

กลุ่มประชากรจุลินทรีย์และกิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดแบบจาน
หมุนชีวภาพ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Microbial communities and nitrogen conversion activities in biofilm of a
rotating biological contactor



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Environmental Engineering
Department of Environmental Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	กลุ่มประชากรจุลินทรีย์และกิจกรรมการเปลี่ยนแปลงรูป ไนโตรเจนในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดแบบจานหมุน ชีวภาพ
โดย	นายชานนท์ พันธพา
สาขาวิชา	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ตะวัน ลิ้มปียากร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.พรินท์พิดา สนธิพันธ์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชวลิต รัตนธรรมสกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ตะวัน ลิ้มปียากร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.พรินท์พิดา สนธิพันธ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิบูลย์ลักษณะ ฟังรัมย์)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.อรทัย ชวาลภาฤทธิ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สรวิศ เผ่าทองสุข)

ชานนท์ พันธพา : กลุ่มประชากรจุลินทรีย์และกิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพ. (Microbial communities and nitrogen conversion activities in biofilm of a rotating biological contactor) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ตะวัน ลิ้มปิยากร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.พรินท์พิดา สนธิพันธ์

งานวิจัยนี้ศึกษาากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดไนโตรเจนและกิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสดน้ำเข้าระบบมีค่าเฉลี่ย COD คือ 247.68 mg/l, NH₃ คือ 77.30 mg/l, NO₂⁻ คือ 0.036 mg/l และ NO₃⁻ คือ 2.70 mg/l ผลการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในฟิล์มชีวภาพโดยเทคนิค NGS พบว่าจุลินทรีย์ที่เคยถูกรายงานว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนในระดับจีสหรือแฟมีลีสมีปริมาณร้อยละ 28 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด เช่น *Pseudomonas* (10.37%), *Clostridium* (7.27 %), *Candidatus Brocadia* (5.15 %), *Nitrospira* (3.21 %), *Arcobacter* (1.09 %), *Nitrosomonadaceae* (0.75 %) และ *Desulfobulbus* (0.35 %) ซึ่งผลการวิเคราะห์ NGS นี้ค่อนข้างสอดคล้องกับผลการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค PCR-cloning-sequencing กล่าวคือในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันพบเพียงกลุ่มประชากร AOB สายพันธุ์ *Nitrosomonas europaea* ไม่พบกลุ่มประชากร Comammox และ AOA สำหรับกระบวนการไนโตรที่ออกซิเดชัน ไพรเมอร์ที่ใช้อาจไม่เหมาะสมทำให้ไม่พบกลุ่มประชากร NOB (*Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrospira*) ส่วนกระบวนการ Anammox พบกลุ่มประชากร *Candidatus Brocadia* นอกจากนี้ยังพบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการ DNRA ร่วมด้วย จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พบว่ามีกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน การศึกษาการเปลี่ยนรูปไนโตรที่ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พบว่ามีกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนโตรที่ออกซิเดชัน การศึกษาการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนโตรที่ พบว่ามีกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนตริฟิเคชันแบบใช้ไนโตรที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน แต่ไม่พบกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Anammox ในสภาวะที่ทำการทดลองนี้และศึกษาการเปลี่ยนรูปไนเตรทสาขาวิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ปลายมือชื่อนิสิต
 ปีการศึกษา 2561 ปลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
 ปลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5870379521 : MAJOR ENVIRONMENTAL ENGINEERING

KEYWORD: Nitrogen cycle, Rotating Biological Contactor, Biofilm, Biological nitrogen removal, Microbial community

Chanon Panthapa : Microbial communities and nitrogen conversion activities in biofilm of a rotating biological contactor. Advisor: Assoc. Prof. Tawan Limpiyakorn, Ph.D. Co-advisor: Prinpida Sonthiphand, Ph.D.

This research focused on microbial communities involved in a biological nitrogen removal process and nitrogen conversion activities in biofilm of a rotating biological contactor (RBC). The first part of this study is the water chemistry analyses. The results showed that average values of chemical oxygen demand (COD), ammonia, nitrite, and nitrate in the influent were 247.68 mg/l, 77.30 mg/l, 0.036 mg/l, and nitrate 2.70 mg/l, respectively. The second part of this study is the analysis of microbial community using Next-Generation Sequencing (NGS). The results revealed that the abundance of microorganisms at the genus and family levels involved in the nitrogen cycle accounted for 28% of the total microbial abundance, including *Pseudomonas* (10.37%), *Clostridium* (7.27 %), *Candidatus Brocadia* (5.15 %), *Nitrospira* (3.21 %), *Arcobacter* (1.09 %), *Nitrosomonadaceae* (0.75 %) and *Desulfobulbus* (0.35 %) of the total microbial abundance. The NGS results were in accordance with the clone library analysis. The cloning and sequencing results showed that, for the ammonia oxidation process, AOB associated with *Nitrosomonas europaea* were found. Other microbial groups, comammox (complete ammonia oxidizer) and AOA, involved in this process showed no amplification. NOB (*Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrospira*), driving the nitrite oxidation process, were not detected likely due to inappropriate primers used. The clone library also revealed that *Candidatus Brocadia* involved in the

Field of Study: Environmental Engineering Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยและทดลอง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บตัวอย่าง รวมทั้งอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมและคณะกรรมการในการสอบทุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำและดูแลตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัยชิ้นนี้

ชานนท์ พันธธาพา



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
สารบัญตาราง.....	ฏ
คำย่อ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ชื่อวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 คำสำคัญ.....	1
1.3 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
บทที่ 2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย.....	3
2.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
2.2 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
2.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3.1 ระบบบำบัดแบบงานหมุนชีวภาพ.....	4
3.1.1 กลไกการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียแบบงานหมุนชีวภาพ.....	4
3.1.2 ชนิดของจุลินทรีย์และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบ บำบัดน้ำเสียแบบงานหมุนชีวภาพ.....	5
3.1.3 ข้อดี - ข้อเสียของระบบบำบัดน้ำเสียแบบงานหมุนชีวภาพ.....	7

3.2	วัฏจักรไนโตรเจนและกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับระบบบำบัดน้ำเสีย.....	8
3.2.1	กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation).....	9
3.2.2	กระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification).....	9
3.2.3	กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification)	10
3.2.3.1	แอมโมนีออกซิเดชัน (Ammonia oxidation)	10
3.2.3.2	ไนไตรท์ออกซิเดชัน (Nitrite oxidation).....	11
3.2.4	กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification)	11
3.2.5	กระบวนการ Complete ammonia oxidation (Comammox).....	12
3.2.6	กระบวนการ Anaerobic ammonia oxidation (Anammox).....	13
3.2.7	กระบวนการ Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA).....	13
3.3	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการกำจัดไนโตรเจนในระบบบำบัดน้ำเสีย	14
3.3.1	Comammox (Complete ammonia oxidizer)	14
3.3.2	AOB (Ammonia oxidizing bacteria)	16
3.3.3	AOA (Ammonia oxidizing archaea).....	19
3.3.4	NOB (Nitrite oxidizing bacteria - <i>Nitrobacter</i>)	21
3.3.5	NOB (Nitrite oxidizing bacteria - <i>Nitrotoga</i>).....	23
3.3.6	NOB (Nitrite oxidizing bacteria - <i>Nitrospira</i>)	24
3.3.7	ANAMMOX (Anaerobic ammonia oxidation).....	28
3.3.8	DNRA (Dissimilatory nitrate reduction to ammonium).....	32
3.4	การตรวจวัดจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR).....	34
3.4.1	Comammox (Complete ammonia oxidation)	35
3.4.2	AOB (Ammonia oxidizing bacteria)	35
3.4.3	AOA (Ammonia oxidizing archaea).....	36
3.4.4	NOB (Nitrite oxidizing bacteria - <i>Nitrobacter</i>)	37

3.4.5 NOB (Nitrite oxidizing bacteria - <i>Nitrotoga</i>).....	38
3.4.6 NOB (Nitrite oxidizing bacteria - <i>Nitrospira</i>)	38
3.4.7 ANAMMOX (Anaerobic ammonia oxidation).....	39
3.4.8 DNRA (Dissimilatory nitrate reduction to ammonium).....	40
3.5 แนวโน้มการบำบัดไนโตรเจนในอนาคต.....	41
3.5.1 กระบวนการบำบัดแบบดั้งเดิม.....	41
3.5.1.1 กระบวนการ Nitrification + Denitrification.....	41
3.5.1.2 กระบวนการ AO (Anoxic + Aerobic).....	41
3.5.1.3 กระบวนการ The Barnard Process	42
3.5.2 กระบวนการบำบัดแบบใหม่.....	43
3.5.2.1 กระบวนการ Partial nitrification + Nitrite denitrification	43
3.5.2.2 กระบวนการ Partial Nitrification + Anammox (Anaerobic ammonium oxidation)	44
3.5.2.3 กระบวนการ CANON (Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrate).....	45
3.5.2.4 กระบวนการ Upflow anaerobic sludge blanket (UASB) + Denitrification coupled to anaerobic methane oxidation + Partial nitrification.....	46
3.5.2.5 กระบวนการ Partial nitrification + DAMO-ANAMMOX	47
บทที่ 4 แผนการทดลองและการดำเนินงานวิจัย.....	49
4.1 แผนการทดลอง	49
4.2 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด.....	51
4.3 การทดลองที่ 1 การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการกำจัดไนโตรเจน	53
4.3.1 การตรวจวัดพารามิเตอร์น้ำ	55

4.3.2 การวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing	57
4.3.3 การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการกำจัดไนโตรเจน ด้วยเทคนิค PCR-sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม	58
4.4 การทดลองที่ 2 ศึกษากิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนที่สภาวะต่าง ๆ	62
บทที่ 5 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	70
5.1 การวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์น้ำ	70
5.2 การวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing. 74	
5.3 การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการบำบัดไนโตรเจน ด้วยเทคนิค PCR-sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม	82
5.3.1 กลุ่มประชากร Comammox (Complete ammonia oxidation).....	82
5.3.2 กลุ่มประชากร AOB (Ammonia oxidizing bacteria).....	84
5.3.3 กลุ่มประชากร AOA (Ammonia oxidizing archaea).....	88
5.3.4 กลุ่มประชากร NOB (Nitrite oxidizing bacteria - <i>Nitrobacter</i>).....	89
5.3.5 กลุ่มประชากร NOB (Nitrite oxidizing bacteria - <i>Nitrotoga</i>)	90
5.3.6 กลุ่มประชากร NOB (Nitrite oxidizing bacteria - <i>Nitrospira</i>).....	91
5.3.7 กลุ่มประชากร Anammox (Anaerobic ammonia oxidation)	94
5.3.8 กลุ่มประชากร DNRA (Dissimilatory nitrate reduction to ammonium)	97
5.4 กิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนที่สภาวะต่าง ๆ	101
5.4.1 การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะแอโรบิก.....	101
5.4.2 การเปลี่ยนรูปไนไตรท์ภายใต้สภาวะแอโรบิก	102
5.4.3 การเปลี่ยนรูปไนแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนไตรท์	103
5.4.4 การเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล	104
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	106
6.1 สรุปผลการทดลอง	106

6.2 ข้อเสนอแนะ	108
6.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	108
บรรณานุกรม.....	109
ภาคผนวก.....	120
ภาคผนวก ก.....	121
ภาคผนวก ข.....	125
ภาคผนวก ค.....	133
ประวัติผู้เขียน.....	138



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะทั่วไปของระบบบำบัดน้ำเสียแบบงานหมุนชีวภาพ	5
รูปที่ 2 กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดแบบงานหมุนชีวภาพ	6
รูปที่ 3 วัฏจักรไนโตรเจน.....	9
รูปที่ 4 สายวิวัฒนาการของ <i>Candidatus Nitrospira inopinata</i>	15
รูปที่ 5 สายวิวัฒนาการของ betaproteobacterial AOB โดยใช้ 16S rRNA-based	17
รูปที่ 6 รูปแบบการกระจายตัวของ AOB โดยใช้ 16S rRNA gene.....	18
รูปที่ 7 สายวิวัฒนาการของ Archaea จำแนกกลุ่มโดยใช้ 16S rRNA gene	20
รูปที่ 8 สายวิวัฒนาการของ <i>Nitrobacter</i> โดยใช้ 16S rRNA gene.....	22
รูปที่ 9 สายวิวัฒนาการของ จีโนส <i>Nitrotoga</i> และสมาชิกในวงศ์ Gallionellaceae	24
รูปที่ 10 สายวิวัฒนาการของ <i>Nitrospira</i>	26
รูปที่ 11 สายวิวัฒนาการของ <i>Candidatus Nitrospira</i> โดยใช้ 16S rRNA genes.....	27
รูปที่ 12 สายวิวัฒนาการของ Anammox แบคทีเรีย โดยใช้ 16S rRNA gene	29
รูปที่ 13 สายวิวัฒนาการของ DNRA โดยใช้ 16S rRNA genes ที่พบ <i>nrfA</i> gene.....	33
รูปที่ 14 กระบวนการ Nitrification + Denitrification.....	41
รูปที่ 15 กระบวนการ AO (Anoxic + Aerobic).....	42
รูปที่ 16 กระบวนการ The Barnard Process	43
รูปที่ 17 กระบวนการ Partial Nitrification + Nitrite Denitrification	44
รูปที่ 18 กระบวนการ Anammox (Anaerobic ammonium oxidation).....	45
รูปที่ 19 กระบวนการ CANON (Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrate)	46
รูปที่ 20 กระบวนการ Denitrification + Aerobic methane oxidation.....	47
รูปที่ 21 กระบวนการ DAMO-ANAMMOX	48
รูปที่ 22 แผนภาพรวมงานวิจัย	50

รูปที่ 23	แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด	51
รูปที่ 24	จานหมุนชีวภาพของระบบบำบัด	52
รูปที่ 25	บ่อรวมน้ำเสียของระบบบำบัด.....	52
รูปที่ 26	รางน้ำล้นของบ่อดกตะกอน.....	53
รูปที่ 27	จุดเก็บฟิล์มชีวภาพจากจานหมุนชีวภาพ	53
รูปที่ 28	การเก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ	53
รูปที่ 29	แผนภาพการทดลองที่ 1	54
รูปที่ 30	ลำดับเวลาในการเก็บน้ำตัวอย่างและตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ.....	56
รูปที่ 31	ตัวอย่างจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีสีขาว	62
รูปที่ 32	ขวดทดลองภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน	65
รูปที่ 33	ขวดทดลองภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	65
รูปที่ 34	การเตรียมการทดลองภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	66
รูปที่ 35	แผนภาพการทดลองที่ 2	67
รูปที่ 36	การเปลี่ยนแปลง pH, Do, อุณหภูมิและ COD ในน้ำเข้า - ออกระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ.....	71
รูปที่ 37	การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนีย, ไนโตรทและไนเตรทในน้ำเข้า - ออกระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ.....	72
รูปที่ 38	เจล PCR ของ Comammox ในช่วงเวลาที่ 1(ก) และ 2(ข)	83
รูปที่ 39	เจล PCR ของ AOB ในช่วงเวลาที่ 1(ข-บน) และ 2(ข-ล่าง).....	84
รูปที่ 40	ตัวอย่างกราฟลำดับเบสของ AOB	85
รูปที่ 41	สายวิวัฒนาการของประชากรจุลินทรีย์กลุ่ม AOB	87
รูปที่ 42	เจล PCR ของ AOA ในช่วงเวลาที่ 1(บน) และ 2(ล่าง).....	88
รูปที่ 43	เจล PCR ของ <i>Nitrobacter</i> ในช่วงเวลาที่ 1 และ 2	89
รูปที่ 44	เจล PCR ของ <i>Nitrotoga</i> ในช่วงเวลาที่ 1 และ 2.....	90

รูปที่ 45 เจล PCR ของ <i>Nitrospira</i> ในช่วงเวลาที่ 1 และ 2 ของไพรเมอร์ P338f กับไพรเมอร์ Nstpa0685r	91
รูปที่ 46 ตัวอย่างกราฟลำดับเบสของ <i>Nitrospira</i>	92
รูปที่ 47 เจล PCR ของ <i>Nitrospira</i> ในช่วงเวลาที่ 1 และ 2 ของไพรเมอร์ EUB338 กับไพรเมอร์ Nstpa0685r	93
รูปที่ 48 เจล PCR ของ Anammox ในช่วงเวลาที่ 1(ก) และ 2(ข).....	94
รูปที่ 49 ตัวอย่างกราฟลำดับเบสของ Anammox	95
รูปที่ 50 สายวิวัฒนาการของประชากรจุลินทรีย์กลุ่ม Anammox.....	96
รูปที่ 51 เจล PCR ของ DNRA ในช่วงเวลาที่ 1 และ 2.....	98
รูปที่ 52 ตัวอย่างกราฟลำดับเบสของ DNRA.....	99
รูปที่ 53 สายวิวัฒนาการของประชากรจุลินทรีย์กลุ่ม DNRA.....	100
รูปที่ 54 การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะแอโรบิก	102
รูปที่ 55 การเปลี่ยนรูปไนโตรที่ภายใต้สภาวะแอโรบิก.....	103
รูปที่ 56 การเปลี่ยนรูปไนแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนโตรที่ โดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์ 50 mg/l .	104
รูปที่ 57 การเปลี่ยนรูปไนแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนโตรที่ โดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์ 25 mg/l .	104
รูปที่ 58 การเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล.....	105

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าดำเนินการของระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพกับระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งธรรมดา	7
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียในจีส <i>Nitrospira</i>	25
ตารางที่ 3 การกระจายตัวของ Anammox แบคทีเรีย	30
ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ Comammox	35
ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ AOB.....	35
ตารางที่ 6 ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ AOA.....	36
ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ NOB (<i>Nitrobacter</i>)	37
ตารางที่ 8 ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ NOB (<i>Nitrotoga</i>).....	38
ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ NOB (<i>Nitrospira</i>)	38
ตารางที่ 10 ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ Anammox.....	39
ตารางที่ 11 ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ DNRA	40
ตารางที่ 12 พารามิเตอร์น้ำที่วิเคราะห์ระหว่างทำการทดลองครั้งที่ 1*	55
ตารางที่ 13 ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มที่ใช้ในงานวิจัยนี้	59
ตารางที่ 14 การทดลองการศึกษากิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจน.....	68
ตารางที่ 15 ส่วนผสมน้ำเสียสังเคราะห์สำหรับการทดลองในสภาวะที่มีออกซิเจน	69
ตารางที่ 16 ส่วนผสมน้ำเสียสังเคราะห์สำหรับการทดลองในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	69
ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยพารามิเตอร์น้ำเข้า - ออกระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพ.....	73
ตารางที่ 18 ร้อยละการกำจัดซีโอดี, แอมโมเนีย, การสะสมไนไตรท์และไนเตรทของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ.....	73
ตารางที่ 19 ร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับไฟลัม (Phylum) ที่ตรวจพบในฟิล์มชีวภาพ	74
ตารางที่ 20 ร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับคลาส (Class) ที่ตรวจพบในฟิล์มชีวภาพ	76
ตารางที่ 21 ร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับอเดอร์ (Order) ที่ตรวจพบในฟิล์มชีวภาพ	77

ตารางที่ 22 ร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับแฟมิลี (Family) ที่ตรวจพบในในฟิล์มชีวภาพ	78
ตารางที่ 23 ร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับจีนัส (Genus) ที่ตรวจพบในในฟิล์มชีวภาพ.....	80
ตารางที่ 24 ร้อยละของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนในระดับจีนัสหรือแฟมิลี	82
ตารางที่ 25 ผล Blast ของ <i>Nitrospira</i> โดยใช้ไพรเมอร์ P338f กับไพรเมอร์ Nstpa0685r	92
ตารางที่ 26 ผล Blast ของ DNRA	99



คำย่อ

AF = Anaerobic filter

AMO = Ammonia monooxygenase

Anammox = Anaerobic ammonium oxidation

AOA = Ammonia oxidizing archaea

AOB = Ammonia oxidizing bacteria

AS = Activated sludge

BLAST = Basic local alignment search tool

CANON = Completely autotrophic nitrogen removal over nitrate

COD = Chemical oxygen demand

COMAMMOX = Complete ammonia oxidation

DNRA = Dissimilatory nitrate reduction to ammonium

HAO = Hydroxylamine oxidoreductase

HDPE = high density polyethylene

HZO = Hydrazine oxidase

MNAR = Membrane bound nitrate reductase

NapAB = Periplasmic nitrate reductase complex

NAR = Nitrate reductase

N-damo = Nitrite dependent methane oxidation

NGS = Next generation sequencing

NIR = Nitrite reductase

NirB = Cytoplasmic NADH dependent nitrite reductase

NOB = Nitrite oxidizing bacteria

NOR = Nitric oxide reductase

NOS = Nitrous oxide reductase

nosZ = Atypical nitrous oxide reductase

NrfA = Pentaheme cytochrome C nitrite reductase

NXR = Nitrite oxidoreductase

OD = Oxidation ditch

PCR = Polymerase chain reaction

PE = polyethylene

RBC = Rotating biological contactor

SBRBC = Rotating biological contractor modified with a sequencing bath reactor system

SRT = Solid retention time

UASB = Upflow anaerobic sludge blanket



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ชื่อวิทยานิพนธ์

ภาษาไทย กลุ่มประชากรจุลินทรีย์และกิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพ

ภาษาอังกฤษ Microbial communities and nitrogen conversion activities in biofilm of a rotating biological contactor

1.2 คำสำคัญ

วัฏจักรไนโตรเจน (Nitrogen cycle)

จานหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactor)

ฟิล์มชีวภาพ (Biofilm)

การบำบัดไนโตรเจนด้วยกระบวนการชีวภาพ (Biological nitrogen removal)

กลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ (Microbial community)

1.3 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

น้ำเสียโดยทั่วไปมักถูกบำบัดเพื่อลดปริมาณสารอินทรีย์ แต่ถูกละเลยการกำจัดธาตุอาหาร ยกตัวอย่างเช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เมื่อน้ำทิ้งถูกบำบัดเฉพาะสารอินทรีย์ ถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ธาตุอาหารโดยเฉพาะไนโตรเจนที่ตกค้างในน้ำทิ้งจะเป็นสาเหตุให้เกิดปรากฏการณ์ Algae Boom หรือ Eutrophication ซึ่งหมายถึงการที่พืชน้ำและสาหร่าย สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในน้ำได้รับออกซิเจนหรือแสงแดดไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิต และเมื่อพืชน้ำและสาหร่ายเหล่านี้ตายลง จะทำให้แหล่งน้ำมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้แหล่งน้ำขาดออกซิเจนอีก การที่แหล่งน้ำมีความเข้มข้นไนเตรทสูง น้ำอุปโภค บริโภคที่มาจากแหล่งน้ำดังกล่าว อาจทำให้เกิดโรค Blue Baby Syndrome โดยทางการแพทย์เรียกว่า Methemoglobinemia (Wright และคณะ, 1999) โดยทารกจะมีอาการตัวเขียวเนื่องจากไนเตรทไปทำให้ฮีโมโกลบินในเลือดเปลี่ยนเป็นเมทฮีโมโกลบินซึ่งจะไม่สามารถลำเลียงออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ ดังนั้น การลดปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในน้ำเสียก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

การกำจัดไนโตรเจนในน้ำเสียโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดเพราะเป็นวิธีที่สามารถกำจัดสารประกอบไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ราคาถูกและดำเนินการได้ง่าย

การกำจัดสารประกอบไนโตรเจนในน้ำเสียโดยกระบวนการทางชีวภาพ ทำได้โดยการเปลี่ยนรูปสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในน้ำเสียเป็นก๊าซ N_2 เพื่อปล่อยออกสูบรรยากาศ โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่ม โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการบำบัดสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ ammonia oxidizer, nitrite oxidizer, denitrifier อีกทั้งยังมีการค้นพบจุลินทรีย์กลุ่มใหม่ ๆ ที่มีบทบาทในการกำจัดไนโตรเจนอีกด้วย ได้แก่ Anaerobic ammonium oxidation (Anammox), Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) และ Complete ammonia oxidation (COMAMMOX) เป็นต้น จะเห็นว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถดำรงชีวิตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำจุลินทรีย์กลุ่มใหม่ ๆ เหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในการเดินระบบบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนสูงขึ้น โดยใช้ต้นทุนในการดำเนินการน้อยลงได้ สำหรับจุลินทรีย์ต่าง ๆ นั้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับระบบบำบัดได้หลากหลาย เช่น ระบบตะกอนเร่ง (Activated Sludge, AS), ระบบคลองวนเวียน (Oxidation Ditch, OD), ระบบสระเติมอากาศ (Aerated Lagoon), ระบบยูเอเอสบี (Upflow Anaerobic Sludge Blanket, UASB), ระบบกรองไร้อากาศ (Anaerobic Filter, AF) และระบบจานหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactors, RBC) เป็นต้น (Metcalf และคณะ, 2003) จากการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมพบว่า ระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพ มีความเป็นไปได้ที่จะพบความหลากหลายของกลุ่มประชากร จุลินทรีย์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่มากกว่าระบบอื่น เพราะจุลินทรีย์ที่อาศัยยึดเกาะติดบนแผ่นจานหมุนเป็นชั้นของฟิล์มที่หนา ทำให้ออกซิเจนไม่สามารถแพร่ผ่านทั่วทั้งแผ่นฟิล์มได้ จึงเกิดสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนซึ่งเอื้อต่อการพบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ได้มากกว่าระบบอื่น ๆ และยังเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดสารอินทรีย์ นอกจากนี้ระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพนั้นยังขั้นตอนการเดินระบบไม่ยุ่งยาก ดูแลระบบได้ง่าย ไม่ต้องมีการควบคุมการเวียนตะกอนกลับ รวมถึงใช้พลังงานในการเดินระบบน้อยกว่าประมาณครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งธรรมดา (Williams, 2011) ทั้งนี้ น้ำเสียจากตลาดยังเป็นน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ในระดับปานกลาง ขณะที่ไนโตรเจนค่อนข้างสูง ซึ่งมาจากกิจกรรมการปรุงอาหารและจากห้องน้ำในตัวตลาดเอง ทำให้เหมาะสมต่อการศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดไนโตรเจน

ด้วยเหตุผลข้างต้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์และศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการกำจัดไนโตรเจนในระบบแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด เนื่องจากน่าจะเป็นระบบที่สามารถพบจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดไนโตรเจนทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เพื่อให้ได้องค์ความรู้พื้นฐานสำหรับพัฒนาเป็นแนวทางใหม่ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบต่อไป และที่สำคัญเป็นการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้แผ่นฟิล์มชีวภาพนี้มาเป็นหัวเชื้อสำหรับระบบกำจัดไนโตรเจนแบบใหม่ต่อไป

บทที่ 2

วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

2.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

2.1.1 ศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการกำจัดไนโตรเจนของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ

2.1.2 ศึกษากิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนในฟิล์มชีวภาพ ของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ

2.2 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย (ศสอ.) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีการกำหนดขอบเขตของงานวิจัยดังนี้

2.2.1 ศึกษากระบวนการกำจัดไนโตรเจน ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพจากตลาดสด

2.2.2 ศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ ที่มีบทบาทในกระบวนการกำจัดไนโตรเจน ได้แก่ Complete ammonia oxidation (Comammox), Ammonia-oxidizing archaea (AOA), Ammonia-oxidizing bacteria (AOB), Nitrite-oxidizing bacteria (NOB) ได้แก่ *Nitrobacter*, *Nitrotoga* และ *Nitrospira*, Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) และ Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น PCR การสร้างห้องสมุดยีน และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA หรือ functional gene

2.2.3 ศึกษากิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจน โดยใช้ฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ ได้แก่ การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะแอโรบิก, การเปลี่ยนรูปไนไตรท์ภายใต้สภาวะแอโรบิก, การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนไตรท์และการเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีสารอินทรีย์ โดยวัดปริมาณของไนโตรเจนต่อเวลาที่เปลี่ยนไป

2.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สร้างองค์ความรู้พื้นฐานของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ ที่มีบทบาทในกระบวนการกำจัดไนโตรเจนของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ฟิล์มชีวภาพจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ มาเป็นหัวใจในการพัฒนาจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่มสำหรับกระบวนการกำจัดไนโตรเจนด้วยระบบแบบใหม่ในอนาคตต่อไป

บทที่ 3

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

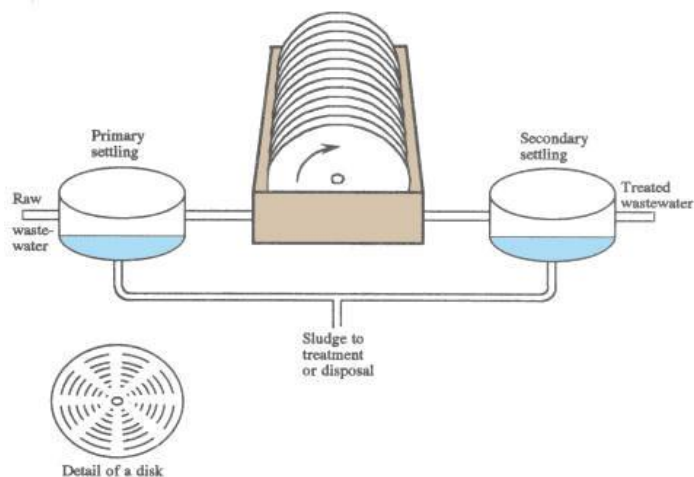
3.1 ระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพ

3.1.1 กลไกการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นจานหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactor; RBC) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพ มีกลไกการทำงานดังนี้ น้ำเสียจะไหลผ่านตัวกลางของระบบบำบัดที่เป็นทรงกระบอกยาว ๆ วางจุ่มในถังบำบัด โดยภายในตัวกลางจะมีจุลินทรีย์จำนวนมากยึดเกาะบนแผ่นจานหมุนและหมุนช้า ๆ เมื่อพ่นน้ำจะสัมผัสกับอากาศทำให้ได้รับออกซิเจนและใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารหรือเปลี่ยนรูปสารอินทรีย์ในน้ำเสียให้เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และเซลล์จุลินทรีย์ จึงถือเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจนเมื่อหมุนลงในน้ำจะสัมผัสน้ำเสียในถังปฏิกริยา อีกครั้งทำให้ออกซิเจนที่เหลือผสมกับน้ำเสีย ถือเป็นเติมออกซิเจนให้กับน้ำเสียและนำน้ำเสียขึ้นมาบำบัดใหม่อีกรอบหมุนเวียนสลับตลอดเป็นวัฏจักร เมื่อระยะเวลาผ่านไปปริมาณแผ่นฟิล์มชีวภาพหนาขึ้นทำให้ตะกอนจุลินทรีย์บางส่วนหลุดออก เนื่องจากแรงเฉือนของการหมุน จึงเป็นการรักษาความหนาของแผ่นฟิล์มชีวภาพให้ค่อนข้างคงที่โดยอัตโนมัติ ทั้งนี้ตะกอนจุลินทรีย์แขวนลอยที่ไหลออกจากถังปฏิกริยานี้ จะไหลเข้าสู่ถังตกตะกอนเพื่อแยกตะกอนและน้ำทิ้ง ทำให้น้ำทิ้งที่ออกจากระบบนี้มีคุณภาพดีขึ้น

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพเป็นระบบบำบัดน้ำเสียรูปแบบหนึ่งของระบบบำบัดขั้นที่สอง (Secondary Treatment) (กรมควบคุมมลพิษ, 2560) ลักษณะทั่วไปของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ แสดงในรูปที่ 1 (Department, 2560) องค์ประกอบหลักของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ ประกอบด้วย 1) ถังตกตะกอนขั้นต้น (Primary Sedimentation Tank) ทำหน้าที่ในการคัดแยกของแข็งที่มากับน้ำเสีย 2) ถังปฏิกริยา ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย และ 3) ถังตกตะกอนขั้นที่สอง (Secondary Sedimentation Tank) ทำหน้าที่ในการตกตะกอนจุลินทรีย์ออกจากน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดเรียบร้อยแล้ว โดยในถังปฏิกริยาประกอบด้วย แผ่นจานพลาสติกจำนวนมากที่ทำจาก polyethylene (PE) หรือ high density polyethylene (HDPE) วางซ้อนแบบเรียงขนานกัน โดยติดตั้งฉากกับเพลานวนตรงจุดศูนย์กลางแผ่น ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจะยึดเกาะติดบนแผ่นจานนี้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ หนาประมาณ 1 - 4 มิลลิเมตร หรือสามารถเรียกระบบนี้ได้อีกอย่างว่า เป็นระบบแบบฟิล์มตรึงชีวภาพ (Fixed film) ทั้งนี้ชุดแผ่นจานหมุนทั้งหมดวางติดตั้งในถังคอนกรีตเสริมเหล็ก ระดับของเพลางจะอยู่เหนือผิวน้ำเล็กน้อย ทำให้พื้นที่ผิวของแผ่นจานจมอยู่ในน้ำประมาณร้อยละ 35 - 40 ของพื้นที่แผ่นทั้งหมด และในการหมุนของแผ่นจานหมุนชีวภาพอาศัย ชุดมอเตอร์ขับเคลื่อนเพลาลูกเบี้ยวและเฟืองทดรอบ

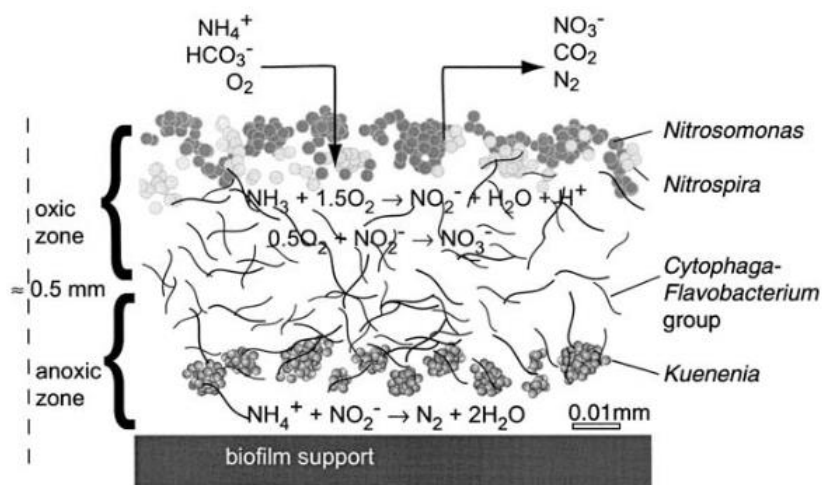
เพื่อหมุนแผ่นจานหมุนชีวภาพในอัตราประมาณ 1 - 3 รอบต่อนาที โดยมีอัตราส่วนพื้นที่ผิวของจานต่อปริมาตรน้ำเสียประมาณ 5 ลิตรต่อตารางเมตร (Williams และ Williams, 2011)



รูปที่ 1 ลักษณะทั่วไปของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ

3.1.2 ชนิดของจุลินทรีย์และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ

ในปี 2003 Egli และคณะ (Egli และคณะ, 2003) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแผ่นฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ ที่มีแอมโมเนียในปริมาณที่มากกว่า 500 มิลลิกรัม แอมโมเนียต่อลิตร แต่มีปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จากน้ำเสียของหลุมฝังกลบขยะในเมือง Ko lliken ประเทศสวีเดนแลนด์ (รูปที่ 2) โดยใช้เทคนิค 16s rDNA clone libraries ที่บริเวณด้านบนของแผ่นฟิล์มชีวภาพสามารถพบจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงค์แบคทีเรียที่เรียกรวม *Nitrosomonas europaea/eutropha* และจุลินทรีย์ในกลุ่มไนโตรทอกซิไดซ์ซิงค์แบคทีเรียที่เรียจากจีนัส *Nitrospira* และจากการใช้เทคนิค fluorescence *in situ* hybridization (FISH) พบจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงค์แบคทีเรียที่เรียประมาณ 20 - 30 % และพบจุลินทรีย์ในกลุ่มไนโตรทอกซิไดซ์ซิงค์แบคทีเรียที่รียน้อยมากประมาณ 5 % ของแผ่นฟิล์มชีวภาพทั้งหมด และที่บริเวณครึ่งด้านล่างของแผ่นฟิล์มชีวภาพจากการใช้เทคนิค 16s rDNA clone libraries พบแบคทีเรียในกลุ่มแอนแอโรบิก แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงค์หรือ Anammox bacteria (*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*) และ filamentous bacteria จากไฟลัม Bacteriodes เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค FISH จะสามารถพบ Anammox bacteria ได้ประมาณ 20 - 31 % ของแผ่นฟิล์มชีวภาพทั้งหมด แต่ประชากรในกลุ่ม filamentous bacteria ซึ่งเป็นสมาชิกในไฟลัม *Cytophaga Flavobacterium* group (CFB) พบได้ประมาณ 7 % และสามารถพบได้ทั่วตลอดทั้งแผ่นฟิล์มดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพ

จากภาพแผนผังแสดงประชากรจุลินทรีย์ยังแสดงให้เห็นว่าปริมาณของออกซิเจนไม่สามารถแทรกซึมผ่านแผ่นฟิล์มได้มากกว่าความลึกตั้งแต่ 100 - 200 ไมโครเมตรลงไป

ในปี 2008 Lee และคณะ ได้ศึกษาระบบ Rotating biological contractor modified with a sequencing bath reactor system (SBRBC) โดยใช้เทคนิค FISH analysis สามารถพบ β - and γ - *Proteobacteria* ที่สามารถกำจัดฟอสฟอรัสและ/หรือไนเตรท ที่พบในแผ่นฟิล์มชีวภาพที่มีความหนา 0 - 250 ไมโครเมตร และเทคนิค 16s rDNA clone libraries แสดงให้เห็นจุลินทรีย์ *Klebsiella* sp. และ *Citrobacter* sp. ที่ความหนาของแผ่นฟิล์มชีวภาพ 0 - 250 ไมโครเมตร เช่นเดียวกัน แต่ในบริเวณที่มีความหนาของแผ่นฟิล์มมากกว่า 250 ไมโครเมตร จะพบจุลินทรีย์กลุ่มซัลเฟอร์ออกซิไดซ์ซิงค์แบคทีเรีย เช่น *Beggiatoa* sp. และ *Thiothrix* sp. (Lee และคณะ, 2008) จากผลการศึกษาทางด้านเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลนี้ มีความสอดคล้องกับหลักฐานทางด้านสัตววิทยาที่ศึกษาจากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นอกจากนี้แผ่นฟิล์มชีวภาพของระบบ RBC สามารถพบจุลินทรีย์กลุ่มแอโรบิกแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงค์แบคทีเรีย (ในจีโนม *Nitrosomonas*) และพบ Anammox bacteria (ในออเดอร์ *Planctomycetales*; *Kuenenia stuttgartiensis*) โดยใช้กระบวนการ FISH, RT-PCR และ DGGE

จากการศึกษาของ Egli และ Lee ทำให้ทราบว่าฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพนั้น สามารถพบจุลินทรีย์ได้หลากหลายกลุ่ม เช่น แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงค์แบคทีเรีย, ไนไตรท์ออกซิไดซ์ซิงค์แบคทีเรีย และแอนแอโรบิกแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงค์ เนื่องจากแผ่นฟิล์มมีระดับของออกซิเจนไม่เท่ากันตลอดทั่วทั้งแผ่นฟิล์ม ซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการก่อให้เกิดความหลากหลายดังกล่าวขึ้น

3.1.3 ข้อดี - ข้อเสียของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ

ข้อดี ปรับปรุงจาก (กรมควบคุมมลพิษ, 2560)

- 1) การเริ่มเดินระบบ (Start Up) ไม่ยุ่งยาก ซึ่งใช้เวลาเพียง 1 - 2 สัปดาห์
- 2) ระบบทำงานได้ค่อนข้างคงที่แม้อัตราการไหลของน้ำเสียที่ไม่ค่อยคงที่
- 3) ระบบมีการผลิตของแข็งที่น้อยกว่าเนื่องจากมี Solid Retention Time (SRT) ที่ยาวนานกว่า
- 4) ตะกอนจุลินทรีย์และน้ำทิ้งสามารถแยกจากกันได้ดี
- 5) การดูแลและบำรุงรักษาง่าย ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญมากนัก
- 6) ไม่ต้องมีการควบคุมการเวียนตะกอนกลับ
- 7) ใช้พื้นที่ในการก่อสร้างน้อย
- 8) ใช้พลังงานในการเดินระบบน้อย เนื่องจากใช้พลังงานไฟฟ้าใช้สำหรับขับเคลื่อนมอเตอร์เท่านั้น ส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการและบำรุงรักษาต่ำด้วย โดยพบว่า ระบบจานหมุนชีวภาพใช้พลังงานน้อยกว่าประมาณครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งธรรมดา (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าดำเนินการของระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพกับระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งธรรมดา

กระบวนการ	อัตราการไหล	Annual Elec. ราคา \$0.1/kWh
จานหมุนชีวภาพ	112,500 ลบ ³ /วัน	\$29,000
ตะกอนเร่งธรรมดา	112,500 ลบ ³ /วัน	\$60,225

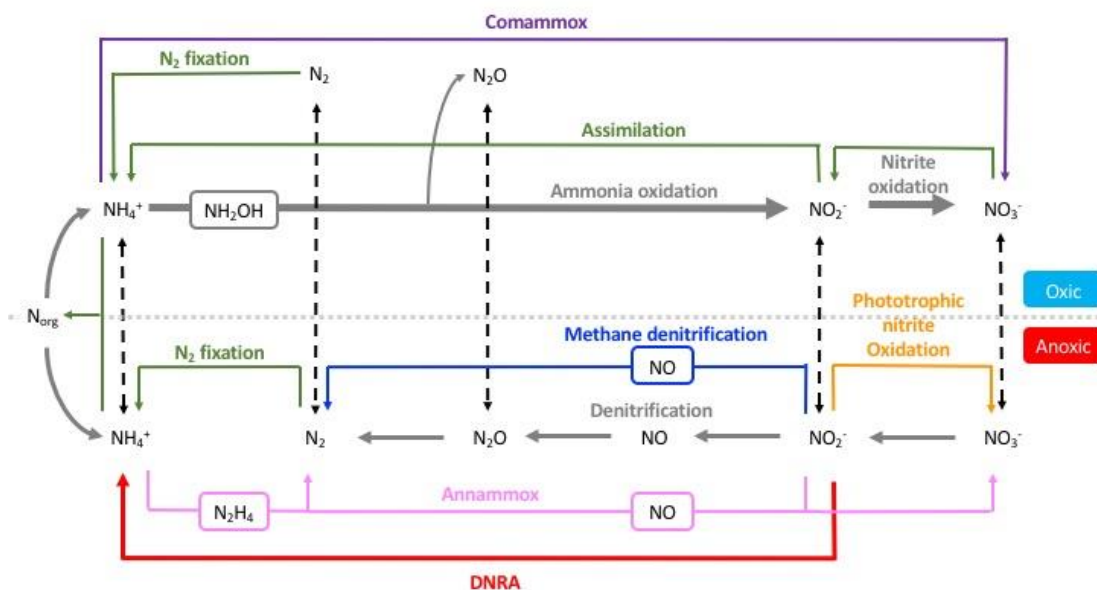
(Williams และ Williams, 2011)

ข้อเสีย ปรับปรุงจาก (กรมควบคุมมลพิษ, 2560)

- 1) ราคาเครื่องจักรอุปกรณ์ที่มีราคาแพง เนื่องจากต้องใช้วัสดุอย่างดีเป็นส่วนประกอบ
- 2) เพลากลั่นหมุนที่ต้องรับทั้งแรงอัดและแรงบิดซ้ำรูดบ่อยครั้ง
- 3) แผ่นจานหมุนชีวภาพชำรุดเสียหายง่าย หากสัมผัสสารสังสีอัลตราไวโอเล็ตและสารพิษเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่อง
- 4) ต้องมีหลังคาปกคลุมป้องกันการเจริญของสาหร่ายที่จะมาพันหรืออุดตันระบบจานหมุน

3.2 วัฏจักรไนโตรเจนและกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับระบบบำบัดน้ำเสีย

ไนโตรเจนบนโลกเกือบทั้งหมดปรากฏอยู่ในรูปของแก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศ ซึ่งสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ไม่สามารถนำมาใช้งานได้ จึงต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปอื่น ๆ โดย พืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ก่อน จึงจะเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต เริ่มจากการผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจนหรือไนโตรเจนฟิกเซชัน (Nitrogen fixation) เปลี่ยนรูปไนโตรเจนแก๊ส (N_2) เป็นแอมโมเนีย (NH_3) แสดงในสีเขียว ดังแสดงในรูปที่ 3 ดัดแปลงจาก (Thamdrup, 2012) และมีกระบวนการแอมโมเนียฟิเคชันที่สามารถเปลี่ยนรูปสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน (N_{org}) ไปอยู่ในรูปของอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย แสดงในสีเทา จากนั้นจะผ่านกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน (Ammonia oxidation) เปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ (NO_2^-) แสดงในสีเทา กระบวนการไนไตรท์ออกซิเดชัน (Nitrite oxidation) เปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรท (NO_3^-) แสดงในสีเทา โดยกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันเมื่อรวมกับกระบวนการไนไตรท์ออกซิเดชันจะเรียกรวมกันว่ากระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) จากนั้นจะเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) เปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แก๊สไนตริกออกไซด์ (NO) แก๊สไนตรัสออกไซด์ (N_2O) และเป็นไนโตรเจนแก๊สอีกรอบ หมุนวนเป็นวัฏจักรแสดงในสีเทาเช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากกระบวนการดังกล่าวแล้ว ยังมีอีกหลายกระบวนการที่น่าสนใจ นั่นคือ กระบวนการ Complete ammonia oxidation (Comammox) แสดงในสีม่วง ที่สามารถเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์เปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนเตรท, กระบวนการ Nitrite-dependent methane oxidation (N-damo) แสดงในสีน้ำเงิน ที่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนโตรเจนแก๊สโดยใช้มีเทนเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและเปลี่ยนเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์, กระบวนการ Anaerobic ammonia oxidation (Anammox) แสดงในสีชมพู ที่สามารถเปลี่ยนแก๊สแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออนและไนไตรท์เป็นไนโตรเจนแก๊สได้ และกระบวนการ Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) แสดงในสีแดง ที่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นแก๊สแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออนได้



รูปที่ 3 วัฏจักรไนโตรเจน

3.2.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation)

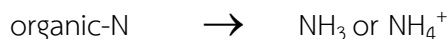
กระบวนการตรึงไนโตรเจน คือ กระบวนการเปลี่ยนรูปแก๊สไนโตรเจนในอากาศให้กลายเป็นแก๊สแอมโมเนีย ดังสมการ



โดยกระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นได้จาก free living bacteria เช่น *Azotobacter* หรือ symbiotic bacteria เช่น *Rhizobium* ในปมรากพืชตระกูลถั่ว ซึ่งกระบวนการนี้ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องในขั้นตอนของการบำบัดน้ำเสีย ดังรูปที่ 3 โดยแสดงในสีเขียว

3.2.2 กระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification)

กระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน คือ กระบวนการที่เปลี่ยนรูปสารประกอบ อินทรีย์ไนโตรเจนไปอยู่ในรูปของอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออน ดังสมการ



โดยการที่จะเปลี่ยนรูปเป็นแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออน ขึ้นอยู่กับค่า pH ในน้ำ ถ้า pH ในน้ำสูงขึ้น จะทำให้แอมโมเนียมไอออนเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย ดังสมการ

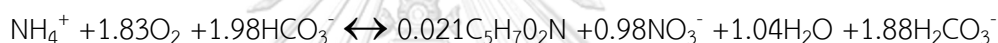


แบคทีเรียที่มีบทบาทในขั้นตอนนี้ ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์พวกเฮเทอโรโทรป (Heterotroph) โดยกระบวนการดังกล่าว สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โดยกระบวนการนี้นับว่ามีความสำคัญต่อระบบบำบัดน้ำเสียที่มีการบำบัดไนโตรเจน เพราะสารอินทรีย์

ไนโตรเจน ไม่ใช่เป้าหมายในการออกซิเดชันของแบคทีเรียกลุ่มไนโตรฟายอิง เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ จะสามารถออกซิไดซ์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออนไปเป็นไนเตรทนั้น หลังจาก ผ่านขั้นตอนนี้แล้ว ดังรูปที่ 3 โดยแสดงในสีเทา

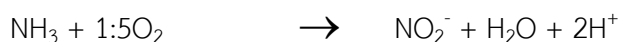
3.2.3 กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification)

กระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นกระบวนการออกซิเดชัน เพื่อเปลี่ยนสารประกอบไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของแอมโมเนียให้กลายเป็นไนเตรท โดยมีสารประกอบอนินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) คือ แอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออน ปฏิกิริยานี้เกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรฟายอิง (Nitrifying bacteria) โดยประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือ ขั้นตอนแอมโมเนียออกซิเดชัน (Ammonia oxidation) จะเปลี่ยนแอมโมเนียให้อยู่ในรูปไนไตรท์ ส่วนขั้นตอนที่สองคือ ขั้นตอนไนไตรท์ออกซิเดชัน (Nitrite oxidation) เปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท ดังรูปที่ 3 โดยแสดงในสีเทา ดังสมการ (Fernando และ Kalpage, 2015)

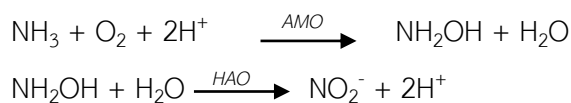


3.2.3.1 แอมโมเนียออกซิเดชัน (Ammonia oxidation)

กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน เป็นกระบวนการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ ที่อาศัยการทำงานของแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (Ammonia oxidizing bacteria, AOB) ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเคมีลิโธออโตโทรฟ (Chemolithoautotrophs) โดยมีแอมโมเนียเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) และมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) โดยมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง เช่น *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira* และ *Nitrosovibrio* นอกจากนี้ แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรียแล้วในปี 2004 Venter และคณะ ยังได้มีการค้นพบแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคีย (Ammonia oxidizing archaea, AOA) จาก *amoA* gene จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ เช่น *Nitrosopumilus maritimus* และ *Cenarchaeum symbiosum* ที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้เช่นเดียวกัน ดังสมการ

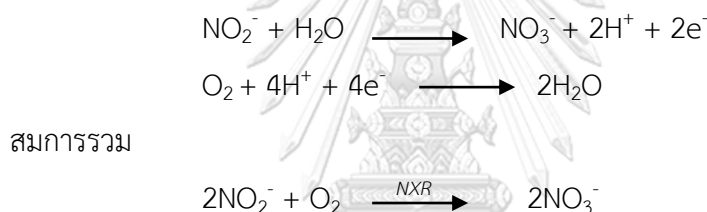


และขั้นตอนการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์อาศัยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ แอมโมเนียออกซิจีเนส (Ammonia monooxygenase, AMO) และไฮดรอกซิลามีนออกซิจีเนส (Hydroxylamine oxidoreductase, HAO) รายละเอียดดังสมการ



3.2.3.2 ไนไตรท์ออกซิเดชัน (Nitrite oxidation)

กระบวนการไนไตรท์ออกซิเดชัน เป็นกระบวนการออกซิไดซ์ไนไตรท์ไปเป็นไนเตรท ที่อาศัยการทำงานของไนไตรท์ออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (Nitrite oxidizing bacteria, NOB) ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเคมีโธออโตโทรฟ (Chemolithoautotrophs) โดยมีไนไตรท์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) โดยมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ เช่น *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrospira* และ *Nitrotoga* และขั้นตอนนี้อาศัยเอนไซม์ไนไตรท์ออกซิโดรีดักเทส (Nitrite oxidoreductase, NXR) ซึ่งมี 2 หน่วยย่อย คือ *nxrA* (α subunit) และ *nxrB* (β subunit) ดังสมการ (Navío และคณะ, 1998)



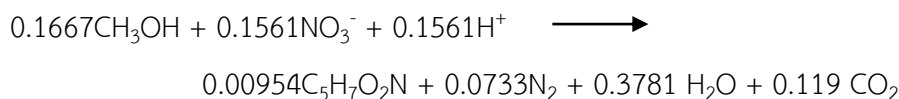
3.2.4 กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification)

กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน เป็นกระบวนการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นก๊าซไนโตรเจน โดยเกิดขึ้นที่สถานะที่ไม่มีออกซิเจนแต่สามารถนำออกซิเจนจากแหล่งอื่นมาใช้ คือ ไนเตรท ไนไตรท์หรือแม้กระทั่งซัลเฟตโดยอาศัยจุลินทรีย์ชนิดดีไนตริฟายอิง (Denitrifying bacteria) โดยมีไนเตรทจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) มีสารอินทรีย์คาร์บอนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ซึ่งสารอินทรีย์คาร์บอนอาจเป็น ซีโอดี บีโอดี ที่มีอยู่ในน้ำเสียหรือเป็นสารเคมีที่เติมลงไปก็ได้ เช่น เมธานอล กลูโคส และเอทานอล ดังรูปที่ 3 โดยแสดงในสี่เท่า จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ เช่น *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* และ *Alcaligenes* โดยแบ่งเป็นทั้งหมด 4 ขั้นตอน คือ ไนเตรทรีดักชัน ไนไตรท์รีดักชัน ไนตริกออกไซด์รีดักชันและไนตรัสออกไซด์รีดักชัน เริ่มแรกทำการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์และเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์และก๊าซไนโตรเจนปล่อยสู่บรรยากาศ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ไนเตรทรีดักเทส (Nitrate reductase, NAR), ไนไตรท์รีดักเทส (Nitrite reductase, NIR), ไนตริกออกไซด์รีดักเทส (Nitric

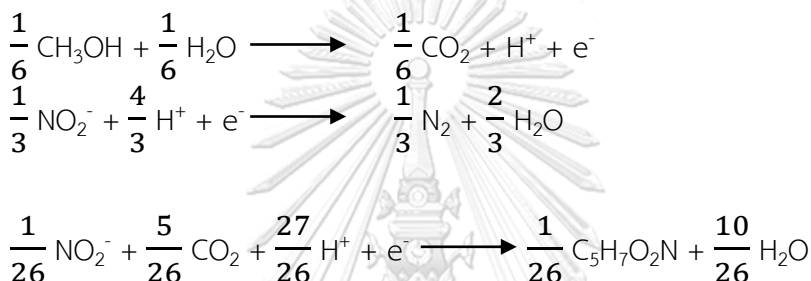
oxide reductase, NOR) และ ไนโตรัสออกไซด์รีดักเทส (Nitrous oxide reductase, NOS) ตามลำดับ ดังสมการ



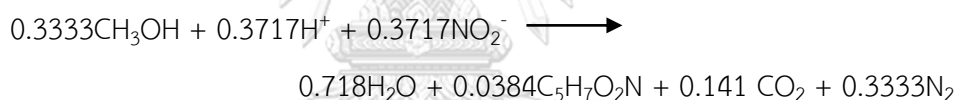
โดยมีสมการสร้างเซลล์โดยใช้เมทานอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอนกับใช้ในไตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ดังสมการ (Rittmann และ McCarty, 2012)



และสมการสร้างเซลล์โดยใช้เมทานอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอนกับใช้ในเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ดังสมการ (Rittmann และ McCarty, 2012)

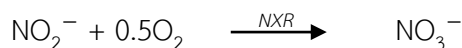
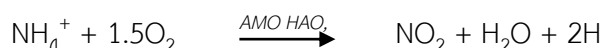


สมการรวม



3.2.5 กระบวนการ Complete ammonia oxidation (Comammox)

กระบวนการ Comammox เป็นกระบวนการเปลี่ยน แก๊สแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออนให้เป็นไนเตรท โดยใช้จุลินทรีย์ใน genus *Nitrospira* (van Kessel และคณะ, 2015) ซึ่งถือเป็นกระบวนการไนตริฟิเคชันแบบสมบูรณ์ โดยเพิ่งมีการค้นพบครั้งแรกโดย van Kessel และคณะ ในปี 2015 ดังรูปที่ 3 โดยแสดงในสีม่วง โดยมีแอมโมเนียเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Electron donor) และมีคาร์บอนไดออกไซด์หรือไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งของคาร์บอน (Carbon source) ซึ่งอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ ไนโตรัสออกไซด์รีดักเทส (Nitrite oxidoreductase, NXR), แอมโมเนียโมนอกซีจีเนส (ammonia monooxygenase, AMO) และไฮดรอกซิลามีนออกซิโดรีดักเทส (Hydroxylamine oxidoreductase, HAO) ดังสมการ

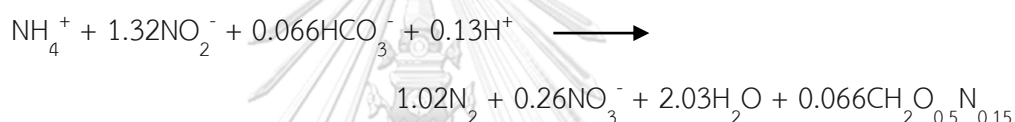


สมการรวม

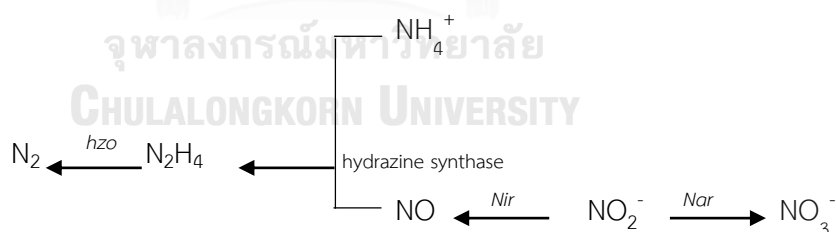


3.2.6 กระบวนการ Anaerobic ammonia oxidation (Anammox)

กระบวนการ Anammox เป็นกระบวนการเปลี่ยนแก๊สแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออนกับไนโตรเจนหรือไนเตรท ให้กลายเป็นแก๊สไนโตรเจนได้โดยตรง โดยอาศัยการทำงานของฟิล์ม Planctomycetes ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มลิโทโทรฟ (lithotroph) ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน โดยมีแอมโมเนียเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ไนโตรเจนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) และใช้ไบคาร์บอเนต (bicarbonate) เป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) ในการสร้างเซลล์ ดังรูปที่ 3 โดยแสดงในสีชมพู ดังสมการออกซิเดชันแบบไร้ออกซิเจนของกระบวนการ Anammox (Strous และคณะ, 1998)



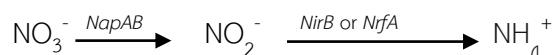
และอาศัยการทำงานของเอนไซม์แมมเบรนบราวดีไนเตรทรีดักเทส (membrane bound nitrate reductase, MNAR), ไนโตรทรีดักเทส (Nitrite reductase, NIR) และไฮดราซีนออกไซด์ (Hydrazine oxidase, HZO) ดังสมการ (Kartal และคณะ, 2011)



3.2.7 กระบวนการ Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA)

กระบวนการ Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) เป็นกระบวนการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นแอมโมเนีย ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน โดยมีไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) และซัลไฟด์หรือสารอินทรีย์คาร์บอนตัวอื่น ๆ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) จัดเป็นกลุ่มเคมีลิโทออโตโทรฟิก (Chemolithotrophic bacteria) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ พอร์พลาสมิกไนเตรทรีดักเทสคอมเพล็กซ์ (periplasmic nitrate reductase complex, NapAB) ในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนโตรเจน, ไฮโดรพลาสมิกเอ็นเอทีเอชดีพี

นเดนท์ไนโตรที่รีดักเทส (cytoplasmic NADH dependent nitrite reductase, NirB) หรือเพนตะฮีมไซโตโครมซีไนโตรที่รีดักเทส (pentaheme cytochrome C nitrite reductase, NrfA) เปลี่ยนไนโตรที่เป็นแอมโมเนียมาไอออน ดังสมการ



โดยมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง เช่น *Desulfovibrio desulfuricans*, *Wolinella succinogenes* และ *Vibrio fischeri*

3.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการกำจัดไนโตรเจนในระบบบำบัดน้ำเสีย

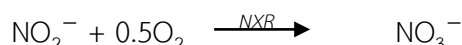
3.3.1 Comammox (Complete ammonia oxidizer)

ข้อมูลทั่วไป

Complete ammonia oxidizer เป็นแบคทีเรียใน genus *Nitrospira* ซึ่งถือเป็นตัวที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันแบบสมบูรณ์ได้ (สมการที่ 3) คือ มีการเกิดแอมโมเนียออกซิเดชัน (สมการที่ 1) เปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนโตร และไนโตรที่ออกซิเดชัน (สมการที่ 2) เปลี่ยนไนโตรเป็นไนเตรตต่อเนื่องกัน โดยมีแอมโมเนียเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Electron donor) และมีคาร์บอนไดออกไซด์หรือไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) ซึ่งเพิ่งมีการค้นพบครั้งแรกโดย Van Kessel และคณะ ในปี 2015 โดยมีสมการการทำงานดังนี้



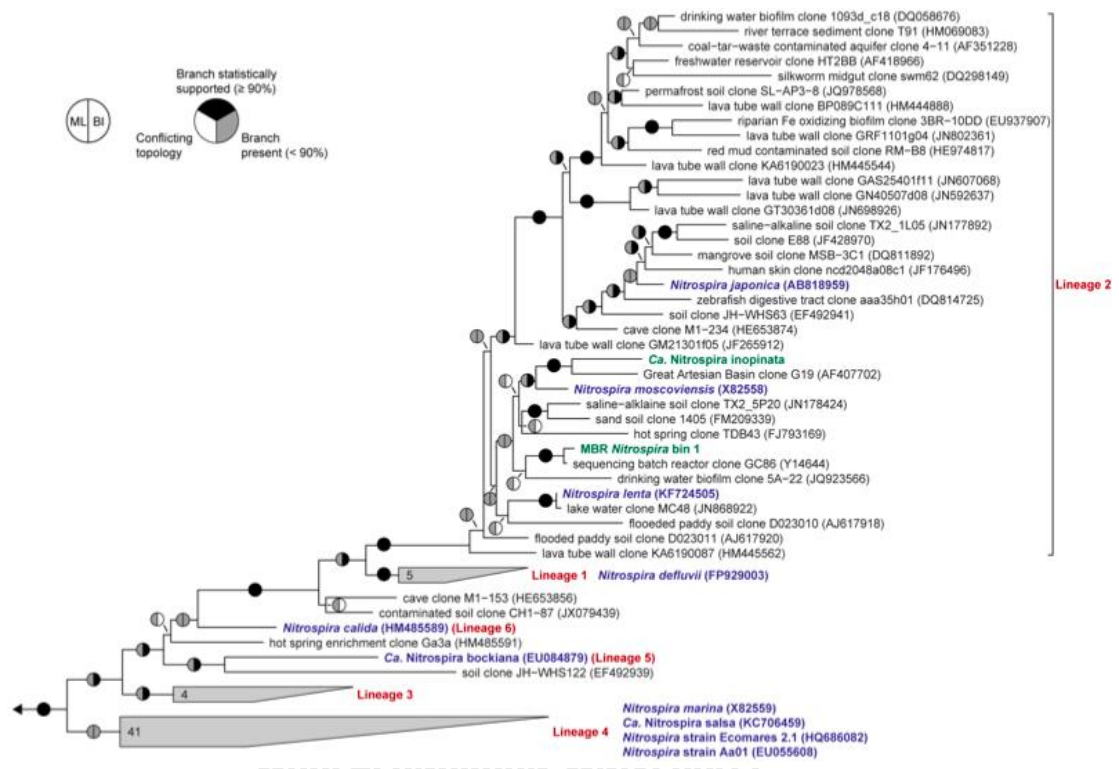
โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ แอมโมเนียโมนอกซิจีเนส (ammonia monooxygenase, AMO), ไฮดรอกซิลามีนออกซิจีเนส (Hydroxylamine oxidoreductase, HAO) และไนโตรที่ออกซิโดรีดักเทส (Nitrite oxidoreductase, NXR) ดังสมการ



ประเภทของแบคทีเรีย

Comammox สามารถตรวจวัดได้จากทั้ง 16S rRNA และ ยีน ammonia monooxygenase (*amoA*, *amoB* และ *amoC*) กับ Hydroxylamine oxidoreductase, *hao*

(Pinto และคณะ, 2015) จากการทดลองของ Daims และคณะในปี 2015 ได้จัดแบคทีเรียไว้ใน *Candidatus Nitrospira inopinata* และเมื่อเปรียบเทียบ โดยใช้ 16S ribosomal RNA กับ สมาชิกในจีนัส *Nitrospira* พบว่า *Ca. N. inopinata* แสดงในสีเขียว เป็นสมาชิกของ *Nitrospira* lineage II ส่วนแสดงในสีฟ้า จะเป็นสมาชิก *Nitrospira* strains อื่น ที่ไม่ทราบว่ามีการใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งของพลังงานหรือไม่ ซึ่งทั้งหมดพิจารณาจาก 95 taxa และ 1,543 ตำแหน่งของการจัดวาง nucleotide sequence ดังรูปที่ 4 (Daims และคณะ, 2015)



รูปที่ 4 สายวิวัฒนาการของ *Candidatus Nitrospira inopinata*

แหล่งที่พบแบคทีเรีย

Comammox สามารถพบได้ทั่วไปในดินบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม เช่น นาข้าวและป่า ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นแหล่งน้ำจืด เช่น พื้นที่ชุ่มน้ำ, ตะกอนปากแม่น้ำ, ชั้นหินใต้ดินที่อุ้มน้ำ และ ตะกอนของทะเลสาบ รวมถึงระบบในทางวิศวกรรม เช่น ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอกติเวตเต็ดสลัดจ์ และ ระบบบำบัดน้ำดื่ม จากการตรวจสอบโดยใช้ *amoA* sequences (Daims และคณะ, 2015)

สภาวะแวดล้อมในการเจริญของแบคทีเรีย

Comammox สามารถเจริญเติบโตได้ที่ pH ระหว่าง 6.99 – 8.2 อุณหภูมิระหว่าง 23 - 50 °C (Daims และคณะ, 2015, van Kessel และคณะ, 2015) และการทดลองของ Kessel ที่ให้ NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- เริ่มต้นที่ 0 -75 μM , 0 – 29 μM และ 300 -1848 μM ตามลำดับ

3.3.2 AOB (Ammonia oxidizing bacteria)

ข้อมูลทั่วไป

Ammonia oxidizing bacteria เป็นแบคทีเรียที่สามารถการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้กลายเป็นไนโตรที่ในกระบวนการ nitrification เช่นเดียวกับ Ammonia oxidizing archaea โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์หรือไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งของคาร์บอน (Carbon source) และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) โดยมีแอมโมเนียเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) (Koops และคณะ, 2006) ดังสมการ



และอาศัยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ แอมโมเนียออกซิจีเนส (Ammonia monooxygenase, AMO) และไฮดรอกซิลามีนออกซิจีเนส (Hydroxylamine oxidoreductase, HAO) รายละเอียดดังสมการ



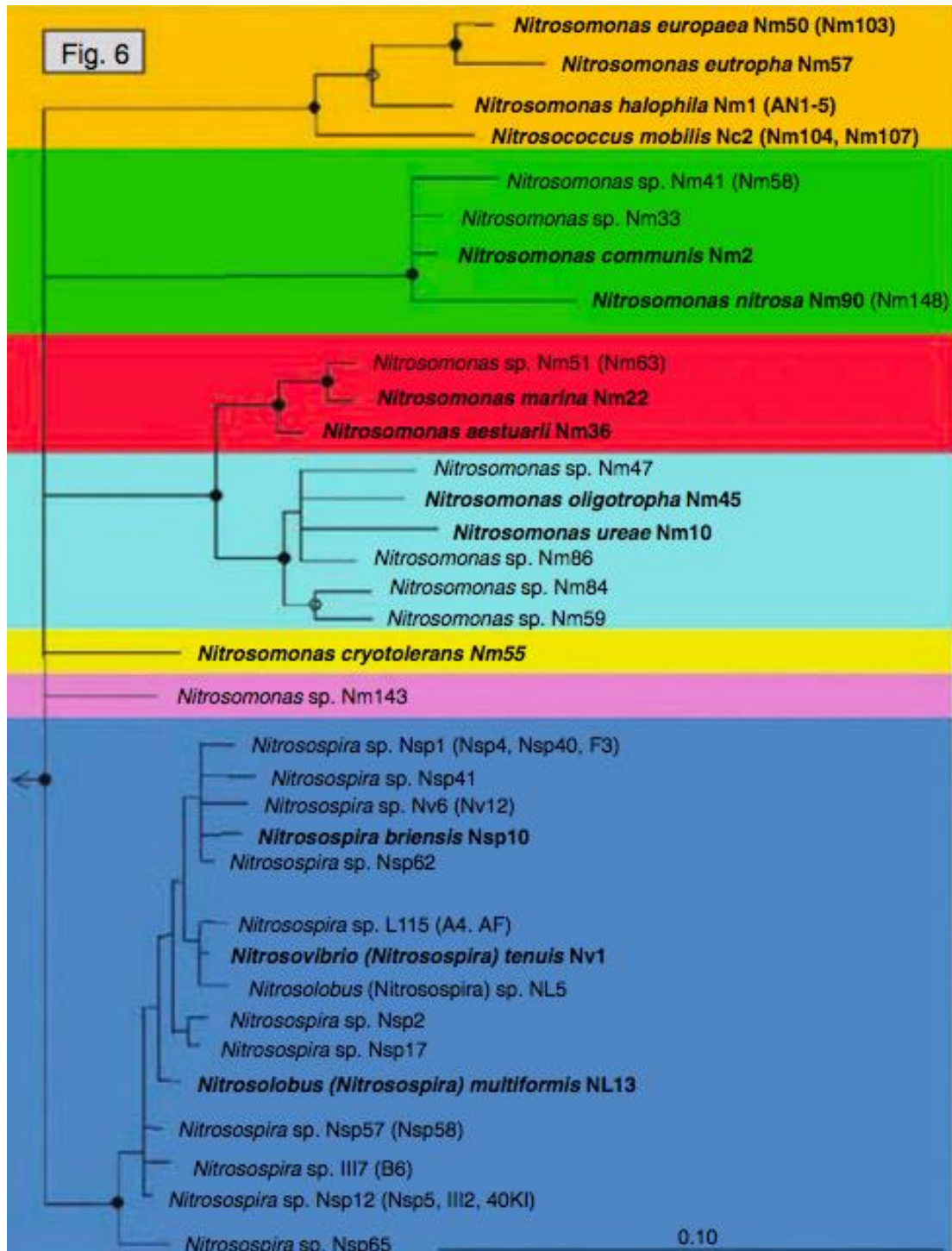
ประเภทของแบคทีเรีย

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสบน 16S rRNA gene และเปรียบเทียบลำดับ Ammonia monooxygenase, *amoA* gene โดยเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Ammonia monooxygenase ที่มีความสำคัญในการย่อยสลายแอมโมเนีย พบว่า สามารถแบ่ง Ammonia oxidizing bacteria ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามการทดลองของ Koops และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ดังนี้

1. กลุ่ม Gamma-proteobacteria ซึ่งประกอบด้วย Genus *Nitrosococcus* (*Nitrosococcus oceani* และ *Nitrosococcus halophilus*) ซึ่งทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะทางกายภาพเหมือนกันต่างกันที่ความทนต่อเกลือและความทนต่อแอมโมเนียที่แตกต่างกัน

2. กลุ่ม Beta-proteobacteria ซึ่งประกอบด้วยกลุ่ม Nitrospira lineage (Genus *Nitrospira*, Genus *Nitrosovibrio*, Genus *Nitrosolobus*) และกลุ่มของ Nitrosomonas Group (*Nitrosomonas europaea*/*Nc.Mobilis* lineage, *Nitrosomonas communis* lineage, *Nitrosomonas marina* lineage, *Nitrosomonas oligotropha* lineage, *Nitrosomonas*

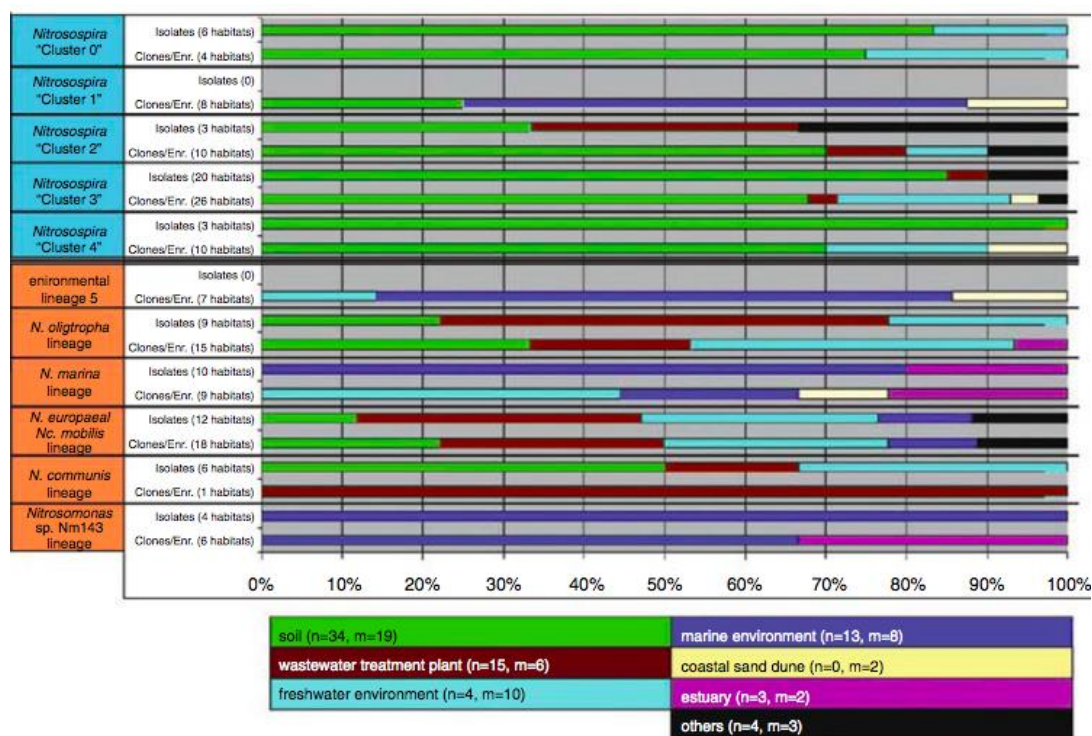
cryptolerans lineage และ *Nitrosomonas* sp. Nm 143 lineage) ดังรูปที่ 5 (Koops และคณะ, 2006)



รูปที่ 5 สายวิวัฒนาการของ betaproteobacterial AOB โดยใช้ 16S rRNA-based

แหล่งที่พบแบคทีเรีย

AOB ในแต่ละสปีชีส์นั้น สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมต่างๆที่หลากหลาย เช่น ในระบบบำบัดน้ำเสีย, น้ำทะเล, น้ำจืด, ดิน, ดินตะกอนเขตชายฝั่งทะเลและบริเวณปากแม่น้ำ เป็นต้น ซึ่งแต่ละแห่งจะมีสัดส่วนในการค้นพบแต่ละสปีชีส์แตกต่างกัน ดังรูปที่ 6 (Koops และคณะ, 2006)



รูปที่ 6 รูปแบบการกระจายตัวของ AOB โดยใช้ 16S rRNA gene

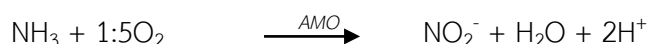
สภาวะแวดล้อมในการเจริญของแบคทีเรีย

AOB สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ pH ประมาณ 7.4 (Koops และคณะ, 2006), อุณหภูมิระหว่าง 20 - 30 °C, DO ไม่ต่ำกว่า 2 mg/L และยังพบว่าแอมโมเนียอิสระที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญเติบโตของ AOB อีกด้วย (ธนสิตา โชติอนนต์, 2556)

3.3.3 AOA (Ammonia oxidizing archaea)

ข้อมูลทั่วไป

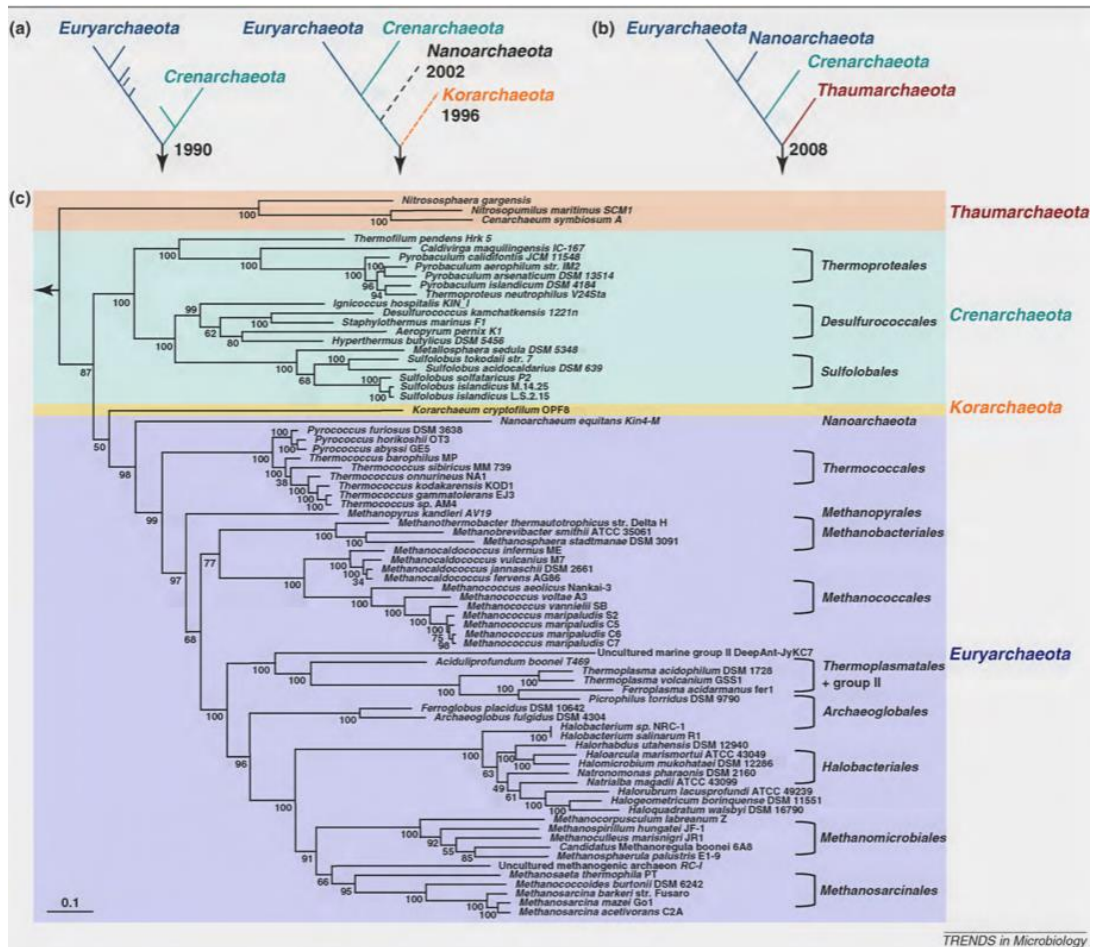
Ammonia oxidizing archaea เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป โดยเฉพาะในสิ่งแวดล้อมที่รุนแรง และเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญมากกลุ่มหนึ่ง ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย ให้กลายเป็นไนไตรท์ได้ เช่นเดียวกับ Ammonia oxidizing bacteria โดยมีแอมโมเนียเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) และมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) ดังสมการ



โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ คือ แอมโมเนียออกซิจีเนส (Ammonia monooxygenase, *amoA*) ซึ่งมีการค้นพบครั้งแรกโดย Venter และคณะ ในปี 2004 ในน้ำทะเลจากการศึกษา *amoA* ต่อมาจึงมีการคัดแยก *Nitrosopumilus maritimus* ออกจากน้ำทะเลโดย Könneke และคณะในปี 2005 และแยก *Nitrososphaera viennensis* ออกจากดินได้โดย Tourna และคณะ ในปี 2011

ประเภทของจุลินทรีย์

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสบน 16S rRNA gene สามารถแบ่งจุลินทรีย์กลุ่มอาร์เคียออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Euryarchaeota และ Crenarchaeota ต่อมาได้มีการศึกษาเพิ่มเติมพบ Korarchaeota (Barns และคณะ, 1996) และ Nanoarchaeota (Huber และคณะ, 2002) จากรายงานของ Spang และคณะ ในปี 2010 ได้มีการจัดกลุ่มใหม่ โดยแบ่งเป็นทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ Euryarchaeota, Korarchaeota, Crenarchaeota และ Thaumarchaeota ดังรูปที่ 7 (Spang และคณะ, 2010) โดย Ammonia oxidizing archaea จัดอยู่ในแฟลัม Thaumarchaeota



รูปที่ 7 สายวิวัฒนาการของ Archaea จำแนกกลุ่มโดยใช้ 16S rRNA gene

แหล่งที่พบแบคทีเรีย

AOA สามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ในทะเลและในดิน โดยสามารถเจริญเติบโตได้ในที่อุณหภูมิสูงกว่า 74 องศาเซลเซียส (*Nitrosocaldus yellowstonii*) ที่ pH ต่ำกว่า 4 (*Nitrosotalea devanaterre*) หรือที่ที่อุณหภูมิสูงถึง 97 องศาเซลเซียส ที่บริเวณน้ำพุร้อน และบริเวณที่ pH ต่ำกว่า 2.5 จะสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Stahl และ de la Torre, 2012) รวมถึง *Nitrososphaera viennensis* ที่พบว่าสามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูงและเจริญเติบโตร่วมกับ AOB กลุ่ม Oligotrophic bacteria ammonia oxidizers (Tourna และคณะ, 2011) และจากการรายงานของ (Park และคณะ, 2006) ทำให้ทราบว่าสามารถพบ AOA ได้ที่ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอกติเวตเตดสลัดจ์ด้วย

สภาวะแวดล้อมในการเจริญของแบคทีเรีย

AOA สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ pH ระหว่าง 7.5 – 8.2, อุณหภูมิระหว่าง 25 - 30 °C (Martens-Habbenha และคณะ, 2009, Park และคณะ, 2010)

3.3.4 NOB (Nitrite oxidizing bacteria - *Nitrobacter*)

ข้อมูลทั่วไป

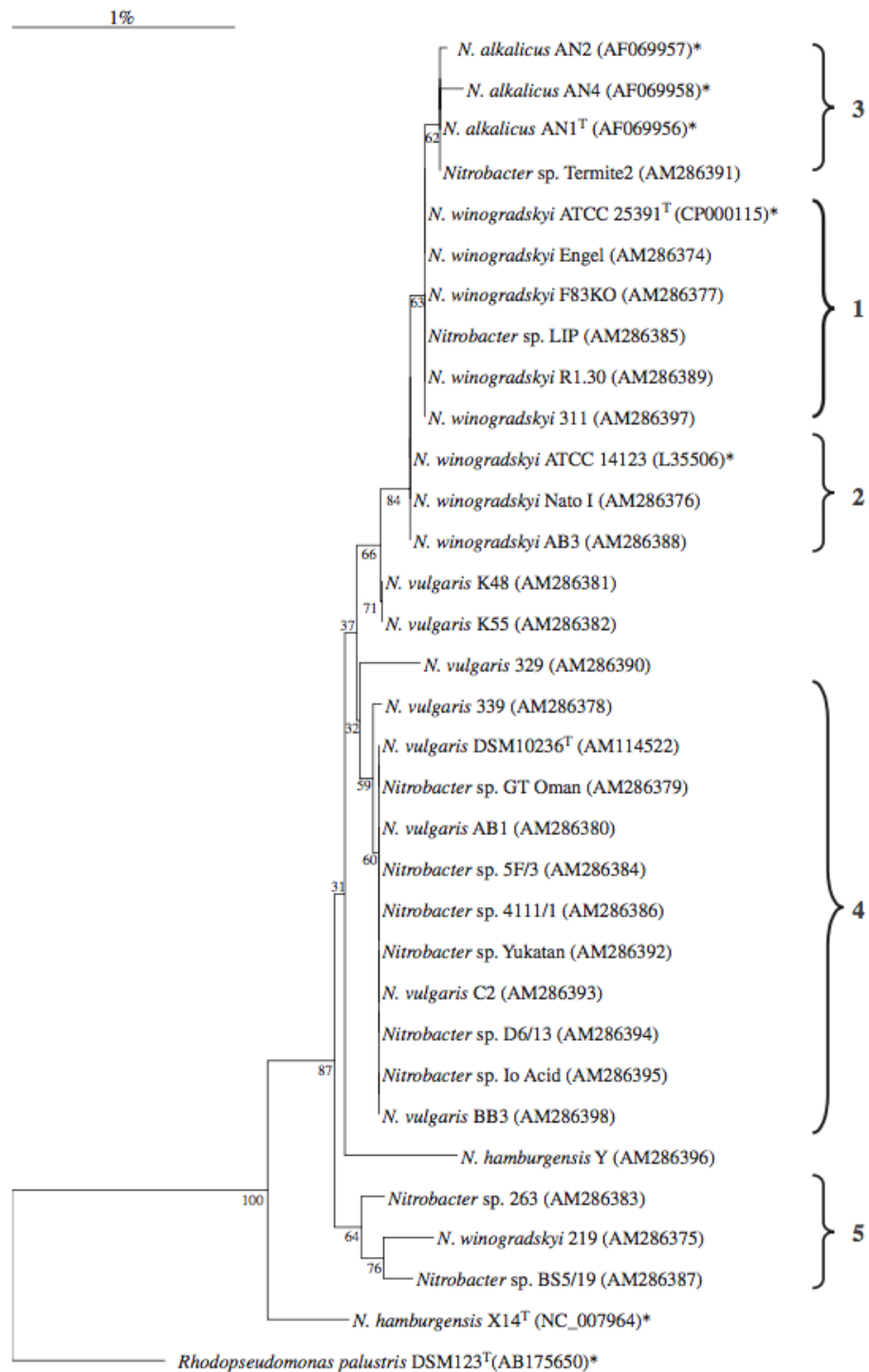
Nitrobacter เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ในกลุ่ม Chemoautotrophic Nitrite oxidizing bacteria ที่สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้กลายเป็นไนเตรท โดยมีไนไตรท์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) โดยอาศัยเอนไซม์ไนไตรท์ออกซิโดรีดักเทส (Nitrite oxidoreductase, NXR) ดังสมการ



โดย *Nitrobacter* สามารถเติบโตได้ดีที่ pH 7.3- 7.5 จะตายถ้าอุณหภูมิมากกว่า 49 องศาเซลเซียสและต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส

ประเภทของแบคทีเรีย

เมื่อแบ่งตามสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic group) จะจัด *Nitrobacter* อยู่ในกลุ่มของ α -Proteobacteria โดยใช้การจัดลำดับเบส 16S rRNA สามารถแบ่งได้ดังนี้ *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter alkalicus*, *Nitrobacter vulgaris* และ *Nitrobacter hamburgensis* (Vanpary และคณะ, 2007) ดังรูปที่ 8 (Vanparys และคณะ, 2007)



รูปที่ 8 สายวิวัฒนาการของ *Nitrobacter* โดยใช้ 16S rRNA gene

แหล่งที่พบแบคทีเรีย

สามารถพบได้ทั้งในดิน น้ำจืดและแหล่งน้ำเค็ม และจากการศึกษาของ Huang และคณะในปี 2010 ที่ได้ทำการศึกษาในถังเติมอากาศของระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอกติเวตเตดสลัดจ์ สามารถพบ *Nitrobacter* ที่ความเข้มข้นเฉลี่ย $1.87 \pm 1.78 \times 10^{12}$ เซลล์/ลิตร ซึ่งคิดเป็น $24\% \pm 18\%$ ของ NOB ทั้งหมด

สภาวะแวดล้อมในการเจริญของแบคทีเรีย

Nitrobacter สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ pH ระหว่าง 7.3 – 7.5, อุณหภูมิระหว่าง 30 - 45 °C (Huang และคณะ, 2010, Vanparys และคณะ, 2007)

3.3.5 NOB (Nitrite oxidizing bacteria - *Nitrotoga*)

ข้อมูลทั่วไป

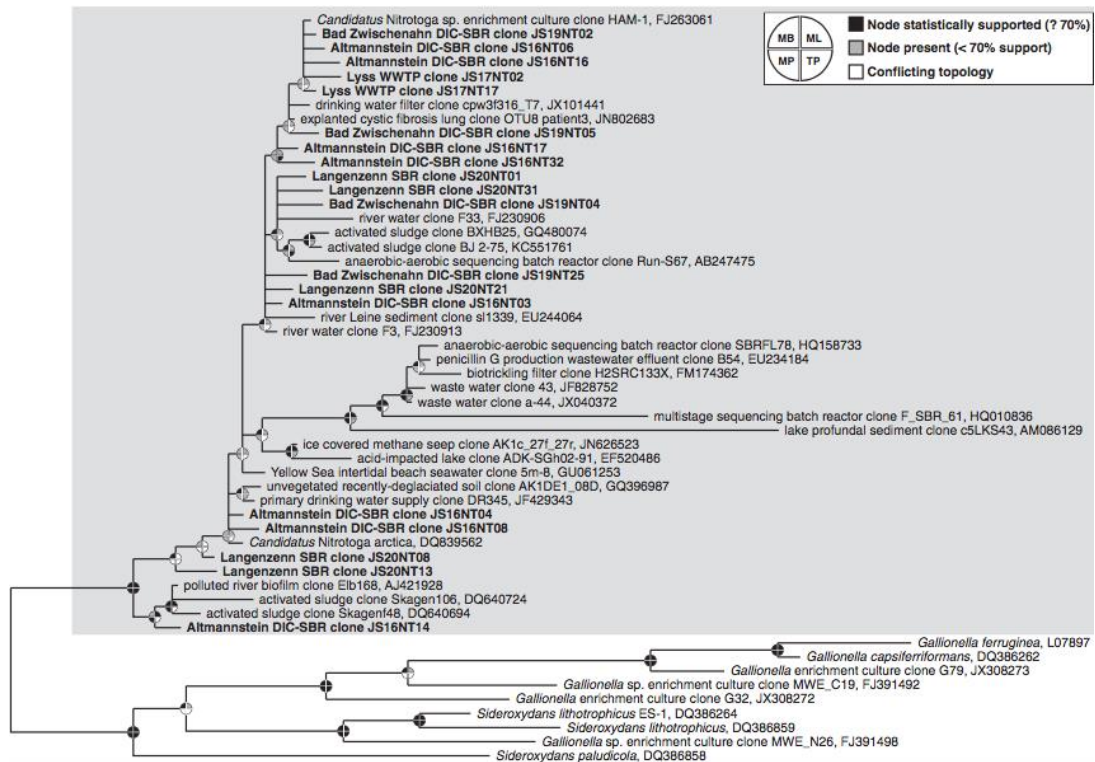
Nitrotoga เป็นแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Betaproteobacterium พบครั้งแรกในดินของบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำโดย Alawi และคณะ ในปี 2007 และให้ชื่อว่า *Candidatus Nitrotoga arctica* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้กลายเป็นไนเตรท โดยมีไนไตรท์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งของคาร์บอน (Carbon source) โดยอาศัยเอนไซม์ไนไตรท์ออกซิโดรีดักเทส (Nitrite oxidoreductase, NXR) ดังสมการ



Nitrotoga สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 4 - 22 องศาเซลเซียส โดยเหมาะสมที่ 10 องศาเซลเซียสและสามารถมีการเจริญได้ที่ความเข้มข้นไนไตรท์ต่ำ (0.3 มิลลิโมลต่อลิตร) ทนสูงสุดที่ 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร (Alawi และคณะ, 2007)

ประเภทของแบคทีเรีย

Candidatus Nitrotoga arctica จัดอยู่ในจีโนส *Nitrotoga* วงศ์ Gallionellaceae และอันดับ Gallionellales โดยเป็นกลุ่มของ Beta-proteobacteria ซึ่งในวงศ์ Gallionellaceae นี้ยังมี iron-oxidizing (*Gallionella*) และ *Sideroxydans* ด้วย และจากการทดลองของ Lucker และคณะ ในปี 2015 โดยใช้ 16S rRNA ที่มีความสัมพันธ์กับ *Nitrotoga arctica* strain 6680 ได้ผลดังรูปที่ 9 (Lücker และคณะ, 2015)



รูปที่ 9 สายวิวัฒนาการของ จีโนส *Nitrotoga* และสมาชิกในวงศ์ Gallionellacea

แหล่งที่พบแบคทีเรีย

สามารถพบได้ทั้งในระบบบำบัดน้ำเสีย, ระบบบำบัดน้ำดื่ม, ดิน, น้ำใต้ดิน, ทะเลสาบ, แม่น้ำ, น้ำทะเลรวมถึงตะกอนจากน้ำทะเลอีกด้วย (Alawi และคณะ, 2007)

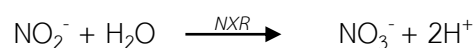
สภาวะแวดล้อมในการเจริญของแบคทีเรีย

Nitrotoga สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 7 – 36 °C (Lücker และคณะ, 2015) แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่า *Nitrobacter* จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า NOB สายพันธุ์อื่นที่อุณหภูมิต่ำ

3.3.6 NOB (Nitrite oxidizing bacteria - *Nitrospira*)

ข้อมูลทั่วไป

Nitrospira เป็นแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Chemoautotrophic nitrifying bacteria ที่สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้กลายเป็นไนเตรทโดยกระบวนการ nitrification โดยมีไนไตรท์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) โดยอาศัยเอนไซม์ไนไตรท์ออกซิโดรีดักเทส (Nitrite oxidoreductase, NXR) ดังสมการ



เช่นเดียวกับ NOB อื่นๆ และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Nitrospira* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 ดัดแปลงจาก (Lebedeva และคณะ, 2008)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียไนจิรัส *Nitrospira*

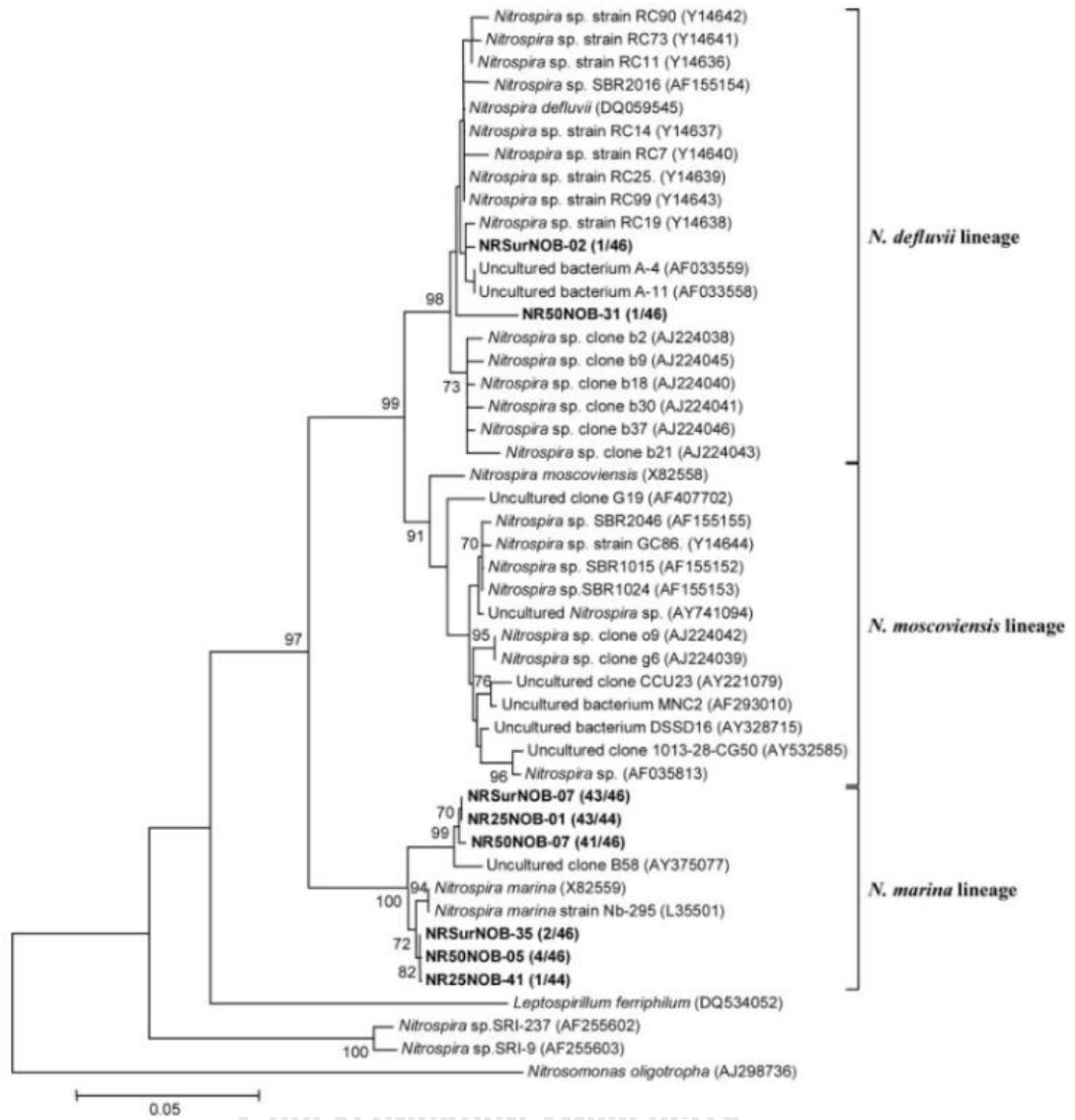
ลักษณะ	<i>Candidatus Nitrospira bockiana</i>	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	<i>Nitrospira marina</i>
ขนาด	0.3 – 0.66 x 1.0 – 2.5 หรือ 0.9 x 0.9	0.2 – 0.46 x 0.7 – 1.7	0.2 – 0.46 x 0.9 – 2.2	0.3 – 0.46 x 0.8 – 1.0
อุณหภูมิที่ชอบ (°C)	44 – 46	28 – 32	39	28
ปริมาณไนโตรเจนที่ทนได้ (mM)	26 – 30	20 – 25	15	6

ประเภทของแบคทีเรีย

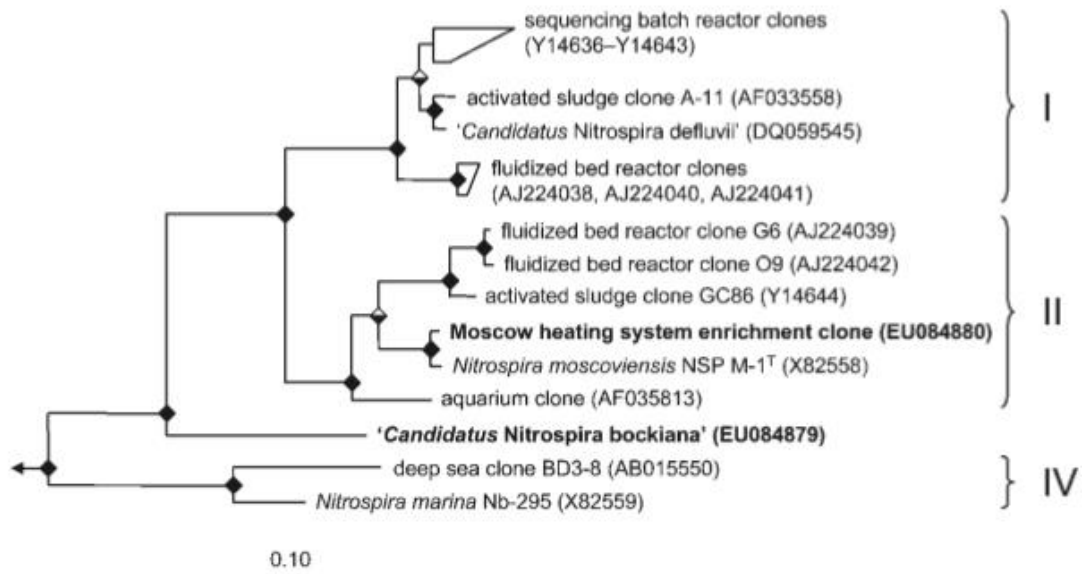
Nitrospira สามารถแบ่งตามสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic group) ตามการทดลองของ Satoh และคณะในปี 2007 จะจัดอยู่ในไฟลัมไนโตรสไปรา และสามารถแบ่ง *nitrospira* เป็น 4 กลุ่มย่อย (sublineage) (Satoh และคณะ, 2007) คือ

- *Nitrospira defluvii* sublineage,
- *Nitrospira moscoviensis* sublineage,
- *Nitrospira marina* sublineage

และกลุ่มย่อยอีกหนึ่งกลุ่มที่ไม่ใช่สกุล *Nitrospira* และในปี 2008 Lebedeva และคณะ ได้ค้นพบประชากรกลุ่ม NOB กลุ่มใหม่ คือ *Candidatus Nitrospira bockiana* (Lebedeva และคณะ, 2008) แต่ยังไม่มีการจัดเข้ากลุ่ม sublineage ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ดังรูปที่ 10 (Satoh และคณะ, 2007) และ 11 (Lebedeva และคณะ, 2008)



รูปที่ 10 สายวิวัฒนาการของ *Nitrospira*



รูปที่ 11 สายวิวัฒนาการของ *Candidatus Nitrospira* โดยใช้ 16S rRNA genes

แหล่งที่พบแบคทีเรีย

Nitrospira สามารถที่จะมีชีวิตรอดอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำเค็มและน้ำจืด ตามรายงานของ Daims และคณะในปี 2001 สามารถพบได้ในน้ำทะเล แม่น้ำลำธาร น้ำในพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำ (Daims และคณะ, 2001) ตะกอนสามเหลี่ยมปากแม่น้ำ ตะกอนจากทะเลลึก ในดินและในท่อน้ำร้อนที่ทำจากเหล็ก และจากการศึกษาของ Huang และคณะในปี 2010 ที่ได้ทำการศึกษาในถังเติมอากาศของระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Activated sludge สามารถพบ *Nitrospira* ที่ความเข้มข้นเฉลี่ย $5.71 \pm 2.68 \times 10^{12}$ เซลล์/ลิตร ซึ่งคิดเป็น $76\% \pm 18\%$ ของ NOB ทั้งหมด (Huang และคณะ, 2010)

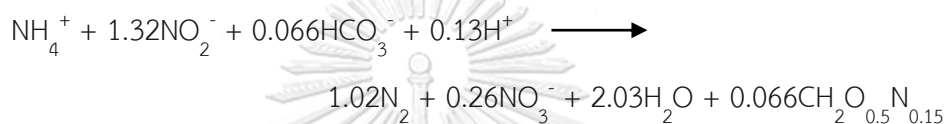
สภาวะแวดล้อมในการเจริญของแบคทีเรีย

Nitrospira สามารถเจริญเติบโตได้ที่ pH 7.6, อุณหภูมิระหว่าง 28 – 46, ค่า DO ที่ 0.87 mg/L และแอมโมเนียที่ 29.36 mg/L (Huang และคณะ, 2010, Lebedeva และคณะ, 2008)

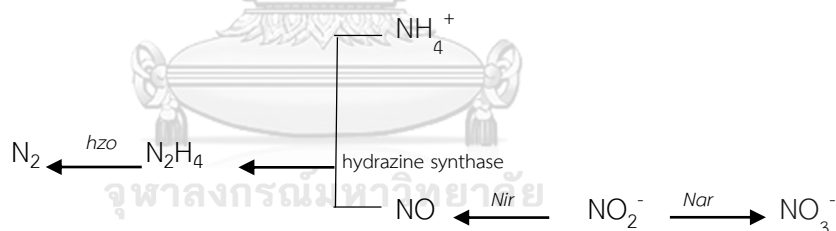
3.3.7 ANAMMOX (Anaerobic ammonia oxidation)

ข้อมูลทั่วไป

Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) ถูกค้นพบครั้งแรกในช่วงปี 1990s ในตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสีย (Kuenen, 2008) เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในกระบวนการบำบัดไนโตรเจน เนื่องจากสามารถเปลี่ยนแอมโมเนียและไนโตรที่ให้เป็นก๊าซไนโตรเจนได้โดยตรง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยมีแอมโมเนียเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ไนโตรที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) และใช้ไบคาร์บอเนต (bicarbonate) เป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) ในการสร้างเซลล์ ดังสมการออกซิเดชันแบบไร้ออกซิเจนของกระบวนการ Anammox (Strous และคณะ, 1998)

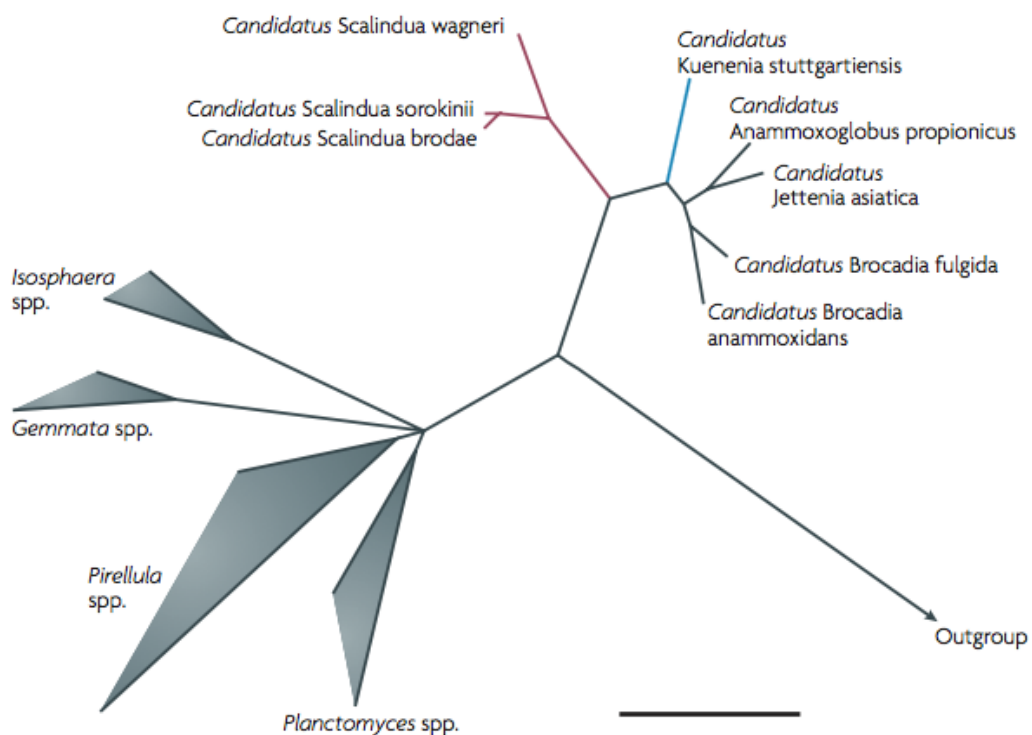


และอาศัยการทำงานของเอนไซม์แมมเบรนบราวด์ไนเตรตรีดักเทส (membrane bound nitrate reductase, NAR), ไนโตรตรีดักเทส (Nitrite reductase, NIR) และไฮดราซีนออกไซด์ (Hydrazine oxidase, HZO) ดังสมการ (Kartal และคณะ, 2011)



ประเภทของแบคทีเรีย

Anammox ถูกจัดอยู่ในไฟลัม Planctomycetes โดยแบคทีเรียชนิดนี้ถูกค้นพบเป็นพวกแรก ชื่อ *Candidatus Brocadia anammoxidans* และจากการสำรวจในโรงบำบัดน้ำเสียต่าง ๆ ยังพบกลุ่มแบคทีเรีย Anammox ที่แตกต่างกันออกไปแบ่งได้อีก 3 สายพันธุ์ (พีรภาส นรินทร์หงษ์ทอง, 2553) ดังนี้ *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri* และ *Candidatus Scalindua brodae* และสุดท้ายคือ *Candidatus Scalindua sorokinii* ที่ถูกค้นพบในบริเวณปราศจากออกซิเจนในทะเลดำ (Blacksea) และในบริเวณมหาสมุทรในระดับน้ำที่ลึก นอกจากนี้จากงานวิจัย ยังพบ Anammox สายพันธุ์ใหม่คือ *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* ใน fed-batch enrichments (ที่มีแอมโมเนียและไนโตรที่อยู่) (Kuenen, 2008) ดังรูปที่ 12 (Kuenen, 2008)



รูปที่ 12 สายวิวัฒนาการของ Anammox แบคทีเรีย โดยใช้ 16S rRNA gene

แหล่งที่พบแบคทีเรีย

จากการศึกษามีการค้นพบ Anammox ครั้งแรกทีในระบบบำบัดน้ำเสียที่มนุษย์สร้างขึ้น นอกจากนี้ยังมีการค้นพบจากที่ต่าง ๆ มากมาย เช่น ตะกอนจากทะเลในสภาวะปราศจากออกซิเจน, ตะกอนน้ำจืด, บนพื้นดินและระบบนิเวศพิเศษอย่างถังเก็บน้ำมัน โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 3 และจากการศึกษาของ Hu และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 พบว่า กระบวนการ Anammox มีบทบาทประมาณ 9 - 40 % ในการกำจัดไนโตรเจนบริเวณทะเลสาบและ 4 - 37 % ในดินของบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม ดังแสดงในตารางที่ 3 (Hu และคณะ, 2011)

ตารางที่ 3 การกระจายตัวของ Anammox แบคทีเรีย

	16s rRNA affiliation	Contribution (%)
Marine sediments		
Skagerak (North Sea)	ND (No data)	24–67
Thames Estuary (U.K.)	ND	1–8
Randers Fjord (Denmark)	<i>Scalindua</i>	5–24
Greenland Sea (Greenland)	<i>Scalindua</i>	>19
Disko Bay (Greenland)	<i>Scalindua</i>	ND
Cascadia Basin (U.S.A)	ND	40–42
Gullmarsfjorden (Sweden)	ND	23–47
Barents Sea (Greenland)	<i>Scalindua</i>	ND
Golfo Dulce (Costa Rica)	<i>Scalindua</i>	ND
Young Sound (Greenland)	<i>Scalindua</i>	ND
North Sea (North of the Friesian Front)	<i>Scalindua</i>	ND
Yodo Estuary (Japan)	<i>Scalindua, Brocadia,</i>	1–2
Chesapeake Bay (U.S.A.)	<i>Kuenenia</i>	0–22
Cape Fear River Estuary (U.S.A.)	<i>Scalindua</i> <i>Scalindua, Brocadia,</i> <i>Kuenenia, Jettenia</i>	4–17 33–65
North Atlantic	ND	ND
Jiaozhou Bay (China)	<i>Scalindua</i>	ND
Mai Po Marshes (Hong Kong)	<i>Scalindua, Kuenenia</i>	ND
South China Sea (China)	<i>Scalindua</i>	ND
Equatorial Pacific	<i>Scalindua</i>	<2
Haiphong (Vietnam)	<i>Scalindua, Brocadia,</i> <i>Kuenenia</i>	

	16s rRNA affiliation	Contribution (%)
Marine water columns		
Golfo Dulce (Costa Rica)	<i>Scalindua</i>	19–35
Black Sea	<i>Scalindua</i>	10–15
Namibian waters	<i>Scalindua</i>	Approximately 100
Peruvian waters	<i>Scalindua</i>	Approximately 100
Northern Chile	<i>Scalindua</i>	Approximately 100
Arabian Sea	<i>Scalindua</i>	<13
Freshwater ecosystems		
Lake Tanganyika (Kigoma)	<i>Scalindua</i>	9–13
Wintergreen Lake (U.K.)	<i>Scalindua</i>	ND
Xinyi River (China)	<i>Brocadia</i>	ND
Groundwater (Canada)	<i>Scalindua, Brocadia, Kuenenia, Jettenia</i>	18–36
Lake Kitaura (Japan)	<i>Brocadia, Kuenenia, Jettenia, Anammoxoglobus</i>	<40
Terrestrial ecosystems		
Various terrestrial habitats (Switzerland)	<i>Scalindua, Brocadia, Kuenenia, Jettenia</i>	ND
Peat soil (The Netherlands)	<i>Brocadia, Kuenenia, Jettenia</i>	ND
Paddy soil (Southern China)	<i>Brocadia, Kuenenia, Jettenia, Anammoxoglobus</i>	4–37
Special ecosystems		
Hot springs (U.S.A.)	<i>Brocadia, Kuenenia</i>	ND
Hydrothermal vents (Mid-Atlantic Ridge)	<i>Scalindua, Kuenenia</i>	ND
Marine sponge (Norway)	<i>Scalindua</i>	0–1
Marine sponge (U.S.A.)	<i>Brocadia</i>	ND
Petroleum reservoirs (China)	<i>Scalindua, Brocadia, Kuenenia, Jettenia</i>	ND

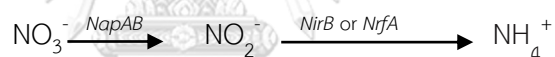
สภาวะแวดล้อมในการเจริญของแบคทีเรีย

Anammox สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ค่า O_2 0.02 mg/L, pH 6.7 – 8.3 และอุณหภูมิ 20 – 43 °C จากการศึกษาพบว่าถ้าค่าของ NO_2^- มากกว่า 70 mg/L จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ Anammox ได้ (Schmid และคณะ, 2003, Strous และคณะ, 1998)

3.3.8 DNRA (Dissimilatory nitrate reduction to ammonium)

ข้อมูลทั่วไป

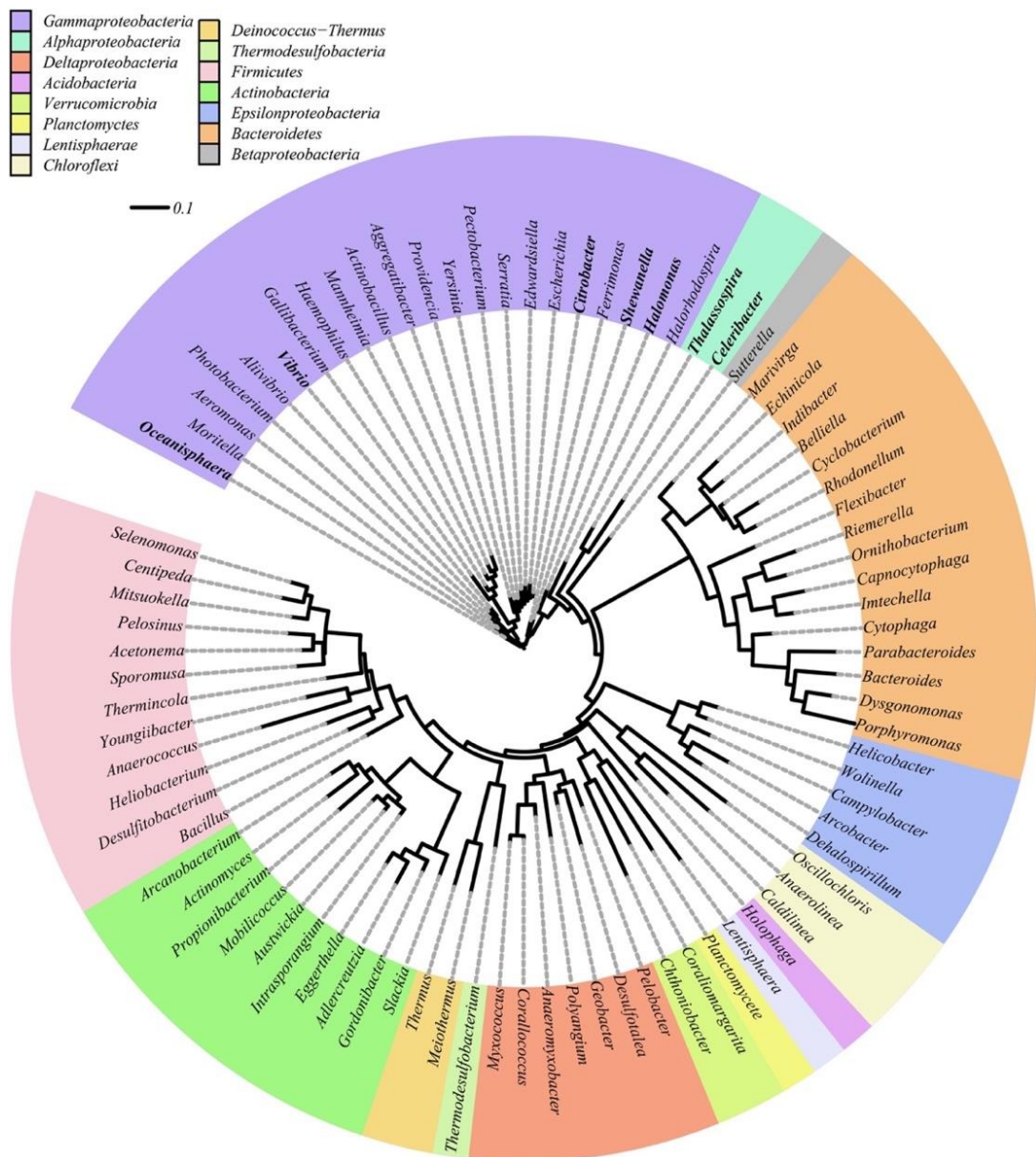
Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นแอมโมเนีย ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน โดยมีไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) และซัลไฟด์หรือสารอินทรีย์คาร์บอนตัวอื่น ๆ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ พอร์พลาสติกไนเตรทรีดักเทสคอปเพล็กซ์ (periplasmic nitrate reductase complex, *NapAB*) ในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์, ไซโทพลาสติกเอ็นเอตีเอซตีเพนเดนทีไนไตรท์รีดักเทส (cytoplasmic NADH dependent nitrite reductase, *NirB*) หรือเพนตะฮีมไซโตโครมซีไนไตรท์รีดักเทส (pentaheme cytochrome C nitrite reductase, *NrfA*) เปลี่ยนไนไตรท์เป็นแอมโมเนียมไอออน ดังสมการ



นอกจากนี้ ในการทดลองของ Sanford และคณะในปี 2012 ได้แสดงให้เห็นว่ามีเอนไซม์ Atypical nitrous oxide reductase (*nosZ*) ที่มาสามารถเปลี่ยนไนตรัสออกไซด์เป็นไนโตรเจนแก๊สได้เช่นกัน (Sanford และคณะ, 2012)

ประเภทของแบคทีเรีย

จากการศึกษาของ Decleyre และคณะในปี 2015 ได้ทำการแบ่ง DNRA จาก *nrfA* gene ได้จัดให้อยู่ในกลุ่ม Gamma-proteobacteria and Alpha-proteobacteria และในกลุ่มอื่น ๆ ดังรูปที่ 13 พบว่าแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่พบอยู่เพียงในกลุ่ม Gamma-proteobacteria (Decleyre และคณะ, 2015)



รูปที่ 13 สายวิวัฒนาการของ DNRA โดยใช้ 16S rRNA genes ที่พบ *nrfA* gene

แหล่งที่พบแบคทีเรีย

DNRA สามารถพบได้ที่ดิน, ดินที่มีความเค็ม, ตะกอนจากทะเลและตะกอนปากแม่น้ำ (Tiedje, 1988) โดยในตะกอนดินบริเวณชายฝั่ง พบได้ที่ความลึกมากกว่า 5 เซนติเมตร และการทดลองของ van den Berg และคณะในปี 2015 ที่ทำการเพาะเลี้ยง DNRA ในถังปฏิกรณ์ที่มีการจำลองสัดส่วน COD:N ที่สูงเหมือนในถังของระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งได้สำเร็จ (Van Den Berg และคณะ, 2015) นอกจากนี้ในงานของ Kashima และ Regan ในปี

2015 สามารถพบ DNRA ได้ในฟิล์มชีวภาพของ electrode-respiring ของระบบบำบัดน้ำเสียได้ (Kashima และ Regan, 2015)

สภาวะแวดล้อมในการเจริญของแบคทีเรีย

DNRA สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ อุณหภูมิ 15 - 20 °C, pH 7.1 – 7.2 และที่ความเข้มข้น NH_4^+ เริ่มต้น 4 mM (Decleyre และคณะ, 2015, Van Den Berg และคณะ, 2015)

3.4 การตรวจวัดจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR เป็นเทคนิคที่ได้ผลดีกับการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียเป้าหมายที่มีกิจกรรมต่ำ ๆ โดยขั้นตอนการทำประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ให้ออกเป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90 - 95 °C เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมกันของดีเอ็นเอสายคู่ดังกล่าว

2. ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 50 - 55 °C เพื่อให้ Primer ที่เราเลือกมาสามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยว บริเวณลำดับของเบสคู่สมที่ตรงกัน

3. ขั้นตอน Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกมาจาก Primer ที่เราเลือก ในลำดับการสร้างที่มีทิศทางจาก 5' ไป 3' โดยอุณหภูมิของขั้นตอนนี้ จะอยู่ในช่วงประมาณ 70 - 75 °C

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ จะดำเนินการเรียงลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20 - 30 รอบ ทำให้เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ จะได้ PCR product หรือ amplified product ที่มาจาก primer ที่เราสนใจเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก สำหรับ primer ที่เลือกใช้ในการทำ PCR นั้นมีทั้งที่เป็น universal primer ที่เฉพาะเจาะจงบริเวณยีน 16S rRNA หรือ specific primer ที่เฉพาะเจาะจงทั้งบริเวณยีน 16s rRNA หรือ functional gene ก็ได้ สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้ specific primer ในการเพิ่มจำนวนเฉพาะยีนของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการกำจัดไนโตรเจนที่สนใจ ดังแสดงในตารางที่ 4 – 11 ที่แสดงไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในการตรวจวัด COMAMMOX, AOB, AOA, NOB (*Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrospira*, Anammox และ DNRA) ตามลำดับ

3.4.1 Comammox (Complete ammonia oxidation)

ตารางที่ 4 โพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ Comammox

Gene	Primers	Sequence (5'-3')	Target site	Annealing temperature (°C)	References
16S rRNA	28F 519R	GAGTTTGATCNTGGCTCAG GTNTTACNG CGGCKGCTG	500	60	(Gonzalez-Martinez และคณะ, 2016)
<i>amoA</i>	ComaA-224f ComaA-659R ComaB-224f ComaB-659R	TAYAAAYTGGGTSAAAYTA ARATCATSGTGCTRTG TAYTTCTGGACRTTYTA ARATCCARACDGTGTG	415	42 - 52	(Pjevac และคณะ, 2017)

3.4.2 AOB (Ammonia oxidizing bacteria)

ตารางที่ 5 โพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ AOB

Gene	Primers	Sequence (5'-3')	Target site	Annealing temperature (°C)	References
16S rDNA	CTO189f A/B ^b CTO189f C ^b CTO654r	GGAGRAAAGCAGGGGATCG GGAGGAAAGTAGGGGATCG CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC	189 - 207 189 - 207	61	(Kowalchuk และคณะ, 1997)
16S rRNA	nitA nitB	CTTAAGTGGGAATAACGCATC G TTACGTGTGAAGCCCTACCCA	137 - 159 1214 - 1234	58	(Voytek และ Ward, 1995)

Gene	Primers	Sequence (5'–3')	Target site	Annealing temperature (°C)	References
<i>Hao</i> gene	<i>Hao-f</i> <i>Hao-r</i>	GA(C/T)ATICCIGA(C/T)GA(A/G))C/T)TITA(C/ T)GA GTTTCATIGGICCCCAICTICAGT GTA	440 - 490	45	(Bergmann และคณะ, 2005)
<i>amoA</i> gene	<i>amoA-1f</i> <i>amoA-2r</i>	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	491	55	(Rotthauwe และคณะ, 1997)
<i>amoA</i> gene	<i>amoA-1Fmod</i> GenAOBR	CTGGGGTTTCTACTGGTGGTC GCAGTGATCATCCAGTTGCG	673		(Meinhardt และคณะ, 2015)

3.4.3 AOA (Ammonia oxidizing archaea)

ตารางที่ 6 โพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ AOA

Gene	Primers	Sequence (5'–3')	Target site	Annealing temperature (°C)	References
<i>amoA</i> gene	Arch- <i>amoAF</i> Arch- <i>amoAR</i>	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATGT	635	53	(Francis และคณะ, 2005)
<i>amoA</i> gene	<i>amo196F</i> <i>amo277R</i>	GGWGTKCCRGGRACWGCMAC CRATGAAGTCRTAHGGRTADCC		55	(Treusch และคณะ, 2005)
<i>amoA</i> gene	<i>amo111F</i> <i>amo643R</i>	TTYTAYACHGAYTGGGCHTGGACAT C TCCCCTTWGACCARGCGGCCATC CA		55	(Treusch และคณะ, 2005)

Gene	Primers	Sequence (5'–3')	Target site	Annealing temperature (°C)	References
<i>amoA</i> gene	CrenAmo AQ-F CrenAmo AModR	GCARGTMGGWAARTTCTAYAA AAGCGGCCATCCATCTGTA		60	(Mincer และ คณณะ, 2007)
<i>amoA</i> gene	GenAOAF GenAOAR	ATAGAGCCTCAAGTAGGAAAGTTCTA CCAAGCGGCCATCCAGCTGTATGTCC			(Meinhardt และคณณะ, 2015)

3.4.4 NOB (Nitrite oxidizing bacteria - *Nitrobacter*)

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ NOB (*Nitrobacter*)

Gene	Primers	Sequence (5'–3')	Target site	Annealing temperature (°C)	References
16S rRNA	FGPS872f FGPS1269r	CTAAAACTCAAAGGAATTGA TTTTTTGAGATTTGCTAG	872- 1269	51	(Geets และ คณณะ, 2007)
16S rRNA	P338f NIT3	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG CCTGTGCTCCATGCTCCG	635	65	(Jie และ Daping, 2008)
16S rRNA	<i>Nitro</i> -1198f <i>Nitro</i> -1423r	ACCCCTAGCAAATCTCAAAAA CCG CTTCACCCCAGTCGCTGACC		58	(Graham และ คณณะ, 2007)
<i>nxr</i> gene	NxA-1F NxB-1R	GCATGGATCCGGTGTGGATCA CCGTGCTGTTGAYCTCGTTGA	3242- 3262 470-490	55	(Vanparys และ คณณะ, 2007)

3.4.5 NOB (Nitrite oxidizing bacteria - *Nitrotoga*)

ตารางที่ 8 โพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ NOB (*Nitrotoga*)

Gene	Primers	Sequence (5'-3')	Target site	Annealing temperature (°C)	References
16S rRNA	Ntoga124F Ntoga1462R	ATCGGAACGTACCCGGAAA CGAACCTACCGTGGCAAC	1,300	63	(Lücker และคณะ, 2015)

3.4.6 NOB (Nitrite oxidizing bacteria - *Nitrospira*)

ตารางที่ 9 โพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ NOB (*Nitrospira*)

Gene	Primers	Sequence (5'-3')	Target site	Annealing temperature (°C)	References
16S rRNA	NSR1113f NSR1264r	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG GTTTGCAGCGCTTGTACCG	1113 - 1264	65	(Dionisi และคณะ, 2002)
16S rDNA	P338f Ntspa0685	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG CGGGAATTCCGCGCTC	320	52	(Liu และคณะ, 2008)
16S rDNA	EUB338 Ntspa0685	ACTCCTACGGGAGGCAGC CGGGAATTCCGCGCTC	320	52	(Amann และคณะ, 1990)
16S rRNA	Nspra-675f Nspra-746r	GCGGTGAAATGCGTAGAKAT CG TCAGCGTCAGRWAYGTTCCA GAG		58	(Graham และคณะ, 2007)
16S rRNA	m27f Nspra746r	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG TCAGCGTCAGRWAYGTTCCA GAG		58	(Abdulrasheed และคณะ, 2018)

3.4.7 ANAMMOX (Anaerobic ammonia oxidation)

ตารางที่ 10 โพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ Anammox

Gene	Primers	Sequence (5'–3')	Target site	Annealing temperature (°C)	References
16S rRNA	A438f A684r	GTCRGGAGTTADGAAATG ACCAGAAGTTCCACTCTC	248	55	(Humbert และคณะ, 2012)
16S rRNA	609F 699R	TTAGATACCCC(A/G/T)GTA GT AGGGTTGCGCTCGTTGC	785–806 1099– 1114	50 - 65	(Schmidt และคณะ, 2003)
16S rRNA	An7f An1388r	GGCATGCAAGTCGAACGAGG GCTTGACGGGCGGTGTG	1,380	63	(Penton และคณะ, 2006)
16S rRNA	Brod541F Brod1260 R	GAGCACGTAGGTGGGTTTGT GGATTCGCTTCACCTCTC GG	720	60	(Penton และคณะ, 2006)
<i>hzo</i>	hzoAB1F hzoAB1R	GAAGCNAAGGCNGTAGAAAT TATCAC CTCTTCNGCAGGTGCATGAT G	600	55	(Hirsch และคณะ, 2011)
<i>hzo</i>	hzoAB4F hzoAB4R	TTGARTGTGCATGGTCTAWT GAAAG GCTGACCTGACCARTCAGG	600	55	(Hirsch และคณะ, 2011)

3.4.8 DNRA (Dissimilatory nitrate reduction to ammonium)

ตารางที่ 11 ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ PCR ของ DNRA

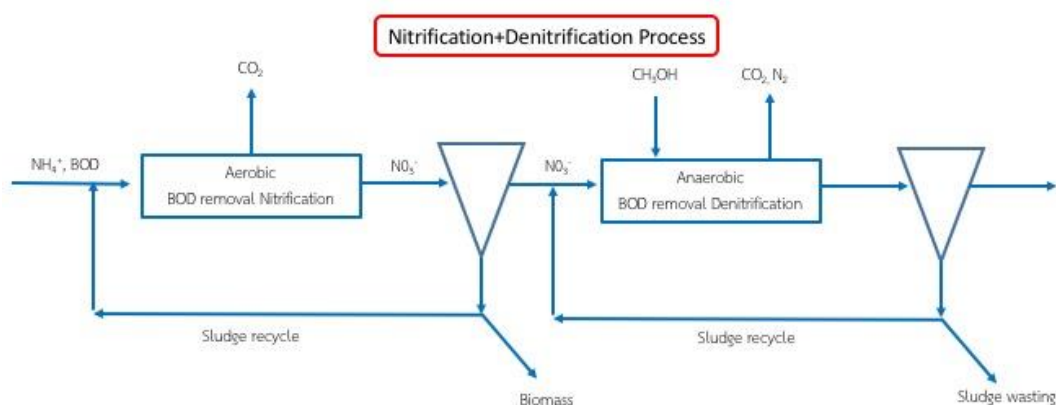
Gene	Primers	Sequence (5'–3')	Target site	Annealing temperature (°C)	References
<i>nrfA</i> gene	F1 R1	GCNTGYTGGWSNTGYAA TWNGGCATRTGRCARTC	520	45	(Mohan และคณะ, 2004)
<i>nrfA</i> gene	nrfAF2aw nrfAR1	CARTGYCAYGTBGARTA TWNGGCATRTGRCARTC	269	53	(Welsh และคณะ, 2014)
<i>napA</i>	napA V67F napA V67R	TAYTTYTNHSNAARATHATG TAYGG DATNGGRTGCATYTCNGCCATRTT	414	55	(Smith และคณะ, 2007)
<i>narG</i>	narG 1960F narG 2659R	TAYGTSGGCCARGARA TTYTCGTACCAGGTGGC TTYTCRTACCABGTBGC	650	60	(Smith และคณะ, 2007)
<i>nirS-m</i>	nirS-mF nirS-mR	GGAAACCTGTTCGTCAAGAC CSGARTCCTTGCGCAGCT	162	60	(Smith และคณะ, 2007)
<i>nirS-n</i>	nirS-nF nirS-nR	AAGGAAGTCTGGATYTC CGTTGAACTTRCCGGT	140	55	(Smith และคณะ, 2007)

3.5 แนวโน้มการบำบัดไนโตรเจนในอนาคต

3.5.1 กระบวนการบำบัดแบบดั้งเดิม

3.5.1.1 กระบวนการ Nitrification + Denitrification

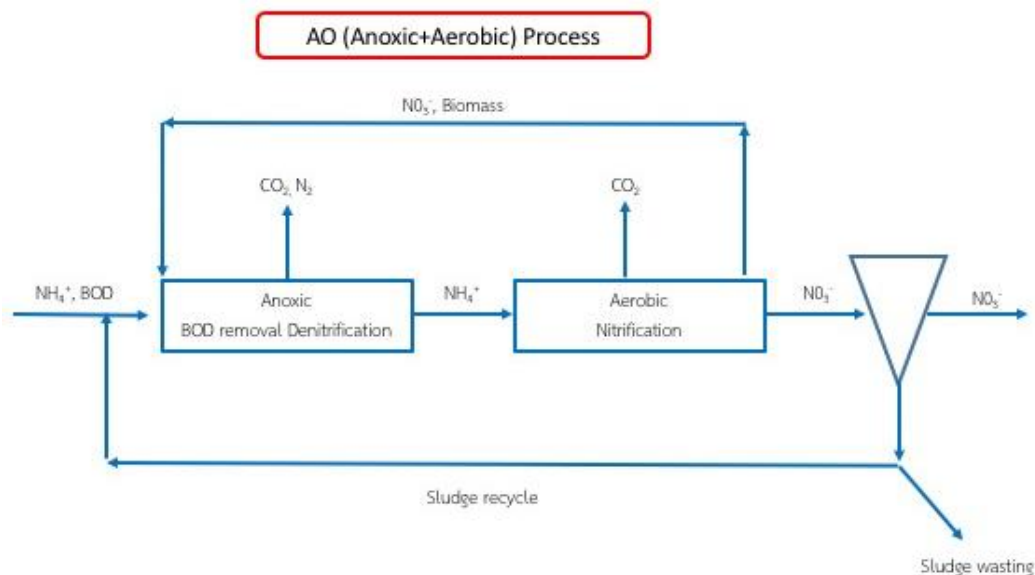
กระบวนการ Nitrification + Denitrification เป็นกระบวนการที่มี 2 ขั้นตอนของปฏิกิริยา โดยขั้นตอนแรกจะมีการเติมอากาศหรือใช้ออกซิเจนเพื่อให้เกิดไนตริฟิเคชัน คือการย่อยสลายแอมโมเนียให้หมดไปเป็นไนเตรท และขั้นตอนที่สองเกิดดีไนตริฟิเคชัน คือการเปลี่ยนจากไนเตรทให้กลายเป็นแก๊สไนโตรเจนและกำจัดออกจากระบบได้ โดยกระบวนการนี้ในขั้นตอนที่สอง จะต้องการเติมตัวให้อิเล็กตรอนคือเมทานอล ซึ่งจะทำให้เกิดการสิ้นเปลืองเพิ่มขึ้นได้ ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 กระบวนการ Nitrification + Denitrification

3.5.1.2 กระบวนการ AO (Anoxic + Aerobic)

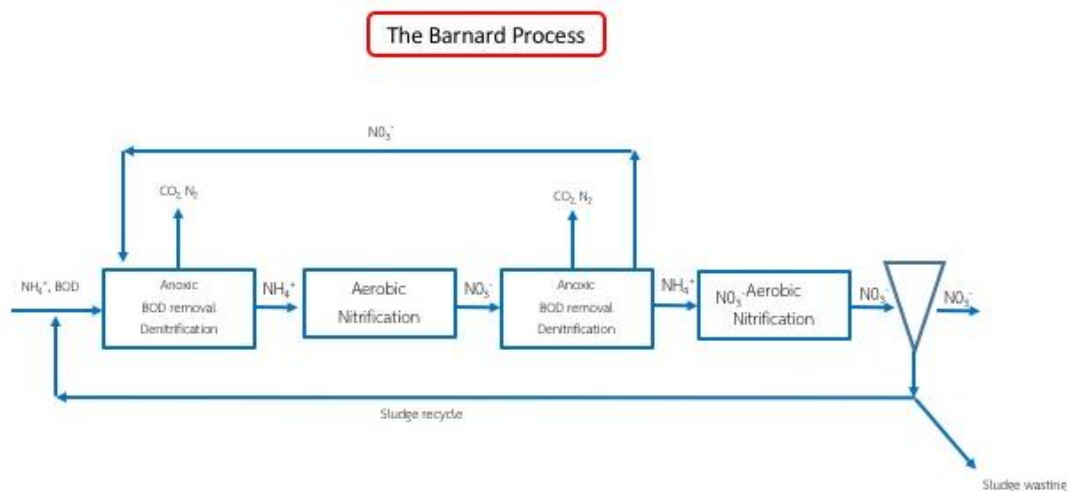
กระบวนการ AO (Anoxic + Aerobic) เป็นกระบวนการที่เริ่มต้นด้วยระบบแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anoxic) เป็นถังที่มีการบำบัดสารสกปรกในรูปบีโอดีและไนเตรทให้เปลี่ยนเป็นไนโตรเจนแก๊สเพื่อกำจัดออกนอกระบบและมีการย่อยสลายสารอินทรีย์ให้กลายเป็นแอมโมเนีย จากนั้น จึงเข้าสู่ขั้นตอนที่สองที่มีการเติมอากาศและสามารถเปลี่ยนแอมโมเนียให้กลายเป็นไนเตรท แล้วจึงวนกลับเข้าสู่ระบบในขั้นตอนที่แรกอีกครั้ง จึงเป็นการประหยัดออกซิเจนและไม่ต้องใส่ตัวให้อิเล็กตรอนอย่างในกระบวนการไนตริฟิเคชัน + ดีไนตริฟิเคชัน แต่ประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนจะต่ำ รวมถึงต้องมีการเวียนไนเตรทประมาณ 1 - 2 เท่า ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 กระบวนการ AO (Anoxic + Aerobic)

3.5.1.3 กระบวนการ The Barnard Process

กระบวนการ The Barnard Process จะเป็นกระบวนการที่มีการย่อยแบบ 4 ถัง คือ ถังที่ 1 จะเป็นการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anoxic) เป็นการย่อยสลายสารสกปรกในรูปปิวโอติและไนเตรทให้เปลี่ยนเป็นไนโตรเจนแก๊สเพื่อกำจัดออกนอกระบบและมีการย่อยสลายสารอินทรีย์ให้กลายเป็นแอมโมเนียเพื่อเข้าสู่ถังที่ 2 คือ ถังเติมอากาศจะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ในรูปปิวโอติที่เหลือและทำการย่อยแอมโมเนียโดยปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันเปลี่ยนเป็นไนเตรท จากนั้น จะมีการเวียนน้ำเสียกลับบางส่วนเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน กำจัดไนโตรเจนออกนอกระบบในถังที่ 1 ได้เพิ่มเติม ถังที่ 3 จะเหมือนกับถังที่ 1 จะเป็นการเปลี่ยนรูปไนเตรทให้หมดไป และเข้าสู่ถังที่ 4 ที่เหมือนกับถังที่ 2 ที่มีการกำจัดสารประกอบคาร์บอนในรูปปิวโอติให้หมดไปและกำจัดสารประกอบไนโตรเจนได้ จากนั้นจึงเข้าสู่ถังตกตะกอนต่อไป โดยระบบนี้ สามารถกำจัดไนโตรเจนได้มากถึง 90 - 95 % ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 กระบวนการ The Barnard Process

3.5.2 กระบวนการบำบัดแบบใหม่

3.5.2.1 กระบวนการ Partial nitrification + Nitrite denitrification

กระบวนการ Partial nitrification + Nitrite denitrification เป็นกระบวนการที่ประกอบด้วยสองขั้นตอนคือ Partial nitrification และ Nitrite denitrification ดังรูปที่ 17

Partial nitrification

ขั้นแรกจะมีการเติมอากาศหรือใช้ออกซิเจนเพื่อให้เกิด Partial nitrification คือการย่อยสลายแอมโมเนียมไอออนให้เป็นไนไตรท์ ดังสมการ

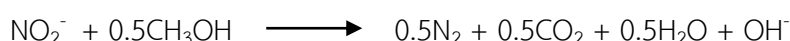


โดยปัจจัยที่ทำให้เกิด partial nitrification คือ (Sinha และ Annachhatre, 2007)

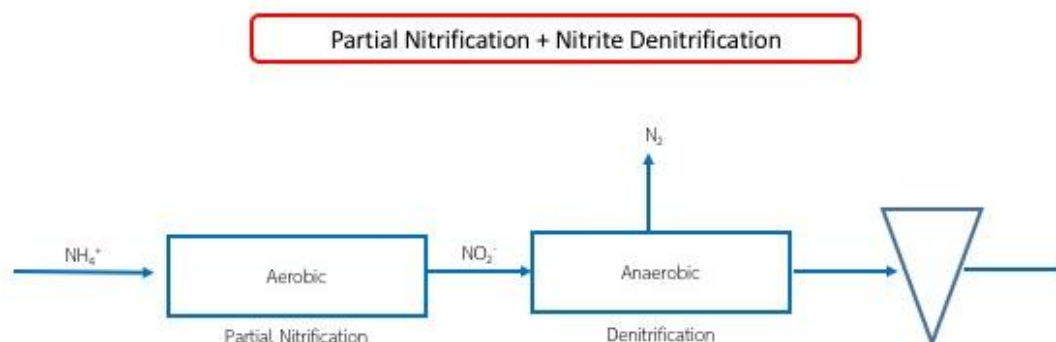
- ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิมากกว่า 25 องศาเซลเซียส
- ควบคุมค่าออกซิเจนละลายน้ำ ให้น้อยกว่า 0.5 mg/l
- ควบคุม pH ระหว่าง 7.5 – 8.5 เพื่อทำให้มีการเจริญเติบโตของของแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกไซด์เรเซอร์ (AOB) ได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มไนไตรท์ออกไซด์เรเซอร์ (NOB)

Nitrite Denitrification

ขั้นตอนนี้จะเกิดดีไนตริฟิเคชัน คือ การเปลี่ยนจากไนไตรท์ให้กลายเป็นแก๊สไนโตรเจนและกำจัดออกจากระบบได้ ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนดังสมการ



นอกจากนี้ยังพบว่า Partial nitrification สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน จากการเติมออกซิเจนได้ 25 % และ 40% จากตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับกระบวนการ denitrification (Grady Jr และคณะ, 2011)



รูปที่ 17 กระบวนการ Partial Nitrification + Nitrite Denitrification

3.5.2.2 กระบวนการ Partial Nitrification + Anammox (Anaerobic ammonium oxidation)

กระบวนการ Partial nitrification + Anammox (Anaerobic ammonium oxidation) ประกอบด้วยสองขั้นตอน คือ Partial nitrification และ Anammox ดังรูปที่ 18

Partial nitrification

ขั้นแรกจะมีการเติมอากาศหรือใช้ออกซิเจนเพื่อให้เกิด partial nitrification คือ การย่อยสลายแอมโมเนียมไอออนให้เป็นไนไตรท์ ดังสมการ

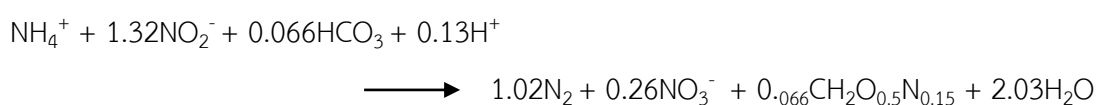


โดยปัจจัยที่ทำให้เกิด partial nitrification คือ (Sinha และ Annachatre, 2007)

- ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิมากกว่า 25 องศาเซลเซียส
- ควบคุมค่าออกซิเจนละลายน้ำ ให้น้อยกว่า 0.5 mg/l
- ควบคุม pH ระหว่าง 7.5 – 8.5 เพื่อทำให้มีการเจริญเติบโตของของแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดร์เซอร์ (AOB) ได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มไนไตรท์ออกซิไดร์เซอร์ (NOB)

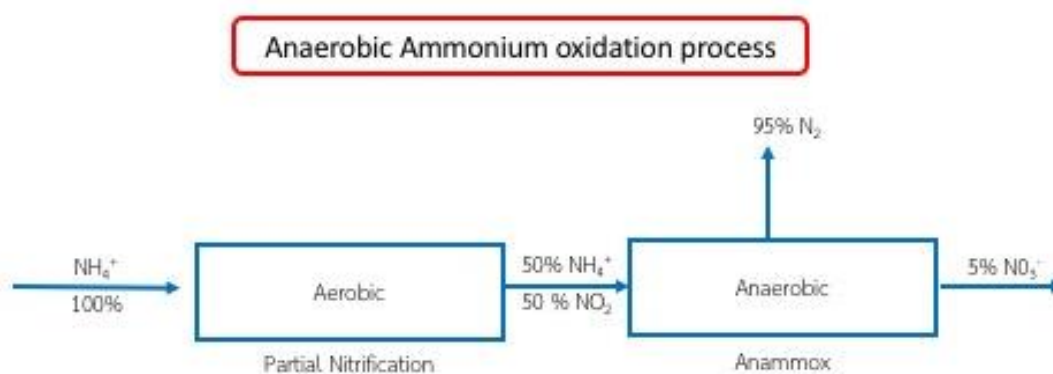
Anammox

ในขั้นตอน Anammox นี้จะมีการใช้แบคทีเรียกลุ่ม Anammox ออกซิไดร์แอมโมเนียโดยใช้ไนไตรท์เป็นตัวรีดิวซ์ตรอนได้ออกมาเป็นไนโตรเจนแก๊สเพื่อที่จะกำจัดออกจากระบบดังสมการ (Ma และคณะ, 2016)



อย่างไรก็ดีกระบวนการนี้เหมาะสำหรับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียสูง (มากกว่า $15 \text{ kgN.m}^{-3}\text{day}^{-1}$) (Schmidt และคณะ, 2003)

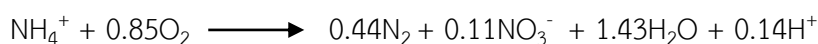
และเมื่อเปรียบเทียบกับระบบแบบ Nitrification + Denitrification พบว่าประหยัดค่าดำเนินการในการเดินระบบได้มากถึง 60 % (PAQUES, 2560) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Fux และ Siegrist ในปี 2004 ที่ใช้ระบบ Partial nitrification + Anammox เปรียบเทียบกับ Nitrification + Denitrification ก็พบว่าประหยัดค่าใช้จ่ายในการดำเนินการได้ 30 % (Fux และ Siegrist, 2004)



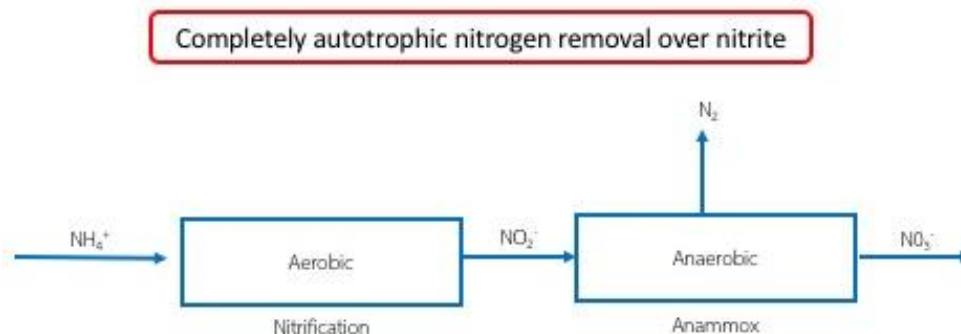
รูปที่ 18 กระบวนการ Anammox (Anaerobic ammonium oxidation)

3.5.2.3 กระบวนการ CANON (Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrate)

กระบวนการ CANON (Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrate) เป็นกระบวนการบำบัดที่มีการใช้ออกซิเจนในปริมาณที่จำกัดในถังปฏิกรณ์เดียว ดังรูปที่ 19 โดยประกอบด้วยสองขั้นตอน คือ ขั้นแรกจะมีการบังคับให้เกิด partial nitrification ย่อยสลายแอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และในขั้นตอนที่สองจะมีการใช้แบคทีเรียกลุ่ม Anammox ออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยใช้ไนไตรท์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ออกมาเป็นไนโตรเจนแก๊สเพื่อที่จะกำจัดออกจากระบบดังสมการรวม (Pynaert และคณะ, 2003)



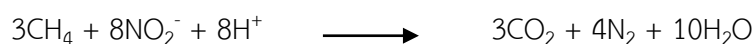
อย่างไรก็ดีกระบวนการนี้เหมาะสำหรับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียสูงและมีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ

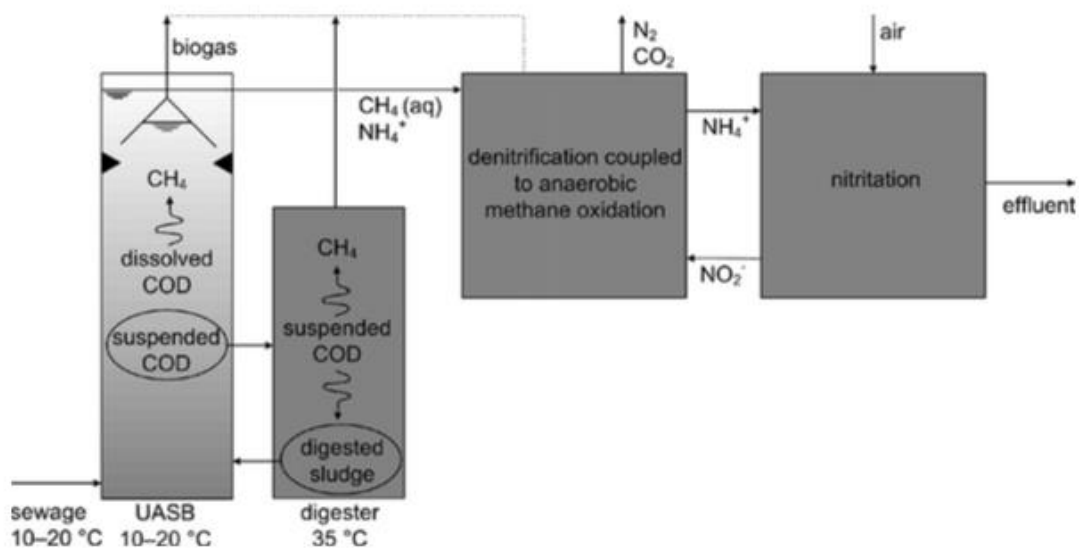


รูปที่ 19 กระบวนการ CANON (Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrate)

3.5.2.4 กระบวนการ Upflow anaerobic sludge blanket (UASB) + Denitrification coupled to anaerobic methane oxidation + Partial nitrification

กระบวนการ UASB + Denitrification coupled to anaerobic methane oxidation + Partial nitrification ดังรูปที่ 20 (Kampman และคณะ, 2012) กระบวนการนี้สามารถกำจัดไนโตรเจนและแก๊สมีเทนได้พร้อมกันโดยสามารถประหยัดตัวให้อิเล็กตรอนอย่างเช่น เอทานอลหรืออะซิเตด ลงได้ จากตัวอย่างการทดลองของ Kampman และคณะในปี 2012 ที่ใช้แบคทีเรีย *N-damo (candidatus Methyloirabirus oxyfera)* โดยเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้กลายเป็นมีเทนในถังย่อยและสลายในถัง UASB เองก่อน จากนั้นน้ำที่มีมีเทนจะส่งถึงกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน เพื่อเปลี่ยนมีเทนเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และเปลี่ยนไนโตรเจนที่มีจากระบบ Partial nitrification ให้กลายเป็นแก๊สไนโตรเจนเพื่อกำจัดออกจากระบบ ดังสมการ





รูปที่ 20 กระบวนการ Denitrification + Aerobic methane oxidation

3.5.2.5 กระบวนการ Partial nitrification + DAMO-ANAMMOX

กระบวนการ Partial nitrification + DAMO-ANAMMOX จะเป็นการอาศัยแบคทีเรีย N-damo (*candidatus* Methylomirabirus oxyfera) และ Anammox ทั้งสองกลุ่มให้อยู่ร่วมกันในระบบ

Partial nitrification

ขั้นแรกจะมีการเติมอากาศหรือใช้ออกซิเจนเพื่อให้เกิด partial nitrification คือ การย่อยสลายแอมโมเนียมไอออนให้เป็นไนไตรท์ ดังสมการ



โดยปัจจัยที่ทำให้เกิด partial nitrification คือ (Sinha และ Annachatre, 2007)

- ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิมากกว่า 25 องศาเซลเซียส
- ควบคุมค่าออกซิเจนละลายน้ำ ให้น้อยกว่า 0.5 mg/l
- ควบคุม pH ระหว่าง 7.5 – 8.5 เพื่อให้มีการเจริญเติบโตของของแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดร์เซอร์ (AOB) ได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มไนไตรท์ออกซิไดร์เซอร์ (NOB)

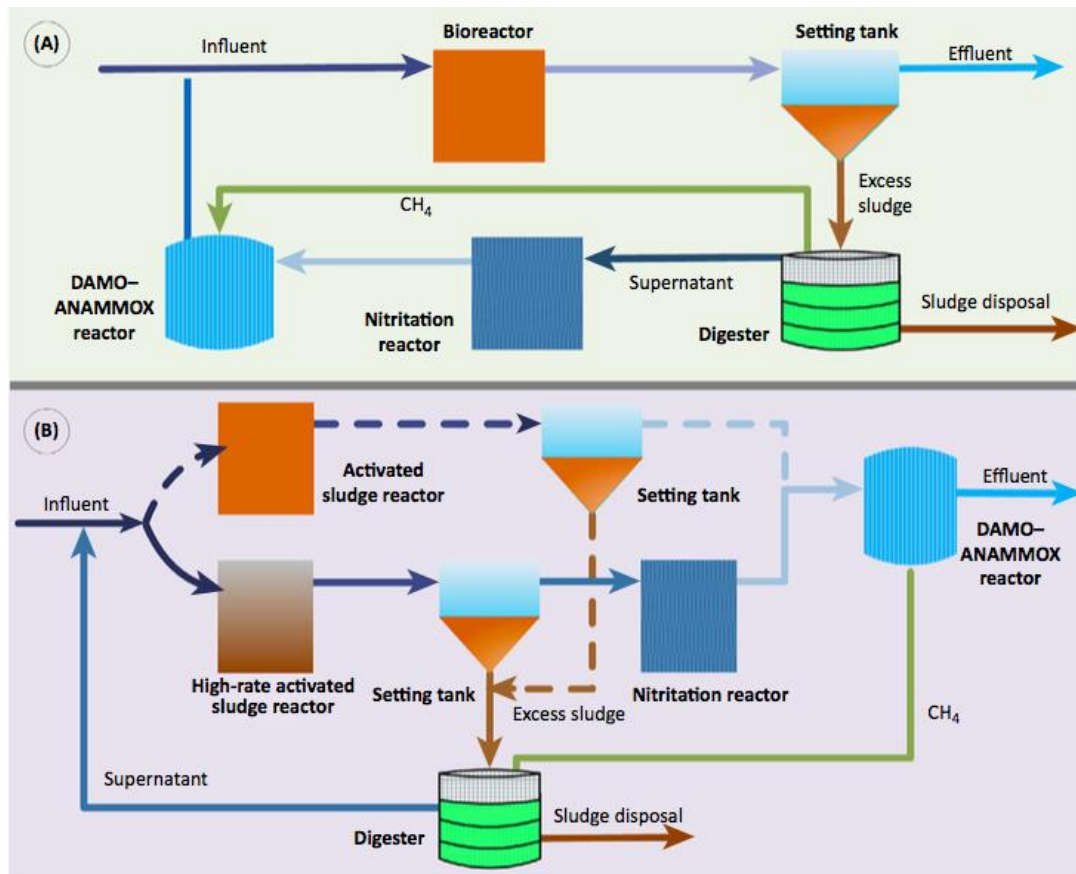
DAMO-ANAMMOX

โดยเริ่มจากกระบวนการ Partial nitrification เพื่อให้ได้ไนไตรท์ จากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการ DAMO-ANAMMOX โดยเป็นกระบวนการที่ไม่อาศัยออกซิเจน เพื่อกำจัดไนโตรเจนในรูปของแก๊สไนโตรเจน ทำให้ระบบนี้เป็นระบบที่ประหยัดการเติมอากาศและตัวให้อิเล็กตรอน เช่น เมทานอลหรืออะซิเตต รวมถึงมีประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนที่มากกว่าระบบ ANAMMOX เพียงอย่างเดียว ที่สามารถกำจัดได้เพียงร้อยละ 70 (Wang และคณะ, 2017) เพราะยังมีไนไตรท์และ

แอมโมเนียไนโตรเจนหรือไนเตรทที่เหลืออยู่ในน้ำขาออก โดยในระบบ Damo-Anammox นี้ยังสามารถใช้เป็นระบบบำบัดขั้นหลังร่วมกับระบบ activated sludge ได้ด้วย ดังรูปที่ 21 (Wang และคณะ, 2017)

A: กระบวนการ DAMO-ANAMMOX ใน side stream

B: กระบวนการ DAMO-ANAMMOX ใน main stream กับ ระบบ Activated sludge



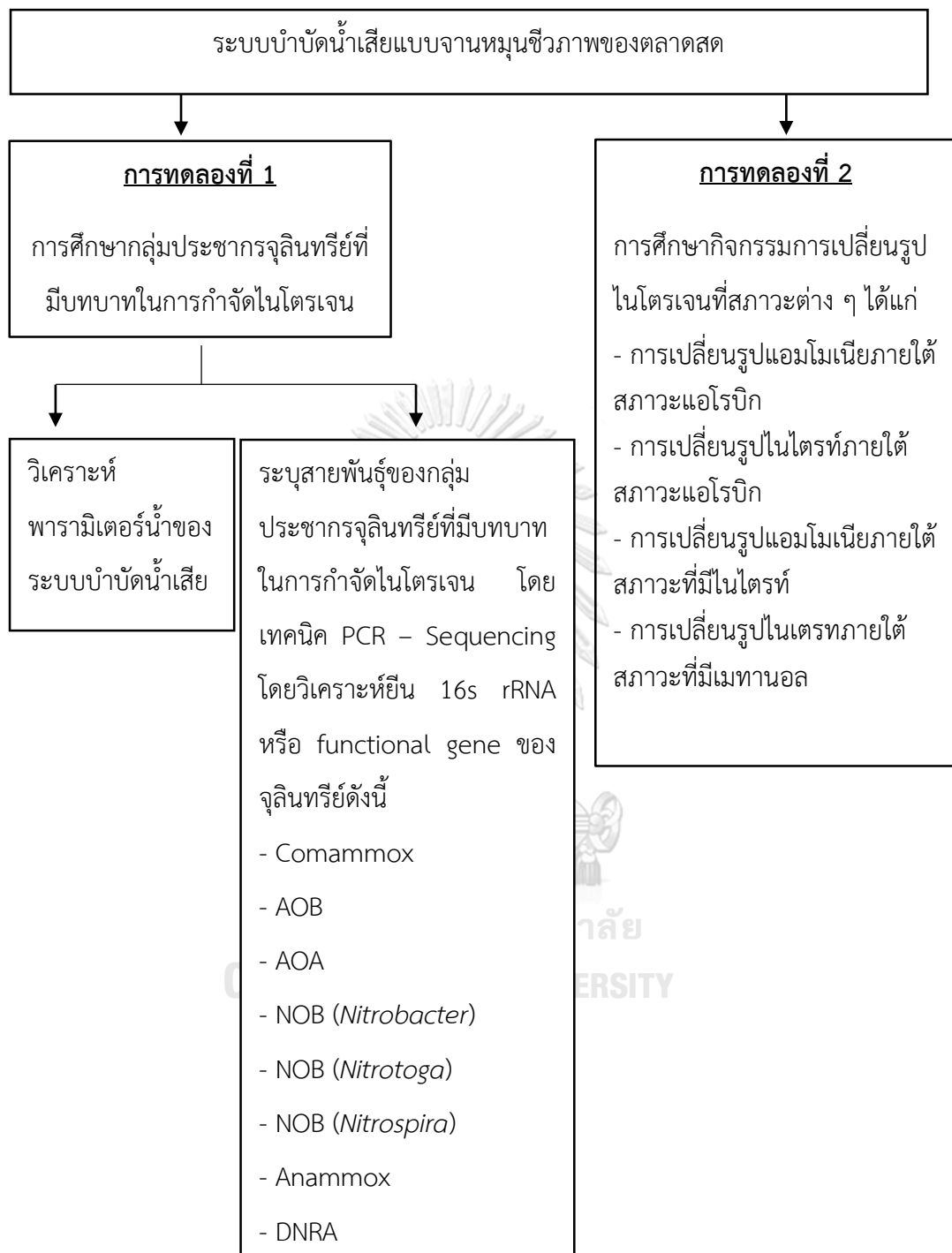
รูปที่ 21 กระบวนการ DAMO-ANAMMOX

บทที่ 4

แผนการทดลองและการดำเนินงานวิจัย

4.1 แผนการทดลอง

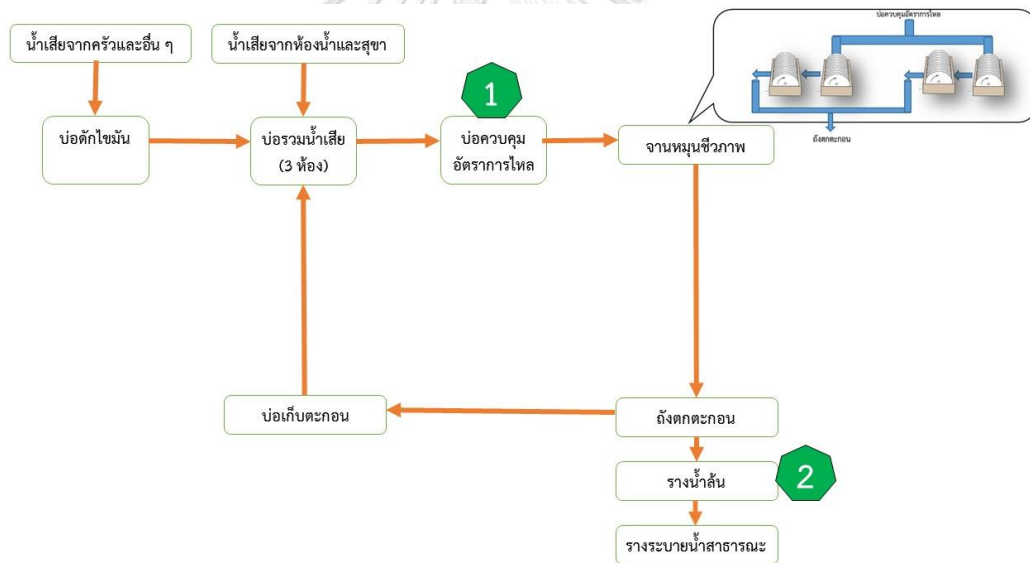
งานวิจัยนี้มุ่งศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการกำจัดไนโตรเจนในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด การทดลองแบ่งออกเป็นสองส่วน ดังรูปที่ 22 โดยเริ่มจากการตรวจวัดพารามิเตอร์ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำ เช่น ซีไอดี, แอมโมเนีย, ไนเตรทและไนไตรท์ในระบบบำบัดเพื่อนำมาเชื่อมโยงกับจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่มที่ศึกษา จากนั้นศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่มที่มีบทบาทในการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนทั้งหมดรวม 8 กลุ่ม ได้แก่ Complete ammonia oxidation (COMAMMOX), Ammonia-oxidizing archaea (AOA), Ammonia-oxidizing bacteria (AOB), Nitrite-oxidizing bacteria (NOB) 3 กลุ่ม คือ *Nitrobacter*, *Nitrotoga* และ *Nitrospira*, Anaerobic ammonium oxidation (Anammox), Denitrification และ Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) ในฟิล์มชีวภาพ จากนั้นศึกษากิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนภายใต้สภาวะต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มทำงาน ได้แก่ การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะแอโรบิก, การเปลี่ยนรูปไนไตรท์ภายใต้สภาวะแอโรบิก, การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนไตรท์ และการเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีสารอินทรีย์ ได้แก่ เมทานอล เพื่อตรวจวัดกิจกรรมของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม



รูปที่ 22 แผนภาพรวมงานวิจัย

4.2 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ มีพื้นที่ใช้สอยรวม 6,200 ตารางเมตร ถือเป็นอาคารประเภท ก (ตามกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้ง จากอาคารบางประเภทและบางขนาด) ลักษณะการไหลของน้ำเสียจะมีน้ำจากภายในตลาดไหลมารวมกันเข้าสู่บริเวณบ่อดักไขมัน และไหลต่อไปที่บ่อรวมน้ำเสียที่ต่อกันจำนวน 3 ห้อง ซึ่งที่บ่อรวมน้ำเสียนี้น้ำเสียจากห้องน้ำและสุขาเหมาะสม จากนั้นจึงไหลเข้าสู่บ่อควบคุมอัตราการไหลก่อนเข้าระบบจานหมุนชีวภาพ (รูปที่ 23) สำหรับตัวจานหมุนชีวภาพ (รูปที่ 24) แบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดละ 2 จานหมุน เมื่อออกจากจานหมุนจะเข้าสู่ถังตกตะกอน รางน้ำล้นและรางระบายน้ำสาธารณะตามลำดับ ซึ่งการตรวจวัดพารามิเตอร์น้ำเข้า - ออกจากจานหมุนชีวภาพจะทำ 2 บริเวณ คือ บริเวณบ่อรวมน้ำเสียก่อนเข้าจานหมุนชีวภาพ และบริเวณรางน้ำล้นของบ่อดักตะกอนหลังจานหมุนชีวภาพ ซึ่งเป็นตัวแทนแสดงน้ำเข้าและออกจากจานหมุนชีวภาพ ดังแสดงในรูปที่ 25 และ 26 ตามลำดับ



รูปที่ 23 แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด



รูปที่ 24 จานหมุนชีวภาพของระบบบำบัด



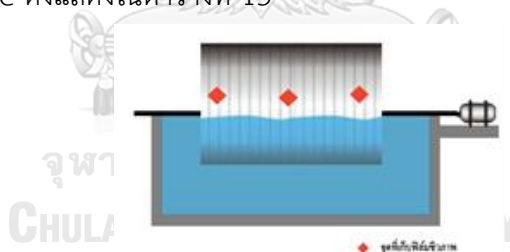
รูปที่ 25 บ่อรวมน้ำเสียของระบบบำบัด



รูปที่ 26 รางน้ำล้นของบ่อตกตะกอน

4.3 การทดลองที่ 1 การศึกษาจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการกำจัดไนโตรเจน

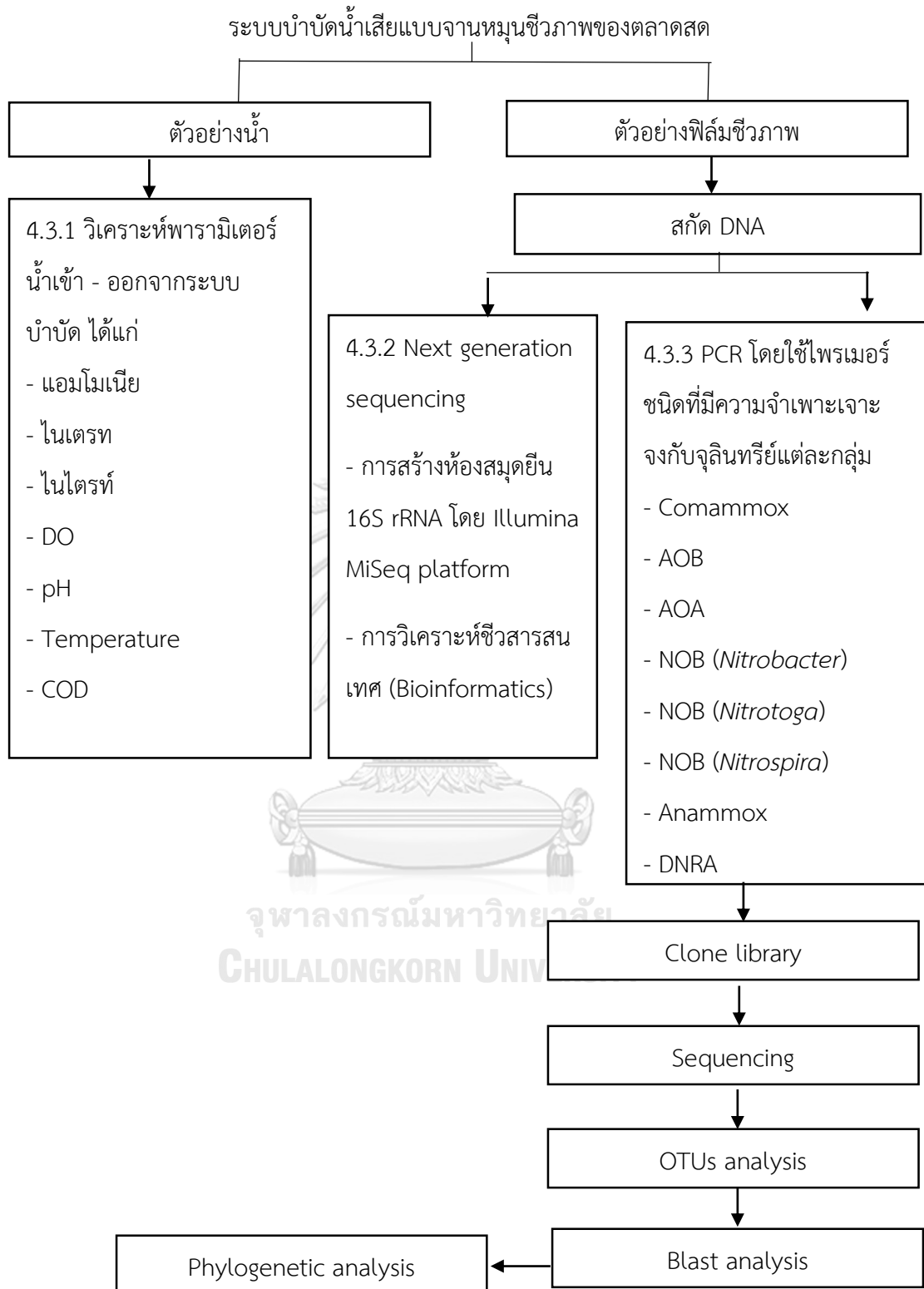
การทดลองที่ 1 เริ่มจากการตรวจวัดพารามิเตอร์น้ำเข้า - ออก ของงานหมุนชีวภาพ โดยพารามิเตอร์ที่ตรวจวัดเป็นพารามิเตอร์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการบำบัดไนโตรเจน จากนั้นเก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพจากงานหมุนชีวภาพจำนวน 3 จุด ต่องานหมุนชีวภาพ 1 งาน ดังรูปที่ 27 และ 28 นำตัวอย่างทั้งหมดมาผสมกัน (composite sampling) โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 500 มิลลิกรัม มาสกัด DNA จากตัวอย่างด้วยชุดสกัด FastDNA® SPIN Kit (MP Biomedicals) และเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20°C และวิเคราะห์ประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค Next generation sequencing จากนั้นวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการกำจัดไนโตรเจนที่สนใจ ด้วยเทคนิค PCR-sequencing ของยีน 16S rRNA หรือ functional gene ดังแสดงในตารางที่ 13



รูปที่ 27 จุดเก็บฟิล์มชีวภาพจากงานหมุนชีวภาพ



รูปที่ 28 การเก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ



รูปที่ 29 แผนภาพการทดลองที่ 1

4.3.1 การตรวจวัดพารามิเตอร์น้ำ

การวิเคราะห์พารามิเตอร์น้ำที่เข้า - ออกของงานหมุนชีวภาพ

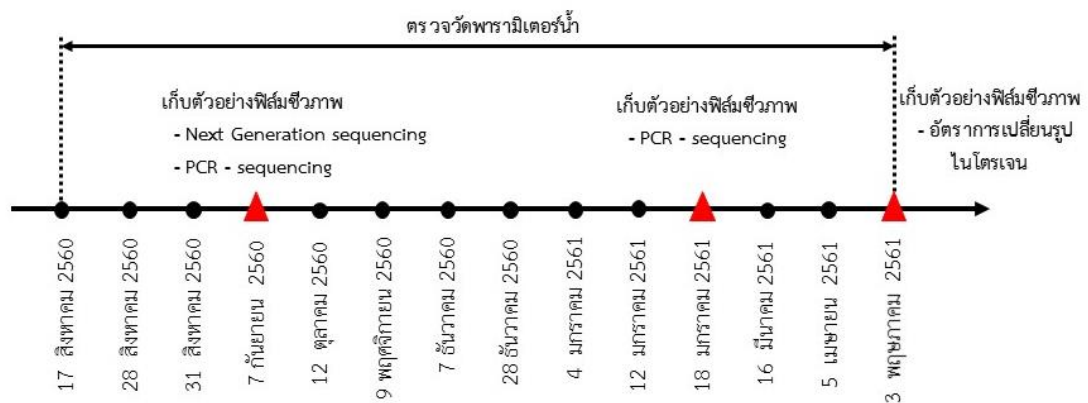
ดำเนินการตรวจวัดพารามิเตอร์น้ำ 2 จุด คือ บริเวณบ่อรวมน้ำเสีย ซึ่งถือเป็นจุดน้ำเข้างานหมุนชีวภาพ และบริเวณรางน้ำล้นของบ่อตกตะกอน ซึ่งถือเป็นจุดน้ำออกจากงานหมุนชีวภาพ (จุดที่ 1 และ 2 ในรูปที่ 23 หรือในรูปที่ 25 และ 26 ตามลำดับ) สำหรับค่าพารามิเตอร์ที่ตรวจวัด แสดงดังตารางที่ 12 โดยเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์ เดือนละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลาประมาณ 10 เดือน ในช่วงที่เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพนั้นจะเก็บตัวอย่างน้ำและวิเคราะห์พารามิเตอร์ทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนการเก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ เริ่มตั้งแต่วันที่ 17 สิงหาคม 2560 – วันที่ 3 พฤษภาคม 2561 ทั้งนี้จะเก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพเพื่อนำไปวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการบำบัดไนโตรเจนจำนวน 2 ช่วงเวลา คือ วันที่ 7 กันยายน 2560 และ วันที่ 18 มกราคม 2561 และเก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพครั้งที่ 3 ณ วันที่ 3 พฤษภาคม 2561 เพื่อศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนที่สภาวะต่าง ๆ (รูปที่ 30)

ตารางที่ 12 พารามิเตอร์น้ำที่วิเคราะห์ระหว่างทำการทดลองช่วงที่ 1*

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์/เครื่องมือวิเคราะห์	ความถี่ในการวิเคราะห์
ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD)	Close reflux	- เดือนละ 1 ครั้ง - สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใน ช่วงที่เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ
แอมโมเนีย (NH_3^+)	Colorimetric and Spectrophotometric Method	- เดือนละ 1 ครั้ง - สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใน ช่วงที่เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ
ไนไตรท์ (NO_2^-)	Colorimetric and Spectrophotometric Method	- เดือนละ 1 ครั้ง - สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใน ช่วงที่เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ
ไนเตรท (NO_3^-)	Colorimetric and Spectrophotometric Method	- เดือนละ 1 ครั้ง - สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใน ช่วงที่เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์/เครื่องมือวิเคราะห์	ความถี่ในการวิเคราะห์
พีเอช (pH)	pH Meter (sension 156; HACH)	- เดือนละ 1 ครั้ง - สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใน ช่วงที่เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ
อุณหภูมิ (Temperature)	pH Meter (sension 156; HACH)	- เดือนละ 1 ครั้ง - สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใน ช่วงที่เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ
ปริมาณออกซิเจนละลาย น้ำ (Dissolved Oxygen, DO)	DO Meter (sension 156; HACH)	- เดือนละ 1 ครั้ง - สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใน ช่วงที่เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ

*วิธีวิเคราะห์อ้างอิงจาก (American Public Health Association และคณะ, 1999)



รูปที่ 30 ลำดับเวลาในการเก็บน้ำตัวอย่างและตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ

4.3.2 การวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing

การสกัด DNA

เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ 1 ครั้ง ณ วันที่ 7 กันยายน 2560 (รูปที่ 30) โดยเก็บตัวอย่าง 3 จุดต่อจานหมุนชีวภาพ 1 จาน (บริเวณหัว กลางและท้ายของจานหมุน) ดังรูปที่ 27 และ 28 โดยมีจานหมุนชีวภาพทั้งหมด 4 จาน นำตัวอย่างทั้งหมดมาผสมกัน (composite sampling) เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นสกัด DNA จากตัวอย่างด้วย FastDNA[®] SPIN Kit (Instruction Manual, Catalog #6540 - 600) โดยใช้ปริมาณตัวอย่าง 500 มิลลิกรัม จากนั้นเก็บรักษา DNA ที่สกัดได้ที่ อุณหภูมิ -20 °C

การสร้างห้องสมุดยีน 16S rRNA เพื่อวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดโดย Illumina MiSeq platform

โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. PCR ครั้งที่ 1 โดยไพรเมอร์ 515F - 806R ซึ่งเป็น universal primers สำหรับ 16s rRNA gene ของแบคทีเรียและอาร์เคีย (Ding และคณะ, 2015)

515F - Forward primer: 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'

806R- Reverse primer: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'

โดยมีรายละเอียดของการทำ PCR ด้วยเครื่อง Thermocycler ดังนี้

Initial denaturating	95	องศาเซลเซียส	30	วินาที	} 25 รอบ
Denaturing	95	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Annealing	53	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Extension	68	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Final extension	68	องศาเซลเซียส	5	นาที	
End	12	องศาเซลเซียส			

2. ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์เพื่อแยก free primers และ primer dimers ออก โดยใช้ AMPure XP beads

จากนั้นนำส่งตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ต่อที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (<http://www.omicscenter.sc.chula.ac.th>)

3. PCR ครั้งที่ 2 เพื่อติด indices และ Illumina sequencing กับ PCR product โดยใช้ Nextera XT Index Kit และทำการเดินเครื่อง Theromocycler ตามรายละเอียดดังนี้

Initial denaturing	95	องศาเซลเซียส	3	นาที	} รอบ
Denaturing	95	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Annealing	55	องศาเซลเซียส	30	วินาที 8	
Extension	72	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Final extension	72	องศาเซลเซียส	5	นาที	
End	4	องศาเซลเซียส			

4. ทำบริสุทธิ์ PCR product ครั้งที่ 2 โดยใช้ AMPure XP beads

5. คำนวณหาความเข้มข้นของ DNA ในหน่วย nM ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดเฉลี่ยของ DNA โดยใช้ Qubit[®] 2.0 Fluorometer และเจือจางความเข้มข้นถึง 4 nM ด้วย 10 nM Tris-HCl pH 8.5 หลังจากนั้นแต่ละตัวอย่างจะแบ่งเป็นส่วนย่อย ๆ ใส่ใน Eppendorf จำนวนหลอดละ 5 μ l และทำการเก็บใน sample library

6. ทำ library denatured ด้วย NaOH เจือจางด้วย hybridization buffer และทำ denatured ก่อนที่จะทำ MiSeq sequencing โดย Illumina MiSeq Sequencer

4.3.3 การศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการกำจัดไนโตรเจน ด้วยเทคนิค PCR-sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม

ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการกำจัดไนโตรเจน ของ Comammox, AOA, AOB, NOB (*Nitrobacter*), NOB (*Nitrotoga*), NOB (*Nitrospira*), Anammox และ DNRA โดยมีรายละเอียดแต่ละขั้นตอนดังนี้

การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

การทำ PCR เป็นขั้นตอนที่เพิ่มปริมาณของชิ้นส่วน DNA ในช่วงที่เฉพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์ที่ศึกษา โดยไพรเมอร์ชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม โดยในงานวิจัยนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการกำจัดไนโตรเจนรวม 8 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 โปรแกรมที่มีควมจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มที่ใช้ในงานวิจัยนี้

Microorganism	Gene	Primers	Sequence (5' - 3')	Target site	Denaturation (°C) / (s)	Annealing (°C) / (s)	Elongation (°C) / (s)	References
Comammox	<i>amoA</i> gene	ComaA-224f ComaA-659R ComaB-224f ComaB-659R	TAYAAYTGGGTSAAAYTA ARATCATSGTGCTRTG TAYTTCTGGACRTTYTA ARATCCARACDGTGTG	415 bp	95 / 30 (Initial) 95 / 30	52 / 30	68 / 30 68 / 300 (Final)	(Pjevac และคณะ, 2017)
AOB	16S rRNA	amoA-1F amoA-2R	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC	491 bp	95 / 30 (Initial) 95 / 30	55 / 30	68 / 30 68 / 300 (Final)	(Rotthauwe และคณะ, 1997)
AOA	<i>amoA</i> gene	Arch-amoAF Arch-amoAR	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATGT	635 bp	95 / 30 (Initial) 95 / 30	53 / 30	68 / 30 68 / 300 (Final)	(Francis และคณะ, 2005)
NOB (<i>Nitrobacter</i>)	16S rRNA	P338f NIT3	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG CCTGTGCTCCAATGCTCCG	635 bp	95 / 30 (Initial) 95 / 30	65 / 30	68 / 30 68 / 300 (Final)	(Jie และ Daping, 2008)

ตารางที่ 13 (ต่อ) เพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มที่ใช้ในงานวิจัยนี้

Microorganism	Gene	Primers	Sequence (5' - 3')	Target site	Denaturation (°C) / (t)	Annealing (°C) / (t)	Elongation (°C) / (t)	References
NOB (<i>Nitrotoga</i>)	16S rRNA	Ntoga124F Ntoga1462R	ATCGGAACGTACCCGGAAA CGAACCCCTACCGTGGCAAC	1300 bp	95 / 30 (Initial) 95 / 30	63 / 30	68 / 30 68 / 300 (Final)	(Lücker และ คณะ, 2015)
NOB (<i>Nitrospira</i>)	16S rRNA	P338f Nstpa0685r EUB338 Nstpa0685f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG CGGGAATTCGGCGCTC ACTCCTACGGGAGGCAGC CGGGAATTCGGCGCTC	320 bp	95 / 30 (Initial) 95 / 30	65 / 30	68 / 30 68 / 300 (Final)	(Liu และคณะ, 2008) (Amann และ คณะ, 1990)
Anammox	16S rRNA	A438f A684r	GTCRGGAGTTADGAAATG ACCAGAAGTTCCTACTCTC	248 bp	95 / 30 (Initial) 95 / 30	57 / 30	68 / 30 68 / 300 (Final)	(Humbert และคณะ, 2012)
DNRA	<i>nrfA</i> gene	nrfA2aw nrfAR1 F1nrfA R1nrfA	CARTGYCAYGTBGARTA TWNNGCATRTGRCARTC GCNTGYTGGWSNTGYAA TWNNGCATRTGRCARTC	269 bp 520 bp	95 / 30 (Initial) 95 / 30 95 / 30 (Initial) 95 / 30	53 / 30 45 / 30	68 / 30 68 / 300 (Final)	(Welsh และ คณะ, 2014) (Mohan และ คณะ, 2004)

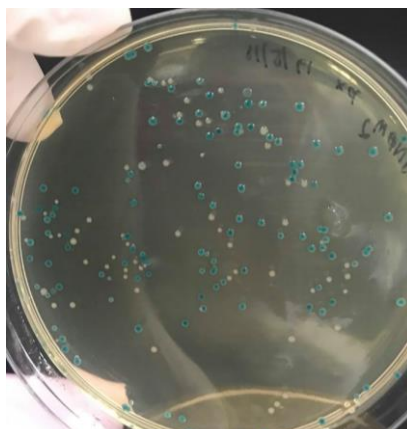
โดยมีรายละเอียดของการทำ PCR ดังนี้ (บริษัท NEW ENGLAND BioLabs)

Initial denaturing	95	องศาเซลเซียส	30	วินาที	} 35 รอบ
Denaturing	95	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Annealing	(ขึ้นกับชนิดไพรเมอร์)	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Extension	68	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Final extension	68	องศาเซลเซียส	5	นาที	
End	12	องศาเซลเซียส			

โดยใช้ 10x Standard Reaction Buffer ปริมาตร 5 μ l/50 μ l, 10 mM dNTPs ปริมาตร 1 μ l/50 μ l, 10 μ M Forward Primer ปริมาตร 1 μ l/50 μ l, 10 μ M Reverse Primer ปริมาตร 1 μ l/50 μ l, *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.25 μ l/50 μ l, Template DNA ปริมาตร 2 μ l/50 μ l, BSA ปริมาตร 1.5 μ l/50 μ l และ น้ำ (Nuclease-free) ปริมาตร 18.275 μ l/50 μ l เมื่อ PCR เสร็จแล้วจะตรวจสอบความถูกต้องของ PCR product โดยใช้ Gel electrophoresis เมื่อลำดับเบสถูกต้องจะเข้าสู่ขั้นตอนทำ DNA ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ตัวอย่างปริมาณ 92 μ l ตามขั้นตอนของ NucleoSpin[®] Soil (User Manual MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG.)

การทำ ligation - cloning

นำ PCR amplified product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมา ligate ลงใน pGEM[®]-T Easy Vectors โดยใส่ 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase จำนวน 5 μ l, pGEM[®]-T Easy Vectors 1 μ l, T4 DNA Ligase 1 μ l และ PCR product 3 μ l ลงใน PCR tube จากนั้นบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 17 ชั่วโมง (Technical manual pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems Instructions for Use of Products A1360, A1380, A3600 and A3610) จากนั้นทำการละลาย competent cell (เซลล์พร้อมรับ DNA) บนน้ำแข็ง จากนั้นจึงทำการใส่ Rapid Ligation Buffer ลงไปผสมกับ competent cell ใส่ชิ้น vector เข้าไปในเซลล์ของ E. coli โดยการ heat shock E. coli competent cell ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 - 50 วินาที จากนั้นนำเซลล์กลับแช่ลงในน้ำแข็ง 2 นาที เติมน้ำ SOC medium ให้กับเซลล์แขวนลอยและทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง จากนั้นจึงเพาะเชื้อลงในจานอาหาร LB/ampicillin/IPTG/X-Gal และบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงคัดเลือกโคโลนีสีขาวดังรูปที่ 31 (ซึ่งมี vector ที่ขึ้น inserted DNA จาก PCR product) ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ต่อไป (XL1-Blue Competent Cells Catalog #200249)



รูปที่ 31 ตัวอย่างจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีสีขาว

การทำ OTUs (Operational Taxonomy Unit) analysis

วิเคราะห์ OTUs เพื่อจัดกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละห้องสมุดยีน โดยการนำลำดับของ DNA ที่ใกล้เคียงกันโดย sequences ที่มีความเหมือนของ gene มากกว่า 99% จะถูกจับกลุ่มเป็น 1 OTU โดยใช้โปรแกรม CD-HIT (Li และ Godzik, 2006)

Blast analysis

นำ DNA sequence ที่ได้ไปเข้าโปรแกรม nucleotide BLAST เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Phylogenic analysis

ใช้โปรแกรม MEGA Version 7.0 (Kumar และคณะ, 2008) ในการสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ Bootstrap method โดยมี Bootstrap Replications ที่ 1000 ด้วยวิธี Maximum Composite Likelihood เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม โดยเปรียบเทียบกับ reference sequences ในสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ

4.4 การทดลองที่ 2 ศึกษากิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนที่สภาวะต่าง ๆ

เก็บตัวอย่างฟิล์มชีวภาพ 1 ครั้ง ในวันที่ 3 พฤษภาคม 2561 (รูปที่ 30) โดยเก็บตัวอย่าง 3 จุดต่อ จานหมุนชีวภาพ 1 จาน โดยมีจานหมุนชีวภาพทั้งหมด 4 จาน ดังรูปที่ 27 และ 28 นำตัวอย่างทั้งหมดมาผสมกัน (composite sampling) ศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนภายใต้สภาวะต่าง ๆ ตามชนิดของจุลินทรีย์ที่สนใจ ทั้งหมด 4 ชุดการทดลองดังต่อไปนี้

1) การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะแอโรบิก เพื่อศึกษาอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียของจุลินทรีย์กลุ่มที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย ได้แก่ Comammox, AOA และ AOB เนื่องจาก จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนและใช้แอมโมเนียเป็นตัวให้อิเล็กตรอน

- 2) การเปลี่ยนรูปไนโตรที่ภายใต้สภาวะแอโรบิก เพื่อศึกษาอัตราการออกซิไดซ์ไนโตรที่ของจุลินทรีย์กลุ่มที่ออกซิไดซ์ไนโตรที่ ได้แก่ NOB กลุ่ม *Nitrobacter*, *Nitrotoga* และ *Nitrospira* เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนและใช้ไนโตรที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน
- 3) การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนโตรที่ เพื่อศึกษาอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียของจุลินทรีย์ Anammox เนื่องจาก Anammox มีแอมโมเนียเป็นตัวรับอิเล็กตรอนและใช้ไนโตรที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน
- 4) การเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล เพื่อศึกษาอัตราการรีดิวซ์ไนเตรทของจุลินทรีย์กลุ่มดีไนตริไฟอิง เนื่องจาก จุลินทรีย์กลุ่มดีไนตริไฟอิง มีไนโตรที่หรือไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนและเมทานอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอน

การทดลองการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะแอโรบิกและการทดลองการเปลี่ยนรูปไนโตรที่ภายใต้สภาวะแอโรบิก ใช้ตัวอย่างฟิล์มชีวภาพจำนวน 50 มิลลิกรัม ใส่ในถังพลาสติกที่มีฝาปิดสนิท ที่บรรจุน้ำเสียสังเคราะห์ที่ทำจากน้ำประปาที่กำจัดคลอรีนแล้ว จำนวน 1 ลิตร (รูปที่ 32) โดยมีรายละเอียดการเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์แสดงในตารางที่ 15 โดยดัดแปลงจากการทดลองของ Widdle และ Bak ในปี 1992 และ ธนสิดา ในปี 2556 มีความเข้มข้นของไนโตรเจน ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 14 โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งของแอมโมเนีย, โซเดียมไนโตรที่ (NaNO_2) เป็นแหล่งของไนโตรที่, โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) เป็นแหล่งของไนเตรทและใช้สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ปริมาตร 7.2 กรัม/ปริมาณแอมโมเนีย 1 กรัม และควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงระหว่าง 7.0 - 7.8 การควบคุม pH จะใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.2 นอร์มอล เติมลงในถังพลาสติกเมื่ออ่านค่า pH ได้ต่ำกว่า 7 ตรวจสอบโดยใช้เครื่อง pH meter (Alpha PH 560, Thermo scientific, Singapore) การควบคุม DO จะทำการเติมอากาศโดยใช้หัวพ่นทรายและใช้ DO Meter (sension 156; HACH) ตรวจสอบให้มีค่าความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในน้ำมากกว่า 2.0 mg/L

การทดลองการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะแอโรบิก ใช้แอมโมเนียเริ่มต้น 50 mg/L จาก 1 โมลของ NH_4Cl หนัก 53.49 กรัม จึงใช้ปริมาณ NH_4Cl 0.157 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร

การทดลองการเปลี่ยนรูปไนโตรที่ภายใต้สภาวะแอโรบิก ใช้ไนโตรที่เริ่มต้น 25 mg/L จาก 1 โมลของ NaNO_2 หนัก 69 กรัม จึงใช้ปริมาณ NH_4Cl 0.04 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร

การทดลองการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนโตรที่และการทดลองการเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล เป็นการทดลองในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทำโดยนำตัวอย่างฟิล์มชีวภาพจำนวน 25 หรือ 50 มิลลิกรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ที่บรรจุน้ำเสียสังเคราะห์ที่ทำจากน้ำประปาที่กำจัดคลอรีนแล้ว จำนวน 1 ลิตร (รูปที่ 33) โดยมีรายละเอียดการเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์แสดงในตารางที่ 16 (Foglar และคณะ, 2005) ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน ดังรายละเอียดแสดงในตาราง

ที่ 14 โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งของแอมโมเนีย, โซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) เป็นแหล่งของไนไตรท์, โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) เป็นแหล่งของไนเตรท ใส่สาร 0.1% Na-rezazurin เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์แสดงปริมาณออกซิเจน เมื่อมีออกซิเจนในระบบ 0.1% Na-rezazurin จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู จากนั้น ต้ม 1 – 2 ชั่วโมง และใส่แก๊สไนโตรเจนลงในขวดรูปชมพู่เพื่อไล่ออกซิเจน ออกจากระบบ ทำการแบ่งใส่ขวดแก้วที่มีจุกยางปิดสนิท ดังรูปที่ 33 และพันด้วยแผ่นพาราฟิล์มเพื่อป้องกันออกซิเจนภายนอกเข้าในระบบ รายละเอียดการเตรียมชุดการทดลองดังรูปที่ 34

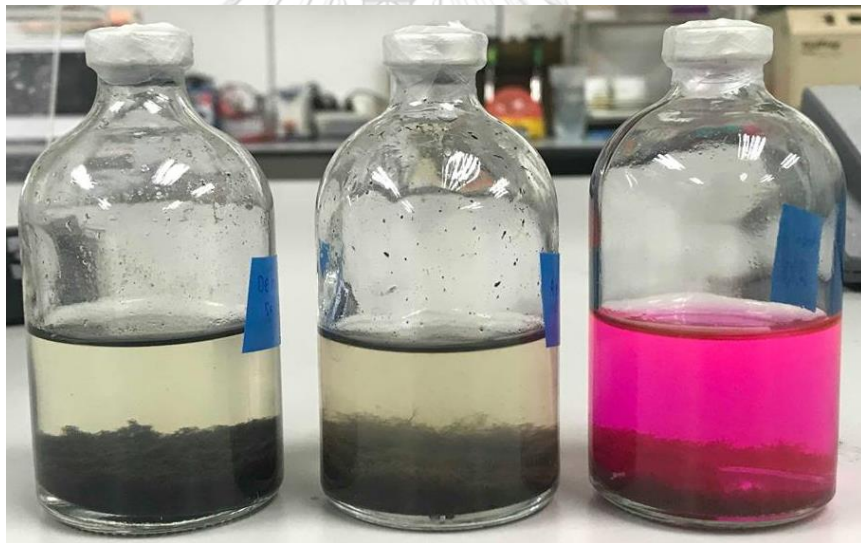
การทดลองการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนไตรท์ ใช้แอมโมเนียเริ่มต้น 100 mg/l จาก 1 โมลของ NH_4Cl หนัก 53.49 กรัม จึงใช้ปริมาณ NH_4Cl 0.31 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร และใช้ไนไตรท์เริ่มต้น 100 mg/l จาก 1 โมลของ NaNO_2 หนัก 69 กรัม จึงใช้ปริมาณ NH_4Cl 0.15 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร

การทดลองการเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล ใช้ไนเตรทเริ่มต้น 100 mg/l จาก 1 โมลของ NaNO_3 หนัก 85 กรัม จึงใช้ปริมาณ NaNO_3 0.14 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร เติม yeast extract 0.1 กรัม/ลิตร และใช้เมทานอล 2 โมล ต่อไนไตรท์ 1 โมล ซึ่งไนไตรท์ 100 mg/l คิดเป็น 0.007 โมล ดังนั้น ใช้เมทานอล 0.014 โมล หรือ 0.45 ml ต่อน้ำ 1 ลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วน COD:N เท่ากับ 6.86:1

โดยแต่ละชุดจะเตรียมการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้น วัดค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย, ไนไตรท์ และไนเตรท ในชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ในระหว่างการทดลอง โดยวัดทั้งหมด 10 ช่วงเวลา ช่วงเวลาละ 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าค่าความเข้มข้นของ แอมโมเนีย, ไนไตรท์และไนเตรท หรือเมทานอลจะหมดไป นำค่าที่วัดได้ต่อเวลามาคำนวณเพื่อวิเคราะห์อัตราการเปลี่ยนรูปของไนโตรเจนสปีชีส์ต่อไป



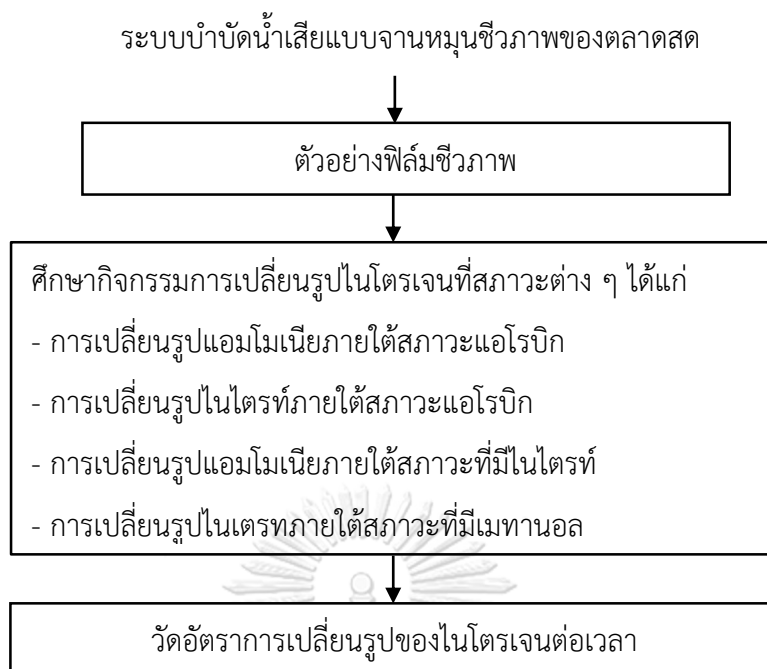
รูปที่ 32 ขวดทดลองภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน



รูปที่ 33 ขวดทดลองภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน



รูปที่ 34 การเตรียมการทดลองภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน



รูปที่ 35 แผนภาพการทดลองที่ 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 14 การทดลองการศึกษากิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจน

การทดลอง	ตัวให้อิเล็กตรอน	ตัวรับอิเล็กตรอน	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง	ความเข้มข้นของตัวให้อิเล็กตรอน (mg/L)	ความเข้มข้นของตัวรับอิเล็กตรอน (mg/L)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (mg)	ตรวจวัด	ความถี่ในการตรวจวัด
การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะแอโรบิก	แอมโมเนีย	ออกซิเจน	Comammox AOA AOB	50	มากกว่า 2	50	แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์	เก็บผล 10 วัน ตลอดการทดลอง หรือจนกว่าสารตั้งต้นจะหมด
การเปลี่ยนรูปไนไตรท์ภายใต้สภาวะแอโรบิก	ไนไตรท์	ออกซิเจน	NOB - <i>Nitrobacter</i> - <i>Nitrotoga</i> - <i>Nitrospira</i>	25	มากกว่า 2	50	แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์	เก็บผล 10 วัน ตลอดการทดลอง หรือจนกว่าสารตั้งต้นจะหมด
การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนไตรท์	แอมโมเนีย	ไนไตรท์	Anammox	100	100	25 และ 50	แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์	เก็บผล 10 วัน ตลอดการทดลอง หรือจนกว่าสารตั้งต้นจะหมด
การเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล	เมทานอล	ไนเตรท	Denitrifying bacteria	2 moles/ moles of nitrite	100	50	แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์	เก็บผล 10 วัน ตลอดการทดลอง หรือจนกว่าสารตั้งต้นจะหมด

ตารางที่ 15 ส่วนผสมน้ำเสียสังเคราะห์สำหรับการทดลองในสภาวะที่มีออกซิเจน

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่เตรียม	
	ปริมาณ/ลิตร	หน่วย
น้ำ	1000	มิลลิลิตร
โปแตสเซียมโบรไมด์ (KBr)	12.6	กรัม
โปแตสเซียมฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	0.1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	400	กรัม
สารละลายผสม Nonchelate trace element	5	กรัม
สารละลายวิตามินรวม	1	มิลลิลิตร
สารละลายวิตามินบี 12	1	มิลลิลิตร
สารละลายวิตามินบี 1	1	มิลลิลิตร
สารละลายซีลีเนียมทั้งสเตรท	1	มิลลิลิตร

ตารางที่ 16 ส่วนผสมน้ำเสียสังเคราะห์สำหรับการทดลองในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

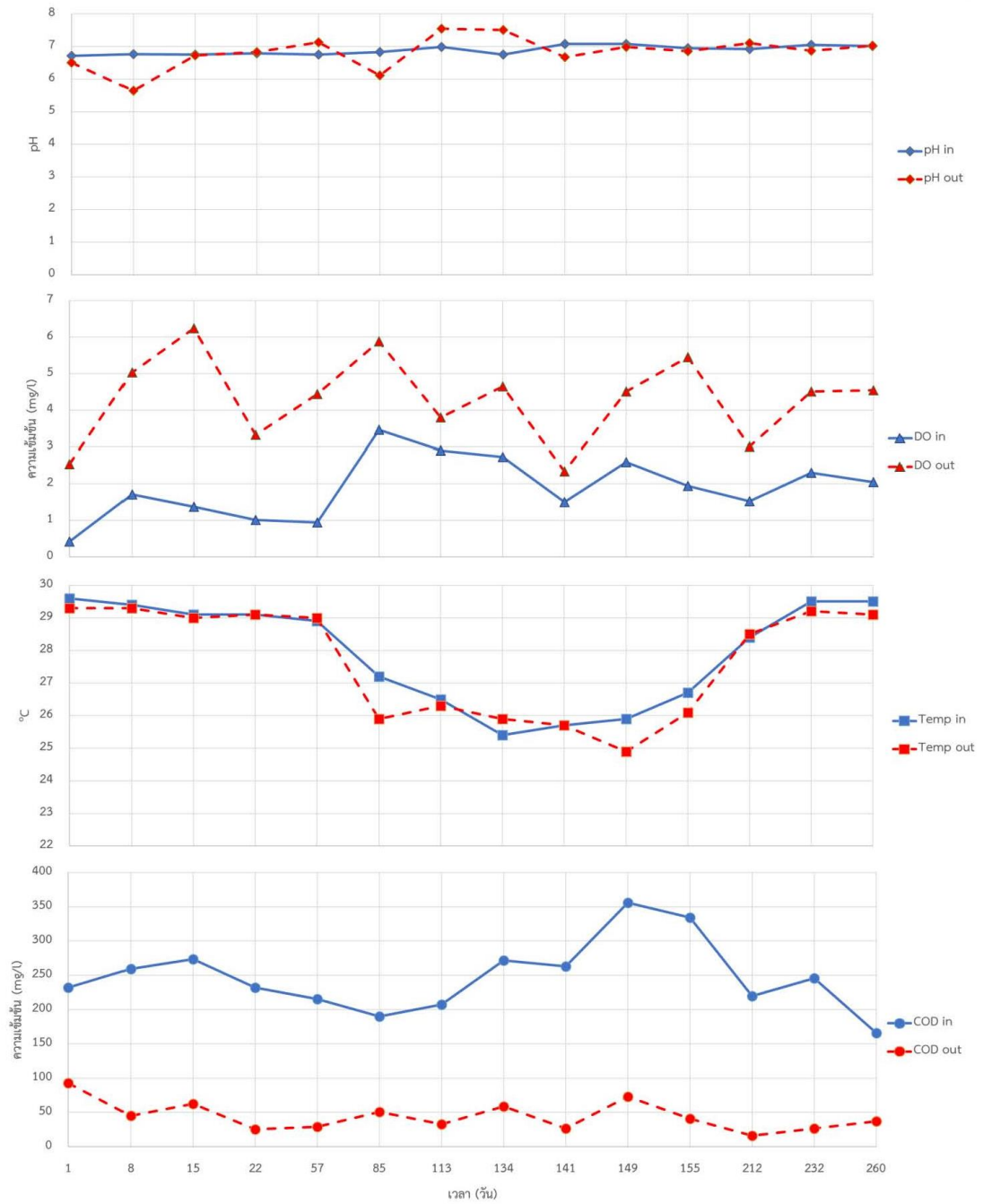
ส่วนประกอบ	ปริมาณที่เตรียม	
	ปริมาณ/ลิตร	หน่วย
K ₂ HPO ₄	2.5	กรัม
KH ₂ PO ₄	1	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.17	กรัม
NaCl	5	กรัม
สารละลาย trace metal mixture	0.1	มิลลิลิตร

บทที่ 5

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

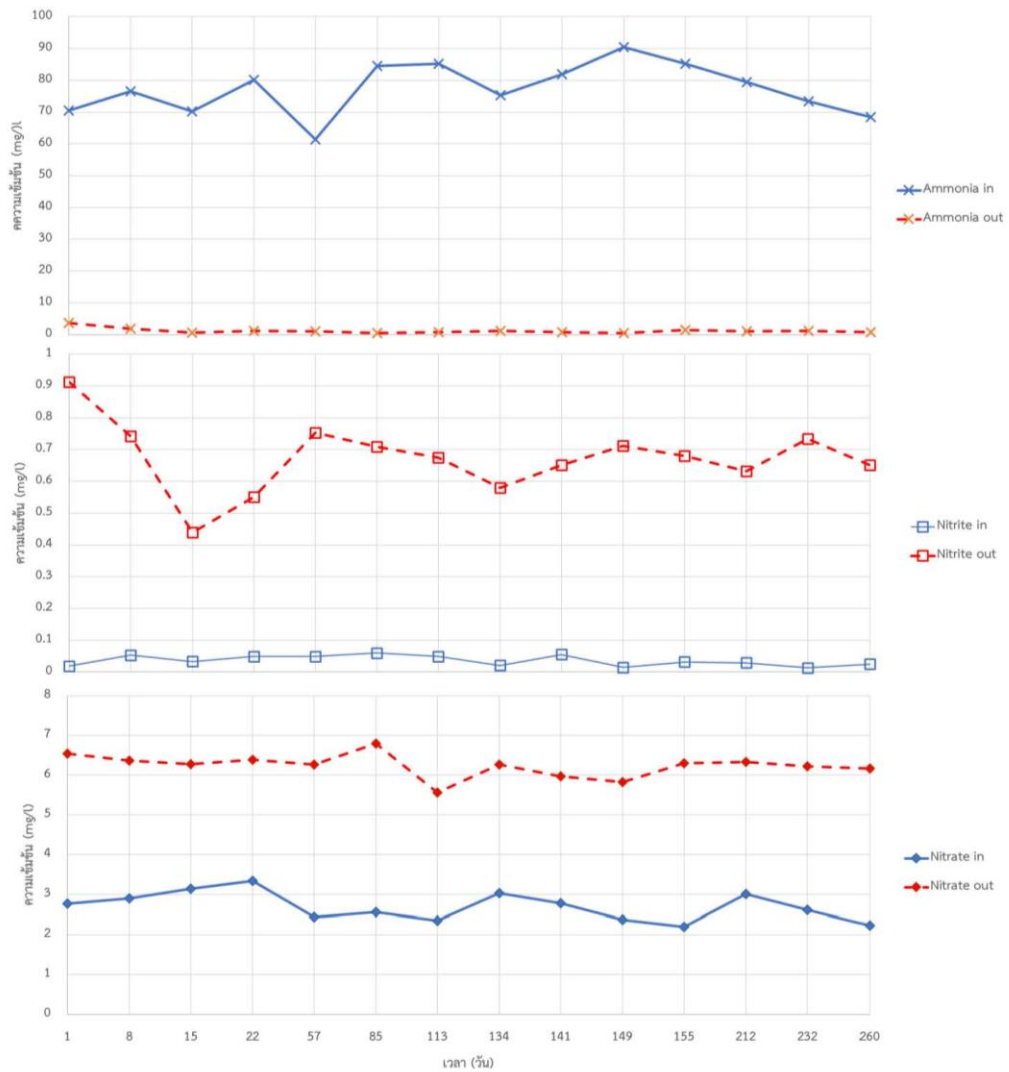
5.1 การวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์น้ำ

จากการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์น้ำเข้า – ออกระบบบำบัดน้ำเสียแบบงานหมุนเวียนชีวภาพของตลาดสดเป็นระยะเวลา 10 เดือน ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2560 ถึง พฤษภาคม 2561 ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 36 -37 จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 17 พบว่า pH ก่อนเข้าระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 6.89 และหลังออกจากระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 6.82, อุณหภูมิก่อนเข้าระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 27.92 °C และหลังออกจากระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 27.66 °C, DO ก่อนเข้าระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 1.89 mg/l และหลังออกจากระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 4.31 mg/l, COD ก่อนเข้าระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 247.68 mg/l และหลังออกจากระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 44.26 mg/l, แอมโมเนียก่อนเข้าระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 77.30 mg/l as N และหลังออกจากระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 1.18 mg/l, ไนโตรท์ก่อนเข้าระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 0.036 mg/l และหลังออกจากระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 0.67 mg/l และไนเตรทก่อนเข้าระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 2.70 mg/l และหลังออกจากระบบบำบัดมีค่าเฉลี่ยที่ 6.23 mg/l ทำให้ทราบว่าระบบบำบัดน้ำเสียแบบงานหมุนเวียนชีวภาพของตลาดสด สามารถลดปริมาณ COD และแอมโมเนีย คิดเป็นร้อยละ 81.93 และร้อยละ 98.43 ตามลำดับ (ตารางที่ 18) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในระบบมีกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันและไนโตรท์ออกซิเดชันเกิดขึ้น ในขณะเดียวกันมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรท์และไนเตรทที่น้อย เพียงร้อยละ 0.85 และร้อยละ 4.71 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณแอมโมเนียที่หายไป กล่าวคือ ไม่เกิดการสะสมของปริมาณไนโตรท์และไนเตรทในระบบ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่ไม่เกิน 4.31 mg/l เป็นผลทำให้ออกซิเจนในชั้นฟิล์มชีวภาพมีปริมาณน้อยและเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันหรือกระบวนการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนอื่นที่ไม่ใช้ออกซิเจนขึ้นได้ในระบบ ดังนั้นจะเห็นว่าระบบบำบัดมีการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียเป็นไนโตรท์ ไนเตรทและไนโตรเจนแก๊สเพื่อกำจัดออกสู่บรรยากาศได้ โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของกระบวนการไนตริฟิเคชัน ดีไนตริฟิเคชัน และกระบวนการอื่น ๆ ร่วมกัน



รูปที่ 36 การเปลี่ยนแปลง pH, Do, อุณหภูมิและ COD ในน้ำเข้า - ออกระบบบำบัดน้ำเสียแบบ

จานหมุนชีวภาพ



รูปที่ 37 การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนีย, ไนไตรท์และไนเตรทในน้ำเข้า - ออกระบบบำบัดน้ำเสีย

แบบงานหมุนชีวภาพ

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยพารามิเตอร์น้ำเข้า - ออกระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพ

พารามิเตอร์	เข้าระบบบำบัด	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน	ออกระบบบำบัด	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน
พีเอช (pH)	6.89	± 0.13	6.82	± 0.48
อุณหภูมิ (°C)	27.92	± 1.54	27.66	± 1.65
ออกซิเจนละลายน้ำ (DO) (mg/l)	1.89	± 0.82	4.31	± 1.14
COD (mg/l)	247.68	± 49.78	44.26	± 20.64
NH ₃ ⁺ (mg/l)	77.30	± 7.71	1.18	± 0.78
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0.036	± 0.02	0.67	± 0.11
NO ₃ ⁻ (mg/l)	2.70	± 0.34	6.23	± 0.29

ตรวจวัดตั้งแต่ สิงหาคม 2560 - พฤษภาคม 2561

ตารางที่ 18 ร้อยละการกำจัดซีไอดี, แอมโมเนีย, การสะสมไนโตรเจนและไนเตรทของระบบบำบัด
น้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ

พารามิเตอร์	ร้อยละการกำจัดเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
COD (mg/l)	81.93	± 8.27
NH ₃ ⁺ (mg/l)	98.43	± 1.12
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0.85	± 1.19
NO ₃ ⁻ (mg/l)	4.71	± 0.77

5.2 การวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing

จากการวิเคราะห์ Next Generation Sequencing โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ 515F - 806R ซึ่งเป็น universal primers สำหรับ 16S rRNA gene ของทั้งแบคทีเรียและอาร์เคีย (Ding และคณะ, 2015) แสดงให้เห็นว่าไฟลัมของจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุด คือ ไฟลัม *Proteobacteria* คิดเป็นร้อยละ 62.07 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด (ตารางที่ 19) ซึ่งเป็นไฟลัมที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน, แอมโมเนียออกซิเดชัน, ดีไนตริฟิเคชัน และ DNRA (Kowalchuk และ Stephen, 2001) นอกจากนี้ยังพบไฟลัม *Bacteroidetes* ร้อยละ 10.63 และ ไฟลัม *Firmicutes* ร้อยละ 7.90 ซึ่งเป็นไฟลัมที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน ไฟลัม *Planctomycetes* ร้อยละ 5.88 ซึ่งเป็นไฟลัมที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการ Anammox (Francis และคณะ, 2007) ไฟลัม *Nitrospirae* ร้อยละ 3.21 ซึ่งเป็นไฟลัมที่น่าจะพบจุลินทรีย์กลุ่ม *Nitrospira* (Lücker และคณะ, 2010) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการไนโตรทออกซิเดชัน นอกจากนี้ ยังพบไฟลัม *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Chlorobi*, *Gemmatimonadetes*, *Chloroflexi* และ *Actinobacteria* ร้อยละ 3.02, 1.84, 1.40, 0.72, 0.65 และ 0.45 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งไฟลัม *Gemmatimonadetes* นั้นเป็นไฟลัมที่น่าจะพบจุลินทรีย์ในกระบวนการ ตรึงไนโตรเจน (McClung และคณะ, 1983) และยังพบจุลินทรีย์ในไฟลัมอื่น ๆ รวมกันร้อยละ 2.22 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด

ตารางที่ 19 ร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับไฟลัม (Phylum) ที่ตรวจพบในในฟิล์มชีวภาพ

ไฟลัม	ร้อยละที่พบ
<i>Proteobacteria</i>	62.07
<i>Bacteroidetes</i>	10.63
<i>Firmicutes</i>	7.90
<i>Planctomycetes</i>	5.88
<i>Nitrospirae</i>	3.21
<i>Acidobacteria</i>	3.02
<i>Verrucomicrobia</i>	1.84
<i>Chlorobi</i>	1.40
<i>Gemmatimonadetes</i>	0.72
<i>Chloroflexi</i>	0.65
<i>Actinobacteria</i>	0.45
Other	2.22

สำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในระดับคลาส พบจุลินทรีย์ที่เคยถูกรายงานว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพมากที่สุด คือ คลาส *Gemmaproteobacteria* โดยพบร้อยละ 28.00 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด (ตารางที่ 20) ซึ่งเป็นคลาสที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน, คลาส *Betaproteobacteria* ร้อยละ 26.36 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นคลาสที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน, คลาส *Saprospirae* ร้อยละ 8.29 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, คลาส *Clostridia* ร้อยละ 7.90 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นคลาสที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน, คลาส *Brocadiae* ร้อยละ 5.15 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นคลาสที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการ Anammox นอกจากนี้ ยังพบคลาส *Deltaproteobacteria* ร้อยละ 3.99 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นคลาสที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการ DNRA, คลาส *Nitrospira* ร้อยละ 3.21 ของจุลินทรีย์ทั้งหมดซึ่งเป็นคลาสที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการไนโตรทออกซิเดชัน นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์ในคลาส *Alphaproteobacteria*, *Chloracidobacteria*, *Sphingobacteriia* และ *Pedospaerae* ร้อยละ 2.60, 1.65, 1.28 และ 1.18 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามลำดับ และคลาส *Epsilonproteobacteria* ร้อยละ 1.09 ของจุลินทรีย์ทั้งหมดซึ่งเป็นคลาสที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน และยังพบจุลินทรีย์ในคลาสอื่น ๆ รวมกันร้อยละ 9.27 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด

ตารางที่ 20 ร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับคลาส (Class) ที่ตรวจพบในฟิล์มชีวภาพ

คลาส	ร้อยละที่พบ
<i>Gammaproteobacteria</i>	28.00
<i>Betaproteobacteria</i>	26.38
<i>Saprosirae</i>	8.29
<i>Clostridia</i>	7.90
<i>Brocadiae</i>	5.15
<i>Deltaproteobacteria</i>	3.99
<i>Nitrospira</i>	3.21
<i>Alphaproteobacteria</i>	2.60
<i>Chloracidobacteria</i>	1.65
<i>Sphingobacteriia</i>	1.28
<i>Pedosphaerae</i>	1.18
<i>Epsilonproteobacteria</i>	1.09
Other	9.27

สำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในระดับออคเตอร์ พบจุลินทรีย์ที่เคยถูกรายงานว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพมากที่สุด คือ ออคเตอร์ *Burkholderiales* ร้อยละ 15.81 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด (ตารางที่ 21) รองลงมาคือ ออคเตอร์ *Pseudomonadales* ร้อยละ 10.60 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นออคเตอร์ที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในดิน นอกจากนี้ยังพบออคเตอร์ *Saprosiraeles* ร้อยละ 8.29 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, ออคเตอร์ *Clostridiales* ร้อยละ 7.90 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นออคเตอร์ที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในดิน เช่นกัน นอกจากนี้ ยังพบออคเตอร์ *Rhodocyclales* ร้อยละ 7.89 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, ออคเตอร์ *Thiotrichales* ร้อยละ 5.55 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, ออคเตอร์ *Brocadiales* ร้อยละ 5.15 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นออคเตอร์ที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการ Anammox , ออคเตอร์ *Xanthomonadales* ร้อยละ 5.05 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, ออคเตอร์ *Alteromonadales* ร้อยละ 3.89 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, ออคเตอร์ *Nitrospirales* ร้อยละ 3.21 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นออคเตอร์ที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการไนโตรเจนออกไซด์ออกซิเดชัน, และยังมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

กับวัฏจักรไนโตรเจนในออเดอร์อื่น ๆ อีก ได้แก่ ออเดอร์ *Campylobacterales* ร้อยละ 1.09 ซึ่งเป็นออเดอร์ที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน, ออเดอร์ *Nitrosomonadales* ร้อยละ 0.75 ซึ่งเป็นออเดอร์ที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน, ออเดอร์ *Desulfobacterales* ร้อยละ 0.35 ซึ่งเป็นออเดอร์ที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการ DNRA และยังพบจุลินทรีย์ในออเดอร์อื่น ๆ รวมกัน ร้อยละ 70.95 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด

ตารางที่ 21 ร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับออเดอร์ (Order) ที่ตรวจพบในฟิล์มชีวภาพ

ออเดอร์	ร้อยละที่พบ
<i>Burkholderiales</i>	15.81
<i>Pseudomonadales</i>	10.60
<i>Saprospirales</i>	8.29
<i>Clostridiales</i>	7.90
<i>Rhodocyclales</i>	7.89
<i>Thiotrichales</i>	5.55
<i>Brocadiales</i>	5.15
<i>Xanthomonadales</i>	5.05
<i>Alteromonadales</i>	3.89
<i>Nitrospirales</i>	3.21
<i>Campylobacterales</i>	1.09
<i>Nitrosomonadales</i>	0.75
<i>Desulfobacterales</i>	0.35
Other	70.95

สำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในระดับแฟมิลี พบจุลินทรีย์ที่เคยถูกรายงานว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพมากที่สุด คือ แฟมิลี *Comamonadaceae* คิดเป็นร้อยละ 15.63 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด (ตารางที่ 22) รองลงมาคือ แฟมิลี *Pseudomonadaceae* ร้อยละ 10.60 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นแฟมิลีที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน และพบแฟมิลี *Rhodocyclaceae* ร้อยละ 7.89 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, จุลินทรีย์ในแฟมิลี *Clostridiaceae* ร้อยละ 7.27 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นแฟมิลีที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ใน

กระบวนการไนโตรฟิกเคชัน, พบจุลินทรีย์ในแฟมิลี *Brocadiaceae* ร้อยละ 5.15 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นแฟมิลีที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการ Anammox, แฟมิลี *Thiotrichaceae* ร้อยละ 5.12 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, แฟมิลี *Saprospiraceae* ร้อยละ 3.72 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, *Xanthomonadaceae* ร้อยละ 3.47 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ยังพบจุลินทรีย์ในแฟมิลี *Nitrospiraceae* ร้อยละ 3.21 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นแฟมิลีที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการไนโตรที่ออกซิเดชัน, แฟมิลี *Chitinophagaceae* ร้อยละ 3.16 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, แฟมิลี *Campylobacteraceae* ร้อยละ 1.09 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นแฟมิลีที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน นอกจากนี้ ยังพบแฟมิลี *Nitrosomonadaceae* ร้อยละ 0.75 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นแฟมิลีที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันและ แฟมิลี *Desulfobulbaceae* ร้อยละ 0.35 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นแฟมิลีที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการ DNRA และยังพบจุลินทรีย์ในแฟมิลีอื่นๆ รวมกัน คิดเป็นร้อยละ 71.58 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด

ตารางที่ 22 ร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับแฟมิลี (Family) ที่ตรวจพบในในฟิล์มชีวภาพ

แฟมิลี	ร้อยละที่พบ
<i>Comamonadaceae</i>	15.63
<i>Pseudomonadaceae</i>	10.60
<i>Rhodocyclaceae</i>	7.89
<i>Clostridiaceae</i>	7.27
<i>Brocadiaceae</i>	5.15
<i>Thiotrichaceae</i>	5.12
<i>Saprospiraceae</i>	3.72
<i>Xanthomonadaceae</i>	3.47
<i>Nitrospiraceae</i>	3.21
<i>Chitinophagaceae</i>	3.16
<i>Campylobacteraceae</i>	1.09
<i>Nitrosomonadaceae</i>	0.75
<i>Desulfobulbaceae</i>	0.35
Other	71.58

สำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในระดับจีโนม พบจุลินทรีย์ที่เคยถูกรายงานว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพมากที่สุดสองอันดับแรกคือ คือ จีโนม *Pseudomonas* และ *Clostridium* คิดเป็นร้อยละ 10.37 และ 7.27 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามลำดับ (ตารางที่ 23) ซึ่งเป็นจีโนมที่น่าจะพบประชากรที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชัน รองลงมาคือ จีโนม Dok59 ร้อยละ 7.22 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, จีโนม *Candidatus Brocadia* ร้อยละ 5.15 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นจีโนมที่น่าจะพบประชากรที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Anammox นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์ในจีโนม *Thiothrix* ร้อยละ 5.12 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด, พบจุลินทรีย์ในจีโนม *Nitrospira* ร้อยละ 3.21 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นจีโนมที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการไนโตรทอกซิเดชัน, จีโนม *Hydrogenophaga*, *HTCC*, *Dokdonella* และ *Nannocystis* ร้อยละ 2.84, 2.38, 1.81 และ 1.38 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบจุลินทรีย์ในจีโนมอื่น ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจน ได้แก่ จีโนม *Arcobacter* ร้อยละ 1.09 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นจีโนมที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนและ จีโนม *Desulfobulbus* ร้อยละ 0.35 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งเป็นจีโนมที่น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการ DNRA และยังพบจุลินทรีย์ในจีโนมอื่น ๆ รวมกัน ร้อยละ 47.40 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด

ตารางที่ 23 ร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับจิ้นัส (Genus) ที่ตรวจพบในในฟิล์มชีวภาพ

จิ้นัส	ร้อยละที่พบ
<i>Pseudomonas</i>	10.37
<i>Clostridium</i>	7.27
<i>Dok59</i>	7.22
<i>Candidatus Brocadia</i>	5.15
<i>Thiothrix</i>	5.12
<i>Nitrospira</i>	3.21
<i>Hydrogenophaga</i>	2.84
<i>HTCC</i>	2.38
<i>Dokdonella</i>	1.81
<i>Nannocystis</i>	1.38
<i>Arcobacter</i>	1.09
<i>Desulfobulbus</i>	0.35
<i>Other</i>	41.40

จากตารางที่ 24 ร้อยละของจุลินทรีย์ที่เคยถูกรายงานว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพในกลุ่ม *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Candidatus Brocadia*, *Nitrospira*, *Arcobacter*, *Nitrosomonadaceae* และ *Desulfobulbus* (ทั้งนี้ อาจมีจุลินทรีย์ตัวอื่นที่ไม่ได้ระบุในงานวิจัยนี้) แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนในระดับจิ้นัสหรือแฟมิลีมีมากถึงร้อยละ 28 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม มีจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่สามารถระบุชนิดของจิ้นัสได้และไม่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจน คิดเป็นร้อยละ 41 และ 31 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามลำดับ สำหรับจิ้นัสที่น่าจะเกี่ยวข้องในกระบวนการตรึงไนโตรเจน คือ จิ้นัส *Arcobacter* คิดเป็นร้อยละ 1.09 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด ยกตัวอย่างเช่น จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Arcobacter nitrofigilis* เป็นตัวที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ (McClung และคณะ, 1983) สำหรับแฟมิลี *Nitrosomonadaceae* พบคิดเป็นร้อยละ 0.75 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด ยกตัวอย่างเช่น จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Nitrosomonas* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการแอมโมเนีย

ออกซิเดชัน สำหรับกระบวนการไนโตรที่ออกซิเดชันจะพบจุลินทรีย์ที่น่าจะเกี่ยวข้องคือ จุลินทรีย์ใน
 จีโนส *Nitrospira* คิดเป็นร้อยละ 3.21 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์ม
 ชีวภาพทั้งหมด สำหรับกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน พบจุลินทรีย์ที่น่าจะเกี่ยวข้องอยู่ในจีโนส
Pseudomonas และ *Clostridium* คิดเป็นร้อยละ 10.37 และ 7.27 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง
 กับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเป็นจีโนสที่มีมากที่สุดที่สอง
 อันดับแรกเมื่อเทียบกับจีโนสอื่น ๆ ทำให้เห็นว่าระบบนี้มีจุลินทรีย์ในกระบวนการดีไนตริฟิเคชันเป็น
 จุลินทรีย์เด่นในระบบ เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Anammox ซึ่งเป็น
 กระบวนการออกซิไดซ์แอมโมเนียภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยพบจุลินทรีย์ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับ
 กระบวนการนี้ในจีโนส *Candidatus Brocadia* ร้อยละ 5.15 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักร
 ไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด และสำหรับกระบวนการ DNRA มีจุลินทรีย์ที่น่าจะเกี่ยวข้องคือ
 จุลินทรีย์ในจีโนส *Desulfobulbus* คิดเป็นร้อยละ 0.35 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจน
 ที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด จากร้อยละของจุลินทรีย์ที่พบทั้งหมดจะเห็นว่า พบจุลินทรีย์ที่น่าจะ
 เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนอย่าง
 หลากหลาย สอดคล้องกับการวิเคราะห์พารามิเตอร์น้ำที่มีค่าออกซิเจนละลายน้ำน้อยทำให้ออกซิเจน
 ไม่สามารถแพร่ไปได้ทั่วทั้งชั้นฟิล์มชีวภาพ เป็นผลทำให้ในระบบสามารถพบจุลินทรีย์กลุ่มที่เกี่ยวข้อง
 ในกระบวนการไนตริฟิเคชันและจุลินทรีย์กลุ่มที่เกี่ยวข้องในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน, Anammox
 และ DNRA ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่เกิดภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนร่วมด้วยใน
 ระบบ โดยถือเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบบำบัดหรือการกำจัดไนโตรเจน สอดคล้อง
 กับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า มีการตรวจพบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการเปลี่ยนรูป
 สารประกอบไนโตรเจนทั้งแบบภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนในระบบบำบัด
 แบบจานหมุนชีวภาพ (Lee และคณะ, 2008) ระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพนี้จึงเหมาะสมสำหรับ
 การศึกษาและพัฒนาจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่ม ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการกำจัดไนโตรเจนต่อไป

ตารางที่ 24 ร้อยละของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการบำบัดไนโตรเจนในระดับจันส์หรือแฟมิลี

กระบวนการเปลี่ยนรูปไนโตรเจน	จันส์ที่พบ	ปริมาณ
กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน	<i>Pseudomonas</i>	10.37
	<i>Clostridium</i>	7.27
กระบวนการ Anammox	<i>Candidatus Brocadia</i>	5.15
กระบวนการไนไตรท์ออกซิเดชัน	<i>Nitrospira</i>	3.21
กระบวนการตรึงไนโตรเจน	<i>Acrobacter</i>	1.09
กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน	<i>Nitrosomonadaceae</i> *	0.75
กระบวนการ DRNA	<i>Desulfobulbus</i>	0.35

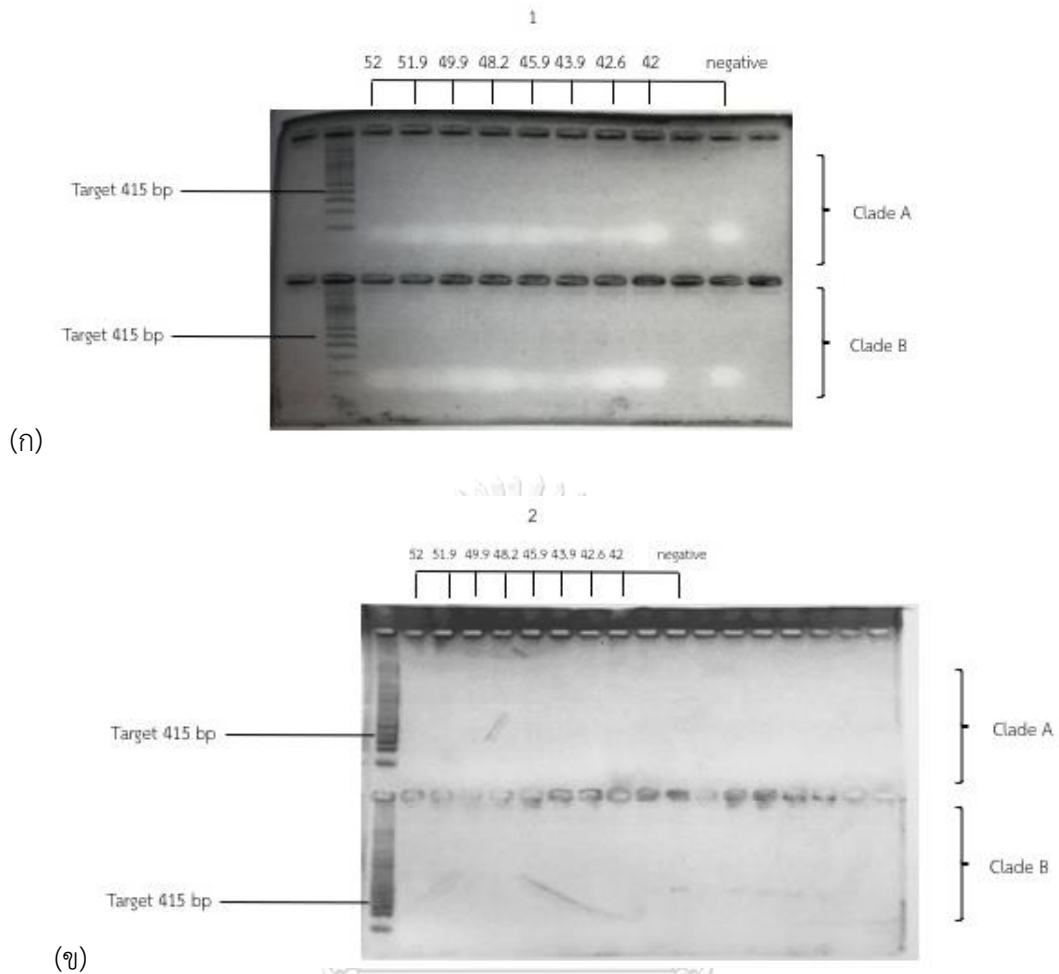
* แฟมิลี

5.3 การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการบำบัดไนโตรเจน ด้วยเทคนิค PCR-sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม

การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการบำบัดไนโตรเจน ด้วยเทคนิค PCR-sequencing จะใช้ตัวอย่างฟิล์มชีวภาพที่เก็บครั้งที่ 1 ณ วันที่ 7 กันยายน 2560 และครั้งที่ 2 ณ วันที่ 18 มกราคม 2561 โดยเก็บตัวอย่าง 3 จุด ต่อจานหมุนชีวภาพ 1 จาน (บริเวณหัว กลางและท้ายของจานหมุน) รวมทั้งหมด 2 ช่วงเวลา (รูปที่ 30)

5.3.1 กลุ่มประชากร Comammox (Complete ammonia oxidation)

ศึกษา กลุ่มประชากร Comammox โดยใช้ไพรเมอร์ ComaA-224f (5'-TAYAAYTGGGTSAAAYTA-3') กับไพรเมอร์ ComaA-659R (5'-ARATCATSGTGCTRTG-3') และไพรเมอร์ ComaB-224f (5'-TAYTTCTGGACRTTYTA-3') กับไพรเมอร์ ComaB-659R (5'-ARATCCARACDGTGTG-3') (Pjevac และคณะ, 2017) ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับยีน *amoA* ของ Comammox cladeA และ cladeB ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์กับตัวอย่างที่เก็บได้ ทั้ง 2 ช่วงเวลา ในเดือนกันยายน 2560 และเดือนมกราคม 2561 ซึ่ง DNA เป้าหมายจากการทำ PCR มีขนาด 415 bp และได้ทำการ PCR โดยปรับ Annealing Temperature ระหว่าง 42 – 55 °C ดังรูปที่ 38 (ก) และ 38 (ข)

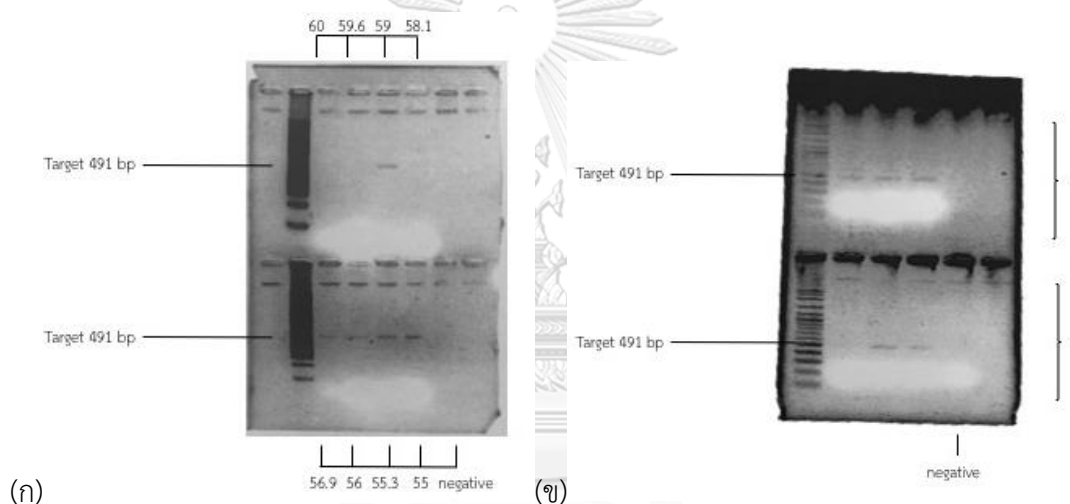


รูปที่ 38 เจล PCR ของ Comammox ในช่วงเวลาที่ 1(ก) และ 2(ข)

จากการศึกษาไม่พบประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม Comammox ทั้ง cladeA และ CladeB ในตัวอย่างที่เก็บทั้ง 2 ช่วงเวลา ทั้งนี้การศึกษาของ Pjevcac, P. และคณะ ในปี 2017 พบ Comammox ในระบบบำบัดน้ำเสียได้เฉพาะ CladeA เท่านั้น และจากการศึกษาของ Gonzalez-Martinez, A. และคณะในปี 2016 พบจุลินทรีย์ Comammox เพียง 1 จาก 9 ระบบบำบัดน้ำเสียที่ศึกษาและยังพบว่า Comammox จะเจริญเติบโตไม่ดีเท่ากับ *Nitrosomonas* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันส่วนกระบวนการไนโตรทอกซิเดชันพบ *Nitrospira* ตัวอื่นที่ไม่ใช่ Comammox

5.3.2 กลุ่มประชากร AOB (Ammonia oxidizing bacteria)

ทำการศึกษากลุ่มประชากร AOB โดยใช้ไพรเมอร์ amoA-1F (5'-GGGTTTCTACTGGTGGT-3') กับไพรเมอร์ amoA-2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3') (Rotthauwe และคณะ, 1997) ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับยีน *amoA* ของ AOB ทำ PCR กับตัวอย่างจากช่วงเวลา 1 โดยมีขนาด DNA เป้าหมาย 491 bp ทำการปรับ Annealing Temperature ระหว่าง 60 - 55 °C ได้ผลดังรูปที่ 39 (ก) ที่พบแบนตรงกับขนาด DNA เป้าหมายที่ Annealing Temperature 59, 56.9, 56, 55.3 และ 55 °C โดยพบว่าที่ Annealing Temperature 55 °C แบนที่ได้มีความชัดเจนที่สุด จึงได้ทำการ PCR อีกครั้งที่ Annealing Temperature 55 °C กับตัวอย่างที่เก็บได้ทั้ง 2 ช่วงเวลา ผลดังรูปที่ 39 (ข)



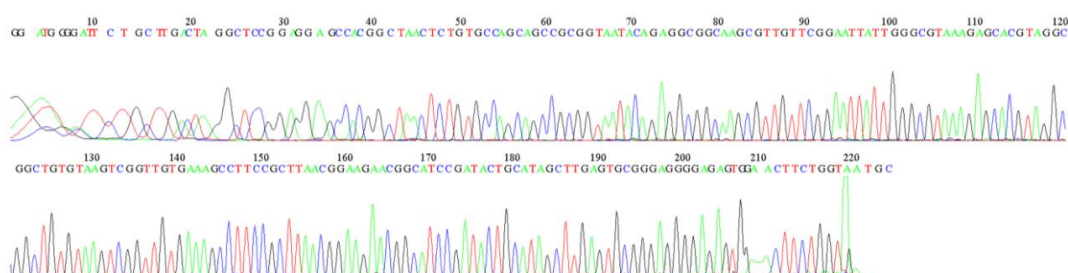
รูปที่ 39 เจล PCR ของ AOB ในช่วงเวลา 1(ข-บน) และ 2(ข-ล่าง)

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปสร้าง clone library และส่งตัวอย่างจากแต่ละช่วงเวลาไปทำการถอดรหัสพันธุกรรมช่วงเวลาละ 24 ตัวอย่าง ได้ผลดังรูป 40 (ก) และ 40 (ข) โดยกราฟที่ได้แต่ละพีคแยกออกจากกันชัดเจน ทำให้ทราบว่าไม่มีการปนเปื้อนของ DNA จากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น

(ก)



(ข)

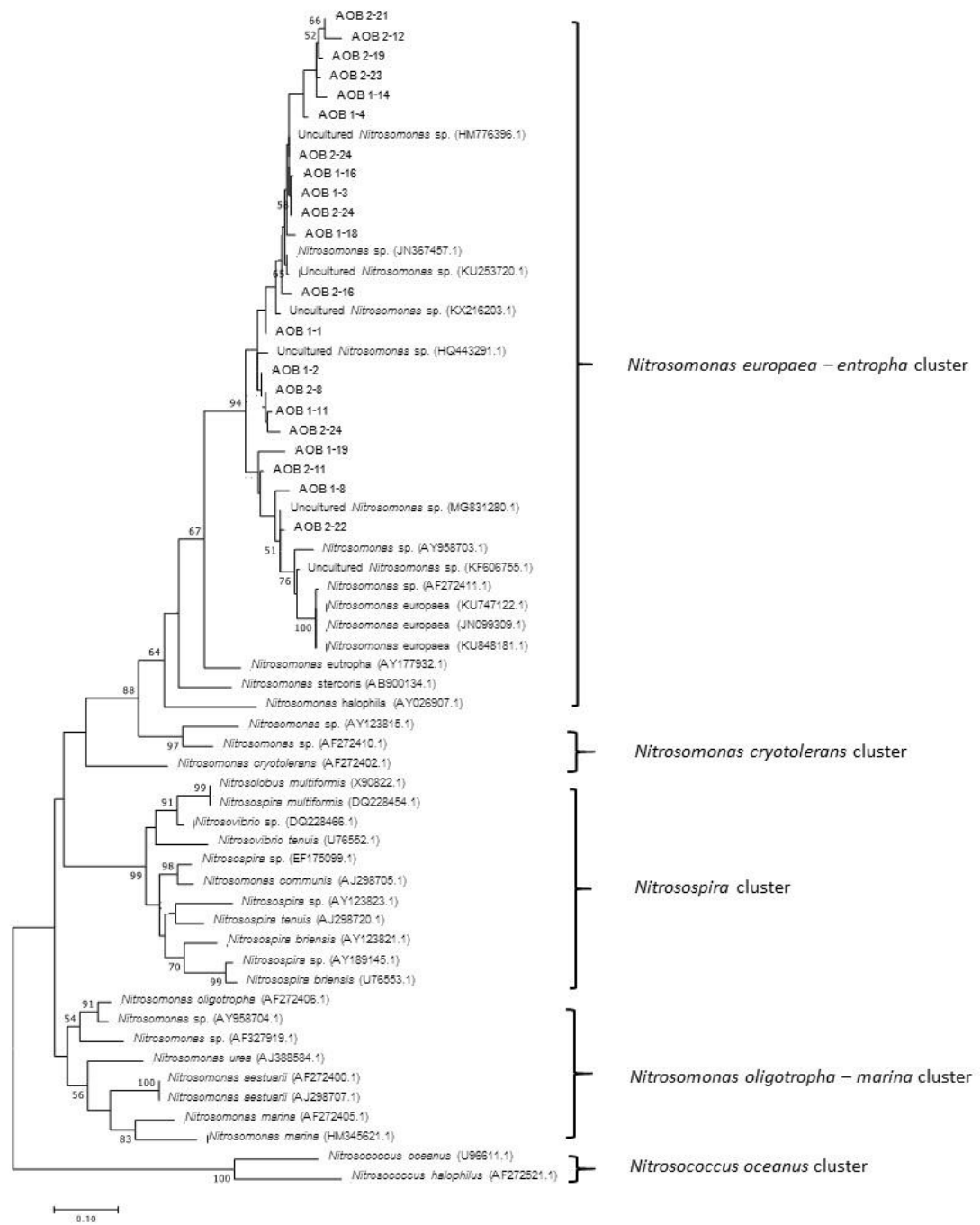


รูปที่ 40 ตัวอย่างกราฟลำดับเบสของ AOB

จากนั้นนำผล sequence ที่ได้มา Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) โดยมี sequence ทั้งสิ้น 48 sequences ผลการ blast แสดงให้เห็นว่าทุก sequence มีความใกล้เคียงกับ AOB ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity) อยู่ในช่วง 97 – 100 % จากการวิเคราะห์ OTU ที่มี % ความเหมือนของ sequence มากกว่า 97 % สามารถจัดกลุ่ม sequence ของตัวอย่างฟิล์มชีวภาพที่เก็บจากช่วงเวลา 1 และ 2 ได้ช่วงเวลาละ 10 OTUs จากนั้นนำตัวแทน sequence แต่ละ OTU มาวิเคราะห์ Phylogenetic tree กับ reference ของ AOB ด้วยโปรแกรม Mega 7 ได้ผลออกมาดังรูปที่ 41 โดยพบว่า AOB ของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด มีความใกล้เคียงกับ AOB กลุ่ม *Nitrosomonas europaea* เพียงกลุ่มเดียว ประชากรจุลินทรีย์กลุ่ม AOB มีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ ดังนี้ *Nitrosomonas europaea* มีค่า K_s ของแอมโมเนียตั้งแต่ 1.62– 27.44 mgN/L (Park และ Noguera, 2007), (Laanbroek และคณะ, 1994), *Nitrosomonas oligotropha* มีค่า K_s ของแอมโมเนียตั้งแต่ 0.238 – 1.86 mgN/L (Suwa และคณะ, 1994), (Koops และคณะ, 2006), *Nitrosomonas eutropha* มีค่า K_s ของแอมโมเนียตั้งแต่ 10.5 – 27.01 mgN/L (Stehr และคณะ, 1995), (Koops และคณะ, 2006), *Nitrosococcus mobilis* มีค่า K_s ของแอมโมเนียตั้งแต่ 13.28 – 27.01 mgN/L (Koops และคณะ, 2006) และ *Nitrospira sp.* มีค่า K_s ของแอมโมเนียตั้งแต่ 0.54

- 4.466 mgN/l (Ward และคณะ, 2000), (Jiang และ Bakken, 1999) จากผลข้างต้น *Nitrosomonas europaea* มีช่วงค่า K_s สูงกว่า AOB กลุ่มอื่น ๆ ทำให้พบ *Nitrosomonas europaea* ได้ในระบบที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง ซึ่งสอดคล้องกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด ที่มีค่าเฉลี่ยของแอมโมเนียน้ำเข้าประมาณ 77.30 mg/l และน้ำออกประมาณ 1.18 mg/l นอกจากนี้ ไม่พบความแตกต่างของกลุ่มประชากร AOB ในตัวอย่างที่เก็บจากทั้ง 2 ช่วงเวลาที่ศึกษา เนื่องจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสดมีการเปิดใช้งานตลอดทั้งปีและมีค่าพารามิเตอร์น้ำใกล้เคียงกันตลอดทั้งปี

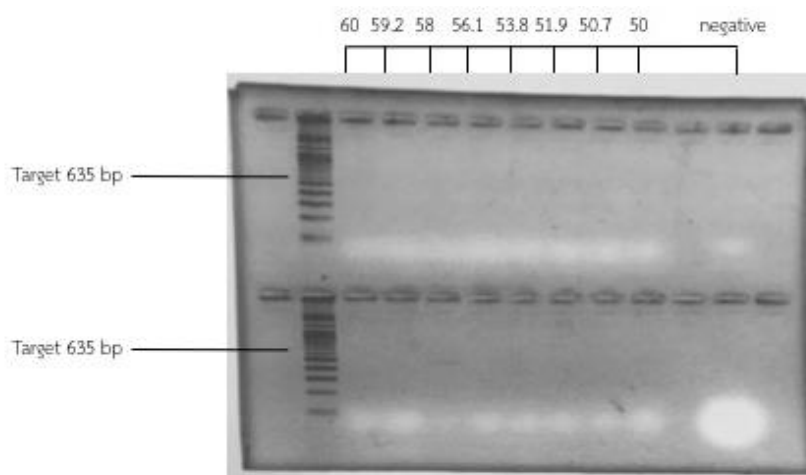




รูปที่ 41 สายวิวัฒนาการของประชากรจุลินทรีย์กลุ่ม AOB

5.3.3 กลุ่มประชากร AOA (Ammonia oxidizing archaea)

ศึกษาากลุ่มประชากร AOA โดยใช้ไพรเมอร์ Arch-amoAF (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3') กับไพรเมอร์ Arch-amoAR (5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3') (Francis และคณะ, 2005) ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับยีน *amoA* ของ AOA โดยมีขนาด DNA เป้าหมายที่ได้จากการ PCR คือ 635 bp ทั้งนี้ได้ทำ PCR โดยปรับ Anneling Temperature ที่ 60 -50 °C กับตัวอย่างที่เก็บได้ทั้ง 2 ช่วงเวลา รูปที่ 42

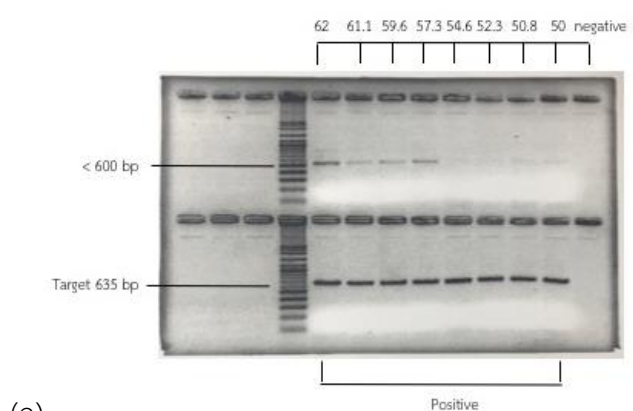


รูปที่ 42 เจล PCR ของ AOA ในช่วงเวลาที่ 1(บน) และ 2(ล่าง)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไม่พบจุลินทรีย์กลุ่ม AOA ในทุก Anneling Temperature ที่ศึกษา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้ จะเจริญได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่แอมโมเนียไม่สูงนัก มี AOA เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตดีที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงถึง 270 mg/L ได้ คือ *Nitrososphaera viennensis* (Tourna และคณะ, 2011) ทั้งนี้ โดยเมื่อพิจารณาค่า K_s ของแอมโมเนียในกลุ่ม AOA จะพบว่า AOA มีค่า K_s ต่ำมากที่สุดที่ 0.001862 mg-N/L (Martens-Habbena และคณะ, 2009) และ 0.00854 mg-N/L (Park และคณะ, 2010) โดยในระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสดมีความเข้มข้นของแอมโมเนียขาเข้าเฉลี่ยสูงถึง 77.30 mg/L และน้ำออกประมาณ 1.18 mg/L ทำให้ไม่พบจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าว

5.3.4 กลุ่มประชากร NOB (Nitrite oxidizing bacteria - *Nitrobacter*)

ศึกษา กลุ่ม ประชากร NOB (*Nitrobacter*) โดยใช้ไพรเมอร์ P338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') กับไพรเมอร์ NIT3 (5'-CCTGTGCTCCATGCTCCG-3') (Jie และ Daping, 2008) ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ของ *Nitrobacter* โดยมีขนาด DNA เป้าหมายของการทำ PCR คือ 635 bp ทั้งนี้ได้ทำ PCR ตัวอย่างจากช่วงเวลา 1 โดยปรับ Annealing Temperature ที่ 62 – 50 °C ดังรูปที่ 43 (ก) จากนั้นทำ PCR อีกครั้งที่ Annealing Temperature 65 °C กับตัวอย่างที่เก็บได้ทั้ง 2 ช่วงเวลา ได้ผลดังรูปที่ 43 (ข)



(ก)



(ข)

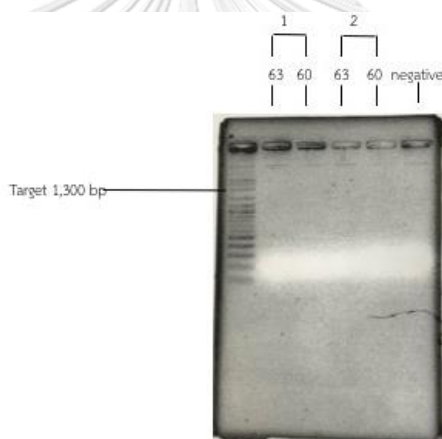
รูปที่ 43 เจล PCR ของ *Nitrobacter* ในช่วงเวลาที่ 1 และ 2

จากการทดลองแบนด์ที่แสดงความยาวของ DNA เป้าหมายจากการทำ PCR ของผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดน้อยกว่า 600 bp ซึ่งแบนด์เป้าหมายสำหรับ *Nitrobacter* ที่ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ P338f กับ NIT3 มีขนาด 635 bp ทั้งนี้ไพรเมอร์ P338f กับไพรเมอร์ NIT3 เฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ของ NOB แต่เนื่องจากไพรเมอร์นี้เฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA อาจทำให้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ของจุลินทรีย์อื่น ๆ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ ที่ไม่ใช่ขนาด 635 bp อีกทั้งโดยทั่วไป

Nitrobacter มีค่า K_s อยู่ที่ 1.49 -17.36 mg-N/l (Ge และคณะ, 2015) และระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสดพบไนโตรท์ขาเข้าและขาออกเฉลี่ยที่ 0.036 และ 0.67 mg/l ตามลำดับ ถือเป็นระบบที่มีความเข้มข้นไนโตรท์สูง ซึ่งอาจไม่เหมาะสมสำหรับ *Nitrobacter*

5.3.5 กลุ่มประชากร NOB (Nitrite oxidizing bacteria - *Nitrotoga*)

ศึกษา กลุ่ม ประชากร NOB (*Nitrotoga*) โดยใช้ไพรเมอร์ Ntoga124F (5'-ATCGGAACGTACCCGGAAA-3') กับไพรเมอร์ Ntoga1462R (5'-CGAACCTACCGTGGCAAC-3') (Lücker และคณะ, 2015) ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ของ *Nitrotoga* ที่มีขนาด DNA เป้าหมายของการทำ PCR ที่ 1300 bp ทั้งนี้ได้ทำ PCR โดยปรับ Annealing Temperature ในช่วงอุณหภูมิ 62 และ 60 °C กับตัวอย่างที่เก็บได้ทั้ง 2 ช่วงเวลาดังรูปที่ 44

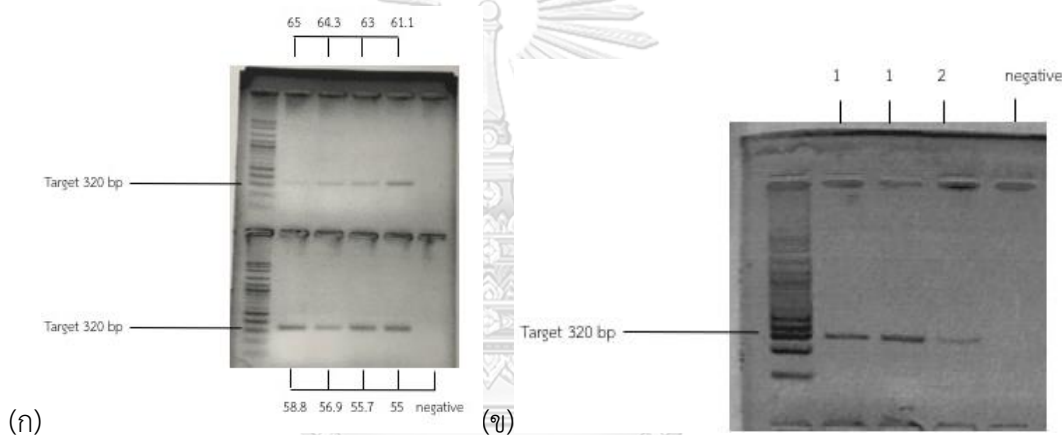


รูปที่ 44 เจล PCR ของ *Nitrotoga* ในช่วงเวลาที่ 1 และ 2

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของ *Nitrotoga* ได้ ทั้งนี้จากการศึกษาของ (Lücker และคณะ, 2015) โดยใช้เทคนิค PCR ในการศึกษาจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Nitrotoga* ในระบบบำบัดน้ำเสียจำนวน 21 แห่ง พบจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Nitrotoga* ในระบบบำบัดน้ำเสีย 11 แห่ง ที่มีแอมโมเนียเข้าระบบที่ 8.32 – 60 mg-N/l โดยระบบบำบัดอีก 10 แห่งไม่พบจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้โดยตั้งข้อสังเกตว่าระบบบำบัด 10 แห่งนั้นจะมีแอมโมเนียเข้าระบบ ตั้งแต่ 56 – 970 mg-N/l อาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีแอมโมเนียสูงอย่างระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสดที่มีค่าแอมโมเนียเข้าระบบ 77.30 mg-N/l ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

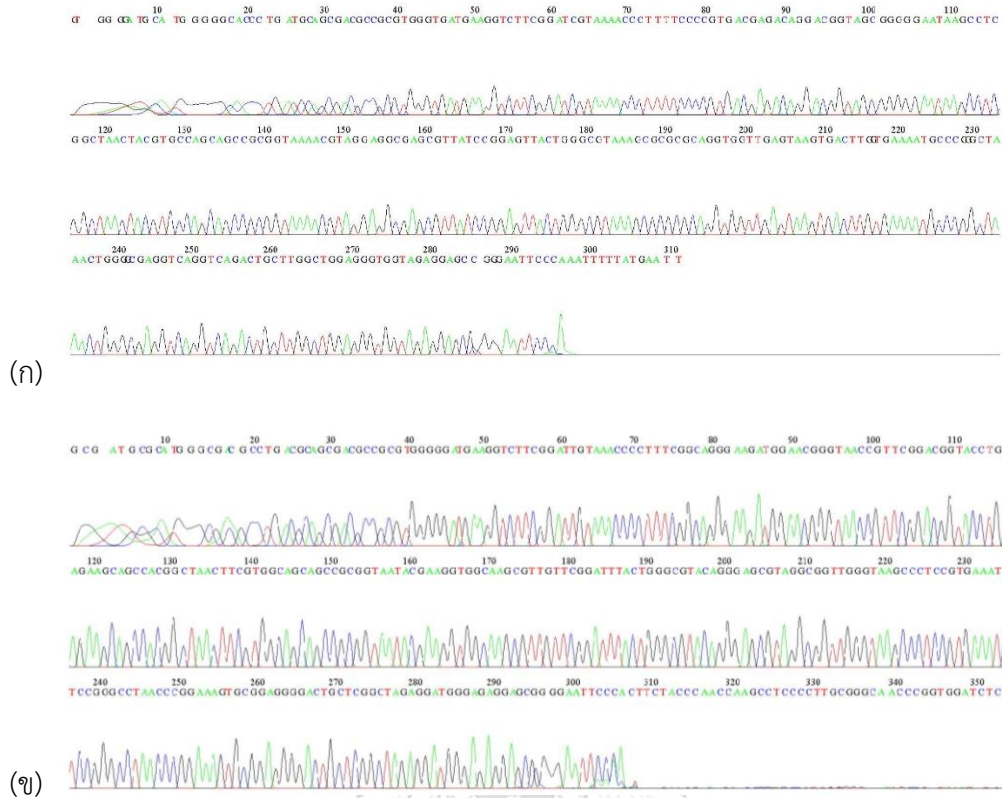
5.3.6 กลุ่มประชากร NOB (Nitrite oxidizing bacteria - *Nitrospira*)

ศึกษา กลุ่ม ประชากร NOB (*Nitrospira*) โดยใช้ไพรเมอร์ P338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') กับไพรเมอร์ Nstpa0685r (5'-CGGGAATTCCGCGCTC-3') (Liu และคณะ, 2008) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ของ *Nitrospira* ที่มีขนาด DNA เป้าหมายของการทำ PCR ที่ 320 bp ทำ PCR ตัวอย่างจากช่วงเวลา ที่ 1 โดยปรับ Annealing Temperature ในช่วงอุณหภูมิที่ 65 - 55 °C ได้ผลดังรูปที่ 45 (ก) โดยพบว่าที่ Annealing Temperature 55 °C แบนด์มีความเข้มชัดจนที่สุด จึงทำ PCR อีกครั้งกับตัวอย่างที่เก็บได้จากทั้ง 2 ช่วงเวลา ที่ Annealing Temperature ที่ 55 °C ได้ผลดังรูปที่ 45 (ข) ซึ่งขนาดของ DNA ที่ได้จากการ PCR ของผลิตภัณฑ์ตรงกับขนาดของ DNA เป้าหมาย



รูปที่ 45 เจล PCR ของ *Nitrospira* ในช่วงเวลาที่ 1 และ 2 ของไพรเมอร์ P338f กับไพรเมอร์ Nstpa0685r

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปสร้าง clone library และส่งตัวอย่างไปทำการถอดรหัสพันธุกรรมทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ได้ผลดังรูป 46 (ก) และ 46 (ข) โดยกราฟที่ได้แต่ละพีคแยกออกจากกันชัดเจน ทำให้ทราบว่าไม่มีการปนเปื้อนของ DNA จากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น



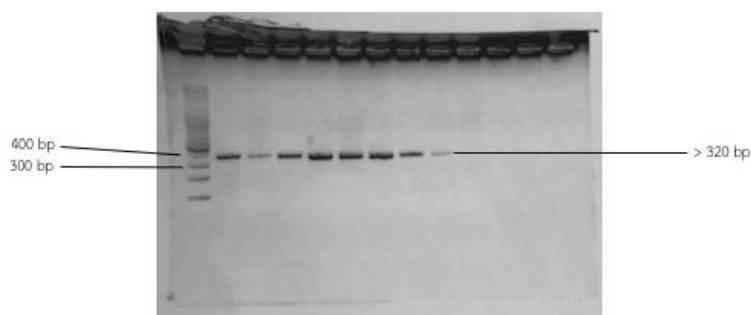
รูปที่ 46 ตัวอย่างกราฟลำดับเบสของ *Nitrospira*

จากนั้นจึง Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) กับตัวอย่างที่เก็บจากทั้ง 2 ช่วงเวลา จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่า sequence ที่ได้ไม่มีความใกล้เคียงกับ *Nitrospira* โดยมีความใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ในสายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *Nitrospira* ได้แก่ clone OTU469, clone OTU_8695 และ clone OTU754_sMFC_T1.23572 ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ผล Blast ของ *Nitrospira* โดยใช้ไพรเมอร์ P338f กับไพรเมอร์ Nstpa0685r

Accession Number	Score			Identities			Source
	Bit	Raw	Evalue	Match	Total	Pct.(%)	
MF692278.1	342	185	6e-92	192	195	98	>MF692278.1:97-290 Uncultured bacterium clone OTU469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KX975981.1	377	204	8e-101	232	245	95	>KX975981.1:48-289 Uncultured bacterium clone OTU_8695 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
MG101621.1	477	258	8e-131	262	264	99	>MG101621.1:61-324 Uncultured bacterium clone OTU754_sMFC_T1.23572 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

จากนั้นทำการทดลองอีกครั้ง โดยเปลี่ยนไพรเมอร์ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้วิเคราะห์ในครั้งแรกอาจไม่เฉพาะเจาะจงต่อ *Nitrospira* จึงเพิ่มปริมาณ DNA ของจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ที่มีขนาดของผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกับ *Nitrospira* โดยเปลี่ยนมาใช้ไพรเมอร์ EUB338 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3') (Amann และคณะ, 1990) กับไพรเมอร์ Nstpa0685r (5'-CGGGAATTCCGCGCTC-3') ที่มีขนาดของ DNA เป้าหมายที่ได้จากการ PCR ที่ 320 bp โดยทำ PCR อีกครั้งกับตัวอย่างที่เก็บได้ทั้ง 2 ช่วงเวลา ที่ Annealing Temperature 55 °C ได้ผลดังรูปที่ 47



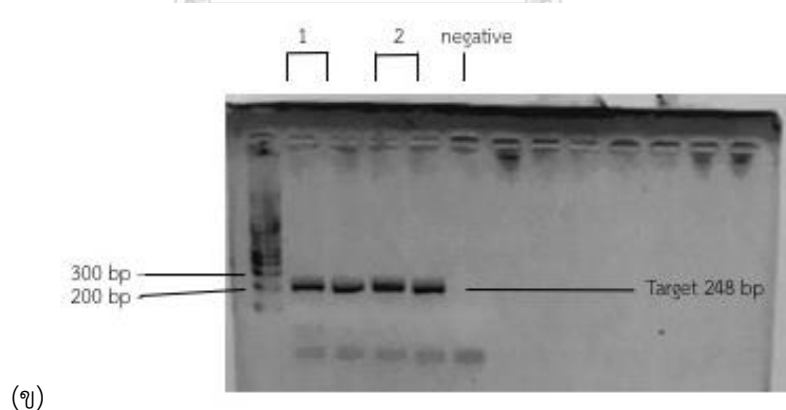
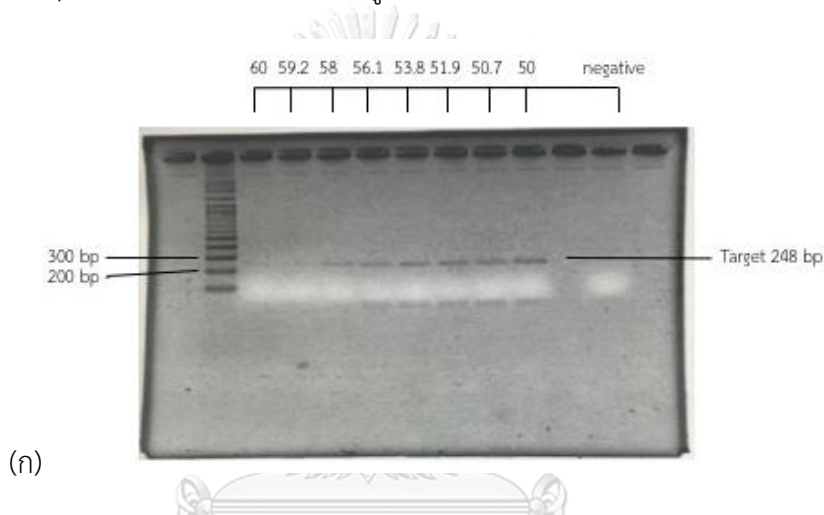
รูปที่ 47 เจล PCR ของ *Nitrospira* ในช่วงเวลาที่ 1 และ 2 ของไพรเมอร์ EUB338 กับไพรเมอร์

Nstpa0685r

โดยพบว่าขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดมากกว่า 320 bp ซึ่งไม่เท่ากับขนาดของ DNA เป้าหมายที่ 320 bp จากการทดลองกับชุดไพรเมอร์ P338f กับไพรเมอร์ Nstpa0685r และไพรเมอร์ EUB338 กับไพรเมอร์ Nstpa0685r ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ไม่พบประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Nitrospira* ทั้งนี้จากการศึกษาค่า K_s ของไนโตรที่ในกลุ่ม *Nitrospira* พบว่าอยู่ที่ 0.11 – 0.5 mg-N/l (Ge และคณะ, 2015) ทำให้ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสดที่พบไนโตรที่เฉลี่ยที่ 0.85 mg/l น่าจะพบประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Nitrospira* อย่างไรก็ตามการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing พบจุลินทรีย์ในจีโนม *Nitrospira* คิดเป็นร้อยละ 3.21 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด ทั้งนี้การศึกษาโดยเทคนิค PCR ไม่พบประชากรจุลินทรีย์กลุ่ม *Nitrospira* อาจเนื่องมาจากชุดของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ที่อาจทำให้เพิ่มปริมาณ DNA ของจุลินทรีย์กลุ่มอื่นได้ง่ายกว่ากลุ่ม *Nitrospira*

5.3.7 กลุ่มประชากร Anammox (Anaerobic ammonia oxidation)

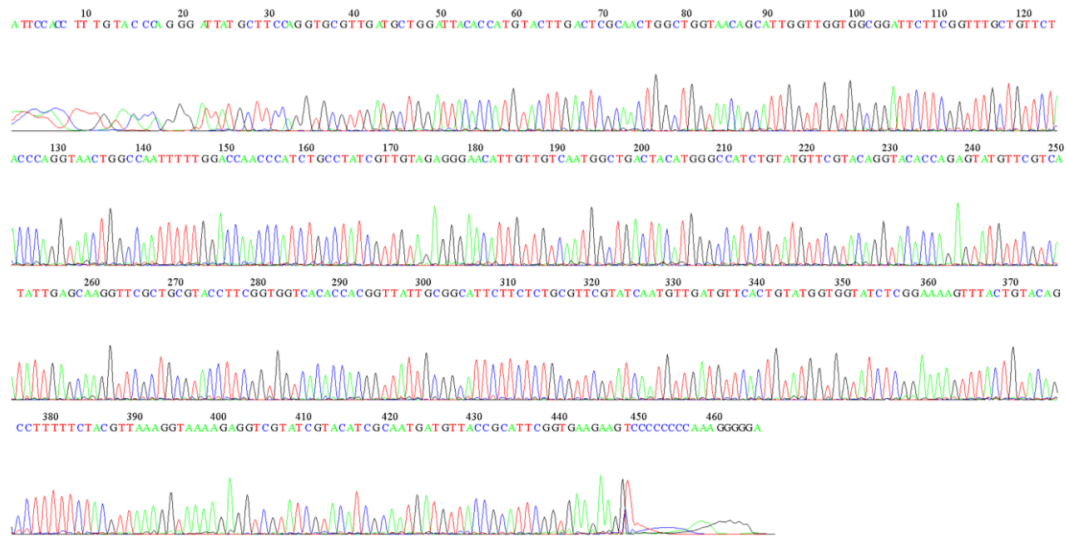
ศึกษากลุ่มประชากร Anammox โดยใช้ไพรเมอร์ A438f (5'-GTCRGGAGTTADGAAATG-3') กับไพรเมอร์ A684r (5'-ACCAGAAGTTCCACTCTC-3') (Humbert และคณะ, 2012) ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA โดยมีขนาดของ DNA เป้าหมายจากการทำ PCR ที่ 248 bp ทำ PCR ตัวอย่างจากช่วงเวลา 1 โดยปรับ Annealing Temperature ที่ช่วงอุณหภูมิ 60 - 50 °C ได้ผลดังรูปที่ 48 (ก) โดยพบว่า Annealing Temperature ที่ 57 °C แบนด์ที่ได้มีความคมชัดที่สุด และมี primer dimer น้อยที่สุด จึงทำ PCR อีกครั้งกับตัวอย่างที่เก็บได้จากทั้ง 2 ช่วงเวลา โดยใช้ Annealing Temperature ที่ 57 °C ได้ผลดังรูปที่ 48 (ข)



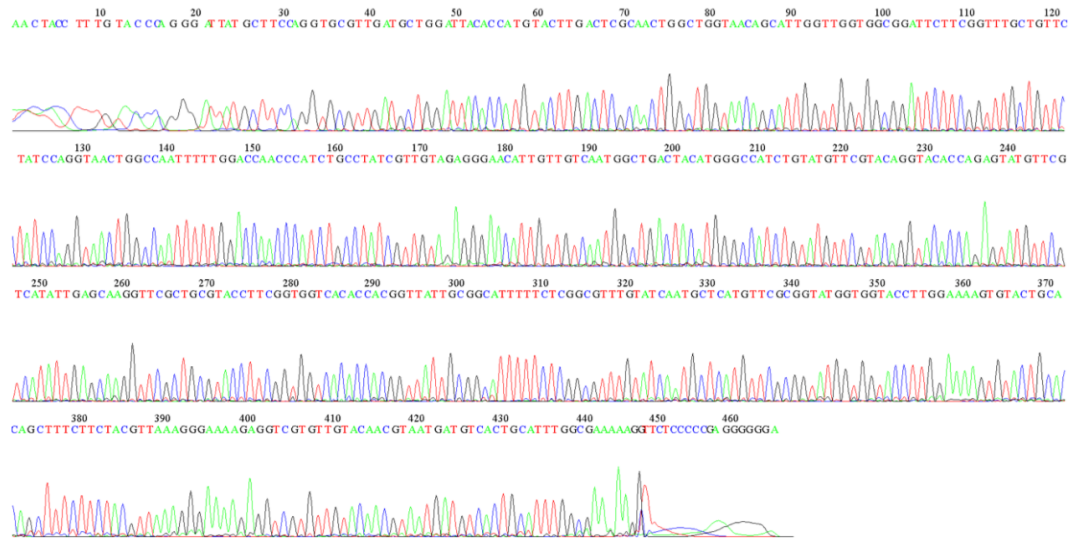
รูปที่ 48 เจล PCR ของ Anammox ในช่วงเวลาที่ 1(ก) และ 2(ข)

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปสร้าง clone library และส่งตัวอย่างไปทำการถอดรหัสพันธุกรรมช่วงเวลาละ 20 ตัวอย่าง ได้ผลดังรูปที่ 49 (ก) และ 49 (ข) โดยกราฟที่ได้แต่ละกราฟก็คแยกออกจากกันชัดเจน ทำให้ทราบว่าไม่มีการปนเปื้อนของ DNA จากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น

(ก)



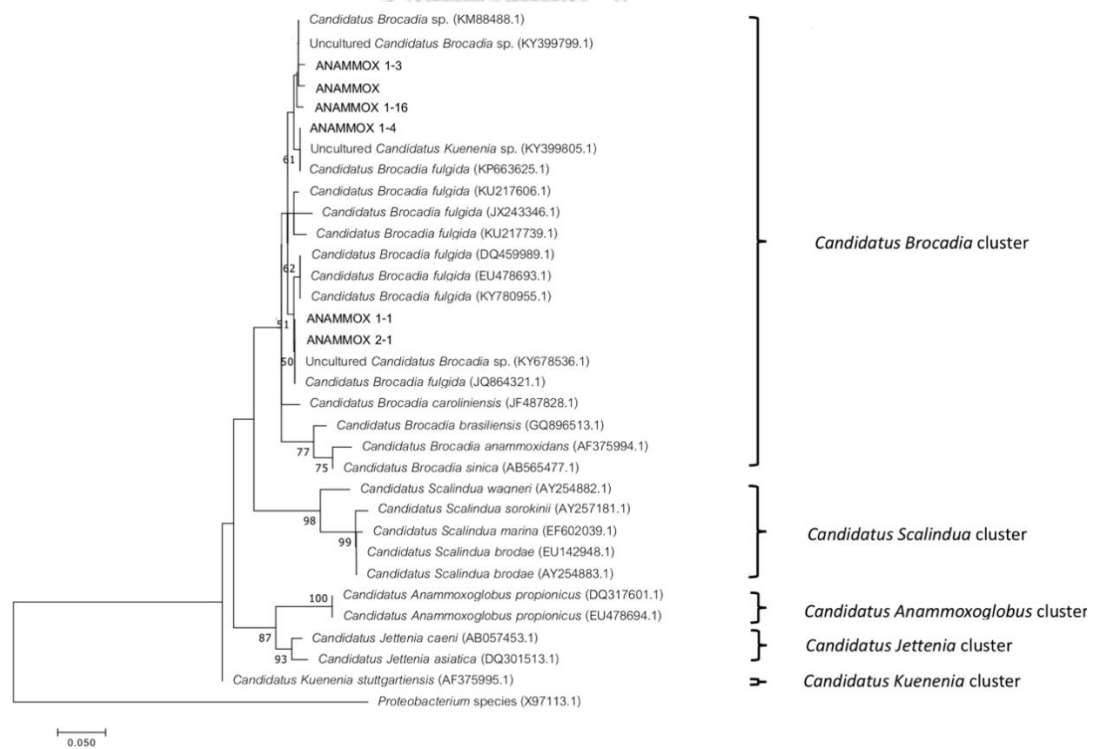
(ข)



รูปที่ 49 ตัวอย่างกราฟลำดับเบสของ Anammox

จากนั้นจึง Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sequence ทั้ง 51 sequences จากตัวอย่างทั้ง 2 ช่วงเวลาที่ทำการวิเคราะห์ โดยกราฟ sequence ทั้ง 51 sequence มีความใกล้เคียงกับ Anammox โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity) อยู่ที่ 99 – 100 % จากนั้นได้วิเคราะห์ OTU ด้วยโปรแกรม ใช้โปรแกรม CD-HIT พบว่าสามารถแบ่ง sequence ได้ ช่วงเวลาละ 5 OTUs จากนั้นนำ sequence ที่เป็นตัวแทนของแต่ละ OTU มาวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Mega 7 ได้ผลดังรูปที่ 50 ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า

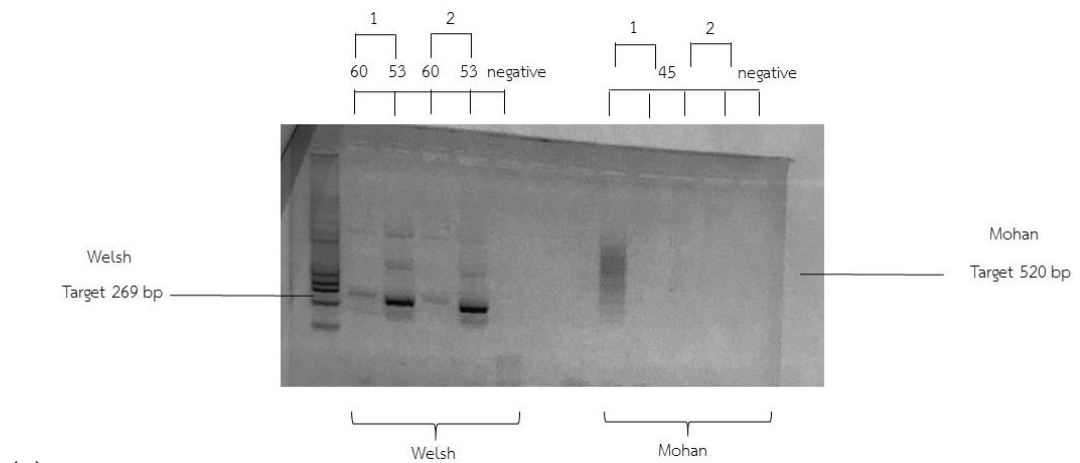
Anammox ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด มีความใกล้เคียงกับ จุลินทรีย์ anammox กลุ่ม *Candidatus Brocadia* เพียงกลุ่มเดียว จุลินทรีย์ Anammox จะสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ได้เป็น *Candidatus Brocadia* มีค่า K_s ของแอมโมเนียและค่า K_s ของไนโตรที่ 0.54 และ 1.564 mg-N/l ตามลำดับ (Oshiki และคณะ, 2011), *Candidatus Jettenia* มีค่า K_s ของแอมโมเนียและค่า K_s ของไนโตรที่ 0.3 และ 1.637 mg-N/l ตามลำดับ (Ali และคณะ, 2015), *Candidatus Anammoxidans* มีค่า K_s ของแอมโมเนียและค่า K_s ของไนโตรที่ 0.09 และ 0.23 mg-N/l ตามลำดับ (Jetten และคณะ, 2005), *Candidatus Kueningenia* มีค่า K_s ของไนโตรที่ 0.0092 – 0.138 mg-N/l ตามลำดับ (Ali และคณะ, 2015), *Candidatus Scindua* มีค่า K_s ของแอมโมเนียและค่า K_s ของไนโตรที่ 0.054 และ 0.0207 mg-N/l (Awata และคณะ, 2013) ตามลำดับ ทำให้ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสดที่มีค่าเฉลี่ยของแอมโมเนียทั้งปีประมาณ 77.30 mg-N/l และไนโตรที่เฉลี่ยไม่เกิน 0.67 mg-N/l พบเพียงกลุ่ม *Candidatus Brocadia* นอกจากนี้ในตัวอย่างที่เก็บจากทั้ง 2 ช่วงเวลาที่ศึกษา ไม่พบความแตกต่างของประชากรจุลินทรีย์ Anammox เนื่องจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด มีการเปิดใช้งานตลอดทั้งปีทำให้มีค่าพารามิเตอร์น้ำ ที่เอื้อต่อการเกิดประชากรจุลินทรีย์ที่ใกล้เคียงกัน



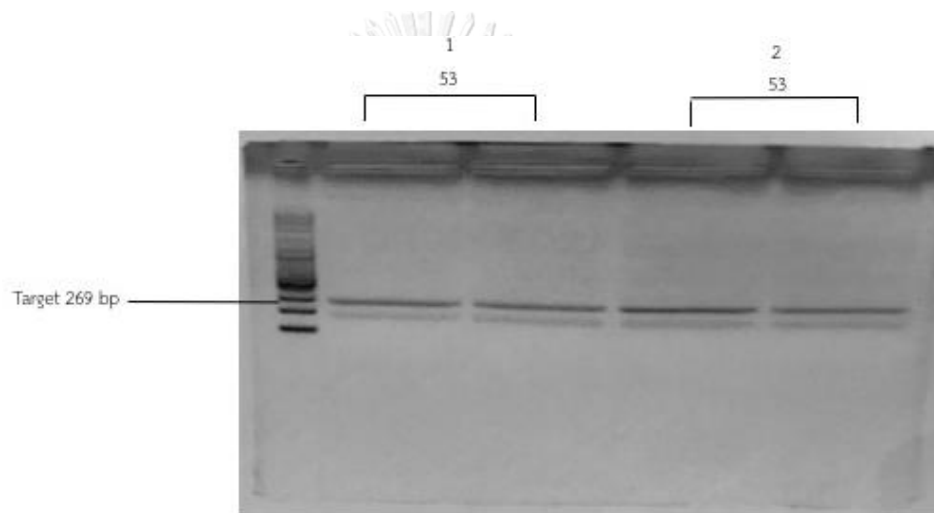
รูปที่ 50 สายวิวัฒนาการของประชากรจุลินทรีย์กลุ่ม Anammox

5.3.8 กลุ่มประชากร DNRA (Dissimilatory nitrate reduction to ammonium)

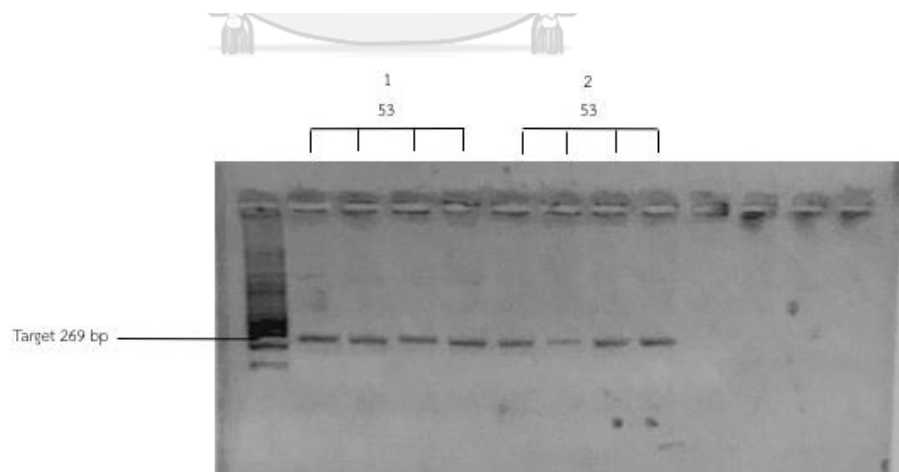
ศึกษากลุ่มประชากร DNRA โดยใช้ไพรเมอร์ *nrfA2aw* (5'-CARTGYCAYGTBGARTA-3') กับไพรเมอร์ *nrfAR1* (5'-TWNGGCATRTGRCARTC-3') (Welsh และคณะ, 2014) และใช้ไพรเมอร์ *F1nrfA* (5'-GCNTGYTGGWSNTGYAA-3') กับไพรเมอร์ *R1nrfA* (5'-TWNGGCATRTGRCARTC-3') (Mohan และคณะ, 2004) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *nrfA* โดย DNA เป้าหมายที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดอยู่ที่ 269 bp และ 520 pb ตามลำดับ ทำ PCR โดยปรับ Annealing Temperature ที่อุณหภูมิ 60 และ 53 °C ในไพรเมอร์ชุดที่ 1 และปรับ Annealing Temperature ที่อุณหภูมิ 45 °C ในไพรเมอร์ชุดที่ 2 ได้ผลดังรูปที่ 51 (ก) ซึ่งไพรเมอร์ชุดที่ 1 มีขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ PCR ที่ 269 bp ตรงกับขนาดของ DNA เป้าหมายจากการทำ PCR และเลือกใช้ Annealing Temperature ที่ 53 °C เนื่องจากพบแบนด์ที่มีความชัดเจนมากกว่าที่ Annealing Temperature 60 °C จึงทำ PCR อีกครั้งกับตัวอย่างทั้ง 2 ช่วงเวลาโดยใช้ Annealing Temperature ที่ 53 °C ได้ผลดังรูปที่ 51 (ข) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ PCR ที่ 269 bp และต่ำกว่าอีก 1 แถบ จึงตัดเจลและทำให้บริสุทธิ์และรันเจลอีกครั้ง ได้ผลดังรูปที่ 51 (ค) ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 2 ไม่พบแบนด์ใด ๆ จากการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ชุดดังกล่าว



(ก)



(ข)

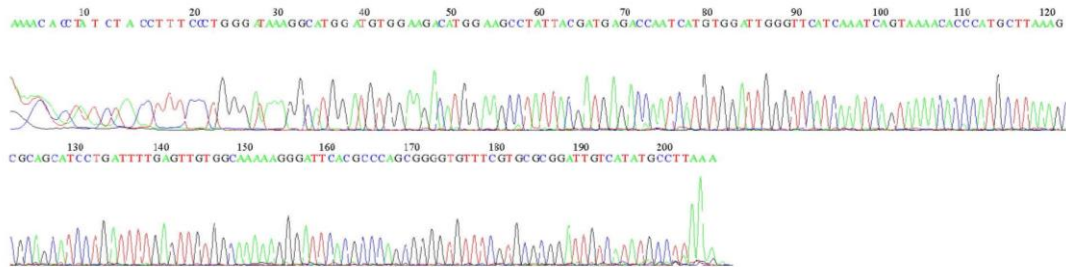


(ค)

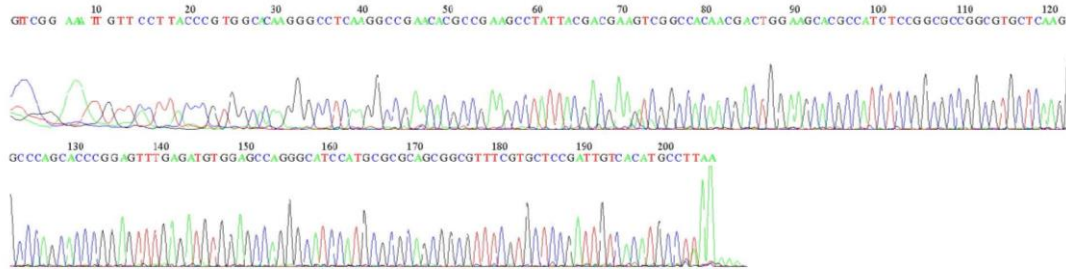
รูปที่ 51 เจล PCR ของ DNRA ในช่วงเวลาที่ 1 และ 2

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปสร้าง clone library และส่งตัวอย่างไปทำการถอดรหัสพันธุกรรมช่วงเวลาละ 10 ตัวอย่าง ได้ผลดังรูปที่ 52 (ก) และ 52 (ข) โดยกราฟที่ได้แต่ละกราฟก็คแยกออกจากกันชัดเจน ทำให้ทราบว่าไม่มีการปนเปื้อนของ DNA จากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น

(ก)



(ข)



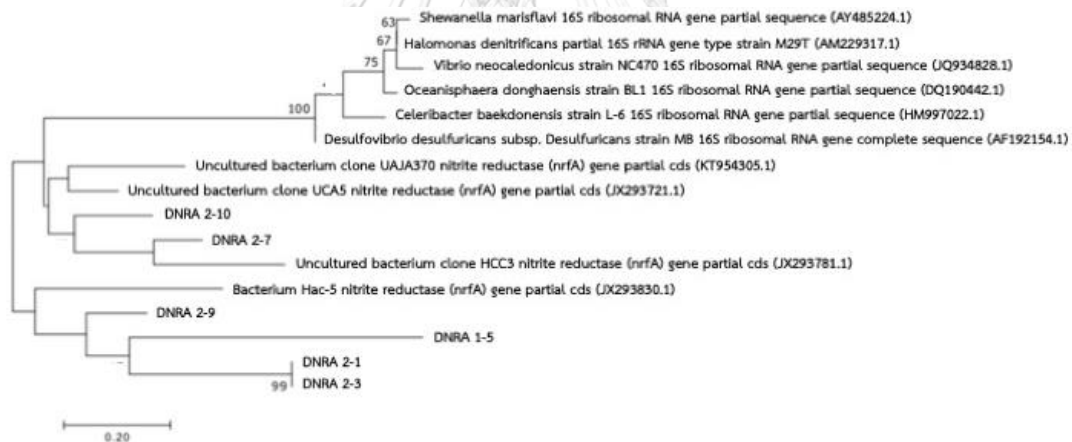
รูปที่ 52 ตัวอย่างกราฟลำดับเบสของ DNRA

จากนั้นนำผล sequence ที่ได้มา Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) โดยมี sequence ทั้งสิ้น 20 sequence มีความใกล้เคียงกับยีน *nrfA* ของ DNRA ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity) อยู่ที่ 78 – 91 % ดังตารางที่ 26 และวิเคราะห์ Phylogenetics tree ด้วยโปรแกรม Mega 7 เปรียบเทียบกับ reference ของ DNRA จากยีน 16S rRNA ดังรูปที่ 53

ตารางที่ 26 ผล Blast ของ DNRA

Accession Number	Score			Identities			Source
	Bit	Raw	Evalue	Match	Total	Pct.(%)	
KT423319.1	63.9	34	2.00E-06	82	105	78	">KT423319.1 Uncultured bacterium clone nrfA_October_Deep_42 cytochrome c nitrite reductase (nrfA) gene, partial cds

Accession Number	Score			Identities			Source
	Bit	Raw	Evalue	Match	Total	Pct.(%)	
LC230543.1	73.1	39	3.00E-09	66	79	84	>LC230543.1:90-167 Uncultured prokaryote <i>nrfA</i> gene for ammonia-forming nitrite reductase, partial cds,
JX293780.1	12.1	65	1.00E-23	137	137	79	>JX293780.1 Uncultured bacterium clone HCC2 nitrite reductase (<i>nrfA</i>) gene, partial cds
KT954305.1	62.1	33	6.00E-06	41	45	91	>KT954304.1 Uncultured bacterium clone UAJA81 nitrite reductase (<i>nrfA</i>) gene, partial cds
MF535630.1	13.9	75	3.00E-29	127	153	83	>MF535630.1 Uncultured bacterium clone B23 cytochrome C nitrite reductase (<i>nrfA</i>) gene, partial cds
JX293790.1	67.6	36	1.00E-07	78	99	79	>JX293790.1:133-231 Uncultured bacterium clone UCE3 nitrite reductase (<i>nrfA</i>) gene, partial cds



รูปที่ 53 สายวิวัฒนาการของประชากรจุลินทรีย์กลุ่ม DNRA

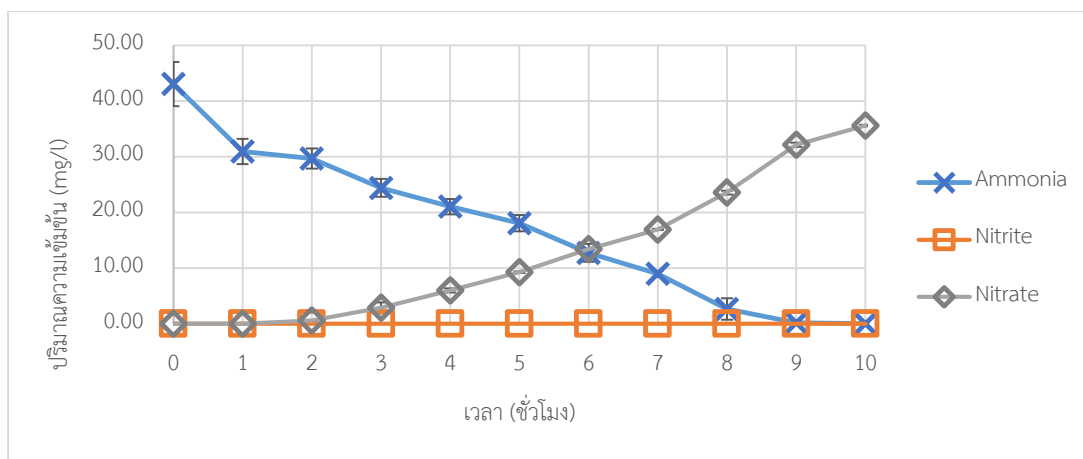
จากรูปที่ 53 จะเห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่ม DNRA ในระบบที่ทำการวิเคราะห์ Phylogenetics tree มีความแตกต่างจากสายวิวัฒนาการของกลุ่มที่นำมาอ้างอิง เนื่องจาก DNRA ที่ใช้ในการในอ้างอิงนั้น เป็น DNRA จากการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ซึ่งต่างจาก DNRA ที่ได้จากการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ที่ใช้ยีน *nrfA*

5.4 กิจกรรมการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนที่สภาวะต่าง ๆ

การศึกษาโดยใช้เทคโนโลยี Next Generation Sequencing แสดงให้เห็นว่า พบการมีอยู่ของ ประชากรจุลินทรีย์ในขั้นตอนตรึงไนโตรเจน, แอมโมเนียออกซิเดชัน, ไนโตรที่ออกซิเดชัน, Anammox, ดีไนตริฟิเคชันและ DNRA ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปของแอมโมเนียไนโตรที่และไนเตรท ในสภาวะต่างๆ เพื่อ ศึกษาการทำงานของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม ดังนี้

5.4.1 การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะแอโรบิก

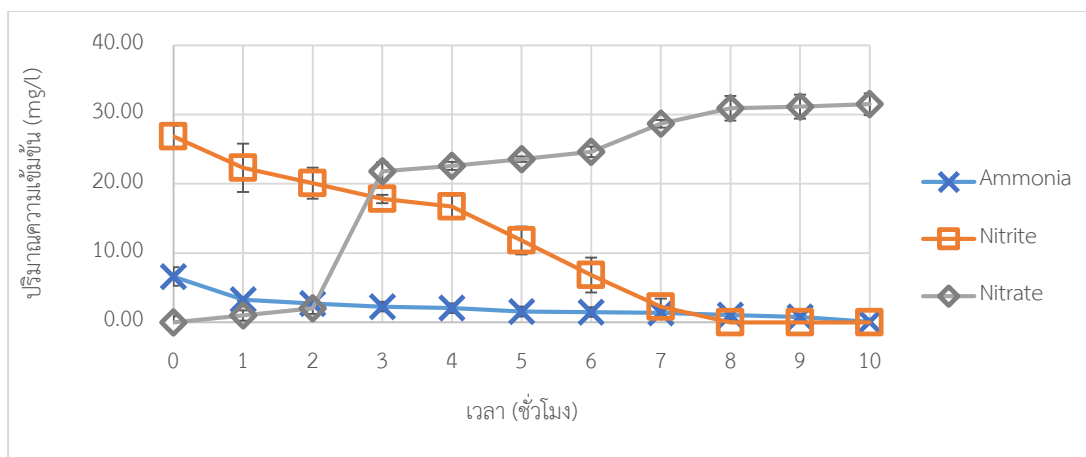
ศึกษาการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (รูปที่ 54) โดยใช้แอมโมเนียเริ่มต้น ที่ 50 mg/l ใช้ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ 50 mg/l โดยตรวจวัดค่า pH DO และ อุณหภูมิ ตลอดการทดลอง 10 ชั่วโมง ได้ค่าเฉลี่ยที่ 7.57, 6.29 mg/l และ 26.14 °C ตามลำดับ ซึ่งเป็นสภาวะ ที่เหมาะสมในการเกิดกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน สำหรับค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 43.03 mg/l ลดลงเหลือ 0 mg/l ภายในเวลา 10 ชั่วโมง โดยคิดเป็นอัตราการลดลงเฉลี่ยในช่วง 5 ชั่วโมงแรกที่ 4.99 mg/l-hr ซึ่งเป็นช่วงที่มีการลดลงมากที่สุด ในขณะที่เดียวกันผลไนเตรทเพิ่มขึ้นจาก 0 mg/l เป็น 35.58 mg/l ภายในชั่วโมงที่ 10 คิดเป็นอัตราการเพิ่มขึ้นเฉลี่ยในช่วง 5 ชั่วโมงสุดท้ายที่ 4.44 mg/l-hr ซึ่งเป็นช่วงที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นมากที่สุด และไม่พบการสะสมไนเตรทในระบบ พบการทดลองนี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาในหัวข้อ 5.2 ที่ศึกษาประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค Next Generation Sequencing พบแฟมิลี *Nitrosomonadaceae* ที่พบคิดเป็นร้อยละ 0.75 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง กับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด ซึ่งเป็นจีนัสที่มีจุลินทรีย์ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับ กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน (ตารางที่ 24) และสอดคล้องกับการศึกษาในหัวข้อ 5.3 ที่ศึกษา ประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค PCR พบกลุ่มประชากร AOB (รูปที่ 41) แต่ไม่มีการพบจุลินทรีย์ใน กลุ่ม Comammox และ AOA ทำให้ทราบว่า ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพนั้น มี จุลินทรีย์กลุ่ม AOB เป็นกลุ่มที่ทำงานหลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้กลายเป็นไนเตรทได้ในระบบ



รูปที่ 54 การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะแอโรบิก

5.4.2 การเปลี่ยนรูปไนโตรที่ภายใต้สภาวะแอโรบิก

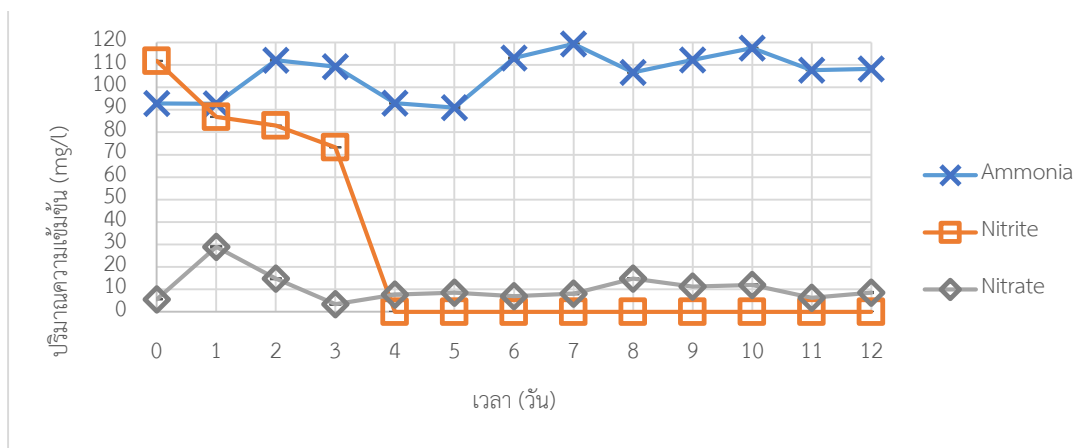
ศึกษาการเปลี่ยนรูปไนโตรที่ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (รูปที่ 55) โดยใช้ไนโตรที่เริ่มต้นที่ 25 mg/l ใช้ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ 50 mg/l โดยตรวจวัดค่า pH DO และ อุณหภูมิ ตลอดการทดลอง 10 ชั่วโมงได้ค่าเฉลี่ยที่ 7.83 6.89 mg/l และ 25.94 °C ตามลำดับ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดกระบวนการไนโตรที่ออกซิเดชัน วัดค่าแอมโมเนียมีเริ่มต้นในระบบได้เล็กน้อยจากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสดที่ 6.60 mg/l และในชั่วโมงที่ 10 ลดลงเหลือ 0.07 mg/l ค่าไนโตรที่เริ่มต้นที่ 26.85 mg/l ลดลงเหลือ 0 mg/l ภายในเวลา 8 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการลดลงเฉลี่ยในช่วง 3 ชั่วโมงแรกที่ 3.01 mg/l-hr ซึ่งเป็นช่วงที่มีอัตราการลดลงมากที่สุด ในขณะที่เดียวกัน ไนเตรทมีการเพิ่มขึ้นเป็น 31.49 mg/l ภายในเวลา 10 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการเพิ่มขึ้นเฉลี่ยในช่วง 3 ชั่วโมงแรกที่ 7.26 mg/l-hr ซึ่งเป็นช่วงที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นมากที่สุด ทำให้ไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ในหัวข้อ 5.2 ที่มีการใช้เทคโนโลยี Next Generation Sequencing ที่พบจุลินทรีย์ในจีนัส *Nitrospira* คิดเป็นร้อยละ 3.21 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด (ตารางที่ 24) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนโตรที่ออกซิเดชัน แต่อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ในหัวข้อ 5.3 โดยเทคนิค PCR พบว่าไม่สอดคล้อง เนื่องจากไม่มีการพบประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม NOB (*Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrospira*) ดังรูปที่ 43 - 44 ตารางที่ 25 และรูปที่ 47 ตามลำดับ อาจเนื่องจากชุดของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ที่อาจทำให้เพิ่มปริมาณ DNA ของจุลินทรีย์กลุ่มอื่นได้ง่ายกว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม NOB (*Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrospira*) ทำให้ไม่สามารถตรวจพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม NOB ที่ออกซิไดซ์ไนโตรที่ไปเป็นไนเตรทจากการใช้เทคนิค PCR ได้



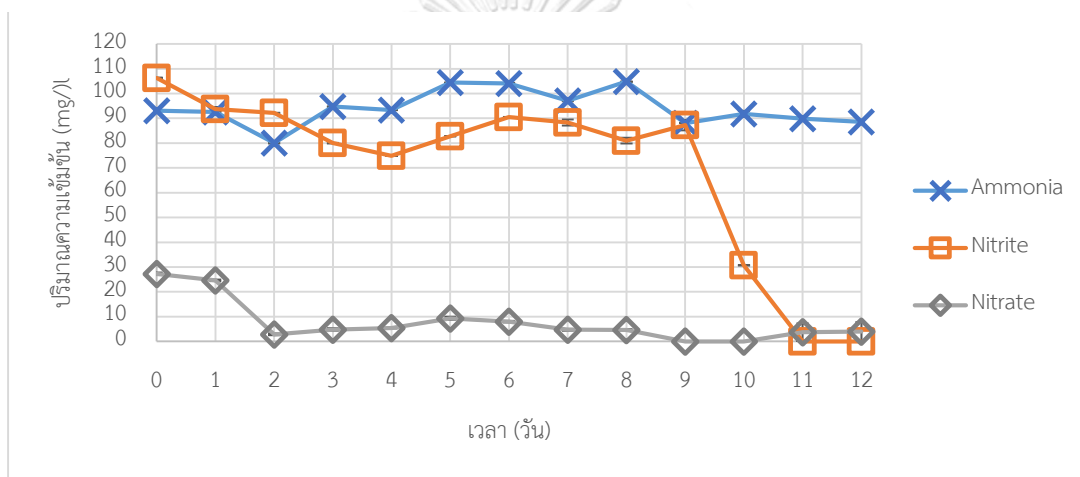
รูปที่ 55 การเปลี่ยนรูปไนไตรท์ภายใต้สภาวะแอโรบิก

5.4.3 การเปลี่ยนรูปไนแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนไตรท์

ศึกษาการเปลี่ยนรูปไนแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนไตรท์ (รูปที่ 56 - 57) โดยใช้ไนแอมโมเนียและไนไตรท์ เริ่มต้นที่ 100 mg/L และใช้ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ 50 และ 25 mg/L เพื่อศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ Anammox โดยพบว่าทั้ง 2 การทดลองค่าไนแอมโมเนียไม่ได้ลดลงเมื่อเทียบกับค่าไนไตรท์ที่ลดลงจนหมดในเวลาไม่เกิน 4 และ 11 วัน สำหรับการทดลองที่ความเข้มข้นตะกอนจุลินทรีย์ที่ 50 และ 25 mg/L ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กิจกรรมของจุลินทรีย์ Anammox ที่มีการเปลี่ยนไนแอมโมเนียและไนไตรท์ให้เป็นก๊าซไนโตรเจนนั้นไม่น่าจะเกิดในการทดลองนี้ โดยไนไตรท์ที่ลดลงอาจเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่มดีไนตริฟิเคชัน เนื่องจากการเปลี่ยนรูปไนไตรท์อย่างเดียวโดยอาจเกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีการใช้สารอินทรีย์ที่มาจากตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้นและเปลี่ยนรูปไนไตรท์ไป ทำให้จุลินทรีย์ Anammox ไม่มีตัวให้อิเล็กตรอนและไม่สามารถเจริญเติบโตในการทดลองนี้ได้ ซึ่งจากผลการทดลองในหัวข้อ 5.2 ที่มีการใช้เทคโนโลยี Next Generation Sequencing พบจุลินทรีย์ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Anammox ในจีโนม *Candidatus Brocadia* ร้อยละ 5.15 และกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน ในจีโนม *Pseudomonas* และ *Clostridium* คิดเป็นร้อยละ 10.37 และ 7.27 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด (ตารางที่ 24) ซึ่งเห็นได้ว่ากระบวนการดีไนตริฟิเคชันมีร้อยละการพบมากกว่ากระบวนการ Anammox สำหรับการทดลองในหัวข้อ 5.3 โดยเทคนิค PCR มีการพบประชากรจุลินทรีย์ Anammox (รูปที่ 50) อาจเนื่องมาจากในระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด มีชั้นฟิล์มชีวภาพที่หนาทำให้มีโอกาสในการแยกชั้นกันอยู่ระหว่างดีไนตริฟิเคชันและ Anammox ทำให้จุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มสามารถอยู่ร่วมกันในระบบได้



รูปที่ 56 การเปลี่ยนรูปไนแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนโตรท โดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์ 50 mg/L



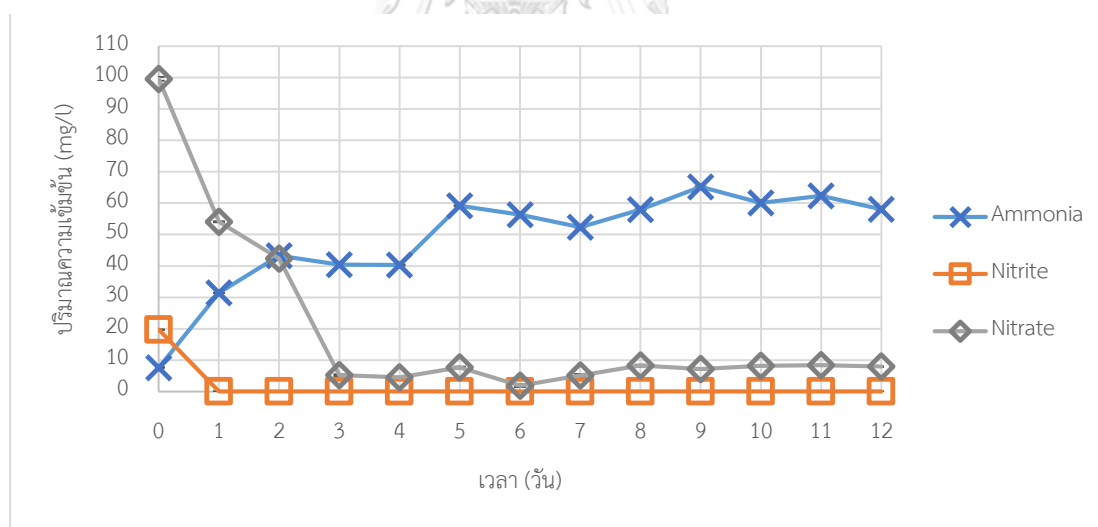
รูปที่ 57 การเปลี่ยนรูปไนแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนโตรท โดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์ 25 mg/L

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.4.4 การเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล

ศึกษาการเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล (รูปที่ 58) โดยใช้ไนเตรทเริ่มต้นที่ 100 mg/L ใช้เมทานอล 2 โมล/ไนเตรท 1 โมล (Foglar และคณะ, 2005) ใช้ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ 50 mg/L เพื่อศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่มดีไนตริฟิเคชัน ในการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนโตรเจนแก๊ส โดยพบว่าการลดลงของไนเตรทจาก 99.58 mg/L เหลือ 5.21 mg/L ภายในเวลา 3 วัน คิดเป็นอัตราการลดลงเฉลี่ยในช่วง 3 วันแรก 31.46 mg/L-day ซึ่งเป็นช่วงที่มีการลดลงสูงที่สุด และแอมโมเนียเพิ่มขึ้นจาก 7.64 mg/L ในวันแรก เป็น 40.44 mg/L ในวันที่ 12 คิดเป็นอัตราการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียเฉลี่ยในช่วง 3 วันแรกที่ 32.8 mg/L-day ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเพิ่มขึ้นสูงที่สุด ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่ม DNRA ร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่ม Denitrification

สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า ที่พบว่ามีการทำงานของ DNRA ที่มากกว่ากลุ่มดีไนทริฟิเคชัน ในระยะเวลาเดียวกัน (Song และคณะ, 2014) โดย DNRA จะเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นแอมโมเนีย ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ซึ่งไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนและซัลไฟด์หรือสารอินทรีย์คาร์บอนตัวอื่น ๆ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และเมื่อคิดจากอัตราส่วนของ COD:N ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ที่ 6.86:1 ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ว่าเมื่ออัตราส่วน COD:N สูงที่ 8:1 จะสามารถพบการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่ม DNRA ได้ (Chutivisut และคณะ, 2018) หรือที่อัตราส่วน COD:N เท่ากับ 7.7:1 พบว่าไนเตรทจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมากถึงร้อยละ 90 แสดงให้เห็นว่ามีการทำงานของ DNRA เกิดขึ้นในการศึกษา การเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล (Van Den Berg และคณะ, 2015) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในหัวข้อ 5.2 ที่มีการใช้เทคโนโลยี Next Generation Sequencing พบจุลินทรีย์ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ในจีโนม *Desulfobulbus* คิดเป็นร้อยละ 0.35 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด (ตารางที่ 24) และการทดลองในหัวข้อ 5.3 โดยเทคนิค PCR มีการพบประชากรจุลินทรีย์กลุ่ม DNRA เช่นกัน ดังตารางที่ 26 และรูปที่ 53



รูปที่ 58 การเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองตรวจวัดพารามิเตอร์น้ำเข้า - ออกจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด ตลอดระยะเวลา 10 เดือน มีค่า COD น้ำเข้า - ออกเท่ากับ 247.68 และ 44.26 mg/l ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการกำจัดเฉลี่ยร้อยละ 81.93 NH_3 น้ำ - ออกเท่ากับ 77.30 และ 1.18 mg/l ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการกำจัดเฉลี่ยร้อยละ 98.43, NO_2^- น้ำ - ออกเท่ากับ 0.04 และ 0.67 mg/l ตามลำดับ NO_3^- น้ำเข้า - ออกเท่ากับ 2.70 และ 6.23 mg/l ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าระบบมีความสามารถในการกำจัดไนโตรเจน ซึ่งมีโอกาสพบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดไนโตรเจนได้

ผลการศึกษาของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค Next Generation Sequencing พบร้อยละของจุลินทรีย์ในระดับจีโนมหรือแฟ้มยีนที่เคยถูกรายงานว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพ คิดเป็นร้อยละ 28 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Candidatus Brocadia*, *Nitrospira*, *Acrobacter*, *Nitrosomonadaceae* และ *Desulfobulbus* (ทั้งนี้อาจมีจุลินทรีย์ตัวอื่นที่ไม่ได้ระบุในงานวิจัยนี้) โดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแอมโมนิเออิกออกซิเดชัน อยู่ในแฟ้มยีน *Nitrosomonadaceae* คิดเป็นร้อยละ 0.75 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด พบจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนโตรโทออกซิเดชัน อยู่ในจีโนม *Nitrospira* ร้อยละ 3.21 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด พบจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน อยู่ในจีโนม *Pseudomonas* และ *Clostridium* คิดเป็นร้อยละ 10.37 และ 7.27 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด ตามลำดับ พบจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Anammox อยู่ในจีโนม *Candidatus Brocadia* คิดเป็นร้อยละ 5.15 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด และพบจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DRNA อยู่ในจีโนม *Desulfobulbus* คิดเป็นร้อยละ 0.35 ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนที่พบในฟิล์มชีวภาพทั้งหมด

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนรูปแอมโมนิเออิกภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พบอัตราการลดลงเฉลี่ยของแอมโมนิเออิกในช่วง 5 ชั่วโมงแรกที่ 4.99 mg/l-hr ขณะเดียวกันพบอัตราการเพิ่มขึ้นเฉลี่ยของไนไตรท์ในช่วง 5 ชั่วโมงสุดท้ายที่ 4.44 mg/l-hr แสดงว่ามีการทำงานของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับ

กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน ผลการศึกษาในกลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค PCR - clone library มีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากเทคนิค Next Generation Sequencing และการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยไม่พบกลุ่มประชากร Comammox จากการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *amoA* ของ Comammox ทั้ง cladeA และ cladeB แต่พบกลุ่มประชากร AOB จากการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *amoA* โดยพบสายพันธุ์ *Nitrosomonas europaea* และไม่พบกลุ่มประชากร AOA จากการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *amoA* ของ AOA ทำให้สรุปได้ว่า AOB เป็นกลุ่มประชากรจุลินทรีย์หลักที่ทำหน้าที่ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ

การศึกษารูปแบบไนโตรที่ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พบอัตราการลดลงเฉลี่ยของไนโตรที่ในช่วง 3 ชั่วโมงแรกที่ 3.01 mg/l-hr ขณะเดียวกันพบอัตราการเพิ่มขึ้นเฉลี่ยของไนเตรทในช่วง 3 ชั่วโมงแรกที่ 7.26 mg/l-hr แสดงว่ามีการทำงานของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกระบวนการไนโตรที่ออกซิเดชัน โดยผลดังกล่าวไม่มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาในกลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค PCR - clone library ซึ่งไม่พบกลุ่มประชากร NOB ทั้ง *Nitrobacter*, *Nitrotoga* และ *Nitrospira* จากการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ซึ่งอาจเนื่องมาจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่มีความเหมาะสมกับกลุ่มประชากร NOB ในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ

การศึกษารูปแบบแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนโตรที่ พบค่าแอมโมเนียไม่ได้ลดลงแต่ค่าไนโตรที่ลดลงจนหมดในเวลาไม่เกิน 4 และ 11 วัน แสดงให้เห็นว่ามีการทำงานของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนโตรที่เฟสแบบใช้ในไนโตรที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน แต่ไม่พบการทำงานของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Anammox ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาในกลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค PCR - clone library และ Next Generation Sequencing ที่พบกลุ่มประชากร Anammox สายพันธุ์ *Candidatus Brocadia* จากการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ของกลุ่มประชากร Anammox ทำให้อาจสรุปได้ว่าพบกลุ่มประชากร Anammox และกลุ่มประชากร Anammox น่าจะทำงานในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ แต่สภาวะที่ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการอาจไม่สนับสนุนการทำงานของกลุ่มประชากร Anammox

การศึกษารูปแบบไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล พบว่า มีอัตราการลดลงเฉลี่ยของไนเตรทในช่วง 3 วันแรก 31.46 mg/l-day และพบอัตราการเพิ่มขึ้นเฉลี่ยของแอมโมเนียในช่วง 3 วันแรกที่ 32.80 mg/l-day และจากค่าอัตราส่วนระหว่าง COD:N แสดงว่าน่าจะมีการทำงานของ

จุลินทรีย์กลุ่ม DNRA ร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่ม Denitrifier ที่ใช้ในเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ในสภาวะการทดลองนี้ โดยการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค PCR - clone library พบกลุ่มประชากร DNRA จากการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *nrfA*

ผลการทดลองสรุปได้ว่า ระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสดมีประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนค่อนข้างหลากหลายในกระบวนการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนในน้ำเสีย ที่ทำได้โดยการเปลี่ยนรูปสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในน้ำเสียให้เป็นก๊าซ N_2 เพื่อปล่อยออกสูบรรยากาศ ที่ต้องอาศัยจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ เช่น AOB, AOA, NOB และ Denitrifier รวมทั้งจุลินทรีย์กลุ่ม Anammox, DNRA และ Comammox เป็นต้น ดังนั้น ระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสด จึงเป็นระบบที่เหมาะสมในการใช้เป็นหัวข้อสำหรับระบบกำจัดไนโตรเจนแบบใหม่ต่อไป

6.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดน้ำเสียแบบอื่น หรือศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียของตลาดสดอื่น เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการกำจัดไนโตรเจน ของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพของตลาดสดที่ทำการศึกษา
2. ควรศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ NOB ในเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์อื่นเพิ่มเติมที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *functional* หรือไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ที่เป็นไพรเมอร์คู่อื่น
3. ควรศึกษาอิทธิพลของการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนในฟิล์มชีวภาพของระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพโดยศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนในสภาวะที่มีสารอินทรีย์เพิ่มเติม

6.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

ได้ทราบองค์ความรู้พื้นฐานของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการกำจัดไนโตรเจนออกจากน้ำเสีย ทั้งชนิดและจำนวนของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง รวมถึงกิจกรรมการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ที่พบได้ในระบบบำบัดแบบจานหมุนชีวภาพ ทำให้สามารถนำข้อมูลไปพัฒนาระบบบำบัดน้ำเสียในชุมชนหรือตลาดสดที่ต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนต่อไปได้

บรรณานุกรม

- Abdulrasheed, M., Ibrahim H.I., Maigari F.U., Umar A.F., and Ibrahim S. "Effect of Soil Ph on Composition and Abundance of Nitrite-Oxidising Bacteria." Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology 6 (2018): 27-34.
- Alawi, M., Lipski A., Sanders T., and Spieck E. "Cultivation of a Novel Cold-Adapted Nitrite Oxidizing Betaproteobacterium from the Siberian Arctic." The ISME journal 1 (2007): 256-64.
- Ali, M., Oshiki M., Awata T., Isobe K., Kimura Z., Yoshikawa H., Hira D., *et al.* "Physiological Characterization of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacterium 'Candidatus Jettenia Caeni'." Environmental microbiology 17 (2015): 2172-89.
- Amann, R.L., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., and Stahl D.A. "Combination of 16s Rrna-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations." Applied and environmental microbiology 56 (1990): 1919-25.
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Federation W.E. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater." 1999.
- Awata, T., Oshiki M., Kindaichi T., Ozaki N., Ohashi A., and Okabe S. "Physiological Characterization of an Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacterium Belonging to the "Candidatus Scalindua" Group." Applied and environmental microbiology 79 (2013): 4145-48.
- Barns, S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D., and Pace N.R. "Perspectives on Archaeal Diversity, Thermophily and Monophyly from Environmental Rrna Sequences." Proceedings of the National Academy of Sciences 93 (1996): 9188-93.
- Bergmann, D.J., Hooper A.B., and Klotz M.G. "Structure and Sequence Conservation of Hao Cluster Genes of Autotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria: Evidence for Their Evolutionary History." Applied and environmental microbiology 71 (2005): 5371-82.
- Chutivisut, P., Isobe K., Powtongsook S., Pungrasmi W., and Kurisu F. "Distinct Microbial Community Performing Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium (Dnra) in a

- High C/No₃-Reactor." Microbes and environments (2018): ME17193.
- Daims, H., Lebedeva E.V., Pjevac P., Han P., Herbold C., Albertsen M., Jehmlich N., *et al.* "Complete Nitrification by Nitrospira Bacteria." Nature 528 (2015): 504-09.
- Daims, H., Nielsen J.L., Nielsen P.H., Schleifer K.-H., and Wagner M. "In Situ Characterization Of nitrospira-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants." Applied and environmental microbiology 67 (2001): 5273-84.
- Decleyre, H., Heylen K., Van Colen C., and Willems A. "Dissimilatory Nitrogen Reduction in Intertidal Sediments of a Temperate Estuary: Small Scale Heterogeneity and Novel Nitrate-to-Ammonium Reducers." Frontiers in microbiology 6 (2015).
- Department, F.a.A. "Wastewater Treatment in the Fishery Industry." <http://www.fao.org/docrep/003/v9922e/v9922E05.htm>.
- Ding, K., Wen X., Li Y., Shen B., and Zhang B. "Ammonia-Oxidizing Archaea Versus Bacteria in Two Soil Aquifer Treatment Systems." Applied microbiology and biotechnology 99 (2015): 1337-47.
- Dionisi, H.M., Layton A.C., Harms G., Gregory I.R., Robinson K.G., and Saylor G.S. "Quantification of Nitrosomonas Oligotropha-Like Ammonia-Oxidizing Bacteria and Nitrospira Spp. From Full-Scale Wastewater Treatment Plants by Competitive Pcr." Applied and environmental microbiology 68 (2002): 245-53.
- Egli, K., Bosshard F., Werlen C., Lais P., Siegrist H., Zehnder A., and Van der Meer J. "Microbial Composition and Structure of a Rotating Biological Contactor Biofilm Treating Ammonium-Rich Wastewater without Organic Carbon." Microbial ecology 45 (2003): 419-32.
- Fernando, L., and Kalpage C. "Nitrogen Removal from Municipal Leachate by Combined Aerobic-Anaerobic Treatments." ACEPS 2015 (2015): 186.
- Foglar, L., Briški F., Sipos L., and Vuković M. "High Nitrate Removal from Synthetic Wastewater with the Mixed Bacterial Culture." Bioresource Technology 96 (2005): 879-88.
- Francis, C.A., Beman J.M., and Kuypers M.M. "New Processes and Players in the Nitrogen Cycle: The Microbial Ecology of Anaerobic and Archaeal Ammonia Oxidation." The ISME journal 1 (2007): 19.
- Francis, C.A., Roberts K.J., Beman J.M., Santoro A.E., and Oakley B.B. "Ubiquity and

- Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea in Water Columns and Sediments of the Ocean." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (2005): 14683-88.
- Fux, C., and Siegrist H. "Nitrogen Removal from Sludge Digester Liquids by Nitrification/Denitrification or Partial Nitrification/Anammox: Environmental and Economical Considerations." Water Science and Technology 50 (2004): 19-26.
- Ge, S., Wang S., Yang X., Qiu S., Li B., and Peng Y. "Detection of Nitrifiers and Evaluation of Partial Nitrification for Wastewater Treatment: A Review." Chemosphere 140 (2015): 85-98.
- Geets, J., De Cooman M., Wittebolle L., Heylen K., Vanparys B., De Vos P., Verstraete W., and Boon N. "Real-Time Pcr Assay for the Simultaneous Quantification of Nitrifying and Denitrifying Bacteria in Activated Sludge." Applied microbiology and biotechnology 75 (2007): 211-21.
- Gonzalez-Martinez, A., Rodriguez-Sanchez A., Lotti T., Garcia-Ruiz M.-J., Osorio F., Gonzalez-Lopez J., and van Loosdrecht M.C. "Comparison of Bacterial Communities of Conventional and a-Stage Activated Sludge Systems." Scientific reports 6 (2016): 18786.
- Grady Jr, C.L., Daigger G.T., Love N.G., and Filipe C.D. *Biological Wastewater Treatment*. CRC press, 2011.
- Graham, D.W., Knapp C.W., Van Vleck E.S., Bloor K., Lane T.B., and Graham C.E. "Experimental Demonstration of Chaotic Instability in Biological Nitrification." The ISME journal 1 (2007): 385-93.
- Hirsch, M.D., Long Z.T., and Song B. "Anammox Bacterial Diversity in Various Aquatic Ecosystems Based on the Detection of Hydrazine Oxidase Genes (Hzoa/Hzob)." Microbial ecology 61 (2011): 264-76.
- Hu, B.-l., Shen L.-d., Xu X.-y., and Zheng P. "Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) in Different Natural Ecosystems." Portland Press Limited, 2011.
- Huang, Z., Gedalanga P.B., and Olson B.H. "Distribution of Nitrobacter and Nitrospira Communities in an Aerobic Activated Sludge Bioreactor and Their Contributions to Nitrite Oxidation." Proceedings of the Water Environment Federation 2010 (2010): 2390-403.

- Huber, H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C., and Stetter K.O. "A New Phylum of Archaea Represented by a Nanosized Hyperthermophilic Symbiont." Nature 417 (2002): 63-67.
- Humbert, S., Zopfi J., and Tarnawski S.E. "Abundance of Anammox Bacteria in Different Wetland Soils." Environmental Microbiology Reports 4 (2012): 484-90.
- Jetten, M., Cirpus I., Kartal B., van Niftrik L., Van De Pas-Schoonen K., Sliemers O., Haaijer S., *et al.* "1994–2004: 10 Years of Research on the Anaerobic Oxidation of Ammonium." Portland Press Limited, 2005.
- Jiang, Q.Q., and Bakken L.R. "Comparison of Nitrosospira Strains Isolated from Terrestrial Environments." FEMS Microbiology Ecology 30 (1999): 171-86.
- Jie, H., and Daping L. "Nitrite Removal Performance and Community Structure of Nitrite-Oxidizing and Heterotrophic Bacteria Suffered with Organic Matter." Current microbiology 57 (2008): 287-93.
- Kampman, C., Hendrickx T.L., Luesken F.A., van Alen T.A., den Camp H.J.O., Jetten M.S., Zeeman G., Buisman C.J., and Temmink H. "Enrichment of Denitrifying Methanotrophic Bacteria for Application after Direct Low-Temperature Anaerobic Sewage Treatment." Journal of hazardous materials 227 (2012): 164-71.
- Kartal, B., Maalcke W.J., de Almeida N.M., Cirpus I., Gloerich J., Geerts W., den Camp H.J.O., *et al.* "Molecular Mechanism of Anaerobic Ammonium Oxidation." Nature 479 (2011): 127-30.
- Kashima, H., and Regan J.M. "Facultative Nitrate Reduction by Electrode-Respiring Geobacter Metallireducens Biofilms as a Competitive Reaction to Electrode Reduction in a Bioelectrochemical System." Environmental science & technology 49 (2015): 3195-202.
- Könneke, M., Bernhard A.E., José R., Walker C.B., Waterbury J.B., and Stahl D.A. "Isolation of an Autotrophic Ammonia-Oxidizing Marine Archaeon." Nature 437 (2005): 543-46.
- Koops, H.-P., Purkhold U., Pommerening-Röser A., Timmermann G., and Wagner M. "The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria." In *The Prokaryotes*, 778-811: Springer, 2006.

- Kowalchuk, G.A., and Stephen J.R. "Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology." Annual Reviews in Microbiology 55 (2001): 485-529.
- Kowalchuk, G.A., Stephen J.R., De Boer W., Prosser J.I., Embley T.M., and Woldendorp J.W. "Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the Beta Subdivision of the Class Proteobacteria in Coastal Sand Dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of Pcr-Amplified 16s Ribosomal DNA Fragments." Applied and environmental microbiology 63 (1997): 1489-97.
- Kuenen, J.G. "Anammox Bacteria: From Discovery to Application." Nature Reviews Microbiology 6 (2008): 320-26.
- Kumar, S., Nei M., Dudley J., and Tamura K. "Mega: A Biologist-Centric Software for Evolutionary Analysis of DNA and Protein Sequences." Briefings in bioinformatics 9 (2008): 299-306.
- Laanbroek, H.J., Bodelier P.L., and Gerards S. "Oxygen Consumption Kinetics of Nitrosomonas Europaea and Nitrobacter Hamburgensis Grown in Mixed Continuous Cultures at Different Oxygen Concentrations." Archives of microbiology 161 (1994): 156-62.
- Lebedeva, E., Alawi M., Maixner F., Jozsa P.-G., Daims H., and Spieck E. "Physiological and Phylogenetic Characterization of a Novel Lithoautotrophic Nitrite-Oxidizing Bacterium, 'Candidatus Nitrospira Bockiana'." International journal of systematic and evolutionary microbiology 58 (2008): 242-50.
- Lee, H., Choi E., Yun Z., and Park Y.K. "Microbial Structure and Community of Rbc Biofilm Removing Nitrate and Phosphorus from Domestic Wastewater." J. Microbiol. Biotechnol 18 (2008): 1459-69.
- Li, W., and Godzik A. "Cd-Hit: A Fast Program for Clustering and Comparing Large Sets of Protein or Nucleotide Sequences." Bioinformatics 22 (2006): 1658-59.
- Liu, S., Yang F., Gong Z., and Su Z. "Assessment of the Positive Effect of Salinity on the Nitrogen Removal Performance and Microbial Composition During the Start-up of Canon Process." Applied microbiology and biotechnology 80 (2008): 339.
- Lücker, S., Schwarz J., Gruber-Dorninger C., Spieck E., Wagner M., and Daims H. "Nitrotoga-Like Bacteria Are Previously Unrecognized Key Nitrite Oxidizers in Full-Scale Wastewater Treatment Plants." The ISME journal 9 (2015): 708-20.

- Lücker, S., Wagner M., Maixner F., Pelletier E., Koch H., Vacherie B., Rattei T., *et al.* "A Nitrospira Metagenome Illuminates the Physiology and Evolution of Globally Important Nitrite-Oxidizing Bacteria." Proceedings of the National Academy of Sciences 107 (2010): 13479-84.
- Ma, B., Wang S., Cao S., Miao Y., Jia F., Du R., and Peng Y. "Biological Nitrogen Removal from Sewage Via Anammox: Recent Advances." Bioresource technology 200 (2016): 981-90.
- Martens-Habben, W., Berube P.M., Urakawa H., José R., and Stahl D.A. "Ammonia Oxidation Kinetics Determine Niche Separation of Nitrifying Archaea and Bacteria." Nature 461 (2009): 976-79.
- McClung, C., Patriquin D., and Davis R. "Campylobacter Nitrofigilis Sp. Nov., a Nitrogen-Fixing Bacterium Associated with Roots of Spartina Alterniflora Loisel." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 33 (1983): 605-12.
- Meinhardt, K.A., Bertagnolli A., Pannu M.W., Strand S.E., Brown S.L., and Stahl D.A. "Evaluation of Revised Polymerase Chain Reaction Primers for More Inclusive Quantification of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria." Environmental microbiology reports 7 (2015): 354-63.
- Metcalf, Eddy, Burton F.L., Stensel H.D., and Tchobanoglous G. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. McGraw Hill, 2003.
- Mincer, T.J., Church M.J., Taylor L.T., Preston C., Karl D.M., and DeLong E.F. "Quantitative Distribution of Presumptive Archaeal and Bacterial Nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre." Environmental microbiology 9 (2007): 1162-75.
- Mohan, S.B., Schmid M., Jetten M., and Cole J. "Detection and Widespread Distribution of the NrfA Gene Encoding Nitrite Reduction to Ammonia, a Short Circuit in the Biological Nitrogen Cycle That Competes with Denitrification." FEMS Microbiology Ecology 49 (2004): 433-43.
- Navío, J.A., Colon G., Trillas M.a., Peral J., Domenech X., Testa J.J., Padron J., Rodríguez D., and Litter M.I. "Heterogeneous Photocatalytic Reactions of Nitrite Oxidation

- and Cr (Vi) Reduction on Iron-Doped Titania Prepared by the Wet Impregnation Method." Applied Catalysis B: Environmental 16 (1998): 187-96.
- Oshiki, M., Shimokawa M., Fujii N., Satoh H., and Okabe S. "Physiological Characteristics of the Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacterium 'Candidatus Brocadia Sinica'." Microbiology 157 (2011): 1706-13.
- PAQUES. "Cost-Effective, Sustainable Removal of Ammonium from Effluents and Ammonia from Waste Gas." <http://en.paques.nl/products/featured/anammox>.
- Park, B.-J., Park S.-J., Yoon D.-N., Schouten S., Damsté J.S.S., and Rhee S.-K. "Cultivation of Autotrophic Ammonia-Oxidizing Archaea from Marine Sediments in Coculture with Sulfur-Oxidizing Bacteria." Applied and Environmental Microbiology 76 (2010): 7575-87.
- Park, H.-D., Wells G.F., Bae H., Criddle C.S., and Francis C.A. "Occurrence of Ammonia-Oxidizing Archaea in Wastewater Treatment Plant Bioreactors." Applied and environmental microbiology 72 (2006): 5643-47.
- Park, H.D., and Noguera D. "Characterization of Two Ammonia-Oxidizing Bacteria Isolated from Reactors Operated with Low Dissolved Oxygen Concentrations." Journal of applied microbiology 102 (2007): 1401-17.
- Penton, C.R., Devol A.H., and Tiedje J.M. "Molecular Evidence for the Broad Distribution of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria in Freshwater and Marine Sediments." Applied and environmental microbiology 72 (2006): 6829-32.
- Pjevac, P., Schauburger C., Poghosyan L., Herbold C.W., van Kessel M.A., Daebeler A., Steinberger M., *et al.* "Amoa-Targeted Polymerase Chain Reaction Primers for the Specific Detection and Quantification of Comammox Nitrospira in the Environment." Frontiers in Microbiology 8 (2017): 1508.
- Pynaert, K., Smets B.F., Wyffels S., Beheydt D., Siciliano S.D., and Verstraete W. "Characterization of an Autotrophic Nitrogen-Removing Biofilm from a Highly Loaded Lab-Scale Rotating Biological Contactor." Applied and Environmental Microbiology 69 (2003): 3626-35.
- Rittmann, B.E., and McCarty P.L. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. Tata McGraw-Hill Education, 2012.

- Rotthauwe, J.-H., Witzel K.-P., and Liesack W. "The Ammonia Monooxygenase Structural Gene AmoA as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations." Applied and environmental microbiology 63 (1997): 4704-12.
- Sanford, R.A., Wagner D.D., Wu Q., Chee-Sanford J.C., Thomas S.H., Cruz-García C., Rodríguez G., *et al.* "Unexpected Nondenitrifier Nitrous Oxide Reductase Gene Diversity and Abundance in Soils." Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (2012): 19709-14.
- Satoh, H., Nakamura Y., and Okabe S. "Influences of Infaunal Burrows on the Community Structure and Activity of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Intertidal Sediments." Applied and environmental microbiology 73 (2007): 1341-48.
- Schmid, M., Walsh K., Webb R., Rijpstra W.I., van de Pas-Schoonen K., Verbruggen M.J., Hill T., *et al.* "Candidatus "Scalindua Brodae", Sp. Nov., Candidatus "Scalindua Wagneri", Sp. Nov., Two New Species of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria." Systematic and applied microbiology 26 (2003): 529-38.
- Schmidt, I., Sliemers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J.G., Jetten M.S., and Strous M. "New Concepts of Microbial Treatment Processes for the Nitrogen Removal in Wastewater." FEMS microbiology reviews 27 (2003): 481-92.
- Sinha, B., and Annachhatre A.P. "Partial Nitrification—Operational Parameters and Microorganisms Involved." Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 6 (2007): 285-313.
- Smith, C.J., Nedwell D.B., Dong L.F., and Osborn A.M. "Diversity and Abundance of Nitrate Reductase Genes (Narg and Napa), Nitrite Reductase Genes (Nirs and Nrfa), and Their Transcripts in Estuarine Sediments." Applied and environmental microbiology 73 (2007): 3612-22.
- Song, B., Lisa J.A., and Tobias C.R. "Linking Dnra Community Structure and Activity in a Shallow Lagoonal Estuarine System." Frontiers in microbiology 5 (2014).
- Spang, A., Hatzenpichler R., Brochier-Armanet C., Rattei T., Tischler P., Spieck E., Streit W., *et al.* "Distinct Gene Set in Two Different Lineages of Ammonia-Oxidizing Archaea Supports the Phylum Thaumarchaeota." Trends in microbiology 18 (2010): 331-40.

- Stahl, D.A., and de la Torre J.R. "Physiology and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea." Annual review of microbiology 66 (2012): 83-101.
- Stehr, G., Böttcher B., Dittberner P., Rath G., and Koops H.-P. "The Ammonia-Oxidizing Nitrifying Population of the River Elbe Estuary." FEMS Microbiology Ecology 17 (1995): 177-86.
- Strous, M., Heijnen J., Kuenen J.G., and Jetten M. "The Sequencing Batch Reactor as a Powerful Tool for the Study of Slowly Growing Anaerobic Ammonium-Oxidizing Microorganisms." Applied microbiology and biotechnology 50 (1998): 589-96.
- Suwa, Y., Imamura Y., Suzuki T., Tashiro T., and Urushigawa Y. "Ammonia-Oxidizing Bacteria with Different Sensitivities to (NH₄)₂SO₄ in Activated Sludges." Water Research 28 (1994): 1523-32.
- Thamdrup, B. "New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle." Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 43 (2012): 407-28.
- Tiedje, J.M. "Ecology of Denitrification and Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium." Biology of anaerobic microorganisms 717 (1988): 179-244.
- Tourna, M., Stieglmeier M., Spang A., Könneke M., Schintlmeister A., Urich T., Engel M., *et al.* "Nitrososphaera Viennensis, an Ammonia Oxidizing Archaeon from Soil." Proceedings of the National Academy of Sciences 108 (2011): 8420-25.
- Treusch, A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H.P., and Schleper C. "Novel Genes for Nitrite Reductase and Amo-Related Proteins Indicate a Role of Uncultivated Mesophilic Crenarchaeota in Nitrogen Cycling." Environmental Microbiology 7 (2005): 1985-95.
- Van Den Berg, E.M., Van Dongen U., Abbas B., and Van Loosdrecht M.C. "Enrichment of Dnra Bacteria in a Continuous Culture." The ISME journal 9 (2015): 2153-61.
- van Kessel, M.A., Speth D.R., Albertsen M., Nielsen P.H., den Camp H.J.O., Kartal B., Jetten M.S., and Lüscher S. "Complete Nitrification by a Single Microorganism." Nature 528 (2015): 555-59.
- Vanparys, B., Spieck E., Heylen K., Wittebolle L., Geets J., Boon N., and De Vos P. "The Phylogeny of the Genus Nitrobacter Based on Comparative Rep-Pcr, 16s Rrna and Nitrite Oxidoreductase Gene Sequence Analysis." Systematic and applied

microbiology 30 (2007): 297-308.

Venter, J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., *et al.* "Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea." science 304 (2004): 66-74.

Voytek, M., and Ward B. "Detection of Ammonium-Oxidizing Bacteria of the Beta-Subclass of the Class Proteobacteria in Aquatic Samples with the Pcr." Applied and environmental microbiology 61 (1995): 1444-50.

Wang, Y., Wang D., Yang Q., Zeng G., and Li X. "Wastewater Opportunities for Denitrifying Anaerobic Methane Oxidation." Trends in Biotechnology (2017).

Ward, B., Martino D., Diaz M., and Joye S. "Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria from Hypersaline Mono Lake, California, on the Basis of 16s Rrna Sequences." Applied and environmental microbiology 66 (2000): 2873-81.

Welsh, A., Chee-Sanford J.C., Connor L.M., Löffler F.E., and Sanford R.A. "Refined Nrfa Phylogeny Improves Pcr-Based Nrfa Gene Detection." Applied and environmental microbiology 80 (2014): 2110-19.

Widdel, F., and Bak F. "Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria." In *The Prokaryotes*, 3352-78: Springer, 1992.

Williams, S.E. "Energy Usage Comparison between Activated Sludge Treatment and Rotating Biological Contactor Treatment of Municipal Wastewater." Williams & Works, Inc (2011): 1-11.

Williams, S.E., and Williams P. "Reconsidering Rotating Biological Contactors as an Option for Municipal Wastewater Treatment." New York (2011).

Wright, R.O., Lewander W.J., and Woolf A.D. "Methemoglobinemia: Etiology, Pharmacology, and Clinical Management." Annals of emergency medicine 34 (1999): 646-56.

กรมควบคุมมลพิษ.

"คุณภาพน้ำและการจัดการ."

http://www.pcd.go.th/info_serv/water_wt.html.

ธนลิตา โชติอนนต์. "ผลของแอมโมเนียต่อการคัดเลือกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์เซอร์จากบ่อเลี้ยงกุ้ง." จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2556.

พีรภาส นรินทร์หงษ์ทอง. " การยับยั้งกระบวนการ Anammox ด้วย Oxytetracycline ", มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2553.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

วิธีการวัดพารามิเตอร์

การวิเคราะห์ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD)

วิเคราะห์ซีโอดีโดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด โดยใช้น้ำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้วขนาด 20 x 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่มีสารซิลเวอร์ซัลเฟตจำนวน 7 มิลลิลิตร และเติมโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.1 นอร์มัลลิตี จำนวน 3 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น แล้วเขย่าผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้น นำไปเข้าเตาอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเฟอโรอินเพนอินดิเคเตอร์ 0.05 - 0.1 มิลลิลิตร ทำประมาณ 1 - 2 หลอด ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.1 นอร์มัลลิตี จนถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

การคำนวณ

$$\text{COD (มิลลิกรัม/ลิตร)} = ((A - B) \times N \times 8000) / \text{มิลลิลิตรของน้ำตัวอย่าง}$$

A = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตแบบลงค์

B = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นนอร์มัลลิตี

การวิเคราะห์แอมโมเนีย (NH₄⁺-N)

ผสมสารละลายอัลคาไลน์ - ซีเตรท และสารละลายไฮโปคลอไรน์ อัตราส่วน 9 : 1 ตามลำดับ นำสารละลายผสมที่ได้ 1 มิลลิลิตรต่อสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรที่ผ่านการกรองด้วย cellulose acetate syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร มาเติมสารละลายซาลิไซลด์เลท 0.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืด 1 ชั่วโมงแล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo (ELECTRON CORPORATION) ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร จัดทำแบลงค์และสารละลายมาตรฐาน เพื่อทำกราฟเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายตัวอย่าง โดยสีของสารละลายที่ได้จะเป็นสีฟ้า

การวิเคราะห์ไนไตรท์ (NO_2^- -N)

ผสมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ 100 ไมโครลิตร และสารละลาย NDED 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรที่ผ่านการกรองด้วย cellulose acetate syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที นำมาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo (ELECTRON CORPORATION) ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร จัดทำแบลนด์และสารละลายมาตรฐาน เพื่อทำกราฟเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสง ที่ได้จากสารละลายตัวอย่าง โดยสีของสารละลายที่ได้จะเป็นสีชมพู

การวิเคราะห์ไนเตรท (NO_3^- -N)

สารละลายตัวอย่าง ที่ผ่านการกรอง cellulose acetate syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร มาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo (ELECTRON CORPORATION) ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตรและ 275 นาโนเมตร นำค่าที่ได้จากค่าความยาวคลื่นแสง 220 นาโนเมตร ไปหักลบกับค่าที่ได้จากค่าความยาวคลื่นแสง 275 นาโนเมตร จัดทำแบลนด์และสารละลายมาตรฐาน เพื่อทำกราฟเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสง ที่ได้จากสารละลายตัวอย่าง

การวิเคราะห์พีเอช (pH)

วิเคราะห์โดยเครื่องวัดพีเอชแบบเคลื่อนที่ ยี่ห้อ HACH รุ่น sension156 ลงในน้ำตัวอย่าง รอคำนึงแล้วอ่านค่าพีเอชที่ปรากฏ

การวิเคราะห์อุณหภูมิ (Temperature)

วิเคราะห์โดยเครื่องวัดพีเอชแบบเคลื่อนที่ ยี่ห้อ HACH รุ่น sension156 ลงในน้ำตัวอย่าง รอคำนึงแล้วอ่านค่าอุณหภูมิที่ปรากฏ

การวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen, DO)

วิเคราะห์โดยเครื่องวัดออกซิเจนละลายน้ำแบบเคลื่อนที่ ยี่ห้อ HACH รุ่น sension156 ลงในน้ำตัวอย่าง รอคำนึงแล้วอ่านค่าออกซิเจนละลายน้ำที่ปรากฏ

สารละลาย Nonchelate trace element

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่เตรียม	
	ปริมาณ/ลิตร	หน่วย
น้ำ	987	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	12.5	มิลลิลิตร
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 6H_2O$)	5	กรัม
นิกเกิลคลอไรด์ ($NiCl_2$)	24	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	30	มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.1	กรัม
คอปเปอร์คลอไรด์ ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)	36	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	144	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	40	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	190	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	36	มิลลิกรัม

สารละลายวิตามินรวม

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่เตรียม	
	ปริมาณ/ลิตร	หน่วย
โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sodium phosphate buffer) pH 7.1 - 7.4 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	1000	มิลลิลิตร
อะมิโนเบนโซอิก (4-aminobenzoic acid)	40	มิลลิกรัม
นิโคตินิกแอซิด (Nicotinic acid)	100	มิลลิกรัม
ดี - ไบโอติน (D-Biotin)	10	มิลลิกรัม
แคลเซียม ดีเพนโทเนต (Calcium D-pantothenate)	50	มิลลิกรัม
พริดอกไซด์ไดไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxide dihydrochloride)	15	มิลลิกรัม

สารละลายวิตามินบี 12

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่เตรียม	
	ปริมาณ/ลิตร	หน่วย
โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sodium phosphate buffer) pH 3.4 เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์	1000	มิลลิลิตร
ไธอะมีนคลอไรด์ไดไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine chloride dihydrochloride)	100	มิลลิกรัม

สารละลายวิตามินบี 1

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่เตรียม	
	ปริมาณ/ลิตร	หน่วย
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ไซยาโนโคบาลามิน (Cyanocobalamin)	50	มิลลิกรัม

สารละลายซีลีไนท์ทั้งสเตท (Selenite-tungstate)

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่เตรียม	
	ปริมาณ/ลิตร	หน่วย
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	400	มิลลิกรัม
โซเดียมทั้งสเตท ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8	มิลลิกรัม
โซเดียมเซเลไนท์ ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	6	มิลลิกรัม
น้ำกลั่นปราศจากไอออน	1000	มิลลิลิตร

สารละลาย trace metal mixture

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่เตรียม	
	ปริมาณ/ลิตร	หน่วย
MnSO_4	5	กรัม
CuSO_4	5	กรัม
FeCl_3	5	กรัม
Na_2MoO_4	5	กรัม

ภาคผนวก ข

ก. ลำดับ sequence ของ AOB

>180611-013_A01_AOB1-1_amoA1F.ab1

TGCGTTGATGCTGGATTACCCATGACTTGGCTCGCAACTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTC
 TTCGGTTTGCTGTTCTACCCAGGTAAGTGGCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAAC
 ATTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTCATATTG
 AGCAAGTTTCGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTCTTCTCTGCGTTTCGTATCAAT
 GTTGATGTTCACTGTATGGTGGTATCTCGGAAAAGTTTACTGTACAGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTTAAAGAG
 GTCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTG

>180611-013_C01_AOB1-2_amoA1F.ab1

TGCGTTGATGCTGGATTACCCATGACTTGGCTCGCAACTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTC
 TTCGGTTTGCTGTTCTATCCAGGTAAGTGGCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAAC
 ATTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTCATATTG
 AGCAAGTTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACTACCGTTATTGCAGCATTCTTCTCTGCGTTTCGTATCAATG
 TTGATGTTCACTGTATGGTGGTATCTCGGAAAAGTTTACTGTACAGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTTAAAGAGG
 TCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTG

>180611-013_E01_AOB1-3_amoA1F.ab1

TGCGTTGATGCTGGATTACCCATGACTTGGCTCGCAACTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTC
 TTCGGTTTGCTGTTCTATCCAGGTAAGTGGCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAAC
 ATTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTCATATTG
 AGCAAGTTTCGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTTTTCTCGGCCTTTGTATCAAT
 GTCATGTTTCGCGGTATGGTGGTACCTTGGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAAGGA
 GGTCGTGTTGTACAACGTAATGATGTCACTGCATTTGGCG

>180611-013_G01_AOB1-4_amoA1F.ab1

TGCGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACTCGCAATTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTC
 TTCGGTTTGCTGTTCTACCCAGGTAAGTGGCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAAC
 ATTGTTGTCAATGGCCGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTCATATTG
 AGCAAGTTTCGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTCTTCTCGGCCTTTGTATCAAT

GTCATGTTGCGGGTATGGTGGTACCTTGGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAAAGA
GGTCGTGTTGTACAACGTAATGATGTCACCTGCATTTGGCG

>180611-013_O01_AOB1-8_amoA1F.ab1

TGCGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACGCGCAACTGGCTGGTAACAGCTCTGGTTGGAGGTGGATTC
TTCGGTCTGCTGTTCTACCCAGGTAACCTGGCCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAA
CATTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTATATT
GAGCAAGGTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACTACCGTTATTGCAGCATTCTTCTCTGCGTTTCGTATCAAT
GTTGATGTTCACTGTATGGTGGTATCTCGGAAAAGTTTACTGTACAGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAAAGAG
GTCGTATCGTACATCGCAATGACGTTACCGCATTTCGGTG

>180611-013_E03_AOB1-11_amoA1F.ab1

TGCGTTGATGCTGGATTACACCATGTAAGTACTGCAATTTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTC
TTCGGTTTGCTGTTCTACCCAGGTAACCTGGCCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAAAC
ATTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACGGGTACACCCGAGTATGTTTCGTATATTG
AGCAAGGTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACTACCGTTATTGCAGCATTCTTCTCTGCGTTTCGTATCAATG
TTGATGTTCACTGTATGGTGGTATCTCGGAAAAGTTTACTGTACAGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAAAGAGG
TCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTG

>180611-013_K03_AOB1-14_amoA1F.ab1

TGCGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACGCGCAACTGGCTGGTAACAGCTCTGGTTGGAGGTGGATTC
TTCGGTCTGCTGTTCTACCCAGGTAACCTGGCCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAA
CATTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCCGAGTATGTTTCGTATATT
GAGCAAGGTTGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTTTTCTCGGCATTTGTATCAA
TGCTCATGTTACCGGTATGGTGGTATCTTGGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAAAGA
GGTCGTGCTGTACAACGTAATGATGTCACCTGCATTTGGCG

>180611-013_O03_AOB1-16_amoA1F.ab1

TGCGTTGATGCTGGATTACACCATGTAAGTACTGCAACTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTC
TTCGGTCTGCTGTTCTATCCAGGTAACCTGGCCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAAAC
ATTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTATATTG
AGCAAGGTTGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTTTTCTCGGCATTTGTATCAAT

GCTCATGTTGCGGGTATGGTGGTACCTTGGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAGAGA
GGTCGTATTGTACAACGTAATGATGTTACTGCATTTGGCG

>180611-013_C05_AOB1-18_amoA1F.ab1

TGCGTTGATGCTGGATTACACCATGTACTTGACTIONGCAACTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTC
TTCGGTTTGCTGTTCTATCCAGGTAAGTGGCCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAAC
ATTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTATATTG
AGCAAGGTTGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTTTTCTCGGCGTTTGTATCAAT
GCTCATGTTGCGGGTATGGTGGTATCTCGAAAAGTTTACTGTACAGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAGAGA
GTCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTG

>180611-013_E05_AOB1-19_amoA1F.ab1

TGCGTTGATGCTGGATTACACCATGTACTTGACTIONGCAACTGGCTGGTAACAGCTCTGGTTGGAGGTGGATTC
TTCGGTCTGCTGTTCTACCCGGGTAAGTGGCCGATCTTTGGGCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAA
CATTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACGGGTACACCCGAGTATGTTTCGTATATTG
GAGCAAGGTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACTACCGTTATTGCAGCATTCTTCTCGGCGTTTGTATCAAT
GCTCATGTTGCGGGTATGGTGGTACCTTGGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAAAGA
GGTCGTGTTGTACAACGTAATGATGTCACTGCATTTGGCG

>180611-013_O05_AOB1-24_amoA1F.ab1

TGCGTTGATGCTGGATTACACCATGTACTTGACTIONGCAACTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTC
TTCGGTTTGCTGTTCTATCCAGGTAAGTGGCCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAAC
ATTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTATATTG
AGCAAGGTTGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTCTTCTCGGCGTTTGTATCAAT
GCTCATGTTGCGGGTATGGTGGTACCTTGGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGTAAGAGA
GGTCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTG

>180611-013_O11_AOB2-24_amoA1F.ab1

CGTTGATGCTGGATTACACCATGTACTTGACTIONGCAACTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTCCTT
CGGTTTGCTGTTCTATCCAGGTAAGTGGCCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAACAT
TGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTATATTGAG
CAAGGTTGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTTTTCTCGGCGTTTGTATCAATGCT

CATGTTGCGGGTATGGTGGTACCTTGGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAAAGAGGT
CGTGTGTACAACGTAATGATGTCACCTGCATTTGGCG

>180611-013_O09_AOB2-16_amoA1F.ab1

CGTTGATGCTGGATTACACCATGTAAGTACTGCAACTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTCTT
CGGTTTGCTGTTCTATCCAGGTAAGTGGCCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAACAT
TGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTATATTGAG
CAAGGTTGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACAGTTATCGCGGCATTCTTCTCTGCGTTCGTATCAATGC
TTATGTTTACGGTATGGTGGTACCTTGGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAGAGAGG
TCGTATTGTACAACGTAATGATGTCACCTGCATTTGGCG

>180611-013_O07_AOB2-8_amoA1F.ab1

CGTTGATGCTGGATTACACCATGTAAGTACTGCAACTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTCTT
CGGTTTGCTGTTCTATCCAGGTAAGTGGCCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAACAT
TGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACGGGTACACCCGAGTATGTTTCGTATATTGA
GCAAGGTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACTACCGTTATTGCAGCATTCTTCTCTGCGTTCGTATCAATGT
TGATGTTCACTGTATGGTGGTATCTCGGAAAAGTTTACTGTACAGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAGAGAGGT
CGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTG

>180611-013_M11_AOB2-23_amoA1F.ab1

CGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACGCGCAACTGGCTGGTAACAGCTCTGGTTGGAGGTGGATTCTT
CGGTCTGCTGTTCTATCCAGGTAAGTGGCCAATTTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTAGAGGGAACA
TTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTATATTGA
GCAAGGTTGCTGCGTACCTCCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTCTTCTCGGCGTTTGTATCAATG
CTCATGTTGCGGGTATGGTGGTACCTTGGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAAAGAG
GTCGTGTTGTACAACGTAATGATGTCACCTGCATTTGGCG

>180611-013_K11_AOB2-22_amoA1F.ab1

CGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACGCGCAACTGGCTGGTAACAGCTCTGGTTGGAGGTGGATTCTT
CGGTCTGCTGTTCTATCCAGGTAAGTGGCCGATCTTTGGTCCAACGCATCTGTCAATCGTTGTAGAGGGAACA
CTGTTGTGATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACGGGTACACCCGAGTATGTTTCGCCATATTG
AGCAAGGTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACTACCGTTATTGCAGCATTCTTCTCTGCGTTCGTATCAATG

TTGATGTTCACTGTATGGTGGTATCTCGGAAAAGTTTACTGTACAGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAAAGAGG
TCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTG

>180611-013_K09_AOB2-14_amoA1F.ab1

CGTTGATGCTGGATTACACCATGTACTIONGACTCGCAACTGGCTGGTAACAGCATTGGTTGGTGGCGGATTCTT
CGGTTTGCTGTTCTATCCAGGTAAGTGGCCAAATTTTTGGACCAACGCATCTGCCAATCGTTGTAGAAGGAACA
CTGTTGTCGATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACGGGTACACCCGAGTATGTTTCGCCATATTG
AGCAAGGTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACTACCGTTATTGCAGCATTCTTCTCTGCGTTTCGTATCAATG
TTGATGTTCACTGTATGGTGGTATCTCGGAAAAGTTTACTGTACAGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAAAGAGG
TCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTG

>180611-013_I11_AOB2-21_amoA1F.ab1

CGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACGCGCAACTGGCTGGTAACAGCTCTGGTTGGAGGTGGATTCTT
CGGTCTGCTGTTCTACCCAGGTAAGTGGCCGATCTTTGGTCCAACGCATCTGCCAATCGTTGTAGAAGGAACA
TTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTATATTGA
GCAAGGTTTCGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTCTTCTCGGCGTTTGTATCAATG
CTCATGTTTCGCGGTATGGTGGTACCTTGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAAAGGAG
GTCGTGTTGTACAACGTAATGATGTCACCTGCATTTGGCG

>180611-013_G09_AOB2-12_amoA1F.ab1

CGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACGCGCAACTGGCTGGTAACAGCTCTGGTTGGAGGTGGATTCTT
CGGTCTGCTGTTCTACCCAGGTAAGTGGCCGATCTTTGGTCCAACGCATCTGCCAATCGTTGTAGAAGGAACA
CTGTTGTCGATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACGGGTACACCCGAGTACGTTTCGTATATTG
AGCAAGGTTTCGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCAGCATTCTTCTCGGCGTTTGTATCAAT
GCTCATGTTTCGCGGTATGGTGGTACCTTGAAAAGTGTACTGCACAGCCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAAAGA
GGTCGTGTTGTACAACGTAATGATGTCACCTGCATTTGGCG

>180611-013_E11_AOB2-19_amoA1F.ab1

CGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACGCGCAACTGGCTGGTAACAGCTCTGGTTGGAGGTGGATTCTT
CGGTCTGCTGTTCTACCCGGGTAAGTGGCCGATCTTTGGACCAACCCATCTGCCTATCGTTGTGGAGGGAACA
TTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCAGAGTATGTTTCGTATATTGA
GCAAGGTTTCGCTGCGTACCTTCGGTGGTCACACCACGGTTATTGCGGCATTCTTCTCGGCGTTTGTATCAATG

CTCATGTTGCGGGTATGGTGGTACCTTGGAAAAGTGTACTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGGAAAAGAG
GTCGTGTTGTACAACGTAATGATGTCACCTGCATTTGGCG

>180611-013_E09_AOB2-11_amoA1F.ab1

CGTTGATGCTGGATTACCCATGTAAGTACTGACTCGCAACTGGCTGGTAACAGCTCTGGTTGGAGGTGGATTCTT
CGGTCTGCTGTTCTACCCAGGTAAGTGGCCGATCTTTGGTCCAACGCATCTGCCAATCGTTGTAGAAGGAACA
TTGTTGTCAATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACGGGTACACCCGAGTATGTTTCGTATATTGA
GCAAGGTTGCTGCGTACCTTTGGTGGTCATACTACCGTTATTGCAGCATTCTTCTCTGCGTTCGTATCAATGT
TGATGTTCACTGTATGGTGGTATCTCGGAAAAGTTTACTGTACAGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAAAGAGGT
CGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTGCGGTG

ข. ลำดับ ลำดับ sequence ของ Anammox

>180611-013_A13_ANAMMOX1-1_A438f.ab1

CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGCGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCACGTA
GGCGGCTGTGTAAGTCGGTTGTGAAAGCCTTCCGCTTAACGGAAGAACGGCATCCGATACTGCATAGCTTGAG
TGCGGGAGGGGAGAGTG

>180611-013_E13_ANAMMOX1-3_A438f.ab1

CTCTGTGCCAGCAGCCACGCGGTAATACAGAGGCGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCACGTA
GGCGGCTGTGTAAGTCGGTTGTGAAAGCCTTCCGCTCAACGGAAGAACGGCATCCGATACTGCATAGCTTGAG
TGTGGGAGGGGAGAGTG

>180611-013_G13_ANAMMOX1-4_A438f.ab1

CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGCGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCACGTA
GGCGGCTGTGTAAGTCGGTTGTGAAAGCCTTCCGCTCAACGGAAGAACGGCATCCGATACTGCATGGCTTGAG
TGTGGGAGGGGAGAGTG

>180611-013_O15_ANAMMOX1-16_A438f.ab1

CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGCGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCACGTA
GGCGGCTGTGTAAGTCGGATGTGAAAGCCTTCCGCTCAACGGAAGAACGGCATCCGATACTGCATAGCTTGAG
TGTGGGAGGGGAGAGTG

>180611-013_A19_ANAMMOX2-1_A438f.ab1

CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGCGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCACGTA
GGCGGCTGTGTAAGTCGGTTGTGAAAGCCTTCCGCTTAACGGAAGAACGGCATCCGATACTGCATAGCTTGAG
TGCGGGAGGGGAGAGTG

>180611-013_G19_ANAMMOX2-4_A438f.ab1

CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGCGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCACGTA
GGCGGCTGTGTAAGTCGGTTGTGAAAGCCTTCCGCTCAACGGAAGAACGGCATCCGATACTGCATGGCTTGAG
TGTGGGAGGGGAGAGTG

ก. ลำดับ sequence ของ DNRA

>180904-023_O07_DNRA1-5_nrfAF2aw.ab1

GATTTACGGCGGAACAGATGGAGTCTTATTATGACTCGGTACAACATGTAGATTGGGTACATGCCGTAGTAAA
GCGCCGATGCTCAAAGCGCAGCATCCGGATTACGAAATTTCAAACAGGTATTCACGCAGAACGCGGTGTAT
CCTGTGCGGATTGTCATATGCCTTAA

>180904-023_K09_DNRA2-1_nrfAF2aw.ab1

GGTCGAGCAGATCGAAGCGACCTACGCCGACCACAAGTTCGCCGACGGCTCGCCCTTCTACGACTTTGAACAT
GGCGAAACCGGCGCCCATGTCCTGAAGGCGCAGCATCCCGAGTTCGAACTCTGGAGCCAAGGCATCCATGCG
CGCAGCGGCGTCAGTTGCGCCGATTGTCACATGCCTTAA

>180904-023_G11_DNRA2-7_nrfAF2aw.ab1

AAGGGACTGAAGGTAGAGAACATCGTCGTTACTACGACGAGGCGAAGTTCGAAAGGATTGGACGCACAAGGAAA
CGGGCGCACCGGTTCTCAAGGCGCAGCACCCGGAATTCGAGATGTACAACCAGGGTGTTCACGCCCGCAGCG
GCGTGGCTTGCGCGGATTGCCATATGCCTTAA

>180904-023_K11_DNRA2-9_nrfAF2aw.ab1

GGGCCTCAAGGCCGAACACGCCGAAGCCTATTACGACGAAGTCGGCCACAACGACTGGAAGCACGCCATCTCC
GGCGCCGGCGTGCTCAAGGCCAGCACCCGAGTTTGAGATGTGGAGCCAGGGCATCCATGCGCGCAGCGGC
GTTTCGTGCTCCGATTGTCACATGCCTTAA

>180904-023_M11_DNRA2-10_nrfAF2aw.ab1

GGGATTAAGGCTGACGAAATCCTCGCGTACTACGAGGAGTCCGGCTTCAAGGACTGGACACACAAGGACACC
GGCGCCCCGGCGCTCAAGGCCAGCACCCGGAGTTCGAGATGTGGAATCAGGGTATCCACGCACGGAGCGGT
GTGACCTGTGCCGATTGTCACATGCCTTAA

>180629-019_K01_DNRA2-3_nrfAF2aw.ab1

GGGGCTGAAGGTCGAGCAGATCGAAGCGACCTACGCCGACCACAAGTTCCTCCGACGGCTCGCCCTTCTACGA
CTTTGAACATGGCGAAACCGGCGCCCATGTCCTGAAGGCGCAGCATCCCGAGTTCGAACTCTGGAGCCAAGGC
ATCCATGCGCGCAGCGGCGTCAGTTGCGCCGATTGTCACATGCCTTAA



ภาคผนวก ค

ก. พารามิเตอร์น้ำในการทดลองอัตราการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

ชั่วโมง ที่	ค่าเฉลี่ย						pH	Temp	DO
	Ammonia (mg/l)	sd	Nitrite (mg/l)	sd	Nitrate (mg/l)	sd			
0	43.03	3.98	<LOD	-	<LOD	-	7.90	26.57	6.03
1	30.94	2.27	<LOD	-	<LOD	-	7.79	27.43	6.13
2	29.67	1.80	<LOD	-	0.58	0.06	7.73	26.73	6.00
3	24.40	1.61	<LOD	-	2.87	2.55	7.37	26.23	6.93
4	21.02	1.37	<LOD	-	5.96	2.30	7.07	26.07	9.07
5	18.06	1.48	<LOD	-	9.28	3.46	7.10	25.87	6.63
6	12.73	1.62	<LOD	-	13.39	4.16	7.79	25.97	6.27
7	8.95	0.57	<LOD	-	16.93	4.93	7.54	25.87	5.90
8	2.66	1.94	<LOD	-	23.56	7.16	7.76	25.67	5.63
9	0.17	0.50	<LOD	-	32.13	1.86	7.63	25.50	5.07
10	<LOD	-	<LOD	-	35.58	1.08	7.62	25.63	5.57
เฉลี่ย							7.57	26.14	6.29

ข. พารามิเตอร์น้ำในการทดลองอัตราการเปลี่ยนรูปไนโตรท์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

ชั่วโมง ที่	ค่าเฉลี่ย						pH	Temp	DO
	Ammonia (mg/l)	sd	Nitrite (mg/l)	sd	Nitrate (mg/l)	sd			
0	6.60	1.33	26.85	0.13	<LOD	-	7.91	26.47	6.47
1	3.26	0.12	22.31	0.07	0.98	0.72	8.01	27.23	6.37
2	2.71	0.22	20.08	0.06	2.03	0.83	7.86	27.07	6.50
3	2.27	0.71	17.81	0.98	21.79	1.33	7.84	27.00	5.93
4	2.04	0.71	16.73	0.38	22.59	0.60	7.77	26.97	6.50
5	1.56	0.72	11.81	0.14	23.55	0.40	7.70	26.77	9.07
6	1.48	0.69	6.81	0.10	24.61	0.74	7.72	26.50	7.67
7	1.37	0.72	2.22	0.10	28.67	0.57	7.82	19.70	7.63
8	1.05	0.56	<LOD	-	30.90	1.76	7.85	26.27	6.87
9	0.75	0.32	<LOD	-	31.15	1.75	7.86	25.97	6.47
10	0.07	0.43	<LOD	-	31.49	1.57	7.80	25.73	6.30
เฉลี่ย							7.83	25.97	6.89

ค. พารามิเตอร์น้ำในการทดลองอัตราการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มีไนโตรท์

ใช้ตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ 50 mg/l

วันที่	ค่าเฉลี่ย			sd		
	Ammonia (mg/l)	Nitrite (mg/l)	Nitrate (mg/l)	Ammonia (mg/l)	Nitrite (mg/l)	Nitrate (mg/l)
0	92.87	111.77	5.62	0.110	0.073	0.178
1	92.65	86.89	28.93	0.166	0.073	0.308
2	112.06	82.95	14.76	0.345	0.146	0.308
3	109.28	73.30	3.36	1.163	0.042	0.308
4	92.90	<LOD	7.67	0.199	-	0.308
5	90.99	<LOD	8.59	0.452	-	0.308
6	113.01	<LOD	6.95	0.287	-	0.178
7	119.39	<LOD	8.08	0.110	-	0.356
8	106.61	<LOD	14.86	0.191	-	0.178
9	112.28	<LOD	11.26	0.307	-	0.178
10	117.51	<LOD	11.98	0.191	-	0.308
11	107.66	<LOD	6.33	0.096	-	0.178
12	108.17	<LOD	8.59	0.110	-	0.308

ใช้ตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ 25 mg/l

วันที่	ค่าเฉลี่ย			sd		
	Ammonia (mg/l)	Nitrite (mg/l)	Nitrate (mg/l)	Ammonia (mg/l)	Nitrite (mg/l)	Nitrate (mg/l)
0	93.16	106.30	27.28	0.06	0.15	0.47
1	92.61	93.75	24.61	0.15	0.89	0.31
2	79.99	92.22	2.84	0.15	0.07	0.36
3	94.72	80.03	4.79	0.11	0.13	0.47
4	93.41	74.85	5.41	0.17	0.07	0.18
5	104.41	82.76	9.31	0.10	0.04	0.64
6	104.12	90.49	7.98	0.10	0.11	0.31
7	97.04	88.28	4.69	0.19	1.21	0.36
8	104.79	81.01	4.59	0.10	1.12	0.31
9	88.12	87.30	0.00	0.06	2.13	0.00
10	91.82	30.74	0.00	1.22	0.04	0.00
11	89.90	<LOD	-	0.11	0.00	3.56
12	88.63	<LOD	-	0.10	0.00	3.75

ง. พารามิเตอร์น้ำในการทดลองอัตราการเปลี่ยนรูปไนเตรทภายใต้สภาวะที่มีเมทานอล

วันที่	ค่าเฉลี่ย			sd		
	Ammonia (mg/l)	Nitrite (mg/l)	Nitrate (mg/l)	Ammonia (mg/l)	Nitrite (mg/l)	Nitrate (mg/l)
0	7.64	19.72	99.58	0.19	0.08	0.64
1	31.45	<LOD	54.09	0.10	-	0.18
2	43.27	<LOD	42.38	0.06	-	0.36
3	40.44	<LOD	5.21	0.10	-	0.31
4	40.31	<LOD	4.49	0.11	-	0.18
5	59.18	<LOD	7.67	0.19	-	0.31
6	56.31	<LOD	1.92	0.10	-	0.47
7	52.39	<LOD	5.10	0.17	-	0.47
8	57.97	<LOD	8.29	0.06	-	0.31
9	65.23	<LOD	7.16	0.15	-	0.18
10	60.13	<LOD	8.18	0.10	-	0.18
11	62.33	<LOD	8.39	0.17	-	0.18
12	58.09	<LOD	7.98	0.15	-	0.00

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

ชานนท์ พันธภาพา

วัน เดือน ปี เกิด

2 พฤศจิกายน 2533



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY