

ออร์โทโทพิกแอมโมเนียออกซิเดชันของแอมโมเนียออกไซด์เชิงอาร์เคียและแบคทีเรีย  
ในระบบบำบัดน้ำเสียด้วยเทคนิค DNA stable isotope probing (DNA-SIP)

นางสาวปริยาภรณ์ พรกุลวัฒน์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

AUTOTROPHIC AMMONIA-OXIDATION OF AMMONIA-  
OXIDIZING ARCHAEA AND BACTERIA IN WASTEWATER TREATMENT  
PLANTS BY DNA STABLE ISOTOPE PROBING TECHNIQUE

Miss Preeyaporn Pornkulwat



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Engineering Program in Environmental Engineering

Department of Environmental Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

อโตโทโรฟิคแอมโมเนียออกซิเดชันของแอมโมเนียออกซิ  
ไดซิงอาร์เคียและแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียด้วย  
เทคนิค DNA stable isotope probing (DNA-SIP)

โดย

นางสาวปรียาภรณ์ พรกุลวัฒน์

สาขาวิชา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร. ปธาน บรรจงปรุ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยพร ภูประเสริฐ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. ปธาน บรรจงปรุ)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มนัสกร ราชอาณาจักร)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ขวลิต รัตนธรรมสกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร. สุวัฒน์ สุนเลิศสง่า)

ปริยาภรณ์ พรกุลวัฒน์ : ออโตโทรฟิกแอมโมเนียออกซิเดชันของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียและแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียด้วยเทคนิค DNA stable isotope probing (DNA-SIP) (AUTOTROPHIC AMMONIA-OXIDATION OF AMMONIA-OXIDIZING ARCHAEA AND BACTERIA IN WASTEWATER TREATMENT PLANTS BY DNA STABLE ISOTOPE PROBING TECHNIQUE) อ. ที่ปริกษาวิทยาพนธ์หลัก: รศ. ดร. ตะวัน ลิมปิยากร, อ.ที่ปริกษาวิทยาพนธ์ร่วม: ดร. ปธาน บรรจงปฐ , 134 หน้า.

การกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียในปัจจุบันเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์สองกลุ่มคือ แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) และแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-Oxidizing bacteria, AOB) จากการศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่ม AOB ที่ผ่านมาขณะออกซิไดซ์แอมโมเนียพบว่ามีการทำงานแบบออโตโทรป (Autotroph) คือใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) และแหล่งพลังงานจากแอมโมเนีย ( $\text{NH}_3$ ) ขณะที่กิจกรรมของ AOA ขณะออกซิไดซ์แอมโมเนียยังไม่เป็นที่แน่ชัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นครั้งแรกที่มีการศึกษากิจกรรมของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียขณะออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยมีวัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือ การระบุการทำงานแบบออโตโทรปของจุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียด้วยเทคนิค DNA-stable isotope probing (DNA-SIP) โดยใช้ไบคาร์บอเนต ( $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) ไอโซโทปคาร์บอน  $^{13}\text{C}$  เป็นตัวระบุแหล่งคาร์บอนของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการทำงานแบบออโตโทรปเปรียบเทียบกับไบคาร์บอเนต ( $\text{H}^{12}\text{CO}_3^-$ ) ไอโซโทปคาร์บอน  $^{12}\text{C}$  ในสภาวะควบคุมความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ฯเข้าที่ 7 และ 0  $\text{mgNH}_4^+/\text{N/L}$  ผลวิจัยพบว่า ระบบบำบัด 2 ใน 3 ระบบที่เลือกศึกษา AOA มีการทำงานแบบออโตโทรปขณะออกซิไดซ์แอมโมเนีย ขณะที่ AOB ในทุกระบบพบการทำงานแบบออโตโทรปทั้งหมด ซึ่งผลการทดลองถูกยืนยันด้วยการศึกษาการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ไนตริฟายอิงแอ็คติเวตเต็ดสลัดจ์ (Nitrifying activated sludge, NAS) ที่เจริญเติบโตในสภาวะสนับสนุนการทำงานแบบออโตโทรปเท่านั้นมาเป็นระยะเวลา 3 ปี ด้วยเทคนิค DNA-SIP ผลการตรวจสอบพบว่าทั้ง AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ดังกล่าวมีการทำงานแบบออโตโทรปขณะออกซิไดซ์แอมโมเนีย ดังนั้น AOA ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียจึงมีความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียได้เช่นเดียวกับ AOB โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน แต่เนื่องจากยังคงมีความเป็นไปได้ที่ AOA จะใช้แหล่งคาร์บอนมากกว่าหนึ่งแหล่งขณะออกซิไดซ์แอมโมเนียยกตัวอย่างเช่น จากสารอินทรีย์ ซึ่ง AOA อาจมีการทำงานแบบมิคโซโทรป (Mixotroph) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคตสำหรับสมมติฐานดังกล่าว

ภาควิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

สาขาวิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5470270321 : MAJOR ENVIRONMENTAL ENGINEERING

KEYWORDS: AMMONIA-OXIDIZING ARCHAEA / AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA / DNA-STABLE ISOTOPE PROBING / WASTEWATER TREATMENT / AMMONIA OXIDATION

PREEYAPORN PORNKULWAT: AUTOTROPHIC AMMONIA-OXIDATION OF AMMONIA-OXIDIZING ARCHAEA AND BACTERIA IN WASTEWATER TREATMENT PLANTS BY DNA STABLE ISOTOPE PROBING TECHNIQUE. ADVISOR: ASSOC. PROF. TAWAN LIMPIYAKORN, CO-ADVISOR: PATHAN BANJONGPROO, 134 pp.

Ammonia-oxidizing archaea (AOA) were more abundant than ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in some wastewater treatment plants (WWTPs) around the world. However, the contribution of AOA to ammonia oxidation in WWTPs is not yet clarified. In this study, sludge from municipal WWTPs was analyzed for autotrophic growth of AOA and AOB, using DNA-stable isotope probing (DNA-SIP) technique. Sludge samples were collected from six municipal WWTPs and were screened for AOA and AOB *amoA* gene numbers by quantitative PCR. AOA *amoA* genes were more abundant than AOB *amoA* genes in all plants studied. Then, sludge from three WWTPs were selected for DNA-SIP analysis. For each plant, DNA-SIP was performed with sludge samples collected from two different occasions as for biological replicates. The sludge was incubated in continuous-stirred-tank reactors with the inorganic media containing the ammonia concentrations of 7 and 0 mg-N/L as a sole energy source.  $^{12}\text{C}$ -bicarbonate/ $^{13}\text{C}$ -bicarbonate was used as a carbon source. DNA-SIP showed that AOA in two out of the three plants selected for study uptaked the labeled  $^{13}\text{C}$  under the incubation condition of 7 mg-N/L of ammonia, but not of the 0 mg-N/L of ammonia. The results suggested for the first time the autotrophic activity of AOA under the presence of ammonia. For AOB, all sludge showed the autotrophic activity. Additional experiment was performed with nitrifying activated sludge that was fed with synthetic wastewater containing only ammonia as the energy source for more than three years. In this sludge AOA *amoA* genes were present and DNA-SIP analysis suggested that AOA in the sludge also performed autotrophic activity under the presence of ammonia strengthen the evidence that AOA from WWTP perform autotrophic ammonia oxidation.

Department: Environmental Engineering

Field of Study: Environmental Engineering

Academic Year: 2014

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยหลักจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนอุดหนุนของภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัยนี้เป็นความร่วมมือระหว่างภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักการระบายน้ำ กรุงเทพมหานคร

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ตะวัน ลิ้มปิยากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้ความรู้ ความช่วยเหลือและเป็นพี่ปรึกษาในการทำวิจัย ตลอดจนช่วยผลักดันลูกศิษย์จนประสบความสำเร็จในการศึกษาระดับปริญญาโท

ขอขอบพระคุณ ดร. ปธาน บรรจงปฐุ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ให้ความรู้และความอนุเคราะห์ การเก็บตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสีย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชัยพร ภูประเสริฐ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ชวลิต รัตนธรรมสกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนัสกร ราชากรกิจ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับข้อเสนอแนะซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร. สุวัฒน์ สูงเลิศส่งฟ้า กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคนิค DNA-stable isotope probing สำหรับคำแนะนำด้านเทคนิคงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้กรุณามอบความรู้อันเป็นประโยชน์ คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษา ณ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

ขอขอบคุณ ดร. พรินท์พิดา สนธิพันธ์ สำหรับทุกความช่วยเหลือทั้งในด้านกำลังใจและการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตรายที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่สำหรับการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอากง คุณพ่อและคุณแม่ที่คอยสนับสนุนข้าพเจ้าในทุก ๆ ด้านเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ภาควิชาวิศวกรรมศาสตร์สิ่งแวดล้อมและสมาชิกในห้องปฏิบัติการทุกคนสำหรับมิตรภาพ กำลังใจ ตลอดจนความช่วยเหลือทั้งในด้านการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

## สารบัญ

หน้า

|  |    |
|--|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....   | ง  |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....  | จ  |
| กิตติกรรมประกาศ.....   | ฉ  |
| สารบัญ.....  | ช  |
| สารบัญตาราง.....   | ฎ  |
| สารบัญรูปภาพ.....  | ฏ  |
| บทที่ 1 บทนำ .....   | 1  |
| 1.1 ชื่อวิทยานิพนธ์ .....  | 1  |
| 1.2 คำสำคัญ.....   | 1  |
| 1.3 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....                                   | 1  |
| บทที่ 2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย .....                                | 1  |
| 2.1 วัตถุประสงค์งานวิจัย .....   | 1  |
| 2.2 ขอบเขตของงานวิจัย .....  | 1  |
| 2.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....   | 1  |
| บทที่ 3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....                               | 6  |
| 3.1 วัฏจักรไนโตรเจน .....  | 6  |
| 3.2 กระบวนการกำจัดไนโตรเจนเชิงวิศวกรรม .....                               | 7  |
| 3.3 กระบวนการไนตริฟิเคชันและกลุ่มจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง.....              | 11 |
| 3.3.1 แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) ..... | 11 |
| 3.3.1.1 สายวิวัฒนาการแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย .....                    | 11 |
| 3.3.1.2 ความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการเจริญเติบโตของ AOB.....                  | 12 |
| 3.3.2 แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia-oxidizing archaea, AOA).....    | 14 |

|  |    |
|--|----|
| 3.3.2.1 การค้นพบแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย .....  | 14 |
| 3.3.2.2 การจัดกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในปัจจุบัน.....  | 15 |
| 3.3.2.3 สายวิวัฒนาการของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย .....  | 15 |
| 3.3.2.4 ความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการเจริญเติบโตของ AOA.....  | 16 |
| 3.3.2.5 การศึกษาแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในระบบบำบัดน้ำเสีย.....   | 17 |
| 3.3.3 การค้นพบการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย .  | 23 |
| 3.4 เทคนิคระดับโมเลกุล (Molecular technique).....  | 24 |
| 3.4.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบเวลาจริง (Real-time polymerase chain reaction; Real- time PCR).....   | 24 |
| 3.4.3 การประยุกต์ใช้ธาตุไอโซโทปกับเทคนิคระดับโมเลกุล .....   | 26 |
| 3.4.3.1 Stable isotope probing (SIP).....  | 27 |
| 3.5 ตำแหน่งยืนสำหรับการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจวัดจุลินทรีย์ AOA และ AOB .....  | 30 |
| 3.5.1 ยืน <i>amo</i> .....   | 30 |
| บทที่ 4 แผนการดำเนินงานและวิธีการวิจัย .....   | 32 |
| 4.1 แผนการดำเนินงานวิจัย .....   | 32 |
| 4.2 แผนผังการทดลอง.....  | 32 |
| 4.2.1 การทดลองที่ 1 การคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย .....  | 35 |
| 4.2.2 การทดลองที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค DNA-SIP ต่อการกระจายตัวของดีเอ็นเอในกลุ่มประชากร AOA และ AOB.....  | 38 |
| 4.2.3 การทดลองที่ 3 การพิสูจน์การใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะมีแอมโมเนียของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนโดยเทคนิค DNA-SIP..... | 38 |
| 4.2.3.1 การทดลองที่ 3.1 ขั้นตอนการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่างกันจนถึงขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอ.....  | 39 |



|   |    |
|---|----|
| 4.2.3.2 การทดลองที่ 1.1, 2.2 และ 3.2 การนับจำนวนเซลล์จากยีน <i>amoA</i> ของ AOA และ AOB .....   | 48 |
| 4.2.3.3 การทดลองที่ 3.3 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อกลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดที่เลือกศึกษา .....   | 49 |
| 4.2.4 การทดลองที่ 4 การศึกษาการทำงานของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ภายใต้ปัจจัยที่แตกต่างกันในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน 1 แห่งโดยเทคนิค DNA -SIP .....   | 50 |
| 4.2.5 การทดลองที่ 5 การศึกษาการทำงานและจำนวนประชากร AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์กวนแบบต่อเนื่อง (Continuous stirred tank reactor, CSTR).....  | 51 |
| บทที่ 5 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง .....  | 53 |
| 5.1 การทดลองที่ 1 การคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย .....   | 53 |
| 5.2 การทดลองที่ 2 การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกดีเอ็นเอในเกรเดียนท์ของสารละลาย.....  | 58 |
| 5.3 การทดลองที่ 3 การพิสูจน์การใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนในสถานะมีแอมโมเนียโดยเทคนิค DNA stable isotope probing (DNA-SIP)..... | 62 |
| 5.3.1 DNA-SIP ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ระบบบำบัด P2 .....  | 63 |
| 5.3.2 DNA-SIP ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ระบบบำบัด P3 .....  | 67 |
| 5.3.3 DNA-SIP ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ระบบบำบัด P6 .....  | 70 |
| 5.3.4 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อกลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัด P6.....  | 77 |
| 5.3.5 ค่าพารามิเตอร์ของระบบบำบัด P2, P3 และ P6 ต่อผล DNA-SIP.....   | 81 |
| 5.4.1 ชุดการทดลอง 1 : DNA-SIP ระบบบำบัด P6 ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L.....   | 82 |
| 5.4.2 ชุดการทดลอง 2 : DNA-SIP ระบบบำบัด P6 ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L (มีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง) .....                                 | 83 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.4.3 ชุดการทดลอง 3 : DNA-SIP ระบบบำบัด P6 ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 70<br>mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L (มีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง) .....        | 85  |
| 5.4.4 ชุดการทดลอง 4 : DNA-SIP ระบบบำบัด P6 ในสถานะไม่เต็มแอมโมเนีย .....   | 89  |
| 5.5 การทดลองที่ 5 การศึกษาความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการทำงานและจำนวนประชากร<br>AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์กวนแบบต่อเนื่อง (Continuous stirred tank reactor,<br>CSTR) ..... | 90  |
| บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....  | 94  |
| รายการอ้างอิง .....  | 97  |
| ภาคผนวก.....   | 102 |
| ภาคผนวก ก .....  | 104 |
| วิธีมาตรฐานสำหรับการวัดแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต .....  | 104 |
| ก.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย .....  | 104 |
| ก.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรต์ .....  | 105 |
| ก.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนเตรต .....   | 105 |
| ภาคผนวก ข .....  | 108 |
| ค่าแอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต และค่าความเป็นกรดต่างระหว่างการบ่มตะกอน<br>จุลินทรีย์.....   | 108 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....   | 134 |

**สารบัญตาราง**

ตารางที่ 3.1 ค่า Ks ของแอมโมเนียของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AOB.....14

ตารางที่ 3.2 ค่า Ks ของแอมโมเนียของ AOA .....17

ตารางที่ 3.3 สรุปงานวิจัยการศึกษาแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในระบบบำบัดน้ำเสีย.....20

ตารางที่ 3.4 สรุปการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย .....24

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลระบบบำบัดน้ำเสียเบื้องต้นสำหรับคัดเลือกระบบบำบัด.....37

ตารางที่ 4.2 ค่า Ks ของแอมโมเนียที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB.....40

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารละลายแต่ละชนิดในน้ำเสียสังเคราะห์ต่อปริมาตร 1 ลิตร .....41

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลายองค์ประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์ .....41

ตารางที่ 4.5 พารามิเตอร์ที่ตรวจวัด.....44

ตารางที่ 4.6 โพรเมอร์จำเพาะกับกลุ่มจุลินทรีย์สำหรับเทคนิค Real-time PCR และ PCR สำหรับ DNA-sequencing .....49

ตารางที่ 4.7 แผนการทดลองการศึกษาการทำงานของ AOA และ AOB ภายใต้ปัจจัยที่แตกต่างกัน.....50

ตารางที่ 4.8 ข้อมูลการเดินระบบของระบบไนโตรฟายอิงแอกติเวตเต็ดสลัดจ์.....52

ตารางที่ 5.1 ปัจจัยสำหรับการคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย .....57

ตารางที่ ข.1 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P2-<sup>13</sup>C รอบ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร ..... 108

ตารางที่ ข.2 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P2-<sup>12</sup>C รอบ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร ..... 109

ตารางที่ ข.3 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P2-<sup>13</sup>C รอบ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร..... 110

ตารางที่ ข.4 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P2-<sup>12</sup>C รอบ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร..... 111



|   |     |
|---|-----|
| ตารางที่ ข.18 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6- <sup>12</sup> C<br>รอบ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร .....   | 125 |
| ตารางที่ ข.19 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6- <sup>13</sup> C<br>รอบ 3 (มีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง) ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/<br>ลิตร..... | 126 |
| ตารางที่ ข.20 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6- <sup>12</sup> C<br>รอบ 3 (มีการปล่อยตะกอนออกไปกับน้ำทิ้ง) ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร.....               | 127 |
| ตารางที่ ข.21 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6- <sup>13</sup> C<br>รอบ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้น 70 มก.ไนโตรเจน/ลิตร.....   | 128 |
| ตารางที่ ข.22 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6- <sup>12</sup> C<br>รอบ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้น 70 มก.ไนโตรเจน/ลิตร.....   | 129 |
| ตารางที่ ข.23 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6- <sup>13</sup> C<br>แบบไม่เติมแอมโมเนีย .....  | 130 |
| ตารางที่ ข.24 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6- <sup>12</sup> C<br>แบบไม่เติมแอมโมเนีย .....  | 131 |
| ตารางที่ ข.25 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ระบบไน<br>ตริฟายอิงแอกติเวตเต็ดจ์สลัดจ์ <sup>13</sup> C ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร.....                      | 132 |
| ตารางที่ ข.26 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ระบบไน<br>ตริฟายอิงแอกติเวตเต็ดจ์สลัดจ์ <sup>12</sup> C ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร.....                      | 133 |

## สารบัญรูปภาพ

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| ภาพที่ 3.1  | วัฏจักรไนโตรเจน.....   | 6  |
| ภาพที่ 3.2  | กระบวนการไนตริฟิเคชัน .....  | 7  |
| ภาพที่ 3.3  | ระบบบำบัดแบบ Single-sludge process .....   | 8  |
| ภาพที่ 3.4  | ระบบบำบัดแบบ Two-sludge suspended growth system.....   | 9  |
| ภาพที่ 3.5  | Pre-anoxic denitrification.....  | 10 |
| ภาพที่ 3.6  | Post-anoxic denitrification.....   | 10 |
| ภาพที่ 3.7  | การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียไปเป็นไนตรด.....   | 11 |
| ภาพที่ 3.8  | สายวิวัฒนาการของ AOB จากยีน 16s rRNA.....  | 12 |
| ภาพที่ 3.9  | กราฟแสดงค่าจลนพลศาสตร์ (Ks) ของ Monod (Monod growth kinetics) .....                                | 13 |
| ภาพที่ 3.10 | ค่า Ks ของแอมโมเนียและแหล่งที่พบ AOB กลุ่มต่าง ๆ.....  | 13 |
| ภาพที่ 3.11 | การจัดแบ่ง AOA จากยีน amoA โดยวิธีแยกแบบกิ่งก้าน (Treeing methods)...                              | 16 |
| ภาพที่ 3.12 | การทำ Clone library .....  | 26 |
| ภาพที่ 3.13 | ตัวอย่างผลการทำ FISH-MAR.....  | 27 |
| ภาพที่ 4.1  | สรุปแผนผังการทดลอง .....   | 35 |
| ภาพที่ 4.2  | แผนผังการทดลองช่วงที่ 1.....   | 35 |
| ภาพที่ 4.3  | แผนผังการทดลองที่ 3.1.....   | 39 |
| ภาพที่ 4.4  | ขั้นตอนการทำ DNA stable isotope probing (DNA-SIP) .....  | 45 |
| ภาพที่ 4.5  | ขั้นตอนการเก็บแฟรคชันและการตกตะกอนดีเอ็นเอ.....  | 47 |
| ภาพที่ 4.6  | กราฟเปรียบเทียบจำนวน AOA ที่ผ่านการบ่มด้วยคาร์บอนไอโซโทป $^{12}\text{C}$ และ $^{13}\text{C}$ ..... | 48 |
| ภาพที่ 5.1  | จำนวนยีน amoA ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย .....                                 | 57 |
| ภาพที่ 5.2  | DNA-SIP การแปรค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของซีเซียมคลอไรด์ .....  | 60 |
| ภาพที่ 5.3  | DNA-SIP การแปรค่าความเร็วรอบของแรงหนีศูนย์กลาง (G-force) .....                                     | 61 |

|  |    |
|--|----|
| ภาพที่ 5.4 DNA-SIP ระบบบำบัด P2 (รอบ 1) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L.....   | 64 |
| ภาพที่ 5.5 DNA-SIP ระบบบำบัด P2 ไม่เติมแอมโมเนีย .....   | 65 |
| ภาพที่ 5.6 DNA-SIP ระบบบำบัด P2 (รอบ 2) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L.....   | 66 |
| ภาพที่ 5.7 DNA-SIP ระบบบำบัด P3 (รอบ 1) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L.....   | 67 |
| ภาพที่ 5.8 DNA-SIP ระบบบำบัด P3 ไม่เติมแอมโมเนีย .....   | 68 |
| ภาพที่ 5.9 DNA-SIP ระบบบำบัด P3 (รอบ 2) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L.....   | 69 |
| ภาพที่ 5.10 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบ 1) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L ....  | 70 |
| ภาพที่ 5.11 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบ 2) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L ก่อน<br>ปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งที่ 28 วัน .....       | 71 |
| ภาพที่ 5.12 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบ 2) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L หลัง<br>ปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งที่ 42 และ 56 วัน..... | 72 |
| ภาพที่ 5.13 ต้นไม้วิวัฒนาการของยีน AOA <i>amoA</i> ที่ได้จากตัวอย่างระบบบำบัด P6 .....   | 74 |
| ภาพที่ 5.14 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA <i>amoA</i> ที่ได้จากตัวอย่าง<br>ระบบบำบัด P6 (ขยายจากภาพที่ 5.13).....                                      | 75 |
| ภาพที่ 5.15 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA <i>amoA</i> ที่ได้จากตัวอย่าง<br>ระบบบำบัด P6 (ขยายจากภาพที่ 5.14).....                                      | 76 |
| ภาพที่ 5.16 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA <i>amoA</i> จากตัวอย่างระบบ<br>บำบัด P2 และ P3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ .....                                 | 77 |
| ภาพที่ 5.17 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA <i>amoA</i> จากตัวอย่างระบบ<br>บำบัด P2 และ P3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ (ขยายจากภาพที่ 5.16).....             | 78 |
| ภาพที่ 5.18 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA <i>amoA</i> จากตัวอย่างระบบ<br>บำบัด P2 และ P3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ (ขยายจากภาพที่ 5.17).....             | 79 |
| ภาพที่ 5.19 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบ 2) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L ที่<br>ระยะการบ่ม 7 วัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ .....             | 80 |
| ภาพที่ 5.20 DNA-SIP ระบบบำบัด P3 (รอบ 1) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L ที่<br>ระยะการบ่ม 7 วัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ .....             | 81 |

ภาพที่ 5.21 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบที่ 3) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L..83

ภาพที่ 5.22 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบที่ 3) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L (มีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง).....85

ภาพที่ 5.23 ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตรต์และไนเตรต ในถังปฏิกรณ์สำหรับการบ่มตะกอน จุลินทรีย์ ความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L .....87

ภาพที่ 5.24 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบที่ 3) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L88

ภาพที่ 5.25 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบที่ 3) แบบไม่เติมแอมโมเนีย .....89

ภาพที่ 5.26 DNA-SIP ของตะกอนจุลินทรีย์จากระบบไนตริฟายอิงแอกติเวตเต็ดสลัดจ์ ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L .....90

ภาพที่ 5.27 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA *amoA* ที่ได้จากตัวอย่าง NAS ที่56 วันของ <sup>13</sup>C.....91

ภาพที่ 5.28 ต้นไม้วิวัฒนาการ ของยีน AOA *amoA* ที่ได้จากตัวอย่าง NAS ที่56 วันของ <sup>13</sup>C..92



## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1 ชื่อวิทยานิพนธ์

ภาษาไทย: ออโตโทรฟิกแอมโมเนียออกซิเดชันของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียและแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียด้วยเทคนิค DNA stable isotope probing (DNA-SIP)

ภาษาอังกฤษ: Autotrophic ammonia-oxidation of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in wastewater treatment plants by DNA-stable isotope probing technique

### 1.2 คำสำคัญ

|                               |                                   |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| ออโตโทรฟิกแอมโมเนียออกซิเดชัน | (Autotrophic ammonia-oxidation)   |
| แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย   | (Ammonia-oxidizing archaea, AOA)  |
| แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย  | (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) |
| กระบวนการไนตริฟิเคชัน         | (Nitrification process)           |
| แอมโมเนียออกซิเดชัน           | (Ammonia oxidation)               |
| DNA stable isotope probing    | (DNA-SIP)                         |

### 1.3 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การค้นพบแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) ครั้งแรกในตะกอนดินใต้ทะเลปี 2004 (Venter และคณะ, 2004, Treusch และคณะ, 2005) และการคัดแยก AOA สายพันธุ์บริสุทธิ์ *Nitrosopumilus maritimus* (*N. maritimus*) จากตัวอย่างน้ำทะเลในปี 2005 (Könneke และคณะ) ได้เปลี่ยนความเข้าใจเกี่ยวกับการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรต์ (Ammonia oxidation) ในวัฏจักรไนโตรเจน ซึ่งแต่เดิมเข้าใจว่าแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) เท่านั้นที่ทำหน้าที่นี้ เพราะการศึกษาการทำงานของ *N. maritimus* พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีการทำงานแบบเคโมลิโธออโตโทรป (Chemolitho-autotroph) คือ มีการใช้แหล่งพลังงานจากแอมโมเนีย ( $\text{NH}_3$ ) และใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) การค้นพบดังกล่าวส่งผลให้มีการศึกษา AOA ในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ตามมาอีกมากมาย เช่น ในระบบน้ำเค็ม ระบบน้ำผิวดิน ระบบน้ำใต้ดินและระบบดิน เป็นต้น สำหรับปัญหาแอมโมเนียในแหล่งน้ำส่วนใหญ่เกิดจากการพบปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่สูงในน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ โดย

จุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรฟ (Heterotroph) จะทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ในโตรเจนไปเป็นสารอนินทรีย์รูปแอมโมเนีย ซึ่งจัดเป็นมลพิษชนิดหนึ่งที่ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ อีกปัญหาหนึ่งที่เกิดขึ้นคือ การเกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน (Eutrophication) ซึ่งมีผลต่อปริมาณออกซิเจนในน้ำที่ลดลงทำให้แหล่งน้ำเน่าเสียและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำเช่นกัน จากปัญหาดังกล่าวทำให้การพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำเสียสำหรับการกำจัดไนโตรเจนจำเป็นต้องเข้าใจถึงกลไกการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการกำจัดไนโตรเจน ทำให้มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านั้น โดยการศึกษาที่ผ่านมามุ่งประเด็นไปยังกลุ่มจุลินทรีย์ AOB ซึ่งขณะนั้นเข้าใจว่าเป็นเพียงจุลินทรีย์กลุ่มเดียวที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ในปฏิบัติการแอมโมเนียออกซิเดชัน อันเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญสำหรับกระบวนการกำจัดไนโตรเจนออกจากแหล่งน้ำ อย่างไรก็ตามงานวิจัยสมัยใหม่ที่มีการตรวจพบยีน *amoA* ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งพบในขั้นตอนการกำจัดแอมโมเนียด้วย (Activated sludge, AS) ที่มีค่าการละลายออกซิเจนต่ำ (Dissolve oxygen, DO) และระยะเวลาการกักเก็บตะกอน (Solid retention time, SRT) ที่นาน (Park และคณะ, 2006) อันนำมาสู่การศึกษา AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียในปีต่อ ๆ มา ซึ่งงานวิจัยในช่วงแรกจะเป็นการตรวจนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA เปรียบเทียบกับ *amoA* ของ AOB โดยส่วนมากพบว่า AOA มีการเจริญเติบโตร่วมกับ AOB จนกระทั่งในปี 2011 Mußmann และคณะ ได้ทำการศึกษา AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียในยุโรปและพบว่า AOA สายพันธุ์หนึ่งในกลุ่ม I.1b Thaumarchaeota ซึ่งพบในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงกลั่นน้ำมันแห่งหนึ่ง อาจมีการทำงานแบบเฮเทอโรโทรฟเพราะตรวจไม่พบการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสร้างเซลล์ของ AOA สายพันธุ์ดังกล่าว ผลดังกล่าวจึงระบุถึงความเป็นไปได้ที่ว่า AOA อาจมีหน้าที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียอยู่ในเซลล์แต่ยีนนั้นอาจไม่สามารถทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวเป็นการศึกษา AOA เพียงสายพันธุ์เดียวในระบบบำบัดน้ำเสียเพียงระบบเดียวเท่านั้น ยังไม่อาจสรุปได้ว่า AOA ทุกสายพันธุ์ในระบบบำบัดน้ำเสียจะมีการทำงานแบบเฮเทอโรโทรฟ เนื่องจากการศึกษา AOA สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ผ่านมาพบว่า AOA แต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อแหล่งคาร์บอนต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น สารอินทรีย์ปริมาณต่ำจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *N. maritimus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีการทำงานแบบออโตโทรฟ (Könneke และคณะ, 2005) ในขณะที่ Tourna และคณะ (2010) กลับพบว่าไฟรเวทซึ่งเป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Nitrososphaera viennensis* (*N. viennensis*) ในสภาวะที่มีแอมโมเนียร่วมได้ โดย *N. viennensis* เป็น AOA สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกจากดิน และมีการทำงานแบบมิคโซโทรฟ (Mixotroph) คือสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้จากทั้งคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์ แต่รูปแบบการทำงานของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียยังไม่สามารถสรุปได้ว่าแท้จริงแล้ว AOA มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากแหล่งใดในกระบวนการสร้างเซลล์ นอกจากนี้เมื่อเริ่มมีการศึกษา AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศ

ไทย พบว่าในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่ได้ทำการตรวจสอบมีจำนวน AOA มากกว่า AOB และเมื่อทำการตรวจสอบเปรียบเทียบสายพันธุ์ AOA พบว่ามีสายพันธุ์ที่หลากหลายต่างกันไปในแต่ละระบบ (Limpiyakorn และคณะ, 2011) ซึ่งพบมากกว่างานที่ศึกษาจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนในยุโรป (Mußmann และคณะ, 2011) จึงทำให้เกิดข้อสงสัยเบื้องต้นขึ้นว่า AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียประเทศไทยมีการใช้แหล่งคาร์บอนมากกว่าหนึ่งแหล่งหรือไม่

สำหรับเป้าหมายหลักของงานวิจัยนี้คือการระบุความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียและแหล่งคาร์บอนในระบบบำบัดน้ำเสียของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB โดยสมมติฐานเบื้องต้นสำหรับงานวิจัยนี้คือ กลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง AOA และ AOB มีการทำงานแบบอโตโทรฟ ซึ่งหมายถึงสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ได้ หากสมมติฐานดังกล่าวเป็นจริงย่อมมีความเป็นไปได้มากที่จุลินทรีย์กลุ่มนั้นสามารถกำจัดแอมโมเนียได้ด้วย แต่หากพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์มีการไม่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ ก็ไม่จำเป็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มนั้นจะไม่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียเช่นกัน โดยการระบุการใช้แหล่งคาร์บอนของกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียในงานวิจัยนี้ จึงเป็นการศึกษาแนวโน้มเบื้องต้นในการตรวจสอบประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ซึ่งหากทราบถึงแหล่งคาร์บอนและความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มแล้ว จะทำให้สามารถออกแบบและปรับปรุงการเดินระบบได้อย่างเหมาะสมยิ่งขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยผลที่ได้จะนำไปใช้ในการพัฒนาการกำจัดไนโตรเจนในน้ำเสียแบบ Bioaugmentation ซึ่งเป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีหน้าที่ในการกำจัดแอมโมเนียลงไปในระบบ ยกตัวอย่างเช่น ระบบ Integrated Immobilization Nitrogen Removal Process ของบริษัทอิตาซีที่ได้พัฒนาเชื้อจุลินทรีย์บรรจุลงในเซลล์พอลิเมอร์และเติมลงไปในน้ำเสียเพื่อช่วยกำจัดแอมโมเนีย ซึ่งเหมาะต่อการใช้บำบัดน้ำเสียที่มีไนโตรเจนสูง แต่สิ่งแวดล้อมในระบบอาจมีความเป็นพิษหรือไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีหน้าที่กำจัดไนโตรเจน ทั้งนี้เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าความเข้มข้นแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียมีผลต่อต่อจำนวนประชากรของ AOA และ AOB และการทำงานของจุลินทรีย์ในสายพันธุ์ที่ต่างกัน พิจารณาได้จากค่าจลนพลศาสตร์ ( $K_s$ ) ของแอมโมเนียซึ่งเป็นค่าความชอบแอมโมเนียที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ครึ่งหนึ่งของการเจริญเติบโตสูงสุด โดยพบว่าที่ค่า  $K_s$  ของแอมโมเนียต่ำกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำงานได้ดีคือ AOA เช่น *N. maritimus* ซึ่งมี  $K_s$  ของแอมโมเนียที่  $1.86 \times 10^{-3}$  มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Konneke และคณะ, 2005) และ AOB สายพันธุ์ *N. oligotropha* มีค่า  $K_s$  ของแอมโมเนียอยู่ในช่วง 0.75-1.68 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Koops และคณะ, 2003) ขณะที่ AOB บางกลุ่มทำงานได้ดีที่ความเข้มข้นแอมโมเนียสูง เช่น *N. europaea* โดยมีค่า  $K_s$  ของแอมโมเนียอยู่ในช่วง 11.84-24.07 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Koops และคณะ, 2003) ซึ่งค่า  $K_s$  ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียจะถูกใช้สำหรับการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียด้วย

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดไนโตรเจนในน้ำเสีย แต่ในความเป็นจริงการออกแบบระบบบำบัดในปัจจุบันเลือกใช้ค่า  $K_s$  ที่ศึกษาได้จากกลุ่มจุลินทรีย์ AOB เท่านั้น แต่จากการตรวจสอบเบื้องต้นระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนในประเทศไทยไม่ได้พบเพียง AOB กลุ่มเดียว แต่ยังพบ AOA ด้วย ดังนั้นค่า  $K_s$  สำหรับการออกแบบที่ใช้อยู่ ณ ปัจจุบันอาจยังไม่ใช่ค่าที่เหมาะสมต่อกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำงานได้จริงในแต่ละระบบบำบัด ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำงานได้จริงอาจเป็น AOA หรือ AOB หรืออาจเป็นไปได้ทั้งสองกลุ่ม โดยปัจจัยหนึ่งที่คาดว่าจะมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันคือ ความเข้มข้นแอมโมเนีย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจการแปรค่าความเข้มข้นแอมโมเนียที่ต่างกันออกไปอีกด้วย เพื่อให้จำนวนกลุ่มจุลินทรีย์ของ AOA และ AOB ที่เจริญเติบโตระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์มีจำนวนและความหลากหลายทางสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจทำให้พบจุลินทรีย์ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันออกไป

เทคนิคที่ใช้ตรวจสอบสมมติฐานที่กล่าวมาคือเทคนิค DNA stable isotope probing (DNA-SIP) ทำโดยบ่มตะกอนจุลินทรีย์กับแหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของไบคาร์บอเนต ( $\text{HCO}_3^-$ ) เนื่องจากสมมติฐานของงานวิจัยนี้คือ AOA และ AOB ควรมีการทำงานแบบอโตโทรป ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสร้างเซลล์ ดังนั้นการทดลองจะแบ่งการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ออกเป็น 2 ชุด โดยชุดที่หนึ่งตะกอนจุลินทรีย์จะถูกบ่มกับไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  ( $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) และชุดที่สองตะกอนจุลินทรีย์จะถูกบ่มกับไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  ( $\text{H}^{12}\text{CO}_3^-$ ) หากจุลินทรีย์กลุ่มใดมีการทำงานแบบอโตโทรป จุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวในชุดที่หนึ่งจะสะสม  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  เข้าสู่เซลล์ ขณะเดียวกันชุดที่สองจะสะสม  $\text{H}^{12}\text{CO}_3^-$  เข้าสู่เซลล์ และเมื่อนำจุลินทรีย์แต่ละชุดมาสกัดและแยกดีเอ็นเอตามน้ำหนักของดีเอ็นเอแต่ละสายพันธุ์ด้วยเครื่อง Ultracentrifuge จุลินทรีย์ในชุดที่ 1 ซึ่งประกอบไปด้วย  $^{13}\text{C}$  จะมีน้ำหนักดีเอ็นเอมากกว่าชุดที่สองซึ่งประกอบไปด้วย  $^{12}\text{C}$  เท่านั้น การเปรียบเทียบตำแหน่งการกระจายตัวของดีเอ็นเอระหว่างชุดการบ่มสองชุด จะพบว่าดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างด้วยคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  จะกระจายตัวตกลงมาในตำแหน่งที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอของจุลินทรีย์กลุ่มเดียวกันที่สร้างด้วยคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  โดยเปรียบเทียบผล DNA-SIP ได้จากเทคนิค Real-time PCR นอกจากนี้สามารถตรวจสอบระดับสายพันธุ์ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบในระบบบำบัดที่สนใจได้โดยเทคนิคระดับโมเลกุลอื่น ๆ เช่น PCR-DGGE เพื่อแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ หรือ DNA sequencing เพื่อระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ เป็นต้น

## บทที่ 2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

### 2.1 วัตถุประสงค์งานวิจัย

- 2.1.1 เพื่อพิสูจน์กระบวนการสร้างเซลล์ของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (AOA) และแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (AOB) ระหว่างที่ตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียออกซิไดซ์แอมโมเนีย
- 2.1.2 เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB

### 2.2 ขอบเขตของงานวิจัย

- 2.2.1 ใช้เทคนิค DNA stable isotope probing (DNA-SIP) โดยใช้คาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  ในรูปไบคาร์บอเนต ( $\text{HCO}_3^-$ ) เป็นตัวระบุแหล่งคาร์บอนสำหรับการทำงานแบบออโตโทรฟของ AOA และ AOB
- 2.2.2 ใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน
- 2.2.3 ตรวจสอบจำนวนกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันโดยเทคนิค Real-time PCR
- 2.2.4 ตรวจสอบสายพันธุ์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยเทคนิค PCR-cloning และ DNA-sequencing

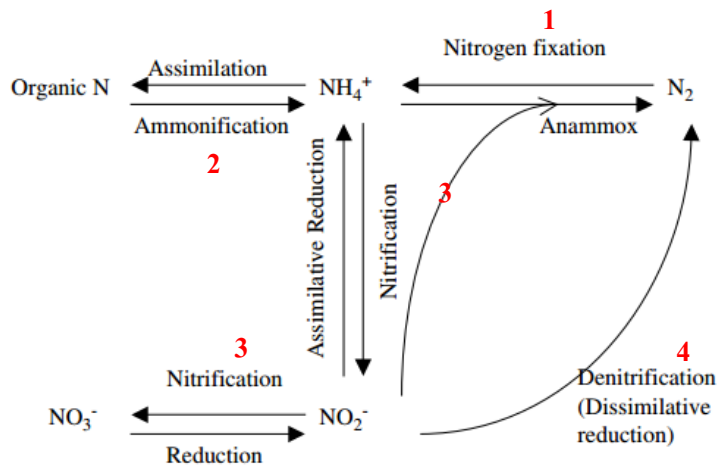
### 2.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 2.3.1 สามารถระบุได้ว่าระหว่าง AOA และ AOB จุลินทรีย์กลุ่มใดมีหน้าที่หลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียและทราบถึงลักษณะน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของจุลินทรีย์แต่ละประเภท
- 2.3.2 องค์ความรู้ดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนากลุ่มจุลินทรีย์หลักที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียให้ดียิ่งขึ้น

### บทที่ 3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 3.1 วัฏจักรไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยในบรรยากาศมีก๊าซไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 78 แต่สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้ไนโตรเจนในอากาศได้โดยตรง ดังนั้นก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศจึงต้องเปลี่ยนรูปให้อยู่ในสภาพที่สิ่งมีชีวิตนำไปใช้ได้ ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้



ภาพที่ 3. 1 วัฏจักรไนโตรเจน (You และคณะ, 2009)

#### 1) กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen Fixation)

กระบวนการตรึงไนโตรเจนเกิดจากแบคทีเรียสกุลไรโซเบียม (Rhizobium) ซึ่งพบมากในปมรากถั่วมีหน้าที่ตรึงไนโตรเจนในอากาศให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนรูปแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+$ )

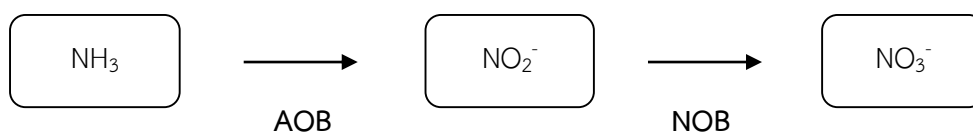
#### 2) กระบวนการสร้างแอมโมเนีย (Ammonification)

แอมโมเนียที่เกิดในสิ่งแวดล้อมนอกเหนือจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน ยังเกิดได้จากการเปลี่ยนรูปสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน (Organic-N) ไปเป็นแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+$ ) โดยจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรฟ

#### 3) กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification)

ไนตริฟิเคชันเป็นกระบวนการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียมไปเป็นไนไตรต์ ( $\text{NO}_2^-$ ) ในปัจจุบันเกิดโดยกลุ่มจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม ได้แก่ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) และแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) จากนั้นไนไตรต์จะ

ถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นไนเตรต ( $\text{NO}_3^-$ ) โดยไนโตรดออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Nitrite-oxidizing bacteria, NOB) ซึ่งมีขั้นตอนและกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำงานในแต่ละขั้นดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 กระบวนการไนตริฟิเคชัน

#### 4) กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification)

กระบวนการดีไนตริฟิเคชันเป็นกระบวนการที่เกิดภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Anoxic) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนรูปไนเตรตกลับไปเป็นไนไตรต์และเปลี่ยนรูปต่อไปเป็นก๊าซไนโตรเจนกลับสู่ชั้นบรรยากาศ

จากกระบวนการทั้งหมดที่กล่าวมาจัดเป็นกระบวนการหลักที่เกิดในวัฏจักรไนโตรเจน ถึงแม้จะเป็นที่ทราบกันว่าไนโตรเจนจัดเป็นธาตุองค์ประกอบที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ แต่หากปริมาณไนโตรเจนที่พบในธรรมชาติเสียสมดุลไปย่อมก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้เช่นกัน โดยเฉพาะผลกระทบของไนโตรเจนต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ โดยไนโตรเจนในแหล่งน้ำส่วนใหญ่อยู่ในรูปแอมโมเนียม หากแหล่งน้ำมีแอมโมเนียมปริมาณสูงเกินไปจะทำให้พืชน้ำโตได้ดีเพราะไนโตรเจนจัดเป็นธาตุอาหารหลักของพืชที่ใช้ในการเจริญเติบโต ดังนั้นเมื่อพืชน้ำเพิ่มมากขึ้นปริมาณออกซิเจนที่พืชต้องใช้หายใจย่อมเพิ่มขึ้นตามและยังบดบังการละลายออกซิเจนจากอากาศลงสู่แหล่งน้ำอีกด้วย และเมื่อออกซิเจนไม่เพียงพอต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นก็จะตายลงซึ่งรวมถึงกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์และแอมโมเนียก็จะไม่สามารถทำงานได้นอกจากนี้แอมโมเนียในน้ำยังจัดเป็นสารพิษต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำอีกด้วย ดังนั้นในกระบวนการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ นอกจากต้องควบคุมปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำแล้วยังต้องตระหนักถึงปริมาณไนโตรเจนในน้ำเสียเช่นกัน ซึ่งทำให้ขั้นตอนการบำบัดไนโตรเจนจัดว่าเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญต่อการบำบัดน้ำเสียให้ได้มาตรฐานก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

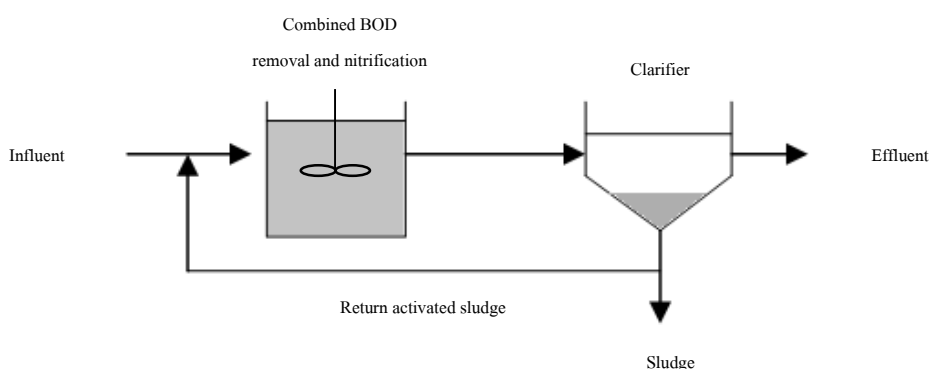
#### 3.2 กระบวนการกำจัดไนโตรเจนเชิงวิศวกรรม

กระบวนการกำจัดไนโตรเจนในเชิงวิศวกรรมเป็นส่วนหนึ่งของงานด้านระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งมีหลายวิธีในการกำจัด เช่น การปรับค่าความเป็นกรดต่างและไล่ด้วยอากาศ (Air stripping) การแลกเปลี่ยนไอออน เป็นต้น (Metcalf และ Eddy, 2004) แต่วิธีที่นิยมใช้วิธีหนึ่งในระบบบำบัดน้ำเสียคือ การกำจัดไนโตรเจนทางชีวภาพโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (อธิบายในหัวข้อที่ 3.3) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ปฏิกริยา ดังนี้

1) ปฏิกริยาไนตริฟิเคชัน – กระบวนการไนตริฟิเคชันในระบบบำบัดน้ำเสียแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามชนิดจุลินทรีย์ ดังนี้

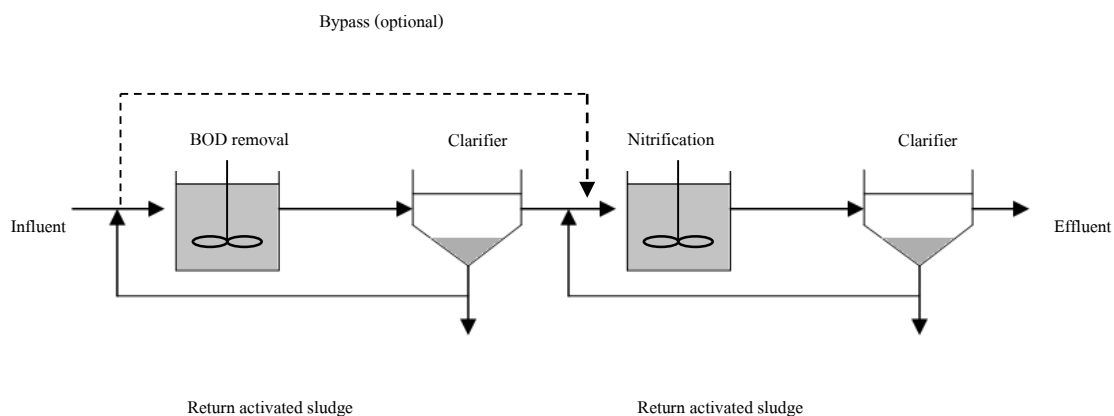
- ชนิดที่จุลินทรีย์อยู่ในลักษณะแขวนลอย (Suspended Growth)

โดยจุลินทรีย์ชนิดนี้นิยมใช้ในระบบบำบัดแบบ Single-sludge process ซึ่งเหมาะกับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียไม่สูงมากและไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ ซึ่งกระบวนการไนตริฟิเคชันจะเกิดในถังเติมอากาศร่วมกับการกำจัดสารอินทรีย์ (BOD removal) ในระบบบำบัด โดยมีองค์ประกอบของระบบ คือ ถังเติมอากาศ (Aeration tank) ถังตกตะกอน (Clarifier tank) และระบบเวียนตะกอน (Sludge recycle system) แสดงในภาพที่ 3.3 แต่ถ้าหากน้ำเสียมีปริมาณแอมโมเนียที่สูงมากจนเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำหรือมีสารพิษบางชนิดที่ยับยั้งการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน ระบบบำบัดที่เหมาะสมสำหรับกรณีนี้คือระบบ Two-sludge suspended growth system ซึ่งเป็นระบบที่เกิดจากการนำระบบ Single-sludge process 2 ระบบมาต่อกัน แสดงดังภาพที่ 3.4 โดยส่วนที่ 1 ของระบบเป็นการกำจัดสารอินทรีย์และสารพิษบางชนิดซึ่งจะมีการเดินระบบโดยควบคุมระยะเวลาการกักเก็บน้ำ (Hydraulic retention time, HRT) ที่สั้น จากนั้นเมื่อปล่อยน้ำเสียจากส่วนที่ 1 ไปยังส่วนที่ 2 จะทำให้ส่วนนี้สามารถเกิดปฏิกริยาไนตริฟิเคชันได้อย่างเต็มที่ และเนื่องจากกลุ่มจุลินทรีย์ไนตริฟายอิง (Nitrifying) ซึ่งเป็นกลุ่มที่สำคัญสำหรับกระบวนการบำบัดไนโตรเจนส่วนที่ 2 และมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่ากลุ่มเฮเทอโรโทรปซึ่งมีหน้าที่กำจัดสารอินทรีย์ ทำให้ต้องมีการนำน้ำเสียที่จะเข้าสู่ระบบส่วนที่ 1 บางส่วนเติมเข้าสู่ระบบส่วนที่ 2 เพื่อเพิ่มปริมาณตะกอนจุลินทรีย์และประสิทธิภาพการตกตะกอนของตะกอนจุลินทรีย์ในส่วนที่ 2 และเมื่อเปรียบเทียบการเดินระบบของระบบบำบัดทั้ง 2 แบบ พบว่าระบบแบบ Two-sludge suspended system มีระยะเวลาการกักเก็บน้ำและการกักเก็บตะกอน (Solid retention time, SRT) นานกว่าแบบ Single-sludge process



ภาพที่ 3.3 ระบบบำบัดแบบ Single-sludge process





ภาพที่ 3. 4 ระบบบำบัดแบบ Two-sludge suspended growth system

- ชนิดที่จุลินทรีย์เกาะติดกับตัวกลาง (Fixed Film or Attached Growth)

การกำจัดแอมโมเนียประเภทนี้จะแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ แบบตัวกลาง (Media) อยู่กับที่ เช่น ระบบโปรยกรอง (Trickling Filter) และแบบตัวกลางเคลื่อนที่ เช่น ระบบจานหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contractor, RBC) โดยจุลินทรีย์จะเกาะอยู่กับผิวตัวกลางและเมื่อน้ำเสียไหลผ่านผิวตัวกลาง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแรกจะเป็นการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรป ก่อนเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียเพราะมีการเจริญเติบโตที่สูงกว่ากลุ่มไนตริฟายอิง ทำให้กระบวนการกำจัดแอมโมเนียจะเกิดขึ้นภายหลังกระบวนการกำจัดสารอินทรีย์ซึ่งอาจมีการเดินระบบแบบให้เสร็จสิ้นในขั้นตอนเดียว หรืออาจแยกกระบวนการไนตริฟิเคชันออกมาบำบัดอีกส่วนหนึ่งก็ได้

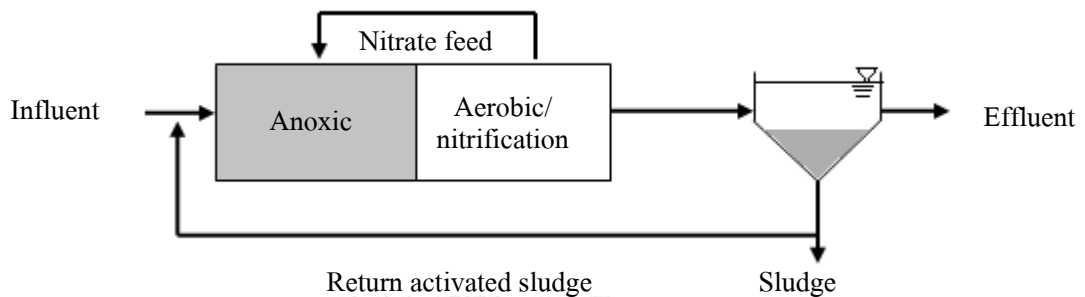
**2) ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน** – กระบวนการดีไนตริฟิเคชันในระบบบำบัดน้ำเสียเป็นการเดินระบบในสภาวะไร้อากาศ (Anoxic) โดยเป็นการกำจัดไนเตรตที่เกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชันให้กลายเป็นก๊าซไนโตรเจนกลับสู่บรรยากาศ การออกแบบระบบแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

- Pre-anoxic denitrification หรือ Modified Ludzak-Ettinger (MLE) process

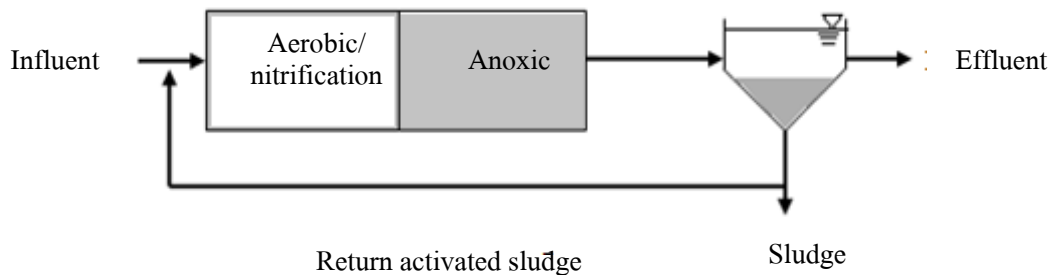
เป็นระบบกำจัดไนเตรตที่นิยมใช้มากในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน จากภาพที่ 3.5 การออกแบบระบบจะมีถังปฏิกรณ์ 2 ถังต่อกัน โดยถังแรกจะเป็นแบบแอนน็อกซิก (Anoxic) และต่อด้วยถังเติมอากาศ (Aeration tank) ซึ่งหลักการทำงานของระบบนี้คือ การเวียนกลับไนเตรตซึ่งเกิดในน้ำเสียที่ผ่านถังเติมอากาศกลับมายังถังแอนน็อกซิก เพื่อใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Electron acceptor) ในกระบวนการดีไนตริฟิเคชันโดยมีสารอินทรีย์ในน้ำเสียเข้าเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Electron donor)

- Post-anoxic denitrification

ในระบบชนิดนี้มีการออกแบบระบบโดยให้ถังปฏิกรณ์แรกเป็นถังเติมอากาศและต่อด้วยถังแอนน็อกซิก (ภาพที่ 3.6) โดยในถังแอนน็อกซิกซึ่งเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน กลุ่มจุลินทรีย์จะใช้ตัวให้อิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาการย่อยสลายตัวเองของจุลินทรีย์ และเนื่องจากระบบชนิดนี้การกำจัดสารอินทรีย์ในระบบจะเกิดก่อนการกำจัดไนโตรเจน ซึ่งทำให้สารอินทรีย์ที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายตัวเองของจุลินทรีย์เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อจุลินทรีย์ในถังแอนน็อกซิก ดังนั้นอาจต้องมีการเติมแหล่งคาร์บอนจากภายนอก เช่น เมทานอล อะซิเตต เป็นต้น เพื่อเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่จุลินทรีย์กลุ่มดีไนตริฟายอิงในกระบวนการกำจัดไนเตรต



ภาพที่ 3.5 Pre-anoxic denitrification

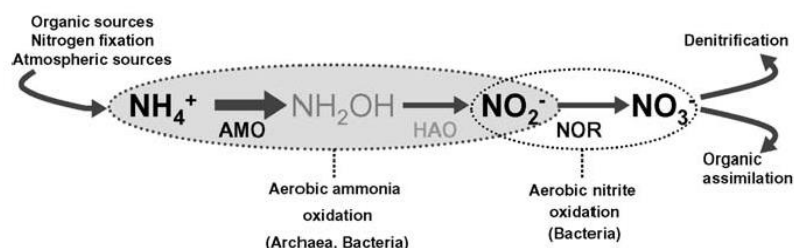


ภาพที่ 3.6 Post-anoxic denitrification

จากที่กล่าวมาจะพบว่าในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงจนส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่ง จำเป็นต้องมีการกำจัดไนโตรเจนโดยออกแบบระบบบำบัดให้มีปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันควบคู่ไปกับดีไนตริฟิเคชันเสมอเพื่อลดปริมาณไนโตรเจนในแหล่งน้ำลงโดยการเปลี่ยนรูปเป็นก๊าซไนโตรเจนกลับสู่บรรยากาศซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของอากาศในธรรมชาติ

### 3.3 กระบวนการไนตริฟิเคชันและกลุ่มจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นกระบวนการที่เกิดภายใต้สภาวะมีออกซิเจน ซึ่งเป็นการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์โดยกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB และเปลี่ยนรูปจากไนไตรต์ไปเป็นไนเตรตโดยกลุ่มจุลินทรีย์ NOB



ภาพที่ 3.7 การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียไปเป็นไนเตรต (Schleper และ Nicol, 2010)

จากภาพที่ 3.7 กระบวนการไนตริฟิเคชันถูกแบ่งออกเป็น 2 ปฏิกิริยาย่อย ดังนี้

#### 1) ปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชัน (Ammonia oxidation)

ปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชันจัดเป็นขั้นปฏิกิริยาย่อยที่เกิดช้าสุด (Rate limiting step) ซึ่งเป็นขั้นควบคุมในเกิดปฏิกิริยาในขั้นต่อไปของกระบวนการไนตริฟิเคชัน จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยานี้มีสองกลุ่มคือ AOA และ AOB ที่มีหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นสารตัวกลางไฮดรอกซิลามีน ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) โดยเอนไซม์แอมโมเนียโมนอกซิจีเนส (Ammonia monooxygenase, AMO) แล้วจึงเปลี่ยนรูปไปเป็นไนไตรต์โดยเอนไซม์ไฮดรอกซิลามีนออกซิโดรีดักเตส (Hydroxylamine oxydoreductase, HAO)

#### 2) ปฏิกิริยาไนไตรต์ออกซิเดชัน (Nitrite oxidation)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนไตรต์ออกซิเดชัน คือ ไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Nitrite-oxidizing bacteria, NOB) ซึ่งจะเปลี่ยนไนไตรต์ไปเป็นไนเตรตโดยเอนไซม์ไนไตรต์ออกซิโดรีดักเตส (Nitrite oxidoreductase, NOR)

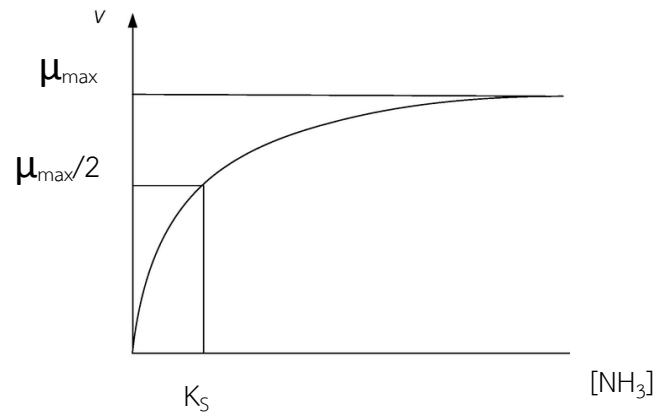
### 3.3.1 แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)

AOB เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีการทำงานแบบเคมีลิโธออโตโทรฟ (Chemolithoautotroph) คือ ใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงานและใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งแบคทีเรียประเภทนี้มีหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรต์ในปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชัน

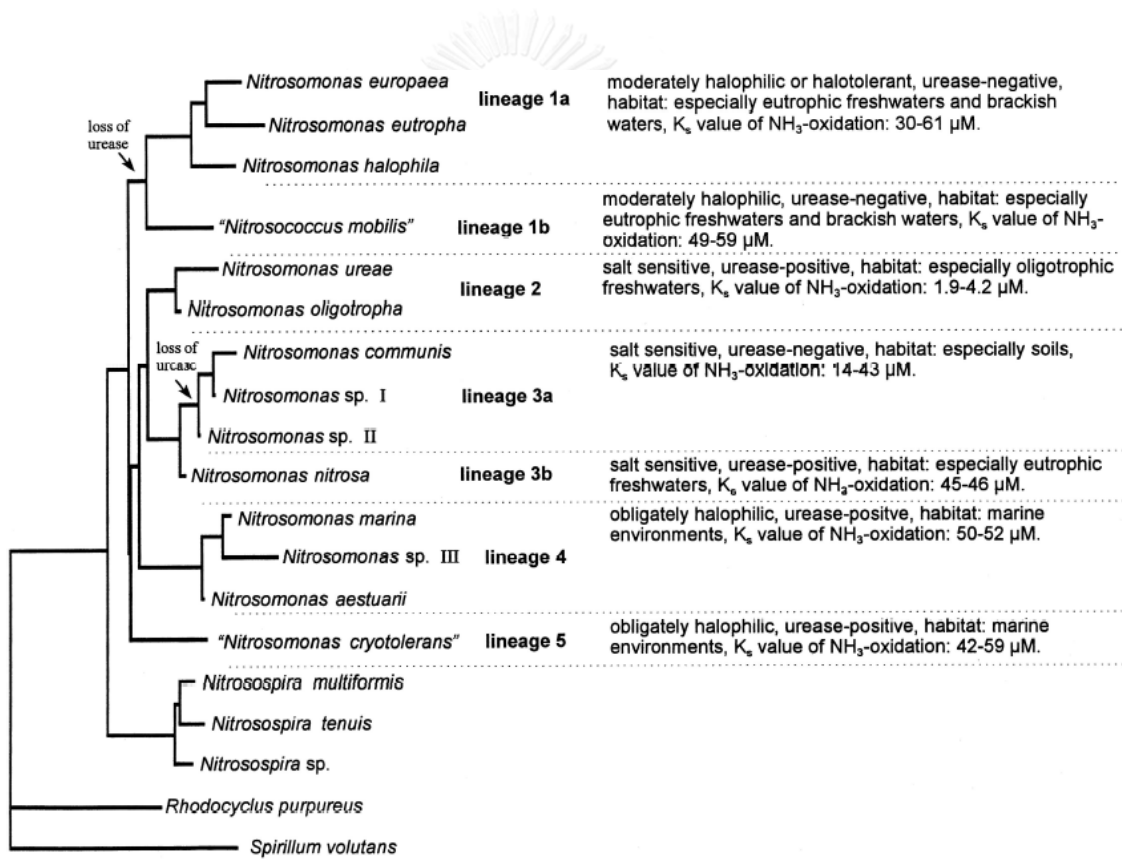
#### 3.3.1.1 สายวิวัฒนาการแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย

การจัดกลุ่ม AOB ใช้การเปรียบเทียบยีน 16s rRNA ในการแบ่งกลุ่ม ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ เบต้าโพรทีโอแบคทีเรีย (Betaproteobacteria) ประกอบไปด้วยสกุล





ภาพที่ 3.9 กราฟแสดงค่าจลนพลศาสตร์ ( $K_s$ ) ของ Monod (Monod growth kinetics)



ภาพที่ 3.10 ค่า  $K_s$  ของแอมโมเนียและแหล่งที่พบ AOB กลุ่มต่าง ๆ (Koops และคณะ, 2003)

จากภาพที่ 3.10 ค่า  $K_s$  ของ AOB หากจัดแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์ตามค่าความเข้มข้นแอมโมเนียที่ AOB เจริญเติบโตได้ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มที่ชอบค่าความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ เช่น *N. oligotropha* ซึ่งมีค่า  $K_s$  ของแอมโมเนียที่ 0.75-1.68 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยจะพบ *N. oligotropha* ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีธาตุอาหารต่ำ (Oligotrophic environment) เช่น ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ ตะกอนดินน้ำจืด เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่มีความชอบค่าความ

เข้มข้นแอมโมเนียสูง เช่น *N. europaea* ซึ่งมีค่า  $K_s$  ของแอมโมเนียที่ 11.84-24.07 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยจะพบ *N. europaea* ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีธาตุอาหารสูง (Eutrophic environment) ตารางที่ 3.1 ค่า  $K_s$  ของแอมโมเนียของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ AOB

| AOB สายพันธุ์บริสุทธิ์        | ค่า $K_s$ ของแอมโมเนีย ( $\text{NH}_4^+ \text{-N mg.L}^{-1}$ ) | สิ่งแวดล้อมที่พบ                                 | อ้างอิง            |
|-------------------------------|--|--|--------------------|
| <i>N. oligotropha</i> cluster | 0.75-1.68  | ระบบบำบัดน้ำเสียที่มีแอมโมเนียต่ำ ตะกอนดินน้ำจืด | Koops และคณะ, 2003 |
| <i>N. communis</i> cluster    | 5.52-16.97   | ระบบดิน  |                    |
| <i>N. europaea</i> cluster    | 11.84-24.07  | สิ่งแวดล้อมที่มีธาตุอาหารสูง                     |                    |

### 3.3.2 แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia-oxidizing archaea, AOA)

จากงานวิจัยในอดีตเชื่อเสมอมาว่า AOB เป็นสิ่งมีชีวิตเดียวในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน แต่เมื่อไม่นานมานี้กลับมีการค้นพบว่ามีสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง คือ อาร์เคีย ซึ่งสามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรต์ได้เช่นกัน

#### 3.3.2.1 การค้นพบแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย

การค้นพบ AOA ครั้งแรกของโลก มีจุดเริ่มต้นมาจากการค้นพบยีน *amoA* โดย Venter และคณะ (2004) ได้ศึกษาจีโนมของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่พบในทะเล Sargasso ซึ่งพบจำนวนยีนมากกว่า 1.046 ล้านยีน และเมื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนกับฐานข้อมูลพบว่ามียีน *amoA* ของอาร์เคียเป็นหนึ่งในกลุ่มยีนเหล่านั้น แต่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ใด จากนั้นในปีต่อมา Könneke และคณะ (2005) ได้ทำการแยกเชื้อ AOA สายพันธุ์บริสุทธิ์ *N. maritimus* ในระบบน้ำเค็มได้เป็นครั้งแรกของโลกจากก้อนกรวดในพิพิธภัณฑสถานน้ำในสหรัฐอเมริกาโดยเลี้ยงจุลินทรีย์ (Enrichment) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 1 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 6 เดือนและทำการแยกเชื้อโดยเทคนิค Serial dilution โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของวิตามิน แร่ธาตุหลายชนิดและสารปฏิชีวนะในคอลัมน์ที่มีตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอนเมตร ต่อมาในปี 2009 Martens-Habbena และคณะ ได้รายงานผลการศึกษาค่าความเข้มข้นแอมโมเนียที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *N. maritimus* โดยพบว่า *N. maritimus* มีค่า  $K_s$  ของความเข้มข้นแอมโมเนียที่ 1.86 ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งหากเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นที่

เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ AOB พบว่ามีค่าต่ำกว่าถึง 1000 เท่า จากการค้นพบ AOA ในครั้งนั้นก่อให้เกิดการศึกษา AOA อย่างแพร่หลายในสิ่งแวดล้อมหลายระบบ ยกตัวอย่างเช่น ระบบดิน ระบบน้ำเค็ม เป็นต้น ซึ่งผลจากการศึกษา AOA ในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ พบว่า AOA เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มียีน *amoA* เช่นเดียวกับ AOB จึงนำมาสู่ข้อสันนิษฐานที่ว่า AOA น่าจะมีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียเช่นเดียวกับ AOB และเป็นที่ทราบกันดีว่ากระบวนการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียจัดเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญต่อคุณภาพน้ำก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ จึงทำให้เกิดงานวิจัยที่ศึกษา AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียและพบว่ามีการเจริญเติบโตร่วมกับ AOB ดังนั้นอาจแสดงได้ว่า AOA อาจมีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้เช่นเดียวกัน AOB

### 3.3.2.2 การจัดกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในปัจจุบัน

การค้นพบอาร์เคียส่วนใหญ่มักพบในสิ่งแวดล้อมสุดขั้ว (Extreme environment) แต่เมื่อมีการค้นพบอาร์เคียบางสายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมสภาวะปกติ (Mesophilic archaea) ทำให้เกิดการศึกษาจีโนมของอาร์เคียเหล่านั้น และเกิดการจัดไฟลัมของโดเมนอาร์เคียออกมาใหม่ โดยจากเดิมโดเมนอาร์เคียประกอบไปด้วย 2 ไฟลัม ดังนี้

1) **Euryarchaeota** - เป็นไฟลัมของอาร์เคียในสิ่งแวดล้อมภาวะมีเกลือ (Halophilic) ภาวะอุณหภูมิสูง (Thermophilic) และกลุ่มอาร์เคียที่ผลิตก๊าซมีเทน (Methanogenic)

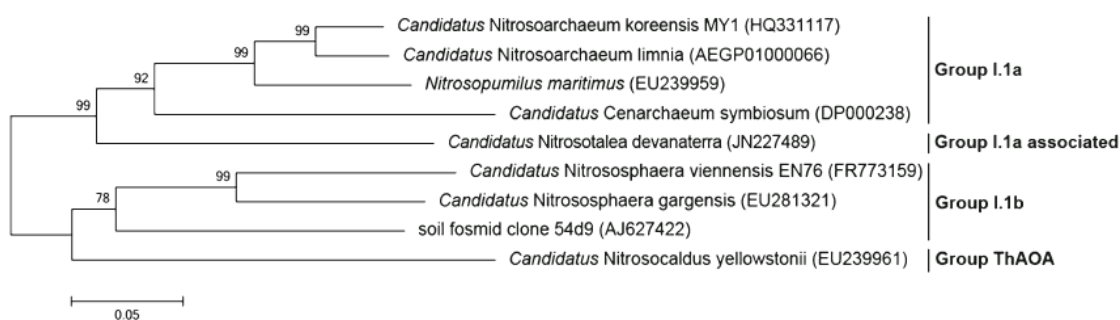
2) **Crenarchaeota** - เป็นไฟลัมของอาร์เคียที่ทนอุณหภูมิสูงมาก (Hyperthermophilic) ซึ่งในช่วงก่อนปี 2008 เมื่อมีการค้นพบ AOA สายพันธุ์ใหม่หรือกลุ่มใหม่ส่วนใหญ่จะถูกจัดอยู่ในไฟลัม Crenarchaeota จนกระทั่งมีการค้นพบ AOA สายพันธุ์ *Candidatus cenarchaeum symbiosum* (Brochier-Armanet และคณะ, 2008) ซึ่งพบในสิ่งแวดล้อมสภาวะปกติ และเมื่อนำมาวิเคราะห์สายวิวัฒนาการที่เชื่อมโยงกับอาร์เคียในไฟลัม Crenarchaeota พบว่ามีความแตกต่างกัน และเกิดการแบ่งไฟลัมใหม่โดยสรุปได้ 3 ไฟลัม โดยไฟลัมที่สามชื่อว่า “Thaumarchaeota” เนื่องด้วยการศึกษาจีโนมของอาร์เคียในไฟลัมนี้พบว่าที่จริงแล้วไฟลัม Thaumarchaeota มีวิวัฒนาการมาก่อนอาร์เคียในไฟลัม Euryarchaeota และ Crenarchaeota ซึ่งทำให้เปลี่ยนความเข้าใจจากเดิมที่ว่า อาร์เคียในสิ่งแวดล้อมสภาวะปกติมีวิวัฒนาการมาจากอาร์เคียที่ชอบสิ่งแวดล้อมภาวะอุณหภูมิสูง (Spang และคณะ, 2010)

### 3.3.2.3 สายวิวัฒนาการของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย

จากการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA จาก AOA ที่พบในระบบดินและระบบน้ำเค็ม สามารถแบ่งกลุ่มในไฟลัม Thaumarchaeota ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ I.1a และ I.1b ดังนี้

1) **กลุ่ม I.1a** - ประกอบไปด้วย AOA ที่พบในระบบน้ำเค็ม ได้แก่ สายพันธุ์ *Nitrosopumilus maritimus*, *Candidatus Cenarchaeum symbiosum*, *Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*, *Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis*, และ *Candidatus Nitrosotalea devanattera*

2) **กลุ่ม I.1b** - ประกอบไปด้วย AOA ที่พบในระบบดิน ได้แก่ สายพันธุ์ *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, *Candidatus Nitrososphaera viennensis* และ *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii*



ภาพที่ 3.11 การจัดแบ่ง AOA จากยีน *amoA* โดยวิธีแยกแบบกิ่งก้าน (Treeing methods)

(Limpiyakorn และคณะ, 2013)

### 3.3.2.4 ความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการเจริญเติบโตของ AOA

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเมื่อศึกษากลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดเซอร์ในระบบที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่างกัน จะพบกลุ่มประชากรที่เด่นและมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ของ AOA และ AOB ต่างกันด้วยออกไปในแต่ละสิ่งแวดล้อม และเมื่อใดก็ตามที่มีการค้นพบ AOA สายพันธุ์บริสุทธิ์หรือกลุ่มจุลินทรีย์ AOA หลายงานวิจัยจะนิยมทำการศึกษาและรายงานค่าทางจลนพลศาสตร์ ได้แก่ค่า  $K_s$  ของแอมโมเนียสำหรับจุลินทรีย์ AOA ทำให้พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่าง AOA และ AOB จะพบว่า AOA ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำกว่า AOB ซึ่งสามารถสรุปค่า  $K_s$  ของแอมโมเนียของ AOA ได้ดังตารางที่ 3.2



ตารางที่ 3.2 ค่า Ks ของแอมโมเนียของ AOA

| AOA                 | ค่า Ks ของแอมโมเนีย (mg N.L <sup>-1</sup> ) | อ้างอิง              |
|---------------------|---|----------------------|
| <i>N. maritimus</i> | $1.86 \times 10^{-3}$                       | Könneke และคณะ, 2005 |
| AR                  | $8.54 \times 10^{-3}$                       | Park และคณะ, 2010    |
| <i>N. koreensis</i> | $9.66 \times 10^{-3}$                       | Jung และคณะ, 2011    |

### 3.3.2.5 การศึกษาแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในระบบบำบัดน้ำเสีย

Park และคณะ (2006) เริ่มต้นศึกษายีน *amoA* ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบ แอคติเวตเต็ดสลัดจ์ในประเทศสหรัฐอเมริกาทั้งหมด 9 ระบบ ซึ่งแต่ละระบบประกอบไปด้วย กระบวนการกำจัดไนโตรเจนแบบแอนน็อกซิก-ออกซิก (Anoxic-Oxic) ผลจากการตรวจสอบพบยีน *amoA* ของ AOA ในระบบบำบัด 5 ระบบจากทั้งหมด 9 ระบบ โดยพบว่าปัจจัยในระบบที่น่าจะมีผลต่อการพบยีน *amoA* คือ ค่าการละลายออกซิเจน (Dissolved oxygen, DO) ที่ต่ำและมีระยะเวลาการกักเก็บตะกอน (Hydraulic retention time, HRT) ที่นาน จากนั้นได้มีการวิเคราะห์สายพันธุ์ของ AOA ที่พบโดยสามารถจำแนกความแตกต่างได้ถึง 75 กลุ่ม และเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่พบมีความใกล้เคียงกับดีเอ็นเอของ AOA ที่พบในดินและตะกอนดิน จึงทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า AOA อาจมีบทบาทร่วมกับ AOB ในการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย

Wells และคณะ (2009) ได้ศึกษาจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ในน้ำเสียชุมชนโดยเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์เพื่อตรวจสอบเป็นระยะเวลา 1 ปี ผลการศึกษาพบว่าตลอดระยะเวลาการตรวจสอบกลุ่มประชากรจากตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่าง พบยีน *amoA* ของ AOA เพียง 15% ของระยะเวลาทั้งหมด ขณะที่พบยีน *amoA* ของ AOB ในทุกตัวอย่าง โดยมีจำนวนเฉลี่ยอยู่ที่  $1.2 \times 10^6$  copies/mL ซึ่งการศึกษาในเชิงลึกของงานวิจัยนี้สนใจเพียงจำนวน AOB เท่านั้นซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับค่าพารามิเตอร์ที่ตรวจวัดในระบบ

Zhang และคณะ (2009) ได้ศึกษากลุ่มประชากร AOA ในระบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์ ที่มีการกำจัดไนโตรเจนในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับระบบบำบัดน้ำเสียจริงของฮ่องกง ผลการศึกษาทั้งสองระดับพบว่า เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างจากระบบบำบัดที่ต่างกันพบว่ามี ความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ของ AOA ซึ่ง AOA ที่ตรวจพบในแต่ละระบบส่วนใหญ่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ AOA ที่พบในระบบดิน นอกจากนี้งานวิจัยยังทำการเลี้ยง AOA (Enrichment) ในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า AOA ในระบบมีการเปลี่ยนกลุ่มประชากรเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน

Jin และคณะ (2010) ได้ตรวจนับจำนวนยีน *amoA* และ 16s rRNA ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ที่มีการกำจัดแอมโมเนีย งานวิจัยนี้แบ่งช่วงการทดลองเป็น 5 ช่วงโดยการแปรค่าการละลายออกซิเจน (0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นแอมโมเนีย (100-200 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ผลการศึกษาพบว่า AOB สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นแอมโมเนียและออกซิเจนละลายในได้ระบบน้อยกว่า AOA แต่อย่างไรก็ตามจำนวน AOB ยังคงสูงกว่า AOA ซึ่ง AOB ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Nitrosomonas* ขณะที่ AOA อยู่ในกลุ่ม I.1a ไฟลัม Crenarchaeota (ขณะนั้นยังไม่มีการจัดไฟลัมไนโดเมนอาร์เคียใหม่)

Ye และ Zhang (2011) ได้ศึกษากลุ่มประชากร AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีค่าการละลายออกซิเจนต่ำ (0.15-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง (0.26-0.52 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน) งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ช่วงโดยการแปรค่าการละลายออกซิเจน (0.15-5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นแอมโมเนีย (200-400 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ผลการวิจัยพบจำนวน AOB ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Nitrosomonas* ซึ่งมีจำนวนมากกว่า AOA และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AOA ในระบบพบว่าร้อยละ 89.3 ของ AOA มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ *N. maritimus* จึงสรุปว่า AOB มีการแข่งขันกับ AOA ในการย่อยสลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้นสูงได้ดีกว่า ดังนั้น AOA อาจไม่มีบทบาทในการย่อยสลายแอมโมเนียในกระบวนการไนตริฟิเคชันที่ความเข้มข้นแอมโมเนียสูง

Sonthiphand และ Limpiyakorn (2011) ได้ศึกษากลุ่มประชากร AOA และ AOB โดยการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ในระบบไนตริฟายอิงแอกติเวตเต็ดสลัดจ์ (Nitrifying activated sludge, NAS) โดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนมาเลี้ยงด้วยน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่อง (continuous flow) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 2, 10 และ 30 มิลลิโมลาร์แอมโมเนียมไนโตรเจน เป็นเวลา 60 วัน จากนั้นทำการศึกษาความหลากหลายของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ซึ่งพบว่า AOB มีการเปลี่ยนกลุ่มประชากรจากกลุ่มที่ชอบความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ ได้แก่ *N. oligotropha* *N. communis* ไปเป็นกลุ่มที่ชอบค่าความเข้มข้นแอมโมเนียสูงและมีกลุ่มประชากรที่หลากหลายมากขึ้นจากตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้น เช่น *N. europaea* cluster และ *Nitrosospira* cluster เป็นต้น ขณะที่ AOA หลังจากผ่านไป 60 วัน ความหลากหลายของกลุ่มประชากร AOA เพิ่มมากขึ้นจากตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้น โดยพบที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 2 และ 10 มิลลิโมลาร์แอมโมเนียมไนโตรเจน ดังนั้นผลการทดลองจึงสรุปว่ากลุ่มประชากร AOB แต่ละกลุ่มที่พบในระหว่างการทดลองมีความแตกต่างกันซึ่งสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในระบบ ขณะที่ AOA แต่ละกลุ่มไม่มีความสัมพันธ์กับค่าแอมโมเนียดังกล่าว

Limpiyakorn และคณะ (2011) ได้ตรวจนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งมีความเข้มข้นแอมโมเนียสูงและระบบบำบัดน้ำเสีย

ชุมชนซึ่งมีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ โดยผลการศึกษาพบว่าในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมพบ แต่ AOB ขณะที่ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนพบ AOA เจริญเติบโตพร้อมกับ AOB ซึ่งในบางระบบพบ AOA มากกว่า AOB และเมื่อทำวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ในระบบบำบัดพบว่าความเข้มข้นแอมโมเนีย ในน้ำเสียขาออกน่าจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย

Kayee และคณะ (2011) ศึกษาจำนวนและความหลากหลายของยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน 8 แห่งซึ่งพบการเจริญเติบโตของ AOA ร่วมกับ AOB ซึ่งระบบที่ ตรวจสอบส่วนใหญ่จะพบจำนวน AOA มากกว่า AOB และเมื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของ AOA พบความ หลากหลายทั้งในกลุ่ม I.1a และ I.1b ของไฟลัม Thaumarchaeota ขณะที่ AOB พบเพียงสองสาย พันธุ์จากระบบบำบัดที่ตรวจสอบทั้งหมด ได้แก่ *N. communis* และ *N. oligotropha* เมื่อวิเคราะห์ ผลพบว่าปัจจัยที่น่าจะส่งผลต่อกลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดคือความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำ เสียออก

Yapsakli และคณะ (2011) ตรวจสอบจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในระบบบำบัด น้ำเสียจากหลุมฝังกลบขยะที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงโดยเก็บตัวอย่างจากระบบทั้งหมด 3 ส่วน ได้แก่ Aeration tank, Facultative tank และ SBR tank เป็นเวลา 594 วัน โดยพบว่าตัวอย่างที่วิเคราะห์ ส่วนใหญ่จะพบ *amoA* ของ AOA แต่ยังคงมีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยีน *amoA* ของ AOB

Yu และคณะ (2011) ได้ศึกษากลุ่มประชากร AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียทาง ชีวภาพแบบ Membrane Bioreactor (MBR) โดยเน้นศึกษากลุ่มประชากรของ AOB ที่พบในระบบ ซึ่งผลการวิจัยพบ AOB 2 สายพันธุ์ได้แก่ *N. oligotropha* และ *N. ureae* โดยสาเหตุที่พบเพียง 2 สายพันธุ์นี้น่าจะมาจากเมมเบรนภายในระบบและอัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์ในระบบ (F/M Ratio) ที่ต่ำ ขณะที่การศึกษา AOA ในระบบได้รายงานผลเพียงว่ามีความหลากหลายในระบบและมีการ เปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรตลอดในระยะเวลาการศึกษา

Bai และคณะ (2012) ตรวจสอบจำนวนยีน *amoA* ของ AOA ซึ่งมากกว่า AOB ในระบบ บำบัดน้ำเสียชุมชน แต่ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมกลับพบยีน *amoA* ของ AOB เป็นกลุ่มเด่น จึงเกิดข้อสันนิษฐานว่า AOA อาจมีการปรับตัวต่อสารพิษในน้ำเสียซึ่งพบมากในโรงงานอุตสาหกรรม ได้น้อยกว่า AOB

Sauder และคณะ (2012) ได้ศึกษาจำนวนประชากรในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนแบบจาน หมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactor, RBC) โดยศึกษาจำนวนประชากรในงานหมุนแต่ละ แผ่นเพื่อพิสูจน์สมมติฐานระหว่างจำนวนประชากร AOA และ AOB กับค่าความเข้มข้นแอมโมเนียที่ แตกต่างกันในแต่ละช่วงงานหมุน โดยผลการทดลองพบว่าจำนวนประชากร AOA จะเพิ่มขึ้นตามการ ไหลของน้ำเสียผ่านชั้นงานหมุนซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นแอมโมเนียที่ลดลงในแต่ละชั้น

ตารางที่ 3.3 สรุปงานวิจัยการศึกษาแอมโมเนียออกไซด์เชิงอาร์เคียในระบบบำบัดน้ำเสีย

| งานวิจัย            | ประเภทระบบบำบัด  |            | ความเข้มข้น NH <sub>3</sub> (mg-N/L) |            | การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ (copies/ml)  |                                | การตรวจสอบสายพันธุ์จุลินทรีย์  |   | พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง                      |
|---------------------|------------------|------------|--------------------------------------|------------|--|--------------------------------|--|---|---|
|                     | ชุมชน            | อุตสาหกรรม | น้ำเสียเข้า                          | น้ำเสียออก | AOA  | AOB                            | AOA  | AOB   |   |
| Park และคณะ (2006)  | ✓<br>(9 ระบบ)    | -          | 17.0-44.8                            | <0.05-0.59 | พบ 5 ระบบ (AOA<AOB)  | พบทั้ง 9 ระบบ                  | พบความหลากหลาย 75 กลุ่ม  | -   | พบ AOA ในระบบ DO ต่ำ และมี SRT และ HRT ที่นาน |
| Well และคณะ (2009)  | ✓                | -          | 14.0-33.0                            | 0.20-2.10  | AOA พบ 15% ในระยะเวลา 1 ปีเฉลี่ย 2 x 10 <sup>3</sup>   | พบเฉลี่ย 1.2 x 10 <sup>6</sup> | -  | <i>N. oligotropha</i> ,<br><i>Nitrospira</i> ,<br><i>N. europaea</i> ,<br><i>N. communis</i> ,<br><i>Nitrosomonas</i> -like cluster | -   |
| Zhang และคณะ (2009) | ✓                | -          | 17-21                                | 0.1-0.5    | -  | -                              | ในระบบจริงสายพันธุ์ใกล้เคียงกับที่พบในระบบบัติน เมื่อ Enrichment 30 วัน มีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากร | -   | -   |
| Jin และคณะ (2010)   | ✓<br>(Lab scale) | -          | 100-200                              | -          | พบ AOB > AOA (2.9x10 <sup>3</sup> - 2.3x10 <sup>5</sup> ) > (1.7x10 <sup>2</sup> - 3.8x10 <sup>3</sup> ) | -                              | [NH <sub>3</sub> ] เปลี่ยนแต่กลุ่มประชากรยังคงเดิมและอยู่ใน I.1a Crenarchaeota                       | [NH <sub>3</sub> ] เปลี่ยน กลุ่มประชากรเปลี่ยน ส่วนใหญ่พบในสกุล <i>Nitrosomonas</i>   | แปรค่า DO 0.5-1 mg/L                          |

ตารางที่ 3.3 (ต่อ) สรุปงานวิจัยการศึกษาแอมโมเนียออกซิเดซิงอาร์เคียในระบบบำบัดน้ำเสีย

| งานวิจัย                           | ประเภทระบบบำบัด  |            | ความเข้มข้น NH <sub>3</sub> (mg-N/L)         |                                       | การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ (copies/ml)   |  | การตรวจสอบสายพันธุ์จุลินทรีย์  |  | พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง   |
|------------------------------------|------------------|------------|--|---------------------------------------|---|--|--|--|--|
|                                    | ชุมชน            | อุตสาหกรรม | น้ำเสียเข้า                                  | น้ำเสียออก                            | AOA   | AOB  | AOB  | AOA  |  |
| Ye และ Zhang (2011)                | ✓<br>(Lab scale) |            | 200-400                                      | -                                     | พบเฉพาะในน้ำเสียชุมชนและมีจำนวนมากกว่า AOB  | พบ AOB > AOA   | 89.3% มีสายพันธุ์ใกล้เคียง <i>N. maritimus</i>   | กลุ่มประชากรส่วนใหญ่พบในสกุล <i>Nitrosomonas</i>   | แปรค่า DO 0.15-0.5 mg/L  |
| Sonthiphand และ Limpiyakorn (2011) | ✓<br>(Lab scale) | -          | 2, 10, 30 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | -                                     | -   | -  | พบความหลากหลายมากขึ้นที่ [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] 2 และ 10 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | เปลี่ยนกลุ่มจาก <i>N. communis</i> cluster, <i>N. marina</i> cluster และ <i>N. oligotropha</i> cluster ไปเป็น <i>N. cryototerans</i> cluster, <i>N. europaea</i> cluster และ <i>N. mobilis</i> cluster | -  |
| Limpiyakorn และคณะ (2011)          | ✓                | ✓          | ชุมชน 5.6-11) อุตสาหกรรม (36.1-442.3)        | ชุมชน (0.2-3.0) อุตสาหกรรม (5.3-29.2) | พบเฉพาะในน้ำเสียชุมชนและมีจำนวนมากกว่า AOB  | เป็นกลุ่มเดียวที่พบในน้ำเสียอุตสาหกรรม และพบร่วมกับ AOA ในน้ำเสียชุมชน | -  | -  | การเจริญเติบโตของ AOA ขึ้นกับ [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] น้ำเสียขาออก |
| Kayee และคณะ (2011)                | ✓<br>(8 ระบบ)    | -          | 5.4-38.6                                     | < 0.1-2.9                             | พบ AOB > AOA (8.1×10 <sup>6</sup> -5.7×10 <sup>9</sup> ) > (3.3×10 <sup>7</sup> -5.2×10 <sup>11</sup> ) | พบ AOB > AOA   | <i>N. communis</i> และ <i>N. oligotropha</i>   | พบความหลากหลายทั้งในกลุ่ม I.1a และ I.1b ของไฟลัม Thaumarchaeota  | การเจริญเติบโตของ AOA ขึ้นกับ [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] น้ำเสียขาออก |

ตารางที่ 3.3 (ต่อ) สรุปงานวิจัยการศึกษาแอมโมเนียออกซิไดซ์เชิงอาร์เคียในระบอบบำบัดน้ำเสีย

| งานวิจัย              | ประเภทระบบบำบัด         |            | ความเข้มข้น NH <sub>3</sub> (mg-N/L)        |              | การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ (copies/mL)   |   | การตรวจสอบสายพันธุ์จุลินทรีย์   |   | พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง  |
|-----------------------|-------------------------|------------|---|--------------|---|---|---|---|---|
|                       | ชุมชน                   | อุตสาหกรรม | น้ำเสียขาเข้า                               | น้ำเสียขาออก | AOA   | AOB   | AOB   | AOA   |   |
| Yapsaki และคณะ (2011) | น้ำเสียจากหลุมฝังกลบขยะ |            | -   |              | พบ AOB > AOA<br>( $2.1 \times 10^3 - 3.1 \times 10^5$ ) > ( $6.8 \times 10^2 - 1.1 \times 10^4$ )           | -   | -   | -   | -   |
| Yu และคณะ (2011)      | ✓                       |            | 48.7-62.8                                   | < 1          | -   | -   | N. oligotropha และ N. ureae   | กลุ่มประชากรเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการตรวจวัดซึ่งสายพันธุ์ส่วนใหญ่ใกล้เคียงที่พบในระบบดิน | -   |
| Bai และคณะ (2012)     | ✓                       | ✓          | ชุมชน (9.8-76.6)<br>อุตสาหกรรม (35.2-262.0) |              | ชุมชน (7.2x10 <sup>3</sup> -1.7x10 <sup>5</sup> )<br>อุตสาหกรรม (2.6x10 <sup>7</sup> -3.6x10 <sup>9</sup> ) | ชุมชน (6.3x10 <sup>5</sup> -4.5x10 <sup>6</sup> )<br>อุตสาหกรรม (5.7x10 <sup>3</sup> -9.9x10 <sup>3</sup> ) | พบในสกุล Nitrosomonas และ Nitrosospira ทั้งในน้ำเสียชุมชนและน้ำเสียอุตสาหกรรม | -   | AOA อาจมีการปรับตัวต่อสารพิษในน้ำเสียอุตสาหกรรมได้น้อยกว่า AOB จึงพบจำนวนน้อยกว่า |
| Sauder และคณะ (2012)  | ✓ (RBC)                 | -          | 401.9-64.5                                  | 106.8-32.8   | [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] ไม่มี<br>ความสัมพันธ์กับจำนวน   | จำนวนเพื่อขึ้นเมื่อ [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] ลดลง  | -   | พบหลากหลายสายพันธุ์ในกลุ่ม thaumarchaeota   | AOA เพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อ [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] ลดลง                   |

### 3.3.3 การค้นพบการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย

จากการค้นพบ AOA สายพันธุ์บริสุทธิ์ *N. maritimus* ครั้งแรกของโลก ซึ่งพบว่ามีการทำงานแบบออโตโทรป คือ ใช้แหล่งพลังงานจากแอมโมเนียและใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อมีสารอินทรีย์อยู่ในระบบ จากการค้นพบดังกล่าวทำให้เปลี่ยนความเข้าใจจากเดิมที่ว่า AOB เท่านั้นที่มีหน้าที่ย่อยสลายแอมโมเนีย หลังจากจากนั้นการศึกษาการทำงานของ AOA จึงเกิดขึ้นอีกจำนวนมาก ซึ่งเป็นการศึกษาความสามารถของ AOA ในการย่อยสลายแอมโมเนียในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ที่พบ ซึ่งผลการศึกษาบางงานวิจัยพบว่า AOA มีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในระดับสายพันธุ์ ดังนี้

1) Mußmann และคณะ (2011) ศึกษาความหลากหลายของกลุ่มประชากรและการทำงานของ AOA ในไฟลัม Thaumarchaeota โดยตรวจนับ AEA (*amoA*-encoding archaea) ซึ่งหมายถึงอาร์เคียที่มียีน *amoA* อยู่ในเซลล์แต่อาจไม่มีการทำงานของยีนดังกล่าว แหล่งศึกษาในงานวิจัยนี้คือระบบบำบัดน้ำเสีย 52 แห่งในยุโรป โดยแบ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรม 17 แห่ง และจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน 35 แห่ง ผลการทดลองพบเพียง 4 ระบบบำบัดเท่านั้นที่มีจำนวนยีน AEA โดย 1 ใน 4 ระบบเป็นน้ำเสียจากโรงงานกลั่นน้ำมันซึ่งพบ AEA มากกว่า AOB 10,000 เท่า ในระบบย่อยของกระบวนการบำบัดน้ำเสียจากโรงกลั่นน้ำมัน จากนั้นได้มีการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนของ AOB และ AEA โดยเทคนิค Microautoradiography fluorescence in situ hybridization (MAR-FISH) ซึ่งใช้สารอินทรีย์คาร์บอนไอโซโทป  $^{14}\text{C}$  เป็นตัวระบุ พบว่า AEA ไม่มีการสะสมคาร์บอนไอโซโทป  $^{14}\text{C}$  เข้าสู่เซลล์จึงสันนิษฐานว่า AEA ที่พบเพียงสายพันธุ์เดียวในกลุ่ม I.1b ของไฟลัม Thaumarchaeota ในระบบบำบัดที่ตรวจพบอาจไม่ได้มีการทำงานแบบ Chemolithoautotrophs แต่อาจมียีน *amoA* อยู่ในเซลล์ และการทำงานของสายพันธุ์ดังกล่าวอาจเป็นแบบเฮเทอโรโทรป (Heterotroph) โดยเซลล์อาจใช้สารอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในกระบวนการสร้างเซลล์แทน

2) Tourna และคณะ (2011) สามารถแยก AOA สายพันธุ์บริสุทธิ์ *Nitrososphaera viennensis* (*N. viennensis*) จากดินโดยการเติมสารปฏิชีวนะ และเมื่อศึกษาการทำงานของ *N. viennensis* โดยดูการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่างกัน และการเติมสารอินทรีย์ต่าง ๆ เพิ่มลงไป เช่น ไพรูเวท กรดอะมิโน ซูโครส เป็นต้น ผลการทดลองพบว่า *N. viennensis* มีการใช้ไพรูเวทซึ่งเป็นสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะมีแอมโมเนียร่วมในระบบ จึงสรุปว่า *N. viennensis* เป็น AOA สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีการทำงานแบบมิคโซโทรป (Mixotroph) ซึ่งหมายถึงการใช้แหล่งคาร์บอนได้จากทั้งสารอินทรีย์และคาร์บอนไดออกไซด์

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า AOA มีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันออกไปในระดับสายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาการทำงานของ AOA ต่อไปโดยเฉพาะในระบบสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ที่การกำจัดแอมโมเนียมีความสำคัญ เพื่อใช้พัฒนาประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบนั้น ๆ ให้ดียิ่งขึ้น

ตารางที่ 3.4 สรุปการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย

| ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง | แหล่งอ้างอิง                                      |  |  |
|---------------------|---|--|--|
|                     | Könneke และคณะ (2005)                             | Mußmaan และคณะ (2011)                    | Tourna และคณะ (2011)   |
| ชนิดจุลินทรีย์      | <i>N.maritimus</i>                                | สายพันธุ์เดียวในกลุ่ม I.1bThaumarchaeota | <i>N. viennensis</i>   |
| การทำงานที่พบ       | ออโตโทรฟ  | เฮเทอโรโทรฟ                              | มิโกโซโทรฟ   |
| สารอินทรีย์         | ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่ำ         | ไม่มีการตรวจสอบ เป็นเพียงข้อสันนิษฐาน    | พบการใช้ไพรวุทในสภาวะมีแอมโมเนีย   |
| การกำจัดแอมโมเนีย   | ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมล | ไม่มีการตรวจสอบ                          | กำจัดแอมโมเนียได้ดีเมื่อมีไพรวุท และถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล |

### 3.4 เทคนิคระดับโมเลกุล (Molecular technique)

ในปัจจุบันเทคนิคระดับโมเลกุลมีบทบาทอย่างมากในการศึกษาจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เพื่อใช้อธิบายการทำงานหรือจำนวนจุลินทรีย์ที่สนใจ โดยในหัวข้อนี้จะอธิบายหลักการทำงานของเทคนิคระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้เท่านั้น

#### 3.4.1 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแบบเวลาจริง (Real-time polymerase chain reaction; Real- time PCR)

ปฏิกริยา Real-time PCR เป็นวิธีที่พัฒนามาจากปฏิกริยา PCR โดยอาศัยหลักการพื้นฐานเดียวกันในเรื่องการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิต แต่มีข้อแตกต่างกัน คือปฏิกริยา Real-time PCR ผลที่ได้ออกมาจะเป็นไปในเชิงปริมาณ กล่าวคือ ปฏิกริยานี้สามารถคำนวณจำนวนยีนที่ต้องการออกมาได้เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน



การใช้งานเครื่อง Real-time PCR แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะใหญ่ คือ

### 1) การใช้งานในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การวัดปริมาณสีเรืองแสงจากตัวเปล่งแสง (Fluorephore) ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เนื่องจากสามารถเห็นการเพิ่มของจำนวนดีเอ็นเอ เนื่องจากในระหว่างการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในแต่ละรอบของปฏิกิริยา Real-time PCR จะมีการนับจำนวนดีเอ็นเอเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากจำนวนดีเอ็นเออ้างอิงที่ทราบจำนวนแน่นอน ตลอดเวลาที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละรอบ ซึ่งจอบรรณาผลจะแสดงออกมาในรูปแบบกราฟเส้นรูปตัวเอส (S shape) และเป็นกราฟระหว่างสีเรืองแสงกับจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาลูโก้ (พีซีเอ ธรรมวงศ์, 2551)

### 2) การวิเคราะห์ Melting Curve

ในการใช้สารเรืองแสงในปฏิกิริยา Real-time PCR สารเรืองแสงสามารถซึมเข้าสู่ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ได้ ทำให้การนับจำนวนเกิดการผิดพลาดได้ ดังนั้นการวิเคราะห์ Melting curve เป็นทำให้ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่มีการซึมของสารเรืองแสงแยกออกจากกันโดยเพิ่มอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 65-75 องศาเซลเซียส โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ประมวลผลแล้วทำเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสีเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่ออุณหภูมิ (dF/dT) กับอุณหภูมิ (T) โดยจะให้กราฟจะมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิต่ำ

### 3.4.2 PCR-DGGE และ DNA-sequencing

เทคนิค PCR-DGGE เป็นเทคนิคสำหรับการแยกดีเอ็นเอของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์โดยประกอบด้วย 2 เทคนิคคือ ปฏิกิริยาลูโก้พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนยีนของจุลินทรีย์ที่สนใจโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับจุลินทรีย์กลุ่มนั้นโดยผลของการทำ PCR จะเป็นไปในเชิงคุณภาพเท่านั้น

#### ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูโก้พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

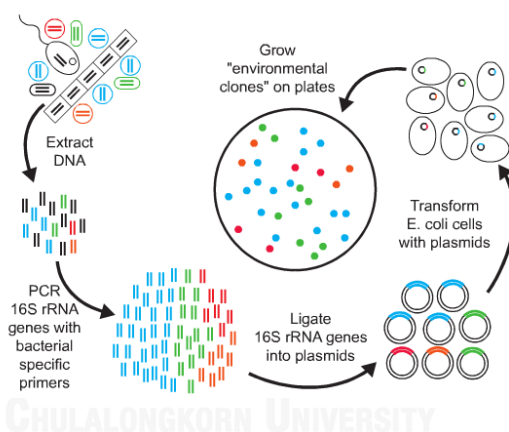
แม่พิมพ์ (Template) - แม่พิมพ์ คือแม่แบบของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ซึ่งในที่นี้คือดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

1) Tag DNA polymerase - Tag DNA polymerase คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต่อสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิสูง (93 ถึง 95 องศาเซลเซียส) ได้

2) นิวคลีโอไทด์ - นิวคลีโอไทด์ มี 4 ชนิด คือ (A-adenine, C-cytosine, G-guanine และ T-thymine) ต่อกันเป็นดีเอ็นเอสายใหม่

3) ไพรเมอร์ (Primer) - ไพรเมอร์ คือ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่จับคู่กับปลายของแม่พิมพ์ทั้ง 2 ด้าน คือปลาย 3' ซึ่งเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ที่สามารถต่อกับนิวคลีโอไทด์อื่นได้ โดยไพรเมอร์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อจุลินทรีย์ AOA และ AOB ที่แตกต่างกัน ตัวอย่างไพรเมอร์และความจำเพาะกับกลุ่มจุลินทรีย์แสดงในตารางที่ 4.7

หลังจากการทำ PCR ส่วนมากนิยมนำไปทำต่อด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) สำหรับหลักการของเทคนิค DGGE คือ การนำดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มจำนวนโดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องการโดยเทคนิค PCR แล้ว ไปหยอดลงบนเจลอาร์คริลามิด (Acrylamide) ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ไปบนเจล และมีการแยกของสายดีเอ็นเอแต่ละสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับลำดับ ชนิดของนิวคลีโอไทด์และอุณหภูมิการหลอมหรือการแยกในดีเอ็นเอแต่ละสายพันธุ์ นอกจากการแยกดีเอ็นเอโดยเทคนิค DGGE แล้วยังสามารถระบุสายพันธุ์ที่พบในตัวอย่างได้อีกวิธีโดยการทำ Clone Library (ภาพที่ 3.12 ) โดยนำดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แล้วแทรกลงไปในพลาสมิด (Plasmid) จากนั้นทำการถ่ายพลาสมิดลงบนเซลล์ *Escherichia coli* (*E.coli*) และนำไปเพาะเชื้อจนเกิดเป็นโคโลนีขึ้นมา และทำการสุ่มโคโลนีที่เกิดขึ้นไปทำ PCR อีกครั้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ DNA-sequencing ซึ่งเป็นการถอดลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอและนำไปตรวจสอบกับฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมใน Genbank เพื่อระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์

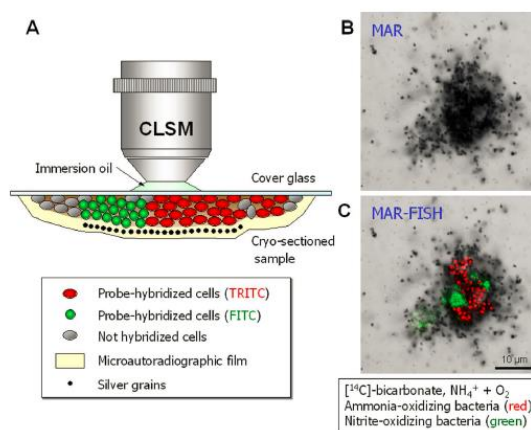


ภาพที่ 3.12 การทำ Clone library

### 3.4.3 การประยุกต์ใช้ธาตุไอโซโทปกับเทคนิคระดับโมเลกุล

การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลโดยการนำไอโซโทปของธาตุที่ไม่ได้พบทั่วไปในธรรมชาติมาสร้างเป็นสารประกอบในรูปของสับสเตรต (Substrate) เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อสับสเตรตชนิดนั้นของจุลินทรีย์ โดยไอโซโทปส่วนใหญ่ที่นิยมใช้ในสับสเตรต คือ คาร์บอนและไนโตรเจน เพราะเป็นธาตุองค์ประกอบหลักของเซลล์ โดยนิยมศึกษาการตอบสนองของกลุ่มจุลินทรีย์ต่อสับสเตรตชนิดนั้นในอนุพันธ์กรดไขมันฟอสโฟลิปิด (Phospholipid-derived fatty acid, PLFA), ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าการใช้ไอโซโทปมีความแม่นยำในการระบุกลุ่มจุลินทรีย์ที่ตอบสนองต่อสับสเตรตที่ต้องการทราบ ต่อมาจึงทำให้มีการนำไอโซโทปมาประยุกต์ใช้กับเทคนิคระดับโมเลกุลอย่างแพร่หลาย (Neufeld และคณะ, 2007) ยกตัวอย่างเช่น

เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography (FISH-MAR) ซึ่งเป็น การนำเทคนิค FISH ที่บอกถึงจำนวนและกลุ่มประชากรในสิ่งแวดล้อมมาศึกษา ร่วมกับการใช้ไอโซโทป รั้งสี เช่น  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  และ  $^{33}\text{P}$  เป็นต้น ทำให้ทราบถึงการทำงานของ กลุ่มจุลินทรีย์ที่สนใจได้ สำหรับการ ทำ FISH-MAR ในเบื้องต้นนั้นต้องทำการบ่มจุลินทรีย์เพื่อให้จุลินทรีย์มีการสะสมไอโซโทปของ สับสเตรตเข้าสู่เซลล์ก่อนจากนั้นจึงทำเทคนิค FISH โดยติดฉลากบน 16s rRNA ของแต่ละเซลล์ และ นำไปวิเคราะห์ร่วมกันซึ่งจะทำให้ทราบถึงการทำงานของ กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สนใจได้พร้อมกัน แสดงผลตัวอย่างการทำ FISH-MAR ภาพที่ 3.13



ภาพที่ 3.13 ตัวอย่างผลการทำ FISH-MAR (Okabe และคณะ, 2005)

การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลโดยประยุกต์ใช้กับไอโซโทปยังมีอีกจำนวนมาก เช่น Raman-FISH nanoSIM-FISH เป็นต้น

#### 3.4.3.1 Stable isotope probing (SIP) (Kreuzer-Martin, 2007)

เทคนิค SIP เป็นเทคนิคที่ใช้ไอโซโทปเสถียร เช่น  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  และ  $^{18}\text{O}$  เป็นต้น เพื่อช่วยระบุ การทำงานและชนิดของ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีต่อสับสเตรตไอโซโทปที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี โดย องค์ประกอบของเซลล์ที่นิยมใช้ศึกษาการสะสมไอโซโทปของสับสเตรตเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ แบ่ง ออกเป็น 2 ประเภท คือ กรดไขมันและกรดนิวคลีอิก ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

##### 1) Lipids stable isotope probing (Lipid-SIP)

การศึกษา กลุ่มประชากรโดยการทำ Lipid-SIP จะใช้กับสับสเตรตไอโซโทปเสถียร เช่น คาร์บอน  $^{13}\text{C}$  เป็นหลัก ขั้นตอนแรกต้องทำการบ่มจุลินทรีย์กับสับสเตรตเพื่อให้จุลินทรีย์สะสม ไอโซโทปเข้าสู่เซลล์ จากนั้นทำการสกัดลิพิดของไอโซโทปออกมาและทำปฏิกิริยาต่อด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC-MS) โดยลิพิดในเซลล์ที่นิยมใช้ศึกษา คือ ฟอสโฟลิพิด ซึ่งข้อดีของการ ทำ Lipid-SIP พบว่าไม่มีข้อจำกัดเรื่องระยะเวลาในการสะสมธาตุไอโซโทปเข้าสู่เซลล์เหมือน DNA-SIP ที่ต้องใช้ระยะเวลาช่วงหนึ่งในการบ่มให้มากพอที่จะเห็นความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอ 2

ไอโซโทป เพราะการตรวจวัดของ Lipid-SIP คือ GC-MS ซึ่งสามารถตรวจจับไอโซโทปได้แม้มีปริมาณน้อยก็ตาม แต่ข้อดีของ Lipid-SIP ก็มีเช่นกัน กรณีใช้ Lipid-SIP ในการศึกษาสายวิวัฒนาการของกลุ่มจุลินทรีย์ เนื่องจากลิปิดเป็นองค์ประกอบในเซลล์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อเซลล์มากพอที่จะใช้ในการศึกษาระดับพันธุกรรม อีกข้อดีของการทำ Lipid-SIP คือ ความเข้มข้นของลิปิดที่สกัดได้ต้องมากพอที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ไอโซโทปในลิปิด

## 2) Nucleic acid – stable isotope probing (NA-SIP)

NA-SIP เป็นการใช้ไอโซโทปเสถียร ได้แก่  $^{13}\text{C}$  ในรูปของสับสเตรตในการบ่มจุลินทรีย์เพื่อให้จุลินทรีย์สะสมธาตุไอโซโทปเข้าสู่เซลล์และนำไปสร้างกรดนิวคลีอิก จากนั้นนำจุลินทรีย์มาสกัดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ และนำไปแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอตามความหนาแน่นสำหรับการลอยตัว (Buoyant density) โดยเครื่อง Ultracentrifuge ซึ่งจะพบว่าดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่เกิดจากคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  จะมีความหนาแน่นมากกว่าและเมื่อถูกปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultracentrifuge จะสามารถแยกตัวออกมาจากดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่ไม่ได้สร้างจากคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  ได้จากนั้นเก็บแฟรคชัน (fraction) ของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ และนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างของการทำงานจุลินทรีย์ต่อสับสเตรตชนิดนั้น สำหรับวิธีวิเคราะห์ที่นิยมทำในขั้นต่อจาก NA-SIP คือ การทำ PCR-DGGE และ Reverse transcript PCR (RT-PCR) เป็นต้น สำหรับการทำ NA-SIP สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามชนิดกรดนิวคลีอิก ดังนี้

### - DNA-SIP (Neufeld และคณะ, 2007)

การทำ DNA-SIP สามารถทำได้ 2 แบบคือ แบบเติมและไม่เติมเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide, EtBr) ซึ่งการเติม EtBr จะช่วยให้เห็นดีเอ็นเอได้ชัดเจนยิ่งขึ้นแต่ต้องใช้ดีเอ็นเอในการแยกอย่างน้อย 15 ไมโครกรัมถึงจะเห็นการแยกที่ชัดเจน สำหรับขั้นตอนการทำ DNA-SIP แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

#### 1) การบ่มจุลินทรีย์และการสกัดดีเอ็นเอ

การบ่มตะกอนจุลินทรีย์จะเป็นการนำตัวอย่างมาบ่มกับสับสเตรตไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  ซึ่งต้องมีการคำนวณปริมาณสับสเตรตให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นให้มากพอที่จะเห็นความแตกต่างของดีเอ็นเอจากการเปรียบเทียบระหว่างคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  ดังนั้นการบ่มจุลินทรีย์ในขั้นนี้ต้องเตรียมชุดการบ่มด้วยสับสเตรต  $^{12}\text{C}$  เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบอีกชุดหนึ่งด้วยเมื่อจำนวนจุลินทรีย์เจริญเติบโตเพิ่มมากพอ (อาจตรวจนับจำนวนโดย Real-time PCR) จึงนำมาสกัดดีเอ็นเอและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer

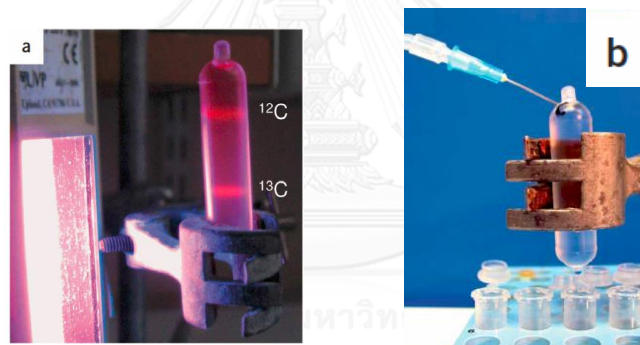
#### 2) การแยกดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Ultracentrifuge

สำหรับการแยกดีเอ็นเอแบบเติม EtBr ต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากกว่าแบบไม่เติมประมาณ 10 เท่า เพื่อบรรจุลงหลอด Ultracentrifuge โดยการบรรจุต้องคำนึงถึงน้ำหนักที่สมดุลระหว่างสอง

หลอดต้องต่างกันไม่เกิน 10 มิลลิกรัม จากนั้นปิดหลอดด้วยความร้อนและชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบอีกครั้ง และนำหลอดเข้าเครื่อง Ultracentrifuge โดยตั้งค่าความเร็วรอบ 44,100 รอบต่อวินาที (แรงหนีศูนย์กลางเฉลี่ย  $177,000 g_{av}$ ) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สำหรับเวลาในการปั่นเหวี่ยงขึ้นอยู่กับแต่ละการทดลองแต่ควรมากกว่า 36 ชั่วโมงขึ้นไปเพื่อการแยกดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

### 3) การเก็บ fraction ดีเอ็นเอ

ตั้งหลอด Ultracentrifuge ดังภาพที่ 3.14 โดยเชื่อมด้านบนต่อกับ Peristaltic pump ซึ่งมีการสูบบubbleต่อเนื่องโดยตั้งอัตราการไหลต่อ 1 แฟรคชัน (fraction) เท่ากับ 425 ไมโครลิตรต่ออนาที จากนั้นเจาะหลอดด้านล่างและเปิด Peristaltic pump เพื่อเก็บสารละลายในหลอด Ultracentrifuge โดยจำนวนแฟรคชัน ของ  $^{12}C$  และ  $^{13}C$  ควรมีจำนวนเท่าหรือใกล้เคียงกันเพื่อที่จะสามารถเปรียบเทียบผลกันได้สำหรับการเก็บแฟรคชัน แบบเต็ม EtBr ต้องเก็บภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (ควรทำด้วยความระมัดระวังและใส่อุปกรณ์ป้องกันให้เรียบร้อย) จากนั้นวัดค่าความหนาแน่นของแต่ละ fraction ซึ่งควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.690-1.760 กรัม/มิลลิลิตร และทำการตกตะกอนดีเอ็นเอและเก็บรักษาดีเอ็นเอใน TE buffer ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.14 การเก็บ fraction แบบเต็ม EtBr (a) และแบบไม่เต็ม EtBr (b)

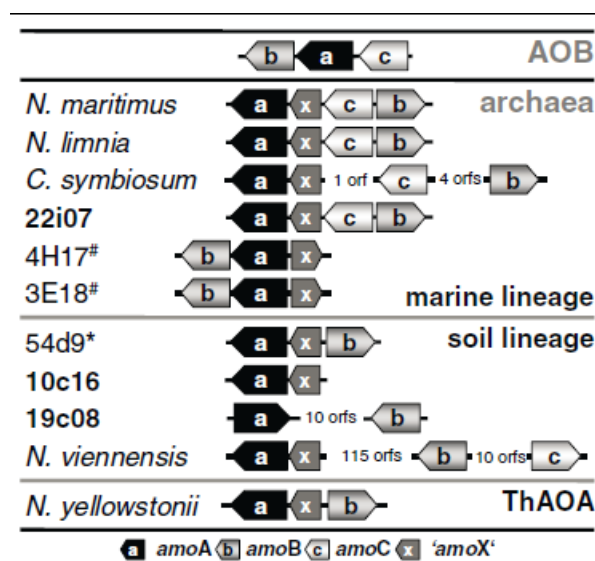
### - RNA-SIP

การเปรียบเทียบการทำ RNA-SIP กับ DNA-SIP พบว่า RNA-SIP ต้องทำการแยกดีเอ็นเอในสารละลายซีเซียมไตรฟลูออโรอะซีเตต (Cesiumtrifluoroacetate, CsTFA) ซึ่งให้ค่าความหนาแน่นในการแยกที่ดีกว่าการใช้ซีเซียมคลอไรด์ โดยสิ่งที่ต้องระวังในการทำ RNA-SIP คือปริมาณ RNA ไม่ควรมากเกินไปเพราะจะทำให้การแยกเกิดไม่สมบูรณ์ และหลังจากการแยกดีเอ็นเอแล้วเทคนิคที่นำมาใช้ตรวจนับจำนวนและระบุสายพันธุ์ ได้แก่ RT-PCR และ DGGE ซึ่งข้อดีประการหนึ่งของ RNA-SIP พบว่ามีการสะสมคาร์บอนไอโซโทปที่เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ DNA-SIP

### 3.5 ตำแหน่งยีนสำหรับการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจวัดจุลินทรีย์ AOA และ AOB

จากภาพที่ 3.7 การออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรตต์ต้องอาศัยเอนไซม์ที่สำคัญคือ แอมโมเนียโมนอกซีจีเนส (ammonia monooxygenase, AMO) ซึ่งในจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดเซอร์จะมียีน *amo* ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ และทั้ง AOA และ AOB ต่างมียีนชนิดนี้เช่นกัน ดังนั้นยีน *amo* จึงเป็นยีนสำคัญที่ใช้ในการตรวจหาากลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน

#### 3.5.1 ยีน *amo*



**FIGURE 5 |** Schematic representation of the gene arrangement of ammonia monooxygenase subunits in ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and *amoA* carrying Thaumarchaeota from marine, soil, and ThAOA lineages. "amoX" is a conserved hypothetical protein associated with the *amo* gene cluster. Fosmids from this study are highlighted in bold. 54d9\* is a fosmid isolated from a calcareous grassland (AJ627422) and 3E18\* and 4H17\* are fosmids isolated from (4000 m depth) sea water (EU016631, EU016635).

ภาพที่ 3.15 เปรียบเทียบยีน *amo* ระหว่าง AOA และ AOB (Bartossek และคณะ, 2012)

AOB ทุกสายพันธุ์มีการเรียงตัวของหน่วยย่อยยีน *amo* ดังนี้ *amoB*, *amoA* และ *amoC* ตามลำดับ ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะกับ AOB ทั้งหมดหรือจำเพาะในระดับสายพันธุ์จะต้องศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์หาตำแหน่งความเหมือนและความต่างของกลุ่มยีน AOB ทั้งหมดเพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะกับกลุ่มหรือสายพันธุ์ของ AOB ที่ต้องการ โดยตำแหน่งที่นิยมใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ของ AOB คือยีน *amoA* แต่ในหลายงานวิจัยได้มีการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะตำแหน่งยีนบน 16s rRNA เนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *amoA* ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ในแง่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้น (450 นิวคลีโอไทด์) และการอนุรักษ์ของยีนที่สูงแต่ยังคงน้อยกว่าตำแหน่งยีนบน 16s rRNA แต่สำหรับการใช้

ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะบนยีน *amoA* ในงานวิจัยด้านสิ่งแวดล้อมยังคงมีความจำเพาะสูงและเหมาะสมต่อการตรวจวัด AOB (Junier และคณะ, 2010) ขณะที่แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (ammonia-oxidizing bacteria, AOA) หน่วยย่อยยีน *amo* ประกอบไปด้วย *amoA*, *amoB*, *amoC* และ *amoX* ซึ่งการจัดเรียงหน่วยย่อยของยีนดังกล่าวแตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ โดยตำแหน่งบนยีน *amoX* หมายถึงตำแหน่งที่คาดการณ์ถึงตำแหน่งยีนอนุรักษ์ของ AOA แต่ละสายพันธุ์ (Bartossek และคณะ, 2012)



## บทที่ 4 แผนการดำเนินงานและวิธีการวิจัย

### 4.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

เพื่อระบุว่าแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) หรือแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์หลักที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพิสูจน์การใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าในระบบบำบัดน้ำเสียดังที่แสดงด้านล่างนี้มีการเจริญเติบโตร่วมกันระหว่างกลุ่มประชากร AOA และ AOB

ระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยในเบื้องต้นมีทั้งหมด 6 ระบบ คือ P1, P2, P3, P4, P5 และ P6

### 4.2 แผนผังการทดลอง

จากแผนผังการทดลองภาพที่ 4.1 การทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

**การทดลองที่ 1** การคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย

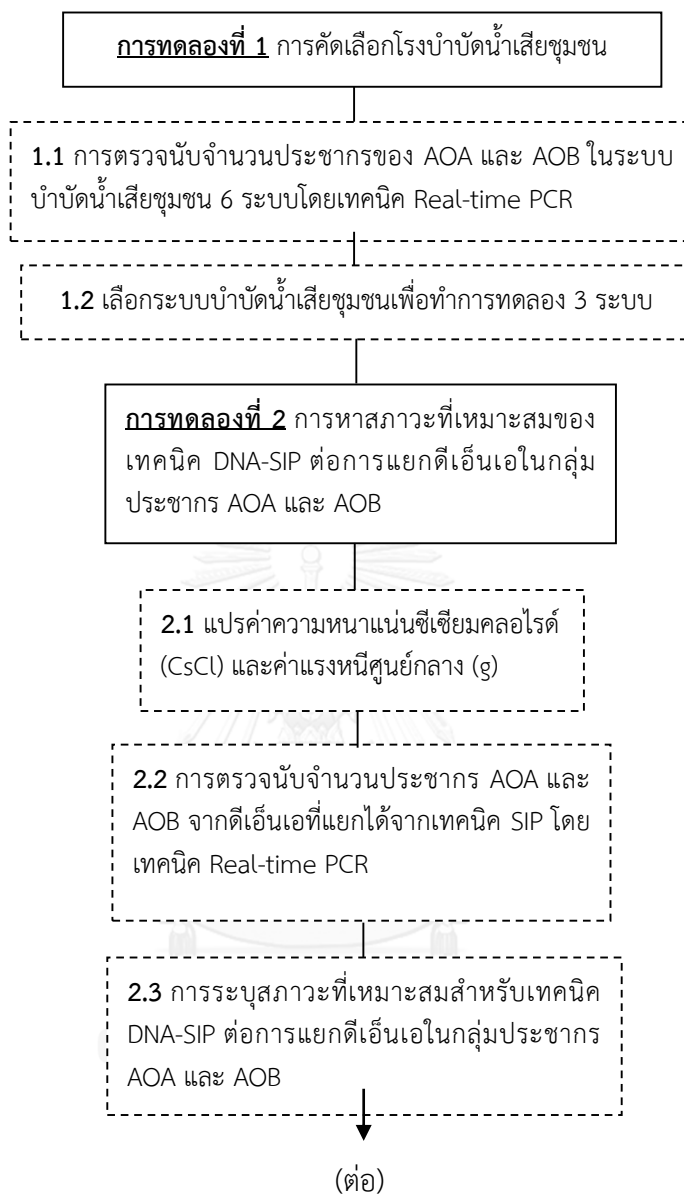
**การทดลองที่ 2** การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค DNA-SIP ต่อการกระจายตัวของดีเอ็นเอในกลุ่มประชากร AOA และ AOB

**การทดลองที่ 3** การพิสูจน์การใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนในสภาวะมีแอมโมเนียโดยเทคนิค DNA stable isotope probing (DNA-SIP)

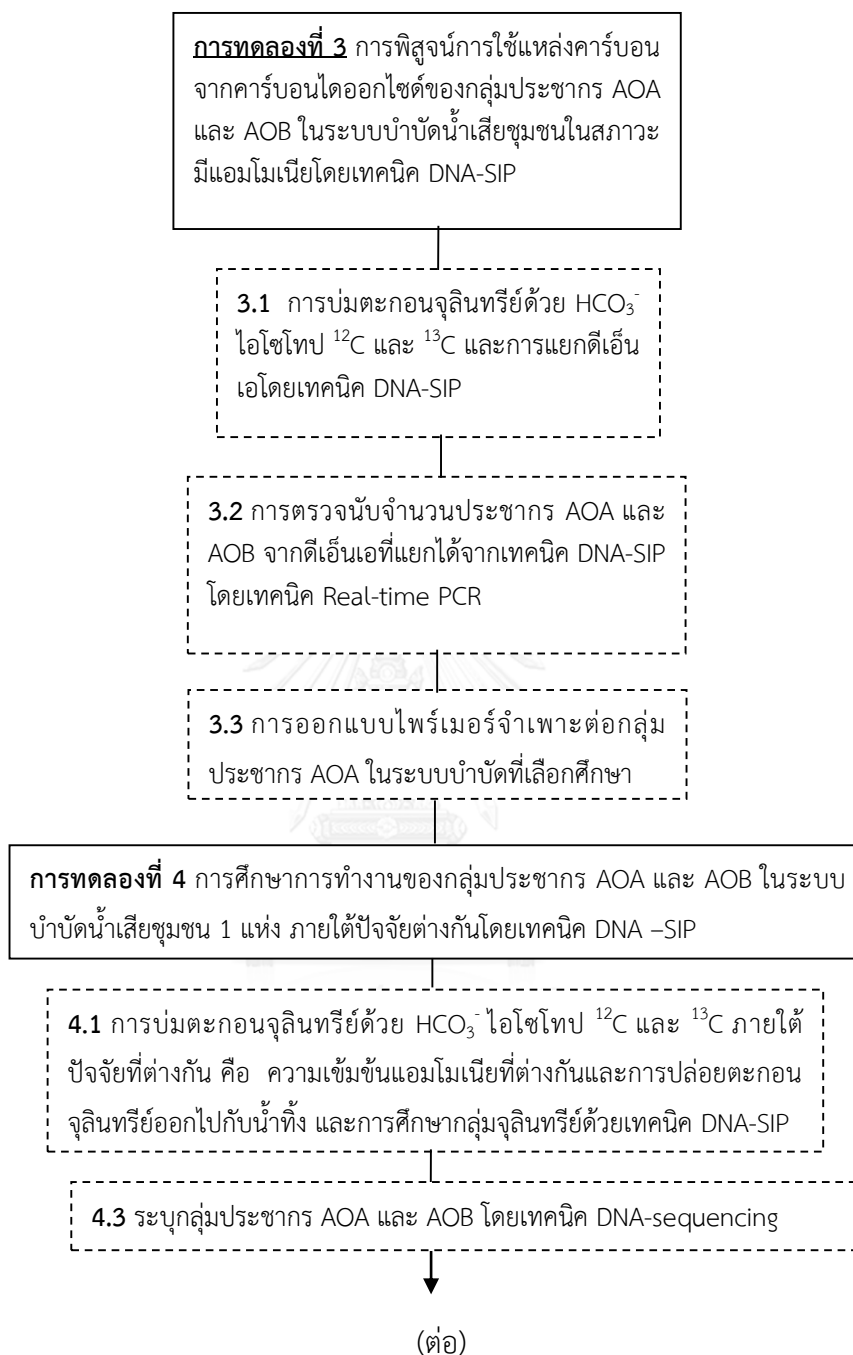
**การทดลองที่ 4** การศึกษาการทำงานของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ภายใต้ปัจจัยที่แตกต่างกันในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน 1 แห่งโดยเทคนิค DNA -SIP

**การทดลองที่ 5** การศึกษาการทำงานและจำนวนประชากร AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์กวนแบบต่อเนื่อง (Continuous stirred tank reactor, CSTR)

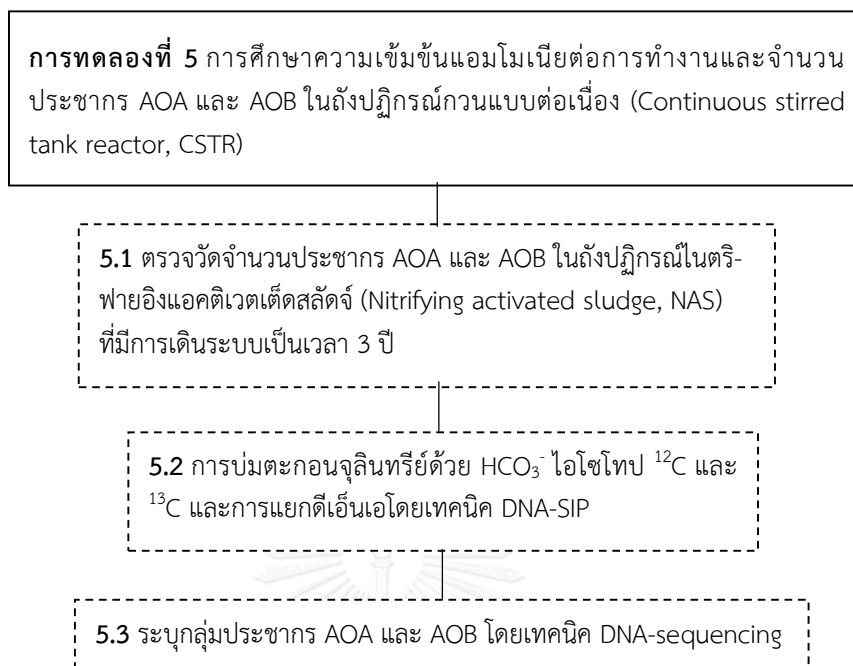




(ต่อ)

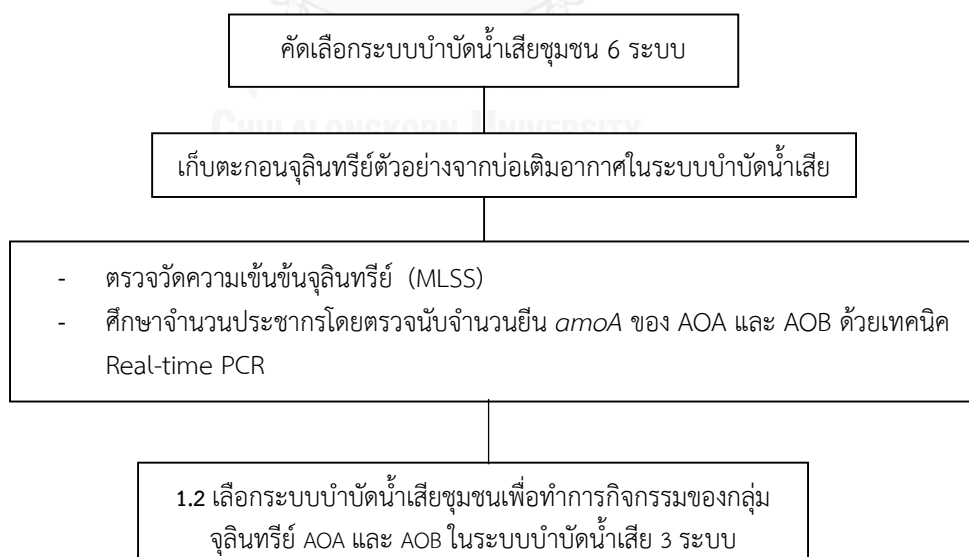


(ต่อ)



ภาพที่ 4.1 สรุปแผนผังการทดลอง

#### 4.2.1 การทดลองที่ 1 การคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย



ภาพที่ 4.2 แผนผังการทดลองช่วงที่ 1

การทดลองที่ 1 เป็นการคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน พิจารณาจากปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ที่แตกต่างกัน ดังนี้

- 1) ประเภทของระบบบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากการใช้ระบบบำบัดน้ำเสียที่แตกต่างกันจะทำให้ค่าพารามิเตอร์ในระบบแตกต่างกันด้วย เช่น สารอินทรีย์ ค่าออกซิเจนละลาย เป็นต้น โดยค่าดังกล่าวอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ที่ต่างกัน
- 2) ค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียขาเข้าและขาออก ความเข้มข้นแอมโมเนียในระบบขณะบำบัดมีค่าเดียวกับความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำเสียขาออก ซึ่งค่าความชอบของแอมโมเนียของกลุ่มจุลินทรีย์หรือค่าจลนพลศาสตร์ของแอมโมเนีย ( $K_s$ ) ของจุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB ในระดับสายพันธุ์ พบว่าที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่างกันจะมีการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน ดังนั้นความเข้มข้นแอมโมเนียจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้ในการเลือกระบบเพื่อสร้างความหลากหลายในระดับสายพันธุ์ของ AOA และ AOB
- 3) จำนวนประชากร AOA และ AOB ในระบบ เป็นการเลือกเพื่อตรวจวัดจำนวนประชากรหลักในระบบเพื่อใช้ศึกษาความเป็นไปได้ที่กลุ่มจุลินทรีย์หลักในระบบจะมีบทบาทหลักในการกำจัดแอมโมเนียในระบบ
- 4) ความหลากหลายของสายพันธุ์ประชากร AOA และ AOB ในงานวิจัยนี้ต้องการความหลากหลายทางสายพันธุ์เพื่อใช้ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ของจุลินทรีย์ที่อาจมีความแตกต่างกันในระดับสายพันธุ์

ข้อมูลในตารางที่ 4.1 เป็นข้อมูลของระบบบำบัดในปี 2554 ซึ่งใช้อ้างอิงเพื่อประกอบการคัดเลือกระบบบำบัดเท่านั้น โดยเมื่อทำการทดลองจริงจะต้องทำการตรวจนับจำนวนยีน  $amoA$  ของ AOA และ AOB ก่อนและตรวจสอบค่าพารามิเตอร์ในระบบจริงขณะทำการทดลอง ซึ่งค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ประกอบการคัดเลือกอาจแตกต่างออกไปจากข้อมูลในตารางที่ 4.1 สำหรับระบบบำบัดน้ำเสียที่คัดเลือกมาเบื้องต้นมีทั้งหมด 6 ระบบ ซึ่งจะทำการศึกษาจำนวนและค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องและคัดเลือกอย่างน้อย 3 ระบบเพื่อใช้ศึกษากิจกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ในการทดลองที่ 3

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลระบบบำบัดน้ำเสียเบื้องต้นสำหรับคัดเลือกระบบบำบัด

| ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย            |                                     | ระบบบำบัดน้ำเสีย         |   |                          |                        |                        |                        |
|---|-------------------------------------|--------------------------|---|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|   |                                     | P1                       | P2  | P3                       | P4                     | P5                     | P6                     |
| ประเภทระบบบำบัด   |                                     | Contact stabilization AS | Cyclic Activated sludge system              | Vertical loop Reactor AS | Aerated Lagoon         | Oxidation ditch        | Anoxic-Oxic AS         |
| ความเข้มข้นแอมโมเนีย (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/l) | ขาเข้า                              | 4.27-8.30                | 8.47-6.09                                   | 5.89-7.77                | -                      | -                      | 9.51-11.19             |
|   | ขาออก                               | 0.12-2.77                | 0.57-0.86                                   | 0.67-2.34                | -                      | -                      | 0.24-0.67              |
| จำนวนประชากรยีน amoA (copies/L)                             | เปรียบเทียบจำนวนระหว่าง AOA และ AOB | AOA > AOB                | AOA > AOB                                   | AOA > AOB                | AOA > AOB              | AOA > AOB              | AOA > AOB              |
|   | AOA                                 | 1.28 × 10 <sup>8</sup>   | 2.19 × 10 <sup>7</sup>                      | 1.74 × 10 <sup>7</sup>   | 2.51 × 10 <sup>4</sup> | 2.46 × 10 <sup>7</sup> | 1.00 × 10 <sup>7</sup> |
|   | AOB                                 | 1.27 × 10 <sup>3</sup>   | 1.51 × 10 <sup>5</sup>                      | 3.23 × 10 <sup>3</sup>   | 6.88 × 10 <sup>3</sup> | 4.78 × 10 <sup>3</sup> | 3.68 × 10 <sup>4</sup> |
| ความหลากหลายสายพันธุ์                                       | AOA                                 | 1.1b                     | 1.1a (2)*, 1.1b                             | 1.1b (2)*                | 1.1a(2)*, 1.1b (5)*    | 1.1b                   | 1.1b                   |
|   | AOB                                 | <i>N. oligotropha</i>    | <i>N. communis</i><br><i>N. oligotropha</i> | <i>N. oligotropha</i>    | <i>N. oligotropha</i>  | <i>N. oligotropha</i>  | <i>N. oligotropha</i>  |

\*ตัวเลขในวงเล็บระบุถึงจำนวนสายพันธุ์ที่พบในแต่ละกลุ่มของ AOA ในไฟลัม Thaumarchaeota

ข้อมูลทั้งหมดในตารางเป็นข้อมูลในปี 2554, AS = Activated sludge

#### 4.2.2 การทดลองที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค DNA-SIP ต่อการกระจายตัวของดีเอ็นเอในกลุ่มประชากร AOA และ AOB

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระจายตัวของดีเอ็นเอเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากโรเตอร์ (Rotor) และประเภทของเครื่อง Ultracentrifuge ที่ใช้ในการทดลองนี้มีลักษณะแตกต่างจากงานวิจัยอื่น ๆ ที่ผ่านมา เช่น องศาการเอียงของโรเตอร์ต่อศูนย์กลาง ทิศทางของหลอดขณะเกิดการหมุนเหวี่ยง เป็นต้น ซึ่งอาจมีผลต่อการแยกตัวของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นจำเป็นต้องมีการทดลองแปรค่าปัจจัยที่มีผลต่อการแยกดีเอ็นเอ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ปัจจัย ดังนี้

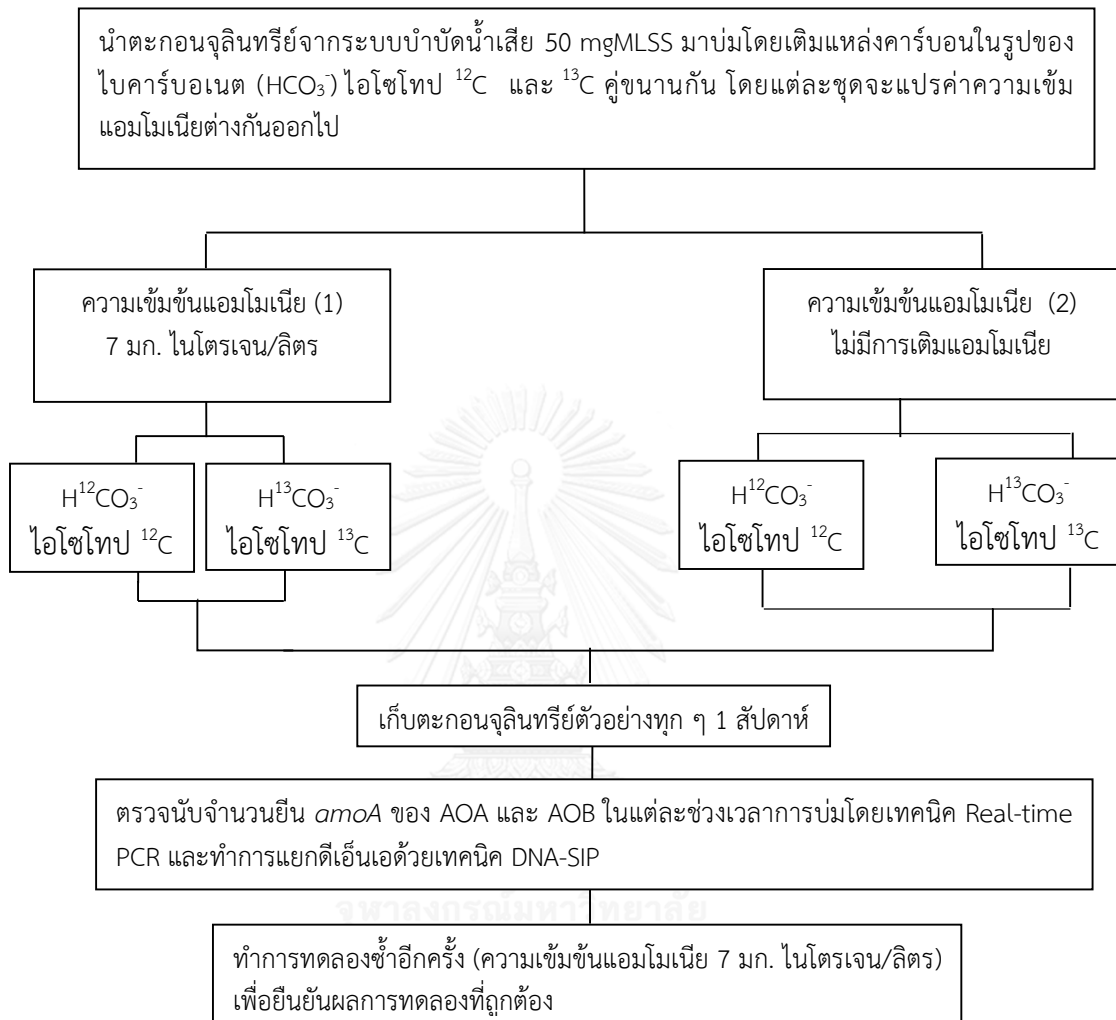
1. ความเข้มข้นสารละลายซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) – หลักการกระจายตัวของดีเอ็นเอในสารละลายซีเซียมคลอไรด์ขึ้นอยู่กับปริมาณ %GC ในดีเอ็นเอของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ สำหรับจุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB พบว่ามีปริมาณ %GC เฉลี่ยอยู่ที่ 45 % ดังนั้นการแปรค่าความเข้มข้นสารละลายซีเซียมคลอไรด์เริ่มต้นก่อนผสมกับดีเอ็นเอเพื่อนำไปปั่นแยกเกรเดียนท์ (gradient) ด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ผลที่ได้จะทำให้เกิดช่วงเกรเดียนท์ของซีเซียมคลอไรด์แตกต่างกันออกไป ซึ่งทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของสารละลายซีเซียมคลอไรด์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่ครอบคลุมช่วงการกระจายตัวของดีเอ็นเอของ AOA และ AOB ที่เกิดจากคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$

2. แรงหนีศูนย์กลาง (G-force) – ความเร็วของแรงหนีศูนย์กลางขณะทำการปั่นแยกดีเอ็นเอ อาจมีผลต่อการแยกดีเอ็นเอที่มีการสะสมของคาร์บอนไอโซโทปที่แตกต่างกันระหว่าง  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  ซึ่งจะมีผลต่อความชัดเจนของผลการทดลอง

#### 4.2.3 การทดลองที่ 3 การพิสูจน์การใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะมีแอมโมเนียของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนโดยเทคนิค DNA-SIP

การพิสูจน์การใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB โดยเทคนิค DNA-SIP มีจุดประสงค์เพื่อระบุการทำงานแบบออโตโทรฟขณะออกซิไดซ์แอมโมเนียของกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปไบคาร์บอเนต ( $\text{HCO}_3^-$ ) ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุด ตามคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  ในสารประกอบไบคาร์บอเนต โดยดำเนินการทดลองภายใต้สภาวะการบ่มที่มีแอมโมเนีย

4.2.3.1 การทดลองที่ 3.1 ขั้นตอนการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่างกันจนถึงขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอ แสดงแผนผังสรุปดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 แผนผังการทดลองที่ 3.1

- การเลือกความเข้มข้นแอมโมเนียสำหรับการบ่ม

จุดประสงค์ของการทดลองที่ 3.1 คือการระบุแหล่งคาร์บอนของ AOA และ AOB ขณะออกซิไดซ์แอมโมเนีย ซึ่งค่าความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นในน้ำเสียสังเคราะห์สำหรับการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ที่เลือกใช้คือ  $7 \text{ mgNH}_4^+-\text{N/L}$  โดยความเข้มข้นดังกล่าวมีอัตราการไหลเข้าถึงต่อวันคือ  $1.4 \text{ mgNH}_4^+-\text{N/L}$  ซึ่งส่งผลให้ค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์สำหรับการบ่มมีค่าต่ำเหมาะสมต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB นอกจากนี้ปริมาณของแอมโมเนียดังกล่าวยังเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวด้วย ซึ่งคำนวณได้จาก Stoichiometry ของ AOB โดย

ในขณะนี้ ยังไม่มี Stoichiometry ของ AOA ดังนั้นจึงอ้างอิงการคำนวณเช่นเดียวกับ AOB (รายละเอียดการคำนวณแสดงดังหัวข้อ วิธีการบ่มตะกอนจุลินทรีย์)

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าความเข้มข้นแอมโมเนียที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB โดยพิจารณาจากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าความเข้มข้นแอมโมเนียอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและการทำงานของ AOA และ AOB สายพันธุ์บริสุทธิ์ โดย AOA ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตได้ดีในช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียที่ต่ำกว่า AOB

ตารางที่ 4.2 ค่า  $K_s$  ของแอมโมเนียที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB

| กลุ่มจุลินทรีย์   |                                  | ค่า $K_s$ ของแอมโมเนีย<br>( $\text{NH}_4^+\text{-N mg.L}^{-1}$ ) | แหล่งอ้างอิง                 |
|---|----------------------------------|--|------------------------------|
| AOA<br>( $1.86 \times 10^{-3}$ -<br>$9.66 \times 10^{-3}$ ) | <i>N. maritimus</i>              | $1.86 \times 10^{-3}$  | Martens-Habben และคณะ (2009) |
|   | AR                               | $8.54 \times 10^{-3}$  | Park และคณะ (2010)           |
|   | <i>N. koreensis</i>              | $9.66 \times 10^{-3}$  | Jung และคณะ (2011)           |
| AOB<br>(0.75-24.07)   | <i>N. oligotropha</i><br>cluster | 0.75-1.68  | Koops และคณะ (2003)          |
|   | <i>N. europaea</i><br>cluster    | 11.84-24.07  | Koops และคณะ (2003)          |

งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการเจริญเติบโตของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ขึ้นกับค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในระบบ โดยจากข้อมูลในตารางที่ 4.2 แสดงถึงค่า  $K_s$  ของแอมโมเนีย ซึ่งเป็นปริมาณแอมโมเนียที่ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเป็นครึ่งหนึ่งของค่าการเจริญเติบโตสูงสุด โดย AOA จะเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ ขณะที่ AOB มีการเจริญเติบโตในช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกัน และเนื่องจากในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่พบจำนวน AOA มากกว่า AOB และมีความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียขาออกจากระบบ (ตารางที่ 4.1) ค่อนข้างต่ำ (น้อยกว่า  $0.1\text{-}2.9 \text{ mgNH}_4^+\text{-N/L}$ ) ซึ่งช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียดังกล่าวมีแนวโน้มสนับสนุนการทำงานของ AOA มากกว่า AOB ดังนั้นค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในการทดลองที่เลือกใช้จึงเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการระบุการใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ ขณะเกิดการออกซิไดซ์แอมโมเนียของจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มด้วยเทคนิค DNA-SIP โดยตะกอนจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษาในการทดลองที่ 3.1 จะคัดเลือกมาเพียง 3 ระบบ จากทั้งหมด 6 ระบบ ซึ่งข้อมูลที่แสดงดังตาราง 4.1 เป็นข้อมูลที่มีการศึกษาเมื่อปี 2554



- วิธีการบ่มตะกอนจุลินทรีย์

การบ่มตะกอนจุลินทรีย์ทุกระบบ ดำเนินการบ่มแบบถังปฏิกรณ์กวนแบบต่อเนื่อง (Continuous stirred tank reactor, CSTR) ด้วยน้ำเสียสังเคราะห์ภายใต้สภาวะระบบปิด

- องค์ประกอบในน้ำเสียสังเคราะห์ (F. Widdel และ F. Bak, 1992)

องค์ประกอบในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดลองนี้จะมีการเติมวิตามินและโลหะบางชนิด ปริมาณเล็กน้อยลงไปซึ่งจะมีส่วนช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของ AOA ซึ่งเคยประสบความสำเร็จมาแล้วในการใช้แยก AOA สายพันธุ์บริสุทธิ์ *N.maritimus* (Könneke และคณะ, 2005) โดยวิธีการเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.3 ซึ่งเป็นปริมาณสารละลายที่เติมลงในน้ำเสียสังเคราะห์ 1 ลิตร โดยสารละลายแต่ละชนิดมีสารเคมีเป็นองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารละลายแต่ละชนิดในน้ำเสียสังเคราะห์ต่อปริมาตร 1 ลิตร

| สารละลาย                    | ปริมาตร (มิลลิลิตร) |
|-----------------------------|---------------------|
| Non-chelated trace element  | 1                   |
| Selenite-tungstate solution | 1                   |
| Vitamin mixture             | 1                   |
| Thiamine solution           | 1                   |
| Vitamin B12                 | 1                   |

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลายองค์ประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์

| สารละลาย  | สารเคมี   | ปริมาตร        |
|---|---|----------------|
| Non-chelated trace element<br>(ปริมาตรรวมสุดท้าย 1 ลิตร)  | HCL (25% = 7.7M)                                    | 12.5 มิลลิลิตร |
|   | FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 2.1 กรัม       |
|   | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 30 มิลลิกรัม   |
|   | MnCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 100 มิลลิกรัม  |
|   | CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 190 มิลลิกรัม  |
|   | NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 24 มิลลิกรัม   |
|   | CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 2 มิลลิกรัม    |
|   | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 144 มิลลิกรัม  |
| Selenite-tungstate solution<br>(ปริมาตรรวมสุดท้าย 1 ลิตร) | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 36 มิลลิกรัม   |
|   | NaOH  | 0.4 กรัม       |
|   | Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O | 6 มิลลิกรัม    |
|   | Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 8 มิลลิกรัม    |

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ปริมาณสารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลายองค์ประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์

| สารละลาย   | สารเคมี                           | ปริมาณ       |
|--|-----------------------------------|--------------|
| Vitamin mixture<br>(ปริมาตรรวม 100 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 7.1 ด้วย Sodium phosphate buffer 10 mM)   | 4-aminobenzoic acid               | 4 มิลลิกรัม  |
|  | D(+)-biotin                       | 1 มิลลิกรัม  |
|  | Nicotinic acid                    | 10 มิลลิกรัม |
|  | Calcium D(+)-pantothenate         | 5 มิลลิกรัม  |
|  | Pyridoxine dihydrochloride        | 15 มิลลิกรัม |
| Thiamine solution<br>(ปริมาตรรวม 100 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 3.4 ด้วย Sodium phosphate buffer 25 mM) | Thiamine chloride dihydrochloride | 10 มิลลิกรัม |
| Vitamin B12<br>(ปริมาตรรวม 100 มล.)  | Cyanocobalamine                   | 5 มิลลิกรัม  |

- การคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างสารอาหารและปริมาณจุลินทรีย์

**ขั้นตอนที่ 1** การคำนวณน้ำหนักจุลินทรีย์ AOA และ AOB ต่อตะกอนจุลินทรีย์ 1 mgMLSS

เมื่อเก็บตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างมาแล้วทำการหา MLSS ของตะกอนจุลินทรีย์ในระบบ และนำไปตรวจนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB โดยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งจะได้จำนวนเซลล์ AOA และ AOB ต่อตะกอนจุลินทรีย์ 1 mgMLSS จากนั้นคำนวณน้ำหนักเซลล์ AOA และ AOB ทั้งหมดต่อตะกอนจุลินทรีย์ 1 mgMLSS โดยคิดจากเซลล์ 1 เซลล์มีน้ำหนักเท่ากับ  $2.8 \times 10^{-13}$  กรัม/เซลล์ (Smith และคณะ, 1992)

$$\text{น้ำหนักเซลล์ AOA และ AOB ต่อ 1 มก. MLSS} = \text{จำนวน เซลล์ใน 1 มก. MLSS (cell)} \times 2.8 \times 10^{-13} \text{ (g/cell)}$$

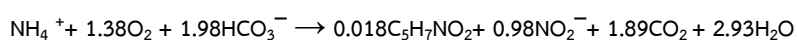
**ขั้นตอนที่ 2** การคำนวณปริมาณแอมโมเนีย ออกซิเจนและไบคาร์บอเนต

ทำการบ่มโดยใช้ MLSS เริ่มต้น 50 mgMLSS และหยุดการบ่มหลังจากจุลินทรีย์โตขึ้นอย่างน้อย 10 เท่าของจำนวนเริ่มต้น เพื่อจะได้น้ำหนักของ AOA และ AOB มากพอที่จะแยกดีเอ็นเอ เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่เกิดจากการสะสมคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  ซึ่งหนักกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่เกิดจากการสะสมคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$

$$\text{น้ำหนัก AOA และ AOB ที่เพิ่มขึ้นหลังการบ่ม} = (\text{น้ำหนัก AOA และ AOB g/1 mgMLSS}) \times (50 \text{ mg MLSS}) \times 10 \text{ เท่า}$$

จากนั้นคำนวณปริมาณแอมโมเนีย ออกซิเจนและไบคาร์บอเนตที่กลุ่มจุลินทรีย์ต้องใช้จากสมการแอมโมเนียออกซิเดชันของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (สมมติ AOA มีการออกซิไดซ์แอมโมเนียเช่นเดียวกับ AOB) โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

นำน้ำหนักจุลินทรีย์ AOA และ AOB ต่อ 1 mgMLSS ( $2.8 \times 10^{-13}$  กรัม/เซลล์) คูณ 50 และคูณเพิ่ม 10 เท่า (จำนวนเซลล์ที่ต้องการให้เพิ่มขึ้นมากพอที่จะแยกดีเอ็นเอได้) โดยค่าที่ได้สุดท้ายจะเป็นน้ำหนักของ AOA และ AOB ที่เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นโดยจะนำไปใช้คำนวณปริมาณแอมโมเนียไบคาร์บอเนต และออกซิเจนที่ต้องเติมต่อการบ่ม 1 รอบ จากสมการต่อไปนี้



ที่มา : (Lin และคณะ, 2009)

ปริมาณแอมโมเนีย – แอมโมเนียที่คำนวณได้จากสมการข้างต้น เป็นปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดที่จะทำให้ AOA และ AOB โตขึ้นอย่างน้อย 10 เท่าจากจำนวนเริ่มต้น แต่เนื่องจากการทดลองเป็นการบ่มแบบถึงปฏิกรณ์กวนแบบต่อเนื่อง ซึ่งเป็นการแบ่งเติมแอมโมเนียจากน้ำเสียสังเคราะห์ที่ไหลเข้าถึงปฏิกรณ์อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในระบบจะขึ้นอยู่กับปริมาณแอมโมเนียที่ถูกเติมเข้าระบบและอัตราการย่อยสลายแอมโมเนียของ AOA และ AOB ในแต่ละวัน

ปริมาณออกซิเจน – ออกซิเจนที่คำนวณได้จากสมการเป็นหน่วยน้ำหนักออกซิเจน ดังนั้นต้องเปลี่ยนค่าให้อยู่ในหน่วยปริมาตร (32 กรัมออกซิเจน = 24.47 ลิตร ที่ 25 °C, 1 atm) โดยปริมาตรออกซิเจนที่คำนวณได้คือปริมาตรช่องว่างภายในขวดบ่มที่เหลือหลังเติมตะกอนจุลินทรีย์ลงไปซึ่งต้องมากกว่าที่คำนวณได้ออย่างน้อย 3-5 เท่าเพื่อให้มากเกินพอต่อกลุ่มจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาการบ่ม เพราะต้องคิดปริมาณออกซิเจนสำหรับกลุ่มไนโตรดออกซิไดซิงแบคทีเรียที่เปลี่ยนรูปไนโตรดเป็นไนเตรตด้วย ซึ่งมีค่าการใช้ออกซิเจนใกล้เคียงกับ AOA และ AOB และเฮเทอโรโทรฟที่ใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายตัวเองเมื่ออยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหาร (Endogenous respiration)

ปริมาณไบคาร์บอเนต – การเติมไบคาร์บอเนตจะเติมมากกว่าที่คำนวณได้จากสมการประมาณ 3-5 เท่าเพื่อให้มากเกินพอสำหรับการสร้างเซลล์ต่อกลุ่มจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาการบ่ม

#### - ขั้นตอนการเตรียมการบ่ม

การบ่มตะกอนจุลินทรีย์แบ่งออกเป็น 2 ชุดการบ่ม โดยเติมแหล่งคาร์บอนของกลุ่มออโตโทรฟที่มีไอโซโทปต่างกัน 2 ชนิด ดังนี้

- คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปไบคาร์บอเนต ( $\text{HCO}_3^-$ ) ไอโซโทป  $^{12}\text{C}$

- คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปไบคาร์บอเนต ( $\text{HCO}_3^-$ ) ไอโซโทป  $^{13}\text{C}$

แต่ละชุดการบ่มมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ ตวงตะกอนจุลินทรีย์ตามปริมาตรที่ได้จากการคำนวณมา กรองน้ำเสียทิ้ง จากนั้นนำตะกอนจุลินทรีย์ที่กรองได้เติมลงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่เตรียมไว้ เติมแหล่งคาร์บอนไบคาร์บอเนต ( $\text{HCO}_3^-$ ) แต่ละขวดแบ่งตามไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  หรือ  $^{13}\text{C}$  จากนั้นเติมแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+$ ) ในรูปแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ในความเข้มข้นที่ต้องการทำการทดลอง จากนั้นใส่คาร์บอนไดออกไซด์ภายในถังปฏิกรณ์สำหรับบ่ม โดยเติมอากาศที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 10 นาที เพื่อไล่อากาศภายในช่องว่างของถังปฏิกรณ์สำหรับบ่มและจำกัดให้ออกซิเจนใช้แหล่งคาร์บอนจากไบคาร์บอเนตได้มากที่สุด

ระหว่างการบ่มจะมีการตรวจวัดค่าแอมโมเนียในระบบทุก 2 วัน และเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เพื่อนับจำนวนยีน *amoA* ของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียและทำการแยกดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA-SIP ในขั้นถัดไป นอกจากนี้การบ่มที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์เข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  จะทำการบ่มซ้ำอีกรอบเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง (Biological replicates)

ตารางที่ 4.5 พารามิเตอร์ที่ตรวจวัด

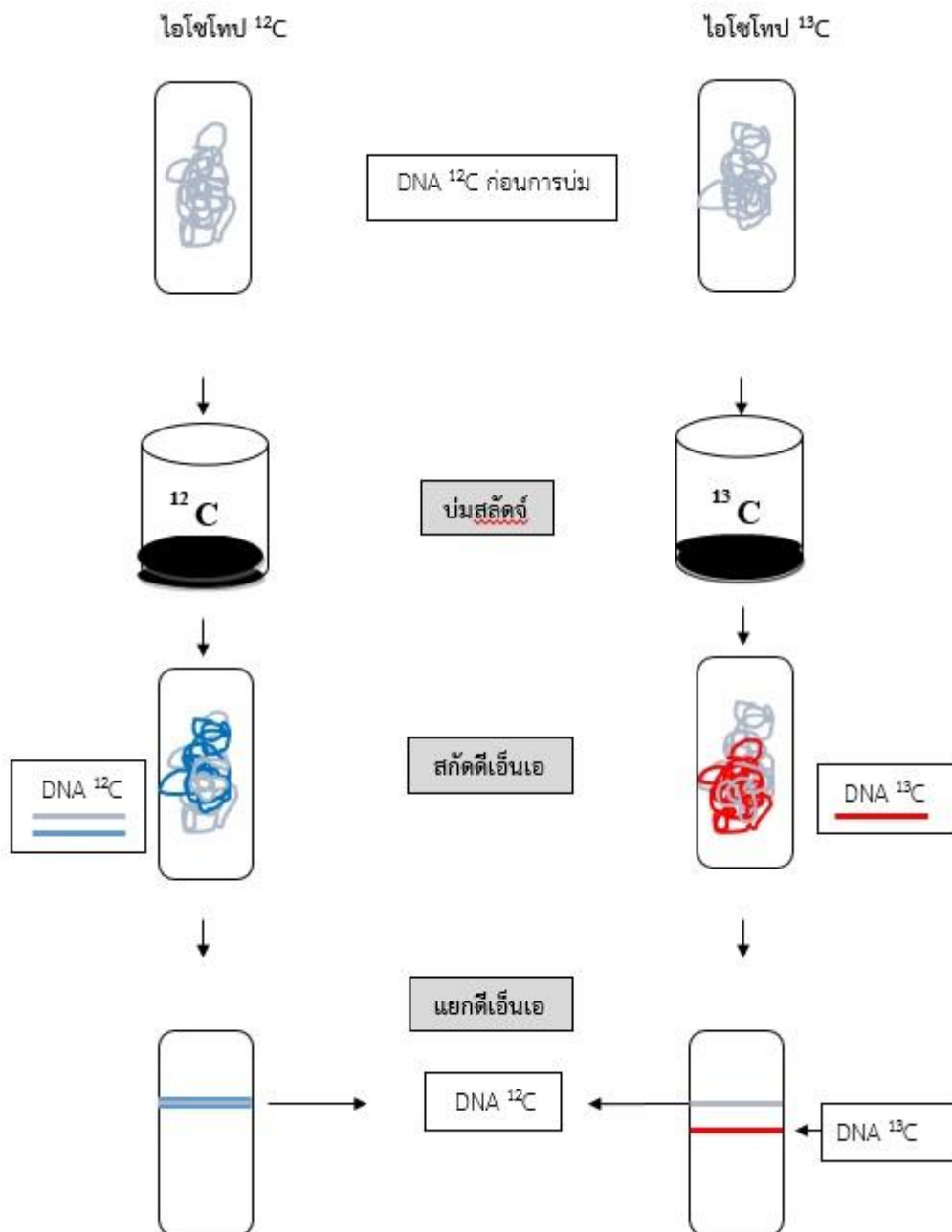
| พารามิเตอร์         | วิธีการตรวจวัด                                    | อ้างอิง   |
|---------------------|---|---|
| แอมโมเนีย           | A salicylate-hypochloride method                  | Bower และคณะ (1980)                                       |
| ไนไตรต์             | Colorimetric method                               | ( Standard Methods 4500-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -B.) |
| ไนเตรต              | UV Spectrophotometric Screening Method            | ( Standard Methods 4500-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -B.) |
| ความเป็นกรดเป็นด่าง | ใช้เครื่อง pH meter (Eutech pHTestr30, Singapore) | -   |

- การแยกดีเอ็นเอโดย Ultracentrifuge

1) หลักการแยกดีเอ็นเอ

การบ่มตะกอนจุลินทรีย์แบ่งออกเป็น 2 ชุดตามคาร์บอนไอโซโทปของไบคาร์บอเนต  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  โดยในระหว่างการบ่ม กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการทำงานแบบออกซิโตรอปในแต่ละชุดการบ่มจะใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการสร้างเซลล์ ซึ่งจะพบว่าเซลล์มีการสะสมคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  เก็บไว้ในเซลล์ ดังนั้นเมื่อนำตะกอนจุลินทรีย์ที่ผ่านการบ่มแต่ละชุดการทดลองมาสกัดดีเอ็นเอ และนำไปแยกชั้นดีเอ็นเอในสารละลายซีเซียมคลอไรด์ ( $\text{CsCl}$ ) โดยเครื่อง Ultracentrifuge ซึ่งดีเอ็นเอจะแยกชั้นตามน้ำหนักคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  โดยหากเปรียบเทียบการแยกชั้นของดีเอ็นเอจุลินทรีย์ชนิดเดียวที่มีการทำงานแบบออกซิโตรอปจะพบว่าดีเอ็นเอ

ที่สกัดได้จากชุดการบ่มด้วยคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  จะหนักกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุดการบ่มด้วยคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  แสดงการแยกดังภาพที่ 4.4



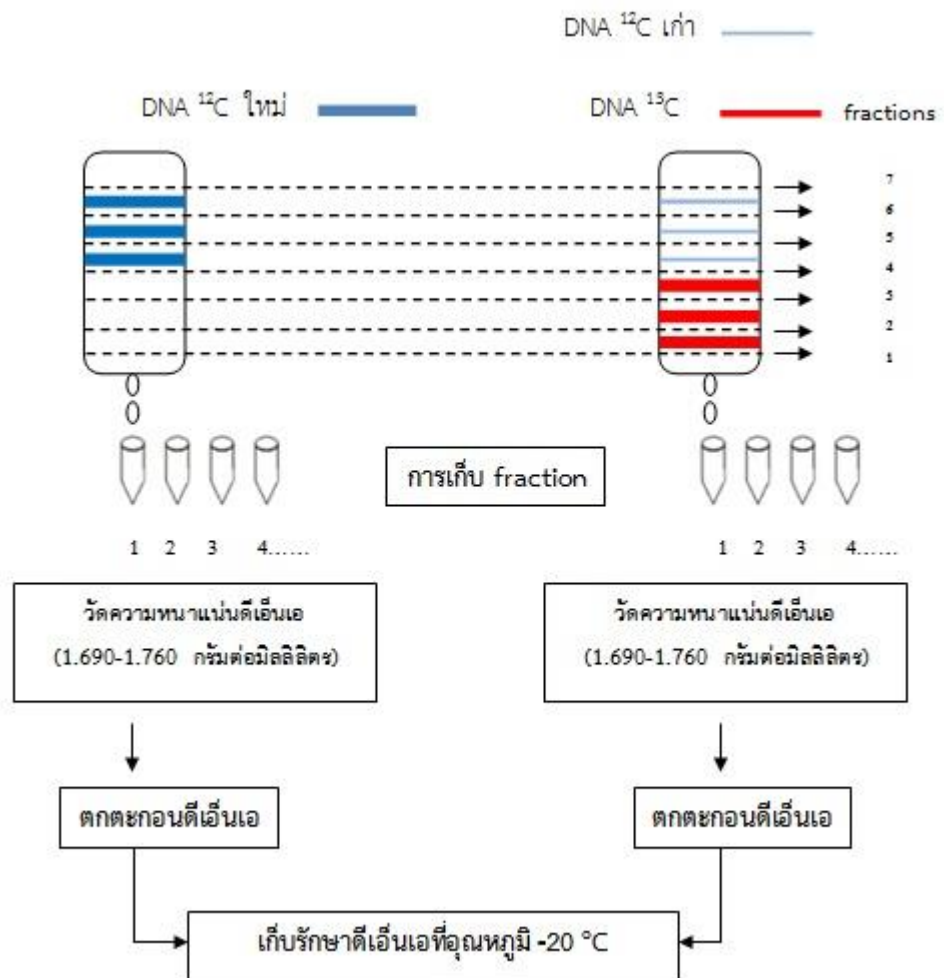
ภาพที่ 4.4 ขั้นตอนการทำ DNA stable isotope probing (DNA-SIP)

2) วิธีการแยกดีเอ็นเอ (Neufeld และคณะ, 2007)

สกัดดีเอ็นเอจากตะกอนจุลินทรีย์โดย Fast DNA SPIN Kit for Soil (QBiogene, Ohio, USA) จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

บรรจุดีเอ็นเอแต่ละคาร์บอนไอโซโทป ( $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$ ) ลงหลอด Ultracentrifuge โดยบรรจุ 1 ไอโซโทปต่อ 1 หลอด เริ่มจากนำดีเอ็นเอปริมาณ 0.5-5 ไมโครกรัมผสมกับสารละลาย TRIS GB BUFFER ซึ่งปริมาตรรวมสุดท้ายคือ 1.20 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่ปราศจากดีเอ็นเอ จากนั้นเติมสารละลายซีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 7.163 โมลาร์ (ซึ่งซีเซียมคลอไรด์ 60.3 กรัมละลายในน้ำที่ปราศจากดีเอ็นเอ 50 มิลลิลิตร) ที่มีความหนาแน่น 1.88-1.89 กรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 4.8 มิลลิลิตรลงไปผสมในเข้ากันและบรรจุสารละลายที่เตรียมได้ทั้งหมดลงในหลอด Ultracentrifuge และแทนที่ช่องว่างภายในหลอดที่เหลือด้วย Mineral oil จนเต็มหลอด (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศขณะบรรจุ) ชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบระหว่างหลอด Ultracentrifuge ของดีเอ็นเอแต่ละคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  โดยทั้งสองหลอดต้องมีน้ำหนักต่างกันไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ปิดฝาหลอดด้วยความร้อน ตรวจสอบหลอดไม่ให้มีจุดรั่วไหลและชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบอีกครั้ง จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่อง Ultracentrifuge เพื่อแยกชั้นดีเอ็นเอ โดยตั้งค่าความเร็วรอบ 44,100 รอบต่อวินาที (แรงหนีศูนย์กลางเฉลี่ย  $177,000 g_{av}$ ) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดีเอ็นเอภายในหลอดจะเกิดการแยกชั้นตามน้ำหนักคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  เมื่อเปรียบเทียบระดับชั้นดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันระหว่างหลอดไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  และ  $^{12}\text{C}$  จะพบว่าภายในหลอดไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  จะพบดีเอ็นเอในระดับเดียวกันกับหลอดไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเดิมภายในเซลล์ก่อนการบ่มอยู่ใน และมีดีเอ็นเอบางส่วนซึ่งสร้างจากคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  ระหว่างการบ่มอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าดีเอ็นเอชนิดเดียวกันเมื่อเทียบกับหลอดไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  แสดงการแยกดังภาพที่ 4.5

## 3) การเก็บ fraction และการตกตะกอนดีเอ็นเอที่ผ่านการแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge

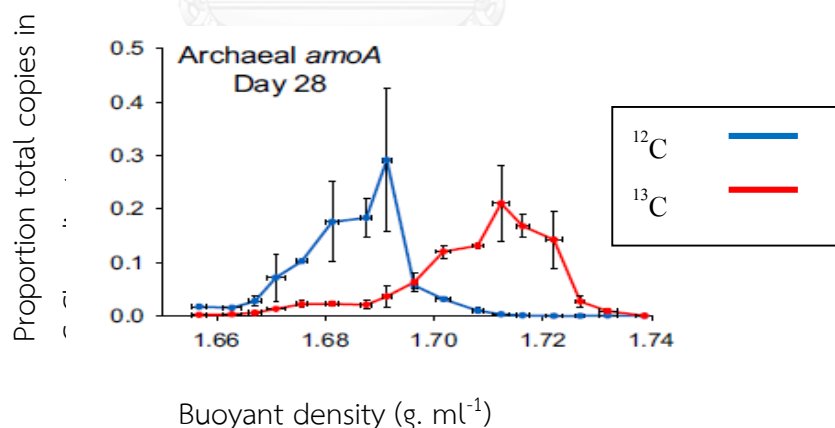


ภาพที่ 4.5 ขั้นตอนการเก็บแฟรคชันและการตกตะกอนดีเอ็นเอ

การเก็บ fraction จะเก็บทางปลายหลอดโดยแบ่งเก็บ fraction ละประมาณ 200 ไมโครลิตร โดยต้องเก็บให้ปริมาตรใกล้เคียงกันทุกหลอด และจำนวน fraction ระหว่าง <sup>12</sup>C และ <sup>13</sup>C ควรมีจำนวนเท่ากันเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่พบในแต่ละ fraction ได้ จากนั้นวัดค่าความหนาแน่นของแต่ละ fraction โดยเครื่อง Refractometer โดยค่าความหนาแน่นควรอยู่ในช่วงประมาณ 1.690-1.760 กรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอแต่ละ fraction และเก็บรักษาดีเอ็นเอในสารละลาย TE buffer ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 4.2.3.2 การทดลองที่ 1.1, 2.2 และ 3.2 การนับจำนวนเซลล์จากยีน *amoA* ของ AOA และ AOB

เนื่องจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่สนใจในงานวิจัยนี้คือ AOA และ AOB ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มจะมียีน *amoA* ซึ่งเป็นยีนที่จำเพาะกับจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดเซอร์ โดยยีนชนิดนี้มีหน้าที่สร้างเอนไซม์แอมโมเนียโมนอกซีจีเนส (ammonia-monooxygenase, AMO) ซึ่งช่วยจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดเซอร์เปลี่ยนสภาพที่แอมโมเนียไปเป็นไฮดรอกซีลามีน ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) ซึ่งเป็นสารตัวกลางก่อนจะเปลี่ยนรูปเป็นไนไตรต์ตามลำดับ การนับจำนวนเซลล์ของ AOA และ AOB จะใช้เทคนิค Real-time PCR (Agilent Mx3000P) โดยข้อมูลตารางที่ 4.6 แสดงไพรเมอร์ที่เลือกใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณและการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเข้าจับของไพรเมอร์กับยีน *amoA* ของ AOA และ AOB หลังนับจำนวนแต่ละแฟรคชันแล้ว นำจำนวนเซลล์ของแต่ละกลุ่มจุลินทรีย์ที่นับได้ มาสร้างกราฟเปรียบเทียบระหว่างจำนวนของกลุ่มจุลินทรีย์จากการบ่มจากคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  โดยกราฟเป็นค่าระหว่างความหนาแน่นและสัดส่วนต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดในแต่ละแฟรคชัน ซึ่งจะให้เห็นแนวโน้มกระบวนการสร้างเซลล์จากคาร์บอนไดออกไซด์ของ AOA และ AOB โดยตัวอย่างกราฟแสดงในภาพที่ 4.6 ซึ่งกราฟของ  $^{13}\text{C}$  ที่เบ้ขวาแสดงถึงจำนวนกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการสะสมคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  เข้าไปภายในเซลล์ในระหว่างการบ่ม



ภาพที่ 4.6 กราฟเปรียบเทียบจำนวน AOA ที่ผ่านการบ่มด้วยคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$

(Zhang และคณะ, 2010)



ตารางที่ 4.6 ไพรเมอร์จำเพาะกับกลุ่มจุลินทรีย์สำหรับเทคนิค Real-time PCR และ PCR สำหรับ DNA-sequencing

| กลุ่มจุลินทรีย์        | AOA   | AOB   |
|------------------------|---|---|
| ยีนจำเพาะ              | <i>amoA</i> gene  | <i>amoA</i> gene                                |
| ความครอบคลุม           | AOA ทั้งหมดที่มียีน <i>amoA</i> ภายในเซลล์  | AOB ทั้งหมดที่มียีน <i>amoA</i> ภายในเซลล์      |
| ชื่อไพรเมอร์           | <i>CamoA</i> -19F/<br><i>CamoA</i> -616R  | <i>amoA</i> -1F/<br><i>amoA</i> -2R             |
| ลำดับนิวคลีโอไทด์      | ( ATGGTCTGGYTWAGACG )/<br>(GCCATCCABCKRTANGTCCA)  | (GGGGTTTCTACTGGTGGT) /<br>(CCCTCKGSAAGCCTTCTTC) |
| สภาวะ<br>Real-time PCR | initial denaturation 10 นาที 95°C<br>DNA denaturation 1.5 นาที 95°C<br>primer annealing 0.5 นาที 56 °C<br>DNA extension 1 นาที 72 °C<br>final extension 6 นาที 78 °C <span style="float: right; margin-left: 20px;">} 40 รอบ</span> |   |
| แหล่งอ้างอิง           | Pester และคณะ (2011)  | Rotthauwe และคณะ (1997)                         |

#### 4.2.3.3 การทดลองที่ 3.3 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อกลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียที่เลือกศึกษา

หลังจากกระบวนการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียที่เลือกศึกษาแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการระบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR-cloning-sequencing โดยในการทดลองนี้จะศึกษาเฉพาะ AOA เท่านั้น เมื่อทำการ โดยอ้างอิงกับฐานข้อมูลของ AOA จาก Pester และคณะ (2011) จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์จากรหัสพันธุกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA ณ ตำแหน่งยีน *amoA* ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียที่ทำการศึกษาแต่ละแห่งด้วยโปรแกรม ARB ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบจะจำเพาะต่อ AOA เพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น

- การตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ออกแบบ
  - 1) ตรวจสอบความเข้ากันได้กับจุลินทรีย์ AOA กลุ่มอื่น หรือจุลินทรีย์กลุ่ม AOB ทั้งหมด

- 2) ถอดรหัสพันธุกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำการเพิ่มจำนวนโดยไพรเมอร์ที่ออกแบบ โดยเทคนิค PCR-cloning-sequencing จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ เพื่อตรวจสอบกลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้ว่าตรงกับกลุ่มจุลินทรีย์ในตะกอนจุลินทรีย์ตั้งต้นที่ใช้ ออกแบบไพรเมอร์หรือไม่
- 3) ตรวจสอบโดยการทำ Real-time PCR กับ DNA-SIP ของระบบที่ใช้ทำการออกแบบไพรเมอร์

#### 4.2.4 การทดลองที่ 4 การศึกษาการทำงานของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ภายใต้ปัจจัยที่แตกต่างกันในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน 1 แห่งโดยเทคนิค DNA-SIP

เมื่อพิสูจน์การใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปคาร์บอนตในน้ำเสียสังเคราะห์ของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB แล้ว การทดลองต่อไปคือการเลือกระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่ทำการศึกษาในการทดลองที่ 3 มา 1 ระบบ เพื่อทำการศึกษาการทำงานของ AOA และ AOB ภายใต้ปัจจัยที่ต่างกัน โดยมีแผนการทดลอง ดังนี้

ตารางที่ 4.7 แผนการทดลองการศึกษาการทำงานของ AOA และ AOB ภายใต้ปัจจัยที่แตกต่างกัน

| ระยะเวลา<br>(วัน) | ความเข้มข้นแอมโมเนีย ( $\text{mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ ) |            |            |          |
|-------------------|--|------------|------------|----------|
|                   | 7  | 7          | 70         | 0        |
| 0                 | กักตะกอน   | ปล่อยตะกอน | ปล่อยตะกอน | กักตะกอน |
| 7                 | ↓  | ↓          | ↓          | ↓        |
| 14                | ↓  | ↓          | ↓          | ↓        |
| 21                | ↓  | ↓          | ↓          | ↓        |
| 28                | ↓  | ↓          | ↓          | ↓        |

จากตารางที่ 4.7 เป็นการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ซ้ำรอบที่ 3 เพื่อยืนยันผลการทดลองจากการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ในรอบที่ 1 และรอบที่ 2 (จากการทดลองที่ 3) โดยการบ่มตะกอนจุลินทรีย์จะมี 2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ได้แก่

- 1) การปล่อยตะกอนออกไปกับน้ำทิ้งและการกักตะกอนจุลินทรีย์ไว้ภายในถังปฏิกรณ์ขณะบ่ม เนื่องจากการออกแบบการทดลองสำหรับการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ในการทดลองที่ 3 ตะกอนจะถูกกักไว้ภายในถังปฏิกรณ์ไม่มีการปล่อยออกไปกับน้ำทิ้ง มีเพียงการปั่นกววนเพียงเล็กน้อยด้วย Magnetic stirrer เพื่อให้ความเข้มข้นแอมโมเนียเท่ากันทั่วถังปฏิกรณ์ สำหรับตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้น

สำหรับการบ่มในถังปฏิกรณ์ใช้ปริมาณน้อย (50 mgMLSS) และจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ทุกสัปดาห์ ทำให้ไม่สามารถปล่อยตะกอนออกไปกับน้ำทิ้งได้ แต่หากไม่มีการปล่อยตะกอนออกไปกับน้ำทิ้งเซลล์เก่าซึ่งประกอบไปด้วยคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  จะยังคงอยู่ในถังปฏิกรณ์ ดังนั้นเพื่อลดปริมาณเซลล์เก่าให้น้อยลงโดยให้ในถังปฏิกรณ์มีแต่เซลล์ใหม่ที่เกิดจากคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  อาจทำให้ผลกราฟ DNA-SIP มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น

2) ค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียขาเข้า โดยทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นแอมโมเนียสูง (70 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L) และต่ำ (7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของความเข้มข้นแอมโมเนียที่มีผลต่อการทำงานที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB

การทดลองที่ 4 แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลองย่อย ดังนี้

ชุดการทดลอง 4.1 - บ่มตะกอนจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ขาเข้า 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L โดยกักตะกอนจุลินทรีย์และใช้เป็นชุดควบคุมการทดลอง เพื่อยืนยันผลการทดลองที่สอดคล้องกับการบ่มในรอบที่ 1 และการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ซ้ำในรอบที่ 2

ชุดการทดลอง 4.2 - บ่มตะกอนจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ขาเข้า 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L โดยมีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งตั้งแต่เริ่มต้น เพื่อเปรียบเทียบกับผลการบ่มตะกอนจุลินทรีย์แบบกักตะกอน (ชุดการทดลอง 1)

ชุดการทดลอง 4.3 - บ่มตะกอนจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ขาเข้า 70 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L โดยมีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งตั้งแต่เริ่มต้น เพื่อดูผลความเข้มข้นของแอมโมเนียต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB

ชุดการทดลอง 4.4 - บ่มตะกอนจุลินทรีย์ในสภาวะไม่เติมแอมโมเนียเพื่อตรวจสอบการใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงานโดยมีไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน

**4.2.5 การทดลองที่ 5** การศึกษาการทำงานและจำนวนประชากร AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์กวนแบบต่อเนื่อง (Continuous stirred tank reactor, CSTR)

ถังปฏิกรณ์ที่สำหรับการศึกษาการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ในการทดลองนี้เป็นถังปฏิกรณ์ที่มีการเดินระบบภายใต้สภาวะสนับสนุนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB ที่มีการทำงานแบบอโตโทรฟ เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ปี เรียกว่าระบบไนตริฟายอิงแอกติเวเตดสลัดจ์ (Nitrifying activated sludge, NAS) ซึ่งมีข้อมูลการเดินระบบ ดังนี้

ตารางที่ 4.8 ข้อมูลการเดินระบบของระบบไนตริฟายอิงแอกติเวตเต็ดสลัดจ์

| พารามิเตอร์                                   | ค่าที่ตรวจวัดได้ |
|---|------------------|
| ระยะเวลาพักน้ำ (HRT) (day)                    | 5                |
| [NH <sub>3</sub> ] น้ำเข้า (mg-N/L.d)         | 28.07±3          |
| อัตราการไหลเข้าของ NH <sub>3</sub> (mg-N/L.d) | 5.61±0.60        |
| [NH <sub>3</sub> ] น้ำออก (mg-N/L.d)          | 0.13±0.10        |
| [NO <sub>2</sub> ] น้ำออก (mg-N/L.d)          | 0.02±0.02        |
| [NO <sub>3</sub> ] น้ำออก (mg-N/L.d)          | 26.20±5          |
| ไนโตรเจนทั้งหมด (mg-N/L.)                     | 26.35±5          |
| MLSS (mg/L)                                   | 100±20           |

วิธีการดำเนินการทดลองในขั้นแรกคือการตรวจนับจำนวนประชากร AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ จากนั้นนำตะกอนจุลินทรีย์ปริมาณ 50 mgMLSS มาทำการบ่มเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 ในถังปฏิกรณ์ปริมาตรน้ำเสียสังเคราะห์ 1 ลิตร ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L จากนั้นระบุการใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปไบคาร์บอเนตของ AOA และ AOB โดยเทคนิค DNA-SIP และระบุกลุ่มประชากร AOA และ AOB โดยเทคนิค DNA-sequencing

## บทที่ 5 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 5.1 การทดลองที่ 1 การคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย

ระบบบำบัดน้ำเสียที่ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาการทำงานของกลุ่มนจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดเซอร์ มีทั้งหมด 6 ระบบ เรียกว่า P1-P6 เบื้องต้นระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 6 ระบบจะถูกนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB (ภาพที่ 5.1) ซึ่งพบว่า 6 ระบบบำบัดที่ทำการศึกษาจำนวนยีน (กรกฎาคม ปี 2557) ทุกระบบพบจำนวนยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า AOB แตกต่างจากข้อมูลที่เคยศึกษาเมื่อปี 2554 (แสดงดังตารางที่ 4.1) ที่ในบางระบบบำบัดจะพบยีน *amoA* ของ AOA น้อยกว่า AOB ดังนั้นข้อมูลประกอบการพิจารณาการคัดเลือกระบบบำบัดสำหรับงานวิจัยนี้ จึงพิจารณาจากข้อมูล ณ ช่วงการทำวิจัย โดยข้อมูลทางกายภาพและทางเคมีเป็นข้อมูลเฉลี่ยในปี 2556-2557 (แสดงดังตารางที่ 5.1) จะถูกใช้ประกอบการคัดเลือกระบบบำบัดเพื่อศึกษากิจกรรมของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยปัจจัยที่ใช้ประกอบการคัดเลือกระบบบำบัด มีดังนี้

#### 1. ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียขาเข้าและขาออก

เนื่องจากระบบบำบัด 6 แห่งที่ทำการคัดเลือก เป็นระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนทั้งหมด แต่ระบบบำบัด P4 และ P5 เป็นระบบบำบัดขนาดเล็ก ซึ่งข้อมูลจากห้องปฏิบัติการของระบบบำบัดไม่ได้แสดงปริมาณแอมโมเนียในน้ำเสียขาเข้าและขาออกทำให้ไม่ทราบแนวโน้มค่าความเข้มข้นแอมโมเนียที่แท้จริงในระบบ เหมือนดังระบบบำบัดขนาดใหญ่ ได้แก่ P1, P2, P3 และ P6 โดยการตรวจสอบข้อมูลย้อนหลังพบว่าความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียขาเข้าและขาออกของระบบบำบัดขนาดใหญ่ค่อนข้างคงที่และมีค่าต่ำ ดั่งจึงสนใจเลือกระบบบำบัดขนาดใหญ่มาศึกษาในงานวิจัยนี้

#### 2. จำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB

จากการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ทั้ง 6 ระบบบำบัด พบว่าทุกระบบมีจำนวน AOA สูงมาก (มากกว่า  $1 \times 10^7$  copies/mgMLSS) ยกเว้นระบบบำบัด P4 ( $1.25 \times 10^4$  copies/mgMLSS) ขณะที่ยีน *amoA* ของ AOB พบจำนวนมากที่ระบบบำบัด P2 และ P6 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบจำนวนระหว่าง AOA และ AOB ทำให้ไม่สามารถพิจารณาการเลือกระบบจากแผนการทดลองเดิมได้ (AOA > AOB, AOA < AOB และ AOA  $\approx$  AOB) ดังนั้นจึงนำประเภทของระบบบำบัดและอัตราการกำจัดแอมโมเนียโดยกลุ่มนจุลินทรีย์อโตโทรปมาประกอบการพิจารณาเพิ่มเติม แสดงรายละเอียดในหัวข้อที่ 3 และ 4 ต่อไป

#### 3. ประเภทของระบบบำบัด

ระบบบำบัดทั้ง 6 แห่งมีการเดินระบบที่แตกต่างกัน ดังนี้

ระบบบำบัด P1 – Contact stabilization activated sludge หรือระบบปรับเสถียรสัมผัส เป็นระบบที่มีการนำตะกอนจุลินทรีย์เวียนกลับเข้ามาบริเวณทางน้ำเสียเข้า ซึ่งจะสัมผัสกับน้ำเสียโดยตรง โดยตะกอนจุลินทรีย์ดังกล่าวก่อนเวียนกลับมาจะถูกเติมอากาศเพื่อปรับสภาพและกระตุ้นการทำงานให้เกิดประสิทธิภาพขณะทำการบำบัดอย่างเต็มที่

ระบบบำบัด P2 – Cyclic activated sludge system เป็นระบบเอสบีอาร์ (Sequencing batch reactor, SBR) มีจุดประสงค์เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ อีกทั้งยังกำจัดธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเสียได้ โดยใน 1 รอบการบำบัด (3 ชั่วโมง) จะแบ่งออกเป็น 3 ช่วง คือ 1. เติมน้ำเสียและเติมอากาศ (Fill – aeration) 2. หยุดการเติมอากาศเพื่อปล่อยตกตะกอนแต่ยังคงปล่อยน้ำเสียเข้าสู่ระบบ (Fill – Settle) และเมื่อน้ำเสียถึงระดับที่กำหนดในบ่อเติมอากาศจะหยุดเติมน้ำเสีย 3. ปล่อยน้ำเสียออก Decant (Surface skim) โดยน้ำเสียในชั้นนี้เป็นน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดจนได้มาตรฐานแล้ว สามารถปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้

ระบบบำบัด P3 - Vertical looped reactor activated sludge เป็นระบบตะกอนเร่งที่เพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยการบำบัดจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจะเป็นการเดินระบบด้วยวิธี Contact stabilization ซึ่งจะเกิดสภาวะ Anoxic เพื่อให้เกิดการกำจัดธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในระบบบำบัดน้ำเสีย ส่วนที่สองเป็นระบบเติมอากาศเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ในระบบให้ได้มาตรฐาน

ระบบบำบัด P4 – Aerated lagoon เป็นระบบบ่อเติมอากาศ ซึ่งออกแบบให้เกิดการผสมระหว่างตะกอนจุลินทรีย์และน้ำเสีย ในสภาวะที่มีออกซิเจนละลายน้ำอย่างเพียงพอเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพการบำบัดมากที่สุด นอกจากนี้จะต้องมีบ่อป้อม (Polishing Pond หรือ Maturation Pond) รับน้ำเสียจากบ่อเติมอากาศเพื่อตกตะกอนและปรับสภาพน้ำทิ้งก่อนระบายออกสู่สิ่งแวดล้อม

ระบบบำบัด P5 – Oxidation ditch เป็นระบบบำบัดแบบคลองวนเวียน ซึ่งน้ำเสียจะปล่อยเข้าสู่ระบบบำบัดและไหลแบบตามแนวยาวในถังเติมอากาศซึ่งค่าการละลายออกซิเจนจะแตกต่างกันออกไปตามความยาวของถังจนกระทั่งค่าการละลายออกซิเจนมีค่าเป็นศูนย์ซึ่งจะอยู่ในสภาวะการบำบัดแบบ Anoxic เพื่อให้เกิดการกำจัดธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

ระบบบำบัด P6 – Anoxic-oxic (AO) ช่วงการบำบัดในระบบจะถูกแบ่งออกเป็น 3 ช่วง มีความแตกต่างที่ค่าการละลายออกซิเจน โดยช่วงเริ่มต้นของบ่อเติมอากาศกำหนดให้สร้างสภาวะการคัดเลือกสายพันธุ์ทางชีวภาพ (Selector zone) มีค่าการละลายออกซิเจน 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกิดสภาวะ Anoxic และช่วงที่ 2 กำหนดให้เกิดการสร้างสภาวะพอดิชาดออกซิเจน (Anoxic zone) มีค่าการละลายออกซิเจน 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงนี้จะเกิดการกำจัดธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้ ช่วงที่ 3 กำหนดให้เกิดการสร้างสภาวะใช้ออกซิเจน (Oxic zone) มีค่าการละลายออกซิเจน 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสารอินทรีย์จะถูกกำจัดในช่วงนี้ หลังจากนั้นน้ำเสียที่ถูกบำบัดแล้วพร้อมตะกอนจุลินทรีย์จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกส่งไปยังถังตกตะกอนขั้นสุดท้าย (Clarifier tank)

ส่วนที่สองส่งกลับไปยังระบบบำบัดช่วงที่ 2 เพื่อให้จุลินทรีย์ย่อยสลายไนเตรตที่เกิดจากปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันในช่วงการบำบัดแบบใช้ออกซิเจน (Oxic zone)

#### 4. อัตราการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียด้วยจุลินทรีย์กลุ่มออโตโทรฟ

การคำนวณอัตราการกำจัดแอมโมเนียด้วยจุลินทรีย์กลุ่มออโตโทรฟในระบบบำบัดน้ำเสียคำนวณได้ ดังนี้

- จำนวนปริมาณแอมโมเนียที่จุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรฟใช้ในกระบวนการสร้างเซลล์ อัตราส่วน BOD: N: P = 100: 5: 1 ดังแสดงในสมการ ต่อไปนี้

$$\text{แอมโมเนียเฮเทอโรโทรฟ (mgNH}_4^+\text{-N/L)} = \frac{[5 \times (\text{BOD}_{\text{น้ำเข้า}} - \text{BOD}_{\text{น้ำออก}})]}{100}$$

- จำนวนปริมาณแอมโมเนียที่ถูกออกซิไดซ์โดยกลุ่มจุลินทรีย์ออโตโทรฟ ดังสมการ

$$\% \text{แอมโมเนียออโตโทรฟ} = \frac{[\text{แอมโมเนีย}_{\text{น้ำเข้า}} - \text{แอมโมเนีย}_{\text{น้ำออก}} - \text{แอมโมเนีย}_{\text{เฮเทอโรโทรฟ}}] \times 100 \text{ (mgNH}_4^+\text{-N/L)}}{(\text{แอมโมเนีย}_{\text{น้ำเข้า}} - \text{แอมโมเนีย}_{\text{น้ำออก}}) \text{ (mgNH}_4^+\text{-N/L)}}$$

ผลการคำนวณจะได้เป็นสัดส่วนการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ออโตโทรฟเมื่อเทียบกับการกำจัดแอมโมเนียทั้งหมดที่เกิดขึ้นในระบบบำบัด ซึ่งแต่ละระบบแสดงค่าดังตารางที่ 5.1

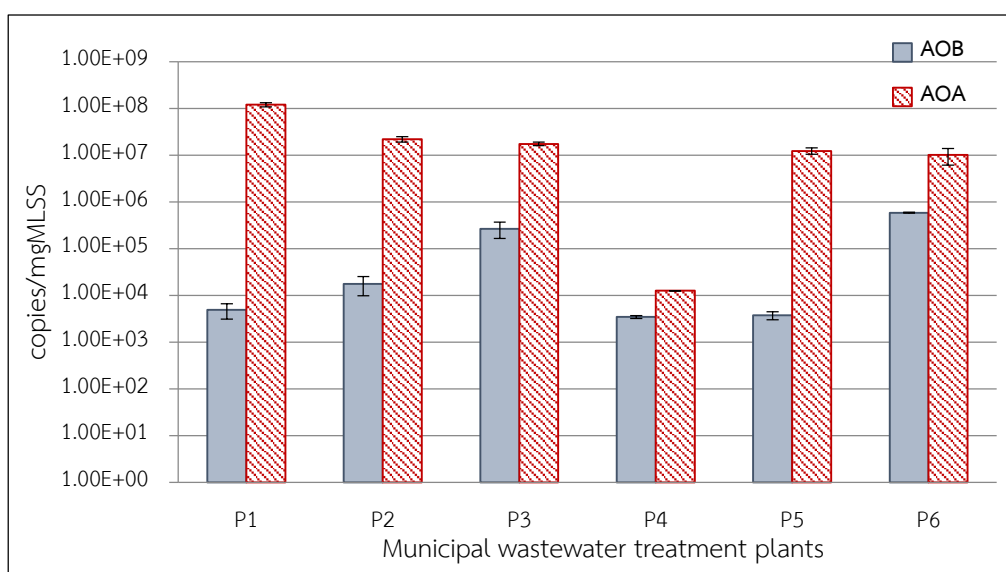
ดังนั้นจากประเภทการบำบัดของทั้ง 6 ระบบ พบว่า ระบบ P2, P3, P5 และ P6 มีการออกแบบระบบบำบัดเพื่อสนับสนุนการกำจัดไนโตรเจน ซึ่งสนับสนุนต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมายที่ต้องการศึกษา แต่เนื่องจากระบบบำบัด P4 และ P5 ไม่มีข้อมูลการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียในน้ำเสียขาเข้าและขาออกดังนั้น 2 ระบบนี้จะไม่แสดงสัดส่วนการกำจัดแอมโมเนียโดยจุลินทรีย์กลุ่มออโตโทรฟและไม่ถูกใช้ศึกษากิจกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ในงานวิจัยนี้ หากพิจารณาอัตราการกำจัดแอมโมเนียโดยจุลินทรีย์กลุ่มออโตโทรฟ ซึ่งคำนวณได้เฉพาะระบบบำบัด P1, P2, P3 และ P6 พบว่าระบบบำบัดที่มีอัตราการกำจัดแอมโมเนียสูงสุด 2 อันดับแรกคือ P2 และ P6 (85.55% และ 82.83% ตามลำดับ) แสดงว่าแอมโมเนียที่หายไปส่วนมากขณะน้ำเสียถูกบำบัดเกิดจากกลุ่มจุลินทรีย์ออโตโทรฟ ดังนั้นระบบบำบัด P2 และ P6 จึงถูกใช้ศึกษากิจกรรม AOA และ AOB ในงานวิจัยนี้ ขณะที่ระบบบำบัด P1 และ P3 มีอัตราการกำจัดแอมโมเนียที่ค่อนข้างต่ำ (50.76% และ 43.73% ตามลำดับ) สาเหตุเพราะปริมาณแอมโมเนียในน้ำเสียขาเข้ามีปริมาณต่ำแต่มีค่าบีโอดีที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับระบบอื่น ๆ โดยในกระบวนการกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำเสีย จุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรฟจะใช้แอมโมเนียบางส่วนเพื่อสร้างเซลล์ขณะย่อยสลายสารอินทรีย์ แต่เมื่อพิจารณา

ประเภทระบบบำบัดประกอบพบว่าระบบบำบัด P3 มีการออกแบบให้สนับสนุนการกำจัดธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในขณะที่ระบบบำบัด P1 ไม่ได้ถูกออกแบบให้เกิดกระบวนการดังกล่าว ประกอบกับจำนวน AOB มีค่าต่ำมาก ( $4.88 \times 10^3$  copies/mgMLSS) เมื่อเทียบกับจำนวน AOA ซึ่งจะทำให้การตรวจนับจำนวนดีเอ็นเอในแต่ละแฟรคชันโดยเทคนิค DNA-SIP ทำได้ยากเนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่บรรจุในหลอด Ultracentrifuge ต้องอยู่ในช่วง 0.5 – 5 ไมโครกรัม และเมื่อทำการปั่นแยกดีเอ็นเอซึ่งจะเกิดการกระจายตัวในหลอดจะถูกแบ่งเก็บแฟรคชันเพื่อนำไปตกตะกอนและดูการกระจายตัวของดีเอ็นเอ และยังคงถูกเจือจางซ้ำอีกครั้งด้วยตัวทำลายดีเอ็นเอ (TE Buffer) ทำให้ในแต่ละแฟรคชันอาจมีสัดส่วนดีเอ็นเอของ AOB น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ AOA ส่งผลต่อการตรวจนับจำนวนในแต่ละแฟรคชันด้วยเทคนิค Real-time PCR เป็นไปได้ยากเพราะปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบ (Template) อาจไม่เพียงพอ ซึ่งจะส่งผลให้เห็นผลการทดลองที่ไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม ตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัด P1 ซึ่งมี AOA มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับระบบบำบัดอื่นเป็นระบบที่น่าสนใจในการศึกษากิจกรรมของ AOA และ AOB ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเช่นกัน แต่อาจต้องมีการปรับเทคนิค DNA-SIP หรือเลือกใช้เทคนิคระดับโมเลกุลเทคนิคอื่นในการศึกษากิจกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวในระบบบำบัดนี้ ดังนั้นระบบบำบัดสำหรับการศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 3 ระบบ ได้แก่ P2, P3 และ P6 ซึ่งจะใช้ศึกษาต่อไปในการทดลองที่ 3



ตารางที่ 5.1 ปัจจัยสำหรับการคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย

| ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการคัดเลือก<br>ระบบบำบัดน้ำเสีย                                      |   | ระบบบำบัดน้ำเสีย               |                                      |                             |                        |                        |                        |
|---|---|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|   |   | P1                             | P2                                   | P3                          | P4                     | P5                     | P6                     |
| ประเภทระบบบำบัด   | ขาเข้า                                  | Contact<br>stabilization<br>AS | Cyclic<br>Activated<br>sludge system | Vertical loop<br>Reactor AS | Aerated Lagoon         | Oxidation ditch        | Anoxic-Oxic AS         |
|   | ขาออก                                   |                                |                                      |                             |                        |                        |                        |
| ความเข้มข้นแอมโมเนีย<br>(mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/l)<br>(ค่าเฉลี่ยปี 2556-2557) |   | 6.27                           | 8.39                                 | 4.51                        | -                      | -                      | 12.84                  |
|   |   | 1.11                           | 1.47                                 | 1.51                        | -                      | -                      | 1.17                   |
| BOD<br>(mg/L)   | ขาเข้า                                  | 55.75                          | 29.58                                | 42.48                       | 69.13                  | 107.79                 | 39.28                  |
|   | ขาออก                                   | 4.95                           | 5.81                                 | 8.45                        | 6.75                   | 4.25                   | 5.56                   |
| จำนวนประชากร<br>ยีน amoA<br>(copies/mgMLSS)<br>(ตรวจวัดเมื่อ ก.ค. 2557)                   | เปรียบเทียบจำนวน<br>ระหว่าง AOA และ AOB | AOA > AOB                      | AOA > AOB                            | AOA > AOB                   | AOA > AOB              | AOA > AOB              | AOA > AOB              |
|   | AOA                                     | 1.19 x 10 <sup>8</sup>         | 1.74 x 10 <sup>7</sup>               | 2.19 x 10 <sup>7</sup>      | 1.25 x 10 <sup>4</sup> | 1.23 x 10 <sup>7</sup> | 1.00 x 10 <sup>7</sup> |
|   | AOB                                     | 4.88 x 10 <sup>3</sup>         | 1.74 x 10 <sup>4</sup>               | 2.56 x 10 <sup>5</sup>      | 3.44 x 10 <sup>3</sup> | 3.74 x 10 <sup>3</sup> | 5.85 x 10 <sup>5</sup> |
| % BOD removal   |   | 91.13                          | 80.37                                | 80.11                       | 90.24                  | 96.06                  | 85.86                  |
| % NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N removal by autotroph                                    |   | 50.76                          | 82.83                                | 43.43                       | -                      | -                      | 85.55                  |



ภาพที่ 5.1 จำนวนยีน *amoA* ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย

## 5.2 การทดลองที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกดีเอ็นเอในเกรเดียนท์ของสารละลาย

หลักการแยกดีเอ็นเอในช่วงเกรเดียนท์ของซีเซียมคลอไรด์ขึ้นอยู่กับปริมาณเบส G และ C (%GC content) ในดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่ามี %GC content โดยเฉลี่ยที่ 50 % ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาไม่เคยมีการใช้เทคนิค DNA-SIP ศึกษากิจกรรมกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมดังกล่าวมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานแรกที่เริ่มศึกษา โดยขั้นแรกจำเป็นต้องตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกระจายตัวของดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB จากระบบบำบัดน้ำเสียในซีเซียมคลอไรด์ โดยปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อการแยกมี 2 ปัจจัยหลักคือ

1. ช่วงเกรเดียนท์ของซีเซียมคลอไรด์ ซึ่งขึ้นกับความหนาแน่นเริ่มต้นของซีเซียมคลอไรด์
2. แรงหนีศูนย์กลาง (g-force) สำหรับการปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge

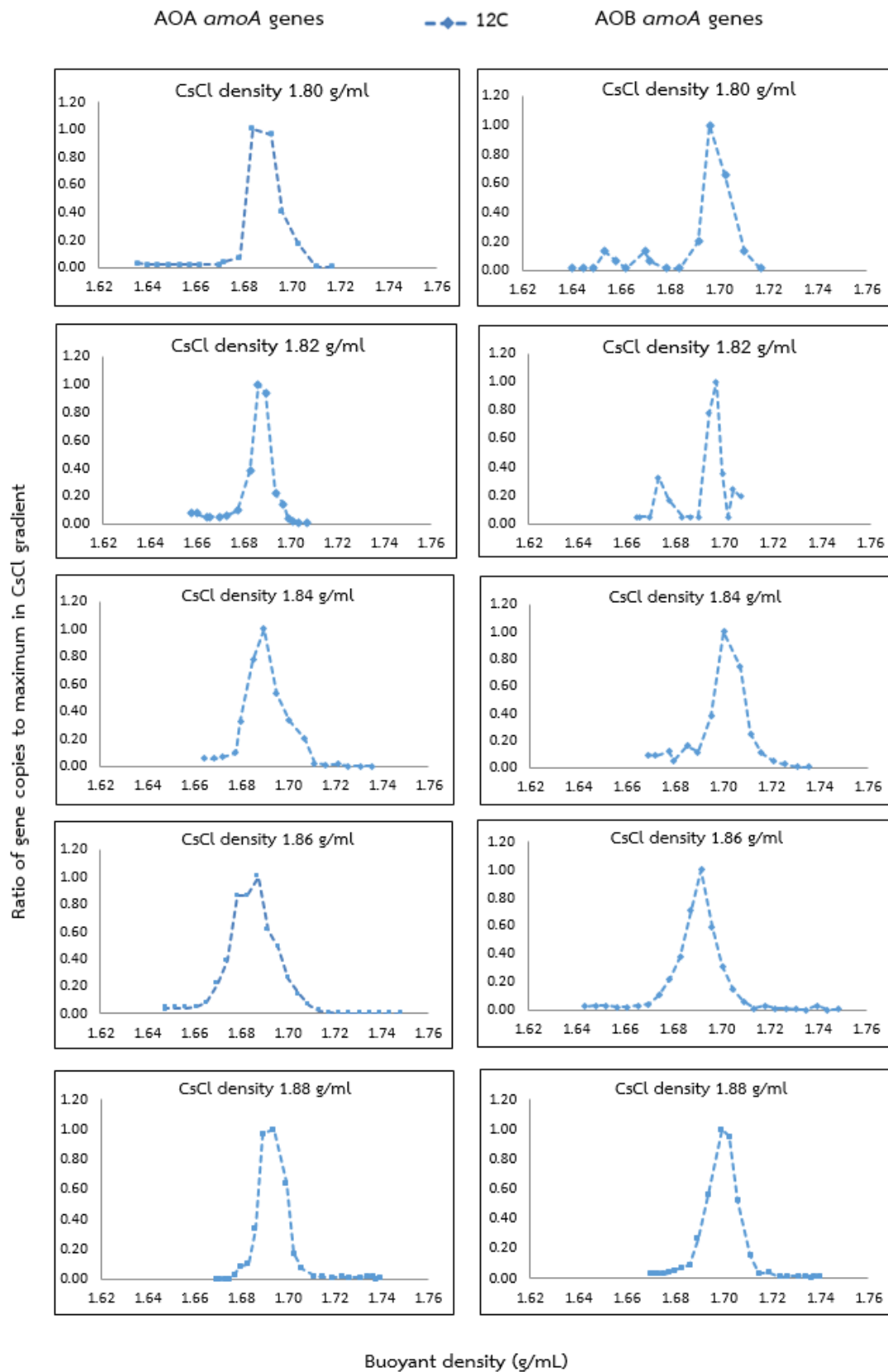
ขั้นตอนสำหรับการทำ DNA-SIP ในเบื้องต้นอ้างอิงจาก Niu และคณะ (2013) ซึ่งเป็นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ในตัวอย่างน้ำประปา งานวิจัยดังกล่าวใช้ความหนาแน่นซีเซียมคลอไรด์เริ่มต้นที่ 1.88 กรัมต่อมิลลิลิตร ความเร็วรอบ 178,000xg ดังนั้นในการทดลองนี้จึงแปรค่าตัวแปร 2 ชนิด ได้แก่ ความหนาแน่นซีเซียมคลอไรด์เริ่มต้นและความเร็วรอบของเครื่อง ultracentrifuge ซึ่งดีเอ็นเอที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกดีเอ็นเอของ AOA และ AOB ในช่วงเกรเดียนท์ของซีเซียมคลอไรด์จะเป็นดีเอ็นเอที่สกัดจากตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย

โดยไม่ผ่านการบ่ม ซึ่งตำแหน่งยอดพีคของกราฟที่แสดงในการทดลองนี้จะเป็นตำแหน่งของคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  โดยผลการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1) ผล DNA-SIP จากการแปรค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของซีซีเอ็มคลอไรด์

ค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของซีซีเอ็มคลอไรด์ที่ทำการทดลอง ค่าดังนี้ 1.80, 1.82, 1.84, 1.86 และ 1.88  $\text{g/mL}^{-1}$  ซึ่งทำการปั่นแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ค่าความเร็วรอบของแรงหนีศูนย์กลาง (G-force) 178,000 $\times$ g ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

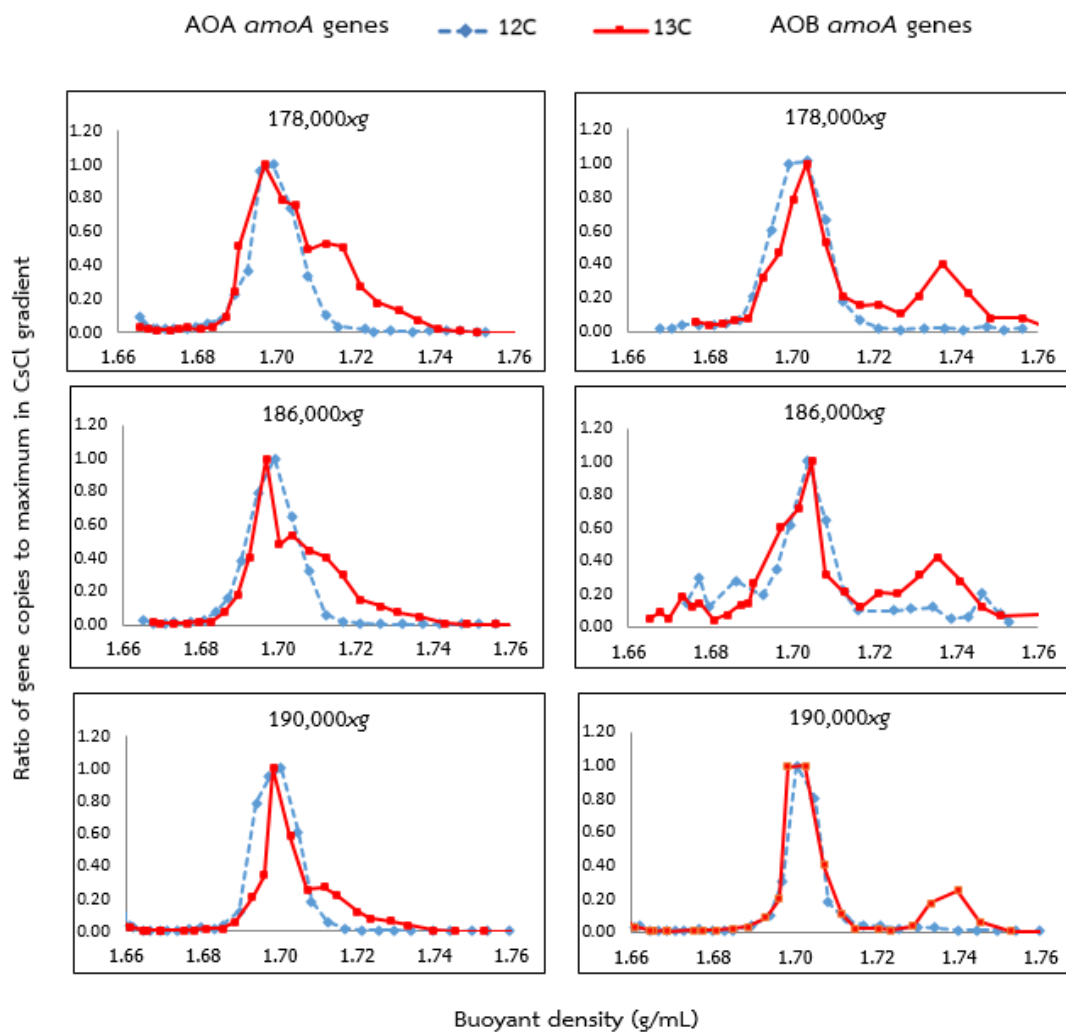
จากการแปรค่าความหนาแน่นของซีซีเอ็มคลอไรด์เริ่มต้นก่อนผสมกับดีเอ็นเอและนำไปแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge พบว่าช่วงเกรเดียนท์การกระจายตัวของซีซีเอ็มคลอไรด์จะแปรตามความหนาแน่นเริ่มต้นของซีซีเอ็มคลอไรด์ โดยค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของซีซีเอ็มคลอไรด์ต่ำจะทำให้ช่วงเกรเดียนท์ค่าความหนาแน่นของซีซีเอ็มคลอไรด์ต่ำด้วย พิจารณาจากยอดพีคของคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  ของ AOA และ AOB พบว่าทุกค่าความหนาแน่นของซีซีเอ็มคลอไรด์เริ่มต้น AOA ยอดพีคอยู่ที่ค่าความหนาแน่นประมาณ 1.69 กรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ AOB ยอดพีคอยู่ที่ค่าความหนาแน่นประมาณ 1.70 กรัมต่อมิลลิลิตร จากทฤษฎีระบุว่าหากเซลล์มีการสะสมคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  เข้าสู่เซลล์ 100% การเคลื่อนที่ของกราฟคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  จะเคลื่อนที่ไปทางขวาโดยยอดพีคของคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  จะห่างจากยอดพีคไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  อยู่ 0.036 กรัมต่อมิลลิลิตร (Buckley และคณะ, 2007) ดังนั้นการเลือกช่วงการกระจายเกรเดียนท์ของซีซีเอ็มคลอไรด์จึงต้องเลือกช่วงที่ครอบคลุมการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  เกิดจากการสะสมไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  เข้าสู่เซลล์ ของ AOA และ AOB ซึ่งมีค่า 1.726 และ 1.736 กรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากภาพที่ 5.2 แสดงกราฟ DNA-SIP ที่เกิดจากการแปรค่าความหนาแน่นซีซีเอ็มคลอไรด์เริ่มต้น พบว่าที่ค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของซีซีเอ็มคลอไรด์ 1.88 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการแยกดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ซึ่งค่าความหนาแน่นดังกล่าวจะถูกใช้เป็นค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของซีซีเอ็มคลอไรด์ในการแปรค่าความเร็วรอบของแรงหนีศูนย์กลางเพื่อหาค่าที่เหมาะสม



ภาพที่ 5.2 DNA-SIP การแปรค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของซีเซียมคลอไรด์

2) ผล DNA-SIP จากการแปรค่าความเร็วรอบของแรงหนีศูนย์กลาง (G-force)

ค่าความเร็วรอบที่ทำการทดลอง มี 3 ค่า ดังนี้ 178,000xg, 184,000xg และ 190,000xg สำหรับการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างในน้ำประปา (Niu และคณะ 2013) ที่พบว่าเซลล์มีการสะสมคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  เข้าสู่เซลล์อย่างแน่นอน ซึ่งผล DNA-SIP จะแสดงการแยกระหว่างกราฟ  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  ซึ่งจะทำให้เหลือตัวแปรของค่าความเร็วรอบเพียงตัวแปรเดียวซึ่งถูกสนใจในการทดลองนี้



ภาพที่ 5.3 DNA-SIP การแปรค่าความเร็วรอบของแรงหนีศูนย์กลาง (G-force)

ผลการแปรค่าความเร็วรอบของแรงหนีศูนย์กลางพบว่า ทั้ง AOA และ AOB มีลักษณะการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  ที่เหมือนกัน คือ AOA มีพื้นที่ใต้กราฟบางส่วนเข้ามาทางด้านขวาของกราฟ  $^{13}\text{C}$  ซึ่งไม่มีการซ้อนทับกับกราฟ  $^{12}\text{C}$  พื้นที่ดังกล่าวแสดงถึงสัดส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการสะสมของคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  ซึ่งหนักกว่าดีเอ็นเอปกติที่สร้างจากคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  ดังนั้นช่วงค่าความหนาแน่นของช่วงพีค  $^{13}\text{C}$  (1.68-1.76 g/mL) จึงมีค่าสูงกว่าช่วงค่าความหนาแน่นของพีค  $^{12}\text{C}$  (1.68-1.72 g/mL) ขณะที่ AOB เกิดการแยกพีคระหว่าง กราฟ  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  อย่างชัดเจน โดยยอดพีคของทั้งสองกราฟมีค่าความหนาแน่นต่างกันอยู่ประมาณ 0.04 g/mL ซึ่งใกล้เคียงกับค่าตามทฤษฎีที่ได้กล่าวไปเบื้องต้นแสดงว่ายีน *amoA* ของ AOB ที่พบที่ค่าความหนาแน่นประมาณ 1.74 g/mL เป็นเซลล์ใหม่ที่มีการสะสมคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  เข้าสู่เซลล์ 100% ดังนั้นการพิจารณาเลือกค่าความเร็วรอบที่เหมาะสมจึงเลือกพิจารณาจากผล DNA-SIP ของ AOA เป็นหลักเพราะพบว่าการแยกที่ไม่ชัดเจนดังเช่น AOB ซึ่งค่าความเร็วรอบมีการแยกของพีค  $^{13}\text{C}$  ชัดเจนที่สุดคือ 178,000xg และเปรียบเทียบผล DNA-SIP เมื่อมีการปรับค่าความเร็วรอบสูงขึ้นพบว่าพีค  $^{13}\text{C}$  ของ AOA มีการแยกที่น้อยลง อย่างไรก็ตามเนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในการทดลองนี้สกัดจากตัวอย่างที่บ่มด้วยคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  แต่ยังคงมีเซลล์เก่าที่ประกอบด้วยคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  เท่านั้นของ AOA และ AOB ปะปนอยู่ด้วย จึงทำให้กราฟ  $^{13}\text{C}$  ยังคงเห็นพีคบางส่วนซ้อนทับกับพีคของกราฟ  $^{12}\text{C}$

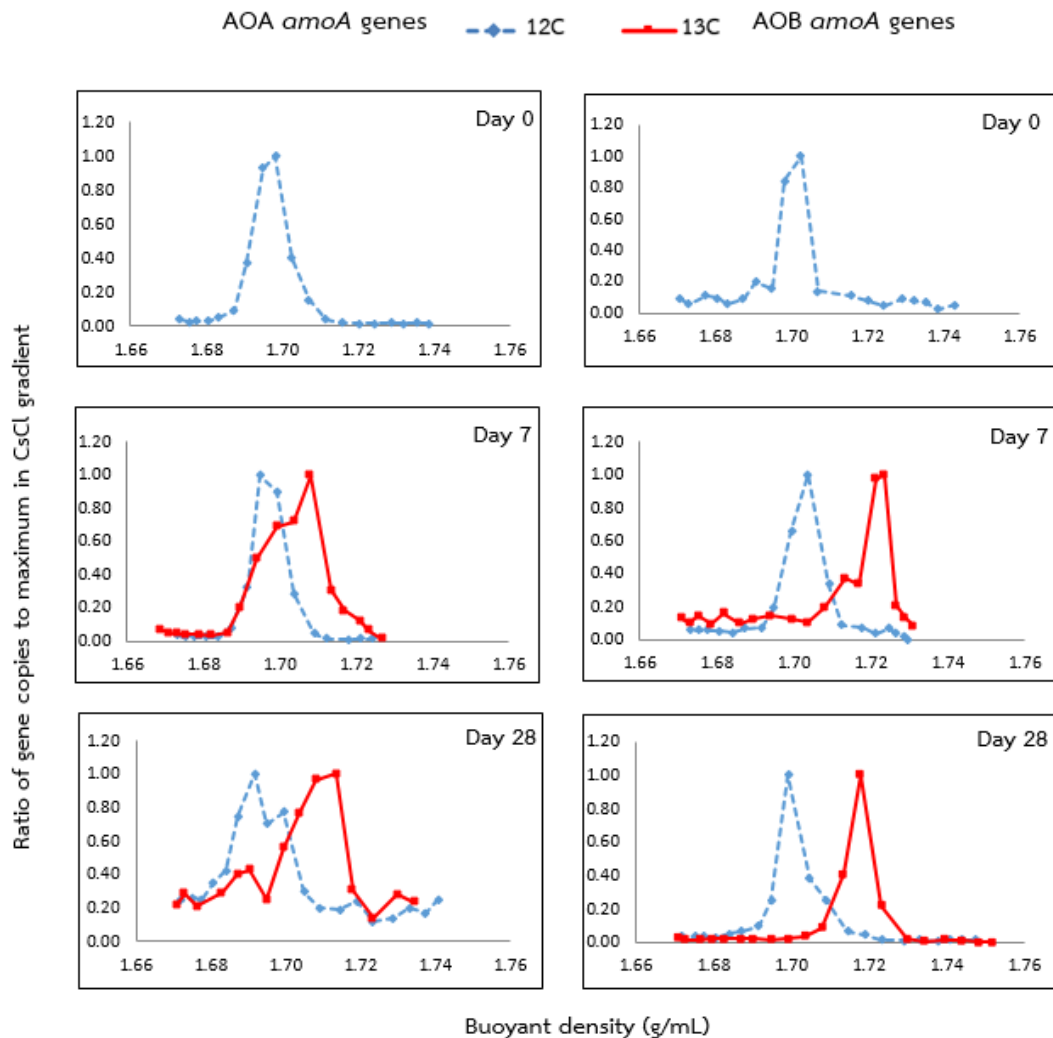
ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้สำหรับการแยกยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ด้วยเครื่อง Ultracentrifuge มีดังนี้ ค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของซีเซียมคลอไรด์ 1.88 g/mL, ค่าความเร็วรอบของแรงหนีศูนย์กลาง 178,000xg, อุณหภูมิขณะปั่นแยก 20 องศาเซลเซียส, ระยะเวลาการปั่น 72 ชั่วโมง

### 5.3 การทดลองที่ 3 การพิสูจน์การใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนในสภาวะมีแอมโมเนียโดยเทคนิค DNA stable isotope probing (DNA-SIP)

การพิสูจน์การใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปแบบไบคาร์บอเนต ( $\text{HCO}_3^-$ ) ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่กลุ่มจุลินทรีย์ในระบบบำบัด โดยความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ขาเข้าสำหรับการบ่มตะกอนจุลินทรีย์มี 2 ค่า ได้แก่ 7  $\text{mgNH}_4^+-\text{N/L}$  และน้ำเสียขาเข้าแบบไม่เติมแอมโมเนีย โดยมีระยะเวลาเก็บน้ำ (HRT) 5 วัน โดยไม่มีการเวียนตะกอนออก ระหว่างการบ่มจะวัดค่าพารามิเตอร์ทางเคมี ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต และค่าความเป็นกรดต่างทุก 3 วัน แสดงในตารางที่ 5.2 โดยการบ่มตะกอนจุลินทรีย์แต่ละสัปดาห์จะมีการเก็บตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างเพื่อมาทำการวิเคราะห์ DNA-SIP ซึ่งผลการทดลองจะแสดงเรียงตามระบบบำบัด คือ P2, P3 และ P6

### 5.3.1 DNA-SIP ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ระบบบำบัด P2

จากภาพที่ 5.4 – 5.6 แสดงผลการทำ DNA-SIP ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่าง ๆ โดยคอลัมน์ทางซ้ายแสดง DNA-SIP ของยีน *amoA* ของ AOA ขณะที่คอลัมน์ทางขวาแสดง DNA-SIP ของยีน *amoA* ของ AOB แต่ละคอลัมน์จากกราฟบนสุดจะแสดง DNA-SIP วันที่ 0 ซึ่งเป็นวันเริ่มต้นของการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ โดยกราฟจากบนลงล่างจะเรียงตามวันของการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ คือ วันที่ 7, 14, 28 ตามลำดับ ในแต่ละกราฟแกน x คือค่า Buoyant density ที่วัดได้จากแต่ละแฟรคชันของ DNA-SIP แกน y คือสัดส่วนที่เกิดจากจำนวนยีน *amoA* ของ AOA หรือ AOB แต่ละแฟรคชันต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA หรือ AOB ที่มากที่สุดต่อแฟรคชันทั้งหมด ซึ่งทำให้ยอดพิกของกราฟแต่ละเส้นจะมีค่าเป็น 1.00 เสมอ โดยผลของแต่ละกราฟจะเป็นการเปรียบเทียบระหว่างการบ่มด้วยไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  แสดงด้วยกราฟเส้นทึบ ( $^{13}\text{C}$ ) และไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  แสดงด้วยกราฟเส้นประ ( $^{12}\text{C}$ ) ผลการทดลอง DNA-SIP ของระบบบำบัด P2 มีดังนี้ ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+-\text{N/L}$  และมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์  $0.5 \text{ mgNH}_4^+-\text{N/L}$  ที่ความเข้มข้นดังกล่าวแบ่งการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ออกเป็น 2 รอบ แต่ละรอบเก็บตะกอนจุลินทรีย์จากระบบระยะเวลาต่างกัน 1 เดือน พบว่ารอบที่ 1 (ภาพที่ 5.4) ผล DNA-SIP ของ AOA ที่การบ่มได้ 7 วัน มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  ไปทางขวาเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟ  $^{12}\text{C}$  แสดงว่า AOA มีการสะสมไบคาร์บอเนตเข้าสู่เซลล์ แต่ยังคงพบว่าพื้นที่ใต้กราฟของ  $^{13}\text{C}$  บางส่วนมีการซ้อนทับกับ  $^{12}\text{C}$  วิเคราะห์ได้ว่า AOA อาจมีการเจริญเติบโตที่ช้า ทำให้สัดส่วนของเซลล์ใหม่ซึ่งประกอบไปด้วย  $^{13}\text{C}$  มีสัดส่วนใกล้เคียงกับเซลล์เก่าซึ่งประกอบไปด้วย  $^{12}\text{C}$  และเมื่อผ่านไป 14 วัน พบว่า AOA มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  ไปทางขวามากขึ้นแสดงว่า AOA มีการสะสมไบคาร์บอเนตและมีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ประกอบไปด้วย  $^{13}\text{C}$  ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การบ่มที่ 7 วัน ขณะที่ผล DNA-SIP ของ AOB ที่การบ่ม 7 วัน พบว่ากราฟ  $^{13}\text{C}$  มีการเคลื่อนที่แยกออกจากกราฟ  $^{12}\text{C}$  อย่างชัดเจน แสดงว่า AOB มีการสะสมไบคาร์บอเนตเข้าสู่เซลล์โดยใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเจริญเติบโตที่เร็วส่งผลให้สัดส่วนเซลล์ใหม่ซึ่งประกอบไปด้วย  $^{13}\text{C}$  มีมากกว่าเซลล์เก่าซึ่งประกอบไปด้วย  $^{12}\text{C}$  อย่างเห็นได้ชัด และเมื่อการบ่มผ่านไป 28 วันพบว่ากราฟไม่มีการเปลี่ยนแปลง สรุปได้ว่าทั้ง AOA และ AOB มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากไบคาร์บอเนตเพื่อสร้างเซลล์อย่างแน่นอน

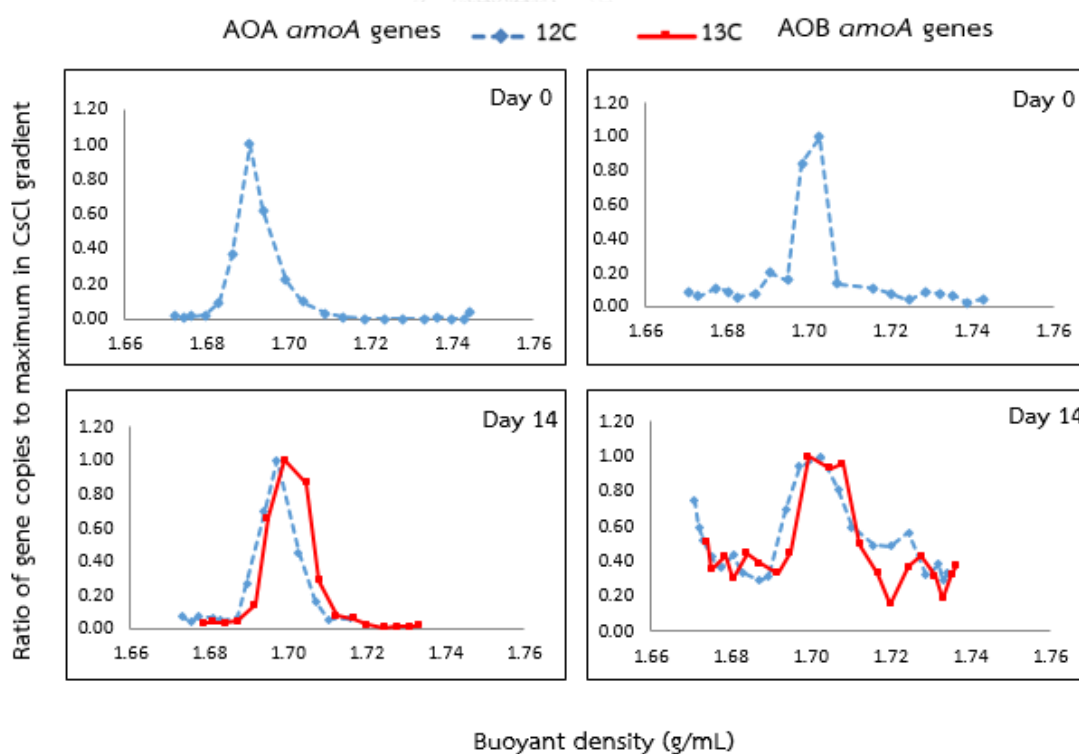


ภาพที่ 5.4 DNA-SIP ระบบบำบัด P2 (รอบ 1) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$

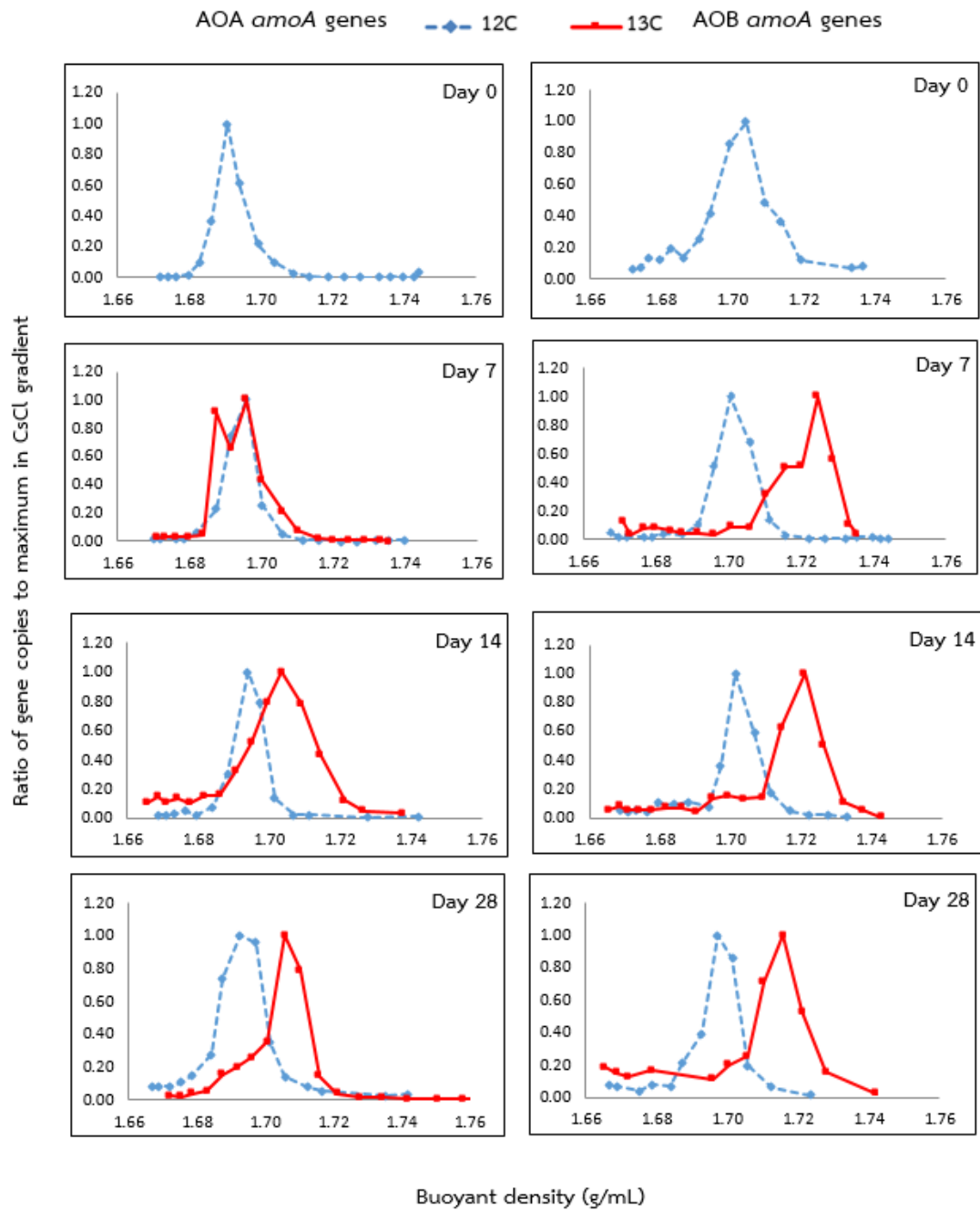
สำหรับแหล่งพลังงานของ AOA และ AOB ซึ่งคาดว่ามาจากแอมโมเนีย สามารถพิสูจน์ได้จากผลการบ่มตะกอนจุลินทรีย์แบบไม่เติมแอมโมเนียให้แก่ น้ำเสียสังเคราะห์ขาเข้าในสภาวะมีไบคาร์บอเนต (ใช้ตะกอนจุลินทรีย์ที่ถูกเก็บรอบ 2) โดยผล DNA-SIP เมื่อการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ผ่านไป 14 วัน (ภาพที่ 5.5) พบว่าไม่มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  จากทั้งยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ขณะที่การบ่มที่แอมโมเนียในน้ำเสียขาเข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  ตั้งแต่การบ่มวันที่ 7 แสดงให้เห็นว่าทั้ง AOA และ AOB ใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงานเมื่อใช้ไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน



เพื่อยืนยันผลดังกล่าวจึงทำการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัด P2 ข้ำรอบที่ 2 (ภาพที่ 5.6) โดยเก็บตะกอนจุลินทรีย์ห่างจากการบ่มรอบแรกเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า AOA และ AOB มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  เมื่อการบ่มผ่านไป 14 วัน ต่างจากรอบแรกที่มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  เมื่อการบ่มผ่านไป 7 วัน ซึ่งอาจมาจาก AOA อาจมีการเจริญเติบโตที่ช้าทำให้เห็นการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  ช้ากว่าการบ่มรอบที่ 1 นอกจากนี้ผลการทดลองยังยืนยันได้ว่าการสะสมไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  ของ AOA ไม่ได้เกิดจาก Cross feeding เนื่องจากการเกิด Cross feeding เป็นการที่เซลล์ตั้งต้นย่อยเซลล์ตาย โดยเซลล์ที่ตายต้องเกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์ตั้งต้นที่มีการสะสมไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  เข้าสู่เซลล์ก่อน โดยระยะเวลาดังกล่าวต้องใช้เวลายาวนานประมาณ 14 วัน ซึ่งจากการบ่มรอบที่ 1 ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  กราฟ  $^{13}\text{C}$  มีการเคลื่อนที่ไปทางขวาตั้งแต่ 7 วัน ขณะที่ระยะเวลาการแบ่งตัวของ AOA ใช้เวลาประมาณ 3-4 วัน (Limpiyakorn และคณะ, 2013) ซึ่งระยะเวลาใกล้เคียงกัน จากผล DNA-SIP ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  ทั้ง 2 รอบ ยืนยันได้ว่า AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย P2 มีการทำงานแบบอโตโทรปและมีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย ณ ความเข้มข้นแอมโมเนียที่ทำการทดลอง ( $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ ) โดยใช้ไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน

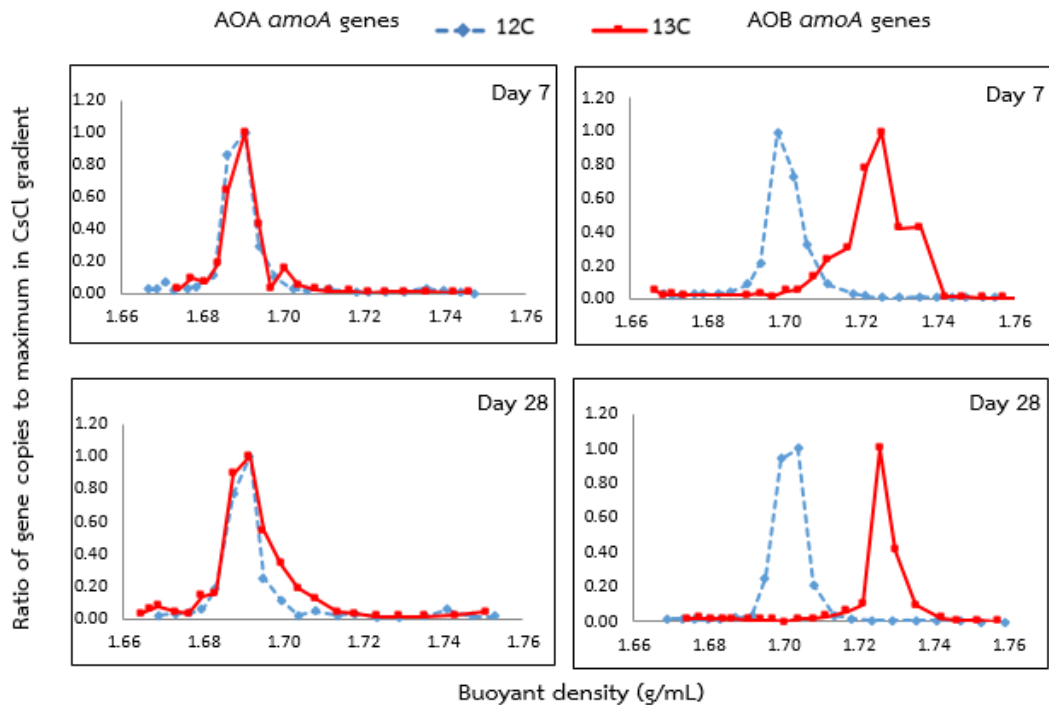


ภาพที่ 5.5 DNA-SIP ระบบบำบัด P2 ไม่เติมแอมโมเนีย



ภาพที่ 5.6 DNA-SIP ระบบบำบัด P2 (รอบ 2) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L

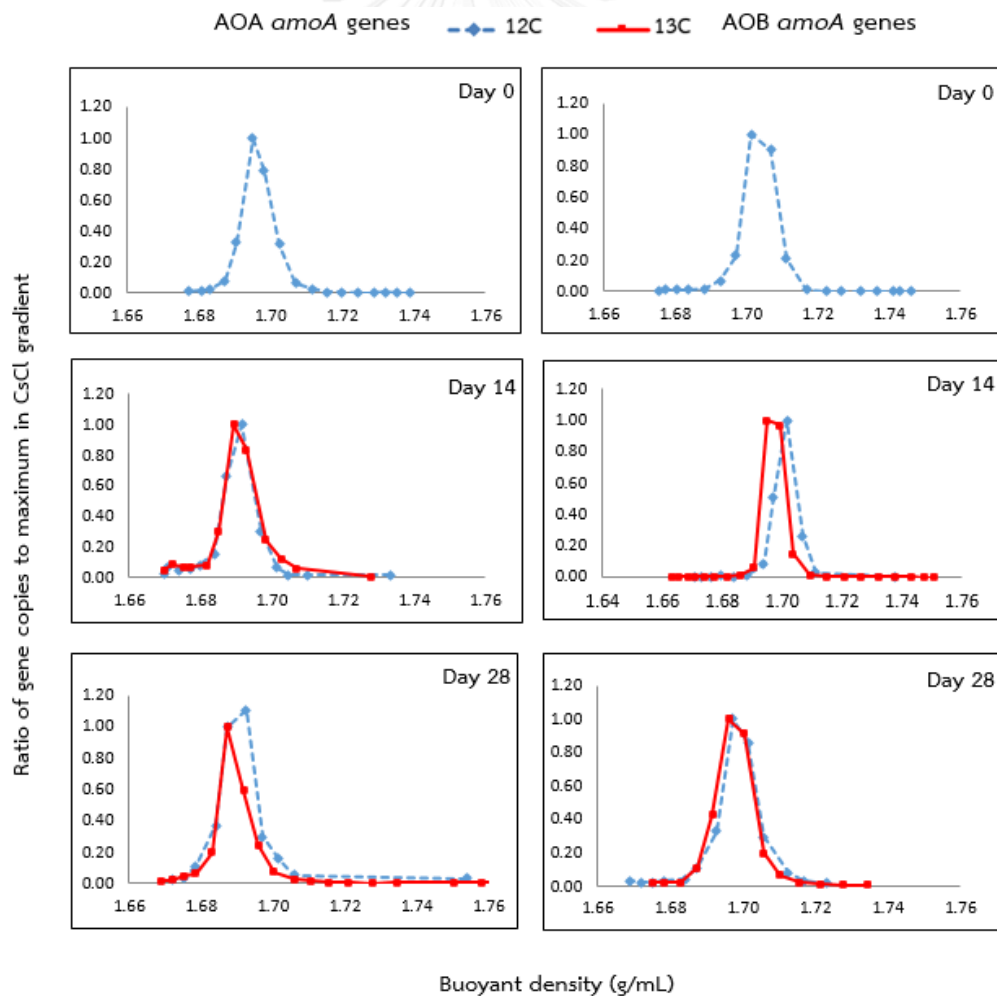
### 5.3.2 DNA-SIP ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ระบบบำบัด P3



ภาพที่ 5.7 DNA-SIP ระบบบำบัด P3 (รอบ 1) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L

จากภาพที่ 5.7 – 5.9 แสดงผลการทำ DNA-SIP ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่าง ๆ โดยคอลัมน์ทางซ้ายแสดง DNA-SIP ของยีน *amoA* ของ AOA ขณะที่คอลัมน์ทางขวาแสดง DNA-SIP ของยีน *amoA* ของ AOB แต่ละคอลัมน์จากกราฟบนสุดจะแสดง DNA-SIP วันที่ 0 ซึ่งเป็นวันเริ่มต้นของการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ โดยกราฟจากบนลงล่างจะเรียงตามวันของการบ่มตะกอนจุลินทรีย์คือ วันที่ 7, 14, 28 ตามลำดับ ในแต่ละกราฟแกน x คือค่า Buoyant density ที่วัดได้จากแต่ละแฟรคชันของ DNA-SIP แกน y คือสัดส่วนที่เกิดจากจำนวนยีน *amoA* ของ AOA หรือ AOB แต่ละแฟรคชันต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA หรือ AOB ที่มากที่สุดต่อแฟรคชันทั้งหมด ซึ่งทำให้ยอดพีคของกราฟแต่ละเส้นจะมีค่าเป็น 1.00 เสมอ โดยผลของแต่ละกราฟจะเป็นการเปรียบเทียบระหว่างการบ่มด้วยไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป <sup>13</sup>C แสดงด้วยกราฟเส้นทึบ (<sup>13</sup>C) และไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป <sup>12</sup>C แสดงด้วยกราฟเส้นประ (<sup>12</sup>C) ผลการทดลอง DNA-SIP ของระบบบำบัด P2 มีดังนี้ ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L และมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์ 0.5 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L ที่ความเข้มข้นดังกล่าวแบ่งการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ออกเป็น 2 รอบ แต่ละรอบเก็บตะกอนจุลินทรีย์จากระบบระยะเวลาต่างกัน พบว่ารอบที่ 1 (ภาพที่ 5.7) ผล DNA-SIP ของ AOA เมื่อการบ่มผ่านไป 28 วันพบว่าไม่มีการเคลื่อนที่ของกราฟ <sup>13</sup>C ขณะที่ AOB มีการเคลื่อนที่

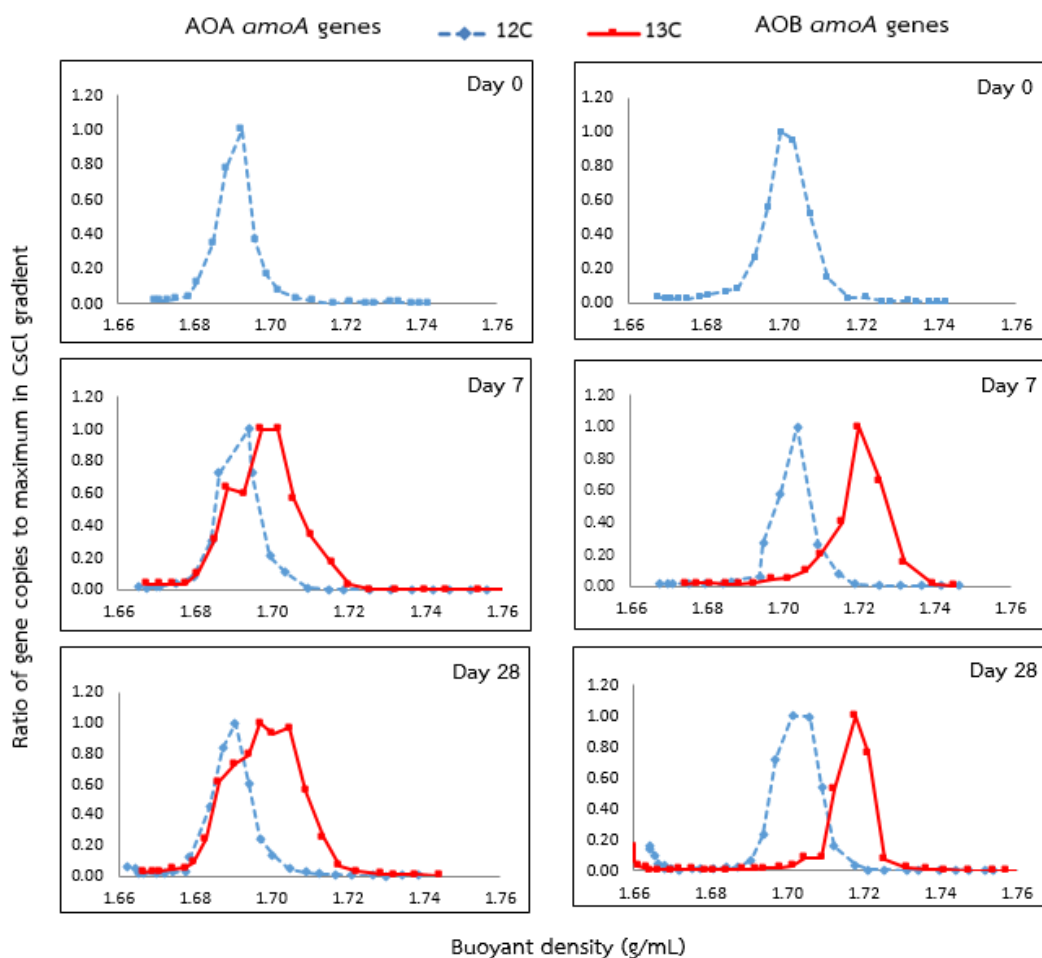
ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  แยกออกจากกราฟ  $^{12}\text{C}$  อย่างชัดเจนเมื่อการบ่มผ่านไป 7 วัน เมื่อทำการบ่มซ้ำรอบที่ 2 ซึ่งตะกอนจุลินทรีย์ถูกเก็บห่างจากรอบที่ 1 เป็นระยะเวลา 5 เดือน (ภาพที่ 5.9) พบว่าเมื่อผ่านไป 14 วัน AOA ไม่มีการเคลื่อนของกราฟ  $^{13}\text{C}$  เช่นเดียวกับรอบแรก ขณะที่ AOB มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  แยกออกจากกราฟ  $^{12}\text{C}$  อย่างชัดเจน แต่การบ่มตะกอนจุลินทรีย์ยังดำเนินต่อไปที่ 28 วันจึงหยุดบ่ม ซึ่งผล DNA-SIP ที่ 28 วัน AOA ไม่มีการเคลื่อนของกราฟ  $^{13}\text{C}$  เช่นกัน (ผลไม่ได้แสดง) ขณะที่การตรวจสอบการใช้แอมโมเนียของ AOA และ AOB โดยการบ่มตะกอนจุลินทรีย์แบบไม่เติมแอมโมเนีย ให้นำน้ำเสียสังเคราะห์มาเข้า (ใช้ตะกอนจุลินทรีย์ที่ถูกเก็บรอบ 2) ในสภาวะมีไบคาร์บอเนตพบว่าเมื่อบ่มตะกอนจุลินทรีย์ผ่านไป 28 วัน (ภาพที่ 5.8) ทั้ง AOA และ AOB ไม่มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  วิเคราะห์ได้ว่า AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย P3 ณ ความเข้มข้นแอมโมเนีย  $7 \text{ mgNH}_4^+-\text{N/L}$  อาจไม่มีการทำงานแบบออโตโทรฟ ซึ่งปริมาณแอมโมเนียที่ลดลงระหว่างการบ่มน่าจะเกิดจากการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOB ที่มีการทำงานแบบออโตโทรฟและใช้ไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน



ภาพที่ 5.8 DNA-SIP ระบบบำบัด P3 ไม่เติมแอมโมเนีย



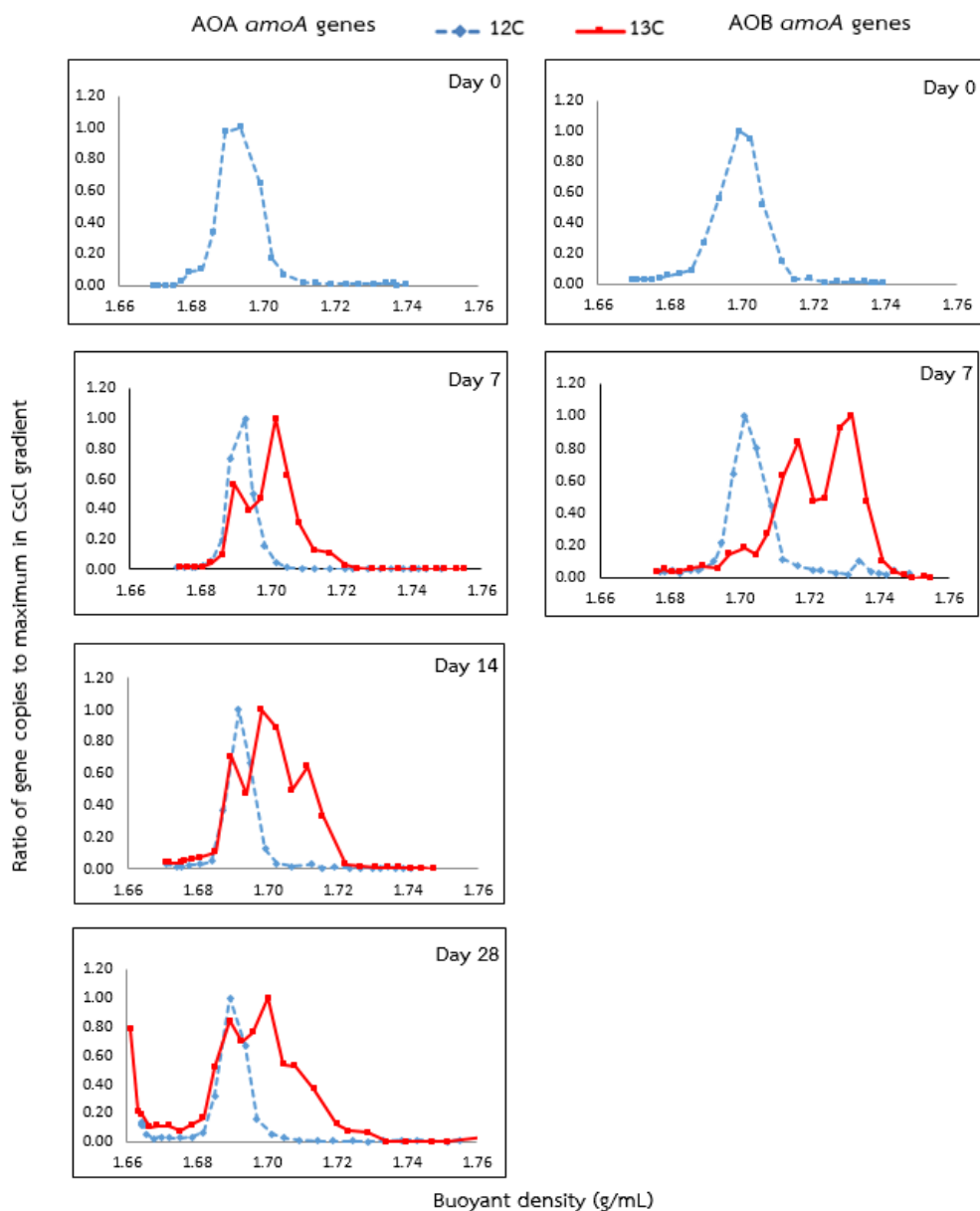
### 5.3.3 DNA-SIP ของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ระบบบำบัด P6



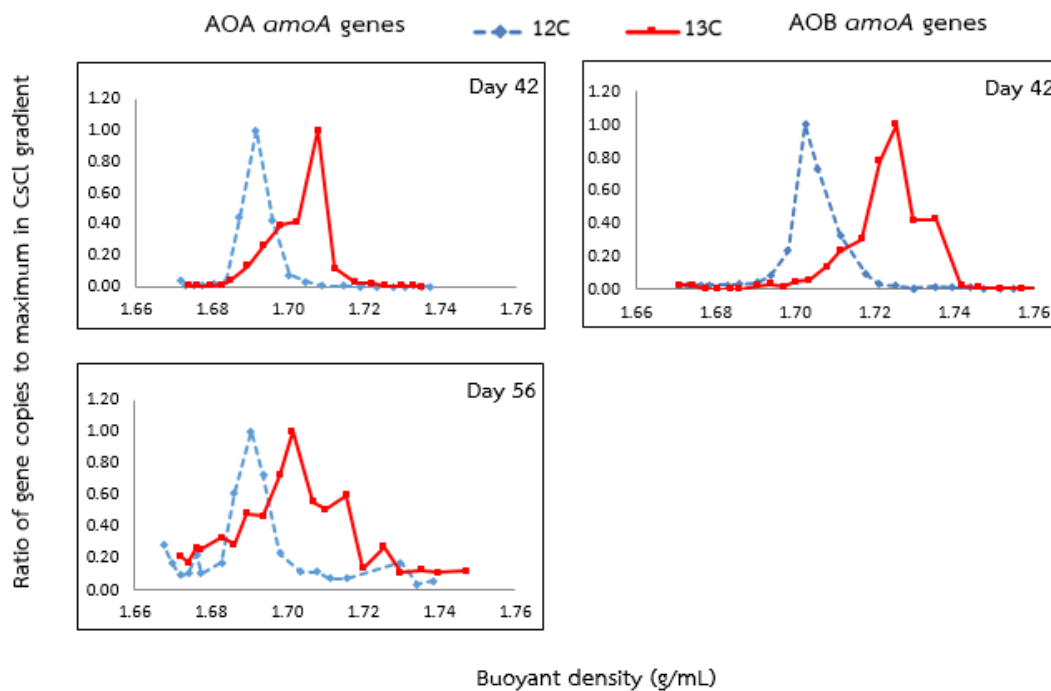
ภาพที่ 5.10 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบ 1) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$

จากภาพที่ 5.10 แสดงผลการทำ DNA-SIP ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่าง ๆ โดยคอลัมน์ทางซ้ายแสดง DNA-SIP ของยีน *amoA* ของ AOA ขณะที่คอลัมน์ทางขวาแสดง DNA-SIP ของยีน *amoA* ของ AOB แต่ละคอลัมน์จากกราฟบนสุดจะแสดง DNA-SIP วันที่ 0 ซึ่งเป็นวันเริ่มต้นของการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ โดยกราฟจากบนลงล่างจะเรียงตามวันของการบ่มตะกอนจุลินทรีย์คือ วันที่ 7, 14, 28 ตามลำดับ ในแต่ละกราฟแกน x คือค่า Buoyant density ที่วัดได้จากแต่ละแฟรคชันของ DNA-SIP แกน y คือสัดส่วนที่เกิดจากจำนวนยีน *amoA* ของ AOA หรือ AOB แต่ละแฟรคชันต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA หรือ AOB ที่มากที่สุดต่อแฟรคชันทั้งหมด ซึ่งทำให้ยอดพีคของกราฟแต่ละเส้นจะมีค่าเป็น 1.00 เสมอ โดยผลของแต่ละกราฟจะเป็นการเปรียบเทียบระหว่างการบ่มด้วยไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  แสดงด้วยกราฟเส้นทึบ ( $^{13}\text{C}$ ) และไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  แสดงด้วยกราฟเส้นประ ( $^{12}\text{C}$ ) ผลการทดลอง DNA-SIP ของระบบบำบัด P2 มีดังนี้ ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  และความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นในถัง

ปฏิกรณ์ 0.5 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L ที่ความเข้มข้นดังกล่าวแบ่งการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ออกเป็น 2 รอบ แต่ ละรอบเก็บตะกอนจุลินทรีย์จากระบบระยะเวลาต่างกัน โดยพบว่าการบ่มตะกอนจุลินทรีย์รอบที่ 1 AOA มีการเคลื่อนที่ของกราฟ <sup>13</sup>C ไปทางขวาเมื่อการบ่มผ่านไป 7 วัน และที่ 28 วัน กราฟยังคงเป็น เช่นเดิมโดยมีพื้นที่ใต้กราฟบางส่วนของกราฟ <sup>13</sup>C ซ้อนทับกับกราฟ <sup>12</sup>C ขณะที่ AOB กราฟ <sup>13</sup>C มีการเคลื่อนที่ไปทางขวาแยกออกจากกราฟ <sup>12</sup>C อย่างชัดเจนเมื่อการบ่มผ่านไป 7 วัน วิเคราะห์ได้ว่า AOB ในระบบบำบัด P6 มีการทำงานแบบอโตโทรฟโดยใช้ไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน



ภาพที่ 5.11 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบ 2) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L ก่อน ปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งที่ 28 วัน



ภาพที่ 5.12 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบ 2) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  หลังปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งที่ 42 และ 56 วัน

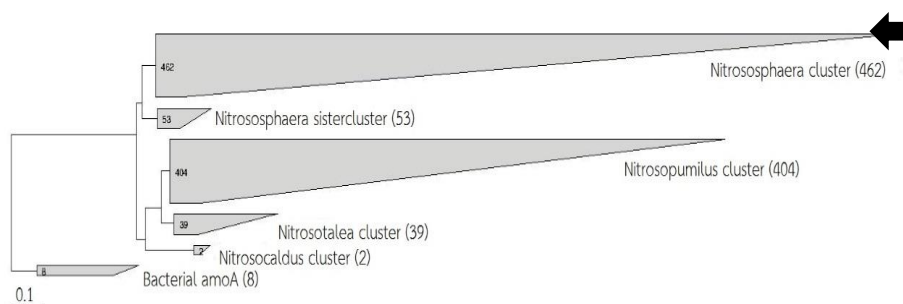
หากพิจารณากราฟ AOA เมื่อระยะเวลาการบ่มผ่านไป 28 วัน พบว่ากราฟ  $^{13}\text{C}$  ไม่มีการแยกออกจากกราฟ  $^{12}\text{C}$  อย่างชัดเจนและเมื่อทำการเก็บตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างรอบสอง โดยมีระยะเวลาห่างจากรอบแรก 3 เดือน เพื่อทำการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  พบว่าเมื่อบ่มตะกอนจุลินทรีย์ที่ 28 วัน ผล DNA-SIP ของ AOA ยังคงเหมือนกับการบ่มตะกอนจุลินทรีย์รอบแรก ซึ่งพื้นที่ใต้กราฟของกราฟ  $^{13}\text{C}$  บางส่วนยังคงซ้อนทับกับกราฟ  $^{12}\text{C}$  ซึ่งบริเวณกราฟ  $^{13}\text{C}$  ส่วนที่ซ้อนทับอาจเป็นดีเอ็นเอที่เกิดจากคาร์บอนไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  ทำให้คาดการณ์ว่าสาเหตุจากการบ่ม เพราะการทดลองที่ผ่านมาได้มีการปั่นกวนด้วย Magnetic stirrer เพียงเพื่อให้ความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์เท่ากันทั้งถังแต่ไม่มีการฟุ้งกระจายของตะกอนจุลินทรีย์ อีกทั้งตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้นสำหรับการบ่มมีปริมาณน้อยและต้องมีการเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์ ดังนั้นจึงไม่มีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง ทำให้เซลล์เก่ายังคงอยู่ในถังปฏิกรณ์ จึงเกิดสมมติฐานว่าการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งโดยให้เกิดการปั่นกวนอย่างสมบูรณ์ (ตะกอนมีการฟุ้งกระจายทั่วถังปฏิกรณ์) จะทำให้เซลล์เก่าถูกระบายออกไปเพื่อเพิ่มอัตราส่วนเซลล์ใหม่ให้มากขึ้นและเห็นผลการเคลื่อนที่ของกราฟ DNA-SIP ของ AOA ที่ชัดเจนขึ้น ดังนั้นจึงเริ่มทำการตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งหลังการบ่มผ่านไป 28 วัน เพื่อระบายเซลล์เก่าที่ประกอบด้วยไอโซโทป  $^{12}\text{C}$  ออกจากถังปฏิกรณ์เพื่อพิสูจน์สาเหตุของการซ้อนทับของกราฟระหว่าง  $^{12}\text{C}$  และ  $^{13}\text{C}$  ดังกล่าว การปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งทำโดยการปั่นกวนด้วย Magnetic stirrer โดยมีการฟุ้ง



กระจายของตะกอนจุลินทรีย์ทั่วถึงปฏิกรณ์โดยระยะเวลาการปั่นกววนต่อวันโดยประมาณคือ 8 ชั่วโมงต่อวันซึ่งยังคงเป็นข้อจำกัดที่ต้องปรับแก้ต่อไปในอนาคตเนื่องจากไม่สามารถเปิด Stirrer ไว้ได้ตลอดเวลา ผลหลังการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง พบว่า AOA ที่ 42 วัน (ภาพที่ 5.12) กราฟ  $^{13}\text{C}$  มีการเคลื่อนที่ไปทางขวามากขึ้นและเกิดการแยกพีคที่ชัดเจนออกจากกราฟ  $^{12}\text{C}$  ขณะที่ AOB กราฟยังคงลักษณะเดิมเช่นเดียวกับการบ่มที่ 28 วันแรก เมื่อบ่มตะกอนจุลินทรีย์และปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งที่ 56 วัน พบว่ากราฟ DNA-SIP ของ AOA เกิดพีคบริเวณเนื่องจากระยะเวลาการบ่มที่นานและต้องมีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกตลอดเวลาทำให้ตะกอนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์เหลืออยู่น้อยมากและเมื่อทำการเก็บตัวอย่างสำหรับสกัดเพื่อทำ DNA-SIP ทำให้ปริมาณ DNA ไม่มากพอที่จะทำให้เห็นผล DNA-SIP ได้อย่างชัดเจน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผล DNA-SIP ของ AOA ที่ 42 วันพบว่าการแยกพีคระหว่างกราฟ  $^{13}\text{C}$  และ  $^{12}\text{C}$  มีลักษณะใกล้เคียงกัน จากผล DNA-SIP ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  ทั้ง 2 รอบ ยืนยันได้ว่า AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย P6 มีการทำงานแบบออโตโทรปและมีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย ณ ความเข้มข้นแอมโมเนียที่ทำการทดลอง ( $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ ) โดยใช้ไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน และผลการทดลองยังยืนยันได้ว่าการสะสมไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  ของ AOA ไม่ได้เกิดจาก Cross feeding เนื่องจากการเกิด Cross feeding เป็นการที่เซลล์ตั้งต้นกินเซลล์ตาย โดยเซลล์ที่ตายต้องเกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์ตั้งต้นที่มีการสะสมไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  เข้าสู่เซลล์ก่อน โดยระยะเวลาดังกล่าวต้องใช้เวลาอย่างต่ำประมาณ 14 วัน ซึ่งจากการบ่มรอบที่ 1 ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  กราฟ  $^{13}\text{C}$  มีการเคลื่อนที่ไปทางขวาตั้งแต่ 7 วัน ขณะที่ระยะเวลาการแบ่งตัวของ AOA ใช้เวลาประมาณ 3-4 วัน (Limpiyakorn และคณะ, 2013) ซึ่งระยะเวลาใกล้เคียงกัน

จากผล DNA-SIP ของระบบบำบัด P6 เบื้องต้นที่อภิปรายไป เนื่องจากผล DNA-SIP ใน 28 วันแรก ของ AOA ไม่ชัดเจนจึงได้นำตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดที่ใช้ทำการบ่มรอบที่ 1 และรอบที่ 2 ไปสกัดดีเอ็นเอและถอดรหัสพันธุกรรมของ AOA โดยเริ่มจาก เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-cloning โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *amoA* ของ AOA (Pester และคณะ, 2012) จากนั้นทำการถอดรหัสพันธุกรรมด้วยเทคนิค DNA-Sequencing และนำรหัสพันธุกรรมทั้งหมดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ARB เพื่อสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้ฐานข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์จาก Pester และคณะ (2012) ผลจากการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA-sequencing) พบว่า AOA จากระบบบำบัด P6 ทั้ง 2 รอบ มีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาการทำงาน ของ AOA ในแบบเชิงลึก เพราะ AOA ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Nitrososphaera* cluster (ซึ่งด้วยลูกศรในภาพที่ 5.13) โดย cluster นี้ถูกแบ่งย่อยออกเป็น 11 Subcluster ซึ่งเมื่อขยายต้นไม้วิวัฒนาการลงในระดับ Subcluster พบว่า AOA ในระบบบำบัด P6 อยู่ระหว่าง Subcluster 1 และ

2 ซึ่ง AOA ในระบบบำบัด P6 มีความจำเพาะทางสายพันธุ์โดยอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด ดังแสดงในภาพที่ 5.14 และ 5.15 จากนั้นเพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนกลุ่มของ AOA เมื่อผ่านการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ในสภาวะจำกัดเป็นเวลานาน และยืนยันผลการถอดรหัสพันธุกรรมจากตะกอนจุลินทรีย์ตั้งต้นก่อนการบ่ม จึงนำตะกอนจุลินทรีย์ที่ผ่านการบ่มด้วยคาร์บอนไอโซโทป  $^{13}\text{C}$  ที่ 56 วัน ไปถอดรหัสพันธุกรรม พบว่า AOA ที่การบ่มตะกอนจุลินทรีย์ที่ 56 วัน ยังคงเป็นกลุ่มเดียวกับ AOA ในตะกอนจุลินทรีย์ตั้งต้นก่อนการบ่ม



ภาพที่ 5.13 ต้นไม้วิวัฒนาการของยีน AOA *amoA* ที่ได้จากตัวอย่างระบบบำบัด P6 ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนรหัสพันธุกรรมโดยลูกศรแสดงที่ตั้งตำแหน่งรหัสพันธุกรรม



ภาพที่ 5.14 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA amoA ที่ได้จากตัวอย่างระบบบำบัด P6 (ขยายจากภาพที่ 5.13)

จากภาพที่ 5.14 ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนรหัสพันธุกรรม (Sequence) โดยลูกศรแสดงที่ตั้งตำแหน่งรหัสพันธุกรรมที่ได้จากตัวอย่างระบบบำบัด P6



ภาพที่ 5.15 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA *amoA* ที่ได้จากตัวอย่างระบบบำบัด P6 (ขยายจากภาพที่ 5.14)

ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนรหัสพันธุกรรม (Sequence) โดยรหัสพันธุกรรมที่ได้จากตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัด P6 รอบที่ 1 แสดงด้วยตัวอักษร AOA-DD-R1-0 จากตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัด P6 รอบที่ 2 แสดงด้วยตัวอักษร AOA-DD-R2-0 และตะกอนจุลินทรีย์จากการบ่มที่ 56 วัน ของ  $^{13}\text{C}$  แสดงด้วยตัวอักษร AOA-DD-R2-8

### 5.3.4 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อกลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัด P6

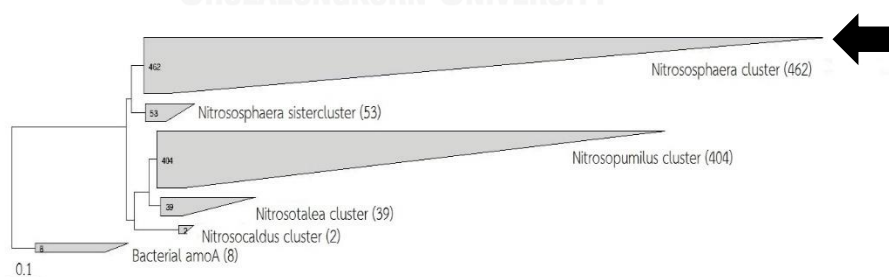
ผลการถอดรหัสพันธุกรรม AOA ในระบบบำบัด P6 พบว่าในระบบบำบัดดังกล่าวมี AOA เพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น ดังนั้นจึงทำการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับตำแหน่งยีน *amoA* ของ AOA ในระบบ P6 ด้วยโปรแกรม ARB ซึ่งไพรเมอร์ที่ได้ ประกอบด้วยลำดับเบส ดังนี้

1. Forward - 5' TACTGGGCKACCAGAAGA 3'
2. Reverse - 5' TAACGCAACGGGACTGTT 3'

ไพรเมอร์ที่ออกแบบถูกตรวจสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นโดยใช้จำนวนยีน *amoA* ของ AOA กลุ่มดังกล่าวด้วย Real-time PCR ซึ่งพบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถตรวจนับจำนวนได้ทั้งในระบบ P2 และ P3 แต่ไม่สามารถรายงานเป็นจำนวนที่แน่นอนได้เนื่องจากไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่จำเพาะกับสแตนด์ราร์ดที่ใช้สำหรับการนับจำนวน ทำให้ไม่สามารถสร้างกราฟมาตรฐานได้เพราะฉะนั้นจึงแสดงผลจากการรัน Agarose gel ซึ่งพบว่ามีเพียงแบนเดียวที่ตำแหน่งประมาณ 230 คู่เบส แสดงว่าไพรเมอร์ที่ใช้และสภาวะสำหรับการทำ Real-time PCR มีความจำเพาะต่อกลุ่มจุลินทรีย์เป็นอย่างดี นอกจากนี้ได้มีการตรวจสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบเพิ่มเติมโดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1. ทำ DNA-sequencing ในระบบบำบัดน้ำเสีย P2 และ P6

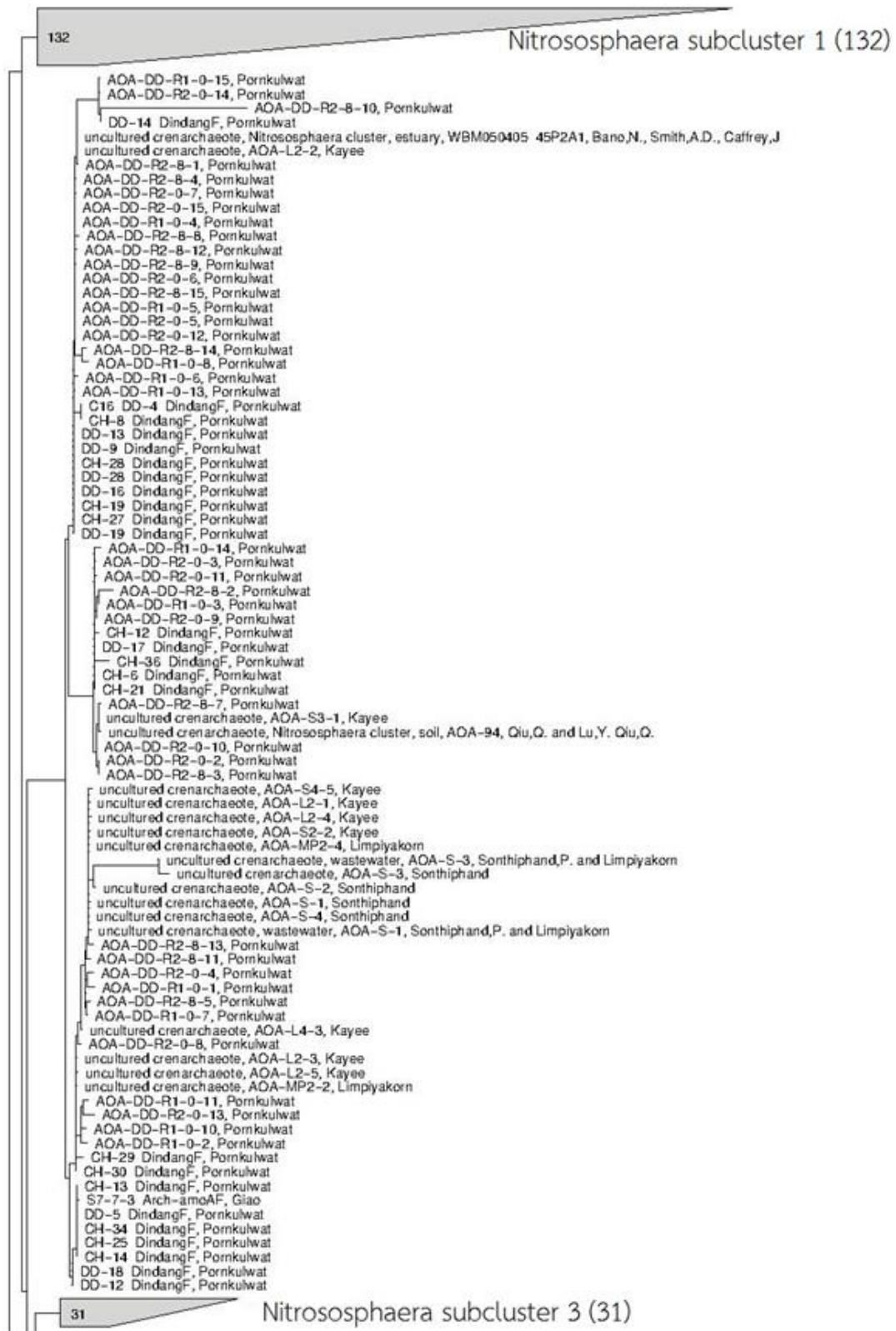
ผลการทำ DNA-sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบทำการเพิ่มจำนวนยีน *amoA* ของ AOA โดยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นทำการโคลนนิ่งและเก็บโคลนตัวอย่างละ 20 โคลนินเพื่อทำพีซีอาร์อีกครั้งและถอดรหัสพันธุกรรมด้วย DNA-sequencing ผลการทดลองทุกโคลนินของ AOA ในระบบ P2 และ P6 ที่ถูกเพิ่มจำนวนจากไพรเมอร์ที่ออกแบบ มีรหัสพันธุกรรมถูกจัดในกลุ่มเดียวกันหมด แสดงว่าไพรเมอร์ดังกล่าวมีความจำเพาะที่ดีต่อยีน *amoA* ของ AOA กลุ่มนี้ ผลแสดงดังภาพที่ 5.16



ภาพที่ 5.16 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA *amoA* จากตัวอย่างระบบบำบัด P2 และ P3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ



ภาพที่ 5.17 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA *amoA* จากตัวอย่างระบบบำบัด P2 และ P3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ (ขยายจากภาพที่ 5.16)

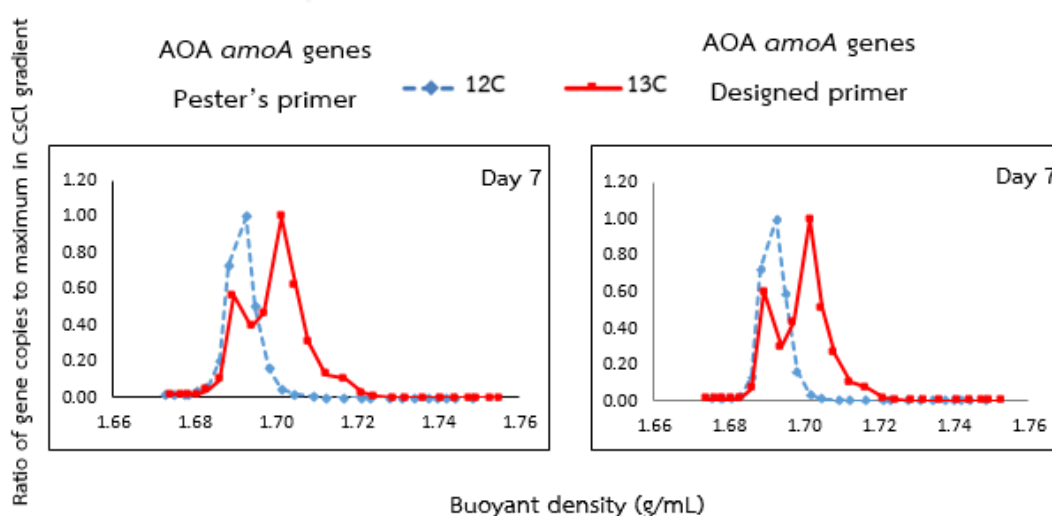


ภาพที่ 5.18 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA amoA จากตัวอย่างระบบบำบัด P2 และ P3 โดยใช้โปรแกรมที่ออกแบบ (ขยายจากภาพที่ 5.17)

ภาพที่ 5.18 ขยายจากภาพที่ 5.17 โดยตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนรหัสพันธุกรรม ขณะที่รหัสพันธุกรรมที่ได้แสดงด้วยตัวอักษร DindangF และรหัสพันธุกรรมเดิมที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ของ Pester และคณะ (2012) กับตัวอย่างในระบบบำบัด P6 แสดงด้วยตัวอักษร AOA-DD

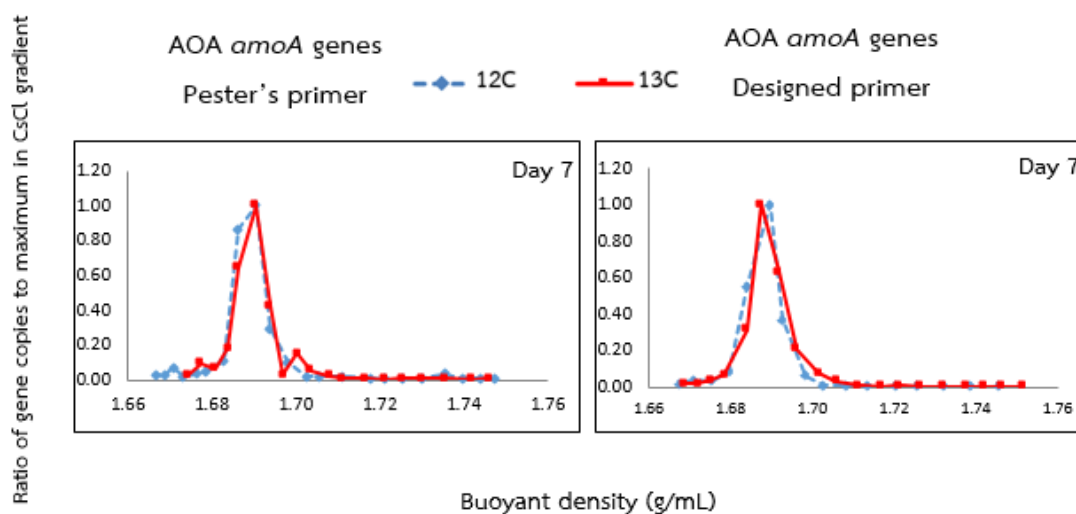
2. ทำ Real-time PCR กับ DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบ 2) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  ที่ระยะการบ่ม 7 วัน ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบ

สภาวะที่เหมาะสมในการทำ Real-time PCR สำหรับไพรเมอร์ที่ออกแบบ ใช้สภาวะเดียวกับไพรเมอร์ที่ใช้นับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA ไพรเมอร์ดังกล่าวจะถูกใช้นับจำนวนยีน *amoA* ของกลุ่ม AOA ที่พบในระบบ P6 ซึ่งพบเพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น โดยผล DNA-SIP แสดงดังภาพที่ 5.19 ซึ่งพบว่ากราฟที่ได้จากการนับจำนวนด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบ มีลักษณะเช่นเดียวกับกราฟที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์สำหรับนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA (Pester และคณะ 2012) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อกลุ่ม AOA ที่พบในระบบ P6 เท่านั้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากกลุ่ม AOA ที่พบในระบบ P6 อาจพบในระบบบำบัดอื่นได้เช่นกัน ดังนั้นจึงทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวกับ DNA-SIP ของระบบ P3 เพิ่มเติม ซึ่งจากภาพที่ 5.20 พบว่าลักษณะกราฟ DNA-SIP ของ  $^{13}\text{C}$  และ  $^{12}\text{C}$  ทางขวามีลักษณะพีคที่ชัดเจนกว่ากราฟเดิมซึ่งแสดงทางซ้าย ถึงแม้ว่าจะไม่มีการเคลื่อนที่ของกราฟไปทางขวาเช่นกัน ซึ่งผลการทดลองดังกล่าววิเคราะห์ได้ว่า กลุ่ม AOA ที่ตรวจสอบจากการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ในระบบ P6 แล้วพบว่ามีการทำงานแบบออโตโทรฟนั้น เมื่อทำตรวจตรวจสอบกลุ่ม AOA เดียวกันในระบบ P3 กลับพบว่าไม่มีการเคลื่อนที่ของกราฟมาทางขวาดังเช่นผลที่ได้จากระบบ P6 ผลดังกล่าวสรุปได้ว่า สภาวะการบ่มของตะกอนจุลินทรีย์จากระบบ P3 อาจไม่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ (อธิบายในข้อ 5.3.2) ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 5.19 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบ 2) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  ที่ระยะการบ่ม 7 วัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ





ภาพที่ 5.20 DNA-SIP ระบบบำบัด P3 (รอบ 1) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  ที่ระยะการบ่ม 7 วัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ

### 5.3.5 ค่าพารามิเตอร์ของระบบบำบัด P2, P3 และ P6 ต่อผล DNA-SIP

ประเภทระบบบำบัดทั้ง 3 ระบบที่เลือกมาศึกษาการทำงานแบบอโตโทรฟของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ขณะออกซิไดซ์แอมโมเนีย ในเบื้องต้นทั้ง 3 ระบบถูกออกแบบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำ ซึ่งบางช่วงของการบำบัดจะมีค่าการละลายออกซิเจนที่ต่ำ (0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ประกอบกับค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในระบบบำบัดมีค่าต่ำใกล้เคียงกับน้ำเสียออก (1.11-1.51  $\text{mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ ) ซึ่งสนับสนุนต่อการเจริญเติบโตทั้ง AOA และ AOB ดังนั้นอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้พบ AOA จำนวนมากในระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศไทย และเมื่อพิจารณาผล DNA-SIP ของระบบบำบัด P2 และ P6 พบว่า AOA และ AOB มีการทำงานแบบอโตโทรฟขณะออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งสอดคล้องกับสัดส่วนการกำจัดแอมโมเนียโดยกลุ่มจุลินทรีย์อโตโทรฟที่คำนวณได้ในแต่ละระบบ ( $P2 = 82.83\%$  และ  $P3 = 85.55\%$ ) ขณะที่ระบบบำบัด P3 พบเพียง AOB เท่านั้นที่มีการทำงานแบบอโตโทรฟ แต่ AOA ไม่มีการทำงานในรูปแบบดังกล่าว แต่มีได้หมายความว่า AOA ในระบบบำบัด P3 จะไม่สามารถทำงานแบบอโตโทรฟได้ เพราะหากดูสัดส่วนการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียโดยจุลินทรีย์กลุ่มอโตโทรฟพบว่า ระบบบำบัด P3 มีสัดส่วนการกำจัดแอมโมเนียอยู่ที่ 43.43% โดยสัดส่วนดังกล่าวอาจเป็นการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOB เพียงอย่างเดียวหรืออาจเป็นการทำงานร่วมกันกับจุลินทรีย์กลุ่ม AOA ด้วย ดังนั้นกิจกรรมของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย ขณะออกซิไดซ์แอมโมเนียยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นแบบใด โดยอาจเกิดจากสภาวะการบ่มที่ไม่เหมาะสมและค่อนข้างแตกต่างจากระบบบำบัดจริง อีกทั้งอัตราการเจริญเติบโตของ AOA ค่อนข้างช้ากว่า AOB จึงทำให้ AOA อาจต้องใช้เวลานานในการเจริญเติบโตจึงจะแสดงผล DNA-SIP ได้อย่างชัดเจนดังเช่นระบบบำบัด P2 และ P6

สำหรับค่าพารามิเตอร์อื่นในระบบบำบัด เช่น ประสิทธิภาพบำบัด ค่าบีโอดี หรือค่าความเข้มข้นแอมโมเนีย เป็นต้น ยังไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระบบบำบัดแต่ละประเภทกับการทำงานแบบอโตโทรฟของจุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB ในขณะออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ โดยอาจต้องการศึกษาระบบบำบัดประเภทเดียวกันแต่พื้นที่การเก็บตัวอย่างต่างกันเพื่อพิสูจน์การทำงานที่แท้จริงและหาปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าว

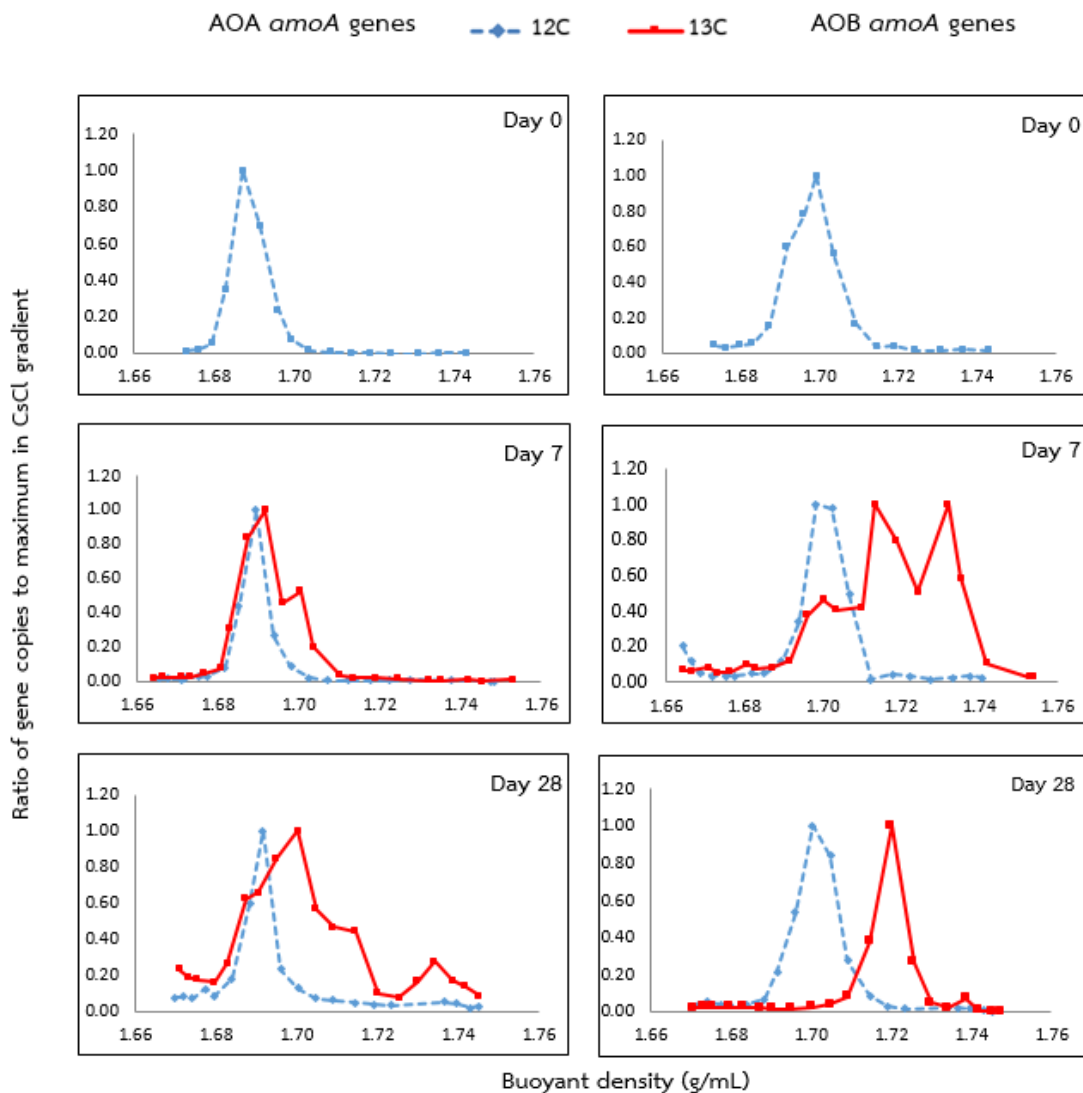
#### 5.4 การทดลองที่ 4 การศึกษาการทำงานของกลุ่มประชากร AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย P6 ภายใต้ปัจจัยต่างกันโดยเทคนิค DNA-SIP

ผลจากการถอดรหัสพันธุกรรมของระบบบำบัด P6 ในการทดลองที่ 3 พบว่า AOA ในระบบบำบัดดังกล่าว มีเพียงกลุ่มเดียวซึ่งอยู่ระหว่าง *Nitrososphaera* subcluster 1 และ 2 จากความจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA ที่พบในระบบบำบัด P6 จึงสนใจที่จะศึกษาปัจจัยอื่น เช่น ความเข้มข้นแอมโมเนียหรือการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง ที่อาจมีผลต่อกลุ่มจุลินทรีย์ AOA รวมทั้ง AOB ในระบบบำบัด และการแสดงผล DNA-SIP ที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

จากตารางที่ 4.8 ผล DNA-SIP ทั้ง 4 ชุดการทดลองแสดงดังนี้

##### 5.4.1 ชุดการทดลอง 1 : DNA-SIP ระบบบำบัด P6 ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L

ผลการทำ DNA-SIP จากการบ่มตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัด P6 ในรอบที่ 3 เพื่อใช้เป็นชุดการทดลองควบคุมของการศึกษากิจกรรมของ AOA และ AOB ภายใต้ปัจจัยที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5.21) แสดงให้เห็นว่ากราฟ <sup>13</sup>C ของ AOA และ AOB มีการเคลื่อนที่ไปทางขวาเช่นเดียวกับการบ่มตะกอนจุลินทรีย์รอบที่ 1 และ 2 ซึ่งยืนยันได้ว่า AOA และ AOB สามารถสะสมไบคาร์บอเนตเข้าสู่เซลล์ได้และมีการทำงานแบบอโตโทรฟ



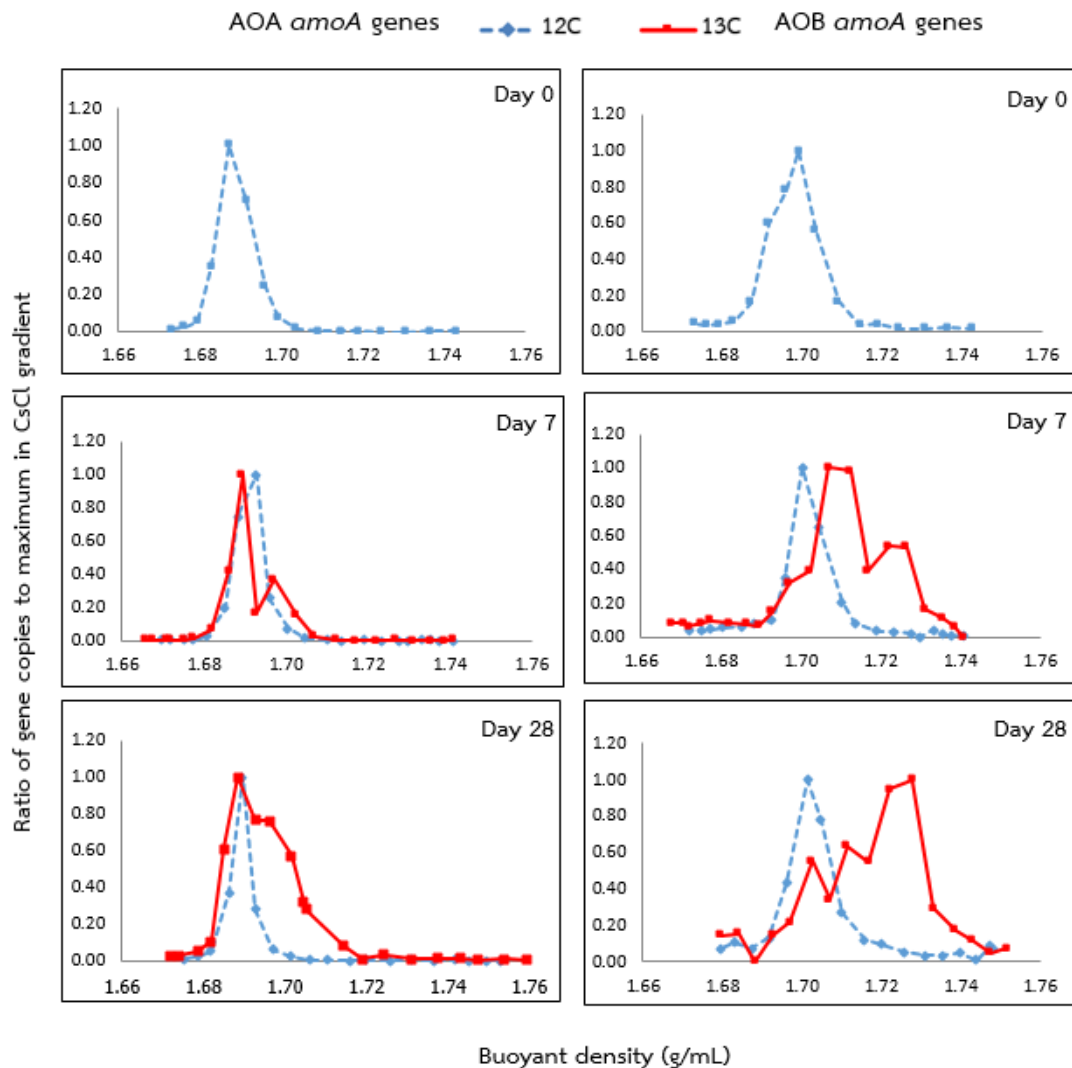
ภาพที่ 5.21 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบที่ 3) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$

#### 5.4.2 ชุดการทดลอง 2 : DNA-SIP ระบบบำบัด P6 ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ (มีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง)

การปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง คือ การระบายเซลล์เก่าออกไปเพื่อให้ในถังปฏิกรณ์มีแต่สัดส่วนเซลล์ใหม่ที่เกิดจากการสะสมไบคาร์บอเนตเข้าสู่เซลล์ สำหรับการบ่มในถังปฏิกรณ์กวนแบบต่อเนื่องมีระยะเวลาการกักเก็บน้ำ (HRT) 5 วัน ส่วนระยะเวลาการกักเก็บตะกอน (SRT) ไม่สามารถระบุได้เนื่องจากการกวนในถังปฏิกรณ์ที่เป็นระบบปิดนั้นต้องใช้เครื่องกวนสารละลายด้วยแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ในการปั่นกวนอย่างสมบูรณ์ในถัง จึงทำให้ในระยะเวลา 1 วันไม่สามารถเปิดเครื่องได้ตลอด 24 ชั่วโมง เนื่องจากต้องพักเครื่อง ซึ่งปัจจัยนี้ยังคงเป็นข้อจำกัดข้อหนึ่งในการศึกษาปัจจัยของการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งต่อกิจกรรมของ AOA

และ AOB ในระบบบำบัด P6 สำหรับสมมติฐานของผล DNA-SIP ที่คาดการณ์ คือ กราฟ  $^{13}\text{C}$  จะมีการเคลื่อนที่ของกราฟไปทางขวามากขึ้นและพิกแยกออกจากกราฟ  $^{12}\text{C}$  อย่างชัดเจน

ภาพที่ 5.22 ผล DNA-SIP จากการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งพบว่าเมื่อการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ผ่านไป 7 วัน AOA มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  ไปทางขวาเพียงเล็กน้อยซึ่งยังไม่สามารถระบุได้ว่าการสะสมไบคาร์บอเนตเข้าสู่เซลล์หรือไม่ แต่เมื่อผ่านไป 28 วัน พบว่ากราฟ  $^{13}\text{C}$  เคลื่อนที่ไปทางขวามากขึ้น แต่ยอดพิกของ  $^{13}\text{C}$  ยังคงซ้อนทับกับ  $^{12}\text{C}$  เช่นเดิมซึ่งผลการทดลองมีลักษณะเหมือนกับการบ่มตะกอนจุลินทรีย์แบบไม่มีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้งขณะที่ AOB เมื่อการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ผ่านไป 7 วันพบว่าการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  ไปทางขวาโดยเมื่อเปรียบเทียบ Buoyant density ของยอดพิก  $^{13}\text{C}$  และ  $^{12}\text{C}$  พบว่ายอดพิกแยกออกจากกันโดยมีค่าประมาณ 0.01 g/mL เมื่อพิจารณาการบ่มที่ 28 วัน พบว่า AOB มียอดพิก  $^{13}\text{C}$  แยกออกจาก  $^{12}\text{C}$  มากขึ้น โดยมีค่า Buoyant density ห่างกันประมาณ 0.03 g/mL แสดงว่า AOB ที่ยังคงอยู่ในถังปฏิกรณ์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ใหม่ที่เกิดจากการสะสมไบคาร์บอเนตเข้าสู่เซลล์ สำหรับ AOA ส่วนของกราฟ  $^{12}\text{C}$  ที่ยังคงซ้อนทับกับ  $^{13}\text{C}$  อาจเป็นเซลล์เก่าจากตะกอนจุลินทรีย์ตั้งต้นในการบ่มเนื่องจากข้อจำกัดของการปั่นกวอย่างสมบูรณ์ในถัง หรืออีกกรณีหนึ่ง AOA สายพันธุ์ที่พบในระบบบำบัด P6 อาจไม่ได้มีการทำงานแบบอโตโทรป ซึ่งอาจมีการทำงานแบบมิโครโทรปที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้จากทั้งคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์ที่อาจมาจากเซลล์เก่าในถังปฏิกรณ์ (Mußmann และคณะ, 2011)

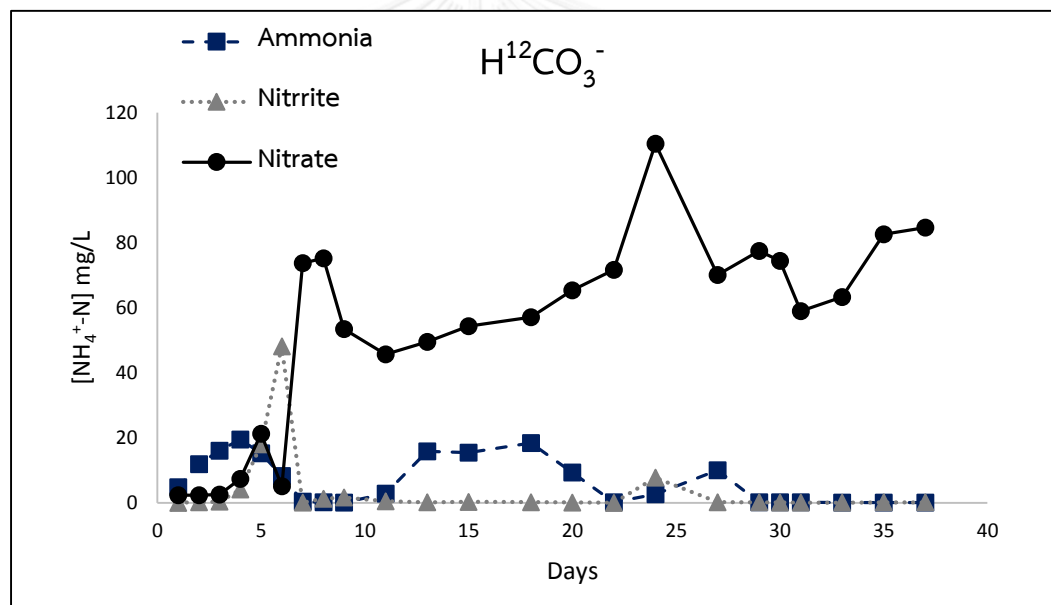
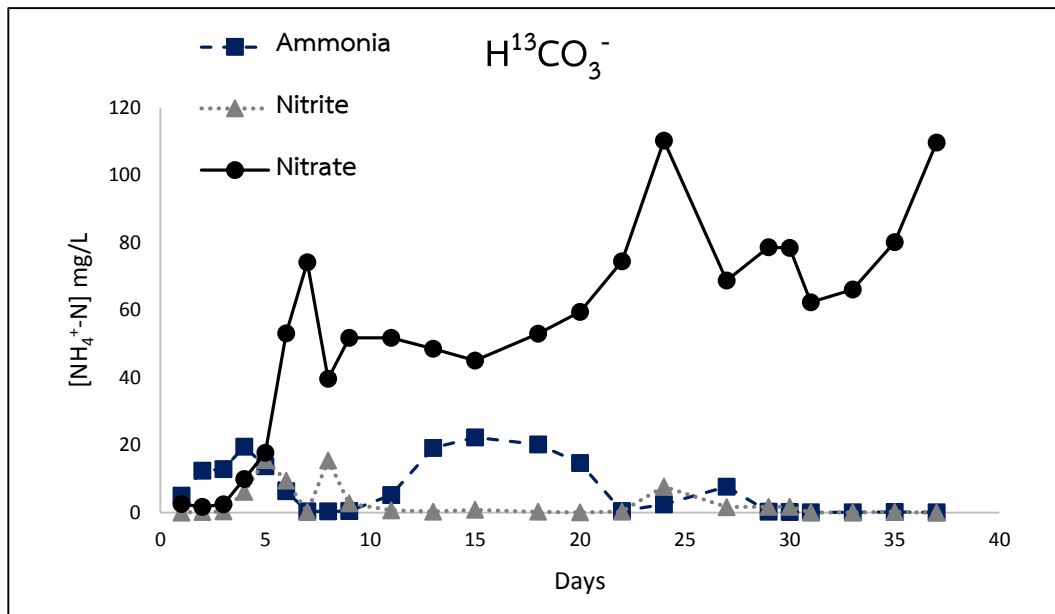


ภาพที่ 5.22 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบที่ 3) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L (มีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง)

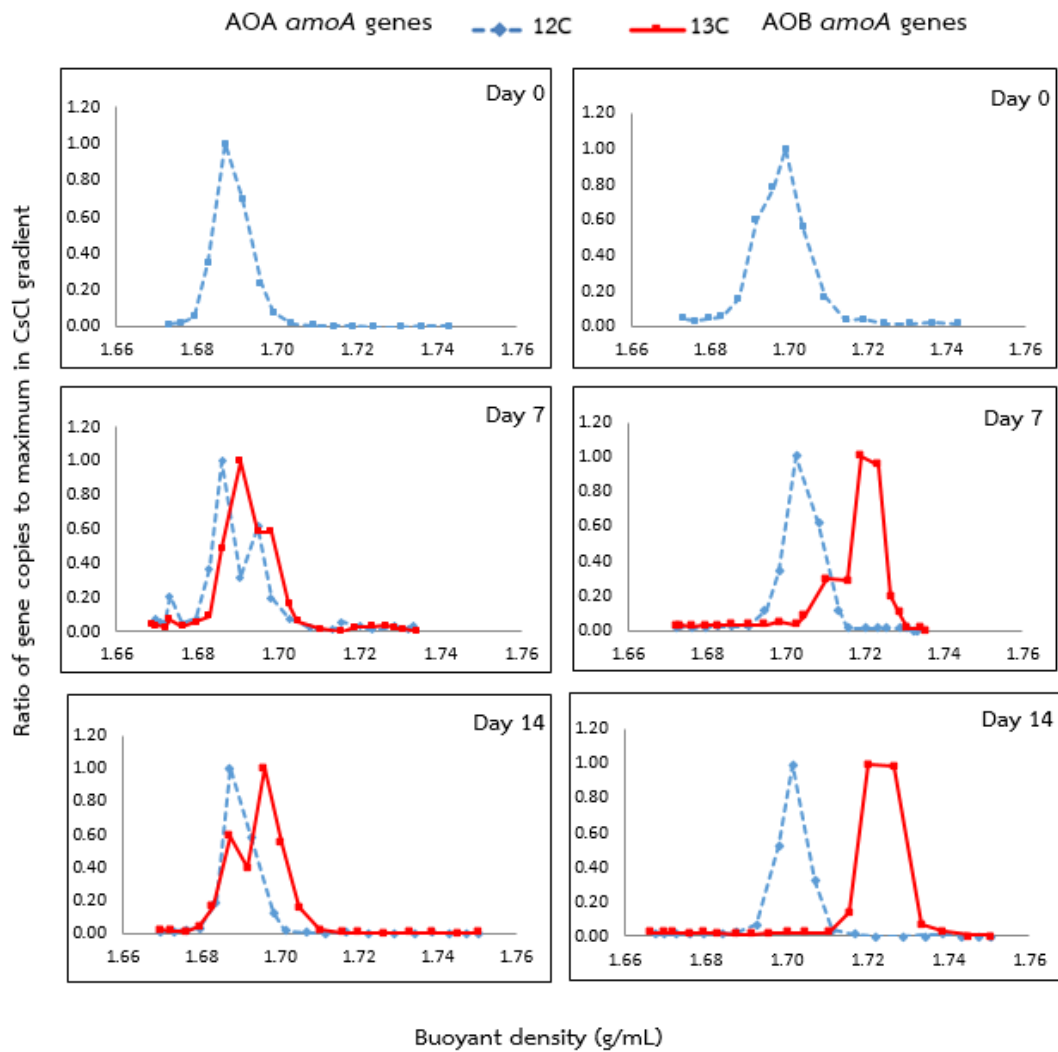
#### 5.4.3 ชุดการทดลอง 3 : DNA-SIP ระบบบำบัด P6 ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L (มีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง)

ปัจจัยด้านความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB จัดว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานระหว่าง AOA และ AOB ที่แตกต่างกัน โดย AOA จะทำงานได้ดีที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำกว่า AOB โดยพิจารณาจากค่า K<sub>s</sub> (ตารางที่ 4.2) ดังนั้นจึงทำการปรับความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้าเข้มข้นขึ้น 10 เท่า เป็น 70 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์คือ 5 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L เพื่อให้ความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ขณะบ่มสูงขึ้น ซึ่งคาดการณ์ว่าความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์จะทำให้กลุ่มจุลินทรีย์ AOB เท่านั้นที่สามารถ

เจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากความเข้มข้นแอมโมเนียที่สูงและดำเนินการบ่มในระบบปิด ทำให้ต้องพิจารณาถึงปริมาณออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ เพราะหากออกซิเจนไม่เพียงพอจะส่งผลกระทบต่อการสะสมของไนไตรต์ ซึ่งมีความสามารถยับยั้งการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์เซอร์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมอากาศวันละ 2 รอบเพื่อลดการสะสมสารดังกล่าว และเมื่อพิจารณาผลความเข้มข้น แอมโมเนียในถังปฏิกรณ์แต่ละชุด ( $\text{H}^{12}\text{CO}_3^-$  และ  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) ประกอบกับผล DNA-SIP ในแต่ละช่วงเวลาพบว่า เมื่อบ่มตะกอนจุลินทรีย์ได้ 7 วันช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์  $\text{H}^{12}\text{CO}_3^-$  และ  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  จากเริ่มต้นที่ 4.78 และ 5.06  $\text{mgNH}_4^+/\text{N/L}$  ตามลำดับ พบว่าการสะสมแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและมีค่าลดลงเมื่อเข้าสู่วันที่ 7 คือ  $\text{H}^{12}\text{CO}_3^-$  (สูงสุด 19.50 ต่ำสุด 0.32  $\text{mgNH}_4^+/\text{N/L}$ )  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  (สูงสุด 19.51 ต่ำสุด 0.43  $\text{mgNH}_4^+/\text{N/L}$ ) และเมื่อเข้าสู่ช่วงการบ่มที่ 8 - 16 วัน แอมโมเนียมีค่าสะสมสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในช่วงดังกล่าวที่ 18.34  $\text{mgNH}_4^+/\text{N/L}$  ( $\text{H}^{12}\text{CO}_3^-$ ) และ 22.27  $\text{mgNH}_4^+/\text{N/L}$  ( $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) หลังจากนั้นความเข้มข้นแอมโมเนียสะสมมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยความเข้มข้นแอมโมเนียสุดท้ายคือ 0.08  $\text{mgNH}_4^+/\text{N/L}$  ( $\text{H}^{12}\text{CO}_3^-$ ) และ 0.07  $\text{mgNH}_4^+/\text{N/L}$  ( $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) ดังแสดงในภาพที่ 5.23 โดยผลความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์สอดคล้องกับผล DNA-SIP ดังนี้ การบ่มที่ 7 วันซึ่งมีความเข้มข้นแอมโมเนียสะสมในถังปฏิกรณ์สูงถึง 19.50-19.51  $\text{mgNH}_4^+/\text{N/L}$  ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าว เมื่อพิจารณาประกอบกับค่า  $K_s$  พบว่าเหมาะสมต่อการทำงานของ AOB ซึ่งผล DNA-SIP ของ AOA พบว่ากราฟ  $^{13}\text{C}$  ของ AOA ยังคงซ้อนทับกับกราฟ  $^{12}\text{C}$  วิเคราะห์ได้ว่า ความเข้มข้นแอมโมเนียในช่วงดังกล่าวในระบบบำบัด P6 ไม่สนับสนุนการเจริญเติบโตของ AOA แต่เมื่อพิจารณาผล DNA-SIP ของ AOA ที่ 14 วัน พบว่า AOA มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  ไปทางขวาบางส่วน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า 7  $\text{mgNH}_4^+/\text{N/L}$  เพราะช่วงระยะเวลาการบ่มที่ 8-16 วัน ความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ลดต่ำลงโดยมีค่าใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในถังของการทดลองชุดที่ 1 ซึ่งเป็นชุดควบคุม ขณะที่ AOB พบว่ามีมีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  โดยแยกพีคออกจากกราฟ  $^{12}\text{C}$  อย่างชัดเจน ดังนั้นความเข้มข้นแอมโมเนียจัดว่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะระหว่าง AOA และ AOB จากผลการทดลองนี้ทำให้การศึกษาการทำงานที่แตกต่างกันในระดับสายพันธุ์ของกลุ่ม AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียมีความน่าสนใจอย่างมากสำหรับงานในอนาคตที่จะนำปัจจัยความเข้มข้นแอมโมเนียใช้แบ่งแยกการทำงานระหว่างสายพันธุ์ของ AOA ซึ่งอาจพบแตกต่างกันออกไปในแต่ละระบบบำบัด



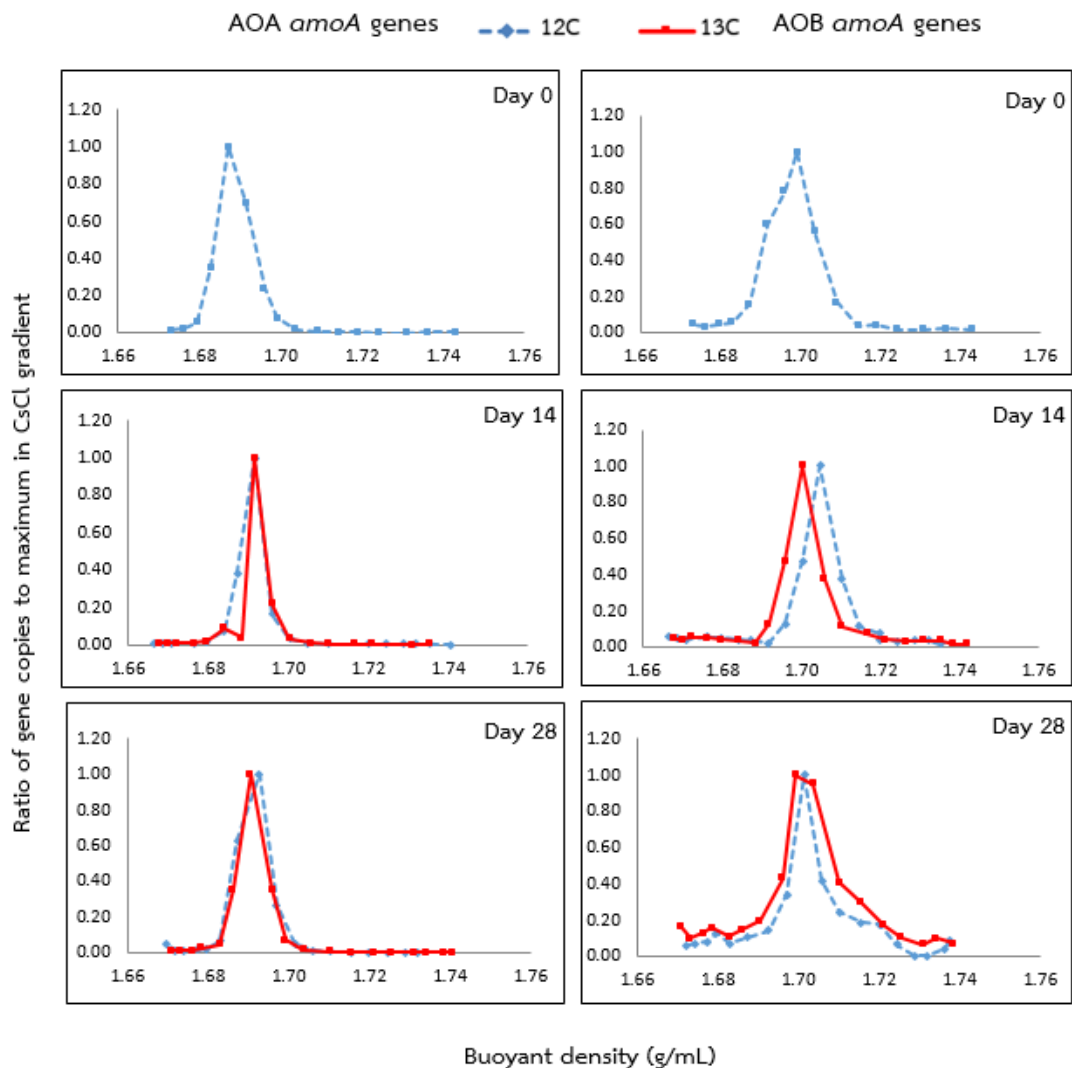
ภาพที่ 5.23 ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนทเตรต ในถังปฏิกรณ์สำหรับการบ่มตะกอน จุลินทรีย์ ความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L



ภาพที่ 5.24 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบที่ 3) ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L



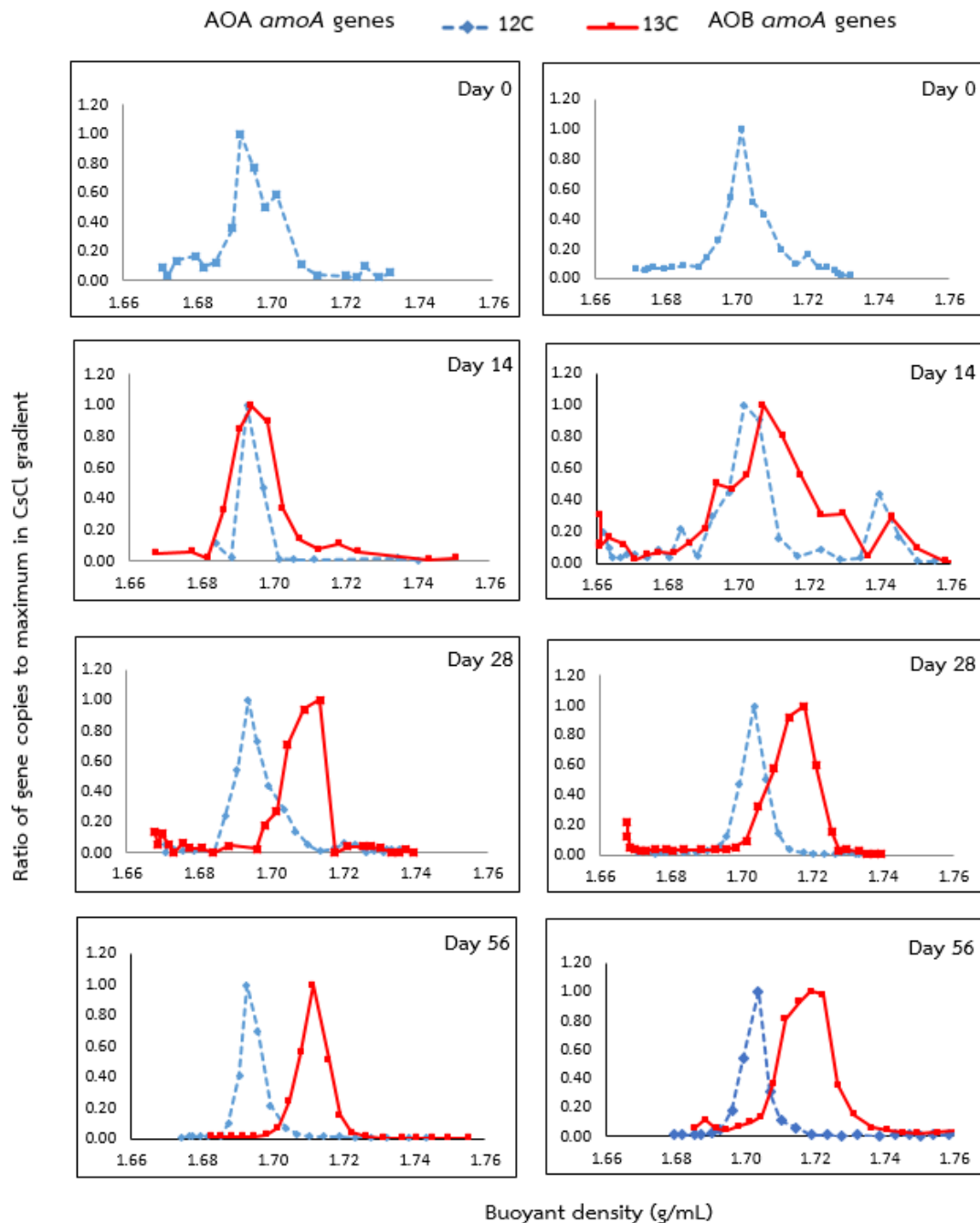
#### 5.4.4 ชุดการทดลอง 4 : DNA-SIP ระบบบำบัด P6 ในสถานะไม่เต็มแอมโมเนีย



ภาพที่ 5.25 DNA-SIP ระบบบำบัด P6 (รอบที่ 3) แบบไม่เต็มแอมโมเนีย

การทดลองชุดที่ 4 เป็นการยืนยันการใช้แหล่งพลังงานจากแอมโมเนียของ AOA และ AOB ในระบบบำบัด P6 โดยการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ในสถานะไม่เต็มแอมโมเนียและมีไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน ผล DNA-SIP (ภาพที่ 5.25) พบว่า เมื่อการบ่มผ่านไป 28 วัน ทั้ง AOA และ AOB ไม่มีการเคลื่อนที่ของกราฟ  $^{13}\text{C}$  แต่อย่างใด โดยกราฟยังคงซ้อนทับกับกราฟ  $^{12}\text{C}$  วิเคราะห์ได้ว่าทั้ง AOA และ AOB ไม่สามารถทำงานแบบออโตโทรฟได้ในสถานะที่ไม่มีแอมโมเนีย

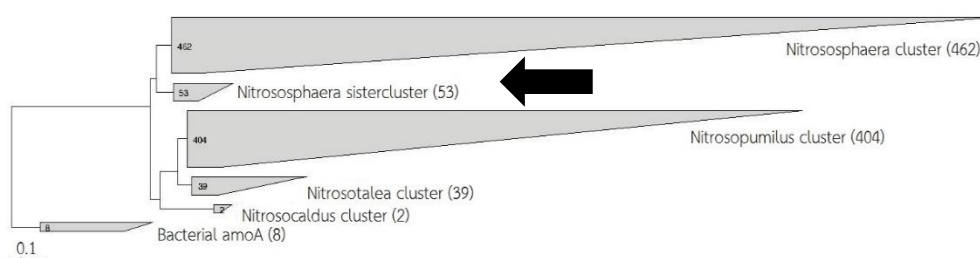
5.5 การทดลองที่ 5 การศึกษาความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการทำงานและจำนวนประชากร AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์กวนแบบต่อเนื่อง (Continuous stirred tank reactor, CSTR)



ภาพที่ 5.26 DNA-SIP ของตะกอนจุลินทรีย์จากระบบไนตริฟายอิงแอกติเวตเต็ดสลัดจ์ ที่ความเข้มข้นแอมโมเนีย  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$

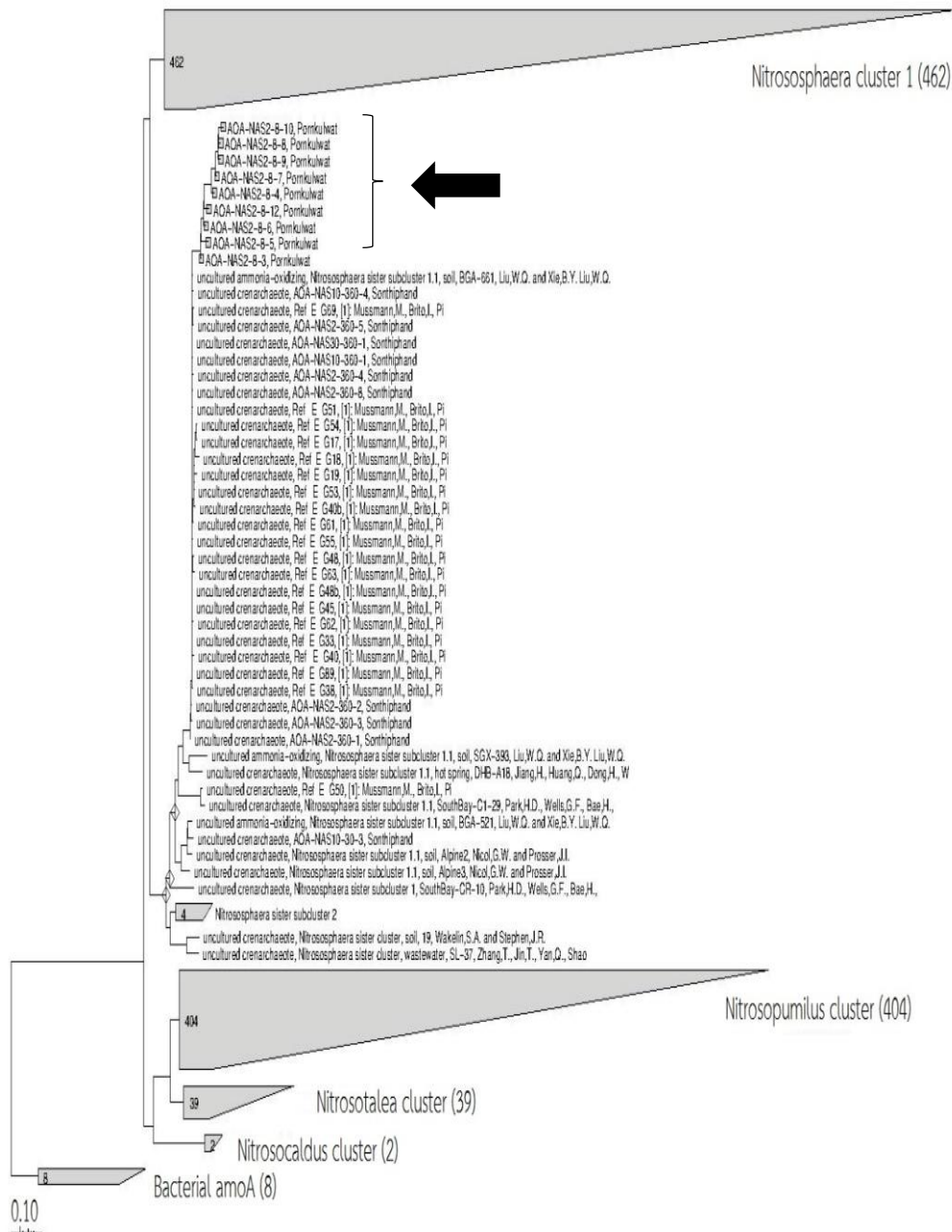
การทดลองที่ 5.3 และ 5.4 เป็นการตรวจสอบการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียจริง ซึ่งมีปัจจัยทางกายภาพที่และเคมีที่หลากหลายและอาจมีผลต่อการทำงานที่แตกต่างกัน

ออกไปในแต่ละระบบ ดังนั้นการทดลองที่ 5 จึงเป็นการนำตะกอนจุลินทรีย์ที่มีการเดินระบบภายใต้สภาวะที่สนับสนุนการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดเซอร์หรือเรียกว่าระบบไนตริฟายอิงแอกติเวตเต็ดสลัดจ์ (Nitrifying activated sludge, NAS) สำหรับตะกอนจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้ มาจากระบบบำบัดระดับห้องปฏิบัติการ (Lab scale) ซึ่งมีการเจริญเติบโตในน้ำเสียสังเคราะห์ที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของ AOA ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียเข้า 28 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L โดยความเข้มข้นแอมโมเนียในถังคือ 0.13-0.11 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L สำหรับข้อมูลการเดินระบบแสดงดังตารางที่ 4.9 จากการตรวจสอบจำนวน AOA และ AOB ในระบบ NAS เบื้องต้นพบว่ากลุ่มประชากร AOB เป็นกลุ่มเด่นในระบบ ซึ่งพบจำนวนยีน *amoA* ของ AOB 1.68×10<sup>7</sup> copies/mgMLSS ขณะที่ AOA พบเพียง 1.31×10<sup>3</sup> copies/mgMLSS จากลักษณะการเดินระบบที่กล่าวมาคาดการณ์ได้ว่า AOA ที่พบในระบบน่าจะมีการทำงานแบบออโตโทรฟ เนื่องจากน้ำเสียสังเคราะห์ที่ป้อนให้กับระบบประกอบไปด้วยสารอนินทรีย์ (Inorganic medium) และใช้ไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน ผลจากการทำ DNA-SIP พบว่าเมื่อบ่มตะกอนจุลินทรีย์ผ่านไป 14 วัน AOA กราฟ <sup>13</sup>C ของ AOA ยังคงซ้อนทับกราฟ <sup>12</sup>C ขณะที่ AOB มีกราฟ <sup>13</sup>C มีการเคลื่อนที่ไปทางขวาเล็กน้อย และเมื่อบ่มผ่านไป 28 วัน ผล DNA-SIP ของทั้ง AOA และ AOB มีการเคลื่อนที่ของกราฟ <sup>13</sup>C ไปทางขวาและยอดพิกของ <sup>13</sup>C แยกออกจาก <sup>12</sup>C อย่างชัดเจน ทั้งสองพิกของ <sup>12</sup>C และ <sup>13</sup>C ทั้ง AOA และ AOB มีช่วง buoyant density ห่างกัน 0.02 g/mL สำหรับ AOA และเมื่อบ่มตะกอนจุลินทรีย์จนถึงวันที่ 56 พบว่า AOA มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น (<sup>13</sup>C= 5.82×10<sup>4</sup>, <sup>12</sup>C=2.95×10<sup>4</sup> copies/mgMLSS) ขณะที่ AOB มีจำนวนลดลง (<sup>13</sup>C= 2.47×10<sup>5</sup> <sup>12</sup>C=3.10×10<sup>5</sup> copies/mgMLSS) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนในระบบก่อนนำมาบ่ม ดังนั้น AOA ที่โตขึ้นจากการบ่มเมื่อผ่านไป 56 วันน่าจะเป็น AOA ที่มีการทำงานแบบออโตโทรฟ ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวได้ถูกนำไประบุสายพันธุ์ที่พบด้วยเทคนิค PCR-cloning และ DNA sequencing ซึ่งผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 5.27 และ 5.28



ภาพที่ 5.27 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีน AOA *amoA* ที่ได้จากตัวอย่าง NAS ที่ 56 วันของ <sup>13</sup>C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนรหัสพันธุกรรม (Sequence) โดยลูกศรแสดงที่ตั้งตำแหน่งรหัสพันธุกรรม ซึ่งตัวอย่าง NAS ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Nitrososphaera* sistercluster ซึ่งชี้ด้วยลูกศรในภาพที่ 5.27 ซึ่งเมื่อขยายออกมาจะแสดงถึงความใกล้เคียงของรหัสพันธุกรรมดังภาพที่ 5.28



ภาพที่ 5.28 ต้นไม้วิวัฒนาการ ของยีน AOA *amoA* ที่ได้จากตัวอย่าง NAS ที่ 56 วันของ  $^{13}\text{C}$  โดยขยายจากภาพที่ 5.27

โดยลูกศรแสดงที่ตั้งตำแหน่งรหัสพันธุกรรมที่ได้จากตัวอย่าง NAS แสดงด้วยตัวอักษร AOA-NAS2

จากผล DNA-SIP และการถอดรหัสพันธุกรรม AOA ของตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์แบบ NAS ที่ผ่านการบ่มมาแล้วที่ 56 วัน พบว่าเป็น AOA กลุ่ม Nitrososphaera sistercluster ดังนั้น AOA ในกลุ่มดังกล่าวน่าจะมีการทำงานแบบออโตโทรป เพราะตะกอนจุลินทรีย์ที่นำมาทำการบ่มเป็นตะกอนที่ถูกเลี้ยงในสภาวะการสนับสนุนการทำงานแบบออโตโทรปอยู่แล้ว อีกทั้ง AOA ระหว่างการบ่มจุลินทรีย์มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และในสภาวะการบ่มเป็นสภาวะที่สนับสนุนการเจริญเติบโตแบบออโตโทรปเท่านั้นอีกด้วย



## บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศไทยพบการเจริญเติบโตร่วมกันระหว่าง AOA และ AOB โดยในแต่ละระบบที่ทำการตรวจสอบจะพบจำนวน AOA เป็นกลุ่มหลัก ดังนั้นการพิสูจน์การทำงานแบบออโตโทรฟของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียที่เลือกมา 3 ระบบ พบว่า AOA ในระบบบำบัด P2 และ P6 มีการทำงานแบบออโตโทรฟ (Autotroph) ขณะออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน ภายใต้สภาวะการบ่มที่แอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ขาเข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  โดย AOA ที่พบจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 1.1b ของไฟลัม *Thaumachaoeta* ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับ AOA ที่พบในสิ่งแวดล้อมในดิน ซึ่งเมื่อถอดรหัสพันธุกรรมของระบบบำบัด P6 พบว่า AOA ในระบบดังกล่าวมีความจำเพาะอยู่ในกลุ่มย่อย *Nitrososphaera* cluster ของไฟลัม *Thaumachaoeta* เท่านั้น จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าว และนำไปใช้ถอดรหัสพันธุกรรมเทียบกับตัวอย่างอื่นและทำ DNA-SIP โดยสามารถยืนยันได้ว่า AOA ใน กลุ่มย่อย *Nitrososphaera* cluster ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียมีการทำงานแบบออโตโทรฟขณะออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดยใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน ขณะที่ระบบบำบัด P3 พบว่า AOA ไม่มีการทำงานแบบออโตโทรฟภายใต้สภาวะการบ่มที่แอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ขาเข้า  $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$  ดังนั้นในตัวอย่างในระบบนี้จำเป็นต้องหาสภาวะการบ่มที่เหมาะสมต่อไปในอนาคต ขณะที่ AOB พบว่าทุกระบบบำบัด P2, P3 และ P6 AOB มีการทำงานแบบออโตโทรฟทั้งหมดขณะออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน ปัจจัยหลักที่น่าจะมีความสัมพันธ์กับการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ในระบบบำบัดคือความเข้มข้นแอมโมเนียซึ่งมีผลต่อการดำรงอยู่และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB ขณะที่ปริมาณแอมโมเนียในน้ำเสียขาเข้าน้อยแต่ค่าบีโอดีมาก สัดส่วนดังกล่าวอาจมีผลต่อการย่อยแอมโมเนียระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB เพราะแอมโมเนียบางส่วนจะถูกกลุ่มจุลินทรีย์เฮเทอโรโทรฟใช้ โดยแอมโมเนียที่เหลือจะขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโตของ AOA และ AOB ที่อยู่ในระบบบำบัด

ผลของความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเสียขาเข้าต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB พบว่า AOA มีการทำงานได้ดีที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ (ต่ำกว่า  $1 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ ) ขณะที่ AOB มีช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียที่ทำงานได้กว้างกว่า AOA (ต่ำกว่า  $1 -$  มากกว่า  $20 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ ) อย่างไรก็ตามไม่ได้หมายความว่า AOA ทุกสายพันธุ์จะทำงานได้ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำเท่านั้น แต่อาจมีบางสายพันธุ์ทำงานได้ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียสูงได้เช่นกัน ดังนั้นการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนซึ่งมีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำจึงเป็นการทำงานร่วมกัน

ระหว่าง AOA และ AOB แต่สำหรับกิจกรรมที่แท้จริงของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียอื่น ๆ ซึ่งมีสายพันธุ์ที่หลากหลาย ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่า AOA ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียนั้นเป็นออโตโทรปหรือไม่ เนื่องจากยังไม่ได้มีการตรวจสอบการใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่ง AOA ในระบบบำบัดอาจมีการทำงานแบบมิคโซโทรป (Mixotroph) ได้เช่นกัน ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

สำหรับ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ NAS ซึ่งถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะสนับสนุนการทำงานแบบออโตโทรปเท่านั้นเนื่องจากไม่มีการเติมสารอินทรีย์ให้แก่ถังปฏิกรณ์ตลอดระยะเวลา 3 ปี และผล DNA-SIP พบว่ากราฟของ AOA และ AOB มีการแยกพีคระหว่าง  $^{13}\text{C}$  และ  $^{12}\text{C}$  ที่สมบูรณ์ ดังนั้น AOA กลุ่ม *Nitrososphaera* sistercluster ที่พบในถังปฏิกรณ์ NAS จึงมีการทำงานแบบออโตโทรปแน่นอน

ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่ตรวจสอบและพบว่า AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียมีการทำงานแบบออโตโทรปขณะออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดยจากการทดลอง AOA สายพันธุ์ *Nitrososphaera* เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่มีการทำงานในรูปแบบดังกล่าว นอกจากนี้ปัจจัยความเข้มข้นแอมโมเนียยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตระหว่างกลุ่มลินทรีย์ AOA และ AOB ที่แตกต่างกันออกไป

## 6.1 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากกิจกรรมของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียยังไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัด หาก AOA สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ได้เช่นกัน รูปแบบการทำงานของ AOA จะกลายเป็นแบบมิคโซโทรป ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตจะต้องมีการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA ต่อไปเพื่อตรวจสอบการทำงานในรูปแบบดังกล่าว

ควรมีการศึกษาค่า Kinetic ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากในประเทศไทยการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียที่มีประสิทธิภาพการกำจัดไนโตรเจนด้วยนั้นใช้ค่า Kinetics ซึ่งคำนวณได้จากกลุ่มจุลินทรีย์ AOB เท่านั้น แต่เนื่องจากปัจจุบันระบบบำบัดหลายแห่งพบ AOA เป็นจำนวนมากและบางระบบพบเป็นกลุ่มเด่น อีกทั้งการศึกษาค่า Kinetic ของกลุ่ม AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียยังไม่เคยมีมาก่อน ทำให้ในอนาคตการออกแบบระบบบำบัดอาจต้องมีการปรับค่า Kinetic ในเหมาะสมต่อกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำงานจริงในระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุนการบำบัดได้

ผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับระบบบำบัดแบบ Bioaugmentation ได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะกรณีระบบบำบัดมีปัญหาไม่สามารถย่อยแอมโมเนียได้ เช่น สภาวะมีสารพิษปนเปื้อนในน้ำทำให้กิจกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำงานได้หยุดชะงักไป แต่หากทราบช่วงค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในระบบและทราบกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำงานได้ ณ ความเข้มข้นดังกล่าว จะทำให้

สามารถเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่จะเติมเข้าสู่ระบบได้ทันทีเพื่อยังคงประสิทธิภาพการบำบัดของระบบบำบัดน้ำเสียได้อย่างต่อเนื่อง

ดังนั้นหากมีการศึกษาช่วงของความเข้มข้นแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียที่สามารถแบ่งแยกการทำงานระหว่าง AOA และ AOB หรือแบ่งแยกในระดับสายพันธุ์ภายในกลุ่ม AOA และ AOB ด้วยกันได้ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียและอาจช่วยลดขนาดระบบบำบัดได้เป็นอย่างดี





## รายการอ้างอิง

- Bai, Y., Sun, Q., Wen, D. and Tang, X. (2012) Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems. *FEMS Microbiology Ecology* 80(2), 323-330.
- Bartossek, R., Spang, A., Weidler, G., Lanzen, A. and Schleper, C. (2012) Metagenomic analysis of ammonia-oxidizing archaea affiliated with the soil group. *Front Microbiol* 3(JUN).
- Bower, C.E. and Holm-Hansen, T. (1980) A salicylate-hypochlorite method for determining ammonia in seawater. *37*, 794-798.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. and Forterre, P. (2008) Mesophilic crenarchaeota: Proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 6(3), 245-252.
- Buckley, D.H., Huangyutitham, V., Hsu, S.F. and Nelson, T.A. (2007) Stable isotope probing with  $^{15}\text{N}$  achieved by disentangling the effects of genome G+C content and isotope enrichment on DNA density. *Appl Environ Microbiol* 73(10), 3189-3195.
- Jin, T., Zhang, T. and Yan, Q. (2010) Characterization and quantification of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in a nitrogen-removing reactor using T-RFLP and qPCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(3), 1167-1176.
- Jung, M.Y., Park, S.J., Min, D., Kim, J.S., Rijpstra, W.I.C., Damsté, J.S.S., Kim, G.J., Madsen, E.L. and Rhee, S.K. (2011) Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of mesophilic crenarchaeal group I.1a from an agricultural soil. *Appl Environ Microbiol* 77(24), 8635-8647.
- Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O.S., Junier, T., Witzel, K.P. and Imhoff, J.F. (2010) Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(3), 425-440.

- Kayee, P., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C. and Limpiyakorn, T. (2011) Archaeal amoA genes outnumber bacterial amoA genes in municipal wastewater treatment plants in Bangkok. *Microb Ecol* 62(4), 776-788.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B. and Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437(7058), 543-546.
- Koops, H.P., Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Timmermann, G. and Wagner, M. (2003) *Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria*, Springer-Verlag, Newyork.
- Kreuzer-Martin, H.W. (2007) Stable isotope probing: Linking functional activity to specific members of microbial communities. *Soil Science Society of America Journal* 71(2), 611-619.
- Limpiyakorn, T., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C. and Polprasert, C. (2011) Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresour Technol* 102(4), 3694-3701.
- Limpiyakorn, T., Fürhacker, M., Haberl, R., Chodanon, T., Srithep, P. and Sonthiphand, P. (2013) AmoA-encoding archaea in wastewater treatment plants: A review. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(4), 1425-1439.
- Lin, Y.-M., Tay, J.-H., Liu, Y. and Hung, Y.-T. (2009) *Biological Treatment Processes*. Wang, L., Pereira, N. and Hung, Y.-T. (eds), pp. 539-588, Humana Press.
- Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., de la Torre, J.R. and Stahl, D.A. (2009) Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* 461(7266), 976-979.
- Metcalfe and Eddy (2004) *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*, McGraw-Hill.
- Mußmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Sinnighe Damste, J.S., Hatzenpichler, R., Richter, A., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Muller, A., Daims, H., Wagner, M. and Head, I.M. (2011) Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(40), 16771-16776.

- Neufeld, J.D., Dumont, M.G., Vohra, J. and Murrell, J.C. (2007) Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microb Ecol* 53(3), 435-442.
- Niu, J., Kasuga, I., Kurisu, F., Furumai, H. and Shigeeda, T. (2013) Evaluation of autotrophic growth of ammonia-oxidizers associated with granular activated carbon used for drinking water purification by DNA-stable isotope probing. *Water Res* 47(19), 7053-7065.
- Okabe, S., Kindaichi, T. and Ito, T. (2005) Fate of <sup>14</sup>C-labeled microbial products derived from nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms. *Appl Environ Microbiol* 71(7), 3987-3994.
- Park, B.J., Park, S.J., Yoon, D.N., Schouten, S., Damsté, J.S.S. and Rhee, S.K. (2010) Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in coculture with sulfur-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 76(22), 7575-7587.
- Park, H.D., Wells, G.F., Bae, H., Criddle, C.S. and Francis, C.A. (2006) Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl Environ Microbiol* 72(8), 5643-5647.
- Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Gröngröft, A., Richter, A., Overmann, J., Reinhold-Hurek, B., Loy, A. and Wagner, M. (2012) AmoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environ Microbiol* 14(2), 525-539.
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M.C., Koops, H.P. and Wagner, M. (2000) Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amoA Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. *Appl Environ Microbiol* 66(12), 5368-5382.
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P. and Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63(12), 4704-4712.

- Sauder, L.A., Peterse, F., Schouten, S. and Neufeld, J.D. (2012) Low-ammonia niche of ammonia-oxidizing archaea in rotating biological contactors of a municipal wastewater treatment plant. *Environ Microbiol* 14(9), 2589-2600.
- Schleper, C. and Nicol, G.W. (2010) Ammonia-oxidising archaea--physiology, ecology and evolution. *Adv Microb Physiol* 57, 1-41.
- Smith, C.A. (1992) Physiology of the bacterial cell. A molecular approach. By F C Neidhardt, J L Ingraham and M Schaechter. pp 507. Sinauer associates, Sunderland, MA. 1990. \$43.95 ISBN 0-87893-608-4. *Biochemical Education* 20(2), 124-125.
- Sonthiphand, P. and Limpiyakorn, T. (2011) Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 89(3), 843-853.
- Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., Spieck, E., Streit, W., Stahl, D.A., Wagner, M. and Schleper, C. (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends in Microbiology* 18(8), 331-340.
- Tourna, M., Freitag, T.E. and Prosser, J.I. (2010) Stable isotope probing analysis of interactions between ammonia oxidizers. *Appl Environ Microbiol* 76(8), 2468-2477.
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P. and Schleper, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* 7(12), 1985-1995.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Neelson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H. and Smith, H.O. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304(5667), 66-74.
- Wells, G.F., Park, H.D., Yeung, C.H., Eggleston, B., Francis, C.A. and Criddle, C.S. (2009) Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge

- bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. *Environ Microbiol* 11(9), 2310-2328.
- Widdel, F. and Bak, F. (1992) *The Prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds), pp. 3352-3378, Springer New York.
- Ye, L. and Zhang, T. (2011) Ammonia-oxidizing bacteria dominates over ammonia-oxidizing archaea in a saline nitrification reactor under low DO and high nitrogen loading. *Biotechnol Bioeng* 108(11), 2544-2552.
- Yu, T., Li, D., Qi, R., Li, S.T., Xu, S.W. and Yang, M. (2011) Structure and dynamics of nitrifier populations in a full-scale submerged membrane bioreactor during start-up. *Appl Microbiol Biotechnol* 90(1), 369-376.
- Zhang, T., Jin, T., Yan, Q., Shao, M., Wells, G., Criddle, C. and HH, P.F. (2009) Occurrence of ammonia-oxidizing Archaea in activated sludges of a laboratory scale reactor and two wastewater treatment plants. *J Appl Microbiol* 107(3), 970-977.
- ธรรมวงศ์, พ. (2551) ข้อมูลเบื้องต้น Real-Time PCR.







## ภาคผนวก ก

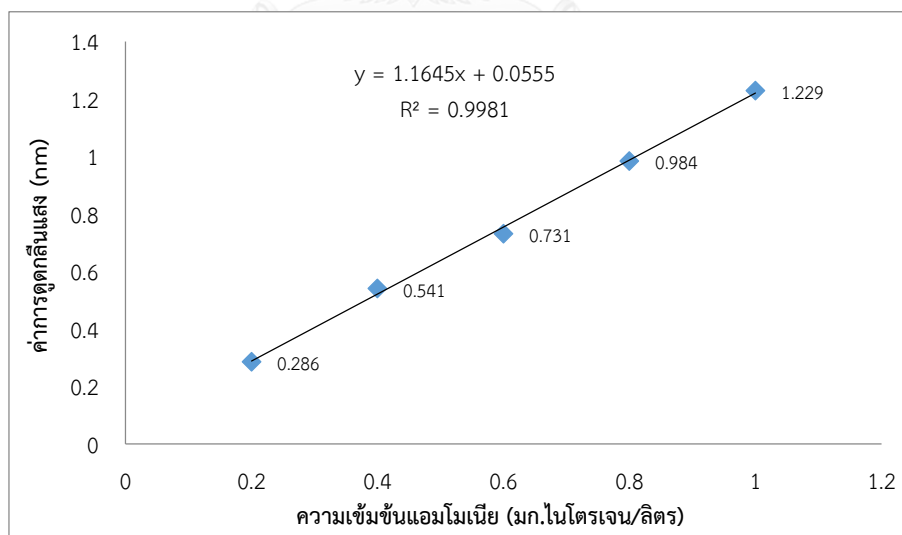
### วิธีมาตรฐานสำหรับการวัดแอมโมเนีย ไนโตรต์และไนเตรต

#### ก.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย (Bower และคณะ, 1980)

กรองน้ำตัวอย่างนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10, 50, 100 เท่า และนำสารละลายมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิดเป็นเกลียวเพื่อป้องกันการระเหยของแอมโมเนีย เติม Salicylate catalyst solution 1.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม Alkaline hypochlorite solution 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV spectrophotometer และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของแอมโมเนียในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความเข้มข้นแอมโมเนียที่แน่นอน

#### การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวัดแอมโมเนีย

เตรียมแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร จากนั้นเติม Salicylate catalyst solution 1.2 มิลลิลิตร และ Alkaline hypochlorite solution 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ในที่มืด และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV spectrophotometer จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ ก.1



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานแอมโมเนีย

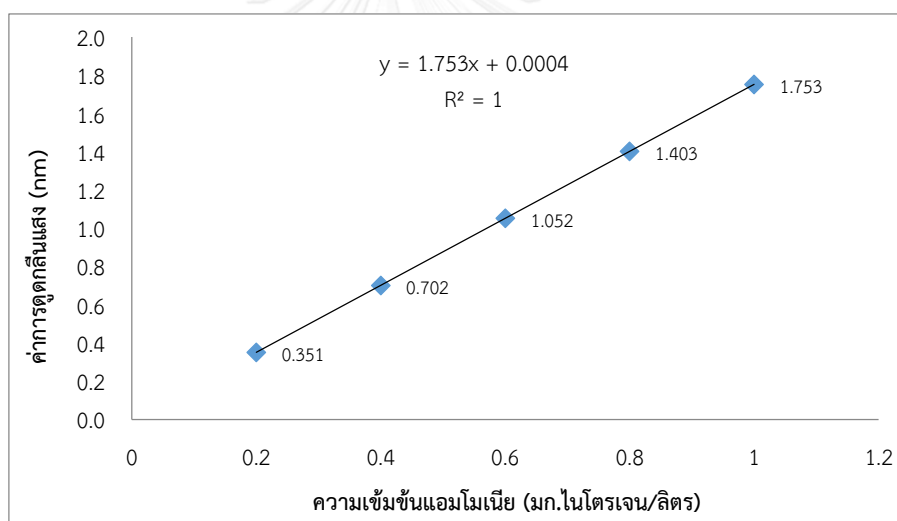


### ก.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรต์ (Standard Methods 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> B.)

ช่วงความเข้มข้นของไนไตรต์ที่วัดได้คือ 10 - 1000 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/L วิธีการวิเคราะห์ คือ กรองน้ำตัวอย่างนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10, 50, 100 เท่า และนำสารละลายมา 10 มิลลิลิตร เติม Color reagent 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของไนไตรต์ในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานจากกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความเข้มข้นไนไตรต์ที่แน่นอน

#### การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวัดไนไตรต์

เตรียมโซเดียมไนไตรต์ (NaNO<sub>2</sub>) ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เติม Color reagent 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูป ก.2



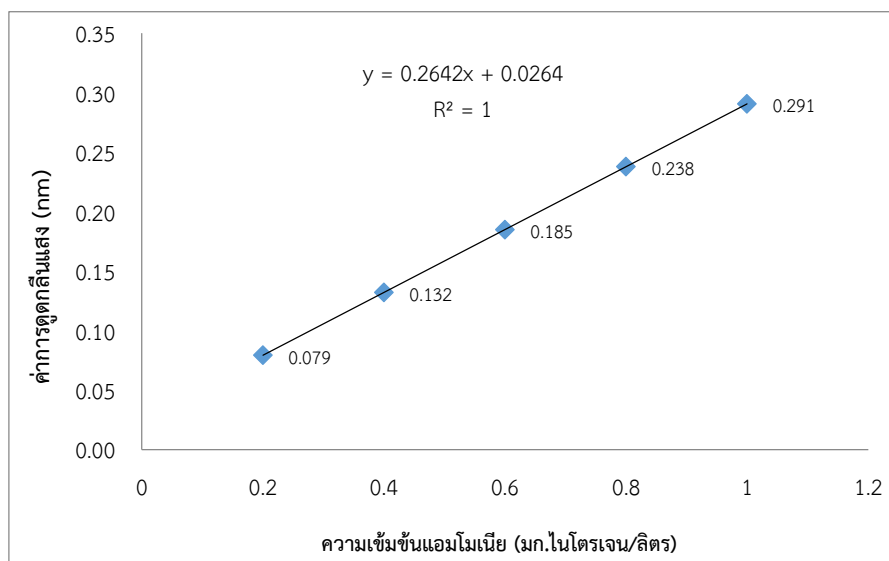
ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานไนไตรต์

### ก.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนเตรต (Standard Methods 4500-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> B.)

กรองน้ำตัวอย่างนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10, 50, 100 เท่า และนำสารละลายมา 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ 220 นาโนเมตรซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของไนเตรต และวัดซ้ำอีกครั้งที่ 275 นาโนเมตรซึ่งไนเตรตจะไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้เพื่อใช้เป็นค่าปรับแก้ค่าการดูดกลืนแสงของไนเตรตซึ่งไม่ควรเกิน 10 % ของค่าที่วัดได้จากความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของไนเตรตตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความเข้มข้นไนเตรตที่แน่นอน

### การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวัดไนเตรต

เตรียมโซเดียมไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เติมนสารละลายไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูป ก.3



ภาพที่ ก.3 กราฟมาตรฐานไนเตรต



## ภาคผนวก ข

ค่าแอมโมเนีย ไนโตรต์ ไนเตรต และค่าความเป็นกรดต่างระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์

ตารางที่ ข.1 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P2-<sup>13</sup>C รอบ 1  
ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P2- <sup>13</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 1) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนโตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 28/12/57  | 0.18                         | 0.13                       | 0.42                      | 8.2                |
| 29/12/57  | 0.64                         | 0.05                       | 0.11                      | 8.66               |
| 30/12/57  | 0.14                         | 0.02                       | 1.60                      | 7.73               |
| 1/1/58  | 0.79                         | 0.14                       | 2.71                      | 7.71               |
| 2/1/58  | 0.15                         | 0.00                       | 0.04                      | 7.69               |
| 4/1/58  | 0.28                         | 0.10                       | 4.78                      | 7.56               |
| 6/1/58  | 0.35                         | 0.20                       | 0.43                      | 7.7                |
| 8/1/58  | 0.23                         | 1.02                       | 0.44                      | 7.41               |
| 10/1/58   | 0.57                         | 0.00                       | 0.54                      | 7.61               |
| 13/1/58   | 0.07                         | 0.00                       | 0.13                      | 7.69               |
| 15/1/58   | 0.78                         | 3.71                       | 6.71                      | 7.23               |
| 17/1/58   | 0.75                         | 0.62                       | 5.62                      | 7.53               |
| 19/1/58   | 0.16                         | 0.43                       | 6.56                      | 7.42               |
| 22/1/58   | 0.16                         | 0.00                       | 0.66                      | 7.33               |
| 26/1/58   | 0.06                         | 0.00                       | 0.66                      | 7.35               |
| 28/1/58   | 0.20                         | 0.22                       | 0.94                      | 7.56               |
| 31/1/58   | 0.17                         | 0.15                       | 1.02                      | 7.56               |

ตารางที่ ข.2 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P2-<sup>12</sup>C รอบ 1  
ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P2- <sup>12</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 1) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 28/12/57  | 0.53                         | 0.05                       | 0.02                      | 8.09               |
| 29/12/57  | 0.68                         | 0.22                       | 0.11                      | 8.53               |
| 30/12/57  | 0.15                         | 0.00                       | 0.32                      | 7.53               |
| 1/1/58  | 0.69                         | 0.12                       | 2.41                      | 7.63               |
| 2/1/58  | 0.97                         | 0.00                       | 0.00                      | 7.63               |
| 4/1/58  | 0.37                         | 0.17                       | 4.40                      | 7.52               |
| 6/1/58  | 0.31                         | 0.13                       | 0.43                      | 7.91               |
| 8/1/58  | 0.12                         | 0.20                       | 0.49                      | 7.83               |
| 10/1/58   | 0.80                         | 0.33                       | 0.51                      | 7.49               |
| 13/1/58   | 0.57                         | 0.00                       | 0.24                      | 7.46               |
| 15/1/58   | 0.38                         | 0.54                       | 6.15                      | 7.24               |
| 17/1/58   | 0.20                         | 4.16                       | 4.71                      | 7.66               |
| 19/1/58   | 0.15                         | 4.77                       | 7.62                      | 7.56               |
| 22/1/58   | 0.06                         | 0.13                       | 0.66                      | 7.37               |
| 26/1/58   | 0.14                         | 0.51                       | 0.67                      | 7.12               |
| 28/1/58   | 0.25                         | 0.34                       | 1.58                      | 7.65               |
| 31/1/58   | 0.18                         | 0.20                       | 1.44                      | 7.68               |

ตารางที่ ข.3 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P2-<sup>13</sup>C รอบ 2  
ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P2- <sup>13</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 2) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 26/2/58   | 0.82                         | 0.00                       | -0.01                     | 7.47               |
| 27/2/58   | 1.46                         | 0.02                       | 0.96                      | 8.12               |
| 28/2/58   | 1.10                         | 0.03                       | 1.99                      | 8.05               |
| 1/3/58  | 0.78                         | 0.03                       | 2.33                      | 7.95               |
| 2/3/58  | 0.45                         | 0.05                       | 3.26                      | 7.74               |
| 3/3/58  | 0.36                         | 0.06                       | 3.93                      | 7.80               |
| 4/3/58  | 0.10                         | 0.02                       | 4.10                      | 8.02               |
| 6/3/58  | 0.54                         | 0.06                       | 0.71                      | 7.99               |
| 7/3/58  | 0.43                         | 0.07                       | 4.60                      | 7.56               |
| 8/3/58  | 0.41                         | 0.10                       | 4.81                      | 7.61               |
| 10/3/58   | 0.35                         | 0.12                       | 5.18                      | 7.63               |
| 11/3/58   | 0.27                         | 0.10                       | 5.59                      | 7.75               |
| 13/3/58   | 0.58                         | 0.29                       | 5.34                      | 7.66               |
| 14/3/58   | 0.40                         | 0.52                       | 5.66                      | 7.54               |
| 16/3/58   | 0.28                         | 1.36                       | 6.77                      | 7.60               |
| 19/3/58   | 0.17                         | 0.52                       | 6.01                      | 7.65               |
| 21/3/58   | 0.17                         | 0.17                       | 5.90                      | 7.72               |
| 23/3/58   | 0.27                         | 0.27                       | 6.05                      | 7.68               |

ตารางที่ ข.4 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P2-<sup>12</sup>C รอบ 2  
ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P2- <sup>12</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 2) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 26/2/58   | 0.83                         | 0.00                       | 0.06                      | 7.51               |
| 27/2/58   | 1.37                         | 0.01                       | 0.91                      | 8.16               |
| 28/2/58   | 1.15                         | 0.02                       | 1.70                      | 7.83               |
| 1/3/58  | 0.88                         | 0.05                       | 2.72                      | 7.90               |
| 2/3/58  | 0.43                         | 0.04                       | 2.86                      | 7.95               |
| 3/3/58  | 0.43                         | 0.04                       | 2.75                      | 7.84               |
| 4/3/58  | 0.11                         | 0.03                       | 3.70                      | 7.90               |
| 6/3/58  | 0.38                         | 0.05                       | 4.91                      | 8.00               |
| 7/3/58  | 0.28                         | 0.04                       | 4.89                      | 7.87               |
| 8/3/58  | 0.37                         | 0.08                       | 4.70                      | 7.67               |
| 10/3/58   | 0.24                         | 0.09                       | 5.12                      | 7.68               |
| 11/3/58   | 0.21                         | 0.07                       | 5.24                      | 7.74               |
| 13/3/58   | 0.49                         | 0.22                       | 5.39                      | 7.61               |
| 14/3/58   | 0.06                         | 0.26                       | 5.59                      | 7.67               |
| 16/3/58   | 0.13                         | 0.10                       | 6.46                      | 7.71               |
| 19/3/58   | 0.08                         | 0.09                       | 6.41                      | 7.73               |
| 21/3/58   | 0.17                         | 0.10                       | 5.87                      | 7.64               |
| 23/3/58   | 0.31                         | 0.25                       | 6.00                      | 7.59               |

ตารางที่ ข.5 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P2-<sup>13</sup>C แบบไม่เติมแอมโมเนีย

| P2- <sup>13</sup> C (ไม่เติมแอมโมเนีย) |                               |                             |                            |                    |
|--|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                       | แอมโมเนีย (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 21/12/57                               | 0.10                          | 0.00                        | 0.06                       | 6.63               |
| 23/12/57                               | 0.11                          | 0.00                        | 0.06                       | 6.43               |
| 26/12/57                               | 0.82                          | 0.00                        | 0.01                       | 7.68               |
| 28/12/57                               | 0.07                          | 0.01                        | 0.12                       | 7.60               |
| 30/12/57                               | 0.08                          | 0.00                        | 0.14                       | 7.61               |
| 1/1/58                                 | 0.05                          | 0.00                        | 0.07                       | 7.49               |
| 4/1/58                                 | 0.06                          | 0.00                        | 0.09                       | 7.71               |
| 6/1/58                                 | 0.08                          | 0.00                        | 0.07                       | 7.77               |
| 8/1/58                                 | 0.07                          | 0.02                        | -0.03                      | 7.73               |
| 13/1/58                                | 0.07                          | 0.20                        | 5.56                       | 7.39               |
| 15/1/58                                | 0.05                          | 0.00                        | 0.08                       | 7.40               |
| 17/1/58                                | 0.06                          | 0.00                        | 0.02                       | 7.53               |
| 19/1/58                                | 0.06                          | 0.00                        | 0.04                       | 7.70               |
| 21/1/58                                | 0.06                          | 0.00                        | 0.03                       | 7.93               |
| 26/1/58                                | 0.05                          | 0.00                        | 0.05                       | 7.76               |
| 28/1/58                                | 0.04                          | 0.00                        | 0.05                       | 7.72               |
| 31/1/58                                | 0.06                          | 0.00                        | 0.07                       | 7.57               |
| 4/2/58                                 | 0.07                          | 0.00                        | 0.06                       | 7.70               |
| 7/2/58                                 | 0.25                          | 0.00                        | 0.13                       | 7.86               |



ตารางที่ ข.6 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P2-<sup>12</sup>C แบบไม่เติมแอมโมเนีย

| P2- <sup>12</sup> C (ไม่เติมแอมโมเนีย) |                               |                             |                            |                    |
|--|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                       | แอมโมเนีย (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 21/12/57                               | 0.09                          | 0.00                        | 0.07                       | 6.55               |
| 23/12/57                               | 0.07                          | 0.00                        | 0.05                       | 6.25               |
| 26/12/57                               | 0.79                          | 0.00                        | 0.03                       | 7.71               |
| 28/12/57                               | 0.06                          | 0.00                        | 0.09                       | 7.50               |
| 30/12/57                               | 0.08                          | 0.02                        | 2.31                       | 7.75               |
| 1/1/58                                 | 0.04                          | 0.00                        | 0.07                       | 7.49               |
| 4/1/58                                 | 0.07                          | 0.00                        | 0.11                       | 7.86               |
| 6/1/58                                 | 0.05                          | 0.01                        | 0.08                       | 7.89               |
| 8/1/58                                 | 0.05                          | 0.02                        | 0.12                       | 8.04               |
| 13/1/58                                | 0.06                          | 0.00                        | 0.15                       | 7.60               |
| 15/1/58                                | 0.06                          | 0.00                        | 0.10                       | 7.51               |
| 17/1/58                                | 0.05                          | 0.00                        | 0.24                       | 7.76               |
| 19/1/58                                | 0.05                          | 0.00                        | 0.07                       | 7.78               |
| 21/1/58                                | 0.06                          | 0.00                        | 0.03                       | 7.97               |
| 26/1/58                                | 0.06                          | 0.00                        | 0.01                       | 7.82               |
| 28/1/58                                | 0.03                          | 0.00                        | 0.06                       | 7.89               |
| 31/1/58                                | 0.05                          | 0.00                        | 0.02                       | 7.85               |
| 4/2/58                                 | 0.04                          | 0.00                        | 0.00                       | 7.88               |
| 7/2/58                                 | 0.06                          | 0.00                        | 0.06                       | 7.93               |

ตารางที่ ข.7 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P3-<sup>13</sup>C รอบ 1  
ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P3- <sup>13</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 1) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 14/9/57   | 0.7996                       | 0.0003                     | 0.0477                    | 7.92               |
| 16/9/57   | 0.4433                       | 0.0785                     | 2.8902                    | 8.39               |
| 19/9/57   | 0.2488                       | 0.0351                     | 4.5178                    | 7.96               |
| 21/9/57   | 0.5178                       | 0.0962                     | 5.6154                    | 7.00               |
| 26/9/57   | 0.1731                       | 0.0009                     | 6.5238                    | 7.63               |
| 28/9/57   | 0.2558                       | 0.0813                     | 6.8266                    | 7.47               |
| 30/9/57   | 0.1195                       | 0.0123                     | 6.7888                    | 7.48               |
| 2/10/57   | 0.1021                       | 0.0311                     | 6.9780                    | 7.50               |
| 4/10/57   | 0.0532                       | 0.0779                     | 7.2430                    | 7.45               |
| 6/10/57   | 0.0695                       | 0.3398                     | 7.5458                    | 7.30               |
| 8/10/57   | 0.0671                       | 0.1036                     | 7.8107                    | 7.27               |
| 10/10/57  | 0.1393                       | 0.0448                     | 7.8864                    | 7.49               |

ตารางที่ ข.8 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P3-<sup>12</sup>C รอบ 1  
ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P3- <sup>12</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 1) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 14/9/57   | 0.7810                       | -0.0002                    | 0.0363                    | 7.92               |
| 16/9/57   | 0.4421                       | 0.0534                     | 2.2468                    | 8.39               |
| 19/9/57   | 0.2383                       | 0.0340                     | 4.5178                    | 7.96               |
| 21/9/57   | 0.5295                       | 0.0819                     | 5.4640                    | 7.00               |
| 26/9/57   | 0.0753                       | 0.0021                     | 6.8645                    | 7.63               |
| 28/9/57   | 0.3059                       | 0.0562                     | 6.9023                    | 7.47               |
| 30/9/57   | 0.1032                       | 0.0232                     | 7.2808                    | 7.48               |
| 2/10/57   | 0.1359                       | 0.0209                     | 7.0537                    | 7.50               |
| 4/10/57   | 0.1172                       | 0.0226                     | 7.5458                    | 7.45               |
| 6/10/57   | 0.1359                       | 0.0642                     | 7.3187                    | 7.30               |
| 8/10/57   | 0.1137                       | 0.0483                     | 7.7350                    | 7.27               |
| 10/10/57  | 0.0730                       | 0.0123                     | 7.5836                    | 7.49               |

ตารางที่ ข.9 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P3-<sup>13</sup>C รอบ 2  
ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P3- <sup>13</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 2) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 26/2/58   | 0.7589                       | 0.0021                     | 0.0288                    | 7.28               |
| 26/2/58   | 0.6273                       | 0.0306                     | 0.0363                    | 8.01               |
| 27/2/58   | 0.8648                       | 0.1606                     | 0.8880                    | 8.13               |
| 28/2/58   | 0.7041                       | 0.1886                     | 1.8229                    | 8.21               |
| 1/3/58  | 0.6645                       | 0.1270                     | 2.6064                    | 7.98               |
| 2/3/58  | 0.4014                       | 0.0751                     | 3.1552                    | 7.82               |
| 3/3/58  | 0.3012                       | 0.0511                     | 5.2086                    | 7.70               |
| 4/3/58  | 0.3024                       | 0.0317                     | 6.4860                    | 8.00               |
| 6/3/58  | 0.3757                       | 0.1150                     | 7.4001                    | 7.99               |
| 7/3/58  | 0.2605                       | 0.1013                     | 7.4640                    | 7.80               |
| 8/3/58  | 0.3839                       | 0.1646                     | 7.9054                    | 7.74               |
| 10/3/58   | 0.2418                       | 0.0659                     | 7.1677                    | 7.84               |
| 11/3/58   | 0.2593                       | 0.0283                     | 7.6972                    | 7.72               |
| 13/3/58   | 0.3653                       | 0.0808                     | 7.4088                    | 7.96               |
| 14/3/00   | 0.2069                       | 0.0540                     | 7.5269                    | 7.92               |
| 19/3/58   | 0.1137                       | 0.0905                     | 7.3081                    | 7.84               |
| 21/3/58   | 0.0671                       | 0.0716                     | 7.3490                    | 7.86               |
| 23/3/58   | 0.0834                       | 0.0928                     | 7.3853                    | 7.47               |

ตารางที่ ข.10 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P3-<sup>12</sup>C รอบ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P3- <sup>12</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 2) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 26/2/58   | 0.4910                       | 0.0038                     | 0.0704                    | 7.26               |
| 26/2/58   | 0.6680                       | 0.0260                     | 0.0855                    | 7.94               |
| 27/2/58   | 0.8986                       | 0.1452                     | 0.7933                    | 8.03               |
| 28/2/58   | 0.7006                       | 0.1606                     | 1.8645                    | 8.14               |
| 1/3/58  | 0.7728                       | 0.1281                     | 2.4966                    | 8.17               |
| 2/3/58  | 0.4002                       | 0.0967                     | 3.1211                    | 7.80               |
| 3/3/58  | 0.3420                       | 0.0614                     | 5.5946                    | 7.94               |
| 4/3/58  | 0.3851                       | 0.0637                     | 6.2021                    | 8.03               |
| 6/3/58  | 0.5108                       | 0.1087                     | 7.0765                    | 8.20               |
| 7/3/58  | 0.3769                       | 0.1025                     | 8.1968                    | 8.04               |
| 8/3/58  | 0.3955                       | 0.1270                     | 8.0700                    | 7.61               |
| 10/3/58   | 0.2709                       | 0.0802                     | 7.5416                    | 7.54               |
| 11/3/58   | 0.3315                       | 0.0825                     | 7.9054                    | 7.68               |
| 13/3/58   | 0.4177                       | 0.0956                     | 7.5220                    | 7.84               |
| 14/3/00   | 0.2721                       | 0.0620                     | 7.6794                    | 7.63               |
| 19/3/58   | 0.2348                       | 0.1213                     | 7.5670                    | 7.51               |
| 21/3/58   | 0.2302                       | 0.0648                     | 7.2808                    | 7.79               |
| 23/3/58   | 0.2942                       | 0.0545                     | 7.3490                    | 7.74               |

ตารางที่ ข.11 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P3-<sup>13</sup>C แบบไม่เติมแอมโมเนีย

| P3- <sup>13</sup> C (ไม่เติมแอมโมเนีย) |                               |                             |                            |                  |
|--|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                       | แอมโมเนีย (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเบี่ยงเบน |
| 26/2/58                                | 0.1056                        | 0.0015                      | 0.1272                     | 7.34             |
| 27/2/58                                | 0.0590                        | 0.0003                      | 0.0515                     | 7.14             |
| 28/2/58                                | 0.0637                        | -0.0002                     | 0.0704                     | 7.32             |
| 1/3/58                                 | 0.0625                        | -0.0002                     | 0.0931                     | 7.31             |
| 2/3/58                                 | 0.0986                        | 0.0003                      | 0.1385                     | 7.64             |
| 3/3/58                                 | 0.0928                        | 0.0026                      | 0.1877                     | 7.74             |
| 4/3/58                                 | 0.0765                        | 0.0015                      | 0.1953                     | 7.30             |
| 6/3/58                                 | 0.0543                        | 0.0015                      | 0.8388                     | 7.82             |
| 7/3/58                                 | 0.0730                        | 0.0009                      | 0.4375                     | 7.74             |
| 8/3/58                                 | 0.1021                        | 0.0021                      | 0.5889                     | 7.63             |
| 10/3/58                                | 0.0695                        | -0.0002                     | 0.7403                     | 7.70             |
| 11/3/58                                | 0.0625                        | -0.0002                     | 0.8653                     | 7.78             |
| 13/3/58                                | 0.0660                        | 0.0009                      | 0.6760                     | 7.65             |
| 14/3/58                                | 0.0555                        | 0.0003                      | 0.5587                     | 7.54             |
| 16/3/58                                | 0.0869                        | 0.0003                      | 0.5057                     | 7.57             |
| 19/3/58                                | 0.0520                        | -0.0008                     | 0.2483                     | 7.59             |
| 21/3/58                                | 0.0590                        | -0.0014                     | 0.2256                     | 7.61             |
| 23/3/58                                | 0.0473                        | -0.0008                     | 0.1158                     | 7.64             |

ตารางที่ ข.12 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P3-<sup>12</sup>C แบบไม่เติมแอมโมเนีย

| P3- <sup>12</sup> C (ไม่เติมแอมโมเนีย) |                               |                             |                            |                |
|--|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------|
| วันที่ทำการทดลอง                       | แอมโมเนีย (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความแตกต่าง |
| 26/2/58                                | 0.0602                        | 0.0015                      | 0.0931                     | 7.34           |
| 27/2/58                                | 0.0637                        | 0.0003                      | 0.0401                     | 7.19           |
| 28/2/58                                | 0.0834                        | -0.0002                     | 0.0742                     | 7.24           |
| 1/3/58                                 | 0.0567                        | -0.0002                     | 0.1310                     | 7.29           |
| 2/3/58                                 | 0.0834                        | 0.0009                      | 0.1688                     | 7.71           |
| 3/3/58                                 | 0.0846                        | 0.0009                      | 0.1764                     | 7.77           |
| 4/3/58                                 | 0.0881                        | 0.0009                      | 0.2672                     | 7.69           |
| 6/3/58                                 | 0.0532                        | 0.0015                      | 4.4421                     | 7.61           |
| 7/3/58                                 | 0.0590                        | 0.0009                      | 0.5132                     | 7.78           |
| 8/3/58                                 | 0.0695                        | 0.0009                      | 0.5057                     | 7.64           |
| 10/3/58                                | 0.0485                        | -0.0008                     | 0.5322                     | 7.50           |
| 11/3/58                                | 0.0578                        | -0.0002                     | 0.7441                     | 7.75           |
| 13/3/58                                | 0.0776                        | 0.0009                      | 0.4981                     | 7.49           |
| 14/3/58                                | 0.0567                        | 0.0003                      | 0.4792                     | 7.86           |
| 16/3/58                                | 0.0637                        | 0.0003                      | 0.3846                     | 7.89           |
| 19/3/58                                | 0.0543                        | -0.0008                     | 0.2824                     | 8.04           |
| 21/3/58                                | 0.0578                        | -0.0014                     | 0.1915                     | 7.60           |
| 23/3/58                                | 0.0578                        | -0.0014                     | 0.1158                     | 7.51           |

ตารางที่ ข.13 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>13</sup>C รอบ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P6- <sup>13</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 1) |                              |                            |                           |                |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความแตกต่าง |
| 14/7/57   | 2.8037                       | 0.0540                     | 11.9364                   | 7.55           |
| 15/7/57   | 3.2695                       | 0.1315                     | 6.3346                    | 7.57           |
| 17/7/57   | 1.1688                       | 0.1395                     | 7.5458                    | 7.59           |
| 19/7/57   | 0.3827                       | 0.1412                     | 7.8486                    | 7.46           |
| 24/7/57   | 0.1743                       | 0.0813                     | 8.1893                    | 7.36           |
| 25/7/57   | 0.2011                       | 0.0796                     | 8.1514                    | 7.35           |
| 30/7/57   | 0.1114                       | 0.1110                     | 8.4921                    | 7.52           |
| 1/8/57  | 0.1114                       | 0.0819                     | 8.5299                    | 7.36           |
| 4/8/57  | 0.3920                       | 0.0950                     | 7.7729                    | 7.56           |
| 8/8/57  | 0.2686                       | 0.0922                     | 7.6026                    | 7.31           |
| 11/8/57   | 1.0500                       | 0.2262                     | 7.3187                    | 7.61           |





ตารางที่ ข.14 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>12</sup>C รอบ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P6- <sup>12</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 1) |                              |                            |                           |                |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความแตกต่าง |
| 14/7/57   | 2.1050                       | 0.5018                     | 8.5299                    | 7.53           |
| 15/7/57   | 0.2174                       | 0.0682                     | 8.0757                    | 7.58           |
| 17/7/57   | 0.2768                       | 0.2006                     | 9.0598                    | 7.59           |
| 19/7/57   | 0.0555                       | -0.0002                    | 8.0999                    | 7.55           |
| 24/7/57   | 0.1184                       | 0.0448                     | 8.0757                    | 7.45           |
| 25/7/57   | 0.1463                       | 0.1053                     | 8.0379                    | 7.42           |
| 30/7/57   | 0.0718                       | 0.0523                     | 8.4164                    | 7.55           |
| 1/8/57  | 0.1067                       | 0.0437                     | 8.2271                    | 7.35           |
| 4/8/57  | 0.1917                       | 0.0351                     | 7.5269                    | 7.56           |
| 8/8/57  | 0.1813                       | 0.0408                     | 7.3755                    | 7.56           |
| 11/8/57   | 0.1021                       | 0.0175                     | 7.6593                    | 7.72           |



ตารางที่ ข.15 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>13</sup>C รอบ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P6- <sup>13</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 2) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 12/8/57   | 1.0046                       | 0.0745                     | -0.0091                   | 7.78               |
| 14/8/57   | 0.3979                       | 0.1019                     | 3.0416                    | 7.64               |
| 15/8/57   | 0.2197                       | 0.0739                     | 4.8206                    | 7.43               |
| 17/8/57   | 0.0427                       | 0.0015                     | 5.8425                    | 7.51               |
| 19/8/57   | 0.0695                       | 0.0009                     | 6.5617                    | 7.42               |
| 22/8/57   | 0.1661                       | 0.0015                     | 7.1673                    | 7.36               |
| 25/8/57   | 0.0602                       | 0.0568                     | 7.7729                    | 7.28               |
| 28/8/57   | 0.1440                       | 0.1122                     | 7.5079                    | 7.42               |
| 1/9/57  | 0.3187                       | 0.1327                     | 7.6593                    | 7.34               |
| 5/9/57  | 0.0916                       | 0.3654                     | 8.0000                    | 7.26               |
| 8/9/57  | 0.1673                       | 0.1686                     | 8.8706                    | 7.45               |
| 11/9/57   | 0.0683                       | 0.2445                     | 8.8327                    | 7.50               |
| 13/9/57   | 0.0706                       | 0.0431                     | 8.6435                    | 7.56               |
| 16/9/57   | 0.0648                       | 0.0003                     | 10.4603                   | 8.03               |
| 19/9/57   | 0.0625                       | 0.0003                     | 11.1794                   | 7.97               |
| 26/9/57   | 0.0765                       | 0.0009                     | 8.4164                    | 7.53               |
| 28/9/57   | 0.0590                       | 0.0637                     | 8.3028                    | 7.52               |
| 30/9/57   | 0.0846                       | 0.0003                     | 8.2271                    | 7.45               |
| 2/10/57   | 0.0730                       | 0.0021                     | 8.0757                    | 7.55               |
| 4/10/57   | 0.0660                       | 0.0003                     | 8.2650                    | 7.60               |
| 6/10/57   | 0.0555                       | 0.0135                     | 8.1514                    | 7.50               |
| 8/10/57   | 0.0881                       | 0.0129                     | 8.4921                    | 7.57               |

ตารางที่ ข.16 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>12</sup>C รอบ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P6- <sup>12</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 2) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 12/8/57   | 0.5295                       | 0.2274                     | 1.1870                    | 7.78               |
| 14/8/57   | 0.1789                       | 0.2342                     | 3.4201                    | 7.64               |
| 15/8/57   | 0.1871                       | 0.1538                     | 4.8963                    | 7.43               |
| 17/8/57   | 0.0671                       | 0.0055                     | 5.8804                    | 7.51               |
| 19/8/57   | 0.0508                       | 0.0038                     | 6.4103                    | 7.42               |
| 22/8/57   | 0.0555                       | 0.0842                     | 7.3944                    | 7.36               |
| 25/8/57   | 0.2115                       | 0.0346                     | 7.4701                    | 7.28               |
| 28/8/57   | 0.0660                       | 0.0066                     | 7.7729                    | 7.42               |
| 1/9/57  | 0.0800                       | 0.0574                     | 7.8864                    | 7.34               |
| 5/9/57  | 0.0578                       | 0.0038                     | 8.1136                    | 7.26               |
| 8/9/57  | 0.0753                       | -0.0002                    | 8.6056                    | 7.45               |
| 11/9/57   | 0.0671                       | 0.0032                     | 8.3785                    | 7.50               |
| 13/9/57   | 0.0718                       | 0.0836                     | 8.4921                    | 7.56               |
| 16/9/57   | 0.0590                       | 0.0003                     | 8.4921                    | 8.03               |
| 19/9/57   | 0.0613                       | -0.0002                    | 8.6056                    | 7.97               |
| 26/9/57   | 0.0660                       | 0.0140                     | 8.2650                    | 7.53               |
| 28/9/57   | 0.0590                       | 0.0448                     | 8.3407                    | 7.52               |
| 30/9/57   | 0.0695                       | 0.0003                     | 10.1196                   | 7.45               |
| 2/10/57   | 0.0695                       | 0.0026                     | 8.0379                    | 7.55               |
| 4/10/57   | 0.0543                       | 0.0009                     | 8.5299                    | 7.60               |
| 6/10/57   | 0.0706                       | 0.0642                     | 8.0757                    | 7.50               |
| 8/10/57   | 0.0625                       | 0.0214                     | 8.2650                    | 7.57               |

ตารางที่ ข.17 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>13</sup>C  
รอบ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P6- <sup>13</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 3) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 21/12/57  | 0.7845                       | 0.0032                     | 0.0363                    | 7.34               |
| 22/12/57  | 0.7111                       | 0.0488                     | 1.0696                    | 7.50               |
| 23/12/57  | 0.4677                       | 0.0648                     | 2.0840                    | 7.58               |
| 24/12/57  | 0.2931                       | 0.1452                     | 3.1098                    | 8.03               |
| 25/12/57  | 0.1731                       | 0.0277                     | 4.0636                    | 7.89               |
| 26/12/57  | 0.2115                       | 0.0483                     | 5.3883                    | 7.65               |
| 28/12/57  | 0.1056                       | 0.0140                     | 5.8047                    | 7.62               |
| 30/12/57  | 0.2698                       | 0.0374                     | 5.6154                    | 7.52               |
| 1/1/58  | 0.1848                       | 0.0403                     | 6.2589                    | 7.35               |
| 4/1/58  | 0.0963                       | 0.0032                     | 6.5617                    | 7.52               |
| 6/1/58  | 0.5190                       | 0.0808                     | 6.6752                    | 7.54               |
| 8/1/58  | 0.2907                       | 0.0842                     | 7.2430                    | 7.37               |
| 10/1/58   | 0.2337                       | 0.0095                     | 7.6593                    | 7.41               |
| 13/1/58   | 0.4281                       | 0.1224                     | 7.3565                    | 7.22               |
| 15/1/58   | 0.8113                       | 0.6113                     | 6.7509                    | 7.35               |
| 17/1/58   | 0.3455                       | 0.5001                     | 8.0000                    | 7.49               |
| 19/1/58   | 0.1987                       | 0.0893                     | 7.5836                    | 7.44               |
| 22/1/58   | 0.1370                       | 0.0551                     | 7.5458                    | 7.58               |

ตารางที่ ข.18 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>12</sup>C รอบ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P6- <sup>12</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 3) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 21/12/57  | 0.7810                       | 0.0043                     | 0.7876                    | 7.32               |
| 22/12/57  | 0.7787                       | 0.0483                     | 1.8322                    | 7.74               |
| 23/12/57  | 0.5295                       | 0.0716                     | 2.6548                    | 7.69               |
| 24/12/57  | 0.1952                       | 0.1007                     | 3.4474                    | 8.01               |
| 25/12/57  | 0.1487                       | 0.0340                     | 4.1327                    | 8.09               |
| 26/12/57  | 0.1522                       | 0.0300                     | 5.4191                    | 7.81               |
| 28/12/57  | 0.1102                       | 0.0129                     | 5.6250                    | 7.80               |
| 30/12/57  | 0.3105                       | 0.0369                     | 5.6600                    | 7.54               |
| 1/1/58  | 0.2465                       | 0.0620                     | 6.9080                    | 7.35               |
| 4/1/58  | 0.1114                       | 0.0038                     | 6.8283                    | 7.49               |
| 6/1/58  | 0.4002                       | 0.0734                     | 7.4137                    | 7.58               |
| 8/1/58  | 0.2453                       | 0.1253                     | 7.1594                    | 7.51               |
| 10/1/58   | 0.3350                       | 0.0979                     | 7.7894                    | 7.56               |
| 13/1/58   | 0.1964                       | 0.1914                     | 7.5930                    | 7.31               |
| 15/1/58   | 0.3839                       | 0.6358                     | 9.2847                    | 7.28               |
| 17/1/58   | 0.2791                       | 0.2029                     | 7.9899                    | 7.52               |
| 19/1/58   | 0.1859                       | 0.1424                     | 8.2905                    | 7.53               |
| 22/1/58   | 0.1743                       | 0.1310                     | 0.9585                    | 7.70               |

ตารางที่ ข.19 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>13</sup>C รอบ 3 (มีการปล่อยตะกอนจุลินทรีย์ออกไปกับน้ำทิ้ง) ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P6- <sup>13</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 3 มีการปล่อยตะกอนออกไปกับน้ำทิ้ง) |                              |                            |                           |                    |
|--|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง   | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 18/12/57   | 0.7204                       | 0.0055                     | 1.7169                    | 7.97               |
| 19/12/57   | 0.8019                       | 0.0272                     | 1.7017                    | 7.95               |
| 20/12/57   | 0.5597                       | 0.0294                     | 1.7396                    | 7.94               |
| 21/12/57   | 0.2756                       | 0.0671                     | 2.1067                    | 7.79               |
| 22/12/57   | 0.0951                       | 0.0106                     | 2.8448                    | 7.69               |
| 23/12/57   | 0.2861                       | 0.0272                     | 3.0871                    | 7.70               |
| 24/12/57   | 0.0637                       | 0.1099                     | 3.6132                    | 8.04               |
| 25/12/57   | 0.1161                       | 0.0397                     | 3.6472                    | 8.45               |
| 26/12/57   | 0.1475                       | 0.0380                     | 4.8963                    | 8.12               |
| 28/12/57   | 0.0695                       | -0.0002                    | 4.9720                    | 8.14               |
| 30/12/57   | 0.1382                       | 0.0682                     | 5.5019                    | 7.76               |
| 4/1/58   | 0.1207                       | 0.0323                     | 6.2589                    | 7.34               |
| 6/1/58   | 0.0869                       | 0.0021                     | 6.9780                    | 7.51               |
| 8/1/58   | 0.0671                       | 0.0009                     | 7.0916                    | 7.72               |
| 10/1/58  | 0.0986                       | 0.0192                     | 7.0916                    | 7.87               |
| 13/1/58  | 0.0741                       | 0.0123                     | 7.5836                    | 7.35               |
| 15/1/58  | 0.0765                       | 0.0534                     | 7.2808                    | 7.21               |
| 17/1/58  | 0.1137                       | 0.1338                     | 7.8864                    | 7.68               |
| 19/1/58  | 0.0590                       | 0.0043                     | 7.7729                    | 7.68               |
| 21/1/58  | 0.0683                       | 0.0032                     | 7.7350                    | 7.17               |
| 22/1/58  | 0.0485                       | 0.1481                     | 7.6593                    | 7.72               |
| 26/1/58  | 0.0637                       | 0.0254                     | 7.7729                    | 7.67               |
| 28/1/58  | 0.1079                       | 0.0460                     | 7.6593                    | 7.74               |
| 31/1/58  | 0.1533                       | 0.0893                     | 7.2808                    | 7.76               |

ตารางที่ ข.20 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>12</sup>C รอบ 3 (มีการปล่อยตะกอนออกไปกับน้ำทิ้ง) ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P6- <sup>12</sup> C (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 3 มีการปล่อยตะกอนออกไปกับน้ำทิ้ง) |                              |                            |                           |                    |
|--|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง   | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 18/12/57   | 0.6867                       | 0.0060                     | 1.8304                    | 8.01               |
| 19/12/57   | 0.6273                       | 0.0294                     | 1.8683                    | 7.99               |
| 20/12/57   | 0.6121                       | 0.0226                     | 3.0795                    | 8.02               |
| 21/12/57   | 0.1219                       | 0.0043                     | 2.9167                    | 7.71               |
| 22/12/57   | 0.0800                       | 0.0083                     | 3.1211                    | 7.69               |
| 23/12/57   | 0.2069                       | 0.0443                     | 3.4845                    | 7.72               |
| 24/12/57   | 0.1149                       | 0.0956                     | 3.8857                    | 8.21               |
| 25/12/57   | 0.0718                       | 0.0032                     | 4.1771                    | 8.27               |
| 26/12/57   | 0.0695                       | 0.0015                     | 4.9720                    | 8.15               |
| 28/12/57   | 0.0706                       | 0.0015                     | 4.2377                    | 8.35               |
| 30/12/57   | 0.0706                       | 0.0032                     | 6.2210                    | 7.73               |
| 4/1/58   | 0.0788                       | 0.0026                     | 6.7888                    | 7.40               |
| 6/1/58   | 0.1591                       | 0.1350                     | 7.7350                    | 7.46               |
| 8/1/58   | 0.0660                       | 0.0003                     | 6.7131                    | 7.75               |
| 10/1/58  | 0.1032                       | 0.0448                     | 7.2808                    | 7.68               |
| 13/1/58  | 0.0718                       | 0.0300                     | 7.8107                    | 7.70               |
| 15/1/58  | 0.0695                       | 0.0003                     | 6.4254                    | 7.71               |
| 17/1/58  | 0.0613                       | 0.0802                     | 6.8645                    | 7.66               |
| 19/1/58  | 0.0916                       | 0.0043                     | 7.8107                    | 7.59               |
| 21/1/58  | 0.1428                       | -0.0002                    | 7.6972                    | 7.74               |
| 22/1/58  | 0.0450                       | 0.0003                     | 7.7729                    | 7.69               |
| 26/1/58  | 0.0590                       | 0.0842                     | 7.9243                    | 7.59               |
| 28/1/58  | 0.0928                       | 0.0819                     | 8.2271                    | 7.72               |
| 31/1/58  | 0.1580                       | 0.1709                     | 7.5079                    | 7.76               |

ตารางที่ ข.21 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>13</sup>C รอบ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้น 70 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P6- <sup>13</sup> C (70 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 3) |                              |                            |                           |                    |
|--|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                 | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 18/12/57   | 5.0629                       | 0.0135                     | 2.5496                    | 7.99               |
| 19/12/57   | 12.3876                      | 0.2114                     | 1.7169                    | 7.84               |
| 20/12/57   | 12.9116                      | 0.3763                     | 2.4890                    | 8.02               |
| 21/12/57   | 19.5143                      | 6.1835                     | 9.9682                    | 6.87               |
| 22/12/57   | 13.7384                      | 15.5731                    | 17.7653                   | 7.13               |
| 23/12/57   | 6.3438                       | 9.4978                     | 53.1552                   | 7.38               |
| 24/12/57   | 0.4281                       | 0.1709                     | 74.1620                   | 7.42               |
| 25/12/57   | 0.4281                       | 15.4818                    | 39.6427                   | 6.50               |
| 26/12/57   | 0.4747                       | 2.7436                     | 51.7547                   | 6.78               |
| 28/12/57   | 5.2026                       | 0.7071                     | 51.7547                   | 6.11               |
| 30/12/57   | 19.2115                      | 0.3135                     | 48.5375                   | 6.81               |
| 21/1/58  | 22.2742                      | 0.8281                     | 45.0174                   | 7.44               |
| 22/1/58  | 20.2479                      | 0.2531                     | 53.0416                   | 5.55               |
| 6/1/58   | 14.7224                      | 0.0882                     | 59.5140                   | 6.57               |
| 8/1/58   | 0.4747                       | 0.3215                     | 74.4648                   | 6.47               |
| 10/1/58  | 2.5010                       | 7.7237                     | 110.2332                  | 6.89               |
| 13/1/58  | 7.7179                       | 1.6427                     | 68.7873                   | 6.70               |
| 15/1/58  | 0.2651                       | 1.7111                     | 78.6283                   | 5.68               |
| 16/1/58  | 0.1766                       | 1.7568                     | 78.4391                   | 6.58               |
| 17/1/58  | 0.1359                       | 0.0967                     | 62.3528                   | 6.36               |
| 19/1/58  | 0.0741                       | 0.0511                     | 66.1378                   | 6.45               |
| 21/1/58  | 0.1475                       | 0.2240                     | 80.1423                   | 7.18               |
| 22/1/58  | 0.0706                       | 0.0021                     | 109.6654                  | 6.57               |



ตารางที่ ข.22 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>12</sup>C รอบ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้น 70 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| P6- <sup>12</sup> C (70 มก.ไนโตรเจน/ลิตร, รอบ 3) |                              |                            |                           |                    |
|--|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                                 | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 18/12/57   | 4.7834                       | 0.0118                     | 2.3225                    | 8.15               |
| 19/12/57   | 11.8985                      | 0.1937                     | 2.3603                    | 8.11               |
| 20/12/57   | 16.0674                      | 0.3306                     | 2.5155                    | 8.19               |
| 21/12/57   | 19.5027                      | 4.0671                     | 7.3944                    | 7.28               |
| 22/12/57   | 15.2522                      | 17.9690                    | 21.2475                   | 6.96               |
| 23/12/57   | 8.2070                       | 48.1743                    | 5.1310                    | 7.43               |
| 24/12/57   | 0.3233                       | 0.0511                     | 73.7078                   | 7.20               |
| 25/12/57   | 0.1254                       | 1.2890                     | 75.2218                   | 6.62               |
| 26/12/57   | 0.0625                       | 1.5970                     | 53.4580                   | 6.52               |
| 28/12/57   | 2.8037                       | 0.4847                     | 45.6987                   | 6.02               |
| 30/12/57   | 15.7763                      | 0.1424                     | 49.4837                   | 7.12               |
| 21/1/58  | 15.3803                      | 0.2645                     | 54.3285                   | 6.85               |
| 22/1/58  | 18.3382                      | 0.1732                     | 57.0537                   | 5.46               |
| 6/1/58   | 9.3366                       | 0.0967                     | 65.3808                   | 6.78               |
| 8/1/58   | 0.1487                       | 0.0021                     | 71.6260                   | 6.79               |
| 10/1/58  | 2.6174                       | 7.7009                     | 110.4224                  | 6.70               |
| 13/1/58  | 10.0469                      | 0.1692                     | 70.1120                   | 7.63               |
| 15/1/58  | 0.1720                       | 0.1481                     | 77.4928                   | 5.41               |
| 16/1/58  | 0.1289                       | 0.1025                     | 74.4648                   | 6.70               |
| 17/1/58  | 0.1312                       | 0.0397                     | 58.9463                   | 6.37               |
| 19/1/58  | 0.0881                       | 0.0340                     | 63.2990                   | 6.46               |
| 21/1/58  | 0.0718                       | 0.1601                     | 82.6026                   | 7.23               |
| 22/1/58  | 0.0753                       | 0.1538                     | 84.6843                   | 6.75               |

ตารางที่ ข.23 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>13</sup>C แบบไม่เติมแอมโมเนีย

| P6- <sup>13</sup> C (ไม่เติมแอมโมเนีย) |                               |                             |                            |                    |
|--|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                       | แอมโมเนีย (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 19/12/57                               | 0.0543                        | 0.0015                      | 0.0129                     | 7.25               |
| 20/12/57                               | 0.1056                        | 0.0003                      | 0.1075                     | 7.12               |
| 21/12/57                               | 0.0811                        | 0.0003                      | 0.1113                     | 7.35               |
| 22/12/57                               | 0.0660                        | 0.0009                      | 0.0810                     | 7.35               |
| 23/12/57                               | 0.0648                        | -0.0008                     | 0.2218                     | 7.34               |
| 24/12/57                               | 0.0741                        | 0.0009                      | 0.0023                     | 7.91               |
| 26/12/57                               | 0.0846                        | 0.0009                      | 0.0326                     | 7.47               |
| 28/12/57                               | 0.0660                        | 0.0003                      | 0.0023                     | 8.04               |
| 30/12/57                               | 0.1056                        | 0.0009                      | 0.0363                     | 7.73               |
| 1/12/57                                | 0.0462                        | 0.0003                      | 0.0628                     | 7.93               |
| 4/1/58                                 | 0.0660                        | 0.0009                      | 0.0174                     | 7.85               |
| 6/1/58                                 | 0.0578                        | 0.0002                      | 0.0326                     | 7.70               |
| 8/1/58                                 | 0.0497                        | 0.0008                      | 0.0061                     | 7.85               |
| 10/1/58                                | 0.1044                        | 0.0002                      | 0.0326                     | 7.88               |
| 13/1/58                                | 0.0555                        | 0.0055                      | 0.0212                     | 7.53               |
| 15/1/58                                | 0.0730                        | 0.0002                      | 0.0280                     | 7.73               |
| 17/1/58                                | 0.0520                        | 0.0009                      | 0.0280                     | 7.83               |
| 19/1/58                                | 0.0497                        | 0.0003                      | 0.0288                     | 7.81               |
| 22/1/58                                | 0.0462                        | 0.0003                      | 0.0318                     | 7.93               |
| 26/1/58                                | 0.0532                        | 0.0002                      | 0.0659                     | 7.79               |

ตารางที่ ข.24 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ P6-<sup>12</sup>C แบบไม่เติมแอมโมเนีย

| P6- <sup>12</sup> C (ไม่เติมแอมโมเนีย) |                               |                             |                            |                    |
|--|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                       | แอมโมเนีย (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 19/12/57                               | 0.0590                        | 0.0015                      | 0.0061                     | 7.70               |
| 20/12/57                               | 0.1021                        | 0.0032                      | 0.0886                     | 7.75               |
| 21/12/57                               | 0.0800                        | 0.0055                      | 0.0886                     | 7.70               |
| 22/12/57                               | 0.0543                        | 0.0009                      | 0.0431                     | 7.59               |
| 23/12/57                               | 0.0625                        | 0.0003                      | 0.0212                     | 7.63               |
| 24/12/57                               | 0.0637                        | 0.0015                      | 0.0893                     | 7.84               |
| 26/12/57                               | 0.0823                        | 0.0021                      | 0.0242                     | 7.52               |
| 28/12/57                               | 0.0613                        | 0.0002                      | 0.0129                     | 8.06               |
| 30/12/57                               | 0.0741                        | 0.0009                      | 0.0174                     | 7.81               |
| 1/12/57                                | 0.0637                        | 0.0002                      | 0.0439                     | 7.90               |
| 4/1/58                                 | 0.0660                        | 0.0003                      | 0.0098                     | 7.86               |
| 6/1/58                                 | 0.0648                        | 0.0009                      | 0.0288                     | 7.86               |
| 8/1/58                                 | 0.0963                        | 0.0008                      | 0.0212                     | 7.96               |
| 10/1/58                                | 0.0473                        | 0.0008                      | 0.0250                     | 7.87               |
| 13/1/58                                | 0.0683                        | 0.0032                      | 0.0250                     | 7.81               |
| 15/1/58                                | 0.0555                        | 0.0003                      | 0.0129                     | 7.77               |
| 17/1/58                                | 0.0671                        | 0.0026                      | 0.1158                     | 8.05               |
| 19/1/58                                | 0.0625                        | 0.0015                      | 0.0356                     | 7.86               |
| 22/1/58                                | 0.0473                        | 0.0009                      | 0.0394                     | 8.30               |
| 26/1/58                                | 0.0427                        | 0.0002                      | 0.0583                     | 7.81               |

ตารางที่ ข.25 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ระบบไนตริฟายอิงแอกติเวตเต็ดสลัดจ์  $^{13}\text{C}$  ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| NAS- $^{12}\text{C}$ (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                          | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 14/7/57                                   | 0.1685                       | 0.0756                     | 7.6972                    | 7.27               |
| 17/7/57                                   | 0.2814                       | 0.1458                     | 9.9304                    | 7.57               |
| 24/7/57                                   | 0.0415                       | 0.0038                     | 9.1355                    | 7.39               |
| 25/7/57                                   | 0.0264                       | 0.0002                     | 8.7192                    | 7.2                |
| 30/7/57                                   | 0.0590                       | 0.0038                     | 9.8925                    | 7.28               |
| 2/7/57                                    | 0.0427                       | 0.0003                     | 8.3407                    | 7.23               |
| 4/8/57                                    | 0.0928                       | 0.0049                     | 8.0946                    | 7.21               |
| 6/8/57                                    | 0.1428                       | 0.0739                     | 7.8675                    | 7.35               |
| 9/8/57                                    | 0.0660                       | 0.0032                     | 7.8107                    | 7.42               |
| 12/8/57                                   | 0.0858                       | 0.0032                     | 7.9243                    | 7.34               |
| 16/8/57                                   | 0.1102                       | 0.0095                     | 7.9243                    | 7.34               |
| 18/8/57                                   | 0.0392                       | 0.0009                     | 8.4542                    | 7.28               |
| 20/8/57                                   | 0.2663                       | 0.0146                     | 8.3407                    | 7.28               |

ตารางที่ ข.26 ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนระหว่างการบ่มตะกอนจุลินทรีย์ระบบไนตริฟายอิงแอกติเวตเต็ดสลัดจ์  $^{12}\text{C}$  ความเข้มข้นเริ่มต้น 7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร

| NAS- $^{12}\text{C}$ (7 มก.ไนโตรเจน/ลิตร) |                              |                            |                           |                    |
|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| วันที่ทำการทดลอง                          | แอมโมเนีย (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนไตรต์ (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ไนเตรต (มก.ไนโตรเจน/ลิตร) | ค่าความเป็นกรดต่าง |
| 14/7/57                                   | 0.1067                       | 0.1487                     | 8.2650                    | 7.51               |
| 17/7/57                                   | 0.1498                       | 0.1093                     | 8.3407                    | 7.61               |
| 24/7/57                                   | 0.0602                       | 0.0505                     | 8.9463                    | 7.38               |
| 25/7/57                                   | 0.0241                       | 0.0003                     | 8.8327                    | 7.37               |
| 30/7/57                                   | 0.0532                       | 0.0009                     | 8.5299                    | 7.44               |
| 2/7/57                                    | 0.0508                       | 0.0003                     | 8.8706                    | 7.44               |
| 4/8/57                                    | 0.2511                       | 0.0015                     | 7.8107                    | 7.58               |
| 6/8/57                                    | 0.0858                       | 0.0021                     | 8.0000                    | 7.49               |
| 9/8/57                                    | 0.0497                       | 0.0003                     | 7.8297                    | 7.84               |
| 12/8/57                                   | 0.0625                       | 0.0015                     | 8.0000                    | 7.65               |
| 16/8/57                                   | 0.0904                       | 0.0015                     | 8.6435                    | 7.54               |
| 18/8/57                                   | 0.0834                       | 0.0009                     | 9.5519                    | 7.38               |
| 20/8/57                                   | 0.0834                       | 0.0106                     | 9.2869                    | 7.41               |

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปรียาภรณ์ พรกุลวัฒน์ เกิดวันที่ 27 เมษายน พ.ศ. 2531 จังหวัด  
กรุงเทพมหานคร

สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553

โดยเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554

