ที่ 2, 6 และ 8 (N2) (N6) (N8) คั่วอย่างละ 2 ชั่วโมงใน 8% polyacrylamide gel ที่มี 25% - 60% urea denaturant

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





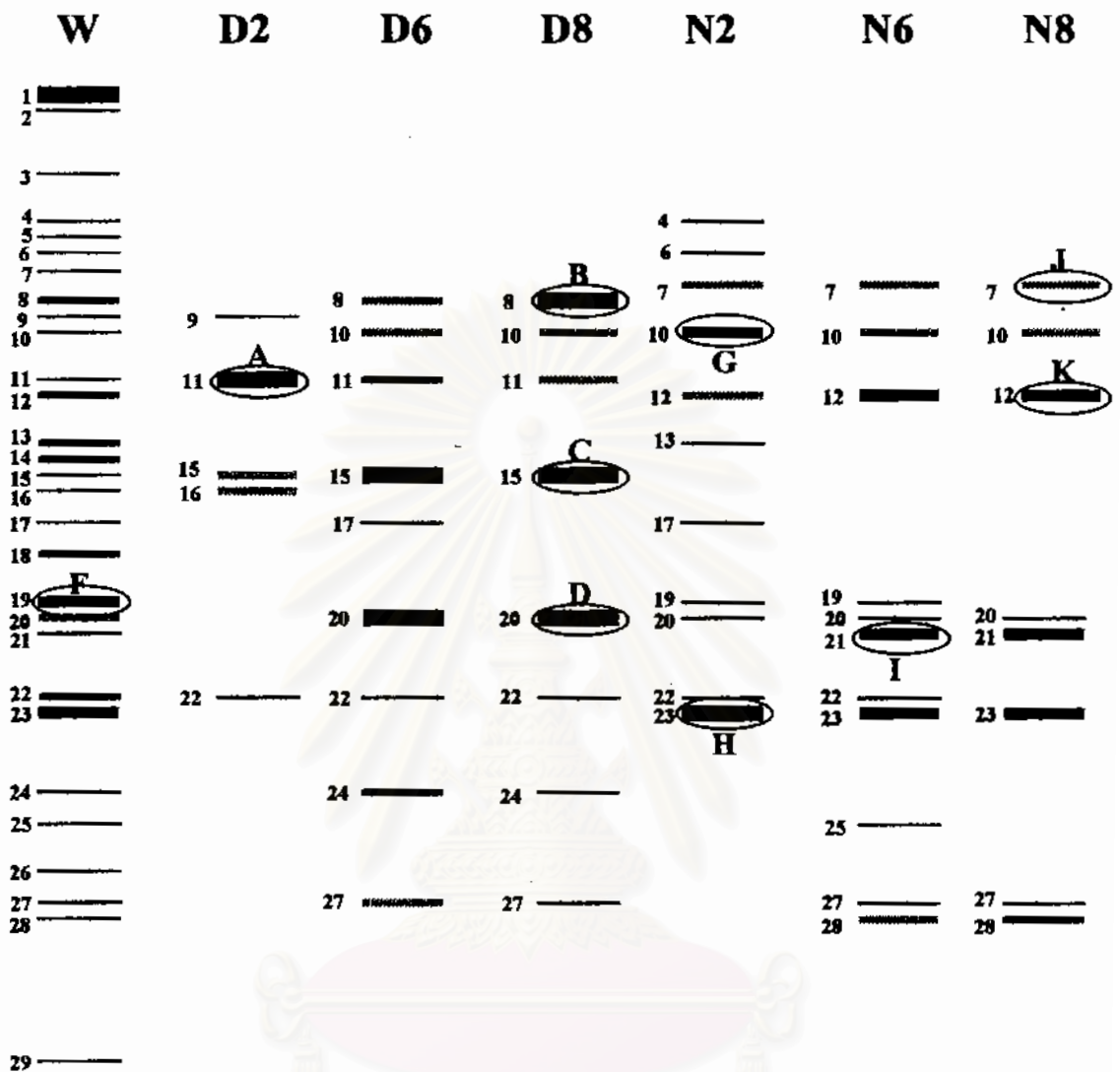
ภาพที่ 4-40 DGGE profile (ครั้งที่ 2) ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียในน้ำเริ่มต้นที่ใช้ทดลอง (W) ของแบคทีเรียบนไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันในสัปดาห์ที่ 2, 6 และ 8 (D2) (D6) (D8) และของแบคทีเรียบนไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันในสัปดาห์ที่ 2, 6 และ 8 (N2) (N6) (N8) ตัวอย่างละ 2 ซ้ำใน 8% polyacrylamide gel ที่มี 25% - 60% urea denaturant

จากผลการวิเคราะห์ PCR-DGGE ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันและดีในครีฟิเคชัน (ภาพที่ 4-39 และ 4-40) นำมาประมวลเป็นภาพที่ 4-41 จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบชนิดของแบคทีเรียที่พบบนตัวอย่างชีวภาพจะมีจำนวนชนิดน้อยกว่าแบคทีเรียที่พบในน้ำ (W) ซึ่งมีแถบ 16S rDNA แบคทีเรีย อย่างน้อย 29 แถบ โดยพบการเปลี่ยนแปลงชนิดของแบคทีเรียตามระยะเวลาของการทดลอง ซึ่งจำนวนชนิดของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์จะเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 6 เนื่องจากองค์ประกอบชนิดของแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 มีลักษณะคล้ายกัน และยังพบว่าแบคทีเรียที่เป็นชนิดเด่นบนไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์ทั้งสองถังมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยในสัปดาห์ที่ 8 พบแถบสีเข้มของแบคทีเรียจากถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันจำนวน 8 แถบ และแถบสีเข้มของแบคทีเรียจากถังปฏิกรณ์ดีในครีฟิเคชันจำนวน 8 แถบ โดยแถบสีเข้มที่พบเฉพาะในถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันมีจำนวน 5 แถบ ได้แก่แถบหมายเลข 7, 12, 21, 23 และ 28 แถบสีเข้มที่พบเฉพาะในถังปฏิกรณ์ดีในครีฟิเคชันมีจำนวน 5 แถบ ได้แก่แถบหมายเลข 8, 11, 15, 22 และ 24 ส่วนแถบสีเข้มที่พบในถังปฏิกรณ์ทั้งสองถังมีจำนวน 3 แถบ ได้แก่แถบหมายเลข 10, 20 และ 27



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาพที่ 4-41 DGGE profile ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียในน้ำเริ่มต้นที่ใช้ทดลอง (W) ของแบคทีเรียบนไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์คิงในสัปดาห์ที่ 2, 6 และ 8 (D2) (D6) (D8) และของแบคทีเรียบนไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์คิงในสัปดาห์ที่ 2, 6 และ 8 (N2) (N6) (N8) ประมวลจากผล DGGE ในภาพที่ 4-39 และ 4-40 โดยแถบสีเอนเอที่แสดงด้วยตัวอักษร A-K คือแถบสีเอนเอที่เลือกเพื่อนำไปหาลำดับเบส

ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA ที่แยกได้จากน้ำเริ่มต้นและจากแบคทีเรียบนไบโอบอลจากถังปฏิกรณ์คิงและถังปฏิกรณ์คิงที่แสดงไว้ด้วยตัวอักษร A-K ในภาพที่ 4-41 และนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank, EMBL, DDBJ, PDB โดยใช้โปรแกรม Blastn ของ National Center for Biotechnology Information ได้ผล



การจัดเรียงหน้า  
ที่ต้นฉบับมีบางหน้า  
ขาดหายไป

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียในตารางที่ 4-3 เมื่อนำมาประมวลเข้ากับผลการวิเคราะห์ DGGE ในภาพที่ 4-41 สามารถสรุปตารางการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ไนตริไฟเคชันและในถังปฏิกรณ์ดีไนตริไฟเคชันได้ดังตารางที่ 4-4 และ 4-5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-4 การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่เกาะอยู่บนไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริไฟเคชัน

ชื่อแบคทีเรียในถัง NR		ปริมาณความเข้มของ DGGE band			
ชนิดที่	ชื่อแบคทีเรีย	น้ำเริ่มต้น	ไบโอบอล		
			สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
1	Unidentified	+++	-	-	-
7(J)	Uncultured soil bacterium	++	+	+	++
8(B)	<i>Pseudomonas</i> sp. หรือ <i>Colwellia</i> sp.	++	-	-	-
10(G)	CFB group bacterium	+	++	+	+
11(A)	Bacteroidetes bacterium	+	-	-	-
12(K)	<i>Methylobacterium</i> sp.	++	+	+	++
13	Unidentified	+	+	-	-
15(C)	<i>Desulfobulbus</i> sp.	+	-	-	-
17	Unidentified	+	+	-	-
18	Unknown	++	-	-	-
19(F)	<i>Roseobacter</i> sp.	+++	+	+	-
20(D)	Unidentified	+++	-	-	-
21(I)	Uncultured Banisveld landfill bacterium	+	-	++	++
22	Unidentified	++	+	+	-
23(H)	Alpha-proteobacterium PWB3	++	+++	++	++
24	Unidentified	+	-	-	-
27	Unidentified	+	-	+	+

ตารางที่ 4-5 การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่เกาะอยู่บนไบโอบอลในถังปฏิกรณ์  
ดีไนตริฟิเคชัน

เชื้อแบคทีเรียในถัง DNR		ปริมาณความเข้มของ DGGE band			
ชนิดที่	ชื่อแบคทีเรีย	น้ำเริ่มต้น	ไบโอบอล		
			สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
1	Unidentified	+++	-	-	-
7(J)	Uncultured soil bacterium	++	-	-	-
8(B)	<i>Pseudomonas</i> sp. หรือ <i>Colwellia</i> sp.	++	-	++	+++
10(G)	CFB group bacterium	+	-	+	+
11(A)	Bacteroidetes bacterium	+	+++	+	+
12(K)	<i>Methylobacterium</i> sp.	++	-	-	-
13	Unidentified	+	-	-	-
15(C)	<i>Desulfobulbus</i> sp.	+	++	+++	+++
17	Unidentified	+	-	+	-
18	Unidentified	++	-	-	-
19(F)	<i>Roseobacter</i> sp.	+++	-	-	-
20(D)	Unidentified	+++	-	++	++
21(I)	Uncultured Banisveld landfill bacterium	+	-	-	-
22	Unidentified	++	+	+	+
23(H)	Alpha-proteobacterium PWB3	+++	-	-	-
24	Unidentified	+	-	++	+
27	Unidentified	+	-	++	+



จากผลการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่เกาะอยู่บนใบไอบอลใน  
 ดั่งปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชันและดีไนโตรฟิเคชันตารางที่ 4-4 และ 4-5 จะพบว่าแบคทีเรียชนิดเด่นที่พบใน  
 ฟิล์มชีวภาพจากดั่งปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชันซึ่งมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาไนโตรฟิเคชัน ได้แก่ *Cytophaga-  
 Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group bacterium, Alpha-proteobacterium, Uncultured soil  
 bacterium, *Methylobacterium* sp. และ Uncultured Banisveld landfill bacterium ส่วนแบคทีเรียชนิด  
 เค้นที่พบในฟิล์มชีวภาพจากดั่งปฏิกรณ์ดีไนโตรฟิเคชันซึ่งมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาคีไนโตรฟิเคชัน  
 ได้แก่ *Pseudomonas* sp. หรือ Unculture *Colwellia* sp., *Desulfobulbus* sp., CFB group bacterium และ  
 Bacteroidetes bacterium .



สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในถังปฏิกรณ์

5.1.1 การเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน

ผลการบำบัดแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันในสภาวะมีออกซิเจนในการทดลองรอบที่ 1 (หัวข้อ 4.1.1.1) พบว่าการลดลงของแอมโมเนียในช่วงแรกของการทดลองน่าจะเกิดกระบวนการนำไนโตรเจนเข้าสู่เซลล์เพื่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่อยู่ในระบบ (Nitrogen assimilation) (Mccaig and Haug, 1971) ดังสมการที่ 1 ทำให้แอมโมเนียในน้ำลดลงโดยไม่พบการเพิ่มขึ้นของไนไตรต์และไนเตรตในน้ำ ซึ่งตามปกติไนตริฟายอิงแบคทีเรียจะต้องใช้เวลาประมาณ 10–20 วันในการทำให้เกิดการออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดไนตริฟิเคชัน (Egli *et al.*, 2003b)



หลังจากที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังปฏิกรณ์ในวันที่ 37 จึงพบว่าแอมโมเนียถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียออกซิไดซ์แอมโมเนีย (Ammonia oxidizing bacteria) ทำให้เกิดไนไตรต์ขึ้น หลังจากนั้นแบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียออกซิไดซ์ไนไตรต์ (Nitrite oxidizing bacteria) จะทำการเปลี่ยนไนไตรต์ให้เป็นไนเตรต (Prosser, 1986) ทำให้พบการเพิ่มขึ้นของไนเตรตในถังปฏิกรณ์ อย่างไรก็ตาม การเติมแอมโมเนียเพิ่มลงในถังปฏิกรณ์วันที่ 46 ของการทดลองพบว่าเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันอย่างไม่สมบูรณ์ โดยแอมโมเนียถูกออกซิไดซ์เป็นไนไตรต์แต่มีไนไตรต์เพียงบางส่วนที่ถูกเปลี่ยนให้เป็นไนเตรต ทำให้เกิดการสะสมของไนไตรต์ขึ้นในถังปฏิกรณ์ อย่างไรก็ตาม ผลของการทดลองในหัวข้อ 4.1.1 สามารถบ่งชี้ได้ว่าเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันขึ้นในถังปฏิกรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่างวันที่ 37-58 ของการทดลอง

สาเหตุของการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันอย่างไม่สมบูรณ์นั้น อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียออกซิไดซ์ไนไตรต์ ถูกยับยั้งการทำงานโดยแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นสูง หรืออาจเกิดจาก hydroxylamine ที่เกิดจากการออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยแบคทีเรียออกซิไดซ์แอมโมเนีย ที่เจริญอยู่ในระบบ (Schmidt *et al.*, 2003) หรืออาจเนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนในน้ำเสียซึ่งมีผลอย่างมากต่อการเกิดไนไตรต์ออกซิเดชัน โดยแบคทีเรียสกุล *Nitrobacter* จะถูกยับยั้งการทำงานได้หากอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนสูง ซึ่งจะทำให้เกิดการสะสมของไนไตรต์ (Prosser, 1986; Schmidt *et al.*,

2003) หรือแม้กระทั่งแสงสว่างซึ่งมีผลทำให้ไนโตรฟายอิงแบคทีเรียตายได้ โดย *Nitrobacter* จะถูกทำลายได้ง่ายกว่า *Nitrosomonas* (Prosser, 1986) แต่ในการทดลองนี้ได้มีการใช้ถุงพลาสติกสีดำคลุมถึงปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชันเพื่อป้องกันแสงไว้แล้ว นอกจากนี้ชั้นฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรียที่เกาะบนตัวกรองที่มีความหนาแน่นเกินไปทำให้ไนโตรฟายอิงแบคทีเรียทำงานได้น้อยลง (เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์, 2543) แต่ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ภาพที่ 4-9) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่เกาะบนตัวกรองไบโอบอล ยังไม่น่าจะมีความหนาแน่นจนเกิดเป็นชั้นแอนอ็อกซิเจนได้

ในการทดลองรอบที่ 2 (หัวข้อ 4.2.1) พบว่าเกิดปฏิกิริยาไนโตรฟิเคชันเกิดขึ้นหลังจากวันที่ 25 ของการทดลอง โดยในช่วงแรกของการทดลองมีการเติมแอมโมเนียเพิ่มในระบบ แต่ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดไม่เพิ่มขึ้น ดังนั้นไนโตรเจนที่หายไปคาดว่าเป็นเพราะเกิดการนำไนโตรเจนเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (Assimilation) เช่นเดียวกับที่พบในการทดลองรอบที่ 1 แต่ภายหลังจากวันที่ 25 ของการทดลอง พบการสะสมของไนเตรตและไนไตรต์ในถังปฏิกรณ์ทำให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการเจริญของไนโตรฟายอิงแบคทีเรียที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาไนโตรฟิเคชัน

เมื่อพิจารณาอัตราการเกิดปฏิกิริยาไนโตรฟิเคชันในถังปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชันของการทดลองรอบที่ 2 (หัวข้อ 4.2.1) พบว่าหลังจากวันที่ 25 ไปแล้วอัตราไนโตรฟิเคชันมีค่าคงที่โดยมีค่าสูงกว่าในช่วงต้นการทดลอง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองรอบที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาไนโตรฟิเคชันในถังปฏิกรณ์ของการทดลองรอบที่ 1 และรอบที่ 2 โดยในการทดลองรอบที่ 2 ช่วงที่มีการเติม  $\text{NaCO}_3$  เพื่อเพิ่มค่าอัลคาไลน์ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับไนโตรฟายอิงแบคทีเรียในน้ำ พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาไนโตรฟิเคชันมีค่าสูงกว่าการทดลองที่ 1 (ตารางที่ 5-1)

ตารางที่ 5-1 การเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาไนโตรฟิเคชันในถังปฏิกรณ์ไนโตรฟิเคชัน

การทดลอง	อัตราการเกิดปฏิกิริยาไนโตรฟิเคชัน ( $\text{mg NH}_4\text{-N/L/day}$ )
รอบที่ 1	$0.575 \pm 0.0456$
รอบที่ 2 เริ่มการทดลองถึงวันที่ 32 (ยังไม่เติม $\text{NaCO}_3$ )	$0.1947 \pm 0.0005$
รอบที่ 2 วันที่ 34-56 (เติม $\text{NaCO}_3$ )	$0.5943 \pm 0.0007$

### 5.1.2 การเกิดปฏิกิริยาดีไนโตรฟิเคชัน

จากผลการทดลองบำบัดไนเตรตในถังปฏิกรณ์ดีไนโตรฟิเคชันในรอบที่ 1 (หัวข้อ 4.1.2) พบว่าในระยะ 44 วันแรกยังไม่สามารถบำบัดไนเตรตได้เนื่องจากสภาพแวดล้อมของระบบไม่เหมาะสม ทั้งนี้เพราะการที่ดีไนโตรฟายอิงแบคทีเรียจะสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาดีไนโตรฟิเคชันได้จำเป็นต้องอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anoxic) มีไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และมีสารอาหารที่เพียงพอ (Hagopian and Riley, 1998) ซึ่งในช่วงแรกระบบในถังปฏิกรณ์มีไนเตรตอยู่ในน้ำ

เพียงอย่างเดียว จึงยังคงขาดปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน การเติมแหล่งคาร์บอนในรูปแบบของเมทานอลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (สุวิมล ดันตสุกิจวัฒน์, 2545) ได้ทำการทดลองแล้วว่า ทำให้เกิดการลดลงของไนเตรตเพียงเล็กน้อย การลดลงดังกล่าวอาจเนื่องมาจากการเกิดการนำไนเตรตเข้าสู่เซลล์ (Assimilation) ของเชื้อแบคทีเรียในน้ำ จากผลดังกล่าวแม้ว่าจะได้มีการเติมเมทานอลที่มีความเข้มข้นสูงเพิ่มลงในถังปฏิกรณ์อีก ระบบก็ยังไม่สามารถบำบัดไนเตรตได้ แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นให้เกิดการทำงานของดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย ดังนั้นในวันที่ 44 จึงได้ทำการเติมสารละลายอาหารกุ้งที่เตรียมจากอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับใช้เลี้ยงกุ้งมาบดละลายน้ำและนึ่งฆ่าเชื้อ สารละลายอาหารกุ้งจะเป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังได้พ่นก๊าซไนโตรเจนลงในระบบเพื่อช่วยกำจัดออกซิเจนที่ยังคงมีหลงเหลืออยู่ในน้ำ ปรากฏว่าภายในถังปฏิกรณ์เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันและสามารถบำบัดไนเตรตได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อทดลองเปลี่ยนน้ำในถังปฏิกรณ์ด้วยน้ำใหม่ที่มีความเข้มข้นไนเตรตเท่าเดิมและมีการเติมสารละลายอาหารกุ้ง พบว่าความเข้มข้นของไนเตรตในถังปฏิกรณ์ลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันขึ้นในถังปฏิกรณ์ และผลการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าไออาร์พีก็มีความสอดคล้องกับการลดลงของไนเตรต โดยค่าไออาร์พีมีความสัมพันธ์อย่างชัดเจนกับการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันในช่วงท้ายของการทดลองในรอบที่ 1

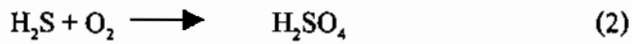
ในส่วนของการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันในการทดลองรอบที่สอง (หัวข้อ 4.2.2) มีความแตกต่างจากการทดลองรอบแรก เนื่องจากมีการเติมเมทานอล เติมสารละลายอาหารกุ้งและพ่นก๊าซไนโตรเจนตั้งแต่วิธีเริ่มต้นการทดลอง ทำให้การบำบัดไนเตรตโดยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันเกิดขึ้นได้ตลอดระยะเวลาการทดลอง ผลการทดลองในภาพที่ 4-16 ซึ่งให้เห็นว่าเป็นการบำบัดไนโตรเจนออกจากระบบโดยสมบูรณ์เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนรวมมีการเปลี่ยนแปลงตามปริมาณไนเตรตที่มีการเติมเข้าสู่ระบบ ในขณะที่พบแอมโมเนียและไนไตรต์ความเข้มข้นต่ำมาก

เมื่อพิจารณาอัตราการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน พบว่าในช่วงที่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันสูง (วันที่ 23-27) เป็นช่วงที่มีการเติมเมทานอลในอัตราส่วน C:N อยู่ที่ 5:1 กรัมเมทานอลต่อกรัมไนโตรเจน ต่อมาเมื่อมีการเติมไนเตรตเพิ่มลงในถังปฏิกรณ์ (ระหว่างวันที่ 27-56) พบว่าระบบมีอัตราดีไนตริฟิเคชันลดลง (ภาพที่ 4-18) เนื่องจากสัดส่วน C:N ที่เปลี่ยนไปจนอาจทำให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่ขาดคาร์บอน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าสัดส่วน C:N มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของระบบบำบัด ซึ่งรัชชัย พรรณสวัสดิ์ (2544) ได้เสนอไว้ว่าโดยทั่วไปอัตราส่วน C:N ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันคือ 2.3:2.7 กรัมเมทานอลต่อกรัมไนโตรเจน แต่ในความเป็นจริงอัตราส่วนที่เหมาะสมอาจจะเปลี่ยนแปลงไปได้ขึ้นอยู่กับสภาวะของระบบบำบัด

สิ่งที่ต้องระวังเป็นพิเศษในการบำบัดไนโตรเจนด้วยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันก็คือไม่ควรปล่อยให้เกิดการบำบัดจนปริมาณไนเตรตในระบบหมด เนื่องจากแบคทีเรียในระบบจะเปลี่ยนมาใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนไนเตรต ทำให้เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $H_2S$ ) ขึ้น



(Lee *et al.*, 2000) ซึ่งก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์มีความเป็นพิษสูงต่อแบคทีเรียในระบบ เนื่องจากโมเลกุลสามารถแทรกผ่านผนังเซลล์แบคทีเรียได้และทำให้เกิดกลิ่นเหม็น นอกจากนี้ไฮโดรเจนซัลไฟด์อาจถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจนโดยแบคทีเรีย *Thiobacillus* sp. ทำให้เกิดกรดซัลฟูริกขึ้นในระบบ ส่งผลให้พีเอชในระบบลดต่ำลง (มันสิน คัมจุลเวศม์ และ มันรัชย์ คัมจุลเวศม์, 2545) ดังสมการที่ 2



ในช่วงแรกของการทดลองรอบที่ 2 พบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ขึ้นหลังจากที่ระบบบำบัดในเตรตในน้ำจนหมด เป็นผลให้พีเอชในถังปฏิกรณ์ลดลงอย่างชัดเจน ต่อมาเมื่อมีการควบคุมปริมาณในเตรตโดยมีการเติมในเตรตเมื่อในเตรตในน้ำมีค่าลดต่ำลง ก็ไม่พบปัญหาการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ขึ้นอีก และค่าพีเอชของน้ำในถังปฏิกรณ์ก็กลับเข้าสู่ภาวะปรกติ โดยค่าพีเอชทั้งในถังปฏิกรณ์ในครีเฟคชันและในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันมีค่า อยู่ระหว่าง 7-8 ซึ่งเป็นช่วงที่ไนตริฟายอิงแบคทีเรียและดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดี (Allison and Prosser, 1992; Hagopian and Riley, 1998) ทั้งนี้การนำระบบบำบัดดีไนตริฟิเคชันเข้ามาใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะต้องระวังไม่ให้เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ขึ้น เนื่องจากไฮโดรเจนซัลไฟด์มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์น้ำ หากมีการควบคุมที่ไม่ดีจะส่งผลเสียมากกว่าการไม่มีระบบบำบัดในเตรตเลยเสียอีก

ความสัมพันธ์ของค่าศักย์ออกซิเดชันรีดักชัน (ORP) กับการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน ในการทดลองรอบที่ 1 และรอบที่ 2 แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ค่าโออาร์พีเป็นตัวบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้เป็นอย่างดี โดยปกติน้ำทะเลในถังปฏิกรณ์ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะมีค่าโออาร์พีเป็นบวกอยู่ระหว่าง 100 ถึง 200 mV แต่ในช่วงที่มีการบำบัดในเตรตค่าโออาร์พีจะอยู่ระหว่าง -100 ถึง -200 mV หลังจากที่ไนเตรตในถังปฏิกรณ์ถูกบำบัดลงจนหมด พบว่าค่าโออาร์พีจะลดต่ำลงอย่างรวดเร็วจนไปอยู่ที่ระดับ -400 ถึง -500 mV และเกิดกลิ่นเหม็นของไฮโดรเจนซัลไฟด์ขึ้นตามมา ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลจากการศึกษาของสุวิมล ต้นทสุกิจวงษ์ (2545) ที่รายงานไว้ว่าค่าโออาร์พีในขณะที่เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันจะอยู่ระหว่าง 0 ถึง -200 mV และเมื่อค่าโออาร์พีต่ำกว่า -300 mV จะเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ขึ้นในระบบ

### 5.1.3 ปัจจัยคุณภาพน้ำที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน

ผลการตรวจวัดปริมาณอัลคาลินิตีในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันของการทดลองรอบที่ 2 (หัวข้อ 4.2.1) มีความสอดคล้องกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (ภาพที่ 4-13) เนื่องจากไนตริฟายอิงแบคทีเรียมีความจำเป็นต้องใช้คาร์บอนไดออกไซด์สำหรับการเติบโต ดังสมการที่ 1 การเติมสารประกอบคาร์บอนลงในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันทำให้ช่วยเพิ่มแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการที่ 3 ในสภาวะที่พีเอชต่ำกว่า 8.5 (McCaig and Haug, 1971)



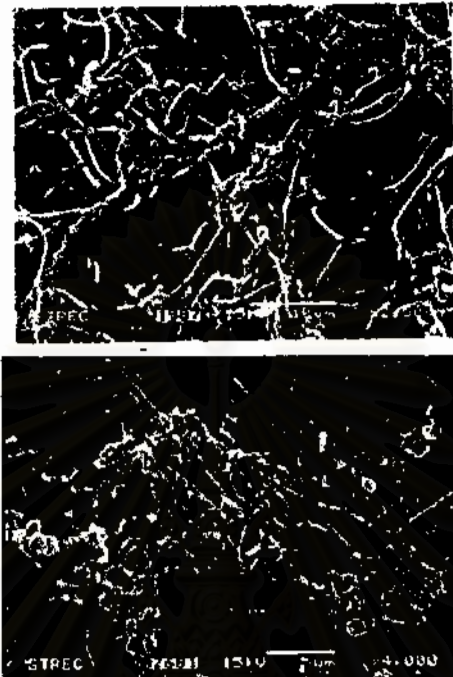
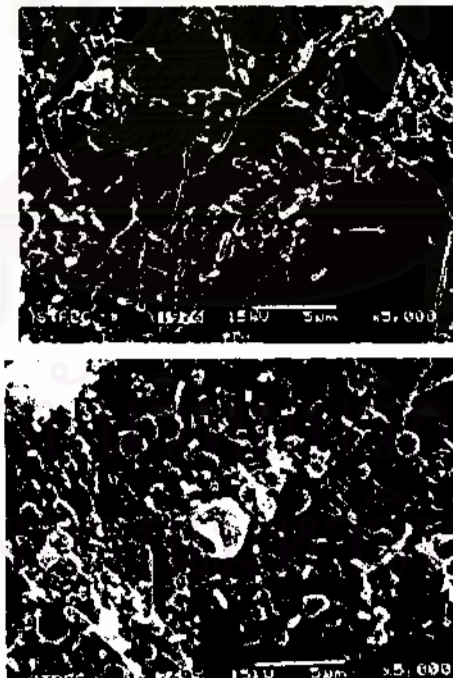
อุณหภูมิมีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน ผลการตรวจวัดอุณหภูมิของน้ำในถังปฏิกรณ์ระหว่างการทดลองนี้พบว่ามีค่าเฉลี่ยประมาณ 29 °C ซึ่งอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไนตริฟายอิงแบคทีเรียคือ 25-30 °C (Allison and Prosser, 1992) ทั้งนี้การนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยในแต่ละประเทศซึ่งมีอุณหภูมิแตกต่างกันมาเปรียบเทียบกันจึงทำได้ยาก การออกแบบระบบบำบัดไนโตรเจนจึงมักจำเป็นต้องสร้างระบบต้นแบบขนาดเล็กเพื่อทำการทดลองในสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะของการบำบัดจริง จึงจะได้ค่าอัตราการบำบัดที่แม่นยำ (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544)

## 5.2 การเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน

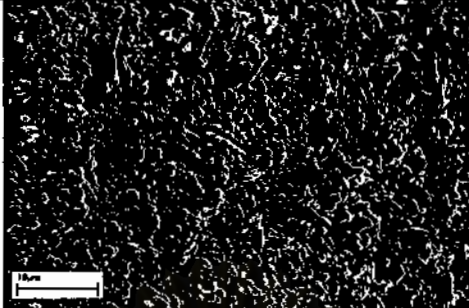
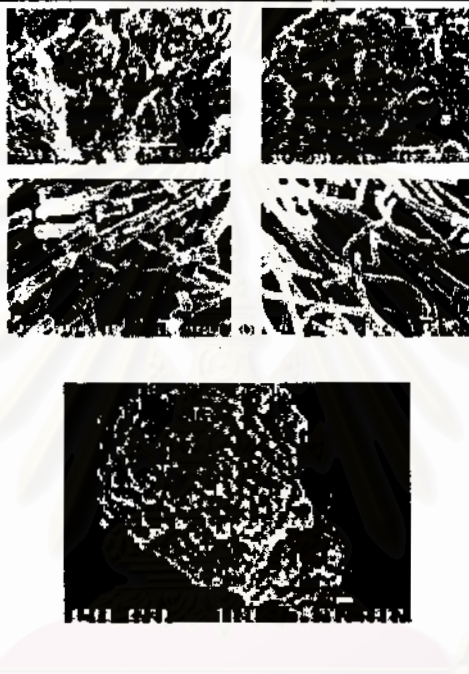
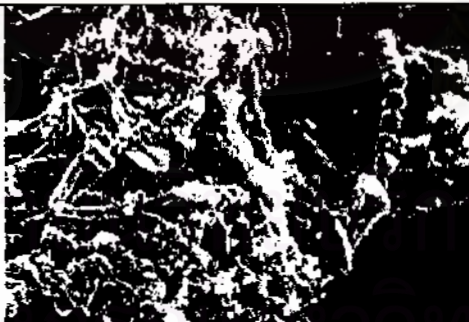
ผลการศึกษาแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพในระยะเวลาการทดลอง 56 วันของการทดลองทั้งสองรอบ (หัวข้อ 4.1.3.4 และ 4.2.3.5) พบว่ามีการเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิวของไบโอบอลที่มีลักษณะเป็นฟิล์มชีวภาพที่ไม่หนาแน่น ยังไม่ครอบคลุมพื้นผิวทั้งหมดของไบโอบอล และไม่เกิดเป็นชั้นฟิล์มที่ซ้อนทับกันและประชากรของแบคทีเรียเริ่มมีจำนวนชนิดที่คงที่หลังจากเดินระบบเป็นเวลาประมาณ 6 สัปดาห์

การศึกษาค้นคว้าด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนสามารถบ่งชี้เฉพาะรูปลักษณะภายนอกของแบคทีเรียเท่านั้น ซึ่งการเปรียบเทียบภาพถ่ายของแบคทีเรียที่พบในการศึกษารั้งนี้กับภาพถ่ายของแบคทีเรียในระบบบำบัดทั้งไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน (ตารางที่ 5-2) จึงไม่สามารถบ่งบอกลักษณะพิเศษของแบคทีเรียได้ แต่การพบจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้แต่มีลักษณะคล้ายการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน (granule) ขนาดประมาณ 10  $\mu\text{m}$  เกิดขึ้นในตัวกรองชีวภาพของถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันในการทดลองรอบที่ 2 (ภาพที่ 4-37) นับเป็นสิ่งที่น่าสนใจเนื่องจากมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่กล่าวถึงการเกาะรวมตัวของแบคทีเรียเกิดเป็นกลุ่มก้อนขึ้นในระบบบำบัด (Egli *et al.*, 2003a; Pol *et al.*, 2004)

ตารางที่ 5-2 ตัวอย่างภาพถ่ายของแบคทีเรียที่เป็นฟิล์มชีวภาพในระบบบำบัดน้ำเสีย

รายละเอียด	ลักษณะฟิล์มชีวภาพ	ที่มา
ฟิล์มชีวภาพบนผิวของไบโอบอลในระบบบำบัดน้ำในศรีสะเกษ		จากผลงานวิจัยนี้
ฟิล์มชีวภาพบนผิวของไบโอบอลในระบบดีในศรีสะเกษ		จากผลงานวิจัยครั้งนี้

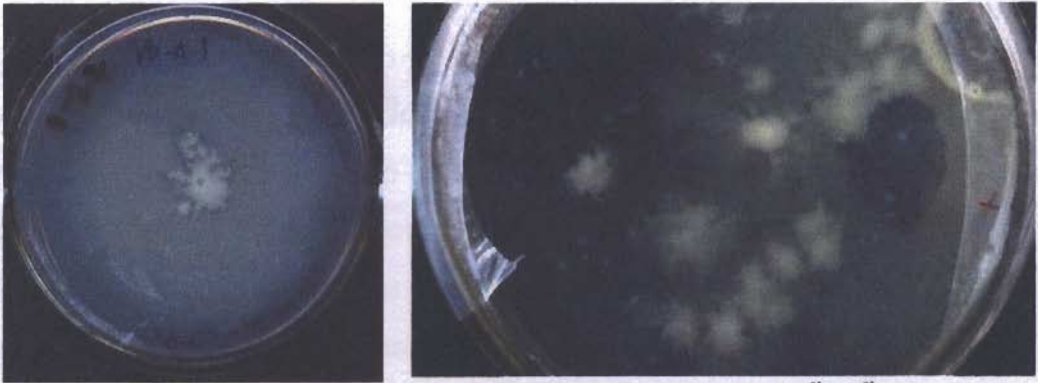
ตารางที่ 5-2 ตัวอย่างภาพถ่ายของแบคทีเรียที่เป็นฟิล์มชีวภาพในระบบบำบัดน้ำเสีย

<p>ลักษณะไนตริฟายอิงแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียจากขยะ</p>		<p>Skodowska, n.d.</p>
<p>การเกาะกลุ่มกันของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ชนิด Upflow Anaerobic Sludge Bed (UASB) บำบัดน้ำเสียจากโรงงาน</p>		<p>Pol <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>ลักษณะฟิล์มชีวภาพในตัวกรองแบบ Trickling ในระบบบำบัดน้ำเสียของประเทศสหรัฐอเมริกา</p>		<p>Grady <i>et al.</i>, 1999</p>

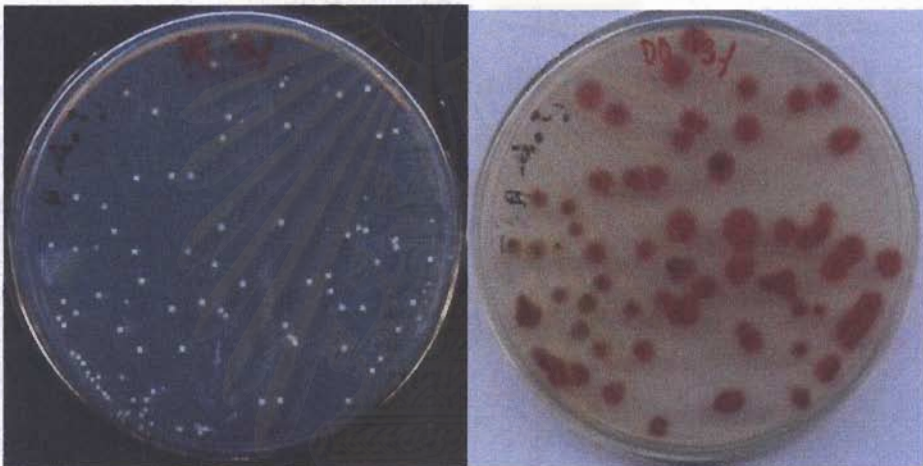


ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียแต่ละกลุ่มในตัวกรองชีวภาพของการทดลองทั้งสองรอบ ทั้งในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่มีมากที่สุด ในตัวกรองชีวภาพคือ ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย ผลการนับปริมาณดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียมีปริมาณใกล้เคียงกับผลการนับแบคทีเรียทั้งหมด (Total Bacteria: TB) และไม่สามารถนำผลรวมของไนตริฟายอิงแบคทีเรีย, ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย, แบคทีเรียลดซัลเฟตและไวรัสโอมารวมกันแล้วเทียบเป็นปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (TB) ได้ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียลดซัลเฟตในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันเฉพาะในการทดลองรอบที่ 2 เนื่องจากในช่วงต้นของการทดลองรอบที่ 2 เกิดภาวะการขาดไนเตรตทำให้เกิดการใช้ซัลเฟตในน้ำโดยแบคทีเรียลดซัลเฟต

วิธีการนับปริมาณแบคทีเรียจากฟิล์มชีวภาพในตัวกรองโดยวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จำเพาะแสดงให้เห็นว่าปริมาณแบคทีเรียที่นับได้มีความแปรผันสูง และมีความผิดพลาดมาก โดยเฉพาะไนตริฟายอิงแบคทีเรียที่เจริญเติบโตช้าในอาหารที่มีสารอาหารจำกัด วิธีการนับจำนวนโดยการแยกนับแบคทีเรียแต่ละกลุ่มในลักษณะนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรียจากฟิล์มชีวภาพในสภาวะธรรมชาติ ตัวอย่างของปัญหาที่พบมากในงานวิจัยนี้ได้แก่การนับโคโลนีของแบคทีเรียที่มีการเคลื่อนที่ได้ (motile bacteria) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ไม่สามารถนับจำนวนได้ เพราะเมื่อแบคทีเรียมีการเติบโตบนอาหารก็จะกระจายตัวลามไปทั่วถังภาพที่ 5-1 และในการนับจำนวนดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nitrate medium ได้มีการทดสอบ Nitrate test (Csuros and Csuros, 1999) กับโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ของดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (ภาพที่ 5-2) ซึ่งจากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียทุกโคโลนีที่พบบนอาหารเพาะเชื้อมีความสามารถเป็นดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย ทำให้ผลของการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดได้ผลใกล้เคียงกับการนับดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีปัญหาของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีแบคทีเรียจำนวนมากไม่สามารถเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงนิยมใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการศึกษาแบคทีเรียจากฟิล์มชีวภาพมากขึ้น



ภาพที่ 5-1 ลักษณะการกระจายของโคโลนีแบคทีเรียที่มีการเคลื่อนที่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Motile bacteria) ทำให้การนับจำนวนโคโลนีผิดพลาดได้ง่าย



ภาพที่ 5-2 การทดสอบ Nitrate test ของดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nitrate medium (ภาพซ้าย) คือ โคโลนีแบคทีเรียก่อนการทดสอบ (ภาพขวา) คือผลการทดสอบ จะเกิดสีแดงขึ้นรอบโคโลนีดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย

ผลของการศึกษาประชาคมแบคทีเรียของฟิล์มชีวภาพที่เกาะบนไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE ของการทดลองทั้งสองรอบพบว่ามี ความแตกต่างกัน ในการทดลองรอบที่ 1 พบว่าแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน ไม่แตกต่างกัน โดยมีแบคทีเรียอย่างน้อย 9 ชนิดเจริญอยู่ในถังปฏิกรณ์ทั้งสอง สังเกตได้จาก จำนวนแถบสีเอ็นเอที่พบบน DGGE gel ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สำคัญได้ 2 ชนิดคือ

1. *Methylophaga marina* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในน้ำทะเล (Janvier and Grimont, 1995) โดย Labbe และคณะ (2003) พบแบคทีเรียชนิดนี้ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันที่มีการเติมเมทานอลในการบำบัดน้ำเสียบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล Montreal Biodome ประเทศแคนาดา *Methylophaga* เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและต้องการโซเดียมและแมกนีเซียมในการเจริญเติบโต ดิคส์แกรมลบ Janvier and Grimont (1995) จัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานเป็น Gamma-proteobacteria; Thiotrichales; Piscirickettsiaceae; *Methylophaga*

2. *Marinobacter* sp. เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินตะกอนชายฝั่งทะเล (Rontani *et al.*, 1997) หรือในระบบบำบัดน้ำเสียหมุนเวียนแบบปิดจากการเพาะเลี้ยงปลาทะเล (Leonard *et al.*, 2000) มีความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (Rontani *et al.*, 1997; Hedlund *et al.*, 2001) *Marinobacter* sp. จัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานเป็น Gamma-proteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae; *Marinobacter* มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนกลม มีขนาดยาว 1.5 – 1.8  $\mu\text{m}$  กว้าง 0.5  $\mu\text{m}$  มี single polar flagellum ดิคส์แกรมลบ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 °C ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมประมาณ 0.6 M (Rontani *et al.*, 1997)



ภาพที่ 5-3 ภาพถ่าย TEM ของแบคทีเรีย *Marinobacter* sp. strain CAB เส้นเทียบขนาดเท่ากับ 1.5  $\mu\text{m}$  (Rontani *et al.*, 1997)

ในการทดลองรอบที่ 2 พบองค์ประกอบชนิดของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยแบคทีเรียที่เป็นชนิดที่มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาจะพบเป็นชนิดเด่นในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 ของการทดลอง ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดปฏิกิริยาขึ้นอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน



แบคทีเรียชนิดเด่นที่พบในฟิล์มชีวภาพจากถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน ได้แก่

1. Alpha-proteobacterium เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในน้ำทะเล (Baker *et al.*, 2003)
2. Uncultured Banisveld landfill bacterium พบในดินปนเปื้อนของเสีย (Röling *et al.*, 2001)
3. *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group bacterium อยู่ในไฟลัม Bacteroidetes (Mouné *et al.*, 2003) พบในฟิล์มชีวภาพของไนตริฟายอิงแบคทีเรียในระบบบำบัดแอมโมเนีย (Egli *et al.*, 2003a; Kindaichi *et al.*, 2003) มีลักษณะรูปร่างเป็นเส้นใย (filamentous) อยู่ในชั้นฟิล์มชีวภาพไนตริฟายอิง (Egli *et al.*, 2003a) และพบในดินตะกอนสภาพไร้ออกซิเจนที่มีความเค็มสูง ชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศฝรั่งเศส (Mouné *et al.*, 2003)
4. *Methylobacterium* sp. อยู่ใน Alpha-proteobacteria; Rhizobiales; Methylobacteriaceae พบใน activated sludge ระบบบำบัดน้ำเสีย (Magnusson *et al.*, 1998)
5. Uncultured soil bacterium (Kim and Crowley, 2003)

แบคทีเรียชนิดเด่นที่พบในฟิล์มชีวภาพจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน ได้แก่

1. Bacteroidetes bacterium เป็นแบคทีเรียในไฟลัม Bacteroidetes มีลักษณะรูปร่างเป็นเส้นสาย (filamentous) (Egli *et al.*, 2003a)
2. *Pseudomonas* sp. เป็นดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญ (Delwiche, 1981) พบในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็มแบบดีไนตริฟิเคชัน (Yoshie *et al.*, 2001; Tal *et al.*, 2003) หรือ *Colwellia* sp. พบในระบบบำบัดดีไนตริฟิเคชันสำหรับบำบัดในเตรจากน้ำเสียที่มีความเค็มสูง (Yoshie *et al.*, 2001)
3. *Desulfobulbus* sp. เป็นแบคทีเรียลดซัลเฟต (Austin, 1988; Ito *et al.*, 2001) พบในฟิล์มชีวภาพบำบัดน้ำเสียที่มีไนเตรต (Ito *et al.*, 2001) และพบในดินตะกอนสภาพไร้ออกซิเจนที่มีความเค็มสูง ชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศฝรั่งเศส (Mouné *et al.*, 2003) มีรูปร่างกลม ขนาด 1-1.3  $\mu\text{m}$  ยาว 1.8-2  $\mu\text{m}$  มี flagellum ติดที่แกรมลบ (Austin, 1988)
4. *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group bacterium

ความแตกต่างของผลการศึกษานี้ขององค์ประกอบชนิดของแบคทีเรียที่ได้จากวิธี PCR-DGGE ในการทดลองทั้งสองรอบ เกิดจากความแตกต่างของการจัดสภาวะของถังปฏิกรณ์ โดยในการทดลองรอบที่ 1 แบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน เริ่มมีการเกิดปฏิกิริยาเฉพาะในช่วงท้ายของการทดลองเป็นเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ ระยะเวลาดังกล่าวจึงยังไม่เพียงพอที่จะพบความแตกต่างของชนิดของแบคทีเรีย รวมถึงยังไม่พบความแตกต่าง



ที่เด่นชัดของปริมาณแบคทีเรียบนใบโอบอลที่แสดงด้วยปริมาณโปรตีน ในขณะที่การทดลองรอบที่ 2 นั้นเกิดปฏิกิริยาขึ้นตั้งแต่ในสัปดาห์แรกของการทดลอง ดังนั้นแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์จึงเกิดการปรับตัวเข้าสู่สภาวะของระบบบำบัดเป็นเวลานานเพียงพอที่จะพบความแตกต่างขององค์ประกอบชนิดของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ทั้งสองถังได้ โดยพบว่าปริมาณโปรตีนของแบคทีเรียที่วิเคราะห์ได้ในตัวกรองชีวภาพจากถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันมีมากกว่าในตัวกรองชีวภาพจากถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (ภาพที่ 4-38) โดยปริมาณโปรตีนในตัวกรองถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนในระหว่างการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่พบจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ในช่วงท้ายการทดลอง



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ที่มีตัวกรองชีวภาพสำหรับเป็นวัสดุยึดเกาะเพื่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่าตัวกรองชีวภาพสามารถบำบัดแอมโมเนียได้เมื่ออยู่ในสถานะที่เหมาะสมคือ มีการเติมสารประกอบคาร์บอนेट มีออกซิเจนและจัดให้อยู่ในที่มืด โดยแอมโมเนียที่เติมลงไปถูกแบคทีเรียออกซิไดซ์แอมโมเนีย ที่เจริญอยู่ในตัวกรองชีวภาพเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนไตรต์และไนไตรต์ที่เกิดขึ้นนั้นถูกแบคทีเรียออกซิไดซ์ไนไตรต์ในตัวกรองชีวภาพเปลี่ยนให้เป็นไนเตรต ทำให้พบการสะสมไนเตรตเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าไนไตรต์บางส่วนไม่สามารถถูกบำบัดเปลี่ยนเป็นไนเตรตได้หมด จึงทำให้เกิดการสะสมของไนไตรต์ขึ้นในระบบ (ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันเกิดไม่สมบูรณ์)

2. การศึกษาปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ที่มีตัวกรองชีวภาพในสถานะที่เหมาะสมคือสถานะไร้ออกซิเจนที่มีการเติมเมทานอลในปริมาณที่เพียงพอและเติมสารละลายอาหารกุ้งปราศจากเชื้อเพื่อเป็นแหล่งอาหาร พบว่าดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยระบบสามารถบำบัดไนเตรตได้อย่างรวดเร็วในอัตรา  $0.6 \text{ mgNO}_3\text{-N/Bioball/day}$  โดยที่ไม่พบการสะสมของไนไตรต์แสดงว่าระบบเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์

3. จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าโออาร์พีกับการบำบัดไนเตรตในน้ำเสียทดลองในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน พบว่าโดยปกติค่าโออาร์พีของน้ำเสียทดลองที่มีความเข้มข้นไนเตรต  $50 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$  มีค่าโออาร์พีอยู่ที่ 100 ถึง 200 mV เมื่อเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันจะทำให้ค่าโออาร์พีลดต่ำลงจนมีค่าติดลบในระหว่างการบำบัดไนเตรต โดยค่าโออาร์พีจะมีค่าอยู่ที่ระหว่าง -100 ถึง -200 mV เมื่อไนเตรตถูกบำบัดจนหมดค่าโออาร์พีจะลดต่ำลงอย่างรวดเร็วจนถึง -400 ถึง -500 mV ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นเหม็นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ฉะนั้นในการบำบัดไนเตรตจึงต้องมีการเติมไนเตรตเพิ่มในระบบก่อนที่ค่าโออาร์พีจะต่ำกว่า -300 mV

4. จากผลการหาปริมาณแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันโดยการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 กลุ่มในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในถังทั้งสองมีปริมาณใกล้เคียงกันคือ แบคทีเรียในน้ำทะเลไนตริฟายอิงแบคทีเรีย และดีไนตริฟายอิงแบคทีเรียมีจำนวนประมาณ  $10^7$  CFU/bioball วับริโอมีปริมาณ  $10^4 - 10^5$  CFU/bioball และไม่พบแบคทีเรียลคซัลเฟต โดยลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 กลุ่ม ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันมีลักษณะเหมือนกับที่พบในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน อย่างไรก็ตามวิธีการหาปริมาณกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญในตัวกรองชีวภาพโดยการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะมีความคลาดเคลื่อนสูงจึงไม่เหมาะสมสำหรับการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่เจริญเป็นฟิล์มชีวภาพในตัวกรองชีวภาพ

5. จากภาพการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนพื้นผิวไบโอบอลในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันพบปริมาณจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่บนไบโอบอลมากกว่าในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและพบจุลินทรีย์ลักษณะทรงกลมขนาด  $10 \mu\text{m}$  ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์แบคทีเรียโดยทั่วไป และยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้

6. จากผลการวิเคราะห์ PCR-DGGE ในการทดลองครั้งที่ 1 พบว่ามีแบคทีเรียอย่างน้อย 9 ชนิดเจริญอยู่ในถังปฏิกรณ์ทั้งสองโดยชนิดและองค์ประกอบของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชันไม่แตกต่างกัน ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีการเติมแหล่งอาหารและเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในถังปฏิกรณ์ตลอดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่าองค์ประกอบชนิดของประชาคมแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ทั้งสองแตกต่างกันและพบแบคทีเรีย CFB group bacterium เจริญอยู่ในถังปฏิกรณ์ทั้งสอง ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันจำแนกแบคทีเรียชนิดเด่นได้เป็น Alpha-proteobacterium, CFB group bacterium และ *Methylobacterium* sp. ส่วนระบบดีไนตริฟิเคชันจำแนกแบคทีเรียชนิดเด่นได้เป็น *Bacteroidetes* bacterium, *Pseudomonas* sp. Uncultured *Colwellia* sp. และ *Desulfobulbus* sp.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ข้อเสนอแนะ

1. จากการทำการทดลองในระบบบำบัดในครีฟิเคชันสถานะที่มีออกซิเจนพบว่าแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตช้าในตัวกรองชีวภาพไบโอบอล โดยใช้เวลาประมาณ 25 วันจึงจะสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาในครีฟิเคชันบำบัดแอมโมเนียได้ แต่จะมีการสะสมของไนไตรต์ในระบบเนื่องจากสถานะที่ไม่เหมาะสมกับการบำบัดไนไตรต์ อย่างไรก็ตามสามารถใช้ตัวกรองชีวภาพไบโอบอลในการบำบัดแอมโมเนียในระบบในครีฟิเคชัน เพื่อบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดได้ แต่ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในการแก้ไขปัญหาเรื่องการสะสมไนไตรต์ในถังปฏิกรณ์

2. จากผลการวิจัยทำให้ทราบว่าแบคทีเรียที่เจริญในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลระบบดีในครีฟิเคชันสถานะไร้ออกซิเจนจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสามารถบำบัดไนเตรตให้เป็นที่กักไนโตรเจนได้อย่างสมบูรณ์ในสถานะที่มีสารอาหารอย่างเพียงพอคือ มีการเติมเมทานอลและสารละลายอาหารกุ้ง ซึ่งสามารถนำระบบนี้ไปประยุกต์ใช้กับระบบบำบัดน้ำเสียที่มีไนเตรตสูง เช่นระบบบำบัดหมุนเวียนน้ำแบบปิดสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ โดยสามารถใช้ค่าไออาร์พีเป็นตัวบ่งชี้สถานะการเกิดปฏิกิริยาดีในครีฟิเคชัน สิ่งที่ควรระวังคือไม่ควรปล่อยให้มีการบำบัดจนไนเตรตในระบบหมด เนื่องจากจะทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ขึ้นซึ่งมีความเป็นพิษสูง สามารถเผ่าระวังได้โดยดูจากการลดลงของค่าไออาร์พี

3. จากผลการวิจัยพบว่าวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อศึกษาชนิดหรือปริมาณแบคทีเรียในระบบ ไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในงานวิจัยทางด้านจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากมีความผิดพลาดสูงและมีแบคทีเรียหลายชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ วิธีที่เหมาะสมคือควรใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเช่น PCR-DGGE ในการศึกษาชนิดหรือองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในตัวกรองชีวภาพระบบบำบัดน้ำเสียได้ ซึ่งจากผลการทดลองควรเพิ่มขั้นตอนการโคลนแบคทีเรียก่อนถึงขั้นการหาลำดับเบส เพื่อให้สามารถการจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ถูกต้องยิ่งขึ้น

4. ควรมีการศึกษาถึงความเหมาะสมและประสิทธิภาพของวัสดุค้ดเกาะแบคทีเรียสำหรับนำมาใช้เป็นตัวกรองชีวภาพเพื่อบำบัดสารประกอบไนโตรเจนในระบบบำบัด



## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- เกรียงศักดิ์ อุคมสินโรจน์. 2543. วิศวกรรมกรำจัดน้ำเสีย. เล่มที่ 4. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี  
ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544. การกรำจัดในโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร :  
สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 703 หน้า.
- พรศรี ประร่ำกะโม. 2541. การขั้บถ่ายแอมโมเนียและยูเรียของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*  
*Fabricius*) ขนาดต่างๆที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีนและความเค็มแตกต่างกัน. วิทยา  
นิพนธ์ปริญญาหมาบัณฑิต ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์.
- มันสิน คั้ณจุลเวศม์ และไพพรรณ พรประภา. 2536. การจัดการคุณภาพน้ำและการบำบัดน้ำเสียใน  
บ่อเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำอื่นๆ เล่มที่ 1 การจัดการคุณภาพน้ำ. กรุงเทพมหานคร : สำนัก  
พิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มันสิน คั้ณจุลเวศม์ และมันรัช คั้ณจุลเวศม์. 2545. เคมีวิทยาของน้ำและน้ำเสีย. พิมพ์ครั้งที่ 1.  
กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุวิมล ตันจสุกจิวงษ์. 2545. ระบบบำบัดไนเตรทสำหรับระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดเพื่อการ  
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาหมาบัณฑิต สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อ่ำไพเทพิน สิงหะพันธุ์. 2543. ระบบบำบัดไนเตรทเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยระบบหมุนเวียน  
น้ำแบบปิดขนาดเล็ก. วิทยานิพนธ์ปริญญาหมาบัณฑิต สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะ  
แวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

- Allison, S.M., Prosser, J.I. 1992. Isolation and Identification of Autotrophic Nitrifying Bacteria.  
Board, R.G., Jones, D., Skinner, F.A., Identification Methods in Applied and  
Environmental Microbiology, 87-213. Oxford : Blackwell Scientific Publication,
- Austin, B. 1988. Methods in Aquatic Bacteriology. Chichester: John Wiley and Sons, 425 pp.
- Baker, p.W., Ito, K., Watanabe, K. 2003. Marine Prosthecate Bacteria Involved in the  
Ennoblement of Stainless Steel. Environmental Microbiology 5(10) : 925-932.
- Balderston, W.L., Sieburth, J.McN. 1976. Nitrate Removal in Closed-System Aquaculture By  
Columnar Denitrification. Applied and Environmental Microbiology 32 : 808-818.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B., Witzel, K.P. 2000. Molecular Analysis of Ammonia

- Oxidation and Denitrification in Natural Environments. FEMS Microbiology Reviews 24 : 673-690.
- Cao, G.M., Zhao, Q.X., Sun, X.B., Zhang, T. 2002. Characterization of Nitrifying and Denitrifying Bacteria Coimmobilized in PVA and Kinetics Model of Biological Nitrogen Removal by Coimmobilized Cells. Enzyme and Microbial Technology 30 : 49-55.
- Cole, A.C., Shanahan, J.W., Semmens, M.J., LaPara, T.M. 2002. Preliminary Studies on the Microbial Community Structure of Membrane-Aerated Biofilms Treating Municipal Wastewater. Desalination 146 : 421-426.
- Csuros, M., Csuros, C. 1999. Microbiological Examination of Water and Wastewater. Washington D.C. : Lewis,
- Delwiche, C.C. 1981. Denitrification Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide. NewYork : John Wiley and Sons, 286 pp.
- Egli, K., Bosshard, F., Werlen, C., Lais, P., Siegrist, H., Zehnder, A.J.B., Meer, J.R. 2003a. Microbial Composition and Structure of a Rotating Biological Contactor Biofilm Treating Ammonium-Rich Wastewater without Organic Carbon. Microbial Ecology 45 : 419-432.
- Egli, K., Langer, C., Siegrist, H.R., Zehnder, A.J.B., Wagner, M., Meer, J.R. 2003b. Community Analysis of Ammonia and Nitrite Oxidizers during Start-Up of Nitrification Reactors. Applied and Environmental Microbiology 69(6) : 3213-3222.
- Flanming, H.C., Szewzyk, U., Griebe, T. 2000. Biofilms: Investigative Methods and Applications. United States of America : Technomic
- Grady, C.P., Leslie, J., Daigger, G.T., Lim, H.C. 1999. Biological Wastewater Treatment. 2<sup>nd</sup>. New York : Marcel-Dekker,
- Greenberg, A.E., Clesceri, L.S., Eaton, A.D. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18<sup>th</sup>. Washington, DC : American Public Health Association,
- Hagopian, D.S., Riley, J.G. 1998. A Closer Look at the Bacteriology of Nitrification. Aquacultural Engineering 18 : 223-244.
- Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D., Staley, J.T. 2001. *Marinobacter* strain NCE312 has a *Pseudomonas*-like Naphthalene Dioxygenase. FEMS Microbiology Letters 201 : 47-51.
- Ito, T, Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y. 2001. Successional Development of Sulfate-Reducing Bacterial Population and Their Activities in a Wastewater Biofilm Growing under Microaerophilic Conditions. Applied and Environmental Microbiology 68(3) : 1392-

1402.

- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Röser, A.O., Koops, H.P., 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(8) : 3042-3051.
- Janvier, M., Grimont, P.A.D. 1995. The Genus *Methylophaga*, a New Line of Descent within Phylogenetic Branch  $\gamma$  of Protobacteria. Research Microbiology 146 : 543-550.
- Kim, J.S., Crowley, D.E. 2003. Bacterial Diversity of Amazon Soil by Oligonucleotide Fingerprinting of rRNA Genes. Submitted (20-JUN-2003) Environmental Sciences, University California Riverside : 3401.
- Kim, D.J., Lee, S.C., Han, D.W., Cha, G.C., Yoo, I.K., Chang, J.W. 2000. Nitrite Accumulation Characteristics of a Biofilm Reactor. Technical Paper: 12<sup>th</sup> IWA-ASPAC Regional Conference and Exhibition Chiangmai, 5-9 November, pp. 463-465.
- Kindaichi, T., Ito, T., Okabe, S. 2003. Ecophysiological Interaction between Nitrifying Bacteria and Heterotrophic Bacteria in Autotrophic Nitrifying Biofilms as Determined by Microautoradiography Fluorescence In Situ Hybridization. Applied and Environmental Microbiology 70(3) : 1641-1650.
- Knowles, R. 2000. Nitrogen cycle. Lederberg, J., Encyclopedia of Microbiology, 379-391. New York : Academic Press,
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., Boer, W.D., Prosser, J.I., Embley, T.M., Woldendorp, J.W. 1997. Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the  $\beta$  Subdivision of the Class *Proteobacteria* in Coastal Sand Dunes by Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of PCR-Amplified 16S Ribosomal DNA Fragments. Applied and Environmental Microbiology 63(4) : 1489-1497.
- Labbe, N., Juteau, P., Parent, S., Villemur, R. 2003. Bacterial Diversity in a Marine Methanol-Fed Denitrification Reactor at the Montreal Biodome, Canada. Microbial Ecology 46 : 12-21.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. E. Stackbrandt and M. Goodfellow, Nucleic acid techniques in bacterial systematics, 115-175. West Sussex, United Kingdom : John Wiley & Sons,
- Lazarova, V., Manem, J. 1995. Biofilm Characterization and Activity Analysis in Water and

Wastewater Treatment. Water Research 29(10) : 2227-2245.

Lee, P.G., Lea, R.N., Dohmann, E., Prebilsky, W., Turk, P.E., Ying, H., Whitson, J.L. 2000.

Denitrification in Aquaculture Systems: an Example of a Fuzzy Logic Control Problem.

Aquacultural Engineering 23 : 37-59.

Leonard, N., Blancheton, J.P., Guiraud, J.P. 2000. Population of Heterotrophic Bacteria in an

Experimental Recirculating Aquaculture System. Aquacultural Engineering 22 : 109-120.

Lowry, O.H., Resebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with Folin-

Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry 193 : 265-275.

Magnusson, G., Edin, H., Dalhammer, G. 1998. Characterisation of Efficient Denitrifying

Bacteria Strains Isolated from Activated Sludge by 16S-rDNA Analysis. Water Science

Technology 38(8-9) : 63-68.

Mccaig, A.E., Phillips, C.J., Stephen, J.R., Kowalchuk, G.A., Harvey, S.M., Herbert, R.A.,

Embley, T.M., Prosser, J.I. 1999. Nitrogen Cycling and Community Structure of

Proteobacterial  $\beta$ -Subgroup Ammonia-Oxidizing Bacteria within Polluted Marine Fish

Farm Sediments. Applied and Environmental Microbiology 65(1) : 213-220.

Mccaig, P.L., Haug, R.T. 1971. Nitrogen Removal from Wastewater by Biological Nitrification

and Denitrification. Sykes, G., Skinner, F.A., Microbial Aspects of Pollution, 215-233.

New York : Academic Press,

Menasveta, P., Panritdam, T., Sihanonth, P., Powtongsook, S., Chuntapa, B. 2001. Design and

Function of a Closed, Recirculating Seawater System with Denitrification for the Culture of

Black Tiger Shrimp Broodstock. Aquacultural Engineering 25 : 35-49.

Mouné, S., Caumette, P., Matheron, R., Willison, J.C. 2003. Molecular Sequence Analysis of

Prokaryotic Diversity in the Anoxic Sediments Underlying Cyanobacterial Mats of Two

Hypersaline Ponds in Mediterranean Salterns. FEMS Microbiology Ecology 44 : 117-

130.

Muyzer, G., Dewaal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profile of Complex Microbial Populations By

by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-

Amplified Genes Coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 59 :

695-700.

Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of Denaturing Gradient gel Electrophoresis (DGGE)

and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. Antonie



van Leeuwenhoek 73 : 127-141.

- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F.L., Torsvik, V. 1997. Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Sælenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 63 (9) : 3367-3373.
- Paustian, T. 2004. Microbiology Web Textbook [Online]. University of Wisconsin-Madison Available from : [http://www.bact.wisc.edu/micro\\_textbook/Metabolism.html](http://www.bact.wisc.edu/micro_textbook/Metabolism.html) [2004, March 5]
- Poi, L.W.H., Lopes, S.I.C., Littinga, G., Lens, P.N.L. 2004. Anaerobic Sludge Granulation. Water Research 38 : 1376-1389.
- Prosser, J.J. 1986. Nitrification. 20<sup>th</sup>. Washington DC : IRL Press,
- Pynaert, K., Smets, B.F., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S.D., Verstraete, W. 2003. Characterization of an Autotrophic Nitrogen-Removing Biofilm from a High Loaded Lab-Scale Rotating Biological Contactor. Applied and Environmental Microbiology 69 (6) : 3626-3635.
- Rittmann, B.E., McCarty, P.L. 2001. Environmental Biotechnology: Principles and Applications Boston : McGraw-Hill, pp. 470-525
- Röling, W.F.M., Breukelen, B.M. Braster, M., Lin, B. Verseveld, H.W. 2001. Relationships between Microbial Community Structure and Hydrochemistry in a Landfill Leachate-Polluted Aquifer. Applied and Environmental Microbiology 67(10) : 4619-4629.
- Rontani, J.F., Gilewicz, M.J., Michotey, V.D., Zheng, T.L., Bonin, P.C., Bertrand, J.C. 1997. Aerobic and Anaerobic Metabolism of 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one by a Denitrifying Bacterium Isolated from Marine Sediments. Applied and Environmental Microbiology 1997 : 636-643.
- Rowan, A.K., Jason, J.R., Fearnside, D., Barer, M.R., Curtis, T.P., Head, I.M. 2003. Composition and Diversity of Ammonia-Oxidising Bacterial Communities in Wastewater Treatment Reactors of Different Design Treating Identical Wastewater. FEMS Microbiology Ecology 43 : 195-206.
- Sakairi, M.A.C., Yasuda, K., Matsumura, M. 1996. Nitrogen Removal in Sewerage Using Nitrifying and Denitrifying Bacteria Immobilized in Porous Cellulose Carrier. Water Science and Technology 34 (7-8) : 267-274.
- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmidt, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., 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.
- Seo, J.K., Jung, I.H., Kim, M.R., Kim, B.J., Nam, S.W., Kim, S.K. 2001. Nitrification Performance of Nitrifiers Immobilized in PVA (Polyvinyl alcohol) for a Marine Recirculating Aquarium System. Aquacultural Engineering 24 : 181-194.
- Skodowska, A. (n.d.) Management of Sewage Sludge from Wastewater treatment Plant [Online]. Available from : [http:// www.cemera.pl/images/nitryfying.html](http://www.cemera.pl/images/nitryfying.html) [2004, March 21]
- Skinner, S., Walker, N. 1968. Isolation of Ammonia-Oxidizing Autotrophic Bacteria. Journal Applied Bacteriology 31 : 493-497.
- Strickland, J.D., Parson, T.R. 1972. Apractical Hanbook of Seawater Analysis. 2<sup>nd</sup>. Ottawa : Fisheries Research board of Cannada, 310 p.
- Tal, Y., Watts, J.E.M., Schreier, S.B., Sowers, K.R., 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.
- Tookwinas, S., 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.
- Tsuneda, S., Nagano, T., Hoshina, T., Ejiri, T. Noda, N., Hirata, A. 2003. Characterization of Nitrifying Granules Produced in an Aerobic upflow Fluidized Bed Reactor. Water Research 37 : 4965-4973.
- Watson, S.W. 1974. Gram-Negative Chemolithotrophic Bacteria. Buchanan, R.F., Gibbons, N.F., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, pp. 450-471. Baltimore : Williams & Wilkins,
- Water Environment Federation. 1998. Biological and Chemical Systems for Nutrient Removal. A special publication under Technical Practice Committee, Alexandria, Va., USA.
- Woodbury, B.L., Dahab, M.F., Mihaltz, P., Csikor, Z. 1998. Evaluation of Reversible Fixed-Film Static-Bed Bio-Denitrification Reactors. Water Science and Technology 38 (1) : 311-318.
- Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Inamori, Y. 2001. Microbial Community Analysis in the Denitrification Process of Saline-Wastewater by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rDNA and the Cultivation Method. Journal of Bioscience and Bioengineering 92 (4) : 346-353.



ภาคผนวก

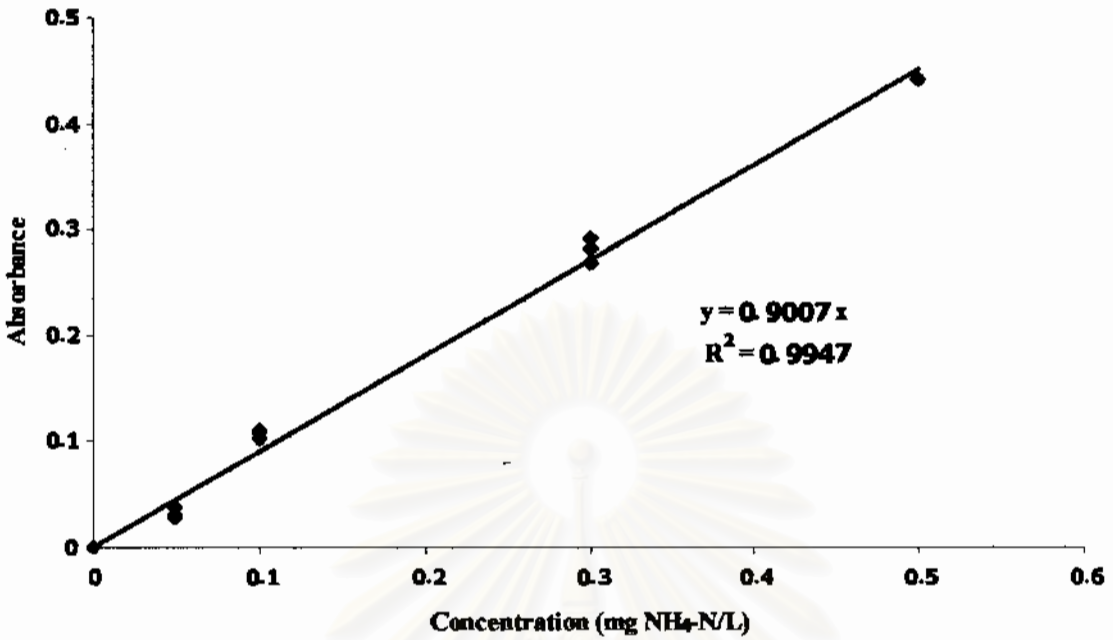
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



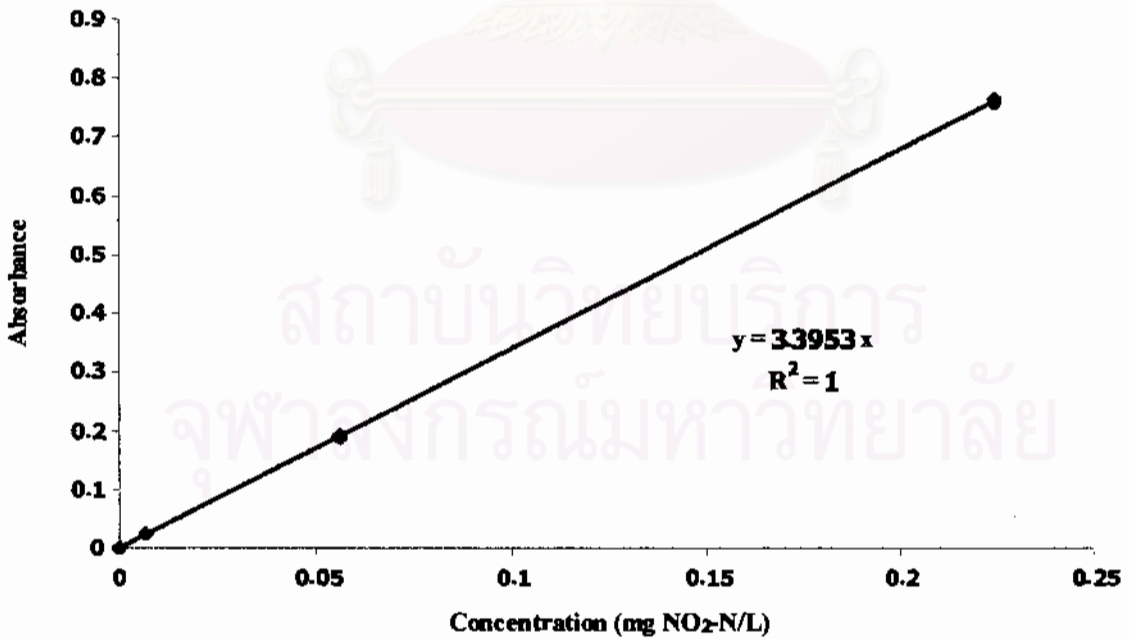
ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

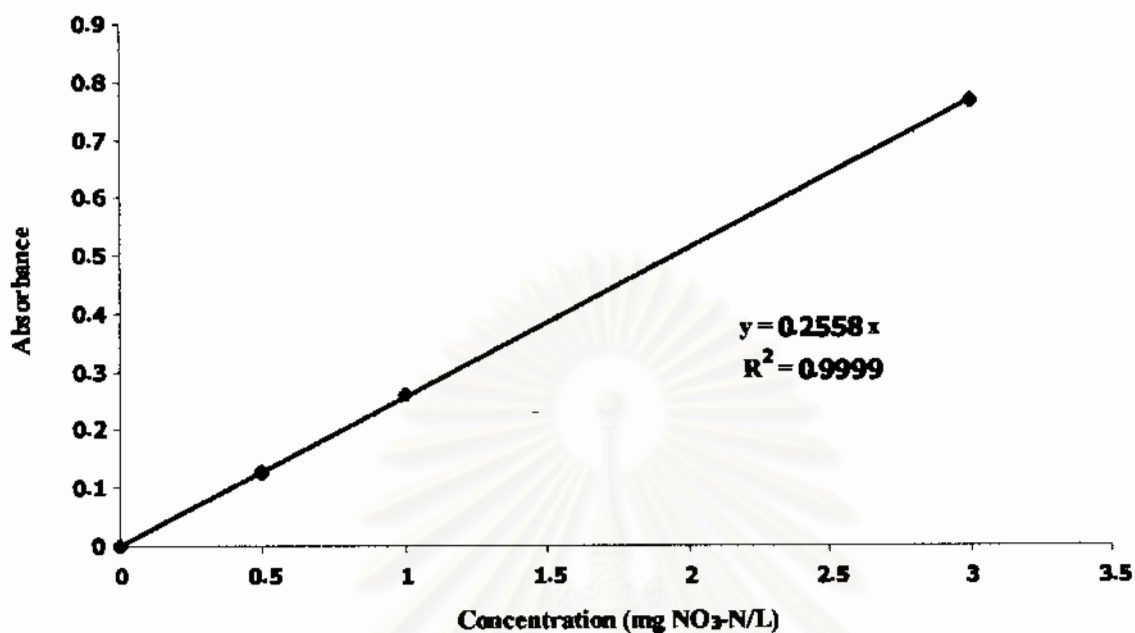




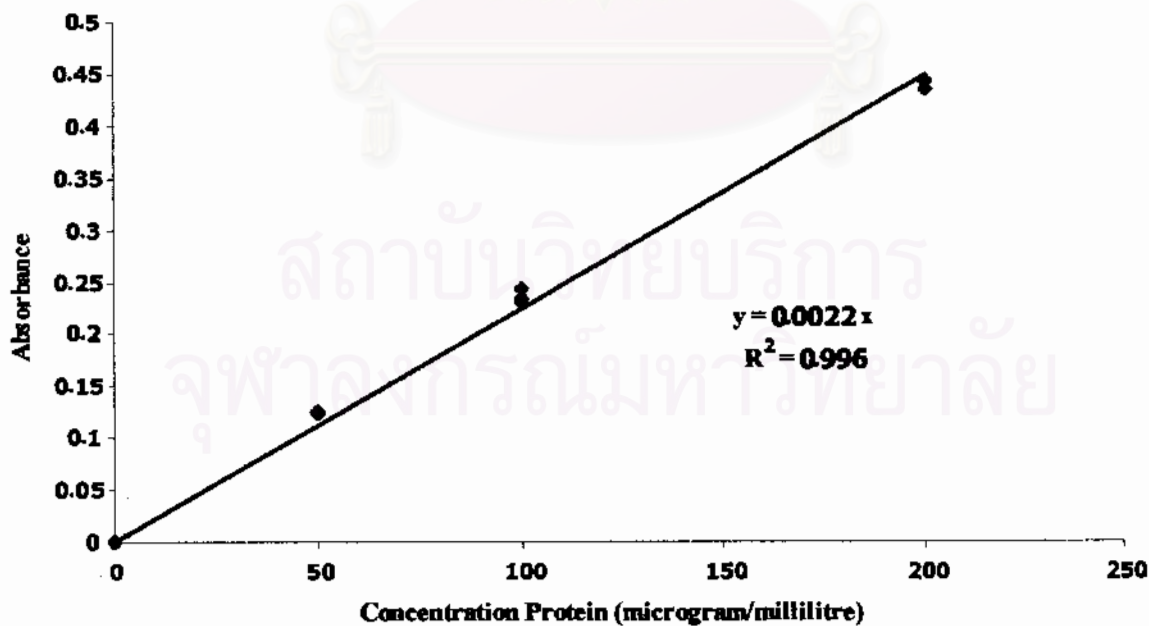
กราฟที่ 1 กราฟมาตรฐานของแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) (หัวข้อ 3.4.1)



กราฟที่ 2 กราฟมาตรฐานของไนไตรต์ ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) (หัวข้อ 3.4.2)



กราฟที่ 3 กราฟมาตรฐานของไนเตรด (NO<sub>3</sub>-N) (หัวข้อ 3.4.3)



กราฟที่ 4 กราฟมาตรฐานของโปรตีน(หัวข้อ 3.5.3)



ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ปริมาณแอมโมเนียม ไนโตรต์ ไนเตรต ในถังปฏิกรณ์ไนตริเคชัน (NR) การทดลอง  
ครั้งที่ 1 หัวข้อ 4.1.1.1

Date	Day	Nitrification reactor					
		NH <sub>4</sub> (mgNH <sub>4</sub> -N/L)	SD	NO <sub>2</sub> (mgNO <sub>2</sub> -N/L)	SD	NO <sub>3</sub> (mgNO <sub>3</sub> -N/L)	SD
26/2/03	0	3.371	0.544	0.061	0.002	6.300	0.033
27/2/03	1	0.279	0.072	0.089	0.003	4.060	0.055
28/2/03	2	0.411	0.049	0.129	0.004	4.241	0.013
1/3/03	3	0.030	0.052	0.049	0.003	3.264	0.003
2/3/03	4	0.047	0.082	0.103	0.032	4.919	0.003
3/3/03	5	0.246	0.427	0.230	0.007	6.010	0.008
4/3/03	6	0.029	0.003	0.073	0.002	4.935	0.007
5/3/03	7	0.010	0.008	0.079	0.001	5.119	0.013
6/3/03	8	0.024	0.023	0.073	0.001	5.215	0.025
7/3/03	9	1.987	0.284	0.768	0.011	4.033	0.009
8/3/03	10	1.062	0.105	1.066	0.003	4.572	0.000
9/3/03	11	0.826	0.080	1.341	0.007	5.091	0.005
10/3/03	12	0.000	0.000	1.367	0.007	5.042	0.010
11/3/03	13	0.009	0.008	1.230	0.003	4.917	0.003
12/3/03	14	0.034	0.015	1.169	0.005	5.018	0.000
13/3/03	15	0.017	0.029	1.046	0.002	4.812	0.003
14/3/03	16	0.061	0.016	1.021	0.002	4.891	0.040
15/3/03	17	0.392	0.037	1.028	0.017	4.896	0.003
16/3/03	18	0.031	0.002	0.857	0.036	4.631	0.010
17/3/03	19	0.022	0.009	0.814	0.014	4.632	0.002
18/3/03	20	0.019	0.012	0.723	0.008	4.680	0.253



ตารางที่ 1 (ต่อ) ปริมาณแอมโมเนียใน ไนโตรด ไนเตรด ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน (NR)  
การทดลองครั้งที่ 1

Date	Day	Nitrification reactor					
		NH <sub>4</sub> (mgNH <sub>4</sub> -N/L)	SD	NO <sub>2</sub> (mgNO <sub>2</sub> -N/L)	SD	NO <sub>3</sub> (mgNO <sub>3</sub> -N/L)	SD
19/3/03	21	0.026	0.005	0.579	0.014	4.327	0.004
20/3/03	22	0.028	0.005	0.476	0.017	4.231	0.016
21/3/03	23	0.021	0.005	0.407	0.002	4.103	0.002
22/3/03	24	0.027	0.003			4.220	0.005
23/3/03	25	0.019	0.003	0.354	0.002	3.784	0.005
24/3/03	26	0.018	0.006			3.954	0.008
25/3/03	27	0.022	0.011	0.333	0.001	4.453	0.005
26/3/03	28	0.019	0.007			4.480	0.005
27/3/03	29	0.012	0.008	0.139	0.002	3.647	0.005
28/3/03	30	0.011	0.007			3.101	0.009
29/3/03	31	0.015	0.004	0.044	0.001	3.066	0.008
30/3/03	32	0.059	0.004			2.790	0.009
31/3/03	33	0.052	0.007	0.031	0.002	2.869	0.000
4/4/03	37	6.623	0.308	0.060	0.001	2.283	0.024
5/4/03	38	3.651	0.364	0.162	0.003	2.228	0.024
6/4/03	39	3.778	0.584	0.276	0.003	2.409	0.024
7/4/03	40	3.331	0.349	0.356	0.004	2.980	0.024
8/4/03	41	2.237	0.146	0.408	0.004	4.233	0.024
9/4/03	42	2.187	0.098	0.453	0.004	4.637	0.042
10/4/03	43	1.925	0.154	0.489	0.002	4.971	0.072

ตารางที่ 1 (ต่อ) ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ ไนเตรต ในถังปฏิกรณ์ไนตริเคชัน (NR)  
การทดลองครั้งที่ 1

Date	Day	Nitrification reactor					
		NH <sub>4</sub> (mgNH <sub>4</sub> -N/L)	SD	NO <sub>2</sub> (mgNO <sub>2</sub> -N/L)	SD	NO <sub>3</sub> (mgNO <sub>3</sub> -N/L)	SD
11/4/03	44	1.402	0.109	0.540	0.006	5.013	0.000
12/4/03	45	1.850	0.073			5.681	0.084
13/4/03	46	5.154	0.587	0.832	0.003	5.890	0.084
14/4/03	47	5.052	0.317	1.058	0.012	6.252	0.064
15/4/03	48	5.020	0.337	1.058	0.011	6.823	0.024
16/4/03	49	4.572	0.554	1.348	0.011	7.324	0.064
17/4/03	50	4.284	0.762	1.833	0.020	7.672	0.048
18/4/03	51	4.358	0.216	2.264	0.009	8.507	0.024
19/4/03	52	3.678	0.418	2.459	0.006	8.159	0.121
20/4/03	53	3.122	0.082	2.475	0.024	10.262	0.024
21/4/03	54	0.910	0.176	2.846	0.045	10.847	0.316
22/4/03	55	0.350	0.047	3.542	0.065	10.304	0.121
23/4/03	56	0.134	0.018	2.484	0.011	8.925	0.024
24/4/03	57	0.072	0.078	2.490	0.010	8.466	0.128
25/4/03	58	0.000	0.000	2.271	0.009	9.663	0.024

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรค ในเครื่อง ไนเตรต ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (DNR) การทดลอง  
ครั้งที่ 1 หัวข้อ 4.1.1.2

Date	Day	Denitrification reactor					
		NH <sub>4</sub> (mgNH <sub>4</sub> -N/L)	SD	NO <sub>2</sub> (mgNO <sub>2</sub> -N/L)	SD	NO <sub>3</sub> (mgNO <sub>3</sub> -N/L)	SD
26/2/03	0	0.299	0.142	0.104	0.008	48.923	0.000
27/2/03	1	0.062	0.035	0.121	0.005	50.467	0.081
28/2/03	2	0.518	0.434	1.783	0.006	50.467	0.141
1/3/03	3	0.000	0.000	4.351	0.099	47.758	0.094
2/3/03	4	0.000	0.000	5.573	0.015		
3/3/03	5	0.000	0.000	6.357	0.372	48.761	0.081
4/3/03	6	0.094	0.007	6.347	0.064	47.737	0.025
5/3/03	7	0.098	0.005	7.605	0.189	49.868	0.044
6/3/03	8	0.096	0.005	7.673	0.172	49.192	0.067
7/3/03	9	0.097	0.002	7.742	0.411	48.530	0.092
8/3/03	10	0.083	0.008	7.648	0.302	47.942	0.092
9/3/03	11	0.008	0.014	7.412	0.217	48.971	0.025
10/3/03	12	0.014	0.004	7.746	0.051	49.907	0.025
11/3/03	13	0.001	0.001	7.412	0.245	49.630	0.068
12/3/03	14	0.005	0.005	6.745	0.164	47.338	0.044
13/3/03	15	0.003	0.005	6.794	0.167	47.708	0.068
14/3/03	16	0.000	0.000	6.804	0.102	48.225	0.154
15/3/03	17	0.000	0.000	5.933	0.119	47.175	0.026
16/3/03	18	0.031	0.027	5.709	0.061	47.391	0.188
17/3/03	19	0.000	0.000	5.601	0.078	47.613	0.025
18/3/03	20	0.028	0.032	5.914	0.150	47.969	0.000

ตารางที่ 2 (ต่อ) ปริมาณแอมโมเนียม ไนโตรด ไนเตรด ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน การทดลอง  
ครั้งที่ 1

Date	Day	Denitrification reactor					
		NH <sub>4</sub> (mgNH <sub>4</sub> -N/L)	SD	NO <sub>2</sub> (mgNO <sub>2</sub> -N/L)	SD	NO <sub>3</sub> (mgNO <sub>3</sub> -N/L)	SD
19/3/03	21	0.048	0.030	5.102	0.280	47.955	0.025
20/3/03	22	0.015	0.005	4.721	0.163	47.941	0.025
21/3/03	23	0.016	0.009			46.516	0.000
22/3/03	24	0.029	0.009	4.213	0.052	43.924	0.047
23/3/03	25	0.022	0.004			45.184	0.095
24/3/03	26	0.023	0.003	4.027	0.061	44.992	0.095
25/3/03	27	0.021	0.003			44.855	0.047
26/3/03	28	0.020	0.004	3.602	0.033	44.435	0.049
27/3/03	29	0.022	0.003			45.550	0.047
28/3/03	30	0.017	0.003	3.415	0.048	44.408	0.047
29/3/03	31	0.014	0.002			43.104	0.047
30/3/03	32	0.000	0.000	2.051	0.013	42.286	0.047
31/3/03	33	0.000	0.000			42.584	0.081
1/4/03	34	0.000	0.000	2.866	0.023	40.796	0.000
2/4/03	35	0.000	0.000			42.672	0.000
3/4/03	36	0.000	0.000	2.663	0.018	43.806	0.081
4/4/03	37	0.000	0.000			43.644	0.000
5/4/03	38	0.000	0.000	2.581	0.025	43.401	0.081
6/4/03	39	0.000	0.000			44.103	0.047
7/4/03	40	0.008	0.005	2.791	0.020	43.671	0.047



ตารางที่ 2 (ต่อ) ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ ไนเตรด ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน  
การทดลองครั้งที่ 1

Date	Day	Denitrification reactor					
		NH <sub>4</sub> (mgNH <sub>4</sub> -N/L)	SD	NO <sub>2</sub> (mgNO <sub>2</sub> -N/L)	SD	NO <sub>3</sub> (mgNO <sub>3</sub> -N/L)	SD
8/4/03	41	0.015	0.002			42.294	0.047
9/4/03	42	0.197	0.016	3.067	0.028	42.405	0.000
10/4/03	43	0.240	0.007			41.309	0.046
11/4/03	44	0.327	0.013	3.482	0.009	41.176	0.046
12/4/03	45	0.719	0.039	8.295	0.062	38.636	0.046
13/4/03	46	0.050	0.002	21.580	0.043	33.653	0.080
14/4/03	47	0.035	0.004	10.649	0.075	20.410	0.122
15/4/03	48	0.398	0.039	1.389	0.004	9.406	0.046
16/4/03	49	0.084	0.012	0.122	0.007	9.592	0.000
17/4/03	50	0.036	0.001	0.089	0.005	8.127	0.122
18/4/03	51	0.000	0.000	0.091	0.003	8.586	0.047
18/4/03	51	0.000	0.000	0.146	0.000	50.061	0.081
19/4/03	52	0.827	0.005	0.139	0.001	4.602	0.081
20/4/03	53	0.791	0.010	0.028	0.001	4.873	0.048
21/4/03	54	0.812	0.018	0.071	0.000	5.430	0.000
22/4/03	55	0.525	0.028	0.094	0.000	5.013	0.000
23/4/03	56	0.403	0.023	0.025	0.021	6.823	0.096

ตารางที่ 3 ค่าพีเอชและอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์(NR)และ(DNR) การทดลองครั้งที่ 1 หัวข้อ 4.1.1.4 และ 4.1.1.5

Date	Day	NR	DNR	DNR	Date	Day	NR	DNR	DNR
		pH	pH	temp			pH	pH	temp
02/26/03	0	7.66	7.47		25/3/03	27	8.14	6.83	28
02/27/03	1	7.82	7.24		26/3/03	28	8.06	6.67	26.5
02/28/03	2	8.04	7.3	29	27/3/03	29	8.06	6.83	27
03/01/03	3	8.22	7.32	29.5	28/3/03	30	8.14	6.77	
03/02/03	4	8.16	7.2	28	29/3/03	32	8.11	6.79	26.5
03/03/03	5	8.13	7.22		30/3/03	33	8.14	6.73	27
03/04/03	6	8.17	7.16	29	31/3/03	34	8.06	6.81	29
03/05/03	7	8.06	7.14	28	1/4/03	35	7.96	6.89	29
03/06/03	8	7.86			2/4/03	36	7.87	6.76	
03/07/03	9	7.87	7.23	28.5	3/4/03	37		6.73	29.5
03/08/03	10	8.14	7.28	30	4/4/03	38		6.84	29
03/09/03	11	7.94	7.17	30	5/4/03	39		6.7	30.5
03/10/03	12	8.1	7.12	28.5	6/4/03	40		6.77	30
03/11/03	13	7.94	7.07	27.5	9/4/03	43		6.86	30
03/12/03	14	8.05	7.14	29.5	10/4/03	44		6.74	30
03/13/03	15	8.1	7.2	28	11/4/03	45		6.68	
03/14/03	16	7.94	7.08	29	12/4/03	46	8.04		29
03/15/03	17	8.01	7.13		13/4/03	47	7.71	6.77	29.5
03/16/03	18	8.02	6.97	29	14/4/03	48	7.75	6.81	30
03/17/03	19	7.94	6.95	29	15/4/03	49	7.7	6.87	29
03/18/03	20	8.23	6.9	29	16/4/03	50	7.6	6.82	30
03/19/03	21	7.84	7.14		17/4/03	51	8.14	6.92	
03/20/03	22	8	6.88	28.5	18/4/03	52	7.8	6.61	30
21/3/03	23	8.11	6.89	28.5	19/4/03	53	8.04	6.6	30
22/3/03	24	7.9	7.01		20/4/03	54	7.7	7.13	
23/3/03	25	8.15	6.81	27.5	21/4/03	55	7.58	7	30
24/3/03	26	8.01	6.62	25	22/4/03	56	7.55	7.07	30

ตารางที่ 4 ปริมาณโปรตีนของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพถึงปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและ  
ดีไนตริฟิเคชัน การทดลองครั้งที่ 1 หัวข้อ 4.1.2.2

วันที่ทำการ ทดลอง	bioball ลูกที่	ปริมาณโปรตีนในไบโอบอล	
		ถึง NR(mg/bioball)	ถึง DNR(mg/bioball)
11	1	0.050	0.057
		0.060	0.052
		0.052	0.064
	2	0.048	0.090
		0.038	0.057
		0.055	0.069
	3	0.045	0.062
		0.043	0.060
		0.055	0.050
19	1	0.089	0.126
		0.116	0.147
		0.087	0.097
	2	0.092	0.118
		0.089	0.147
		0.076	0.103
	3	0.089	0.118
		0.129	0.153
		0.084	0.108

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณโปรตีนแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพถังปฏิกรณ์ในครีฟ  
เคชันและดีในครีฟเคชัน ในตารางที่ 4

t-Test: Paired Two Sample for Means				
	วันที่ 11		วันที่ 19	
	Variable 1 (ถัง NR)	Variable 2 (ถัง DNR)	Variable 1 (ถัง NR)	Variable 2 (ถัง DNR)
Mean	0.049471	0.062434	0.094737	0.124269
Variance	4.5E-05	0.000144	0.000277	0.000426
Observations	3	3	3	3
Pearson Correlation	-0.15435		0.78415	
Hypothesized Mean Difference	0		0	
df	8		8	
t Stat	-2.6574		-6.91635	
P(T<=t) one-tail	0.014461		6.12E-05	
t Critical one-tail	1.859548		1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.028922		0.000122	
t Critical two-tail	2.306006		2.306006	

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 6 ปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพหลังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน  
การทดลองครั้งที่ 1 หัวข้อ 4.1.2.3

Nitrification reactor								
bacteria	colony/bioball	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
TB	2.10E+07	1.80E+06	39	1.00E+04	46	1.00E+04	41	1.00E+04
NB	-	-	-	-	-	-	-	-
DNB	1.77E+07	8.89E+06	16	1.00E+04	39	1.00E+04	51	1.00E+04
SB	0.00E+00	-	0	-	0	-	0	-
VB	1.40E+04	5.29E+03	20	1.00E+01	20	1.00E+01	12	1.00E+01

Denitrification reactor								
bacteria	colony/bioball	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
TB	5.00E+06	-	68	1.00E+04	42	1.00E+04	80	1.00E+04
NB	6.30E+06	-	54	1.00E+04	-	-	-	-
DNB	1.73E+06	1.18E+06	29	1.00E+05	9	1.00E+05	-	-
SB	0.00E+00	0.00E+00	0	1.00E+00	0	-	0	-
VB	6.03E+03	3.14E+03	131	1.00E+01	263	1.00E+01	305	1.00E+01

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ค

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพถึงปฏิกรณ์ NR และ DNR การทดลองครั้งที่ 1 ด้วยโปรแกรม BLASTN จาก National Center for Biotechnology Information

Band	Code	Bacteria	Score bit	E value	% identities	% gaps
a	X95459	<i>Methylophaga marina</i> mRNA for 16S ribosomal RNA	313	6e-83	99	0
	X87338	<i>Methylophaga marina</i> gene for 16S ribosomal RNA	299	9e-79	98	1
	AF387346	<i>Shewanella</i> sp.	256	1e-65		
b	AJ416681	<i>Marinobacter</i> sp.	216	1e-53	96	
	AF513454	Alteromonadaceae bacterium LA50	212	2e-52		

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียที่สำคัญในตัวกรองชีวภาพไบโอบอลถึงปฏิกรณ์ในครีเฟลชันและถึงปฏิกรณ์ดีในครีเฟลชัน

Band	Bacteria	sequence
a	<i>Methylophaga marina</i>	CGGGATGCGGGGCTTCTTCTATAGGTAACGTCACAGATTGC AAGGTATTAACCTTACAACCTTTCCTCCCTAATTGAAAGTGCT TTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGG ATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAATATTCCTCCACTGCTGCC TCCCGTAGGAGTCCCCCGTGGCCCCGCCCCNCCCNCCCCG GGGGGGGGGGGG
b	<i>Marinobacter</i> sp.	CCGGAGATNACGGGGCTTCTTCTGAGGGTACGTNCCNNNT CTGGAGNGNGAATAAACGACCAACTTTTCCTCCTCACTGA AAGGGNTTACAACCCGAAAGCCTTCTNGACACACGCGGC ATGGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTGCAATATTCCTCA CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCCCCCGGGGCCCCGNCCCGC CCGGCGGGGGGGGGGGGG



ภาคผนวก ง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 1 ปริมาณแอมโมเนียม ไนโตรเจน ในไตรต์ ไนเตรด ในถังปฏิกรณ์ในครีทีเคชัน การทดลองครั้งที่ 2

หัวข้อ 4.2.1.1

Date	Day	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mgN/L)	SD	Date	Day	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mgN/L)	SD	Date	Day	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mgN/L)	SD
08/06/03	0	2.206	0.178	8/6/03	0	0.010	0.001	08/06/03	0	3.126	0.031
08/07/03	1	1.635	0.037	8/7/03	1	0.046	0.001	08/07/03	1	3.546	0.002
08/08/03	2	1.490	0.162	8/8/03	2	0.040	0.001	08/08/03	2	3.592	0.002
08/09/03	3	1.384	0.205	8/9/03	3	0.048	0.000	08/09/03	3	3.715	0.010
08/10/03	4	1.818	0.133	8/10/03	4	0.047	0.001	08/10/03	4	3.755	0.002
08/11/03	5	0.957	0.254	8/11/03	5	0.495	0.002	08/11/03	5	3.870	0.004
08/12/03	6	1.573	0.199	8/12/03	6	0.058	0.001	08/12/03	6	4.006	0.007
08/13/03	7	0.804	0.052	8/13/03	7	0.059	0.001	08/13/03	7	3.244	0.012
08/14/03	8	0.294	0.000	8/14/03	8	0.063	0.001	08/14/03	8	3.331	0.002
	8	2.128	0.324	8/15/03	9	0.175	0.004	08/14/03	8	3.336	0.010
08/15/03	9	2.018	0.264	8/16/03	10	0.070	0.000	08/15/03	9	3.373	0.004
08/16/03	10	1.762	0.329	8/17/03	11	0.074	0.002	08/16/03	10	3.656	0.012
08/17/03	11	1.649	0.033	8/18/03	12	0.096	0.002	08/17/03	11	3.349	0.011
08/18/03	12	1.717	0.180	8/19/03	13	0.074	0.026	08/18/03	12	3.454	0.006
08/19/03	13	1.226	0.144	8/20/03	14	0.097	0.000	08/19/03	13	3.473	0.023
08/20/03	14	1.426	0.270	8/21/03	15	0.126	0.002	08/20/03	14	3.505	0.011
08/21/03	15	1.404	0.192	8/22/03	16	0.160	0.001	08/21/03	15	3.499	0.000
08/22/03	16	1.030	0.082	8/23/03	17	0.224	0.020	08/22/03	16	3.551	0.023
08/23/03	17	1.049	0.231	8/24/03	18	0.248	0.003	08/23/03	17	3.544	0.011
08/24/03	18	0.778	0.137	8/25/03	19	0.321	0.002	08/24/03	18	3.629	0.011
08/25/03	19	0.855	0.149	8/26/03	20	0.395	0.002	08/25/03	19	3.636	0.020
08/26/03	20	0.799	0.055	8/27/03	21	0.495	0.007	08/26/03	20	3.563	0.002
08/27/03	21	0.678	0.067	8/28/03	22	0.584	0.002	08/27/03	21	3.815	0.000
08/28/03	22	0.511	0.137	8/29/03	23	0.665	0.004	08/28/03	22	4.062	0.002
08/29/03	23	0.449	0.114	8/30/03	24	0.456	0.004	08/29/03	23	4.204	0.018
08/30/03	24	0.211	0.071	8/31/03	25	0.791	0.004	08/30/03	24	5.000	0.039
08/31/03	25	0.050	0.043	9/1/03	26	0.852	0.007	08/31/03	25	4.423	0.000
09/01/03	26	2.415	0.136	9/2/03	27	0.952	0.004	09/01/03	26	4.592	0.124
09/02/03	27	1.862	0.064	9/3/03	28	0.965	0.006	09/02/03	27	4.748	0.011
09/03/03	28	1.560	0.241	9/4/03	29	1.048	0.009	09/03/03	28	5.210	0.023
09/04/03	29	1.340	0.311	9/5/03	30	1.060	0.003	09/04/03	29	5.682	0.011
09/05/03	30	1.563	0.014	9/7/03	32	1.224	0.003	09/05/03	30	5.682	0.011

ตารางที่ 1 (ต่อ) ปริมาณแอมโมเนียม ไนโตรส ไนเตรต ในถังปฏิกรณ์ในศรีพีเคชั่น การทดลองครั้งที่ 2

Date	Day	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mgN/L)	SD
09/07/03	32	0.789	0.060
09/08/03	33	0.874	0.048
09/09/03	34	2.572	0.092
09/10/03	35	1.909	0.184
09/11/03	36	1.434	0.261
09/12/03	37	1.129	0.129
09/13/03	38	0.445	0.057
09/14/03	39	0.219	0.015
09/15/03	40	0.111	0.006
09/16/03	41	2.218	0.241
09/17/03	42	1.603	0.022
09/18/03	43	0.664	0.159
09/19/03	44	0.219	0.159
09/20/03	45	2.079	0.135
09/21/03	46	1.370	0.052
09/22/03	47	0.963	0.016
09/23/03	48	0.261	0.092
09/24/03	49	0.078	0.006
09/25/03	50	2.250	0.247
09/26/03	51	1.651	0.342
09/27/03	52	0.640	0.077
09/28/03	53	0.298	0.050
09/29/03	54	0.217	0.081
	54	2.034	0.311
09/30/03	55	1.343	0.250
10/01/03	56	0.964	0.057

Date	Day	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mgN/L)	SD
9/8/03	33	1.342	0.002
9/9/03	34	1.667	0.000
9/10/03	35	1.905	0.012
9/11/03	36	2.073	0.005
9/12/03	37	2.988	0.003
9/13/03	38	3.305	0.006
9/14/03	39	3.328	0.010
9/15/03	40	3.530	0.015
9/16/03	41	2.273	0.004
9/17/03	42	2.541	0.007
9/18/03	43	3.440	0.008
9/19/03	44	3.568	0.168
9/20/03	45	4.996	0.035
9/21/03	46	4.931	0.035
9/22/03	47	5.547	0.037
9/23/03	48	5.774	0.045
9/24/03	49	6.011	0.032
9/25/03	50	6.465	0.048
9/26/03	51	6.571	0.035
9/27/03	52	6.330	0.035
9/28/03	53	6.882	0.028
9/29/03	54	6.887	0.029
9/30/03	55	7.387	0.016
10/1/03	56	7.698	0.021

Date	Day	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mgN/L)	SD
09/07/03	32	6.102	0.039
09/08/03	33	6.201	0.020
09/09/03	34	6.601	0.023
09/10/03	35	6.490	0.041
09/11/03	36	6.785	0.023
09/12/03	37	8.438	0.023
09/13/03	38	8.373	0.045
09/14/03	39	8.031	0.068
09/15/03	40	8.661	0.000
09/16/03	41	7.687	0.022
09/17/03	42	8.258	0.027
09/18/03	43	10.840	0.023
09/19/03	44	8.916	0.038
09/20/03	45	9.518	0.022
09/21/03	46	9.241	0.022
09/22/03	47	10.161	0.022
09/23/03	48	10.224	0.022
09/24/03	49	10.262	0.022
09/25/03	50	11.166	0.200
09/26/03	51	10.951	0.044
09/27/03	52	10.156	0.022
09/28/03	53	11.771	0.038
09/29/03	54	11.898	0.022
09/30/03	55	12.087	0.058
10/01/03	56	12.301	0.038

ตารางที่ 2 ปริมาณแอมโมเนียม ไนโตรค์ ไนเตรต ในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน การทดลองครั้งที่ 2

หัวข้อ 4.2.1.2

Date	Day	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mgNH <sub>4</sub> -N/L)	SD	Date	Day	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mgNO <sub>2</sub> -N/L)	SD	Date	Day	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mgNO <sub>3</sub> -N/L)	SD
6/8/03	0	0.061	0.005	6/8/03	0	0.028	0.000	6/8/03	0	53.830	0.224
7/8/03	1	0.797	0.075	7/8/03	1	44.416	0.074	7/8/03	1	46.040	0.000
8/8/03	2	10.918	1.488	8/8/03	2	12.721	0.206	8/8/03	2	26.346	0.045
9/8/03	3	10.024	0.542	9/8/03	3	0.171	0.000	9/8/03	3	10.844	0.045
10/8/03	4	22.773	2.433	10/8/03	4	0.199	0.000	10/8/03	4	10.145	0.045
11/8/03	5	3.951	0.390	11/8/03	5	0.171	0.000	11/8/03	5	8.230	0.078
12/8/03	6	7.175	1.038	12/8/03	6	38.610	0.174		5	58.282	0.045
13/8/03	7	8.773	1.788	13/8/03	7	17.243	0.264	12/8/03	6	53.003	0.249
14/8/03	8	2.273	0.567	14/8/03	8	0.341	0.028	13/8/03	7	31.271	0.089
15/8/03	9	1.025	0.158	15/8/03	9	21.755	0.296	14/8/03	8	9.152	0.045
16/8/03	10	1.937	0.387	16/8/03	10	8.768	0.213		8	54.679	0.409
17/8/03	11	2.262	0.170	17/8/03	11	0.512	0.028	15/8/03	9	42.872	0.118
18/8/03	12	4.520	0.865	18/8/03	12	1.223	0.028	16/8/03	10	12.781	0.090
19/8/03	13	7.029	1.249	19/8/03	13	4.272	0.052	17/8/03	11	3.384	0.045
20/8/03	14	8.722	0.839	20/8/03	14	6.572	0.207		11	42.405	0.078
21/8/03	15	11.527	1.195	21/8/03	15	15.364	0.258	18/8/03	12	42.718	0.078
22/8/03	16	9.025	0.625	22/8/03	16	7.279	0.091	19/8/03	13	34.741	0.090
23/8/03	17	10.226	1.090	23/8/03	17	8.653	0.271	20/8/03	14	29.815	0.119
24/8/03	18	9.055	1.631	24/8/03	18	9.420	0.295	21/8/03	15	26.297	0.045
25/8/03	19	8.186	0.991	25/8/03	19	8.643	0.271	22/8/03	16	22.518	0.000
26/8/03	20	10.520	0.732	26/8/03	20	4.744	0.217	23/8/03	17	17.435	0.000
27/8/03	21	8.105	0.698	27/8/03	21	3.503	0.093	24/8/03	18	14.751	0.045
28/8/03	22	4.884	0.243	28/8/03	22	0.212	0.002	25/8/03	19	11.572	0.000
29/8/03	23	0.865	0.055	29/8/03	23	0.026	0.001	26/8/03	20	97.766	0.225
30/8/03	24	0.324	0.117	30/8/03	24	0.019	0.021	27/8/03	21	90.101	0.078
31/8/03	25	0.403	0.136	31/8/03	25	0.199	0.029	28/8/03	22	69.161	0.119
1/9/03	26	0.229	0.068	1/9/03	26	0.074	0.021	29/8/03	23	3.585	0.000
2/9/03	27	0.195	0.098	2/9/03	27	0.032	0.032		23	94.336	0.180
3/9/03	28	0.140	0.124	3/9/03	28	0.014	0.014	30/8/03	24	4.313	0.023
4/9/03	29	1.209	0.045	4/9/03	29	0.037	0.008		24	83.840	0.045

ตารางที่ 2 (ต่อ) ปริมาณแอมโมเนียม ไนโตรด ไนเตรด ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชัน การทดลอง  
ครั้งที่ 2

Date	Day	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mgNH <sub>4</sub> -N/L)	SD	Date	Day	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mgNO <sub>2</sub> -N/L)	SD	Date	Day	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mgNO <sub>3</sub> -N/L)	SD
5/9/03	30	4.911	0.914	5/9/03	30	0.009	0.016	31/8/03	25	6.469	0.000
7/9/03	32	8.941	0.495	7/9/03	32	0.000	0.000		25	89.842	0.090
8/9/03	33	9.495	0.680	8/9/03	33	0.000	0.000	1/9/03	26	4.495	0.090
9/9/03	34	8.354	1.566	9/9/03	34	0.213	0.008		26	110.340	0.045
10/9/03	35	7.217	0.702	10/9/03	35	0.014	0.024	2/9/03	27	27.454	0.120
11/9/03	36	5.526	0.658	11/9/03	36	0.195	0.000		27	211.352	0.301
12/9/03	37	5.958	0.305	12/9/03	37	0.130	0.000	3/9/03	28	144.094	0.000
13/9/03	38	7.896	0.528	13/9/03	38	0.152	0.002	4/9/03	29	100.866	0.000
14/9/03	39	10.286	0.930	14/9/03	39	0.162	0.003	5/9/03	30	94.934	0.120
15/9/03	40	10.908	0.460	15/9/03	40	0.101	0.002	7/9/03	32	94.514	0.091
16/9/03	41	8.737	1.631	16/9/03	41	0.028	0.000	8/9/03	33	92.388	0.091
17/9/03	42	7.126	0.650	17/9/03	42	0.023	0.008	9/9/03	34	46.745	0.045
18/9/03	43	8.377	0.197	18/9/03	43	0.000	0.000	10/9/03	35	4.646	0.079
19/9/03	44	6.032	0.086	19/9/03	44	0.959	0.014		35	186.877	0.495
20/9/03	45	8.201	0.248	20/9/03	45	0.366	0.008	11/9/03	36	125.591	0.079
21/9/03	46	9.239	1.183	21/9/03	46	0.042	0.000	12/9/03	37	138.714	0.045
22/9/03	47	8.913	0.613	22/9/03	47	0.120	0.008	13/9/03	38	133.622	0.417
23/9/03	48	9.408	0.521	23/9/03	48	0.120	0.008	14/9/03	39	123.465	0.136
24/9/03	49	9.347	0.337	24/9/03	49	0.088	0.008	15/9/03	40	117.402	0.157
25/9/03	50	9.732	1.159	25/9/03	50	0.056	0.000		40	311.942	0.601
26/9/03	51	9.400	0.300	26/9/03	51	0.042	0.000	16/9/03	41	168.222	0.157
27/9/03	52	6.625	0.816	27/9/03	52	0.093	0.016	17/9/03	42	142.438	0.226
28/9/03	53	5.082	0.257	28/9/03	53	0.097	0.000	18/9/03	43	135.967	0.271
29/9/03	54	6.639	0.916	29/9/03	54	0.074	0.008	19/9/03	44	100.477	0.230
30/9/03	55	5.312	0.487	30/9/03	55	0.107	0.008	20/9/03	45	47.151	0.044
1/10/03	56	3.411	0.177	1/10/03	56	0.070	0.000	21/9/03	46	5.068	0.000



ตารางที่ 2 (ต่อ) ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ ไนเตรต ในถังปฏิกรณ์ดีไนริฟิเคชัน  
การทดลองครั้งที่ 2

Date	Day	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mgNO <sub>3</sub> -N/L)	SD
	46	174.987	0.289
22/9/03	47	153.114	0.109
23/9/03	48	95.499	0.500
24/9/03	49	50.807	0.109
25/9/03	50	12.301	0.501
26/9/03	51	5.362	0.219
	51	173.669	0.289
27/9/03	52	141.559	0.189
28/9/03	53	90.146	0.109
29/9/03	54	52.296	0.109
	54	210.384	0.109
30/9/03	55	175.814	0.328
1/10/03	56	140.676	0.219

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 อัตราการบำบัดแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ไนตริไฟเคชันและอัตราการบำบัดไนเตรคในถังปฏิกรณ์ดีไนตริไฟเคชัน การทดลองที่ 2 หัวข้อ 4.2.1.1 และ 4.2.1.2

day	mgNH <sub>4</sub> -N/Bioball/day	mgNH <sub>4</sub> -N/L/day
0-8	0.0016	0.2176
8-25	0.0008	0.1126
26-32	0.0018	0.2538
34-39	0.0034	0.4702
41-44	0.0050	0.6936
45-48	0.0042	0.5861
50-53	0.0049	0.6869
54-56	0.0038	0.5346

day	mgNO <sub>3</sub> -N/Bioball/day	mgNO <sub>3</sub> -N/L/day
0-5	0.072	10.034
5-8	0.121	16.912
8-11	0.131	18.398
11-19	0.030	4.1524
20-23	0.217	30.348
23-24	0.643	90.023
24-25	0.553	77.371
25-26	0.610	85.347
26-27	0.592	82.886
27-29	0.395	55.243
33-35	0.313	43.871
40-46	0.307	43.026
46-50	0.305	42.768
51-54	0.297	41.553
54-56	0.249	34.854

ตารางที่ 4 ค่าอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ดีในครีฟิเคชัน การทดลองครั้งที่ 2 หัวข้อ 4.2.1.5

Date	Day	Temperature	Date	Day	Temperature
08/06/03	0	28	09/01/03	26	29
08/07/03	1	30	09/02/03	27	29
08/08/03	2	29	09/03/03	28	29
08/09/03	3	30	09/04/03	29	29
08/10/03	4	29	09/05/03	30	28
08/11/03	5	30	09/07/03	32	29
08/12/03	6	29	09/08/03	33	28
08/13/03	7	30	09/09/03	34	29
08/14/03	8	30	09/10/03	35	29
08/15/03	9	31	09/11/03	36	28
08/18/03	12	28	09/12/03	37	29
08/19/03	13	28	09/16/03	41	28
08/20/03	14	27	09/17/03	42	29
08/21/03	15	27	09/18/03	43	27
08/22/03	16	29	09/22/03	47	28
08/24/03	18	27	09/24/03	49	29
08/25/03	19	28	09/26/03	51	29
08/27/03	21	28	09/27/03	52	28
08/28/03	22	29	09/29/03	54	29
08/29/03	23	28	09/30/03	55	29
08/30/03	24	28	10/01/03	56	29

ตารางที่ 5 ค่าพีเอชในถังปฏิกรณ์ในครีทีเคชันและดีโนครีทีเคชัน การทดลองครั้งที่ 2 หัวข้อ 4.2.1.3

Date	Day	pH		Date	Day	pH	
		DNR	NR			DNR	NR
08/06/03	0	8.23	8.04	09/01/03	26	7.8	7.93
08/07/03	1	6.75	8.19	09/02/03	27	7.71	7.91
08/08/03	2	5.71	7.89	09/03/03	28	7.82	7.88
08/09/03	3	6.02	8.16	09/04/03	29	7.67	7.59
08/10/03	4	6.69	7.98	09/10/03	35	7.72	8.12
08/11/03	5	6.12	8.03	09/11/03	36	7.9	8.11
08/12/03	6	5.36	7.92	09/12/03	37	7.77	8.04
08/13/03	7	5.81	7.89	09/13/03	38	7.74	8.11
08/14/03	8	6.28	7.94	09/15/03	40	7.78	8.06
08/15/03	9	6.68	7.87	09/16/03	41	7.61	7.97
08/18/03	12	7.11	7.89	09/17/03	42	7.86	7.81
08/19/03	13	7.09	7.88	09/18/03	43	7.86	8.16
08/20/03	14	6.97	7.89	09/19/03	44	8.03	8.14
08/21/03	15	7.56	7.83	09/21/03	46	7.52	7.61
08/22/03	16	7.67	7.85	09/22/03	47	7.84	8.32
08/23/03	17	7.39	7.82	09/24/03	49	7.69	7.54
08/24/03	18	7.38	7.84	09/26/03	51	7.52	7.59
08/25/03	19	7.4	7.85	09/30/03	55	8.14	7.92
08/30/03	24	7.56	7.86	10/01/03	56	7.87	8.17



ตารางที่ 6 ปริมาณ โปรตีนของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพถึงปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน การทดลองที่ 2 หัวข้อ 4.2.2.2

Day	Average Protein (mg/bioball)					Protein NR		Protein DNR	
	NR	SD	DNR	SD		(mg/bioball)	SD	(mg/bioball)	SD
8/20/03	0.1045	0.0222	0.0370	0.0167	1	0.0921	0.0012	0.0325	0.0007
					2	0.0913	0.0010	0.0556	0.0010
					3	0.1302	0.0011	0.0230	0.0007
9/3/03	0.0383	0.0182	0.2922	0.0127	1	0.0568	0.0002	0.3019	0.0015
					2	0.0204	0.0004	0.2778	0.0015
					3	0.0377	0.0027	0.2969	0.0028
17/9/03	0.1030	0.0055	0.5843	0.1167	1	0.1076	0.0007	0.4682	0.0012
					2	0.1045	0.0005	0.5833	0.0021
					3	0.0970	0.0003	0.7015	0.0017
1/10/03	0.0903	0.0215	0.7329	0.0910	1	0.1146	0.0004	0.8104	0.0018
					2	0.0736	0.0013	0.7556	0.0050
					3	0.0826	0.0002	0.6326	0.0038

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพถังปฏิกรณ์ในครีพีเคชัน การทดลองครั้งที่ 2

หัวข้อ 4.2.2.4

Nitrification reactor								
Week	TB	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
2	1.25E+06	3.54E+05	30	1.00E+03	20	1.00E+03	-	-
4	2.03E+06	1.86E+06	59	1.00E+02	80	1.00E+03	36	1.00E+03
6	2.80E+06	1.92E+06	12	1.00E+03	73	1.00E+03	83	1.00E+03
8	3.30E+06	2.83E+05	70	1.00E+03	62	1.00E+03		1.00E+03
Week	NB	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
2	4.00E+05	1.00E+05	8	1.00E+03	10	1.00E+03	6	1.00E+03
4	1.10E+06	6.36E+05	13	1.00E+03	31	1.00E+03	-	-
6	8.62E+06	7.37E+06	70	1.00E+02	290	1.00E+03	220	1.00E+03
8	1.32E+05	4.80E+04	35	1.00E+02	28	1.00E+02	16	1.00E+02
Week	DNB	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
2	6.51E+05	6.09E+05	27	1.00E+03	5	1.00E+03	7	1.00E+03
4	4.05E+06	1.36E+06	77	1.00E+03	56	1.00E+03	110	1.00E+03
6	5.53E+06	4.39E+06	96	1.00E+02	170	1.00E+03	152	1.00E+03
8	3.78E+06	2.43E+06	110	1.00E+03	97	1.00E+03	20	1.00E+03
Week	SB	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
2	0.00E+00	0.00E+00	0	0.00E+00	0	0.00E+00	0	0.00E+00
4	8.83E+02	1.04E+02	20	1.00E+00	17	1.00E+00	16	1.00E+00
6	1.67E+02	1.53E+02	6	1.00E+00	4	1.00E+00	0	1.00E+00
8	0.00E+00	0.00E+00	0	1.00E+00	0	1.00E+00	0	1.00E+00
Week	VB	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
2	1.17E+06	-	234	1.00E+02	-	-	-	-
4	0.00E+00	0.00E+00	0	1.00E+00	0	1.00E+00	0	1.00E+00
6	0.00E+00	0.00E+00	0	1.00E+00	0	1.00E+00	0	1.00E+00
8	0.00E+00	0.00E+00	0	1.00E+00	0	1.00E+00	0	1.00E+00

ตารางที่ 8 ปริมาณแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน การทดลองครั้งที่ 2

หัวข้อ 4.2.2.4

Denitrification reactor								
Week	TB	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
2	1.50E+07	-	3	1.00E+05	-	1.00E+05	-	1.00E+05
4	1.07E+08	3.06E+07	20	1.00E+05	28	1.00E+05	16	1.00E+05
6	2.42E+08	2.42E+08	39	1.00E+04	41	1.00E+05	100	1.00E+05
8	7.12E+08	2.55E+08	117	1.00E+05	201	1.00E+05	109	1.00E+05
Week	NB	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
2	2.83E+08	3.71E+08	4	1.00E+05	109	1.00E+05	-	1.00E+05
4	1.00E+08	4.77E+07	11	1.00E+05	30	1.00E+05	19	1.00E+05
6	1.92E+07	3.69E+06	41	1.00E+04	44	1.00E+04	30	1.00E+04
8	1.63E+07	5.58E+06	20	1.00E+04	41	1.00E+04	37	1.00E+04
Week	DNB	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
2	1.82E+07	4.54E+06	28	1.00E+04	46	1.00E+04	35	1.00E+04
4	1.25E+08	6.06E+07	32	1.00E+05	32	1.00E+05	11	1.00E+05
6	1.13E+08	6.81E+07	38	1.00E+05	12	1.00E+05	18	1.00E+05
8	3.90E+09	2.21E+09	287	1.00E+05	91	1.00E+06	114	1.00E+06
Week	SB	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
2	7.83E+04	2.57E+04	100	1.00E+01	200	1.00E+01	170	1.00E+01
4	2.10E+04	3.61E+03	40	1.00E+01	36	1.00E+01	50	1.00E+01
6	4.03E+04	1.05E+04	60	1.00E+01	80	1.00E+01	102	1.00E+01
8	3.93E+03	9.93E+02	87	1.00E+00	56	1.00E+00	93	1.00E+00
Week	VB	SD	Plate1	Dilution	Plate2	Dilution	Plate3	Dilution
2	1.41E+05	1.16E+05	90	1.00E+01	60	1.00E+01	36	1.00E+01
4	1.60E+06	7.00E+05	220	1.00E+02	190	1.00E+02	-	1.00E+02
6	7.01E+05	1.39E+05	110	1.00E+02	150	1.00E+02	97	1.00E+02
8	2.52E+05	4.85E+04	56	1.00E+02	70	1.00E+02	80	1.00E+02



ภาคผนวก ง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





# results of BLAST

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพถังปฏิกรณ์ NR และ DNR การทดลองครั้งที่ 2 ด้วยโปรแกรม BLASTN จาก National Center for Biotechnology Information

Band	Code	Bacteria	Score bit	E value	% identities	% gaps
A	AF550591	<b>Bacteroidetes bacterium Ko710</b>	218	3e-54	92	1
	AJ438177	<i>Sphingobacterium thalpophilum</i> strain DSM 11723T	210	6e-52	92	1
	X67851	<i>F.thalpophilum</i> (NCTC 11429)	204	4e-50	91	1
	AF380159	<i>Sphingobacterium</i> sp. F1	202	2e-49	91	1
B*	AB052965	<i>Pseudomonas</i> sp. ND137	54	1e-04	96	
	AF196563	Uncultured <i>Colwellia</i> clone MPD-9	54	1e-04	96	
	AF545657	Uncultured candidate division BD bacterium clone stbd14	54	1e-04	96	
	AF257815	Uncultured gamma proteobacterium WkA12	54	1e-04	96	
	AF257809	Uncultured alpha proteobacterium WkA06	54	1e-04	96	
	AY355294	Uncultured bacterium clone C6-E4	54	1e-04	96	
	AY226556	Unculture type I Methanotroph clone MB10gamma-k1	54	1e-04	96	
	C	AB069765	<b>Uncultured bacterium clone:DGGE band 1</b>	54	1e-04	100
AY239400		Uncultured bacterium clone rc4-36	54	1e-04	100	
AY313908		Uncultured <i>Cytophagales</i> bacterium clone P60-11	46.1	0.026	96	
AY245457		Uncultured delta proteobacterium clone ML17_DSV1	46.1	0.026	96	

ตารางที่ 1 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพถึงปฏิกรณ์ NR และ DNR ด้วยโปรแกรม BLASTN จาก National Center for Biotechnology Information

Band	Code	Bacteria	Score bit	E value	% identities	% gaps
D	AY345550	<b>Bacterium H21</b>	40.1	1.5	90	4
	AF417559	<i>Rhizobium gallicum</i> strain DASA12010	38.2	5.8	100	
	AY033321	Alpha proteobacterium R2A57 16S	38.2	5.8	100	
F*	AY167262	<i>Roseobacter</i> sp. ANT9276a	141	6e-31	91	
	AY167260	<i>Roseobacter</i> sp. ANT9270	141	6e-31	91	
	AY442178	Rhodobacteraceae bacterium	141	6e-31	91	
	AF468354	Arctic sea ice bacterium ARK1002	141	6e-31	91	
G	AF427480	<b>CFB group bacterium KbC5-B3</b>	145	3e-32	91	3
	AJ561121	<i>Reinekia marinisedimenta</i> , type strain DSM 15388T	97.6	7e-18	86	3
	AJ495638	Uncultured gamma proteobacterium	97.6	7e-18	86	3
	AF159684	Uncultured marine eubacterium HstpL93	95.6	3e-17	87	2
H	AB106120	<b>Alpha proteobacterium PWB3</b>	240	9e-61	98	0
	AB106125	Uncultured alpha proteobacterium	234	5e-59	98	0
	AF365544	Uncultured bacterium clone BT49M	204	5e-50	95	0
I	AY013647	<b>Uncultured Banisveld landfill bacterium BVB45</b>	58	7e-06	93	2
	AF544959	Uncultured delta proteobacterium clone 2-45	58	7e-06	93	2
	U70683	Unidentified alpha proteobacterium OM75	56	3e-05	94	2
	AY162932	Uncultured bacterium clone ZB-Z74	56	3e-05	92	
J	AY326517	<b>Uncultured soil bacterium clone 3-1 small</b>	161	5e-37	91	
	AF364565	Uncultured <i>Chlamydiales</i> bacterium clone P-5	153	1e-34	90	
	AF364563	Uncultured <i>Chlamydiales</i> bacterium clone P-3	153	1e-34	90	
	AY326518	Uncultured soil bacterium clone 4-1	143	1e-31	90	

ตารางที่ 1 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรียในตัวอย่างชีวภาพตั้งปฏิกรณ์ NR และ DNR ด้วยโปรแกรม BLASTN จาก National Center for Biotechnology Information

Band	Code	Bacteria	Score bit	E value	% identf ties	% gap s
K	AY364033	<i>Methylobacterium</i> sp. IEV8	159	3e-36	91	0
	AY456785	Uncultured bacterium clone ABW-255	159	3e-36	92	0
	AY037671	Uncultured earthworm cast bacter	159	3e-36	92	0
	AY337877	Uncultured gold mine bacterium	155	4e-35	90	2

หมายเหตุ แถบที่ถูกทำเครื่องหมาย \* แสดงว่าผลการวิเคราะห์ลำดับเบสได้แบคทีเรียที่มีค่า score bit และ E value เท่ากันจำนวนมาก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียที่สำคัญในตัวอย่างชีวภาพไปโอบอลถึงปฏิกรณ์ในกรณีเครื่องปฏิกรณ์ดีไนโตรฟิเคชันและในน้ำเสียเริ่มต้นการทดลองการทดลองครั้งที่ 2

Band	Bacteria	sequence
A	<b>Bacteroidetes bacterium</b>	CNNTTGNCGGNACTATTNGGTCANTGGGCGCAAGCCTGAACCAGCCA TGCTCGCGTGCAGTGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTTT ACGGGAATAAACCTTCTACGTGTAGGGAGCTGAAGGTACCGTATGA ATAAGGATCGGCTAACTCCNTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
B	<b>Pseudomonas sp. or Unculture Colwellia sp.</b>	TNNCNCNNNAGGNCACTATTGGACANTGGGCGGCAAGCCNTGC ACTCCAGCCATGCCGCGNTGCTGTGAAGAAGGCCNTCGGGGTTGNNA AGCNNTTTCANTANGGAAGAAAANCTGNCTNTTNGTAGNGNATNGAC GGGACCGTACCNAATANANAAAGCACCGGCTAACTCCGATGCCAGC AGCCGAAGNATAATANN
C	<b>Uncultured bacterium clone:DGGE</b>	CNNNNCNCNNGTGNGTGAGAATNTTTCNGACAATNGGCGCGGCAAN CCTTAACNCAGCNATTGCCCGCGTGTGTGGTGANGAATNGCCCTTCG GGTTGTNAAAGCACTTCAAGTAGGGANGAAAANCNGTGCNTCCNTA GNGNATAGCCCGTGTANATCTCCNNTNCAACANGCNCGGTANNACT CCGTGCCAGCAGCCGCGGATAATAN
D	<b>Bacterium H21</b>	CNNGTGTAGGGCAATATTGGACANTGGGCGGCAANCCTTGCATCCA GCCATGCCGCGNTGCTGTGAAGAAATGGCCCTNNGGTTGNNAAGCNC TTTCAATACGGAANAAAACCNCCTATNTGTAGGGNNNTGACGGGTA CCNTACCGAATAAAGANCGCACCCANGCNCNNACTCCCATGCCACNAG NCNAATATAATA
F	<b>Roseobacter sp.</b>	NCNACAGGTAAGNTAGCCAGGGCTTNTTTTNNCAGGGTACTGTCAT TATCATCCCTGGGCGAAAGAGCNITACGACTCNTAAGACCTNCATCA CTCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCNTNCGCCCATGTCCAAGATTC NCCANTGACTGCCNTCCGCTAGGAGTCNCCCGNGCCCCCCCCCGC CCGCCGCGCGGGGGGGCGGGGGN
G	<b>CFB group bacterium KbC5-B3</b>	NNNNNNNCTGGTGTGAANTATTNGACAANTGGGCGGCAANCCNTG ACTCCAGCCATGCCGCGNTGCTGTGAAGAAGGCCCTCGGGGTTGTAA AGCACTTTCATTGAGGAAGAAAAGCTATGNNTTAATACGTNATAGCC GTGTACNTACTCAATANAAGAAGCACCGGCTAACTCCGATGCCAGC AGCCGCGGATAATA



ตารางที่ 2 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียที่สำคัญในตัวกรองชีวภาพ ไบโอบอดักซ์ปฏิกรณ์ในครีทีเคชั่นดักซ์ปฏิกรณ์ดีในครีทีเคชั่นและในน้ำเสียเริ่มต้นการทดลอง

Band	Bacteria	sequence
H	<b>Alpha proteobacterium</b> <b>PWB3</b>	CNACNGAGAAGCTTAGCCTGGGGACTTATTCNTTCGGCTNCCGTCATT ATCTTCACCGAATGAAAGTGTTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACACA CGGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATCCCCACT GCTGCTCCCGTAGGAGTCCCCCGGGCCCCGCCCGCCGCGCGG CGGNGGGNGGGGNGN
I	<b>Uncultured Banisveld</b> <b>landfill bacterium</b> <b>BVB45</b>	CNNNNNNNNNCTGTGGAGCACATTNGNGNCAANTGGGGGCCGNAAG CCCTNGAACTNCAGCCACTGCCGGCGNTGAGCTGATGAAGNGCCCTTAG GGGTTGTAAAAGCTCTTCTNCTGGGGAACGATAATNANCNGCNACNN GTATCAATACTACNCGGACGTGGTNCCAATGNCAAGNAAGCNCCGGTT ATACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
J	<b>Uncultured soil</b> <b>bacterium clone 3-1</b> <b>small</b>	NCTGGGGNACTATTGGNCANTGGGGCGNNAAGCCCTGACTCAGCCACTG CCGCGNTGATGTGANGAAGGCCTTAGGGTGTAAAGNTCTTTCNCTGG GAACANGAGAAGCTTGCTAATAATCAAGCTAATTTGAGGGTACCAAGTA AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGATAATANA
K	<b>Methylobacterium sp.</b>	NNNNNNCNAAGAGAGCTAGCGGGCTTNTTTGCGGGTACGTCATTATCT TCNCCGATAAAAGAGCTTTACAAGCCTAAGAGGCTNCATCACNCACGG GCATGGCTGNATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTG CCTCCCGNAGGAGTCCCCACGTGGCGCCCTCCCCCTACGANTGCCGCG CGTGGGGGNGGGGNG

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุธาณี อ่วมจันทร์ เกิดเมื่อวันที่ 27 กันยายน พ.ศ.2520 ที่จังหวัดสมุทรสงคราม ได้รับการศึกษาในระดับชั้นประถมศึกษาจากโรงเรียนเมืองสมุทรสงคราม ได้รับการศึกษาในระดับชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนศรีราชาสมุทร จังหวัดสมุทรสงคราม สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เข้ารับการศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543 และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ในปีการศึกษา 2546 ผลงานส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ได้เผยแพร่โดยการนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยาย เรื่อง การศึกษาประจวบคัมแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ในครีฟิเคชันและดีในครีฟิเคชันของระบบหมุนเวียนน้ำทะเลสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 29 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย