ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียโดยเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

Ammonium Removal Efficiency by Heterotrophic Bacteria Isolated from Pacific White Shrimp *(Litopenaeus vannamei)* Farms

สุนิภา จันทร์แก้ว

Sunipa Chankaew

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Aquatic Science
Prince of Songkla University
2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียโดยเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

Ammonium Removal Efficiency by Heterotrophic Bacteria Isolated from Pacific White Shrimp *(Litopenaeus vannamei)* Farms

สุนิภา จันทร์แก้ว

Sunipa Chankaew

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Aquatic Science
Prince of Songkla University
2560
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียโดยเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ผู้เขียน นางสาวสุนิภา จันทร์แก้ว

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.ยุทธพงษ์ สังข์น้อย)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมพงศ์ โอทอง)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร คันธโชติ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

.....กรรมการ

(ดร.ยุทธพงษ์ สังข์น้อย)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมพงศ์ โอทอง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร. ยุทธพงษ์ สังน้อย)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมพงศ์ โอทอง)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....
(นางสาวสุนิภา จันทร์แก้ว)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวสุนิภา จันทร์แก้ว)
นักศึกษา

วิทยานิพนธ์ ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียโดยเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
ผู้เขียน นางสาวสุนิภา จันทร์แก้ว
สาขาวิชา วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

การกำจัดแอมโมเนียในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนับว่ามีความสำคัญมาก เพราะช่วยป้องกันไม่ให้สัตว์น้ำได้รับอันตรายจากความเป็นพิษของแอมโมเนีย ในการศึกษาครั้งนี้แบคทีเรียออกซิไดซ์แอมโมเนียสายพันธุ์ SRNB23 SRNB35 SRNB78 SRNB79 และ SKNB4 ถูกแยกจากตะกอนดินที่เก็บจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว โดยเลี้ยงในอาหาร modified Pep-Beef-AOM เป็นระยะเวลา 28 วัน และทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดแอมโมเนีย ด้วยวิธี Griess-Ilosvay จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท SRNB23 SRNB35 SRNB78 และ SKNB4 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ส่วนไอโซเลท SRNB79 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง สร้างเอ็นโดสปอร์ จากการศึกษายีน 16S rRNA และการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการสายพันธุ์ของแบคทีเรีย พบว่าไอโซเลท SRNB23 SRNB35 และ SRNB78 มีความใกล้เคียงกับ *Alcaligenes* sp. ส่วนไอโซเลท SRNB79 มีความใกล้เคียงกับ *Oceanobacillus profundus* และไอโซเลท SKNB4 มีความใกล้เคียงกับ *Halomonas aquamarina* สำหรับประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของแบคทีเรีย พบว่าไอโซเลท SRNB23 และ SRNB35 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุด แทน 91.75 และ 91.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่ให้ผลบวกของไนเตรท คือ SRNB78 SRNB79 และ SKNB4 ซึ่งสามารถลดแอมโมเนียได้ 55.57, 51.37 และ 20.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีแอมโมเนียเริ่มต้นในช่วง 799.56 ถึง 871.70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อผสมพบว่าเชื้อผสม SRNB23 กับ SRNB35 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ดีที่สุดเท่ากับ 66.07 เปอร์เซ็นต์ โดยสัดส่วนเชื้อผสมที่เหมาะสมที่สุดของ SRNB23 กับ SRNB35 เท่ากับ 30:70 ซึ่งสามารถลดแอมโมเนียได้ 59.72 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท SRNB23 SRNB35 SKNB4 และเชื้อผสมระหว่าง SRNB23 กับ SRNB35 (30:70) มาบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยมีแอมโมเนียเริ่มต้นในช่วง 461.90 ถึง 467.98 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าทุกชุดการทดลองมีความสามารถในการลดแอมโมเนียได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมระหว่าง SRNB23 กับ SRNB35 (30:70) สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้มากที่สุดถึง 63.07 เปอร์เซ็นต์

Thesis Title Ammonium Removal Efficiency by Heterotrophic Bacteria Isolated from Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Farms.
Author Miss Sunipa Chankaew
Major Program Aquatic Science
Academic Year 2016

Abstract

Ammonium removal for aquaculture ponds is significant to prevent aquatic animals from ammonium toxicity. This study, ammonium oxidizing bacteria strains SRNB23, SRNB35, SRNB78, SRNB79 and SKNB4 were isolated from sediment and water samples that collected from white shrimp farms. Each sample was enriched in modified Pep-Beef-AOM medium for 28 days. Ammonium removal ability was preliminary screened by Griess-Ilosvay method. Morphological characteristics showed that strains SRNB23, SRNB35, SRNB78 and SKNB4 were Gram negative and rod shape, while strain SRNB79 was gram positive, rod shape and had endospore formation. Based on 16S rRNA gene sequencing data and phylogenetic analysis, strains SRNB23, SRNB35 and SRNB78 were identified as Alcaligenes sp. with similarity ranges of 98%, 91% and 99%, respectively. While strains SRNB79 and SKNB4 were identified as Oceanobacillus profundus and Halomonas aquamarina with similarity ranges of 99% and 99.7%, respectively. The result of ammonium removal efficiency showed that strains SRNB23 and SRNB35 have the highest ammonium removal ability for 91.75% and 91.21%, respectively. While only three isolates including SRNB78, SRNB79 and SKNB4 exhibited nitrate production and showed ammonium removal efficiency with initial concentration of 799-871 mg-N/L for 55.57%, 51.37% and 20.32%, respectively. Mixture of SRNB23 and SRNB35 had a highest ammonium removal efficiency of 66.07% and the best ratio of 30:70 had an ammonium removal efficiency of 59.72%. The, the single and mixture of bacteria were examined for treating of saline ammonium waste water with initial ammomium concentration of 461-467 mg-N/L from shrimp farm. The result showed that a mixture (SRNB23:SRNB35) had the highest ammonium removal efficiency of 63.07%

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร.ยุทธพงษ์ สังข์น้อย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ช่วยเหลือในการวางแผนการทดลอง แนะนำ รวมถึงคอยให้คำปรึกษาและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมพงศ์ โอทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ แก้ไข และทำให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบพระคุณ คุณวศิน ธนภิรมณ์ เจ้าของฟาร์มเลี้ยงกุ้ง ภัทรวุฒิฟาร์ม ต.แหลมโพธิ์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ขอบพระคุณ คุณแทน เทือกสุบรรณ และ ผู้จัดการฟาร์มศรีสุบรรณ ทั้ง 7 ฟาร์ม อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี ที่อนุเคราะห์และคอยอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

ขอบพระคุณอาจารย์ และบุคลากรภาควิชาวาริชศาสตร์ ที่คอยให้คำปรึกษาและสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ขอบคุณเพื่อนๆนักศึกษาปริญญาโท ที่คอยช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอบคุณนิสิตบัณฑิตคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่คอยช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนเป็นอย่างสูงที่ให้พื้นฐานทางด้านการศึกษา อีกทั้งเป็นผู้ให้การสนับสนุนช่วยเหลือทั้งด้านกำลังใจ และกำลังความรู้ สติปัญญาจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุนิภา จันทร์แก้ว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(9)
สารบัญรูปภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	18
บทที่ 3 ผลการทดลอง	27
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการศึกษา	46
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	55
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก	63
ประวัติผู้เขียน	86

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	คุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)	5
ตารางที่ 2	ระดับของแอมโมเนียอิสระและผลกระทบต่อกุ้งทะเล	7
ตารางที่ 3	วิธีการศึกษาพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำ	22
ตารางที่ 4	วิธีการศึกษาปัจจัยทางเคมีของน้ำในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง	25
ตารางที่ 5	จำนวนไอโซเลทของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำจาก บ.ศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด และ ภัทรวุฒิฟาร์ม	28
ตารางที่ 6	ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจากการคัดแยกที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์	31
ตารางที่ 7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกได้	33
ตารางที่ 8	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA	34
ตารางที่ 9	รหัสนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (accession number) ในฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ) ของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย	34
ตารางที่ 10	ความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม	37
ตารางที่ 11	การทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของสัดส่วนเชื้อผสมสายพันธุ์ SRNB23 และ SRNB35	38
ตารางที่ 12	การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน	40
ตารางที่ 13	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน	41
ตารางที่ 14	การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน	42
ตารางที่ 15	ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการลดแอมโมเนียในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งระยะเวลา 14 วัน	43
ตารางที่ 16	ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการลดไนไตรท์ในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งระยะเวลา 14 วัน	44
ตารางที่ 17	ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการลดไนเตรทในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งระยะเวลา 14 วัน	45
ตารางที่ 18	การคัดแยกและการทำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ที่ทำการทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนโตรเจน โดยวิธี Griess-Ilosvay method	65

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 19 ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ 75
ตารางที่ 20 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน 80
ตารางที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน 81
ตารางที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน 82
ตารางที่ 23 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน 83
ตารางที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์ในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน 84
ตารางที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน 85

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อความเป็นพิษของแอมโมเนีย	7
ภาพที่ 2	วัฏจักรไนโตรเจนในแหล่งน้ำ	10
ภาพที่ 3	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ HLf01 (A), HBf01 (B) และ HHf01 (C)	15
ภาพที่ 4	แผนภูมิวิวัฒนาการของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ HLf01, HBf01 และ HHf01ที่ได้จากบ่อเพาะเลี้ยงปลาทับทิม	15
ภาพที่ 5	แผนภูมิวิวัฒนาการ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SF16 จากอ่าว Jimei ประเทศจีน	16
ภาพที่ 6	ตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งของ บริษัท ศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี; ก: ตัวอย่างดิน, ข: ตัวอย่างน้ำ	20
ภาพที่ 7	ผลการทดสอบด้วย Nitrite reagent และแสดงผลเป็นบวก (มีการเปลี่ยนเป็นสีแดง)	21
ภาพที่ 8	ผลการทดสอบด้วย Nitrite reagent และแสดงผลเป็นลบ (ไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีแดง)	21
ภาพที่ 9	การบ่มน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารกุ้ง	24
ภาพที่ 10	การทำกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสำหรับการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง	25
ภาพที่ 11	การทดสอบประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	26
ภาพที่ 12	แผนภูมิวิวัฒนาการของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยศึกษาจากยีน 16S rRNA (Bar=0.05)	35
ภาพที่ 13	การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 14 วัน	40
ภาพที่ 14	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน	41
ภาพที่ 15	การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดลอง	42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจัดว่าเป็นกิจกรรมด้านการเกษตรกรรมอันดับต้นๆ ของประเทศไทย โดยประเทศไทยได้ทำการส่งออกสัตว์น้ำในรูปแบบของสด แช่เย็น และแช่แข็ง (Fresh, Chilled และ Frozen) ซึ่งมีปริมาณส่งออกรวมในปี 2554 เท่ากับ 572,256 ตัน มีมูลค่าในการส่งออกประมาณ 8.5 หมื่นล้านบาท โดยในจำนวนนี้มีสัตว์น้ำที่ส่งออกเป็นปลา 304,394 ตัน มูลค่าการส่งออกประมาณ 2 หมื่นล้านบาท และส่งออกกุ้ง 200,358 ตัน มูลค่าประมาณ 5.2 หมื่นล้านบาท และพบว่าพื้นที่การเพาะเลี้ยงกุ้งมีมากถึง 362,645 ไร่ (กรมประมง, 2556ก)

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลสร้างมูลค่าการส่งออกจำนวนมากให้กับประเทศไทย ทำให้เป็นที่ดึงดูดใจเกษตรกรให้หันมาเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลมากขึ้น และเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด จึงมีการเพิ่มปัจจัยการผลิตต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยง และการเพิ่มปริมาณอาหาร เป็นต้น การเพิ่มปัจจัยการผลิตโดยเฉพาะการเพิ่มปริมาณอาหาร ทำให้เกิดของเสียจำพวกสารอินทรีย์ไนโตรเจนในบ่อมากขึ้น (Tookwinas, 1996) ส่งผลให้คุณภาพน้ำในบ่อไม่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยง จึงทำให้กุ้งอ่อนแอและอาจเกิดปัญหาโรคระบาดตามมา การเพาะเลี้ยงกุ้งในระบบปิดซึ่งเป็นระบบที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ หรือมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในปริมาณที่น้อยมาก จะเกิดของเสียที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ไนโตรเจนซึ่งเป็นพิษต่อกุ้ง คือ แอมโมเนีย (ammonia) ไนไตรท์ (nitrite) และไนเตรท (nitrate) สะสมอยู่ในน้ำและตะกอนดินในบ่อมาก และหากมีการสะสมของสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเป็นจำนวนมาก อาจส่งผลให้กุ้งตายและทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยง (นิคม และคณะ, 2547) นอกจากนี้การที่มีแอมโมเนียและไนไตรท์ความเข้มข้นต่ำๆ ก็อาจทำให้กุ้งตายได้ และแม้ว่าไนเตรทที่เกิดขึ้นจะมีความเป็นพิษกับกุ้งน้อยมากเมื่อเทียบกับแอมโมเนียและไนไตรท์ แต่หากมีปริมาณของไนเตรทสะสมอยู่มากก็อาจส่งผลเสียต่อกุ้งได้ (กัญญาณัฐ และคณะ, 2552) และหากมีการปล่อยน้ำทิ้งที่มีปริมาณของสารอินทรีย์ไนโตรเจนสูงลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ จะส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน (Eutrophication) ขึ้นในแหล่งน้ำ

อย่างไรก็ตาม สารอินทรีย์ไนโตรเจนในแหล่งน้ำสามารถถูกกำจัดได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพที่เรียกว่า กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) และกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) ซึ่งอาศัยการทำงานของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Nitrifying bacteria) เช่น *Nitrosomonas* sp. และ *Nitrosospira* sp. และดีไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) เช่น *Nitrobacter* sp. และ *Nitrococcus* sp. (เกยูร และคณะ, 2551) อย่างไรก็ตามไนตริไฟอิงแบคทีเรียและดีไนตริไฟอิงแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียในกลุ่มออโตโทรพ (autotrop) ที่เจริญเติบโตช้า ไม่ทนต่อสภาวะแอมโมเนียสูง และความสามารถในการแข่งขันต่ำเมื่อเทียบกับแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรพ (Heterotroph) ซึ่งมีเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย (Heterotrophic bacteria) ในแหล่งน้ำหลายชนิดที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นสูง เช่น *Alcaligenes* sp. โดยกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียเหล่านี้เจริญเติบโตได้ดี มีความสามารถในการแข่งขันสูง ทนต่อสภาวะแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นสูง ทนเค็ม และบางชนิดสามารถกำจัดแอมโมเนียในสภาพออกซิเจนต่ำได้ ดังนั้นการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง จึงเป็นการช่วยรักษาคุณภาพน้ำในแหล่งเพาะเลี้ยงให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และอาจช่วยให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งมีความยั่งยืนในอนาคต

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นการหาทางออกทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณผลผลิตทางการประมง และเป็นการทดแทนหรือบรรเทาปัญหาจากการขาดแคลนทรัพยากรประมง โดยพบว่าปริมาณการส่งออกสัตว์น้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรวมของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 เท่ากับ 755,464 ตัน โดยที่ 64.3 เปอร์เซ็นต์ มาจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง 33.7 เปอร์เซ็นต์ มาจากการเพาะเลี้ยงหอย และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ มาจากการเลี้ยงปลา (กรมประมง, 2554; กรมประมง, 2556ก)

กุ้งทะเลถือได้ว่าเป็นสัตว์ที่เป็นต้นแบบในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาถึง 40 ปี และมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศและมีแนวโน้มของผลผลิตที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ประเทศไทยเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกกุ้ง ในอดีตประเทศไทยนิยมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และทำการส่งออก เพราะเป็นกุ้งสายพันธุ์ท้องถิ่น มีขนาดใหญ่ แต่หลังจากประสบปัญหาโรคระบาด เกิดภาวะน้ำเค็มจัด ทำให้กุ้งโตช้า รวมถึงการขาดพ่อแม่พันธุ์กุ้ง จึงเป็นสาเหตุให้เกษตรกรเปลี่ยนชนิดการเลี้ยงกุ้งจากกุ้งกุลาดำเป็นกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เลี้ยงง่าย ผลผลิตสูง และทำให้ประเทศไทยมีผลผลิตกุ้งเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2545 (กรมประมง, 2554; กรมประมง, 2556ข)

1.2.2 ปัญหาในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตสูงสุด เช่น การใส่ปัจจัยในการผลิตให้เพิ่มมากขึ้น ทั้งด้านการเลี้ยงอย่างหนาแน่นมากขึ้น การเพิ่มอาหาร เป็นต้น ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเกษตรกรบางรายได้ทำการจับสัตว์น้ำและมีการปล่อยน้ำจากการเพาะเลี้ยงออกสู่ธรรมชาติ ซึ่งน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงได้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้คุณภาพน้ำและดินในบริเวณนั้นเกิดความเสื่อมโทรม เพิ่มอัตราการระบาดของโรค รวมถึงทำให้แหล่งน้ำจืดและแหล่งน้ำผิวดินในบริเวณใกล้เคียงไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ (กษิดิศ, 2551; Nimrat *et al*., 2005) นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกหลายประการดังต่อไปนี้

1) ปัญหาเรื่องภาวะมลพิษในบ่อเพาะเลี้ยง

เนื่องจากปัจจุบันได้ทำการเพาะเลี้ยงอย่างหนาแน่น มีการให้อาหารในปริมาณมาก ทำให้มีสารอินทรีย์จากเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายของกุ้งอยู่ภายในมวลน้ำของการเพาะเลี้ยงและบริเวณก้นบ่ออยู่มาก ส่งผลให้คุณสมบัติของคุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงและมีความไม่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยง เกิดเป็นน้ำเสียและกุ้งในบ่อเพาะเลี้ยงเกิดความเครียด ไม่กินอาหาร อ่อนแอ เสี่ยงต่อการเป็นโรคและตายในที่สุด อันจะนำมาซึ่งความเสียหายต่อระบบการเพาะเลี้ยงภายในบ่อและต่อตัวเกษตรกรที่สูญเสียรายได้

ปัญหาเรื่องโรคระบาดเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลต่อการตายของกุ้ง เนื่องมาจากการที่คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม เกิดมลภาวะทำให้กุ้งเครียด ไม่กินอาหาร อ่อนแอ และขาดความต้านทานโรค นอกจากนี้การเปลี่ยนถ่ายน้ำยังส่งผลต่อการปนเปื้อนของเชื้อโรคจากแหล่งที่เลี้ยงไปสู่ธรรมชาติ หรือจากธรรมชาติมาสู่แหล่งเลี้ยง ซึ่งเป็นการเพิ่มความเสี่ยงให้กุ้งตายมากขึ้น

2) ปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกบ่อเพาะเลี้ยง

เมื่อคุณสมบัติของน้ำภายในบ่อเพาะเลี้ยงเสื่อมโทรมหรือช่วงเก็บเกี่ยวผลผลิตจากการเพาะเลี้ยง เกษตรกรบางรายเลือกที่จะปล่อยน้ำเสียออกสู่ภายนอก ซึ่งเป็นน้ำที่มีองค์ประกอบของเสียพวกสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท รวมไปถึงสารประกอบฟอสฟอรัสอยู่ในปริมาณมากและเกินมาตรฐานน้ำทิ้ง (ตารางที่ 1) ซึ่งสารอนินทรีย์ไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่สิ่งมีชีวิตจำพวกแพลงก์ตอนพืชและสาหร่ายสามารถดูดซึมไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ แต่ถ้ามีสารอาหารมากเกินไปจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน (Eutrophication) ซึ่งมีปริมาณของเซลล์แพลงก์ตอนพืชชนิดใดชนิดหนึ่งมากเกินไป ส่งผลให้ปริมาณของออกซิเจนละลายน้ำลดต่ำลงจนกลายเป็นแหล่งน้ำเน่าเสีย ทั้งนี้ของเสียที่พบบ่อยและเป็นสารที่มีพิษมากที่สุดต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ แอมโมเนีย ซึ่งถือเป็นอุปสรรคต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างยิ่ง

ตารางที่ 1 คุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

ดัชนีคุณภาพน้ำ	มาตรฐานน้ำทิ้งของกรมควบคุมมลพิษ[1]	น้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ[2]	น้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม[3]	น้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม[4]
1.ความเป็นกรดและด่าง (พีเอช)	6.5-9.0	7.4-8.2	7.8-8.5	NA
2.บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	< 20	6.3-19.0	3.7-19.9	12.2 – 40.2
3.สารแขวนลอย (Suspended Soilds, SS)	< 70	35.0-437.0	55.0-345.0	87.0 – 480.0
4.แอมโมเนีย (NH_3-N) (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	< 1.1	0.8-4.6	0.1-5.5	0.4 – 37.2
5.ฟอสฟอรัสรวม (Total Phosphorus) (มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร)	< 0.4	0.4-0.8	0.3-0.6	0.14 – 1.03
6.ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	<0.01	0.0-0.8	0.1-2.2	NA
7.ไนโตรเจนรวม (Total Nitrogen) (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	< 4.0	3.7-12.0	3.5-14.8	7.8-61.0

NA หมายถึง ไม่มีการบันทึกข้อมูล

ที่มา: ดัดแปลงจาก กรมควบคุมมลพิษ (2555)[1], สิริ และชนินทร์ (2541)[2], สิริ และคณะ (2548)[3] และ พุทธ และคณะ (2546)[4]

1.2.3. สารอนินทรีย์ไนโตรเจน

ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อระบบนิเวศของแหล่งน้ำ และยังเป็นส่วนประกอบของอินทรีย์สารหลายชนิดที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต เช่น เป็นส่วนประกอบของโปรตีน และนิวคลีโอไทด์ ซึ่งในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อนินทรีย์ไนโตรเจนอยู่ในสารประกอบหลายประเภท เช่น ก๊าซไนโตรเจน แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท ซึ่งแอมโมเนีย และไนไตรท์มีผลเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ โดยไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่มาจากอาหาร ซึ่งกุ้งสามารถที่จะเก็บไนโตรเจนไว้อยู่ในเนื้อกุ้งได้เพียง 21.8 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในปลาเรนโบว์เทร้าท์สามารถเก็บไนโตรเจนอยู่ในรูปโปรตีนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้เพียง 22 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่เหลือนั้นจะตกค้างอยู่ในบ่อกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสิ่งขับถ่ายจากสัตว์น้ำในรูปของแอมโมเนีย รวมถึงเศษอาหารที่ละลายน้ำและตกค้างที่ก้นบ่อ (พุทธ และคณะ, 2546; Gowen and Bradbury, 1987) และอยู่ในรูปของสิ่งขับถ่ายที่ละลายน้ำได้ เช่น อินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) แอมโมเนีย (ammonia) ไนไตรท์ (nitrite) และไนเตรท (nitrate) ซึ่งส่งผลให้น้ำเสีย และไม่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

1) ความเป็นพิษของแอมโมเนีย (Ammonia: NH_3)

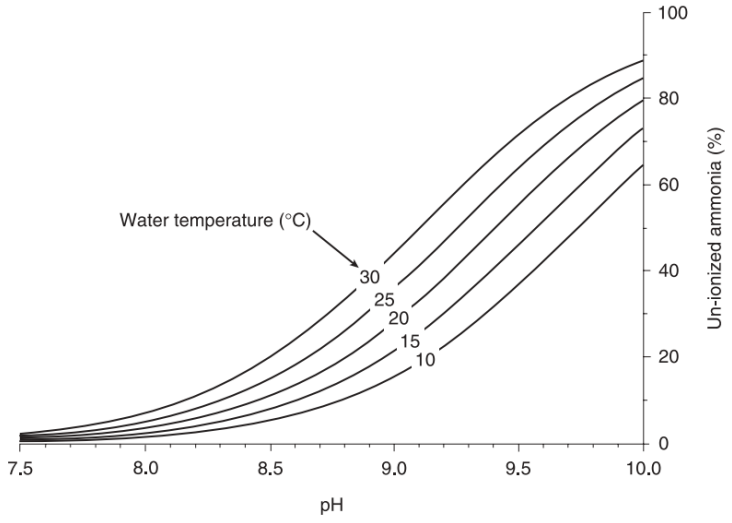
แอมโมเนียที่พบในแหล่งน้ำมี 2 รูปแบบ คือ แอมโมเนีย (NH_3) และแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ซึ่งทั้ง 2 รูปแบบสามารถเปลี่ยนไปมาได้ โดยขึ้นอยู่กับค่าพีเอช เมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้นปริมาณของแอมโมเนียจะเพิ่มขึ้น และเมื่อค่าพีเอชลดลงปริมาณของแอมโมเนียมไอออนจะเพิ่มขึ้น ซึ่งแอมโมเนียมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำมากกว่าแอมโมเนียมไอออน (ภาพที่ 1) (Spotte, 1979) แอมโมเนียส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง (ตารางที่ 2) เมื่อน้ำมีระดับแอมโมเนียน้อย จะทำให้กุ้งสามารถขับถ่ายแอมโมเนียออกมาได้ดี และทำให้มีการเจริญเติบโตที่ดี แต่ถ้ามีแอมโมเนียในน้ำมาก นอกจากจะทำให้กุ้งไม่สามารถขับถ่ายแอมโมเนียออกมาได้แล้ว ยังทำให้แอมโมเนียแพร่กลับเข้าไปในเลือดได้ ส่งผลให้เลือดในตัวของกุ้งมีแอมโมเนียสูง พีเอชในเลือดสูงและมีความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ในเลือดกุ้งทำงานผิดปกติ กุ้งโตช้า และถ้าแอมโมเนียมีความเข้มข้นสูงมาก จะทำให้กุ้งตายได้

ตารางที่ 2 ระดับของแอมโมเนียอิสระและผลกระทบต่อกุ้งทะเล

แอมโมเนียอิสระ (มิลลิกรัมไนโตรเจน/ลิตร)	ผลต่อกุ้งทะเล
< 0.1	ปลอดภัยต่อการเลี้ยงกุ้ง
0.1 - 0.4	กุ้งโตช้า
> 0.4	กุ้งโตช้า กินอาหารน้อยลงเครียดหรือตาย

ที่มา: พุทธ และคณะ (2546)

นอกจากนี้ยังทำให้เนื้อเยื่อของกุ้งใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น ลดความสามารถของเลือดในการลำเลียงออกซิเจน ทำลายเหงือก ทำให้กุ้งตกอยู่ในสภาวะเครียด การหายใจและเปลี่ยนออกซิเจนไม่เป็นปกติ มีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย และตายในที่สุด กุ้งจะแสดงอาการตอบสนองต่อแอมโมเนียในระดับต่างๆ แอมโมเนียที่เพิ่มมากขึ้นทำให้กุ้งต้องการออกซิเจนมากขึ้น แสดงว่ากุ้งมีการหายใจมากขึ้น ในทางตรงข้ามกัน กุ้งสามารถหมุนเวียนเลือดนำแอมโมเนียมาขับออกที่เหงือก แต่ทำให้กุ้งเสียพลังงานมาก ในภาวะที่น้ำมีปริมาณแอมโมเนียสูงและออกซิเจนละลายน้ำต่ำ กุ้งจะลดการหายใจเพื่อป้องกันไม่ให้แอมโมเนียในน้ำเข้าสู่ร่างกาย แต่จะมีผลทำให้กุ้งมีความเครียดเพิ่มขึ้น เจริญเติบโตช้า เพราะลดกิจกรรมในการดำรงชีวิต รวมถึงลดอัตราการกินด้วย นอกจากนี้เมื่อน้ำมีค่าพีเอชสูงขึ้นจะเพิ่มระดับความเป็นพิษของแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้นในขณะที่มีปริมาณของแอมโมเนียรวมในน้ำเท่าเดิม (ชลอ และพรเลิศ, 2547)



ภาพที่ 1: ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อความเป็นพิษของแอมโมเนีย

ที่มา: Hargreaves and Tucker (2004)

2) ความเป็นพิษของไนไตรท์ (Nitrite: NO_2^-)

ไนไตรท์เกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) โดยที่แอมโมเนียถูกแบคทีเรียกลุ่ม Ammonium oxidizing bacteria (AOB) เปลี่ยนเป็นไนไตรท์ในสภาวะที่มีอากาศ คุณสมบัติของไนไตรท์จะให้ความเป็นพิษเช่นเดียวกับแอมโมเนีย ส่งผลต่อเลือดของกุ้งทำให้ระดับโปรตีนและพีเอชของเลือดกุ้งลดลง ทำให้ชีวเคมีในเลือดของกุ้งมีการเปลี่ยนแปลง การทำงานของระบบเผาผลาญอาหารในร่างกายมีประสิทธิภาพลดลง ส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต ไนไตรท์ยังสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ในการเปลี่ยนไนเตรทให้กลับมาเป็นไนไตรท์โดยแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำและดินของบ่อกุ้ง และเกิดขึ้นในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ พุทธ และคณะ (2546) ได้รายงานถึงพิษของไนไตรท์เพิ่มเติมว่านอกจากทำให้การลำเลียงออกซิเจนลดลงแล้ว ยังทำให้ระบบการหายใจของกุ้งผิดปกติ กุ้งลอกคราบไม่ได้ กุ้งมีเปลือกนิ่ม มีการกินกันเองในระหว่างที่ลอกคราบ ผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน อุณหภูมิควรอยู่ที่ 25-35 องศาเซลเซียส และพีเอชควรอยู่ที่ 7-8.5 ซึ่งหากพีเอชมีค่าสูงมากกว่า 8.5 แบคทีเรียจะถูกยับยั้งการทำงาน และแบคทีเรียในกลุ่ม *Nitrobacter* ได้รับผลกระทบมากกว่ากลุ่ม *Nitrosomonas* เป็นผลให้ในบ่อการเพาะเลี้ยงเกิดการสะสมของไนไตรท์ นอกจากนี้ความเป็นพิษของไนไตรท์ถูกยับยั้งได้ด้วยคลอไรด์ในน้ำ โดยในน้ำทะเลที่มีคลอไรด์สูง จะมีความเป็นพิษของไนไตรท์ต่อสัตว์น้ำค่อนข้างต่ำ ระดับความเป็นพิษของไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen; DO) และค่าพีเอช (pH) ของน้ำลดลง (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

3) ความเป็นพิษของไนเตรท (Nitrate: NO_3^-)

ไนเตรทเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) จากไนไตรท์เป็นไนเตรท ซึ่งเกิดในกระบวนการไนตริฟิเคชัน ไนเตรทเป็นสารที่มีความเป็นพิษน้อย เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลัน ไนเตรทส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ โดยทำให้เกิดความอ่อนแอ กินอาหารน้อยลงและมีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย ไนเตรทมีความเป็นพิษมากขึ้นถ้าสัตว์น้ำต้องอาศัยอยู่ในน้ำที่มีระดับของไนเตรทสูงเป็นเวลานาน ซึ่งผลการเป็นพิษของไนเตรทให้ผลเช่นเดียวกันกับพิษของไนไตรท์ ถ้าในน้ำการเพาะเลี้ยงกุ้งมีปริมาณของไนเตรทเข้มข้น 15.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร จะส่งผลให้กุ้งประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ตายภายใน 90 ชั่วโมง และไม่ควรมีความเข้มข้นของไนเตรทสูงกว่า 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เพราะจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ (Hart and O'Sullivan, 1993)

1.2.4 กระบวนการทางชีวภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในแหล่งน้ำ

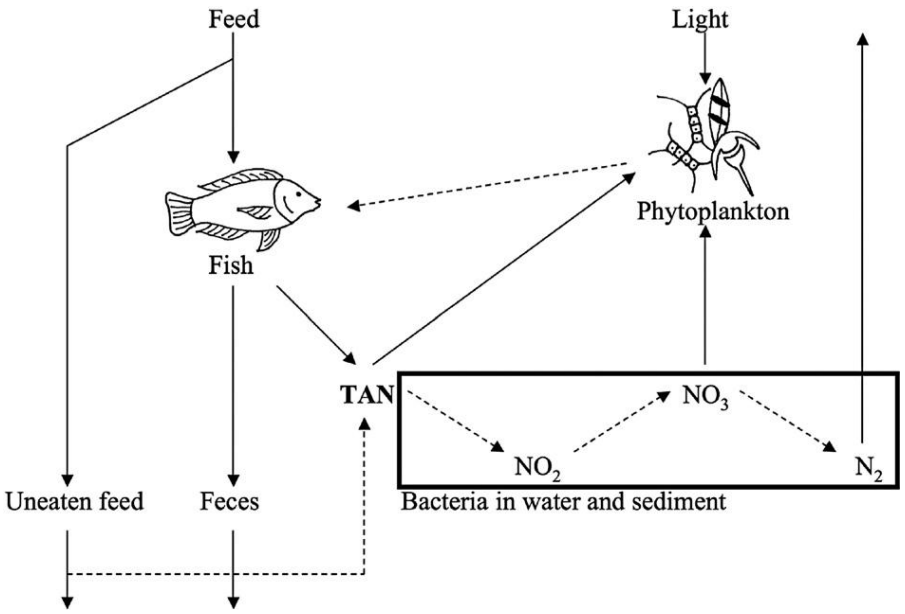
กระบวนการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนทางชีวภาพในแหล่งน้ำเป็นกระบวนการที่จำเป็นต้องมีจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกันในการกำจัด ซึ่งแบคทีเรียในวัฏจักรไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบกลุ่มสำคัญในระบบนิเวศการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 2) ซึ่งปรมินทร์ (2548) รายงานว่าโปรตีนจากเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายจะเกิดการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ในบ่อเป็นกรดอะมิโน โดยอาศัยกระบวนการแอมโมนิเซชั่น (Amonization) โดยจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรพ ดังสมการ

สารประกอบไนโตรเจน $\xrightarrow{\text{heterotrophic bacteria}}$ กรดอะมิโน, เอมีน

และโดยกระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification) เปลี่ยนสารประกอบเอมีนหรือกรดอะมิโนให้เป็นแอมโนเนีย หรือแอมโมเนียม เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยอาศัย Ammonifying bacteria เช่น *Bacillus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. ในกระบวนการ ดังสมการ

กรดอะมิโน, เอมีน $\xrightarrow{\text{ammonification}}$ แอมโมเนีย

เพื่อให้ได้สารอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีความเป็นพิษน้อย หรือไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แอมโมเนียจะถูกเปลี่ยนต่อเป็นไนไตรท์ ไนเตรท และเป็นก๊าซไนโตรเจน โดยอาศัยกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) โดยแบคทีเรียที่มีบทบาท คือ ไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Nitrifying bacteria) ในสภาวะที่มีออกซิเจน และกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) โดยแบคทีเรียที่มีบทบาท คือ ดีไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (ดวงพร, 2545; ธงชัย, 2544; Hargreaves, 1998)



ภาพที่ 2: วัฏจักรไนโตรเจนในแหล่งน้ำ
ที่มา: Crab *et al*. (2007)

กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification)

กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) คือ กระบวนการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ กระบวนการไนตริฟิเคชันแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อยและมีกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง 2 กลุ่ม เรียกว่าไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Nitrifying bacteria) ซึ่งสามารถแบ่งได้ดังนี้ (ธงชัย, 2544; Yanagita, 1990; Bitton, 1994)

1. กระบวนการไนไตรเตชัน (nitritation) หรือไนไตรติฟิเคชัน (nitritification)

เป็นขั้นตอนการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้กลายเป็นไนไตรท์ ดังสมการที่ (1.1) โดยมีแบคทีเรียในกลุ่ม ammonium oxidizing bacteria (AOB) เปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ แบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในจีนัส *Nitrosomonas, Nitrospira, Nitrosococcus, Nitrosolobus, Nitrosovibrio* และ *Nitrosogloea*

$$2NH_4^+ + 3O_2 \longrightarrow 2NO_2^- + 2H_20 + 4H^+ \quad (1.1)$$

2. กระบวนการไนเตรเตชัน (nitratation) หรือ ไนเตรติเตชัน (nitratitation)

เป็นขั้นตอนในการเปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท สมการที่ (1.2) และมีแบคทีเรียในกลุ่มของ nitrite oxidizing bacteria (NOB) ที่เปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรีย *Nitrobacter winogradskyi, Nitrobacter agilis, Nitrospira gracilis* และ *Nitrococcus mobilis* เป็นต้น

$$2NO_2^- + O_2 \longrightarrow 2NO_3^- \qquad (1.2)$$

นอกจากนี้ยังมีกลุ่มแบคทีเรียอื่นๆ เช่น *Bacillus, Pseudomonas* และ *Alcaligenes* สามารถบำบัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน คือ ออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen: DO) พีเอช (pH) อุณหภูมิ (Temperature) และความเค็ม (ธงชัย, 2544)

1. ออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen: DO)

กลุ่มไนตริไฟอิงแบคทีเรียมีความไวต่อออกซิเจนที่มีความเข้มข้นต่ำ ซึ่งไนตริไฟอิงแบคทีเรียต้องการปริมาณของออกซิเจนละลายน้ำ 4.57 มิลลิกรัม/ลิตร พบปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันจะเกิดได้ควรมีระดับของออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร แต่หากมีปริมาณของออกซิเจนมากไปจะทำให้เปลืองพลังงาน และถ้าในแหล่งน้ำมีค่าออกซิเจนอยู่ในช่วง 0.2-0.3 มิลลิกรัม/ลิตร จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันพร้อมกัน เรียกว่า SND (Simultaneous Nitrification-Denitrification) (Tchobanoglous *et al*. 2004)

2. พีเอช (pH)

กลุ่มไนตริไฟอิงแบคทีเรียสามารถทำงานได้ดีที่สภาพค่อนข้างเป็นด่าง โดยประมาณ 7.5-9.0 ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *Nitrosomonas* spp. อยู่ในช่วงระหว่าง 7.2-8.8 และพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *Nitrobacter* spp. อยู่ในช่วง 7.2-9.0 จึงเป็นเหตุผลที่พีเอช 8.5 จะเกิดปฏิกิริยาของไนตริฟิเคชันได้ดีที่สุด (Chena *et al*. 2006)

3. อุณหภูมิ (Temperature)

พบว่าไนตริไฟอิงแบคทีเรียจะสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 – 60 องศาเซลเซียส และมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออุณภูมิลดลงถึง 15 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง 75 เปอร์เซ็นต์ แต่หากเกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจะทำให้จุลินทรีย์ตายอย่างฉับพลัน และส่งผลต่อปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (ธงชัย, 2544)

4. ความเค็ม (Salinity)

ความเค็มส่งผลในทางลบต่อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย หากมีการเปลี่ยนแปลงของความเค็มอย่างกะทันทัน จะทำให้อัตราการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันลดลง และหากมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่า 5 พีพีที (หนึ่งในพันส่วน) จะทำให้อัตราการกำจัดแอมโมเนียและไนไตรท์ลดลง (Lawson, 1995)

กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification)

เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนไนไตรท์หรือไนไตรทให้เป็นแก๊สไนโตรเจน (N_2) หรือไนตรัสออกไซด์ (NO_2) กลับสู่ชั้นบรรยากาศ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anoxic) โดยแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (denitrifying bacteria) เช่น *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. และ *Thiobacillus* sp. กระบวนการดีไนตริฟิเคชันจะมีขั้นตอนการเกิดของปฏิกิริยา 4 ขั้นตอนด้วยกัน (Bitton, 1994) คือ

1. ไนไตรทรีดักชัน (nitrate reduction) โดยการเปลี่ยนไนเตรท (NO_3^-) ให้เป็นไนไตรท์ (NO_2^-)

$$NO_3^- \xrightarrow{\text{nitrate reductase}} NO_2^-$$

2. ไนไตรท์รีดักชัน (nitrite reduction) โดยการเปลี่ยนไนไตรท์ (NO_2^-) ให้เป็นแก๊สไนตริกออกไซด์ (NO)

$$NO_2^- \xrightarrow{\text{nitrite reductase}} NO$$

3. ไนตริกรีดักชัน (nitric reduction) โดยการเปลี่ยนแก๊สไนตริกออกไซด์ (NO) ให้เป็นแก๊สไนตรัสออกไซด์ (N_2O)

$$NO \xrightarrow{\text{nitric oxide reductase}} N_2O$$

4. ไนตรัสรีดักชัน (nitrous reduction) โดยการเปลี่ยนแก๊สไนตรัสออกไซด์ (N_2O) ให้เป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระ (N_2)

$$N_2O \xrightarrow{\text{nitrous oxide reductase}} N_2$$

กระบวนการแอนแอโรบิคแอมโมเนียออกซิเดชันหรืออะนาม๊อค (anaerobic ammonia oxidation หรือ ANAMMOX)

เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนแอมโมเนียและไนไตรท์ให้เป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน โดยใช้ไนไตรท์เป็นตัวรับอิเลคตรอน จะเกิดขึ้นโดยแบคทีเรียกลุ่ม Planctomycetales โดยสามารถพบได้ทั้งน้ำจืด น้ำเค็มและตะกอนดินในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยกระบวนการอะนาม๊อคจะมีความคล้ายคลึงกับกระบวนการดีไนตริฟิเคชันที่ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระกลับสู่ชั้นบรรยากาศ ซึ่งกระบวนการดีไนตริฟิเคชันจะเกิดแก๊สไนโตรเจนได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กระบวนการอะนาม๊อคจะสามารถเกิดแก๊สไนโตรเจนได้เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากในกระบวนการจะต้องใช้แอมโมเนีย 1 โมล และไนไตรท์ 1 โมล จึงจะสามารถเกิดกระบวนการอะนาม๊อคเปลี่ยนไปกลายเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระได้ รวมไปถึงแบคทีเรียกลุ่ม Planctomycetales มีการเจริญเติบโตช้า โดยจะใช้ระยะเวลาประมาณ 9-10 วัน (Dalsgaard *et al*., 2005)

$$NH_4^+ + NO_2^- \longrightarrow N_2 + 2H_2O \qquad (1.3)$$

1.2.5 การคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน

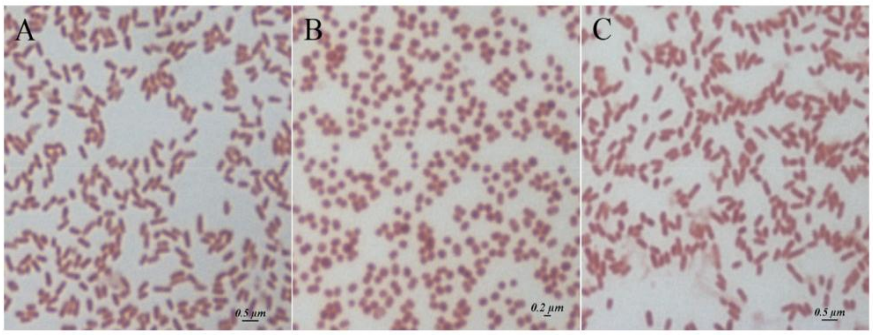
Yang *et al.* (2011) ศึกษาการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นไนตริไฟอิงแบคทีเรียและดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียในการย่อยสลายไนโตรเจนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 จากการศึกษาโดยการแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด enrichment ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.7 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม, $CaCl_2.2H_2O$ 0.5 กรัม และ 1 มิลลิลิตร สารละลาย trace mineral ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ซึ่งสารละลาย Trace mineral ประกอบด้วย (ต่อลิตร): H_3BO_3 2.86 กรัม, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.22 กรัม, $CuSO_4.5H_2O$ 0.08 กรัม, $MnSO_4.4H_2O$ 2.03 กรัมและ $Na_2MoO_4.2H_2O$ 1.26 กรัม พีเอช 7.0) หลังจากการย้อมสีแกรมพบว่าแบคทีเรีย A1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง และสามารถที่จะสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ หลังจากที่ทำการทดสอบทางชีวเคมี catalase reaction, gelatin liquefaction, starch hydrolysis, casein hydrolysis, sugar fermentation และ Voges-Proskauer tests พบว่าผลการทดสอบเป็นบวก ในขณะที่การทดสอบ oxidase reaction และ indole test ให้ผลเป็นลบ ทำให้ทราบว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* จึงได้นำไปศึกษาชนิดโดยการใช้ 16S rDNA โดยเทคนิค PCR ด้วย primers 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 5'-TACCTTGTTACGACTT-3' พบว่าเฮเทอโรโทรฟิตแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 เป็นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในขณะที่ Lu *et al*. (2012) ได้ศึกษาการแยกและบทบาทของเฮเทอโรโทรฟิค

แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ W1 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ Enrichment medium (beef extract-peptone medium), Basic medium ($(NH_4)_2SO_4$ 2.0 กรัม, K_2HPO_4 0.75 กรัม, NaH_2PO_4 0.25 กรัม, $MgSO_4$ 0.03 กรัม, $MnSO_4$ 0.01 กรัม, sodium citrate 5.0 กรัม, น้ำ 1000 มิลลิลิตร, พีเอช 7.2) และ Improved medium ($(NH_4)_2SO_4$ 2.0 กรัม, K_2HPO_4 0.75 กรัม, NaH_2PO_4 0.25 กรัม, $MgSO_4$ 0.03 กรัม, $MnSO_4$ 0.01 กรัม, sodium citrate 17.8054 กรัม, น้ำ 1000 มิลลิลิตร, พีเอช 7.0) พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ W1 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น ไม่มีการสร้างเอ็นโดสปอร์ ลักษณะของโคโลนีมีลักษณะกลม สีเหลืองขุ่นบนอาหารแข็ง ภายหลังจากการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA พบว่าเป็นเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียชนิด *Alcaligenes* sp.

Zheng *et al*. (2012) ได้ทำการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจากแผ่นกรองของระบบกรองน้ำเสียจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม โดยใช้อาหาร LB medium (กรัมต่อลิตร): Yeast extract 5.0, Peptone 10.0 และ NaCl 10.0 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ F6 มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง รูปร่างกลม และมีสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่มีเอ็นโดสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ รูปร่างแท่ง มีขนาด 0.2–0.3 x 2–3 ไมโครเมตร เมื่อศึกษายีน 16S rRNA พบว่าเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ F6 เป็นแบคทีเรีย *Marinobacter* sp.

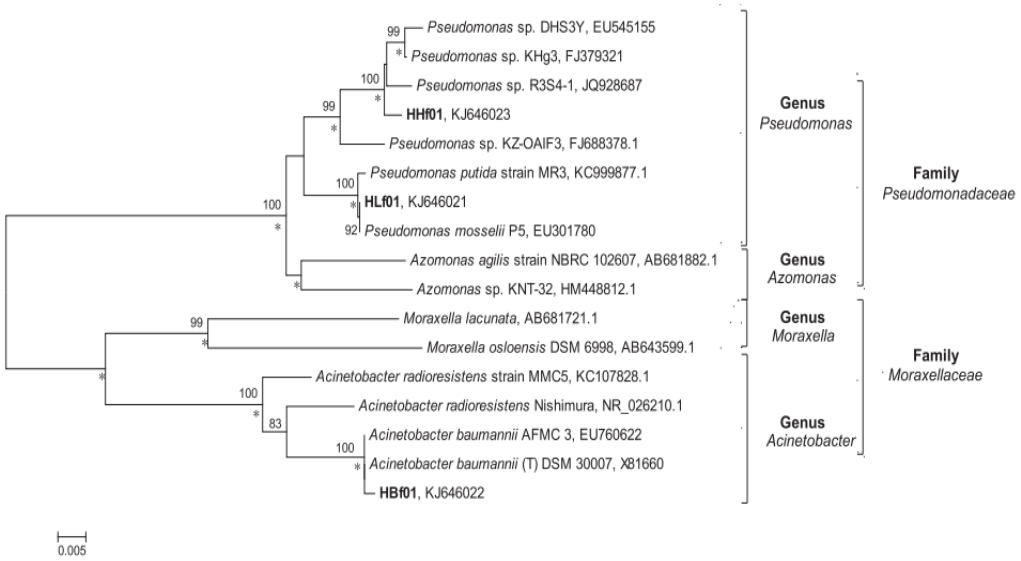
Fan *et al*. (2014) ได้ศึกษาสายพันธุ์ของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นไนตริไฟอิงแบคทีเรียในบ่อเพาะเลี้ยงปลาทับทิม โดยนำตัวอย่างน้ำจากบ่อเพาะเลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร 100 มิลลิลิตร ของอาหาร enrichment medium ($(NH_4)_2SO_4$ 0.50 กรัม, sodium succinate 2.17 กรัม, Vickers salt solution 50 มิลลิลิตร และ H_2O 1,000 มิลลิลิตร ซึ่ง Vickers salt solution ประกอบไปด้วย $K_2HPO_4.3H_2O$ 6.50 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 2.50 กรัม, NaCl 2.50 กรัม, $FeSO_4.H_2O$ 0.05 กรัม, $MnSO_4.H_2O$ 0.04 กรัม และ H_2O 1,000 มิลลิลิตร) โดยทำการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางและ spread plate ลงในอาหาร heterotrophic nitrification medium agar ($(NH_4)_2SO_4$ 0.24 กรัม, sodium succinate 2.17 กรัม, Vickers salt solution 50 มิลลิลิตร, H_2O 1,000 มิลลิลิตร และagar 2 เปอร์เซ็นต์) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียเจริญบนอาหาร heterotrophic nitrification medium agar จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ HLf01, HBf01 และ HHf01 หลังจากนั้นนำเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ HLf01 มีโคโลนีสีฟ้าอ่อน ลักษณะกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างแท่ง ขนาด 0.2-0.5 µm แบคทีเรียสายพันธุ์ HBf01 มีโคโลนีสีขาว ลักษณะกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 mm ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างแท่ง ขนาด 0.1-0.5 µm และแบคทีเรียสายพันธุ์ HHf01 มีโคโลนีสีเหลืองอ่อน ลักษณะกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างกลม ขนาด 0.15-0.2 µm (ภาพที่

3) และเมื่อนำมาศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rDNA ด้วย primers 7F:5'-CAGAGTTTGA TCCTGGCT-3' และ 1540R:5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' และวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ พบว่า เฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ HLf01 และ HHf01 เป็นแบคทีเรียชนิด *Pseudomanas* spp. เฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ HBf01 เป็นแบคทีเรียชนิด *Acinetobacter baumannii* (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3: ลักษณะสัณฐานวิทยาของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ HLf01 (A), HBf01 (B) และ HHf01 (C)

ที่มา: Fan *et al*. (2014)

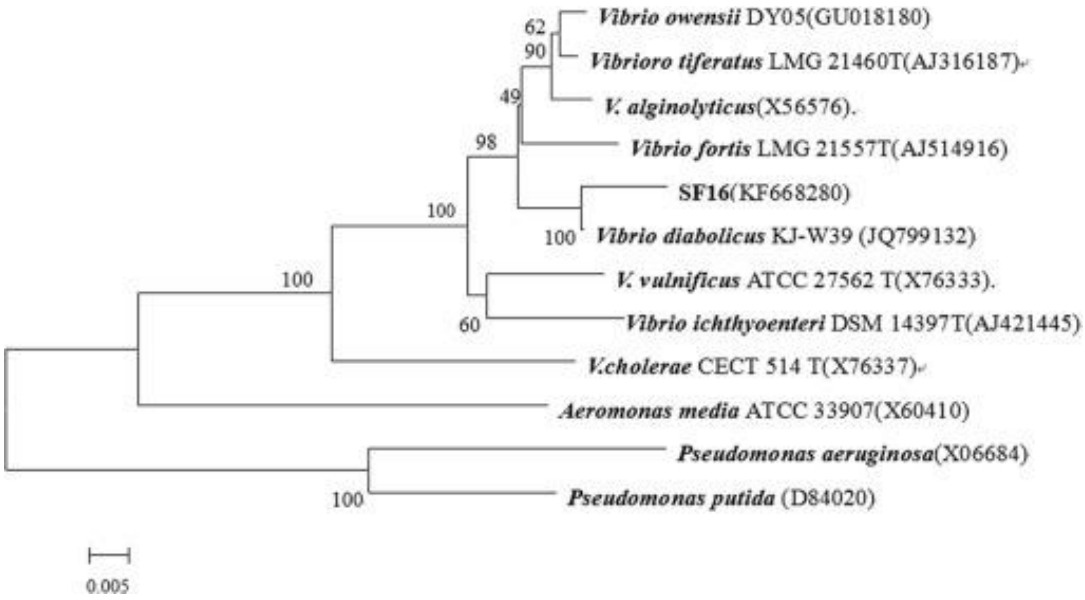


ภาพที่ 4: แผนภูมิวิวัฒนาการของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ HLf01, HBf01 และ HHf01 ที่ได้จากบ่อเพาะเลี้ยงปลาทับทิม

ที่มา: Fan *et al*. (2014)

Duan *et al.* (2015) ได้ศึกษาการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถทนความเค็ม จากอ่าว Jimei ประเทศจีน (มีความเค็ม 30 พีพีที) โดยแยกในอาหาร basic screening medium (BSM): $NaNO_2$ 0.5 กรัม, CH_3COONa 3.9 กรัม, K_2HPO_4 7.9 กรัม, KH_2PO_4 1.5 กรัม,

$MgSO_4$ 0.1 กรัม, NaCl 30 กรัม, agar 20 กรัม และ trace element solution 2 มิลลิลิตร (กรัม/ลิตร) ประกอบไปด้วย Na_2EDTA 63.70 กรัม, $CaCl_2$ 5.50 กรัม, $ZnSO_4$ 3.90 กรัม, $MnCl_2$ 5.06 กรัม, $FeSO_4$ 5.00 กรัม, Na_2MoO_4 1.00 กรัม, $CuSO_4$ 1.01 กรัม, $CoCl_2$ 1.61 กรัม พบว่ามีเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ถึง 19 สายพันธุ์ รวมถึงเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ SF 16 จึงได้นำมาศึกษา 16S rRNA โดยใช้ primer 27F และ 1492R พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Vibrio diabolicus* (ภาพที่ 5) ลักษณะโคโลนีสีขาว รูปร่างกลม และมีสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น มีขนาด 0.6–0.7 x 1.1–1.2 µm



ภาพที่ 5: แผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรียสายพันธุ์ SF16 จากอ่าว Jimei ประเทศจีน
ที่มา: Duan *et al.* (2015)

1.2.6 ประสิทธิภาพการในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย

Yang *et al.* (2011) ได้นำเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ A1 มาศึกษาความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยมีแอมโมเนียเริ่มต้นที่ 104.12 ± 1.27 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus subtilis* A1 สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 20.4 ± 2.7 เปอร์เซ็นต์ พบการเกิดไนไตรท์ 0.003 ± 0.001 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไนเตรท 3.100 ± 0.085 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร นอกจากนี้ได้ศึกษาความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ ความเข้มข้นต่ำ มีแอมโมเนียเริ่มต้น 105.58 ± 11.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ระดับกลาง 257.23 ±

1.97 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และระดับสูงโดยมีแอมโมเนียเริ่มต้น 2 ความเข้มข้น คือ 536.21 ± 3.15 และ 1014.17 ± 39.32 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* A1 สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 36.3 ± 3.0, 19.5 ± 1.6, 6.5 ± 0.3 และ 2.3 ± 2.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Lu *et al*. (2012) ได้ทดสอบความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียของแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. W1 โดยมีแอมโมเนียเริ่มต้น 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 2000 และ 3000 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าที่ระดับแอมโมเนีย 200 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร สามารถลดแอมโมเนียได้ 92.34 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดไนโตรเจนรวม (Total Nitrogen) ได้ 81.41 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย *Alcligenes* sp. W1 สามารถลดแอมโมเนียได้ดีที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำกว่า 1200 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร หากระดับแอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ในช่วง 1200-2000 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. W1 จะสามารถเติบโตได้แต่ความสามารถในการลดแอมโมเนียต่ำลง

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้กลุ่มเชื้อหรือการใช้เชื้อผสมทั้งเชื้อกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิคและไนตริไฟอิงแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสีย โดยในการศึกษาของ Dhanasiri *et al*. (2011) ได้ทำการศึกษาการผสมเชื้อแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงปลาสิงโต โดยชุดการทดลอง Nbc1 เป็นการผสมระหว่าง *Nitrosomonas marina* ผสมรวมกับ *Nitrobacter winogradskyi* และ *Nitrobacter alcalicus* และชุดการทดลอง Nbc 2 เป็นการผสมกันระหว่าง *Nitrosomonas eutropha* และ *Nitrobacter winogradskyi* จากการทดลองพบว่าชุดการทดลอง Nbc1 สามารถลดปริมาณของแอมโมเนียรวม (total ammonia) ได้ดีที่สุด รวมถึงพบปริมาณของไนเตรทภายใน 72 ชั่วโมง

Suantika *et al*. (2013) ได้ใช้เฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย *Halomonas aquamarina* และ *Shewanella algae* ในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว จากการทดลองการใช้เชื้อผสมในการบำบัดน้ำเป็นเวลา 12 วัน พบปริมาณไนไตรท์อยู่ในช่วง 0.02-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณของไนเตรท 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าอัตราการรอดตายของลูกกุ้งขาวสูงถึง 93.94 เปอร์เซ็นต์

1.3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ

2.1.1 วัสดุสำหรับการแยกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย

- ตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จากภัทรวุฒิฟาร์ม ตำบลแหลมโพธิ์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 6 ตัวอย่าง
- ตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จากบริษัทศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด อำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 42 ตัวอย่าง

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำ

- เครื่องวัดคุณภาพน้ำแบบหัวรวม Horiba รุ่น U-52G
- กระบอกเก็บน้ำ
- ขวดพลาสติกขุ่นขนาด 1 ลิตร
- ถุงพลาสติกแบบมีซิปล๊อค
- ลังโฟม
- ท่อพีวีซี (core) สำหรับเก็บตัวอย่างดิน

2.2.2 อุปกรณ์สำหรับการใช้งานทางด้านจุลชีววิทยา

- หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
- จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
- แท่งแก้ว (spreader)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

- กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ (compound microscope)
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- Micropipette ขนาด 2, 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- ทิปขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- Microcentrifuge tube ขนาด 1,500 ไมโครลิตร
- หลอดพีซีอาร์ (PCR Tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร
- ชุดทดสอบทางชีวเคมี API 20E
- ชุดสกัด DNA (mini kit DNA)
- ชุด GenepHlow™ Gel/PCR Kit

2.2.2 อุปกรณ์สำหรับการใช้การศึกษาพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำ

- ขวดปรับปริมาตรขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250, 600 และ 1,000 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองแบบฝาเกลียว
- คอลัมน์พร้อมแคดเมียม
- ปิเปตขนาด 1, 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเก็บตัวอย่างและคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง

การเก็บตัวอย่าง

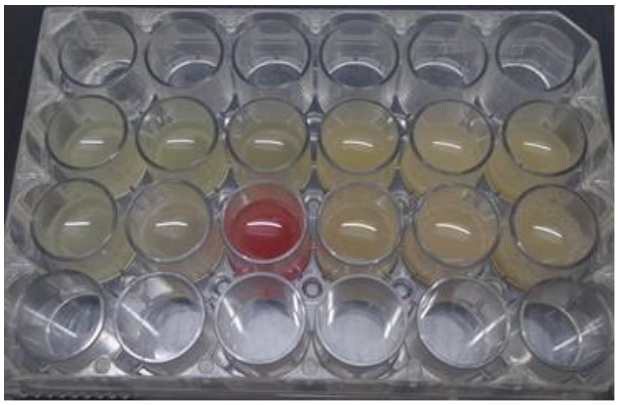
ทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ของภัทรวุฒิฟาร์ม ต.แหลมโพธิ์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา โดยเก็บตัวอย่างน้ำจำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินจำนวน 3 ตัวอย่าง และฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งของบริษัท ศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี จำนวน 7 ฟาร์ม ฟาร์มละ 3 จุด ทำการเก็บตัวอย่างน้ำโดยใช้กระบอกเก็บน้ำ และเก็บตัวอย่างดินโดยใช้ท่อพีวีซีสำหรับเก็บตัวอย่างดิน (core) โดยเก็บเนื้อดินที่ความลึก 0-5 cm จากผิวดิน รวมตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 48 ตัวอย่าง (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6: ตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งของ บริษัท ศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี; ก: ตัวอย่างดิน, ข: ตัวอย่างน้ำ

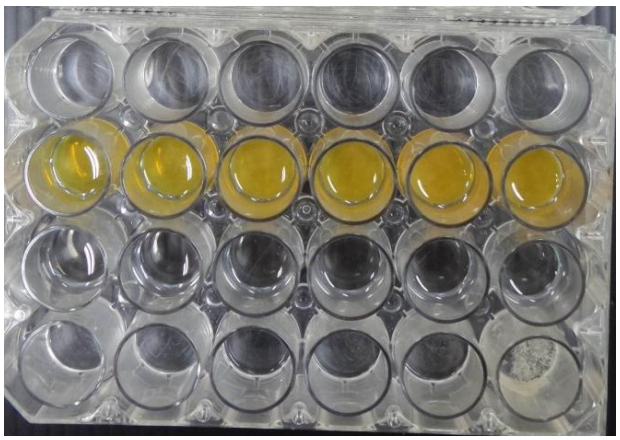
การคัดแยกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย

- การเพิ่มปริมาณเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในอาหารเหลว

ตัวอย่างดินน้ำหนัก 1 กรัม หรือตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเขย่าในอาหารเหลว modified Pep-Beef-AOM 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย โดยเขย่าที่อุณหภูมิห้อง และที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 28 วัน นำอาหารเหลวมาทำการทดสอบการออกซิไดซ์แอมโมเนียและการออกซิไดซ์ไนไตรท์ โดยวิธี Griess-Ilosvay method โดยการหยด nitrite reagent จำนวน 5-7 หยดลงในตัวอย่าง หากตัวอย่างให้ผลเป็นสีแดงภายใน 1 นาที แสดงว่าผลเป็นบวก (ภาพที่ 7) แปลความได้ว่ามีกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียและไนไตรท์ จึงนำไปทำการเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง modified Pep-Beef-AOM ส่วนในตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบ (ไม่ให้ผลสีแดง) (ภาพที่ 8) ทำการเลี้ยงเชื้อต่อ โดยทำการทดสอบด้วย nitrite reagent ทุกๆ 3 วัน



ภาพที่ 7: ผลการทดสอบด้วย Nitrite reagent และแสดงผลเป็นบวก (มีการเปลี่ยนเป็นสีแดง)



ภาพที่ 8: ผลการทดสอบด้วย Nitrite reagent และแสดงผลเป็นลบ (ไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีแดง)

- การแยกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปิเปตอาหารเหลวที่ให้ผลทดสอบเป็นบวก 0.1 มิลลิลิตร มาทำการ Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง modified Pep-Beef-AOM (2% agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการ streak plate หลายๆ ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (Yang *et al.*, 2011; Lu *et al.* 2012)

- การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ลงบนอาหารแข็ง modified Pep-Beef-AOM และนำไปบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเชื้อที่ได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยศึกษาลักษณะรูปร่างและสีของโคโลนี การติดสีแกรมและขนาดของแบคทีเรีย ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยการศึกษา Catalase test, Oxidase test และการทดสอบด้วยชุด API 20E (ดวงพร, 2537)

2.3.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกได้

- การเตรียมหัวเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากการคัดแยกและผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จำนวน 1 loop ลงในอาหารเหลว modified Pep-Beef-AOM 10 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

- ทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยศึกษาจากพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำ

ปิเปตหัวเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรที่มีปริมาณเชื้อ 10^9 CFU/มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหาร modified Pep-Beef-AOM 150 มิลลิลิตร โดยเพิ่ม $(NH_4)_2SO_4$ เป็น 4.0 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน และทำการทดสอบคุณภาพน้ำดังตารางที่ 3 (Yang *et al.*, 2011; Lu *et al.* 2012)

ตารางที่ 3 วิธีการศึกษาพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำ

Parameter	Method	Reference
Ammonia (mg-N/L)	Phenol – hypochlorite method	Strickland and Parson (1972)
Nitrite (mg-N/L)	Colorimetric method	Strickland and Parson (1972)
Nitrate (mg-N/L)	Cadmium reduction method	Strickland and Parson (1972)

2.3.3 ศึกษาชนิดของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วย Genomic DNA minikit (Geneaid) และทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rRNA และใช้ primers 27F (5'-AGAGTTTGATCAT GGCTCAG-3') และ 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็น เอ และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ GF-1 AmbiClean Kit (PCR/Gel) (Vivantis) (ภาคผนวก) และจากนั้น วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการส่งวิเคราะห์ที่สถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลี โอไทด์โดย BLAST program ในฐานข้อมูลของ GenBank/EMBL/DDBJ database (Altschul *et al*., 1990) และศึกษาลำดับวิวัฒนาการโดยการวิเคราะห์ แผนภูมิวิวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม MEGA 6 (Tamura *et al*., 2011) ถ้าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 93-98 เปอร์เซ็นต์ เป็นไปได้ว่า แบคทีเรียสายพันธุ์นั้นอาจเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ (new species) หากค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง มีค่าต่ำกว่า 92% จะมีความเป็นไปได้สูงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นั้นอาจจะเป็นแบคทีเรียสกุลใหม่ (novel genus) (Stackebrandt and Goebel, 1994)

2.3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อ

จากการทดสอบศักยภาพเบื้องต้นในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเฮเทอ โรโทรฟิคแบคทีเรียที่แยกได้ โดยเลือกเชื้อไอโซเลทที่มีศักยภาพดีที่สุดจำนวน 3 ไอโซเลท มาศึกษา สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน

- ศึกษาความสามารถในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

ทำการเลี้ยงเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในอาหารเหลว modified Pep-Beef-AOM โดยการปรับปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ เป็น 4 กรัมต่อลิตร และเติมเชื้อเดี่ยว 10^9 CFU/มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว และเชื้อผสมในอัตราส่วนรวม 1 เปอร์เซ็นต์ ของอาหาร เหลว แล้วทดสอบหาเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ ดีที่สุด เพื่อนำไปศึกษาสัดส่วนผสมระหว่างเชื้อผสมที่ดีที่สุด

- ศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของเชื้อผสม

เมื่อได้เฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ดี ที่สุดแล้ว นำมาศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างเชื้อ โดยปรับสัดส่วนเป็น 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 และ 70:30 โดยทำการเลี้ยงเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในอาหารเหลว modifed Pep-

Beef-AOM ซึ่งมีการปรับปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ เป็น 4 กรัมต่อลิตร แล้วทดสอบหาสัดส่วนเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ดีที่สุด

2.3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

- การเตรียมน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ทำการบ่มน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยบ่มน้ำเสียด้วยอาหารกุ้งในอัตราส่วน 1% (w/v) เป็นเวลา 3 วันพร้อมทั้งให้อากาศตลอดระยะเวลาการบ่ม (ภาพที่ 9)

ภาพที่ 9: การบ่มน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารกุ้ง

- การทำกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากการคัดแยกและผ่านการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมงจำนวน 1 loop ลงในอาหารเหลว Pep-Beef-AOM 10 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการขยายหัวเชื้อเป็น 500 มิลลิลิตร (ภาพที่ 10)

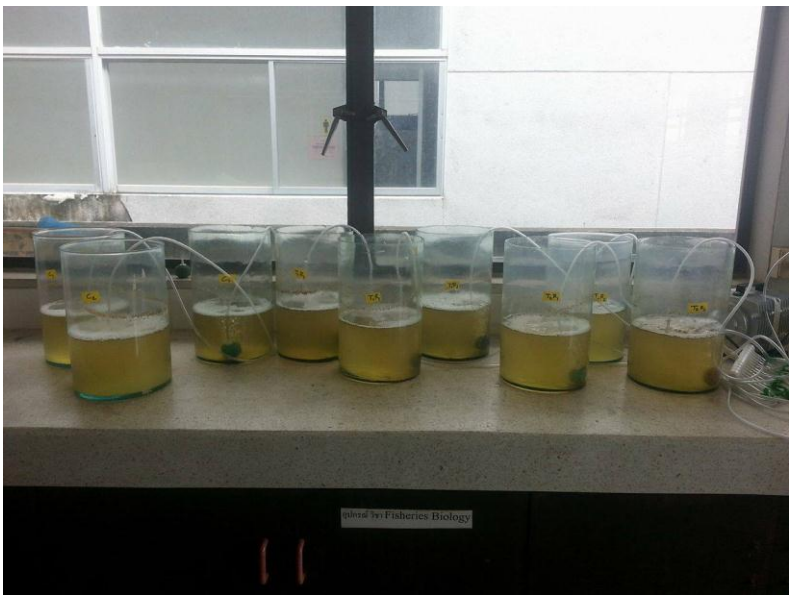
ภาพที่ 10: การทำกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสำหรับการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

- การทดสอบประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ทำการฆ่าเชื้อน้ำเสียที่ผ่านการบ่ม อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตลอดการทดลองได้ทำการให้อากาศตลอดเวลาและทดลองเป็นระยะเวลา 14 วัน (ภาพที่ 11) โดยเติมหัวเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในวันที่ 0, 7 และวันที่ 14 ของการทดลอง ในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และทำการศึกษาประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการบำบัดน้ำโดยวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์คุณภาพน้ำต่างๆ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 วิธีการศึกษาปัจจัยทางเคมีของน้ำในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

Parameter	Method	Reference
Ammonia (mg-N/L)	Phenol – hypochlorite method	Strickland and Parson (1972)
Nitrite (mg-N/L)	Colorimetric method	Strickland and Parson (1972)
Nitrate (mg-N/L)	Cadmium reduction method	Strickland and Parson (1972)
pH	pH meter	-
Dissolved oxygen (mg/L)	DO meter	-
Temperature (^{o}C)	Thermometer	-



ภาพที่ 11: การทดสอบประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2.3.6 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าพารามิเตอร์ทางเคมีของน้ำทั้ง แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท ความเป็นกรด – ด่าง ออกซิเจนละลายน้ำ อุณหภูมิ และความเค็ม โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ (R program)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การคัดแยกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย

จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดิน ทั้งหมดจำนวน 48 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Griess-Ilosvay method พบว่ามี 27 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกด้วย nitrite reagent โดยมี 3 ตัวอย่างที่สามารถเริ่มแสดงผลเป็นบวก เมื่อผ่านการทดลองไปแล้ว 9 วัน คือ SRS 1.2, SRS 1.3 และ SRW 2.3 มี 9 ตัวอย่างที่สามารถ แสดงผลการทดสอบเป็นบวกเมื่อผ่านการทดลองไป 12 วัน คือ SRW 4.1, SRW 4.2, SRW 4.3, SRS 6.1, SRS 6.2, SRS 6.3, SRS 7.1, SRS 7.2 และ SRS 7.3 มี 10 ตัวอย่างที่แสดงผลเป็นบวก เมื่อผ่าน การทดลอง 15 วัน คือ SKW1, SKW2, SKW3, SKS1, SKS2, SKS3, SRS2.2, SRS4.2, SRW5.3, SRW7.1 และ SRW7.2 และมีเพียง 1 ตัวอย่างที่แสดงผลเป็นบวกเมื่อผ่านการทดลอง 18 วัน คือ SRW6.1 และมีตัวอย่างจำนวน 21 ตัวอย่างที่มีผลการทดสอบของ nitrite reagent เป็นลบ (ไม่มีการ เปลี่ยนเป็นสีแดง) เมื่อคัดแยกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียบนอาหารแข็ง modified Pep-Beef-AOM พบว่าสามารถคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียได้ จำนวน 141 ไอโซเลท (ตารางที่ 5) โดย สามารถแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจากตัวอย่างที่เก็บจาก บ.ศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด จ.สุราษฎร์ ธานี จำนวน 140 ไอโซเลท ในจำนวนนี้แยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียได้จากตัวอย่างดินจำนวน 85 ไอโซเลท และจากตัวอย่างน้ำจำนวน 55 ไอโซเลท และตัวอย่างจากภัทรวุฒิ ฟาร์ม จ.สงขลา จำนวน 1 ไอโซเลท ซึ่งสามารถแยกได้จากตัวอย่างดิน

ตารางที่ 5 จำนวนไอโซเลทของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำจาก บ.ศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด และ ภัทรวุฒิฟาร์ม

Sample	Isolate	Sample	Isolate
SRS 1.2	27	SRW 6.3	3
SRS 1.3	22	SRS 6.1	6
SRW2.2	14	SRS 6.2	3
SRW2.3	9	SRS 6.3	1
SRS 2.2	9	SRW 7.1	4
SRW 4.1	2	SRW 7.2	3
SRW 4.3	2	SRW 7.3	4
SRS 4.2	10	SRS 7.1	9
SRW 5.3	7	SRS 7.2	2
SRW 6.1	6	SRS 7.3	6
SRW 6.2	1	SKS2	1

หมายเหตุ SRS ตัวอย่างดินจาก บ.ศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด
SRW ตัวอย่างน้ำจาก บ.ศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด
SKS ตัวอย่างดินจากภัทรวุฒิฟาร์ม

3.2 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน

จากตารางที่ 6 พบว่ามีเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 20 ไอโซเลท และมีจำนวน 2 ไอโซเลทที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ คือ SRNB23 และ SRNB35 ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 91.75 เปอร์เซ็นต์ และ 91.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้มีจำนวน 9 ไอโซเลทที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 80-90 เปอร์เซ็นต์ คือ SRNB1, SRNB8, SRNB9, SRNB19, SRNB28, SRNB29, SRNB42, SRNB93 และ SRNB95 ที่สามารถลดแอมโมเนียได้ 83.08, 88.78, 87.81, 85.76, 88.34, 80.97, 88.32, 84.03 และ 81.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีจำนวน 7 ไอโซเลทที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 70-80 เปอร์เซ็นต์ คือ SRNB10, SRNB11, SRNB21, SRNB30, SRNB83, SRNB84 และ SRNB106 ที่สามารถลดแอมโมเนียได้ 74.69, 77.10, 78.72, 78.97, 78.10, 74.84 และ 78.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีจำนวน 2 ไอโซเลทที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้มากกว่า 60-70 เปอร์เซ็นต์ คือ SRNB17 และ SRNB90 ที่สามารถลดแอมโมเนียได้ 69.66 และ 68.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่ให้ผลบวกของไนเตรท คือ SKNB4, SRNB78 และ SRNB79 ที่มีค่าไนเตรท 0.01±0.00, 0.03±0.00 และ 0.05±0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถลดแอมโมเนียได้ 20.32, 55.57 และ 51.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเลือกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลทมาทำการศึกษาต่อ คือ สายพันธุ์ SRNB23, SRNB35, SRNB78 และ SRNB79 ซึ่งเป็นตัวแทนจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก บ.ศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด และสายพันธุ์ SKNB4 ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากภัทรวุฒิฟาร์ม

3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไนตริไฟอิงและการจัดจำแนกชนิดของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

จากการนำเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้จำนวน 5 ไอโซเลท คือ SRNB23, SRNB35, SRNB78, SRNB79 และ SKNB4 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าลักษณะของโคโลนีที่ผ่านการบ่มที่ 24-48 ชั่วโมงพบว่าเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB23, SRNB35, SRNB78 และ SKNB4 มีลักษณะกลม สีครีม, สีส้ม, สีขาว และสีครีม ตามลำดับ เมื่อทำการย้อมแกรมพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง ในขณะที่เฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB79 มีลักษณะโคโลนีสีขาว เมื่อทำการย้อมแกรม พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง มีโครงสร้างของเอ็นโดสปอร์ เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า การทดสอบ catalase ให้ผลเป็นบวกทุกสายพันธุ์ของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ และเมื่อทำการทดสอบ oxidase พบว่าเฮเทอโร

โทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ SKNB4 ให้ผลเป็นบวกเพียงสายพันธุ์เดียว ในขณะที่เฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียอีก 4 สายพันธุ์แสดงผลเป็นลบ (ตารางที่ 7) และศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rRNA (ตารางที่ 8) พบว่า แบคทีเรีย SRNB23, SRNB35 และ SRNB78 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Alcaligenes* โดยมีค่าความคล้ายคลึง (similarity) กับแบคทีเรีย *A. faecalis* ที่ระดับ 98, 91 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ SRNB79 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *Oceanobacillus profundus* ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ และ SKNB4 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *Halomonas aquamarina* ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12) ทั้งนี้เฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้ทำการ submitted นิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ไปที่ฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ) และเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ SKNB4 ได้ทำการฝากเก็บ (deposited) ที่ Thailand Bioresource Research Center (TBRC) และ Biological Resource Center, NITE (NBRC) ซึ่งทั้งหมดมีรหัส (accession numbers) ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจากการคัดแยกที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ [1]

Isolate	Ammonia				Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Removal (mg-N/L)	Removal (%)		
SKNB4	815.88±0.00^{bc}	625.63±1.66^{a}	190.25±1.66^{k}	23.32±0.20^{j}	0.011±0.00^{k}	0.01±0.00^{c}
SRNB1	871.70±8.25^{a}	147.51±2.22^{efgh}	724.19±10.46^{bcde}	83.08±0.41^{cdef}	0.08±0.01^{i}	0.00±0.00^{d}
SRNB8	871.70±8.25^{a}	97.84±4.13^{hi}	773.86±7.15^{ab}	88.78±0.43^{abc}	0.14±0.00^{g}	0.00±0.00^{d}
SRNB9	871.70±8.25^{a}	106.24±16.68^{hi}	765.46±2.02^{abc}	87.81±1.95^{abcd}	0.14±0.02^{gh}	0.00±0.00^{d}
SRNB10	833.40±14.64^{b}	210.68±16.98^{cde}	622.72±3.14^{ghi}	74.69±2.46^{gh}	0.01±0.00^{k}	0.00±0.00^{d}
SRNB11	833.40±14.64^{b}	190.67±13.53^{def}	642.73±2.13^{fgh}	77.10±1.92^{fg}	0.03±0.00^{k}	0.00±0.00^{d}
SRNB17	816.70±21.43^{bc}	247.58±4.13^{cd}	569.13±2.45^{i}	69.66±1.31^{h}	0.48±0.00^{a}	0.00±0.00^{d}
SRNB19	816.70±21.43^{bc}	116.13±5.46^{ghi}	700.58±2.87^{cdef}	85.76±1.06^{abcde}	0.11±0.00^{h}	0.00±0.00^{d}
SRNB21	816.70±21.43^{bc}	173.15±91.64^{efg}	643.55±1.13^{fgh}	78.72±1.36^{efg}	0.12±0.03^{gh}	0.00±0.00^{d}
SRNB23	816.70±21.43^{bc}	67.46±6.29^{i}	749.24±16.82^{abcd}	91.75±0.61^{a}	0.05±0.00^{j}	0.00±0.00^{d}
SRNB28	816.70±21.43^{bc}	94.88±20.38^{cde}	721.82±4.742^{bcde}	88.34±2.81^{abcd}	0.26±0.03^{d}	0.00±0.00^{d}
SRNB29	816.70±21.43^{bc}	155.41±3.42^{efgh}	661.29±1.57^{efgh}	80.97±0.42^{defg}	0.32±0.03^{b}	0.00±0.00^{d}
SRNB30	816.70±21.43^{bc}	171.72±7.99^{efg}	644.98±1.59^{fgh}	78.97±0.83^{efg}	0.22±0.03^{e}	0.00±0.00^{d}
SRNB35	871.70±8.25^{a}	76.59±1.86^{i}	795.11±7.42^{a}	91.21±0.18^{ab}	0.20±0.01^{f}	0.00±0.00^{d}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

ตารางที่ 6 (ต่อ) ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจากการคัดแยกที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียมมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ [1]

Isolate	Ammonia				Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Removal (mg-N/L)	Removal (%)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
SRNB42	871.70±8.25^{a}	101.80±13.45^{hi}	769.90±14.01^{ab}	88.32±1.51^{abcd}	0.20±0.01^{f}	0.00±0.00^{d}
SRNB78	799.56±6.37^{c}	354.94±12.35^{b}	444.62±3.57^{j}	55.57±2.48^{i}	0.03±0.00^{jk}	0.03±0.00^{b}
SRNB79	799.56±6.37^{c}	388.87±34.99^{b}	410.69±7.28^{j}	51.37±4.03^{i}	0.01±0.00^{k}	0.05±0.00^{a}
SRNB83	816.70±21.43^{bc}	179.45±53.45^{ef}	637.26±2.13^{fgh}	78.10±6.19^{fg}	0.03±0.00^{k}	0.00±0.00^{d}
SRNB84	816.70±21.43^{bc}	206.11±81.22^{cde}	610.60±2.93^{hi}	74.84±9.59^{gh}	0.25±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}
SRNB90	819.96±10.18^{bc}	257.71±42.40^{c}	562.25±3.13^{i}	68.60±4.87^{h}	0.29±0.00^{c}	0.00±0.00^{d}
SRNB93	871.70±8.25^{a}	139.11±47.49^{fgh}	732.59±1.36^{abcd}	84.03±5.48^{bcdef}	0.18±0.01^{f}	0.00±0.00^{d}
SRNB95	871.70±8.25^{a}	157.88±7.07^{efgh}	713.82±8.15^{bcde}	81.89±0.74^{cdefg}	0.17±0.01^{f}	0.00±0.00^{d}
SRNB106	871.70±8.25^{a}	185.80±4.08^{ef}	685.90±7.99^{defg}	78.68±0.44^{efg}	0.05±0.01^{j}	0.00±0.00^{d}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกได้

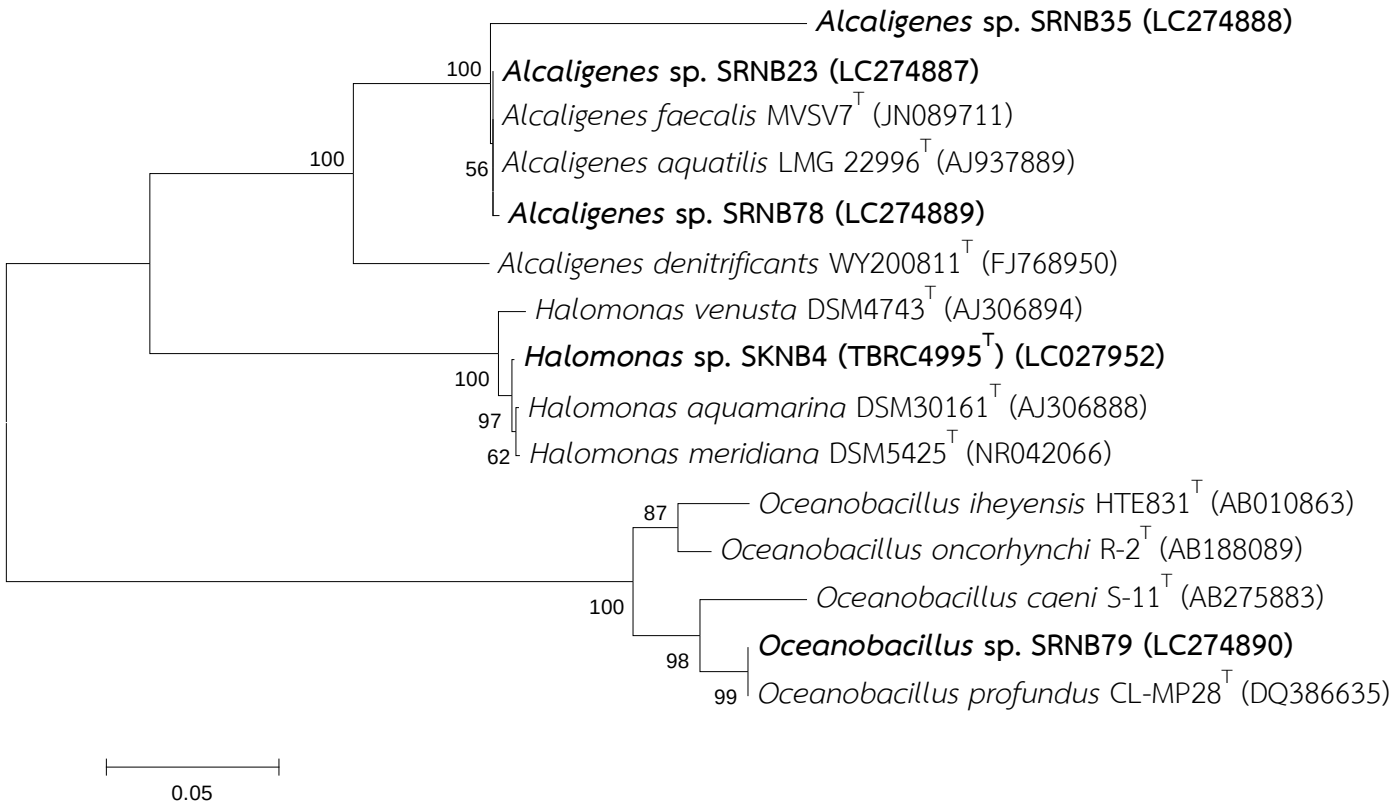
Characteristic	SRNB23	SRNB35	SRNB78	SRNB79	SKNB4
Isolation source	Sediment	Water	Sediment	Sediment	Water
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Pigmentation	Cream	Orange	White	White	Cream
Gram's stain	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative
Endospore forming	-	-	-	+	-
Oxidase	-	-	-	-	+
Catalase	+	+	+	+	+
β-galactosidase	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
Citrate utilisation	+	-	+	+	+
H_2S production	-	-	-	-	-
Urea hydrolysis	-	+	-	-	-
Tryptophan deamination	+	+	-	+	+
Indole production	-	-	-	-	-
Acetoin production	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	-	+	-	-	-
Glucose fermentation	+	-	+	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	+	-	-
Melibiose	-	-	+	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

Isolate	Identification Result	Sequence (bp)	Similarity (%)	Accession Number
SRNB23	*Alcaligenes faecalis* strain MVSV7	787	98%	JN089711
	Alcaligenes aquatilis strain LMG 22996	787	97%	KX345319
SRNB35	*Alcaligenes faecalis* strain MVSV7	817	91%	JN089711
	Alcaligenes aquatilis strain LonMTB_7	817	91%	KX254355
SRNB78	*Alcaligenes faecalis* strain Ni3-1	1,186	99%	KF542893
	Alcaligenes aquatilis strain LMG 22996	1,186	99%	NR104977
SRNB79	*Oceanobacillus profundus* strain CMS206	1,180	99%	FR750975
SKNB4	*Halomonas aquamarina* strain DSM 30161	1,284	99%	AJ306888
	Halomonas meridiana strain DSM5425	1,284	99%	AJ306891

ตารางที่ 9 รหัสนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (accession numbers) ในฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ) ของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่แยกได้

Isolate	Accession number	Deposit number
SKNB4	LC027952	TBRC 4995, BCC 77606, NBRC 111840
SRNB23	LC274887	-
SRNB35	LC274888	-
SRNB78	LC274889	-
SRNB79	LC274890	-



ภาพที่ 12: แผนภูมิวิวัฒนาการของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยศึกษาจากยีน 16S rRNA (Bar=0.05)

3.4 ความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

จากการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม (ตารางที่ 10) พบว่าเชื้อเดี่ยว SRNB23 และ SRNB35 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุด คือ 91.75 และ 91.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้สามารถตรวจพบไนไตรท์ได้เท่ากับ 0.09 และ 0.04 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่พบปริมาณไนเตรท ส่วนเชื้อผสมที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุด คือ SRB23+SRNB35 เท่ากับ 66.07 เปอร์เซ็นต์ พบไนไตรท์เท่ากับ 0.07 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไม่พบปริมาณของไนเตรทเช่นกัน จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อผสมระหว่าง SRNB23 และ SRNB35 ที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุดมาศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของเชื้อผสมในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อไป

3.5 สัดส่วนที่เหมาะสมของเชื้อผสมในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน

จากการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย SRNB23:SRNB35 ที่ 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 และ 70:30 (ตารางที่ 11) พบว่า สัดส่วนระหว่างแบคทีเรียไอโซเลท SRNB 23:SRNB35 ที่ 30:70 สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้สูงที่สุดเท่ากับ 66.77 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณไนไตรท์ 0.18 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และมีความสามารถในการเจริญเติบโตสูงที่สุดที่ค่า OD_{600} 0.67 รองลงมา คือ สัดส่วน 50:50, 40:60, 60:40 และ 70:30 ที่สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ 59.72, 53.72, 52.21 และ 47.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณไนไตรท์เท่ากับ 0.21, 0.25, 0.27 และ 0.23 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ และไม่สามารถตรวจพบปริมาณของไนเตรทได้ จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB23 และ SRNB35 ที่เป็นเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่สัดส่วน 30:70 และเชื้อ SKNB4 (จากภัทรวุฒิฟาร์ม) ไปศึกษาการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ตารางที่ 10 ความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม [1]

Isolate	Ammonia				Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Removal (mg-N/L)	Removal (%)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
SRNB23	813.37±7.94^{c}	67.46±4.45^{g}	749.24±12.92^{b}	91.75±0.38^{a}	0.09±0.00^{cd}	0.00±0.00^{c}
SRNB35	871.70±5.24^{b}	76.59±0.17^{g}	795.11±5.41^{a}	91.21±0.07^{a}	0.04±0.00^{dg}	0.00±0.00^{c}
SRNB78	799.56±3.77^{c}	354.94±7.95^{e}	444.62±25.86^{e}	55.57±1.96^{d}	0.13±0.00^{b}	0.03±0.00^{b}
SRNB79	799.56±3.77^{c}	388.87±1.07^{d}	410.69±0.16^{e}	51.37±1.14^{e}	0.04±0.00^{fg}	0.05±0.00^{a}
SRNB23+SRNB35	858.05±0.00^{b}	291.15±1.81^{f}	566.91±1.01^{c}	66.07±2.01^{b}	0.07±0.05^{de}	0.00±0.00^{c}
SRNB23+SRNB78	957.73±6.71^{a}	467.38±0.25^{c}	490.35±6.46^{d}	51.19±0.32^{e}	0.05±0.01^{ef}	0.00±0.00^{c}
SRNB23+SRNB79	957.73±6.71^{a}	402.29±0.10^{d}	555.44±6.81^{c}	57.99±0.30^{cd}	0.20±0.02^{a}	0.00±0.00^{c}
SRNB35+SRNB78	957.73±6.71^{a}	471.11±0.96^{c}	486.62±5.75^{d}	50.81±0.24^{e}	0.03±0.00^{fg}	0.00±0.00^{c}
SRNB35+SRNB79	957.73±6.71^{a}	545.66±2.33^{b}	412.07±9.04^{e}	43.02±0.64^{f}	0.01±0.00^{g}	0.00±0.00^{c}
SRNB78+SRNB79	858.05±0.00^{b}	341.84±2.59^{e}	516.21±20.59^{d}	60.16±2.40^{c}	0.11±0.00^{bc}	0.00±0.00^{c}
SRNB23+SRNB35+ SRNB78+SRNB79	957.73±6.71^{a}	618.78±1.72^{a}	338.95±8.43^{f}	35.39±0.63^{g}	0.04±00^{fg}	0.00±0.00^{c}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

ตารางที่ 11 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของสัดส่วนเชื้อผสมสายพันธุ์ SRNB23 และ SRNB35 [1]

Ratio	Ammonia				Nitrite	Nitrate	OD_{600}
SRNB23 : SRNB35	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Removal (mg-N/L)	Removal (%)	(mg-N/L)	(mg-N/L)	
30 : 70	785.78±11.50^{ns}	294.36±33.06^{b}	591.42±31.32^{a}	66.77±3.61^{a}	0.18±0.02^{c}	0.00±0.00^{ns}	0.67 ± 0.02^{a}
40 : 60	785.78±11.50^{ns}	409.88±8.51^{a}	475.90±12.31^{b}	53.72±0.99^{ab}	0.25±0.03^{ab}	0.00±0.00^{ns}	0.55 ± 0.04^{b}
50 : 50	785.78±11.50^{ns}	362.97±41.36^{ab}	522.81±38.49^{ab}	59.03±4.48^{b}	0.21±0.02^{bc}	0.00±0.00^{ns}	0.54 ± 0.04^{b}
60 : 40	785.78±11.50^{ns}	463.81±63.76^{a}	462.82±69.24^{b}	52.21±7.52^{b}	0.27±0.01^{a}	0.00±0.00^{ns}	0.64 ± 0.02^{a}
70 : 30	785.78±11.50^{ns}	463.81±93.96^{a}	421.97±88.90^{b}	47.68±10.24^{b}	0.23±0.02^{ab}	0.00±0.00^{ns}	0.45 ± 0.05^{c}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

[ns] คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยทำการทดลองเป็นระยะเวลา 14 วัน และมีการเติมหัวเชื้อเดี่ยวของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียไอโซเลท SRNB23, SRNB35, SKNB4 และ หัวเชื้อผสมระหว่าง SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) ทุกๆ 7 วัน ซึ่งเติมหัวเชื้อในวันเริ่มต้นการทดลอง (Day0) วันที่ 7 ของการทดลอง (Day7) และวันสิ้นสุดการทดลอง (Day14) โดยที่ในระหว่างการทดลองได้ทำการศึกษาคุณภาพน้ำบางประการ เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม พีเอช การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทเป็นต้น

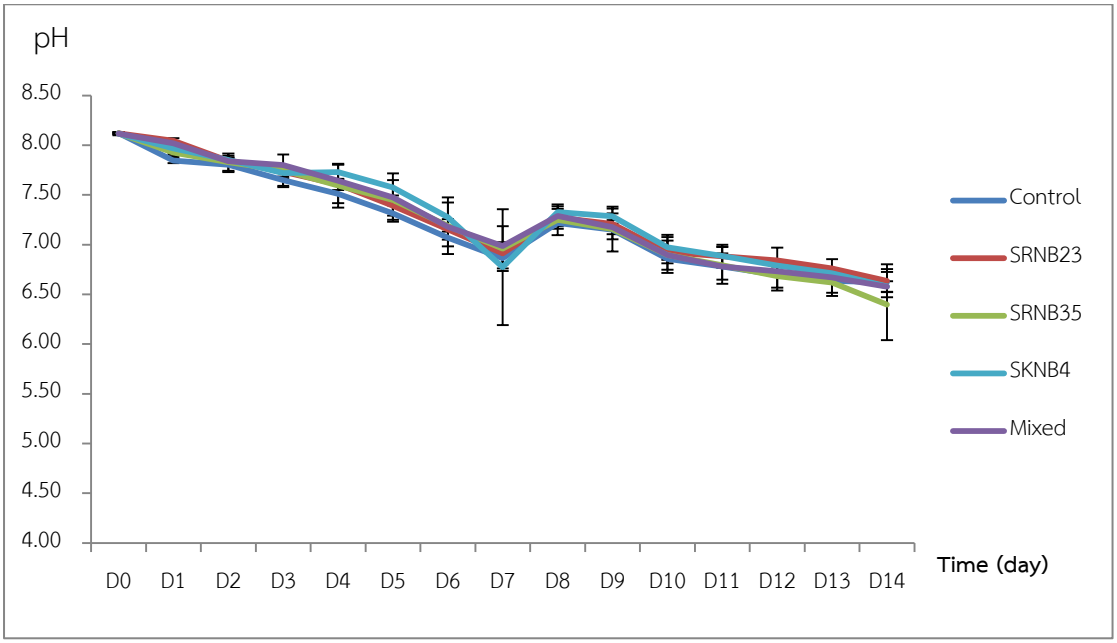
1) การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช (pH) ในระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ พีเอช พบว่าในการทดลองมีการลดลงของค่าพีเอชเล็กน้อยทั้ง 5 ชุดการทดลอง (ภาพที่ 13) คือ ในชุดควบคุม (Control) พบค่าพีเอชเฉลี่ย 7.12±0.48 ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SRNB23 พบค่าพีเอชเฉลี่ย 7.29±0.48 ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SRNB35 พบค่าพีเอชเฉลี่ย 7.24±0.52 ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SKNB4 พบค่าพี่เอชเฉลี่ย 7.30±0.50 และชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อผสมระหว่าง SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) พบค่าพีเอชเฉลี่ย 7.28±0.51

ตารางที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน [1]

Day	Control	SRNB23	SRNB35	SKNB4	Mixed
0	8.12±0.02[a]	8.12±0.01[a]	8.12±0.01[a]	8.12±0.02[a]	8.12±0.01[a]
7	6.86±0.10[b]	6.91±0.11[b]	6.96±0.23[b]	6.77±0.58[b]	6.99±0.10[b]
14	6.62±0.07[c]	6.64±0.17[c]	6.40±0.36[c]	6.58±0.05[b]	6.58±0.10[c]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)



ภาพที่ 13: การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 14 วัน

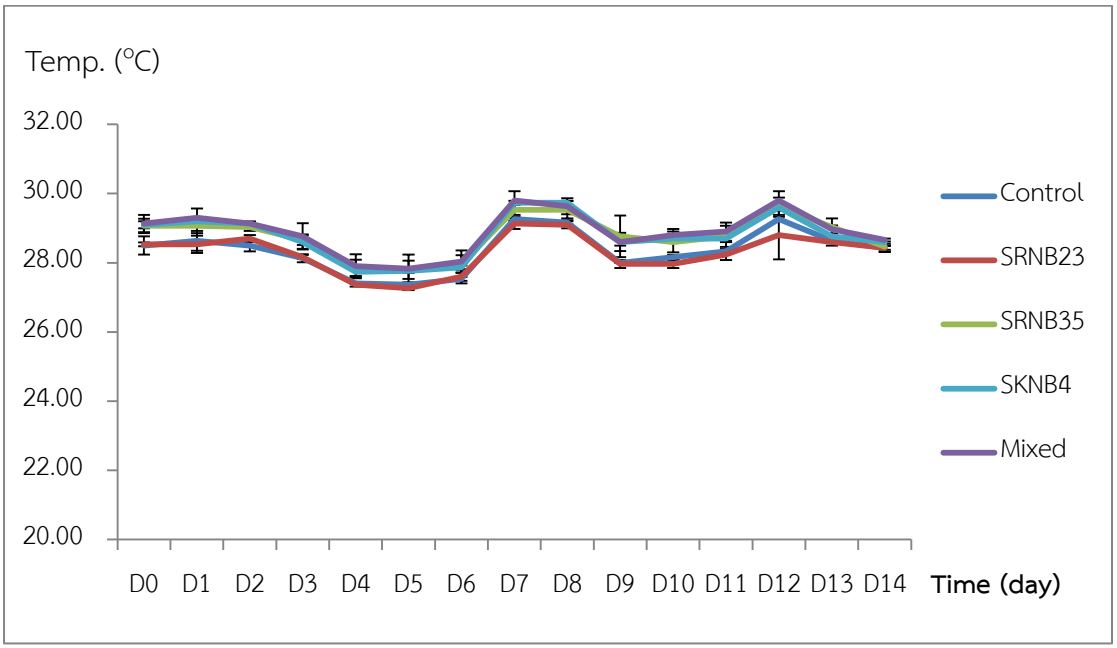
2) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (ภาพที่ 14) พบว่าในชุดควบคุม (Control) มีอุณหภูมิเฉลี่ย 28.36±0.62 องศาเซลเซียส ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SRNB23 มีอุณหภูมิเฉลี่ย 28.29±0.58 องศาเซลเซียส ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SRNB35 มีอุณหภูมิเฉลี่ย 28.78±0.59 องศาเซลเซียส ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SKNB4 มีอุณหภูมิเฉลี่ย 28.79±0.65 องศาเซลเซียส และชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อผสมระหว่าง SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) มีอุณหภูมิเฉลี่ย 28.88±0.63 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน [1]

Day	Control	SRNB23	SRNB35	SKNB4	Mixed
0	28.50±0.26^{b}	28.53±0.06^{b}	29.07±0.21^{b}	29.10±0.10^{b}	29.13±0.25^{c}
7	29.27±0.06^{a}	29.13±0.15^{a}	29.53±0.15^{a}	29.73±0.06^{a}	29.80±0.26^{a}
14	28.43±0.06^{b}	28.43±0.12^{b}	28.47±0.15^{c}	28.60±0.10^{c}	28.67±0.15^{b}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)



ภาพที่ 14: การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน

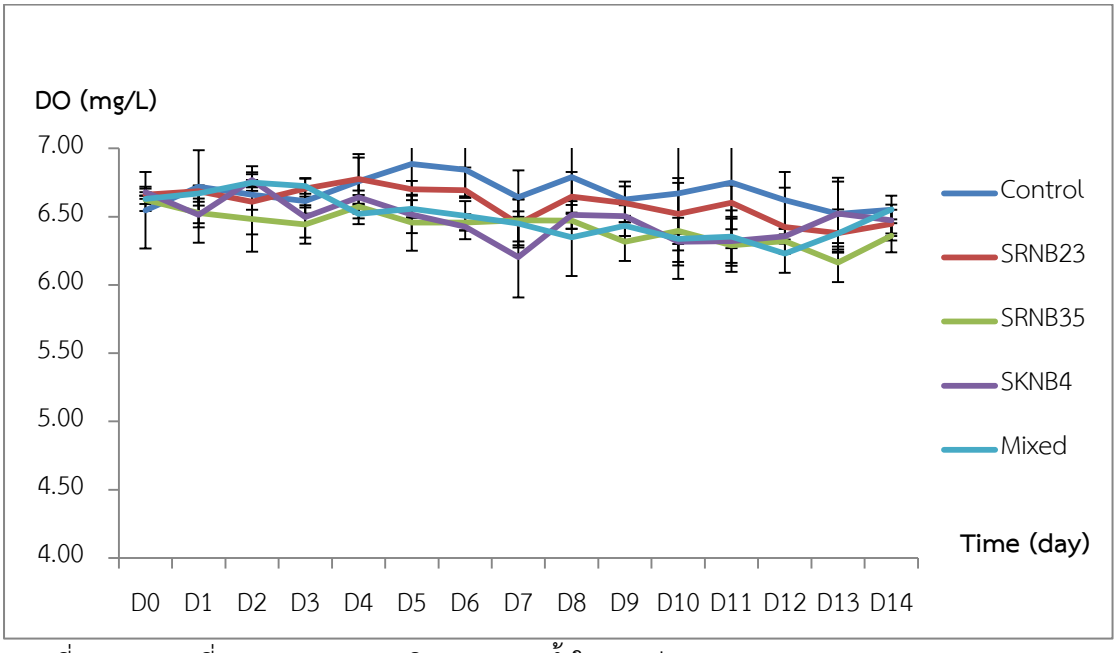
3) การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายในน้ำระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำ (ภาพที่ 15) พบว่าในชุดควบคุม (Control) มีออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ย 6.68±0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SRNB23 มีออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ย 6.59±0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SRNB35 มีออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ย 6.42±0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SKNB4 ออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ย 6.47±0.17 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อผสมระหว่าง SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) มีออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ย 6.50±0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน [1]

Day	Control	SRNB23	SRNB35	SKNB4	Mixed
0	6.55±0.28^{a}	6.66±0.02^{a}	6.62±0.03^{a}	6.68±0.03^{a}	6.63±0.09^{a}
7	6.64±0.20^{a}	6.45±0.09^{b}	6.47±0.16^{ab}	6.04±0.56^{a}	6.45±0.18^{a}
14	6.55±0.17^{a}	6.45±0.11^{b}	6.36±0.12^{b}	6.47±0.12^{a}	6.55±0.10^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)



ภาพที่ 15: การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดลอง

4) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดลอง

ในการศึกษาประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อจากบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 14 วัน พบว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสามารถลดปริมาณของแอมโมเนียได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15) กล่าวคือ ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อผสมระหว่าง SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ดีที่สุดเท่ากับ 63.07 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เชื้อ SRNB35, SRNB23, SKNB4 และชุดควบคุม (Control) โดยสามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ในวันที่ 14 ของการทดลองเท่ากับ 57.43, 56.45, 56.37 และ 23.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการลดแอมโมเนียในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งระยะเวลา 14 วัน [1]

Treatment	Day	Initial Ammonia (mg-N/L)	Final Ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Control	Day 0	461.90±1.49^{b}			
	Day 7		388.94±7.09^{a}	72.96±5.76^{g}	15.80±1.29^{g}
	Day 14		353.73±2.82^{b}	108.17±4.02^{f}	23.42±0.81^{f}
SRNB23	Day 0	467.13±4.19^{ab}			
	Day 7		274.82±12.02^{d}	192.31±10.48^{d}	41.17±2.34^{d}
	Day 14		203.39±4.91^{f}	263.74±8.44^{b}	56.45±1.36^{b}
SRNB35	Day 0	464.82±2.46^{ab}			
	Day 7		299.88±9.58^{c}	164.94±8.27^{e}	35.49±1.86^{e}
	Day 14		197.87±3.26^{f}	266.96±5.69^{b}	57.43±0.92^{b}
SKNB4	Day 0	463.79±4.03^{ab}			
	Day 7		300.47±2.78^{c}	163.32±4.60^{e}	35.21±0.77^{e}
	Day 14		202.38±5.98^{f}	261.40±4.06^{b}	56.37±1.05^{b}
Mixed	Day 0	467.98±0.41^{a}			
	Day 7		246.04±6.79^{e}	221.94±6.58^{c}	47.43±1.43^{c}
	Day 14		172.81±2.90^{g}	295.16±3.29^{a}	63.07±0.65^{a}

หมายเหตุ Mixed = สัดส่วน 30:70 ของเชื้อผสม SRNB23:SRNB35

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

5) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์ในระหว่างการทดลอง

จากการทดลองพบว่าทุกชุดการทดลองมีการเพิ่มขึ้นของไนไตรท์ในระหว่างการทดลองและลดลงในวันที่ 14 ของการทดลอง ยกเว้นชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อผสมระหว่าง SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) พบว่าค่าไนไตรท์ไม่มีการลดลงระหว่างการทดลอง และมีปริมาณของไนไตรท์เพิ่มสูงขึ้นจากวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 14 ของการทดลองเท่ากับ 0.25±0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร นั่นคือ มีไนไตรท์เพิ่มขึ้น 171.00±14.6 เปอร์เซ็นต์ จากวันแรก (Day 0) และพบว่าชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SRNB35 มีการลดไนไตรท์ได้ดีที่สุด คือ สามารถลดได้ 0.05±0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร หรือ 34.89 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการลดไนไตรท์ในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งระยะเวลา 14 วัน [1]

Treatment	Day	Initial Nitrite (mg-N/L)	Final Nitrite (mg-N/L)	Nitrite production (mg-N/L)	Nitrite (%)
Control	Day 0	0.15±0.01^{a}			
	Day 7		0.18±0.01^{c}	0.04±0.02^{cd}	24.06±12.20^{cd}
	Day 14		0.16±0.01^{cde}	0.01±0.01^{cde}	6.28±7.39^{cd}
SRNB23	Day 0	0.14±0.01^{a}			
	Day 7		0.17±0.01^{cd}	0.02±0.01^{cd}	16.91±5.34^{c}
	Day 14		0.12±0.00^{cde}	-0.02±0.01^{de}	-15.38±6.69^{de}
SRNB35	Day 0	0.14±0.00^{a}			
	Day 7		0.19±0.02^{c}	0.05±0.02^{c}	32.54±12.98^{c}
	Day 14		0.09±0.01^{e}	-0.05±0.01e	-34.89±7.41^{c}
SKNB4	Day 0	0.15±0.01^{a}			
	Day 7		0.18±0.00^{c}	0.04±0.01^{cd}	26.77±7.00^{c}
	Day 14		0.11±0.01^{de}	-0.03±0.01^{e}	-23.42±6.68^{e}
Mixed	Day 0	0.15±0.02^{a}			
	Day 7		0.25±0.11^{b}	0.10±0.10^{b}	68.06±56.77^{b}
	Day 14		0.40±0.03^{a}	0.25±0.02^{a}	171.00±14.68^{a}

หมายเหตุ Mixed = สัดส่วน 30:70 ของเชื้อผสม SRNB23:SRNB35

\- = การลดลงของปริมาณของไนไตรท์ที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

6) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการทดลอง

จากการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SRNB23, SRNB35 และชุดควบคุม (Control) มีการลดลงของปริมาณไนเตรท 21.14, 10.66 และ 7.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อ SKNB4 และชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อผสมระหว่าง SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) มีปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 ของการทดลองเท่ากับ 11.30 และ 3.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการลดไนเตรทในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งระยะเวลา 14 วัน [1]

Treatment	Day	Initial Nitrate (mg-N/L)	Final Nitrate (mg-N/L)	Nitrate production (mg-N/L)	Nitrate (%)
Control	Day 0	0.13±0.00^{ab}			
	Day 7		0.11±0.00^{b}	-0.02±0.00^{cde}	-15.86±1.31^{cd}
	Day 14		0.12±0.02^{ab}	-0.01±0.02^{abcd}	-7.40±14.42^{bc}
SRNB23	Day 0	0.13±0.01^{ab}			
	Day 7		0.11±0.01^{ab}	-0.02±0.02^{de}	-17.27±2.88^{cd}
	Day 14		0.10±0.00^{b}	-0.03±0.01^{de}	-21.14±7.63^{cd}
SRNB35	Day 0	0.14±0.01^{a}			
	Day 7		0.10±0.03^{b}	-0.04±0.02^{e}	-27.52±14.72^{d}
	Day 14		0.12±0.03^{ab}	-0.02±0.02^{bcde}	-10.66±13.65^{bcd}
SKNB4	Day 0	0.12±0.01^{ab}			
	Day 7		0.11±0.01^{ab}	-0.01±0.01^{abcd}	-8.69±11.89^{bcd}
	Day 14		0.14±0.01^{a}	0.01±0.01^{a}	11.30±5.27^{a}
Mixed	Day 0	0.12±0.01^{b}			
	Day 7		0.13±0.02^{ab}	0.01±0.2^{ab}	4.93±12.70^{ab}
	Day 14		0.12±0.00^{ab}	0.01±0.02^{abc}	3.14±3.56^{ab}

หมายเหตุ Mixed = สัดส่วน 30:70 ของเชื้อผสม SRNB23:SRNB35

\- = การลดลงของปริมาณของไนเตรทที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการศึกษา

4.1 การคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน

ในการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียได้ใช้อาหารสูตร modified Pep-beef-AOM ที่มีการเติม peptone, beef extract และ sodium citrate เป็นแหล่งสารอินทรีย์ของเชื้อกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย (heterotrophic bacteria) ที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น *Bacillus, Alcaligenes* และ *Halomonas* (Chankaew *et al*. 2017; Sangnoi *et al*. 2017) ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้เร็วกว่ากลุ่มออโตโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (autotrophic nitrifying bacteria) เช่น *Nitrosomonas, Nitrosospira, Nitrosococcus, Nitrosolobus, Nitrobacter* และ *Nitrococcus* ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญเติบโตช้าและมีความสามารถในการแข่งขันต่ำ รวมถึงมีการเติมสาร $(NH_4)_2SO_4$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการคัดเลือกและเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้หรือกำจัดแอมโมเนียได้ นอกจากนี้การเติมแอมโมเนียลงไปในอาหาร ทำให้แบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีแอมโมเนียได้หรือไม่สามารถใช้แอมโมเนียได้ต้องตายไป จากการทดลองของ Mizoguchi *et al*. (1998) ที่ได้ศึกษาเชื้อ AOB (Ammomiun oxidizing bacteria) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ จากตัวอย่างดิน ตัวอย่างน้ำจืด ตัวอย่างน้ำเค็มและสาหร่าย บริเวณชายฝั่ง Chiba และ Kanarawa ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้อาหารจำเพาะ 3 ชนิด ซึ่งอาหารแต่ละชนิดมีปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่แตกต่างกันเป็นองค์ประกอบ โดยทำการเลี้ยงบนอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำไปศึกษาโดยใช้ยีน 16S rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nitrosomonas europaea* เช่นเดียวกับ Yang *et al.* (2011) ได้ทำการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่สามารถลดปริมาณไนโตรเจนในน้ำเสีย ถึงแม้ว่าผู้วิจัยใช้อาหาร Inorganic medium แทนอาหาร organic medium แต่ในอาหารก็มีส่วนผสมของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 กรัม ซึ่งสามารถคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 และเมื่อศึกษายีน 16S rDNA พบว่าเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 เป็นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Fan *et al.* (2015) ที่ได้ทำแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียโดยใช้อาหาร heterotrophic nitrification enrichment medium ที่มีส่วนผสมของ sodium succinate เป็นแหล่งสารอินทรีย์ (organic compound) และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.24 กรัมต่อลิตร ในการคัดแยกเฮเทอโร

โทรฟิคแบคทีเรีย ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 3 ไอโซเลท คือ HLf01, HBf01 และ HHf01 เมื่อศึกษายีน 16S rDNA พบว่าเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียไอโซเลท HLf01 และ HBf01 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และไอโซเลท HHf01 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* ทั้งนี้ยังมีผู้วิจัยที่ใช้สารประกอบแอมโมเนียอื่นๆ ในการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนีย เช่น การศึกษาของ Su *et al*. (2015) ที่ใช้ NH_4Cl ในการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจากอ่างเก็บน้ำ Hei He ประเทศจีน จากการศึกษาสามารถคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ SYF26 เมื่อวิเคราะห์ยีน 16S rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. นอกจากนี้ Lin *et al*. (2007) ได้คัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจากน้ำเสียด้วยอาหาร enrichment medium โดยมีส่วนประกอบของ peptone และ NH_4Cl จากการศึกษาการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ได้ ในขณะที่ Lu *et al*. (2012) ได้คัดแยกแบคทีเรียโดยเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียด้วยอาหาร beef extract-peptone medium และใช้อาหารที่มีส่วนผสมของ $(NH_4)_2SO_4$ ในการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ W1 เมื่อศึกษายีน 16S rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Alcaligenes* sp. แสดงให้เห็นว่าการเติมแอมโมเนียในอาหารแยกเชื้อมีความสำคัญมากต่อการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนีย แต่การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันไม่น่าจะส่งผลต่อการคัดแยกไนตริไฟอิงแบคทีเรียแต่อย่างใด

นอกจากนี้ปัจจัยความเค็มยังมีอิทธิพลต่อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย ซึ่งในการทดลองได้ใช้น้ำทะเลที่มีความเค็ม 20 พีพีที สำหรับการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย ซึ่งทำให้ได้สายพันธุ์ของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนเค็ม (Salt-tolerant) (Chankaew *et al*., 2017; Sangnoi *et al*., 2017) ดังนั้นการคัดแยกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียครั้งนี้ ทำให้ได้เชื้อที่เจริญเติบโตดี สามารถใช้สารอาหารอินทรีย์และทนเค็ม ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียในสภาวะที่มีความเค็ม เช่น บ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งโดยทั่วไปแล้วความเค็มที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลมีค่าประมาณ 1-2.5 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์หรือ 10-25 พีพีที

ในระหว่างการทดลองพบว่าเชื้อบางไอโซเลทให้ผลเป็นลบในการทดสอบไนไตรท์และไนเตรทด้วย nitrite reagent แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร modified Pep-beef-AOM แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านั้นไม่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และสุดท้ายคือไนเตรทตามปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันได้ แต่เป็นกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่สามารถทนต่อแอมโมเนียและสามารถที่จะใช้ peptone และ beef extract รวมไปถึงแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโต อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลของการทดสอบไนไตรท์และไนเตรทเป็นลบ คืออาจเกิดจากการที่ไนเตรทถูกเปลี่ยนไปเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระอย่างสมบูรณ์ทำให้ตรวจไม่พบไนเตรท (Chankaew *et al*, 2017)

อย่างไรก็ตาม นุกูล และคณะ (2547) ได้รายงานถึงข้อจำกัดของเทคนิคในการศึกษาจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกล่าวว่ามีแบคทีเรียเพียง 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ก็อาจสามารถเจริญเติบโตได้สูงถึง 15 เปอร์เซ็นต์ หากเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม และการศึกษาแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลาในการเจริญเติบโตยาวนานถึง 1 เดือนหรือมากกว่านั้น จึงทำให้วิธีการแยกเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้น้อย

4.2 การจัดจำแนกชนิดของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน

จากการศึกษาชนิดของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยใช้ยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นว่ามีกลุ่มของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจำนวน 3 จีนัส คือ *Alcaligenes*, *Oceanobacillus* และ *Halomonas* แต่ไม่พบกลุ่มออโตโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย เช่น *Nitrospira, Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosolobus, Nitrococcus* และ *Nitrobacter* ซึ่งเป็นกลุ่มเด่นที่พบได้ทั่วไป (ธงชัย, 2544; Yanagita, 1990; Bitton, 1994) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าอาหาร modified Pep-Beef-AOM เป็นอาหาร organic medium ซึ่งมีความเหมาะสมกับกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้เร็วมากกว่ากลุ่มออโตโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่เจริญเติบโตช้า (Sangnoi *et al*., 2017) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 จีนัสมีความสามารถในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน ทั้งนี้แบคทีเรียกลุ่ม *Alcaligenes, Halomonas* และ *Oceanobacillus* เป็นแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม มักพบในสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็มรวมถึงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ซึ่งในปี ค.ศ. 1980 ได้มีการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับการคัดแยก *Halomonas elongata* ที่มีความสามารถในการทนต่อเกลือ รวมถึงมีความสามารถในการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ ซึ่งเป็นบทบาทหน้าที่ของดีไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) ในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) ซึ่งเป็นกระบวนการในการกำจัดไนเตรทที่เป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการไนตริฟิเคชันเพื่อให้เป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระหรือการเปลี่ยนไนเตรทกลับเป็นไนไตรท์ (Joo *et al*., 2005; Lu *et al*., 2012) และมีรายงานว่า *Halomonas* spp. หลายชนิดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นแก๊สไนโตรเจน เช่น *H. campisalis, H. fontilapidosi, H. cerina, H. denitrificans, H. korlensis* และ *H. shengliensis* (Kim *et al*., 2007; Gonzalez-Domenech *et al*., 2008; Li *et al*., 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนที่อนุรักษ์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในการถ่ายถอดรหัสพันธุกรรม นอกจากนี้ในการศึกษาชนิดของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย ยังมีรายงานการใช้ยีนอื่นในการจัดจำแนกอีก เช่น ยีน ammonia monooxygenase (*amo*A) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ammonia monooxygenase ที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ และ

nitrite-oxido-reductase (*nor*B) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ nitrite oxidoreductase ที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท โดยที่ยีนทั้งสองชนิดนี้จะพบในแบคทีเรียกลุ่ม AOB และ NOB ตามลำดับ (Krishnani, 2010) เช่น Wu *et al*. (2013) ได้ทำการศึกษาไนตริไฟอิงแบคทีเรียโดยใช้ primer *amo*A-1F/*amo*A-2R และ *amo*196F/*amo*277R ซึ่งสามารถตรวจพบ *Nitrosomonas* เป็นกลุ่มเด่น เช่นเดียวกับ Urakawa *et al.* (2006) ได้ศึกษาความชุกชุมและโครงสร้างประชาคมของ ammonia-oxidizing bacteria จากน้ำและตะกอนดินในคลองรับน้ำจากโรงบำบัดน้ำเสีย ซึ่งอยู่บริเวณอ่าวโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้ยีน 16S rRNA จำนวน 12 ยีน และยีน *amo*A จำนวน 11 ยีน เป็น primers ในการศึกษา พบไนตริไฟอิงแบคทีเรียกลุ่ม *Nitrosomonas* spp. เป็นกลุ่มหลัก นอกจากนี้ได้มีการนำเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) มาใช้ในการศึกษาโครงสร้างประชาคมและพลวัตของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย พบว่าการใช้เทคนิค DGGE และ FISH สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายของไนตริไฟอิงแบคทีเรียได้โดยไม่จำเป็นต้องทำการแยกเชื้อ ทำให้ไม่มีข้อจำกัดในการคัดแยกเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่ค่อนข้างแยกได้ยาก (Kumar *et al*., 2013; Nicolaisen and Ramsing, 2002; Ziembinska *et al*., 2009) อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียจำเป็นต้องแยกตัวเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียให้ได้ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ดังกล่าว

4.3 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย

มีแบคทีเรียบางกลุ่มที่ถูกระบุว่าสามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันในสภาพมีอากาศได้ (aerobic-denitrification) (Joo *et al*., 2005; Wen and Wei, 2011; Yang *et al*., 2011; Zheng *et al*., 2012; Guo *et al*., 2013; Yao *et al*., 2013; Duan *et al*., 2015; Su *et al*., 2015) โดยทั่วไปแล้วไนตริไฟอิงแบคทีเรียกับดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียคนละกลุ่มกัน กล่าวคือ ไนตริไฟอิงแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันซึ่งต้องการออกซิเจนในการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงเป็นกลุ่มแอโรบ (aerobe) ส่วนดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันซึ่งไม่ต้องการออกซิเจนในการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงเป็นแบคทีเรียที่เป็นกลุ่มแอนแอโรบ (anaerobe) แต่ในขณะทำการทดลองนั้นมีการให้อากาศโดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า สภาวะในการทดลองจึงอยู่ในสภาวะมีอากาศ แบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้จึงเป็นพวกแอโรบ และปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้ควรเป็นปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่มีผลให้แอมโมเนียถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ และถูกเปลี่ยนต่อเป็นไนเตรท ตามลำดับ แต่การทดลองครั้งนี้

กลับไม่มีไนเตรทหรือมีไนเตรทน้อยมาก ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการนำแอมโมเนียไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์ แต่ไม่มีความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และออกซิไดซ์ไนไตรท์ต่อไปเป็นไนเตรทได้ หรือเชื้อกลุ่มนี้อาจเป็นเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถทำให้เกิดได้ทั้งปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในสภาพมีอากาศ (aerobic-denitrification) ส่งผลให้ไนเตรทถูกเปลี่ยนเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระจึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบไนเตรทได้ โดย Zhang *et al*. (2012) ได้รายงานว่าเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย *Bacillus methylotrophicus* สายพันธุ์ L7 มีบทบาททั้งในกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียและไนไตรท์ได้ในอัตราวันละ 51.58 และ 5.81 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ Chen *et al.* (2012) รายงานว่าเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย *Rhodococcus* sp. CPZ24 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ 86เปอร์เซ็นต์ เกิดผลิตภัณฑ์ของไนตริฟิเคชัน (ไนไตรท์และไนเตรท) 13.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตแก๊สไนโตรเจน (N_2, N_2O, NO_2 และ NO) 48.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำไนโตรเจนไปสร้างเซลล์ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 25 ชั่วโมง Guo *et al*. (2013) ได้รายงานประสิทธิภาพของ *Halomonas campisalis* ha3 ในน้ำเสียที่มีความเค็มโดยสามารถลดแอมโมเนียได้ 71 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง (แอมโมเนียเริ่มต้น 140 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ลดไนไตรท์และไนเตรทได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 12 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ รวมถึงเกิดอัตราดีไนตริฟิเคชันที่มีอากาศ 87.5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง

จากการศึกษาความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยใช้อาหารเหลว modified Pep-Beef-AOM ซึ่งมีปริมาณของแอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ในช่วง 799.56–871.70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยทั่วไปเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสามารถทำงานได้ดีที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ เช่น *Bacillus subtilis* มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ 58 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 5 วัน เมื่อมีปริมาณของแอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ที่ 104 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Yang *et al*., 2011) ส่วนเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นที่ 434.47 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ภายในเวลา 4 วัน (Lu *et al*., 2012) แต่มีเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ดีเมื่อมีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง เช่น *Alcaligenes faecalis* (Joo *et al*., 2005) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ แต่ไม่สามารถที่จะเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์และเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรทได้ หรืออาจเปลี่ยนได้เพียงเล็กน้อย อาจเป็นไปได้ว่าเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียเหล่านี้ไม่มียีน Ammonia monooxygenase (*amo*A) ที่สร้างเอนไซม์ในการทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ (Hooper *et al*., 1997; Krishnani, 2010) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ใช้ยีน *amo*A ในการตรวจสอบเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่แยกได้ จึงไม่

สามารถที่จะสรุปได้อย่างชัดเจนว่าเชื้อที่แยกได้สามารถสร้างเอนไซม์ Ammonia monooxygenase ที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้หรือไม่ นอกจากนี้เฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่แยกได้จากการศึกษาเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่น โดยสามารถกำจัดแอมโมเนียได้ในแหล่งที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงและอยู่ในสภาวะที่มีเกลือ (Chankaew *et al*., 2017; Sangnoi *et al*., 2017) ซึ่ง Zheng *et al*. (2012) สามารถคัดแยกไนตริไฟอิงแบคทีเรียจากแผ่นกรองของระบบกรองน้ำเสียจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม แต่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้เพียง 48 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 242.78 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง

ระหว่างการทดลองพบว่าค่าพีเอชลดลง เนื่องจากในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย มีการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออน (H^+) ออกมา จึงทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลง โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจะอยู่ในช่วง 6-9 (ธงชัย, 2544) ปกติแล้วพีเอชที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงกุ้งอยู่ที่ 8-9 ซึ่งจะพบแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) มากกว่าแอมโมเนียอิสระ (NH_3) หากค่า พีเอช ลดต่ำลงจะส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียอิสระสูงขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิยังเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราเมทาบอลิซึม (metabolism rate) การกินอาหารของกุ้ง รวมไปถึงปริมาณของแอมโมเนีย ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นก็จะส่งผลให้ระดับเมตาบอลิซึมและแอมโมเนียอิสระสูงขึ้นเช่นกัน

ตลอดการทดลองมีค่าออกซิเจนละลายน้ำไม่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง แม้ว่าออกซิเจนจะมีบทบาทที่สำคัญมากต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือไนตริฟิเคชัน แต่ในการทดลองครั้งนี้มีการให้อากาศอย่างเต็มที่ด้วยเครื่องปั๊มลม ทำให้มีออกซิเจนละลายน้ำมากเกินพอเฉลี่ยประมาณ 6.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากพอต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มแอโรบและต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน จากการทดสอบประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียพบว่า เชื้อผสมระหว่าง SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ดีที่สุด เท่ากับ 63.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าเชื้อเดี่ยวที่สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าการทดลองการลดปริมาณแอมโมเนียก่อนหน้านี้ในขวดรูปชมพู่นั้น พบว่าเชื้อเดี่ยว SRNB23 และ SRNB35 มีความสามารถในการลดปริมาณแอมโมเนียได้มากกว่าเชื้อผสม SRNB23:SRNB35 (30:70) นั่นอาจเป็นเพราะในขณะนั้นใช้สัดส่วนของเชื้อผสมที่ 50:50 ซึ่งยังไม่ใช่สัดส่วนที่เหมาะสมในการกำจัดแอมโมเนีย ต่อมาได้ทำการทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมของเชื้อผสม พบว่าสัดส่วนของเชื้อผสม SRNB23:SRNB35 (30:70) มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ดี

ที่สุด เท่ากับ 66.77 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สัดส่วนเชื้อผสม 50:50 สามารถกำจัดแอมโมเนียได้เพียง 59.03 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

นอกจากนี้การทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ ที่มีการให้อากาศโดยการเขย่านั้น ทำให้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกจำกัดและมีปริมาณน้อยกว่าการทำการทดลองในขวดโหลที่ให้อากาศด้วยปั๊มลม ฉะนั้นการลดปริมาณแอมโมเนียในขวดรูปชมพู่ของเชื้อผสมจึงด้อยกว่าเชื้อเดี่ยว แต่สำหรับการทดลองในขวดโหล ปรากฏว่าเชื้อผสมกลับมีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียได้ดีกว่าเชื้อเดี่ยวเมื่อมีการให้อากาศอย่างเพียงพอ

เนื่องจากการทดลองกำจัดปริมาณแอมโมเนียในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นน้อยกว่าการทดลองในขวดรูปชมพู่ประมาณ 2 เท่า โดยน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นประมาณ 450 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในขณะที่การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียในขวดรูปชมพู่มีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นประมาณ 900 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นมีผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย (Guo *et al*., 2013) ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อเดี่ยวในการทดลองในขวดรูปชมพู่ดีกว่าเชื้อผสม แต่เมื่อทำการทดลองในขวดโหลที่มีปริมาณแอมโมเนียน้อยลง 2 เท่า ปรากฏว่าประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อผสมดีกว่าเชื้อเดี่ยว

นอกจากนี้อาจเป็นเพราะการทดลองในขวดรูปชมพู่มีการเติมสารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน เช่น peptone และ beef extract ทำให้เชื้อเดี่ยวมีการเจริญเติบโตได้ดี ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียดีไปด้วย แต่เมื่อทำการทดลองในขวดโหลที่บำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งและไม่มีการเติมสารอินทรีย์เพิ่มเติมลงไป อาจทำให้เชื้อเดี่ยวเจริญเติบโตได้น้อยลง ประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียจึงลดลงไปด้วย ในขณะที่เชื้อผสมอาจมีการทำงานร่วมกันระหว่างเชื้อ (co-metabolism) จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียดีกว่าเชื้อเดี่ยว โดย Dhanasiri *et al*. (2011) ได้รายงานถึงการใช้เชื้อรวม (consortia) ของไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้งกลุ่ม AOB และ NOB ว่าทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมระดับแอมโมเนียในบ่อเพาะเลี้ยงปลาม้าลาย (zebrafish) นอกจากนี้ Suantika *et al*. (2013) ได้รายงานถึงการใช้เชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียผสมระหว่าง *Halomonas aquamarina* และ *Shewanella algae* ในการเป็นโปรไบโอติก (probiotic) ในบ่อเพาะฟักลูกกุ้งขาว พบว่าเชื้อผสมทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการเพิ่มอัตราการรอดของลูกกุ้ง ทำให้ลูกกุ้งมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และยังช่วยต่อต้านแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในกุ้งได้

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณของแอมโมเนียมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และพบว่าแอมโมเนียลดลงได้ดีที่สุดในวันที่ 7 หลังจากการเติมหัวเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของกัญญาณัฐ และคณะ (2552) ที่ได้นำไนตริไฟอิงแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Nitrosomonas eutropha* และ *Nitrobacter winogradskyi* มาควบคุมปริมาณของแอมโมเนียและไนไตรท์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาว มีระยะเวลาในการทดสอบ 14 วัน และทำการเติมไนตริไฟอิงแบคทีเรียทุกๆ 7 วัน พบว่าปริมาณของแอมโมเนียค่อยๆ ลดลงและลดลงต่ำสุดในช่วง 7 วันหลังจากที่ได้ทำการเติมไนตริไฟอิงแบคทีเรียสู่บ่อเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณแอมโมเนียจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการให้อาหารแก่กุ้ง รวมถึงมีการขับถ่ายของกุ้งตลอดเวลา จึงทำให้ปริมาณของแอมโมเนียมีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 8 และลดต่ำลงในวันที่ 10 อีกครั้งหนึ่ง หลังจากมีการเติมไนตริไฟอิงแบคทีเรียในวันที่ 7 จากการศึกษาของ Joo *et al*. (2005) พบว่าเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย *Alcaligenes faecalis* no. 4 สามารถกำจัดแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นสูงถึง 366 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรได้ภายใน 35 ชั่วโมง

การศึกษาครั้งนี้ปริมาณไนไตรท์ของชุดการทดลองมีการเพิ่มขึ้นและลดลงในวันที่ 14 ซึ่งอาจเกิดจากการที่ไนไตรท์ถูกเปลี่ยนไปเป็นไนเตรทด้วยกลไกของกระบวนการไนตริฟิเคชัน ยกเว้นชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อผสมระหว่าง SRNB23 และ SRNB35 (30:70) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของไนไตรท์อย่างต่อเนื่องตลอดการทดลองระยะเวลา 14 วัน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการลดลงของแอมโมเนีย โดยชุดการทดลองนี้เป็นชุดการทดลองที่สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ดีที่สุด โดยทั่วไปไนตริไฟอิงแบคทีเรีย เช่น *Nitrosomonas* และ *Nitrosospira* สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ดีที่ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำๆ (ธงชัย, 2544; Bitton, 1994) แต่ในการทดลองครั้งนี้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงเกินค่ามาตรฐาน อาจส่งผลให้การเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันในการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์เกิดได้ไม่เต็มที่ รวมถึงไนไตรท์อาจสามารถเปลี่ยนเป็นแก๊สไนโตรเจนได้ด้วยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันแบบใช้อากาศ ซึ่งมีเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียหลายชนิดที่มีความสามารถดังกล่าว เช่น *Alcaligenes denitrificans, Alcaligenes faecalis, Thioshaera pantotropha* และ *Ochrobactrum grignonense* เป็นต้น (Matsuzaka *et al*., 2003; Wen and Wei, 2011)

สำหรับปริมาณไนเตรทในชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียสายพันธุ์ SKNB4 พบว่ามีปริมาณของไนเตรทสูงสุด ซึ่งกระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ไนโตรเจนจากแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ และออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรท ในการเปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรทจะเกิดขึ้นด้วยแบคทีเรียกลุ่ม NOB ได้แก่ *Nitrobacter* และ *Nitrococcus* (Boyd, 1990) อย่างไรก็ตามไนเตรทยังสามารถที่จะเปลี่ยนเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระด้วยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันแบบใช้อากาศ โดยเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus subtilis* เป็นต้น (Yang *et al*., 2011)

นอกจากนี้ในการทดสอบความสามารถของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการกำจัดแอมโมเนียในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง ได้ทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงเฉพาะคุณภาพน้ำเท่านั้น ไม่ได้ทำการศึกษาพลวัตประชากรของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE จึงทำให้ไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่างบทบาทหรือพลวัตของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ ซึ่งน่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นดังกล่าวต่อไปในอนาคต

ประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งนี้ก็คือเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ค่อนข้างดี แต่กลับผลิตไนไตรท์และไนเตรทได้น้อยมาก ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไนตริไฟอิงแบคทีเรียคือการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และไนเตรท ฉะนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ดังกล่าวไม่ใช่ไนตริไฟอิงแบคทีเรียแต่เป็นเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตและสร้างเซลล์ อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยหลายชิ้นที่ระบุว่าเชื้อบางชนิดเป็นเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่สามารถใช้สารอินทรีย์และสามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และไนเตรทได้ (Yang *et al*., 2011; Lu *et al*., 2012) และยังมีรายงานว่าเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียบางชนิดสามารถกำจัดไนเตรทในระบบให้กลายเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระได้ด้วยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันแบบใช้อากาศ (areobic denitrification) จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบไนเตรทได้ แต่สามารถตรวจพบแก๊สไนโตรเจนได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (Lu *et al*., 2012) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการวิเคราะห์แก๊สไนโตรเจน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่ามีปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันเกิดขึ้นหรือไม่ นั่นเท่ากับว่าทำให้ไม่สามารถยืนยันได้ว่าการไม่มีไนไตรท์และไนเตรทเกิดขึ้น เป็นเพราะเชื้อดังกล่าวเป็นแต่เพียงเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียไม่ใช่ไนตริไฟอิงแบคทีเรีย หรือเป็นเพราะไนไตรท์และไนเตรทถูกรีดิวซ์ไปเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระด้วปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันแบบใช้อากาศ

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

จากการคัดเลือกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวจาก 2 แหล่ง คือ ตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินจาก บริษัท ศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี จำนวน 42 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินจากภัทรวุฒิฟาร์ม ต.แหลมโพธิ์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา จำนวน 6 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 48 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาทำการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในอาหาร modified Pep-Beef-AOM สามารถแยกเชื้อได้จำนวน 141 ไอโซเลท เมื่อนำเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียทั้ง 141 ไอโซเลทมาศึกษาความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน พบว่ามีเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลทที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้สูงกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ โดยมี 2 ไอโซเลทที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ คือ SRNB23 และ SRNB35 และมีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่มีผลไนเตรทเป็นบวก คือ SKNB4 SRNB78 และ SRNB79 เมื่อศึกษายีน 16S rRNA พบว่า SRNB35 และ SRNB78 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Alcaligenes* ส่วน SRNB79 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Oceanobacillus* และ SKNB4 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Halomonas* เมื่อนำเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทมาศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อผสม พบว่าเชื้อเดี่ยว SRNB23 และ SRNB35 และเชื้อผสม SRNB23 + SRNB35 เป็นกลุ่มสายพันธุ์ที่สามารถลดแอมโมเนียได้ดีเท่ากับ 91.75±0.38, 91.21±0.07 และ 66.07±2.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของเชื้อผสม พบว่าที่สัดส่วน 30:70 ของเชื้อผสม SRNB23:SRNB35 สามารถลดปริมาณของแอมโมเนียได้สูงสุดที่ 66.77 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเชื้อผสมและเชื้อเดี่ยว SRNB23 SRNB35 และ SKNB4 มาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า เชื้อผสม SRNB23:SRNB35 (30:70) สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้สูงที่สุด โดยสามารถลดได้ 63.07±0.65 เปอร์เซ็นต์ ตามมาด้วยเชื้อเดี่ยว SRNB35, SRNB23 และ SKNB4 โดยสามารถลดแอมโมเนียได้ 57.43±0.92, 56.45±1.36 และ 56.37±1.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาพลวัตประชากรของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE เพื่อให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างบทบาทหรือพลวัตของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ

2. การทดสอบความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียของหัวเชื้อแบคทีเรีย ควรศึกษาเปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ไม่มีการฆ่าเชื้อเพื่อการประยุกต์ใช้

3. ควรทดสอบการผลิตแก๊สไนโตรเจน เพื่อยืนยันว่าไนเตรทในระบบถูกเปลี่ยนหรือไม่ถูกเปลี่ยนเป็นแก๊สไนโตรเจน

4. ควรศึกษายีน *amo*A และ *nor*B ของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่คัดแยกได้เปรียบเทียบกับยีน 16S rRNA

บรรณานุกรม

กรมควบคุมมลพิษ. 2559. มาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. เข้าถึงได้จาก http://www.pcd.go.th. เข้าถึงเมื่อวันที่ 15 ธันวาคม 2559.

กรมประมง. 2554. หนังสือสถิติหน่วยธุรกิจการประมง พ.ศ. 2553. กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. ศูนย์สารสนเทศ. เอกสารฉบับที่ 13/2556.

กรมประมง. 2556ก. หนังสือสถิติหน่วยธุรกิจการประมง พ.ศ. 2554. กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. ศูนย์สารสนเทศ. เอกสารฉบับที่ 13/2556.

กรมประมง. 2556ข.ยุทธศาสตร์กุ้งไทย ฉบับที่ 3 ปี 2557-2559. สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง.

กษิดิศ หนูทอง. 2551. การบำบัดไนโตรเจนในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบปิด. ว.พระจอมเกล้าลาดกระบัง. 16: 11–22.

กัญญาณัฐ ขุนดี, ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2552. ประสิทธิภาพของไนตริไฟอิงแบคทีเรียในการควบคุมปริมาณแอมโมเนียและไนไตรท์. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 17-20 มี.ค. 2552. หน้า 188-196.

เกยูร คำคง, ดอกรัก ชัยสาร, ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร และนุกูล อินทระสังขา. 2551. การตรวจสอบและติดตามแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายอิงและดีไนตริฟายอิงในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนด้วยเทคนิค Fluorescent *In Situ* Hybridization. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 31 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2550. หน้า 424-431.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. บริษัท เมจิคพับบลิเคชั่นจำกัด, กรุงเทพฯ.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 703 หน้า.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 202 หน้า.

ดวงพร คันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 216 หน้า.

นิคม ละอองศิริวงศ์, ภาสกร ถมพลกรัง, ลักขณา ละอองศิริวงศ์ และทองเพชร สันบูกา. 2547. ยูโทรฟิเคชัน : ผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการประมงในทะเลสาบสงขลา. กลุ่มงานวิจัยระบบและการจัดการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักงานวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. 40 หน้า.

นุกูล อินทระสังขา, นิแอ นิฮะ, พีระศักดิ์ ศิริวัฒน์ และสมพงศ์ โอทอง. 2547. การบำบัดไนโตรเจนแบบสมบูรณ์ในน้ำทิ้งที่มีความเค็มโดยระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอน. การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 3 28-30 มกราคม 2547.

ปรมินทร์ สันใจ. 2548. การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียและไนไตร์ท. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พุทธ ส่องแสงจินดา, ลักขณา ละอองศิริวงศ์ และชัชวาล อินทรมนตรี. 2546. ฟลักซ์ของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ผิวสัมผัสของน้ำ-ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย. 13 หน้า.

สิริ ทุกข์วินาศ และชนินทร์ แสงรุ่งเรือง. 2541. การศึกษาวิจัยบำบัดน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาด้วยระบบ Bio-filter. ว.การประมง 51: 535-540.

สิริ ทุกข์วินาศ, ธนิฏฐา จงพีร์เพียร และมาลินี วิชชาวุธ. 2548. การรับรองมาตรฐานขบวนการผลิตผลิตภัณฑ์กุ้งจากการเพาะเลี้ยงและระบบตรวจสอบย้อนกลับของประเทศไทย. ว.การประมง 58: 19-23.

Bitton, G. 1994. Wastewater Microbiology. Wiley-Liss, Inc. USA. 765 pp.

Boyd, C. E. 1990. Water Quality in Ponds of Aquaculture. Alabama Agriculture Experiment Station, Auburn University. Alabama. 482 pp.

Chen, P., Li, J., Li, Q. X., Wang, Y., Li, S., Ren, T. and Wang, L. 2012. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. Bioresour. Technol. 116: 266–270.

Chena, S., Linga, J. and Blanchetonb, J. P. 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. Aquacult. Eng. 34: 179–197.

Chankaew, S., O-Thong, S. and Sangnoi, Y. 2017. Nitrogen removal efficiency of salt-tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. Chiang Mai J. Sci. 44: 1–10 (*In press*).

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

Dalsgaard, T., Thamdrup, B. and Canfield, D. E. 2005. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. Res. Microbiol. 156: 457–464.

Dhanasiri, A. K. S., Kiron, V., Fernandes, J. M. O., Bergh, Ø. and Powell, M. D. 2011. Novel application of nitrifying bacterial consortia to ease ammonia toxicity in ornamental fish transport units: trials with zebrafish. J. Appl Microbiol. 111: 278–292.

Duan, J., Fang, H., Su, H., Chen, J. and Lin, J. 2015. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. Bioresour. Technol. 179: 421–428.

Fan, L., Chen, J., Liu, Q., Wu, W., Meng, S., Song, C., Qu, J. and Xu, P. 2014. Exploration of three heterotrophic nitrifying strains from a tilapia pond for their characteristics of inorganic nitrogen use and application in aquaculture water. J. Biosci. Bioeng. 119: 303–309.

Gonzalez-Domenech, C. M., Bejar, V., Martinez-Checa, F. and Quesada, E. 2008. *Halomonas nitroreducens* sp. nov., a novel nitrate- and nitrite-reducing species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 872–876.

Gowen, R. J. and Bradbury, N. B. 1987. The ecological impact of salmonid farming in coastal waters: a review. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 25: 563–575.

Guo, Y., Zhou, X., Li, Y., Li, K. Wang, C., Yan, D., Liu, Y., Yang, D. and Xing, J. 2013. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. Biotechnol. Lett. 35: 2045–2049.

Hargreaves, J. A .1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture pond. Aquaculture. 166: 181–212.

Hargreaves, J. A. and Tucker, C. S. 2004. Managing ammonia in fish pond. The Southern Regional Aquaculture Center. 4603: 1–7.

Hart, P. and O'Sullivan, D. B. 1993. Recirculation Systems: Design, Construction and Management; Turtle Press: Tasmania, Australia. 127 pp.

Hooper, A. B., Vannelli, D., Bergmann, D. J. and Arciero, D. M. 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. Antonie Leeuwenhoek 71: 59–67.

Joo, H. S., Hirai, H. and Shoda, M. 2005. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. J. Biosci. Bioeng. 100: 184–191.

Kim, K. K., Jin, L., Yang, H. C. and Lee, S. T. 2007. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 675–681.

Krishnani, K. K. 2010. Detection and diversity of nitrifying and denitrifying functional genes in coastal aquaculture. Aquaculture. 302: 57–70.

Kumar, V. J. R., Sukumaran, V., Achuthan, C., Joseph, V., Philip, R. and Singh, I. S. B. 2013. Molecular characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. Int. Biodeter. Biodegr. 78: 74–81.

Lawson, T. B. 1995. Fundamentals of Aquacultural Engineering. Chapman and Hall. New York. 328 pp.

Li, H. B., Zhang, L. P. and Chen, S. F. 2008. *Halomonas korlensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium isolated from saline and alkaline soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2582–2588.

Lin, Y., Kong, H., He, Y., Liu, B.. Inamori, Y. and Yan. L. 2007. Isolation and characterization of a new heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. Strain. Biomed . Environ. Sci. 20: 450–455.

Lu, Y., Wang, X., Liu, B., Liu, Y. and Yang, X. 2012. Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying strain W1. Chinese J. Chem. Eng. 20: 995–1002.

Matsuzaka, E., Nomura, N., Nakajima-Kambe, T., Okada, N. and Nakahara, T. 2003. A simple screening procedure for heterotrophic nitrifying bacteria with oxygen-tolerant denitrification activity. J. Biosci. Bioeng. 95: 409–411.

Mizoguchi, M., Omotani, J., Takahashi, R., Kanehira, T., Shinohara, M. and Tokuyama, T. 1998. Newly isolated marine ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas* sp. TN0632. J. Ferment. Bioeng. 88: 406–409.

Nicolaisen, M. H. and Ramsing, N. B. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. J. Microbiol. Meth. 50: 189–203.

Nimrat, S., Sakanuchaichan, K., Chuersuwan, N. and Vuthiphandchai, V. 2005. Prevalence of *Vibrio* spp. in aquatic organism collection from natural environments and aquaculture systems. Burapha Science Journal. 10: 83–91.

Sangnoi, Y., Chankaew, S. and O-Thong, S. 2017. Indigenous halomonas spp., the potential nitrifying bacteria for saline ammonium waste water treatment. Pak. J. Bio. Sci. 20: 52–58.

Spotte, S. 1979. Seawater Aquariums: The Captive Environment. NewYork : John Wiley and Sons. 413 pp.

Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 846–849.

Strickland, J. D. H. and Parson, T. R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Canada: Fishery Research Board. 310 pp.

Su, J., Zhang, K., Huang, T., Wen, G., Guo, L. and Yang, S. 2015. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low nutrient conditions by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. SYF26. Microbiology. 161: 829–837.

Suantika, G., Aditiawati, P., Astuti, D. I. and Khotimah, Z. F. 2013. The Use of indigenous probiotic *Halomonas aquamarina* and *Shewanella algae* for white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone) hatchery productivity in zero water discharge system. J. Aquac. Res. Dev. 4: 1–8.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipsk,i A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30: 2725–2729.

Tchobanoglous, G., Burton, F. L. and Stensel, H. D. 2004. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, 4 edn., Metcalf and Eddy Inc., New York, McGraw Hill.

Tookwinas, S. 1996. Environmental impact assessment for intensive marine shrimp farming in Thailand. Coastal Aquaculture Division, Department of Fisheries, Bangkok.

Urakawa, H., Maki, H., Kawabata, S., Fujiwara, T., Ando, H., Kawai, T., Hiwatari, T., Kohata, K. and Watanabe, M. 2006. Abundance and population structure of ammonia-oxidizing bacteria that inhabit canal sediments receiving effluents from municipal wastewater treatment plants. Appl. Environ. Microbiol. 72: 6845–6850.

Wen, Y. and Wei, C. H. 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium isolated from anaerobic/anoxic/oxic treatment system. Afr. J. Biotechnol. 10: 6985–6990.

Wu, Y., Ke, X., Hernandez, M., Wang, B., Dumont, M. G., Jia, Z. and Conrad, R. 2013. Autotrophic growth of bacterial and archaeal ammonia oxidizers in freshwater sediment microcosms incubated at different temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 79: 3076–3084.

Yanagita, T. 1990. Nature Microbiology Communities: Ecological and Physiological Features. Tokyo Japan Scientific Societies Press, Japan. 485 p.

Yang, X. P., Wang, S. M., Zhang, D. W. and Zhou, L. X. 2011. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. Bioresour. Technol. 102: 854–862.

Yao, S., Ni, J., Ma, T. and Li, C. 2013. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. Bioresour. Technol. 139: 80–86.

Zhang, Q. L., Liu, Y., Ai, G. M., Miao, L. L., Zheng, H. Y. and Liu, Z. P. 2012. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. Bioresour. Technol. 108: 35–44.

Zheng, H. Y., Liu, Y., Gao, X. Y., Ai, Guo. M., Miao, L. L. and Liu, Z. P. 2012. Characterization of a marine origin aerobic nitrifying - denitrifying bacterium. J. Biosci. Bioeng.. 114: 33–37.

Ziembinska, A., Ciesielski, S. and Miksch, K. 2009. Ammonia oxidizing bacteria community in activated sludge monitored by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). J. Gen. Appl. Microbiol. 55: 373–380.

ภาคผนวก

สูตรอาหาร modified Pep-Beef-AOM (ดัดแปลงจาก Lu *et al.,* 2012)

- Peptone 5.0 กรัม
- Beef extract 3.0 กรัม
- $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 กรัม
- K_2HPO_4 0.75 กรัม
- NaH_2PO_4 0.25 กรัม
- $MgSO_4$ 0.03 กรัม
- $MnSO_4$ 0.01 กรัม
- Agar 15.0 กรัม
- Sodium citrate 17.8054 กรัม
- น้ำทะเลที่มีความเค็ม 20 พีพีที 1000 มิลลิลิตร

ตารางที่ 18 การคัดแยกและการทำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ที่ทำการทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนโตรเจน โดยวิธี Griess-Ilosvay method

Sample	3 day	6 day	9 day	12 day	15 day	18 day	21 day	24 day	28 day
Blank	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SKW1	-	-	-	-	+	+	++	++	++
SKW2	-	-	-	-	+	+	++	++	++
SKW3	-	-	-	-	+	+	++	++	++
SKS1	-	-	-	-	+	+	++	+++	++++
SKS2	-	-	-	-	+	+	++	++	+++
SKS3	-	-	-	-	+	+	+	+	+
water 1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
soil 1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
soil 1.2	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++

หมายเหตุ

- แปลความหมายว่า ไม่เกิดการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (ไม่มีการเกิดไนไตร์ทหรือไนเตรท)

+ แปลความหมายว่า เกิดการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (มีการเกิดไนไตร์ทหรือไนเตรท)

ตารางที่ 17 (ต่อ) การคัดแยกและการทำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ที่ทำการทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนโตรเจน โดยวิธี Griess-Ilosvay method

Sample	3 day	6 day	9 day	12 day	15 day	18 day	21 day	24 day	28 day
soil 1.3	-	-	+	+	++	++	++	++	++
water 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 2.2	-	-	-	-	-	-	+	+	+
water 2.3	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
soil 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
soil 2.2	-	-	-	-	+	+	+	+	+
soil 2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 3.3	-	-	-	-	-	-	-	+	+

<u>หมายเหตุ</u>

- แปลความหมายว่า ไม่เกิดการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (ไม่มีการเกิดไนไตร์ทหรือไนเตรท)

+ แปลความหมายว่า เกิดการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (มีการเกิดไนไตร์ทหรือไนเตรท)

ตารางที่ 17 (ต่อ) การคัดแยกและการทำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ที่ทำการทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนโตรเจน โดยวิธี Griess-Ilosvay method

Sample	3 day	6 day	9 day	12 day	15 day	18 day	21 day	24 day	28 day
soil 3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
soil 3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
soil 3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 4.1	-	-	-	+	+	+	+	++	++
water 4.2	-	-	-	+	+	+	+	+	++
water 4.3	-	-	-	++	++	++	++	++	++
soil 4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
soil 4.2	-	-	-	-	+	+	+	+	+
soil 4.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 5.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<u>หมายเหตุ</u>

- แปลความหมายว่า ไม่เกิดการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (ไม่มีการเกิดไนไตร์ทหรือไนเตรท)

+ แปลความหมายว่า เกิดการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (มีการเกิดไนไตร์ทหรือไนเตรท)

ตารางที่ 17 (ต่อ) การคัดแยกและการทำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ที่ทำการทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนโตรเจน โดยวิธี Griess-Ilosvay method

Sample	3 day	6 day	9 day	12 day	15 day	18 day	21 day	24 day	28 day
water 5.3	-	-	-	-	+	+	++	++	++
soil 5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
soil 5.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
soil 5.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 6.1	-	-	-	-	-	+	+	+	+
water 6.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water 6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
soil 6.1	-	-	-	+	+	+	+	+	+
soil 6.2	-	-	-	+	+	++	++	++	++
soil 6.3	-	-	-	+	+	+	+	+	+

<u>หมายเหตุ</u>

- แปลความหมายว่า ไม่เกิดการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (ไม่มีการเกิดไนไตร์ทหรือไนเตรท)

+ แปลความหมายว่า เกิดการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (มีการเกิดไนไตร์ทหรือไนเตรท)

ตารางที่ 17 (ต่อ) การคัดแยกและการทำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ที่ทำการทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนโตรเจน โดยวิธี Griess-Ilosvay method

Sample	3 day	6 day	9 day	12 day	15 day	18 day	21 day	24 day	28 day
water 7.1	-	-	-	-	+	+	++	++	++
water 7.2	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
water 7.3	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++
soil 7.1	-	-	-	+	+	+	+	++	++
soil 7.2	-	-	-	+	+	+	+	+	+
soil 7.3	-	-	-	+	+	+	+	+	+

<u>หมายเหตุ</u>

- แปลความหมายว่า ไม่เกิดการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (ไม่มีการเกิดไนไตร์ทหรือไนเตรท)

+ แปลความหมายว่า เกิดการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (มีการเกิดไนไตร์ทหรือไนเตรท)

ความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยศึกษาจากปัจจัยทางเคมีของน้ำ

1. การวิเคราะห์แอมโมเนียด้วยวิธี Colorimetric method (Strickland and Parson, 1972)

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนีย

- สารละลาย Phenol
  ละลาย 5 กรัม C_6H_5OH ใน 50 มิลลิลิตร 95 เปอร์เซ็นต์ ethyl alcohol
- สารละลาย sodiumnitroprusside
  ละลาย 0.5 กรัม $Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$ ในน้ำกลั่น De-ionized 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาในขวดสีชา
- สารละลาย alkaline
  ละลาย $C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$ 20 กรัม และ NaOH 1 กรัม ในน้ำกลั่น de-ionized 100 มิลลิลิตร
- สารละลาย hypochlorite
  ใช้ไฮเตอร์ที่มีความเข้มข้นของคลอไรด์มากกว่า 1.5 นอร์มอล์
- สารละลาย oxidizing
  นำสารละลาย alkaline และสารละลาย hypochlorite มาผสมกันในอัตราส่วน 4:1
- สารละลายแอมโมเนียมาตรฐาน
  ละลาย $(NH_4)_2SO_4$ (โดยผ่านการอบ 105-110 องศาเซลเซียส นาน 1-24 ชั่วโมง) 0.165 กรัม ในน้ำกลั่น de-ionized ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร สารละลายจะมีความเข้มข้น 35 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา
- น้ำทะเลเทียม
  ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น โดยมีความเค็มเท่ากับความเค็มจากตัวอย่าง

การวิเคราะห์แอมโมเนียจากตัวอย่างน้ำ

- ปิเปตตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เพื่อป้องกันการระเหยของแอมโมเนีย
- เติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย phenol เขย่าให้เข้ากัน
- เติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย sodiumnitroprusside และ 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย oxidizing
- ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

- นำ 5 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐานมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร
- ดูดสารละลายข้างต้นมา 5, 10, 20 และ 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลเทียม ส่วน blank ให้ใช้น้ำทะเลเทียม
- เติม 2.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย phenol เขย่าให้เข้ากัน
- เติม 2.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย sodiumnitroprusside และ 5 มิลลิลิตร ของสารละลาย oxidizing
- ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร
- จดบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับความเข้มข้นด้วยวิธี Linear regression

2. การวิเคราะห์ไนไตรท์ด้วยวิธี Colorimetric method (Strickland and Parson, 1972)

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนไตรท์

- สารละลาย sulfanilamide

ละลาย $C_6H_8N_2O_2S$ 5 กรัม ใน กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

- สารละลาย *N*-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride

ละลาย $C_{10}H_7NHCH_2NH_2.2HCl.CH_3OH$ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

- สารละลายไนไตรท์มาตรฐาน

ละลาย $NaNO_2$ (โดยผ่านการอบ 105-110 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง) 0.345 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร สารละลายจะมีความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาและแช่เย็น

การวิเคราะห์ไนไตรท์จากตัวอย่างน้ำ

- นำตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ 125 มิลลิลิตร
- เติมสารละลาย 1 มิลลิลิตร sulfanilamide ผสมและตั้งทิ้งไว้ 2-8 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

- เติม 1 มิลลิลิตร *N*-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride เขย่าตัวอย่างทันที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร
- สำหรับ blank ให้ใช้น้ำทะเลเทียมแทนตัวอย่างน้ำ และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับตัวอย่างน้ำ

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

- ดูดสารละลายไนไตรท์มาตรฐาน 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้น 0.70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร
- นำสารละลายข้างต้นมา 0.1, 0.5, 1 และ 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลเทียม ส่วน blank ให้ใช้น้ำทะเลเทียม
- เติมสารละลาย 1 มิลลิลิตร sulfanilamide ผสมและตั้งทิ้งไว้ 2-8 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
- เติม 1 มิลลิลิตร *N*-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride เขย่าตัวอย่างทันที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
- จดบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับความเข้มข้นด้วยวิธี Linear regression

3. การวิเคราะห์ไนเตรทด้วยวิธี Cadmium Reduction Column (Strickland and Parson, 1972)

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนเตรท

- สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น

ละลาย 125 กรัม NH_4Cl ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

- สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจาง

นำสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 2000 มิลลิลิตร

- สารละลาย sulfanilamide

  สามารถใช้สารร่วมกับการวิเคราะห์ไนไตรท์
- สารละลาย *N*-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride

  สามารถใช้สารร่วมกับการวิเคราะห์ไนไตรท์

- สารละลาย 2เปอร์เซ็นต์ (W/V) $CuSO_4.5H_2O$

  ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 10 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

- สารละลายไนเตรทมาตรฐาน

ละลาย KNO_3 (โดยผ่านการอบ 105-110 องศาเซลเซียส นาน 1-1.5 ชั่วโมง) 1.02 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร สารละลายจะมีความเข้มข้น 140 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

<u>การเตรียม Cadmium – copper column material</u>

- ชั่งโลหะแคดเมียม 50 กรัม ผสมกับสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) $CuSO_4.5H_2O$ 250 มิลลิลิตร กวนแคดเมียมจนกว่าสารละลายสีฟ้าจะเริ่มจางหายไปและเกิดตะกอนสีแดงอิฐ จากนั้นให้ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 8-12 ครั้ง

- อุดด้านในของคอลัมน์ด้วยใยแก้ว เติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจางให้เต็มคอลัมน์

- ทำการบรรจุแคดเมียมลงในคอลัมน์ ระวังอย่าให้แคดเมียมสัมผัสกับอากาศ และทำการล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจาง 4-5 ครั้ง

- เติมสารละลายไนเตรทมาตรฐาน 1.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร 100 มิลลิลิตร ปล่อยให้ผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 8-12 มิลลิลิตร/นาที เพื่อทำการ activated คอลัมน์ จากนั้นล้างด้วยสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจาง 3-4 ครั้ง

<u>การวิเคราะห์ไนเตรทจากตัวอย่างน้ำ</u>

- เติม 2 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียมเข้มข้น ลงในตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร

- นำ 5 มิลลิลิตร ของสารละลายตัวอย่างน้ำข้างต้นไปใส่ในคอลัมน์ และปล่อยผ่านสารละลาย โดยมีอัตราการไหลผ่าน 8-12 นาที ต่อ 100 มิลลิลิตร

- เติมสารละลายตัวอย่างน้ำลงในคอลัมน์ โดยปล่อยทิ้งสารละลาย 25 มิลลิลิตร ในช่วงแรก แล้วเก็บสารละลาย 50 มิลลิลิตร ในช่วงหลังเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อ

- เติม 1 มิลลิลิตร sulfanilamide ตั้งทิ้งไว้ 2-8 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

- เติม 1 มิลลิลิตร *N*-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride เขย่าทันที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง

- วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 543 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

- ดูดสารละลายไนเตรทมาตรฐาน 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร
- นำสารละลายข้างต้นมา 1, 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลเทียม ส่วน blank ให้ใช้น้ำทะเลเทียม เรียกสารละลายนี้ว่า working standard solution
- เติมสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น 2 มิลลิลิตร ใน working standard solution และ blank ที่จะนำมาผ่านคอลัมน์
- นำ working standard solution ไปผ่านคอลัมน์ที่มีอัตราการไหล 8-12 มิลลิลิตร ต่อนาที เติมสารละลาย 5-10 มิลลิลิตร ปล่อยสารละลายในคอลัมน์ทิ้งจนมีระดับเท่าเดิม แล้วจึงเติมสารละลาย working standard solution ที่เหลือลงในคอลัมน์ โดยปล่อยทิ้งสารละลาย 25 มิลลิลิตร ในช่วงแรก แล้วเก็บสารละลาย 50 มิลลิลิตร ในช่วงหลังเพื่อนำไปวิเคราะห์
- เติมสารละลาย 1 มิลลิลิตร sulfanilamide ผสมและตั้งทิ้งไว้ 2-8 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
- เติม 1 มิลลิลิตร *N*-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride เขย่าตัวอย่างทันที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร
- จดบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับความเข้มข้นด้วยวิธี Linear regression

ความเข้มข้นของไนเตรทหาได้จาก

ความเข้มข้นของไนเตรทที่ผ่านคอลัมน์ - ความเข้มข้นของไนไตรท์ของตัวอย่างน้ำเดียวกัน

ตารางที่ 19 ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

Sample	Ammonia				Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
	Intital (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Removal (mg-N/L)	Removal (%)		
SRNB1	871.70±8.25	147.51±2.22	724.19±10.46	83.08±0.41	0.08±0.01	0.00±0.00
SRNB8	871.70±8.25	97.84±4.13	773.86±7.15	88.78±0.43	0.14±4.17	0.00±0.00
SRNB9	871.70±8.25	106.24±16.68	765.46±21.02	87.81±1.95	0.14±0.02	0.00±0.00
SRNB10	833.40±14.64	210.68±16.98	622.72±8.91	74.69±2.46	0.01±0.00	0.00±0.00
SRNB11	833.40±14.64	190.67±13.53	642.73±7.72	77.10±1.92	0.03±0.00	0.00±0.00
SRNB12	833.40±14.64	274.43±3.54	558.97±11.20	67.00±6.19	0.10±0.00	0.00±0.00
SRNB14	833.40±14.64	404.40±10.93	429.01±7.07	51.48±0.67	0.11±0.00	0.00±0.00
SRNB16	833.40±14.64	325.08±9.65	508.32±24.17	60.97±1.84	0.09±0.05	0.00±0.00
SRNB17	816.70±21.43	247.58±4.13	569.13±25.45	69.66±1.31	0.48±0.00	0.00±0.00
SRNB18	912.47±9.72	429.43±8.20	483.04±2.60	52.94±0.43	0.85±0.01	0.00±0.00
SRNB19	816.70±21.43	116.13±3.62	700.58±25.03	85.76±1.06	0.11±0.01	0.00±0.00
SRNB20	912.47±9.72	395.33±9.79	517.14±0.43	56.68±0.61	0.21±0.01	0.00±0.00
SRNB21	816.70±21.43	173.15±6.65	643.55±20.27	78.72±11.36	0.12±0.03	0.00±0.00
SRNB22	912.47±9.72	356.54±14.88	555.93±5.79	60.93±1.23	0.01±0.02	0.00±0.00
SRNB23	816.70±21.43	67.46±6.29	749.24±16.82	91.75±0.61	0.05±0.01	0.00±0.00
SRNB24	912.47±9.72	291.80±2.50	620.67±7.75	68.05±4.74	0.10±0.02	0.00±0.00
SRNB27	912.47±9.72	363.70±6.87	548.77±15.74	60.11±8.75	0.26±0.02	0.00±0.00
SRNB28	816.70±21.43	94.88±3.85	721.82±23.94	88.34±2.81	0.26±0.03	0.00±0.00
SRNB29	816.70±21.43	155.41±3.42	661.29±19.57	80.97±0.42	0.32±0.03	0.00±0.00
SRNB30	816.70±21.43	171.72±7.99	644.98±18.59	78.97±0.83	0.22±0.03	0.00±0.00
SRNB31	871.70±8.25	378.37±19.44	493.33±26.93	56.58±2.61	0.13±0.02	0.00±0.00
SRNB32	871.70±8.25	393.30±27.01	478.40±20.72	54.90±2.77	0.06±0.01	0.00±0.00
SRNB33	871.70±8.25	300.20±11.93	571.50±3.71	65.57±1.04	0.13±0.03	0.00±0.00
SRNB35	871.70±8.25	76.59±1.86	795.11±7.42	91.21±0.18	0.20±0.01	0.00±0.00

ตารางที่ 19 (ต่อ) ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

Sample	Ammonia				Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
	Intital (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Removal (mg-N/L)	Removal (%)		
SRNB42	871.70±8.25	101.80±13.45	769.90±14.01	88.32±1.51	0.20±0.01	0.00±0.00
SRNB49	812.90±16.18	341.47±23.78	471.43±31.46	57.97±3.17	0.58±0.02	0.00±0.00
SRNB71	799.56±22.65	263.51±9.11	536.05±19.09	67.04±0.99	0.15±0.00	0.00±0.00
SRNB72	799.56±22.65	289.29±32.31	510.28±3.54	63.73±4.98	0.18±0.00	0.00±0.00
SRNB73	799.56±22.65	364.54±10.95	435.02±29.60	54.37±2.31	0.17±0.00	0.00±0.00
SRNB76	799.56±22.65	342.17±29.33	457.39±17.62	57.24±2.77	0.10±0.00	0.00±0.00
SRNB77	799.56±22.65	389.09±9.57	410.46±18.02	51.33±1.09	0.05±0.00	0.00±0.00
SRNB78	799.56±22.65	354.94±12.35	444.62±31.74	55.57±2.48	0.03±0.00	0.01±0.00
SRNB79	799.56±22.65	389.18±12.45	410.39±33.78	51.28±2.81	0.01±0.00	0.03±0.00
SRNB81	871.70±8.25	342.40±9.90	529.30±11.59	60.72±1.12	0.16±0.00	0.00±0.00
SRNB83	816.70±21.43	179.45±7.62	637.26±17.27	78.10±6.19	0.03±0.00	0.00±0.00
SRNB84	816.70±21.43	206.11±5.28	610.60±16.21	74.84±9.59	0.25±0.00	0.00±0.00
SRNB85	871.70±8.25	321.51±5.91	550.19±9.07	63.12±0.69	0.19±0.00	0.00±0.00
SRNB86	871.70±8.25	293.58±8.43	578.13±15.60	66.31±1.23	0.14±0.00	0.00±0.00
SRNB88	871.70±8.25	353.95±9.09	517.75±16.49	59.39±1.37	0.99±0.01	0.00±0.00
SRNB89	871.70±8.25	333.51±12.18	538.19±17.63	61.73±1.61	0.85±0.01	0.00±0.00
SRNB90	819.96±10.18	257.71±6.89	562.25±13.65	68.60±4.87	0.29±0.01	0.00±0.00
SRNB91	871.70±8.25	388.65±6.15	483.05±10.85	55.41±5.69	0.91±0.00	0.00±0.00
SRNB93	871.70±8.25	139.11±3.34	732.59±9.85	84.03±5.48	0.18±0.01	0.00±0.00
SRNB95	871.70±8.25	157.88±7.07	713.82±8.15	81.89±0.75	0.17±0.01	0.00±0.00
SRNB100	871.70±8.25	269.58±7.62	602.12±9.87	69.07±0.85	0.07±0.00	0.00±0.00
SRNB105	871.70±8.25	307.62±5.16	564.09±8.69	64.71±2.54	0.11±0.13	0.00±0.00
SRNB106	871.70±8.25	185.80±4.08	685.90±7.99	78.68±0.45	0.05±0.01	0.00±0.00

ขั้นตอนการสกัดDNA

ชุดสกัด DNA Genomic DNA Mini kit

- ทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย
- เติม 200 ไมโครลิตร lysozyme (20มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แล้ว vortex บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ในระหว่างการบ่มให้ทำการกลับ microtube ไปมาทุก 2-3 นาที
- เติม 20 ไมโครลิตร Proteinase K (10มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แล้วบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 5-10 นาที
- เติม 200 ไมโครลิตร GB buffer นำไป vortex บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะใส (บ่มสารละลาย elution สำหรับใช้ในการตกตะกอน DNA 200 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่าง ที่ 70 องศาเซลเซียส)
- เติม 200 ไมโครลิตร absolute ethanol แล้วนำไป vortex 10 วินาที
- วาง GD column ลงใน collection tube
- ย้ายตัวอย่างใส่ลงใน collection tube ทำการ centrifuge 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- ย้าย GD column วางลงใน collection tube ใหม่
- เติม 400 ไมโครลิตร สารละลาย W1 buffer ใน GD column centrifuge 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที และทิ้งสารละลายใน collection tube
- เติม 600 ไมโครลิตร สารละลาย Wash buffer ใน GD column centrifuge 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที และทิ้งสารละลายใน collection tube
- Centrifuge 12,000 รอบต่อนาที 3 นาที เพื่อทำให้ GD column แห้ง
- ย้าย GD column ลงใน 1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube
- เติม 100 ไมโครลิตร ของสารละลาย elution ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที centrifuge 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที
- ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 1เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ที่ 100 โวลล์ เป็นเวลา 45 นาที

ขั้นตอนการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR Material

- H_2O 18 ไมโครลิตร
- Master mix (Gene direx) 5 ไมโครลิตร
- Primer 27F (25พิโคโมล/ไมโครลิตร) 0.5 ไมโครลิตร
- Primer 1492R (25พิโคโมล/ไมโครลิตร) 0.5 ไมโครลิตร
- DNA Template 1 ไมโครลิตร

PCR condition

- Innitial denature	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	
- Denaturing	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	30 รอบ
- Annealing	54 องศาเซลเซียส	40 วินาที	
- Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
- Extension II	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
- Hold	4 องศาเซลเซียส	infinity	

- ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 1 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ที่ 80 โวลล์ เป็นเวลา 45 นาที

ขั้นตอนการทำ Pure PCR

PCR GenepHlowTM Gel/PCR kit Protocol

- เติมน้ำกลั่นปราศจาก DNA ลงใน PCR Product ให้มีปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร แล้วจึงถ่ายสารละลายไปยังหลอด 1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube
- เติม 500 ไมโครลิตร ของสารละลาย Gel/PCR buffer แล้ว vortex หากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงให้เติม 10 ไมโครลิตร ของ 3 โมล sodium acetate เพื่อให้สารละลายกลับเป็นสีเหลือง
- วาง GDF Column ใน collection tube แล้วจึงถ่ายตัวอย่างทั้งหมดจาก microtube ลงใน GDF Column ทำการ centrifuge 14,000 รอบต่อนาที 30 วินาที แล้วทิ้งสารละลายใน collection tube
- เติม 600 ไมโครลิตร ของ Wash buffer (ที่ผ่านการเติม absolute ethanol แล้ว) ใน GDF Column โดยตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้น centrifuge 14,000 รอบต่อนาที 30 วินาที ทิ้งสารละลายใน collection tube และ centrifuge ต่ออีก 3 นาทีเพื่อทำให้ GDF Column แห้ง
- ย้าย GDF Column ลงใน 1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube เติม 30 ไมโครลิตร ของ elution buffer ตั้งทิ้งไว้ 2 นาทีแล้ว centrifuge 14,000 รอบต่อนาที 30 วินาที
- ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 1เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ที่ 80 โวลล์ เป็นเวลา 45 นาที

คุณภาพน้ำบางประการจากการทดสอบประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ตารางที่ 20 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน*

Day	Control	SRNB23	SRNB35	Mixed	SKNB4
0	8.12±0.02	8.12±0.01	8.12±0.01	8.12±0.01	8.12±0.02
1	7.85±0.16	8.05±0.02	7.93±0.04	8.02±0.03	7.97±0.06
2	7.80±0.08	7.84±0.05	7.83±0.09	7.84±0.07	7.85±0.02
3	7.65±0.16	7.73±0.06	7.75±0.16	7.80±0.07	7.72±0.04
4	7.51±0.19	7.61±0.06	7.59±0.22	7.64±0.09	7.73±0.08
5	7.31±0.17	7.39±0.10	7.45±0.20	7.48±0.08	7.58±0.14
6	7.07±0.19	7.15±0.10	7.19±0.28	7.18±0.09	7.28±0.15
7	6.86±0.10	6.91±0.11	6.96±0.23	6.99±0.10	6.77±0.58
8	7.22±0.09	7.27±0.09	7.25±0.15	7.29±0.06	7.33±0.06
9	7.15±0.10	7.21±0.11	7.16±0.22	7.18±0.10	7.29±0.08
10	6.86±0.06	6.93±0.12	6.90±0.18	6.90±0.11	6.97±0.12
11	6.78±0.05	6.88±0.12	6.79±0.19	6.78±0.13	6.89±0.09
12	6.70±0.09	6.84±0.13	6.68±0.15	6.73±0.13	6.79±0.01
13	6.64±0.06	6.76±0.10	6.62±0.14	6.67±0.12	6.71±0.05
14	6.62±0.07	6.64±0.17	6.40±0.36	6.58±0.10	6.58±0.05

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน*

Day	Control	SRNB23	SRNB35	Mixed	SKNB4
0	6.55±0.28	6.66±0.02	6.62±0.03	6.63±0.09	6.68±0.03
1	6.39±0.84	6.69±0.04	6.53±0.11	6.67±0.06	6.51±0.20
2	6.66±0.11	6.61±0.26	6.48±0.24	6.75±0.06	6.77±0.06
3	6.61±0.09	6.71±0.08	6.44±0.14	6.72±0.06	6.50±0.15
4	6.76±0.17	6.78±0.18	6.57±0.09	6.52±0.08	6.64±0.12
5	6.89±0.33	6.70±0.06	6.46±0.21	6.56±0.06	6.52±0.14
6	6.84±0.19	6.69±0.17	6.46±0.06	6.51±0.11	6.43±0.09
7	6.64±0.20	6.45±0.09	6.47±0.16	6.45±0.18	6.04±0.56
8	6.79±0.27	6.65±0.18	6.47±0.06	6.35±0.28	6.51±0.10
9	6.63±0.13	6.60±0.12	6.32±0.14	6.43±0.07	6.50±0.08
10	6.67±0.42	6.52±0.26	6.40±0.35	6.34±0.04	6.32±0.17
11	6.75±0.48	6.60±0.13	6.29±0.20	6.35±0.19	6.32±0.18
12	6.62±0.21	6.42±0.29	6.32±0.09	6.23±0.14	6.36±0.06
13	6.52±0.24	6.38±0.17	6.16±0.14	6.38±0.13	6.52±0.26
14	6.55±0.17	6.45±0.11	6.36±0.12	6.55±0.10	6.47±0.12

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน *

Day	Control	SRNB23	SRNB35	Mixed	SKNB4
0	28.50±0.26	28.53±0.06	29.07±0.21	29.13±0.25	29.10±0.10
1	28.63±0.29	28.53±0.25	29.07±0.21	29.30±0.26	29.20±0.10
2	28.50±0.17	28.70±0.10	29.03±0.12	29.13±0.06	29.13±0.06
3	28.13±0.12	28.17±0.06	28.67±0.15	28.77±0.38	28.60±0.20
4	27.40±0.00	27.37±0.06	27.83±0.25	27.90±0.35	27.73±0.12
5	27.37±0.06	27.27±0.06	27.80±0.26	27.83±0.40	27.77±0.06
6	27.53±0.06	27.60±0.20	27.97±0.25	28.03±0.32	27.87±0.06
7	29.27±0.06	29.13±0.15	29.53±0.15	29.80±0.26	29.73±0.06
8	29.17±0.06	29.10±0.10	29.53±0.25	29.63±0.23	29.73±0.06
9	28.00±0.00	27.97±0.12	28.77±0.60	28.60±0.26	28.60±0.10
10	28.17±0.06	27.97±0.12	28.60±0.30	28.80±0.17	28.70±0.00
11	28.33±0.06	28.23±0.15	28.77±0.31	28.90±0.26	28.70±0.10
12	29.27±0.06	28.80±0.70	29.63±0.25	29.80±0.26	29.60±0.10
13	28.63±0.06	28.60±0.10	29.03±0.25	28.97±0.12	28.77±0.06
14	28.43±0.06	28.43±0.12	28.47±0.15	28.67±0.15	28.60±0.10

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 23 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน *

Day	Control	SRNB23	SRNB35	Mixed	SKNB4
0	461.90±1.49	467.13±4.19	464.82±2.46	467.98±0.41	463.79±4.03
1	464.10±14.06	403.24±5.76	395.12±1.90	446.04±54.03	431.99±15.96
2	407.24±35.46	391.20±12.26	330.29±6.48	388.37±18.49	402.01±3.02
3	400.18±13.61	377.80±3.04	315.22±14.94	312.88±27.58	383.82±12.54
4	398.71±4.77	347.86±4.52	311.33±17.91	299.53±12.85	362.33±14.53
5	403.32±34.16	317.86±16.36	328.98±21.74	268.42±6.64	331.45±37.06
6	391.97±10.74	301.49±11.13	308.51±5.90	252.95±8.28	316.82±7.76
7	388.94±33.00	274.82±12.02	299.88±9.58	246.04±19.26	300.47±2.78
8	432.81±5.65	354.47±26.54	329.19±98.54	331.4±12.71	381.77±34.08
9	393.90±33.33	336.87±12.51	326.20±8.72	309.49±13.13	360.38±18.39
10	373.56±7.91	318.16±25.88	265.10±8.41	275.96±13.63	276.45±38.66
11	370.67±64.04	302.07±10.87	246.27±37.06	211.25±2.98	232.64±18.27
12	362.49±7.65	210.00±7.40	210.58±6.96	207.74±1.68	209.08±7.42
13	370.37±63.91	205.19±5.26	205.27±6.45	184.37±28.03	206.86±5.17
14	353.73±37.64	203.30±4.91	197.87±13.15	172.81±32.16	202.38±5.98

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์ในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน *

Day	Control	SRNB23	SRNB35	Mixed	SKNB4
0	0.15±0.01	0.15±0.01	0.14±0.00	0.15±0.02	0.15±0.01
1	0.16±0.02	0.16±0.03	0.14±0.01	0.17±0.05	0.15±0.01
2	0.18±0.01	0.15±0.00	0.17±0.02	0.17±0.03	0.18±0.01
3	0.18±0.01	0.14±0.02	0.17±0.01	0.17±0.02	0.16±0.00
4	0.18±0.01	0.18±0.01	0.20±0.01	0.20±0.05	0.18±0.01
5	0.18±0.01	0.15±0.01	0.19±0.02	0.20±0.06	0.17±0.01
6	0.18±0.01	0.16±0.01	0.19±0.01	0.23±0.09	0.18±0.01
7	0.18±0.01	0.17±0.01	0.19±0.02	0.25±0.11	0.18±0
8	0.19±0.00	0.17±0.01	0.17±0.01	0.28±0.18	0.16±0.01
9	0.19±0.00	0.17±0.01	0.17±0.02	0.28±0.18	0.16±0.01
10	0.2±0.00	0.18±0.01	0.17±0.02	0.28±0.18	0.17±0.01
11	0.19±0.00	0.17±0.01	0.16±0.02	0.28±0.18	0.16±0.01
12	0.17±0.02	0.14±0.01	0.12±0.02	0.33±0.11	0.12±0.02
13	0.17±0.03	0.13±0.01	0.11±0.03	0.33±0.11	0.10±0.02
14	0.16±0.03	0.12±0.00	0.09±0.02	0.40±0.03	0.10±0.02

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการทดลองระยะเวลา 14 วัน*

Day	Control	SRNB23	SRNB35	Mixed	SKNB4
0	0.13±0.00	0.13±0.01	0.14±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01
1	0.12±0.02	0.12±0.06	0.13±0.01	0.11±0.01	0.15±0.02
2	0.11±0.01	0.13±0.01	0.11±0.02	0.10±0.01	0.15±0.02
3	0.11±0.00	0.13±0.01	0.13±0.04	0.10±0.00	0.12±0.01
4	0.10±0.00	0.10±0.01	0.09±0.02	0.12±0.01	0.12±0.01
5	0.11±0.00	0.14±0.01	0.13±0.03	0.13±0.02	0.15±0.01
6	0.11±0.00	0.11±0.01	0.1±0.02	0.12±0.01	0.11±0.01
7	0.11±0.00	0.11±0.01	0.1±0.03	0.13±0.02	0.11±0.01
8	0.10±0.00	0.09±0.01	0.13±0.02	0.16±0.14	0.11±0.01
9	0.10±0.00	0.11±0.00	0.09±0.01	0.16±0.08	0.12±0.01
10	0.10±0.00	0.12±0.00	0.14±0.03	0.14±0.00	0.15±0.01
11	0.10±0.00	0.08±0.00	0.09±0.01	0.17±0.08	0.11±0.01
12	0.12±0.01	0.10±0.00	0.12±0.03	0.16±0.04	0.13±0.02
13	0.11±0.02	0.11±0.00	0.12±0.02	0.17±0.02	0.13±0.01
14	0.12±0.02	0.10±0.00	0.12±0.03	0.12±0.00	0.14±0.01

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุนิภา จันทร์แก้ว

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5510620037

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วาริชศาสตร์)	มหาวิทยาลังสงขลานครินทร์	2555

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนเชื่อมโยงผลิตบัณฑิตศึกษา เงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีงบประมาณ 2557

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Chankaew, S., O-Thong, S. and Sangnoi, Y. 2016. *Halomonas* sp. SKNB4, a proficient ammonium oxidizing bacterium. Proceedings of the 3rd National Meeting on Biodiversity Management in Thailand, June 15-17, 2016 The Impress Nan Hotel, Nan province, Thailand. 187–192.

Chankaew, S., O-Thong, S. and Sangnoi, Y. 2017. Nitrogen removal efficiency of salt-tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. Chiang Mai J. Sci. 44:1–10 (*In press*).

Sangnoi, Y., **Chankaew, S.** and O-Thong, S. 2017. Indigenous *Halomonas* spp., the potential nitrifying bacteria for saline ammonium waste water treatment. Pak. J. Bio. Sci. 20: 52–58.